

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

**MEME KANSERİ HASTALARINDA TWIST, RAR β 2 ve ESR1
GENLERİNİN METİLASYON DURUMLARININ METİLASYON
SPESİFİK HRM (MS-HRM) YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

ONUR EROĞLU

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. BEYHAN DURAK ARAS

AĞUSTOS 2011

Proje No: 201011037

KABUL ve ONAY SAYFASI

Onur EROĞLU'nun Doktora tezi olarak hazırladığı "Meme Kanseri Hastalarında TWIST, RAR β 2 ve ESR1 Genlerinin Metilasyon Durumlarının Metilasyon Spesifik HRM (MS-HRM) Yöntemiyle İncelenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih: 12.08.2011

Üye: Prof. Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Prof. Dr. Dilek AKTAŞ



Üye: Prof. Dr. Serap IŞIKSOY



Üye: Yrd. Doç. Dr. Muhsin ÖZDEMİR



Üye: Yrd. Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS (Danışman)



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16./08/2011 tarih ve 884.../4087 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser tipi iken, erkeklerde oldukça nadirdir. Kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturur. Akciğer ve kolorektal kanserden sonra üçüncü sırayı alırken, 40-44 yaş arasında kansere bağlı ölümlerde birinci sıradadır.

Epigenetik mekanizmalardan biri olan metilasyon, DNA düzeyinde herhangi bir mutasyon olmamasına rağmen ilgili genin ifade bulmasını engelleyen bir mekanizmadır.

Bu çalışmada Metilasyon spesifik HRM (MS-HRM) tekniğiyle meme kanseri ile ilişkilendirilmiş 3 genin (TWIST, RAR β 2 ve ESR1) promoter metilasyon paternlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Kliniğinden meme kanseri tanısı almış 80 hastanın doku örnekleri dâhil edilmiştir. Örnekler Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda parafinize doku örneğinin tümör bölümünden hazırlanan 10 μ 'luk 10'ar kesitler halinde ependorf içerisinde laboratuvarımıza gelmiştir. Örnekler deparafinizasyon işleminin ardından DNA izolasyonu yapıp, bisülfıt modifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Modifiye edilen örneklerin metilasyon paternlerinin HRM tekniği ile belirlenmesi için Light cycler 480 cihazında analiz gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada TWIST geninde olguların %25'inde, RAR β 2 geninde olguların %88,75'inde ve ESR1 geninde ise %72,5'inde promoter hipermetilasyonu saptanmış olup metilasyon oranları değişkendir. Bu sonuçlar ile olguların prognostik faktörlerine bakıldığı zaman TWIST geni metilasyonu ile tümörün evresi ve olgu yaşı ile anlamlı bir ilişki bulunmamış. Lenf nodu(+)'liği, ER(+)'liği, PR(-)'liği ve HER2/NEU(-)'liği ile anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Retinoikasıit reseptör β 2 (RAR β 2) ve östrojen reseptör1 (ESR1) geni yaş, tümörün evresi ve PR durumu ile anlamsız iken, lenf nodu(+)'liği, ER(+)'liği ve HER2/NEU(-)'liği ile anlamlı bulunmuştur.

Sonuç olarak metilasyonun tümör gelişiminde kanser için bir nevi zemin hazırladığı, kanserin prognoz ve yayılım hızına etki ettiği yönündedir. Bu bağlamda, tümör klasifikasyonu, hastalığın prognozu, tedavi protokollerinin düzenlenmesi, tedaviye yanıtın kontrolü ve kanserden korunma yolları konularına ışık tutulabilir.

Anahtar Sözcükler: Meme Kanseri, Metilasyon, MS-HRM

SUMMARY

Breast cancer is the most common cancer in women, although very rare in men. Breast cancer constitutes approximately 30% of all cancers in women. After lung and colorectal cancer as occupying the third place, it ranks first in cancer-related deaths between the ages of 40-44.

Methylation is one of the epigenetic mechanisms; although no mutations at the DNA level, it is a mechanism that prevents the gene expression.

In this study, the promoter methylation patterns of 3 genes (TWIST, RAR β 2 and ESR1) which are associated with breast cancer were investigated by technique of MS-HRM. To our research, tissue samples of 80 patients with a diagnosis of breast cancer from Eskisehir Osmangazi University medical faculty of Oncology Clinic were included. Tumor tissue samples which were embedded in parafin blocks as 10 sections of 10 microns thick and in eppendorf tubes were taken from Eskisehir Osmangazi University of medical faculty of Pathology department.

After deparafinization and the isolation of the DNA from samples they were taken to the bisulfite modification process. To analyze the methylation status of the modified samples, Light Cycler 480 instrument was used.

In this study the promoter hypermethylation status were observed at different rates; TWIST gene with 25% of the cases, RAR β 2 gene with 88.75% and the ESR1 gene with 72.5%. With these results when the prognostic factors of the patients were analyzed, tumor stage and age were found to be meaningless with the hypermethylation of TWIST gene but found to be significant with lymph node positivity, ER positivity, PR negativity, and HER2/NEU negativity. While RAR β 2 and ESR1 genes were meaningless with age, tumor stage and PR status, the lymph node positivity, ER positivity, and HER2/NEU negativity were significant.

To conclude with, methylation is one of tumor predisposing to the development of cancer and effects the cancer prognosis and the speed of propagation. In this context, the tumor classification, prognosis, treatment protocols, regulation and response to treatment may be light on ways to control and prevention of cancer.

Key Words: Breast Cancer, Methylation, MS-HRM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO DİZİNİ	xi
ŞEKİL DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Meme Kanseri Biyolojisi	3
2.2.1. Normal Gelişim	3
2.2.2. Hormonlar ve Reseptörleri	4
2.3. Kanser Gelişimiyle İlişkili Genler	5
2.3.1. Onkogenler	5
2.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler	6
2.4. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi	7
2.5. Meme Kanserinin Patolojisi	9
2.6. Evrelendirme ve Prognoz	12
2.6.1. Prognostik Faktörler	12
2.6.2. İmmunohistokimyasal Belirleyiciler	16
2.6.2.1. BRCA-1	16
2.6.2.2. BRCA-2	16
2.6.2.3. Cyclooxygenase-2 (Cox-2)	17
2.6.2.4. P53	19
2.6.2.5. Ki-67	20
2.6.2.6. C-ERB B-2 (HER2/NEU)	20
2.6.2.7. Östrojen ve Progesteron Reseptörleri	21
2.7. Epigenetik Mekanizmalar	22

2.7.1. Histon Modifikasyonları	22
2.7.2. RNA Aracılı Gen Susturulması	23
2.7.3. DNA Metilasyonu	23
2.7.3.1. CpG Adacıkları	25
2.7.3.2. Kanserde Metilasyon Profili	25
2.7.3.3. DNA Metilasyonu Aracılığıyla Transkripsiyonun Baskılanma Mekanizmaları	26
2.7.3.4. DNA Metilasyonunun Kansere Gelişiminde Etkilediği Mekanizmalar	27
2.8. Meme Kanserinde Metilasyon Değişikliği Görülen Bazı Genler	29
2.8.1. Retinoik Asit Reseptörü β	29
2.8.1.1. Retinoidlerin Gen Regülasyonundaki Görevleri	30
2.8.2. TWIST	32
2.8.3. Östrojen Reseptör Proteini Alfanın (ESR α) Yapısı	32
2.8.3.1. ESR α 'nın Aktivasyonu	34
2.8.3.2. Östrojen Reseptör Geni	35
2.9. Kuantitatif Real-Time PCR Yöntemi	36
2.9.1. Kuantitatif Real-Time PCR metodları	36
2.9.2. Real-Time PCR için kullanılan problemler	37
2.10. High Resolution Melting (HRM) Analizi	39
2.10.1. Denatürasyon Eğrisi (HRM Eğrisi)	41
2.10.2. Denatürasyon Eğrisi Analizi	42
2.10.3. Normalize ve Türev Eğriler	44
2.10.4. Çift Zincirli DNA'ya Bağlanma Özelliği Olan Floresan Boyalar	45
2.11. Methylation Specific High Resolution Melting (MS-HRM)	47
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	49
3.1. Hasta Grubu	49
3.2. Gereçler	49
3.2.1. Kullanılan aletler	49
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	50
3.2.3. Kullanılan Primerler	50

3.3. Yöntemler	52
3.3.1. Parafinli Doku Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	52
3.3.1.1. Deparafinizasyon İşlemi	52
3.3.1.2. DNA İzolasyonu	53
3.3.2. Bisüfit Modifikasyon İşleminin Gerçekleştirilmesi	53
3.3.3. MS-HRM Cihazına Yükleme	55
3.3.4. LightCycler 480 Cihazındaki PCR Şartları	57
3.3.5. Değerlendirme	58
3.3.6. İstatistiksel Analiz	58
4. BULGULAR	59
4.1. Olguların Demografik ve Patolojik Özellikleri	59
4.2. TWIST Geninde Saptanan Bulgular	61
4.2.1. TWIST Geninde Çalışma Grubuna Ait Bulgular	63
4.2.2. Olguların Yaşları, Evreleri, Lenf nodu metastazları, ER, PR ve HER2/NEU Durumlarının TWIST Geni ile İlişkisi	67
4.2.2.1. Olguların Yaşı ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	67
4.2.2.2. Tümörün Tipi ile TWIST Geni Promoter Metilasyonu İlişkisi	67
4.2.2.3. Tümörün Evresi ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	69
4.2.2.4. Lenf Nodu Metastazı ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	70
4.2.2.5. Östrojen Reseptör ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	71
4.2.2.6. Progesteron Reseptör ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	71
4.2.2.7. HER2/NEU ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	72
4.3. Retinoik Asit Reseptör Beta2 (RAR β 2) Geninde Saptanan Bulgular	73
4.3.1. Retinoik Asit Reseptör Beta2 (RAR β 2) Geninde Çalışma Grubuna Ait Bulgular	74

4.3.2. Olguların Yaşları, Evreleri, Lenf nodu metastazları, ER, PR ve HER2/NEU Durumlarının RAR β 2 Geni ile İlişkisi	79
4.3.2.1. Olguların Yaşı ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	79
4.3.2.2. Tümörün Tipi ile RAR β 2 Geni Promoter Metilasyonu İlişkisi	79
4.3.2.3. Tümörün Evresi ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	80
4.3.2.4. Lenf Nodu Metastazı ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	82
4.3.2.5. Östrojen Reseptör ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	83
4.3.2.6. Progesteron Reseptör ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	83
4.3.2.7. HER2/NEU ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	84
4.4. Östrojen Reseptör1 (ESR1) Geninde Saptanan Bulgular	85
4.4.1. Östrojen Reseptör1 (ESR1) Geninde Çalışma Grubuna Ait Bulgular	87
4.4.2. Olguların Yaşları, Evreleri, Lenf nodu metastazları, ER, PR ve HER2/NEU Durumlarının ESR1 Geni ile İlişkisi	92
4.4.2.1. Olguların Yaşı ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	92
4.4.2.2. Tümörün Tipi ile ESR1 Geni Promoter Metilasyonu İlişkisi	93
4.4.2.3. Tümörün Evresi ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	93
4.4.2.4. Lenf Nodu Metastazı ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	95
4.4.2.5. Östrojen Reseptör ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	96

4.4.2.6. Progesteron Reseptör ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	96
4.4.2.7. HER2/NEU ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	97
5. TARTIŞMA	98
5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması	99
5.1.1. Meme Kanserli Olgularda TWIST geni Metilasyonunun Literatürdeki Diğer Çalışmalar ile Karşılaştırılması	99
5.1.2. Meme Kanserli Olgularda TWIST Geni Metilasyonunun Prognostik Faktörlerle Birlikte Değerlendirilmesi	101
5.1.3. Meme Kanserli Olgularda RAR β 2 geni Metilasyonunun Literatürdeki Diğer Çalışmalar ile Karşılaştırılması	102
5.1.4. Meme Kanserli Olgularda RAR β 2 Geni Metilasyonunun Prognostik Faktörlerle Birlikte Değerlendirilmesi	105
5.1.5. Meme Kanserli Olgularda ESR1 geni Metilasyonunun Literatürdeki Diğer Çalışmalar ile Karşılaştırılması	106
5.1.6. Meme Kanserli Olgularda ESR1 Geni Metilasyonunun Prognostik Faktörlerle Birlikte Değerlendirilmesi	108
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	112
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	114
EKLER DİZİNİ	131
EK-1 Meme Karsinomunda TNM Sınıflaması (WHO 2003)	131
EK-2 Meme karsinomlarında TNM evreleme sistemi	134
EK-3 Tüm olguların prognostik faktörleri ve çalışılan genlerin metilasyon oranları	135
EK-4 Genlerin metilasyon oranlarının prognostik faktörlere göre dağılımı	138
EK-5 Çalışılan genlerin evrelerde metile ve unmetile durumları	139
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Meme tümörlerinin histopatolojik sınıflaması	10
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primer dizileri	51
Tablo 3.2. Metilasyon yüzdelerini saptamak için kullanılan kontrollerin hazırlanışı	56
Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların klinik özellikleri	60
Tablo 4.2. TWIST geni metilasyon oranları	66
Tablo 4.3. Olguların Yaşı ile TWIST geni metilasyon oranları	67
Tablo 4.4. Olguların Tümör tipi ve TWIST geni metilasyon durumlarının Dağılımı	68
Tablo 4.5. Metile olan invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom olgularının dağılımı	68
Tablo 4.6. Olguların tümör evresi ve TWIST geni promoter metilasyon durumlarının dağılımı	69
Tablo 4.7. Metile olan evreII, evreIII ve evreIV olgularının dağılımı	70
Tablo 4.8. Metile olan lenf nodu(+) ve lenf nodu(-) olan olguların dağılımı	70
Tablo 4.9. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı	71
Tablo 4.10. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı	72
Tablo 4.11. Metile olan HER2/NEU(+) ve HER2/NEU(-) olan olguların dağılımı	72
Tablo 4.12. RAR β 2 geni metilasyon oranları	78
Tablo 4.13. Olguların Yaşı ve RAR β 2 Geni Promoter Metilasyonu dağılımı	79
Tablo 4.14. Olguların tümör tipi ve RAR β 2 geni promoter metilasyon durumu dağılımı	80
Tablo 4.15. Metile olan invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom olgularının dağılımı	80
Tablo 4.16. Olguların tümör evresi ve RAR β 2 geni promoter metilasyon durumu dağılımı	81
Tablo 4.17. Metile olan evreII, evreIII ve evreIV olan olguların dağılımı	82
Tablo 4.18. Metile olan lenf nodu(+) ve lenf nodu(-) olan olguların dağılımı	82

Tablo 4.19. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı	83
Tablo 4.20. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı	83
Tablo 4.21. Metile olan HER2/NEU(+) ve HER2/NEU(-) olan olguların dağılımı	84
Tablo 4.22. ESR1 geni metilasyon oranları	91
Tablo 4.23. Olguların yaşı ve ESR1 geni promoter metilasyon durumu dağılımı	92
Tablo 4.24. Olguların tümör tipi ve ESR1 geni promoter metilasyon durumu dağılımı	93
Tablo 4.25. Metile olan invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom olgularının dağılımı	93
Tablo 4.26. Olguların tümör evresi ve ESR1 geni promoter metilasyon durumu dağılımı	94
Tablo 4.27. Metile olan evreII, evreIII ve evreIV olan olguların dağılımı	95
Tablo 4.28. Metile olan lenf nodu(+) ve lenf nodu(-) olan olguların dağılımı	95
Tablo 4.29. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı	96
Tablo 4.30. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı	97
Tablo 4.31. Metile olan HER2/NEU(+) ve HER2/NEU(-) olan olguların dağılımı	97
Tablo 5.1. Çalışılan genlerin literatür bilgileriyle karşılaştırılması	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-metilsitozin mutagenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi	24
Şekil 2.2. Kanserde metilasyon görünümü	26
Şekil 2.3. Sitozin metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel susturulma mekanizmalar	27
Şekil 2.4. Onkogeneizde, sitozin metilasyonunun neden olduğu mekanizmalar	29
Şekil 2.5. RAR'ın aktivasyon mekanizması	31
Şekil 2.6. İnsan Östrojen reseptör α (ESR α) proteininin işlevsel bölgeleri. AF-1; Aktivasyon işlevi 1, AF- 2; Aktivasyon işlevi 2	33
Şekil 2.7. İnsan östrojen reseptör α geni intron ve ekson bölgeleri	35
Şekil.2.8. Denatürasyon eğrisi analizi	42
Şekil 2.9. Heterozigot örneğin denatürasyon analizi	43
Şekil 2.10. Tm derecesi ve denatürasyon fazı	45
Şekil 2.11. Boya doygunluk modeli	46
Şekil 3.1. TWIST, RAR β 2 ve ESR1 genlerinin MS-HRM analizi için PCR şartları görüntüsü	57
Şekil 4.1. Araştırma grubuna dahil edilen TWIST genine ait tüm örnekler ve kontrol gruplarının “Difference plot” görüntüsü	61
Şekil 4.2. Araştırma grubuna dahil edilen TWIST genine ait tüm örneklerin ve kontrol gruplarına ait pikler erime eğrisi görüntüsü	62
Şekil 4.3. TWIST genine ait kontrol grubunun pikleri görüntüsü	63
Şekil 4.4. TWIST geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %75 oranında metile olan bir olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	64
Şekil 4.5. TWIST geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen unmetile olan bir olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	64
Şekil 4.6. TWIST geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen unmetile olan bir olgunun “Tm calling” analiz görüntüsü	65

Şekil 4.7. Araştırma grubuna dahil edilen RAR β 2 genine ait tüm örnekler ve kontrol gruplarının “Difference plot” görüntüsü	73
Şekil 4.8. Araştırma grubuna dahil edilen RAR β 2 genine ait tüm örneklerin ve kontrol gruplarına ait pikler erime eğrisi görüntüsü	74
Şekil 4.9. RAR β 2 genine ait kontrol grubunun pikleri “Difference plot” görüntüsü	74
Şekil 4.10. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen unmetile olan iki olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	75
Şekil 4.11. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %25’den daha düşük oranda metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	75
Şekil 4.12. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %25 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	76
Şekil 4.13. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %50 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	76
Şekil 4.14. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %75 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	77
Şekil 4.15. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %100 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	77
Şekil 4.16. Araştırma grubuna dahil edilen ESR1 genine ait tüm örnekler ve kontrol gruplarının “Difference plot” görüntüsü	85
Şekil 4.17. Araştırma grubuna dahil edilen ESR1 genine ait tüm örneklerin ve kontrol gruplarına ait pikler erime eğrisi görüntüsü	86
Şekil 4.18. ESR1 genine ait kontrol grubunun pikleri “Difference plot” üzerindeki görüntüsü	87

Şekil 4.19. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen unmetile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	88
Şekil 4.20. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %25’den daha düşük oranda metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	88
Şekil 4.21. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %25 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	89
Şekil 4.22. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %50 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	89
Şekil 4.23. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %75 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	90
Şekil 4.24. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %100 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü	90

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A	: Adenin bazı
ATRA	: All-Trans Retinoik Asit
Bç	: Baz çifti
BRCA1	: Breast cancer 1
BRCA2	: Breast cancer 2
C	: Sitozin bazı
cAMP	: Siklik AMP
C-erbB-2 (HER2/neu)	: Human Epidermal growth factor Receptor 2
Cox-2	: Cyclooxygenase-2
Cp	: Crossing points
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNMT1	: DNA metiltransferaz 1
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
ER	: Östrojen reseptörü
ER α	: Östrojen reseptörü α
ER β	: Östrojen reseptörü β
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FRET	: Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	: Guanin bazı
HA	: Heterodupleks Analiz
HAT	: Histon Asetil Transferaz
HCPE	: High Performance Capillary Electrophoresis
HDAC	: Histon Deasetilaz
HIF-1	: Hipoksi inducible factor
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HRM	: High Resolution Melting
HTF	: HpaII Tiny Fragment

IGF-1 ve IGF-2	: İnsulin ve insulin benzeri büyüme faktörleri 1 ve 2
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
LBA	: Ligand bağlama yolu
MeCP-1 ve MeCP-2	: Metil sitozine bağlanma proteini 1 ve 2
5-MeC	: 5-metilsitozin
MMP-2	: Matriks metalloproteinaz-2
MS-HRM	: Methylation specific high resolution melting
NBS1	: Nibrin, Nijmegen kırılma sendromu
Ng	: Nanogram
NK	: Doğal öldürücü
OK	: Oral kontraseptifler
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD	: Primerdimer
PG	: Prostaglandin
PGE2	: Prostaglandin E2
PR	: Progesteron reseptörü
RA	: Retinoik asit
RAR β 2	: Retinoik Asit Reseptörü β 2
Rb	: Retinoblastoma
RNA	: Ribonükleik asit
siRNA	: Small Interfering RNAs
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SUMO	: Ubikutin benzeri proteinler
T	: Timin bazı
TGF- α	: Transforme edici büyüme faktörü α
TNM	: Tümör Node Metastaz
Tm	: Erime sıcaklığı
μ	: Mikron
μ l	: Mikrolitre
UV	: ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri %30 sıklıkla kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle meydana gelmektedir. Hormona bağımlı bir hastalıktır, insidansı üzerinde menarş yaşı, ilk gebelik yaşı ve menapoz yaşının etkisi görülmektedir. Ekzojen kaynaklı hormonlar riski etkileyebildiği gibi, iyonizan radyasyon ve fiziksel aktivitenin de etkisi bulunur. Ailesinde meme kanseri olanlarda meme kanseri görülme riski daha fazladır (20, 63).

Diğer taraftan, bazı epigenetik mekanizmalar da genin yapısını bozmaksızın tümör süpresör gende, fonksiyonel kayba neden olmaktadır. Bu epigenetik mekanizmalardan biri metilasyon olup, kanserden sorumlu genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu, tümör süpresör gen kaybına, hipometilasyonu ise protoonkogenlerin onkogenik aktivasyonuna neden olmaktadır. Dolayısıyla kanserden sorumlu genlerin promotor bölgelerinin metilasyon profilinin araştırılması ile ilgili çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır.

Meme kanserinde metilasyon profil değişikliği gösteren genlerden biri TWIST olup yalnızca metastatik meme kanserli serilerde eksprese iken, non-metastatik meme kanseri serilerinde eksprese olmaması; insan tümör metastazını kontrol eden ve bu konuda bulunan ilk gen olma özelliğini kazandırmıştır. TWIST1 promotor bölgesindeki metilasyon seviyesinde artışın meme tümöründe malign fenotiple korele olduğu görülmüştür.

Gen regülasyonunda büyük görevlere sahip olan nükleer retinoid reseptörleri vardır ve bu reseptörler bazı genlerin aktifleşmesi için öncü görevlere sahiptir. Bu reseptörlere retinoidler bağlanır ve böylece gen regülasyonu aktifleşir. Retinoik asit reseptörü beta2 geninin meme kanserinde metilasyon durumu genin ekspresyonu açısından önemlidir.

Östrojen reseptör1 (ESR1) geni promoter hipermetilasyon durumu genin ekspresyon profili açısından önemlidir. Hastalık progresyonunda transkripsiyon düzeyinde ER α geninin ekspresyon kaybı hormon rezistansındaki olası mekanizmalardan biridir. Bu nedenle ER α durumu hormona bağlı büyümenin bir göstergesi ve belirleyicisi olarak hormonal tedaviye yanıt vermektedir.

Bu çalışmada, meme kanserli olguların metilasyon spesifik HRM (MS-HRM) tekniği ile 3 farklı genin (TWIST, RAR β 2 ve ESR1) promotör bölgelerindeki metilasyon paternleri açısından değerlendirilmesi ve genlerin metilasyon profillerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Meme kanseri insanlık tarihinde tanımlanmış ilk kanser türlerinden biridir. İlk olarak milattan önce 3000-2500 yılları arasında Eski Mısır'da İmhotep tarafından yazıldığı tahmin edilen tıbbi bir papirusta meme kanseri ile ilgili ilk kayıtlara rastlanmıştır. Daha sonra tarihçi Herodot (M.Ö. 484-425), bir yazısında Darius'un karısı Atossa'nın memesinde ülserleşmiş bir tümör olduğunu ve bunun Pers'li doktor Democedes tarafından tedavi edildiğini belirtmiştir (21, 112).

Hipokrat (M.Ö 460-370), ilk olarak meme tümörlerini iyi huylu ve kötü huylu olarak ikiye ayırmış; kötü huylu olanın yayılabildiğini ve ölüme sebep olduğunu yazmıştır (9, 112).

Roma'lı Celsus (M.S. 30) da iltihabın dört kardinal belirtisini tanımlamıştır. Ayrıca meme kanserinin 4 evresini; erken kanser, ülsersiz kanser, ülserli kanser, karnabahar şeklinde ülserli kanser şeklinde tanımlamış ve adeta bugün TNM sınıflamasında T1, T2-T3-T4 tümörleri tarif etmiştir. Celsus erken kanser dışındaki meme kanserlerine cerrahi uygulanmaması gerektiğini savunmuştur (98, 106).

Daha sonraları İskenderiye'de yaşayan Dr Leonides (M.S. 80), mastektomi ameliyatını anlatmış; Alman cerrah Wilhelm Fabry von Hilden (M.S. 1560-1624) aksiller lenf düğümlerinin de çıkartılması gerektiğini belirtmiştir (45, 112).

Fransız cerrah Henri François Le Dran (1685-1770) 1757 yılında "meme kanserinin başlangıçta lokal bir hastalık olduğunu, büyüdükçe aksiller lenf düğümlerine ve buradan da genel dolaşıma geçerek uzak organlara yayıldığını" bildirmiştir (9, 98).

William Stewart Halsted, 1894'te ilk radikal mastektomi yapılmış ve yaptığı 50 vakalık radikal mastektomi serisi meme cerrahisinin temelini oluşturmuştur (9, 21, 98).

Gray 1939'da meme kanserinin erken lenfatik yayılmasının permeasyon yolu ile değil embolizasyon ile olduğunu, kan damarları yolu ile yayılmanın uzak metastazlardan sorumlu olduğunu ileri sürmüştür (9).

Patey ve Dyson 1948 yılında "Modifiye Radikal Mastektomi" tekniklerini açıklamışlardır. Son yıllarda "meme koruyucu cerrahi" teknikleri popülerlik kazanmıştır (45, 112).

International Union Against Cancer 1954'de ilk TNM sınıflamasını yapmıştır. Meme kanseri cerrahisi ile yapılan çok sayıda randomize çalışma ile MRM ve meme koruyucu cerrahi ile eşit sonuçlar sağladığının gösterilmesinden sonra aksillanın tedavisi de gözden geçirilmiştir. Giderek daha çok sayıda hastaya erken dönemde tanı konulması aksiller lenf nodülü tutulumunu azaltmış ve rutin aksiller disseksiyonu tartışılır hale getirmişti.

Guiliano 1994'de meme kanserli hastalarda sentinel lenf nodülü biopsisinin sonuçlarını ve tekniği yayınlamış, bu tarihten sonra pek çok merkez SLN biopsi yapmaya başlamıştır (33, 36, 112).

2.2. Meme Kanseri Biyolojisi

2.2.1. Normal Gelişim

Meme bezi embriyoda gebeliğin erken evrelerinde gelişmeye başlar ve puberteden menapoza kadar hipofiz ve over hormonları etkisi altında değişim göstermeye devam eder. Pubertede lobul oluşumu ile belirginleşen gelişim ve diferensiyasyon ilk term gebeliğin sonunda tamamlanır. Meme puberte öncesinde duktal yapılardan meydana gelir, pubertede fibroadipoz elemanlar katılır, duktus uzaması ve areolar tomurcuklar görülür. Erişkin meme dokusu fibröz doku ve yağ içinde bulunan sekretuar alveollerde sonlanan epitelyal laktifer kanallardan oluşur. Normal meme epitelinde hücre proliferasyonu ile ölümü dengede gibi görünse de over hormonlarının neden olduğu meme büyümesi menstruasyon döngüsü sonunda hiçbir zaman başlangıç seviyesine dönmez, bu nedenle yaklaşık 35 yaşına kadar her döngüde meme gelişimi biraz daha artar. Memede atrofik değişiklikler ise 40 yaş dolaylarında başlar (35, 97, 111).

Normal meme büyümesi ve gelişimi östrojen, progesteron, androjen, glukokortikoid, prolaktin, tiroid hormonu, insulin ve insulin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1 ve IGF-2), fibroblast büyüme faktörleri (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF)/transforme edici büyüme faktörü α (TGF- α) dâhil otokrin ve parakrin etkili pek çok hormon, büyüme faktörü ve TGF- β ve mammastatin gibi epitel kökenli büyüme inhibitörleri etkileşimi ile gerçekleşir. Büyüme faktörü, sitokin ve hormonlar reseptör etkileşimleri aracılığı ile bazı genlerin anlatımını artırırken diğerlerini baskılayabilir. Bu hormon ve reseptörler normal meme dokusunu düzenledikleri gibi meme dokusundan kaynaklanan malign hücreleri de etkilerler. Bu hücrelerde reseptörler ve ilgili sinyal yollarında bulunan genetik bozukluklar kanser gelişmesinden sorumludur (97, 111). Tümör epitel ve/veya stroma hücreleri tümör invazyonu ve metastatik gücünde rol alabilen katepsinler, stromelizinler, jelatinazlar ya da urokinaz plazminojen aktivatörü gibi proteazlar da salgılar. Meme kanser hücrelerinin malign potansiyeli büyük olasılıkla tümör tarafından üretilen büyüme stimulatörleri ile inhibitörleri arasındaki dengeye dayanır (97, 111).

2.2.2. Hormonlar ve Reseptörleri

Hormonlar meme hücresi gelişiminde rol alan genlerin ekspresyonunu etkileyerek tümör gelişiminde rol alır. Östrojenler DNA, RNA ve protein sentezini ve önemli düzenleyici enzimlerin aktivitesini uyarır ve hücre döngüsünü düzenler. Progesteron ile beraber normal meme epitelinde proliferasyon ve diferensiyasyonu tetikler. Östrojenler doğrudan DNA hasarına neden olarak tümör inisiyatörü olarak davranabilir, mitozu tetikleyerek DNA hasarının birikmesine neden olabilirler (47, 97).

Nükleer hormon reseptör ailesinin üyesi olan östrojen reseptörleri (ER) liganda bağlandıklarında transkripsiyon faktörleri olarak davranır (84). Östrojen reseptör ekspresyonu görülen hücrelerin oranı memenin lobular gelişimi ile ilişkilidir ve ekspresyonu meme dokusunun diferensiyasyon derecesi tarafından belirlenir (97). Östrojen reseptör'ün iki ayrı izoformu bulunur (ER α ve ER β) (47, 84). Meme kanserinin erken evrelerinde ER α aşırı ekspresyonu sıktır (39, 47). Transkripsiyonu etkilenen genlerin çoğu proliferasyon, apoptoz, metastaz, invazyon ve anjiyogenezde rol alır (84). Östrojen reseptör β 'nin önemi ER α 'dan daha az bilinmekte ve tümör gelişimi

üzerine ters etkisi var gibi görünmektedir (19, 47, 84). Östrojen reseptör'ler meme kanserlerinin %60-80'inde tespit edilir. Östrojen reseptör-negatif tümörlerin viseral organlara metastaz olasılığı daha fazladır. Östrojen reseptör pozitifliği histolojik farklılaşma derecesi (düşük nükleer grad), diploid DNA içeriği ve düşük proliferatif indeks (düşük SPF ya da Ki-67 ekspresyonu) ile korelasyon gösterirken, HER-2 ve EGFR ekspresyonu ile ters korelasyon gösterir (97).

Östrojen reseptör testleri endokrin tedavi için hasta seçiminde önemlidir. Östrojen reseptör-pozitif hastaların yaklaşık %50-60'ı endokrin tedavisinden yarar görürken; ER-negatif hastalar yarar görmez. Reseptör varlığına rağmen ER-pozitif tümörlerin %40-50 kadarı hormon tedavisine yanıt vermemektedir (111). Progesteron reseptörünün PR-A ve PR-B olarak iki izoformu bulunur.

Progesteron ile düzenlenen genlerden büyük çoğunluğu PR-A tarafından düzenlenmektedir. Meme kanserindeki rolleri iyi bilinmemektedir (47).

2.3. Kanser Gelişimiyle İlişkili Genler

2.3.1. Onkogenler

Onkogenler aktivasyonları kanser gelişimine katkıda bulunan genlerdir. Normal hücrede büyümeyi düzenler ve protoonkogen olarak adlandırılırlar. Bir genin onkogen olarak tanımlanması için kanserde aktifleştığının gösterilmesi ve hücre kültüründe ya da hayvan modelinde ekspresyonunun maliniteye neden olması gerekir. Aktivasyon gen amplifikasyonu, nokta mutasyonları ya da kromozom translokasyonları ile yeni füzyon geni oluşması yoluyla meydana gelebilir. Onkogenler aynı zamanda başka genler ile genetik ya da epigenetik olarak da bir arada çalışabilirler (56, 84).

Sporadik meme kanserinde onkogen amplifikasyonu sık görülür (47). Bu onkogenlerin aşırı ekspresyonu malign fenotipin hem inisiyasyon hem de idamesine katkıda bulunabilir. Meme kanserinde aşırı ekspresyonu görülen onkogenler MYC ve RAS ailesi üyeleri (C-MYC, HA-RAS-1), INT-2; EMS1; epidermal büyüme faktör reseptörü ailesi üyeleri HER-2 (ERBB-2), HER-3 ve HER-4'dür. Hücre döngüsü kontrolünde görev alan genler, özellikle siklin D ailesi üyeleri de onkogen olarak davranabilir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), TGF β ve IGF-1 gibi büyüme

faktörlerinin de onkogenik etkisi olabilir. Örneğin Bcl-2 meme kanserinde aşırı ifadesi görülen bir diğer gen dir ve kötü prognoz ve sitotoksik tedaviye yanıtın az olması ile ilişkilidir (47, 56, 83).

2.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genlerde görülen işlev kayıpları malinitenin başlamasına neden olur. Bu genler genellikle hücre adezyonu ya da proteaz aktivitesi gibi invaziv ve metastatik potansiyeli etkiler, büyüme ve diğer işlevler üzerinde negatif düzenleyici rol oynarlar. Tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar sporadik olarak gelişebileceği gibi germ hücre mutasyonları da görülebilir. Malinleşmeye katkıda bulunmaları için her iki allelin de etkilenmiş olması, her iki genin de baskılanması gerekmektedir. Bazı durumlarda tümör baskılayıcı gende mutasyon olmasa bile, genin promotor bölgesinde meydana gelebilecek metilasyondan, proteozomal degradasyondan ya da gen ürünü ile etkileşen diğer proteinlerle ilgili anormalliklerden kaynaklanabilen nedenlerle genin ifadesi bozulmuş olabilir (49, 84).

Tümör baskılayıcı genler olan BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları ailevi meme kanseri olgularının yaklaşık % 60'ından sorumludur. Germ hücre mutasyonları meme ve over kanserine yatkınlığa neden olur. Sporadik meme kanserinde mutasyon nadirdir ama işlevsel bozukluklar görülür. Meme kanserinde P53 mutasyonu %50 (56), Rb (13q14.1) mutasyon ya da kaybı %30 sıklıkla görülürken; PTEN (10q23) germ hücre mutasyonlarında görülen Cowden Sendromunda da meme kanseri görülür ancak sporadik meme kanserinde somatik mutasyonlar nadirdir. Hücre döngü kontrol noktası kinaz geni olan CHEK2 BRCA1/2 DNA onarım yolağı ile etkileşir. Ailevi meme kanserinde 1100delC varyantı düşük penetranslı yatkınlığa neden olur. Epiteyal-Cadherin adezyon molekülünü kodlayan CDH1'in (16q22.1) sporadik lobular meme kanserinde rol aldığı düşünülmektedir (47).

Ataksia telenjiektazili hastaların yakın akrabalarında görülen meme kanseri risk artışı ATM geninde görülen belirli dominant negatif etkili missens mutasyonları ile ilişkilidir. ATM proteini BRCA1/2 DNA onarım yolağı ile etkileşir ve radyasyonun neden olduğu DNA hasarına yanıt olarak BRCA1 fosforilasyonunda rol alır. Nibrin (NBS1) geninde görülen germ hücre mutasyonu (657del15) ataksi telenjiektazi benzeri

bir durum olan Nijmegen kırılma sendromuna neden olur ve meme kanserli olgularda özellikle ailevi olanlarda frekansının yüksek olduğu bildirilmiştir (14, 42, 47, 56, 84, 88).

2.4. Meme Kanserinin Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

Meme kanseri, memenin duktus ya da lobüllerini kaplayan epitel hücrelerinin malin proliferasyonudur. Kadınlarda en sık görülen kanser olmakla beraber, erkeklerde oldukça nadirdir. Kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturur. Görülme sıklığı yılda %1-2 oranında artmakta, Avrupa'da yılda 180.000, Amerika'da 184.000 yeni olgu belirlenmektedir (20, 63).

Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri yüzünden ortaya çıkmaktadır. Akciğer ve kolorektal kanserden sonra üçüncü sırayı alırken, 40-44 yaş arasında kansere bağlı ölümlerde birinci sıradadır. Mortalite ve görülme sıklığı gibi faktörler ülkeden ülkeye değişir (20).

Klonal bir hastalık olan meme kanseri bir dizi somatik ya da germ hücre mutasyonu sonrasında bir somatik hücrenin malin potansiyel kazanması ile başlar. Uzun süre noninvaziv, ya da invaziv ama metastaz yapmayan bir hastalık olarak kalabildiği için zamanında tanınması ve uygun şekilde tedavi edilmesi önemlidir (63).

Meme kanseri hormona bağımlı bir hastalıktır 30 yaştan öncesinde nadir görülür, 30 yaş ile menopoz arasında görülme sıklığı artar ve menapozda hafif azalma görülür. Menopoz sonrası yıllarda sürekli devam eden bir artış olur. Meme kanseri insidansı üzerinde etkisi olan üç önemli faktör menarş yaşı, ilk gebelik yaşı ve menopoz yaşıdır. Özellikle ilk miyadında gebelikten önce olan menstruel yaşam uzunluğu risk oluşmasında önemli bir etkidir ve ülkeler arasında görülen farklılıkların %70-80'inden sorumlu olabilir. Diyet ve davranış alışkanlıklarının da insidans farklılıklarında rolü olabilmektedir (20, 56, 63).

Meme kanserinin oluşum nedenleri arasında endokrin mekanizmalar, diyet, çevresel etkenler ve genetik değişiklikler üzerinde durulmaktadır. Hormonal karsinogenez konusunda en yararlı veriler ülkeler arasındaki görülme sıklığı farklarının incelenmesiyle elde edilmiştir. Kuzey Amerika'da yaşayan kadınların meme kanserine yakalanma riski 1/9, Asyalı kadınlarda ise bunun ve Batı Avrupa'daki riskin onda biri

ya da beşte biri arasında değişmektedir. Asyalı kadınlarda östrojen ve progesteron düzeyleri önemli derecede daha düşüktür. Batı ortamında yaşayan Asyalı kadınlarda risk batılıların düzeyine çıktığı için bu farklar genetik bir temelle açıklanamamaktadır. Ancak menarş yaşının kritik düzenleyicileri olan ve östrojenlerin plazma konsantrasyonları üzerinde önemli etkileri görülen boy ve kilo değerlerinin batılı kadınlar ile Asyalı kadınlar arasında farklılık gösterdiği açıktır (63).

Oral kontraseptiflerin (OK) yaygın kullanımı nedeniyle ekzojen hormonların kanser ile ilişkisi önem kazanmış ve araştırılmıştır. Veriler oral kontraseptiflerin epitelyal over tümörleri ve endometrium kanserleri için koruyucu olduğunu ancak meme kanser riskini az da olsa artırdıklarını göstermektedir. Meme kanseri üzerindeki etkileri çok az olmakla beraber, koruyucu etkileri olmadığı da açıktır. Postmenopozal ve 45 yaş üstü kadınlarda OK kullanım süresiyle kanser riski arasında ilişki saptanmamıştır. Risk artışı genellikle premenopozal kadınlarda daha belirgindir, 45 yaş altında uzun süreli OK kullanımına ilişkin çalışmalarda meme kanseri riskinde anlamlı artış gösterilmiştir (20, 63).

Hipogonadal ya da menapozdaki kadınlarda hormon replasman tedavisi uygulaması da tartışmalı bir konudur. Tek başına östrojen uygulandığında sağlanan östrojen düzeyi premenopozal östrojen düzeyinden daha düşüktür. Östrojen eksikliği semptomlarında, osteoporoz ve ilişkili kalça kırıklarında azalma ile kardiyovasküler hastalığa bağlı ölümlerde üçte bir kadar azalma görülür, ancak endometriyal kanser riski artar. Meta analizler meme kanseri insidansında yüksek doz uygulanan östrojenler ve uzun tedavi süresine bağlı olarak küçük bir artışa işaret etmektedirler. Postmenopozal kadınlarda uzun süreli östrojen tedavisinin meme kanseri riskini artırdığı kısa süreli kullanımın ise risk oluşturmadığı kabul edilmektedir. Ailesinde meme kanseri olan kadınlar konjuge östrojenlerin karsinojenik etkilerine daha duyarlı olabilirler. Hormon replasman tedavisi uygulamalarına progesteron eklenmesinin, kardiyovasküler ya da kemik hastalıkları riskini değiştirip değiştirmediği tam bilinmemekle beraber endometriyal kanser riskini belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir (20, 63). Total kalori alımı ile meme kanseri ilişkisi tartışılmakta, yüksek yağ alımıyla da ilişkilendirilmektedir. Alkol ile meme kanseri arasındaki ilişki belirgin olarak ortaya konmuş, belli miktar alkol alımının total östrojen düzeyini artırdığı gözlenmiştir (20). Vitaminlerle yapılmış çalışmalarda A vitamininin orta derecede koruyucu bir etkiye

sahip olduğu, E vitamininin koruyucu bir etkisi olmadığı gösterilmiştir, C vitamininin etkisi ise henüz tartışmalıdır (20). İyonizan radyasyon genç kadınlarda risk faktörüdür. Otuz yaşından önce çok sayıda floroskopi (200-300cGy) ya da Hodgkin tedavisi için (>3600cGy) radyasyona maruz kalan kadınlarda meme kanseri riski belirgin olarak daha fazladır. 30 yaşından sonra radyasyona maruz kalmanın meme üzerindeki karsinojenik etkisi minimaldir (20). Fizik aktivite ile meme kanseri ilişkilendirilmiştir. Ağır fizik aktivite menarşı geciktirir. Egzersiz 40 yaş altındaki kadınlarda meme kanseri riskini azaltmaktadır (20). Genel olarak tüm meme kanserlerinin %5-10 kadarının BRCA1 ve BRCA2 gibi tümör baskılayıcı genlerde baskın penetrans gösteren mutasyonlardan kaynaklandığı düşünölmektedir (14, 88). Çeşitli ailevi sendromlarda da meme kanseri görölr. Herediter meme-over kanser sendromu, Li-Fraumeni sendromu ve Muir Sendromunda meme kanseri görölme sıklığı artar. Cowden sendromu meme kanserinde yatkınlık artışı ile ilişkilidir ve Peutz- Jeghers sendromu meme kanserinin nadir nedenlerinden birisidir (20, 42).

