

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

MEME KANSERLİ OLGULARDA HER2 ve TOP2A GEN
DÜZENSİZLİKLERİ VE KANSERLE İLİŞKİLİ DİĞER
GENLERİN EPIGENETİK DURUMU İLE
İLİŞKİLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

AYŞE FEYDA NURSAL

DANIŞMAN
YRD. DOÇ.DR. OĞUZ ÇİLİNGİR

MART 2012
Proje No: 201011037

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

MEME KANSERLİ OLGULARDA HER2 ve TOP2A GEN
DÜZENSİZLİKLERİ VE KANSERLE İLİŞKİLİ DİĞER
GENLERİN EPIGENETİK DURUMU İLE
İLİŞKİLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

AYŞE FEYDA NURSAL

DANIŞMAN
YRD. DOÇ.DR. OĞUZ ÇİLİNGİR

MART 2012
Proje No:201011037

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ayşe Feyda NURSAL' ın Doktora Tezi olarak hazırladığı “*Meme Kanserli Olgularda HER2 ve TOP2A Gen Düzensizlikleri ve Kanserle İlişkili Diğer Genlerin Epigenetik Durumu İle İlişkilendirilmesi*” başlıklı bu çalışma, jürimizce Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “KABUL” edilmiştir.

27.03.2012

Üye : Prof.Dr. Sevilhan ARTAN


Üye : Doç.Dr. Tahsin YAKUT

Üye : Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR

Üye : Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS

Üye : Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR (Danışman)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30./03./2012 tarih ve 910.../...4247 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Meme kanseri tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür.

HER2/neu protoonkogeni kromozom 17q12-21'de lokalizedir ve invaziv meme karsinomlarının yaklaşık %25-30'unda amplifiye ve aşırı eksprese olur. DNA topoizomeraz 2 alfa insanlarda TOP2A geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Bu enzim transkripsiyon sırasında DNA'nın topolojik durumunu kontrol eder ve değiştirir. Düzensiz kromozom kopya sayısı değişikliği veya anozomi 17'e invaziv meme kanserinde sık rastlanır.

Epigenetik gen dizisinde değişiklik olmadan gen ekspresyonunda reversibl ve kalıtsal değişiklik olarak tanımlanır. RASSF1A ve APC genleri meme kanserinde sıklıkla inaktive olan tümör baskılayıcı genlerdir.

Bu çalışmada retrospektif olarak HER2/neu, TOP2A genleri ve CEP 17 kopya sayısı değişiklikleri yüksek riskli 60 hastanın tümör dokusundan FISH analizi ile incelendi (tümör boyutu ≥ 2 cm. ve/veya lenf ve/veya uzak metastazı olan ve /veya 40 yaş altı hastalar). RASSF1A ve APC gen promotor metilasyon seviyeleri MS-HRM analizi ile incelendi.

Çalışmamızda HER2/neu gen amplifikasyonu %25, eşlik eden TOP2A gen amplifikasyonu %53.4 ve delesyonu %13.3 olarak bulundu. HER2/neu gen amplifikasyonu yüksek grade, ER(-)'liği ve PR(-)'liği ile birliktelik gösterdi. Polizomi 17 hastaların %23.3'ünde mevcuttu. RASSF1A ve APC gen metilasyon seviyeleri %96.6 ve %43.3'dü. HER2/neu gen amplifikasyonu yüksek oranda RASSF1A gen metilasyonu ile birlikte bulundu. Bu bulgular HER2/neu pozitif olan tümörlerde epigenetik farklılıklar olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızın bu alanda yapılacak diğer çalışmalara bilgiler vereceği düşüncesindeyiz. Çalışmamız, Türk popülasyonunda HER2/neu, TOP2A genleri kopya sayıları ile RASSF1A, APC genleri promotor metilasyonu arasındaki ilişkinin incelendiği ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Meme Kanseri, HER2/neu geni, TOP2A geni, FISH, RASSF1A geni, APC geni, Metilasyon, MS-HRM

SUMMARY

Breast cancer is an important public health problem worldwide. Breast cancer is the type of cancer most frequently seen among women in the world.

The HER2 /neu protooncogene is mapped to chromosome 17q12-21 and is amplified and overexpressed in approximately 25-30% of invasive breast carcinomas. DNA topoisomerase 2-alpha is an enzyme that is encoded by the TOP2A gene in humans. This enzyme controls and alters the topologic states of DNA during transcription. Aberrant numerical changes in chromosome copy or aneusomy 17 are frequently encountered in invasive breast cancer .

Epigenetic is defined as a reversible and heritable change in gene expression that is not accompanied by alteration in gene sequence. RASSF1A and APC gene are putative tumor-suppressor genes that are frequently inactivated epigenetically in breast cancer.

In this study we analysed retrospective HER2, TOP2A gene and CEP17 copy number alterations by FISH analysis in primary tumor core biopsies from 60 high-risk primary breast cancer patients (tumors ≥ 2 cm and/or lenfatic metastase and/or distant metastases and/or under 40 years) . The methylation levels of the RASSF1A, APC gene promoters were assessed by MS-HRM method.

In our study, HER2/neu amplifications were identified in 25% and TOP2A complications in 53.4% and deletions in 13.3% of patients. HER2/neu gen amplification is found to be associated with high grade, ER negativity and PR negativity. Polysomy17 was present in 23.3% of patients. RASSF1A and APC methylation frequencies were 96.6% and 43.3%. HER2/neu gene amplification was found to be high together with RASSF1A promotor methylation levels. These findings indicate that there are epigenetic differences in HER2/neu positive breast tumors.

As a result we think that our study will provide information for the other studies which will be performed about this subject. Our study is important as being the first study that analyzes association between HER2/neu, TOP2A gene copy numbers and RASSF1A, APC gene promotor methylation status in Turkish population.

Key words: Breast cancer, HER2/neu gene, TOP2A gene, FISH, RASSF1A gene, APC gene, Methylation, MS-HRM Analysis

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.Kanser	5
2.1.1. Genel Olarak Kanser Tipleri	5
2.1.2. Kanser Oluşumu	5
2.1.3. Kansere Neden Olan Etkenler	6
2.1.4. Kanser Hücrelerinin Özelliği	7
2.1.5. Kanser Genleri	7
2.2.Epigenetik	10
2.2.1 DNA Metilasyonu	10
2.2.2 DNA Metilasyonu ve Kanser	11
2.2.3 DNA Metilasyonunun Kanserdeki Önemi	13
2.3. Meme	15
2.3.1. Meme Anatomisi	14
2.3.2. Meme Histolojisi	15
2.3.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	15
2.3.4. Meme Kanseri Etyolojisi	16
2.3.5. Meme Kanseri Genetiği	15
2.3.6. Meme Kanserinin Patolojik Sınıflaması	19
2.3.7. Meme Kanserinde Evreleme	21
2.3.8. Meme Kanserinin TNM Evrelemesi	21
2.3.9. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler	23

İÇİNDEKİLER (DEVAM EDİYOR)	Sayfa
2.4. Meme Kanserinde Rol Oynayan Genler	24
2.4.1.HER2/neu Geni	24
2.4.1.1. Kromozom 17	26
2.4.1.2. ER- PR	26
2.4.2.TOP2A Geni	26
2.4.3. RASSF1A Geni	28
2.4.4.. APC Geni	29
2.5. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi	29
2.6. High Resolution Melting (HRM) Analiz	30
2.6.1. Methylation Sensitive High Resolution Melting (MS- HRM) Analizi	31
2.6.2. Bisülfit Modifikasyonu	32
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER	33
3.1. Gereçler	33
3.1.1.Materyal Seçimi	33
3.1.2. FISH Analizinde Kullanılan Gereçler	33
3.1.3. FISH Analizinde Kullanılan Cam Malzemeler	34
3.1.4. FISH Analizinde Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
3.1.5. FISH Analizinde Kullanılan Kullanılan Problar	34
3.2. MS-HRM Analizinde Kullanılan Gereçler	35
3.2.1. MS-HRM Analizinde Kullanılan Aletler	35
3.2.2. MS-HRM Analizinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	35
3.2.3. MS-HRM Analizinde Kullanılan Primerler	36
3.2.3.1. RASSF1A Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler	36
3.2.3.2..APC Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler	36
3.3. Yöntemler	37
3.3.1. FISH Tekniğinin Uygulaması	37

İÇİNDEKİLER (DEVAM EDİYOR)	Sayfa
3.3.1.1. Pretreatment Aşaması (Proteoliz)	37
3.3.1.2. Prob Uygulanması (Hibridizasyon)	38
3.3.1.3. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	38
3.3.1.4. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	39
3.3.1.5. Değerlendirme	39
3.4. MS-HRM Analizinin Uygulanması	40
3.4.1. Parafinli Doku Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	40
3.4.2. Deparafinizasyon İşlemi	40
3.4.3. DNA izolasyonu	41
3.4.4. Bisüfit Modifikasyon İşleminin Gerçekleştirilmesi	41
3.4.5. MS-HRM Uygulanması	43
3.4.6. Değerlendirme	44
3.5. İstatistiksel Analizler	45
4. BULGULAR	46
4.1. Çalışmadaki Olguların Demografik Özellikleri	46
4.2. Çalışmadaki Olguların Özellikleri	46
4.2.1. Tümör Örneklerinin Grade'lere Göre Dağılımı	46
4.2.2. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Dağılımı	47
4.2.3. Tümör Örneklerinin ER-PR Dağılımı	47
4.2.4. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Tip - Grade Dağılımı	47
4.2.5. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Tip ve ER -PR Dağılımı	48
4.2.6. Örneklerinin Grade ve ER- PR Dağılımı	49
4.3. Meme Kanserli Hastalarda HER2/neu, TOP2A Geni ve CEP17 Özelliklerinin Dağılımı	50

İÇİNDEKİLER (DEVAM EDİYOR)	Sayfa
4.3.1. Tümör Örneklerinin CEP 17 Dağılımı	50
4.3.1.1. Tümör Örneklerinin CEP 17 ve Histopatolojik Tip Dağılımı	50
4.3.1.2. Tümör Örneklerinin CEP 17 ve Grade Dağılım	50
4.3.1.3. Tümör Örneklerinin CEP17 ve ER-PR Durumu Dağılımı	51
4.3.2. Tümör Örneklerinin HER2/neu Gen Dağılımı	51
4.3.2.1. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni ve Histopatolojik Tip Dağılımı	52
4.3.2.2. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni ve Grade Dağılımı	53
4.3.2.3. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni ve ER- PR Dağılımı	53
4.3.2.4. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni ve CEP 17 Dağılımı	55
4.3.3. Meme Kanserli Hastalarda TOP2A Gen Dağılımı	55
4.3.3.1. Tümör Örneklerinin TOP2A Geni ve Histopatolojik Tip Dağılımı	55
4.3.3.2. Tümör Örneklerinin TOP2A Geni ve Grade Dağılımı	56
4.3.3.3. Tümör Örneklerinin TOP2A Geni ve ER-PR Dağılımı	56
4.3.3.4. Tümör Örneklerinin HER2/neu ve TOP2A Gen Dağılımı	57
4.3.3.5. Tümör Örneklerinin TOP2A Geni ve CEP17 Dağılımı	58
4.3.3.6. Tümör Örneklerinde HER2/neu, TOP2A Genleri ve CEP 17 Dağılımı	59

İÇİNDEKİLER (DEVAM EDİYOR)	Sayfa
4.4. Tümör Örneklerinde HER2/neu, TOP2A Genleri ve CEP17'e Ait FISH Analiz Görüntüleri	60
4.5. HER2/neu-TOP2A Genleri ve CEP17 için Yaşam analizi	63
4.5.1. HER2/neu Geni için Yaşam Analizi	63
4.5.2. TOP2A Geni için Yaşam Analizi	64
4.5.3. CEP17 için Yaşam Analizi	64
4.6. Tümör Örneklerinde RASSF1A ve APC Genlerinin Metilasyon Dağılımı	65
4.6.1. RASSF1A Geni MS-HRM Analiz Görüntüleri	66
4.6.2. APC Geni MS-HRM Analiz Görüntüleri	69
4.7. Meme Kanserli Hastalarda RASSF1A ve APC Gen Metilasyon Sonuçları	71
4.7.1. Tümör Örneklerinde RASSF1A -APC Gen Metilasyonu ve Histopatolojik Tip Dağılımı	70
4.7.2. Tümör Örneklerinde RASSF1A-APC Gen Metilasyonu ve Grade Dağılımı	71
4.7.3. Tümör Örneklerinde RASSF1A -APC Gen Metilasyonu ve ER-PR Dağılımı	72
4.7.4. Tümör Örneklerinde RASSF1A - APC Gen Metilasyonu ve CEP 17 Dağılımı	74
4.7.5. Tümör Örneklerinde RASSF1A-APC Gen Metilasyonu ve HER2/neu Gen Dağılımı	75
4.7.6. Tümör Örneklerinde RASSF1A-APC Gen Metilasyonu ve TOP2A Gen Dağılımı	76
4.8. RASSF1A-APC Gen Metilasyonu ile Yaşam Analizi	77
4.8.1. RASSF1A Gen Metilasyonu ile Yaşam Analizi	77
4.8.2. APC Gen Metilasyonu ile Yaşam Analizi	78
5. TARTIŞMA	80
5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması	81

İÇİNDEKİLER (DEVAM EDİYOR)	Sayfa
5.1.1. Meme Kanserli Hastalarda HER2/neu, TOP2A Geni ve CEP17 Kopya Sayısı Dağılım Özelliklerinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması	81
5.1.2. Meme Kanserli Hastalarda RASSF1A ve APC Gen Metilasyon Değişikliklerinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması	95
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	105
7.KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	127

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1: KETEM Verilerine Göre Türkiye 2005 Kanser Verileri	15
Tablo 2.2: KETEM Verilerine Göre Kadınlarda Görülen İlk 10 Kanser Türü	16
Tablo 2.3: Meme Kanseri Patolojik Sınıflaması (WHO)	20
Tablo 2.4: Meme kanserinde AJCC (American Joint Comission on Cancer) Evreleme Sistemi	23
Tablo 2.5: FISH Metodunun Kullanılma Alanları	30
Tablo 3.1: HER2/neu, TOP2A geni ve CEP 17 Değerlendirme Kriterleri	40
Tablo 3.2: Metilasyon Yüzdelerini Saptamak İçin Kullanılan Kontrollerin Hesaplanması	44
Tablo 4.1: Tümör Örneklerinin Grade'e Göre Dağılımı	46
Tablo 4.2: Tümör Örneklerinin Histopatolojik Tiplere Göre Dağılımı	47
Tablo 4.3 Tümör Örneklerinin ER-PR Dağılımı	47
Tablo 4.4 Tümör Örneklerinin Histopatolojik Tip- Grade Dağılımı	48
Tablo 4.5: Tümör Örneklerinde Histopatolojik Tip ve ER-PR Dağılımı	48
Tablo 4.6: Tümör Örneklerinde Grade ve ER-PR Dağılımı	49
Tablo 4.7: Tümör Örneklerinde CEP 17- Histopatolojik Tip Dağılımı	50
Tablo 4.8: Tümör Örneklerinde CEP 17- Grade Dağılımı	51
Tablo 4.9: Tümör Örneklerinde CEP 17 ve ER-PR Dağılımı	51
Tablo 4.10: Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni Kopya Sayılarının Histopatolojik Tiplere Göre Dağılımı	52
Tablo 4.11: Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni- Grade Dağılımı	53
Tablo 4.12: Tümör Örneklerinde HER2/neu Geni ve ER-PR Dağılımı	54
Tablo 4.13: Tümör Örneklerinde HER2/neu Geni ve Kromozom 17 Sentromer Sinyal Değişiklikleri Dağılımı	55
Tablo 4.14: Tümör Örneklerinde TOP2A Geni- Histopatolojik Tip Dağılımı	56
Tablo 4.15: Tümör Örneklerinde TOP2A Geni- Grade Dağılımı	56
Tablo 4.16: Tümör Örneklerinde TOP2A Geni ve ER-PR Dağılımı	57

TABLolar DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)**Sayfa**

Tablo 4.17: Tümör Örneklerinde HER2/neu- TOP2A Gen Dağılımı	58
Tablo 4.18: Tümör Örneklerinde TOP2AGeni- CEP 17 Dağılımı	58
Tablo 4.19: Tümör Örneklerinde HER2/neu, TOP2A Genleri ve CEP 17 Dağılımı	59
Tablo 4.20: HER2/neu Geni ile İlgili Sağ Kalım Sürelerinin Yığılım Tablosu	63
Tablo 4.21: TOP2A Geni ile İlgili Sağkalım Sürelerinin Yığılım Tablosu	64
Tablo 4.22: CEP17 ile İlgili Sağkalım Sürelerinin Yığılım Tablosu	65
Tablo 4.23: Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve Histopatolojik Tip Dağılımı	70
Tablo 4.24: Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve Histopatolojik Tip dağılımı	71
Tablo 4.25: Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve Grade Dağılımı	71
Tablo 4.26: Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve Grade Dağılımı	72
Tablo 4.27: Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve ER-PR Dağılımı	72
Tablo 4.28: Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve ER-PR Dağılımı	73
Tablo 4.29: Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve CEP 17 Dağılımı	74
Tablo 4.30: Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve CEP 17 Dağılımı	74
Tablo 4.31 Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve HER2/neu Gen Dağılımı	75
Tablo 4.32 Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve HER2/neu Gen Dağılımı	75

TABLolar DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)	Sayfa
Tablo 4.33: Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve TOP2A Geni Dağılımı	76
Tablo 4.34: Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve TOP2A Gen Dağılımı	76
Tablo 4.35: Tüm Olgularda RASSF1A Gen Metilasyon Oranı	77
Tablo 4.36: RASSF1A Genine Ait Sağkalım Sürelerinin Yığılım Tablosu	78
Tablo 4.37: Tüm Olgularda APC Gen Metilasyon Oranı	78
Tablo 4.38: APC Genine Ait Sağkalım Sürelerinin Yığılım Tablosu	79
Tablo 5.1: HER2/neu, TOP2A Genleri ve CEP 17 Kopya Sayısı Değişikliklerinin Literatür Çalışmaları ile Karşılaştırılması	93
Tablo 5.2: RASSF1A ve APC Gen Metilasyon Durumunun Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kanser Oluşumu	9
Şekil 2.2 : DNA Tamir Fonksiyonları	9
Şekil 2.3: Sitozinin 5 Numaralı Karbon Molekülüne Metil Grubu Eklenmesi	10
Şekil 2.4: Metilasyon ve Kanser İlişkisi	12
Şekil 2.5: Normal ve Kanserli Hücrede Metilasyon	13
Şekil 2.6: Meme Anatomisi	14
Şekil 2.7: Meme Kanseri ve Yaş İlişkisi	16
Şekil 2.8: HER2/neu Gen Reseptörünün Şematik Şekli	24
Şekil 2.9: HER2/neu Pozitif Meme Kanserlerinde Hedef Yolak Mekanizması	25
Şekil 2.10: Genomik DNA'nın Bisülfid ile Modifikasyonu	32
Şekil 4.1: HER2/neu-TOP2A Geni ve CEP17 Normal Bulunan Hastaya Ait Görüntü	60
Şekil 4.2: HER2/neu ve TOP2A Gen Amplifikasyonu Olan Olguya Ait Görüntü	60
Şekil 4.3: HER2/neu Geni normal ve TOP2A Geni Delesyonlu Olguya Ait Görüntü	61
Şekil 4.4: HER2/neu Geni Amplifiye ve TOP2A Geni Delesyonlu Olguya Ait Görüntü	61
Şekil 4.5: HER2/neu Geni Normal ve TOP2A Gen Amplifikasyonu Olan Olguya Ait Görüntü	62
Şekil 4.6: HER2/neu Gen amplifikasyonu ve TOP2A Geni Normal Olan Olguya Ait Görüntü	62
Şekil 4.7: RASSF1A Geni Unmetile ve Metile Kontrol DNA'ların Floresan Piklerine Göre Görüntüleri	66

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Sayfa

Şekil 4.8: Araştırma Grubuna Dahil Edilen Tüm Örneklerin Tm Derecelerine Ait Görüntü	67
Şekil 4.9: RASSF1A geninde %25↓ Metile ile Uyumlu Olgu Görüntüsü	67
Şekil 4.10: RASSF1A Geni %50 Metile DNA Örneği ile Uyumlu Olgu Görüntüsü	68
Şekil 4.11: RASSF1A geni %100 Metile DNA Örneği ile Uyumlu Olgu Görüntüsü	68
Şekil 4.12: APC Geni Unmetile ve Metile Kontrol DNA'ların Floresan Piklerine Göre Görüntüleri	69
Şekil 4.13: APC Geni için Tüm Olguların Tm Derecelerine Ait Pik Görüntüsü	69
Şekil 4.14: APC Geni İçin Unmetile Olguya Ait Pik Görüntüsü	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ABD:** Amerika Birleşik Devletleri
APC: Adenomatöz Polipozis Koli
BRCA1: Meme kanseri yatkınlık geni 1
BRCA2: Meme kanseri yatkınlık geni 2
CEF: Siklofosfamid, Epirubicin,5-Fluorourasil
CEP: Kromozom enumerasyon probu
CGH: Komperativ Genom Hibridizasyon
CMF: Siklofosfamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
C-MYC: C-MYC Geni
C-Jun: C-Jun Geni
CpG : Sitozin-fosfo-Guanin
DAPI: 4',6'- diamidino-2-fenilindol dihidroklorid
DKIS: Duktal karsinoma in situ
DNA: Deoksiribonukleik asit
dUTP:Deoksi uridin trifosfat
EBV: Epstein Bar virusu
EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Resepörü
ER: Östrojen Reseptörü
ESOGU: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
FAP: Familyal Adenomatöz Polipozis
FISH: Flouresan İn Situ Hibridizasyon
G0:Hücre siklusunun G0evresi
G1:Hücre siklusunun G1 evresi
G2: Hücre siklusunun G2 evresi
HBV: Hepatit B virusu
HE: Hematoksilen Eosin boyası
HER-2/neu: Epidermal Reseptör proteini
JK: Janus kinaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

IHC: İmmüno Histokimyasal

kD: Kilodalton

Ki-67: Proliferasyon Belirleyici

KETEM: Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezi

KT: Kemoterapi

LKIS: Lobular karsinoma in situ

LOH: Heterozigozite kaybı

LSI: Lokus spesifik belirleyici

M: Mitoz

MAPK: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz

Meme CA: Meme Kanseri

MS-HRM: Metilasyona hassas yüksek çözünürlüklü erime analizi

ml: Mililitre

mRNA: Messenger Ribonukleik Asit

NaCl: Sodyum Klorur

N-MYC: N-MYC Geni

NaOH: Sodyum Hidroksit

PAH: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pCR: Cerrahi örnekte kalan canlı invaziv hücre olmaması

Ph: Çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini gösteren terim

PI3K: Fosfatidil İnositol 3-OH Kinaz

PR: Progesteron Reseptörü

RASS: Ras Association Domain Family Geni

RASSF1A: Ras Association Domain Family 1 İsoform A

RB: Retinablastom

RB/E2: Retinablastom/E2 geni

RNA: Ribonukleik Asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

rpm: Round Per Minute

RT- PCR: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

S: Hücre siklusunun S evresi

SSC: NaCl/Trisodyum Sitrat

TNM: Tümör, Nod, Metastaza göre sınıflama

TOP2A: Topoizomeraz2 alfa geni

TP53: Tümör protein P53 geni

TSG: Tümör baskılayıcı gen

TUBA: Türkiye Bilimler Akademisi

USG: Ultrasonografi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

µl: Mikrolitre

µg: Mikrogram

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli mortalite ve morbidite sebebidir. Kalp damar hastalıklarından sonra ikinci ölüm nedeni olarak görülmektedir. Böylesine önemli bir toplumsal sorunun nedeni, tanısı ve tedavisine yönelik çalışmalar hastaların yaşam süresi açısından önem arz etmektedir. Gelişmiş ülkelerde her beş kişiden biri kanserden ölmekte, genel sağlık giderlerinin %10'undan fazlası kansere harcanmaktadır (96).

Meme kanseri meme dokusundan köken alan bir malignitedir. Tüm ülkelerde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (27). Tüm kadın kanserlerinin %18'ini teşkil eder (108). Amerikan Kanser Derneğinin verilerine göre tüm dünyada her yıl 1.3 milyon kadın meme kanseri tanısı almakta ve 465 000 kadın bu sebepten hayatını kaybetmektedir (91). Bir kadının tüm hayatı boyunca meme kanseri geliştirme riski 1/12-1/20 arasında değişmektedir (27). Ölüm sıralamasında ise meme kanseri kadınlarda akciğer kanserinin ardından ikinci sırada yer almaktadır (27, 58).

Meme kanseri genetik ve genetik olmayan risk faktörlerinin etkileşimi ile oluşan kompleks ve heterojen bir hastalıktır (36). Meme kanserlerinin çoğunluğu sporadiktir (36). Herediter tip meme kanseri olguların %5-10'nunu oluşturur. Sporadik kanserler somatik genlerdeki sonradan kazanılmış ve düzeltilemeyen mutasyonların çok aşamalı süreçte birikiminden kaynaklanır (36).

Meme kanserinin farklı biyolojik ve moleküler özelliği tümörün davranışını ve prognozunu etkiler (31). Aynı tanı ve klinik prognostik profile sahip olan meme kanserli hastalar birbirinden oldukça farklı klinik davranış ve yaşam süresi gösterirler (118).

Human epidermal growth factor receptor-2 (HER2/neu) geni transmembran tirozin kinaz kodlayan bir protoonkogendir (148). Meme kanserinde prognostik ve prediktif öneme sahip bir belirteçdir. Meme kanserlerinin yaklaşık %25-30'unda HER2/neu gen amplifikasyonu ve protein aşırı ekspresyonu mevcuttur (31, 42, 72). Bu durum kötü klinik seyir ve prognoz göstergesidir (14).

DNA Topoizomeraz 2 alfa enzimini kodlayan TOP2A geni HER2/neu genine yakın lokalizasyondadır (34). Bu enzim DNA zincirinde geçici kırıklar oluşturarak

DNA'nın topolojik durumunu düzenler (92). Tip 2 topoizomerazlar '*Topoizomeraz İnhibitörleri*' olarak adlandırılan antrasiklinlerin primer hedefidir (92). HER2/neu gen amplifikasyonu olan meme kanserlerinin büyük çoğunluğunda TOP2A geninde de kopya sayısı değişiklikleri görülür (34). HER2/neu geni yanısıra TOP2A geninin de meme kanserinin seyrinde önemli olduğu ileri sürülmüştür (34).

Kromozom17 anozomisi (polizomi veya monozomi) meme kanserinde sık ve erken görülen bir değişikliktir. Meme kanserinde yeni bir belirteç olabileceği fikri öne sürülmüştür (137).

Gen ekspresyonunlardaki değişikliklerde gen/kromozom mutasyonlarının yanı sıra epigenetik değişikliklerinin de özellikle kanserde çok önemli olduğu bugün kabul edilen bir gerçektir. DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen ve kalıtılabilen değişikliklere '*epigenetik*' adı verilir (12). Genomdaki DNA promotor metilasyonu ve kromatin yeniden şekillenmesi gibi epigenetik değişiklikler tümör oluşumunda önemli rol oynar (25). Gene özgü epigenetik değişiklikler tümör oluşumunun erken evresinde olduğundan erken tanı ve tedavi için kullanılabilme potansiyeline sahiptir (25). Epigenetik mekanizmalar içinde en çok çalışılan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıdır (98). DNA metilasyonu DNA'daki CpG dinükleotidlerindeki sitozinin 5 numaralı karbonuna metil grubu bağlanması ile meydana gelir. DNA metilasyonu gelişim genetiğinin, hücresel farklılaşmanın ve dokuya özgü gen ekspresyonunun temelini oluşturur. DNA metilasyonu normal hücrelerde hipo ve hipermetilasyon özelliği ile canlılar ve dokular arası farklılıklara neden olur (98). DNA hipermetilasyonu genlerin promotor bölgesindeki CpG adacıklarındaki sitozinlerin metillenmesi sonucu oluşur. Aberan DNA metilasyonu meme kanserinde tanımlanan en yaygın moleküler değişimlerden biridir (30) . Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına yol açan bu değişiklik çeşitli epigenetik çalışmalarla ortaya konmuştur. Son yıllarda elde edilen veriler DNA metilasyonun kanser tanısı, prognozu ve tedavisi açısından önemli belirteç olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Bu değişimler geri dönüşümlü olduğundan meme kanserinin önlenmesi ve tedavisinde başarılı bir hedef olma özelliğindedir (25).

Kromozom 3p21.3 bölgesine lokalize Ras association domain family 1A (RASSF1A) geni bir tümör baskılayıcı gendir. Hücre siklus kontrolü, mikrotubul stabilizasyonu, hücre adezyonu gibi çeşitli hücreyel olaylarda görev alır (104). RASSF1A promotor bölge hipermetilasyonu meme kanseri de dahil olmak üzere akciğer, over, tiroid gibi pek çok malignitede izlenir (120).

Adenomatous polyposis coli (APC) geni kromozom 5q21.22'de lokalize bir tümör baskılayıcı gendir. Transkripsiyon, hücre siklus kontrolü, migrasyon, farklılaşma, apoptoz gibi hücreyel olaylarda rol oynar (38). Özellikle kolorektal kanserlerin moleküler patolojisinde mutasyonları ile kendini gösterir. Germ hücrelerindeki APC gen mutasyonlarının kalıtlanması Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) gelişiminin ana nedenidir. Tümör baskılayıcı gen olan APC gen promotor bölge metilasyonu başta kolorektal kanser olmak üzere gastrik kanser, pankreas kanseri, karaciğer kanseri gibi farklı neoplazilerde rapor edilmiştir (73). APC gen promotor hipermetilasyonun meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (146).

Tüm kanser tiplerinde olduğu gibi meme kanserinin farklı prognostik özellikler göstermesi, bireyler arasında tedaviye farklı yanıtlar verilmesi gerek hasta survisi gerekse yaşam kalitesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenden ötürü klinisyenlere yardımcı olabilecek belirteç arayışına ilişkin çalışmaların anlamlı düzeyde ivme kazandığı gözlenmektedir.

Çalışmamızda meme kanserli hastalarda HER2/neu, TOP2A genleri ve kromozom 17 kopya sayısı değişikliklerinin tümör histopatolojik tipi, tümör derecesi, tümörlerin östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) özellikleri ve olguların yaşam süreleri arasındaki ilişkiyi göstermek amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra meme kanseri etyopatogenezinde rol oynayan RASSF1A ve APC genlerinin metilasyon düzeylerinin HER2/neu, TOP2A genleri ve kromozom 17 kopya sayısı anomalileri ile ilişkili olup olmadıkları değerlendirilerek tümörlerin histopatolojik tipi, derecesi ile olguların yaşam sürelerine etkileri irdelenmiştir.

Bu amaçlar doğrultusunda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi ESOĞU Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında meme kanseri tanısı almış ve Tıbbi Onkoloji

Kliniğinde izlenen 60 hastanın mastektomi materyallerine ait parafinize doku kesitlerinde genetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen olguların belirlenmesindeki temel kriter 'yüksek risk grubu' olmalarıdır. Olgu seçiminde aşağıdaki belirtilen kriterlere göre yüksek risk grubundaki hastalardan seçilmiştir. Hasta seçimindeki kriterler:

- Tümör boyutu ≥ 2 cm. olanlar ve/veya
- Lenf nodu metastazı olanlar ve/veya
- Uzak metastazı olanlar ve/veya
- 40 yaş altı hastalar

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser genetik ve epigenetik değişikliklerin normal hücre fonksiyonlarını bozması ile uzun süreçte oluşan bir bozukluktur (26). Kanser hücresinde çoğalma, farklılaşma, yaşama gibi doğal mekanizmalar bozulur. Hücreler kontrolsüz şekilde çoğalır ve vücudun diğer bölümlerine yayılarak diğer doku ve organ işlevlerini bozar (17).

Kanser ile eşanlamlı olarak kullanılan tümör benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olma özelliğine bakmadan anormal hücre büyümesi olarak ifade edilebilir. Buna göre benign tümörler oluştuğu bölgede kalır ve vücudun diğer bölgelerine yayılmaz. Malign tümörler ise sürekli bölünerek çoğalır ve vücudun yakın veya uzak bölgelerine yayılarak metastaz yapma özelliği taşır (75).

2.1.1. Kanser Tipleri

Genel olarak kanserler köken aldıkları hücre tipine göre üç gruba ayrılırlar:

- Karsinomlar
- Sarkomlar
- Lösemi lenfoma gibi hematolojik maligniteler (17)

Karsinomlar insan kanserlerinin % 90'nını oluşturan epitelyal kökenli kanserlerdir. Sarkomlar daha az sıklıkta karşımıza çıkar ve bağ dokusu kökenli solid tümörlerdir (kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi). Hematolojik maligniteler ise tüm kanserlerin %7'sini meydana getirir ve kan veya immun sistem hücrelerinden gelişir (17).

2.1.2.Kanser Oluşumu

Sağlıklı bir canlıda hücreler bölünür, büyür, farklılaşır ve ve apoptoz denilen programlanmış ölüm süreci ile yaşamını tamamlar (96). Her tümör hücredeki DNA molekülünde bir veya fazla mutasyonun hücresel işlevleri bozması ile ortaya çıkar (7). Kanser oluşumu 2 şekilde meydana gelir:

1- Kalıtsal kanserler:

Gonadlardaki germ hücrelerinde (ovum ve sperm) oluşan bir mutasyon gelecek kuşaklara aktarılır. Bu mutasyonu alan birey yalnız germ hücrelerinde değil tüm vücut hücrelerinde bu mutasyonu taşır (7).

Germinal mutasyonla meydana gelen kalıtsal kanserler tüm kanser olgularının % 5-10'nunu oluşturur. Kalıtsal kansere yol açtığı belirlenen RB1,WT1, BRCA1, BRCA2, P53, NF1, VHL gibi otuz civarında tümör baskılayıcı gen vardır (26).

Bu genler Mendelian-dominant geçiş gösterir ve kansere yatkınlık kazandırır. Ancak bu genlerin hücrel yansıması resesif özelliktedir. Yani kanser oluşturması her iki allelin inaktif olması gerekir (26). Kalıtsal kanserler sporadik kanserlere göre daha erken yaşta ortaya çıkar.

2- Sporadik kanserler:

Sporadik kanserler çeşitli faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan ve daha sıklıkla karşılaşılan kanserlerdir. Somatik yani vücut hücrelerinde oluşan mutasyonlar ile meydana gelir (7). Bu mutasyonlar dokuya özgüdür. Gelecek kuşaklara aktarılmaz. Sadece etkilediği kişide hastalık oluşturur (26).

2.1.3.Kansere Neden Olan Etkenler

Kansere neden olan maddelere karsinojenik madde denir (17). Radyasyon ve birçok kimyasal madde etkisini hücre DNA'sını bozarak veya mutasyon yaparak meydana getirir. İnsanda kansere neden olabilen etkenler arasında radyasyon, UV ışını gibi fiziksel, asbest, aflotoksin, vinil klorür gibi kimyasal maddeler sayılabilir (17) . Bunun yanı sıra bazı virüsler de kansere neden olur. Hem retrovirusler hem DNA virüsleri kanser oluşumunda etkili olabilirler (26).

2.1.4.Kanser Hücrelerinin Özelliği

Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması, çevre ve uzak dokulara yayılması normal dışı oluşan biyolojik davranışının sonucudur. Kanser hücrelerinde normal hücre popülasyonundan farklı olan pek çok özellik vardır (75). Bunlar:

- Hücre dışı büyüme faktörlerine gereksinim duymamaları
- Kontakt inhibisyon yokluğu
- Sınırsız bölünme gücü
- Apoptozisten kaçma
- Anjiogenez oluşumu
- Hücre siklus düzenini bozulması
- Normal farklılaşmanın bozulması
- Otokrin çoğalma uyarısı
- Telomer fonksiyonunun bozulması

2.1.5.Kanser Genleri

Oluşum mekanizmasında kanser başlama, ilerleme ve metastaz evrelerinden geçerek uzun yıllar alabilecek bir süreçte kendini gösterir (26). Kanser oluşumunda rol oynayan 3 tip gen grubu vardır.

A-Proto-onkogenler: Normal hücre yaşamı süresince hücrenin büyümesini, bölünmesini başlatan, sürdüren ve apoptozisi baskılayan proteinleri oluşturan gen grubudur. Proto-onkogenlerin ürünleri olan proteinler büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, sinyal ileticileri, transkripsiyon faktörleri gibi moleküler olaylarda görev alırlar(1). Protoonkogenler bazı olaylarla patojenik etkili onkogen haline dönüşürler. Proto- onkogenleri onkogen haline dönüştüren olaylar (26):

- Nokta mutasyonlar
- Kromozomal translokasyonlar
- Gen amplifikasyonları
- Retroviral transdüksiyon

Onkogenler hücreseel seviyede dominant etkiye sahiptir. Yani bir allelin mutasyonlu olması kanser oluşumu için yeterlidir.

