

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

MEME KANSERLİ DOKULARDA GSTP1 VE CDH1 GENLERİNİN
MS-HRM YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİNE ERCİ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. OĞUZ ÇİLİNGİR

MAYIS 2011

KABUL VE ONAY SAYFASI

Mine ERCİ'nin Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "**Meme Kanserli Dokularda GSTP1 ve CDH1 Genlerinin MS-HRM Yöntemi İle İncelenmesi**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

12.09.2011

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Prof.Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ



Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



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



Üye: Yrd.Doç.Dr. Hülyam KURT



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.09.2011.. tarih ve 887.1.4/13. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Giriş: Meme kanseri, meme hücrelerinin anormal çoğalma gösterdikleri genetik bir hastalıktır. Çevreyle, yaşam biçimiyle ve kalıtımla ilişkilidir. Meme kanserinin kadınlar arasındaki görülme sıklığı % 10.4 olup kanser nedeni ölümlerde beşinci sırada yer almaktadır. DNA metilasyonu, kanserlerin gelişimi ve evrenmesinde rol oynayan epigenetik mekanizmalardan biridir. Özellikle promotör bölgedeki CpG adacıklarının hipermetilasyonunun farklı kanser tiplerinde tümör baskılayıcı genlerin inaktif hale gelmesinde major bir mekanizma olduğu bilinmektedir.

Amaç: Yaptığımız çalışmada meme kanserinde hipermetilasyonu gözlenen GSTP1 ve CDH1 genlerinin metilasyon durumları ile meme kanserinde kullanılan lenf nodu tutulumu, tümörün evresi, ER, PR ve HER2/neu gibi bazı biyolojik belirteçler karşılaştırılarak bunlar arasındaki ilişkinin saptanması amaçlanmıştır.

Gereç-yöntem: Çalışmamıza Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Kliniği'nden meme kanseri tanısı almış 80 olgunun doku örnekleri dâhil edilmiştir. Meme kanserli olguların doku örneklerinde GSTP1 ve CDH1 genlerinin promotör bölgelerindeki metilasyon durumları MS-HRM yöntemiyle incelenmiştir.

Bulgular: Olgularımızın %82'sinde GSTP1 promotör hipermetilasyonu saptanırken, %95'inde CDH1 promotör hipermetilasyonu saptanmıştır. Ayrıca yaş ve tümör evresi ile bu genlerin promotör hipermetilasyonu arasında ilişki saptanmamıştır. Lenf nodu metastazı, ER(+) ve HER2/neu(-) ile GSTP1 ve CDH1 genlerinin promotör hipermetilasyonu anlamlı bulunmuştur. PR(+) olgularda CDH1 promotör metilasyonu oranı yüksek bulunmuş fakat istatistiklere yansıyan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, Metilasyon, MS-HRM

SUMMARY

Background: breast cancer is a genetic disease which showed an abnormal proliferation of breast cells. It is associated with environment, lifestyle and inherited. Worldwide, the incidence of breast cancer is 10.4% among women and fifth leading cause of cancer-related death in the world. Aberrant DNA methylation is one of the epigenetic mechanisms deeply involved in the development and progression of human cancers. Especially hypermethylation of CpG islands in the promoter regions has been shown a major mechanism for inactivation of tumor suppressor genes in different cancer types.

Aim: In this study, it's been aimed to compare and identify a relation between methylation between states of GSTP1 and CDH1 genes which observed in hypermethylation of breast cancer and lymph node involvement, stage of the tumor and some of the prognostic factors such as ER, PR and HER2/neu.

Methods: 80 samples having diagnosis of breast cancer are studied which was observed in Osmangazi University, Faculty of medical. Methylation in promoter areas of the GSTP1 and CDH1 genes investigated on the samples by MS-HRM method.

Findings: 82 percent of GSTP1 promoter hypermethylation and 95 percent of CDH1 promoter hypermethylation are identified on the samples. Additionally it's not been observed any relation between age and tumor stage. Lymph node(+), ER(+), HER2/neu(-) and GSTP1, CDH1 genes promoter hypermethylation found logical. CDH1 promoter methylation rate on PR(+) samples found high but it's not logical that can be determined by statistics.

Keywords: Breast cancer, Methylation, MS-HR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kanserin Gelişimi.....	4
2.3. Kanserin Nedenleri.....	4
2.4. Kanser Oluşumundan Sorumlu Genler ve Fonksiyonları.....	5
2.5. Kanserde Epigenetik Değişiklikler.....	7
2.6. Kanser ve DNA Metilasyonu.....	7
2.6.1. Promotor Bölge Hipermetilasyonunun Kanserdeki Rolü.....	10
2.6.2. Genomdaki Genel Hipometilasyonun Kanserdeki Rolü.....	11
2.6.3. Tümör Belirteci Olarak DNA Metilasyonu.....	12
2.7. Meme Dokusu.....	13
2.7.1. Meme Anatomisi.....	13
2.7.2. Meme Embriyolojisi.....	14

2.7.3. Meme Gelişimi ve Memedeki Fizyolojik Değişimler.....	15
2.8. Meme Kanseri.....	16
2.8.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	17
2.8.2. Meme Kanseri Etyolojisi.....	17
2.8.2.1. Genetik Faktörler.....	17
2.8.2.2. Edinsel Faktörler.....	18
2.9. Meme Kanseri Evrelemesi.....	18
2.9.1. TNM Sınıflandırması.....	18
2.9.2. Meme Kanserinde Histolojik Sınıflandırma.....	20
2.10. Meme Kanseri ve Metilasyon.....	21
2.10.1. Meme Kanserinde GSTP1 ve CDH1 Genlerinin Hipermetilasyonu.....	22
2.10.1.1. Glutasyon-S Transferazlar.....	22
2.10.1.2. CDH1 (E-kaderin) Geni.....	23
2.11. Methylation Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM).....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Hasta Grubu.....	28
3.2. Gereçler.....	28
3.2.1. Kullanılan Aletler.....	28
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	29
3.2.3. Kullanılan Primerler.....	29
3.2.3.1. GSTP1 Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler.....	29

3.2.3.2. CDH1 Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler..	30
3.3. Yöntemler.....	30
3.3.1. Parafinli Doku Örneklerinden DNA Elde Edilmesi.....	30
3.3.1.1. Deparafinizasyon İşlemi.....	30
3.3.1.2. DNA İzolasyonu.....	31
3.3.2. Bisüfit Modifikasyon İşleminin Gerçekleştirilmesi.....	32
3.3.3. MS-HRM Cihazına Yükleme.....	34
3.3.4. Değerlendirme.....	37
3.3.5. İstatiksel Analiz.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. GSTP1 Geninde Saptanan Bulgular.....	40
4.1.1. Yaş ile GSTP1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	43
4.1.2. Tümörün Evresi ile GSTP1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	43
4.1.3. Lenf Nodu Metastazi ile GSTP1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	44
4.1.4. ER ile GSTP1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	45
4.1.5. PR ile GSTP1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	46
4.1.6. HER2/neu GSTP1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	46
4.2. CDH1 Geninde Saptanan Bulgular.....	49
4.2.1. Yaş ile CDH1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	52
4.2.2. Tümörün Evresi ile CDH1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	52
4.2.3. Lenf Nodu Metastazi ile CDH1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	53

4.2.4. ER ile CDH1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	54
4.2.5. PR ile CDH1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	55
4.2.6. HER2/neu ile CDH1 Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	55
5. TARTIŞMA.....	58
5.1. GSTP1 ve CDH1 Genlerinin MS-HRM Yöntemi Sonuçları ile Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	59
6. SONUÇ.....	66
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	68

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Meme Kanserinde Evreleme.....	20
Tablo 4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Olguların Demografik Özellikleri.....	39
Tablo 4.2. Olgularımızın GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu Yüzdeleri.....	43
Tablo 4.3. Metile olan ve Metile Olmayan Olguların Tümörlerin Evresine Göre Dağılımı.....	44
Tablo 4.4. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların Lenf Nodu Tutulumuna Göre Dağılımı.....	45
Tablo 4.5. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların ER Durumlarına Göre Dağılımı.....	45
Tablo 4.6. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların PR Durumlarına Göre Dağılımı.....	46
Tablo 4.7. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların HER2/neu Durumlarına Göre Dağılımı.....	47
Tablo 4.8. GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu ile Prognostik Faktörler.....	48
Tablo 4.9. Olgularımızın CDH1 Geni Promotor Metilasyonu Yüzdeleri.....	52
Tablo 4.10. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların Tümörlerin Evresine Göre Dağılımı.....	53