2.5. Meme Kanserinin Patolojisi

Meme kanseri bağ ya da epitel dokusundan köken alabilir. Ancak sık görölenler epitelyum kökenli olanlardır. Hastaların %4 kadarında primer tümör iki taraflıdır ya da ikinci primer gelişir. Tümörler en sık üst dış kadranda görölr (%50), bunu santral (%20), alt dış (%10), üst iç (%10) ve alt iç kadran izler (%10) (15). Tümörlerin çoğu duktus epitelinden (%90), diğerleri lobul epitelinden köken alır. Karsinogenezin bu iki formda farklı şekillerde geliştiği düşünölmektedir. Her iki grup kanser bazal membran infiltrasyonu yapıp yapmamalarına göre iki gruba ayrılırlar (Tablo 2.1.) (15, 47):

Tablo 2.1. Meme tümörlerinin histopatolojik sınıflaması (15).

İnfiltrasyon Yapmayan	1. İntraduktal karsinom (komedokarsinom)
	2. Paget hastalığında intraduktal karsinom
	3. Lobuler karsinoma in situ
İnfiltrasyon Yapan	1. İnvaziv duktal karsinom
	2. İnvaziv lobuler karsinom
	3. Medüller karsinom
	4. Kolloid (müsinöz) karsinom
	5. Tubuler karsinom
	6. Diğer nadir tipler

Tüm meme kanserlerinin %20-25 kadarını oluşturan noninvaziv (in situ) karsinom (komedokarsinom) intraduktal ve lobuler olmak üzere iki tiptir. Meme duktusları atipik tümör hücreleri ile dolmuştur. Nadiren hücreler papiller yapılar oluşturur ya da meme başına yayılarak meme başı Paget hastalığına neden olurlar. Atipik hücreler duktus bazal membranını penetre etmez ve noninvaziv in situ olarak kalırlar. Yüksek dereceli olanların %40'ında zamanla invazyon gerçekleşir (15). Lobuler karsinoma in situ terminal duktus ve duktüllerden gelişir ve bu yapıları atipik tümör hücreleri doldurur. Lezyonlar fibrokistik değişiklikler ile beraber ya da intraduktal karsinomlarla beraber invaziv karsinom alanlarının komşuluğunda olabilir, fibroadenom zemininde gelişebilir ve sıklıkla çok sayıda ve bilateraldirler. Üçte birinde aynı taraf ya da karşı tarafta invaziv karsinom gelişir. Genellikle ER ve PR pozitif ve HER-2 negatiftirler ve premenapozal dönemde rastlantısal bulunurlar (15, 112).

Kolloid (müsinöz) karsinom, memenin paget hastalığı, medüller karsinom ve infiltratif lobuler karsinom invaziv infiltratif karsinomlardır. İnvazyona neden olan genetik değişiklik net olarak bilinmemektedir. Görülen genetik değişikliklerin çoğunun in situ düzeyinde de görülüyor olması meme kanserini kolon ve serviks kanseri gibi ilerleyen karsinogenez modellerinden ayıran bir özelliktir. Sporadik meme kanserinin

gelişiminde birden fazla yolak rol oynar ve meme kanseri tipi, karsinogenezin erken evresinde belirlenebilir (15, 47).

İnvaziv duktal karsinom en sık görülen şekildir. Kullanılan morfolojik kriterlere göre değişmekle birlikte %44-75 sıklıkla görülür. Sertliği ve yoğun stroması nedeniyle skiröz karsinom olarak da adlandırılır. Stroma içine dağılmış yuvarlak, poligonal ya da sıkışmış ve uniform, küçük, çok az mitotik figür içeren koyu nukleuslu tümör hücre küme ve kordonlarından oluşur. Çevre doku infiltrasyonu, kan damarları, perivasküler ve perinöral alanların invazyonu gözlenir (15, 112).

Memenin Paget Hastalığı meme kanserleri içinde %12 sıklıkla ve ileri yaşta görülür. Genellikle in situ duktal karsinom ile ilişkilidir. Ana boşaltıcı duktusları tutan tipik intraduktal karsinom olarak başlar ve ilerleyerek meme başını ve areola derisini infiltre eder. Epidermis Paget hücreleri denon patognomonik hücrelerle infiltredir. Hücreler tek ya da kümeler halinde, büyük ve hiperkromatiktir ve pleomorfik nukleusları berrak halka ile çevrelenmiştir. Diğer yönleri ile intraduktal karsinomlara benzer. Deri invazyonu olmasına rağmen prognoz iyidir (15, 112). Meme karsinomlarının %1'ini oluşturan medüller karsinom daha sık 50 yaş altında görülür. Stroması azdır, nadiren gland yapıları içerir ve farklılaşmamış poligonalden igsiye değişen görünümde hücrelerin oluşturduğu düzensiz tabakalar şeklinde çoğalır. Tümörün içinde ve çevresinde orta dereceli ya da belirgin lenfosit infiltrasyonu vardır. Prognoz diğer infiltre meme karsinomlarına göre daha iyidir (15, 112).

Genellikle postmenapozal kadınlarda görülen kolloid (müsinöz) karsinom medüller karsinomdan daha nadirdir. Hücre içi ve dışı mukus yapımı ile karakterizedir. Prognozları infiltratif tümörlerden daha iyidir (15, 112). İnfiltratif lobuler karsinom sınırları belirsiz, lastik kıvamındadır. Sıklıkla ele gelen bir kitle oluşturmaz. Birer hücreden oluşan ve fibröz stroma içinde dağılmış olan tümör hücre dizileri asinus ya da duktusları kuşatarak karakteristik “hedef tahtası” görünümü oluşturur. İki taraflı olmaları nedeniyle önemlidirler. Görülme sıklığı kullanılan morfolojik kriterlere göre değişmekle beraber %1-20 arasında bildirilmiştir (15, 112).

Otuz yıllık sağ kalım intraduktal karsinomda %74, papiller karsinomda %65, medüller karsinomda %58, kolloid karsinomda %58, invaziv lobüler karsinomda %34, invaziv duktal karsinomda %29 oranındadır (15). Meme kanserleri biyolojik agresifliklerine göre metastaz yapmayanlar (stromal invazyonu olmayan intraduktal

karsinom, in situ lobuler karsinom), seyrek metastaz yapan (kolloid karsinom, lenfositer infiltrasyonlu medüller karsinom) ve orta derecede agresif metastatik (diğer tipler) olarak üç grup altında incelenebilirler (15). Tüm invaziv kanserlerde yayılım lenfatik ve hematojen yolla olur. Dış kadran ve santral yerleşimli lezyonlar tipik olarak aksiller lenf nodlarını, iç kadrandaki lezyonlar ise internal meme arterleri boyunca yayılan lenfatikleri tutarlar. Supraklaviküler nodül ilk yayılım yeri olabilir ama daha çok aksiller ve internal meme nodüllerinin tutulumundan sonra gelişir. En çok akciğer, iskelet, karaciğer, srenal metastazları ve daha az oranda beyin, dalak ve hipofiz tutulumları görülür. Metastazlar ilk lezyonun kontrol altına alınmasından üç yıl, bazen 15 yıl sonra dahi görülebilir (15).

2.6. Evrelendirme ve Prognoz

Seyri hastadan hastaya değişen meme kanseri hızlı gidişli ya da gizli seyirli olabilir. Uzun dönem prognozu belirleyen nüks ya da metastazın yerleştiği dokudur. Tümörün büyüme hızı, tedavilere duyarlılığı ve biyolojik özellikleri prognozu etkiler. Uzak metastazı olan hastaların çoğu tedavi edilemez. Ancak standart kemoterapi sonrasında tam remisyon elde edilen hastalardan bazıları uzun süre progresyon göstermeden kalabilir ve bu süre nadiren 20 yılı geçebilir. Metastatik meme kanserli hastaların ortanca sağ kalım süresi 2 ile 3 yıldır. Östrojen reseptörü (ER) pozitif tümörü olan hastalarda ve kemoterapiden sonra tam remisyon elde edenlerde sağ kalım daha uzundur (56).

Meme kanserinin evrelendirilmesinde, 5 yıllık sağ kalım oranları evre I kanserde %87, evre II'de %75, evre III'de %46, evre IV'de %13'dür (15, 112).

2.6.1. Prognostik Faktörler

Meme karsinomlarının prognozunu belirlemede birçok klinik ve patolojik ölçüt bulunmaktadır. Prognozun kötü olacağını düşündüren bazı bulgular şu şekilde sıralanabilir:

1. Meme derisinde yaygın ödem ve deri üzerinde multipl nodüllerin bulunması
2. Göğüs duvarına fiksasyon

3. Arteria mammaria interna çevresi ve supraklaviküler lenf düğümlerinin tutulması
4. İnflamatuvar karsinom
5. Uzak metastazların bulunması

Bu bulguların izlenmediği durumlarda prognozu belirlemede birçok değişken değerlendirilir. Başlıcaları şunlardır:

Yaş: Meme karsinomu tanısı aldığıında 50 yaşın altında olan kadınlarda iyi prognoz gözlenirken 50 yaş üstü ve ileri yaş olgularda sağkalım oranları daha düşüktür. Benzer şekilde 35 yaş altı olgularda da sağkalım oranları düşüktür (59, 95, 109). Nüks ve uzak metastaz riski daha yüksektir. Bu durum olguların daha yüksek dereceli tümörlere sahip olmalarıyla ilişkilidir.

İnvazyon: Meme karsinomlarında tek başına en önemli prognostik etkidir. İnvaziv komponentin bulunmadığı in situ karsinomlarda mastektomi ile %100 sağkalım sağlanmaktadır. Hem in situ hem de invaziv komponenti bulunan olgularda invaziv komponentin oranı ile lenf düğümü metastaz olasılığı arasında ilişki bulunmaktadır.

Tümör boyutu: Tümör boyutu en önemli prognostik faktörlerden biridir ve lenf düğümü metastazlarından bağımsızdır. Ancak aksiller lenf düğümü metastazı riski tümör boyutu ile birlikte artar. In situ ve invaziv komponenti bulunan tümörlerde total tümör ölçüsünden çok invaziv komponentin boyutu daha iyi bir göstergedir. Mikroskopik tümör ölçüsü makroskopik ölçüden daha önemli olduğu bilinmektedir.

Yerleşim yeri: Yapılan birçok çalışmada prognoz ile tümörün kadranlara göre yerleşimi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ancak son zamanlarda yayımlanan bir çalışmada medial yerleşimli tümörler, lateral yerleşimlilerle karşılaştırıldığında %50 nüks ve ölüm riski bulunmuştur (95).

Histolojik tip: Klasik duktal ve lobüler tip invaziv meme karsinomları arasında istatistiksel belirgin bir prognostik fark bulunmadığı bildirilmektedir. Bazı invaziv duktal karsinomun morfolojik varyantları ise iyi prognoz göstermektedir. Bunlar tubuler karsinom, kribriform karsinom, medüller karsinom, müsinöz karsinom, papiller karsinom, adenoid kistik karsinom ve sekretuar karsinomdur. Taşlı yüzük hücreli karsinom ve inflamatuvar karsinom da ise prognoz kötüdür.

Derece: Tümörün histolojik derecesi ile sağkalım oranları arasında bağlantı bulunmaktadır. İyi diferansiye derece I tümörlerde 10 yıllık sağkalım oranları %85 iken orta derece diferansiye derece II tümörlerde %60 ve az diferansiye derece III tümörlerde

ise %15'tir (95). İnvaziv meme karsinomlarında en yaygın olarak kullanılan derecelendirme sistemi Patley ve Scarf tarafından tanımlanan, önce Bloom ve Richardson sonra da Elston ve Ellis tarafında modifiye edilen sistemdir. Bu sistem tubuler diferansiyasyon, nükleer atipi ve mitozdan oluşan üç parametrenin ayrı ayrı değerlendirilmesi ve elde edilen puanların toplanması temeline dayanır (59, 67, 109).

Tubuler diferansiyasyon: Tümörün tümü değerlendirilerek tubuler yapıların tüm tümör alanındaki oranı belirlenir. Puanlama ölçütleri aşağıdaki belirtilmiştir.

1: Tubul yapıları tümörün %75'inden fazla

2: Tubul yapıları tümörün %75-10'u

3: Tubul yapıları tümörün %10'undan az

Nükleer atipi: Tümör hücreleri normal meme epiteli ile karşılaştırılır, atipi ve pleomorfizm değerlendirilir.

1: Nükleuslar küçük ve normale göre hafif büyüktür. Nükleus konturları hafif düzensizdir.

2: Nükleuslar normale göre büyük ve vezikülerdir. Nükleolus belirginliği bulunur. Orta derecede biçim ve boyut farklılığı gözlenir.

3: Veziküler nükleuslu, genellikle nükleoluslu, belirgin biçim ve boyut farkı bulunan hücrelerdir. Bazen çok büyük ve bizar hücreler de bulunur.

Mitoz: 10 büyük büyütme alanında mikroskop alanının çapı dikkate alınarak sayım yapılır. Mitoz sayısı 1, 2 ve 3 olarak puanlanır.

Derece I: Toplam puan 3-5, iyi diferansiye

Derece II: Toplam puan 6-7, orta derece diferansiye

Derece III: Toplam puan 8-9, az diferansiye olarak değerlendirilir.

Lenf düğümü metastazı: Uzun dönem sağkalım oranlarının en önemli belirleyicilerinden biridir. Lenf düğümü metastazı olan olgularda olmayanlara göre mortalite riskinin 4-8 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Tutulan lenf düğümü sayısı da önemli olup yüksek metastatik lenf düğümü sayısı kötü prognozla ilişkilidir. 10 ya da daha fazla lenf düğümü metastazı olan olgularda 1-3 lenf düğümü metastazı olanlara göre 10 yıllık sağkalım oranlarının %70 daha kötü olduğunu belirten yayınlar bulunmaktadır (95).

Lenfovasküler invazyon: Tümör çevresinde lenfatik ve kapiller damarlar içinde tümör hücreleri görülebilir. Bu bulgu lenf düğümü metastazı ve kötü prognozla

ilişkilidir. Lenfatikler içinde tümör embolüsünün varlığı rekürrens riskini, tümör içinde ve çevresinde yeni damar yapımının fazla olması ise tümörün metastaz yapma olasılığını arttırmaktadır (67, 109).

Hormon reseptörleri: Hücrel diferansiyasyona bağlı olarak östrojen ve progesteron reseptörlerinin miktarı değişkenlik göstermektedir. Bir tümör ne denli diferansiye ise hücrelerdeki östrojen ve progesteron reseptörü o denli fazla miktarda saptanmaktadır. Meme karsinomlarının %85'inde östrojen reseptörü pozitifliği saptandığı bildirilmiş ve bu tümörlerin çoğunu postmenopozal dönemdeki kadınların oluşturduğu gösterilmiştir. Hormon reseptör pozitifliği antiöstrojen olarak kullanılan tamoksifene yanıtı belirlediği için sağkalımı etkilemektedir.

Proliferasyon hızı ve anöploidi: İmmünohistokimyasal olarak saptanabilen bazı belirleyiciler (Ki-67) yanı sıra akım sitometrisi (flow cytometry) yöntemiyle DNA değerlerine bakılarak bir tümörün proliferasyon hızına ilişkin bilgiler elde edilebilmektedir. Tümör hücrelerinde DNA miktarının artması ya da yüksek Ki-67 indeksi kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilmektedir (67, 109).

C-erbB-2: C-erbB-2'nin amplifikasyonu sonucunda aşırı ekspresyonu kötü bir prognoz göstergesi olduğunu belirten çok sayıda yaygın bulunmaktadır. Bu durum özellikle lenf düğümü metastazı ve tümör derecesi ile ilişkilidir (68, 95, 109).

Evre: En önemli prognostik faktörler olan tümör boyutu, lenf düğümü metastazı ve uzak metastazı temel alan evrelendirme sistemleri bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2003 yılındaki TNM evrelendirme sistemi en sık kullanılanlarından biridir (Bkz. EK-1, EK-2) (59, 95).

2.6.2. İmmunohistokimyasal Belirleyiciler

2.6.2.1. BRCA-1

Bir tümör süpresör gen olan BRCA-1 17q21.3'de lokalizedir. Bu protein DNA çift zincir kırılmalarının onarımı, transkripsiyon regülasyonu, hücre siklus kontrolü, kromatin yeniden şekillenmesi gibi çok sayıda işleve sahiptir. Bu gen 24 exondan oluşur ve 1853 amino asitten oluşan bir protein kodlar (6, 43, 46). Bu proteinin NH₂ (amino uç; N-terminal) ve COOH (karboksi uç; C-terminal) uçları bulunmaktadır (46).

Bu proteinin yerleşimi konusunda farklı çalışmalar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda BRCA-1 proteininin amino ve karboksi uçlarının nükleusta bulunduğu saptanmıştır. Ancak bazı çalışmalarda ekson 11'de bulunan nükleer lokalizasyon sinyali (NLSs) ve ekson 11'siz BRCA splice varyantının (BRCA1-Δ ekson 11) sitoplazmada yer aldığı gösterilmiştir (46). Çok sayıda BRCA-1 germ-line mutasyonlar tanımlanmış olmakla birlikte intrasellüler lokalizasyonu hakkında az bilgi bulunmaktadır.

Yapılan bir çalışmada BRCA-1 proteininin amino ve karboksi uçlarına etkili antikorlar ile BRCA-1 mutasyonları ile boyanma lokalizasyonları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Karboksi uca karşı antikor (GLK-2) ile ekson 11 mutasyonlarında sitoplazmik boyanma elde edilirken diğer mutasyonlarda boyanma saptanmamıştır. BRCA-1 mutasyonu olmayan olgularda ise nükleer boyanma gözlenmiştir. Amino ucuna etkili antikorla (Ab-2) NLSs'nin bulunduğu ekson 11'in aşağısındaki mutasyonlarda nükleer boyanma izlenirken üstündeki mutasyonlarda ise boyanmanın saptanmadığı bildirilmiştir (46).

2.6.2.2. BRCA-2

İlk kez 1994 yılında tanımlanmış olan BRCA-2 geni 13. kromozomun uzun kolunda yerleşmiştir. Ayrıca BRCA-2 geni geniş bir gen olup 27 eksondan oluşur ve 3418 aminoasitten oluşan protein kodlar. Transkripsiyon regülasyonu, DNA zincir kırılmalarının onarımı, hücre siklus kontrolü gibi işlevlere sahiptir (6, 28, 59, 79, 125). Bu genin mutasyonları BRCA-1'e benzer şekilde meme ve over kanseri riskini artırır.

Ancak BRCA-2 gen mutasyonları BRCA-1'e göre over kanseri gelişiminde daha düşük risk oluşturur. BRCA-2 ilişkili meme kanserleri erkeklerde de görülebilir (6).

Bir çalışmada BRCA-2 geninin proteini immunohistokimyasal boyama yöntemleriyle meme epitel hücreleri, endometrium, timus, lenfoid dokuda folliküllerin germinal merkezlerinde bulunan tingible body makrofajlarda ve dalak retiküloendotelial hücrelerde gösterilmiştir (71).

2.6.2.3. Cyclooxygenase-2 (Cox-2)

Cyclooxygenase bir enzim olup araşidonik asitten prostaglandin (PG) sentezini katalizleyen prostaglandin sentetaz kompleksinin bir parçasıdır. Cyclooxygenase, Cox-1 ve Cox-2 olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. Bunlarda Cox-1 normal dokuda hücre membranında yer alır, sürekli olarak salgınır ve mide mukaza bütünlüğünün korunması, trombosit agregasyonunun düzenlenmesi gibi fizyolojik olaylarda etkilidir. Diğer bir alt tipi olan Cox-2 ise birçok normal dokuda saptanamamakla birlikte yangı ve neoplastik süreçte sitoplazmada ortaya çıkar. Büyüme hormonları, tümör ilerleticileri, bakteriyel endotoksinler ve sitokinler tarafından Cox-2 salgınımı indüklenir. Kolon, akciğer, mide ve özofagus adenokarsinomları gibi birçok malignitede Cox-2 ekspresyonu artmıştır. Bunun yanı sıra Cox-2'nin kanser gelişiminde rolü olduğuna ilişkin çok sayıda bulgu bulunmaktadır (57, 91). Ayrıca genetik ve farmakolojik çalışmalar Cox-2'nin erken dönem tümör gelişiminde etkili olduğunu belirtmektedir. Half ve arkadaşları invaziv tümöre komşu DKIS alanlarında invaziv tümöre göre daha yüksek ekspresyon gözlemişlerdir (38).

Cyclooxygenase enzimleri, Cox-1; 9. kromozomda, Cox-2; 1. kromozomda olmak üzere farklı genlerde yer almaktadır. Cyclooxygenase-1 576, Cox-2 ise 587 aminoasitten oluşmaktadırlar. Cyclooxygenase-2 salgınımı PG sentezini uyarır. Bu moleküller hücresel fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yardımcı olan lokal hormonlardır. Yarılanma ömürleri kısadır (sıklıkla sadece dakikalar), etkilerini sentezlendikleri hücrede ve komşu hücrelerde gösterirler. Bu moleküller hücre proliferasyonunu stimüle ederler, özellikle meme epitel hücrelerinin mitotik aktivitesini arttırırlar (57, 91). Bununla birlikte Prostaglandin E2 (PGE2) immunregülatör lenfokinlerin üretimini, T ve B hücre hücre proliferasyonunu ve doğal öldürücü (NK)

hücrelerin sitotoksik aktivitelerini inhibe eder. Prostaglandin E2 aynı zamanda tümör nekroz faktörünü de inhibe eder. Ek olarak immünsüpresif etkisi olan interlökin 10'u aktivite eder (91).

Prostaglandin düzeylerinin yükselmesi sellüler siklik AMP (cAMP) artışına neden olur. Bu da apoptozisin azalması ve hücre yaşam süresinin artmasına yol açar. Aynı zamanda Cox-2 artışı doğal substratı olan araşidonik asit düzeyinin de azalmasına yol açar ki bu da apoptozisin azalmasıyla sonuçlanmaktadır (91).

Birçok çalışmada Cox-2 aşırı salınımının VEGF, bFGF, TGF, PDGF ve endotelin gibi yeni damar oluşumunu uyaran faktörlerin salınımına neden olduğunu göstermiştir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) neovaskülarizasyon ve kanser progresyonunda kritik role sahip bir anjiogenik faktördür. Vasküler endotelial büyüme faktörü regülasyonunda en önemli etken hipoksi olup hipoksi araşidonik asitten PGE2 dönüşümünü sağlayan Cox-2'yi de artırmaktadır. Prostaglandin E2, (HIF)-1 alfa'nın (hipoksi inducible factor) sitozolden nükleusa taşınmasına, VEGF'nin transkripsiyonunun indüklenmesine neden olmaktadır (91).

Cyclooxygenase'ın araşidonik asidi metabolize etmesiyle bazı mutajenler oluşmaktadır. Araşidonik asidin oksidasyon ürünleri örneğin melandialdehit oldukça reaktif olup bu madde DNA'da hasara yol açabilmektedir (91).

Tümör hücrelerinde Cox-2 aşırı salınımı olduğunda, PG düzeyi artar ve hücreler daha invaziv hale gelirler. Yapılan bazı çalışmalarda Cox-2 ekspresyonu ile matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) arasında ilişki bulunmuştur. Matriks metalloproteinaz-2 bazal membranın kollajen matriksini sindirmekte ve tümör hücrelerinin dokudaki invazivliğini arttırmaktadır (91, 105).

Cyclooxygenase-2, hücre proliferasyonu, mitoz, hücre adezyonu, apoptozis, immünsüpresyon ve anjigenezis üzerinde etkileri ile malign transformasyon ve tümör progresyonunda yer almaktadır. Cyclooxygenase-2 düzeylerinin artması bazı meme kanserlerinde kötü prognozla ilişkilidir. Bilindiği gibi NSAİ ilaçların hedefi cyclooxygenase (Cox) enzimidir. Düzenli olarak bu ilaçların kullanımının meme kanserine karşı koruyucu etki oluşturabileceğini öne süren epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Benzer biçimde bu ilaçların kolon, akciğer gibi diğer tümörlerde potansiyel koruyucu ajan olarak etki edebileceği belirtilmiştir (91).

2.6.2.4. P53

Lane ve Crawford tarafından 1979 yılında, daha sonra Liozer ve Levine tarafından Simian virus 40'un büyük transformasyon antijeniyle (SV40T antijeni) sıkı bir kompleks oluşturmuş bir fosfoprotein olarak tanımlanan P53 geni hala kanser patogenezinde en çok çalışılan genlerden biridir (56, 60).

Onyedinci kromozomun kısa kolunda lokalize P53 tümör süpresör geni 393 amino asitten oluşan P53 proteinini kodlar. Bu protein aracılığıyla DNA replikasyonu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü düzenler. Yabancıl tip P53 immunoreaktivitesi genellikle normal hücrelerde görülmemektedir. Çünkü ubiquitin aracılı proteolizis nedeniyle proteinin yarılanma ömrü (20 dakika) kısalmakta ve saptanabilir birikim olmamaktadır. Deoksiribonükleik asit (DNA) radyasyon, UV ışınları ve mutajenik kimyasallarla hasarlandığında P53 proteini stabil hale gelir ve nükleusta birikir. Biriken vahşi P53 DNA'yı bağlar, hücre siklusu duraklaması ve apoptozise aracılık eden birkaç genin transkripsiyonunu uyarır. Tümör protein 53'ün uyardığı hücre siklusu duraklaması G1 fazının geç döneminde ortaya çıkar. Bu duraklama hasarlı DNA'nın onarımı için hücreye zaman kazandırır. Eğer onarım olmazsa P53 apoptozis yoluyla hücreyi ölüme götürür. Bu nedenle P53'e "genomun gardiyanı" denmektedir (56, 76).

Tümör gelişiminde P53 tümör süpresör geninde mutasyonlar ve allelik kayıplarla fonksiyonunun inaktive olması önemli rol oynar. Birçok olguda P53 genindeki mutasyonlar, bir bazın diğeri ile yer değiştirmesiyle gelişen "missense" mutasyonlardır. Bu mutant proteinler hücre siklusunda birikir ve immunohistokimyasal olarak saptanabilir.

Mutasyona uğramış ya da inaktive olmuş P53 genini içeren hücrelerde, bölünme sırasında duraklama ve apoptozis gerçekleşmeyeceği için hasarlı DNA replikasyona uğrar ve mutasyon kalıcı hale gelir. Tümör protein 53'ün fonksiyon kaybı diğer mutasyonlara da zemin hazırlar ve malign klonlar üretilir. Son yıllardaki moleküler çalışmalar meme, akciğer ve kolon kanserlerinde P53 geninde nokta mutasyonların da bulunduğunu göstermektedir (1, 76).

Tümör protein 53'ün tümörlerdeki yaygınlığı malignite belirleyicisi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu da immunohistokimyasal yöntemle tümör

hücrelerindeki mutant P53 proteininin aşırı miktarlarının saptanması temeline dayanır. Vahşi tip P53'ün tümör süpresör fonksiyonunun kaybı ile tümörün radyoterapiye ve kemoterapiye direnç kazanması ya da kötü prognozlu olması arasında ilişki saptanmıştır (1, 76).

2.6.2.5. Ki-67

Gerdes ve arkadaşları tarafından 1984 yılında saptanan Ki-67, hücre siklusuna özgü antijenlerin önemli bir örneğidir (8, 29). Onuncu kromozomun uzun kolunda lokalize bir gen tarafından kodlanan, 345 ve 395 kd ağırlığında ki ayrı bölümden oluşan bu protein siklusa girmeyen hücrelerde bulunmazken, siklustaki hücrelerin G1 fazında artarak geç G1, S, G2 ve M fazlarında eksprese edilir (8, 29).

İmmunohistokimyasal yöntemlerle dondurulmuş kesitlere ve/veya parafin bloklara uygulanabilen Ki-67 antijenine karşı geliştirilmiş MIB-1, MIB-2 ve MIB-3 monoklonal ve poliklonal antikolar tümörlerin proliferasyon aktivitesini belirlemek için kullanılır. Antijen Ki-67 ile nükleer boyanma gösteren tümör hücrelerinin tüm tümör hücrelerine oranı yüzde olarak belirlenip Ki-67 proliferasyon indeksi saptanır. Genel olarak Ki-67 proliferasyon indeksi yüksek olan tümörlerin daha agresif seyrettiği gözlenmektedir (8, 24).

Meme kanserlerinde yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi yüksek histolojik derece, hormon reseptörlerini yokluğu, büyük tümör boyutu ve lenf düğümü metastazı gibi kötü prognostik faktörlerle de ilişkilidir (59, 68, 76, 95, 109).

2.6.2.6. C-ERB B-2 (HER2/NEU)

Tirozin kinaz aktivitesine sahip, epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinden bir onkogen olan C-ERB B-2 17q21'de lokalize ve 185 kd ağırlığında bir transmembran glikoproteini kodlar (95). Bu genin amplifikasyonu ve/veya aşırı ekspresyonu meme karsinomu patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda C-ERB B-2 ekspresyonu immunohistokimyasal ya da FISH (flourescent in situ hibridization) ile tespit edilebilmektedir.

Büyüme faktör reseptörleri transmembran proteinlerdir. Dışta ligand bağlayan grubu içte ise tirozin kinaz grubu bulunur. Normal koşullarda büyüme faktörlerinin

bağlanması ile bu reseptörlerin tirozin kinaz grubu geçici olarak aktive olur ve mitozda etkili bazı faktörlerin fosforilasyonu gerçekleşir. Bu genin amplifikasyonu sonucu hücre ortamında az miktarda bulunan büyüme faktörünün etkisine son derece duyarlı hale gelmektedir (95, 109).

Bu onkogenin amplifikasyonu tüm meme kansinomlarının %20-40'ında bulunduğu bildirilmiştir (95). Yüksek histolojik derece, aksiler lenf düğümü metastazı ve metastatik lenf düğümü sayısı C-ERB B-2 ekspresyonu ile ilişkilidir. Östrojen ve progesteron reseptörleri ile de ters orantılıdır (68, 76, 109).

Son yıllarda C-ERB B-2 ekspresyonu bulunan olgularda C-ERB B-2'nin ekstrasellüler kısmını bağlayan, insan monoklonal antikoru olan trastuzumab ile tedavide yararlı etkiler elde edilmiştir (95).

2.6.2.7. Östrojen ve Progesteron Reseptörleri

Pubertede meme büyümesi östrojenin doğrudan etkisine bağlıdır. Östrojenler memenin hem yağ oranını artırarak hem de bezlerin proliferasyonuna yol açarak memede büyüme sağlamaktadır. Östrojen özellikle duktusların ve stromanın gelişimini artırırken, progesteron daha çok asinusların gelişimine neden olmaktadır (109).

Östrojen reseptörü meme gelişimi, büyümesi ve diferansiyasyonunda rol alan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. Östrojen ve progesteron reseptörleri intrasellüler proteinler olup, konsantrasyon değişimine bağlı olarak dolaşımdan hücre içine alınan hormon molekülüne seçici olarak bağlanır ve hormon-reseptör kompleksini oluştururlar. Aktive olan hormon-reseptör kompleksi nükleus içinde hormon yanıt elementleri olarak adlandırılan DNA dizilerine bağlanır ve hormon aktivitesini sağlayan transkripsiyonu gerçekleştirir.

Meme kanserlerinde östrojen ve progesteron hormonları mutajenik ve ilerletici etki yapmaktadır. Bu etkiler reseptörler tarafından düzenlenmektedir.

Meme kanserlerinde hormon reseptörlerini göstermenin iki önemli yolu bulunmaktadır. Bunlar frozen kesitlerde ligand bağlama yolu (LBA) ve immunohistokimyasal boyamadır. Son yıllarda immunohistokimya daha tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. İmmunohistokimyasal yöntemle östrojen ve progesteron reseptörü ile nükleer boyanma gözlenmektedir (76, 109).

Östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği meme kanserli olgularda tamoksifen ile tedavi olanağı sağlamaktadır ve 5 yıllık tamoksifen kullanımından sonra rekürrens ve ölüm oranlarında azalma gözlenmektedir.

2.7. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar; DNA dizisinde bir değişim içermeyen ve hücre döngüsü boyunca gerçekleşen kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik değişiklikler; genetik modifikasyonlardan farklı olarak geri dönüşebilme potansiyellerine sahip olma, genomda yakındaki bir diğer gen grubunu etkileyebilme ve çevre ile modifiye edilebilme gibi ortak özelliklere sahiptirler (26).

Epigenetik değişiklikler; Histon modifikasyonları, RNA aracılı gen susturulmaları ve DNA metilasyonu olarak 3 temel grupta toplanır (87).

2.7.1. Histon Modifikasyonları

Histonların post-transkripsiyonel modifikasyonları, metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubikütinasyon/sumolasyon ve ADP-ribozilasyonudur (64).

Metilasyon: Histonlarda Lizin ve Arjininin azot atomlarında post-translasyonel olarak gerçekleşen kovalent bir modifikasyondur. Histon H3 ve H4'te birkaç rezidüde meydana gelen Lizin metilasyonu; transkripsiyon aktivasyonu boyunca nükleozom değişikliklerini sağlayan "Chromatin Remodeling"e neden olur. Arjinin metilasyonu ise çeşitli genlerin transkripsiyonel aktivitesi ile ilişkili olup, bu aktivasyonun histon asetilasyonu ile olan birlikteliği gösterilmiştir (100).

Asetilasyon/deasetilasyon ile kromatin katlanmalarının değişimi ve transkripsiyon koregülatörler için spesifik bağlanma yüzeylerinin oluşumu sağlanarak gen ifadesi düzenlenir. Histonların asetilasyonu, transkripsiyon faktörleriyle promotora özgü gen ifadesinin aktivasyonunu sağlar. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu; Histon Asetil Transferaz (HAT) ile Histon Deasetilaz (HDAC) enzimleri ile regüle edilir (23).

Fosforilasyon: Kovalent bir post-translasyonel modifikasyon olan bu mekanizma için fosforillenecek olan başlıca substrat histon H3'tür. Histon H3'ün amino

terminalinde bulunan 10. pozisyonundaki Serin'in fosforillenmesi, perisentrik heterokromatinde, kromozom kondensasyonunun başlatılması için gereklidir (100).

Ubikutinasyon ve Sumolasyon: Histon Lizin rezidülerinin amino grubu ubikutin ve ubikutin benzeri proteinler (SUMO) yoluyla modifiye edilebilir. Histon ubikutinasyonu genellikle artan gen ifadesiyle ilişkili iken, Histon sumolasyonu ise azalmış gen ifadesi ile ilişkilidir (100).

ADP-Ribozilasyonu; DNA hasarına karşı oluşan hücrel cevaplarda yer alan post-translasyonel bir modifikasyondur. Negatif yüklü poli-ADP-riboz zincirinin, DNA ile histonlar arasındaki etkileşimi azaltarak, kromatinde bölgesel açılmalara neden olduğu düşünülmektedir (75).

2.7.2. RNA Aracılı Gen Susturulması

Antisense transkript, kodlanmayan RNA ve siRNA'lar olarak çeşitli formlarda bulunan RNA; histon modifikasyonu ve DNA metilasyonunu kolaylaştırarak, gen ifadelerinin susturulmasını indükleyebilir (87).

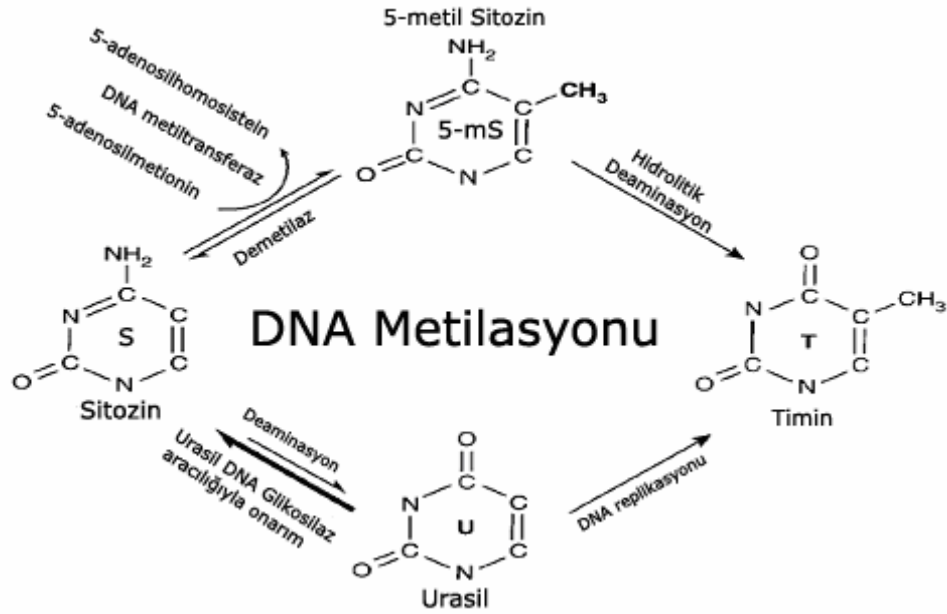
Promotor bölgelerinde CpG adacıklarını hedef alan kodlanmayan (Non-Coding) RNA, gen ifadesinde etkili olan DNA ve Histon Metilasyonu ile birliktelik göstererek etki eder. Ancak, transkripsiyonel aktivite açısından non-coding RNA'nın etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir (23). Küçük müdahaleci RNA (siRNA) (Small Interfering RNAs) ise mRNA degradasyonunun hedeflenmesi yoluyla genlerin sessizleştirilmesinde etkin olan bir molekül olarak tanımlanmıştır (64). Bu RNA'nın, gen aktivasyonunun fizyolojik regülasyonu ve immün savunma olmak üzere iki önemli işlevi vardır (110). Ribonükleik asit interferansın akciğer ve meme kanser hücrelerinde, DNMT1 protein ekspresyonunu "downregüle" ettiği tespit edilmiştir (64).

2.7.3. DNA Metilasyonu

İnsanda başlıca epigenetik değişiklik, CpG dinükleotitleri içinde bulunan sitozinlerin metilasyonudur (25). Bazı memeli genleri, DNA dizilerindeki metilasyonla sessizleştirilir. Ayrıca, memeli genomunun büyük bölümü bu yolla işaretlenir (imprint) ve DNA metilasyonu sıklıkla heterokromatin bölgelerde görülür (116). Epigenetik bir

mekanizma olan genlerin CpG adacıklarının metilasyonu, kanserde gen susturulmalarında; gen delesyonu ve gen mutasyonları ile eşit öneme sahip olarak görülmektedir (66).

Ökaryotlarda DNA metilasyonu; sitozin halkasının 5. pozisyonundaki karbonuna metil grubunun (-CH₃) eklenmesiyle meydana gelir (Şekil 2.1.). Memeli hücrelerinin genomik DNA'larının yaklaşık olarak %3-5'inde sitozin rezidülerinde metilasyon görülmektedir. Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon, DNA replikasyonundan sonra meydana gelir ve bu olay DNMT1 (DNA metiltransferaz) enzimi tarafından katalizlenir. Deoksiribonükleik asit metiltransferaz enzimi, genomik DNA'daki CpG dinükleotidlerini (CpG adacıkları) substrat olarak kullanır (72). Memeli DNMT1 enzimi, DNA'daki hemimetile bölgelere karşı yüksek afiniteye sahip olmasına karşı ayrıca metile olmamış bölgelerde de *de novo* metilasyona neden olabilmektedir (103). Deoksiribonükleik asit metiltransferaz, ilk kez kolon kanserlerinde bildirilmiş olup, artan ekspresyon miktarından dolayı DNA metilasyon profilini değiştirdiği gösterilmiştir (66).



Şekil 2.1. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-metilsitozin mutagenesi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi (103).

2.7.3.1. CpG Adacıkları

İnsan genomunda CpG dinükleotidince zengin bölgelere CpG adacıkları denir. Bu adacıklar, genellikle tüm normal dokularda metile değildir ve genlerin 5' ucunda (promotor, ifade edilmeyen bölge- UTR, ekzon- 1) bulunur (25).

Bu adacıklar ilk olarak, restriksiyon enzimi HpaII için kesim bölgesine sahip kısa genomik DNA bölgeleri olarak tanımlanarak, "HpaII Tiny Fragment (HTF) adacıkları" olarak adlandırılmıştır. Genomun yaklaşık %2'sini oluşturan bu adacıklar 1-2 kb uzunluğunda kısa DNA bölgeleridir. Bu bölgeler, %60- 70 oranında guanin ve sitozince (GC) zengin dizilere sahiptir (66). Adacıkların metilasyon içeriği ve modeli hem türe, hem de dokuya özgüdür. Normal insan doku DNA'sında 5- metilsitozinin oranı; HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ve HCPE (High Performance Capillary Electrophoresis) ile yapılan ölçümlerde %0.75-1 olarak bildirilmektedir (25).

Genomun yaklaşık %2'sini oluşturan bu adacıklar, "housekeeping" genleri olarak bilinen temel genlerde, dokuya özgü genlerin 5'promotor bölgelerinde ve ayrıca bazı genlerin 1.ekzonlarında bulunmaktadır. İnsan genomunda bu şekilde tanımlanmış 45.000 CpG adacığı bulunmaktadır (66). Genomun yaklaşık %2'sini oluşturan bu adacıklar normalde; işaretlenmiş (imprint) genler, kadınlarda X kromozom genleri, eşey hücrelerine özgü genler ve dokuya özgü genler olmak üzere 4 durumda metiledir (25).