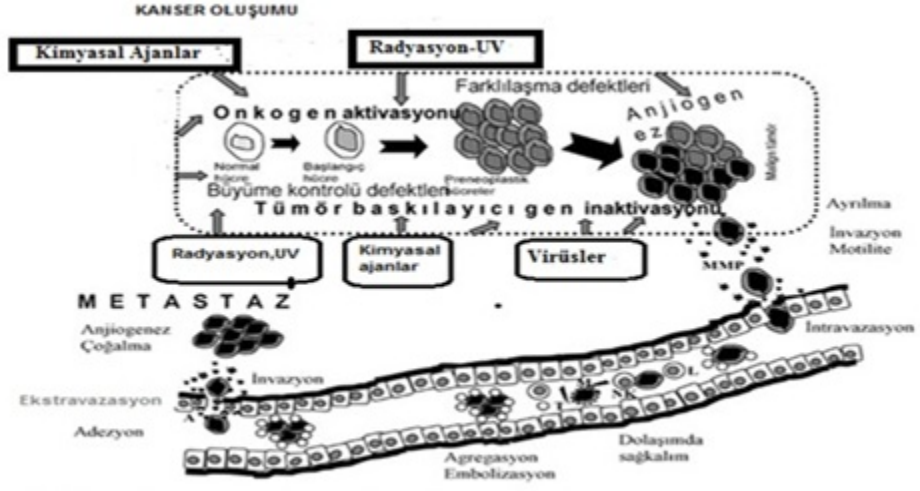
B-Tümör baskılayıcı genler: Hücre döngüsünün negatif düzenleyicisi olarak tümör oluşumuna engel olan genlerdir (75). Tümör baskılayıcı genlerin ürünü olan proteinlerin fonksiyon kaybı ile kontrolsüz hücre bölünmesi, anormal hücre büyümesi ve kusurlu hücre ölümü gerçekleşir. 2 grupta incelenir;

A) Hücreseel işlevi düzenleyici genler: hücre siklus geçişlerini denetleyen genler.

B) Genomik instabilite genleri: genomik bütünlüğünün korunmasını sağlayan genler.

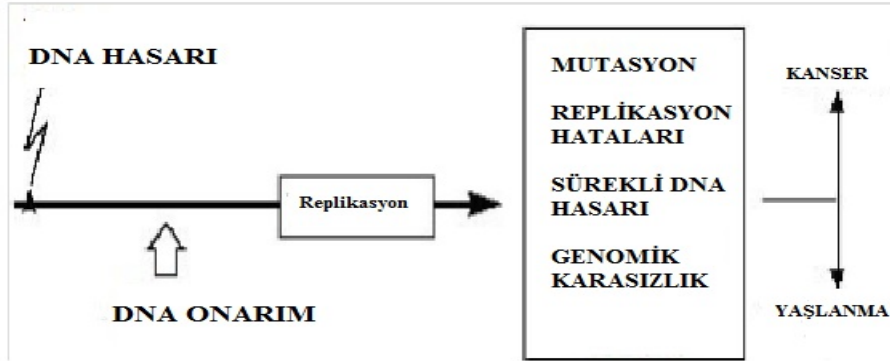
Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı genin kodlayıcı bölgesindeki yanlış anlamlı mutasyonlar, proteininin büyüklüğünü ve aktivitesini değiştiren eksilme, artma veya çerçeve kayması mutasyonlar ile oluşur. Bu olaylar proteinin aktivitesini azaltır ya da tamamen ortadan kaldırır (26). Tümör baskılayıcı genler dominant yolla kalıtılır ancak hücredeki fenotipi resesiftir. Tek alleldeki mutasyon kanser oluşumu için yeterli değildir.

Tümör baskılayıcı gen mutasyonu sonucu oluşan kanserlerin protipi kabul edilen retinablastoma RB1 geninde oluşan mutasyonla meydana gelen nadir bir tümördür. Retinablastomaların %40'ı herediter tiptedir. Herediter retinablastomada ilk mutasyon tüm hücrelerde mutasyon bulunduğu için gelecek nesillere %50 olasılıkla aktarılır. Ancak ikinci mutasyon oluşana dek birey sağlıklıdır (96). Sonradan meydana gelen mutasyonla ikinci allel işlevini yitirdiği zaman kanser ortaya çıkar Sporadik tip retinablastomada ise kanser oluşumu için allelerin her birinde ayrı ayrı mutasyon çıkması gerekir.



Şekil 2.1. Kanser oluşumu (51). (kaynak 51'den değiştirilerek alınmıştır)

C-Genom stabilite ve DNA tamir genleri: Kanserın başlıca özelliği genomik karasızlıktır. Bu genler genomik bütünlüğü koruyarak hücrenin malign hale dönmesini dolaylı olarak engelleyen genlerdir (26). Tamir genleri ise DNA sentezi sırasında oluşan hasarların düzeltilmesini sağlar (26). Farklı DNA tamir mekanizmaları vardır.



Şekil 2.2. DNA Tamir Fonksiyonları (20). (kaynak 20'den değiştirilerek alınmıştır)

2.2. Epigenetik

İnsanda oluşan kanserlerin başlama ve ilerlemesi çok aşamalı süreçlerden geçerek oluşur. Karsinogeneziste hem kalıtsal ve hem de de novo mutasyonlar tanımlanmıştır (25). Bu değişiklikler onkogenlerde aktivasyona veya tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybına neden olur.

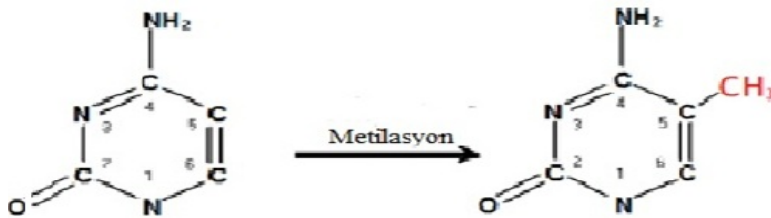
Ancak yapılan çalışmalar kanser oluşumunda mutasyon dışında epigenetik mekanizmaların da rolü olduğunu göstermektedir (25). Organizmadaki tüm hücrelerde DNA yapısı ve nükleotid dizisi aynı olmakla birlikte, hücreler arası farklılıklar bulunması gen ifadesindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler '*epigenetik*' olarak adlandırılır (12).

Epigenetik mekanizmaları üç ana gruba ayırabiliriz (12):

1. DNA metilasyonu
2. Histon modifikasyonları
3. RNA aracılığı ile sessizleşme (RNA-induced silencing)

2.2.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu memelilerde üzerinde en çok çalışılmış olan epigenetik modifikasyondur (12). Metilasyon memeli DNA'sında gerçekleşen tek kovalan bağıdır ve sadece CpG adacıklarındaki sitozinde meydana gelir (119).



Şekil 2.3. Sitozinin 5 numaralı karbon molekülüne metil grubu eklenmesi (144) (kaynak 144'den değiştirilerek alınmıştır)

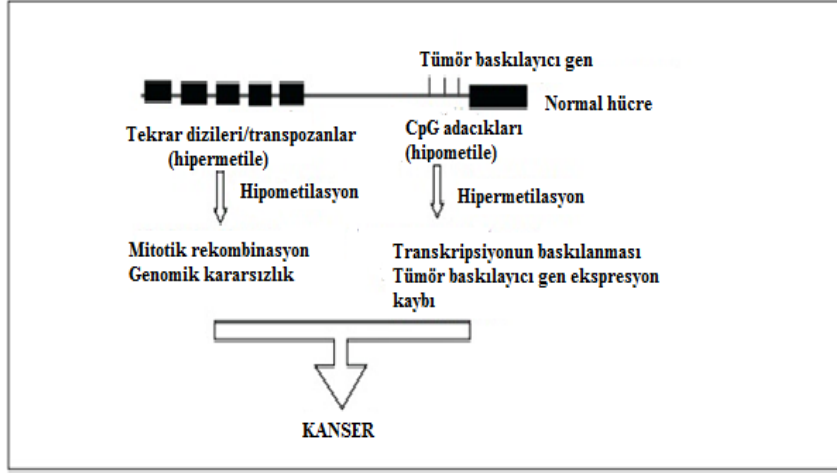
CpG adacıkları genellikle genlerin promotor bölgelerinde bulunan ve 0,2-1 kb uzunluğunda dinükleotidlerdir (119). Normal dokularda yapılan çalışmalarda genlerde CpG adacıklarının az sayıda bulunduğu ve genin ekzon bölgesinde metilasyonun yoğun olduğu gözlenmiştir. Ancak promotor bölgede yoğun olarak bulunan CpG adacıklarının unmetile olduğu görülmüştür (75). Çünkü promotor bölgesi gen ekspresyonunu düzenleyen proteinlerin bağlandığı özel bir kısımdır. Bu bölgedeki CpG adacık metilasyonu gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Gendeki CpG adacıkları hipometile ise gen aktif, hipermetile ise gen sessiz demektir (75).

DNA metilasyonu normalde gen ekspresyonunun çeşitlenmesi, düzenlenmesi, genomik imprinting, X kromozom inaktivasyonu, retroviral ve transposabl DNA'ların sessizleştirilmesi ve kromatin organizasyonu gibi pek çok hücrel olayda meydana gelir (116).

2.2.2. DNA Metilasyonu ve Kanser

Son dönemlerde yapılan pek çok çalışma ile normal ve tümörlü hücrelerde metilasyonla sessizleşen genlerdeki moleküler mekanizmayı anlama hedeflenmektedir. Metilasyon ile tümör baskılayıcı genlerin yanı sıra apoptoz, hücre siklus düzenleyici, DNA tamir, detoksifikasyon, hormonal cevap gibi çeşitli hücrel yollarda görev yapan genler sessizleşebilir (28).

Knudson'nun çift vuruş hipotezine göre tümör baskılayıcı genlerde malign transformasyon gelişebilmesi için her iki allelde de fonksiyon kaybı gerekmektedir (60). Bu hipotez ilk kez retinablastoma gibi kanserlerin hem herediter hem de sporadik formlarının oluşumunu açıklamak için öne sürülmüştür (94). CpG adacık hipermetilasyonu ile oluşan ekspresyon kaybı Retinablastomanın sporadik formuna sahip hastaların %10'nunda Rb geni için gösterilmiştir (75). Normal allelde ikinci vuruşun her zaman mutasyon ile meydana gelmediği anlaşıldığında teori daha detaylandırılmış ve DNA hipermetilasyonunun tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı yaratabileceği mekanizması ön plana çıkmıştır (94).



Şekil 2.4. Metilasyon ve kanser ilişkisi (12). (kaynak 12'den değiştirilerek alınmıştır)

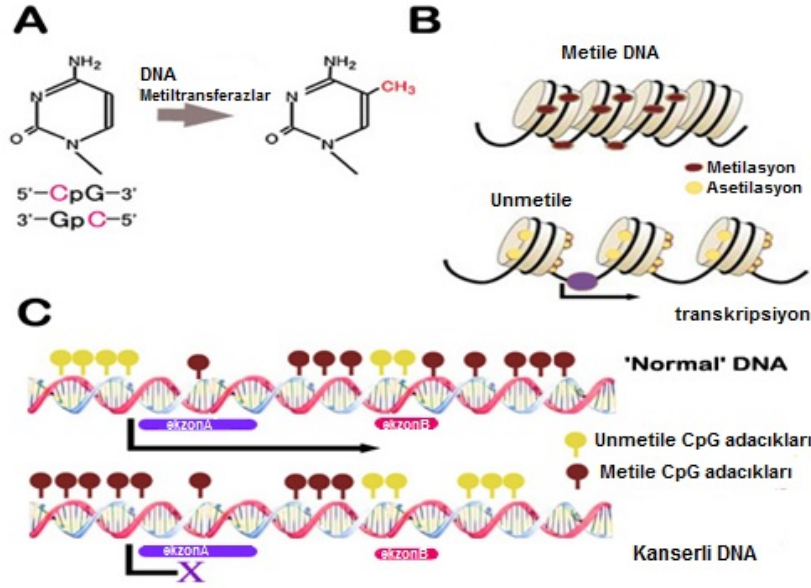
Metilasyonun kanser oluşumuna katkısı ilk olarak 5-metilsitozinin kanser oluşturma riskidir (119). Normalde DNA'da bulunan sitozin en sık görülen mutasyonlardan biri olan deaminasyonla urasile dönüşür. Bu RNA bazı olduğu için DNA tamir mekanizmaları ile tanınarak tamir edilir (119). Oysa metilsitozinin spontan deaminasyonu sonucu oluşan timin bir DNA bazıdır ve tamir mekanizmalarından kolayca kaçır.

Tümör baskılayıcı veya imprintinge uğrayan genlerin CpG adacıklarındaki hipermetilasyon genin farklı ifade bulmasına neden olur. Bu şekilde kanser oluşumuna katkıda bulunur (119).

DNA metilasyonu karsinojenlerin DNA'ya bağlanmasını arttırarak DNA'nın UV ışınlarını daha fazla absorbe etmesine neden olarak mutasyon hızını arttırır (119).

Promotor bölge hipermetilasyonu transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını önleyerek gende fonksiyon kaybına neden olurlar (119). Bunu direk ve indirek yolla yaparlar. Direk olarak metilsitozindeki metil grubu DNA'daki büyük oluğa çıkıntı yaparak bu bölgenin tanınmasını engeller. İndirek olarak ise metilsitozine bağlanan proteinler ile tanıma bölgesi maskelenir (119).

Ayrıca biyokimyasal bir mekanizma olarak 5-metilsitozinin polaritesinin yüksek olmasıyla RNA polimerazların daha yüksek enerjiyle transkripsiyon başlangıcına ulaştığı ve bunun gen ekspresyonunu engellediği de düşünülmektedir.



Şekil 2.5. Normal ve kanserli hücrede metilasyon (145) (kaynak 145'den değiştirilerek alınmıştır)

2.2.3. DNA Metilasyonunun Kanserdeki Önemi

Hücredeki promotor bölge hipermetilasyonu sonraki kuşaklara aktırılabilmesi ve mutasyon olmadan gen ifadesini değiştirebilmesi ile önemli bir olaydır. Kanserli dokuda metilasyon tümör tipine göre değişir. Metilasyon tümöre ve gene özgü bir olaydır.

Metilasyon değişiklikleri tümör oluşumunun erken evresinde olduğu için kanserin erken tanısında kullanılabilme potansiyeline sahiptir (19). Meme kanserinin erken tanısında da biomarker olarak DNA metilasyonunu önemli yeri vardır (25). Çünkü mutasyondan daha sıklıkla oluşan anormal DNA metilasyonu, gen ekspresyonundan bağımsız, kimyasal ve biyolojik olarak stabil tümör spesifik bir markırdır. Tümör dokusunda spesifik bir gende oluşan metilasyon genellikle kaybolmaz hatta zaman içinde ilerleme gösterebilir (77).

Metilasyon değişiklikleri primer tümörün dışında da tesbit edilebilir. Metilasyon analizi basit bir analizdir ve günümüzde birçok non-invaziv yöntemle incelenebilmektedir (140). Mesela kolorektal kanser için gaita, akciğer kanseri için balgam, prostat kanseri için idrar analizi yeterli olmaktadır.

Meme kanserinde de duktal lavaj, meme başı aspirasyon sıvısı ve ince iğne aspirasyon sıvısı gibi materyallerde metilasyon analizi yapılabilir (25). Bazı kanser hastalarının serumunda tümörden derive DNA bulunmaktadır (143). Serumda serbest DNA’da metilasyon analizleri de son yıllarda pekçok araştırmaya konu olmuştur.

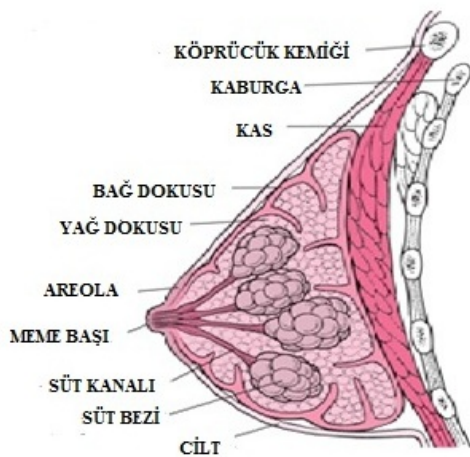
Mutasyonlar genin her bölgesinde meydana gelebilir, araştırılması daha kapsamlı çalışmalarla gerçekleşir. Metilasyon ise DNA’daki belirli dizilerde olması nedeniyle mutasyonlardan daha kolay saptanabilir.

Genetik değişikliklerin aksine epigenetik değişikliklerin geri dönüşümlü olması terapötik hedef olmasını da gündeme getirmiştir (19). Hücre kültürü kullanarak yapılan deneysel çalışmalarda demetile ajanların metilasyondan kaynaklanan gen sessizleşmesini geriye çevirdiği saptanmıştır (106, 124).

2.3.Meme

2.3.1. Meme Anatomisi

Meme, süt üretmek üzere düzenlenmiş modifiye bir apokrin ter bezidir. Özel bir kılıf veya kapsülü yoktur. Göğüs ön duvarındaki yüzeysel fasiya içinde yer alır ve 15-20 adet lobtan oluşmuştur. Lobların arasında fibröz bağ dokusu bulunur (27).



Şekil 2.6. Meme Anatomisi (49) (kaynak 49’den değiştirilerek alınmıştır)

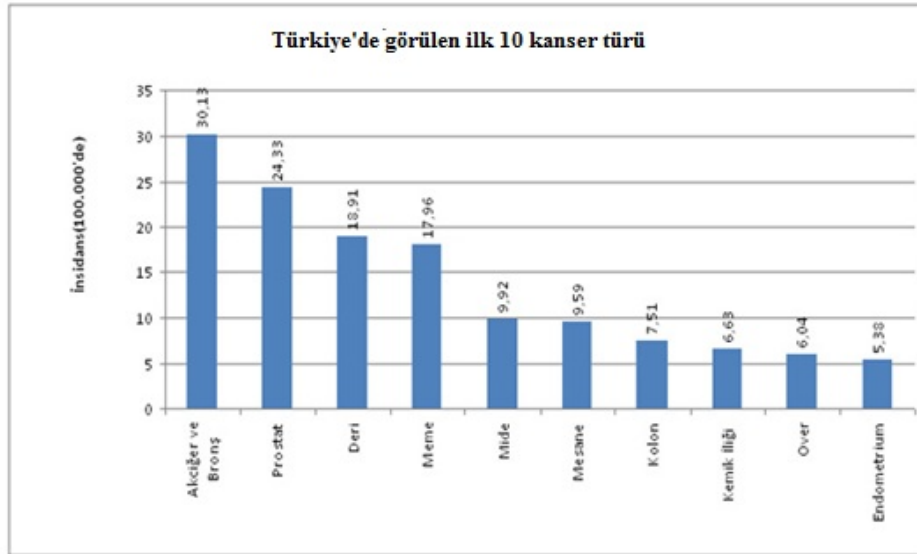
2.3.2. Meme Histolojisi

Meme dokusundaki loblar bileşik tübüloalveolar tip bezler içeren 15-25 adet lobülenden meydana gelmiştir. Her lobun yoğun bağ dokusu yanı sıra lobun kendine ait bir boşaltıcı kanalı vardır. Her duktus 2-4,5 cm. uzunluğundadır ve meme başından dışarıya açılır. Memenin histolojik yapısı cinsiyet, yaş ve fizyolojik durumuna göre farklılıklar gösterir (27).

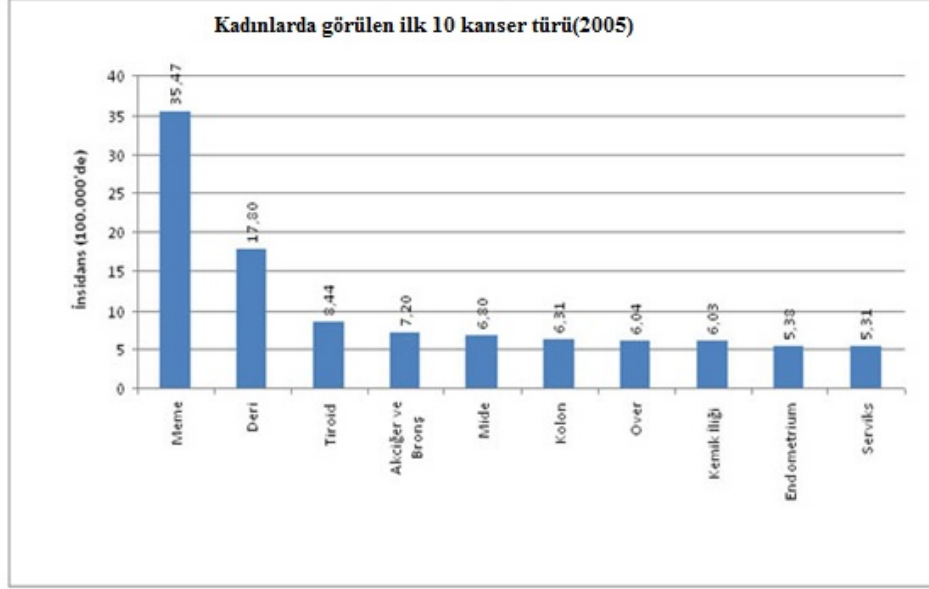
2.3.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitedir. Erkeklerde ise %1 oranında rastlanır. Meme kanseri 2002 yılında tüm dünyadaki kadın kanserlerinin %23'ünü teşkil etmiştir (78).

Tablo 2.1. KETEM Verilerine Göre Türkiye 2005 Kanser Verileri (48).



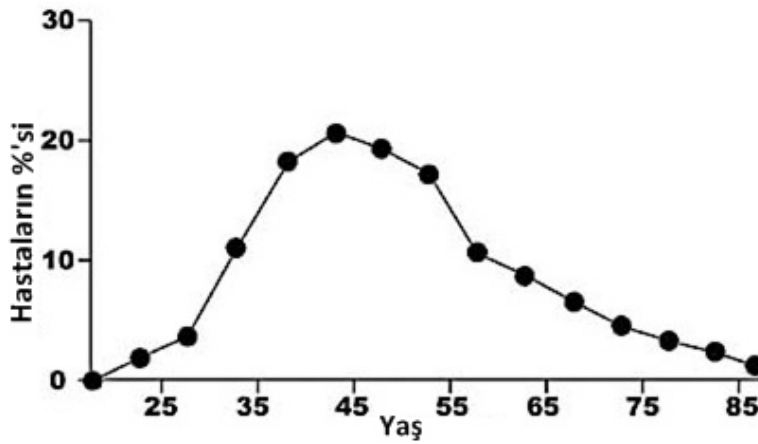
Tablo 2.2. KETEM Verilerine Göre Kadınlarda Görülen İlk 10 Kanser Türü (48).



2.3.4. Meme Kanseri Etyolojisi

Meme kanseri çevresel, genetik, hormonal, yaşam şekli gibi çeşitli faktörlerin etkileşimiyle oluşan kompleks bir hastalıktır. Genel popülasyonla karşılaştırıldığında kişilerin meme kanseri gelişme riskini arttıran pek çok risk faktörü tanımlanmıştır.

- **Yaş:** Meme kanseri gelişme insidansı yaşla birlikte artış gösterir (81).



Şekil 2.7. Meme Kanseri ve Yaş İlişkisi (81).(kaynak 81'den değiştirilerek alınmıştır.)

- **Coğrafi özellikler:** Meme kanseri insidansı ve mortalitesi heterojenik bir coğrafi dağılımı gösterir (78).
- **Aile öyküsü:** Meme kanserlerinin %5-10'u herediter özelliktedir.
- **Menarş ve menapoz yaşı:** Erken menarş ve geç menapoz özelliği gösteren kişilerde meme kanseri riski artmaktadır.
- **Parite:** Nulliparite ve ilk doğumun geç yaşta olması meme kanseri riskini artırır. İlk doğumunu 35 yaşından sonra yapanlarda risk en yüksektir (78).
- **Önceden geçirilmiş benign meme hastalıkları:** Fibroadenom, duktal papilloma, sklerozan adenozis gibi benign hastalıklar bu hastalığı olmayanlara göre 1,5-3 kez riski artırmaktadır (78).
- **Radyasyon:** İkinci Dünya Savaşında radyasyona maruz kalan adolesan devresindeki kızlarda ileride meme kanseri gelişme riski iki kat artmış bulunmuştur (78).
- **Hormon replasman tedavisi:** Östrojen ve progesteron kombinasyonu kullanan kişilerde meme kanseri riski bariz şekilde yüksektir (78).
- **Kilo:** Postmenapozal kadınlarda obezitenin meme kanseri riskini %50 arttırdığı gösterilmiştir. Kilo verme, ideal kilonun devamı ve uygun fiziksel aktivitelerin kadınlarda meme kanseri riskini yaklaşık %30 azalttığı belirlenmiştir (78).
- **Diyet:** Diyetle alınan yağ miktarı ile meme kanseri riski arasında bağlantı olduğu ifade edilse de kesin bir sonuç gösterilememiştir (81).

2.3.5. Meme Kanseri Genetiği

Meme kanseri gelişimi her adımda bir ya da daha fazla genin rol oynadığı çok adımlı bir süreç içinde oluşur. Kompleks bir hastalık olan meme kanserinin herediter ve sporadik formları vardır. Sporadik ve herediter meme kanseri etyopatogenezinde rol oynayan çeşitli genler vardır.

Herediter tip meme kanseri tüm meme kanseri olgularının %10'unu teşkil eder (72). Herediter tip meme kanserinden yatkınlık genleri olarak bilinen ve penetransı yüksek olan BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki germline mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır. Knudson'un Çift Vuruş hipotezine göre bu genlerin

ikinci allelinde oluşan mutasyonlar onkojenik başlangıcı oluşturmaktadır. Herediter tip meme kanserlerinin %80-90'ından BRCA1 ve BRCA2 genleri sorumludur.

Sporadik meme kanserinde ise germline mutasyonlar yoktur. Bu tip kanser sonradan oluşan ve düzeltilemeyen mutasyonların birikimi ile uzun bir süreçte meydana gelir.

Meme kanser gelişiminde rolü olduğu düşünülen bazı genler şunlardır:

- Onkogenler:

Farklı fonksiyonlarda ve hücrel lokalizasyonlarda bulunan pek çok onkogenin meme kanseri gelişmesinde rolü vardır (56). Sporadik meme kanserinde MYC, EMS1, CCND1, HER2/neu gibi onkogenlerde amplifikasyon sıklıkla görülür (56, 90).

- Tümör baskılayıcı genler:

17q12-21'de lokalize olan BReast-CAnCer susceptibilyity genel (BRCA1) 1994'te klonlanmıştır (83). BRCA1 proteini 1863 aminoasitten meydana gelmiştir ve proliferen olan hücrelerin çoğunda eksprese olur (107). Genomik instabilitenin sağlanmasında önemli rol oynayan bu gen çeşitli proteinler ile etkileşimde bulunarak DNA tamir, transkripsiyonel düzenleme, apoptoz gibi çeşitli hücrel olaylarda görev alır. Germline mutasyonları kalıtsal meme ve over kanserine yatkınlık sağlar. Ancak sporadik meme kanserinde mutasyonu nadirdir.

13q12-13 bölgesine lokalize olan BReast-CAnCer susceptibilyity gene 2 (BRCA2) geni de 385 kDa ağırlığında ve 3418 aminoasitten oluşan protein kodlayan büyük bir gendir (107). DNA tamir, hücre siklus kontrolü ve transkripsiyonda rol oynar (57). Sporadik meme kanserinde mutasyonu nadirdir. BRCA1 gibi kalıtsal meme kanserinden sorumlu tutulmaktadır. BRCA2 mutasyonu taşıyan ailelerdeki erkeklerde meme kanseri oluşma riski genel popülasyona göre 80 kez artmıştır (6).

Adezyon molekülü E-Cadherin'i kodlayan CDH1 gen mutasyonunun sporadik lobuler kanserde rol oynadığı öngörülmektedir (9).

Li Freumeni sendromu otozomal dominant geçişli nadir gözlenen bir hastalıktır. Hücre siklusunu ve DNA tamir mekanizmasında görev yapan TP53 geninin germline mutasyonu sonucu meme kanseri, beyin tümörü, yumuşak doku sarkomları, kemik sarkomu gibi değişik organları kapsayan maligniteler görülür (7, 36).

10q23'de lokalize olan Phosphatase and tensin homolog (PTEN) geni Cowden sendromunda mutasyona uğramıştır. Cowden sendromu dominant geçiş gösteren nadir bir sendromdur (41). Multipl benign hamartomoz lezyonların yanı sıra tiroid, meme, endometrium gibi organ kanserlerinde artış gözlenir.

- Steroid Reseptörler:

6q25.1'de bulunan Östrojen Reseptörü α (ER α) hormon bağımlı meme karsinogenezinde en önemli büyüme faktör reseptörüdür. Östrojenler direk DNA hasarına neden olarak tümör başlatıcı olarak davranır (71). Östrojen reseptörleri gen transkripsiyon aktivasyonuna yol açarak hem östrojen bağımlı hem östrojen bağımsız mekanizmalar ile gen ekspresyon düzenlenmesi yaparlar. Bu da hücre proliferasyonu ile sonuçlanır. ER α gen overekspresyonu meme kanserinin erken evrelerinde sıklıkla saptanır (43). ER β geninin meme kanserindeki rolü tam belli değildir.

- İnvazyon ve hücre adezyon genleri:

N-CAM, integrinler, E-Cadherin, uPA, cathepsinD, collagenaz I-IV, CD44, NME1 ve metalloproteazlar gibi genler bu kategoride yer alır (122).

- Anjiogenezis genleri:

Tümörün büyümesi ve ilerlemesi için yeni kan damarlarının oluşması gerekir. Stromadaki tümör hücreleri vascular endothelial growth factor (VEGF) ve fibroblast growth factor (FGF) ve platelet-derived growth factor (PDGF) gibi diğer anjiogenik faktörlerin artmasına katkıda bulunur (149).

2.3.6. Meme Kanserinin Patolojik Sınıflaması

Histopatolojik olarak meme tümörleri in situ ve invaziv kanserler olarak iki gruba ayrılır. In situ karsinomda malign hücreler bazal membranla çevrili duktus ve bez

yapısı içinde sınırlıdır (11). İnvaziv tip karsinomda ise neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya doğru infiltrasyon olmaktadır.

İnvaziv duktal karsinom invaziv meme kanserleri içinde %70-80 olmak üzere en sık görülen tiptir. Bunların %70-80'inde östrojen reseptörü, %60-70'inde progesteron reseptörü ve %15-30'unda HER2/neu gen reseptörü pozitif bulunur (11).

Tablo 2.3. Meme Kanseri Patolojik Sınıflaması (WHO) (1,11)

İn Situ Karsinom	İnvaziv Karsinom
	İnvaziv Duktal Karsinom
	İnvaziv Lobuler Karsinom
	Tubuler Karsinom
	İnvaziv Kribriform Karsinom
	Medüller Karsinom
	Müsinöz Karsinom
İn Situ Duktal Karsinom(DKIS)	İnvaziv Papiller Karsinom
İn Situ Lobuler Karsinom(LKIS)	İnvaziv Mikropapiller Karsinom
	Apokrin Karsinom
	Sekretuar Karsinom
	Adenoid Kistik Karsinom
	Metaplastik Karsinom
	Nöroendokrin Karsinom
	İnflamatuar Karsinom

İnvaziv lobuler meme kanseri ise tüm meme kanserlerinin %5-15'ini teşkil eder. Bilateral ve multifokalite olma özelliğine sahiptir (11). İnvaziv lobuler kanserlerin %70-95'i östrojen reseptörü, %60-70'i progesteron reseptörü yönünden pozitif bulunur. Bazı tipleri dışında HER2/neu gen reseptörü negatiftir (11).

2.3.7. Meme Kanserinde Evreleme

Meme kanseri hastalığın yayılma derecesine göre gruplara ayrılmasına 'Evreleme' denir. Evreleme, tedavi programını düzenlemede, prognozu saptamada ve farklı tedavi yöntemlerinin sonuçlarını karşılaştırmada önemli rol oynar (27).

Primer tümörün durumu: T (Tümör) harfine eklenen sayılarla belirtilir. Meme kanserinde T1, T2 ve T3 daha büyük tümörleri gösterir. T4 ise ne büyüklüğü fark etmeden tümörün direk toraks duvarına ya da deriye kadar ilerleyip bu yapıları tutmuş olduğunu gösterir. Lenf bezlerinde metastaz varken primer tümör olmadığında 'T0' olarak adlandırılır. Karsinoma in situ için 'Tis' kullanılır.

Lenf bezlerinin durumu: N (Node) harfine eklenen sayılarla belirtilir. N1 aynı tarafın aksillasında lenf bezleri tutulumu olduğunu, N2 birbirine ya da başka yapılara yapışmış lenf bezlerinin varlığını belirtir. N3 ise aynı tarafta mamma interna lenf bezlerinde lenf metastazı olduğunu gösterir.

Uzak metastaz durumu: M (Metastaz) harfine eklenen sayılarla belirtilir. M0 uzak metastazı yok, M1 ise uzak metastaz var demektir. Supraklavikular, servikal ve karşı taraftaki mamma interna lenf bezlerine metastaz da M1 sayılır.

TNM evrelemesinde beş evre bulunur:

Evre 0: Karsinoma in situ

Evre I: Lokalize karsinoma

EvreII: Sınırlı lokal yayılım veya sınırlı bölgesel lenf bezi metastazı

Evre III: Daha fazla lokal yayılım veya daha ileri lenf bezi metastazı

Evre IV: Uzak metastaz

2.3.8. Meme Kanserinin TNM Evrelemesi

Primer Tümör (T)

Tis→ Karsinoma in situ veya meme başının Paget hastalığı (memede tümör yok)

T1 →Tümörün çapı 2 cm veya daha küçük

T1a Tümörün çapı 0,5 cm ya da daha küçük

T1b Tümörün çapı 0,5 cm'den büyük,1 cm'den küçük

T1c Tümörün çapı 1 cm'den büyük, 2 cm'den küçük

T2→ Tümörün çapı 2-5 cm arasında

T3 →Tümörün çapı 3 cm'den büyük

T4 →Çapı ne olursa olsun toraks duvarına ya da meme derisine infiltre

T4a Toraks duvarına infiltre

T4b Meme derisinin ödemi ya da ülserasyonu veya aynı memede deri nodülleri

T4c Hem T4a hem T4b

T4d İnflamatuvar karsinoma

Rejional Lenf bezleri (N)

N0 →Rejional lenf bezi metastazı yok

N1 →Aynı tarafın aksillada mobil metastazlar

N2→ Aynı tarafın aksillasında biribirine ya da başka yapılara yapışık metastazlar

N3→ Aynı tarafın mammaria interna lenf bezlerine metastaz

Uzak Metastaz (M)

M0 → Uzak metastaz yok

M1 → Uzak metastaz var.(Aynı tarafın supraklavikuler lenf bezlerinde metastazı dahil

Tablo 2.4. Meme kanserinde AJCC (American Joint Comission on Cancer) Evreleme Sistemi (değiştirilerek alınmıştır) (22)

EVRELER	TÜMÖR BOYUTU	NOD DURUMU	METASTAZ
EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE 1	T1	N0	M0
EVRE 2A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
EVRE 2B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE 3A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
EVRE 3B	T4	N (HERHANGİ)	M0
	T (HERHANGİ)	N3	M0
EVRE 4	T (HERHANGİ)	N (HERHANGİ)	M1

2.3.9. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler

Meme karsinomlarında TNM dışında son 30 yıl içinde prognozu etkileyen birçok faktör saptanmıştır. Amerikan Patolojistlerinin 1999 yılında aldığı ortak raporunda meme karsinomunda prognostik faktörler şu şekilde kategorilere ayrılmıştır (32).

Kategori 1: TNM evre bilgileri

Histolojik grade

Histolojik tip

Mitoz sayısı

Hormon reseptör durumu

Kategori 2: HER2/neu geni

Proliferasyon markerları

Lenfatik ve kan damarı infiltrasyonu

Kategori 3: DNA ploidi analizi

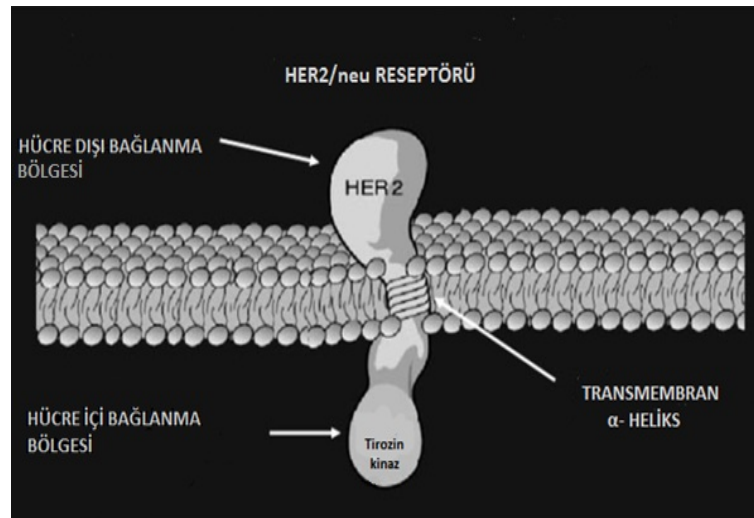
Tümör anjiogenezisi

2.4. Meme Kanserinde Rol Oynayan Genler

2.4.1. HER2/neu geni: (Human Epidermal Growth Receptor 2) insan epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin ikinci üyesidir (148). 17q12-21'de lokalize bir proto-onkogendir. 185 kD'luk transmembran glikoprotein kodlar (115). HER2/neu embriyogenez ve pubertede meme gelişiminde hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol alan önemli bir regülatördür (88). Epidermal büyüme faktör ailesinin üç önemli fonksiyonel domaini vardır.