Tablo 4.11. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların Lenf Nodu Tutulumuna Göre Dağılımı.....	54
Tablo 4.12. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların ER Durumlarına Göre Dağılımı.....	54
Tablo 4.13. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların PR Durumlarına Göre Dağılımı.....	55
Tablo 4.14. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların HER2/neu Durumlarına Göre Dağılımı.....	56
Tablo 4.15. CDH1 Geni Promotor Metilasyonu ile Prognostik Faktörler.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1.Meme Anatomisi.....	14
Şekil 4.1. GSTP1 Geni Metile Olan ve Metile Olmayan Kontrol DNA'larından Alınan Pikler.....	40
Şekil 4.2. GSTP1 Geni Metile Olan ve Metile Olmayan Kontrol DNA'larının Amplifikasyona Girme Eğrileri.....	41
Şekil 4.3.Olgularımızdaki Metile Olan ve Metile Olmayan Pikler.....	42
Şekil 4.4. CDH1 Geni Metile Olan ve Metile Olmayan Kontrol DNA'larından Alınan Pikler.....	49
Şekil 4.5. CDH1 Geni Metile Olan ve Metile Olmayan Kontrol DNA'larının Amplifikasyona Girme Eğrileri.....	50
Şekil 4.6. Olgularımızdaki Metile Olan ve Metile Olmayan Pikler.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
ER	Östrojen Reseptör
PR	Progesteron reseptör
HER2/neu	Human Epidermal Receptor
MS-HRM	Methylation Sensitive High Resolution Melting
5Mc	5-metilsitozin
kb	Kilobaz
RNA	Riboz Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon-S Transferaz
kDa	Kilodalton
Ca	Kalsiyum
PCR	Polimerase Chain Reaction
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi

MgCl₂	Magnezyum klorür
H₂O	Su
ATL	Tissue Lysis Buffer
AL	Lysis Buffer
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
BL	Loading Buffer
BD	Desulfonation Buffer
BW	Wash Buffer
EB	Elution Buffer
b.ç.	Baz Çifti

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser normal hücrelerin malign dönüşüme uğraması, uzun bir zaman süreci içinde genetik mutasyonların etkisi ile hasara uğraması sonucu oluşur. Dünya’da her yıl 6 milyon kişi kanserden ölmektedir. Ülkemiz’de ise bu sayının 50.000 civarında olduğu tahmin edilmektedir (6).

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen, gelişmiş ülkelerde ilk sıralarda seyreden ve sayısı hızla artan önemli bir sağlık problemidir. Dünya’da her yıl yaklaşık 1 milyon yeni meme kanseri tanısı konulmaktadır. Tüm dünya genelinde meme kanserinin yaşam boyu oluşma riski 1/12-1/20 arasında olarak kabul edilmektedir ve tüm Dünya’da kanser ölümleri arasında akciğer, mide, kolon ve karaciğer kanserinden sonra 5. sıradadır. Tüm kadınların ömür boyu %13.22’sinin meme kanseri olma ihtimali vardır (14).

Kanser oluşum süreci ile genomik metilasyon kalıbı değişiklikleri arasındaki ilişki 1980’li yılların başından beri bilinmektedir. CpG dinükleotidlerinde gözlenen DNA metilasyonu, memelilerdeki epigenetik değişikliklerin başında gelir. Epigenetik mutasyon, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ifadesini kalıtlılabılır şekilde değiştirir ve kanser oluşumuna katılır. Kanser hücrelerinde genomda yaygın hipometilasyon ile birlikte, promotor bölgelerdeki CpG adacıklarında hipermetilasyon gözlenir. Promotor bölge hipermetilasyonu genin susturulmasına neden olur ve özellikle tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesinde önemlidir (62).

DNA metilasyonunun, genom organizasyonunda önemli ve karmaşık bir role sahip olduğu, her geçen gün biraz daha anlaşılmaktadır. Genomun işleyişindeki farklılıklar ise kanserin en önemli nedenidir. Bu bilgiler göz önüne alındığında, çok basamaklı kanser oluşum sürecinde, metilasyonun da genomik değişiklikler kadar etkili olduğu ortaya çıkmaktadır. Metilasyon değişikliklerinin nasıl oluştuğu ve gen ifadesi üzerindeki etkileri daha net bir şekilde ortaya konduğunda kanser tedavisine yeni yaklaşımlar sunulabilecektir.

Kanserde mortalitenin dűşűrűlmesinde en önemli basamak erken tanıdır, metilasyon deęiřikliklerinin de kanser oluřununun erken basamaklarında olduęu dűřűnűlűrse, metilasyon kalıbı deęiřikliklerinin incelenmesi mortalitenin azaltılması ynűnden umut vericidir (52).

Yaptığımız alışmada;

Meme kanseri tanısı konmuş olan olgulara ait bazı biyolojik belirteçler ile literatűrde kanser oluşumunda promotor hipermetilasyonu saptanmış olan GSTP1 ve CDH1 genlerinin MS-HRM yöntemi ile metilasyon durumları karşılaştırılarak meme kanseri tedavisine yeni yaklaşımlar sunabilmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser

Kanser, genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu tümör baskılayıcı genleri inaktif ve onkogenleri aktif hale getiren karmaşık bir hastalıktır (58). Kanser hücre fenotipinin niteliğini açıklayan temel özellikler şunlardır;

- 1.Büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık
- 2.Hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması
- 3.Apoptozdan kurtulma
- 4.Anjiyogenez özelliğinin kazanılması
- 5.Doku yayılımı
- 6.Metastaz oluşumudur (12).

Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik, kanser hücrelerinin sürekli ve kontrolsüz çoğalmasıdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi vermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organları da istila eder ve tüm vücuda yayılırlar (50). Kanser patolojisindeki en önemli konu benign ve malign huylu tümörleri birbirinden ayırt etmektir. Benign tümörler çevredeki dokuya veya vücudun uzak bölgelerine yayılmazlar ve etrafları bağ dokusu ile kuşatılmıştır. Buna karşılık malign tümörler hem çevredeki normal dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılarak metastaz oluştururlar. Kanser, normal hücrelerin malign dönüşüme uğraması ve uzun bir zaman süreci içinde genetik mutasyonların etkisi ile hasara uğraması sonucu oluşur (10).

2.2.Kanserin Gelişimi

Kanserleşme sürecinde ilk basamak olan hızlı ve kontrolsüz bölünme, aynı zamanda, kanserin en temel özelliklerinden birisi olan tümör hücre klonu olmalarıyla açıklanabilir. Kanserleşme yolunda inisiasyon yapan kimyasalların çoğu mutajeniktir. Bu nedenle DNA, kimyasal karsinojenler için ana hedeftir. DNA yapısında oluşan hasarlar, tamir enzimleriyle onarılsa veya onarılmadığı durumlarda tümör baskılayıcı genler ve apoptotik genlerin işbirliğiyle hücre apoptoza sürüklenirse inisiasyon olmaz ve organizma kanser hücrelerinden temizlenir. Ters durumlarında ise kanser dediğimiz birden fazla gen ve çevrenin etkileşimi ile multifaktöriyel bir hastalık ortaya çıkar.

Kanserleşme yoluna giren ilk hücreden kök alan hücre klonlarında oluşan farklı mutasyonlar belli bir süre sonra tümör populasyonunda dominant hale gelir. Ayrıca kanserin yaş gruplarına göre dağılımına baktığımızda, görülme sıklığının genellikle ilerleyen yaş dönemlerinde olması, yaşam boyunca oluşan mutasyonların biriken etkisini de göstermesi nedeniyle oldukça önemlidir. Kanserleşme süreci; yeni tümör hücre klonları, artmış büyüme oranı ve selektif avantaj sağlayan canlı kalma, yayılım ve metastaz gibi özellikleri kapsamından dolayı bu süreç 'klonal seleksiyon' olarak adlandırılır. Klonal seleksiyon, tümör gelişimi boyunca devam ederek, tümörlerin sürekli daha hızlı büyüyüp artan oranda malignant hale gelmesini sağlayan bir seçim mekanizmasıdır (10).