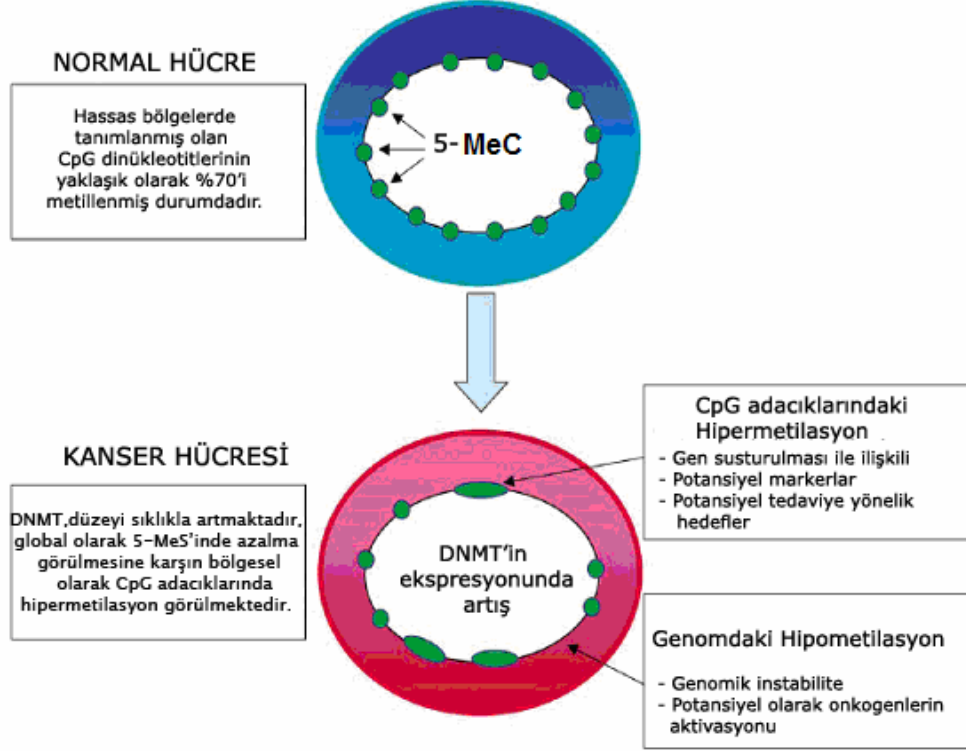
Metilasyon durumunun hücre tipine özgüllüğü, farklı malignensiler arasında sıklıkla görülür. Lösemide, CpG adacıklarındaki sitozinlerde metilasyon artışları; hipermetilasyon ve hücre tipi özgüllüğünden kaynaklanır (66).

Hipermetilasyonla gerçekleşen sessizleşme; DNA tamiri (*hMLH1*, *BRCAl*, *MGMT*), hücre döngüsü ve apoptoz (*DAPK*, *APAF-1*) gibi, hücresel iletişimdeki tüm yolakları etkiler (25).

2.7.3.2. Kanserde Metilasyon Profili

Genelde tümör baskılayıcı genlerde, metilasyonun artması, DNMT enzimlerinin yükselmesi ile birlikte gözlenir. Deoksiribonükleik asit metiltransferaz 1'in artışı, ilk kez kolon kanserinde rapor edilmiştir. Ayrıca DNMT1 aktivitesinin insan kolon kanseri dışında akciğer kanserlerinin ileri aşamasında ve lösemili hastaların olgunlaşmamış

hücrelerinde de arttığı gösterilmiştir (66). Kanserli hücrelerin DNA'sında 5-metilsitozin (5-MeC) miktarında azalma görülmektedir. Ancak bazı bölgelerde; örneğin tümör baskılayıcı genlerde, DNA hipermetilasyonu saptanmıştır. Buna karşın DNA hipometilasyonu ile de onkogen aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu değişim solid tümörlerde olduğu gibi lösemilerde de bildirilmektedir (Şekil 2.2.) (66).



Şekil 2.2. Kanserde metilasyon görünümü (40).

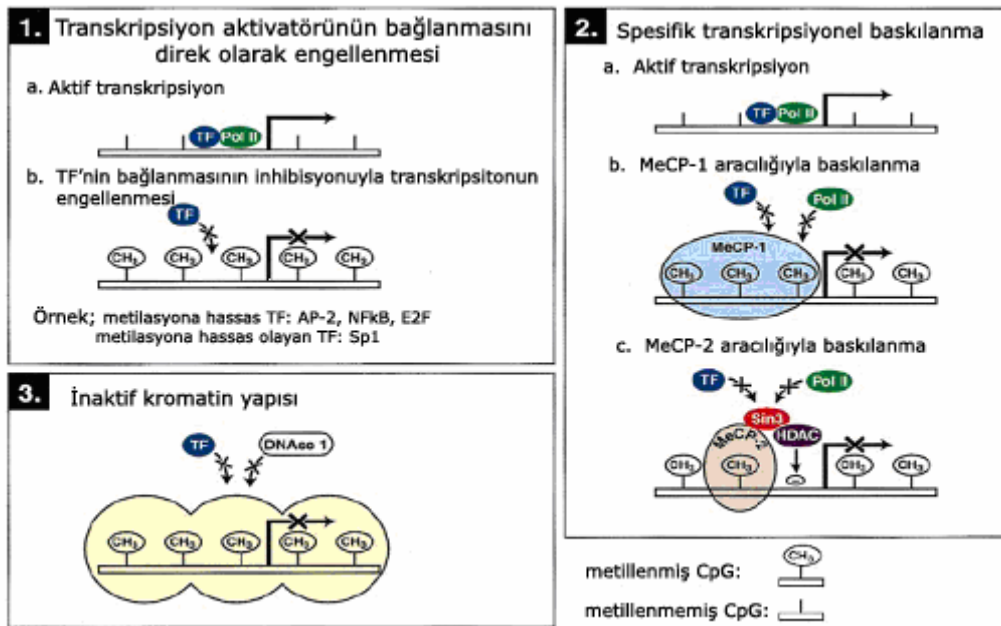
2.7.3.3. DNA Metilasyonu Aracılığıyla Transkripsiyonun Baskılanma Mekanizmaları

Transkripsiyon aktivatör faktörünün bağlanmasına direk müdahale: AP-2, C-MYC/MYN, cAMP-bağımlı aktivatör CREB, E2F ve NF-kB gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin tanıyıp bağlandığı bölgeler, CpG rezidüleri içermektedir. Bu bölgelerde meydana gelen metilasyon sayesinde transkripsiyon faktörleri bağlanamadığından transkripsiyon inhibe olur. Buna karşın, bazı transkripsiyon faktörleri (örneğin; Sp1 ve

CTF) bağlanma bölgelerindeki metilasyona duyarlı değildir ve birçok faktöründe bağlanma bölgesinde CpG dinükleotid rezidüleri bulunmamaktadır (103).

Spesifik transkripsiyonel baskılanma: Spesifik transkripsiyonel represörün, metillenmiş DNA'ya direk bağlanmasıyla meydana gelir. Bu özelliğe sahip iki faktör MeCP-1 ve MeCP-2 (metil sitozine bağlanma proteini 1 ve 2), herhangi bir dizide metillenmiş CpG rezidülerine bağlanarak inaktivasyona neden olur (103).

İnaktif Kromatin Yapısı: DNA metilasyonu, kromatin yapısında değişiklikler meydana getirerek transkripsiyonu engelleyebilir. Heterokromatin bölgelerin oluşumunda ve genomun sıkı bir şekilde paketlenmesinde DNA metilasyonu önemli rol oynamaktadır. Heterokromatin bölge içerisinde yer alan genler genellikle ifade bulamazlar (Şekil 2.3.) (103).



Şekil 2.3. Sitozin metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel susturulma mekanizmaları (103).

2.7.3.4. DNA Metilasyonunun Kanser Gelişiminde Etkilediği Mekanizmalar

Kanser hücrelerindeki C → T dönüşümü: Metile olmamış C, deaminasyon sonucu U'ye dönüşür. Ancak Urasil-DNA glikosilaz enzimi sayesinde G:U yanlış eşleşmesi tanınır ve onarılır. Bununla birlikte, DNMT enzimi bu onarımı

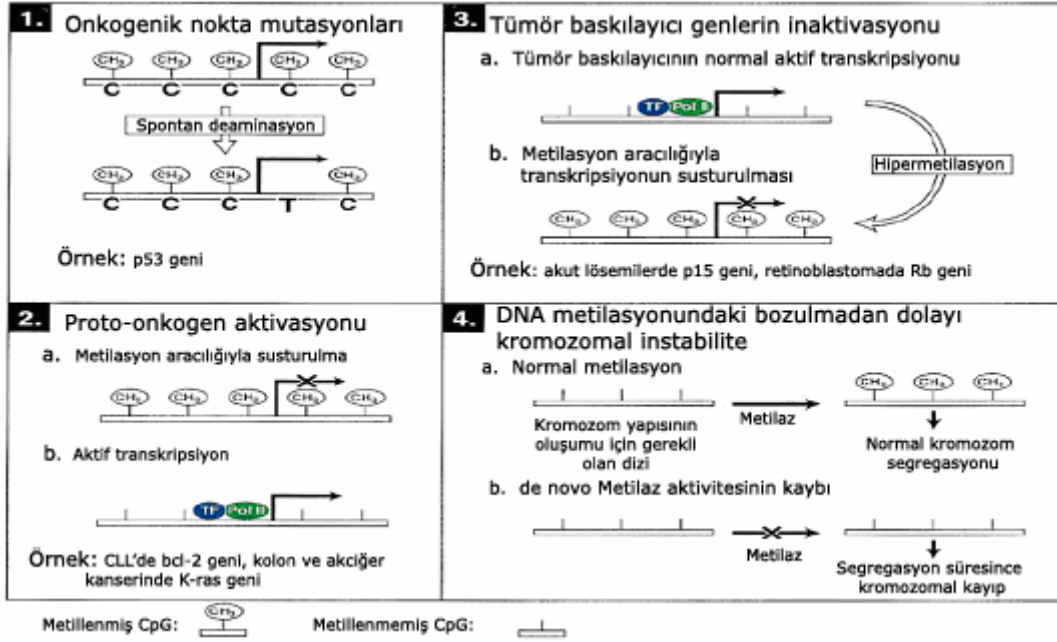
bloklamaktadır. Deoksiribonükleik asit metiltransferaz enzimi CpG adacıklarındaki sitozinlere (C) metil grubu ekler. 5MeC'in deaminasyonu sonucunda T bazı oluşur. Ancak bu dönüşüm DNA'da tanınarak onarılamaz ve böylece nokta mutasyonları meydana gelir. Bu olaya tümör baskılayıcı gen olan P53 örnek verilebilmektedir.

İnsan solid tümörlerinin %50'sinden fazlasında P53 tümör baskılayıcı geninde mutasyon görülmektedir ve bunların %24'ünü, CpG adacıklarındaki CT dönüşümü oluşturmaktadır (103).

DNA hipometilasyonu: Genomik metilasyon düzeyindeki düşüş bir diğer mekanizmadır. Bu olay sonucunda metilasyon aracılığıyla inaktifleşmiş olan genler, metilasyonun kalkması ile aktif duruma geçerler. Bunlara kronik lenfoid lösemilerdeki BCL-2 onkogeninin reaktivasyonunu örnek verebiliriz (103).

Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu: Deoksiribonükleik asit metiltransferaz1 düzeyindeki artış sonucunda, tümör baskılayıcı genler promotor dizilerindeki CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyon sonucunda inaktive olabilmektedir (103).

DNA metilasyonundaki bozulmadan dolayı kromozomal instabilite: Kanser gelişimi ve ilerleyişinde kromozomal instabilite oldukça önemlidir. Deoksiribonükleik asit metilasyonu ayrıca DNA'nın sıkı bir şekilde paketlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sıkı paketlenmeden dolayı örneğin transpozonların genom içerisinde hareket etmeleri engellenmiş olmaktadır. Ancak metilasyon kaybıyla, DNA sıkı bir şekilde paketlenemeyeceği için transpozonlar genomda rahatlıkla hareket ederek kromozomal instabiliteye neden olmaktadır. Ayrıca metilasyon paternindeki değişimler sonucunda ortaya çıkabilen DNA onarım genlerindeki anomaliler ve kromozomal instabiliteye neden olmaktadır (Şekil 2.4.) (103).



Şekil 2.4. Onkogeneizde, sitozin metilasyonunun neden olduğu mekanizmalar (103).

Deoksiribonükleik asit metilasyon belirteçleri (marker) , hem hastalığın sınıflandırılması hem de saptanması için kullanılabilir. Ayrıca her bir gen promotörünün DNA metilasyon durumunun belirlenmesi özel bir tedaviye cevabı tespit etmek için de kullanılabilir (55). Kanserdeki genetik değişikliklerin aksine epigenetik mekanizmalar geri dönüşü olabilen değişikliklerdir. Metilasyonun tersinir sürecinde, DNA'nın demetilasyonu ve sessiz genlerin yeniden etkinleştirilmesinde bazı DNA metiltransferaz inhibitörleri kullanılmaktadır.

2.8. Meme Kanserinde Metilasyon Değişikliği Görülen Bazı Genler

2.8.1. Retinoik Asit Reseptörü β

Retinoidler yapısal olarak retinol (vitamin A) ile ilişkili molekül ailesinin üyeleridir. Retinoidler hücre diferansiyasyonu, çoğalması, apoptosisi ve homeostazı gibi fizyolojik fonksiyonlarda önemli roller oynar (12).

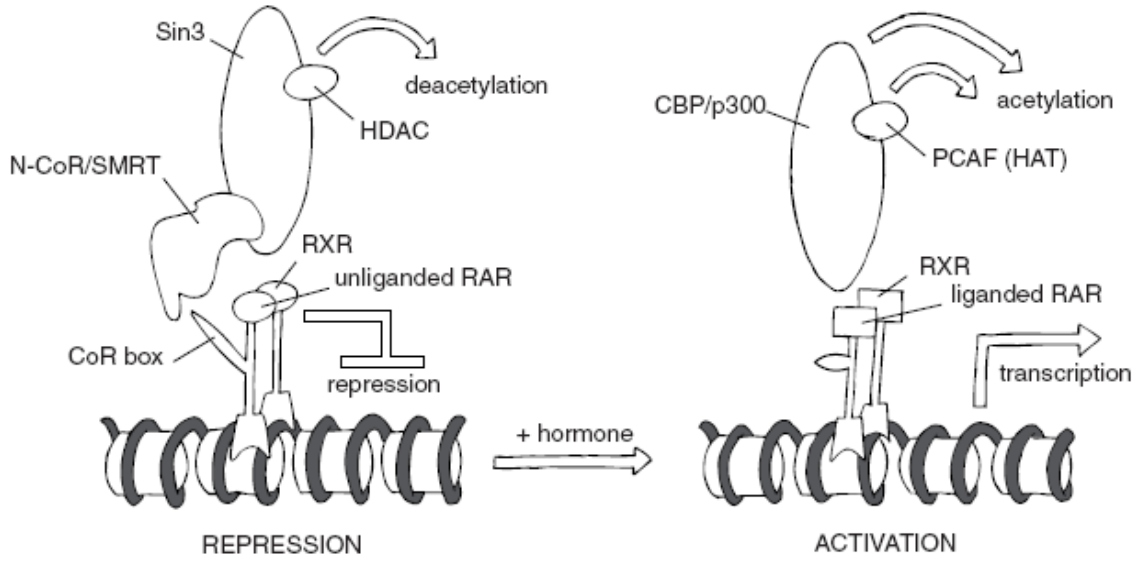
Retinoidler biyolojik etkilerini retinoik asite'e (RA) duyarlı genlerin ekspresyonuyla steroidler, D vitamini ve tiroid hormonları da dahil olmak üzere ligand'ın neden olabileceği transkripsiyon faktörleri süper ailesine ait olan nükleer

reseptörlere bağlanmak suretiyle modüle ederler (12, 69). Nükleer retinoid reseptörlerinin iki sınıfı belirlenmiştir. Bunlar retinoik asit reseptörleri (RAR'lar) ve Retinoid X reseptörleri (RXR'ler)'dir. Bu reseptörlerin her biri üç izotipten (α , β , ve γ) ve bunların izoformlarından (örneğin, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ - $\beta 4$, $\gamma 1$ ve $\gamma 2$) oluşur. Retinoik asit reseptörleri ve retinoid X reseptörleri RA sinyal yolağında önemli bir rol oynar (12, 69). Retinoik asit reseptörleri ve retinoid X reseptörleri RA'ya duyarlı genlerin promoterlarında bulunan retinoik asit tepki elementlerine (RARE'ler) bağlanması için heterodimerlerin (RAR-RXR, RXR-X, X; bir orphan reseptör) veya homodimerlerin (RXR-RXR) oluşturulması gerekir (12). Ligand bağlama sonrasında, RARE'lere bağlanan reseptörler transkripsiyonel olarak aktive edilir ve bu durum hedef genlerin transkripsiyonuna neden olur. All-Trans Retinoic Acid (ATRA) sadece RAR'ları aktive eder; ancak, ATRA'nın bir stereoizomeri olan 9-*cis*-RA hem RAR'ları hem de RXR'leri aktive eder. All-Trans Retinoik Asit'in (ATRA) diğer stereoizomeri olan 13-*cis*-RA hem RAR'lar hem de RXR'ler için daha düşük afinite gösterir (69).

2.8.1.1. Retinoidlerin Gen Regülasyonundaki Görevleri

Gen regülasyonunda büyük görevlere sahip olan nükleer retinoid reseptörleri vardır ve bu reseptörler bazı genlerin aktifleşmesi için öncü görevlere sahiptirler. Bu reseptörlere retinoidler bağlanır ve böylece gen regülasyonu aktifleşir ve gen üretimi gerçekleşir.

Ligand ile birleşmemiş yani retinoid bağlanmamış RAR, genin transkribe olmasına izin vermez. Ancak bir retinoid bağlanır ise RAR artık gen transkripsiyonuna izin verir ve gen aktif hale gelir (Şekil 2.5.). Retinoidler bu nedenle gen ekspresyonunda 1. dereceden önemlidir. Gen regülasyonunda çoğu zaman RAR ve RXR'ler birlikte görev yaparlar.



Şekil: 2.5. RAR'ın aktivasyon mekanizması (104).

Retinoik asit reseptörü β 'yı kodlayan RAR- β geni, (önceden HAP; RRB2; NR1B2 olarak da adlandırılmıştır) somatik hücre hibridizasyonu ve in situ hibridizasyon metodlarıyla 3p24 bölgesine haritalanmıştır (GenBank: X07282) (104, 108). Bu gen, şimdiye kadar 90 değişik cDNA klonuyla tanımlanmıştır 171,40 kb büyüklüğündeki gen, 12 adet GT-AG intronu içermektedir, 3.kromozom üzerinde 3p24.3 bölgesinde, 25443028-25614427 nükleotidleri arasına yerleşmiştir. Bu gen özellikle epiteliyal dokularda baskın bir ekspresyon paterni göstermektedir.

Retinoik asit reseptör β geni, P1 ve P2 promotörlerinin etkisiyle alternatif kırılma sonucu dört farklı izoform oluşturmaktadır; RAR β 1 ve RAR β 3 izoformları P1 promotöründen transkribe olmakta, RAR β 2 ve RAR β 4 izoformları ise P2 promotörünü kullanmaktadır. İnsanlarda tanımlanan üç RAR β izoformu β 1, β 2, and β 4'tür. β 1 ve β 2 izoformları nükleusta yer alırken, β 4 izoformu sitoplasmada lokalizedir (118, 119).

Retinoik asit reseptörü, ligand-bağlı transkripsiyon faktörü olarak işlev yapar. Retinoik asit reseptörü'nün birden fazla promotörü kullanabilen ve alternatif intron kesimiyle oluşturduğu ve her biri farklı genden ifade edilen α , β , and γ izotipleri ve bunların da birkaç izoformları bulunur. Diğer çekirdek reseptörleriyle de heterodimerler oluşturarak DNA'ya bağlanabilirler. Bu sinyal moleküllerindeki çeşitlilik ve bunların DNA'ya bağlandıkları özel hedef bölge polimorfizmleri, denetledikleri genlerin ifade edilmelerinde de rol oynayabilmektedir. Örneğin RAR genlerinin epigenetik

metilasyonla ifade edilmesinin engellenmesi bazı karsinomların oluşmasında etkili olabilmektedir (118, 119).

2.8.2. TWIST

Bir transkripsiyon faktörü olan TWIST geni 20,9 kDa'luk bir protein kodlar ve 7p21.2 lokalize; (GenBank:U80998), temel heliks-loop-heliks yapısına aittir. Bu gen kanserde birçok malign tümör tipinin gelişimi ve kanser gelişiminde anahtar rol üstlenir. Meme kanseri gelişiminde TWIST geninin onkojenik rolünü açıklayan birçok moleküler mekanizma vardır. Bunlardan en yaygın olan mekanizma epitelyal marker olan E-kaderinin ekspresyonunun inhibisyonudur. Epitelyal-kaderinle ilişkili olarak TWIST geni hücre-hücre yapışması ve hücre hareketliliğini artırır. Ayrıca TWIST1 promotor bölgesindeki metilasyon seviyesinde artışın meme tümöründe malign fenotiple korele olduğu görülmüştür (126).

Epitelyal meme tümörlerinin metastaz yapabilmeleri için “embriyogenezde epitelyal-mezenkimal değişimi” kontrol eden TWIST adlı bir genin gerekli olduğu bildirilmiştir (126). Bu genin diğer bir önemi ise genlerin okunup okunmamasında düzenleyici bir role sahip olmasıdır. Yalnızca metastatik meme kanserli serilerde eksprese olup non-metastatik meme kanseri serilerinde eksprese olmaması; insan tümör metastazını kontrol eden ve bu konuda bulunan ilk gen olma özelliğini kazandırmıştır. Böylece TWIST geninin eksprese olup olmadığına bakılarak tümörün metastatik özelliği hakkında yorum yapılabilmektedir (126).

2.8.3. Östrojen Reseptör Proteini Alfa (ESR α) Yapısı

Östrojen reseptör proteini alfa (ESR α) ilk olarak 1958 yılında Elwood Jensen tarafından tanımlanmış, 1986 yılında ilk kez uterus klonlanmıştır (18, 22). Bugüne kadar östrojen reseptörleri oositte, granuloza hücrelerinde ve overyum epitelyum hücrelerinde tanımlanmıştır (124). Östrojen reseptör proteini alfa 595 aminoasit içerir ve 66 kDa ağırlığındadır (5). Östrojen reseptör proteini alfa proteini amino ucundan karboksil ucuna doğru A'dan F'ye kadar isimlendirilen 6 bölgeye sahiptir (48) (Şekil 2,6).



Şekil 2.6. İnsan Östrojen reseptör α (ESR α) proteininin işlevsel bölgeleri. AF-1;Aktivasyon işlevi 1, AF-2; Aktivasyon işlevi 2 (48).

A ve B bölgeleri; çekirdek reseptör ailesi içinde oldukça değişken bir bölge olup sahip olduğu Aktivasyon İşlevi 1 (AF-1) yoluyla bir genin ifadenmesini hücreye özgün şekilde düzenlemektedir (48). Bu sayede ESR α merkez transkripsiyon aygıtının bileşenleri ile doğrudan etkileşerek hedef genleri aktive eder ya da diğer proteinlere sinyal iletiminde rol oynayan koaktivatör proteinlerle doğrudan ilişki kurar. Aktivasyon İşlevi 1 bölgesi, hücre tipi ve kontrol bölgesi içerik özgünlüğüne sahip olmakla birlikte ESR β ' da bulunmamaktadır (37).

C Bölgesi; ESR α proteininin DNA bağlanma bölgesidir. Hedef genlerin Östrojen Cevap Elementlerine bağlanmasından sorumlu olup reseptör dimerizasyonunda görev alır (48, 82).

D Bölgesi; DNA bağlanma bölgesini ligand bağlanma bölgesi ile ayıran 40-50 aminoasitlik bir bölgedir. Reseptör proteininin dimerizasyonunda görev alır aynı zamanda korepressör proteinler ile etkileşmektedir (48, 82).

E Bölgesi; Ligand bağlanma bölgesini ve Aktivasyon İşlevi 2'yi (AF-2) içermektedir. Aynı zamanda dimerizasyon ve reseptör proteinin çekirdek yerleşiminden de sorumludur. E bölgesinin C ucunda yer alan ve çekirdek reseptör süper ailesi içinde oldukça korunmuş bir yapı olan AF-2, çeşitli koaktivatörler tarafından tanınmakta olup bazı korepressörler için bir tutunma yeri görevi üstlenmektedir (48).

F bölgesi; Karboksil uçta yer alan bu bölge, ESR α proteininin gen aktivasyon kapasitesine katkıda bulunmakta ve proteininin dimerizasyonu ve kofaktör bağlanmasında da etki göstermektedir (5).

2.8.3.1. ESR α 'nın Aktivasyonu

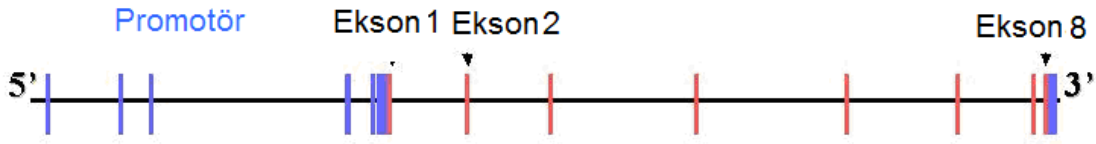
Östrojen reseptör proteini alfa'nın aktivasyonu ligand (östrojen) bağımlı ve ligandtan bağımsız olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Östrojen bağımlı aktivasyon durumunda reseptör proteini, DNA bağlanma bölgesini kapatan ve reseptörü inaktif bir pozisyonda tutan şaperonlar ile bağlıdır. Reseptöre östrojen bağlanması durumunda reseptör proteini Hsp 90, Hsp 70 ve diğer proteinlerden ayrılıp konformasyonel değişiklikler geçirerek dimerizasyon oluşur ve bu şekilde sitoplazmadan çekirdeğe geçer (31, 37). Reseptörün ligand bağlanması ile aktive olmasını reseptörün inaktif durumunda bağlı olduğu Hsp 90 şaperonunun ATP'yi hidrolize etmesi tetiklemektedir. Bu durumda östrojen reseptör dimeri DNA üzerindeki Östrojen Yanıt Elementi ile etkileşime girer ve hücrel transkripsiyon kompleksi diğer bileşenleri ile etkileşir (50). Amino uçta yer alan AF-1 ve ligand bağlanma bölgesinde yer alan AF-2'nin birbirleriyle etkileşimleri sonucu doku, hücre ve kontrol bölgesine özgü olan yardımcı düzenleyici kompleksler hedef gen bölgesinde toplanarak hedef genlerin aktivasyonu veya baskılanması yönünde etkilerini gösterirler (37, 50).

Östrojen reseptör proteini alfa'yı da içeren tüm steroid reseptör proteinleri kendilerine özgü ligandların bağlanmasından sonra fosforile edilirler. Steroid hormon reseptörlerinin fosforilasyonu reseptörün gendeki kendi yanıt elementine bağlanmasında ve bundan sonra gerçekleşen transkripsiyonun aktivasyonunda önemli bir rol oynar (41). Genel olarak AF-1 bölgesindeki serin aminoasitlerinin fosforilasyonu koaktivatör toplanmasını arttırmakta ve ESR α aracılı transkripsiyonun artışıyla sonuçlanmaktadır. Serin 236 fosforilasyonu, reseptör dimerizasyonunda ve DNA'ya bağlanmada rol oynamaktadır (13).

Östrojen reseptör proteini alfa'nın ligand bağımsız aktivasyonu ise hücrel kinaz ve fosfatazların aktivitelerini değiştiren moleküler yollarla gerçekleşmektedir (18). Östrojen yokluğunda farklı sinyallerle aktifleşen kinazların aktive olması ile östrojen reseptörü geri dönüşümlü olarak fosforile edilip aktivasyonu sağlanır (50). Bu mekanizma özellikle büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler gibi hücre dışı sinyal moleküllerinin yerel konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda ve erkeklerde veya menopoz sonrası kadınlarda olduğu gibi serum östrojen konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda etkili olabilmektedir (80).

2.8.3.2. Östrojen Reseptör Geni

Östrojen reseptör proteini alfa ($ESR\alpha$) ve östrojen reseptör proteini beta ($ESR\beta$) sırasıyla $ESR1$ ve $ESR2$ genlerinden ifadelenmektedir (54). Östrojen reseptör 2 ($ESR2$) geni 14. kromozomda (14q23.2) 40 kb'lık bir bölgeyi içermektedir. Östrojen reseptör 1 ($ESR1$) geni, 6. kromozomda (6q25) 140 kb'lık bir bölgeyi kapsar ve 8 ekson, 7 intron içermektedir (Şekil 2.7). Eksonlar sırasıyla 684, 191, 117, 336, 139, 134, 184 ve 4537 bç (toplam 6322 bç) büyüklüğündedir (3, 115).



Şekil 2.7. İnsan östrojen reseptör α geni intron ve ekson bölgeleri (48).

Östrojen reseptör proteini alfa geninin transkripsiyonu karmaşıktır ve bir kaç tane kontrol bölgesinin aktivitesi rol almaktadır (101). Östrojen reseptör proteini alfa'nın da yer aldığı çekirdek reseptör ailesinin diğer üyelerinden elde edilen bulgular, çoklu kontrol bölgelerinin, steroid hormon reseptörlerinin ortak bir özelliği olduğunu göstermektedir. İnsan $ESR\alpha$ geninin, en az 7 kontrol bölgesine bağlı 7 çeşit mRNA transkripsiyonu yapılmaktadır. Bu kontrol bölgelerinin bazıları reseptörün ligandı olan östrojenle düzenlenmektedir. Çoklu kontrol bölgelerinin en önemli olası işlevi, kontrol bölgelerinin dokuya özgün düzenlenmesi ve dokulardaki farklı mRNA varyantlarının ifadelenmesinin düzenlenmesinde iş görebileceğidir. Örneğin normal meme ve uterin dokusunda kontrol bölgesi A, kontrol bölgesi B'ye oranla daha az kullanılmaktadır. Farklı kontrol bölgeleri gelişimin farklı aşamalarında kullanılabilir. Sıçan embriyonik gelişiminde $ESR\alpha$ mRNA varyantlarının düzeylerinde farklılıkların olduğu belirlenmiştir (51).

Çoklu kontrol bölgesi mekanizmasının diğer bir işlevi de farklı kontrol bölgelerinden üretilen mRNA'ların farklı alternatif intron çıkartılması ve ekson birleştirilmesi işlemine (alternatif splicing) uğrayabileceği ve bunun da çeşitli protein

izoformlarını kodlayan mRNA'larla sonuçlanabileceğidir. Bu sayede ESR α 'nın farklı mRNA işlenmesine uğramış formları tanımlanmıştır (51).

2.9. KUANTİTATİF REAL-TİME PCR YÖNTEMİ

Bilim ve tıp alanındaki çalışmalar, nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniği sunmayı başarmıştır: Real-time PCR tekniği. Bu teknik seksenli yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PCR'in ileri bir versiyonudur. Klasik PCR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz etmek için çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte sonrasında ürün miktarını net olarak belirlemek de oldukça güçtür. Çünkü klasik PCR, başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak bir ürün miktarı ortaya çıkarır. Ancak bu durum Higuchi ve arkadaşlarının 1992 yılında Real-Time PCR'ı geliştirmesiyle çözüme ulaşmıştır. Real-Time PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süreci boyunca, oluşan ürünün miktarını Real-time PCR sırasında gözlemek mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağını takip edilebilmesi, Real-time PCR'ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinden tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkân reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü flörsan işaretli probler ile sağlanır (52, 120).

2.9.1. Kuantitatif Real-Time PCR metodları

Mutlak kuantifikasyon (Absolute Quantification): Hedefin konsantrasyonu mutlak değerler olarak ifade edilir. Mutlak kuantifikasyon konsantrasyonları önceden bilinen seri olarak dilüe edilmiş eksternal standartların kullanımıyla oluşturulan standart bir eğri yardımıyla yapılır. Konsantrasyonları bilinmeyen örneklerin konsantrasyonlarının belirlenmesi crossing points (Cp) değerlerinin belirlenmesi ile sağlanır (Cp değeri, PCR içindeki her bir eğriye ait PCR ürünü miktarını gösterdiği varsayılan, bir örneğin PCR amplifikasyonuna başladığı noktayı ifade eder).

Rölatif kuantifikasyon (Relative Quantification): Hedefin konsantrasyonu hedefin belli bir referansa oranı olarak ifade edilir. Bu metot ile hedef ve referans genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur (70).

2.9.2. Real-Time PCR için kullanılan proplar

Tüm Real-Time PCR sistemleri, reaksiyondaki PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir flörsan boyadan alınan boya miktarı arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışır. Flörsan boya miktarının ölçümü esasına dayanan bu sistemlerde belli bir diziyeye bağlı kalmadan tüm çift iplikli DNA molekülüne bağlanan flörsan boyalar ya da belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziyeye bağlanabilen oligonükleotit hibridizasyon propları kullanılır.

Dizi spesifik olmayan flörsan boyalar: Bu tip boyalar çift iplikli DNA'nın tamamına bağlanabilme özelliği taşıyan etidyum bromid benzeri boyalardır. Real-Time PCR sistemlerinde kullanılan boya SYBR Green I'dir. SYBR Green I, onun emisyon özelliğini önemli ölçüde arttıran bir solüsyon içerisinde bulunduğunda DNA molekülüne bağlanır. PCR boyunca amplifiye olan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak SYBR Green I'in sinyali artacaktır.

Dizi spesifik flörsan proplar: Real-time PCR'larında oldukça yüksek hassasiyete sahip floroforlar ile işaretli dizi spesifik proplar da kullanılabilir. Reaksiyon içerisinde sadece spesifik hedef mevcut ise flörsan artışı gözlenir. Bu reaksiyonlarda ürünün belirlenmesi için melting curve analizine genellikle ihtiyaç duyulmaz. Bu hassas dizi spesifikliğinden dolayı primer dimerleri gibi ürünlere bağlı ekstra görüntüler elde edilmeyecektir. Buna rağmen reaksiyon sırasında bu tip görüntülerle karşılaşılabilen ve bu durum PCR hassasiyetini ve verimliliğini düşürmektedir.

Dizi spesifik flörsan proplar da yapılmak istenen çalışmaya göre çeşitlilik gösterir:

Simple Probe Format: Tek işaretli probalar, mutasyon ve tek nükleotit polimorfizmlerinin (SNP) taranmasında kullanılan, basitçe dizayn edilmiş hibridizasyon problemlerinin özel bir tipidir. ‘Simple Probe Format’ olarak adlandırılan bu problemler, sadece bir floroforla işaretlenmiş ve sadece bir hibridizasyon probuna ihtiyaç duyan dizi spesifik problemlerdir. Bir prob, SNP’yi içeren hedef diziye hibridize olacak şekilde spesifik olarak dizayn edilir. Hedef diziye bir kez hibridize olmasıyla, hibridizasyon olmadığı durumda Simple Probe çok miktarda flöresan emer. Sonuç olarak bu problemler, flöresan miktarındaki değişikliklerin, sadece problemin hibridizasyon düzeyine göre belirleme prensibine bağlı olarak dizayn edilir.

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ile dizi spesifik prob kullanımı:

Çoğu dizi spesifik prob formatları “FRET” olarak adlandırılan teknolojiye dayalı olarak dizayn edilir. FRET, flöresan ile işaretli (flöresein gibi) bir molekülün enerjisinin, bir diğer komşu flöresan moleküle aktarılması prensibine dayanır. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) için sağlanması gereken temel koşullar vardır.

- Birbirlerine oldukça yakın konumlanmış verici (donor) ve alıcı (acceptor) moleküller
- Alıcının uyarım spektrumu, vericinin yayılım spektrumu örtüşmelidir.
- Alıcının ve vericinin dipol yerleşimi neredeyse paralel olmalıdır.

Hibridizasyon Probe Format: Hibridizasyon prob formatı özel olarak dizayn edilmiş iki oligonükleotit dizisi kullanır. Yakın pozisyonda hibridize olan bu oligonükleotitler PCR’ın bağlanma basamağı boyunca amplifiye olan fragmenti içerisindeki dizilerdir. Verici problemin 3’ucu flöresein gibi flöresan bir boya ile, alıcı problemin 5’ucu ise florofor gibi farklı bir flöresan boya ile işaretlenir. İki oligonükleotit PCR’ın bağlanma basamağı sırasında hedef üzerinde yer alan komşu bölgelere bağlandığı zaman bu işaretler birbirlerine yakın konumlanır. Fluorescence Resonance Energy Transfer’in oluşması ancak böyle bir yerleşimle mümkün olmaktadır. Birinci prob üzerindeki verici boyanın enerjisi ikinci hibrid prob üzerindeki alıcı boyayı uyarır.

Bunu takiben farklı dalga boylarında flörsan ışık salınımı gerçekleşir ve Real-Time PCR sistemi bu salınan ışık miktarını belirler. Salınan bu flörsan miktarı PCR boyunca oluşan hedef DNA miktarı ile orantılıdır. Hibridizasyon prob formatı kuantifikasyon için, melting curve çalışmalarında, mutasyon saptama ve SNP analizleri için uygundur.

Hydrolysis Probes (TaqMan): Bu problemlerin kullanımında Taq Polimeraz'ın 5'→3' aktivitesinden faydalanılır. Taq Polimeraz'ın 5'→3' aktivitesi ile hidroliz problemleri hidrolize olduğu zaman problemler flörsan yayılımı yapar. Bu yöntem prensip olarak spesifik hedef DNA dizisinin artışı belirleyen 3' yönünde uzama yapmayan tek bir problemin bağlanması kullanır. Bu tek prob flörsan özelliğe sahip hem raportör (reporter) hem söndürücü (quencher) özellikte boyaya sahiptir. Söndürücü boya, raportör boyaya, raportör boyanın flörsan sinyalini baskılayabilecek kadar yakın konumlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu boyunca polimerazın 5' nükleaz aktivitesi probu keser, raportör ile söndürücü ayrılır ve raportör boyanın flörsan salınımına izin verir. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünün artışı söndürücü boyanın artışı ile direkt olarak izlenebilir. TaqMan PCR yönteminde amplifikasyon sonrası tüm problemler parçalanır. Bu melting curve analizine izin vermez. Bu sebeple bu tip çalışmalar mutasyon ve SNP taraması için farklı deneysel yöntemlere ihtiyaç duyar (94).

Kuantitatif Real-Time PCR teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan, uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren, hassasiyeti iyi olan bir uygulamadır. Farklı dilüsyon oranlarında hazırlanmış standart eğrilerin kullanımı ile örnekler ve deneyler arasında karşılaştırma imkânı sağlayan, internal standartlar yardımı ile de başlangıç miktarı farklılığından kaynaklanacak problemlere son veren yüksek verimde sonuçlar sağlamaktadır. Pek çok uygulaması kanser araştırmaları için fırsat yaratmış olmasıyla birlikte, tümör davranışıyla ilgili araştırmacıya ve klinisyene büyük ölçüde bilgi sağlamaktadır (70).

2.10. High Resolution Melting (HRM) Analizi

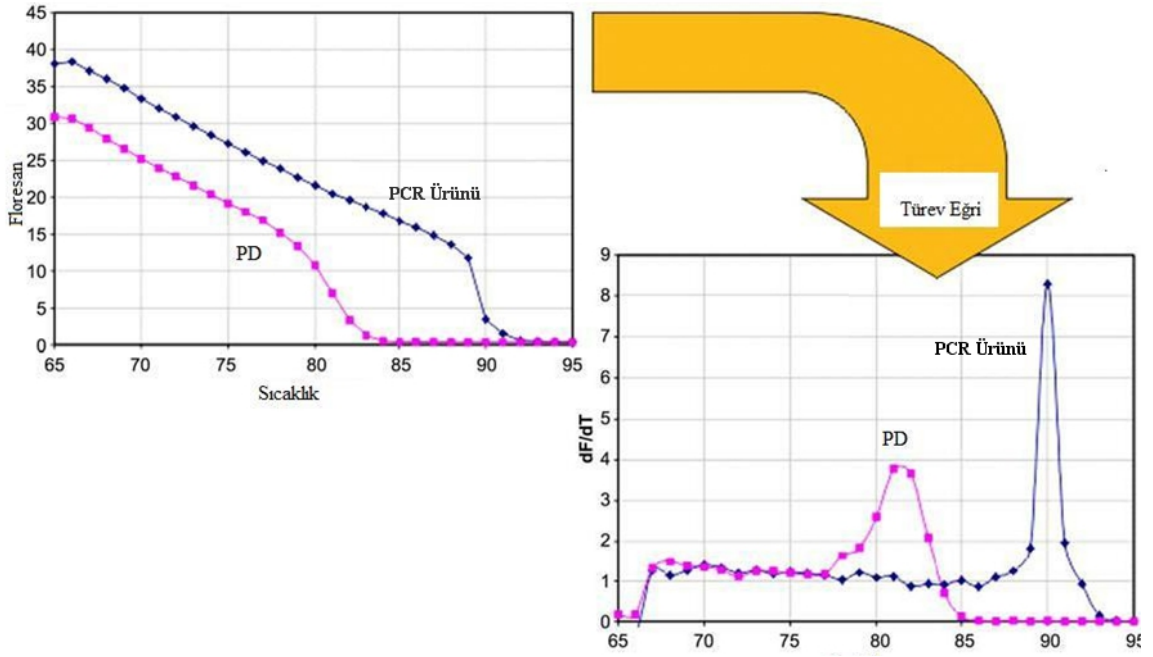
Deoksiribonükleik asit'in keşfini takip eden yıllarda, DNA çift zincirinin denatürasyonu, klasik ultraviyole (UV) spektrofotometrelerde absorbans değişimi takip edilerek incelenmekteydi (99). On yılı aşkın süredir ise, PCR ürünlerini ve bu ürünlerin denatürasyonlarını görüntülemek için hızlı floresan yöntemleri geliştirilmektedir (93).