- Hücre dışında sisteinden zengin ligandın bağlandığı kısım
- Lipofilik transmembran domain,
- Hücre içinde yer alan sitoplazmik tirozin kinaz domaini

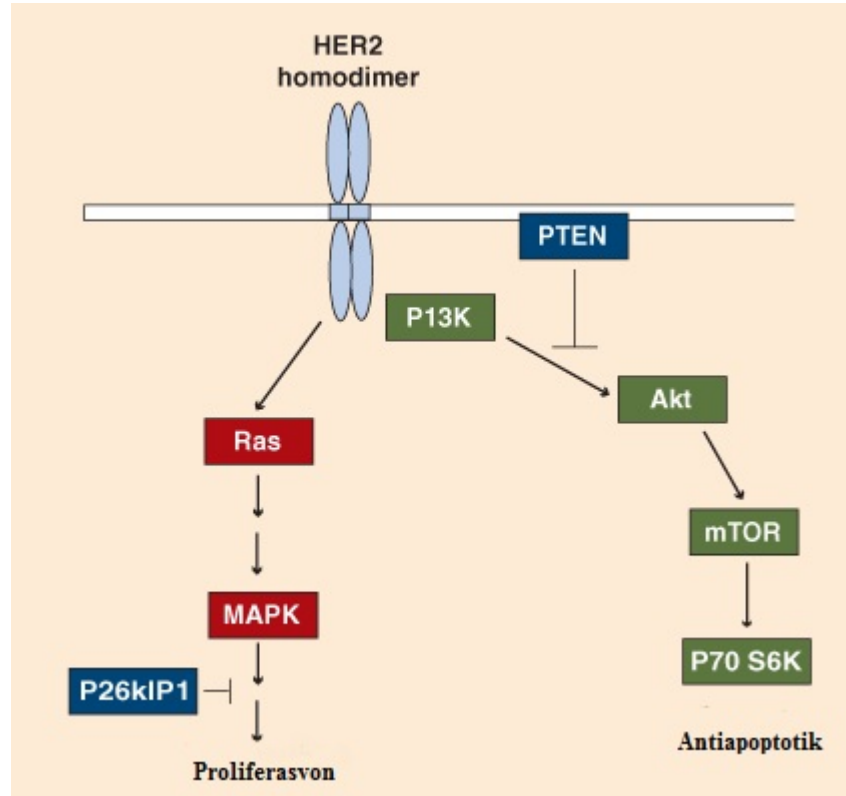
Ancak bugüne kadar HER2/neu için spesifik bir ligand saptanmamıştır (148).



Şekil 2.8 HER2/neu Gen Reseptörünün Şematik Şekli (114). (kaynak 114'den değiştirilerek alınmıştır)

HER2/neu geni fosfotidil inozitol 3-kinaz (PI3K) ve Mitojen Aktive edici Protein Kinaz (MAPK) kaskatını içeren birçok sinyal iletim yolağını aktive eder (89). MAPK (Ras/Raf-1/mitogen-activated protein kinase) yolağı proliferasyon, farklılaşma, yaşlanma ve apoptoz gibi pek çok hücrel olayı düzenler (61, 80). Bu yolağın aktivasyonu ve ekspresyonu kanserin başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynar. MAPK aktivasyonu memede östrojenin indüklediği proliferasyona katkıda bulunur.

Klinik çalışmalar HER2/neu ve/veya EGFR'nin overekspresyonu ve Akt veya ERK'in aşırı fosforillenmesinin bazı hastalarda tamoxifen direncinin gelişmesine yol açtığını desteklemektedir (40).



Şekil2.9 HER2/neu pozitif meme kanserlerinde hedef yolak mekanizması (86).(kaynak 86'dan değiştirilerek alınmıştır)

HER2/neu geni metastatik meme kanserlerinin %25-30'unda overeksprese olur (31, 42, 86, 88). HER2/neu gen amplifikasyonu meme karsinogenezinde erken oluşan bir olaydır. In situ karsinomlarının yaklaşık %50'inde meydana gelir (39). HER2/neu

overekspresyonu meme kanserinde yaşam süresinde kısalmayı ve kötü prognozu gösterir. Benign meme hastalıklarında tesbit edilmemiştir (148).

Klinikte HER2/neu inhibisyonunu sağlamak amacıyla HER2/neu genine direk bağlanabilen humanize antikolar ve küçük moleküllu tirozin kinaz inhibitörleri olarak iki önemli tip ajan kullanılır (31).

Trastuzumab (Herceptin™) Genentech (South San Francisco, Cav) tarafından rekombinant teknoloji kullanılarak geliştirilen humanize murin antikor sınıfından monoklonal IgG'dir (114). Spesifik olarak HER2/neu geninin ekstrasellüler kısmına bağlanır (114). Meme kanseri tedavisinde önemli yer tutar.

2.4.1.1. Kromozom 17

Anozomi 17 (polizomi veya monozomi) genetik instabilite göstergesidir ve meme kanserlerinin %90'dan fazlasında bulunur (95,109). Polizomi 17 kromozom 17 sentromerinin her hücre için ikiden fazla sayıda kopya bulunması olarak tanımlanabilir. Polizomi 17 meme kanserlerinde %13-46 gibi değişen oranlarda bulunur (135). HER2/neu gen amplifikasyonu olmadan polizomi 17 bulunması daima HER2/neu mRNA artışını göstermez (113).

2.4.1.2. ER- PR

Meme kanserlerinin yaklaşık %70'i ER ve/veya PR eksprese eder (79). ER ve/veya PR ekspresyonunun varlığı iyi klinik gidişle beraberdir (68). Antihormonal tedaviye cevap ve yaşam süresi ER(+) ve PR(+) tümörlerde en iyidir. Antihormonal tedavi meme kanserinde önemli yer tutar. Bu tedaviye karşı edinilmiş dirençte HER2/neu sinyal yolağındaki PI3K yolağında yer alan Akt aktivasyonun rolü bazı çalışmalarda belirlenmiştir (128).

2.4.2. TOP2A Geni:

Topoizomeraz II α enzimini kodlayan Topoizomeraz2A (TOP2A) geni 17q21'de lokalize olup genomda 27,5 kb yer tutar. 35 ekzona sahiptir ve 170 kDa'lık bir protein kodlar (92). TopoII α proteini normal ve kanserli hücrelerde hücre siklusu boyunca

değişik derecelerde eksprese olur (92,123). Ekspresyonu Ki-67 ile korelasyon gösterir (87, 92).

Topoizomerazlar DNA'nın tersiyer (üçüncül) yapısında değişiklikler oluşturan enzimlerdir. Bu işlevlerini DNA'daki süper dönümlerin tiplerini ve derecesini değiştirerek yaparlar (127). Katalitik aktivitelerine göre tip I ve II olarak ayrılır. Tip II topoizomerazlar DNA'da geçici kırıklar oluşturur (21).

TOP2A hızlı çoğalan hücrelerde daha fazla eksprese olur. Ekspresyonu hücre siklusunda S ve G2/M fazlarında gerçekleşir (131). Mitozun sonunda minimum seviyeye iner (21, 82).

TOP2A geni meme kanseri tedavisinde önemli yer tutan '*TopoII inhibitörleri*' olarak adlandırılan antrasiklin grubu ilaçların moleküler hedefidir. Antrasiklinler TOP2A kompleksini stabilize eder ve TOP2A'nın katalitik aktivitesini inhibe eder. (131). TopoII inhibitörlerinin sensitivitesi kanser hücrelerindeki topoII ekspresyon seviyesi ile koreledir (21).

HER2/neu geni hedef olmamasına rağmen Antrasiklin grubu ilaçlara sensitivite gösterir. Ancak bunun mekanizması henüz aydınlatılamamıştır (95). Bu durum, HER2/neu ve TOP2A genlerinin yakın lokalizasyonda bulunmaları ve pek çok meme kanseri olgusunda birlikte amplifiye olması ile açıklanabilir.

TOP2A gen amplifikasyonu tüm primer meme tümörlerinin yaklaşık %8'inde amplifiye bulunur. TOP2A geni HER2/neu gen amplifikasyonu gösteren meme tümörlerinin %25-40'ında amplifiye olurken HER2/neu amplifiye olmayan tümörlerde genellikle amplifiye bulunmaz (21, 52, 123). HER2/neu gen amplifikasyonu olmadan TOP2A gen amplifikasyonu düşük histopatolojik grade ve ER(+)'liği ile görülmektedir (150). TOP2A gen delesyonu ise HER2/neu gen amplifikasyonu olan tümörlerin %20'sinde bulunur. Diğer grupta olduğu gibi HER2/neu amplifiye olmayan vakalarda fazla bulunmaz (21).

TOP2A gen aberasyonu olan hastalarda tedavi protokolü olarak CMF ile CEF tedavisi karşılaştırıldığında CEF tedavisi alan hastalarda yaşam süresinde artış olmaktadır (93).

2.4.3. RASSF1A Geni

Ras-Associated domain family member 1(RASSF1A) geni RASSF süperaillesine mensup Ras efektör bir gendir (99). 3p21.3 bölgesine lokalize tümör baskılayıcı bir gendir. 7 ekzona sahiptir (1 α , 1 β , 2 $\alpha\beta$, 2 γ , 3, 4, 5, 6) (110). Genomda 11 000 bp'lik bir alanı kaplar (23). RASSF1A-RASSF1G olmak üzere alternatif splice ile oluşan yedi isoformu vardır (110).

RASSF1A geni hücre siklusunun düzenlenmesi, mikrotubul stabilizasyonu, sellüler adezyon, genomik instabilitenin sağlanması, apoptoz gibi önemli sellüler olaylarda rol alır (78). RASSF1A'nın interfazda mikrotubul ağı ile birlikte yer alır, mitozda ise iğ iplikçığı ve sentrozomda bulunur (110). RASSF1A tubuline bağlanır böylece mikrotubulleri stabilize eder (110). RASSF1A geni Ras-MAPK yolağının negatif düzenleyicisidir (99).

Deneysel çalışmalarda RASSF1A geni her iki allelinde knockout olan farelerde spontan olarak akciğer adenomu, meme adenokarsinomu ve lenfoma geliştiği görülmüştür (25).

Çeşitli çalışmalarda meme, prostat ve kolorektal kanser dahil pek çok malignitede aberan promotor metilasyonu ile RASSF1A geninin inaktive olduğu görülmüştür (78). RASSF1A metilasyonu meme kanserinde ideal bir kanser biyomarkeri olma potansiyeline sahiptir. Normal dokularda nadiren metile bulunması spesifitesini göstermektedir (25,78). İnvaziv meme kanserlerinde RASSF1A gen hipermetilasyon sıklığı %49-65 gibi yüksek oranlarda bulunur (13, 46). RASSF1A gen promotor metilasyonu meme kanserinin erken evrelerinde tarama yöntemi olarak kullanılabilir (25).

Lenf nodu metastazı olan meme kanserli hastalarda RASSF1A metilasyonu primer meme kanserli hastalardan daha sık görülmüştür ve hipermetilasyon kemik, beyin ve akciğer metastazlarında da bulunmaktadır (18).

2.4.4. APC Geni

Adenomatöz polypozis coli (APC) geni 5q21-22'de lokalize 15 ekzonlu bir tümör baskılayıcı genidir. Otozomal dominant germline mutasyonları bağırsakta sayısız poliple karakterize olan familyal adenomatöz polipozis (FAP) ile sonuçlanır (66).

APC geni proteini Wingless and INT-1 (WNT) sinyal yolağı iletiminde rol oynar (73). Hücre büyüme, gelişim, apoptoz, migrasyon ve sinyal iletimini regüle eder. APC gen inaktivasyonu B-catenin protein degradasyonunun bozulmasına yol açar. Sitoplazmada biriken serbest B-catenin nukleusa geçerek C-Myc, C-Jun, cyclin D1 gibi onkogenlerin anormal transkripsiyonuna yol açar (73).

APC gen mutasyonları ve değişik ekspresyon seviyeleri meme kanserinde sıklıkla gözlenir (54). Germline heterozigot mutant farelerde spontan olarak meme kanseri gelişir (35).

APC gen promotor metilasyonu kolorektal kanser, gastrik kanser, pankreas kanseri ve karaciğer kanseri gibi farklı neoplazmlarda saptanır (73). Meme kanserlerinde özellikle lobüler meme kanserinde APC gen promotor metilasyonu görülür (125). Meme kanserinde yöntem farklılığına bağlı olarak %28-53 oranında APC gen promotor metilasyonu saptanmıştır (133). Bu meme kanserinde kötü prognozla birlikte (146).

2.5. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği prob adı verilen tek zincirli DNA parçasının, genomun herhangi bir yerinde lokalize komplementeri olan hedef DNA veya RNA dizisine bağlanma (hibridize olma) ilkesine dayanır. Problar direkt florokromla işaretli veya indirekt olarak bir reporter molekülün bağlanması ile görüntülenir (3, 8).

FISH tekniği doku kesitlerindeki her hücrede, kromozomlarda veya interfaz nukleuslarında özgün DNA ve RNA dizilerinin morfolojik olarak gösterilmesini ve nükleik asitlerin doğal hücresel ortamlarında incelenmesini sağlayan, doku ve hücre yapısının bozulmadığı bir tekniktir.

Tablo 2.5. FISH Metodunun Kullanılma Alanları (8)

Tanı amaçlı	Araştırma amaçlı
Sayısal ve yapısal kromozom anomalileri	Tümör biyolojisi
Prenatal tanı	Gen haritalanması
Mikrodelesyon sendromları	Mayoz/mitoz tanımlanması
Kanser sitogenetiği	Gen ekspresyon analizi
Dokuda enfeksiyon ajanının tanısı	Somatik hücre hibrid analizi

Kanserin temel özelliği genomik instabilitedir. Bunlar, sayısal değişiklikler, delesyonlar, translokasyonlar, amplifikasyonlar gibi kromozomal anomalileri kapsar (33). Solid tümörlerde bu anomalilere sıklıkla rastlanır. Klasik sitogenetik yöntemlerle metafaz kromozomu eldesi zor hatta bazen imkansız olduğu için farklı yöntemlere başvurmak gerekebilir. FISH yönteminin interfaz hücrelerine de uygulanabilir olması kanser genetiğinde önemli bir konuma gelmesini sağlamıştır (8). FISH tekniği çeşitli tümörlerin interfaz nükleuslarında kromozomal aberasyonları ve gen kopya sayı belirlemek için uygulanan basit, hızlı ve güçlü bir tekniktir (3, 8). Özellikle tümör doku heterojenitesinin değerlendirilmesinde güvenilirliği en yüksek olan moleküler tekniktir.

2.6 . High Resolution Melting (HRM) Analizi

Yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi moleküler biyolojide çift dallı DNA molekülünde oluşan mutasyon, polimorfizm ve epigenetik gibi değişiklikleri ortaya koymak için kullanılan bir yöntemdir (47). Basit ve PCR metoduna dayalı bir yöntemdir. Maliyetin az olması, hızlı ve basit bir yöntem olması sebebiyle pek çok avantajı vardır. Uygulama alanları şunlardır:

- SNP genotipleme
- Mutasyon tarama
- Heterozigozite kaybı
- Metilasyon saptama
- DNA fingerprint
- DNA haritalaması

- Viral/Mikrobik ajan identifikasyonu
- Aday gen taraması

Yöntem uygulanırken standart PCR bileşenlerine ve çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan sinyal veren boyalara gereksinim vardır (85). Çünkü bu boyalar sayesinde DNA denatürasyonu takip edilmektedir. Artan sıcaklık ile çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılması ile floresan sinyal şiddeti azalma gösterir (111). Florometrik cihazlar sıcaklık artışına bağlı olarak değişen sinyal şiddetini görüntülemeye yarar (85). Yüksek çözünürlüklü erime'nin (HRM) gücü cihazın sıcaklık kontrolüne, sıcaklık ve floresan ölçümüne, floresan boyalara ve PCR ürününün saflığına bağlıdır (44, 85). Yüksek çözünürlük kapasitesi hassas ölçümü sağlar.

Yüksek çözünürlüklü erime analizinin diğer gen tarama yöntemlerine göre avantajları vardır. Yöntemin "kapalı tüp sistemi" olarak adlandırılmasının nedeni PCR tamamlanmasından sonra HRM 'in PCR ile aynı tüpte gerçekleşmesidir. Bu durum kısmi otomasyon sağlar. Ayrıca kontaminasyon riski ve analiz süresi azalır.

HRM veri eldesi ve analizi PCR işleminden sonra 10-15 dakika içinde gerçekleşir. Artan her 0,1-1,0 derece ile sıcaklığın yarattığı floresan şiddetini değiştirir. Veri eldesi ve analizi 2 sn.deki 0,1-1,0 derece sıcaklık artışına karşılık oluşan floresan sinyalin şiddetinin ölçümü ile elde edilir. Artan her 0,1°C için ölçüm alınabilir. Bu nedenle çözünürlük yüksek olmaktadır (67).

Yüksek çözünürlüklü erime analizinde çift zincirli DNA'yı tek zincirli DNA'dan floresan sinyal şiddetindeki değişimle ayırt etmemizi sağlayan imkan sağlayan boyalara gereksinim vardır (138). DNA denatürasyonunun doğru takibi için floresan sinyalin doğru ölçülmesi gerekir. Etidyum bromür, propidyum iyodit, DAPI ve hoechst gibi birinci nesil boyaların çoğu mutajenik ve karsinojeniktir. Bu nedenle SYBR gibi ikinci nesil boyalar ve son dönemlerde Eva Green, LC Green, SYTO9 gibi üçüncü nesil boyalar kullanılmaktadır.

2.6.1. Methylation Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) Analizi

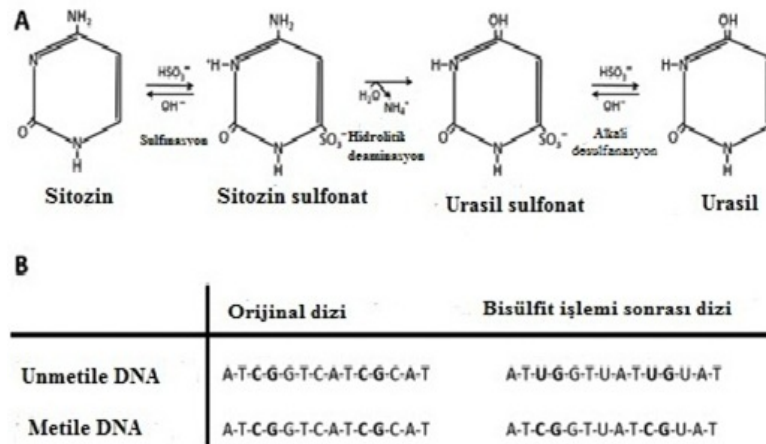
Methylation Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) analizi DNA'nın metilasyon durumunu saptamada kullanılan ve HRM'i temel alan bir metottur (147).

Spesifik, hassas ve basit bir metottur. MS-HRM analizi lokusa özgün DNA metilasyonunu saptamaya uygun bir yöntemdir (65).

Bu yöntem farklı DNA dizileri arasındaki metilasyon farkını ortaya çıkaracak oldukça yeni bir analiz yöntemidir. Bu yöntemde bisülfıt ile modifikasyonun sonrasında Real-time PCR cihazında yüksek çözünürlüklü erime görüntülenir. Bunun için geliştirilmiş yazılım kullanılır. Erime basamağında çift zincirli DNA tek zincirli DNA'ya denatüre olur ve boya tek zincirli DNA'dan ayrılarak floresan ışımaya durur. Floresanın azalması erime eğrisi olarak ölçülür ve kayıt edilir (142). Böylece metilasyon profili bilinmeyen örnekte metile ve unmetile alleller arasındaki Tm farklılıklarından faydalanarak DNA metilasyonu saptanmış olur (147). Metillenmiş DNA GC'den zengin olduğu için ısıya daha çok resistans gösterir ve daha yüksek ısılarda erime eğrisi verir.

2.6.2. Bisülfıt Modifikasyonu

Bisülfıt modifikasyonu genomdaki metile ve unmetile CpG adalarını saptamak için kullanılır. Bu işlem yüksek ısı ve düşük pH'da tek dallı DNA'nın sodyum bisülfıt ile muamele işlemine dayanır. Sitozinin bisülfıt ile reaksiyonu sonucu sitozin sülfonata, hidrolitik deaminasyonu ile urasil sülfonata ve alkali desülfonasyonu ile urasile dönüşür. Metile sitozinler ise değişime uğramadan kalır.



Şekil 2.10 Genomik DNA'nın bisülfıt ile modifikasyonu (64) (kaynak 64'den değiştirilerek alınmıştır)

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada ESOGU Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında Meme Kanseri tanısı almış ve Tıbbi Onkoloji Kliniğinde izlenen riskli gruba dahil 60 hastanın retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız Aralık 2010-Mayıs 2011 tarihleri arasında ESOGU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Sitogenetik ve Moleküler Laboratuvarlarında gerçekleşmiştir. HER2/neu, TOP2A ve CEP17 gen kopya sayısı değişiklikleri FISH yöntemi ile RASSF1A ve APC gen metilasyon durumları ise MS-HRM analizi ile değerlendirilmiştir.

3.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan gereçler ve kimyasal malzemeler aşağıda liste halinde verilmiştir.

3.1.1. Materyal seçimi

Yaptığımız çalışmaya ESOGU Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında meme kanseri tanısı alan ve Tıbbi Onkoloji Anabilim dalında izlenen riskli gruba dahil 60 olgu dahil edilmiştir. Çalışmamız retrospektif olup örnekler 2003-2008 yıllarında opere olmuş hastalara aittir. Olgulara ait örnekler mastektomi materyallerinden tümör dokusunu içeren parafinize doku kesitlerinden elde edilmiştir.

3.1.2. FISH Analizinde Kullanılan Gereçler

Bek	Ben Mari (Heto-DT Hetoterm)
Buzdolabı (Arçelik415)C	Cover slip(22x22mm,24x60mm)
Cam Kalem	Deep-Freeze (Heraeus)
Enjektör	Etüv (Friocell MMM Med Center)
Floresan mikroskop (Olympus BX-61)	Hot Plate
Floresan mikroskop (Nikon Eclipse 80i)	Kronometre
Image Analyser (Applied Imaging)	Mikropipet (Eppendorf)

Mikrosantrifuj (Eppendorf Centrifuge 5415)	Pipet Uçları
Rubber Sement	Sensys Kamera (Sensys)
Zaman Ayarlı Santrifuj(Heraeus)	Termometre
Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)	Su banyosu

3.1.3. FISH Analinde Kullanılan Cam Malzemeler

Beher (500 ml, 1000 ml)	Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)
Lam	Lamel
Mezur	Su banyosu
Yatay ve Dikey Şale	

3.1.4. FISH Analizinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Ethonol (Merck)
Distile Su
Immersion yağı (Merck)

3.1.5. FISH Analizine Kullanılan Problar

FISH analizinde HER2/TOP2A/CEN17 Triple Color Probe(gren/orange/blue) ZytoLight kiti kullanılmıştır. Kitin içeriği şöyledir:

- ZytoLight FISH LSI Probe (LSI HER2/TOP2A/CEN 17)
- PT1(Heat Pretreatment Solution Citric)
- ES1(Pepsin solusyon)
- WB1(Wash Buffer SSC)
- WB2(25xWash Buffer A)
- MT1(DAPI/Antifade-Solution)

3.2. MS-HRM Analizinde Kullanılan Gereçler

3.2.1. MS-HRM Analizinde Kullanılan Aletler

Pipet takımı (Gilson)

Buzdolabı (Arçelik)

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

0.2 ml'lik micro amplifikasyon strip tüpü ve kapakları

Light cyclers 480 Multiwell plate 96

Deep-freeze (Arçelik) Eppendorf Tüpü (1,5 ml'lik)

Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

LightCycler 480 real-time PCR(Roche)

Nanodrop 1000 (peqLab)

Vorteks (Heidolph)

0.2 ml'lik mikroamplifikasyon strip tüpü ve kapakları

3.2.2. MS-HRM Analizinde 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 (Epiect-QIAGEN)

RASSF1A Forward ve Reverse Primer Çifti (Metabion)

APC Forward ve Reverse Primer Çifti(Metabion)

Proteinaz K (QIAGEN)	Ksilol
Distile Su	%100' lük etil alkol
%70' lik etil alkol	Parafilm
PBS (phosphate buffered saline)	

3.2.3. MS-HRM Analizinde Kullanılan Primerler

Çalışmada RASSF1A ve APC genlerine ait primerler liyofilize halde ve 0,04 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınmıştır. Primerler PCR şartlarına uygun 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde steril distile su eklenerek çözülmüştür ve seksiyonlanarak eşit hacimler halinde kullanıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.1. RASSF1A Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler (15, 125)

Metile	Forward	5'-GTGTTAACGCGTTGCGTATC-3'
	Reverse	5'-AACCCCGCGAACTAAAAACGA-3'
Unmetile	Forward	5'-TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG-3'
	Reverse	5'-CAAACCCACAACTAAAAACAA-3'

3.2.3.2. APC Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler (29, 53, 73, 125)

Metile	Forward	5'-TATTGCGGAGTGCGGGTC-3'
	Reverse	5'-TCGACGAACTCCCGACGA-3'
Unmetile	Forward	5'-GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT-3'
	Reverse	5'-CCAATCACAACCTCCCAACAA-3'

3.3. Yöntemler

Çalışmamızda ESOGU Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından elde edilen 60 meme kanserli hastaya ait mastektomi materyalinden tümör dokusu içeren parafinize doku kesitleri incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen olguların seçimi yüksek riskli olarak kabul edilen tümör boyutu ≥ 2 cm. olan ve/veya lenf metastazı ve/veya uzak metastazı ve/veya yaşı 40 yaş altı olan primer meme kanserli hastalardır. Parafinize doku örneklerine FISH ve MS-HRM analizi uygulanmıştır. Hastaların klinik bilgileri, histopatolojik tanıları, ER, PR durumları ve yaşam süreleri hasta takip dosyalarından temin edilmiştir. Meme kanserli olguların doku örneklerinde HER2/neu, TOP2A ve kromozom 17 gen kopya sayısı FISH yöntemi, RASSF1A ve APC genlerinin promotor bölgelerindeki metilasyon durumları ise MS-HRM yöntemiyle incelenmiştir.

3.3.1. FISH Tekniğinin Uygulaması

FISH analizi için parafinize dokudan 4 μ 'luk kesit halinde hazırlanan preparatlar incelenmiştir. Kesitler uzman patolog tarafından değerlendirilmiş, tümör bölgesinden alınan ilk kesit HE ile boyanarak incelenmiş, >80 büyük tümör materyali içeren bölgeden takip eden kesitler genetik analizler için incelemeye alınmıştır. Örnekler inceleme aşamasına kadar -20°C derecede saklanmıştır. FISH işleminde Zytovision FISH problemlerine ait protokol uygulanmıştır. HER2/neu probu yeşil, TOP2A probu kırmızı ve sentromer 17 probu mavi işaretli olarak izlenmiştir.

3.3.1.1. Pretreatment Aşaması (Proteoliz)

Bu aşamada üretici firmanın önerdiği protokol modifiye edilerek uygulanmıştır.

- Preparatlar her biri 5 dakika olmak üzere sırasıyla % 100, %100, %90, %70'lik alkol serilerinden geçirildikten sonra 2x2 dakika distile sudan geçirilerek yıkanmıştır.
- Preparatlar önceden 98°C'ye ısıtılmış Heat Pretreatment Solusyon (PT1) konulmuş ve 15 dakika bekletilmiştir.
- Süre sonunda preparatlar 2x2 dakika distile suda yıkanmıştır.
- Bundan sonra preparatlara pepsin solusyonu (ES1) damlatılmış ve nemli bir ortam içerisinde 37 °C'lik etüvde 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

- Bunu takiben preparatlar oda ısısına getirilmiş Wash Buffer SSC(WB1) solusyonunda 5 dakika yıkanmıştır. Arkasından tekrar 1 dakika distile sudan geçirilmiştir.
- Süre sonunda preparatlar sırasıyla %70 ,%90 ve %100'lük alkol serilerinde 1 dakika bekletilerek dehidre edilmiştir. Havada kurumaya bırakılmıştır.

3.3.1.2. Prob Uygulanması (Hibridizasyon)

• -20°C 'de saklanan ZytoLight FISH probu tümör kesitinin olduğu bölgeye 5 µl uygulanmıştır.

- Hava kabarcığı oluşmasından kaçınılması için örneklerin üzeri (22mmx22mm) lamel ile kapatılmıştır. Hava almasını önlemek amacıyla lamel çevresi yapıştırıcı Rubber sement ile yalıtılmıştır.
- Preparatlar 75 °C'lik hotplate üzerinde 10 dakika bekletilerek prob ve hücre DNA denaturasyonları birlikte gerçekleştirilmiştir.
- Preparatlar 37 °C'lik etüvde nemli ortamda bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.3.1.3. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

- Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi küçük bir penset ile dikkatlice temizlenmiştir.
- Preparatlar, 37°C'lik 1xWash Buffer A içinde 1-3 dakika hafifçe çalkalanarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.
- Preparatlar 37° ye getirilmiş 1xWash Buffer A içinde 2x5 dakika yıkanmıştır.
- Daha sonra sırasıyla %70, %90, %100 alkol serilerinden 1 dakika geçirilmiştir.
- Işıktan uzak bir ortamda kurumaya bırakılmıştır.
- Her örnek üzerine mikro pipetle 15µ DAPI/Antifade solusyonu (MT1) konularak üzerleri (24mmx60mm) lamel ile kapatılmıştır.
- İnceleme aşamasına kadar -20 °C'de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

3.3.1.4. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Bu aşamada prob ve nukleus DNA'sının hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Preparatlar Nikon Eclipse 80i floresan mikroskobunda incelenmiştir. X10 büyütme ile incelenecek alan bulunduktan sonra X100 objektif kullanılmıştır. Mikroskobun ince ayarı kullanılarak netlik sağlanmıştır. Olympus BX-61 floresan mikroskobuna bağlı yazılım programı aracılığıyla (Applied Imaging) ile sinyaller değerlendirilmiş ve FISH sinyalleri içeren nukleuslar bilgisayar ortamında kaydedilmiştir.

3.3.1.5. Değerlendirme

Meme kanseri tanısı alan olgulara ait parafinize doku örneklerinden hazırlanan preparatlar FISH analizi sonrası incelemeye alınmıştır. Nukleus sınırları belirli olan ve güçlü sinyal veren hücreler değerlendirilmiştir. Her olguda en az 100 nukleus sayılmıştır. Sinyaller değerlendirilirken birbirine çok yakın ve üst üste gelmiş hücrelerdeki sinyaller değerlendirmeye alınmamıştır. HER2/neu geni yeşil, TOP2A geni kırmızı ve CEP17 mavi sinyal ile izlenmiştir

Değerlendirme yapılırken interfaz nukleusundaki;

HER2/neu:CEP17

TOP2A:CEP17

CEP17: toplam hücre sayısı oranları incelenmiştir.

HER2/neu ve TOP2A geni değerlendirmesi için Beşer ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışma referans alınmış ve sinyal sayıları;

HER2/neu: CEP17 ≥ 2 Amplifikasyon

TOP2A: CEP17 $\geq 1,5$ Amplifikasyon

TOP2A sinyal: CEP17 sinyal $< 0,8$ delesyon olarak kabul edilmiştir (10).

Kromozom 17 kopya sayısı için 2003 yılında Watters tarafından yayınlanan çalışma referans alınmış ve CEP17 sinyali: hücre sayısı = 1.61 ± 0.08 (normal doku kontrollü) değer dizomi olarak değerlendirilmiştir. Yine belirtilen kıstaslara göre monozomi ve polizomi saptanmıştır (137).

Çalışmamız FISH analiz bölümünde kullanılan değerlendirme kriterleri Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. HER2/neu, TOP2A geni ve CEP17 Değerlendirme Kriterleri (10, 137)

HER2/neu sinyal: CEP17 sinyal ≥ 2	AMPLİFİKASYON
TOP2A sinyal: CEP17 sinyal $\geq 1,5$	AMPLİFİKASYON
TOP2A sinyal: CEP17 sinyal $< 0,8$	DELESYON
CEP17 sinyal: hücre sayısı = 1,35-1,85	DİZOMİ
CEP17 sinyal: hücre sayısı $\leq 1,35$	MONOZOMİ
CEP17 sinyal : hücre sayısı $\geq 1,86$	POLİZOMİ

3.4. MS-HRM Analizinin Uygulanması

3.4.1. Parafinli Doku Örneklerinden DNA Elde Edilmesi

ESOGU Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından tümör dokusu içeren bölgeden alınan her olgu için 10μ 'luk toplam 10 parafinize kesit $1,5\text{ ml}$ 'lik tüpler içinde ESOGU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına ulaştırılmıştır. Bu kesitlerin alınımında da yine uzman patolog tarafından ilk kesit HE ile değerlendirilmiş ve $> \%80$ tümör olduğu belirlenmesi ile takip edilen kesitler genetik analizler için ependorf tüplere alınmıştır. Son kesit sonrası HE ile boyama ile alınan örneklerin tümör hücreleri açısından zengin olduğu kesinleştirilmiştir.

3.4.2. Deparafinizasyon İşlemi

- İçinde parafin bloğa sarılı dokular bulunan ependorflara $1200\ \mu\text{l}$ ksilol eklenmiştir.

- 15 sn vorteks yapılmıştır ve örnekler 14000 rpm'da 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'da 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılarak pelete 1200 µl %70'lik alkol eklenmiştir.
- 15 sn vorteks yapılmıştır ve örnekler 14000rpm'da 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 tamamlanması için bir tampon çözelti olan 160 µl PBS eklenmiştir.

3.4.3. DNA izolasyonu

Deparafinizasyon işleminden sonra doku örneklerinden DNA eldesi için robotik DNA izolasyon sistemi kullanılmıştır. Doku örnekleri doğrudan robotik DNA izolasyon sistemine (MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation KitI) yüklenmiştir. Örnek hacmi 1000 µl, elüsyon hacmi 100µl ve 'DNA doku' protokolü seçilmiştir. Örneklerin DNA izolasyonu üretici firmanın belirttiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri Nanodrop 1000 (peqLab)'da ölçümleri yapılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.4. Bisülfid Modifikasyon İşleminin Gerçekleştirilmesi

Bu metotta hedef DNA'nın sodyum bisülfid ile inkübasyonu ile unmetile olan sitozinler urasile dönüşürken metile sitozinler değişmeden kalır. İzole edilmiş doku

örneklerinin modifikasyon işlemi üretici firma protokolü ile yapılmıştır.(Epiect-QIAGEN)

- 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 1,5 ml'lik ependorfa alınmıştır
- Ependorfa 310 µl loading buffer (BL) eklenerek vorteks yapılmıştır ve 12000 rpm'da 1dk santrifüj edilmiştir
- Üzerine 250 µl %100'lük ethanol eklenerek vorteks yapılmıştır ve 12000 rpm'da 1 dk santrifüj edilmiştir
- Ependorftaki ürünün hepsi spin tüpüne alınarak 14000 rpm'da 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'da 1 dk santrifüj edilerek spin filtresinden alt tarafa süzülen sıvı dökülmüştür
- Spin tüpüne 500 µl Wash Buffer (BW) eklenmiştir
- 14000 rpm'da 1 dk santrifüj edilerek spin filtresinden alt tarafa süzülen sıvı dökülmüştür
- Aynı işlem bir defa daha gerçekleştirilerek spin tüpleri 2 µl'lik collection tüplere aktarılmıştır
- 14000 rpm'da 1 dk santrifüj edildikten sonra spin tüpleri ependorfa koyulmuştur
- Spin tüpündeki filtreye 35 µl Elution Buffer (EB) filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konularak 12000rpm'da 1 dk santrifüj edilmiştir ve aynı işlem bir kere daha tekrarlanmıştır.
- Modifikasyon ürünleri Nanodrop 1000(peqLab)'da ölçüm yapılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.5. MS-HRM Uygulanması

Modifikasyona tabi tutulan DNA'ların metilasyon analizi Light Cycler 480 real-time PCR cihazı ile yapılmıştır. Yüksek rezolusyonlu erime reaksiyonları için pozitif ve negatif kontroller ile PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri karşılaştırılmıştır.

Bisülfid işlemi sonrası elde edilen ürünlerden 10µl alınarak 96 'lık cihaz platine konulmuştur. Her plate sırasıyla;

10 µl Mastermix

3 µl Forward primer

3 µl Reverse primer

2,5 µl MgCl₂

1 µl H₂O konularak pipetaj yapılmıştır.

Örneklerin metilasyon yüzdelerini hesaplamak 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 bisüfit işleminden geçirilerek %100 metile, %75 metile, %50 metile, %25 metile ve %100 unmetile kontrol grupları hazırlanmıştır.

Toplam 60 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.