2.3. Kanser Nedenleri

Kansere yol açan maddelere karsinojen denir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkma olasılığını etkiler. Tümör gelişiminin erken aşamalarında çoğalma hızı yüksek hücre topluluğunun aşırı büyümesine neden olacak şekilde hücre bölünme hızını arttırdıklarından, bu tür maddelere 'tümör kamçılayıcılar' denir. Başta östrojenler olmak üzere hormonlar da insan kanserlerinin gelişiminde önemli tümör kamçılayıcılarıdır. Bunlara ek olarak bazı virüsler de insanda kansere neden olabilir

Sonuç olarak, kanserleşme olarak tanımlayabileceğimiz onkogenez sürecinde etkili olan çok farklı alternatif yollar ve bu yollarda etkili değişik gen ve çevre kombinasyonları bulunmaktadır (49).

2.4. Kanser Oluşumundan Sorumlu Genler ve Fonksiyonları

Kanser ve diğer maligniteler hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir işlem sonucu ortaya çıkar. Çoğu genetik değişimler sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken, daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan maligniteler kalıtsal özellik taşırlar. Genomdaki bu kalıtsal veya kalıtsal olmayan genetik değişimler, belli hücresel genlerin belli özel değişimleri ile ilişkilidir. Bunlar onkogenler olarak isimlendirilirler ve normal işlevlere sahip bir diğer gen grubu olan protoonkogenlerden türevlenirler. Protoonkogenler, normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı proteinlere ait kodlar içerirler. Eğer bir mutasyon sonucu protoonkogenin yapısı değişirse oluşan hasar, genin dolayısıyla gen ürününün yapısının değişmesine neden olarak çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolünü ortadan kaldırır ve malignite ortaya çıkar. Kanser oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu kanserogeneizde birbirleriyle zıt etkilidir. Onkogenler, malign transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre bölünmesinde işlev gören genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerler. Eğer tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar (11-22).

Onkogenlerin kanser oluşumuna katılması hakkında iki hipotez vardır. Birincisi; onkogenlerin ekspresyon seviyelerindeki kantitatif değişiklikler, ikincisi onkogenlerin yapısında meydana gelen değişikliklerdir. Onkogenlerdeki değişiklikler; nokta mutasyonu, gen delesyonu, kromozomlarda yeni düzenlenmeler, gen amplifikasyonu ve insersiyonal mutagenez olarak sıralanabilir.

Protoonkogenler, DNA dizilerindeki sadece bir bazın değişmesi ile onkogenlere dönüşebilirler. Somatik hücrelerde bu olay anormal gen ürününün sentezine yol açar ve bu ürün, hücre bölünmesini ve gelişimini uyararak kansere neden olur. Kromozomlardaki yapısal mutasyonlar protoonkogenlerin aktivasyonunu etkileyen mekanizmalardan biridir. Çeşitli kanser türlerinde, bir kromozomun her zaman aynı yerinde bir kırık veya translokasyonun meydana gelmesi o kanser türü için ayırıcı bir özellik olarak gözlenir. Gen amplifikasyonunda ise onkogene ait DNA parçası çok fazla sayıda replike olur. Bu işlem normal hücrelerde ya hiç gözlenmez ya da çok nadir gözlenir. Fakat kanserli hücrelerde sık rastlanan bir olaydır. Amplifiye olan DNA'nın kodladığı proteinler normal işlevlerini kaybederler ya da anormal tarzda işlev görürler. İnsersiyonal mutagenizasyon olarak isimlendirilen bir başka mekanizma ile de onkogenler faaliyete geçerler. Bazı durumlarda retroviral genomların küçük bir parçasının, hücrel onkogenlerin hemen bitişiğine kaynaştığı gözlenir ve bu yol ile hücrel onkogenlere promotör etki yaparlar (22).

Tüm bu mekanizmalar sonucu ortaya çıkan onkogenlerin ürünleri hücrede yerleştikleri yerlerde özel fonksiyonlar görerek hücrenin fizyolojik aktivitesinde değişiklikler ortaya çıkarırlar. Onkoproteinler, hücre çoğalması ve farklılaşması sırasında hücrenin nükleusundan plazma zarına kadar uzanan bir seri işlemde rol alırlar. Örneğin hücrel onkogenler büyüme faktörü ve çeşitli hormon reseptörlerine ait kodlar içerebilirler. Böylece bu proteinler plazma zarından nükleusa doğru çeşitli sinyallerin iletilmesinde rol alırlar. Bazı onkogenler ise gen ekspresyonunu düzenlemek için transkripsiyon düzenleyici faktörler gibi DNA'ya bağlanan proteinlerin işlevini görecek olan onkoproteinleri kodlarlar. Onkogenler hücre seviyesinde dominant bir etkiye sahiptir. Bu genler aktifleştiklerinde tek bir mutant allel bile, bir hücrenin normalden malign şekle dönüşmesine yeterli etkidedir (11).

Protoonkogenlerin ürünleri, büyüme ve gelişmeyi ilerletici işlevlere sahiptirler. Ancak hücrede, protoonkogenlerin çalışmalarını kontrol eden, anormal büyümeyi ve malign değişimleri engelleyen tümör baskılayıcı genler bulunur. Bu genlere ait her iki allel kaybolduğunda (heterozigotluk kaybı) veya bu genler mutasyona uğradığında kontrol

mekanizması ortadan kalkar ve tümör oluşumu gerçekleşir. Protoonkogenlerdeki mutasyonların tersine tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar çekinik karakterlidir. Tümör baskılayıcı genin tek bir fonksiyonel kopyası (normal alleli) normal hücre fenotipinin ortaya çıkması için yeterlidir (40).

2.5.Kanserde Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik tanımı ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından ortaya atılmış olup DNA dizi değişikliği olmadan mayotik ve/veya mitotik olarak kalıtılabilen gen ekspresyon değişiklikleri olarak tanımlanır (41). DNA metilasyonu için hipometilasyon veya hipermetilasyon, histon modifikasyonları için asetilasyon veya deasetilasyon epigenetik değişikliklere örnek olarak verilebilir.

Son on yılda yapılan çalışmalar, epigenetik değişikliklerin tümör gelişiminde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Kanser gelişimi süresince meydana gelen epigenetik değişiklikler ise tümör baskılayıcı genlerin DNA metilasyonu ve kromatinin histon modifikasyonları'dır (41).

2.6.Kanser ve DNA Metilasyonu

Metilasyon, memeli DNA'sında gerçekleştiği bilinen ve yalnızca CpG dinükleotidlerinde bulunan sitozinlerde meydana gelir (59). 1950 yılından beri varlığı bilinen 5mC (5-metilsitozin), değişime uğramış bir bazdır ve genomda ki bazların yaklaşık %4'ünü oluşturur. Metile CpG dinükleotidlerinin çoğu; sentromerik tekrarlar, satellit dizileri ve tekrarlayan genler gibi dizilerde yer alırlar (4). Tüm genomun yaklaşık %2'sini ve CpG'lerin yaklaşık %15'ini oluşturan CpG adacıkları ise; 0.2-1kb uzunluktadır ve insan genomundaki genlerin yaklaşık %50'sinin promotor bölgelerinde bulunurlar (65). DNA metilasyonu memeli genomunda transkripsiyonel baskılama, kromatin yapının

değiştirilmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik imprinting, tekrarlayan ve parazitik DNA dizilerinin baskılanması gibi önemli etkilere sahiptir. Normal hücrelerde ekstragenik DNA metile iken, gen promotorlarında bulunan CpG adacıkları metile değildir, bunun istisnası X inaktivasyonuna ve genomik imprintinge uğrayan genlerdir; bunlar, normal hücrelerde de tek alelden ekspresyonun sağlanması için sadece bir alelde metiledir. Normal dokularda imprintinge ve X kromozomu inaktivasyonuna uğrayan genler dışında da ender olarak CpG adacık metilasyonu gözlenir ve sıklıkla genin susturulmasına yol açar. CpG adacık metilasyonu promotor bölgeden çok gen içindeki CpG adacıklarında saptanır, promotor bölgede olması durumunda ise; CpG içeriği az olan promotor bölgeler de CpG içeriği yoğun olanlara göre daha fazla gözlenir. Promotor, bir genin 5' ucunda bulunan ve transkripsiyon faktörleri ile RNA polimeraza bağlanma bölgesi oluşturan DNA dizisidir ve gen ekspresyonunun kontrolünde önemli role sahiptir. Normal hücreler de gözlenen promotor bölge metilasyonunun hücre farklılaşmasında, dokuya özgü genlerin ekspresyonunu düzenleyerek etkili olduğu düşünülür (48).