Bu yöntemlerin önemi, cihazlardaki teknolojik ilerlemeler ve yeni floresan boyalar nedeniyle her geçen gün artmaktadır (40). Yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi, real-time PCR'nin kullanıma girmesi ile birlikte 1997'de geliştirilen bir yöntemdir (58, 93). Mutasyon taraması ve genotiplendirme başta olmak üzere genetik haritalama, asosiyasyon çalışmaları, aday gen taraması, DNA metilasyon analizi gibi birçok çalışmada kullanılabilir. Uygulaması kolay ve hızlı bir yöntemdir (16). Yöntemi uygularken, standart PCR bileşenlerine ve çift zincirli DNA'nın varlığında floresan sinyal veren boyalara ihtiyaç duyulmaktadır (74). Çünkü bu boyaların yardımıyla DNA denatürasyonu takip edilebilmektedir. Artan sıcaklığa karşılık, çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılması ile floresan sinyal şiddetinde azalma meydana gelmektedir (93). Florometrik cihazlar, sıcaklık artışına bağlı olarak değişen bu sinyal şiddetini görüntüleyecek şekilde tasarlanmıştır (74). Yüksek çözünürlüklü erime'nin (HRM) gücü, cihazın sıcaklık kontrolüne, sıcaklık ve floresan ölçümüne, floresan boyalara ve PCR ürününün saflığına bağlıdır (40, 74, 122). Cihazın sözü edilen faktörlerden kaynaklanan yüksek çözünürlük kapasitesi, hassas ölçüm sağlamaktadır. Hassas ölçüm, artan her 0,1-1,0 derece (°C) sıcaklığın neden olduğu floresan sinyal şiddeti değişiminin kayıt edilebildiğini ifade etmektedir. Bu durum, DNA denatürasyonunun çok iyi takip edildiğinin bir göstergesidir. Yüksek çözünürlüklü erime analizinin diğer gen tarama yöntemlerine göre çeşitli avantajları bulunmaktadır. Yöntem, "kapalı tüp sistemi" olarak adlandırılmaktadır. Bunun temel nedeni, PCR'nin tamamlanmasından sonra, HRM'nin PCR ile aynı tüpte gerçekleştirilmesidir. Bu durum, kısmi otomasyon yarattığı için kolaylık sağlamaktadır (74). Ayrıca, DNA mutasyonlarının jel ya da matriks ayırımına gerek duymaksızın solüsyon içinde saptanmasına imkan tanımaktadır (121). Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinden gelebilecek laboratuvar kontaminasyon riskini ve analiz süresini azaltmaktadır (74). Çünkü HRM için veri eldesi ve analizi PCR'den sonra 10-15 dk içinde gerçekleşmektedir. Veri eldesi, 2 sn'deki 0,1- 1,0°C sıcaklık artışına karşılık oluşan floresan sinyal şiddeti değişiminin ölçülmesi ile elde edilir. Artan her 0,1°C için ölçüm alınabilmektedir. Bu nedenle çözünürlük yüksektir (34, 121, 123). Buna karşın, UV absorbanası ile yapılan çalışmalarda, fazla miktarda DNA (123) ve uzun süre gerekmektedir (34, 121, 123). Çünkü yüksek çözünürlüklü veriyi dk'da 0,1-1,0°C sıcaklık artışıyla elde etmek çok emek gerektirmektedir. Bu nedenle, florometrik cihaz kullanmadan böyle bir yöntemin kullanılabilme ihtimali düşüktür. Real-time PCR

cihazının özellikleri ve HRM yönteminin avantajları göz önüne alındığında; tek nükleotid polimorfizmi (SNP), mikro insersiyon ve delesyon gibi dizi varyasyonlarını taramak için (74) ve klinik tanı için HRM yöntemine olan ilgi artmaktadır (40).

2.10.1. Denatürasyon Eğrisi (HRM Eğrisi)

Artan sıcaklığın çift zincirli DNA üzerinde yarattığı etkinin, floresan sinyal şiddetinde oluşan değişikle takip edildiği eğrilere “denatürasyon eğrisi” denir. Bunlar, x ekseninde “sıcaklık” dereceleri, y ekseninde ise “floresan” değerleri çizilen eğrilerdir. Bu eğriler, belirlenen denatürasyon aralıkları için HRM analiziyle elde edilen ham veriyi sunmaktadır. Bu veri, 2 sn’lik zaman dilimlerinde 0,1°C’lik sıcaklık artışına karşılık floresan sinyal şiddetindeki değişimdir. Polimeraz zincir reaksiyonu’nda çift zincirli DNA’ya bağlanan boyaların floresan sinyal şiddeti, çoğalan çift zincirli DNA miktarıyla birlikte artmaktadır. Deoksiribonükleik asit örneklerinin PCR ile amplifiye edilmelerinin ardından gerçekleştirilen HRM analizinde, artan sıcaklıkla birlikte DNA çift sarmalı zincirleri ayrılmaya başladığı için floresan sinyal şiddeti yavaş yavaş azalmaktadır (81). Sıcaklık, DNA çift zincirlerinin %50’sinin ayrıldığı noktaya ulaştığında ise floresan sinyal hızlı bir azalma göstermektedir (93). Erime sıcaklığı (T_m) derecesi en kolay denatürasyonun türev eğrisinin tepe noktasından belirlenmektedir. Primer-dimer ürünleri ilgilenilen üründen daha kısa olduğu için, daha düşük sıcaklıkta denatüre olurlar ve denatürasyon eğrisi analizi ile kolaylıkla ayırt edilirler (Şekil 2.8) (52).



Şekil 2.8. Denatürasyon eğrisi analizi (53).

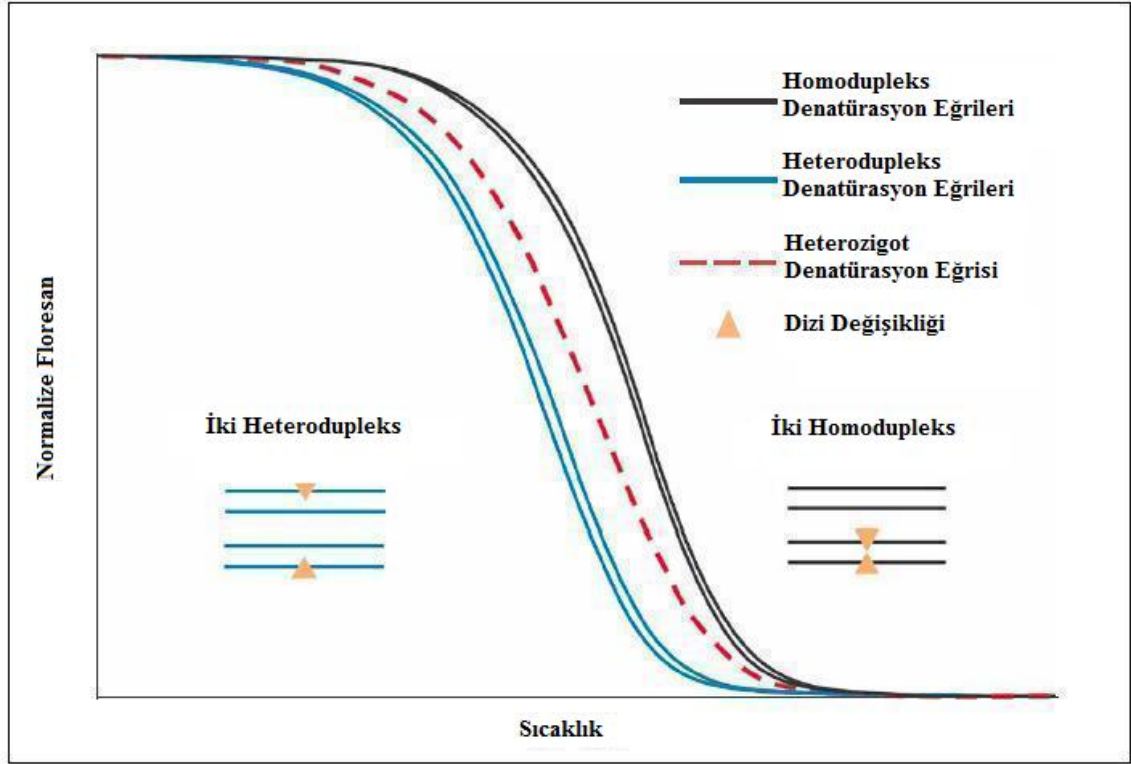
Deoksiribonükleik asit denatüre olduğunda floresan sinyal hızlıca düşer. Erime sıcaklığı derecesi, denatürasyon eğrisinin kırılma noktasıdır ve en kolay türev eğrinin tepe noktasından belirlenmektedir. İlgilenilen ekzonun PCR ürününün boyutu primerdimer (PD)'den daha büyüktür ve daha yüksek sıcaklıkta denatüre olur (52).

2.10.2. Denatürasyon Eğrisi Analizi

Yüksek çözünürlüklü erime analizi, bir örnekteki heterodupleks ve homodupleks DNA türlerinin varlığını yansıtabilen yüksek çözünürlüklü denatürasyon eğrilerinin değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır. Bu şekilde, bilinmeyen DNA örnekleri, normal olduğu bilinen örneklerle karşılaştırılarak DNA mutasyonları saptanmaya çalışılmaktadır (117).

Deoksiribonükleik asit örneklerinin denatürasyonu, normalize ve türev eğriler ile gösterilmektedir (30, 122). Farklı genotipler, birbirlerinden farklı denatürasyon davranışları sergilemektedir. Homozigot DNA örneklerindeki dizi değişiklikleri normal ile karşılaştırıldığında, T_m değişimi oluşturmaktadır (62, 85). Bu örnekler, tipik olarak keskin ve simetrik denatürasyon eğrilerine sahiplerdir. Heterozigot DNA örnekleri ise,

Tm değişiminin yanı sıra eğride Şekil değişikliği de meydana getirmektedir. Ayrıca, farklı homo ve heterodupleks formların varlığı nedeniyle kademeli, kompleks eğriler oluşturmaktadır (30, 122). Bu özellikleri nedeniyle heterozigot örnekleri homozigot örneklerden ayırt etmek kolay olmaktadır (30).



Şekil 2.9. Heterozigot örneğin denatürasyon analizi (74).

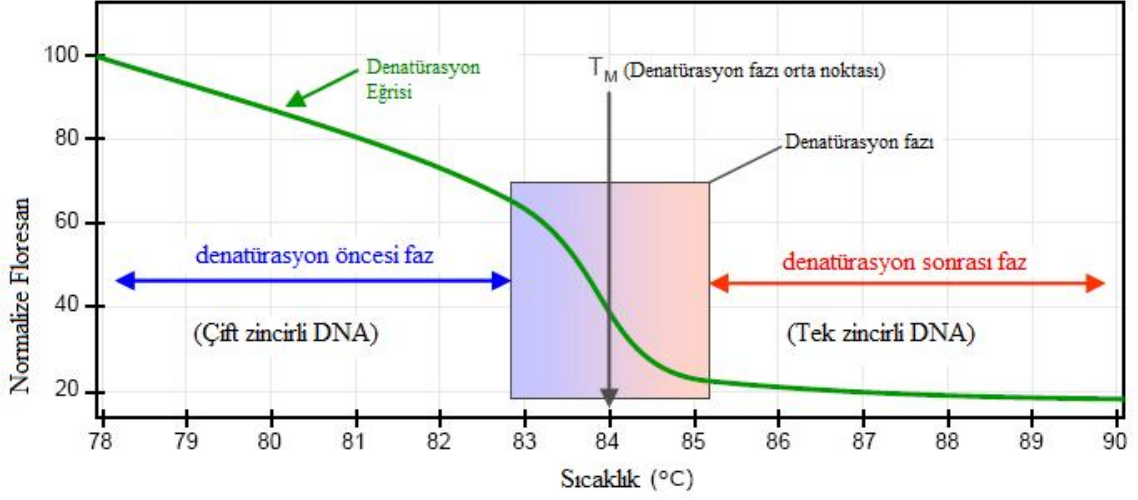
Polimeraz zincir reaksiyonun'dan sonra heterozigotlar için dört dupleks oluşmaktadır: iki homodupleks ve iki heterodupleks. Heterodupleksler kararsızlıkları nedeniyle homoduplekslerden daha düşük Tm'e sahiptir. Heterozigot denatürasyon eğrisi, heterodupleks ve homodupleks denatürasyon eğrilerinin birleŐimidir (74).

Bir PCR ampliconu, normal veya homozigot olarak mutasyon taşıyan örnekler için tek homodupleksten oluŐmasına rağmen heterozigot örnekler için iki heterodupleks ve iki homodupleks formdan oluşmaktadır (Şekil 2.9.) (74). Bunun nedeni, heterozigot PCR ürünlerinin normal ve mutasyon taşıyan allelleri bir arada taŐımasıdır. Tümör biyopsisi gibi heterojen DNA örneklerinde, normal ve mutasyon taşıyan DNA'ların tümü PCR ile amplifiye olmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında ise, heterodupleks formlar oluşmaktadır (96). Heterodupleks formların oluşum

mekanizmasını, HA'nın çalışma prensibiyle de açıklamak mümkündür. Heterodupleks analiz (HA), normal DNA ile mutasyon taşıyan DNA arasındaki dizi farklılıklarını belirleyen bir yöntemdir. Normal ve incelenen DNA karıştırıldıktan sonra sıcaklık ile denatüre edilmekte ve soğutulularak DNA'ların hibrid oluşturmaları sağlanmaktadır. Yeni oluşan DNA çiftinde bir zincir normal DNA'ya, diğeri ise incelenen DNA'ya aittir. Eğer iki DNA dizisi birbirlerinden farklı ise, aynı noktada iki baz eşleşmemektedir. Heterodupleks DNA formu bu şekilde oluşmaktadır. Heterodupleks DNA, elektroforezde homoduplekslere göre daha yavaş hareket edeceğinden kolayca ayırt edilebilmektedir (78).

2.10.3. Normalize ve Türev Eğriler

Yorum ve analiz yapabilmek amacıyla tüm örneklerin aynı başlangıç (%100) ve bitiş (%0) floresan sinyal seviyelerine sahip olmalarını sağlayan, böylece bilinmeyen DNA örneklerinin normal örneklerle karşılaştırılarak analiz edilmesine imkan tanıyan eğrilere “normalize eğri” denir (40). Bu eğrilerde, x eksenindeki “sıcaklık” değerlerine karşılık y ekseninde “normalize floresan” değerleri yer almaktadır. Yüksek çözünürlüklü erime analizi yazılımı, ilk olarak ham veriyi sunmaktadır. Bu veri, normalizasyon bölgesini belirlememizi sağlayan temel bilgidir. Denatürasyon fazındaki floresan sinyal şiddeti değişikliği önemlidir. Çünkü denatürasyon fazının orta noktası, DNA örneklerinin Tm derecelerini vermektedir (Şekil 2.10.) (16). Denatürasyon fazındaki Tm derecesi değişikliklerini analiz etmek amacıyla; HRM'den sonra manuel olarak denatürasyon öncesi ve denatürasyon sonrası faz bölgelerinin işaretlenmesine “normalizasyon” denir. Bu işlemle, örnekler arasındaki sıcaklık farklılıkları elimine edilerek, ortak sıcaklık değerleri elde etmek için eğriler x eksenine doğru hareket ettirilmektedir (122). Normalize eğride, normal örnekle karşılaştırıldığında homozigot genotipler için eğrinin yerinin değişmesi söz konusu iken; heterozigotlarda eğrinin şeklinin değişmesi mutasyonların yorumlanması açısından önem taşımaktadır (74).



Şekil 2.10. T_m derecesi ve denatürasyon fazı (16).

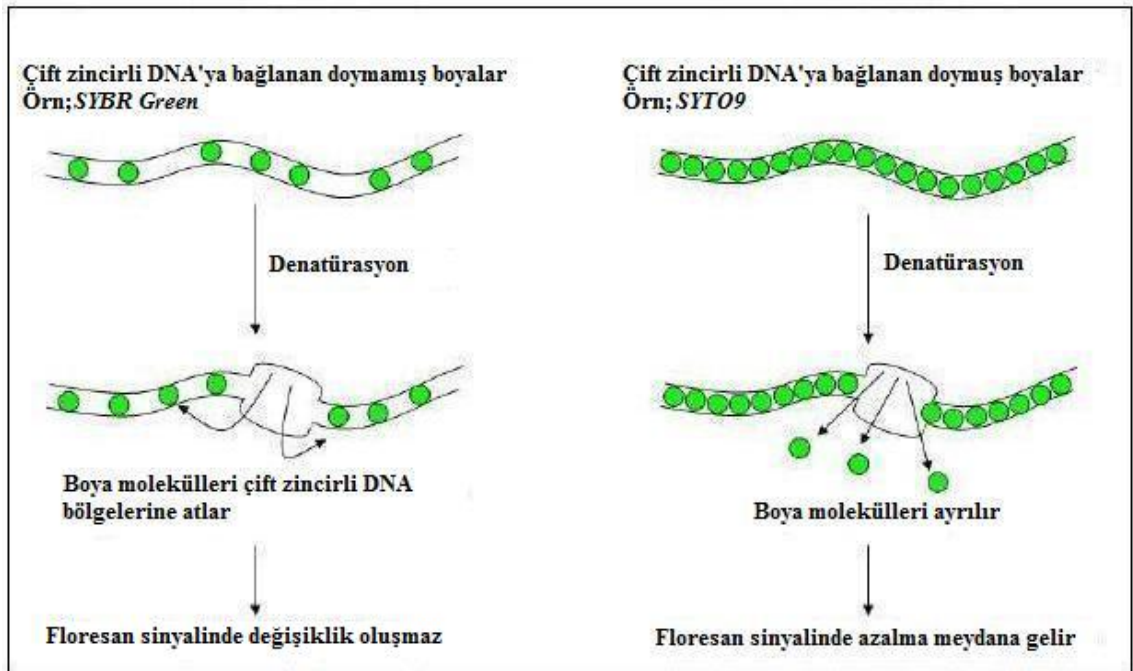
Artan sıcaklıkla meydana gelen floresan sinyali değişimlerinin tepe noktası (peak) olarak ifade edildiği eğrilere “türev eğri” denir. Türev eğride, y eksenine çizilen floresanın sıcaklık türevi ($-dF/dT$) ile x ekseninde sıcaklık derecesi yer almaktadır. Türev eğride normal örnekler mutasyon taşımadıkları için tek bir tepe noktası oluştururken heterozigot örnekler, allellerinden biri mutant diğeri normal olduğundan iki tepe noktası oluşturmaktadırlar. Homozigot örnekler ise, her iki allellerinde mutasyon taşıdıkları için tek tepe noktası meydana getirmektedir (40). Ancak, T_m dereceleri normal örneklerden farklı olduğu için homozigot örneklerin eğrilerinde kayma gözlenmektedir (74). Bununla beraber, türev eğrilerin HRM analizi için uygun olmadığı dikkate alınmalıdır. Bunun nedeni, türev eğrilerin yapay etkiler ilave etmesi sonucunda verilerin yorumlanmasının zorlaştırmasıdır (16). Ayrıca, türev eğriler çoğunlukla düşük çözünürlüklü denatürasyon verisinin değerlendirilmesinde kullanılır (30).

2.10.4. Çift Zincirli DNA’ya Bağlanma Özelliği Olan Floresan Boyalar

Yüksek çözünürlüklü erime analizinde, çift zincirli DNA’yı tek zincirli DNA’dan floresan sinyal şiddetindeki değişimle ayırt etmemize olanak veren boyalara ihtiyaç duyulmaktadır (117). Deoksiribonükleik asit denatürasyonunun doğru bir şekilde takip edilebilmesi, floresan sinyalin doğru ölçülmesine bağlıdır. Bunu, DNA

molekülünün floresan boya ile olan doygunluğu sağlamaktadır. Doygunluk terimi, çift zincirli DNA'ya özgül olan floresan boyanın DNA molekülüne yoğun olarak bağlanmasını ifade etmektedir. Amplifiye edilen DNA moleküllerinin boya ile doygunluğa ulaşabilmesi için yüksek konsantrasyonlarda boya kullanımı gereklidir. Etidyum bromür, propidyum iyodit, DAPI ve hoechst gibi boyalar birinci nesil boyaları temsil etmektedir. Bu boyalar, genellikle nükleik asit görüntülemeye ve floresan mikroskop incelemelerinde DNA işaretlemeye kullanılmaktadırlar. Çoğu mutajenik ve karsinojeniktir. Ayrıca, bazıları çift zincirli DNA'ya özgül değildir (17). Yüksek çözünürlüklü erime analizi için *SYBR Green* gibi ikinci nesil boyalar kullanılabilir. Ancak, bu boyalar yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıklarında PCR inhibitörü olarak etki göstermektedir (73).

Boyaların düşük konsantrasyonlardaki kullanımları ise; denatürasyonla açılan DNA çift zincirinden ayrılmalardan sonra henüz denatüre olmamış bölgelere yeniden bağlanmalarıyla sonuçlanmaktadır. DNA'dan boyanın ayrılmasıyla floresan sinyali şiddetinin azalması gerekirken, boyanın çift zincirli DNA'ya tekrar bağlanmasıyla floresan sinyali şiddetinde bir değişiklik olmamaktadır (Şekil 2.11). Başka bir deyişle, floresan sinyali şiddeti hatalı ölçülmektedir. Bu durumda, denatürasyon kinetiklerinin görüntülenmesi, dolayısıyla Tm derecesi saptama hassasiyeti azalmaktadır (117).



Şekil 2.11. Boya doygunluk modeli (117).

Çift zincirli DNA'ya özgül, doymamış boyalar, denatüre olmuş DNA'dan ayrıldıktan sonra yeniden çift zincirli DNA'ya bağlandığından floresan sinyalde değişiklik oluşmaz. Doymuş boyaların yeniden bağlanabilecekleri boşluk olmadığı için floresan şiddeti azalmaktadır (117).

Son dönemlerde, *LC Green*, *Eva Green* ve SYTO9 adı verilen üçüncü nesil boyalar geliştirilmiştir. Bu boyaların PCR'yi inhibe edici etkileri daha düşüktür. Bu nedenle, yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilirler (73). Boya konsantrasyonunun yüksek olması, DNA'nın boya molekülleriyle olan doygunluğunu arttırmaktadır. Deoksiribonükleik asit boya doygunluğuyla; denatürasyon sonucunda çift zincirli DNA'dan ayrılan boyaların, denatüre olmamış bölgelere yeniden bağlanmalarının azaltıldığına inanılmaktadır (Şekil 2.4) (117). Bu boyaların kullanımıyla ölçülen floresan sinyali şiddetindeki değişiklik, çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılmasını doğru oranda yansıtmaktadır. Bir başka deyişle, yüksek doygunluktaki boyaların kullanımı, HRM analizinin mutasyon saptama hassasiyetini arttırmaktadır (40, 122).

2.11. Methylation Specific High Resolution Melting (MS-HRM)

Metilasyon spesifik-HRM metilasyon tespiti için kullanılan duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Metilasyon spesifik -HRM dizisi bilinmeyen PCR ürününün erime profili ile dizisi bilinen PCR ürününün erime profilini karşılaştırarak metilasyon seviyesinin tahminini sağlar. Metilasyon spesifik -HRM protokolünün basitliği ve yüksek tekrarlanabilirliği metilasyon değerlendirmesi için birçok tanı ve araştırma uygulamalarında MS-HRM'i tercih edilen bir yöntem yapar (94).

Şu anda hem araştırma çalışmalarında hemde tanıya yönelik çalışmalarda kullanılabilen bölgeye özgül, hızlı, güvenilir ve maliyeti az olan metilasyon testleri yoktur. Bu yüzden metilasyon analizleri için rutinde de kullanılacak yeni ve daha güvenilir bir metoda ihtiyaç duyulmuştur. Bu analiz aslında SNP (single nucleotid polymorphism) genotiplendirmesi için geliştirilmiş yüksek çözünürlüklü erimeye dayandırılan yeni bir yaklaşımdır. Bütün erime analizlerinde olduğu gibi yüksek ısıda çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılması esasına dayanır. Yüksek

çözünürlüklü analizden önce hedef sekansın kopya sayısı arttırılmalıdır. En kolay yol çalışılacak DNA'nın HRM'den önce PCR amplifikasyonuna sokulmasıdır. Her 2 prosedürde sadece çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan boyasının varlığında çalışılır. Bu boya tek zincirli DNA'nın arasına giremez fakat çift zincirli DNA'nın varlığında ışığa yayar. Bu floresan değişimi hem PCR boyunca DNA konsantrasyonunun artışı ölçer 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 (94).

Bu yöntemin 2 önemli avantajı vardır. Birincisi; araya giren boyalar hedef DNA dublekslerini tamamen doyurmak için gerekli olan PCR reaksiyon ürünlerinin konsantrasyonunu engellemez. İkincisi ise çalışma süresince floresan değişiklikleri yüksek doğruluk ile takip edilebilir (94).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan meme kanseri tanısı alan ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Medikal Onkoloji Bilim Dalı'nda tedavi alıp takip edilen 80 hastanın doku örneklerinde çalışılmıştır. Örnekler parafin bloğa gömülü doku kesiti olarak 1,5ml'lik tüpler içinde laboratuvarımıza gelmiştir. Çalışmamız Aralık 2010-Nisan 2011 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Meme kanserli olguların doku örneklerinde TWIST, RAR β 2 ve ESR1 genlerinin promotor bölgelerindeki metilasyon durumları MS-HRM yöntemiyle incelenmiştir.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan aletler

Pipet takımı (Gilson)

PCR aleti (Thermal cycler) (PE GeneAmp PCR System 9700)

0.2 ml'lik micro amplifikasyon strip tüpü ve kapakları (Greiner bio-one)

Light cycler 480 Multiwell plate 96 (Roche)

Su banyosu (Nüve)

Vorteks (Heidolph)

Deep-freeze (Arçelik)

Buzdolabı (Arçelik)

Eppendorf Tüpü (1,5 ml'lik)

Manga Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Nanodrop 1000 (peqLab)

LightCycler 480 real-time PCR (Roche)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DNA İzolasyon Kiti (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I)

CpGenome Universal Methylated DNA

CpGenome Universal Unmethylated DNA

Bisülfite Modifikasyon Kiti (Epitect-QIAGEN)

TWIST Forward ve Reverse Primer Çifti (Metabion)

RAR β 2 Forward ve Reverse Primer Çifti (Metabion)

ESR1 Forward ve Reverse Primer Çifti (Metabion)

Proteinaz K (QIAGEN)

Distile Su

Ksilol

%70' lik etil alkol

%100' lük etil alkol

PBS (phosphate buffered saline)

Parafilm

3.2.3. Kullanılan Primerler

Çalışmada TWIST, RAR β 2 ve ESR1 genleri için kullanılacak olan primerler liyofilize halde ve 0.04 μ mol sentez skalasında ticari olarak satın alınmıştır. Primerler PCR şartlarına uygun 100 pmol/ μ l hacimde olacak şekilde steril distile su eklenerek çözülmüştür ve bloklanarak eşit hacimler halinde kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Genler	Primer Dizisi	Kaynak
TWIST	metile forward; 5'-TTTCGGATGGGGTTGTTATCG-3'	107
	metile reverse; 5'-GACGAACGCGAAACGATTTC-3'	
	unmetile forward; 5'-TTGGATGGGGTTGTTATTGT-3'	
	unmetile reverse; 5'-ACCTTCCTCCAACAAACACA-3'	
RAR β 2	metile forward; 5'-GAACGCGAGCGATTTCGAGT-3'	107
	metile reverse; 5'-GACCAATCCAACCGAAACG-3'	
	unmetile forward; 5'-GGATTGGGATGTTGAGAATGT-3'	
	unmetile reverse; 5'-CAACCAATCCAACCAAACAA-3'	
ESR1	metile forward; 5'-TTTTGGGATTGTATTTGTTTTTCGTC-3'	107
	metile reverse; 5'-AACAAAATACAAACCGTATCCCCG-3'	
	unmetile forward; 5'-TTTTGGGATTGTATTTGTTTTTGTTG-3'	
	unmetile reverse; 5'-AAACAAAATACAAACCATATCCCCA-3'	

3.3. Yöntemler

3.3.1. Parafinli Doku Örneklerinden DNA Elde Edilmesi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından ön parafinize kesitlerin analizi ile >70 tümör dokusu içerdiği kesinleşen bölgeden alınan her olgu için 10 µ'luk toplam 10 parafinize kesit 1,5 ml'lik tüpler içerisinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na ulaştırılmıştır.

3.3.1.1. Deparafinizasyon İşlemi

- İçinde parafin bloğa gömülü dokular bulunan 1,5ml'lik tüplere 1200 µl ksilol eklenmiştir.
- 15 sn vorteks yapılmıştır ve örnekler 14000rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılarak aynı işlem 2 defa tekrarlanmıştır.
- Pelet üzerine 1200 µl %100'lük alkol eklenmiştir.
- 15 sn vorteks yapılmıştır ve örnekler 14000rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılarak pelete 1200 µl %70'lik alkol eklenmiştir.
- 15 sn vorteks yapılmıştır ve örnekler 14000rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Alkol iyice uzaklaştırılıp örnekler 1 saat etüvde bırakılmıştır.
- Kuruyan örnekler 200 µl Tissue Lysis Buffer (ATL) ve 20 µl Proteinaz K eklenip vorteks yapılmıştır.
- Örnekler 70°C çalkalamalı su banyosunda 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında örnekler 200 µl Lysis Buffer (AL) eklenmiştir ve tekrar 70°C'de 10 dk su banyosuna bırakılmıştır.

- Bu işlemlerden sonra elde edilen ürün 840 µl olmuştur, 1000 µl'ye tamamlanması için bir tampon çözelti olan 160 µl PBS eklenmiştir.

3.3.1.2. DNA İzolasyonu

Deparfinizasyon işleminden sonra doku örneklerinden DNA elde edilmesinde robotik DNA izolasyon sistemi kullanılmıştır. Doku örnekleri doğrudan robotik DNA izolasyon sistemine (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I) yüklenmiştir. Örnek hacmi 1000 µl, elüsyon hacmi 100 µl ve 'DNA doku' protokolü seçilmiştir. Örneklerin DNA izolasyonu üretici firmanın belirttiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri Nanodrop 1000 (peqLab)'da ölçümleri yapıldıktan sonra -20 C'de saklanmaktadır.

3.3.2. Bisülfıt Modifikasyon İşleminin Gerçekleştirilmesi

Bisülfıt metodu, 5-metilsitozin içeren DNA dizisi için, genlerin metilasyon derecelerinin analizi için yeni tekniklerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu teknik genomik DNA'daki tek 5-metilsitozinlerin (5-MC) bile ortaya çıkarılması için mükemmel bir araçtır. Metod hedef DNA'nın sodyum bisülfıt ile inkübasyonu sonucu unmetile olan sitozinler urasile dönüşürken metile sitozinler değişmeden kalmaktadır.

	Orijinal sekans	Bisülfıt işlemi sonrası
Unmetile DNA	A-C-G-A-C-G-A-C-G-A	A-U-G-A-U-G-A-U-G-A
Metile DNA	A-C-G-A-C-G-A-C-G-A	A-C-G-A-C-G-A-C-G-A

İzole edilmiş doku örneklerinin bisülfıt modifikasyon işlemi üretici firma protokolü ile gerçekleştirilmiştir (Epiect-QIAGEN). Buna göre;

- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA'dan 10 µl (20-250 ng DNA) alınmıştır. Alınan örnekler 200 µl'lik PCR strip tüplerine aktarılmıştır.

- Daha sonra DNA ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla:

10 µl RNAase free water
35 µl DNA product buffer
85 µl Bisülfite mix,
konularak PCR başlatılmıştır.

- PCR şartları:

95 °C 5 dk	denatürasyon
60 °C 25 dk	inkübasyon
95 °C 5 dk	denatürasyon
60 °C 85 dk	inkübasyon
95 °C 5 dk	denatürasyon
60 °C 175 dk	inkübasyon

- PCR ürününün hepsi 1,5ml'lik tüplere alınmıştır.

- Bu tüplere 310 µl Loading buffer (BL) eklenerek vorteks yapılmıştır ve 12000rpm'de 1dk santrifüj edilmiştir.

- Üzerine 250 µl %100'lük ethanol eklenerek vorteks yapılmıştır ve 12000rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

- Ürünün hepsi spin tüpüne alınarak 14000rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

- Santrifüjden sonra spin filtresinden alt tarafa süzülen sıvı dökülerek 500 µl desulfonation buffer (BD) eklenmiştir.

- Spin tüpünün kapakları açık olacak şekilde 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

- 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek spin filtresinden alt tarafa süzülen sıvı dökülmüştür.

- Spin tüpüne 500 µl Wash Buffer (BW) eklenmiştir.
- 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek spin filtresinden alt tarafa süzülen sıvı dökülmüştür.
- Aynı işlem bir defa daha gerçekleştirilerek spin tüpleri 2 µl'lik toplama tüplerine aktarılmıştır.
- 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildikten sonra spin tüpleri ependorfa koyulmuştur.
- Spin tüpündeki filtreye 35 µl Elution Buffer (EB) filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konularak 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir ve aynı işlem bir kere daha tekrarlanmıştır.
- Modifikasyon ürünleri Nanodrop 1000 (peqLab)'da ölçümleri yapıldıktan sonra -20 C'de saklanmaktadır.

3.3.3. MS-HRM Cihazına Yükleme

Bisülfıt modifikasyon işlemi sonrasında MS-HRM tekniği uygulanmıştır. Bu teknikte modifikasyona tabi tutulan DNA'ların LightCycler 480 real-time PCR cihazı ile PCR amplifikasyonu ve yüksek rezolüsyonlu erime reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu analizde örneklerimizden elde edilen bisülfıt modifikasyona tabi tutulmuş, pozitif ve negatif kontroller ile birlikte PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri karşılaştırılmıştır.

Bisülfıt işleminden sonra elde ettiğimiz ürünlerden 10 µl alınarak 96'lık cihaz platine konulmuştur. Daha sonra bisülfıt ürünü konmuş her plate sırasıyla:

- 10 µl Master Mix
- 3 µl Forward primer
- 3 µl Reverse primer
- 2,5 µl MgCl₂
- 1 µl H₂O konularak pipetaj yapılmıştır.

Ayrıca örneklerin metilasyon yüzdelerini saptamak için kontrol grupları kullanılmıştır. Kontrol grupları hazırlanırken CpGenome Universal Methylated DNA ve CpGenome Universal Unmethylated DNA kitlerinden yararlanılmıştır. Bu kitler erkek cinsiyetine ait periferik kan hücrelerinden laboratuvar ortamında ticari olarak hazırlanan ürünlerdir. Bu kitler bisülfid işleminden geçirilerek %100 metile, %75 metile, %50 metile, %25 metile ve %100 unmetile kontrol grupları hazırlanmıştır (Tablo 3.2)..

Tablo 3.2. Metilasyon yüzdelerini saptamak için kullanılan kontrollerin hazırlanışı

Kontrol Grupları		
10 µl Master mix 3 µl Forward primer 3 µl Reverse primer 2,5 µl MgCl ₂ 1 µl H ₂ O	%100 metile	10 µl %100 metile kontrol DNA
	%75 metile	10 µl %75 metile kontrol DNA (7,5 µl %100 metile kontrol DNA + 2,5 µl %100 unmetile kontrol DNA)
	%50 metile	10 µl %50 metile kontrol DNA (5 µl %100 metile kontrol DNA + 5 µl %100 unmetile kontrol DNA)
	%25 metile	10 µl %25 metile kontrol DNA (2,5 µl %100 metile kontrol DNA + 7,5 µl %100 unmetile kontrol DNA)
	%100 unmetile	10 µl %100 unmetile kontrol DNA

Toplam 80 örnek ve 5 kontrol grubu (%100 metile, %75 metile, %50 metile, %25 metile ve %100 unmetile) plate konulduktan sonra LightCycler 480 real-time PCR cihazına yüklenmiştir.

3.3.4. LightCycler 480 Cihazındaki PCR Şartları

Örneklerin metilasyon yüzdelerini belirlemek için gerçekleştirilen Lightcycler 480 cihazındaki PCR şartlarında denatürasyon sonrası metilasyon derecelerinin belirlendiği kantifikasyon analizi gerçekleştirilir. Nicel analiz sonrasında erime eğrisi belirlenerek olguların metilasyon seviyeleri analiz için hazır hale gelir (Şekil 3.1.).

Programs

Program Name	denaturasyon						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	4.4		0	0	0	None

Program Name	amplifikasyon						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:10	4.4		0	0	0	None
65	00:00:15	2.2		53	0.5	1	None
72	00:00:25	4.4		0	0	0	Single

Program Name	hrm						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:01:00	4.4		0	0	0	None
40	00:01:00	2.2		0	0	0	None
65	00:00:01	1		0	0	0	None
95			25	0	0	0	Continuous

Program Name	sogutma						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
40	00:00:10	2.2		0	0	0	None

Şekil 3.1. TWIST, RARβ2 ve ESR1 genlerinin MS-HRM analizi için PCR şartları görüntüsü

3.3.5. Değerlendirme

Çalışma tamamlandıktan sonra ilk önce amplifikasyona girmeyen örnekler ortaya çıkartılır. Düşük floresan sinyali veren bu örneklerin erime eğrileri yoktur. Amplifikasyona girmeyen örnekler cihazdaki filtreleme ile negatif olarak gruplandırılır ve bu örnekler çalışmaya dahil edilmez. Bizim çalışmamızda negatif örnek saptanmamıştır. LightCycler 480 real-time PCR cihazında “Tm calling” kısmında örnekler kontrol grubuyla beraber erime sıcaklıkları karşılaştırılırken; “Gene scanning” kısmında ise ‘Difference plot’ ile analizi gerçekleştirilen örneklerin referans eğri üzerinden erime eğrileri karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamızda unmetile kontrol grubu referans eğri olarak kullanılmıştır. Erime eğrileri benzer olan örnekler otomatik olarak aynı gruplara kümelenemiştir. Metilasyona uğrayan örnekler metile kontrol gruplarının yanında, unmetile örnekler ise unmetile kontrol grubunun yanında pik vermiştir. Örnekler ile aynı plate eklenen kontrol grupları %100 metile, %75 metile, %50 metile, %25 metile ve %100 unmetile olarak belirlenmiştir. Kontrol gruplarından alınan pikler ile hasta örneklerinden alınan pikler karşılaştırılarak TWIST, RARβ2 ve ESR1 genlerinin metilasyon seviyeleri tespit edilmiştir.

Hastalar yaş, hastalığın evresi, tümör tipi, lenf nodu metastazı, ER, PR ve HER2/neu gibi meme kanserinde önemli olan bazı prognostik faktörlere göre gruplandırıldıktan sonra örneklerin metilasyon seviyeleri ile bu prognostik faktörler karşılaştırılmıştır.

3.3.6. İstatistiksel Analiz

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. Kategorik yapıdaki veri setlerine ise 2 Proportions Testi yapılmıştır. Olasılık değerleri;

P>0,05 ns

P<0,05 önemli düzeyde farklılık

P<0,01 çok önemli düzeyde farklılık

P<0,001 ileri düzeyde farklılık olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Aralık 2010-Nisan 2011 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Onkoloji Bilim Dalı'ndan gelen meme kanseri tanısı almış 80 olgudan alınan doku örneklerine MS-HRM yöntemi kullanılarak metilasyon analizi yapılmıştır. Olguların yaşları, evreleri, tümör tipleri, lenf nodu metastazları, ER, PR ve HER2/NEU gibi prognostik faktörleri hasta dosyalarından temin edilmiştir. Çalışmamız meme kanserli hastaların TWIST, RARβ2 ve ESR1 genlerindeki metilasyon durumlarını belirleyerek meme kanseri için geliştirilecek tedavi yöntemlerine de ışık tutmak, hastalığın evresi ve prognozu arasında ilişki kurabilmek, hastalarımıza ait demografik ve histopatolojik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek amacıyla yapılmıştır.

4.1. Olguların Demografik ve Patolojik Özellikleri

İncelemeye alınan 80 olgunun yaş ortalaması $58,44 \pm 11,09$ olarak tespit edilmiştir. Olguların 19/80'i (%24) ≤ 50 yaş iken; 61/80'i ise (%76) >50 yaş olarak saptanmıştır.

Olgular TNM sınıflandırmasına göre evre II, evre III ve evre IV olarak gruplandırılmıştır. Tümör örneklerinin evrelerine göre dağılımlarında ise en çok evre III 44/80 (% 55) gözlenmiştir. Geri kalan örneklerin 30/80 (%37,5) evre II, 6/80 (%7,5) evre IV olarak belirlenmiştir.

Olgular tümör tipine göre değerlendirildiğinde, 67/80 olgu invaziv duktal karsinom tümör tipinde iken; 13/80 olgu invaziv lobüler karsinom tümör tipindedir.

Lenf nodu metastazları değerlendirildiğinde olguların 68/80 (%85) lenf nodu pozitif iken, 12/80 (%15) olguda lenf nodu negatiftir.

Östrojen reseptör (ER) durumu ve meme kanserinde metilasyon arasındaki ilişki incelenmek amacıyla hastalar ER(+) ve ER(-) olarak gruplandırıldığında ise; olguların 54/80 (%67,5) ER(+) iken, 26/80 (%32,5) olguda ER(-) olarak saptanmıştır.

Progesteron reseptör (PR) durumları değerlendirildiğinde olguların 42/80 (% 52,5) PR(+) iken, 38/80 (%47,5) olgu PR(-) olarak belirlenmiştir.