Tablo 3.2. Metilasyon yüzdelerini saptamak için kullanılan kontrollerin hesaplanması

%100 metile kontrol	10 µl %100 metile kontrol DNA
%75 metile kontrol	10µl %75 metile kontrol DNA (7,5 µl%100 metile kontrol DNA + 2,5µ %100 unmetile kontrol DNA)
% 50 metile kontrol	10µl %50 unmetile kontrol DNA (5µl %100 metile kontrol DNA + 5µl %100 unmetile kontrol DNA)
%25 metile kontrol	10µl %25 metile kontrol DNA (2,5 µl %100 metile kontrol DNA + 7,5µl %100 unmetile kontrol DNA)
%100 unmetile kontrol	10µl %100 unmetile kontrol DNA

3.4.6. Değerlendirme

Çalışma tamamlandıktan sonra öncelikle amplifikasyona girmeyen örnekler belirlenmiştir. Düşük floresan sinyali veren bu örneklerde erime eğrileri değerlendirilememiştir. Negatif olarak gruplandırılan bu örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. LightCycler 480 real-time PCR cihazında “Tm calling” programı ile kontrol grubunun erime sıcaklıkları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada metilasyon

değişimi olmayan kontrol grubu referans eğri olarak kullanılmıştır. Erime eğrileri benzer örnekler otomatik olarak aynı gruplara kümelendirilmiştir. Metilasyonu olan örnekler metile kontrol gruplarının yanında, unmetile örnekler ise unmetile kontrol grubunun yanında pik vermiştir. Örnekler aynı plate eklenen kontrol grupları %100 metile, %75 metile, %50 metile,%25 metile ve %100 unmetile olarak belirlenmiştir. Kontrol grupları ile hasta örneklerindeki pikler karşılaştırılarak RASSF1A ve APC genlerine ait metilasyon değişimleri tespit edilmiştir.

3.5. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonucunda elde edilen veriler Monte Carlo χ^2 ve Kolmogorov – Smirnov iki örnekleme testi ile değerlendirilmiştir. Olasılık değerleri:

* $p < 0.05$ önemli fark var

** $p < 0.01$ çok önemli farklılık var

*** $p < 0.001$ ileri düzeyde fark var şeklinde değerlendirilmiştir.

Olguların sağkalım süreleri ise Kaplan-Meier metodu (Logrank Testi) kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamız Aralık 2010- Mayıs 2011 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Sitogenetik ve Moleküler Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada riskli gruba dahil olan primer meme kanserli 60 olgu retrospektif olarak incelenmiştir. Kullanılan örnekler ESOGU Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan alınan meme kanserli hastaların mastektomi materyaline ait parafin blok kesitlerinden elde edilmiştir. Bu kesitlerde HER2/neu, TOP2A ve CEP 17 gen kopya sayısı değişiklikleri moleküler sitogenetik bir yöntem olan Fluoresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ile incelenmiştir.

Aynı hastalarda ait diğer doku kesitlerinde ise RASSF1A ve APC genlerine ait metilasyon durumu MS-HRM analizi ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızda olguların cinsiyet, yaş, histopatolojik tanı, grade, ER, PR durumu ile ilgili bilgiler hasta takip dosyalarından temin edilmiştir.

4.1. Çalışmadaki Olguların Demografik Özellikleri

Çalışma grubumuza dahil edilen olguların hepsi kadındır. Yaş aralığı 36-81 olarak değişmektedir Ortalama yaş 59,23 (\pm standart hata 1.40)

4.2. Çalışmadaki Olguların Özellikleri

4.2.1. Tümör Örneklerinin Grade'lere Göre Dağılımı

Tablo 4.1'de çalışmadaki tümör örneklerinin grade dağılımı görülmektedir.

Tablo 4.1. Tümör Örneklerinin Grade'e Göre Dağılımı

Grade	Sayı (%)
Bilinmeyen	18 (30)
Grade I	6 (10)
Grade II	23 (38.3)
Grade III	13 (21.7)
Toplam	60 (100.0)

4.2.2. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Dağılımı

Tablo 4.2’de çalışmadaki tümör örneklerinin histopatolojik tiplerine göre dağılımı görülmektedir.

Tablo 4.2. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Tiplere Göre Dağılımı

Histopatolojik Tip	Sayı	(%)
İnvaziv Duktal Karsinom	49	(81.7)
İnvaziv Lobuler Karsinom	5	(8.3)
Diğer	6	(10)
Toplam	60	(100.0)

4.2.3. Tümör Örneklerinin ER-PR Dağılımı

Tablo 4.3’de tümör örneklerinin ER dağılımı görülmektedir.

Tablo 4.3. Tümör Örneklerinin ER-PR Dağılımı

ER	Sayı	(%)
ER(-)	25	(41.7)
ER(+)	35	(58.3)
Toplam	60	(100.0)
PR	Sayı	(%)
PR(-)	29	(48.3)
PR(+)	31	(51.7)
Toplam	60	(100.0)

4.2.4. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Tip - Grade Dağılımı

Tablo 4.4’te tümörlerin histopatolojik tip- grade dağılımı görülmektedir.

Tablo 4.4. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Tip- Grade Dağılımı

Histopat.Tip	Bilinmeyen(%)	I (%)	II (%)	III (%)	Toplam	χ^2	P
İn. Duktal K.	11 (22.4)	5(10.4)	20(40.8)	13(26.4)	49	9.624	0.130
İn. Lob.K	3 (60.0)	0 (0)	2 (40.0)	0 (0)	5		
Diğer	4 (66.6)	1(16.7)	1 (16.7)	0 (0)	6		
Toplam	18	6	23	13	60		

Burada istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamakla birlikte invaziv duktal karsinomlu tümörlerde çoğunluğun grade II örneklerden oluştuğu görülmüştür.

4.2.5. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Tip ve ER –PR Dağılımı

Tablo 4.5’de tümörlerin histopatolojik tipleri ile ER-PR dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.5. Tümör Örneklerinde Histopatolojik Tip ve ER-PR Dağılımı

Histopat. Tip	ER(-) (%)	ER(+) (%)	Toplam	χ^2	p
İn. Duktal K.	22 (44.9)	27 (55.1)	49	1.348	0.547
İn. Lobuler K.	1 (20.0)	4 (80.0)	5		
Diğer	2 (33.3)	4 (66.7)	6		
Toplam	25 (100.0)	35 (100.0)	60		

Histopat. Tip	PR(-) (%)	PR(+) (%)	Toplam	χ^2	p
İn. Duktal K.	26 (53.1)	23 (46.9)	49	2.587	0.340
İn. Lobuler K.	1 (20.0)	4 (80.0)	5		
Diğer	2 (33.3)	4 (66.7)	6		
Toplam	29 (100.0)	31 (100.0)	60		

Çalışmada incelenen tümörlerin histopatolojik tiplerinde östrojen reseptörü pozitifliğinin daha yüksek oranda olduğu görülmektedir. En yüksek oran invaziv lobuler karsinomda görülmüştür. Fakat istatistiksel olarak önemli bir ilişkiyi göstermemektedir.

Çalışmada incelenen tümörlerin progesteron reseptör değerlendirilmesinde İnvaziv duktal karsinomlu örneklerde progesteron reseptörü negatifliğinin daha yüksek oranda olduğu, fakat invaziv lobuler karsinom ve diğer tiplerde progesteron reseptör pozitifliğinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç istatistiksel olarak önemli bir ilişkiyi göstermemektedir.

4.2.6. Tümör Örneklerinin Grade ve ER- PR Dağılımı

Tablo 4.6'da meme kanserli hastalarda grade ile ER-PR dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.6. Tümör Örneklerinde Grade ve ER-PR Dağılımı

Grade	ER(-) (%)	ER(+) (%)	Toplam	χ^2	p
Bilinmeyen	7 (38.9)	11 (61.1)	18	3.77	0.288
I	1 (16.7)	5 (83.3)	6		
II	9 (39.1)	14 (60.9)	23		
III	8 (61.5)	5 (38.5)	13		
Toplam	25 (100.0)	35 (100.0)	60		

Grade	PR(-)	PR(+)	Toplam	χ^2	p
Bilinmeyen	10(55.6)	8(44.4)	18	6.89	0.083
I	0(0)	6(100)	6		
II	11(47.8)	12(52.2)	23		
III	8(61.5)	5(38.5)	13		
Toplam	29 (100.0)	31 (100.0)	60		

Çalışma dahilindeki tümörlerde grade'i bilinmeyen, grade I ve grade II örneklerde östrojen reseptörü pozitif olarak gözlenmiştir. Grade III örneklerde ise östrojen reseptörü negatif olanlar çoğunluğu oluşturmuştur. Veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmadaki tümörlerin progesteron reseptör özelliği incelendiğinde grade I hastalarının tamamında progesteron reseptörü pozitif olarak bulunmuştur. Grade II vakalarında ise progesteron reseptörü pozitifliği çoğunluğu oluşturmuştur. Bilinmeyen ve grade III tümörlerde ise progesteron reseptörü negatifliği daha fazla saptanmıştır. Veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.3. Meme Kanserli Hastalarda HER2/neu, TOP2A Geni ve CEP17 Özelliklerinin Dağılımı

4.3.1. Tümör Örneklerinin CEP 17 Dağılımı

4.3.1.1. Tümör Örneklerinin CEP 17 ve Histopatolojik Tip Dağılımı

Tablo 4.7’de çalışma dahilindeki tümörlerde CEP17 ve histopatolojik tip dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.7. Tümör Örneklerinde CEP 17- Histopatolojik Tip Dağılımı

Histopat.	Monozomi(%)	Dizomi(%)	Polizomi(%)	Toplam	χ^2	p
İn.Duk.K.	8 (16.3)	29 (59.2)	12(24.5)	49	1.715	0.837
İn.Lob.K.	1 (20.0)	3 (60.0)	1 (20.0)	5		
Diğer	0 (0)	5 (83.3)	1 (16.7)	6		
Toplam	9 (100.0)	37 (100.0)	14(100.0)	60		

Çalışmada incelenen meme kanserli tümörlerin histopatolojik tiplerinde kromozom17 sentromer özelliklerinin dağılımı incelendiğinde tüm histopatolojik tiplerde dizomi çoğunluğu görülmüştür. Toplam 14 hastada polizomi saptanmıştır. Polizomi 12/14 (%85.7) vakada olmak üzere en çok invaziv duktal karsinomlu hastalarda görülmüştür.

4.3.1.2 Tümör Örneklerinin CEP 17 ve Grade Dağılımı

Tablo 4.8’de tümörlerde CEP17 ve grade dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.8. Tümör Örneklerinde CEP 17- Grade Dağılımı

Grade	Monozomi(%)	Dizomi(%)	Polizomi(%)	Toplam	χ^2	p
Bilinmeyen	4 (44.4)	11(29.7)	3 (21.4)	18	5.075	0.556
I	2 (22.3)	3 (8.2)	1 (7.1)	6		
II	3 (33.3)	14 (37.8)	6 (42.8)	23		
III	0 (0)	9 (24.3)	4 (28.5)	13		
Toplam	9 (100.0)	37 (100.0)	14 (100.0)	60		

Kromozom 17 sinyali temel alındığında incelenen tümör örneklerinde tabloda görüldüğü gibi 37/60 (%61.6) oranında dizomi saptanmıştır. Polizomi saptanan tümör örnekleri 14/60 (%23.3)'ini teşkil etmiştir. Bunların %28.5'i Grade III'te görülürken %42.8'i Grade III olgularda saptanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanmamıştır.

4.3.1.3. Tümör Örneklerinin CEP 17 ve ER-PR Durumu Dağılımı

Tablo 4.9'da meme kanserli hastalarda CEP17 ve ER-PR dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.9. Tümör Örneklerinde CEP 17 ve ER-PR Dağılımı

ER	Monozomi17(%)	Dizomi17(%)	Polizomi17(%)	Top.	χ^2	p
ER(-)	4 (44.4)	15 (40.5)	6 (42.9)	25	0.056	1.000
ER(+)	5 (55.6)	22 (59.5)	8 (57.1)	35		
Toplam	9 (100.0)	37 (100.0)	14 (100.0)	60		

PR	Monozomi17(%)	Dizomi17(%)	Polizomi17(%)	Top.	χ^2	p
PR(-)	4(44.4)	15 (40.5)	10 (71.4)	29	3.945	0.156
PR(+)	5(55.6)	22 (59.5)	4 (28.6)	31		
Toplam	9 (100.0)	37 (100.0)	14 (100.0)	60		

İncelemeye alınan meme kanserli tümör örneklerinde sentromer 17 özelliğine göre monozomi, dizomi ve polizomi saptanan örneklerin tümünde östrogen reseptörü pozitifliği ön planda izlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir.

Örneklerin progesteron reseptör durumuna göre incelenmesinde monozomi ve dizomi bulunan tümörlerde progesteron reseptörü pozitifliği daha fazla gözlenirken polizomi bulunan hastaların çoğunluğunda progesteron reseptörü negatif olarak bulunmuştur.

4.3.2. Tümör Örneklerinin HER2/neu Gen Dağılımı

4.3.2.1. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni ve Histopatolojik Tip Dağılımı

Tablo 4.10’da tümör örneklerinde HER2/neu genine ilişkin normal ve artmış kopya sayısı değişikliklerinin histopatolojik tipler arasındaki dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.10. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni Kopya Sayılarının Histopatolojik Tiplere Göre Dağılımı

Histopat. Tip	HER2/neu Geni Kopya Sayısı				T	χ^2	p
	Normal		Amplifikasyon				
	N	(%)	N	(%)			
İn. Duktal K.	34	(75.6)	15	(100.0)	49	4.490	0.095
İn. Lobuler K.	5	(11.1)	0	(0.0)	5		
Diğer	6	(13.3)	0	(0.0)	6		
Toplam	45	(100.0)	15	(100.0)	60		

Tablo 4.10’da görüldüğü gibi incelenen meme kanseri tümör örneklerinden özellikle invaziv duktal karsinom tipi tümörlerde HER2/neu geni kopya sayısı artışı

toplam 49 örneğin % 30.61' inde (N=15) gözlenmiştir. Sayıları az olmakla birlikte lobüler tip karsinomlarda ilgili gen amplifikasyonuna rastlanmamıştır.

4.3.2.2. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni ve Grade Dağılımı

Tablo 4.11'de çalışmaya dahil edilen tümör örneklerinin gradelerine göre gruplandırmalarında HER2/neu gen kopya sayılarının durumu özetlenmiştir

Tablo 4.11. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni - Grade Dağılımı

Grade	HER2/neu Geni Kopya Sayısı				Toplam	χ^2	p
	Normal		Amplifikasyon				
	N	%	N	%			
Bilinmeyen	16	(35.6)	2	(13.3)	18	18.126	0.001**
I	6	(13.3)	0	(0.0)	6		
II	19	(42.2)	4	(26.7)	23		
III	4	(8.9)	9	(60.0)	13		
Toplam	45	(100.0)	15	(100.0)	60		

Tablo 4.11'de görüldüğü gibi HER2/neu geni amplifikasyonu özellikle Grade III ileri evre tümörlerde yüksek oranda gözlenmiştir. Buna karşılık Grade II'e sahip olan 23 tümörün sadece 4 tanesinde ilgili gen amplifikasyonu saptanmıştır. Tabloda da açıkça görüldüğü gibi grade arttıkça gen amplifikasyon oranı da istatistiksel olarak çok anlamlı ($p \leq 0.001$) bir şekilde artmaktadır.

4.3.2.3. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni ve ER- PR Dağılımı

Tablo 4.12'de tümörlerdeki HER2/neu geni ve ER dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.12. Tümör Örneklerinde HER2/neu Geni ve ER-PR Dağılımı

ER	HER2/neu Geni Kopya Sayısı				T	χ^2	p
	Normal		Amplifikasyon				
	N	(%)	N	(%)			
ER(-)	16	(35.6)	9	(60)	25	2.766	0.096
ER(+)	29	(64.4)	6	(40)	35		
Toplam	45	(100.0)	15	(100.0)	60		

PR	HER2/neu Geni Kopya Sayısı				T	χ^2	p
	Normal		Amplifikasyon				
	N	(%)	N	(%)			
PR(-)	18	(40)	11	(73.3)	29	5.006	0.025*
PR(+)	27	(60)	4	(26.7)	31		
Toplam	45	(100.0)	15	(100.0)	60		

Tablo 4.12’de gösterilen HER2/neu gen kopya sayısı ile östrogen reseptörü incelemesinde HER2/neu geni kopya sayısı bakımından normal bulunan 45 örneğin %64.4’ünde östrogen reseptörü pozitif olarak değerlendirilmiştir. HER2/neu gen amplifikasyonu olan 15 örneğin çoğunluğunda (%60) ise östrogen reseptörü negatif olarak bulunmuştur.

HER2/neu gen kopya sayısı özelliğinin PR reseptör durumu ile bağlantısında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur. Çalışmada incelenen tümörlerde HER2/neu geni normal bulunan örneklerde progesteron reseptörü pozitifliği daha ön

planda izlenmiştir. HER2/neu gen amplifikasyonu olan örneklerde ise progesteron reseptörü negatifliği (%73.3) ön planda izlenmiştir.

4.3.2.4. Tümör Örneklerinin HER2/neu Geni ve CEP 17 Dağılımı

Tablo 4.13’de tümörlerdeki HER2/neu geni ve Kromozom 17 sentromer sinyal değişikliklerinin ilişkisi verilmiştir.

Tablo 4.13. Tümör Örneklerinde HER2/neu Geni ve Kromozom 17 Sentromer Sinyal Değişiklikleri Dağılımı

	HER2/neu Gen Kopya Sayısı				T	χ^2	p
	Normal		Amplifikasyon				
Kr.17	N	(%)	N	(%)			
Monozomi	8	(17.8)	1	(6.7)	9	1.102	0.697
Dizomi	27	(60.0)	10	(66.6)	37		
Polizomi	10	(22.2)	4	(26.7)	14		
Toplam	45	(100.0)	15	(100.0)	60		

Tablo 4.13’de görüldüğü gibi HER2/neu geni kopya sayısı ile kromozom 17 sentromer kopya sayısı değişiklikleri karşılaştırıldığında kromozom 17 sentromer kopya sayısı değişikliklerinin HER2/neu geni normal ve amplifiye örneklerde istatistiksel olarak bir ilişkisi olmadığı saptanmıştır.

4.3.3. Meme Kanserli Hastalarda TOP2A Gen Dağılımı

4.3.3.1. Tümör Örneklerinin TOP2A Geni ve Histopatolojik Tip Dağılımı

Tablo 4.14’te tümör örneklerinde TOP2A geni ve histopatolojik tip dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.14. Tümör Örneklerinde TOP2A Geni- Histopatolojik Tip Dağılımı

Histopat.Tip	TOP2AN(%)	TOP2AAmp(%)	TOP2ADel(%)	Toplam	χ^2	p
İn.Duk.Kar.	32 (76.2)	13 (92.9)	4 (100)	49	3.343	0.534
İn.Lob.Kar.	5 (11.9)	0 (0)	0 (0)	5		
Diğer	5 (11.9)	1 (7.1)	0 (0)	6		
Toplam	42 (100.0)	14 (100.0)	4 (100.0)	60		

Meme kanserli tümörlerinin TOP2A gen kopya sayısı analizinde normal kopya sayısı ve amplifikasyon saptanan tümör örneklerinin çoğunluğunu invaziv duktal karsinom olgularının oluşturduğu saptanmıştır. TOP2A gen delesyonu saptanan tümörlerin tamamını invaziv duktal karsinom oluşturmuştur.

4.3.3.2. Tümör Örneklerinin TOP2A Geni ve Grade Dağılımı

Tablo 4.15’de tümör örneklerinde TOP2A geni ve grade dağılımı verilmiştir

Tablo 4.15. Tümör Örneklerinde TOP2A Geni - Grade Dağılımı

Grade	TOP2AN	TOP2AAmp.	TOP2ADel.	Toplam	χ^2	p
Bilinmeyen	11 (26.2)	5 (35.7)	2 (50)	18	9.677	0.139
I	6 (14.3)	0 (0)	0 (0)	6		
II	19 (45.2)	4 (28.6)	0 (0)	23		
III	6 (14.3)	5 (35.7)	2 (50)	13		
Toplam	42 (100.0)	14 (100.0)	4 (100.0)	60		

İnceleye aldığımız tümör örneklerinde TOP2A gen kopya sayısı normal bulunan tümörlerin çoğunluğunun grade II örneklerden oluştuğu görülmüştür.

4.3.3.3. Tümör Örneklerinin TOP2A Geni ve ER-PR Dağılımı

Tablo 4.16’da tümör örneklerinde TOP2A geni ve ER dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.16. Tümör Örneklerinde TOP2A Geni ve ER-PR Dağılımı

	TOP2AN(%)	TOP2AAmp(%)	TOP2ADel.(%)	Toplam	χ^2	p
ER (-)	17 (40.5)	5 (35.7)	3 (75)	25	2.057	0.494
ER (+)	25 (59.5)	9 (64.3)	1 (25)	35		
Toplam	42 (100.09)	14 (100.0)	4 (100.0)	60		

	TOP2AN(%)	TOP2AAmp.(%)	TOP2ADel.(%)	Toplam	χ^2	p
PR (-)	18 (42.9)	7 (50)	4 (100)	29	4.796	0.091
PR (+)	24 (57.1)	7 (50)	0 (0)	31		
Toplam	42 (100.0)	14 (100.0)	4 (100.0)	60		

Tablo 4.16’da gösterildiği gibi çalışmada incelenen tümörlerde TOP2A geni normal ve amplifikasyonlu bulunan örneklerde östrojen reseptörü pozitifliği daha fazla gözlenmiştir. TOP2A gen delesyonu olan örneklerde ise östrojen reseptörü negatifliği fazlalığı saptanmıştır.

TOP2A geni kopya sayısı ile progesteron reseptörü karşılaştırıldığında TOP2A geni normal ve amplifiye bulunan örneklerde progesteron reseptörü açısından bir farklılık görülmemiştir. TOP2A geninde delesyonu olan örneklerin tümünün progesteron reseptörü yönünden negatif olduğu gözlenmiştir. Veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.3.3.4. Tümör Örneklerinin HER2/neu ve TOP2A Gen Dağılımı

Tablo 4.17’de tümör örneklerinde HER2/neu ve TOP2A gen dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.17. Tümör Örneklerinde HER2/neu ve TOP2A Gen Dağılımı

TOP2A Geni	HER2/neu Geni Kopya Sayısı				T	χ^2	p
	Normal		Amplifikasyon				
	N	(%)	N	(%)			
TOP2A N	37	(82.3)	5	(33.3)	42	12.889	0.004*
TOP2A Amp.	6	(13.3)	8	(53.4)	14		
TOP2A Del.	2	(4.4)	2	(13.3)	4		
Toplam	45	(100.0)	15	(100.0)	60		

HER2/neu ve TOP2A genleri arasındaki bağlantı değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Toplam 37/60(%61.6) hasta HER2/neu ve TOP2A geni yönünden normal bulunmuştur. HER2/neu geni normal olan hastalarda 8/45 (%17.7) TOP2A gen düzensizliği saptanmıştır. HER2/neu gen amplifikasyonu olan 15 hastanın 8/15 'inde (%53.4) TOP2A gen amplifikasyonu, 2/15'inde (%13.3) TOP2A gen delesyonu olmak üzere %66.7 oranında TOP2A gen aberasyonu saptanmıştır.

4.3.3.5. Tümör Örneklerinin TOP2A Geni ve CEP 17 Dağılımı

Tablo 4.18'de TOP2A geni ve CEP 17 dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.18. Tümör Örneklerinde TOP2AGeni- CEP 17 Dağılımı

	TOP2AN(%)	TOP2AAmp.(%)	TOP2ADel.(%)	Top.	χ^2	p
Monozomi 17	7 (16.7)	1 (7.1)	1 (25)	9	2.357	0.714
Dizomi 17	27 (64.3)	8 (57.1)	2 (50)	37		
Polizomi 17	8 (19)	5 (35.7)	1 (25)	14		
Toplam	42 (100.0)	14 (100.0)	4 (100.0)	60		

Tablo 4.18’de görüldüğü gibi TOP2A gen kopya sayısı ile sentromer sinyal sayısı değerlendirilmesinde TOP2A geni normal, amplifikasyonlu ve delesyonlu olan tümörlerin çoğunluğunda dizomi saptanmıştır. TOP2A gen amplifikasyonu olan 5/14 (%35.7) hastada polizomi saptanmıştır.

4.3.3.6. Tümör Örneklerinde HER2/neu, TOP2A Genleri ve CEP 17 Dağılımı

Tablo 4.19’da HER2/neu, TOP2A geni ve CEP17 dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.19. Tümör Örneklerinde HER2/neu, TOP2A Genleri ve CEP 17 Dağılımı

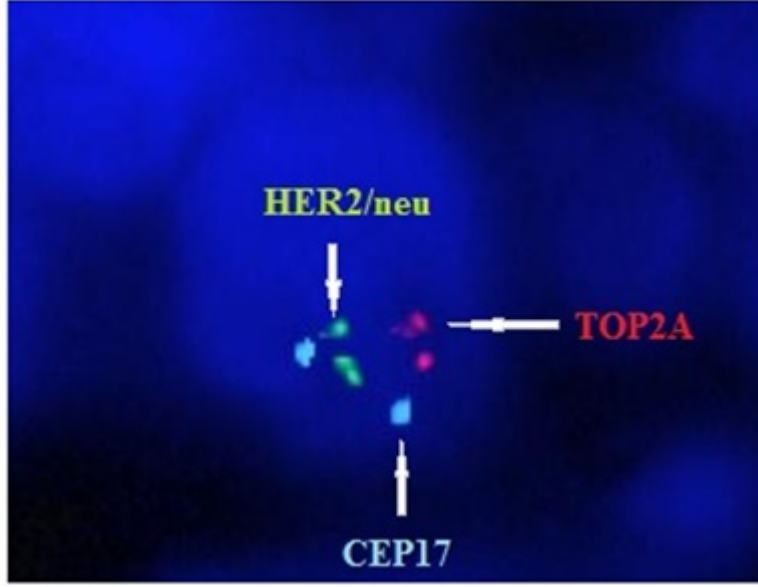
HER2/neu	TOP2A	Monozomi(%)	Dizomi(%)	Polizomi(%)	χ^2	P
Amp.	Amp.	0 (0)	5 (50.0)	3(75.0)	7.706	0.155
	Del.	1 (100.0)	1 (10.0)	0 (0)		
	Normal	0 (0)	4 (40.0)	1 (25.0)		
Toplam		1(100.0)	10 (100.0)	4 (100.0)		
Normal	Amp.	1 (12.5)	3 (11.1)	2 (20.0)	1.758	0.895
	Del.	0 (0)	1(3.7)	1(10)		
	Normal	7 (87.5)	23(85.2)	7 (70.0)		
Toplam		8 (100.0)	27 (100.0)	10 (100.0)		

Çalışmamızda yer alan 60 tümör dokusunun HER2/neu, TOP2A genleri ve kromozom 17 sentromerine ait kopya sayısı değişiklikleri FISH analizi ile incelenmiştir. Polizomi 17 saptanan 3/14’ünde (%21.4) HER2/neu ve TOP2A gen amplifikasyonu birlikteliği bulunmaktaydı. HER2/neu gen amplifikasyonu ile birlikte TOP2A gen delesyonu olan vakalarda ise polizomi hiç görülmemiştir.

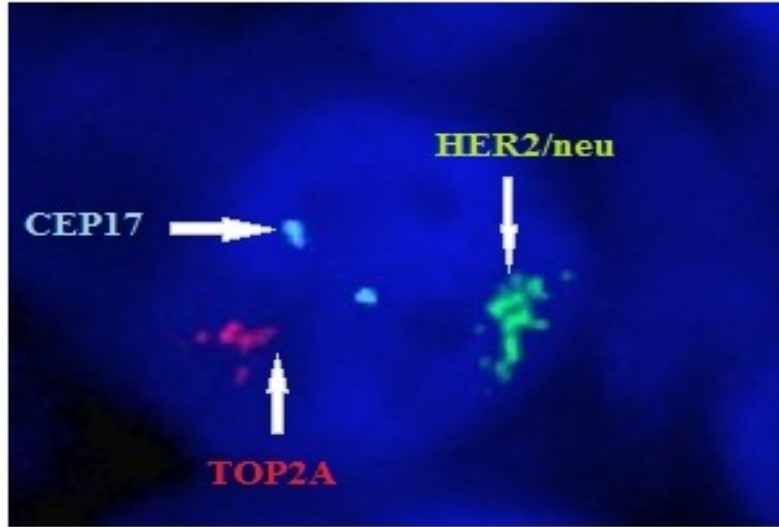
HER2/neu ve TOP2A geni normal olan toplam 37 örnekte ise 23/37 (% 62.1) oranla dizomi izlenmiştir.

Polizomi bulunan toplam 14 vakanın 7’sinde (%50) hem HER2/neu hem de TOP2A geni normal bulunmuştur. HER2/neu ve TOP2A geninin birlikte amplifiye bulunduğu olgularda ise 3/14 (% 21.4) polizomi saptanmıştır.

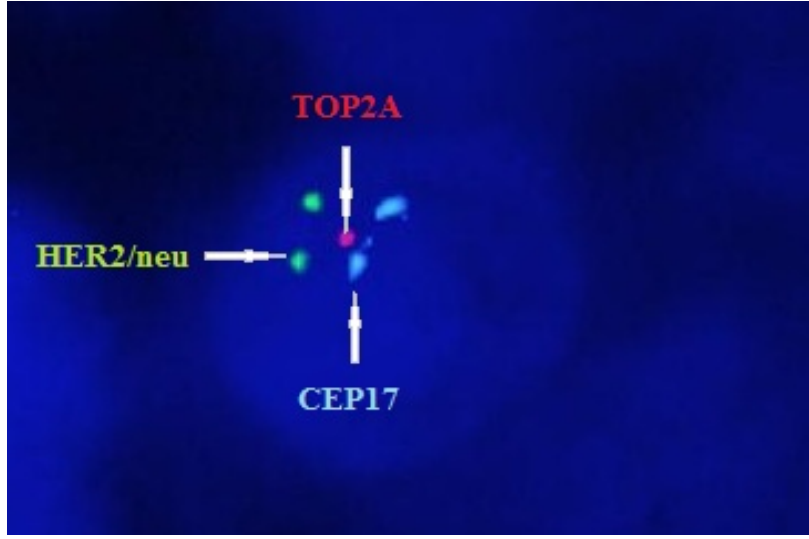
4.4. Tümör Örneklerinde HER2/neu, TOP2A Genleri ve CEP 17'e Ait FISH Analiz Görüntüleri



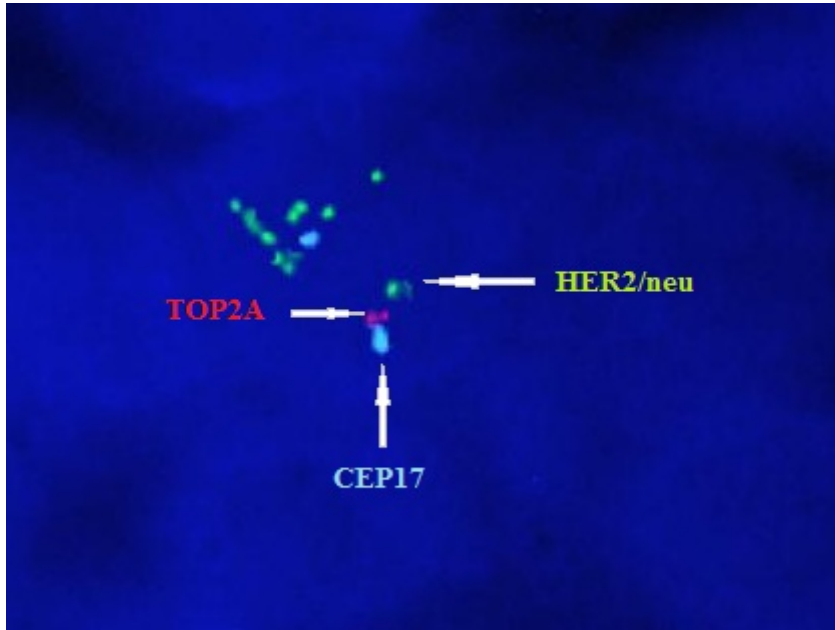
Şekil 4.1 HER2/neu-TOP2A genleri ve CEP17 normal bulunan olguya ait görüntü



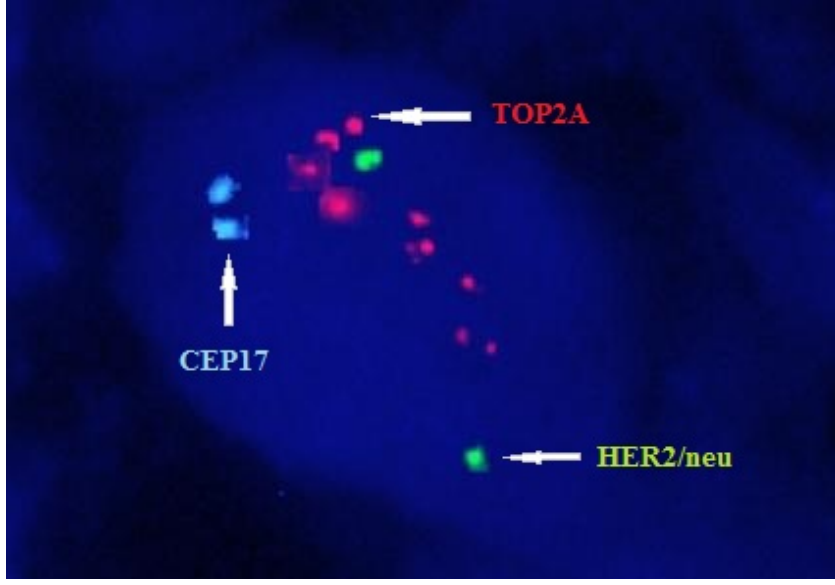
Şekil 4.2 HER2/neu-TOP2A gen amplifikasyonu olan olguya ait görüntü



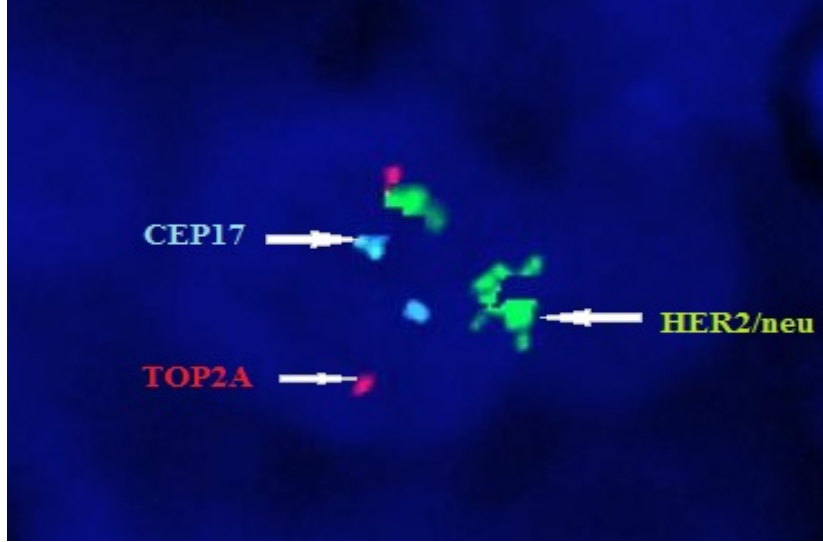
Şekil 4.3 HER2/neu geni normal ve TOP2A geni delesyonlu olguya ait görüntü



Şekil 4.4 HER2/neu geni amplifiye ve TOP2A geni delesyonlu olguya ait görüntü



Şekil 4.5 HER2/neu geni normal ve TOP2A gen amplifikasyonu olan olguya ait görüntü



Şekil 4.6 HER2/neu gen amplifikasyonu ve TOP2A geni normal olan olguya ait görüntü

4.5. HER2/neu-TOP2A Genleri ve CEP 17 için Yaşam analizi

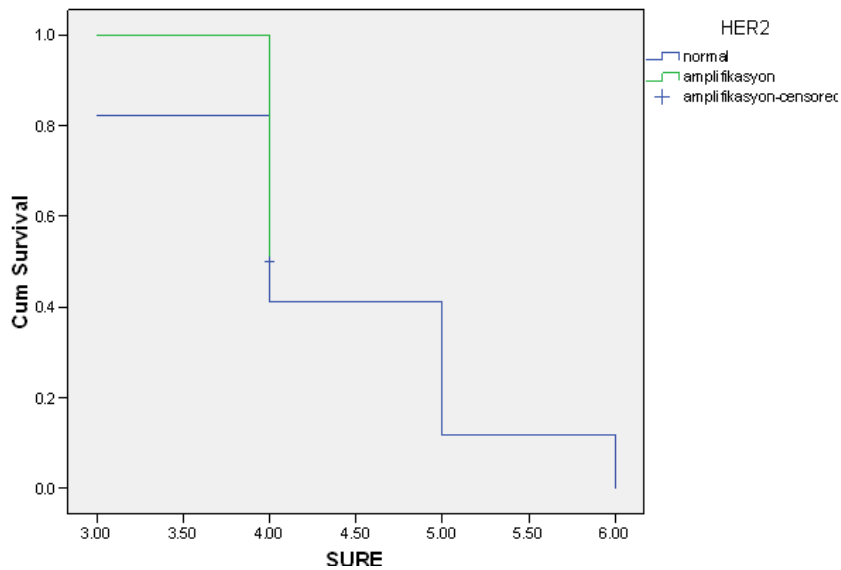
Toplam 60 hastamızın 19'u takipli ve halen yaşayan hastadır. Yaşayan tüm hastalara FAC (flurourasil+adriamisin+siklofosfamid) veya FEC (flurourasil+epirubisin+siklofosfamid) tedavi protokolü uygulanmıştır. Bu hastaların tanıdan sonraki yaşam süreleri 3-6 yıl arasında değişmektedir. Bu hastaların gen durumuna göre yaşam sürelerini değerlendirmek için Kaplan-Meier Yaşam Analizi ve Logrank testi uygulanmıştır.