Metilasyon kalıbı dokulara özgüdür ve tek bir hücre klonunda bile farklılık gösterebilir. CpG adacıklarında doku ve gene özgü metilasyon derecesinin yaşla arttığı bilinir. Bu artışın rastgele olmadığı ve yaşlanmaya bağlı oluşan kanserlerde metilasyonun etkili olduğu düşünülür (56).

Kanser oluşum süreci ile genomik metilasyon kalıbı değişiklikleri arasındaki ilişki 1980'li yılların başından beri bilinmektedir. Kanser hücrelerinde, genomda genel hipometilasyonun yanı sıra, bazı özel genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarında hipermetilasyon gözlenmektedir. CpG adacık metilasyonunun, o genin transkripsiyonunu önlediği bilinir. Genel olarak bakıldığında, genomdaki yaygın hipometilasyon ile bölgesel hipermetilasyon arasında bir bağlantı olmadığı görülür. Bu nedenle, ikisinin birbirinden bağımsız olaylar olarak ele alınması gerektiği, kanser oluşum sürecinde metilasyon kalıbı değişikliğinin farklı yollarla etki ettiği düşünülür (62).

Metilasyonun kanser oluşumuna neden olma mekanizmalarından ilki, 5mC'nin kendisinin, mutasyon oluşturma riskidir. Normalde DNA'da bulunan sitozin, en sık gözlenen mutasyon mekanizmalarından biri olan deaminasyon sonucu urasile dönüşür ve bir RNA bazı olması nedeniyle onarım mekanizmalarınca kolayca tanınarak onarılır. Buna karşılık metilsitozinin kendiliğinden oluşan deaminasyonu sonucu oluşan timin, normalde de DNA'da bulunan bir baz olduğu için onarım mekanizmalarından kaçır. İkinci yol ise; özellikle tümör baskılayıcı genlerin ya da imprintinge uğrayan genlerin promotor bölgelerindeki hipermetilasyonun, ilgili genin normalden farklı şekilde ifade bulmasına yol açmasıdır. Bu şekilde normalden farklı düzeyde çalışan genler, kanserogeneizde etkili olur. Üçüncü yol ise; genomda gözlenen yaygın hipometilasyonun, tekrar bölgelerindeki rekombinasyon oranında artışa ve genomda kararsızlığa neden olmasıdır. Bunların dışında DNA metilasyonu; karsinojenlerin DNA'ya bağlanmasını arttırarak ve DNA'nın ultraviyole ışınları daha fazla emmesine neden olarak mutasyon hızını arttırır ve gen inaktivasyonuna neden olur (62).

CpG adacıklarındaki metilasyonun yanısıra, histon proteinlerinin metillendiği yaklaşık otuzbeş yıldır bilinmektedir. Histon proteinleri, DNA'nın kromatin halinde paketlenmesinde etkilidir ve bu nedenle DNA ile yakın ilişkili, bazik yapıda proteinlerdir. Amino uçlarında meydana gelen değişik modifikasyonlar (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon gibi) kromatin paketlenmesini sıkıştırarak ya da gevşeterek, transkripsiyon faktörlerinin bölgeye ulaşmasını etkilerler ve bu şekilde gen ifadesinin değişmesinde rol alırlar. Histon proteinlerindeki asetilasyon kromatin yapının gevşemesine, histon deasetilazlar tarafından gerçekleştirilen deasetilasyon ise kromatin yapının sıkılaşmasına neden olur (62).

2.6.1.Promotor Bölge Hipermetilasyonunun Kanser Oluşumundaki Rolü

Kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin, hücre döngüsünü kontrol eden ve apoptozu önleyen genlerin, DNA onarım genlerinin ve gelişim sürecinde etkili yolların

normal işlemlerini sağlayan genlerin hipermetilasyon ile susturulduğu bilinmektedir (65). Kanser hücrelerinde gen inaktivasyon mekanizması olarak promotor bölge hipermetilasyonu;

1. Sonraki kuşaklara aktarılabilmesi,
2. İlgili gende, kodlayan bölgede mutasyon olmaksızın genin ifadesini baskılayabilmesi,
3. Gen ifadesini baskılamada, kodlayan bölge mutasyonları ile aynı etkinlikte olması ile önem taşımaktadır (36,47).

Promotor bölge hipermetilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin promotora bağlanmasını önleyerek genin susturulmasında etkili olur. Bunu doğrudan yapabileceği gibi dolaylı olarak, metilsitozine bağlanan proteinleri bölgeye çekerek de gerçekleştirebilir. Doğrudan baskılamada metilsitozindeki metil grubu, DNA'nın büyük oluşuna doğru çıkıntı yaparak tanıma bölgesini tanınmaz hale getirirken; dolaylı yolda, promotora bağlanacak transkripsiyon faktörlerinin tanıyacağı bölgeler, metilsitozine bağlanan proteinlerle maskelenir. Bu etkilerin dışında biyokimyasal olarak metil grubu eklenmesinin, 5mC'in yüksek polaritesi nedeniyle, RNA polimerazların daha yüksek enerji ile transkripsiyon başlangıç noktasına ulaşabilmesine yol açtığı ve bu şekilde genin ifadesini baskıladığı düşünülmektedir. Ayrıca, DNA'nın büyük oluşuna doğru uzanmış olan metil gruplarının, histonların yerleşimlerini değiştirerek daha kapalı bir kromatin yapısına neden olduğu ve gen ifadesini bu şekilde baskıladığı da öne sürülmektedir (39).

CpG adacıklarının metilasyon derecesi, farklı tümör tiplerinde değişebildiği gibi aynı tümöre sahip kişilerde de, çevresel etmenlere, genetik yatkınlığa ve epigenetik kontrolü etkileyen diğer faktörlere bağlı farklılık gösterir (2). Metilasyon profili tümöre ve gene özgüdür (43). Metilasyon değişiklikleri hem düşük hem de yüksek evre tümörlerde görülebilir, bu da metilasyon değişikliğinin tümör oluşumunun erken evrelerinde oluştuğunun bir göstergesidir. Ayrıca CpG adacık metilasyonu rastgele gerçekleşmemekte ve bazı bölgelerde 'de novo' metilasyona yatkınlık görülmektedir (2,43). Kansere özgü

metilasyon kalıpları işlevsel ya da yapısal nedenlerden kaynaklanabilir. Baz dizisinin özellikleri yapısal, genin metilasyon ile susturulmasının hücreye büyüme avantajı sağlaması ise işlevsel yatkınlıktan sorumludur (43).

2.6.2.Genomdaki Genel Hipometilasyonunun Kanser Oluşumundaki Rolü

Kanser hücrelerinde genel hipometilasyon ile bölgesel hipermetilasyon aynı hücrede oluşabilir. Malign hücrede normal hücreye göre %20-60 oranda daha az 5mC gözlenir. Bunun nedeni, genlerin intronlarında ve kodlanan bölgelerinde bulunan CpG dinükleotidlerinin ve genomun %20-30'unu oluşturan ve normalde hipermetile olan tekrarlayıcı DNA bölgeleri ile parazitik DNA dizilerinin demetile olmasıdır (27). Parazitik DNA dizileri; genoma girmiş viral DNA ya da transpozonlar gibi kodlamayan, transkripsiyonu yapılmayan, pasif olarak kuşaktan kuşağa aktarılan, DNA'da yayılma eğilimi gösteren ve organizmanın yaşamsal hiçbir basamağında görev almayan DNA dizileridir (27).