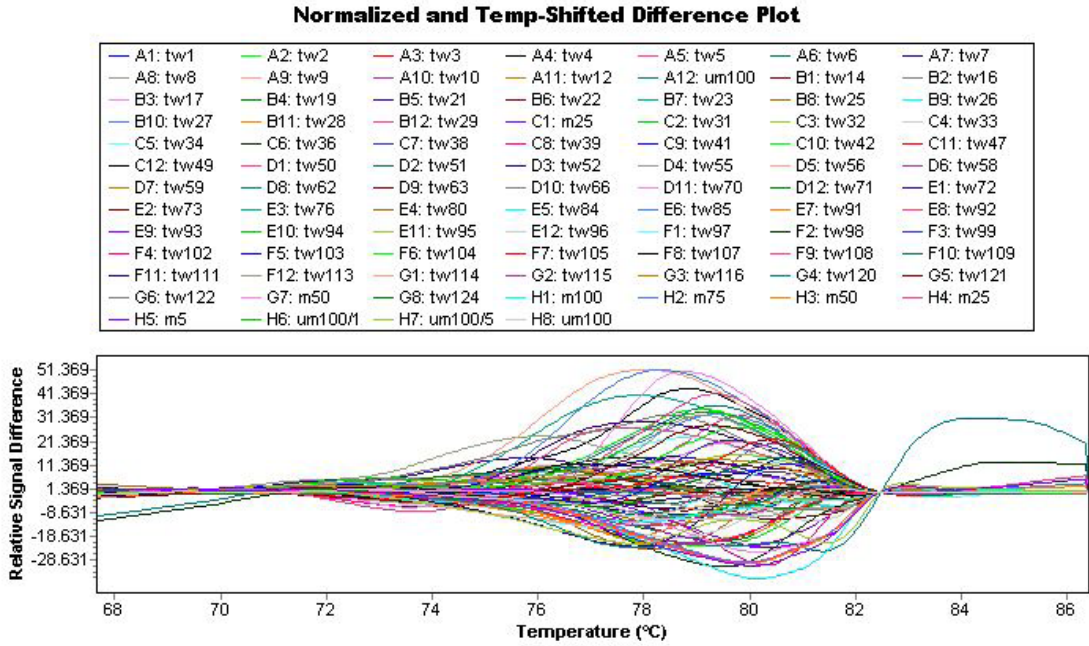
Meme kanserinde önemli bir prognostik faktör olarak ele alınan HER2/NEU durumları değerlendirildiğinde ise olguların 30/80 (%37,5) HER2/NEU(+) iken, 50/80 (%62,5) HER2/NEU(-) olarak saptanmıştır. Olguların demografik özellikleri tablo 4.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların klinik özellikleri

Hastaların demografik özellikleri	HASTA SAYISI
YAŞ	
≤ 50 YAŞ	19
>50 YAŞ	61
EVRE	
EVRE II	29
EVRE III	45
EVRE IV	6
TÜMÖR TİPİ	
İNVAZİV DUKTAL KARSİNOM	67
İNVAZİV LOBÜLER KARSİNOM	13
LENF NODU METASTAZI	
POZİTİF	67
NEGATİF	13
ER	
POZİTİF	54
NEGATİF	26
PR	
POZİTİF	42
NEGATİF	38
HER2/NEU	
POZİTİF	30
NEGATİF	50

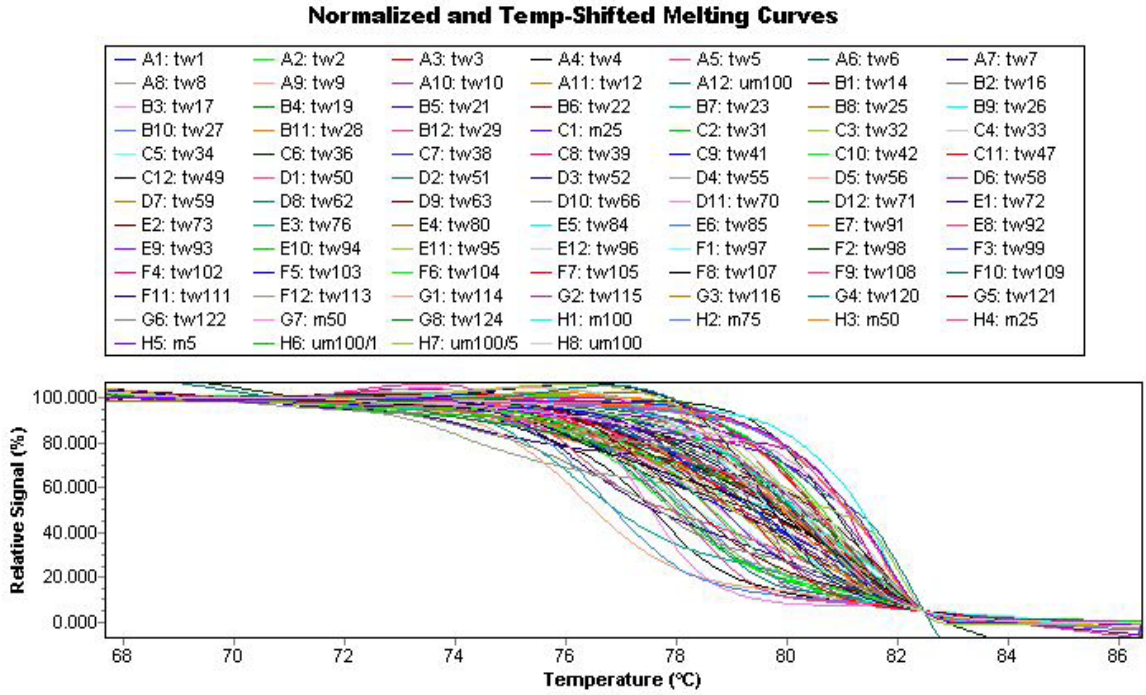
4.2. TWIST Geninde Saptanan Bulgular

Çalışma tamamlandıktan sonra örneklerin analizi için LightCycler 480 real-time PCR cihazında “Gene scanning” kısmında ‘Difference plot’ ile analizi gerçekleştirilen örneklerin referans eğri üzerinden erime eğrileri karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamızda unmetile kontrol grubu referans eğri olarak kullanılmıştır. Erime eğrileri benzer olan örnekler otomatik olarak aynı gruplara kümelenmiştir. Buna göre referans eğrisinin üzerinde görülen eğriler metile olmayan olguları gösterirken; referans eğrisinin altında görülen eğriler farklı oranlarda metile olan olguları göstermektedir. Metile olan örneklerin oranları metile kontrol gruplarıyla değerlendirilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Araştırma grubuna dahil edilen TWIST genine ait tüm örnekler ve kontrol gruplarının “Difference plot” görüntüsü.

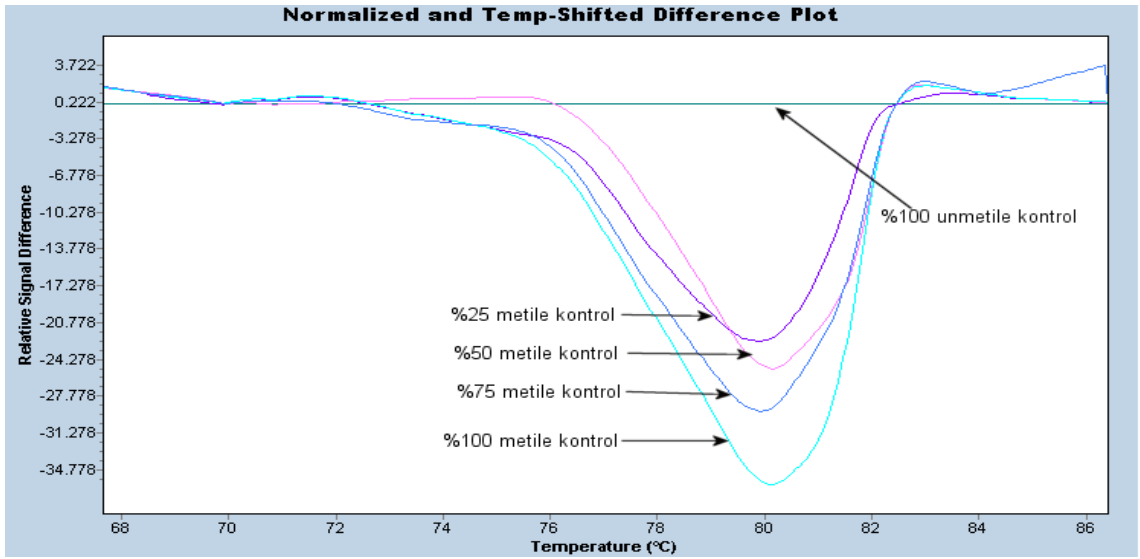
“Tm calling” kısmında örnekler kontrol grubuyla beraber erime sıcaklıkları karşılaştırılmıştır. Metile olmayan örnekler daha erken amplifikasyona girerken metile olan örnekler daha geç amplifikasyona girmiştir. Buna göre metile olmayan örnekler erime eğrisinin altında gözlenirken metile olan örnekler erime eğrisinin üzerinde görülmüştür (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Araştırma grubuna dahil edilen tüm örneklerin ve kontrol gruplarına ait pikler erime eğrisi üzerinde gözlenmektedir.

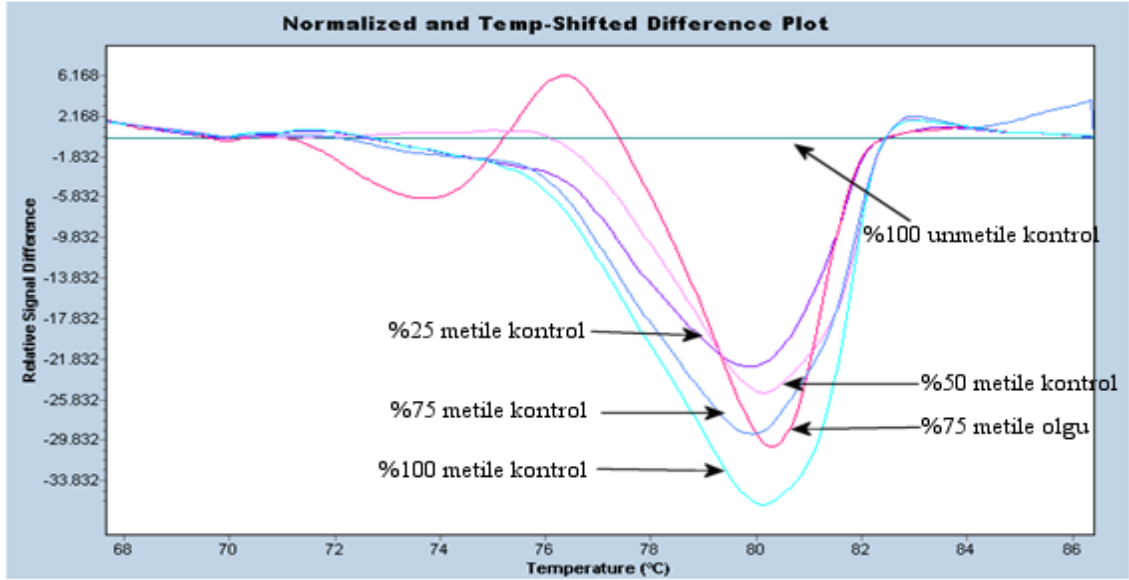
4.2.1. TWIST Geninde Çalışma Grubuna Ait Bulgular

Çalışma tamamlandıktan sonra önce kontrol grubu eğrileri “Difference plot” analiz kısmında ortaya çıkartılır. Bu kontrol grupları temel alınarak öncelikle referans eğrisi olan %100 unmetile kontrol seçilir ve sırasıyla, %25 metile, %50 metile, %75 metile ve %100 metile olan kontroller farklı pikler vererek sıralanır (Şekil 4.3.).

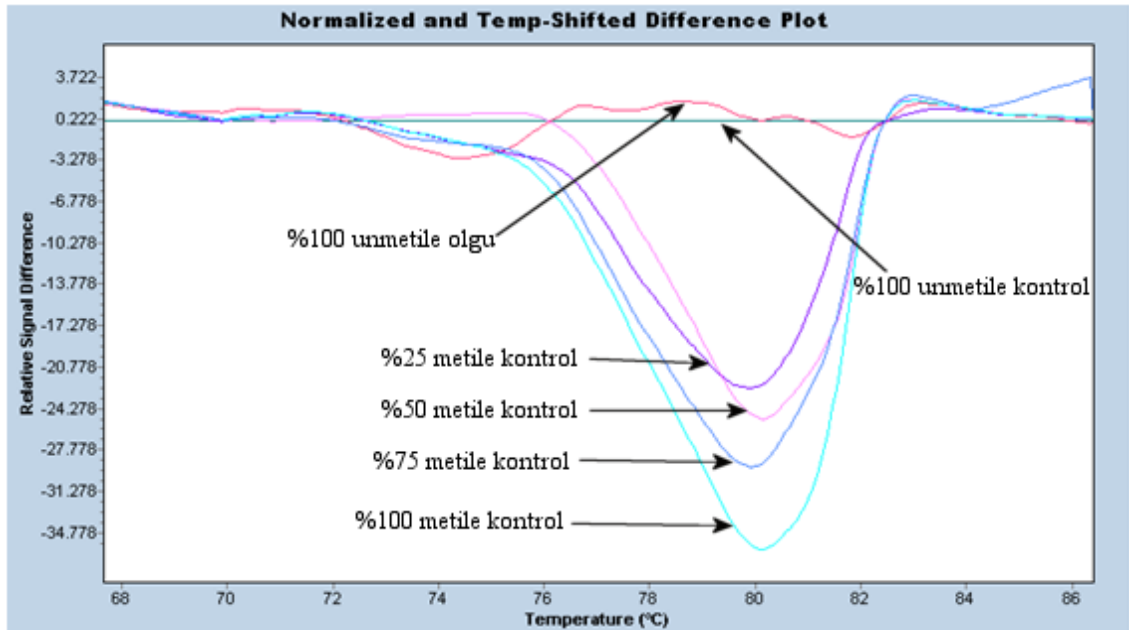


Şekil 4.3. TWIST genine ait kontrol grubunun pikleri görüntüsü

Örneklerin analizi bu kontrol grubuyla karşılaştırılarak belirlenmiştir. Buna göre Twist geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %75 oranında metile olan bir olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü (Şekil 4.4.).



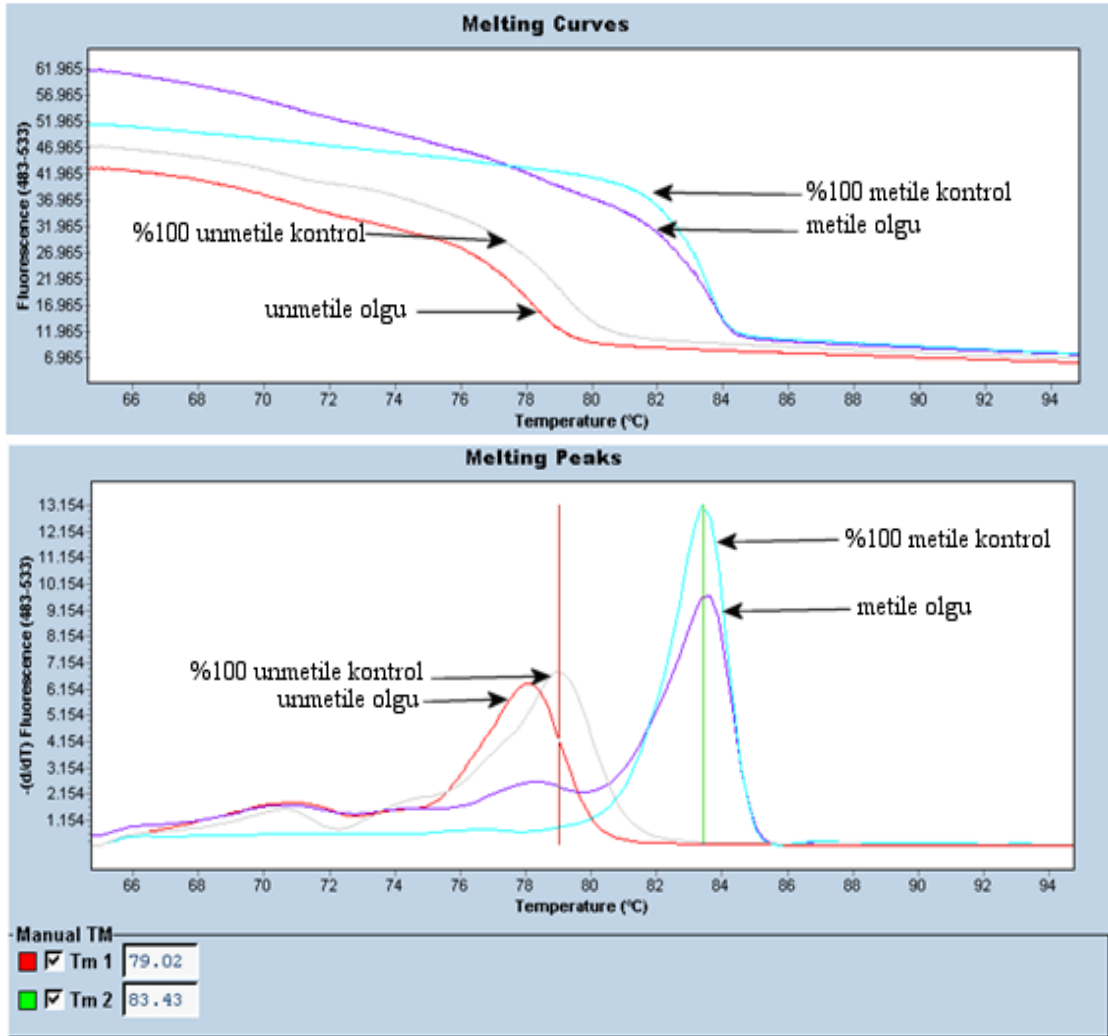
Şekil 4.4. TWIST geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %75 oranında metile olan bir olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



Şekil 4.5. TWIST geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen unmetile olan bir olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü

Ayrıca aynı örnekler Lightcycler 480 cihazındaki “Tm calling” ile analiz kısmında da değerlendirilerek, erime eğrileri üzerinden sonuçların karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir.

“Tm calling” ile analiz bölümünde ise metile ve unmetile örneklerin sıcaklık dereceleri üzerinden karşılaştırma yapılmıştır. Buna göre unmetile örneklerin unmetile kontrol grubuyla birlikte daha erken sıcaklıkta pik verirken metile örneklerin metile kontrol grubuyla birlikte daha geç sıcaklıkta pik verdikleri görülmüştür. (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. TWIST geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen unmetile olan bir olgunun “Tm calling” analiz görüntüsü

Genel olarak bakıldığında meme kanseri tanısı almış olan 80 olgunun 20'sinin (%25'inin) TWIST geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 80 olgunun 60'ında (%75'inde) metilasyon gözlenmemiştir.

Ayrıca TWIST geninin promotor bölge metilasyonu, 2/80 olguda %75 metile, 4/80 olguda %50 metile, 6/80 olguda %25 metile, 8/80 olguda ise %25'in altında metile olarak saptanmıştır (Tablo 4.2.). Olguların 60/80'inin TWIST geninde promotor bölge metilasyonu saptanmamıştır.

Tablo 4.2. TWIST geni metilasyon oranları

METİLASYON ORANI	HASTA ORANI (%) (n)
%100 METİLE	- (0/80)
%75 METİLE	%2,5 (2/80)
%50 METİLE	%5 (4/80)
%25 METİLE	%7,5 (6/80)
%25 ALTI METİLE	%10 (8/80)
UNMETİLE	%75 (60/80)

4.2.2. Olguların Yaşları, Evreleri, Lenf nodu metastazları, ER, PR ve HER2/neu Durumlarının TWIST Geni ile İlişkisi

4.2.2.1. Olguların Yaşı ile TWIST Geni Promoter Metilasyonu İlişkisi

Olguların yaşı ile TWIST geni promoter metilasyonu ilişkisine bakıldığında; TWIST geni promoter metilasyonu gözlenen olguların yaş ortalamaları $54,40 \pm 10,06$ iken, unmetile olan olguların yaş ortalamaları $59,78 \pm 11,17$ olarak saptanmıştır.

Yaşı ≤ 50 olan 8/19 olgunun TWIST geninde promoter metilasyonu gözlenirken, 11/19 olguda promoter metilasyonu gözlenmemiştir. Yaşı >50 olan 12/61 olgunun TWIST geninde promoter metilasyonu gözlenirken, 49/61 olguda ise promoter metilasyonu gözlenmemiştir (Tablo 4.3.). Yapılan ‘2 Proportions Testi’ ile yaş ve TWIST promoter metilasyonu arasında ilişki bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.3. Olguların Yaşı ile TWIST geni metilasyon oranları

	twist		Total
	metile	unmetile	
Yaş ≤ 50	8	11	19
>50	12	49	61
Total	20	60	80

4.2.2.2. Tümörün Tipi ile TWIST Geni Promoter Metilasyonu İlişkisi

Tümörün tipi ile TWIST geni promoter metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; invaziv duktal karsinomda (IDC) 16/67 olguda promoter metilasyonu gözlenirken, 51/67 olguda metilasyon saptanmamıştır. İnvaziv lobüler karsinomda (ILC) 4/13 olguda promoter metilasyonu gözlenirken, 9/13 olguda metilasyon saptanmamıştır (Tablo 4.4.). İnvaziv duktal ve invaziv lobüler karsinomda unmetile olan TWIST geninin istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu sonucuna varılmıştır ($p < 0,001$) ($p < 0,05$).

Tablo 4.4. Olguların Tümör tipi ve TWIST geni metilasyon durumlarının dağılımı

			twist		Total
			metile	unmetile	
tumortipi	invaziv ductal	Count	16	51	67
		% within tumortipi	23,9%	76,1%	100,0%
	invaziv lobuler	Count	4	9	13
		% within tumortipi	30,8%	69,2%	100,0%
Total		Count	20	60	80
		% within tumortipi	25,0%	75,0%	100,0%

Tümörün tipi ile TWIST geni promoter metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında TWIST geninde promoter metilasyonu gözlenen 16/20 olgu invaziv duktal karsinom, 4/20 olgu ise invaziv lobüler karsinom olarak saptanmıştır. Metile olan invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom olgularının dağılımı tablo 4.5.'de gösterilmiştir. TWIST geninde promoter metilasyonu gözlenen olguların %80'i invaziv duktal karsinom olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analize göre invaziv duktal karsinom tümör tipinde TWIST geni metilasyonu invaziv lobüler karsinom tümör tipine göre çok daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,001$).

Tablo 4.5. Metile olan invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom olgularının dağılımı

			twist		Total
			metile	unmetile	
tumortipi	invaziv ductal	Count	16	51	67
		% within twist	80,0%	85,0%	83,8%
	invaziv lobuler	Count	4	9	13
		% within twist	20,0%	15,0%	16,3%
Total		Count	20	60	80
		% within twist	100,0%	100,0%	100,0%

4.2.2.3. Tümörün Evresi ile TWIST Geni Promoter Metilasyonu İlişkisi

Tümörün evresi ile TWIST geni promoter metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; Evre II'de 3/29 olguda promoter metilasyonu gözlenirken, 26/29 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir. Evre III'de 14/45 olguda promoter metilasyonu gözlenirken, 31/45 olguda metilasyon gözlenmemiştir. Evre IV'de ise 3/6 olguda promoter metilasyonu görülürken, 3/6 olguda metilasyon saptanmamıştır (Tablo 4.6.). Yapılan istatistiksel analize göre, Evre II ve evre III'de TWIST geninin unmetile olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Evre IV'de ise olgu sayısı azlığı nedeniyle herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Tablo 4.6. Olguların tümör evresi ve TWIST geni promoter metilasyon durumlarının dağılımı

			twist		Total
			metile	unmetile	
evre	2a2b	Count	3	26	29
		% within evre	10,3%	89,7%	100,0%
	3a3b	Count	14	31	45
		% within evre	31,1%	68,9%	100,0%
	4	Count	3	3	6
		% within evre	50,0%	50,0%	100,0%
Total		Count	20	60	80
		% within evre	25,0%	75,0%	100,0%

Tümörün evresi ile TWIST geni promoter metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında TWIST geninde promoter metilasyonu gözlenen 3/20 olgu evre II, 14/20 olgu evre III ve 3/20 olgu evre IV olarak saptanmıştır. Metile olan evre II, evre III ve evre IV olgularının dağılımı tablo 4.7.'de gösterilmiştir. Ayrıca TWIST geninde promoter metilasyonu gözlenen olguların %70'i evre III olarak saptanmıştır. Evre IV'de daha yüksek metilasyon oranı beklenmiştir fakat evre IV'deki olguların sayısının azlığı nedeni ile tam olarak karşılaştırma yapılamamıştır. Buna göre evre II ve evre III'de sadece metile olan olgular arasında yapılan istatistiksel analiz sonucu göre evre III'ün evre II'ye göre çok daha yüksek oranda TWIST geni promoter hipermetilasyonu görüldüğü sonucuna varılmıştır ($p<0,001$).

Tablo 4.7. Metile olan evre II, evre III ve evre IV olgularının dağılımı

			twist		Total
			metile	unmetile	
evre 2a2b	Count		3	26	29
	% within twist		15,0%	43,3%	36,3%
3a3b	Count		14	31	45
	% within twist		70,0%	51,7%	56,3%
4	Count		3	3	6
	% within twist		15,0%	5,0%	7,5%
Total	Count		20	60	80
	% within twist		100,0%	100,0%	100,0%

4.2.2.4. Lenf Nodu Metastazı ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Lenf nodu metastazı ile TWIST geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında TWIST promotor hipermetilasyonu gözlenen 17/20 olgunun lenf nodu metastazı pozitif iken, 3/20 olgu lenf nodu bakımından negatiftir. Metile olan lenf nodu(+) ve lenf nodu(-) olan olguların dağılımı tablo 4.8.'de gösterilmiştir. Metile olan olguların %85'inde lenf nodu pozitifliği saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında lenf nodu(+) olan olguların lenf nodu(-) olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu görülmüştür ($p < 0,001$).

Tablo 4.8. Metile olan lenf nodu(+) ve lenf nodu(-) olan olguların dağılımı

			twist		Total
			metile	unmetile	
lenfnodu pozitif	Count		17	50	67
	% within twist		85,0%	83,3%	83,8%
negatif	Count		3	10	13
	% within twist		15,0%	16,7%	16,3%
Total	Count		20	60	80
	% within twist		100,0%	100,0%	100,0%

4.2.2.5 Östrojen Reseptör ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Östrojen reseptörü ile TWIST geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında TWIST promotor metilasyonu gözlenen 12/20 olguda ER(+) iken 8/20 olguda ER(-) olarak saptanmıştır. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı tablo 4.9.'da gösterilmiştir. Metile olan olguların %60'ı ER(+) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında ER(+) olan olguların ER(-) olan olgulara göre TWIST promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4.9. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı

			twist		Total
			metile	unmetile	
erdurumu	pozitif	Count	12	42	54
		% within twist	60,0%	70,0%	67,5%
	negatif	Count	8	18	26
		% within twist	40,0%	30,0%	32,5%
Total		Count	20	60	80
		% within twist	100,0%	100,0%	100,0%

4.2.2.6. Progesteron Reseptör ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Progesteron reseptörü ile TWIST geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında TWIST promotor metilasyonu gözlenen 8/20 olguda PR(+) iken, 12/20 olguda PR(-) olarak saptanmıştır. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı tablo 4.10.'da gösterilmiştir. Ayrıca TWIST promotor metilasyonu gözlenen olguların %40'ı PR(+), %60'ı PR(-) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında PR(-) olan olguların PR(+) olan olgulara göre TWIST promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4.10. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı

			twist		Total
			metile	unmetile	
prdurumu	pozitif	Count	8	34	42
		% within twist	40,0%	56,7%	52,5%
	negatif	Count	12	26	38
		% within twist	60,0%	43,3%	47,5%
Total		Count	20	60	80
		% within twist	100,0%	100,0%	100,0%

4.2.2.7. HER2/NEU ile TWIST Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

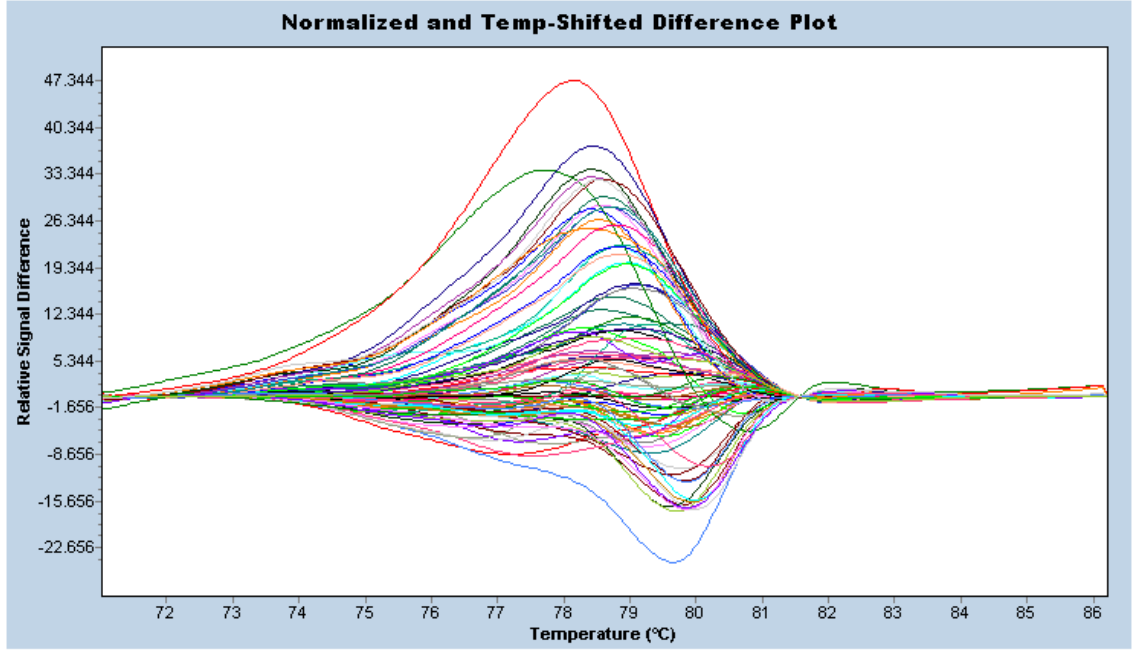
HER2/NEU ile TWIST geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında TWIST promotor metilasyonu gözlenen 6/20 olguda HER2/NEU(+) iken, 14/20 olguda HER2/NEU(-) olarak saptanmıştır. Metile olan HER2/NEU(+) ve HER2/NEU(-) olan olguların dağılımı tablo 4.11.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında HER2/NEU(-) olan olguların HER2/NEU(+) olan olgulara göre TWIST promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.11. Metile olan HER2/NEU(+) ve HER2/NEU(-) olan olguların dağılımı

			twist		Total
			metile	unmetile	
her2	pozitif	Count	6	24	30
		% within twist	30,0%	40,0%	37,5%
	negatif	Count	14	36	50
		% within twist	70,0%	60,0%	62,5%
Total		Count	20	60	80
		% within twist	100,0%	100,0%	100,0%

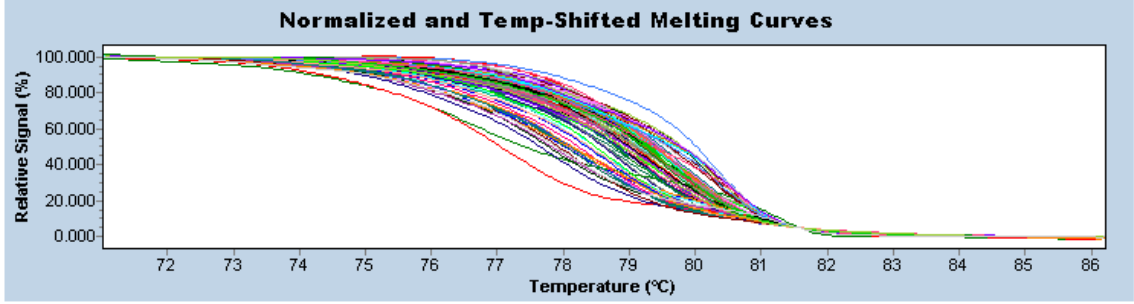
4.3. Retinoik Asit Reseptör Beta2 (RAR β 2) Geninde Saptanan Bulgular

Retinoik asit reseptör beta2 (RAR β 2) geni metilasyon analizinde çalışılan bütün örnekler değerlendirmeye alınmıştır. ‘Difference plot’ ile analiz bölümünde unmetile kontrol grubu referans eğri olarak kullanılmıştır. Erime eğrileri benzer olan örnekler otomatik olarak aynı gruplara kümelenebilir. Metile olan örnekler metile kontrol gruplarının yanında, unmetile örnekler ise unmetile kontrol grubunun yanında pik vermiştir. Buna göre referans eğrisinin üzerinde görülen eğriler metile olmayan olguları gösterirken; referans eğrisinin altında görülen eğriler farklı oranlarda metile olan olguları göstermektedir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Araştırma grubuna dahil edilen RAR β 2 genine ait tüm örnekler ve kontrol gruplarının ‘Difference plot’ görüntüsü

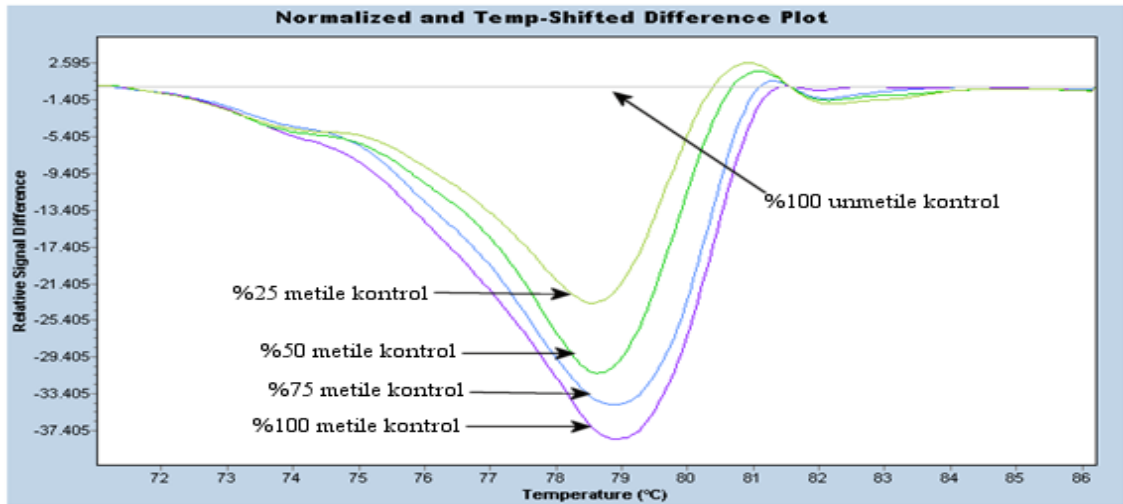
“Tm calling” kısmında örnekler kontrol grubuyla beraber erime sıcaklıkları karşılaştırılmıştır. Metile olmayan örnekler daha erken amplifikasyona girerken metile olan örnekler daha geç amplifikasyona girmiştir. Buna göre metile olmayan örnekler erime eğrisinin altında gözlenirken metile olan örnekler erime eğrisinin üzerinde görülmüştür (Şekil 4.8.).



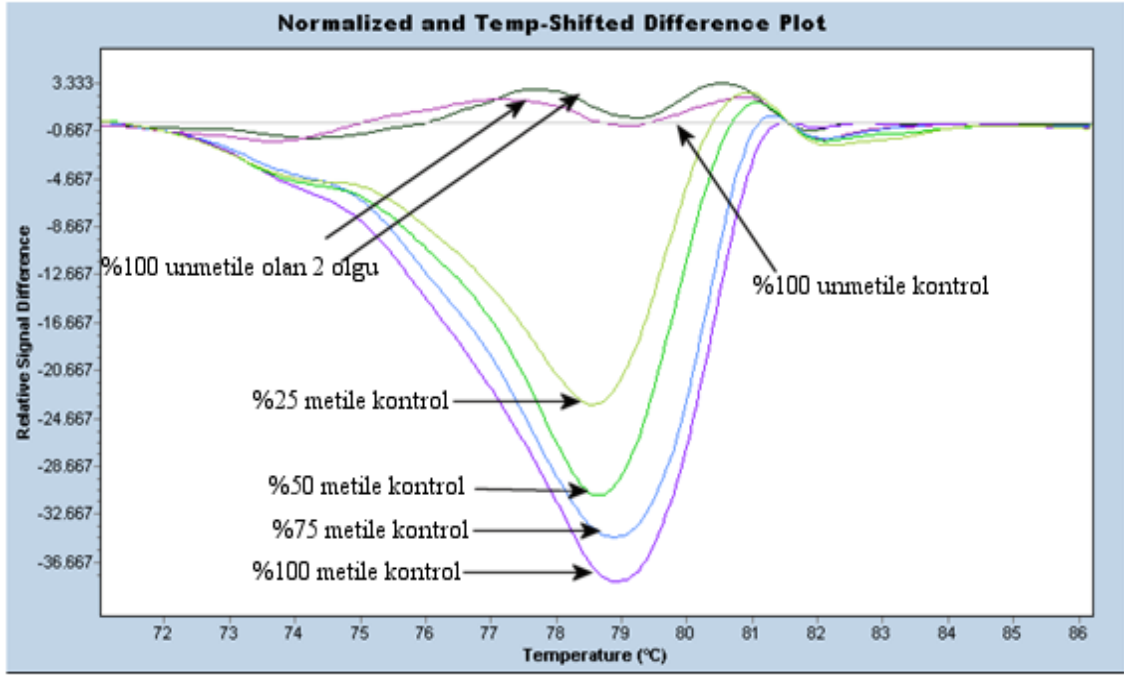
Şekil 4.8. Araştırma grubuna dahil edilen RAR β 2 genine ait tüm örneklerin ve kontrol gruplarına ait piklerin erime eğrisi görüntüsü

4.3.1. RAR β 2 Geninde Çalışma Grubuna Ait Bulgular

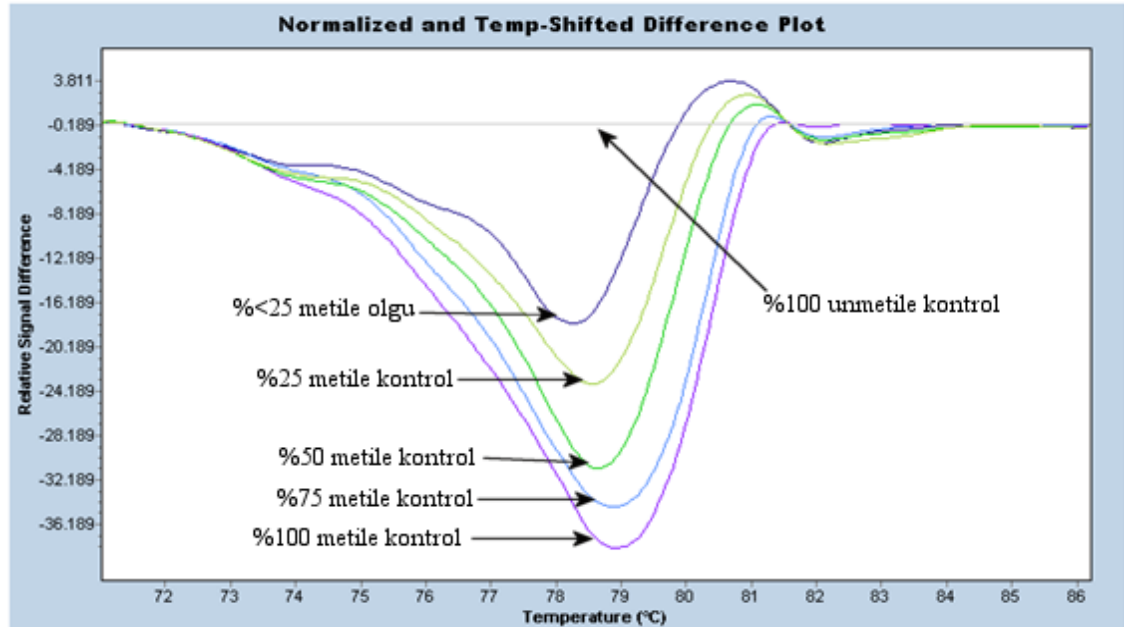
Çalışma tamamlandıktan sonra önce kontrol grubu eğrileri “Difference plot” analiz kısmında ortaya çıkartılır. Bu kontrol grupları temel alınarak öncelikle referans eğrisi olan %100 unmetile kontrol seçilir ve sırasıyla, %25 metile, %50 metile, %75 metile ve %100 metile olan kontroller farklı pikler vererek sıralanır (Şekil 4.9.). Örneklerin analizi bu kontrol grubuyla karşılaştırılarak belirlenmiştir.



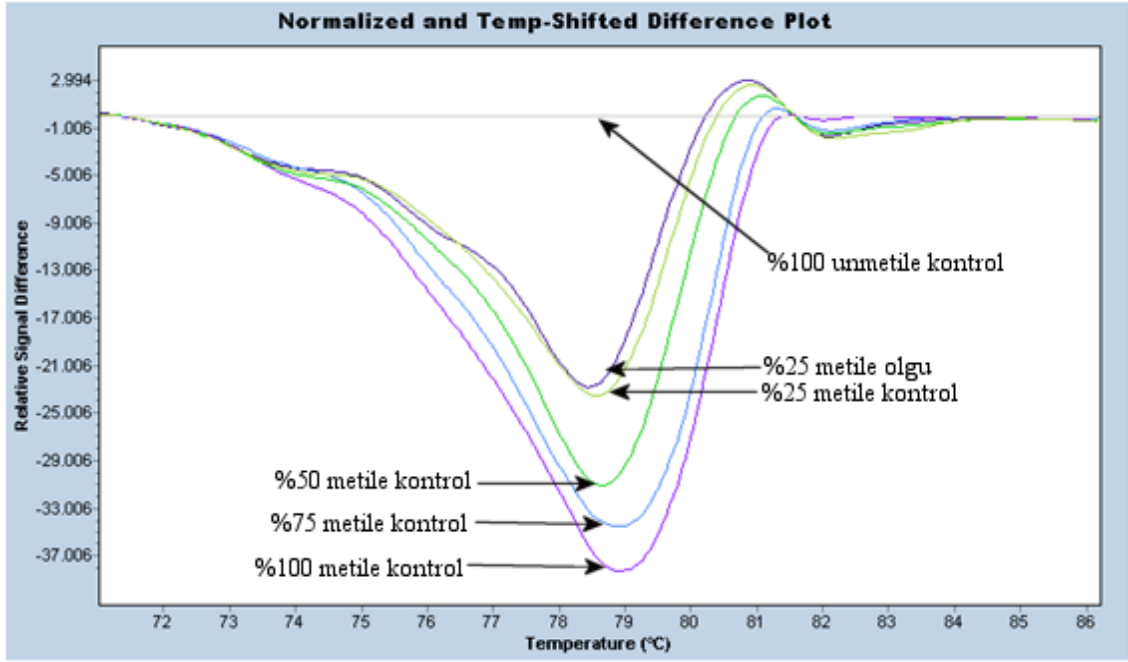
Şekil 4.9. RAR β 2 genine ait kontrol grubunun pikleri “Difference plot” görüntüsü



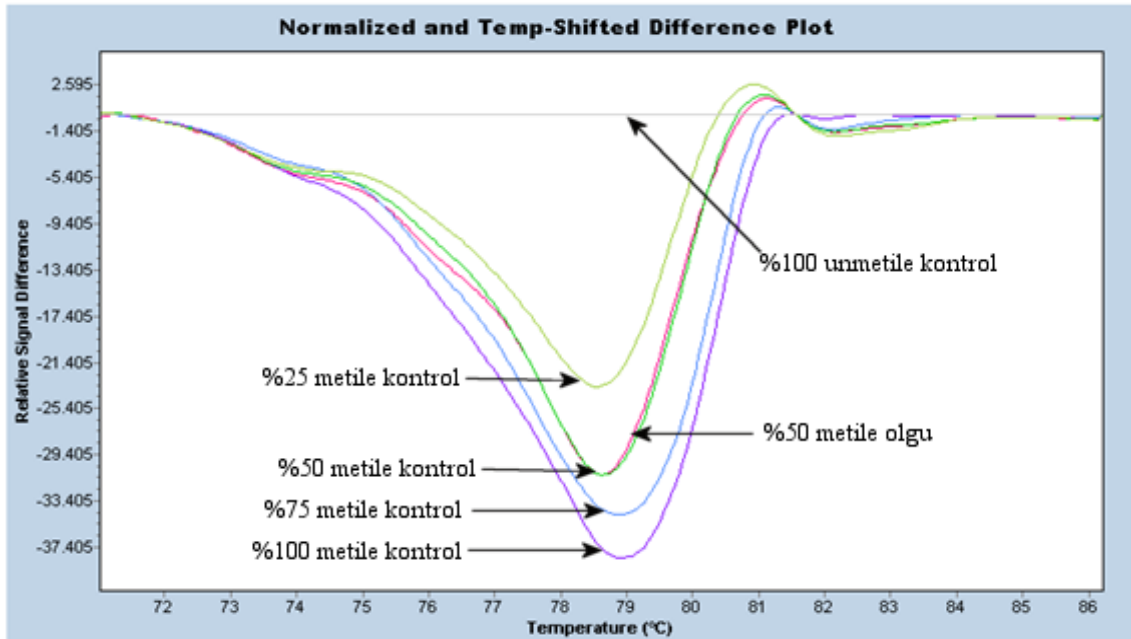
Şekil 4.10. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen unmetile olan iki olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü.