4.5.1. HER2/neu Geni için Yaşam Analizi

Takipli ve yaşayan 19 hastadaki HER2/neu gen durumu değerlendirildiğinde HER2/neu geni kopya sayısı normal olan 17/19 hasta bulunmaktadır. HER2/neu geni kopya sayısı normal bulunan hastalarda 4.yılda yaşama olasılığı: 0,82 bulunmuştur. HER2/neu geni amplifikasyonu saptanan 2 hastada 4.yılda yaşama olasılığı 0,50 bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. HER2/neu geni ile ilgili sağ kalım sürelerinin yığılım tablosu Tablo 4.20'de verilmiştir.

Logrank=0,139 p=0,709 (yaşam sürelerinde fark yok)

Tablo 4.20. HER2/neu Geni ile İlgili Sağ Kalım Sürelerinin Yığılım Tablosu



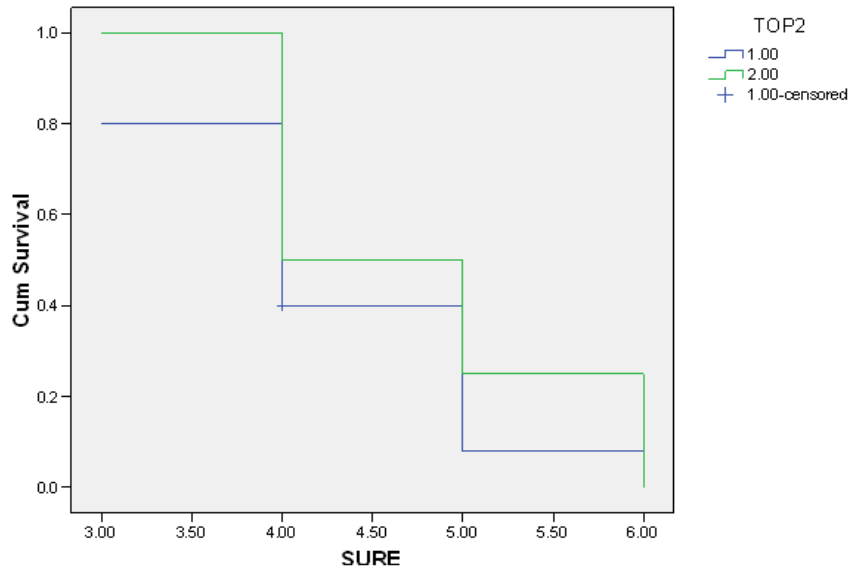
4.5.2. TOP2A Geni için Yaşam Analizi

Takipli ve yaşayan 19 hastadaki TOP2A gen durumu incelendiğinde

TOP2A geni normal olan normal olan 15 hastanın bulunduğu saptanmıştır. TOP2A geni normal vakalarda 3.yılda yaşama olasılığı 0,80 bulunmuştur. TOP2A gen amplifikasyonu olan 4 hastada 3.yılda yaşam olasılığı 0,25 bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Tablo 4.21’de TOP2A gen durumu ile ilgili sağkalım sürelerinin yığılım tablosu gösterilmiştir.

Logrank=0,710 p=0,399 (yaşam sürelerinde fark yok)

Tablo 4.21. TOP2A Geni ile İlgili Sağkalım Sürelerinin Yığılım Tablosu



4.5.3. CEP 17 için Yaşam Analizi

Çalışmada incelen hastaların sentromer 17 durumu değerlendirildiğinde takipli ve yaşayan 19 hastadaki bulgular;

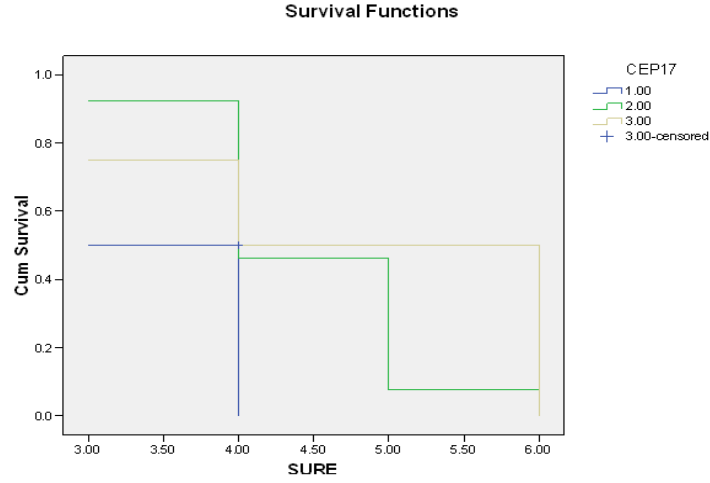
Monozomisi olan 2 hastada 3.yılda yaşama olasılığı 0,50

Dizomisi olan 13 hastada 3.yılda yaşama olasılığı 0,923

Polizomisi olan 4 hastada 3.yılda yaşama olasılığı 0,75 bulunmuştur. Bulunan bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. CEP17 ile ilgili sağkalım sürelerinin yığılım tablosu tablo 4.22’de gösterilmiştir.

Logrank=2,044 p=0,153(yaşam sürelerinde fark yok)

Tablo 4.22. CEP17 ile İlgili Sağkalım Sürelerinin Yığılım Tablosu



4.6. Tümör Örneklerinde RASSF1A ve APC Genlerinin Metilasyon Dağılımı

Çalışma tamamlandıktan sonra 60 hastaya ait örneklerin RASSF1A-APC gen promotor metilasyonu MS-HRM yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmada örnekler Real-time PCR sistemine (LightCycler480 Roche) yüklenmiştir. RASSF1A-APC genlerinin metilasyon incelemesinde amplifikasyona girmeyen örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. Reaksiyon sonrasında 'Tm Calling', 'Gene Scanning' ve 'Difference Plot' yazılım programları karşılaştırarak incelenmiştir. Her üç programda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

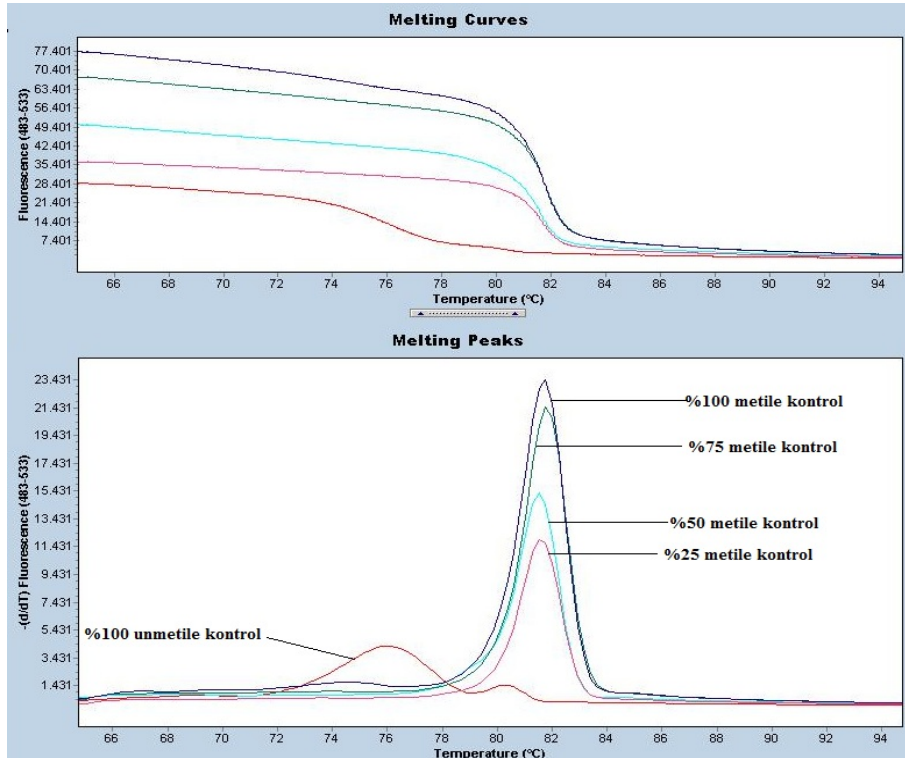
Bulguların sunumunda 'Tm calling' verileri esas alınmıştır. Olgulara ilişkin PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri metile ve unmetile kontrol PCR ürünlerinin erime

sıcaklık eğrileri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen hasta DNA'larına ait erime eğrileri kontrol örneklerinin erime eğrileri ile karşılaştırılarak her örneğin metilasyon paterni belirlenmiştir.

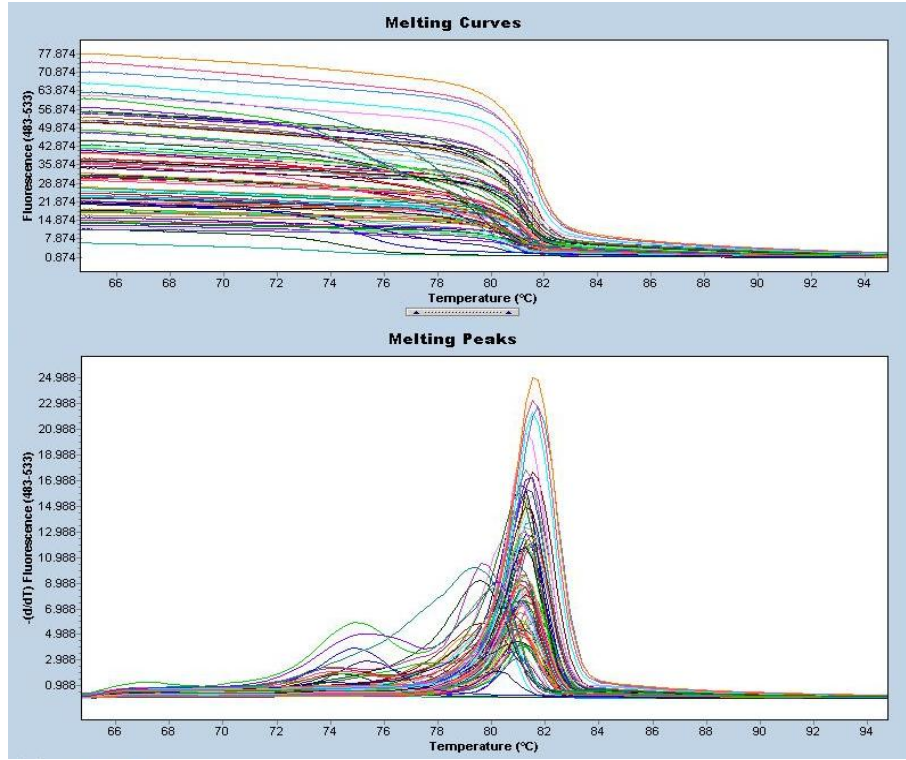
4.6.1. RASSF1A Geni MS-HRM Analiz Görüntüleri

Bu çalışmada %100, %75, %50, %25 ve unmetile kontrol DNA'ları kullanılmış olup bu kontrol DNA'ların MS-HRM görüntüleri şekillerde gösterilmiştir. Erime ısısı verileri "Tm Calling" yazılım programına göre değerlendirilmiştir. Çalışılan olguların metile olup olmadığı kontrol DNA'larının Tm ısısı ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

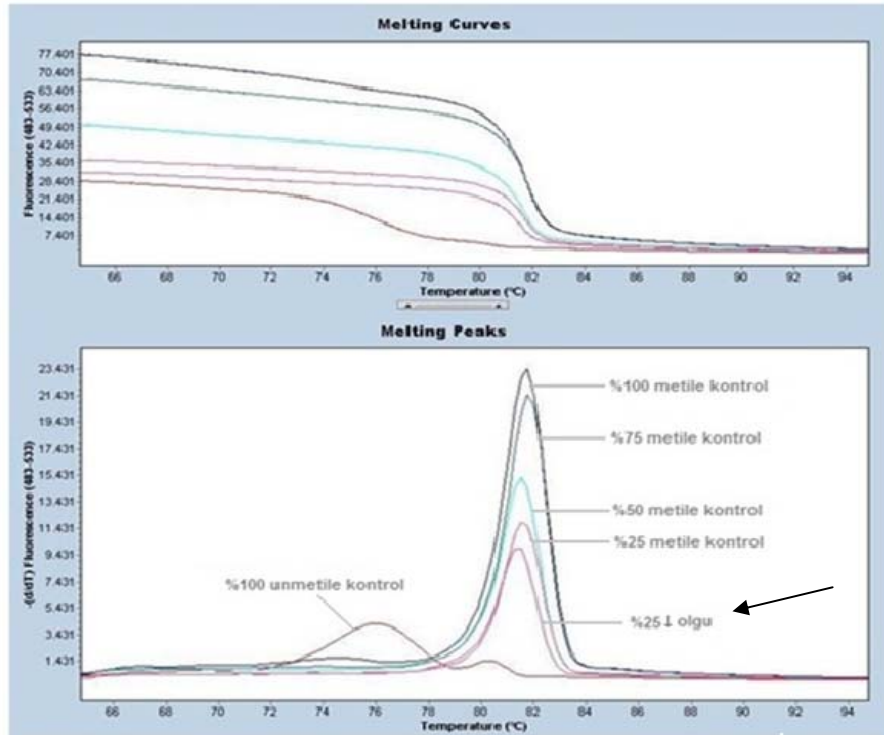
Metile DNA'dan amplifiye olan ürünler CpG dizileri nedeniyle daha yüksek Tm derecesine sahipken metile olmayan örnekler bisülfid modifikasyonu ile urasile dönüştüğü için Tm dereceleri daha düşüktür.



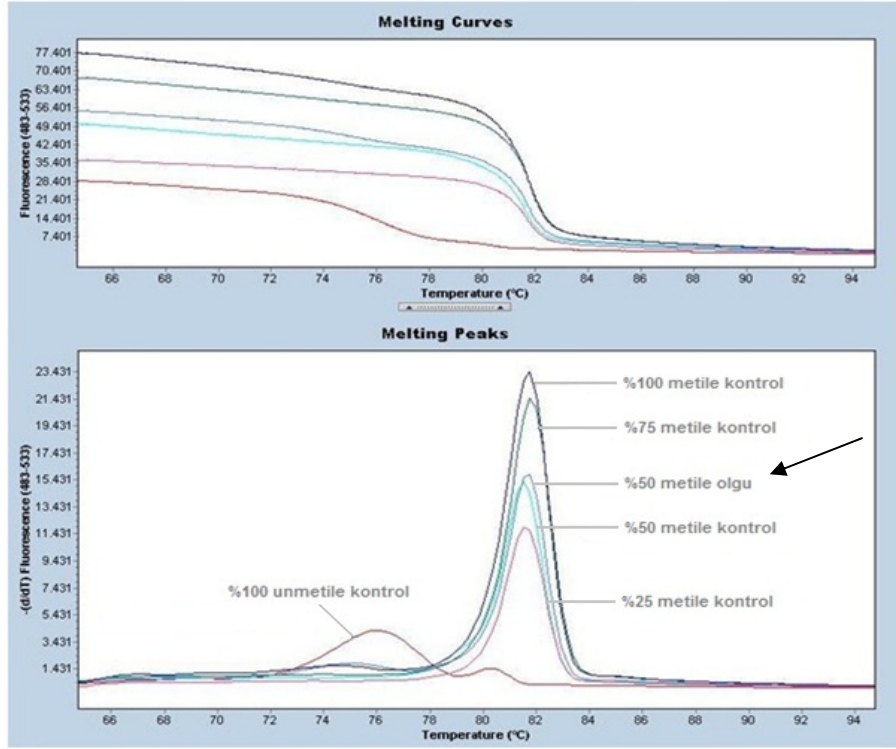
Şekil 4.7. RASSF1A Geni Unmetile ve metile kontrol DNA'ların floresan piklerine göre görüntüleri



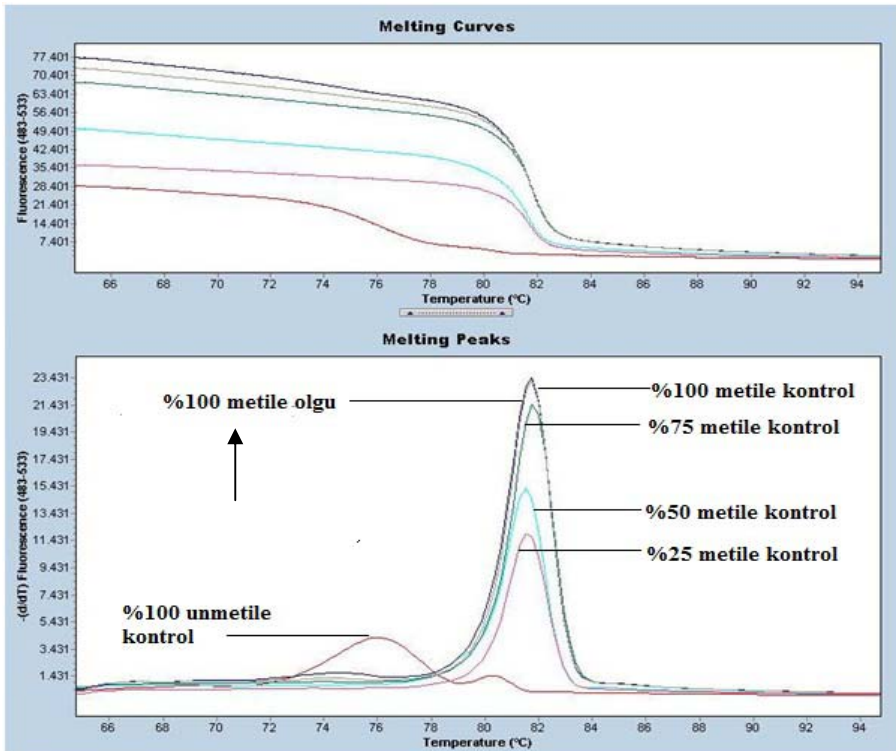
Şekil 4.8. Araştırma grubuna dahil edilen tüm örneklerin Tm derecelerine ait görüntü



Şekil 4.9. RASSF1A geninde %25↓ metile ile uyumlu olgu görüntüsü

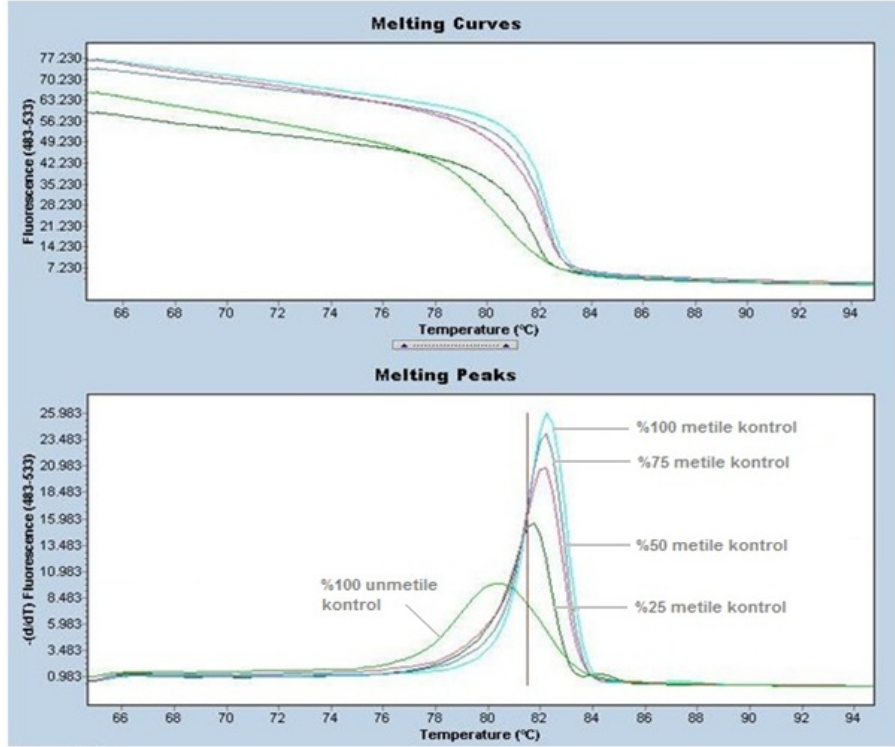


Şekil 4.10. RASSF1A geni %50 metile DNA örneği ile uyumlu olgu görüntüsü

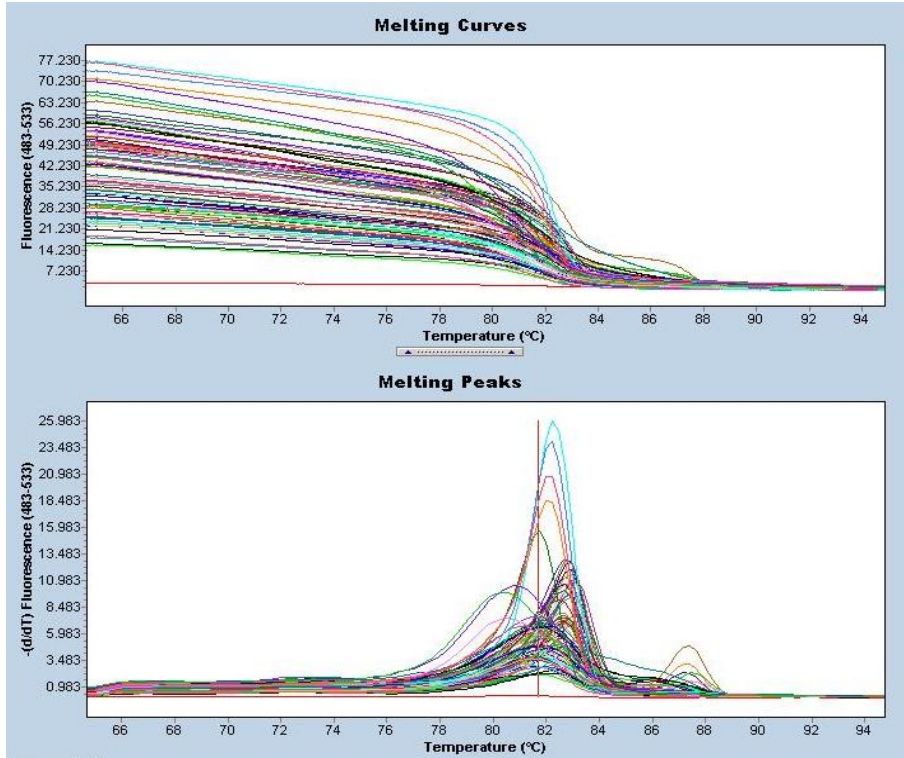


Şekil 4.11. RASSF1A geni %100 metile DNA örneği ile uyumlu olgu görüntüsü

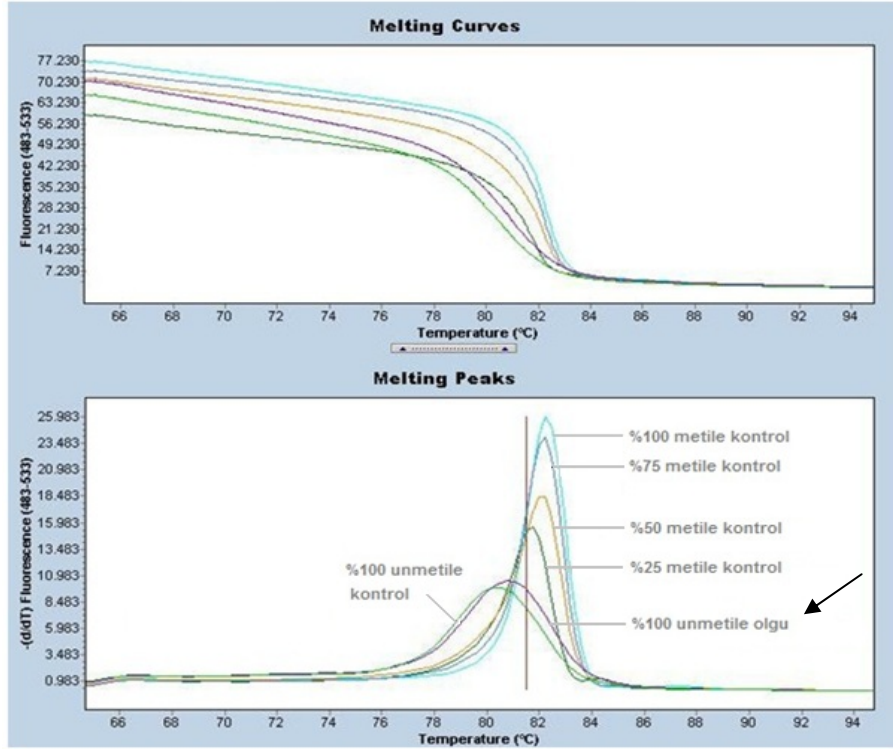
4.6.2. APC Geni MS-HRM Analiz Görüntüleri



Şekil 4.12. APC Geni Unmetile ve Metile Kontrol DNA'ların Floresan Piklerine Göre Görüntüleri



Şekil 4.13. APC geni için tüm olguların Tm derecelerine ait pik görüntüsü



Şekil 4.14 APC geni için unmetile olguya ait pik görüntüsü

4.7. Meme Kanserli Hastalarda RASSF1A ve APC Gen Metilasyon Sonuçları

4.7.1. Tümör Örneklerinde RASSF1A -APC Gen Metilasyonu ve Histopatolojik Tip Dağılımı

Tablo 4.23’de tümörlerdeki RASSF1A gen metilasyonu ve histopatolojik tip dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.23. Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve Histopatolojik Tip Dağılımı

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
İn.Duk.Kar.	13(27.0)	8(16.0)	8(16.0)	11(23.0)	8(16.0)	1(2.0)	8.191	0.630
İn.Lob.Kar:	1(20.0)	1(20.0)	0(0)	2(40.0)	0(0)	1(20.0)		
Diğer	2(33.0)	1(17.0)	1(17.0)	2(33.0)	0(0)	0(0)		
Toplam	16	10	9	15	8	2		

Çalışmada incelenen meme kanserli hastalara ait tümör örneklerinde RASSF1A geni ve histopatolojik tip değerlendirilmesinde olguların çoğunluğunu oluşturan invaziv duktal karsinomlu örneklerin biri dışında değişen oranlarda olmak üzere tüm örneklerde metilasyon paternlerinde artış olduğu gözlenmiştir. İnvaziv lobuler karsinomlu ve diğer tipteki hasta sayısı az olduğu için metilasyon paternlerinde sapma görülmele birlikte oranlama olanağı olmamıştır.

Tablo 4.24'te tümörlerde APC gen metilasyonu ve histopatolojik tip dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.24 Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve Histopatolojik Tip dağılımı

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
İn.Duk.K	12(24.0)	6(12.0)	2(4.0)	1(2.0)	0(0)	28(58.0)	8.541	0.343
İn. Lob. K	3(60.0)	0(0)	1(20.0)	0(0)	0(0)	1(20.0)		
Diğer	1(17.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(83.0)		
Toplam	16	6	3	1	0	34		

APC geninin metilasyon ve histopatolojik tip incelenmesinde invaziv duktal karsinomlu 28/49 (%58) tümör örneğinde APC geninde aşırı metilasyonunun olmadığı, APC geninin aktif olduğu gözlenmiştir

4.7.2 Tümör Örneklerinde RASSF1A-APC Gen Metilasyonu ve Grade Dağılımı

Tablo 4.25'de tümör örneklerinde RASSF1A gen metilasyonu ve grade dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.25 Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve Grade Dağılımı

Grade	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
Bilinme.	3(17.0)	5(28.0)	3(17.0)	5(28.0)	1(5.0)	1(5.0)	17.752	0.274
I	2(33.0)	1(17.0)	0(0)	0(0)	3(50.0)	0(0)		
II	7(31.0)	3(13.0)	3(13.0)	8(35.0)	1(4.0)	1(4.0)		
III	4(31.0)	1(8.0)	3(23.0)	2(15.0)	3(23.0)	0(0)		
Toplam	16	10	9	15	8	2		

RASSF1A geni metilasyon paterni değişikliği tüm gradelerde gözlenmiştir. Gruplar arasında olgu sayılarının azlığı da dikkate alındığında belirli bir farklılık ortaya konamamıştır.

Tablo 4.26’da tümörlerde APC gen metilasyonu ve grade dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.26. Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve Grade Dağılımı

Grade	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
Bilinmeyen	5(28.0)	2(11.0)	0(0)	0(0)	0(0)	11(61.0)	11.905	0.472
I	1(17.0)	1(17.0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(66.0)		
II	9(39.0)	2(9.0)	1(4.0)	0(0)	0(0)	11(48.0)		
III	1(8.0)	1(8.0)	2(16.0)	1(8.0)	0(0)	8(61.0)		
Toplam	16	6	3	1	0	34		

DNA tamir genlerinden biri olan APC geni metilasyon paterni değişikliği düşük oranlarda gözlenmiştir.

4.7.3. Tümör Örneklerinde RASSF1A –APC Gen Metilasyonu ve ER-PR Dağılımı

Tablo 4.27’de tümörlerde RASSF1A gen metilasyonu ve ER-PR dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.27. Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve ER-PR Dağılımı

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
ER(-)	9(36.0)	4(16.0)	6(24.0)	4(16.0)	2(8.0)	0(0)	7.457	0.192
ER(+)	7(20.0)	6(17.0)	3(9.0)	11(31.0)	6(17.0)	2(6.0)		
Top.	16	10	9	15	8	2		

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
PR(-)	9(32.0)	6(21.0)	6(21.0)	4(13.0)	4(13.0)	0(0)	6.858	0.238
PR(+)	7(23.0)	4(13.0)	3(10.0)	11(35.0)	4(13.0)	2(6.0)		
Top.	16	10	9	15	8	2		

Çalışmada incelenen tümörlerdeki RASSF1A gen metilasyonu ve östrogen reseptörü incelemesinde RASSF1A geninin östrogen reseptörü negatif örneklerin tümünde farklı oranlarda metile olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur.

Tümörlerin RASSF1A gen metilasyonu ve progesteron reseptörü incelemesinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. RASSF1A geni progesteron reseptörü negatif olan örneklerin tümünde farklı oranlarda metilasyon paterni göstermiştir.

Tablo 4.28’de tümörlerde APC gen metilasyonu ve ER-PR dağılımı gösterilmiştir

Tablo 4.28. Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve ER-PR Dağılımı

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
ER(-)	3(12.0)	2(8.0)	2(8.0)	1(4.0)	0(0)	17(68.0)	6.771	0.121
ER(+)	13(37.0)	4(11.0)	1(3.0)	0(0)	0(0)	17(49.0)		
Top.	16	6	3	1	0	34		

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
PR(-)	6(21.0)	3(10.0)	0(0)	1(3.0)	0(0)	19(66.0)	5.410	0.219
PR(+)	10(48.0)	3(14.0)	3(14.0)	0(0)	0(0)	5(24.0)		
Top.	16	6	3	1	0	24		

Tümörlerin APC gen metilasyonu ve östrogen reseptörü incelemesinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmasa da APC geninde metilasyon paterni östrogen reseptörü hem negatif hem de pozitif olgularda az sayıda izlenmiştir.

Tümörlerin APC gen metilasyonu ve progesteron reseptörü incelemesinde ise APC geni progesteron reseptörü negatif olan örneklerin çoğunluğunda aktif haldedir. Metilasyon paterni düşüktür.

4.7.4. Tümör Örneklerinde RASSF1A - APC Gen Metilasyonu ve CEP 17 Dağılımı

Tablo 4.29'da tümörlerde RASSF1A gen metilasyonu ve CEP17 dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.29. Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve CEP17 Dağılımı

CEP 17	25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
Monozomi	1(11.0)	3(33.0)	0(0)	1(11.0)	3(33.0)	1(11.0)	13.624	0.196
Dizomi	11(30.0)	5(14.0)	5(14.0)	12(32.0)	3(8.0)	1(3.0)		
Polizomi	4(29.0)	2(14.0)	4(29.0)	2(14.0)	2(14.0)	0(0)		
Toplam	16	10	9	15	8	2		

Tümörlerdeki RASSF1A gen metilasyonu ve CEP17 incelemesinde monozomi ve dizomi saptanan örneklerde RASSF1A geninde farklı oranlarda metilasyon üstünlüğü izlenmiştir. Polizomi saptanan 14 tümörün tümünde RASSF1A geninde farklı oranlarda metilasyon gözlenmiştir.

Tablo 4.30'da tümörlerde APC gen metilasyonu ve CEP17 dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.30. Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve CEP 17 Dağılımı

CEP 17	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
Monozomi	3(33.3)	1(11.1)	0(0)	0(0)	0(0)	5(55.6)	1.848	0.995
Dizomi	10(27.0)	4(11.0)	2(5.0)	1(3.0)	0(0)	20(54.0)		
Polizomi	3(21.4)	1(7.2)	1(7.2)	0(0)	0(0)	9(64.2)		
Toplam	16	6	3	1	0	34		

Tümörlerde APC gen metilasyonu ve CEP 17 incelemesinde monozomi, dizomi ve polizomi saptanan örneklerin çoğunluğunda gen aktif durumdadır yani metilasyon paterni azdır. Veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.7.5. Tümör Örneklerinde RASSF1A-APC Gen Metilasyonu ve HER2/neu Gen Dağılımı

Tablo 4.31’de tümörlerde RASSF1A gen metilasyonu ve HER2/neu gen dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.31. Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve HER2/neu Gen Dağılımı

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
HER2/neu N	12(27.0)	7(16.0)	8(17.0)	11(24.0)	5(11.0)	2(4.0)	2.415	0.811
HER2/neuAmp	4(26.0)	3(20.0)	1(8.0)	4(26.0)	3(20.0)	0(0)		
Toplam	16	10	9	15	8	2		

Tümörlerde RASSF1A gen metilasyonu ve HER2/neu gen ilişkisi incelemesinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da HER2/neu gen amplifikasyonun olan örnekler RASSF1A gen metilasyonu ile birliktelik göstermiştir. Prognostik ve terapötik öneme sahip olan HER2/neu geninin amplifiye olduğu tüm örneklerde RASSF1A geni farklı derecelerde metile olması nedeniyle fonksiyonlarını yitirmiştir. HER2/neu gen amplifikasyonun epigenetik değişiklikler üzerine etkili olduğu düşünülmüştür.

Tablo 4.32’de meme kanserli hastalarda APC gen metilasyonu ve HER2/neu gen dağılımı gösterilmiştir.

Tablo 4.32. Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve HER2/neu Gen Dağılımı

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
HER2/neuN	13(28.8)	5(11.1)	1(2.2)	0(0)	0(0)	26(57.9)	6.373	0.172
HER2/neuAmp	3(20.0)	1(7.0)	2(13.0)	1(7.0)	0(0)	8(53.0)		
Toplam	16	6	3	1	0	34		

Tümörlerin APC gen metilasyonu ve HER2/neu gen durumunun incelenmesinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da HER2/neu geni normal ve amplifikasyonu olan vakalarda APC gen açısından metile olmayan örnekler çoğunluğu teşkil etmiştir.

4.7.6. Tümör Örneklerinde RASSF1A-APC Gen Metilasyonu ve TOP2A Gen Dağılımı

Tablo 4.33’de tümörlerde RASSF1A gen metilasyonu ve TOP2A gen dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.33. Tümör Örneklerinde RASSF1A Gen Metilasyonu ve TOP2A Geni Dağılımı

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
TOP2AN	14(33.3)	7(16.6)	6(14.3)	8(19.1)	6(14.3)	1(2.4)	13.435	0.201
TOP2AAmp	2(14.3)	2(14.3)	1(7.1)	7(50.0)	1(7.1)	1(7.1)		
TOP2A Del	0(0)	1(25.0)	2(50.0)	0(0)	1(25.0)	0(0)		
Toplam	16	10	9	15	8	2		

Tümörlerin RASSF1A gen metilasyonu ve TOP2A gen dağılımında TOP2A gen delesyonu saptanan tüm örneklerin farklı oranlarda metile olduğu gözlenmiştir. TOP2A geni normal ve amplifiye örneklerde de çoğunlukla metilasyon paterni izlenmiştir.

Tablo 4.34’de tümörlerin APC gen metilasyonu ve TOP2A gen dağılımı verilmiştir.