Hipometilasyon kanser oluşum sürecini değişik şekillerde etkiler. Bunlardan biri, artan mitotik rekombinasyonlar ile genomda heterozigozite kaybı oluşmasıdır. Heterozigozite kaybı, özellikle tümör baskılayıcı genlerde her iki kopyanın birden etkisini yitirmesine yol açarak ve imprinting kaybına neden olarak kanserogenezde etkilidir. Tekrar dizilerinde gözlenen metilasyon, diziler arasında rekombinasyon oluşmasını önleyerek genomun kararsızlığını artırır. Bununla birlikte karyotipik olarak saptanabilen kromozomal değişikliklere, aynı zamanda sentromerik bölgelerde rekombinasyon ile anoploidi oluşumuna neden olabilir. Hipometilasyonun kanser oluşumundaki bir diğer etkisi şu şekildedir: parazitik DNA dizileri normalde metile olmaları nedeniyle transkribe edilmez, ancak hipometile olursa transkripsiyonu yapılır. Bunların transkripsiyonunun yapılması mevcut transkripsiyon faktörlerinin seviyesini değiştirerek, kompetitif inhibisyona benzer bir mekanizma ile normalde çalışması gereken başka genlerin ifadesinin değişmesine neden olabilir. Alternatif olarak, yer değiştiren transpozonlar, hem kodlayan hem de kodlamayan

bölgelere girerek, antisens bir transkriptin oluşumuna neden olur ya da transkripsiyonun intron gibi farklı bir bölgeden başlamasını sağlayarak etkili olabilir. Transpozonlar hedef lokus ile ilişkisi olmaksızın kendini genomda yeni bir yere yerleştirebilen DNA dizileridir. Antisens transkript ise transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalardan biri olup, sens transkripte bağlanarak onun ifade bulmasını engelleyen RNA molekülüdür. Ayrıca, yayılım ve metastazdan sorumlu genlerde gözlenen hipometilasyon bu genlerde etkinlik artışına neden olarak da kanserogenezde etkilidir (13).

2.6.3.Tümör Belirteci Olarak DNA Metilasyonu

Kanser hücrelerindeki metilasyon kalıbı değişiklikleri doku ve tümör tipine özgü olmalarının verdiği avantajla kanser saptanması ve sınıflandırmasında önemli yere sahiptir (65). Hipermetile promotor bölgelerinin tümör belirleyicisi olarak kullanımı rutin olarak kullanılmasa da pek çok yönden uygundur. Kanser türlerinin çoğunda, CpG adacık hipermetilasyonu tümör tipine özgü izlenmektedir. Ayrıca, promotor hipermetilasyonu kanserlerin erken dönemlerinde olduğu için erken tanıya da olanak sağlamaktadır (20).

Metilasyon değişiklikleri, primer tümör bölgesi dışında da saptanabilmektedir. Örneğin, kanser hastalarının serum, idrar ve balgamlarında da anormal CpG metilasyonu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, akciğer kanserinde bronkoalveolar lavaj sıvısından, endometriyal kanserde vajinal tamponlardan elde edilen vajinal sekresyondan, böbrek ve mesane kanserlerinde idrardan, kolorektal kanserde feçesten, prostat ve mesane kanserlerinde serumdan elde edilen DNA örneklerinde promotor metilasyonuna bakılarak bu yöntemlerin erken tanı için elverişli olduğu sonucuna varılmıştır. Kanser hastalarının plazmasında muhtemelen artmış apoptotik ve nekrotik hücre artıklarına bağlı olarak normalden daha fazla oranda serbest DNA bulunur, bu da metilasyon değişikliklerinin saptanması için kanın da kullanılmasına olanak sağlar. Farklı tümör tiplerinde metile olan genlere bakıldığında, bir kısmının ortak olduğu gözlenir, bu özellik pek çok kanser için

aynı genlerin metilasyon derecelerine bakarak kanser tarama metodlarının geliştirilmesine olanak tanır.

Metilasyon, sıklıkla DNA üzerindeki belli bölgelerde gözlenmesi nedeniyle de, DNA dizisi değişikliklerinden daha kolay saptanabilir. Mutasyonlar genin herhangi bir yerinde gözlenebilmesi nedeniyle daha geniş çaplı araştırmalarla belirlenebilmektedir. PCR'a dayalı, metilasyon tanımlayıcı, yeterli özgüllüğe sahip yöntemlerin geliştirilmiş olması metilasyon değişikliklerinin saptanmasını pratikleştirmektedir. Kanser hücrelerinin DNA' sında genel hipometilasyon saptanmasına rağmen bunun tanısal açıdan bir önemi belirlenememiştir (3,42,51).

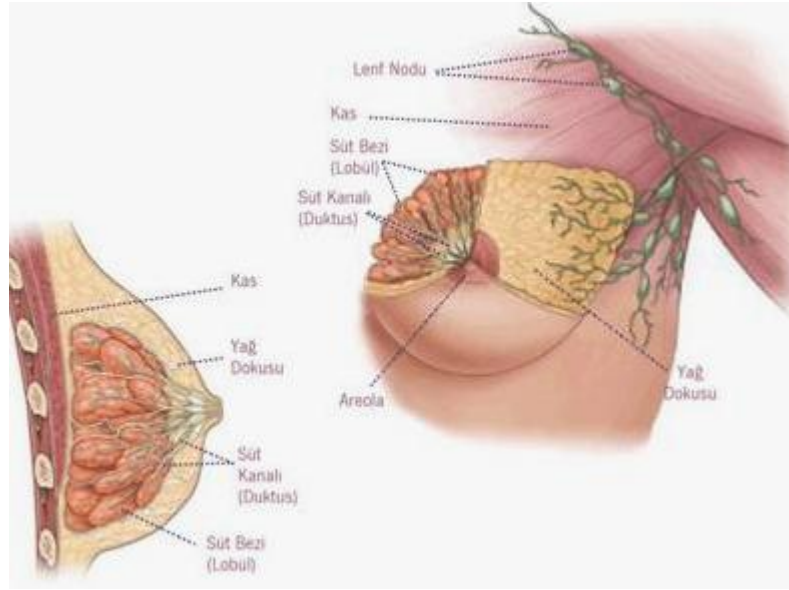
2.7.Meme Dokusu

Meme dokusu insanın memeliler sınıfından olduğunun işareti olan önemli bir anatomik yapıdır. Aslında değişime uğramış bir apokrin ter bezidir. Erkeklerde prepubertal küçük değişimlerin dışında hep aynı ve sessiz kalır, kadınlarda ise puberteden başlayarak hayatın sonuna kadar süren dinamik bir yapısı vardır. Bu aktivite içerisinde oluşabilen fonksiyonel ve patolojik değişimler meme hastalıklarına yol açmaktadır (15).

2.7.1.Meme Anatomisi

Meme vertikal olarak 2. kosta ile 6. kosta, horizontal olarak ise parasternal çizgi ile orta aksiller çizgi arasında yer alır. Büyük bir bölümüyle pektoral kas üzerine oturur. Yarım küre biçimindedir. Ancak çoğunlukla yukarı, aksillaya doğru olmak üzere dik biçimde uzantıları olabilir. Spence'in aksiller kuyruğu adı verilen bu uzantı, aksiller fasya açıklığı olan foramen Langer'den geçerek koltuk altında derinde yer alabilir. Bu durumda aksiller kitle ya da aksiller lenfadenopati olarak değerlendirilebilir. Meme yüzeysel fasyanın içinde yerleşir. Alt yüzü Pektoralis Major ve Serratus Anterior'u örten fasya üzerine oturur. Meme

bezi loblardan oluşmuştur. Genellikle 10-15 tane olan loblar asinüslerden oluşan lobüllere bölünmüştür. Her lob meme başına 12-20 adet laktiferöz kanala açılır. Meme üzerindeki deri ve altındaki pektoral fasiaya Cooper bağları adı verilen fibröz bantlarla tesbit edilmiştir. Meme başı koni biçimindedir. Areolada Montgomery bezleri adı verilen yağ bezleri nedeniyle hafif yuvarlak alanlar bulunur (53).