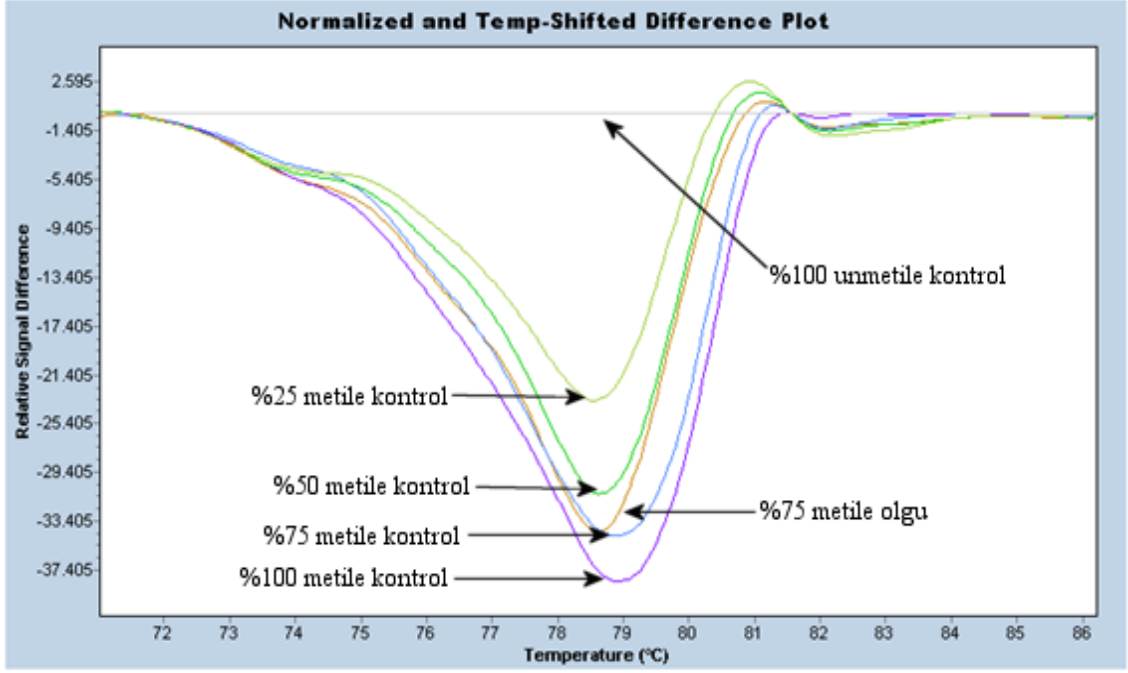
Şekil 4.11. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %25’den daha düşük oranda metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



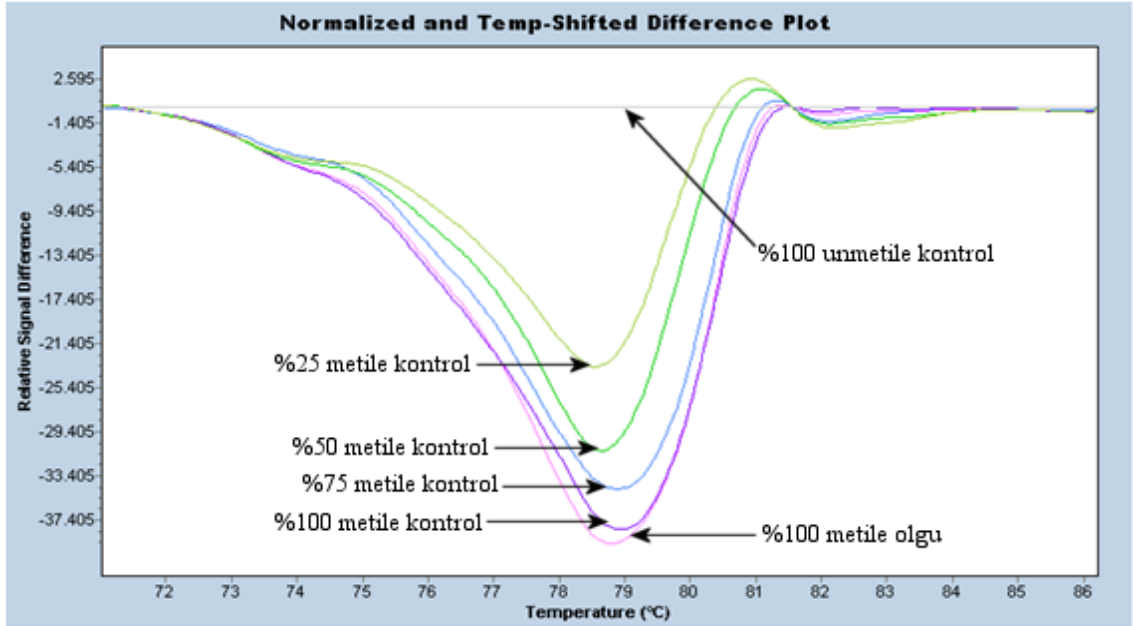
Şekil 4.12. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %25 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



Şekil 4.13. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %50 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



Şekil 4.14. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %75 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



Şekil 4.15. RAR β 2 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %100 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü

Genel olarak bakıldığında meme kanseri tanısı almış olan 80 olgunun 71'inin (%88,75'inin) RAR β 2 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 80 olgunun 9'unda (%11,25'inde) metilasyon gözlenmemiştir.

Retinoik asit reseptör beta2 (RAR β 2) geninin promotor bölge metilasyonu 15/80 olguda %100 metile, 8/80 olguda %75 metile, 4/80 olguda %50 metile, 8/80 olguda %25 metile, 36/80 olguda %25 altı metile olarak saptanmıştır. Ayrıca olguların 9/80'inde RAR β 2 geninde promotor bölge metilasyonu saptanmamıştır. Tablo 4.12.'de RAR β 2 geni promotor metilasyonu seviyeleri yüzde (%) ve sayısal (n) olarak belirtilmiştir.

Tablo 4.12. RAR β 2 geni metilasyon oranları

METİLASYON ORANI	HASTA ORANI (%) (n)
%100 METİLE	%18,75 (15/80)
%75 METİLE	%10 (8/80)
%50 METİLE	%5 (4/80)
%25 METİLE	%10 (8/80)
%25 ALTI METİLE	%45 (45/80)
UNMETİLE	%11,25 (9/80)

4.3.2. Olguların Yaşları, Evreleri, Lenf nodu metastazları, ER, PR ve HER2/NEU Durumlarının RAR β 2 Geni ile İlişkisi

4.3.2.1. Olguların Yaşı ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Retinoik asit reseptör beta2 (RAR β 2) geni promotor metilasyonu gözlenen olguların yaş ortalamaları 58,14 \pm 11,25 iken, unmetile olan olguların yaş ortalamaları 60,78 \pm 10,05 olarak saptanmıştır.

Yaşı \leq 50 olan 17/19 olgunun RAR β 2 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 2/19 olguda promotor metilasyonu gözlenmemiştir. Yaşı $>$ 50 olan 54/61 olgunun RAR β 2 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 7/61 olguda ise promotor metilasyonu gözlenmemiştir (Tablo 4.13.). Yapılan ‘2 Proportions Testi’ ile yaş ve RAR β 2 promotor metilasyonu arasında ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.13. Olguların Yaşı ve RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu dağılımı

	rarb2		Total
	metile	unmetile	
Yaş \leq 50	17	2	19
$>$ 50	54	7	61
Total	71	9	80

4.3.2.2. Tümörün Tipi ile RAR β 2 Geni Promoter Metilasyonu İlişkisi

Tümörün tipi ile RAR β 2 geni promoter metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; invaziv duktal karsinomda (IDC) 59/67 olguda promoter metilasyonu gözlenirken, 8/67 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir. İnvaziv lobüler karsinomda (ILC) 12/13 olguda promoter metilasyonu gözlenirken, 1/13 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.14.). Yapılan istatistiksel analize göre hem invaziv duktal karsinomda hem de invaziv lobüler karsinom tümör tipinde olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında metile olan olguların unmetile olan olgulara göre RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu çok daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,001$).

Tablo 4.14. Olguların tümör tipi ve RAR β 2 geni promotor metilasyon durumu dağılımı

			rarb2		Total
			metile	unmetile	
tumortipi	invaziv ductal	Count	59	8	67
		% within tumortipi	88,1%	11,9%	100,0%
	invaziv lobuler	Count	12	1	13
		% within tumortipi	92,3%	7,7%	100,0%
Total		Count	71	9	80
		% within tumortipi	88,8%	11,3%	100,0%

Tümörün tipi ile RAR β 2 geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında RAR β 2 geninde promotor metilasyonu gözlenen 59/71 olgu invaziv duktal karsinom, 12/71 olgu ise invaziv lobüler karsinom olarak saptanmıştır. Metile olan invaziv ductal karsinom ve invaziv lobüler karsinom olgularının dağılımı tablo 4.15.'de gösterilmiştir. Retinoik asit reseptör beta2 geninde promotor metilasyonu gözlenen olguların %83,1'i invaziv duktal karsinom olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analize göre sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında invaziv duktal karsinom tümörün tipinin invaziv lobüler karsinom tümör tipine göre RAR β 2 geni promotor hipermetilasyonunun çok daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir (p<0,001).

Tablo 4.15. Metile olan invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom olgularının dağılımı

			rarb2		Total
			metile	unmetile	
tumortipi	invaziv ductal	Count	59	8	67
		% within rarb2	83,1%	88,9%	83,8%
	invaziv lobuler	Count	12	1	13
		% within rarb2	16,9%	11,1%	16,3%
Total		Count	71	9	80
		% within rarb2	100,0%	100,0%	100,0%

4.3.2.3. Tümörün Evresi ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Tümörün evresi ile RAR β 2 geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; Evre II'de 27/29 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 2/29 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir. Evre III'de 38/45 olguda promotor metilasyonu

gözlenirken, 7/45 olguda metilasyon gözlenmemiştir. Evre IV’de ise 6/6 olguda promoter metilasyonu görülürken, 0/6 olguda metilasyon saptanmamıştır (Tablo 4.16.). Yapılan istatistiksel analize göre, Evre II ve evre III’de RAR β 2 geni için metile olan olguların unmetile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Ayrıca evre II’de RAR β 2 gen metilasyonunun erken evrede başladığını göstermesi önemli bir bulgudur.

Tablo 4.16. Olguların tümör evresi ve RAR β 2 geni promoter metilasyon durumu dağılımı

			rarb2		Total
			metile	unmetile	
evre	2a2b	Count	27	2	29
		% within evre	93,1%	6,9%	100,0%
	3a3b	Count	38	7	45
		% within evre	84,4%	15,6%	100,0%
	4	Count	6	0	6
		% within evre	100,0%	,0%	100,0%
Total		Count	71	9	80
		% within evre	88,8%	11,3%	100,0%

Tümörün evresi ile RAR β 2 geni promoter metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında RAR β 2 geninde promoter metilasyonu gözlenen 27/71 olgu evre II, 38/71 olgu evre III ve 6/71 olgu evre IV olarak saptanmıştır. Metile olan evreII, evreIII ve evreIV olan olguların dağılımı tablo 4.17.’de gösterilmiştir. Retinoik asit reseptör beta2 geninde promoter metilasyonu gözlenen olguların %53,5’i evre III olarak saptanmıştır. Evre IV’deki olguların hepsinin metile olduğu saptanmıştır. Fakat evre IV’deki olguların sayısının azlığı nedeni ile diğer evrelerle tam olarak karşılaştırma yapılamamıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu evre III’de evre II’ye göre daha yüksek oranda metilasyon gözlenmiştir ancak tümörün evresi ile RAR β 2 geni promoter metilasyonu arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.17. Metile olan evreII, evreIII ve evreIV olan olguların dağılımı

			rarb2		Total
			metile	unmetile	
evre	2a2b	Count	27	2	29
		% within rarb2	38,0%	22,2%	36,3%
	3a3b	Count	38	7	45
		% within rarb2	53,5%	77,8%	56,3%
	4	Count	6	0	6
		% within rarb2	8,5%	,0%	7,5%
Total		Count	71	9	80
		% within rarb2	100,0%	100,0%	100,0%

4.3.2.4. Lenf Nodu Metastazı ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Lenf nodu metastazı ile RAR β 2 geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında RAR β 2 promotor hipermetilasyonu gözlenen 61/71 olgunun lenf nodu metastazı pozitif iken, 10/71 olgu lenf nodu bakımından negatiftir. Metile olan lenf nodu(+) ve lenf nodu(-) olan olguların dağılımı tablo 4.18.'de gösterilmiştir. Metile olan olguların %85,9'unda lenf nodu pozitifliği saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında RAR β 2 geni promotor hipermetilasyonu lenf nodu(+) olan olguların lenf nodu(-) olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu görülmüştür (p<0,001).

Tablo 4.18. Metile olan lenf nodu(+) ve lenf nodu(-) olan olguların dağılımı

			rarb2		Total
			metile	unmetile	
lenfnodu	pozitif	Count	61	6	67
		% within rarb2	85,9%	66,7%	83,8%
	negatif	Count	10	3	13
		% within rarb2	14,1%	33,3%	16,3%
Total		Count	71	9	80
		% within rarb2	100,0%	100,0%	100,0%

4.3.2.5. Östrojen Reseptör ile RARβ2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Östrojen reseptör durumu ile RARβ2 geni promoter metilasyonu olan olgular karşılaştırıldığında RARβ2 promotor metilasyonu gözlenen 49/71 olguda ER(+) iken 22/71 olguda ER(-) olarak saptanmıştır. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı tablo 4.19.'da gösterilmiştir. Metile olan olguların %69'u ER(+) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında ER(+) olan olguların ER(-) olan olgulara göre RARβ2 promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4.19. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı

			rarb2		Total
			metile	unmetile	
erdurumu	pozitif	Count	49	5	54
		% within rarb2	69,0%	55,6%	67,5%
	negatif	Count	22	4	26
		% within rarb2	31,0%	44,4%	32,5%
Total		Count	71	9	80
		% within rarb2	100,0%	100,0%	100,0%

4.3.2.6. Progesteron Reseptör ile RARβ2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Progesteron reseptör ile RARβ2 geni promoter metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında RARβ2 promotor metilasyonu gözlenen 38/71 olguda PR(+) iken, 33/71 olguda PR(-) olarak saptanmıştır. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı tablo 4.20.'de gösterilmiştir. Retinoik asit reseptör beta2 promotor metilasyonu gözlenen olguların %53,5'i PR(+), %46,5'i PR(-) olarak saptandığından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.20. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı

			rarb2		Total
			metile	unmetile	
prdurumu	pozitif	Count	38	4	42
		% within rarb2	53,5%	44,4%	52,5%
	negatif	Count	33	5	38
		% within rarb2	46,5%	55,6%	47,5%
Total		Count	71	9	80
		% within rarb2	100,0%	100,0%	100,0%

4.3.2.7. HER2/NEU ile RAR β 2 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

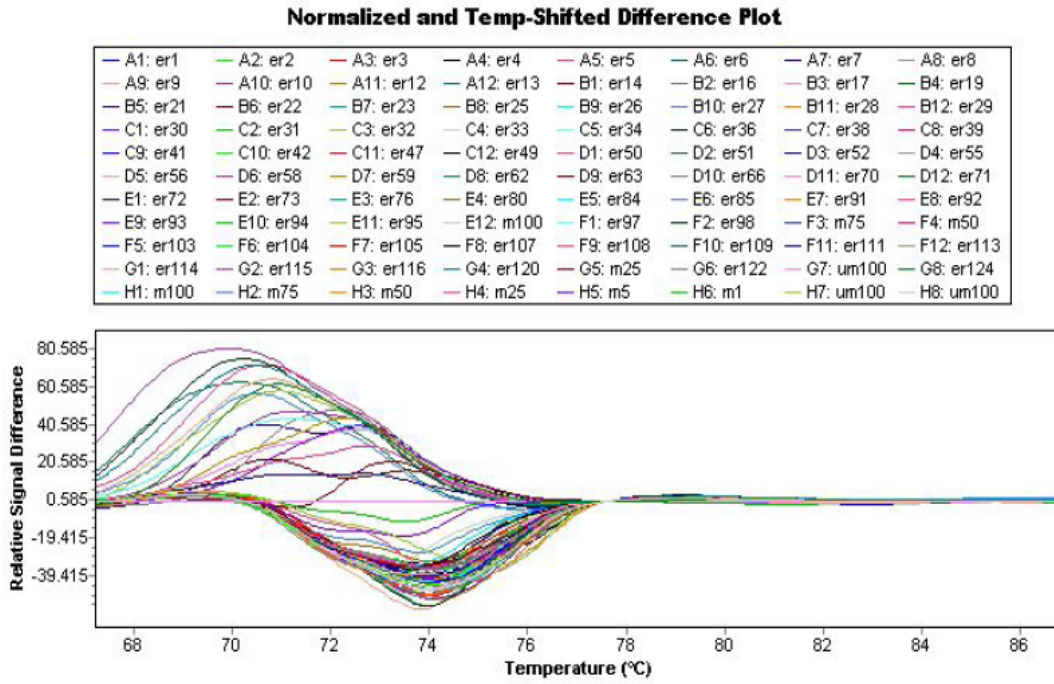
HER2/NEU ile RAR β 2 geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında RAR β 2 promotor metilasyonu gözlenen 29/71 olguda HER2/NEU(+) iken, 42/71 olguda HER2/NEU(-) olarak saptanmıştır. Metile olan HER2/NEU (+) ve HER2/NEU (-) olan olguların dağılımı tablo 4.21.'de gösterilmiştir. Retinoik asit reseptör beta2 promotor metilasyonu gözlenen olguların %59,2'si HER2/NEU(-) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında HER2/NEU(-) olan olguların HER2/NEU(+) olan olgulara göre RAR β 2 promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır (p<0,05).

Tablo 4.21. Metile olan HER2/NEU (+) ve HER2/NEU (-) olan olguların dağılımı

			rarb2		Total
			metile	unmetile	
HER2 pozitif	Count	29	1	30	
	% within rarb2	40,8%	11,1%	37,5%	
negatif	Count	42	8	50	
	% within rarb2	59,2%	88,9%	62,5%	
Total	Count	71	9	80	
	% within rarb2	100,0%	100,0%	100,0%	

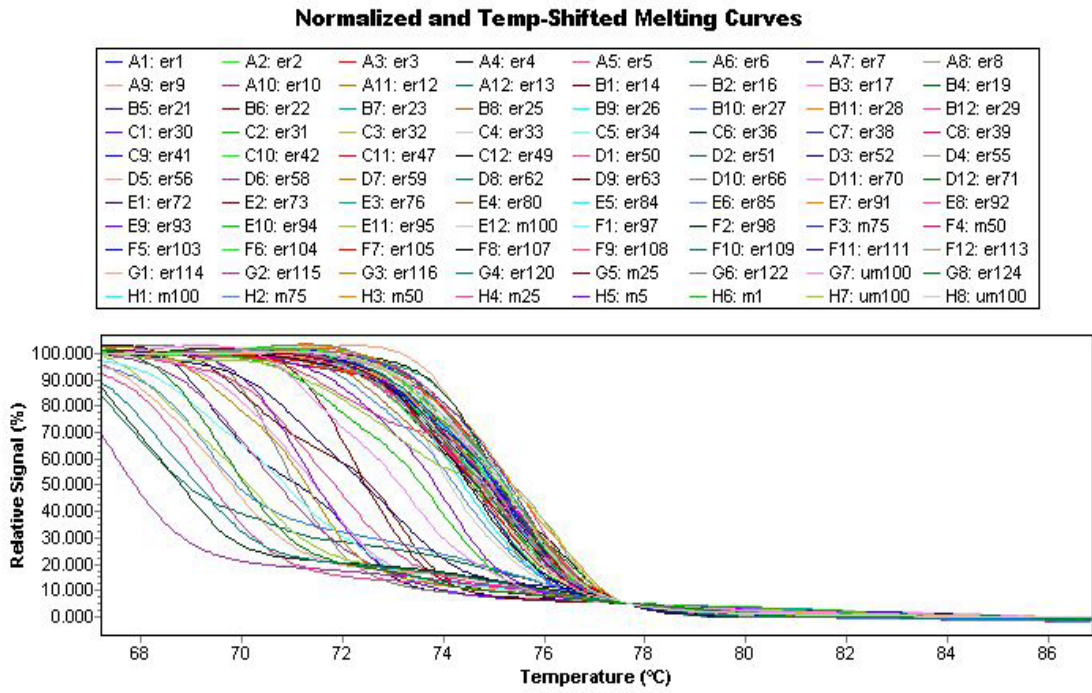
4.4. Östrojen Reseptör1 (ESR1) Geninde Saptanan Bulgular

Östrojen reseptör1 geni metilasyon analizinde çalışılan bütün örnekler değerlendirmeye alınmıştır. ‘Difference plot’ ile analiz bölümünde unmetile kontrol grubu referans eğri olarak kullanılmıştır. Erime eğrileri benzer olan örnekler otomatik olarak aynı gruplara kümelenebilir. Metilasyona uğrayan örnekler metile kontrol gruplarının yanında, unmetile örnekler ise unmetile kontrol grubunun yanında pik vermiştir. Buna göre referans eğrisinin üzerinde görülen eğriler metile olmayan olguları gösterirken; referans eğrisinin altında görülen eğriler farklı oranlarda metile olan olguları göstermektedir (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Araştırma grubuna dahil edilen ESR1 genine ait tüm örnekler ve kontrol gruplarının ‘Difference plot’ görüntüsü

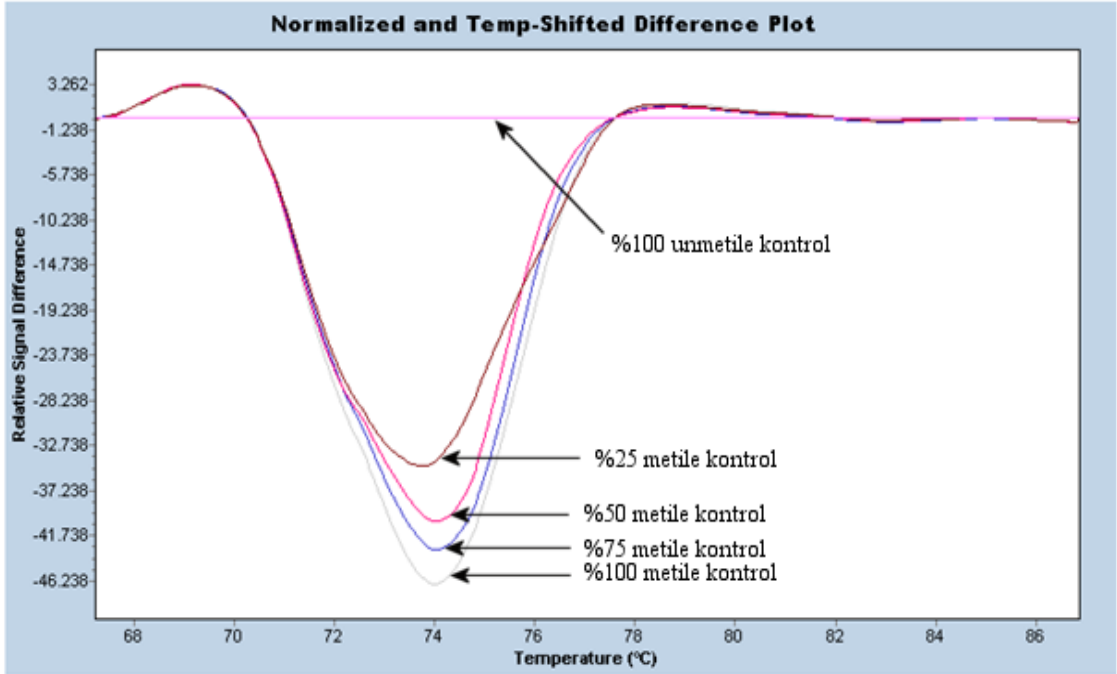
“Tm calling” kısmında örnekler kontrol grubuyla beraber erime sıcaklıkları karşılaştırılmıştır. Metile olmayan örnekler daha erken amplifikasyona girerken metile olan örnekler daha geç amplifikasyona girmiştir. Buna göre metile olmayan örnekler erime eğrisinin altında gözlenirken metile olan örnekler erime eğrisinin üzerinde görülmüştür (Şekil 4.17.).



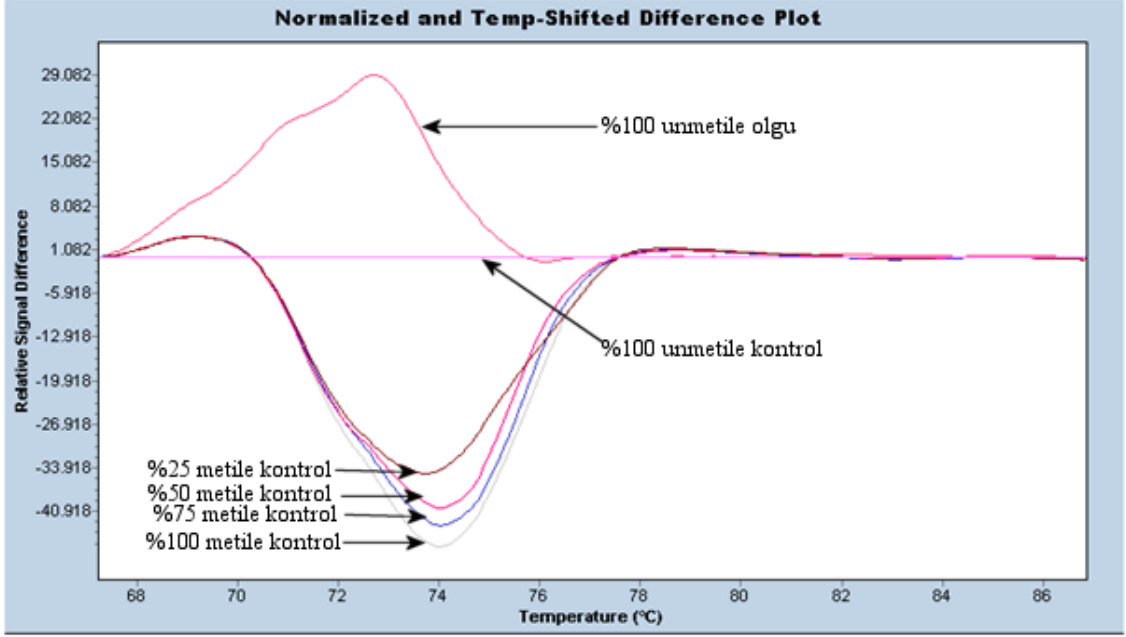
Şekil 4.17. Araştırma grubuna dahil edilen ESR1 genine ait tüm örneklerin ve kontrol gruplarına ait piklerin erime eğrisi görüntüsü

4.4.1. Östrojen Reseptör1 (ESR1) Geninde Çalışma Grubuna Ait Bulgular

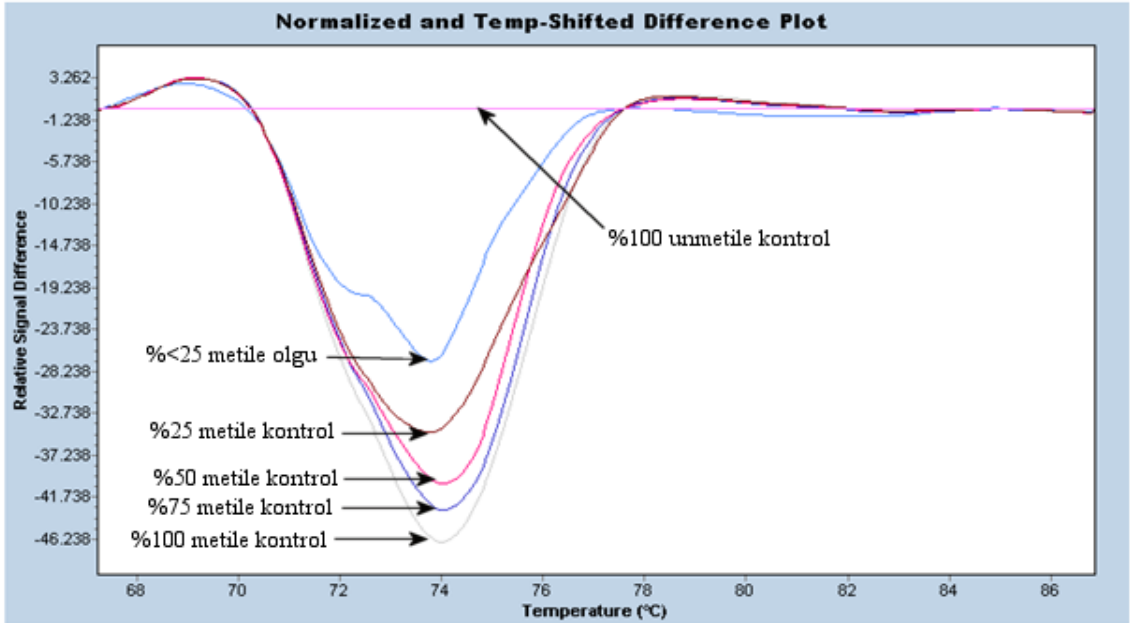
Çalışma tamamlandıktan sonra önce kontrol grubu eğrileri “Difference plot” analiz kısmında ortaya çıkartılır. Bu kontrol grupları temel alınarak öncelikle referans eğrisi olan %100 unmetile kontrol seçilir ve sırasıyla, %25 metile, %50 metile, %75 metile ve %100 metile olan kontroller farklı pikler vererek sıralanır (Şekil 4.18.). Örneklerin analizi bu kontrol grubuyla karşılaştırılarak belirlenmiştir.



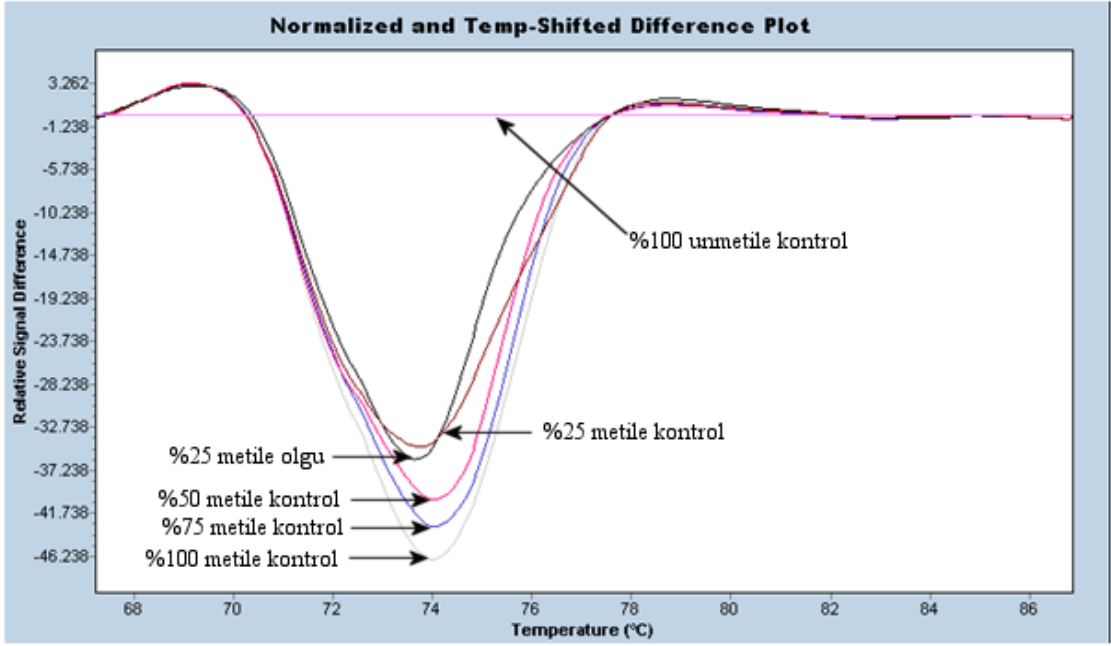
Şekil 4.18. ESR1 genine ait kontrol grubunun pikleri “Difference plot” üzerindeki görüntüsü



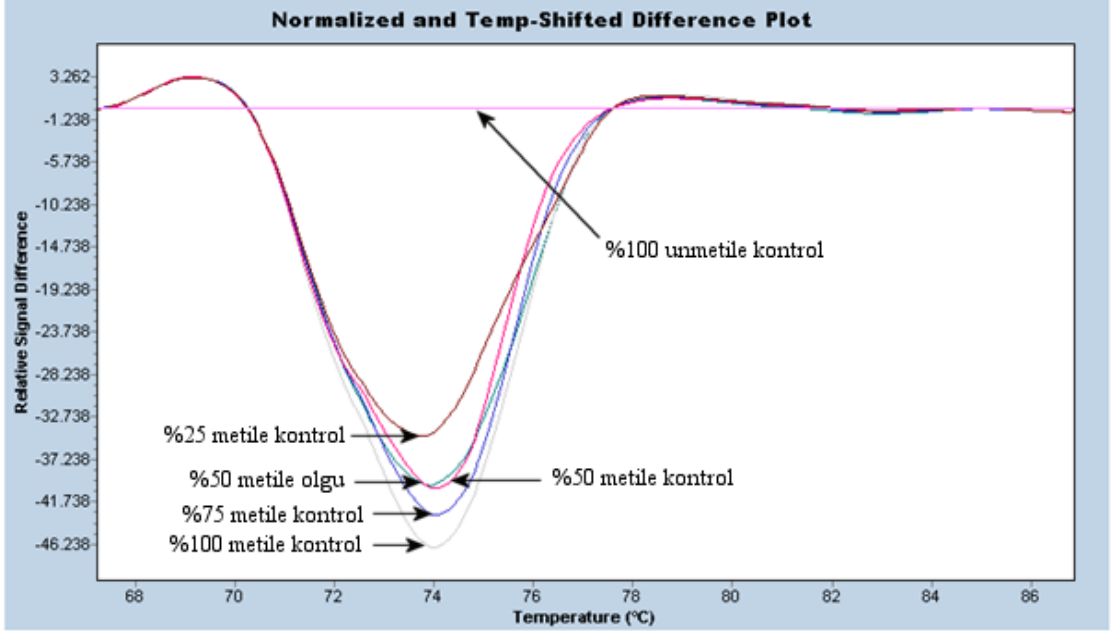
Şekil 4.19. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen unmetile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



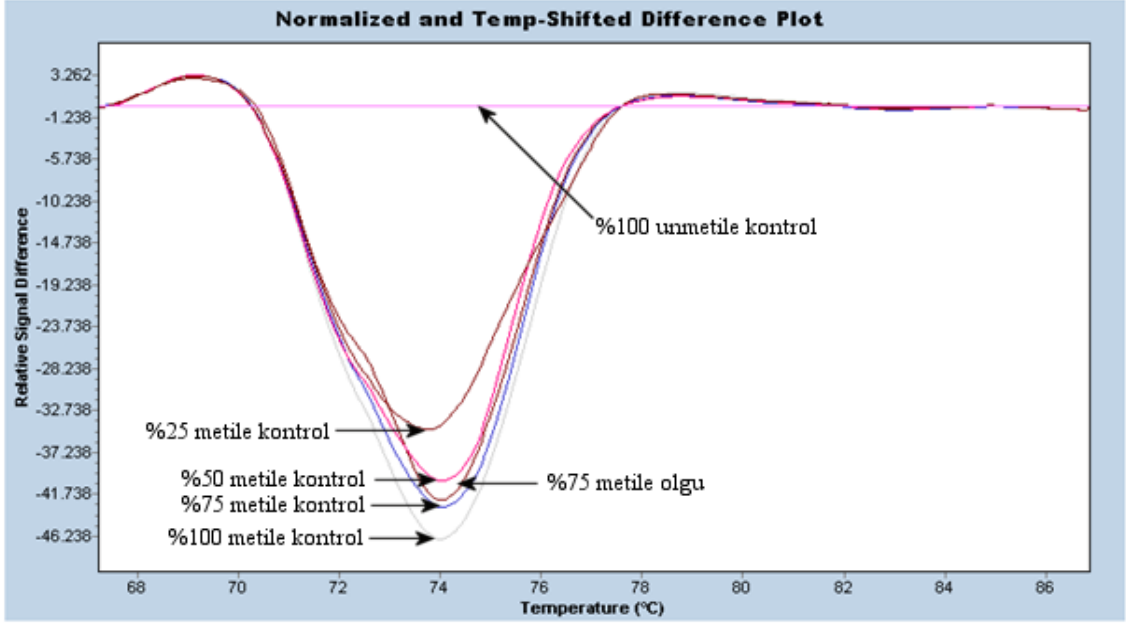
Şekil 4.20. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %25’den daha düşük oranda metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



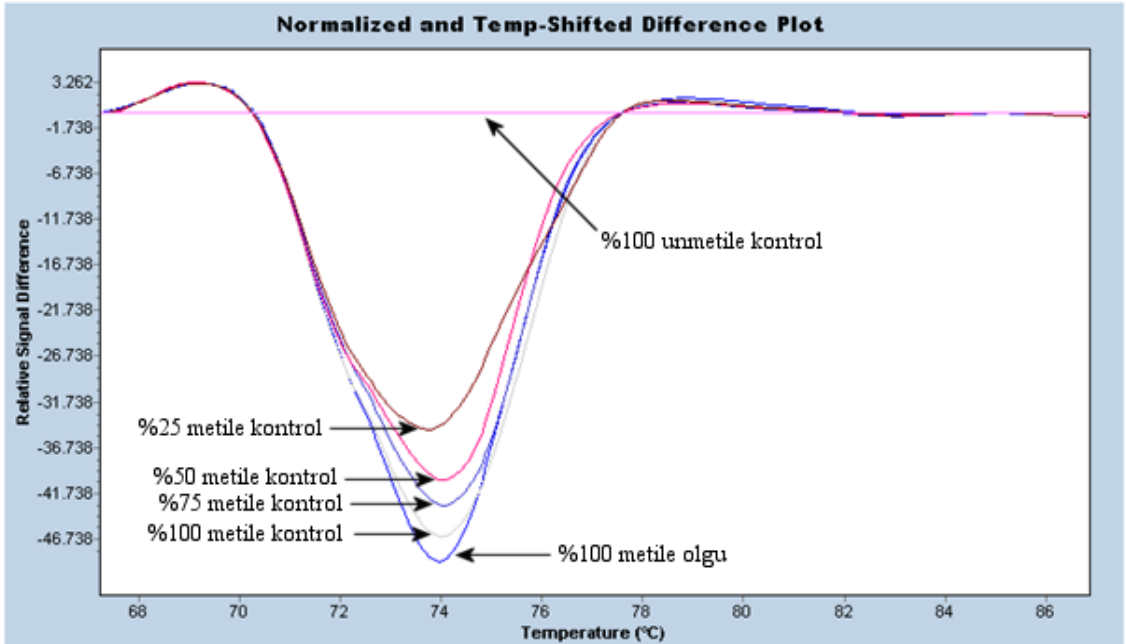
Şekil 4.21. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %25 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



Şekil 4.22. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %50 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



Şekil 4.23. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %75 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü



Şekil 4.24. ESR1 geninde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tespit edilen %100 oranında metile olan olgunun “gene scanning” “difference plot” görüntüsü

Genel olarak bakıldığında meme kanseri tanısı almış olan 80 olgunun 58'inin (%72,5'inin) ESR1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, olguların 22'sinde (%27,5'inde) metilasyon saptanmamıştır.

Östrojen reseptör1 geninin promotor bölge metilasyonu 18/80 olguda %100 metile, 14/80 olguda %75 metile, 9/80 olguda %50 metile, 13/80 olguda %25 metile, 4/80 olguda %25 altı metile olarak saptanmıştır. Ayrıca olguların 22/80'inde ESR1 geninde promotor bölge metilasyonu saptanmamıştır. Promotor metilasyonu seviyeleri yüzde (%) ve sayısal (n) olarak belirtilmiştir (Tablo 4.22.).

Tablo 4.22. ESR1 geni metilasyon oranları

METİLASYON ORANI	HASTA ORANI (%) (n)
%100 METİLE	%22,5 (18/80)
%75 METİLE	%17,5 (14/80)
%50 METİLE	%11,25 (9/80)
%25 METİLE	%16,25 (13/80)
%25 ALTI METİLE	%5 (4/80)
UNMETİLE	%27,5 (22/80)

4.4.2. Olguların Yaşları, Evreleri, Lenf nodu metastazları, ER, PR ve HER2/NEU Durumlarının ESR1 Geni ile İlişkisi

4.4.2.1. Olguların Yaşı ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Östrojen reseptör1 (ESR1) geni promotor metilasyonu gözlenen olguların yaş ortalamaları $57,97 \pm 11,24$ iken, unmetile olan olguların yaş ortalamaları $59,68 \pm 10,86$ olarak saptanmıştır.

Yaşı ≤ 50 olan 16/19 olgunun ESR1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 3/19 olguda promotor metilasyonu gözlenmemiştir. Yaşı > 50 olan 42/61 olgunun ESR1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 19/61 olguda ise promotor metilasyonu gözlenmemiştir (Tablo 4.23.). Yapılan ‘2 Proportions Testi’ ile yaş ve ESR1 promotor metilasyonu arasında ilişki bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.23. Olguların yaşı ve ESR1 geni promoter metilasyon durumu dağılımı

	esr1		Total
	metile	unmetile	
Yaş ≤ 50	16	3	19
> 50	42	19	61
Total	58	22	80

4.4.2.2. Tümörün Tipi ile ESR1 Geni Promoter Metilasyonu İlişkisi

Tümörün tipi ile ESR1 geni promoter metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; invaziv duktal karsinomda (IDC) 49/67 olguda promoter metilasyonu gözlenirken, 18/67 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir. İnvaziv lobüler karsinomda (ILC) 9/13 olguda promoter metilasyonu gözlenirken; 4/13 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.24.). Yapılan istatistiksel analize göre hem invaziv duktal karsinomda hem de invaziv lobüler karsinom tümör tipinde olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında metile olan olguların unmetile olan olgulara göre ESR1 geni promoter hipermetilasyonu çok daha yüksek oranda saptanmıştır ($p < 0,001$).