Tablo 4.34. Tümör Örneklerinde APC Gen Metilasyonu ve TOP2A Gen Dağılımı

	%25↓(%)	%25(%)	%50(%)	%75(%)	%100(%)	UM(%)	χ^2	p
TOP2AN	11(27.0)	3(7.0)	1(2.0)	0(0)	0(0)	27(64.0)	21.335	0.026*
TOP2AAmp.	4(29.0)	3(21.0)	2(14.0)	0(0)	0(0)	5(36.0)		
TOP2ADel.	1(25.0)	0(0)	0(0)	1(25.0)	0(0)	2(50.0)		
Toplam	16	6	3	1	0	34		

Tümörlerin APC gen metilasyonu ve TOP2A gen dağılımında istatistiksel olarak anlamlı değerler saptanmıştır. TOP2A geni normal bulunan örneklerin çoğunluğunda gen metile olmayıp aktiftir. TOP2A gen amplifikasyonu olan örneklerde ise %64 metilasyon saptanmıştır. TOP2A gen delesyonu olan örnek sayısı az olduğu için değerler çok anlamlı olmamıştır.

4.8 RASSF1A-APC Gen Metilasyonu ile Yaşam Analiz

4.8.1. RASSF1A Gen Metilasyonu ile Yaşam Analizi

Tablo 4.35. Tüm Olgularda RASSF1A Gen Metilasyon Oranı

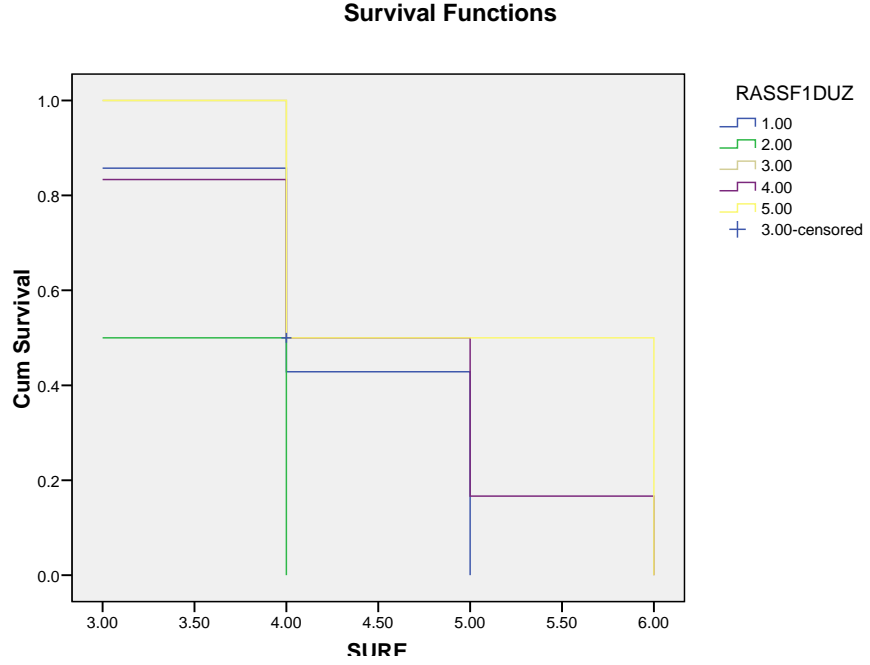
METİLASYON (%)	HASTA SAYISI (%)
%100 metile	8 (13.4)
%75 Metile	15 (25.0)
%50 metile	9 (15.0)
%25 metile	10 (16.6)
%25↓ metile	16 (26.6)
Unmetile	2 (3.4)
Toplam	60 (100.0)

Çalışmada incelemeye alınan toplam 60 örnek alınmıştır. 2/60 örnekte RASSF1A geni metile bulunmamıştır. RASSF1A gen metilasyon oranı %96.6 olarak değerlendirilmiştir. Takipli ve yaşayan 19 hastanın RASSF1A gen metilasyonu incelendiğinde 18 hastaya ait tümör örneklerinin farklı oranlarda metile olduğu görülmüştür. Sadece 1 örnek unmetile bulunmuştur.

RASSF1A gen metilasyonu ile yapılan yaşam analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir.

Tablo 4.36'da RASSF1A genine ait sağkalım sürelerinin yığılım tablosu gösterilmiştir.

Tablo 4.36. RASSF1A Genine Ait Sağkalım Sürelerinin Yığılım Tablosu



4.8.2. APC Gen Metilasyonu ile Yaşam Analizi

Tablo 4.37. Tüm Olgularda APC Gen Metilasyon Oranı

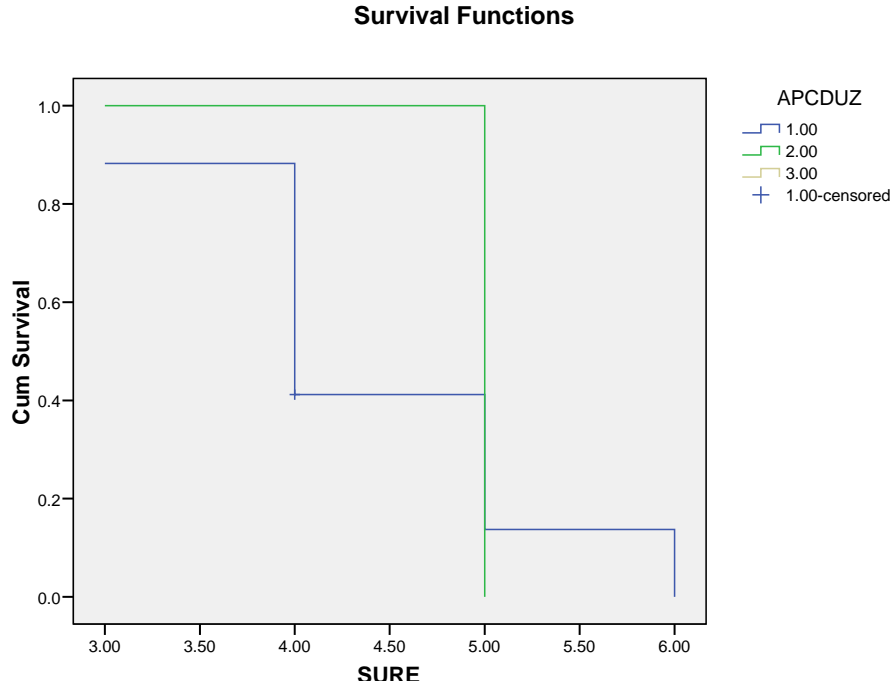
METİLASYON ORANI(%)	HASTA SAYISI(%)
%100 metile	0 (0)
%75 metile	1 (1.6)
%50 metile	3 (5)
%25 metile	6 (10)
%25↓ metile	16 (26.7)
Unmetile	34 (56.7)
Toplam	60 (100.0)

Çalışmada incelenen meme kanserli hastaya ait 60 tümör örneğinin APC gen metilasyon analizinde tüm örneklerde metilasyon oranı 26/60 (%43.3) olarak bulunmuştur. Takipli ve yaşayan 19 hastanın APC gen metilasyonu incelendiğinde 11 hastanın metile olmadığı görülmüştür. Diğer 8 hastanın dağılımında 6 hasta %25↓, 1 hasta %25, 1 hasta %50 olarak değerlendirilmiştir.

APC gen metilasyonu ile yapılan yaşam analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir.

Tablo 4.38’de APC genine ait sağkalım sürelerinin yığılım tablosu gösterilmiştir.

Tablo 4.38. APC Genine Ait Sağkalım Sürelerinin Yığılım Tablosu



5. TARTIŞMA

Çalışmamız retrospektif olarak ESOGU Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında meme kanseri tanısı almış ve Tıbbi Onkoloji Anabilim dalında izlenen riskli gruba ait 60 olgu ile yapılmıştır. Olguların örnekleri FISH için parafinize bloktan 4 µ'luk kesitler halinde, MS-HRM için ise 10 µ'luk on adet kesit şeklinde tüplerde temin edilmiştir.

Olgulara ait yaş, histopatolojik tanı, grade, ER, PR gibi bulguları dosyalarından temin edilmiştir.

Çalışmamızda meme kanserinde prognostik ve prediktif role sahip olan HER2/neu geni yanı sıra TOP2A genleri CEP 17 kopya sayısı değişiklikleri FISH yöntemi ile incelenmiştir. Aynı hastalara ait diğer kesitlerinden ise meme kanseri etyopatogenezinde rol oynadığı düşünülen RASSF1A ve APC genleri MS-HRM yöntemi ile incelenmiştir. Kantitatif bir yöntem olan gen MS-HRM metilasyonu açısından oldukça hassas bir yöntemdir.

Son yıllarda meme kanserindeki epigenetik değişimleri araştırmak için pek çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunların içinde en önemli çalışma alanı metilasyon incelemeleri olmuştur. DNA mutasyonlarına göre daha sık görülmesi nedeniyle farklı kanser genlerinin metilasyon profillerinin incelenmesi kanser araştırmalarında ön plana çıkmaya başlamıştır.

Metilasyon analizlerinde çok farklı teknikler kullanılmaktadır. MS-HRM tekniği ülkemizde yeni kullanılmaya başlanmıştır.

Meme kanserinde önemli yere sahip olan HER2/neu geni ve farklı genlerin metilasyon arasındaki dağılımı ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Ancak FDA tarafından yüksek riskli meme kanserli hastalar için yapılması önerilen TOP2A geni ve meme kanserinde sıkça değişikliğe uğrayan kromozom 17 kopya sayısı değişiklikleri ile metilasyon ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma yurdumuzda HER2/neu, TOP2A ve CEP17 kopya sayısı değişiklikleri ile RASSF1A-APC genlerinin metilasyon özelliklerini inceleyen ilk çalışma olma özelliğindedir.

Ayrıca MS-HRM yöntemi RASSF1A ve APC genleri için yurdumuzda meme kanseri çalışmasında ilk kez kullanılmıştır.

5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

5.1.1. Meme Kanserli Hastalarda HER2/neu, TOP2A geni ve CEP17 Kopya Sayısı Dağılım Özelliklerinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

HER2/neu geni 17q 12-21 bölgesinde yer alan ve ERBB membran tirozin kinaz reseptör ailesine mensup 185-kD'luk transmembran protein kodlayan bir protoonkogendir. İnvaziv meme kanserlerinin %25-30'unda amplifiye ve overeksprese olur. Bu durum hastalısız geçen sürede azalma ve kötü gidiş göstergesidir (37, 149).

HER2/neu gen durumunu belirlemek için yapılan çalışmalarda Flouresan İn Situ Hibridization (FISH), immunhistokimya (IHC), Chromogenic in situ hybridization (CISH) , Real-time Reverse Transkripsiyon PCR (RT-PCR) ve Elisa yöntemleri kullanılmıştır. HER2/neu gen değerlendirilmesi için IHC ve FISH sonuçları sensitivite, spesifite, uygunluk açısından karşılaştırılmıştır ve FISH yöntemi altın standart olarak belirlenmiştir (100).

TOP2A geni ise DNA'nın topolojik durumunu değiştiren ve kontrol eden bir topoizomeraz 2 alfa enzimini kodlar. Kromozom17q21 bölgesine lokalizedir. Enzim çift dallı DNA'nın replikasyonu, transkripsiyonu sırasında oluşan kıvrımları önler (92).

Kanser heterojen ve kompleks bir hastalıktır. Kanserde anöploidi sık görülen bir bulgudur. Kromozom 17 anozomisi (monozomi veya polizomi) meme kanserinde en sık görülen kromozomal aberasyonlardan biridir. Polizomi 17 kromozom 17'nin fazla kopyası olduğu anlamındadır. Bazı çalışmalar anozomi17 olgularında prognozun daha kötü olduğunu göstermiştir. Polizomi 17 bulunması HER2/neu gen dozajında artışa neden olabilir. Ancak polizomiye her zaman HER2/neu amplifikasyonu eşlik etmemektedir (63). IHC ile yapılan çalışmalarda HER2/neu proteinindeki fazlalığın gen amplifikasyonu nedeniyle mi kromozom 17 polizomisi nedeniyle mi oluştuğu henüz

belirlenememiştir. Ancak çalışmamızda kullanılan FISH yöntemi ile gen ve sentromere ait sinyaller eş zamanlı sayılabilmekte ve daha kantitatif bir ölçüm yapılabilir.

Tsukamoto ve ark.nın 2001 yılındaki çalışmalarında 113 meme kanserli hastanın ince iğne aspirasyon materyalinde kromozom 1, 11 ve 17 sentromerlerini FISH yöntemi ile incelemiştir (129). Meme kanserli hastaların klinikopatolojik özellikleri ile kromozomal anozomi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Polizomi 17 %32.7 oranında saptanmıştır. Monozomi 17 ile ER(-)'liği arasında, polizomi 17 ile PR(-)'liği arasında bariz korelasyon saptanmıştır.

Çalışmamızda kromozom 17 kopya sayısı değişikliği 14 örnekte polizomi (23.3), 9 örnekte monozomi (%15) olmak üzere toplam 23/60 (%38.3) örnekte saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da polizomi 17 olgularında PR(-)'liği ön planda görülmüştür.

Knoop ve arkadaşları ise 2005 yılında yayınladıkları çalışmalarında meme kanserli hastalarda HER2/neu ve TOP2A genlerinin epirubisin tedavisi için belirleyici olup olmadığını FISH ve IHC yöntemi ile araştırmışlardır (59). Danimarka Meme Kanseri Grubunun 89D olarak adlandırılan bu çalışmada retrospektif olarak 805 hasta incelenmiştir. HER2/neu amplifikasyonu %33 olarak saptanmış ama epirubisin sensitivitesi için prediktif markır olmadığı gözlenmiştir. HER2/neu gen amplifikasyonu sıklıkla postmenapozal kadınlarda, üçten fazla lenf nodu pozitif ve ER(-) olanlarda çok gözlenmiştir. HER2/neu pozitifliğinin yaş, grade ve tümör boyutu ile ilgili olmadığı bildirilmiştir. HER2/neu pozitif hastaların %56,9'unda aynı zamanda TOP2A gen aberasyonu da saptanmıştır. TOP2A amplifikasyonu olan ve CEF ile tedavi olan hastaların CMF tedavine göre rekürrens olmayan süre ve total yaşam süresi açısından daha iyi gelişme gösterdiği, TOP2A delesyonlu hastalar da benzer etkilerin gözlendiği bildirilmiştir. Bu sonuç normal TOP2A genotipine sahip ve her iki tedavi protokolü ile tedavi olan ve benzer sonuçlar gösteren hasta grubuna ters düşmüştür. Bu çalışmayı konfirme etmek için meta analiz gerektiği belirtilmiştir.

Hicks ve ark.nın 2005 yılında yayınladıkları çalışmada meme adenokarsinomlarında TOP2A geni ile HER2/neu geni arasındaki ilişki FISH yöntemi ile incelenmiştir (45). Çalışmaya dahil edilen hastalardan HER2/neu amplifiye olan 137 hastanın %50'sinde TOP2A gen amplifikasyonu, %16'sında TOP2A delesyonu

izlenirken %34'ünde TOP2A normal bulunmuştur. TOP2A gen amplifikasyonu HER2/neu amplifikasyonu olmayan vakalarda gözlenmemiştir. HER2/neu amplifikasyonu olmayan 43 vakada TOP2A delesyonu %5, dizomi %63, polizomi %30 ve monozomi %7 olarak bulunmuştur. TOP2A genindeki amplifikasyon ve delesyonun klinik özelliklerini belirlemek için daha ileri tanımlamaların gerektiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda incelenen 60 tümör örneğinde HER2/neu gen amplifikasyonu %25 oranında saptanmıştır. HER2/neu gen amplifikasyonu olan vakaların %53.4'de TOP2A gen amplifikasyonu, %13.3'ünde TOP2A gen delesyonu olmak üzere toplam %66.7 oranında TOP2A gen aberasyonu saptanmıştır. Bulduğumuz veriler *Knoop ve ark.* ile *Hicks ve ark.* 'nın verileri ile uyum göstermiştir.

Çalışmadaki hastalarda HER2/neu gen amplifikasyonu olan olgularda ER(-)'liği %60 oranında izlenmiştir. Bu veri *Knoop ve ark.*'nin verileri ile uyumaktadır. Ancak *Knoop ve ark.*'ı HER2/neu gen amplifikasyonu ile grade ve yaş arasında bağlantı olmadığını bildirmişlerse de bizim çalışmamızda HER2/neu gen amplifikasyonu ileri grade ve ileri yaş ile bağlantılı olarak saptanmıştır.

Huang ve arkadaşlarının 2005'de yayınladıkları çalışmada metastazı olmayan ve opere olmuş 1362 meme kanserli olgu ile çalışılmıştır (50). Farklı yaş gruplarında hormon reseptör durumu ile HER2/neu geni aşırı ekspresyonu arasındaki bağlantı IHC yöntemi ile incelenmiştir. Çok değişkenli model çalışmasına göre HER2/neu aşırı ekspresyonunda ER(-) , PR(-) ve yüksek grade saptanmış olması yol gösterici olarak değerlendirilmiştir. 45 yaş altındaki ve üzerindeki gruplar kıyaslandığında 45 yaşın üzerinde tümör grade'i ve hormon reseptör durumunun HER2/neu pozitifliğinden bağımsız olduğu bildirilmiştir. 45 yaşın altında ve düşük grade sahip olan grupta hormon reseptörü negatifliğinin HER2/neu geni için prediktif role sahip olduğu belirtilmiş. Ancak yüksek grade'i olan grupta ER-PR durumunun HER2/neu için prediktif olmadığı yönünde görüş bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda hormon reseptör durumu ile HER2/neu arasındaki bağlantının hasta yaşıyla değiştiği belirtilmiştir.

Çalışmamızda incelemeye alınan 60 hastanın 5 tanesi 45 yaş altında yer almaktadır. HER2/neu gen amplifikasyonu saptanan 15 hastanın, TOP2A gen

amplifikasyonu saptanan 14 hastanın ve polizomi saptanan 14 hastanın 13'ünün 45 yaşın üzerinde olduğu görülmüştür. Veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da HER2/neu, TOP2A gen amplifikasyonu ve polizomi ileri yaştaki olgularda fazla görülmüştür.

Lal ve ekibinin 2005 yılında yayınladıkları çalışmada 3655 invaziv meme kanserli hastada ER-PR durumu, HER2/neu geni ile histolojik özellikler arasındaki bağlantı incelenmiştir (68). 3 yıllık periyod içinde primer ve metastatik hastalara ait örneklerde ER-PR durumu IHC, HER2/neu geni FISH analizi ile incelenmiş ve HER2/neu gen amplifikasyonu %14,69 olarak saptanmıştır. ER-PR ekspresyonu HER2/neu (+) tümörlerde negatif gruba göre bariz şekilde azalmış olarak bulunmuştur. Primer ve metastatik olgularda HER2/neu (+)'liği yüksek histopatolojik grade ile birliktelik göstermiştir. Grade I vakalarda HER2/neu pozitifliği saptanmamıştır. Birçok çalışmada saptanmış olan ER-PR ekspresyonu ile HER2/neu geni arasındaki ters ilişki burada yinelenmiştir.

Bizim çalışmamızda da HER2/neu gen amplifikasyonu olan örneklerin çoğunluğunu Grade III olgular oluşturmuştur. HER2/neu gen amplifikasyonu saptanan örneklerde ER (-), PR (-)'liği daha çok görülmüştür. Verilerimiz *Lal ve ark.nın* verileri ile uyumludur.

Salido ve arkadaşlarının 2005 yılındaki çalışmalarında meme kanserinde kromozom 17'de sayısal değişiklik olup olmadığı ve bunun HER2/neu gen amplifikasyonu ile ilişkisi olup olmadığını araştırılmıştır (117). Çalışmada çift renkli FISH analizi ile HER2/neu gen amplifikasyonu saptanan 175 hastanın analizlerinde %13 oranında polizomi ve %2 oranında monozomi saptanmıştır. Polizomi HER2/neu gen amplifikasyonu olmayan vakalarda daha sık görüldüğünden gen amplifikasyonunun polizomiden bağımsız bir olay olduğu vurgulanmıştır. Nodal tutulum ise polizomik olmayan olgularla karşılaştırıldığında polizomi17 olan vakalarda daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir .(p=0,046)

Villman ve ark.nın 2006 yılındaki yayınlarında ilerlemiş meme kanseri olgularında HER2/neu ve TOP2A gen amplifikasyonlarının antrasiklin tedavisi için prediktif marker olup olmayacağını araştırılmıştır (135). Antrasiklin tedavisi alan 85

meme kanserli hastaya ait tümörlü doku CISH yöntemi ile incelenmiştir. HER2/neu gen amplifikasyonu 38 (%45), TOP2A gen amplifikasyonu 14 (%16) hastada bulunmuştur. TOP2A gen amplifikasyonu gösteren 14 hastanın 2'sinde HER2/neu gen amplifikasyonu bulunmamıştır. HER2/neu ve TOP2A gen amplifikasyonu ile tedaviye cevap arasında ilişki kurulamamıştır ($p=0,49$, $p=0,35$). Bu nedenle HER2/neu ve TOP2A gen amplifikasyonlarının antrasiklin tedavisine cevabında prediktif markır olarak görülemeyeceği belirtilmiştir.

Takehisa ve ark.'nin 2007 yılındaki yayınlarında 42 meme kanserli hastanın ince iğne aspirasyon sıvısında kromozom 1, 11 ve 17 anozomisi FISH yöntemi ile incelenmiş ve prognoz ile arasındaki bağlantı irdelenmiştir (126). Polizomi 17 ile yüksek histolojik grade arasında istatistiksel olarak bağlantı bulunmuştur. Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı olmasa da lenf nodu metastazında artış ile bağlantı saptanmıştır. Polizomi ve ER (+)'liği arasında ilişki olduğu savunulmuştur.

Yapılan FISH analizleri sonucunda polizomi saptanan 14 hastanın 10'nunu grade II ve III yani ileri grade olgularının oluşturduğu görülmüştür. Polizomi 17 vakalarında ER (+) (%57.1)'liği ön planda görülmüştür. Verilerimiz *Takehisa ve ark.* ile uyumludur.

Beşer ve arkadaşları 2007 yılında yayınladıkları çalışmada HER2/neu ile yakın lokalizasyonda bulunan TOP2A'nın da antrasiklinlere yanıtta HER2/neu ile birlikte kullanılıp kullanılmayacağını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada 50 meme kanserli hastada HER2/neu, TOP2A ve kromozom 17 değişikliklerini incelenmiştir (10). Toplam 11 hastada (%22) HER2/neu gen amplifikasyonu, 6 hastada (%12) TOP2A kopya sayısı değişikliklerini gözlemlemişlerdir. HER2/neu amplifikasyonunun gözlemlendiği hastalardan sadece 4'ünde amplifikasyon ve delesyon olmak üzere TOP2A anomalisi saptamışlardır. Çalışma verileri doğrultusunda TOP2A kopya sayısının HER2/neu durumuna göre tahmin edilemeyeceğini, sadece tedaviye direnç gösteren HER2/neu aşırı ekspresyonu olan hastalarda TOP2A delesyonunun belirlenmesinin faydalı olabileceği sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızda HER2/neu ve TOP2A geni incelemesinde elde ettiğimiz değerler Beşer ve arkadaşlarının sonucu ile uyumludur. TOP2A geni ve HER2/neu geni yakın lokalizasyonda olduğu için HER2/neu gen amplifikasyonu olan vakalarda TOP2A gen aberasyonunun olması beklenen bir durum olmaktadır. HER2/neu gen amplifikasyonu olan vakalarda antrasiklinlere hassasiyetin de buna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Sunami ve grubunun 2008 yılında yayınladıkları çalışmada meme kanserinde ER ve HER2/neu gen durumu ile çeşitli genlerin metilasyonu arasındaki ilişki incelenmiştir (125). ER (+) 65 ve ER (-) 65 hastada MS-PCR ile meme kanseri ile ilişkili genlerin metilasyon durumu araştırılmıştır. IHC yöntemi kullanılarak HER2/neu pozitifliği %27 olarak bulunmuştur. HER2/neu gen durumu ile ER durumu birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmiştir.

Lü ve arkadaşları 2008 yılındaki çalışmalarında polizomi 17'nin klinikopatolojik önemini araştırmışlardır (74). Retrospektif olarak 200 meme kanserli hastada FISH analizi ile polizomi 17 ile yaş, nükleer atipi, lenf metastazı HER2/neu gen amplifikasyonu ve HER2/neu proteini arasındaki bağlantıyı incelemişlerdir. Polizomi 17 %26 oranında saptanmıştır. Polizomi invaziv duktal karsinomlu vakaların %52.8'inde gözlenmiştir, bu durumun HER2/neu gen kopya sayısı ve HER2 protein ekspresyonu ile bağlantılı olduğu saptanmıştır. Ayrıca HER2/neu gen amplifikasyonu saptanan olgularda HER2/neu protein ekspresyonunun da arttığı belirtilmiştir. Polizomi 17'nin HER2 amplifikasyonu olsun veya olmasın yüksek grade nükleer atipi ve lenf metastazı ile ilişkili olduğu, ancak hasta yaşı bağlantısının olmadığı gözlenmiştir. Araştırmacılar invaziv duktal karsinom olgularında kromozom 17'nin nükleer atipi, metastaz, HER2 gen amplifikasyonu ile ilişkili olabileceğini ve bu nedenle de kötü prognoz belirteci olabileceği sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızda saptadığımız %23.3 polizomi 17 sıklığı ve bu anomalinin baskın olarak invaziv duktal karsinom tanılı olgularda gözlenmiş olması bakımından *Lü ve arkadaşlarının* verileri ile uyumludur. Ancak çalışmamızda polizomi 17 ile HER2 amplifikasyonu veya kötü prognoz arasında bir bağlantı gözlenmediği için çalışma verilerimiz *Lü ve ark.*'nin görüşlerini destekler nitelikte değildir. Bizim çalışmamızda da

HER2/neu gen amplifikasyonu olan hastaların %66.6'sında dizomi saptanmıştır. HER2/neu gen amplifikasyonu ve polizomi 17 arasında ilişki kurulamamıştır.

Vanden Bempt ve grubu 2008 yılında yayınladıkları çalışmalarında 226 primer meme kanserinde polizomi 17 ve HER2/neu gen kopya sayısı ile ilişkisini ve HER2/neu gen amplifikasyonunun klinikopatolojik özelliklerini incelemiştir (134). Bu çalışmada HER2/neu ve Polizomi 17 çift renkli FISH ile, HER2/neu proteini IHC ile HER2/neu mRNA ekspresyonu da RT-PCR yöntemleri ile incelenmiştir. Bu sonuçlar ve çeşitli klinikopatolojik özellikler ile FISH sonuçları korele olarak bulunmuş. Polizomi 17 toplam 104 örnekte (%46) saptanmıştır. Bu örneklerden %59.62 kadarında sadece polizomi 17 gözlenirken, %40.39'unda polizomi 17'ye HER2/neu gen amplifikasyonunun eşlik ettiği saptanmıştır. HER2/neu gen amplifikasyonu olan vakaların özellikle daha yüksek gradeli, ER (-)'liği, PR (-)'liği ile olduğu bildirilmiş ve rekürrens olmayan sürenin daha kısa olduğu saptanmıştır. Polizomi 17 saptanan vakalarda ise klinik özelliklerinin normal HER2/neu sinyal paterni gösteren olguların klinik özellikleri ile benzerlik gösterdiği, sürvide anlamlılık göstermediği bildirilmiştir. Bu çalışma özellikle HER2/neu gen amplifikasyonu ile polizomi 17'nin farklı klinikopatolojik özelliğe sahip iki farklı genetik aberasyon olduğunu ve polizomi 17'nin HER2/neu ekspresyon artışı ile birlikte olmadığını göstermesi nedeniyle önemlidir.

Çalışmamızda polizomi 17 %23.3 oranında saptanmıştır ki bu oran diğer çalışmalarda saptanan oranlar yelpazesi içerisindedir (%23-%46). Geniş bir yelpaze içerisinde olan polizomi 17 oranlarında çalışılan populasyon, incelemeye alınan örnek kalitesi ve tümör oranı, kullanılan metoda ve cut-off değerlerine bağlı olarak değiştiği düşüncesindeyiz. Polizomi saptanan olgularda sentromere ait floresan sinyal sayısı 3-6 arasında değişen sayılabilen sinyaller şeklinde idi. Olguların 4/14'ünde (%28.5) HER2/neu gen amplifikasyonu, 3/14 (%21.4) hastada ise hem HER2/neu hem de TOP2A gen amplifikasyonu birlikte izlenmiştir ve floresan sinyal fenotipleri sayılamayacak kadar çok kopya şeklinde kendilerini gösterdikleri için HER2/neu ve TOP2A gen amplifikasyonlarının polizomiye bağlı olarak gelişmedikleri düşüncesindeyiz. Geri kalan 7 olguda sadece sentromer 17'e ait çoklu sinyaller izlenmiştir. Bu sinyal artışı polizomi 17 nedeniyle olabileceği gibi kromozom 17 duplikasyonu nedeniyle de olabilir.

Nielsen ve arkadaşları 2008 yılında daha önce yapılan DBCG 89D çalışmasını güncellemiş ve daha geniş istatistiksel testler yapmışlardır (92). Rastgele seçilen CEF veya CMF tedavisi alan 806 hastanın 773'ünde HER2/neu ve TOP2A gen durumu ve yaşam süreleri incelenmiş. TOP2A gen amplifikasyonu %11.9, delesyonu da % 11.3 şeklinde bildirilmiştir. Toplam TOP2A gen aberasyonu olguların %23.2'inde saptanmıştır. HER2/neu gen amplifikasyonu olan hastaların %56,5'inde, gen amplifikasyonu olmayan hastalarında %7.6'sında TOP2A gen aberasyonu gözlenmiştir. TOP2A gen aberasyonu gösteren hastaların rekürrens olayın süre ve total yaşam süresinin anlamlı düzeyde azaldığı belirtilmiştir.

Arriola ve grubu'nun 2009 yılındaki yayınladıkları çalışmanın amacı meme kanserinin moleküler subtiplerinde TOP2A gen amplifikasyonu ile ekspresyonunu araştırmak ve antrasiklin tedavisi ile ilgisinin ortaya konulması olmuştur (2). Bunun için erken evre meme kanseri olan ve antrasiklin alan 245 hastada HER2/neu ve TOP2A gen kopya sayısı değişikliği CISH ile TOP2A proteini IHC ile değerlendirilmiştir. TOP2A gen amplifikasyonu sadece HER2/neu amplifikasyonu olan vakalarda saptanmış ve anlamlı olarak ER pozitifliği ile birliktelik göstermiştir. HER2/neu amplifikasyonu olan bazı hasta grubunda TOP2A amplifikasyonu eşlik ettiğinde rekürrens olmayan süre ve total yaşam süresinde iyileşme saptandığı ($p=0.028$), çok değişkenli analizde ise TOP2A amplifikasyonunun hastalısız süre açısından belirleyici olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda TOP2A gen özellikleri incelendiğinde TOP2A geninde amplifikasyon olan olgularda %64.3 ER (+)'liği saptanmıştır ki bu veriler *Arriola ve ark.*'larının verileri ile uyumludur. TOP2A gen delesyonu saptanan vakalarda ise ER (-)'liği ön planda izlenmiştir (%75).

Tubbs ve grubunun 2009 yılında yayınladıkları çalışmada TOP2A genindeki amplifikasyon veya delesyon durumunun antrasiklin tedavisi için pozitif marker olabileceği savından yola çıkarak HER2/neu ve TOP2A genleri adjuvan Doxorubisin(A) ve Siklofosfamid(C) tedavi alan orta risk grubundan 2123 meme kanserli hastada FISH yöntemi ile analiz edilmiştir (130). Aberan TOP2A gen kopya sayısı % 9,4 (% 4 amplifiye, %5,4 delesyon) oranında saptanırken toplam %20.4 anormal HER2/neu gen kopya sayısı (%18,8 amplifikasyon, %1,6 delesyon) olduğu

rapor edilmiştir. TOP2A geni ile rekürrensiz süre ve total yaşam süresi arasında ilişki kurulamamış buna karşılık yüksek düzey (≥ 4) HER2/neu gen amplifikasyonu ile total yaşam ve rekürrens olmayan süre açısından ters yönde bir bağlantı olduğu bildirilmiştir. Survi süresi düşük seviyedeki HER2/neu amplifikasyonu (≥ 2) ile ilişkili bulunmamıştır. Bu çalışmada adjuvan AC tedavisi alan erken evre meme kanserli hasta popülasyonunda TOP2A geni aberasyonunun klinik seyir ile ilişkili olmadığı, yüksek düzey HER2/neu amplifikasyonunun antrasiklin tedavisi alan hastalarda prognostik faktör olarak değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda TOP2A gen aberasyonu 18/60 (% 30) (% 23.3 amplifikasyon, % 6.7 delesyon) oranında gözlenmiştir. Bu oran *Tubbs ve arkadaşlarının* verilerine göre daha yüksektir. Ancak *Tubbs ve ark.*1 erken evre ve orta risk grubu olgularında bu çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Oysa bizim çalışmamızda yüksek risk grubu hastalar incelenmiştir. Dolayısıyla ileri evre meme kanserinde TOP2A kopya aberasyonlarının daha yüksek oranda gözlenebileceği görüşündeyiz.

Oakman ve arkadaşları tarafından 2009 yılında daha önceden yapılan 2 meta analizin değerlendirmesi yapılmıştır (95). Bu iki çalışma HER2/neu amplifikasyonu olan ve antrasiklin tedavisi alan hastaların nüks olmadan geçen süre ve total yaşam süresinin HER2/neu amplifikasyonu olmayan gruba göre daha iyi olduğunu desteklemiştir. Kanada MA5 çalışmasında premenapozal lenf nodu pozitif olan 438 hastada HER2/neu ve TOP2A gen durumu FISH ile incelenmiş ve rekürrens olmayan ve total yaşam süreleri yönünden CMF ile CEF tedavisi karşılaştırılmıştır. HER2/neu pozitif ve CEF tedavisi alan hastalarda rekürrens olmayan sürelerinin daha iyi olduğu belirlenmiştir. TOP2A gen aberasyonu %18 hastada (%12 amp. ve %6 delesyon) izlenmiş ve büyük boyutlu tümörler ile HER2/neu pozitif olanlarda daha çok görülmüştür. TOP2A gen değişikliği olup CEF tedavisi alan hastaların nüks olmayan süre ve yaşam süresi açısından CMF grubuna göre üstünlük gösterdiği belirlenmiştir.

Konecny ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınlanan çalışmasında HER2/neu ve TOP2A genleri arasındaki ilişki ile yüksek riskteki meme kanserli hastaların preoperatif dönemde Antrasiklinlere verdikleri cevapları değerlendirilmiştir (62). Preoperatif dönemde yüksek doz kemoterapi veya antrasiklin tedavisi alan 373 yüksek riskli meme

kanserli olguda (tümör \geq 3 cm. veya inflamatuvar kanser) FISH yöntemi ile HER2/neu ve TOP2A genleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Örneklerin %27 sinde (94/350) HER2/neu amplifikasyonu saptanmıştır. Bu olguların %46'sında (40/94) TOP2A amplifikasyonu TOP2A amplifikasyonu, %18'inde (17/94) TOP2A delesyonu gözlemlenmiştir. TOP2A gen kopya sayısı değişikliği HER2/neu gen amplifikasyonu olmayan vakalarda saptanmamıştır. HER2/neu gen amplifikasyonuna TOP2A gen amplifikasyonu eşlik ettiğinde (30% - 11%, P = 0.002) komple patolojik cevap (pCR) saptanmıştır. Bu yanıt TOP2A gen delesyonu veya HER2/neu geni normal olan olgularda gözlenmemiştir. Multideğişkenli çalışmada TOP2A amplifikasyonu (p=0,021) bariz şekilde komple patolojik cevap (pCR) ile birlikte bulunmuştur. (pCR= cerrahi örneğin kalan kısmında canlı, invaziv tümör hücrelerinin kalmaması)

Bartlett ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları NEAT/BR9601 çalışmasında erken evre meme kanserinde adjuvan CMF tedavisine antrasiklin eklenmesinin faydalı olacağını gösterilmiştir (5). 1762 hastada HER2/neu, TOP2A, CEP17, HER1, KI67 durumları mikroarray ile analiz edilmiştir. HER2/neu amplifikasyonu %21, TOP2A amplifikasyonu %10, TOP2A delesyonu % 11 ve CEP 17 duplikasyonu %23 oranında saptanmıştır. Tek değişkenli analizde sadece HER2/neu gen amplifikasyonu ve TOP2A delesyonunun rekürrens olmayan süre ve total yaşam süresi için anlamlı bir prognostik faktör olduğu, HER2/neu veya TOP2A'nın antrasiklin tedavisi ile anlamlı bir ilişkisi olmadığını belirtmişlerdir. Ancak çok değişkenli analizde CEP 17 duplikasyonunun antrasiklin tedavisi ile rekürrens olmayan ve total yaşam sürelerindeki artma ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Erken evre meme kanseri olup adjuvan kemoterapi alan kadınlarda antrasiklinlerden fayda sağlayıp sağlamayacağını ortaya koyabilen en kuvvetli belirtecin kromozom 17 sentromer duplikasyonu olduğu, HER2/neu ve TOP2A'nın kromozom 17'de lokalize olmaları nedeniyle ortaya çıkan önceki çalışmalardaki tutarsızlıkların kromozom17 sentromer duplikasyonu ile açıklanabileceği yorumunu yapmışlardır.