Şekil 2.1.Meme Anatomisi

Istanbulcerrahi.com'dan alınmıştır.

2.7.2.Meme Embriyolojisi

Meme dokusu ekdoderm'den gelişir. Altıncı haftada her iki tarafta aksilla ile kasık arasında ekdodermde 'süt çizgisi' adı verilen bir kalınlaşma meydana gelir. Bu çizgi büyük bir bölümüyle silinirken pektoral bölgelere rastlayan alanlarda devam eder ve meme dokusunun gelişimini sağlar. Süt çizgisinde pektoral bölgede başlangıçta diskoid kalınlaşma olur, sonra lobüllü bir yapı ortaya çıkar. Daha sonra solid kordonlar oluşur. İleri doğru uzanarak tüp halini alan bu yapılar kanalları ve memenin salgı yapan bölümlerini

oluşturur. Areola ve meme başı deride hafif kalınlaşma biçiminde belirginleşir. Doğumdan kısa bir süre sonra meme başı kabarak normal görünümünü alır (53).

2.7.3.Meme Gelişimi ve Memedeki Fizyolojik Değişimler

Kadınlarda meme çocukluk çağında hemen hiç değişiklik göstermez. Prepubertal dönemden başlayarak tüm hayat boyu memede belirgin değişiklikler olur. Prepubertal dönemde büyüme başlar. Areola yükselir, meme başı küçük bir çıkıntı halinde belirginleşir. Puberte ile birlikte meme normal erişkindeki biçimini alır.

Menstruel siklusun 8. gününden başlayarak meme büyür. Boyutlar, menstruel siklusun ortasındaki ölçülere göre %50 artmış olarak saptanır. Değişimler interlobüler ödem ve konjesyonda artma nedeniyle olmaktadır. Menstrüel kanamayla birlikte konjesyon ve ödem geriler ve meme eski boyutuna ulaşır. Gebelikte memede önemli değişiklikler olmaktadır. Bu değişimler ovumun implantasyonu ile başlar. Gebelik boyunca sürmek üzere meme büyümeye başlar. Meme başı ve areola daha belirgin olur, pigmentasyon artar. Montgomery bezleri belirginleşir. Meme derisinde genişlemiş venler ve strialar görülür. Bu dönemde laktasyonu sağlayacak önemli histopatolojik değişimlerde olmaktadır. Oluşan bu makroskopik ve mikroskopik değişimler süt verme kesilmediği sürece devam eder. Süt vermenin kesilmesinden başlayarak meme dokusu küçülerek normal boyutlarına yaklaşır. Fakat hiçbir zaman değişim yapmadan önceki durumunda olmaz. Areoladaki kabarık yatıştır, areola etrafındaki pigmentasyon ve strialar bazen devam edebilir. Menapozu takiben meme giderek küçülür. Bu değişim yavaş olur. Lobüller giderek kaybolur. Parankim ve fibröz doku giderek homojen bir kitle haline gelir (53).

2.8.Meme Kanseri

Meme kanseri, meme hücrelerinin anormal çoğalma gösterdikleri genetik bir hastalıktır. Tek bir hastalık gibi görünse de, hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalıktır ve hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir. Çevreyle, yaşam biçimiyle ve kalıtımla ilişkilidir (5,30,61). Meme kanseri gelişiminin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Protoonkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanan genetik değişiklikler başta olmak üzere genetik hasarlarla olmaktadır. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu bu çok basamaklı gelişimde erken meydana gelen olaylardır. Bunları daha sonra kontrolsüz hücre bölünmesi ve/veya programlanmış hücre ölümünün bozulması takip eder (5,30).

Çok basamaklı tümör gelişiminin klasik modelinde, ilk olarak normal bir epitelyum hücre premalignant atipik hücreye dönüşür. Daha sonra klonal büyüme ve gelişme sonucu premalignant lezyon oluşur. Bir süre sonra lezyon invaziv hale gelir. Vücuda yayılmaya başlar, immün sistemin etkisinden kurtulduktan sonra metastaz yapar. İnvaziv meme kanserine doğru ilerlemeyi haber veren biyolojik ve genetik anormalliklerin tanımlanması ile çok aşamalı karsinogenez modeli oluşur (5,30,61).

Mutasyona uğramış formları meme kanseri riskini arttıran genlere meme kanseri yatkınlık genleri denir. Bu genlerin farklı alelleri kanserin ailevi formlarında olduğu gibi sporadik kanserlerde de önemli rol oynayabilir. Meme kanseriyle doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili çok sayıda gen tanımlanmıştır. Kadın meme kanserlerinde bilinen asıl risk faktörü, artmış seviyelerdeki östrojene uzun süre maruz kalmayla ilişkilidir. Endojen ya da ekzojen östrojenlerin neden olduğu artmış hücre bölünmesi, hücre sayısını ve dolayısıyla mutasyonların gerçekleşme olasılığını artırır (30,32,37).

2.8.1.Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri kadınlarda en çok görülen kanser olmasının yanında, birçok ülkede kadınlardaki kanser ölümlerinin de başlıca nedenidir. Mortalite ve morbidite verileri ülkelere göre değişiklik gösterir. Kuzey Amerika’da kadınlar arasındaki kanserlerin %29’ unu ve tüm kanserlerden ölümlerin %18’ini meme kanseri oluşturur (37). Meme kanserlerinden ölüm oranları Danimarka, İngiltere ve Hollanda gibi batı ülkelerindeki kadınlarda 100.000’de 10-25 iken; Japonya, Meksika ve Venezuela’da 100.000’de 2-5 arasındadır (32). Amerika Birleşik Devletleri’nde kadınlar arasındaki kansere bağlı ölümlerde ilk iki sırayı akciğer ve meme kanseri almaktadır. Akciğer kanserlerinden ölümlerin daha fazla olması, kadınlar arasındaki sigara alışkanlığının artışı ve son 50 yılda meme kanserlerinden ölüm oranlarının stabil kalması gibi nedenlerle açıklanmaktadır. Kadınlarda, meme kanseri gelişme riski tüm yaşam boyunca %7-10 arasındadır. Yani yaklaşık her 10 ile 14 kadından bir tanesi meme kanserine yakalanmaktadır. Tüm meme kanserleri içinde erkek meme kanseri oranı ise %1 civarındadır (37). Meme kanseri 25 yaşın altında nadir gözlenir ve görülme sıklığı yaşla orantılı olarak artar. En sık 45-74 yaşları arasında görülür (32).

2.8.2.Meme Kanseri Etyolojisi

Çoğu olguda meme kanserinin etyolojisi bilinmez, ancak pek çok predispozan faktör ileri sürülür. Hem genetik, hem de edinsel olabilen bu faktörler şunlardır;

2.8.2.1.Genetik Faktörler: meme kanserli hastaların ailesinde sıkça kanser hikayesine rastlanır. Meme kanserli bir kadının kız kardeşi ya da kızı hastalık açısından üç kat fazla risk altındadır. Hem annesi hem kız kardeşi meme kanseri olan bir kadında ise bu riskin 10 kat arttığı gözlenmiştir (5). Annesinde menapoz öncesi bilateral meme kanseri görülen kadınların ortalama %50’sinde meme kanseri gelişir (32).

Meme kanseri bazı spesifik gruplarda daha sıktır. Örneğin beyaz ırkta siyah ırktan ve Musevi kadınlarda diğerlerinden daha sık görülür. Çoğu Asya ve Afrika ülkesinde hem meme kanseri riski ve hem de mortalitesi daha düşüktür. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da ise yüksek risk ve mortalite söz konusudur. Bunu çevresel ve diyet faktörleriyle açıklamak mümkündür (30).

2.8.2.2.Edinsel Faktörler: alkol bağımlılığı, menstruasyonun uzun yıllar devam etmesi, menarşın 12 yaşından önce başlaması, puberte esnasında ya da sonrasında iyonize radyasyona maruz kalmak ve hayvansal yağlardan zengin diyet meme kanseri riskini artırır (30). Sigara ile meme kanseri arasında ilgi kurulamamıştır (38).