Tablo 4.24. Olguların tümör tipi ve ESR1 geni promotor metilasyon durumu dağılımı

			esr1		Total
			metile	unmetile	
tumortipi	invaziv ductal	Count	49	18	67
		% within tumortipi	73,1%	26,9%	100,0%
	invaziv lobuler	Count	9	4	13
		% within tumortipi	69,2%	30,8%	100,0%
Total		Count	58	22	80
		% within tumortipi	72,5%	27,5%	100,0%

Tümörün tipi ile ESR1 geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında ESR1 geninde promotor metilasyonu gözlenen 49/58 olgu invaziv duktal karsinom, 9/58 olgu ise invaziv lobüler karsinom olarak saptanmıştır. Metile olan invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom olgularının dağılımı tablo 4.25.'de gösterilmiştir. Östrojen reseptör1 geninde promotor metilasyonu gözlenen olguların %84,5'i invaziv duktal karsinom olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analize göre sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında invaziv duktal karsinom tümörün tipinin invaziv lobüler karsinom tümör tipine göre ESR1 geni promotor hipermetilasyonunun çok daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Tablo 4.25. Metile olan invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom olgularının dağılımı

			esr1		Total
			metile	unmetile	
tumortipi	invaziv ductal	Count	49	18	67
		% within er1	84,5%	81,8%	83,8%
	invaziv lobuler	Count	9	4	13
		% within er1	15,5%	18,2%	16,3%
Total		Count	58	22	80
		% within er1	100,0%	100,0%	100,0%

4.4.2.3. Tümörün Evresi ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Tümörün evresi ile ESR1 geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; Evre II'de 21/29 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 8/29 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir. Evre III'de 32/45 olguda promotor metilasyonu

gözlenirken, 13/45 olguda metilasyon gözlenmemiştir. Evre IV'de ise 5/6 olguda promoter metilasyonu görülürken, 1/6 olguda metilasyon saptanmamıştır (Tablo 4.26.). Yapılan istatistiksel analize göre, Evre II ve evre III'de ESR1 geni için metile olan olguların unmetile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Ayrıca evre II'de ESR1 gen metilasyonunun erken evrede başladığını göstermesi önemli bir bulgudur.

Tablo 4.26. Olguların tümör evresi ve ESR1 geni promoter metilasyon durumu dağılımı

			esr1		Total
			metile	unmetile	
evre	2a2b	Count	21	8	29
		% within evre	72,4%	27,6%	100,0%
	3a3b	Count	32	13	45
		% within evre	71,1%	28,9%	100,0%
	4	Count	5	1	6
		% within evre	83,3%	16,7%	100,0%
Total		Count	58	22	80
		% within evre	72,5%	27,5%	100,0%

Tümörün evresi ile ESR1 geni promoter metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında ESR1 geninde promotor metilasyonu gözlenen 21/58 olgu evre II, 32/58 olgu evre III ve 5/58 olgu evre IV olarak saptanmıştır. Metile olan evreII, evreIII ve evreIV olan olguların dağılımı tablo 4.27.'de gösterilmiştir. Östrojen reseptör1 geninde promotor metilasyonu gözlenen olguların %55,2'si evre III olarak saptanmıştır. Evre IV'deki olguların sayısının azlığı nedeni ile tam olarak karşılaştırma yapılamamıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu evre III'de evre II'ye göre daha yüksek oranda metilasyon gözlenmiştir ancak tümörün evresi ile ESR1 geni promotor metilasyonu arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.27. Metile olan evreII, evreIII ve evreIV olan olguların dağılımı

			esr1		Total
			metile	unmetile	
evre	2a2b	Count	21	8	29
		% within er1	36,2%	36,4%	36,3%
	3a3b	Count	32	13	45
		% within er1	55,2%	59,1%	56,3%
	4	Count	5	1	6
		% within er1	8,6%	4,5%	7,5%
Total		Count	58	22	80
		% within er1	100,0%	100,0%	100,0%

4.4.2.4. Lenf Nodu Metastazı ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Lenf nodu metastazı ile ESR1 geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında ESR1 promotor hipermetilasyonu gözlenen 48/58 olgunun lenf nodu metastazı pozitif iken, 10/58 olgu lenf nodu bakımından negatiftir. Metile olan lenf nodu(+) ve lenf nodu(-) olan olguların dağılımı tablo 4.28.'de gösterilmiştir. Metile olan olguların %82,75'inde lenf nodu pozitifliği saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında ESR1 geni promotor hipermetilasyonunun lenf nodu(+) olan olguların lenf nodu(-) olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

Tablo 4.28. Metile olan lenf nodu(+) ve lenf nodu(-) olan olguların dağılımı

			esr1		Total
			metile	unmetile	
lenfnodu	pozitif	Count	48	19	67
		% within er1	82,8%	86,4%	83,8%
	negatif	Count	10	3	13
		% within er1	17,2%	13,6%	16,3%
Total		Count	58	22	80
		% within er1	100,0%	100,0%	100,0%

4.4.2.5. Östrojen Reseptör ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Östrojen reseptör ile ESR1 geni promoter metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında ESR1 promotor metilasyonu gözlenen 39/58 olguda ER(+) iken 19/58 olguda ER(-) olarak saptanmıştır. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı tablo 4.29.'da gösterilmiştir. Metile olan olguların %67,25'i ER(+) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında ER(+) olan olguların ER(-) olan olgulara göre ESR1 geni promotor hipermetilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p < 0,001$). Buna göre ESR1 geni promotor hipermetilasyonu ile ER pozitifliği anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4.29. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı

			esr1		Total
			metile	unmetile	
erdurumu	pozitif	Count	39	15	54
		% within er1	67,2%	68,2%	67,5%
	negatif	Count	19	7	26
		% within er1	32,8%	31,8%	32,5%
Total		Count	58	22	80
		% within er1	100,0%	100,0%	100,0%

4.4.2.6. Progesteron Reseptör ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Progesteron reseptör ile ESR1 geni promoter metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında ESR1 promotor metilasyonu gözlenen 28/58 olguda PR(+) iken, 30/58 olguda PR(-) olarak saptanmıştır. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı tablo 4.30.'da gösterilmiştir. Östrojen reseptör1 (ESR1) promotor metilasyonu gözlenen olguların %48,3'ü PR(+), %51,7'si PR(-) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda PR(+) olan metile olgular ile PR(-) olan metile olgular arasındaki oran anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.30. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı

			esr1		Total
			metile	unmetile	
prdurumu	pozitif	Count	28	14	42
		% within er1	48,3%	63,6%	52,5%
	negatif	Count	30	8	38
		% within er1	51,7%	36,4%	47,5%
Total		Count	58	22	80
		% within er1	100,0%	100,0%	100,0%

4.4.2.7. HER2/NEU ile ESR1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

HER2/NEU ile ESR1 geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında ESR1 promotor metilasyonu gözlenen 21/58 olguda HER2/NEU(+) iken, 37/58 olguda HER2/NEU(-) olarak saptanmıştır. Metile olan HER2/NEU(+) ve HER2/NEU(-) olan olguların dağılımı tablo 4.31.'de gösterilmiştir. Östrojen reseptör1 geni promotor metilasyonu gözlenen olguların %63,8'i HER2/NEU(-) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında HER2/NEU(-) olan olguların HER2/NEU(+) olan olgulara göre ESR1 promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.31. Metile olan HER2/NEU (+) ve HER2/NEU (-) olan olguların dağılımı

			esr1		Total
			metile	unmetile	
HER2	pozitif	Count	21	9	30
		% within er1	36,2%	40,9%	37,5%
	negatif	Count	37	13	50
		% within er1	63,8%	59,1%	62,5%
Total		Count	58	22	80
		% within er1	100,0%	100,0%	100,0%

5.TARTIŞMA

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Onkoloji Bilim Dalı arşivinden temin edilen meme kanseri tanısı almış 80 hastanın doku örnekleri dâhil edilmiştir. Olgulara ait doku örnekleri Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan parafin bloğa gömülü dokulardan 10µ'luk 10'ar kesit halinde kapalı tüpler içerisinde laboratuvarımıza gelmiştir.

Olguların yaşları, hastalığın evresi, tümörün tipi, lenf nodu metastazları, ER, PR ve HER2/NEU gibi klinikopatolojik durumları hasta dosyalarından temin edilmiştir. Doku örnekleri DNA eldesinden sonra bisülfid modifikasyon işlemine tabii tutulmuştur. Modifiye edilen örneklerin metilasyon spesifik HRM yöntemiyle, TWIST, RARβ2 ve ESR1 genleri için Lightcycler 480 cihazında metilasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları literatür ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

Bugüne kadar pek çok gende epigenetik mekanizmaların incelendiği çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu epigenetik değişimler içerisinde en önemli çalışma sahası metilasyon olmuştur. Araştırmacıların geçmişte yoğunlaştıkları alanlar gen düzeyindeki mutasyonlar ve sonuçları iken, metilasyonun kanser genetiğindeki rolünün anlaşılması nedeniyle son yıllarda farklı kanser genlerinin metilasyon profilleri ve sonuçları üzerine yoğunlaşmıştır.

Araştırmacılar genomdaki metilasyon profillerindeki değişimleri incelerken birçok farklı teknik kullanmışlardır. Bu tekniklere her geçen gün yeni yöntemlerin ilave edilmesiyle bu araştırma sahası geniş boyutlara ulaşmış ve birçok gendeki metilasyon değişimleri net bir şekilde tanımlanmıştır.

Metilasyon spesifik-HRM yöntemi metilasyon analizleri içerisinde son yıllarda gerek dünyada gerekse de ülkemizde yeni kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızın önemli bir özelliği de bu yöntemin ülkemizde meme kanserli olgulardaki metilasyon analizleri için ilk defa kullanılıyor olmasıdır. Bu nedenle elde edilen veriler metilasyon analiz yöntem bulguları ile de karşılaştırılacaktır.

5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması

5.1.1. Meme Kanserli Olgularda TWIST geni Metilasyonunun Literatürdeki Diğer Çalışmalar ile Karşılaştırılması

Gort ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada 76 invaziv meme kanserli olgunun TWIST geninin promoter metilasyon seviyelerini ve TWIST geninin protein ekspresyon seviyesini incelemişlerdir (32). Yapılan çalışma Kantitatif Multiplex Metilasyon spesifik PCR ile gerçekleştirilmiştir. İnvaziv meme kanserli 76 olgunun parafine gömülü doku kesitleriyle çalışılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 76 olgunun 26'sında (%34) TWIST geninde promoter hipermetilasyonu görülürken, olguların 50'sinde (%66) genin unmetile konumda olduğu saptanmıştır (Tablo 5.1.).

Auwers ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada 56 primer meme tümörlü ve 56 normal doku örneği olan meme kanserli hastalar ile 9 tane normal meme dokusu örneği olan etkilenmemiş kadın bireylerden kantitatif metilasyon spesifik PCR (qMSP) yöntemiyle 6 genin (DAPK, TWIST, HIN-1, RASSF1A, RARβ2 ve APC) metilasyon profilleri incelenmiştir (4). Genlerdeki kanserli doku ile meme kanserli olguların normal dokuları arasındaki orana bakıldığında, TWIST geninde %46 kanserli dokuda, %36 normal dokuda promoter hipermetilasyon oranı saptanmıştır (Tablo 5.1.). Ayrıca genlerden bir tanesi primer meme tümöründe hipermetileyken aynı zamanda normal meme dokusunda da TWIST geninde hipermetile konumda olduğu (olguların %54'ünde) saptanmıştır.

Shinozaki ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada 151 primer meme tümörlü olgunun hipermetilasyon durumlarını lenf nodu metastazları ile ilişkilendirmiştir. Yapılan çalışmada 6 gen (RASSF1A, APC, TWIST, CDH1, GSTP1 ve RARβ2) metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) yöntemiyle parafine gömülü dokulardan çalışılmıştır (102). Çalışma sonucunda primer meme kanseri olan 151 olgunun 72'sinde (%48) TWIST geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır (Tablo 5.1.).

Sunami ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada primer meme tümörlü 130 olgunun 65'i ER(+) ve 65'i ER(-) parafine gömülü (FFPE) örneklerinden

metilasyon spesifik PCR yöntemiyle 8 genin (RASSF1A, CCND2, GSTP1, **TWIST**, APC, NES1, RAR β 2 ve CDH1) metilasyon durumları incelenmiştir (107). Buna göre olguların %37,5'inde (49/130) TWIST geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır..

Li ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada 193 primer meme tümörlü frozen doku örnekleriyle metilasyon spesifik PCR yöntemiyle 7 genin (RAR β 2, CDH1, ESR1, BRCA1, CCND2, P16 ve **TWIST**) metilasyon durumları incelenmiştir (61). Çalışma sonucunda 193 olgunun 109'unda (%59) TWIST geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır (Tablo 5.1.).

Huang ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada meme kanserinde 86 filloid ve 26 fibroadenoma tümörlü olgunun parafin bloğa gömülü doku örnekleriyle metilasyon spesifik HRM yöntemini kullanarak 11 genin (RASSF1A, **TWIST**, APC, WIF1, MGMT, MAL, RAR β , CDKN2A, CDH1, TP73 ve MLH1) metilasyon durumlarını incelemişlerdir (44). Çalışma sonucunda olguların %10,7'sinde TWIST geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır (Tablo 5.1.).

Bizim çalışmamız sonucunda araştırmaya dahil edilen 80 olgunun 67'si invaziv duktal karsinom, 13 olgu ise invaziv lobüler karsinom tümör tipindedir. Çalışmamızda olguların %25'inde (20/80) TWIST geninde promoter hipermetilasyonu görülürken; olguların %75'inde (60/80) genin unmetile konumda olduğu saptanmıştır. Buna göre yaptığımız çalışmadaki metilasyon oranımız *Huang ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışma hariç yapılan diğer çalışmalardan daha düşük seviyede saptanmıştır. Araştırmacılar çalışma gruplarına oldukça fazla hasta dahil etmişlerdir. *Shinozaki, Sunami, Li ve arkadaşları* metilasyon spesifik PCR yönteminden faydalanmışlardır. *Gort, Auwera, Huang ve arkadaşları* ise bizim çalışmamızda olduğu gibi kantitatif metilasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Bu yöntemin metilasyon spesifik PCR yöntemine göre spesifitesi ve sensitivitesi oldukça yüksektir fakat metilasyon oranımızın araştırmacıların belirlediği metilasyon oranları arasındaki bu farklılığın tümör heterojenitesinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

5.1.2. Meme Kanserli Olgularda TWIST Geni Metilasyonunun Prognostik Faktörlerle Birlikte Değerlendirilmesi

Gort ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonucunda 76 invaziv meme kanserli olgunun TWIST geninin promoter metilasyon seviyelerini ve TWIST geninin protein ekspresyon seviyesini incelemişlerdir (32). Yapılan çalışma sonucunda 76 olgunun 26'sında (%34) TWIST geninde promoter hipermetilasyonu görülmüştür. Bu sonuca göre TWIST geni promoter hipermetilasyonunun mitotik indeks, tümör boyutu, tümörün evresi, lenf nodu, HER2/NEU, ER ve PR gibi prognostik faktörlerle ilişkili olmadığını belirtmişlerdir (32).

Shinozaki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 151 primer meme tümörlü olgunun hipermetilasyon durumlarını lenf nodu metastazları ile ilişkilendirmişlerdir. Lenf nodu metastazı görülen 29 olgunun 8'inde (%28) TWIST geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır. Bu çalışmada TWIST geni promoter hipermetilasyonu ile klinik ya da patolojik olarak lenf nodu pozitifliği ya da HER2/NEU durumu arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır (102).

Sunami ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada TWIST geninde ER(-) 65 olgunun 17'si (%26) metile konumadayken, ER(+) 65 olgunun 32'si (%49) metile konumdadır (Tablo 5.1.). Buna göre TWIST geni promoter hipermetilasyonu ile ER(+)'liği arasında korelasyon bulunmaktadır. Ancak TWIST geni hipermetilasyonu ile HER2/NEU ve lenf nodu pozitifliği ya da negatifliği arasında herhangi bir korelasyon kurulamamıştır (107).

Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonucunda metilasyon durumları prognostik faktörlerle karşılaştırıldığında TWIST geni promoter hipermetilasyonunun lenf nodu ve HER2/NEU pozitif ya da negatifliği ile ilişki kurulamamıştır (61). Yapılan çalışmada ER(-) 54 olgunun 26'sında (%49) ve ER(+) 134 olgunun 82'sinde (%64) TWIST geni promoter hipermetilasyonu gözlenmiştir ($p<0,07$) (61). Buna göre TWIST geni promoter hipermetilasyonu ile ER(+)'liği arasında korelasyon bulunmaktadır.

Bizim çalışmamızda TWIST geni promoter hipermetilasyonunun prognostik faktörlerle karşılaştırıldığında tümörün evresi ve yaş durumuyla ilişki kurulamamıştır.

Buna karşın çalışmamızda lenf nodu pozitifliği, ER pozitifliği, PR negatifliği ve HER2/NEU pozitifliği ile TWIST geni promoter hipermetilasyonu arasında korelasyon bulunmaktadır. *Li, Sunami ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışmalarda ER(+)'liği ile TWIST geni promoter hipermetilasyonu arasındaki ilişki bizim çalışmamızla uyum göstermektedir.

5.1.3. Meme Kanseri Olgularında RAR β 2 Geni Metilasyonunun Literatürdeki Diğer Çalışmalar ile Karşılaştırılması

Park ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada 125 olguda meme kanseri progresyonundaki promoter CpG ada hipermetilasyonları incelenmiştir (86). Parafine gömülü (FFPE) materyallerden 15 farklı genin (HOXA1, TMEFF2, MT1G, DLEC1, GSTP1, **RAR β 2**, RASSF1A, GRIN2B, SFRP1, SFRP4, SCGB3A1 (HIN-1), APC, HOXA10, RUNX3 ve IGF2) analizi Metillight yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda duktal karsinom in situ (DCIS) ile invaziv duktal karsinom (IDC) tümör tipleri ile RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu arasında farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 125 olgunun 73'ünde (%58) RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır.

Auweru ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada 56 primer meme tümörlü ve 56 normal doku örneği olan meme kanserli hastalar ile 9 tane normal meme dokusu örneği olan etkilenmemiş kadın bireylerden kantitatif metilasyon spesifik PCR (qMSP) yöntemiyle 6 genin (DAPK, TWIST, HIN-1, RASSF1A, **RAR β 2** ve APC) metilasyon profilleri incelenmiştir (4). Genlerdeki kanserli doku ile meme kanserli olguların normal dokuları arasındaki oran karşılaştırıldığında, RAR β 2 geninde %29 kanserli dokuda ve %34 normal dokuda promoter hipermetilasyonu saptanmıştır (Tablo 5.1.). Ayrıca genlerden bir tanesi primer meme tümöründe hipermetileyen aynı zamanda normal meme dokusunda da hipermetile konumda olduğu RAR β 2 geninde olguların %69'unda saptanmıştır.

Feng ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada 38 primer meme tümörü ve lenf nodu metastazı olan olgularda 6 tümör süpresör genin (HIN-1, RASSF1A, RIL, CDH13, **RAR β 2** ve E-cadherin) frozen dokulardan bisülfid

pyrosequencing ile metilasyon durumları incelenmiştir (27). Amaçları tümör progresyonunda primer meme tümörü ile metastatik meme tümörlerinin bu 6 gendeki metilasyon durumlarının karşılaştırmasıdır. Bu çalışmada, her PCR aşamasında pozitif kontrol olarak birçok gende yüksek metilasyon görülen MDAMB-231 meme kanseri hücre serileri ve negatif kontrol olarak da normal meme epitelial hücreleri olan HMEC23 (6 gende unmetile konumdayken sadece LINE1 'de metile konumdadır) kullanılmıştır. Buna göre primer meme tümörü olan 23/38 (%60,5) olguda RAR β 2 geni hipermetile konumdayken, metastatik meme tümörü olan 21/38 (%55,3) olguda RAR β 2 geninde hipermetilasyon saptanmıştır (Tablo 5.1.).

Bizim çalışmamızda olgularımız invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom tümör tiplerindedir. Olguların %88,75'inde (71/80) RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır (Tablo 5.1.). Metilasyon oranımız *Park, Auwera, Feng ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışmadan çok daha yüksek oranda saptanmıştır. Araştırmacıların analiz yöntemlerine bakıldığı zaman her üç çalışmada da yüksek sensitivite ve spesifite gösteren analiz yöntemleri kullanılmıştır. Ancak *Park, Auwera, Feng ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışma ile bizim araştırmamız arasındaki metilasyon oran farklılığının tümör heterojenitesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Pirouzpanah ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada 137 primer meme kanserli olguda **RAR β 2** ve ESR1 genlerinin hipermetilasyon durumlarını incelemişlerdir. Yapılan çalışma metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (89). Retinoik asit reseptör beta2 (RAR β 2) geni 137 vakanın 50'sinde (%36,5) hipermetile durumda olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5.1).

Sunami ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada primer meme tümörlü 130 olgunun (65'i ER(+) ve 65'i ER(-) parafine gömülü (FFPE) örneklerinden metilasyon spesifik PCR yöntemiyle 8 genin (RASSF1A, CCND2, GSTP1, TWIST, APC, NES1, **RAR β 2** ve CDH1) metilasyon durumları incelenmiştir (107). Buna göre olguların %27'sinde (35/130) RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır.

Li ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada 193 meme karsinomu frozen doku örnekleriyle metilasyon spesifik PCR yöntemiyle 7 genin (**RAR β 2**, CDH1,

ESR1, BRCA1, CCND2, P16 ve TWIST) metilasyon durumları incelenmiştir (61). Çalışma sonucunda 193 olgunun 50'sinde (%26) RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır (Tablo 5.1.).

Shinozaki ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada 151 primer meme tümörlü olgunun hipermetilasyon durumlarını lenf nodu metastazları ile ilişkilendirmişlerdir. Yapılan çalışmada 6 gen (RASSF1A, APC, TWIST, CDH1, GSTP1 ve **RAR β 2**) metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) yöntemiyle parafine gömülü dokulardan çalışılmıştır (102). Çalışma sonucunda primer meme kanseri olan 151 olgunun 36'sında (%24) RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır (Tablo 5.1.).

Çalışmamızda RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu oranımız *Pirouzpanah, Sunami, Li, Shinozaki ve arkadaşlarının* çalışmasından çok daha yüksektir. Araştırmacılar çalışma yöntemi olarak metilasyon spesifik PCR yöntemini kullanmışlardır. Bizim yaptığımız çalışmada ise metilasyon spesifik HRM analiz yöntemi kullanılmıştır. Araştırmalar arasındaki farklılığın çalışılan yöntemden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) yönteminin temelindeki işlem, elde edilen DNA'nın bisülfite modifikasyonu, sitozinlerin urasile çevrilmesidir. Metile olan sitozin ise urasile dönüşmeyecektir. Kullanılan spesifik dizayn edilmiş primerler ile amplifikasyon gerçekleşir. Her gen bölgesi için ayrı ayrı PCR çalışması yapılması gerekmektedir. Değerlendirme aşamasında ise agaroz jel elektroforezinde görüntülenen bantların metile ve unmetile kontroller ile olan karşılaştırma esasına dayanmaktadır. Buna göre çalışılan gen bölgesinin metilasyon durumu sadece metile ya da unmetile şeklinde yorumlanabilmektedir. Hiçbir şekilde metilasyon oranı vermemektedir. Bu da yöntemin güvenilirliğini etkilemektedir.

Metilasyon spesifik-HRM'de ise, DNA izolasyonunun ardından elde edilen ürünün bisülfite modifikasyonu yapıldıktan sonra kapalı sistem içerisinde metilasyon analizi işlemine dayanmasıdır. Bu sayede metilasyon analizinin jel ya da matriks ayırımına gerek duymaksızın solüsyon içerisinde saptanmasına imkân tanımaktadır.

Böylece hem kontaminasyon riski azaltılır hem de analiz süresi kısaltılmış olur. Metilasyon spesifik HRM, metilasyon spesifik PCR'a göre çok daha hassas bir yöntemdir. Hassas ölçüm, artan her 0,1-1,0 derece (°C) sıcaklığın neden olduğu floresan sinyal şiddeti değişiminin kayıt edilebildiğini ifade etmektedir. Veri eldesi, 2 sn'deki 0,1-1,0°C sıcaklık artışına karşılık oluşan floresan sinyal şiddeti değişiminin ölçülmesi ile elde edilir. Bu durum, DNA denatürasyonunun çok iyi takip edildiğinin bir göstergesidir. Bu nedenle yöntemin spesifitesi ile sensitivitesi çok yüksektir. Çok düşük oranlardaki metilasyon farklılığı tespit edilebilmektedir.

5.1.4. Meme Kanserli Olgularda RARβ2 Geni Metilasyonunun Prognostik Faktörlerle Birlikte Değerlendirilmesi

Park ve arkadaşları yaptıkları araştırmada ductal karsinom in situ (DCIS) ile invaziv duktal karsinom (IDC) tümör tipinde olan 125 olgu çalışmışlardır. Buna göre RARβ2 geni ile yaş, ER, PR gibi klinikopatolojik durumlarla ilişki kurulamamıştır (86). Yapılan çalışmada ER(+) 40 olgunun 10'unda (%25) RARβ2 geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır.

Feng ve arkadaşları yaptıkları araştırmada 38 primer meme tümörü ve lenf nodu metastazı olan olgularda çalışmışlardır. Araştırma sonucunda RARβ2 geni promoter hipermetilasyonu hormon reseptörleriyle karşılaştırıldığında ER(+) ve PR(+) olgular ile ER(-) ve PR(-) olgular arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır. Ayrıca HER2/NEU ekspresyonu, evre, grade ya da tümör progresyonu ile ilgili RARβ2 geni metilasyon durumu ile de herhangi bir ilişki kurulamamıştır (27).

Bizim çalışmamızda invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom tümör tipinde 80 olgu çalışılmıştır. Çalışmamızda RARβ2 geni promoter hipermetilasyonu ile evre, yaş ve PR durumu arasında ilişki kurulamamıştır. Bu sonuç *Park, Feng ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışma ile korelidir. Yapılan bu çalışmalardan farklı olarak araştırmamızda ER(+) 54 olgunun 49'unda (%90,7) RARβ2 geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır. Buna göre ER(+)'liği, ayrıca HER2/NEU(-)'liği, lenf nodu(+)'liği ve invaziv duktal karsinom (IDC) tümör tipi RARβ2 geni promoter

hipermetilasyonu ile anlamlı bir ilişki göstermektedir. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın çalışılan tümör heterojenitesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Pirouzpanah ve arkadaşları yaptıkları araştırmada 137 primer meme kanserli olguda çalışmışlardır. Araştırmacılar RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu saptanan 50/137 olgunun metilasyon durumlarını tümör tipi, ER, evre, sigara kullanımı, yaş, östrodiol kullanımı, aile hikâyesi, vitamin B₁₂ gibi prognostik faktörlerle karşılaştırmışlardır. Buna göre bu çalışmada, RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu genç yaş ve ailesinde daha önce meme kanseri hikâyesi olmayan vakalarda korele bulunmuştur. Östrojen reseptör durumunda ise, ER(+) 62 olgunun RAR β 2 geninde 19'u hipermetileyken; ER(-) 30 olgunun RAR β 2 geninde 10'u hipermetile konumdadır. Buna göre RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu ile östrojen reseptör negatifliği ya da pozitifliği arasında bir korelasyon saptanmamıştır (89).

Tümörün evresine bakıldığı zaman yapılan çalışmada hem RAR β 2 geninde evre III'te, evre II ve evre I'e göre daha yüksek oranda hipermetilasyon görülmüştür. Bizim çalışmamızda da evre III'de diğer evrelere göre daha yüksek oranda hipermetilasyon saptanmıştır. Sonuç olarak araştırmamızdaki RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonunun evrelere göre durumu yapılan bu çalışmayla uyumludur.

5.1.5. Meme Kanserli Olgularda ESR1 geni Metilasyonunun Literatürdeki Diğer Çalışmalar ile Karşılaştırılması

Ramos ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada 69 sporadik meme kanserli olguda CXCL12 ve ESR1 genlerindeki CpG hipermetilasyonunu araştırmışlardır (90). Meme tümörlü olguların frozen dokularıyla metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) yöntemiyle çalışılmıştır. Yapılan araştırmada 69 olgunun 28'inde (%41) ESR1 geni promoter hipermetilasyonu görülmüştür (Tablo 5.1.).

Zhao ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada 138 sporadik meme kanseri ile 14 benign meme hiperplazi frozen doku örnekleri ile ESR1, ESR3, ESR4, ESR5 bölgelerine özgü primerlerle metilasyon spesifik PCR yöntemiyle ER α geni metilasyon durumunu incelemişlerdir (127). Hastalık progresyonunda transkripsiyon düzeyinde ER α geninin ekspresyon kaybı hormon rezistansındaki olası

mekanizmalardan biridir. Bu nedenle ER α durumu hormona bağılı büyümenin bir göstergesi ve belirleyicisi olarak hormonal tedaviye yanıt vermektedir. Östrojen reseptör alfa (ESR α) geni metilasyon durumu sporadik meme tümörü olgularında %60,1 (83/138) oranında gözlenirken; bening meme hiperplazi olgularında %28,6 (4/14) oranında gözlenmiştir. Bölgelerin metilasyon oranlarına bakılacak olunursa ESR1 %34,8, ESR3 %35,5, ESR4 %39,1, ESR5 %36,9 oranında hipermetile konumda olduğu tespit edilmiştir (127) (Tablo 5.1.).

Pirouzpanah ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada 137 primer meme kanserli olguda RAR β 2 ve **ESR1** genlerinin hipermetilasyon durumlarını incelemişlerdir. Yapılan çalışma metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (89). Östrojen reseptör1 (ESR1) geni 137 vakanın 70'inde (%51,1) hipermetile durumda olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5.1).

Li ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada 193 meme karsinomu frozen doku örnekleriyle metilasyon spesifik PCR yöntemiyle 7 genin (RAR β 2, CDH1, **ESR1**, BRCA1, CCND2, P16 ve TWIST) metilasyon durumları incelenmiştir (61). Çalışma sonucunda 193 olgunun, 162/193'ünde (%84) ESR1 geni promoter hipermetilasyonu saptanmıştır (Tablo 5.1.).

Araştırmamızda çalışılan 80 olgunun 58'inde (%72,5) ESR1 geni promoter hipermetilasyonu gözlenirken, 80 olgunun 22'sinde ise (%27,5) ESR1 geni promoter bölgesi için unmetile konumdadır. *Ramos, Zhao, Pirouzpanah ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışmadan daha yüksek oranda görülen ESR1 geni promoter hipermetilasyon durumunun yöntem farkından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. MS-HRM yönteminin spesifikliğı ve sensitivitesi karşılaştırıldığında MS-PCR'a göre çok daha duyarlıdır. *Li ve arkadaşlarının* yaptıkları çalışmadaki metilasyon oranı bizim çalışmamızdan daha yüksek orandadır. Bunun nedeninin olgu sayısındaki farklılıktan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

5.1.6. Meme Kanserli Olgularda ESR1 Geni Metilasyonunun Prognostik Faktörlerle Birlikte Değerlendirilmesi

Ramos ve arkadaşları yaptıkları araştırmada 69 sporadik meme kanserli olguda CXCL12 ve ESR1 genlerindeki CpG hipermetilasyonunu araştırmışlardır (90). Meme tümörlü olguların frozen dokularıyla metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) yöntemiyle çalışılmıştır. Yapılan araştırmada 69 olgunun 28'inde (%41) ESR1 geni promoter hipermetilasyonu görülmüştür (Tablo 5.1.). Östrojen reseptör1 geni promoter hipermetilasyonu ile ER α protein ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0,0001$).

Östrojen reseptör1 (ESR1) geni promoter hipermetilasyonu ile yaş, HER2/NEU ve PR durumu arasında herhangi bir ilişki görülmezken, lenf nodu ($p = 0,0288$), ER durumu ($p = 0,0054$) ve evre ($p = 0,0003$) arasında anlamlı bir ilişki kurulmuştur (90).

Bizim çalışmamızda ise 80 olgunun 58'i (%72,5) ESR1 geni promoter hipermetilasyonu gözlenirken, 80 olgunun 22'si (%27,5) ESR1 geni promoter bölgesi için unmetile konumdadır. Ramos ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadan daha yüksek oranda görülen ESR1 geni promoter hipermetilasyon durumunun yöntem farkından kaynaklandığı düşünülmektedir. Metilasyon spesifik HRM analiz yönteminin spesifikliği ve sensitivitesi karşılaştırıldığında, MS-PCR'a göre çok daha duyarlıdır. Bizim çalışmamızda da yaş ve PR durumu ESR1 geni promoter hipermetilasyonu ile karşılaştırıldığında aralarında ilişki kurulamazken, lenf nodu, ER ve HER2/NEU ekspresyonu ile ESR1 gen promoter hipermetilasyonu ile arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Pirouzpanah ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada 137 primer meme kanserli olguda RAR β 2 ve ESR1 genlerinin hipermetilasyon durumlarını incelemişlerdir. Yapılan çalışma metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (89). Östrojen reseptör1 (ESR1) geni 137 vakanın 70'inde (%51,1) hipermetile durumda olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5.1). Araştırmacılar bu genlerin metilasyon durumlarını tümör tipi, ER, evre, sigara kullanımı, yaş, östrodiol kullanımı, aile hikâyesi, vitamin B₁₂ gibi prognostik faktörlerle karşılaştırmışlardır. Buna göre bu çalışmada, ESR1 geni promoter hipermetilasyonu sigara kullanımı, östradiol maruz

kalma süresi ve östrojen reseptör negatifliği ile korele bulunmuştur. Ayrıca ESR1 hipermetilasyonu histopatolojik olarak duktal karsinomda daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,023$). Östrojen reseptör durumunda ise, ER(+) 62 olgunun, ESR1 geninde 17'si hipermetile konumdadır. Östrojen reseptör negatif 30 olgunun, ESR1 geninde 28'i hipermetile konumdadır. Buna göre ER(-)'liği ile ESR1 geninin hipermetilasyon durumu arasında korelasyon bulunmuştur (89).

Bizim çalışmamızda ER(+)ve ER(-)) olgularda ESR1 gen hipermetilasyonu açısından bir fark bulunamamıştır. Çalışmamızda histolojik tipe bakıldığı zaman yapılan çalışmada ESR1 geninde evre III'te, evre II'ye göre daha yüksek oranda hipermetilasyon görülmüştür. Bizim çalışmamızda da evre III'de diğer evrelere göre daha yüksek oranda hipermetilasyon saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda ESR1 hipermetilasyonu histopatolojik olarak invaziv duktal karsinomda lobüler karsinoma oranla çok yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,001$).

Sonuç olarak araştırmamızdaki ESR1 geninin hipermetilasyonunun evrelere ve tümör tipine göre durumu yapılan bu çalışmayla koreledir.

Çalışmalar sonucunda ortak kanı, metilasyonun tümör gelişiminde kanser için bir nevi zemin hazırladığı, kanserin prognoz ve yayılım hızına etki ettiği yönündedir. Bu durum, bir tümör markeri olarak metilasyonun önemini vurgulamaktadır.

Bu doğrultuda kanserdeki CpG adalarının metilasyon profillerini inceleyen çalışmalardan elde edilecek veriler ile kanserin erken tanısı, tümör klasifikasyonu, hastalığın prognozu, tedavi protokollerinin düzenlenmesi, tedaviye yanıtın kontrolü ve kanserden korunma yolları konularına ışık tutulabilir.

Tablo 5.1. Çalışılan genlerin literatür bilgileriyle karşılaştırılması

Araştırma grubu	Yıl	Olgu sayısı	Çalışılan yöntem	TWIST geni met. oranı	RARβ2 geni met. oranı	ESR1 geni met. oranı
Gort ve ark.	2008	76	qMSP	26/76 (%34)		
Park ve ark.	2011	125	Metillight		73/125 (%58)	
Feng ve ark.	2010	38+38*	bisüfit pyrosequencing		23/38 (%60,5) primer 21/38 (%55,3) metastatik	
Huang ve ark	2010	112	MS-HRM	12/112 (%10,7)		
Shinozaki ve ark.	2005	151	MS-PCR	72/151 (%48)	36/151 (%24)	
Auwers ve ark.	2010	56+56+9**	qMSP	26/56 (%46) kanserli doku 20/56 (%36) normal doku	16/56 (%29) kanserli doku 19/56 (%34) normal doku	
Sunami ve ark.	2008	130***	MS-PCR	ER(-) 17/65 (%26), ER(+) 32/65 (%49) Top:49/130 (~%38)	ER(-) 18/65 (%28), ER(+) 17/65 (%26) Top: 35/130 (~%27)	

Ramos ve ark.	2010	69	MS-PCR			28/69 (%41)
Zhao ve ark.	2009	138	MS-PCR			48/138 (%34,8)
Pirouzpanah ve ark.	2010	137	MS-PCR		50/137 (%36,5)	70/137 (%51,1)
Li ve ark.	2006	193	MS-PCR	109/193 (%59)	50/193 (%26)	162/193 (%84)
Bizim çalışmamız	2011	80	MS-HRM	20/80 (%25) ER(-) 8/26 (%30,8) ER(+) 12/54 (%22,2) Top: 20/80 (%25)	71/80 (%88,75) ER(-) 22/26 (%84,6) ER(+) 49/54 (%90,7) Top: 71/80 (%88,75)	58/80 (%72,5) ER(-) 19/26 (%73,1) ER(+) 39/54 (%72,2) Top: 58/80 (%72,5)

*Not: 38 olgu primer meme ca. 38 olgu metastatik meme ca.

**Not: 56 meme tümörlü ve 56 normal doku örneği olan meme kanserli hastalar ile 9 tane normal meme dokusu örneği olan etkilenmemiş kadın bireylerin sayısı

***Not: 130 olgunun 65'i ER(+), 65'i ER(-)

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırma grubunu oluşturan 80 meme kanseri olgusunun tümör dokusu örneklerinde TWIST, RAR β 2 ve ESR1 genlerinin metilasyonu değerlendirmek üzere metilasyon spesifik HRM analizi yapılmıştır.

1. Çalışılan tümör dokularında MS-HRM analizi ile TWIST geni promoter hipermetilasyonu %25 (20/80) oranında saptanmıştır.
2. Olgularda saptanan metilasyon ile prognostik faktörler karşılaştırıldığında tümörün evresi ve yaş durumuyla TWIST geni promoter hipermetilasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.
3. Lenf nodu(+)'liği, ER(+)'liği, PR(-)'liği ve HER2/NEU(-)'liği ile TWIST geni promoter hipermetilasyonu arasında ilişki anlamlı bulunmuştur.
4. Çalışılan tümör dokularında MS-HRM analizi ile RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu %88,75 (71/80) oranında saptanmıştır.
5. Olgularda saptanan metilasyon ile prognostik faktörler karşılaştırıldığında yaş, tümörün evresi ve PR durumuyla RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.
6. Lenf nodu(+)'liği, HER2/NEU(-)'liği, invaziv duktal karsinom tümör tipi ve ER(+)'liği ile RAR β 2 geni promoter hipermetilasyonu arasında ilişki anlamlı saptanmıştır.
7. Çalışılan tümör dokularında MS-HRM analizi ile ESR1 geni promoter hipermetilasyonu %72,5 (58/80) oranında saptanmıştır.
8. Olgularda saptanan metilasyon ile prognostik faktörler karşılaştırıldığında yaş, tümörün evresi ve PR durumuyla ESR1 geni promoter hipermetilasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.
9. Lenf nodu(+)'liği, ER(+)'liği ve HER2/NEU(-)'liği ile ESR1 geni promoter hipermetilasyonu arasında ilişki anlamlı olarak saptanmıştır.

10. Çalışmamız Türk popülasyonunda meme kanserli olgularda metilasyon oranlarının MS-HRM yöntemi kullanılarak incelendiği ilk çalışmadır.

Bu çalışma sonrasında metilasyon durumları belirlenmiş olan bu genlerin ekspresyon profillerinde çalışılması bir sonraki basamak olarak düşünülebilir.