Krishnamurti ve grubu 2010 yılında yayınladıkları çalışmalarında 365 hastada HER2/neu amplifikasyonu ve polizomi 17'nin invaziv meme kanserli hastalarda prognostik ve prediktif faktör olup olamayacağını araştırmışlardır (63). FISH ile yapılan çalışmada Polizomi 17 CEP17:hücre sayısı \geq 3,0 ve HER2/neu gen amplifikasyonu ise

HER2:Cep17>2,2 olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre 365 hastanın %23'ünde polizomi 17 saptanmış. FISH bulguları doğrultusunda olgular üç grupta toplanmıştır.

36 vaka normal(N) = HER2/neu gen amplifikasyonu ve polizomi 17 yok.

44 vaka (P)= polizomi 17 (HER2/neu gen amplifikasyonu yok)

35 hasta(A) = HER2/neu amplifikasyonu (polizomi 17 yok) olarak ele alınmış. Bu çalışmada gruplar nükleer grade, mitotik aktivite, Nottingham skoru, histolojik grade, tümör stage ve nodal tutulumu açısından karşılaştırılmıştır. 365 vakanın incelemesinde 83 (%23) olguda polizomi 17 saptanmış. (P) grubunda olan (HER2/neu gen amplifikasyonu olmadan polizomi 17) hastaların nükleer grade, mitotik aktivite, Nottingham skoru, histolojik grade, ER (-)'liği, evre ve kötü prognostik etki ile ilişkili olduğunu buna karşılık nodal tutulum ile polizomi arasında bir bağlantının olmadığını öne sürmüşlerdir.

Zhu ve ark.nın 2011 yılındaki yayınlarında retrospektif olarak 481 invaziv meme kanserli hastada HER2/neu geni incelenmiştir (151). HER2/neu geni FISH, proteini ise IHC ile değerlendirilmiştir. FISH analizi ile %57.4 oranında amplifikasyon ve %28.3 oranında polizomi 17 saptanmıştır. Polizomi 17'nin HER2 gen amplifikasyonu ile korelasyonunu ortaya koyarlarken HER2/neu protein ekspresyonu ile polizomi 17 arasında bir bağlantı olmadığını bildirmişlerdir.

Moelans ve ark.'nın 2010 yılında yayınladıkları çalışmada 111 invaziv meme kanseri olgusu polizomi 17 ve HER2, amplifikasyon ilişkisi açısından FISH yöntemi ile incelenirken kromozom 17 üzerinde lokalize 17 gende polizomi açısından MLPA yöntemi ile değerlendirilmiştir (84). Çalışma verileri değerlendirildiğinde sentromer sinyal fenotipine göre %19 olguda sentromer sinyal sayısı artışı gözlenmiş ve bu olguların %60'ında HER2 amplifikasyonu saptanmıştır. Ancak 111 olgunun hiçbirinde MLPA ile polizomi 17 verisi elde edilmemiş, sadece iki olguda 17q artışı belirlenmiştir. Kromozom 17p delesyonu bir olguda gözlenirken amplifikasyonu olan olgu saptanmamıştır. Bu veriler ışığı altında invaziv meme kanserinde gerçek tüm kromozom veya parsiyel p ya da q polizomisinin çok nadir olduğunu, sentromer 17 anormal kopya

sayısının yüksek oranda sentromer dizisi duplikasyonlarından kaynaklandığını yorumlamışlardır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda polizomi 17 olarak saptadığımız 14 olgunun gerçek polizomi olup olmadıklarının kromozom 17 amplikonlarının incelenmesi ile kesinlik kazanacağı düşüncesindeyiz.

Tablo 5.1. HER2/neu, TOP2A Genleri ve CEP17 Kopya Sayısı Değişikliklerinin Literatür Çalışmaları ile Karşılaştırılması

Araştırmacı	Olgu sayısı- Yöntem	Genler	Sonuç
Tsukamoto ve ark. (2001)	113 FISH	CEP 17 CEP 1 CEP 11	Polizomi %32.7 Monozomi ile ER(-) Polizomi ile PR(-) korele
Knoop ve ark. (2005)	805 FISH-IHC	HER2/neu TOP2A	HER2/neu Amp.%33- Postmenapoz, lenf nodu ³ ↑ve ER(-) ile beraber HER2/neu (+)lerin %56,9'unda TOP2 Aber.
Hicks ve ark. (2005)	180 FISH	HER2/neu TOP2A CEP17	HER2/neu (+) →TOP2A%50 amp. ,%16 del.%34 normal) HER2 normal(%63dizomi,%30polizomi,%7monozomi,%5TOP2A del)
Huang ve ark. (2005)	1362 IHC	HER2/neu ER PR	Çok değişkenli analizde; >45 yaş grade, ER- PR HER2'den bağımsız <45yaş ER-PR(-)liği HER2için prediktif
Lal ve ark. (2005)	3655 FISH IHC	HER2/neu ER PR	HER2/neu amp. %14.69 HER2/neu amp. yüksek grade ,ER-PR(-)ile ilişkili
Salido ve ark. (2005)	175 FISH IHC	HER2/neu CEP17	Polizomi%13 Monozomi%2 Polizomi ve HER2/neu bağımsız
Villman ve ark. (2006)	85 CISH	HER2/neu TOP2A	HER2/neu Amp.%45 TOP2A Amp.%16. HER2-TOP2A antrasiklinler için prediktif değil
Takehisa ve ark.(2007)	42 FISH	Kr.1,11 ve 17 sentromer	Polizomi 17 yüksek grade ve ER(+)liği ilişkili.Polizomide lenf nodu met.↑
Beşer ve ark. (2007)	50 FISH	HER2/neu TOP2A Kr.17	HER2/neu amp.%22 TOP2A aberasyonu %12
Sunami ve ark. (2008)	130 IHC,MS-PCR Elektroforez	HER2/neu ER	HER2/neu amp.%27 HER2/neu amp –ER bağımsız
Nielsen ve ark. (2008)	773 FISH	HER2/neu TOP2A	TOP2A amp.%11.9 TOP2A del.%11.3 HER2/neu amp.olan TOP2A aber.%56.5
Vanden Bempt ve ark. (2008)	226 FISH IHC RT PCR	HER2/neu Kr.17	104/226 (Polizomi %46) Polizomi(+)olan%59.62'ında sadece polizomi17, %40.39'da polizomi+HER2 amp.var.HER2(+) olanlarda ER(-) PR(-)ve yüksek grade

Lü ve ark. (2008)	200 FISH	HER2/neu CEP17	Polizomi%26ve HER2 amp.ile ilişkili İn.duk.kar.da polizomi %52.8 Polizomi yüksek grade,atipi ve lenf met. ile ilgili, yaş ile ilgisiz
Tubbs ve ark. (2009)	2123 FISH	HER2/neu TOP2A	HER2/neu Amp. %18.8 TOP2A aberasyonu%9.4 (%4 amp.%5.8 del.)HER2amp↑ ise yaşam süresi azalması
Arriola ve ark. (2009)	245 CISH IHC	HER2/neu TOP2A FISH-IHC	TOP2A amp.HER2/neu amp.ile beraber TOP2A amp.ER(+) ile beraber
Oakman ve ark. 2009	Kanada MA5 438(premenapoz) FISH	HER2/neu TOP2A	TOP2Aaberasyonu%18 (%12 amp.+%6del.)
Konency ve ark. 2010	373yüksek risk FISH	HER2/neu TOP2A	HER2/neu amp.%27 HER2(+)'ların %46TOP2A amp.,%18 del.
Bartlett ve ark. (2010)	1762 Mikroarray	HER2/neu TOP2A CEP17 Ki67 HER1	HER2/neu Amp.%21 TOP2A Amp.%10 TOP2A Del. %11 CEP17 Dup.%23
Krisnamurti ve ark.(2010)	365 FISH	HER2/neu CEP17	HER2/neuamp.grade,mitotik akt.,grade,evre ,ER(-)ilgili Polizomi%23ve nod ile ilgisiz
Zhu ve ark.(2011)	481 FISH IHC	HER2/neu CEP17	HER2/neu amp.%57.4,polizomi%28.3 HER2/neu prt.ile polizomi bağlantısız
Moelans ve ark.(2011)	111 FISH MLPA	HER2/neu CEP17	Gerçek tüm kromozom17 polizomisi yok. Polizomilerde CEP17 duplikasyonu(+)
ÇALIŞMAMIZ	60 FISH	HER2/neu TOP2A CEP17	HER2/neu amp.%25 HER2/neu amp.vakaların çoğu gradeIII HER2/neu amp.çoğu ER(-)PR(-) HER2/neu amp. çoğu dizomi HER2/neu amp.olanlarda (TOP2A del%13.3 -amp.%53.4) Polizomi %23 Polizomide yüksek grade ve PR(-)fazla

5.1.2. Meme Kanserli Hastalarda RASSF1A ve APC Gen Metilasyon Değişikliklerinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

'*Epigenetik*' DNA dizisinde değişiklik yapmayan ancak kalıtılabilir bir ifade değişikliğidir (140). Kansere oluşumunda genetik değişiklikler kadar epigenetik mekanizmalar da sorumlu tutulmaktadır. Epigenetik mekanizmalardan üzerinde en çok çalışılan DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu mutasyonlardan daha sık meydana gelir ve geri dönüşümlü bir olaydır (140). Karsinogenezin erken evrelerinde meydana geldiği için genetik özgü bir olaydır ve bu nedenle erken tanı için kullanılabilir. Geri dönüşümlü bir olay olması da yeni tedavi protokollerinin gelişmesinde rol oynamaktadır.

RASSF1A geni 3p21.3 bölgesine lokalize olan tümör baskılayıcı bir genidir. Mikrotubul stabilizasyonu, apoptotik sinyalizasyon ve hücre siklusunun düzenlenmesinde rol alır (105). Meme kanseri dahil olmak üzere pek çok kanser türünde hipermetile olduğu saptanmıştır.

APC Geni ise 5 q21 bölgesine lokalize olup kolorektal kanser oluşumunda önemli rol oynar. Otozomal dominant germline mutasyonları bağırsakta çok sayıda polipe karakterize olan familial adenomatöz polipozis (FAP) ile sonuçlanır. APC geni etkisini transkripsiyonel aktivatör olan β -catenin üzerinden yapar. Fonksiyonel kaybında hücre büyüme kontrolü bozulur. APC gen promotor hipermetilasyonu meme kanserinde uygulanan yöntemlere göre değişen oranlarda (%28-53) gösterilmiştir (133).

Meme kanserinde tanıya ve tedaviye yönelik yeni belirteçlerin belirlenmesi için yıllardır pek çok çalışma yapılmaktadır. HER2/neu geni meme kanserinde prognostik ve terapötik öneme sahip bir belirteçtir. Bu çalışmada bu genin yanı sıra TOP2A geni ve kromozom 17 kopya sayısı değerlendirilmiştir. Ancak metilasyon paternlerindeki değişikliklerin de incelenmesi meme kanserinde moleküler yapının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu amaçla MS-HRM gibi sensitif bir yöntemle RASSF1A ve APC gen

metilasyonları incelenerek HER2/neu, TOP2A genleri ve CEP17 kopya sayısı değişikliği ve metilasyon arasındaki bağlantı irdelenmiştir.

Virmani ve arkadaşlarının 2001 yılındaki yayınlarında meme ve akciğer kanserlerinde APC gen promotor hipermetilasyonunu araştırılmıştır (136). 77 meme kanserli, 50 küçük hücreli akciğer ve 106 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve 68 non-malign hücre hattında APC gen promotor 1A'nın metilasyon durumu MS-PCR ile, ekspresyon analizi RT-PCR ile incelenmiştir. 77 meme kanserli dokunun 34'ünde ve hücre hattında metilasyon saptanmıştır(%44). Meme kanserindeki metilasyon sıklığı tümör boyutu ve stage ile artış göstermiştir.

Jin ve grubunun 2001 yılında yayınladıkları çalışmada 50 kanserli ve 21 normal meme dokusunda APC gen metilasyonunu incelenmiştir (53). MS-PCR kullanarak yapılan bu çalışmada metilasyon oranını 18/50 (%36) olarak bulunmuştur. 21 sağlıklı dokuda hiç metilasyon saptanmamıştır. Bu sonuçların ışığında hipermetilasyonun kansere spesifik bir olay olduğunu savunmuşlardır. APC promotor hipermetilasyonu ile hasta yaşı, stage, histolojik tip, lenf nodu metastazı, tümör boyutu, ER ve PR durumu arasında belirgin bir ilişki bulunamamıştır.

Roa ve arkadaşlarının 2004 yılındaki yayınladıkları çalışmada meme kanserli hastalardaki farklı karsinojenik mekanizmayı ve biyolojik davranışı incelemek için CDKN2A (p16), hMLH1, APC, CDH1 (Cadherin E) ve FHIT genlerine ait metilasyon paternleri incelenmiştir (112). Bu amaçla 70 taze tümör dokusunda MS-PCR yöntemi kullanılarak yapılan incelemede çalışılan örneklerin %88'inde en az 1 gen metile bulunmuştur. APC gen metilasyonu %52,9 olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca APC gen hipermetilasyonu büyük boyutlu tümör ile ilişkili olduğu saptanmıştır .(p<0.05)

Parrella ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladıkları çalışmada sporadik meme kanserinde hipermetilasyonu değerlendirmek amacıyla 10 genin metilasyon durumunu MS-PCR ile incelenmiştir (103). 54 primer meme kanseri ve 10 benign meme lezyonunda yapılan bu çalışmada tümörlü dokunun %85'inde, benign meme dokusunun %70'inde en azından bir gen için hipermetilasyon saptanmıştır. Çalışılan genlerden biri olan APC gen metilasyonu %28 olarak bulunmuştur. Taze doku ve parafinize dokular arasında metilasyon farkı saptanmamıştır.

Bae ve arkadaşlarının 2004 yılındaki yayınlarında meme kanserinin histopatolojik tipleri ile hipermetilasyon arasındaki ilişki araştırılmıştır (4). Duktal, lobuler ve müsinöz invaziv karsinom tiplerini içeren 109 taze tümör dokusunda 12 farklı genin metilasyonu MS-PCR ile incelenmiştir. (60 invaziv duktal karsinom, 30 müsinöz kanser, 19 invaziv lobüler kanser) Farklı hücresel görevlere sahip olan bu genlerden biri olan RASSF1A geni olguların %85'inde metile bulunmuştur.

Widschwendter ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladıkları çalışmada 148 meme kanserli olguda 65 metilasyon marker durumu incelenmiştir (141). RASSF1A gen promotor metilasyonunun ileri evre meme kanseri ve hormon reseptör durumu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. APC gen metilasyonu ise ER (+)'liği ile korele bulunmuştur.

Meme kanserinde metilasyon yönünden en çok incelenen genlerden birisi olan RASSF1A gen promotor metilasyonu pek çok çalışmaya konu olmuştur. Farklı zamanlarda ve yöntemlerle incelenen bu gende metilasyon oranları değişmekle birlikte genellikle metilasyon oranı yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda incelenen 60 olguda RASSF1A gen metilasyonu 58/60(%96.6) olarak değerlendirilmiştir. Diğer çalışmalara göre daha yüksek oranda tesbit edilen değerler yöntemin hassasiyetine ve örneklerin tam tümör dokusu içeren kısımlardan alınmasına bağlanmıştır. MS-HRM analizi diğer yöntemlerden daha sensitif olup 1/1000 yüzdesinde bile sonuç verebilmektedir.

APC gen metilasyonu ise 26/60 (%43.3) olarak değerlendirilmiştir. Bu değer literatürde sözü geçen pek çok çalışma ile uyumludur.

Dulaimi ve arkadaşları 2004 yılındaki yayınlarında 34 meme kanserli dokuda ve serumda karşılaştırmalı olarak **RASSF1A**, **APC**, **DAPK** gen metilasyonu incelenmiştir (24). MS-PCR kullanılan çalışmada tümör DNA'sında %94 oranında bir veya fazla genin metile olduğunu bulunmuştur. Tümör dokusunda **RASSF1A**%65, **APC** %47 metile olarak değerlendirilmiştir. Duktal karsinoma in situ, lobuler karsinoma in situ, stage I invaziv duktal karsinom ve lobüler kanser hasta serumlarında %7 metilasyon saptanmıştır ancak normal sağlıklı kadın, non-neoplastik veya inflamatuvar meme hastalığı olan hastaların serumunda metilasyon saptanmamıştır. Tümör dokusunda unmetile olan bir gen serumda da mutlaka unmetile bulunmuştur.(%100 spesifite)

Shinozaki ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları yayında 151 meme kanserli hastanın tümör dokusunda MS-PCR ile **RASSF1A**, **APC**, **TWIST**, **CDH1**, **GSTP1** ve **RAR-B2** metilasyonunu incelenmiştir (121). **RASSF1A** gen metilasyonu %81 değerinde saptanmıştır. Bu metilasyon ER (+) ve HER2/neu gen (+)'liği ile birliktelik göstermiş. **APC** gen metilasyonu ise %49 olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda **RASSF1A** geni ER (-) ve PR (-) olan tüm olgularda metile bulunmuştur. Bu sonuç *Shinozaki ve arkadaşlarının* verileri ile uyum göstermemiştir.

Bizim çalışmamızda **RASSF1A** geni HER2/neu gen amplifikasyonu ile birliktelik göstermiştir. Bu tümör agresifliğinin artışı olarak yorumlanabilir. Bu veriler *Shinozaki ve arkadaşlarının* değerleri ile uyumludur.

Liu ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada meme kanserli hastalarda **APC** gen promotor 1A durumu, protein ekspresyonu ve klinikopatolojik özellikleri ile ilişkisi araştırılmıştır (73). 2003-2005 yılları arasında opere olan hastaya ait 76 meme tümör dokusu ve komşu normal dokuda **APC** gen metilasyonu MSP ile protein ekspresyonu ise IHC ile incelenmiştir. **APC** gen metilasyonu komşu meme dokusuna göre oldukça metile bulunmuştur ($P < 0.05$). **APC** promotor metilasyonu TNM durumu ile pozitif olarak ilişkili bulunmuştur ($p < 0.05$) 76 kanserli olgunun kanserli dokuya komşu olan dokusu metile bulunmamıştır. Kanserli ve non-kanserli dokulardaki metilasyon farkı anlamlı bulunmuştur. ($p \leq 0.05$) Metilasyon durumu yaş, tümör boyutu, histolojik grade, ER, PR, HER2/neu geni ve aksiler lenf tutulumu ile ilişkili bulunamamıştır.

Bizim çalışmamızda da **APC** gen metilasyonu ile grade, ER, CEP17 durumu arasında ilişki kurulamamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da **APC** geninin aktif olduğu olgularda PR (-)'liği ön plandadır.

Feng ve grubunun 2007'deki çalışmalarında meme kanseri ile ilişkili genlerin metilasyonu ile ER-PR durumlarının ilişkisi incelenmiştir (30). Çalışmada pyrosekans yöntemi kullanılarak 90 malign ve normal meme dokusunda 12 tümör baskılayıcı genin metilasyon analizi yapılmıştır. ER ve PR IHC ile incelenmiştir. İncelenen genlerden **RIL**, **HIN1**, **RASSF1A**, **CDH13** ve **RARb2** geni normal dokuda unmetile (%1-4)olarak

değerlendirilmiştir. RASSF1A gen metilasyonu tümör dokusunda oldukça metile (%58) bulunmuştur. Tek değişkenli analizlerde ER pozitifliği RASSF1A metilasyonu ile birlikte bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda ER (+) olan 35 olgu vardı. Bunların 33/35 'i RASSF1A geni açısından metile bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da RASSF1A gen metilasyonuna ER (+)'liği eşlik etmiştir.

Park ve grubu 2007 yılındaki yayınlarında meme kanseri prognozu ile ilgili olduğu düşünülen **RASSF1A** ve **APC** genlerinin metilasyon durumu MS-PCR ile incelenmiştir (101). Bunun için 2001 Ocak-2003 Aralık süreleri arasında opere olmuş 110 hasta değerlendirilmiştir. 16 hastada metastaz bulunduğu için bu gruba dahil edilmemiştir. Metastaz olmayan 17 hasta doku grubu olarak değerlendirilmiş, 47 hasta ise serum değerlendirilmesine tabi tutulmuştur. Bu çalışma grubunda APC metilasyonu evre 2-3 olanlarda %50 ve %94 olarak bulunmuştur. RASSF1A gen metilasyonu ise aynı evrelerde %68.7 ve %65 olarak değerlendirilmiştir. Her iki genin metilasyonu evre 2 rekürrens gösteren hasta grubunda % 42.9 olarak bulunmuştur. Evre 3 rekürrens gösteren hastalarda ise % 77.8 olarak değerlendirilmiştir. Serum değerlendirilmesi yapılan grupta RASSF1A gen metilasyonu ve rekürrens arasında istatistiksel korelasyon bulunmuştur($p=0.013$). Metilasyonu olan 16 hastanın 5'i rekürrens gösterirken, non-metile olan 31 hastanın sadece 1 tanesi rekürrens göstermiştir. Böylece meme kanserinde metilasyon ve rekürrens arasında bağlantı olduğunu savunmuşlardır.

Metilasyon paterni kanserin erken evrelerinde ortaya çıkan bir değişikliktir. Çalışmamızda incelenen hastalar yüksek risk grubuna dahil oldukları için hepsi ileri evrede hastalardı ve hepsinde lenf veya yakın - uzak metastaz mevcuttu.

Lee ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladıkları çalışmada meme kanserinin insidansı ve dağılımında etnik farklılığı incelenmiştir (69). Bu amaçla Amerika'daki Kafkas ve Kore kökenli kadınlarda inceleme yapılmıştır. Kore kökenli 67 ve Kafkas kökenli 50 meme kanserli kadını ER durumu ve yaşa göre dört kategoriye göre ayırarak HIN-1, Twist, Cyclin D2, RAR- β , GSTP1, **RASSF1A** ve CDH1 genlerine ait metilasyon durumu MS-PCR ile incelenmiştir. İki ırk arasındaki metilasyon oranı benzer şekilde değerlendirilmiştir. RASSF1A metilasyonu Koreli kadınlarda %82

bulunurken, Kafkas kadınlarda %76 olarak bulunmuştur. Irklar arasındaki metilasyon farkı anlamlı bulunmamıştır.

Park ve arkadaşları 2007 yılında yayınladıkları çalışmada farklı kanser tiplerindeki metilasyon araştırmışlardır (102). Meme kanseri (invaziv duktal karsinom n=24) , mide kanseri (adenokarsinom n=61) , kolon kanseri (adenokarsinom n=48), akciğer kanseri (adenokarsinom n=24) , larinks kanseri (skuamoz hücreli n=37), hepatosellüler kanser (n=47) , serviks kanseri (skuamoz hücreli n= 46), prostat kanseri(adenokarsinom n=40) olmak üzere 8 farklı tipten 328 tümörlü dokuda çalışılmıştır. Kore’li hastalarda yapılan bu çalışmada **APC**, **COX-2**,**DAP-kinaz**, **E-kaderin**, **GSTP1**, **hMLH1**, **MGMT**, **p14**, **p16**, **RASSF1A**, **RUNX3**, **THBS1** ve **TIMP-3** genleri ait metilasyon durumu MS-PCR yöntemi ile incelenmiştir. **RASSF1A** ve **APC** geninin meme kanserindeki metilasyon oranları %50 ve %33 olarak bulunmuştur.

Li ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladıkları çalışmada sporadik meme kanserli 36 Çinli kadında kanser dokusunda ve komşu dokuda **RASSF1A** metilasyonunu ve ekspresyonunu incelenmiştir (70). Yaptıkları çalışmada tümör dokusunda **RASSF1A** metilasyonunu % 61,1 olarak bulunmuştur. Çalışmada MS-PCR, semi-quantatif RT-PCR ve IHC yöntemlerini kullanılmıştır. 36 meme kanserli dokunun %66.6’sı hipermetilasyon göstermiştir. Tümörün komşu dokusunda metilasyon saptanmamıştır. Kanserli doku ve komşu dokusu arasında bariz metilasyon farklılığı saptanması ($p < 0.05$) nedeniyle meme kanserinde **RASSF1A** gen metilasyonunun tümörlü dokuda fazla olduğunu ileri sürmüşlerdir. Meme kanserinde **RASSF1A** metilasyonunu hasta yaşı, histolojik tip, TNM stage ve lenf nodu metastazı gibi klinik parametrelerle korele bulunmamıştır.

Sunami ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladıkları çalışmada ER(+) 65 ve ER(-) 65 hastaya ait tümör dokusunda 7 gene ait metilasyon durumunu incelemişlerdir (125). ER durumu ile epigenetik özelliklerin ilişkisini araştırılmıştır. Hastaların HER2/neu gen durumu IHC ile değerlendirilmiştir. **APC** gen metilasyonu ER (+)’liği ile korele bulunmuş. T1c ve T2 evresinde ER (+) ve ER (-) gruplar arasında **RASSF1A** ve **APC** gen metilasyonu kıyaslandığında ER (+)olan olgularda T evresinden bağımsız olarak **RASSF1A** belirgin şekilde metile bulunmuştur. Bu bulgu tümör T1c evresinden T2

evresine geçişte metilasyonda bariz farklılık olmadığını göstermiştir. Ayrıca lenf nodu metastazı olan ve olmayan gruplarda metilasyon farkı bulunmamıştır. ER (+) ve ER (-) gruplar arasında erken evrelerde RASSF1A gen metilasyonunda fark bulunmuştur. Bu bulgular ER durumunun erken evrelerde epigenetik değişiklere katkıda bulunduğunu göstermiştir. HER2/neu geni (+) olanlarda **RASSF1A** ve **APC** bariz olarak daha metile bulunmuştur. Double negatif (ER ve HER2/neu negatif) olan grupta **RASSF1A** ve **APC** genleri HER2/neu (+) veya ER (+) olan gruplara göre daha sık metile bulunmuştur. Bu bulgulara göre ER ve HER2/neu gen durumunun **RASSF1A** ve **APC** ekspresyonuna ayrı ayrı katkıda bulunduğunu savunmuşlardır.

Cho ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları çalışmada 40 hastaya ait kanserli meme dokusu, komşu doku ve hasta kanında 8 tümör baskılayıcı gene (**RASSF1A**, **APC**, HIN1, BRCA1, CYCLIND2, RAR β , CDH1 ve TWIST1) ve LINE1, Sat2M1,AluM2 gibi tekrarlayan dizilere ait metilasyon durumu MethyLight assay yöntemi ile incelenmiştir (16). Tümör dokusu(n=40), komşu doku(n=27) ve kan(n=40 ve kontrol) olmak üzere çalışılmıştır. Tümör dokusunda **RASSF1A**, HIN1 ve **APC** metilasyonu (%**82,5**, %75, %**52,5**) ve komşu dokuda (%**85,2**, %70,4 , %**44,4**) olmak üzere oldukça metile bulunmuştur.

Van der Auwera ve arkadaşlarının 2010 yılındaki yayınlarında Quantitatif metilasyon spesifik PCR (qMSP) ile primer tümör dokusunda ve ona komşu normal dokuda olmak üzere 6 gen (DAPK, TWIST, HIN-1,**RASSF1A**, RARb2 ve **APC**) metilasyonu incelenmiştir (132). 56 kanserli meme dokusu ve bu hastalardan alınan normal doku ile 9 sağlıklı kadından alınan normal meme dokusu ile çalışılmıştır. Meme kanserli hastalardan alınan normal meme dokusu ile sağlıklı kişilerden alınan doku bariz farklılık göstermiştir. RASSF1A (p=0.03) ve APC(p=0.04) Kanserli hastaların normal dokusundaki metilasyon oranı kanserli dokuya göre daha az metilasyon özelliği göstermiştir. (p< veya =0.01). RASSF1A gen hipermetilasyonu ilerlemiş meme kanserli hastalarda komşu dokuda daha fazla metile bulunmuştur. APC gen metilasyonu ise ER pozitif meme kanserli hastaların komşu dokusunda daha fazla metile bulunmuştur.

Xu ve grubunun 2010 yılındaki yayınlarında meme kanser etyopatogezinde rolü olduğunu düşündükleri BRCA1, **APC** ve p16 gen metilasyonunu incelemişlerdir (146).

1996-1997 yılları arasında primer meme kanseri ve in situ meme kanseri tanısı almış 800 meme tümör dokusunda inceleme yapılmıştır. MethyLight yöntemi ile incelenen APC gen metilasyon oranı %48,4 olarak bulunmuştur. Unmetile hastalarla kıyaslandığında APC hipermetilasyonu ile ölüm riskinin %46 arttığı görülmüştür.

Karray-Chouayekh ve arkadaşlarının 2010 yılındaki yayınlarında Tunuslu 78 meme kanserli hastada **RASSF1A**, RARb2, CDH1 ve p 16 gen metilasyonu MS-PCR ile araştırılmıştır (55). RASSF1A gen promotor bölge hipermetilasyonu %87 bulunmuştur. Bu sonucun azalmış survi ($p=0,014$), yaş ($p=0,048$) ve stage ($p=0,033$) ile ilişkili bulunması nedeniyle RASSF1A metilasyonunun kötü prognoz için iyi bir belirteç olabileceği öngörülmüştür.

Çalışmamızda takipli hasta sayısı oldukça az olduğu için RASSF1A ve APC gen metilasyonu ile yapılan yaşam analizlerinde anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

RASSF1A gen metilasyonu ve CEP17 değerlendirilmesinde polizomi saptanan olgularının hepsinde RASSF1A geninde metilasyon saptanmıştır.

Meme kanserli hastaların RASSF1A gen metilasyonu ve TOP2A gen dağılımı incelendiğinde TOP2A gen delesyonu olan hastaların tümünde RASSF1A geninin farklı oranlarda metile olduğu gözlenmiştir. TOP2A gen amplifikasyonu olan 13/14 hastada yine farklı oranlarda metilasyon izlenmiştir. TOP2A gen aberasyonunun RASSF1A gen metilasyonu ile birliktelik gösterdiği söylenebilir.

Çalışmamızda meme kanserli hastaların APC gen metilasyonu ve TOP2A gen dağılımında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmıştır. TOP2A geni normal bulunan hastalarda unmetilasyon fazla bulunmuştur yani gen aktif durumdadır. TOP2A gen delesyonu olan vakaların 2/4'ünde APC geninin metile olduğu gözlenmiştir.

Tablo 5.2. RASSF1A ve APC Gen Metilasyon Durumunun Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

Literatür	Olgu Sayısı- Teknik	Genler	Metilasyon Sonuç
Virmani ve ark. (2001)	77 MS-PCR	APC	Met. %44 Metil.tm boyutu ve stage ile artış göstermiş
Jin ve ark. (2001)	50 tümör 21 normal MS-PCR	APC	Metil.%36 Met. yaş,stage,lenf met.,tm boyutu,hist.tip,ER,PR ile ilgisi yok
Roa ve ark. (2004)	70 MS-PCR	APC	Metilasyon%52.9 Met.tm boyut artışı ile ilgili
Parrella ve ark. (2004)	54 tümör 10 benign MS-PCR	APC	Tümörde metil.%28
Bae ve ark. (2004)	109 MS-PCR İn.duk.kar. İn.lob.kar. Musinoz kar.	RASSF1A	Metilasyon %85
Widschwendter ve ark. (2004)	148 IHC MethyLight	RASSF1A APC	RASSF1A met. ileri evre ve hormon res.ile ilişkili APC metil.ER(+),korele
Dulaimi ve ark. (2004)	34 MS-PCR	RASSF1A APC	Tm.dokusunda RASSF1A %65 APC %47
Shinozaki ve ark. (2005)	151 MS-PCR	RASSF1A APC	RASSF1A met. %81 ER(+),HER2/neu(+)ile ilgili APC met.%43
Liu ve ark. 2007	76 MSP-IHC	APC	Kanserli ve non-kanseröz dokuda met. farklı. Met.TNM ile ilgil
Feng ve ark. (2007)	90 Pyrosekans IHC	RASSF1A	Tm. dokusu %58 RASSF1Ametil.ER(+) beraber
Park ve ark. (2007)	110 MS-PCR	RASSF1A APC	Stage II - III RASSF1 % 68.7- 65 APC %50- 94 Metil. rekürrens bağlantılı
Lee ve ark. (2007)	67 Koreli 50 Kafkas MS-PCR	RASSF1A	Kafkas %76 Kore %82

Park ve ark. (2007)	24 MS-PCR	RASSF1A APC	RASSF1A %50 APC %33
Sunami ve ark. (2008)	65 ER(+) 65 ER(-) IHC MS-PCR	RASSF1A APC	APC met.ER(+)ile korele ER erken evrede RASSF1A met. üzerine etkili RASSF1A ve APC Double (-)grupta HER2(+) veya ER(+) olana göre daha metile
Cho ve ark. (2010)	40 MethyLight	RASSF1A APC	Tümör—Komşu doku RASSF1A %82.5 --%85.2 APC %52.5--%44.4
Van der Auwera ve ark. (2010)	56 tümörlü 9 normal doku Q-MSP	RASSF1A APC	RASSF1ileri evrede komşu dokuda fazla metile APC ER(+)komşu dokuda fazla metile
Xu ve ark. (2010)	800 MethyLight	APC	Metil.%48.4 Ölüm riskinde %46 artış(unmetileye göre)
Karray-Chouayekh ve ark. (2010)	78 MS-PCR	RASSF1A	Metil.%87 Metil.kötü survi,yaş,stage ile ilişkili
ÇALIŞMAMIZ	60 MS-HRM	RASSF1A APC	RASSF1A %96.6 APC % 43.3 HER2/neu amp. ve polizomi olan olgularda RASSF1A metile APC unmetile olguların çoğundaPR(-),TOP2A normal TOP2Aamp.olgularda APC %64 metile

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

En çok araştırma yapılan kanserlerden biri olan meme kanserinin tanı ve prognozunu tayin etmede her geçen gün yeni belirteçler bulunmakta ve gündeme gelmektedir.

Aynı histopatolojik tipe sahip olsa da kişiler arası tedaviye cevap, nüks olmayan ve toplam yaşam sürelerinde farklılıklar olması meme kanserinin farklı moleküler yapısından kaynaklanmaktadır. Moleküler yapının aydınlatılabilmesi için çalışmalar yoğun şekilde devam etmektedir. Kanser ve metilasyon arasındaki ilişkinin son yıllarda önem kazanması ile bu yönde pekçok çalışma yapılmaktadır.

Bu çalışmada meme kanseri etyopatogenezinde rol oynadığı düşünülen RASSF1A ve APC gen promotor metilasyonu ülkemizde ilk kez MS-HRM analizi ile çalışılmıştır. Yüksek riskli gruba dahil 60 olguda HER2/neu, TOP2A genleri ve CEP 17 kopya sayısı değişiklikleri, histopatolojik tip, grade, ER, PR durumu ve yaşam süreleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca RASSF1A-APC gen metilasyonu incelenerek bu değerler ile ilişkisi irdelenmiştir.

- HER2/neu gen amplifikasyonu %25 oranında saptanmıştır. HER2/neu gen amplifikasyonu olan vakaların %53.4’de TOP2A gen amplifikasyonu, %13.3’ünde TOP2A gen delesyonu olmak üzere toplam %66.7 oranında TOP2A gen aberasyonu saptanmıştır.
- Çalışmamızda HER2/neu gen amplifikasyonu olan örneklerin çoğunluğunu Grade III olgular oluşturmuştur. HER2/neu gen amplifikasyonu saptanan örneklerde ER ve PR negatifliği daha çok görülmüştür.
- Çalışmamızda TOP2A gen aberasyonu tüm olgularda 18/60 (%30) (%23.3 amplifikasyon, %6.7 delesyon) oranında gözlenmiştir. Bu oranın yüksek oluşunun olguların yüksek riskli grup olması ile ilintili olduğu düşünülmüştür.
- Kromozom 17 kopya sayısı değişikliği 14/60 (%23.3) polizomi , 9/60 (%15) monozomi olmak üzere toplam 23/60 (%38.3) örnekte saptanmıştır. Polizomi 17 olan olgularında PR (-)’liği ve ER (+)’liği ön planda görülmüştür..

- HER2/neu gen amplifikasyonu ile polizomi arasında bağlantı saptanamamıştır.
- Veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da HER2/neu ve TOP2A gen amplifikasyonu ve polizomi 17 ileri yaştaki olgularda daha fazla görülmüştür.
- RASSF1A gen metilasyonu 58/60 (%96.6), APC gen metilasyonu ise 26/60 (%43.3) olarak değerlendirilmiştir.
- Çalışmamızda HER2/neu gen amplifikasyonu olan tüm olgularda RASSF1A geni farklı oranlarda olmak üzere metile bulunmuştur. Bu, HER2/neu gen amplifikasyonunun epigenetik özelliklere katkısı olduğunu düşündürmüştür. Aynı şekilde polizomi 17 olgularının tümünde de RASSF1A geni metile bulunmuştur.
- TOP2A gen delesyonu olan tüm hastalarda RASSF1A geni farklı oranlarda metiledir. TOP2A gen amplifikasyonu olan 13/14 hastada yine farklı oranlarda metilasyon izlenmiştir. TOP2A gen aberasyonu da RASSF1A gen metilasyonu ile birliktelik göstermiştir.
- Çalışmamızda APC gen metilasyonu ve TOP2A gen dağılımında istatistiksel olarak anlamlı değer saptanmıştır. TOP2A geni normal bulunan olguların %64'ünde APC geni unmetile bulunmuştur yani gen aktif durumdadır.