2.9.Meme Kanseri Evrelemesi

2.9.1.TNM Sınıflandırması (26)

Primer Tümör Boyutu (T) :

Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümöre ait bulgular yok

Tis: İnsitu karsinom, intraduktal karsinom, lobuler karsinoma in situ; ya da tümörsüz meme başının Paget hastalığı

T1: Tümör 0-2 cm arasındadır

T1a: Tümör 0,1-0,5 cm arasındadır

T1b: Tümör 0,5-1 cm arasındadır

T1c: Tümör 1-2 cm arasındadır

T2: Tümör 2-5 cm arasındadır

T3: Tümör 5 cm'den fazladır

T4: Boyutu ne olursa olsun, göğüs duvarı veya cilde direkt yayılım gösteren tümör

T4a: Göğüs duvarına yayılım vardır

T4b: Ödem (peau d'orange dahil), cilt ülserasyonu, ya da ipsilateral memede sınırlı satellit cilt nodülleri vardır

T4c: İki özelliğin birlikte olması (T4a ve T4b)

T4d: İnflamatuvar karsinom

Bölgesel Lenf Nodları (N) :

Nx: Bölgesel nodlar değerlendirilemiyor (Daha önce çıkartılmış olanlar da dahil)

N0: Bölgesel nod metastazı yok

N1: Mobil ipsilateral aksiller lenf nodlarına metastaz; meme içi, infraklavikuler ve 'Rotter' nodları dahil

N2: Bir diğerine ya da diğer yapılara fikse 'konglomere' ipsilateral aksiller lenf nodlarına metastaz vardır

N3: İpsilateral internal mamarian lenf nodlarına metastaz vardır

Uzak Metastaz:

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

Tablo 2.1. Meme Kanserinde Evreleme (26)

EVRE 0	T _{is} , N0, M0
EVRE I	T1, N0, M0
EVRE IIA	T0, N1, M0 T1, N1, M0 T2, N0, M0
EVRE IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0
EVRE IIIA	T0, N2, M0 T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1, M0 T3, N2, M0
EVRE IIIB	T4, herhangi bir N, M0 Herhangi bir T, N3, M0
EVRE IV	Herhangi bir T, herhangi bir N, M1

2.9.2.Meme Kanserinde Histolojik Sınıflandırma

Meme kanserinin Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre histolojik olarak sınıflandırılması aşağıda görülmektedir (28).

1. In situ karsinom
 - In situ duktal karsinom
 - In situ lobuler karsinom
2. İnvaziv karsinom
 - İnvaziv duktal karsinom
 - İnvaziv lobuler karsinom

- Tubuler karsinom
- İnvaziv kribriform karsinom
- Medüller karsinom
- Müsinöz karsinom
- İnvaziv papiller karsinom
- İnvaziv mikropapiller karsinom
- Apokrin karsinom
- Sekretuar (juvenil) karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Metaplastik karsinom
- Nöroendokrin karsinom
- İnflamatuvar karsinom

2.10. Meme Kanseri ve Metilasyon

Meme kanserinde çeşitli genlerin ekspresyon kayıpları, CpG adacıklarındaki hipermetilasyon ile ilişkilendirilmiştir. Kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin, hücre döngüsünü kontrol eden ve apoptozu önleyen genlerin, DNA onarım genlerinin ve gelişim sürecindeki yollaklarda yer alan genlerin hipermetilasyon ile susturulduğu bilinmektedir. Kanserlerde, promotor bölgelerinin hipermetilasyonu en iyi karakterize edilen epigenetik değişikliktir. Yapılan çalışmalarda, CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyonun rastgele olmadığı ve tümör tipine göre spesifik olarak meydana geldiği gösterilmiştir (64).

2.10.1.Meme Kanserinde GSTP1 ve CDH1 Genlerinin Hipermetilasyonu

2.10.1.1.Glutatyon-S Transferazlar: memelilerde Glutatyon-S transferazlar'ın yapısı hakkındaki ilk bilgiler 1961 yılında, fare karaciğerinde glutatyonun (GSH) konjugasyonunun gözlenmesi üzerine elde edilmiştir (7,9). Glutatyon-S transferazlar (GST) faz II enzimleri olup, kemoterapötik ilaçlar, karsinojenler, çevre kirliliği etkenleri ve ksenobiyotikler ile glutatyon arasında konjugasyonu katalizleyen dimerik enzimler ailesidir. GST, reaktif oksijen radikallerinin ve sigara tütününde bulunan karsinojenlerin detoksifikasyonunda, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan 4-hidroksinonenal gibi ajanların metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Bunun dışında, GST substratları arasında parasetamol ve kemoterapötikler gibi farmakolojik ilaçlar da yer almaktadır. GST enzimleri yukarıda sayılan bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunu sağlayarak suda çözünür bileşikler haline dönüştürür, dolayısıyla ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve dokuların oksidatif zarardan korunmasında önemlidir (44,55).

İnsan sitozolik GST'lerin birçok formu bulunduğundan ayrı olarak sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırmaları, aminoasit dizileri gibi proteinin temel yapısına dayanmaktadır. İnsan dokularında sentezlenen sitozolik Glutatyon-S transferaz enzimleri, en az sekiz gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bu enzimler; Alfa (GST α), Mu (GSTM, GST μ), Pi (GSTP, GST π), Teta (GSTT, GST θ), Sigma (GSTS), Kappa (GSTK), Omega (GSTO) ve Zeta (GSTZ)' dir (35).

Glutatyon-S Transferaz P1 (GSTP1) geni ksenobiyotik metabolizmasının faz II evresinde rol oynayan GST enzim ailesinin bir üyesidir. Sigara dumanında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bazı kanserojen maddelerin glutatyonla konjugasyon reaksiyonlarını katalizler. GSTP1 geni kromozom 11q13'de lokalizedir ve 7 ekson içermektedir. Okuma çerçevesi (open reading frame) 1. eksonun 3' ucundan başlar ve 630 bç uzunluğunda 209 aminoasitten oluşan protein sentezler. GSTP1'in yapısındaki, fonksiyonundaki veya ekspresyon seviyesindeki genetik değişiklikler sonucunda oluşan

düşük enzimatik aktivite, karsinojenlerin detoksifiye edilebilmelerinde belirli kanser tiplerinin gelişmesinde risk faktörü taşımaktadır.

Bu genin promotor bölgesindeki hipermetilasyon GSTP1 proteinin ekspresyon kaybına ve dolayısıyla oksidatif DNA hasarında artışa neden olur. Meme kanserlerinin yaklaşık olarak %30-40'ında bu genin hipermetilasyonu gözlenmiştir. GSTP1'in hipermetilasyon sonucu inaktive olması, olguların karsinojenlere karşı hassasiyetini artırır ve böylece başka mutasyonlara ve DNA hasarına yatkınlık kazandırır (19).

2.10.1.2.CDH1 (E-Kaderin): kaderinler, erişkin organizmada seçici hücre tanınmasından ve yaşam boyu normal doku mimarisinden sorumlu molekül ağırlıkları 120.000-140.000 kDa arasında değişen hücre zarından ekstrasellüler matrikse uzanan yapı ve fonksiyonları açısından Ca^{+2} 'a bağımlı transmembran glikoproteinleridir. Yan yana hücreler arasındaki moleküler bağlantıyı sağlarlar (16,17,24). Adezyon moleküllerinin bir ailesi olan kaderinler, yapılarında bulundukları Ca^{+2} 'dan dolayı bu adı alırlar. Kaderin glikoproteinleri yapısal olarak birbirleri ile benzerlik gösterirler. Temel kaderin yapısı N ve C terminali içeren iki bölgeden oluşur. Birçok tekrarlayan ilmikten oluşan ve Ca^{+2} 'a bağlanmada önem taşıyan geniş bir hücre dışı N-ucu ile kaderinler arasında çok iyi korunan sitoplazmik bölümlerle bağlantılı tek bir transmembran kısımdan oluşurlar. 4 ekstraselüler bölgesi bulunurken bu bölgeler arasında da kalsiyum içeren alanlar yer almaktadır. Kaderinlerin histidin-valinalanın bağlantı yüzeylerinden birbirini tanıyan homofilik bağlanma yolu ile birbiriyle birleşir ve adezyonu sağlar. Homofilik bağlantılarını N terminallerindeki birinci ekstraselüler ürünleri aracılığıyla kurarlar. Ancak C terminalinin bulunduğu bölgesi; diğer adezyon moleküllerinden farklı olarak kateninlerle ilişkisini sağlayacak şekilde özelleşmiştir. Sitoplazmik kısım üç sitoplazmik protein ile ilişkilidir; bunlar α , β ve γ -katenindir (16,17).