Ayrıca bu yapılan çalışmanın bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adıgüzel, G.L., 2003, *Kolon adenokarsinomlarında CD44, E-Cadherin, nm23 ve P53 ekspresyonunun tümörün metastazı ve prognozu ile ilişkisi*. Manisa: Celal Bayar Üniversitesi; 19-20
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P., 2002, *Molecular Biology of the Cell* (4.bs.). Bölüm 4, The structure and function of DNA. USA: Garland Science.
3. Andersen, T.I., Heimdal, K.R., Skrede, M., Tveit, K., Berg, K., Borresen, A.L., 1994, *Oestrogen Receptor (ESR) Polymorphisms and Breast Cancer Susceptibility*. Hum. Genet. ;94:665-670.
4. Auwera, I.V., Bovie, C., Svensson, C., Trinh, B.X., Limame, R., Dam, P., Laere, S., Marck, E.A., Dirix, L.Y., Vermeulen, P.B., 2010, *Quantitative methylation profiling in tumor and matched morphologically normal tissues from breast cancer patients* Van der Auwera et al. BMC Cancer, 10:97 <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/97>
5. Babiker, F.A., De Windt, L.J., Eickels, M., Grohe, C., Meyer, R., Doenemdans, P.A., 2002, *Estrogenic Hormone Action in The Heart: Regulatory Network and Function*, Cardiovasc. Res; 53:709–719.
6. Bane, A., O'Malley, F.P., Familial Breast Cancer. In O'Malley, F.P., Pinder, S.E., 2006, ed. *Breast Pathology. A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology*. Philadelphia: Churchill Livingstone ; 241-247
7. Barker, R., 1971, *Organic Chemistry of Biological Compounds (Foundations of Modern Biochemistry Series)*. The polynucleotides and nucleic acids. (s. 309-339). Prentice-Hall, New Jersey, Englewood Cliffs.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

8. Baştürk, O., 2003, *Mesaneinin değişici epitel karsinomlarında P53, Ki-67, bcl-2 ve p27Kip1 ekspresyonunun dercelendirme sistemleriyle ve prognozla ilişkisi*. Manisa: Celal Bayar Üniversitesi
9. Beenken, S.W., Wanger, F.B., Bland, K., 2004, *History of the therapy of breast cancer in The Breast, KI Bland and EM Copeland III*. Saunders – Elsevier, St.Louis, p.3-18.
10. Benjamin, L., 1997, *Genes VI* (1.bs.). Stage 5, Nucleic acid structure. (s. 97-113). New York: Oxford University Press.
11. Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H., ve Marky, L.A., 1986, *Predicting DNA duplex stability from the base sequence*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 83 (11), 3746-3750.
12. Chambon, P., 1996, *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors*. *FASEB Journal* 10 940–954.
13. Chen, D., Pace, P.E., Coombes, R.C., Ali, S., 1999, *Phosphorylation of Human Estrogen Receptor α by Protein Kinase A Regulates Dimerization*. *Mol.Cell. Biol*; 19: 1002–1015.
14. Claus, E.B., Risch, N., Thompson W.D. 1991, *Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study*. *Am J Hum Genet*;48:232–242.
15. Crum, C.P., Lester, S.C., Cotran, R.S., 2002, *The Female Genital System and Breast*. Cotran, R.S., Robbins, S.L., Kumar V.C, editors. Pathologic basis of disease 7th ed. Philadelphia pennsylvania; Saunders: p 679-719.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

16. Corbett Life Science., 2006, *High Resolution Melt Assay Design and Analysis* (CorProtocol™ 6000-1-Sept06). Avustralya: Corbett Research.
17. Cosa, G., Focsaneanu, K.-S., McLean, J. R. N., McNamee, J.P. Ve Scaiano, J.C. 2001, *Photophysical properties of fluorescent DNAdyes bound to Single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution*. Photochemistry and Photobiology, 73 (6), 585–599.
18. Couse, J.F., Bunch, D.O., Lindzey, J., Schomberg, D.W., Korach, K.S., 1999, *Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse*. Endocrinology.;140(12):5855-65.
19. Cullen, R., Maguire, T.M., McDermott, E.W., Hill, A.D., O’Higgins, N.J., Duffy, M.J., 2001, *Studies on oestrogen receptor-alpha and -beta mRNA in breast cancer*. Eur J Cancer;37:1118–22.
20. Darendeliler, E., Ağaoğlu, F., 2003, *Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi*. Topuz, E., Aydın, A., Dinçer, M., editörler. *Meme Kanseri*. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri ; pp 13-34.
21. Donegan, W.L., 2006, *History of Breast Cancer in Breast Cancer* D.J Winchester, D.P Winchester, C.A Hudis and L. Norton. Editors. D.C Decker Inc. Ontario, p.1-14.
22. Dubey, RK., Jackson, EK., Keller, PJ., Imthurn, B., Rosselli, M., 2001, *Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor independent mechanism*. Hypertension;37:640-4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

23. Ducasse, M., and Brown, M., 2006, *Epigenetic aberrations and cancer*. Molecular Cancer, 5; 60
24. Ellis, I.O., Elston, C.W., Histologic grade. In O'Malley, F.P., Pinder, S.E., 2006, ed. *Breast Pathology. A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 225-233
25. Etseller, M., and Herman, J., 2002, *Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*. J Pathol, 196; 1- 7
26. Feinberg, A., 2004, *The Epigenetics of cancer etiology*. Cancer Biology, 14; 427-432
27. Feng, W., Orlandi, R., Zhao, N., Carcangiu, M.L., Tagliabue, E., Xu, J., Jr, R.C.B., Yu, Y., 2010, *Tumor suppressor genes are frequently methylated in lymph node metastases of breast cancers Feng et al.* BMC Cancer, 10:378
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/378>
28. Fruscaizo, A., Damante, G., Calcagno, A., Di Loreta, C., Marchesoni, D., 2006, *Four primary malignancies successively occurred in a BRCA2 mutation carrier: A case report*. Cancer Investigation; 24:611-614
29. Gerdes, J., Leemke, H., Baisch, H., 1984, *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67*. Immunol; 133:1710-1715
30. Graham, R., Liew, M., Meadows, C., Lyon, E. ve Wittwer, C.T. 2005, *Distinguishing different DNA heterozygotes by highresolution melting*. Clinical Chemistry, 51, 1295-1298.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

31. Gruber, C.J., Wieser, F., Gruber, I.M., Ferlitsch, K., Gruber, D.M., Huber, J.C., 2002, *Current concepts in aesthetic endocrinology*. Gynecol Endocrinol;16(6):431-41. Review.
32. Gort, E.H., Suijkerbuijk, K.P., Roothaan, S.M., Raman, V., Vooijs, M., van der Wall, E., van Diest, P.J., 2008, *Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Dec;17(12):3325-30.
33. Guiliano, A.E., Kirgan, D.M., Guenter, J.M., Morton, D.L., 1994, *Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer*. Ann Surg. 231, 220:391-401.
34. Gundry, C.N., Bernard, P.S., Herrmann, M.G., Reed, G.H. ve Wittwer, C.T. 1999, *Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes*. Genetic Testing, 3, 365–370.
35. Güllüoğlu, M.G., İplikçi, A., 2003, Meme Anatomisi: Topuz, E., Aydın, A., Dinçer, M., (editörler). *Meme Kanseri*. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri: pp 13-34.
36. Haberl, L., Shak, S., Jacobs, M.K., et al., 2006, *A population – based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node – negative patients* Breast Cancer Res. 31;
37. Hall, J.M., Couse, J.F., Korach, K.S., 2001, *The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling*. J. Biol. Chem; 276: 36869-36872.
38. Half, E., Tang, X.M., Gwyn, K., Sahin, A., Wathrn, K., Sinicrope, F.A., 2002, *Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ*. Cancer Res. ;62:1676-1681

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

39. Hayashi, S.I., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yoshida, N., Yamaguchi, Y. 2003, *The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application*. *Endocr Relat Cancer*;10(2):193-202.
40. Herrmann, M.G., Durtschi, J.D., Bromley, L.K., Wittwer, C.T. ve Voelkerding, K.V. 2006, *Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes*. *Clinical Chemistry*, 52, 494-503.
41. Ho, K.J., Liao, J.K. 2002, *Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment of cardiovascular disease*. *Mol Interv* ;2(4):219-28. Review.
42. Hodgson, S.V., Morrison, P.J., Irving, M. 2004, *Breast Cancer Genetics. Unsolved Questions and Open Perspectives in an Expanding Clinical Practice*. *Am J Med Genet (Semin. Med. Genet.)* ; 129C: 56–64
43. Honrado, E., Benitez, J., Palacios, J. 2005, *The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications*. *Modern Pathology*; 18:1305-1320
44. Huang, K.T., Dobrovic, A., Yan, M., Karim, R.Z., Lee, C.S., Lakhani, S.R., Fox, S.B., 2010, “*DNA methylation profiling of phyllodes and fibroadenoma tumors of the breast*” *Breast Cancer Res Treat* (2010) 124:555–565 DOI 10.1007/s10549-010-0970-4
45. Jamal, A., et al. 2006, American Cancer Society Inc. Surveillance Research. *CA Cancer J Clin* 56:108-130.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

46. Kashima, K. et al. 2000, *Screening of BRCA1 mutation using immunohistochemical staining with C-terminal and N-terminal antibodies in familial ovarian cancers*. Jpn. J. Cancer; 91:399-409
47. Kenemans, P., Bosman, A. 2004, *Breast cancer and post-menopausal hormone therapy*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2003;17:123–37. *Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer*. Maturitas; 49: 34–43.
48. Klinge, C.M. 2000, *Estrogen Receptor Interaction with Co-activators and Corepressors*. Steroids; 65:227-251.
49. Knudson, Ag Jr., 1971, *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci USA; 68:820-823
50. Kong, E.H., Pike, A.C.W., Hubbard, R.E. 2003, *Structure and Mechanism of the Oestrogen Receptor*, Biochem. Soc. Trans; 31: 56-59.
51. Kos, M., Reid, G., Denger, S., Gannon, F. 2001, *Genomic Organization of the Human ER α Gene Promoter Region*. Mol. Endocrinol; 15, 2057- 2063.
52. Kubista, M., Andrade, J. M., et all, 2006, *The real-time polymerase chain reaction*, 27: 95-125, 20 p.
53. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J. and Lind, K. 2006, *The real-time polymerase chain reaction*. Molecular Aspects of Medicine, 27(2-3), 95-125.
54. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. 1996, *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A; 93(12):5925-30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

55. Laird, P. 2005, *Cancer epigenetics*. Human Molecular Genetics, 14; 65- 76
56. Lane, D.P. 1979, *P53, guardian of the genome*. Nature; 358:15-16
57. Larkins, T.L., Nowell, M., Singh, S., Sanford, G.L. 2006, *Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression*. BMC Cancer; 6:181-193
58. Lay, M.J. and Wittwer, C.T. 1997, *Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid cycle PCR*. Clinical Chemistry, 43, 2262-2267.
59. Lester, S.C., The Breast In Kumar V., Abbas, A.K., Fausto, N., Editor. 2005, *Pathologic basis of disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. p 1120-1149
60. Levine, A., Momend, J., Finlay, C. 1991, *The P53 supressor gene*. Nature; 351:453-456
61. Shao Ying, Li., Minna, Rong., Barry, Iacopetta., 2006, *DNA hypermethylation in breast cancer and its associationwith clinicopathological features* Cancer Letters 237 Elsevier Ireland 272–280
62. Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., et al. 2004, *Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons*. Clinical Chemistry, 50, 1156-1164.
63. Lippman, M.E., 1997, *Breast Cancer*. Fauci et al. Editors Harrison's Principals of Internal Medicine. 14th Ed. NY, USA; Mc-Graw Hill Companies. Pp 562-568
64. Lu, Q., Qiu, X., Hu, N., Wen, H., Su, Y. and Richardson, B. 2006, *Epigenetics, diseases and therapeutic interventions*. Ageing Research Rewievs, 5; 449- 467

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

65. Margolese, R.G., Hortobagyi, G.N., Buchholz T.A., 2003, *Breast. Cancer Medicine* 6th ed. Hamilton (Canada): BC Decker Inc.
66. Melki, J. and Clark, S. 2002, *DNA methylation changes in leukaemia*. *Seminars in Cancer Biology*, 12; 347-357
67. Meme Hastalıkları Temel Patoloji Kursu Kitapçığı, 2006
68. Millis, R.R., Hanby, Am., Oberman, H.A., 1999, *The Breast In Sternberg SS editor. Diagnostic Surgical Pathology, Third edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, p 319-379*
69. Minucci, S. & Pelicci, P.G., 1999, *Retinoid receptors in health and disease: co-regulators and the chromatin connection*. *Seminars in Cell Development and Biology* 10 215–225.
70. Mocellin, S., Rossi, C.R., et all., 2003, *Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research*, *TRENDS in Molecular Medicine*, 9: 189-195, 6 p.
71. Moll, U., Lau, R., Sypes, M.A., Gupta, M.M., Anderson, C.W., 1999, *DNA-PK, the DNA-activated protein kinase, is differentially expressed in normal and malignant human tissues*. *Oncogene*; 18:3114-3126
72. Momparler, R. and Bovenzi, V., 2002, *DNA methylation and Cancer*. *Journal of Cellular Physiology*, 183;145- 154

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

73. Monis, P.T., Giglio, S. and Saint, C.P., 2005, *Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis*. Analytical Biochemistry, 340 (1), 24-34.
74. Montgomery, J., Wittwer, J.T., Palais, R., and Zhou, R., 2007, *Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis*. Nature Protocols, 2 (1), 59-66.
75. Morin, V., Diaz, F., Montecino, M., Fothergill-Gilmore, L., Puchi, M. and Imschenetzky, M. 1999, *Poly(ADP-ribosylation) protects maternally derived histones from proteolysis after fertilization*. Biochem. J., 343; 95- 98
76. Moshin, S.K., 2006, *Molecular markers in invasive breast cancer*. In O'Malley F.P, Pinder S.E ed. Breast Pathology. A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology. Philadelphia: Churchill Livingstone; 265-273
77. Nakano, S., Fujimoto, M., Hara, H. ve Sugimoto, N., 1999, *Nucleic acid duplex stability influence of base composition on cation effects*. Nucleic Acids Research, 27, 2957-2965.
78. Nataraj, A.J., Olivos-Glander, I., Kusukawa, N. and Highsmith, W.E. Jr., 1999, *Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection*. Electrophoresis, 20 (6), 1177-1185.
79. Nicoletto, M.O., Donach, M., De Nicole, A., Artioli, G., Banna, G., Monfardini, S. 2001, *BRCA-1 and BRCA-2 mutations as prognostic factors in clinical practise and genetic counselling*. Cancer Treatment Reviews; 27:295-304

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

80. Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Anderson, G., et al., 2001, *Mechanisms of Estrogen Action*. *Physiol. Rev*; 81:1535-1565.
81. Nygren, J., Svanvik, N. ve Kubista, M., 1998, *The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA*. *Biopolymers*.46, 39-51.
82. Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Oeimo, A., Hosoi, T., et al., 1998, *The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and Its Heterodimerization with ER α in Vivo and in Vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*;243:122-126.
83. Ormandy, C.J., Musgrove, E.A., Hui, R., Daly, R.J., Sutherland, R.L., 2003, *Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*;78:323–35.
84. Osborn, C., Wilson, P., Tripathy, D., 2004, *Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications*. *the Oncologist*; 9:361-377.
84. Osborne, C.K., Schiff, R., 2005, *Estrogen-Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications*. *J Clin Oncol*; 23:1616-1622.
85. Palais, R., Liew, M.A. and Wittwer, C.T., 2005, *Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping*. *Analytical Biochemistry*, 346, 167-175.
86. Park, S.Y., Kwon, H.J., Lee, H.E., Ryu, H.S., Kim, S.W., Kim, J.H., Kim, I.A., Jung, N., Cho, N.Y., Kang, G.H., 2011, *Promoter CpG island hypermethylation during breast cancer progression* *Virchows Arch* 458:73–84 DOI 10.1007/s00428-010-1013-6

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

87. Peedicayil, J., 2006, *Epigenetic therapy-a new development in pharmacology*. Indian J Med Res, 123; 17- 24
88. Pharoah, P.D., Antoniou, A., Bobrow, M., Zimmern, R.L., Easton, D.F., Ponder, B.A. 2002, *Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention*. Nat Genet; 31:33–36
89. Pirouzpanah, S., Taleban, F.A., Atri, M., Abadi, A.R., Mehdipour, P. 2010, *The effect of modifiable potentials on hypermethylation status of retinoic acid receptor-beta2 and estrogen receptor-alpha genes in primary breast cancer* Cancer Causes Control 21:2101–2111 DOI 10.1007/s10552-010-9629-z
90. Ramos, E.A.S., Camargo, A.A., Braun, K., Slowik, R., Cavalli, I.J., Ribeiro, E.M.S.F., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., Costa, F.F., Klassen, G. 2010, *Simultaneous CXCL12 and ESRI CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer* Ramos et al. BMC Cancer, 10:23
91. Ranger, G.S., Salhab, M., Mokbel, K. 2007, *The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer*: review. Breast Cancer Res Treat.
92. Razlutskii, I.V., Shlyakhtenko, L.S. and Lyubchenko, Yu.L., 1987, *The effect of nucleotide substitution on DNA denaturation profiles*. Nucleic Acids Research. 15 (16), 6665-6676.
93. Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. and Wittwer, C.T., 1997, *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. Analytical Biochemistry, 245, 154-160.
94. Roche Applied Science, Technical Note, No. LC 18/2004.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

95. Rosai J., 2004, Breast. In ROSAI editor. Rosai and Ackerman's surgical pathology, 9th ed. Edinburgh: Mosby. p 1763-1827
96. Ruano, G. and Kidd, K.K., 1992, *Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates*. PCR Methods and Applications, (2), 112-116.
97. Russo, J., Russo, I.H., 2004, *Development of the human breast*. Maturitas;49: 2-15
98. Sanders-Goebel, S., 1991, *Crisis and Controversy: Historical Patterns in Breast Cancer Surgery*. CBMH/BCHM 8:77-99.
99. SantaLucia, J. Jr. and Hicks, D., 2004, *The thermodynamics of DNA structural motifs*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 33, 415-440.
100. Santos-Rosa, H. and Caldas, C., 2005, *Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer*. European Journal of Cancer, 41; 2381- 2402
101. Schuur, E.R., Loktev, A.V., Sharma, M., Sun, Z., Roth, R.A., Weigel, R.J. 2001, *Ligand-dependent interaction of estrogen receptor-alpha with members of the forkhead transcription factor family*. J Biol Chem;276(36):33554-60.
102. Shinozaki, M., Dave, S.B., Hoon, Armando E., Giuliano, Nora M., Hansen, He-Jing, Wang., Roderick, Turner., and Bret Taback. 2005, *Is Associated with Sentinel Lymph Node Metastasis Distinct Hypermethylation Profile of Primary Breast Cancer* Clin Cancer Res;11:2156-2162.
103. Singal, R. and Ginder, G., 1999, *DNA methylation*. Blood, 93; 4059- 4070

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

104. Sirchia, S.M., Ferguson, A.T., Sironi, E., Subramanyan, S., Orlandi, R., Sukumar, S & Sacchi N., 2000, *Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells*. *Oncogene* 19 1556–1563.
105. Sivula, A., Talvensaaari-Mattila, A., Lundin, J., Joensuu, H., Haglung, C., Ristimaki, A., Turpeenniemi-Hujanen, T., 2005, *Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase in human breast cancer*. *Breast Cancer Research and Treatment*; 89:215-220
106. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J et al., 2003, *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. *Proc Natl Acad USA* 100:8418-23.
107. Sunami, E., Shinozaki, M., Sim, M.S., Nguyen, S.L., Vu, A.T., Giuliano, A.E. and Hoon, D.B.S., 2008, *Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors* *Breast Cancer Research* Volume 10, Number 3, R46, DOI: 10.1186/bcr2098
108. Swisshelm, K., Ryan, K., Lee, X., Tsou, H.C., Peacocke, M. & Sager. R., 1994, *Down-regulation of retinoic acid receptor beta in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells*. *Cell Growth and Differentiation* 5 133–141.
109. Tavassoli, F.A., 1999, *Pathology of the breast*. 2nd edition Stanford: Appleton&Lange.
110. Tchurikov, N., 2004, *Molecular mechanisms of epigenetics*. *Biochemistry* (Moscow), 70; 406- 423

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

111. Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G., Kolar, Z., 2005, *Mammary gland development and cancer*. Cesk Patol;41(3):94-101.
112. Tuzlalı, S., 2003, *Memenin Malign Tümörlerinin Patolojik Özellikleri.*: Topuz, E., Aydın, A., Dinçer, M. (editörler). Meme Kanseri. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri: pp 242-262.
112. Ünal, H., 2006, *Meme Kanserinin Tanı ve Tedavisinin Tarihsel Gelişimi*, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri Sempozyumu Dizisi No:54 Aralık 2006; s 9-13
113. Van't Veer, L.J., Dai, H., Van de, Vijver et al., 2002, *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer* Nature 415:530-536.
114. Wada, A., Yabuki, S. and Husimi, Y., 1980, *Fine structure in the thermal denaturation of DNA: High temperature-resolution spectrophotometric studies*. CRC Critical Reviews in Biochemistry, 9, 87-144.
115. Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., et al., 1985, *Cloning of the human estrogen receptor cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A;82(23):7889-93.
116. Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. and Losick, R., 2004, 5th edition., *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin Cummings, 732
117. White, H. and Potts, G., 2006, *Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science), HR1™ and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology)*. (Rapor No: NGRLW_HRM_1.0). United Kingdom, National Genetics Reference Laboratory (Wessex).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

118. Widschwendter, M., Berger, J., Daxenbichler, G., Muller-Holzner, E., Widschwendter, A., Mayr, A., Marth, C. & Zeimet, A.G., 1997, *Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer*. Cancer Research 57 4158– 4161.
119. Widschwendter, M., Berger, J., Hermann, M., Muller, H.M., Amberger, A., Zeschnigk, M., Widschwendter, A., Abendstein, B., Zeimet, A.G., Daxenbichler, G. & Marth, C. 2000, *Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute 92 826–832.
120. Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003, *Real-Time Polymerase Chain Reaction*, ChemBioChem, 4: 1120-1128, 8 p.
121. Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N. and Elenitoba-Johnson K.S.J., 2001, *Real-time multiplex PCR assays*. Methods, 25, 430- 442.
122. Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G. ve Pryor, R.J., 2003, *High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen*. Clinical Chemistry, 49, 853-860.
123. Wittwer, C.T., Kusakawa, N., *Real-time PCR*. Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y.W., Unger, E.R., Relman, D.A. et al., 2004, *Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications*. (s. 71-84). Washington, DC: ASM Press.
124. Wu, T.C., Wang, L., Wan, Y.J., 1993, *Detection of estrogen receptor Messenger ribonucleic acid in human oocytes and cumulus-oocyte complexes using reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Fertil Steril;59(1):54-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

125. Yang, X., Lippman, M.E., 1999, *BRCA 1 and BRCA 2 in breast cancer*. Breast Cancer Research and Treatment; 54:1-10
126. Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L. et al., 2004, *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell; 117: 927-939.
127. Zhao, L., Wang, L., Jin, F., Ma, W., Ren, J., Wen, X., He, M., Sun, M., Tang, H., Wei, M., 2009, *Silencing of estrogen receptor alpha (ERalpha) gene by promoter hypermethylation is a frequent event in Chinese women with sporadic breast cancer*. Breast Cancer Res Treat.;117(2):253-9. Epub 2008 Sep 24.

EKLER DİZİNİ

EK-1 MEME KARSİNOMUNDA TNM SINIFLAMASI (WHO 2003)

- T- Primer tümör
- Tx Saptanamayan tümör.
- T0 Primer tümöre ait bulgu yok.
- Tis Karsinoma in situ.
- Tis(DCIS) Duktal karsinoma in situ.
- Tis(LCIS) Lobüler karsinoma in situ.
- Tis(Paget) Tümör olmaksızın meme başının Paget hastalığı*
- T1 Tümör en büyük boyutunda 2cm veya daha az.
- T1mic Mikroinvazyon en büyük boyutunda 0,1cm veya daha az.
- T1a Tümör en büyük boyutunda 0,1cm'den büyük, 0,5cm'den küçük ölçüde.
- T1b Tümör en büyük boyutunda 0,5cm'den büyük, 1cm'den küçük ölçüde.
- T1c Tümör en büyük boyutunda 1cm'den büyük, 2cm'den küçük ölçüde.
- T2 Tümör en büyük boyutunda 2cm'den büyük, 5cm'den küçük ölçüde.
- T3 Tümör en büyük boyutunda 5cm'den büyük ölçüde.
- T4 Tümörün boyutuna bakmaksızın göğüs duvarına veya deriye direkt yayılımın bulunması**
- T4a Göğüs duvarına yayılım.
- T4b Ödem (portakal kabuğu görünümü) veya meme derisinde ülserasyon veya aynı taraf memede satelit deri nodülleri.
- T4c Yukarıda belirtilen 4a ve 4b'nin birlikte görülmesi.
- T4d İnflamatuar karsinom.
- N- Bölgesel Lenf Nodları
- Nx Bölgesel lenf nodları elde edilemiyor (örn: daha önce çıkartılmış).
- N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
- N1 Aynı taraf fikse olmayan lenf nodları metastazı.
- N2 Aynı tarafın fikse lenf nodlarında metastaz veya aksiller lenf nodlarının metastazı olmadığı durumlarda aynı taraf internal mamaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz.
- N2a Birbirlerine veya diğer yapılara fikse olan aksiller lenf nodlarında metastaz.

N2b Klinik olarak tesbit edilebilen aynı taraf internal mamaryal lenf nodlarında metastaz, klinik olarak aksiller lenf nodları tespit edilemiyor.

N3 Aynı taraf infraklaviküler lenf nodları aksiller lenf nodu metastazı olarak veya olmaksızın metastazlı; veya klinik olarak aynı taraf aksiller lenf nodları ve internal mamaryal lenf nodları metastazlı; veya aynı taraf supraklaviküler lenf nodlarında aksiller ve internal mamaryal lenf nodu tutulumu olarak veya olmaksızın metastazlı.

N3a İnfraklaviküler lenf nodu(ları) metastazı.

N3b İnternal mamaryal ve aksiller lenf nodu metastazları.

N3c Supraklaviküler lenf nodu(ları) metastazı.

M- Uzak Metastaz

Mx Uzak metastaz değerlendirilemiyor.

M0 Uzak metastaz yok.

M1 Uzak metastaz var.

PTNM Patolojik Sınıflama

pT- Primer Tümör

Primer kanserin patolojik sınıflaması için rezeksiyon sınırlarında makroskopik olarak tümör hücresi görülmemelidir. Cerrahi sınırlarda sadece mikroskopik boyutlarda tümör varsa bu olgu pT olarak sınıflanabilir.

pN- Bölgesel lenf nodları

pNx Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi (daha önce çıkartılmış veya hiç çıkartılmamış).

pN0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

pN1mi Mikrometastazlar (hepsi 0,2mm'den büyük fakat hiçbiri en büyük boyutunda 2mm'den büyük değil).

pN1 Aynı taraf 1-3 aksiller lenf nodunda metastaz ve/veya klinik olarak tespit edilemeyen, ancak sentinel lenf nodu araştırılmasında internal mamaryal lenf nodlarında mikroskopik metastaz.

pN1a En azından bir tanesi en geniş boyutunda 2mm'den büyük, 1-3 aksiller lenf bezinde metastaz.

pN1b Klinik olarak tespit edilemeyen ancak sentinel lenf nodu biopsisi ile tespit edilen internal mamaryal lenf nodlarında mikroskopik metastaz.

pN1c 1-3 aksiller lenf nodunda metastaz ve klinik olarak tespit edilemeyen ancak sentinel lenf nodu incelemesinde tespit edilen internal mamaryal lenf nodlarında mikroskopik metastaz.

pN2 Aynı taraf aksiller lenf nodlarında 4-9 metastaz ve/veya aynı taraf aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın, aynı taraf internal mamaryal lenf nodlarında klinik olarak tespit edilmiş.

pN2a 4-9 aksiller lenf nodu metastazı, en az bir tanesinde çap 2mm'den büyük.

pN2b Aksiller lenf nodu metastazı olmaksızın klinik olarak tespit edilebilen internal mamaryal lenf nodlarında metastaz.

pN3 Aynı taraf aksiller lenf nodlarında 10 veya daha fazla lenf nodu, veya infraklaviküler lenf nodlarında metastaz, veya klinik olarak tespit edilmiş aynı taraf internal mamaryal lenf nodu metastazı ve bununla birlikte bir veya daha fazla aksiller lenf nodu metastazı, veya 3'den daha fazla aksiller lenf nodu metastazı ve bununla birlikte klinik olarak tespit edilememiş ancak internal mamaryal lenf nodlarında metastaz, veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz.

pN3a Aksiller lenf nodlarında 10 veya daha fazla metastaz (en az bir tanesi 2mm'den büyük) veya infraklaviküler lenf nodlarında metastaz.

pN3b Klinik olarak tespit edilmiş internal mamaryal lenf nodu metastazı ve bununla birlikte bir veya daha fazla aksiller lenf nodu pozitifliği veya 3'den fazla aksiller lenf nodunda metastaz ve klinik olarak tespit edilmemiş ancak sentinel lenf nodu biopsisi ile tespit edilmiş internal mamaryal lenf nodunda metastaz.

pN3c Supraklaviküler lenf nodlarında metastaz.

pM- Uzak metastaz. pM kategorileri diğer m kategorileri ile aynıdır (15).

*Not: Tümörlü Paget hastalığı tümörün boyutuna göre sınıflandırılır

**Not: Göğüs duvarı tanımı, kaburgalar, interkostal kaslar ve serratus anterior kasını içerir, ancak pektoral kası içermez.

EK-2 Meme karsinomlarında TNM evreleme sistemi (59)

Evre 0	T is	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIC	Herhangi T	N3	M0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

EK-3 Tüm olguların prognostik faktörleri ve çalışılan genlerin metilasyon oranları

No	Yaş	Tümör Tipi	Evre	TNM	ER	PR	HER2	TWIST	RARβ2	ESR1
1	54	İnvaziv ductal	3A	T2N2M0	-	-	-	<25	75	100
2	72	İnvaziv lobüler	3A	T2N2M0	+	+	+	25	75	75
3	32	İnvaziv ductal	3A	T2N1M0	+	+	-	25	100	100
4	67	İnvaziv ductal	2B	T2N1M0	-	-	-	UN	<25	25
5	47	İnfiltratif ductal	2A	T1N1M0	-	+	-	UN	25	100
6	52	İnvaziv ductal	3A	T3N2M0	-	-	-	UN	<25	UN
7	54	İnvaziv ductal	3A	T3N2M0	-	-	-	UN	25	UN
8	60	İnfiltratif ductal	2B	T2N1M0	-	-	-	UN	100	100
9	64	İnvaziv ductal	2A	T1N1M0	-	-	+	UN	75	100
10	59	İnvaziv ductal	3B	T4N2M0	-	+	+	UN	<25	UN
12	70	İnvaziv ductal	3B	T4N2M0	+	+	-	UN	50	75
13	74	İnfiltratif ductal	3A	T2N2M0	+	+	-	UN	100	100
14	54	İnvaziv ductal	3B	T2N3M0	+	+	+	UN	100	UN
16	45	İnvaziv ductal	3A	T3N2M0	+	+	+	UN	100	UN
17	83	İnvaziv ductal	3B	T2N2M0	+	+	-	UN	UN	UN
19	47	İnvaziv ductal	3B	T3N3M0	+	-	-	<25	<25	75
21	51	İnvaziv ductal	3A	T3N2M0	-	-	+	UN	<25	50
22	73	İnvaziv ductal	3A	T3N2M0	+	-	+	UN	25	75
23	43	İnfiltratif ductal	3A	T3N2M0	+	+	+	UN	<25	100
25	74	İnfiltratif ductal	3A	T3N2M0	-	+	-	50	50	75
26	61	İnfiltratif ductal	2B	T2N1M0	-	-	-	UN	<25	25
27	71	İnvaziv ductal	2B	T2N1M0	+	+	+	UN	25	UN
28	69	İnvaziv lobüler	2B	T2N1M0	+	-	-	25	75	100
29	77	İnvaziv lobüler	3A	T1N2M0	+	+	-	UN	<25	UN
30	51	İnvaziv ductal	2B	T2N1M0	-	-	-	25	100	UN
31	69	İnfiltratif ductal	2A	T2N0M0	+	-	-	UN	50	100
32	52	İnvaziv ductal	3A	T3N2M0	+	+	+	UN	<25	UN
33	66	İnfiltratif lobüler	2B	T2N1M0	+	-	+	UN	75	25

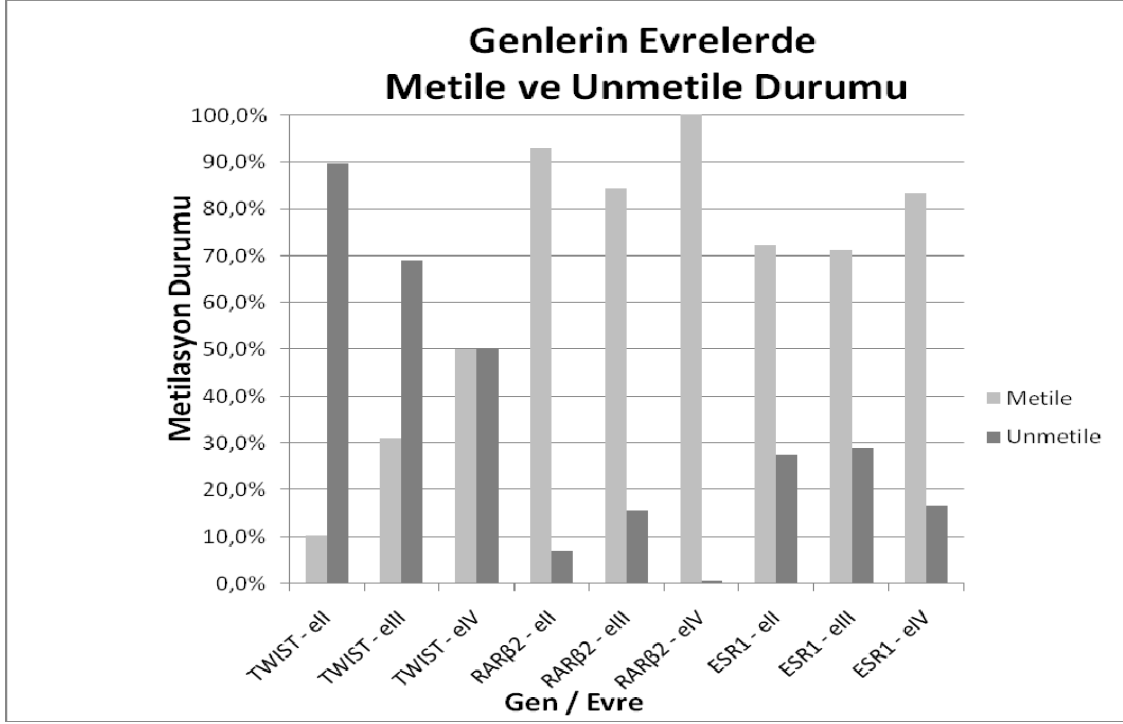
34	79	İnvaziv lobüler	2A	T1N1M0	+	+	-	UN	<25	UN
36	52	İnvaziv ductal	3A	T3N2M0	+	+	+	UN	100	100
38	61	İnvaziv ductal	2B	T2N1M0	+	+	-	UN	<25	100
39	50	İnfiltratif ductal	3B	T4N3M0	+	-	-	75	25	100
41	48	İnvaziv lobüler	2B	T3N0M0	+	+	+	UN	<25	25
42	63	İnvaziv ductal	4	T4N1M1	+	-	+	UN	<25	75
47	45	İnvaziv lobüler	2A	T1N1M0	+	+	-	UN	<25	25
49	66	İnfiltratif ductal	2B	T2N1M0	+	-	-	UN	25	75
50	42	İnvaziv ductal	2B	T2N1M0	+	-	+	UN	<25	100
51	72	İnfiltratif ductal	2B	T2N1M0	+	+	-	UN	<25	50
52	58	İnvaziv lobüler	2A	T1N1M0	+	+	+	UN	<25	UN
55	52	İnvaziv lobüler	2A	T1N1M0	+	+	+	UN	<25	75
56	63	İnvaziv ductal	2B	T3N0M0	-	-	-	UN	<25	UN
58	75	İnvaziv ductal	2A	T1N1M0	-	-	-	UN	<25	UN
59	60	İnvaziv ductal	3A	T2N2M0	+	+	-	UN	50	100
62	75	İnfiltratif ductal	4	T4N0M1	+	+	+	UN	<25	50
63	44	İnvaziv ductal	2A	T2N0M0	+	+	-	UN	100	UN
66	69	İnvaziv ductal	3B	T4N2M0	+	+	-	UN	<25	100
70	36	İnvaziv ductal	3A	T2N2M0	-	-	-	UN	100	100
71	61	İnvaziv ductal	2A	T2N0M0	-	-	-	UN	UN	75
72	55	İnvaziv lobüler	3B	T3N3M0	+	+	-	UN	<25	75
73	60	İnvaziv ductal	2B	T2N1M0	-	-	+	UN	75	UN
76	43	İnfiltratif ductal	4	T4N2M1	+	+	-	<25	<25	100
80	52	İnvaziv lobüler	3A	T3N1M0	-	-	+	<25	25	<25
84	51	İnfiltratif ductal	2A	T1N1M0	+	+	-	<25	75	75
85	77	İnvaziv ductal	3A	T3N1M0	+	+	-	UN	100	<25
91	64	İnvaziv ductal	2A	T1N1M0	-	-	-	UN	<25	50
92	59	İnvaziv ductal	3B	T4N2M0	+	-	-	UN	100	UN
93	50	İnvaziv ductal	3B	T4N1M0	+	+	+	25	<25	<25
94	41	İnvaziv ductal	3A	T2N2M0	+	+	-	UN	75	<25

95	58	İnvaziv lobüler	3A	T3N2M0	+	+	-	UN	100	25
96	54	İnvaziv ductal	3B	T4N0M0	-	-	-	<25	100	100
97	74	İnvaziv ductal	3A	T3N2M0	+	-	+	UN	<25	75
98	60	İnvaziv lobüler	3A	T2N1M0	+	+	-	75	UN	UN
99	55	İnvaziv ductal	2B	T2N0M0	+	-	-	UN	<25	75
102	50	İnvaziv intraductal	4	T2N3M1	-	-	+	25	<25	50
103	55	İnvaziv ductal	3A	T2N2M0	-	-	-	UN	<25	75
104	71	İnfiltratif ductal	3B	T4N2M0	+	+	-	UN	<25	25
105	56	İnvaziv ductal	3B	T2N3M0	-	-	-	UN	UN	25
107	49	İnvaziv ductal	4	T3N0M1	+	-	+	UN	<25	25
108	33	İnvaziv ductal	2A	T2N0M0	+	+	-	UN	<25	25
109	67	İnvaziv ductal	3B	T2N3M0	+	+	-	UN	UN	50
111	50	İnvaziv ductal	3B	T2N1M0	+	-	-	50	UN	50
113	64	İnvaziv ductal	3B	T3N3M0	-	-	+	<25	<25	50
114	68	İnvaziv ductal	3A	T2N2M0	+	+	+	UN	<25	50
115	63	İnvaziv ductal	3B	T3N3M0	-	-	-	<25	UN	25
116	57	İnvaziv ductal	3A	T3N1M0	+	+	+	UN	100	UN
120	50	İnvaziv lobüler	3A	T2N0M0	+	+	-	50	UN	UN
121	57	İnvaziv ductal	2A	T2N0M0	-	-	+	UN	UN	25
122	60	İnvaziv ductal	3A	T2N2M0	+	+	-	UN	<25	25
123	52	İnvaziv ductal	4	T2N0M1	+	-	+	50	100	UN
124	58	İnvaziv ductal	3A	T2N2M0	+	+	+	UN	25	UN

EK-4 Genlerin metilasyon oranlarının prognostik faktörlere göre dağılımı

Değişkenler	Olgular (n) (%)	TWIST met.		RARβ2 met.		ESR1 met.		
		M n (%)	U n (%)	M n (%)	U n (%)	M n (%)	U n (%)	
Toplam: 80 olgu		20 (25)	60 (75)	71 (88,75)	9 (11,25)	58 (72,5)	22 (27,5)	
Yaş								
	≤50	19 (24)	8	11	17	2	16	3
	>50	61 (76)	12	49	54	7	42	19
Evre								
	II	29 (37,5)	3(10,3)	26(89,7)	27 (93,1)	2(6,9)	21(72,4)	8(27,6)
	III	45 (55)	14(31,1)	31(68,9)	38 (84,4)	7(15,6)	32(71,1)	13(28,9)
	IV	6 (7,5)	3(5)	3(50)	6 (100)	0(0,0)	5(83,3)	1(16,7)
Tümör Tipi								
	IDC	67 (83,75)	16(23,9)	51(76,1)	59(88,1)	8(11,9)	49(73,1)	18(26,9)
	ILC	13 (16,25)	4 (30,8)	9(69,2)	12 (92,3)	1(7,7)	9 (69,2)	4(30,8)
Lenf Nodu								
	Pozitif	67 (85)	17 (25,4)	50(74,6)	61(91)	6(9)	48(71,6)	19(28,4)
	Negatif	13 (15)	3(23,1)	10(76,9)	10(76,9)	3(23,1)	10(76,9)	3(23,1)
Östrojen res.								
	Pozitif	54 (67,5)	12(22,2)	42(70)	49(90,7)	5(9,3)	39(72,2)	15(27,8)
	Negatif	26 (32,5)	8(40)	18(30)	22(84,6)	4(15,4)	19(73,1)	7(26,9)
Progesteron res.								
	Pozitif	42 (52,5)	8(19)	34(81)	38 (90,5)	4(9,5)	28(66,7)	14(33,3)
	Negatif	38 (47,5)	12(31,6)	26(68,4)	33 (86,8)	5(13,2)	30(78,9)	8(21,1)
HER2/NEU								
	Pozitif	30 (37,5)	6(20)	24(80)	29(96,7)	1(3,3)	21(70)	9(30)
	Negatif	50 (62,5)	14 (28)	36(72)	42 (84)	8(16)	37(74)	13(26)

EK-5 Çalışılan genlerin evrelerde metile ve unmetile durumları



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Onur EROĞLU
Doğum tarihi ve yeri : 03.11.1981 ESKİŞEHİR
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekâr
İletişim adresleri : onreroglu@gmail.com

Eğitim Durumu

1992-1996 Kültür Koleji
1996-1999 Bodrum Lisesi
2000-2004 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Lisans Programı
GPA:65/100
2004-2006 Anadolu Üniversitesi Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı
GPA:3.71/4.00
2006-2011 Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Doktora Programı
GPA:3.60/4.00

Mesleki Deneyim

2005-2009 Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Servis Laboratuvar Sorumlusu
2006-2011 Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D.
“Postnatal, Prenatal (Hücre Kültürü, CVS, Amniyon vs), Moleküler Sitogenetik (FISH), Kanser Sitogenetiği, Moleküler Genetik seksiyonlarında 5 yıl deneyim

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

- Biyoloji Derneği
- Tıbbi Genetik Derneği
- European Cytogenetics Association (ECA)

Yayınlar

- Ünal S., **Eroğlu O.**,” **Endemizm ve Bazı Çanakkale Endemikleri**” 8. Ulusal Biyoloji Kongresi, 10-13 Ekim 2001, Ankara, 2001 Sözlü Bildiri
- Çilingir O., Özdemir M., Bademci G., Aslan H., Durak B., Hassa H., **Eroğlu O.**, Uludağ P., Atlı E., Müslümanoğlu M. H., Artan S., “**Çoklu Kromozomal Yeniden Düzenlenmesi Olan Turner Sendromu Fenotipine Sahip Olgu**” Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 06-09 Mayıs 2008, Kolin Otel, ÇANAKKALE , 2008
- Emre R., Cantürk K. M., Şenol M., Müslümanoğlu M. H., Özdemir M., Çilingir O., Celayir F. M., **Eroğlu O.**, Hassa H., Artan S. “**Erken Dönemde Gonadoblastom Gelişen 46,XY Cinsiyet Dönüşümlü Olgu**” 5. Ulusal Tıbbi Genetik Sempozyumu Endokrin, 8-10 Ekim 2009 Abant, Abant International Palace, 2009

Bilimsel Etkinlikler

Ödüller:

- Çilingir O., Özdemir M., Bademci G., Aslan H., Durak B., Hassa H., **Eroğlu O.**, Uludağ P., Atlı E., Müslümanoğlu M. H., Artan S., “**Çoklu Kromozomal Yeniden Düzenlenmesi Olan Turner Sendromu Fenotipine Sahip Olgu**” Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 06-09 Mayıs 2008, Kolin Otel, ÇANAKKALE , 2008 Klinik/Moleküler Sitogenetik Dalında Poster Olarak **Birincilik Ödülü**

Projeler

“Meme Kanserli Hastalarda HER2/TOP2 Değişikliklerinin Epigenetik Durumla İlişkilendirilmesi” Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011 Proje No: 201011037 Yardımcı Araştırmacı

Sözlü konferans veya seminerler

Uluslararası toplantılara katılmak

- 6th European Cytogenetics Conference, 7-10 Temmuz 2007, İstanbul, 2007
- 7th European Cytogenetics Conference, 4–7 July 2009, Stockholm, SWEDEN, 2009

Ulusal toplantılara katılmak

- 8. Ulusal Biyoloji Kongresi, 10-13 Ekim 2001, Ankara, 2001
- 2. Ege Genetik Sempozyumu, 24 Kasım 2006, Afyonkarahisar, 2006
- Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 06-09 Mayıs 2008, Kolin Otel, ÇANAKKALE, 2008
- 4. Onkolojide Arayışlar Sempozyumu, Hematolojide Tanı Yöntemleri ve Kronik Myeloid Lösemi Çalıştayı, 19-22 Haziran 2008, Crowne Plaza Hotel-İzmir, 2008
- IV. Kök Hücre Sempozyumu, Türkiye Bilimler Akademisi, 26-27 Haziran 2009, Ankara, 2009
- 9. Tıbbi Genetik Kongresi, 01-05 Aralık 2010, Conrad Otel İstanbul