Heterojen bir hastalık olan meme kanserinde HER2/neu geninin yanı sıra metilasyon gibi farklı belirteçlerin kullanılması hastaların tedavi seçeneği ve yaşam süresinin artması yönünde olumlu katkıda bulunacaktır. Epigenetik özelliklerin geri dönüşümlü olması yeni tedavi protokollerinin gündeme gelmesini sağlayacaktır. Bu amaca hizmet eden çalışmamızdaki bu genlerle yapılacak olan farklı çalışmalar konudaki görüşleri güçlendirecektir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. American Joint Committee On Cancer. : AJCC Cancer Staging Manuel.6th ed.New Yorkk, NY: Springer, 2002, 171-180 p.
2. Arriola, E., Rodriguez-Pinilla, S. M., Lambros, M. B., Jones, R. L., James, M., Savage, K., Smith, I E., Dowsett, M., Reis-Filho, J. S., 2007, Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer, *Breast Cancer Res Treat.*, 106, 2, 181-9 p.
3. Artan, S.,1999, Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, 51-59 s.
4. Bae, Y. K., Brown, A., Garrett, E., Bornman, D., Fackler, M. J., Sukumar, S., Herman, J. G., Gabrielson, E.,2004 , Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer, *Clin Cancer Res.*, 10, 18, 5998-6005 p.
5. Bartlett, J. M., Munro, A. F., Dunn, J. A., McConkey, C., Jordan, S., Twelves, C. J., Cameron, D. A., Thomas, J., Campbell, F. M., Rea, D. W., Provenzano, E., Caldas, C., Pharoah, P., Hiller, L., Earl, H., Poole, C. J.,2010 , Predictive markers of anthracycline benefit:a prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial(NEAT/BR9601) , *Lancet Oncol.*, 11, 3, 266-74 p.
6. Basham, V.M., Lipscombe, J.M., Ward , J.M., Gayther, S.A., Ponder, B.A., Easton, D.F., Pharoah, P.D., 2002 , BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer, *Breast Cancer Res*, 4,1 , 2
7. Başaran, N.,1999 , Tıbbi Genetik.8. Baskı. Güneş &Nobel Kitabevi, 373-384 s.
8. Başaran, N.,1996 , Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon FISH .Ed. Başaran, N.,GENTAM Eskişehir, 11-57 s.
9. Berx, G., Cleton-Jansen , A.M., Nollet, F., et al.,1995, E-Cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers, 14, 24, 6107-15.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

10. Beser, A. R., Tuzlali, S., Guzey, D., Dolek Guler, S., Hacihanefioglu, S., Dalay, N.,2007, HER-2, TOP2A and Chromosome 17 Alterations in Breast Cancer, Pathol Oncol Res. , 13, 3, 180-5.
11. Beyzadeoğlu, M.M., Ebruli,C.C.,2008, Temel Radyasyon Onkolojisi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 297-302 s.
12. Bora, G., Yurter, E .H.,2007 , Epigenetik ve tedavi yaklaşımları, Hacettepe Tıp Dergisi, 38, 48-54.
13. Burbee, D.G., Forgacs, E., Zchbauer-Müller, S., Shivakumar, L., Fong, K., Gao, B., Randle, D., Kondo, M., Virmani, A., Bader, S., Sekido, Y., Latif ,F., Milchgrub, S., Toyooka, S., Gazdar, A.F., Lerman, M.I., Zabarovsky, E., White ,M., Minna, J.D.,2001, Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression, J Natl Cancer Inst., 93 , 9 ,691-9.
14. Cayre, A., Mishellany, F., Lagarde, N., Penault-Llorca, F., 2007, Comparison of different commercial kits for HER2 testing in breast cancer: looking for the accurate cutoff for amplification , Breast Cancer Res. , 9, 5, 64.
15. Chiu, R. W., Chim, S. S., Wong, I. H., Wong, C. S., Lee, W. S., To, K F., Tong ,J. H., Yuen, R. K., Shum, A. S., Chan, J. K., Chan, L. Y., Yuen, J .W., Tong, Y. K., Weier,J. F., Ferlatte ,C., Leung ,T. N., Lau, T. K., Lo, K. W., Lo, Y. M., 2007, Hypermethylation of RASSF1A in Human and Rhesus Placentas, Am J Pathol., 170, 3 , 941-50.
16. Cho, Y. H., Yazici, H., Wu, H. C., Terry, M. B., Gonzalez, K., Qu, M., Dalay, N., Santella, R. M., 2010, Aberrant Promotor Hypermethylation and Genomic Hypomethylation in Tumor, Adjacent Normal Tissues and Blood from Breast Cancer Patients, Anticancer Res., 30 ,7, 2489-96.
17. Cooper, G. M., Hausman, R. E., Hücre, 2006, (ev.:Sakızlı, M.,Atabey,N.), İzmır Tıp Kitabevi, İzmır, 631-64 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

18. Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Seidel, C., Strunnikova, M., Rastetter, M., Baier, K., Pfeifer, G. P., 2005, The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update, *Histol Histopathol.*, 20, 2, 645-63.
19. Das, M. P., Singal, R., 2004 ,DNA methylation and cancer, *JCO*, 22, 22 ,4632-4642.
20. Debeleş-Bütüner, B., 2006, Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları Ve Kanslerle İlişkisi, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi.*, 35, 2, 149-170 .
21. Di Leo, A., Isola, J., 2003, Topoisomerase II alpha as a marker predicting the efficacy of anthracyclines in breast cancer: are we at the end of the beginning?, *Clin Breast Cancer.*, 4, 3, 179-86.
22. Donegan, W.L., 1995, Staging and primary treatment, In: Donegan, W.L, Spratt, J.S, *Cancer of the breast. 4thed. W.B.Saunders, 4th ed. Philadelphia (PA): Saunders , 375-442 p.*
23. Donniger , H., Vos, D.M., Clark, G. J., 2007, The RASSF1A tumor supressor, *J Cell Sci* ,120, 3163-3172.
24. Dulaimi, E., Hillinck, J., Ibanez de Caceres, I., Al-Saleem, T., Cairns, P., 2004, Tumor Suppressor Gene Promoter Hypermethylation in Serum of Breast Cancer patients, *Clin Cancer Res.* , 10, 18, 6189-93.
25. Dworkin, A .M., Huang, T. H., Toland, A. E., 2009, Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment , *Semin Cancer Biol.*,19, 3, 165-71.
26. Ekmekçi, A., 2006,. *Gen Genetik Değişim ve Hastalıklar. Gazi Kitabevi; 217-220 s.*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

27. Engin, K.,2005,. Meme Kanserleri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 27-49 s.
28. Esteller, M., Cancer epigenetics: DNAmethylation and chromatin alterations in human cancer, New Trends In Cancer For The 21th Century, Edited by Llombart-Bosch and Felipe, Kluwer Academic/Plenum publishers p.39-49.
29. Esteller, M., Sparks, A.,Toyota, A.,Sanchez-Cespedes, M.,Capella, G.,Peinado, M., A.,Gonzales, S.,Tarafa, G.,Sidransky, D.,Meltzer, J.S.,Baylin, S.B.,Herman, J. G.,2000, Analysis of Adenomatous Polyposis Coli Promoter Hypermethylation in Human Cancer, Cancer Res, 60, 16, 4366-71 p.
30. Feng, W., Shen, L., Wen, S., Rosen, D. G., Jelinek, J., Hu, X., Huan, S., Huang, M., Liu, J., Sahin, A. A., Hunt, K. K., Bast, R.C Jr., Shen, Y., Issa, J .P., Yu, Y., 2007, Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers, Breast Cancer Res, 9 ,4, 57
31. Fiszman, G.L., Jasnis, M.A., 2011, Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer, Int.Jour.of Bre, Epub 2011
32. Fitzgibbons, P.L., Page, D.L., Weaver, D., Thor, A.D., Allred, D.C., Clark, G.M., Ruby, S.G., O'Malley, F., Simpson, J.F., Connolly, J.L., Hayes ,D.F., Edge, S.B., Lichter, A., Schnitt ,S.J., 1999, Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999, Arch Pathol Lab Med, 124, 7, 966-78.
33. Fox, J.L., Hsu, P.H., Legator, M.S., Morrison, L.E., Seelig, S.A., 1995, Fluorescence in situ hybridization: powerful molecular tool for cancer prognosis, Clin Chem , 41,11, 1554-9.
34. Fritz, P., Cabrera, C .M., Dippon, J., Gerteis, A., Simon, W., Aulitzky, W. E., Van der Kuip, H., 2005, c-erbB2 and topoisomerase II protein expression indepently predict poor survival in primary human breast cancer retrospective study, Breast Cancer Res. 7, 3, 374-84 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

35. Gaspar, C., Franken, P., Molenaar, L., Breukel, C., Van der Valk, M., Smits, R., Fodde, R., 2009, A targeted constitutive mutation in the APC tumor suppressor gene underlies mammary but not intestinal tumorigenesis, PLoS Genet, 5, 7, 1000547
36. Giordano, A., Normanno, N., 2009,. Breast Cancer in the Post-genomic Era, Humana Press, editör Markman M, 39-41 p.
37. Gokhale, S., Gatalica, Z., Mohammad, A., Rampy, A. I., Gopalrao, V. N V., 2004, FISH for HER-2/neu in breast cancer: Standardization makes difference, Indian J Cancer, 41, 4, 152-8.
38. Goss, K.H., Groden, J., 2000, Biology of the Adenomatous Polyposis Coli Tumor Suppressor, J Clin Oncol, 18, 9, 1967-79.
39. Gutierrez, C., Schiff, R., 2011, HER2: Biology, Detection and Clinical Implications, Arch Pathol Lab Med, 135, 1, 55-62.
40. Gutierrez, M.C., Detre, S., Johnston, S., Mohsin, S.K., Shou, J., Allred, D.C., Schiff, R., Osborne, C.K., Dowsett, M., 2005, Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase, J Clin Oncol, 23,11, 2469-76.
41. Haiman, C.A., Stram, D.O., Cheng, I., Giorgi, E.E., Pooler, L., Penney, K., Le Marchand, L., Henderson, B.E., Freedman, M.L., 2006, Common genetic variation at PTEN and risk of sporadic breast and prostate cancer, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 15, 5, 1021-5
42. Harris, L. N., Yang, L., Liotcheva, V., Pauli, S., Iglehart, J. D., Colvin, O. M., Hsieh, T. S., 2001, Induction of Topoisomerase II Activity after ErbB2 Activation Is Associated with a Differential Response to Breast Cancer Chemotherapy, Clin Cancer Res, 7, 6, 1497-504.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

43. Hayashi, S.I., Eguchi, H., Tanimoto, K., et al., 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.
44. Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Bromley, L. K., Wittwer, C. T., Voelkerding ,K V., 2006, Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping:cross-platform comparison of instruments and dyes, *Clin Chem*, 52, 3, 494-503.
45. Hicks, D.G., Yoder, B.J., Pettay, J., Swain, E., Tarr, S., Hartke, M., Skacel, M., Crowe, J. P., Budd, G. T., Tubbs, R. R., 2005, The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification:a fluorescence in situ hybridization study, *Hum Pathol*, 36, 4, 348-56.
46. Honorio, S., Agathangelou, A., Schuermann, M., Pankow, W., Viacava, P., Maher, E. R., Latif ,F., 2003, Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast cancer patients, *Oncogene* ,22, 1, 147-50.
47. http://en.wikipedia.org/wiki/High_Resolution_Melt.
48. <http://ketem.org/istatistik.php>.
49. <http://www.istanbulcerrahi.com/meme-hastalıkları-cerrahi-merkezi-meme-anatomisi.asp>.
50. Huang, H.J., Neven, P., Drijkoningen, M., Paridaens, R., Wildiers, H., Limbergen, V. E., Berteloot, P., Amant, F., Vergote, I., Christiaens, M.R., 2005, Hormone receptors do not predict the HER2/neu status in all age groups of women with an operable breast cancer, *Ann Oncol*, 16, 11,1755-1761.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

51. İçli, F., Akbulut, H., 2005, Onkolojiye Giriş, İn.iliçin G,Biberoğlu K, Süleymanlar G ve ark.; eds. İç Hastalıkları, Güneş Kitapevi, 2007-2014.
52. Järvinen, T.A., Tanner, M., Rantanen, V., Bärlund, M., Borg, A., Grénman, S., Isola, J., 2000, Amplification and deletion of topoisomerase II alpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer, *Am J Pathol*, 156, 3, 839-47.
53. Jin, Z., Tamura, G., Tsuchiya, T., Sakata, K., Kashiwaba, M., Osakabe, M., Motoyama, T., 2001, Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers, *British Journal of Cancer*, 85, 1, 69–73.
54. Joo, Y.K., Logullo, A.F., Mattar, A., Nonogaki, S., Soares, A.F., Gebrim, L.H., 2011, Wnt pathway is affected by endocrine therapy in breast carcinomas, *Basic and Applied Pathology*, 4, 2, 38-45 p.
55. Karray-Chouayekh, S., Trifa, F., Khabir, A., Boujelbane, N., Sellami-Boudawara, T., Daoud, J., Frikha, M., Jlidi, R., Gargouri, A., Mokdad-Gargouri, R., 2010, Aberrant methylation of RASSF1A is associated with poor survival in Tunisian breast cancer patients, *J Cancer Res Clin Oncol*, 136, 2, 203-10
56. Kenemans, P., Verstraeten, R.A., Verheijen, R.H., 2008, Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer, *Maturitas*, 61, 1-2, 141-50.
57. Kerr, P., Ashworth, A., 2001, New complexities for BRCA1 and BRCA2, *Curr Biol*, 11, 16, 668–76.
58. Klarmann, G. J., Decker, A., Farrar, W.L., 2008, Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer, *Epigenetics*, 3, 2, 59-63.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

59. Knoop, A.S., Knudsen, H., Balslev, E., Rasmussen, B.B., Overgaard, J., Nielsen, K. V., Schonau, A., Gunnarsdóttir, K., Olsen, K.E., Mouridsen, H., Ejlertsen, B; Danish Breast Cancer Cooperative Group, 2005, Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin and fluorouracil, *J Clin Onc*, 23, 30, 7483-90.
60. Knudson, A.G., 2001, Two genetic hits (more or less) to cancer, *Nat Rev Cancer*, 1, 2, 157–62 p.
61. Kolch, W., 2000, Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interaction, *Biochem J.*, 351, 2, 289-305.
62. Konecny, G.E., Pauletti, G., Untch, M., Wang, H.J., Möbus, V., Kuhn, W., Thomssen, C., Harbeck, N., Wang, L., Apple, S., Jänicke, F., Slamon, D.J., 2010, Association between HER2, TOP2A and response to anthracycline-based preoperative chemotherapy in high-risk primary breast cancer, *Breast Cancer Res Treat.*, 120, 2, 481-9
63. Krishnamurti, U., Hammers, J.L., Atem, F.D., Storto, P.D., Silverman, J. F., 2009, Poor prognostic significance of unamplified chromosome 17 polysomy in invasive breast carcinoma, *Mod Pathol.*, 22, 8, 1044-8
64. Kristensen, L.S., Hansen, L.L., 2009, PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment, *Clin Chem*, 55, 8, 1471-83
65. Krypuy, M., Wojdacz, T.K., Dobrovic, A., 2008, Rapid High-throughput Methylation Analysis Using in Light-Cycler 480 System, *Biochemica*, No 1.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

66. Kuraguchi, M., Wang, X.P., Bronson, R.T., Rothenberg, R., Ohene-Baah, N.Y., Lund, J.J., Kucherlapati, M., Maas, R.L., Kucherlapati, R., 2006, Adenomatous Polyposis Coli (APC) Is Required for Normal Development of Skin and Thymus, PLoS Genet, 2, 9, 146
67. Kuzupınar, A., 2007, High resolution Melting Curve (HRM) analiz yönteminin delesyon tipi mutasyonların saptanmasında kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 73 s
68. Lal, P., Tan, L.K., Chen, B., 2005, Correlation of HER-2 Status With Estrogen and Progesterone Receptors and Histologic Features in 3,655 Invasive Breast Carcinomas, Am J Clin Pathol., 123, 4, 541-6.
69. Lee, J.S., Lo, P.K., Fackler, M.J., Argani, P., Zhang, Z., Garrett-Meyer, E., Sukumar, S., 2007, A Comparative Study of Korean with Caucasian Breast Cancer Reveals Frequency of Methylation in Multiple Genes Correlates with Breast Cancer in Young, ER, PR-Negative Breast Cancer in Korean Women, Cancer Biol Ther, 6, 7, 1114-20.
70. Li, Y., Wei, Q., Cao, F., Cao, X., 2008, Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancer in Chinese women, Oncol Rep, 19, 5, 1149-53.
71. Liehr, J.G., 1997, Dual role of oestrogens as hormones and pro-carcinogens: tumour initiation by metabolic activation of oestrogens, Eur J Cancer Prev, 6, 1, 3-10.
72. Ligresti, G., Libra, M., Militello, L., Clementi, S., Donia, M., Imbesi, R., Malaponte, G., Cappellani, A., McCubrey, J. A., Stivala F., 2008, Breast cancer: Molecular basis and therapeutic strategies (Review), Mol Med Report, 1,4, 451-8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

73. Liu, Z., Yang, L., Cui, D.X., Liu, B.L., Zhang, X.B., Ma, W.F., Zhang, Q., 2007, Methylation Status and Protein Expression of Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gene in Breast Cancer , *Ai Zheng*, 26, 6, 586-90.
74. Lü, Y.L., Zhong, M., Liu, L., Wei, L.X., Zhao, P., 2008, Clinicopathologic significance of chromosome 17 polysomy in breast cancer , *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 37, 2, 88-91.
75. Lüleyp, H. Ü., 2008, Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, 306-307 s .
76. Lynch ,H.T., Silva, E., Snyder, C., Lynch, J.F., 2008, Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes, *Breast J*, 14, 1, 3-13
77. Markl, I.D., Cheng J., Liang, G., Shibata, D., Laird, P.W., Jones, P.A., 2001, Global and gene-specific epigenetic patterns in human bladder cancer genomes are relatively stable in vivo and in vitro over time , *Cancer Res*, 61, 15, 5875-5884
78. Martins, A.T.P.T., 2009, Prognostic value of methylation markers in breast cancer. www.repositorioaberto.up.pt/bitstream/10216/20022/2/TESEANA%20MARTINS.pdf.
79. Massarweh, S., Schiff, R., 2006, Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk, *Endocr Relat Cancer*, 13, 1, 15-24.
80. McGlynn, L.M., Kirkegaard, T., Edwards, J., Tovey, S., Cameron, D., Twelves ,C., Bartlett, J.M., Cooke ,T.G., 2009, Ras/Raf-1/MAPK Pathway Mediates Response to Tamoxifen but not Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*, 15, 4, 1487-95.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

81. McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M., 2000, ABC of Breast Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Genetics, *BMJ*, 321, 7261, 624-8.
82. Meyer, K.N., Kjeldsen, E., Straub, T., Knudsen, B.R., Hickson, I.D., Kikuchi, A., Kreipe, H., Boege, F., 1997, Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities , *J Cell Biol*, 136, 4, 775-88.
83. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., et al., 1994, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 , *Science*, 266, 5182, 66–71.
84. Moelans, C.B., de Weger, R.A., Van Diest, P.J., 2010 , Absence of chromosome 17 polysomy in breast cancer: analysis by CEP17 chromogenic in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification , *Breast Cancer Res Treat*, 120, 1, 1-7
85. Montgomery, J., Wittwer, C.T., Palais, R., Zhou, L., 2007, Simultaneous mutation scanning and genotyping by High-resolution DNA Melting Analysis , *Nat Protoc*, 2 ,1, 59-66.
86. Morris, S.R., Carey, L.A., 2006, Trastuzumab and Beyond: New Possibilities for the Treatment of HER2-Positive Breast Cancer, *Oncology* , 20, 14, 1763-71
87. Mueller, R.E., Parkes, R.A., Andrulis, I., O'Malley, F.P., 2004, Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples , *Genes Chromosomes Cancer*, 39, 288-97.
88. Nahta, R., Shabaya, S., Ozbay, T., Rowe, D.L., 2009, Personalizing HER2-targeted Therapy in Metastatic Breast cancer Beyond HER2 Status: What We Have Learned from Clinical specimens, *Curr Pharmacogenomics Person Med*, 7, 4, 263-274.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

89. Nahta, R., Yu, D., Hung, M.C., Hortobagyi, G.N., Esteva, F.J., 2006, Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer, *Nat Clin Pract Oncol*, 3, 5, 269-80.
90. Nass, S.J, Dickson, R.B,1997, Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis, *Breast Cancer Res Treat*, 44, 1, 1–22.
91. Navolanic, P.M., Steelman, L.S., McCubrey, J.A., 2003, EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy (Review), *Int J Oncol*, 22, 2, 237-252
92. Nielsen, K.V., Ejlersen, B., Møller, S., Jørgensen, J.T., Knoop, A., Knudsen, H., Mouridsen, H.T., 2008, The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer:Update of DBCG Trial 89D, *Acta Oncol*, 47 ,4, 725-34.
93. Nielsen, K.V., Brüner, N., 2011, Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy, *J Natl Cancer Inst*, 103, 4, 352-3.
94. Nussbaum, R.L., McInnes R.R., Willard ,H.F, Boerkoel III, F.C., 2005, *Tıbbi Genetik*, 6 th ed.Güneş Kitabevi, 314-323 s .
95. Oakman, C., Moretti, E.,Galardi, F., Santarpia, L., Di Leo, A., 2009, The role of topoisomerase IIa and HER-2 in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients, *Cancer Treat Rev*, 35, 8, 662-667 p.
96. Oğur, G., 2005, *Kanser, Kromozomlar, Genler, Türkiye Klinikleri*, 1 , 2, s
97. O'Malley, F.P., Chia, S., Sepherd, L.E, Levine, M.N, Bramwell,V.H, Andrulis, I.L., Pritchard, K.I., 2009, Topoisomerase II Alpha and Responsiveness of Breast Cancer to Adjuvant Chemotherapy *JNCI J Natl Cancer Inst*, 101, 9, 644-650.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

98. Orcan, S., 2006, Epigenetik ve Epigenomik,
www.yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_epigenetik.pdf
99. Pallarés, J., Velasco, A., Eritja, N., Santacana, M., Dolcet, X., Cuatrecasas, M., Palomar-Asenjo, V., Catasús, L., Prat, J., Matias-Guiu, X., 2008, Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma, *Mod Pathol*, 21, 6, 691-9
100. Panjwani, P., Epari, S., Karpate, A., Shirsat, H., Rajsekharan, P., Basak, R., Shet, T., Chinoy, R., Chacko, R., Gursale, S., Baraskar, N., Gupta, S., Hawaldar, R., Desai, S., 2010, Assessment of HER-2/neu status in breast cancer using fluorescence in situ hybridization& immunohistochemistry, Experience of a tertiary cancer referral centre in India, *Indian J Med Res*, 132, 287-94.
101. Park, I.K., Yim, J.S., Ra, Y.M., Ko, D.G., Choi, I.S., Choi, W.J., Yoon, D. S., 2007, Adenomatous Polyposis Coli and Ras Association Domain Family 1A Gene Methylation in Breast Cancer Patients, *J Breast Cancer*, 10, 2, 120-126.
102. Park, S.Y., Kim, B.H., Kim, J.H., Cho, N.Y., Choi, M., Yu, E.J., Lee, S., Kang, G.H., 2007, Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers, *J Korean Med Sci.*, 22, 2, 311-7.
103. Parrella, P., Poeta, M.L., Gallo, A.P., Prencipe, M., Scintu, M., Apicella ,A., Rossiello, R., Liguoro, G., Seripa, D., Gravina, C., Rabitti, C., Rinaldi, M., Nicol ,T., Tommasi, S., Paradiso, A., Schittulli, F., Altomare, V., Fazio, V.M., 2004, Nonrandom Distribution of Aberrant Promoter Methylation of Cancer-Related Genes in Sporadic Breast Tumors ,*Clin Cancer Res*, 10, 16, 5349-54.
104. Peters, I., Rehmet, K., Wilke, N., Kuczyk, M.A., Hennenlotter, J., Eilers, T., Machtens, S., Jonas, U., Serth J., 2007, RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis, *Mol Cancer*, 16, 6, 49.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

105. Pfeifer, G.P., Dammann, R., 2005, Methylation of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Human Tumors, *Biochemistry (Mosc)* 70, 5, 576-83.
106. Plumb, J.A., Strathdee, G., Sludden, J., Kaye, S.B, Brown R, 2000, Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter, *Cancer Res*, 60, 21, 6039-6044
107. Powell, S.N., Kachnic, L.A., 2003, Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation, *Oncogene*, 22, 37, 5784-91.
108. Purnomosari, D., Ameziane, N., Wahyono, A., Aryandono, T., Meijer, G.A., Pals, G., High throughput analysis of promoter hypermethylation status of 22 tumor suppressor genes in invasive breast cancer.
www.igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2006-1201-223020/c6.pdf.
109. Reinholz, M.M., Bruzek, A.K., Visscher, D.W., Lingle, W.L., Schroeder, M.J., Perez, E.A., Jenkins, R.B., 2009, Breast cancer and aneusomy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response, *Lancet Oncol*, 10, 3, 267-77.
110. Richter, A.M., Pfeifer, G.P., Dammann, R.H., 2009, The RASSF proteins in cancer: from epigenetic silencing to functional characterization, *Biochim Biophys Acta*, 1796, 2, 114-28
111. Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997, Product Differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Anal Biochem*, 245, 2, 154-60.
112. Roa, J.C., Anabalón, L., Tapia, O., Martínez, J., Araya, J.C., Villaseca, M., Guzmán, P., Roa, I., 2004, Promoter methylation profile in breast cancer, *Rev Med Chil*, 132, 9, 1069-77.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

113. Rosenberg, C.L.,2008, Polysomy 17 and HER-2 Amplification: True, True, and Unrelated, J Clin Oncol , 26 , 30, 4856-4858.
114. Ross, J.S., Fletcher, A. J.,Bloom, K.J.,Linette, G.P., Stec, J.,Symmans, W. F.,Pusztai ,L.,Hortobagyi, G.N., 2004, Targeted Therapy in Breast cancer the HER-2/neu Gene and Protein, Molecular & Cellular Proteomics, 3, 4, 379-398.
115. Rubin, I., Yarden, Y., 2001, The Basic Biology of HER2, Ann Oncol ,12, 1, 3-8.
116. Sadikovic, B., Al-Romaih, K., Squire, J.A., Zielenska, M., 2008, Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer, Curr Genomics, 9, 6, 394-408.
117. Salido, M., Tusquets, I., Corominas, J.M., Suarez, M., Espinet, B., Corzo, C., Bellet, M., Fabregat, X., Serrano, S., Solé, F., 2005, Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry, Breast Cancer Res.,7, 2, 267-73
118. Sarkar, S., Mandal, M., 2009, Growth Factor Receptors and Apoptosis Regulators: signaling pathways, prognosis, chemosensitivity and treatment outcomes of breast cancer, Breast Cancer (Auckl) 17, 3, 47-60.
119. Sayın, D.B., 2008, Metilasyon ve Kanser. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2008, 28, 513-524.
120. Schagdarsurengin, U., Wilkens, L., Steinemann, D., Flemming, P., Kreipe, H. H., Pfeifer, G.P., Schlegelberger, B., Dammann, R., 2003, Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma, Oncogene, 22 12, 1866-71.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

121. Shinozaki, M., Hoon, D.S., Giuliano, A.E., Hansen, N.M., Wang, H.J., Turner, R., Taback, B., 2005, Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis, *Clin Cancer Res*, 15, 11, 2156-62.
122. Sledge, G.W.Jr., Miller, K.D., 2003, Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer, *Eur J Cancer* , 39, 12, 1668–75.
123. Smith, K., Houlbrook, S., Greenall, M., Carmichael, J., Harris, A.L., 1993, Topoisomerase II alpha co-amplification with erbB2 in human primary breast cancer and breast cancer cell lines: relationship to m-AMSA and mitoxantrone sensitivity, *Oncogene*, 8, 4, 933-8.
124. Strathdee, G., MacKean, M.J, Illand, M., Brown, R, 1999, A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer, *Oncogene* ,18, 14, 2335-41
125. Sunami, E., Shinozaki, M., Sim, M.S., Nguyen, S.L., Vu, A.T., Giuliano , A.E., Hoon ,D.S., 2008, Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors, *Breast Cancer Res*, 10, 3, 46.
126. Takehisa, M., Sasa, M., Bando, Y., Hirose, Y., Morimoto, T., Nagao, T., Tangoku, A., 2007, Chromosomal aneusomy (chr 1, 11, 17) detected by fluorescence in situ hybridization may be a prognostic factor in breast cancer, *Anticancer Res*, 27, 2, 1073–8.
127. Temizkan, G., 1999, *Genetik II. Moleküler Genetik*, İ.Ü.Fen Fakültesi, 72-73 s.
128. Tokunaga, E., Kataoka, A., Kimura, Y., Oki, E., Mashino, K., Nishida, K., Koga, T., Morita, M., Kakeji, Y., Baba, H., Ohno, S., Maehara, Y., 2006, The association between Akt activation and resistanceto hormone therapy in metastatic breast cancer, *Eur J Cancer*, 42, 5, 629-35

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

129. Tsukamoto, F., Miyoshi, Y., Egawa, C., Kasugai, T., Takami, S., Inazawa, J., Noguchi, S., 2001, Clinicopathologic analysis of breast carcinoma with chromosomal aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization, *Cancer*, 93 , 2, 165-70.
130. Tubbs, R., Barlow, W.E., Budd, G.T., Swain, E., Porter, P., Gown, A., Yeh, I. T., Sledge, G., Shapiro, C., Ingle, J., Haskell, C., Albain, K.S., Livingston, R., Hayes, D.F., 2009, Outcome of Patients With Early-Stage Breast Cancer Treated With Doxorubicin-Based Adjuvant Chemotherapy As a Function of HER2 and TOP2A Status, *J Clin Oncol*, 27, 24, 3881-6.
131. Usha, L., Tabesh, B., Morrison, L.E., Rao, R.D., Jacobson, K., Zhu, A., Basu, S., Coon, J.S., 2008, Topoisomerase II alpha gene copy loss has adverse prognostic significance in ERBB2-amplified breast cancer: a retrospective study of paraffin-embedded tumor specimens and medical charts, *J Hematol Oncol*, 1, 12.
132. Van der Auwera, I., Bovie, C., Svensson, C., Trinh, X.B., Limame, R., Van Dam, P., Van Laere, S. J., Van Marck, E.A., Dirix, L.Y., Vermeulen, P.B., 2010, Quantative methylation profiling in tumor and matched morphologically normal tissues from breast cancer patients, *BMC Cancer*, 10, 97.
133. Van der Auwera, I., Van Laere , S..J., Van den Bosch, S.M., Van den Eynden, G.G., Trinh, B.X., Van Dam, P.A., Colpaert, C.G., Van Engeland, M., Van Marck, E.A., Vermeulen P.B., Dirix, L.Y., 2008, Aberrant methylation of the Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene promoter is associated with the inflammatory breast cancer phenotype ,*Br J Cancer*, 99, 10, 1735-42.
134. Vanden Bempt, I., Van Loo, P., Drijkoningen, M., Neven, P., Smeets, A., Christiaens, M.R., Paridaens ,R., De Wolf-Peeters, C., 2008, Polysomy 17 in Breast Cancer: Clinicopathologic Significance and Impact on HER-2 Testing, *J Clin Oncol*, 26, 30, 4869-74

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

135. Villman, K., Sjöström, J., Heikkilä, R., Hultborn, R., Malmström, P., Bengtsson, N O., Söderberg, M., Saksela, E., Blomqvist, C., 2006, TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer, *Acta Oncol*, 45, 5, 590-6.
136. Virmani, A.K., Rathi, A., Sathyanarayana, U.G., Padar, A., Huang, C.X., Cunnigham, H.T., Farinas, A.J., Milchgrub, S., Euhus, D.M., Gilcrease, M., Herman, J., Minna, J.D., Gazdar, A.F., 2001, Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas, *Clin Cancer Res*, 7, 7, 1998-2004.
137. Watters, A.D., Going, J.J., Cooke, T.G., Bartlett, J.M., 2003, Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma, *Breast Cancer Res Treat*, 77, 2, 109-14.
138. White, H., Potts,G., Mutation Scanning by High Resolution Melt Analysis.Evaluation of RotorGene TM6000(Corbett Life Science), HR1 and 384 well LightScanner(Idaho Technology).(Rapor no:NGRLW_HRM_1.0.United Kingdom,National Genetics Reference Laboratory(Wessex).
139. Widschwendter, M., Jones, P.A., 2002, The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer, Commentary re:J.Kwonget al.,Promotor hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma :*Clin Cancer Res.*, 8, 131-137, 2002 and H-Z Zou et al., Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients, *Clin Cancer Res*, 8, 188-191, *Clin Cancer Res*, 8, 1, 17-21p.
140. Widschwendter, M., Jones, P.A., 2002, DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, 21, 35, 5462-82 p.
141. Widschwendter, M., Siegmund , K.D., Müller , H.M., , Fiegl, H., Marth, C.,Müller- Holzner, E., Jones, P.A., Laird, P.D., 2004, Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen, *Cancer Res*, 64, 11, 3807-13

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

142. Wojdacz, T.K., Dobrovic, A., 2007, Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation, *Nucleic Acids Res*, 35, 6, 41
143. Wong, I.H., 2001, Methylation profiling of human cancers in blood: molecular monitoring and prognostication(review), *Int J Oncol*, 19, 6, 1319-24.
144. www.bio.miami.edu/dana/250/250SS10_11.html.
145. www.philos.biol.mun.ca/~b4241/Cancer_BKL/methylation.html.
146. Xu, X., Gammon, M.D., Zhang, Y., Cho, Y.H., Wetmur, J.G., Bradshaw, P.T., Garbowski, G., Hibshoosh, H., Teitelbaum, S.L., Neugut, A.I., Santella, R.M., Chen, J., 2010, Gene Promoter Methylation is Associated with Increased Mortality among Women with Breast Cancer, *Breast Cancer Res Treat*, 121, 3,685-92.
147. Yang, N., Wisman, G.B.A., Schuurin, E.,Van der Zee, A.G.J., 2010, An overview of different techniques to detect hypermethylation, <http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/medicine/2010/n.yang/02c2.pdf>
148. Yarden, Y., 2001, Biology Of HER2 and Its Importance in Breast Cancer, *Oncology* 61, 2, 1–13.
149. Yoshij, i. H., Gomez, D.E., Shibuya, M., Thorgeirsson, U.P.,1996, Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor and other angiogenic factors in human breast cancer, *Cancer Res* , 56, 2013–6.
150. Zhang, W., Yu, Y., 2011, The important molecular markers on chromosome 17 and their clinical impact in breast cancer, *Int J Mol Sci*, 12, 9, 5672-83p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

151. Zhu, X., Lu, Y., Lu, H., Yang, W., Tu, X., Cai, X., Zhou, X., 2011, Genetic alterations and protein expression of HER2 and chromosome 17 polysomy in breast cancer, Hum Pathol, 42, 10, 1499-504.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Ayşe Feyda NURSAL
Doğum Tarihi ve Yeri : 05. 06. 1962 MERSİN
Uyruğu : T.C
Medeni Durumu : Bekar
İletişim Adresleri : Yenibağlar mah.Seylap cad.No:19/9 ESKİŞEHİR
feydanursal@hotmail.com
0.546.6067590

Eğitim Durumu

İlkokul: Tarsus-Duatepe İlkokulu-1973

Ortaokul: Tarsus Lisesi -1976

Lise: Tarsus Lisesi -1979

Üniversite: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi -1985

Eskişehir Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi- 2004

Çalıştığı Kurum: Eskişehir Devlet Hastanesi Acil Servisi

Üye Olduğu Kuruluşlar:

-Tıbbi Genetik Derneği

Projeler:

‘Meme Kanserli Hastalarda HER2/TOP2A Değişikliklerinin Epigenetik Durumla İlişkilendirilmesi’ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi. Proje No: 201011037 Yardımcı Araştırmacı

Katıldığı Kongre, Sempozyum ve Kurslar:

04-08 Haziran 2007: Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi –Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü

‘Hücre Füzyonu Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi’ Kursu

09-10 Haziran 2007: 1.İç Hastalıkları Kongresi

27 Mart 2008: Kan ve Kan Ürünleri Transfüzyon Uygulamaları Sempozyumu

06-09 Mayıs 2008: VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi

29 Mayıs-1 Haziran 2008: 3.Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi ve

‘Mezenkimal Kök Hücre Kültür Teknikleri Uygulamalı Kursu’

20.06.2008: Kocaeli Üniversitesi Sürekli Eğitim Araştırma ve Uygulama merkezi

‘Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu’

20.06.2008: Confokal Seminer

14-18 Eylül 2009: Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi –Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü

‘İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri’ Kursu

08-10 Ekim 2009: Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu

07-10 Ocak 2010: 1.Erciyes Genetik Günleri, Klinik Genetik Kursu

12-14. Mayıs 2010: Neonatal Resusitasyon Programı Uygulayıcı Sertifikası

01-05 Aralık 2010: 9.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi

27 Şubat 2012: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi 'Kök Hücre ve Gen Tedavisi Sempozyumu'