Kaderin/katenin kompleksinin aralarındaki ilişkinin kaderinlerin yayılım fonksiyonunda önemli olduğu düşünülmektedir. Kaderinlerin yayılım fonksiyonunu göstermek için normal koşullarda yüzeyinde bu molekülleri taşımayan hücelere, kaderin

cDNA transfeksiyonu yapılmış, bu hücreler kaderin moleküllerini eksprese etmeye başladıktan sonra yayılma özelliği kazanmıştır. Böylece iki kaderinin ilişkisi bir dizi biyokimyasal olaya neden olarak doğru pozisyon, tanıma ve hücreler arası haberleşmeyi sağlamaktadır. Tümör hücrelerinin düzensiz davranışı nedeniyle hücre-hücre ilişkisi tümörlerde bozulmuştur. Kaderinlerin hücre yüzeyinde azalması ile ortaya çıkan azalmış yayılım ve hücre ilişkilerinin neoplastik progresyonla ilişkisi her geçen gün daha da belirgin hale gelmeye başlamıştır (16,17).

Kaderinler buldukları bölgelere göre 5 farklı gruba ayrılmaktadırlar:

1) E-kaderin (epitelyal); E-kaderin'ler basit glandüler ve stratifiye epitelyal hücrelerde eksprese edilen bir alt gruptur (18). En iyi bilinen üyedir. Uvomorulin de denilen E-kaderin embriyonun preimplantasyon döneminde morula ve blastosist, hücre-hücre bağlanma bölgelerinde yoğun olarak izlenir. Epitel bütünlüğünü sağlayan interselüler bir yapıştırıcı olarak işlev görür (31).

2) N-kaderin (nöral); sinir sistemi, kalp, akciğer, lens, embriyonik mezoderm ve nöral ektoderimde bulunur. Sağ-sol asimetrisinin kurulmasında, yayılım ve sinyal mekanizmalarında, büyüme konilerinin adezyonu ve rehberliğinde önemli rol oynar.

3) P-kaderin (plasental); trofoblast, kalp, akciğer, sindirim kanalı hücrelerinde bulunur.

4) R-kaderin (retinal); retinal nöronlarda ve glia hücrelerinde bulunur.

5) M-kaderin (kas); miyoblast ve iskelet kası hücrelerinde bulunur (24).

E-kaderin 6q22.1 lokalizedir ve hücre membranlarından ekstra sellüler matrikse uzanan 120kDa büyüklüğünde bir glikoproteindir. Normal epitel bütünlüğünün korunması ve devamında önemli görevi vardır ve kalsiyum bağımlı hücreler arası adezyondan sorumludur.

E-kaderinler sitoplazmadaki kateninler ile birleşirler ve zonula adherensi oluştururlar, bunlarda hücrede tutunma yeri ve stabilizasyonu sağlarlar. İmmünohistokimyasal

incelemelerde farklılaşmış tümörler yüksek miktarda E-kaderin içerirler. Epitelyel morfolojisi bozulan farklılaşmamış tümörlerde ise E-kaderin miktarı azalmıştır. Diğer bir deyişle tümör farklılaşması ile E-kaderin ekspresyon azalması arasında bir korelasyon vardır. E-kaderin ekspresyonu azalınca tümörün yayılım özelliği ve tümörün lenfojen, hematojen metastaz riski de artmaktadır. Ayrıca bu hastalar kötü prognoza sahip olmaktadır (31).

Son yıllarda bulunan yeni bir kaderin de H-kaderindir. E-kaderin'e %25 benzerlik gösteren bu molekülün meme kanserinin gelişiminde rolü olduğuna inanılmaktadır. Meme kanserli hastalarda H-kaderin ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır. E-kaderin ekspresyonu boyun, özefagus, mide, kolon, karaciğer, over, meme vb. pek çok kanserin kötü prognozu ile bağlantılıdır. E-kaderin ekspresyonu azalan epitelyum hücrelerinde, farklılaşmanın azaldığı ve hücrelerin göç kabiliyetlerinin arttığı belirlenmiştir. Buradan E-kaderinlerin yayılma özelliğine karşı koruyucu olduğu metastazı baskılayıcı bir görev yaptığı sonucuna varılmıştır (24). Ayrıca E-kaderinin birçok az farklılaşmış insan karsinom hücresinde bulunmadığı da tesbit edilmiş ve bu hücrelerin yayılım özelliği E-kaderin cDNA transkripsiyonu ile ortadan kaldırılmıştır (31). E-kaderin ekspresyonunun azalması sonucu tümör hücrelerinin hareketlilik kazandığı görülmüştür (18). Yapılan çalışmalarda E-kaderin'in normal ekspresyonu olan meme kanserli hastaların takipleri sırasında %93' ünün sağ kaldığı ancak anormal E-kaderin ekspresyonunda %34 oranında ölüm olduğu görülmüştür (34).

Mutasyonlar ve delesyonlar E-kaderin ekspresyon kaybına sebep olabilirken yapılan birçok çalışmada primer meme kanserlerinin çoğunda E-kaderin geninin metilasyonla sessizleştiği bu durumun ise tümörün metastazında artışa ve hastanın yaşam süresinde azalmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir (23).

Meme kanserli tümörlerde yapılan çalışmalarda E-kaderin geninin promotor bölgesinde bulunan CpG adacıkları %50 oranında metile olarak saptanmıştır. Ayrıca in situ duktal karsinomlarda %30 CpG metilasyonu saptanırken metastatik lezyonlarda bu oran

%60'a çıkmıştır. Bu süreç tümör progresyonunda önemli bir role sahip olduğu için E-kaderin tümör evrenmesinde önemli bir biyomarkırdır (23) .

2.11. Metilasyona Hassas Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi Analizi (Methylation Sensitive High Resolution Melting) (MS-HRM)

MS-HRM metilasyon tespiti için kullanılan duyarlı ve özgül bir yöntemdir. MS-HRM dizisi bilinmeyen PCR ürününün erime profili ile dizisi bilinen PCR ürününün erime profillini karşılaştırarak metilasyon seviyesinin tahminini sağlar. MS-HRM protokolünün basitliği ve yüksek tekrarlanabilirliği metilasyon değerlendirmesi için birçok tanı ve araştırma uygulamalarında MS-HRM'i tercih edilen bir yöntem yapar (63).

Şu anda hem araştırma çalışmalarında hem de tanıya yönelik çalışmalarda kullanılabilen bölgeye özgü, hızlı, güvenilir ve maliyeti az olan metilasyon testleri yoktur. Bu yüzden metilasyon analizleri için rutinde de kullanılabilecek yeni ve daha güvenilir bir metoda ihtiyaç duyulmuştur. HRM aslında SNP genotiplendirmesi için geliştirilmiş yüksek çözünürlüklü erimeye dayandırılan yeni bir yaklaşımdır. Bütün erime analizlerinde olduğu gibi yüksek ısıda çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılması esasına dayanır. HRM analizinden önce hedef sekansın kopya sayısı arttırılmalıdır. En kolay yol çalışılacak DNA'nın HRM'den önce PCR amplifikasyonuna sokulmasıdır. Her 2 prosedürde sadece çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan boyasının varlığında çalışılır. Bu boya tek zincirli DNA'nın arasına giremez fakat çift zincirli DNA'nın varlığında ışığa yapar. Bu floresan değişimi hem PCR boyunca DNA konsantrasyonunun artışı hem de HRM boyunca ısıyla indüklenmiş DNA'nın ayrılmasını ölçer. Erime eğrisi analizinde başlangıçta floresan yüksektir çünkü örnek çift zincirli DNA olarak tepkimeye başlar. Fakat yükselen ısıyla birlikte floresan azalır ve DNA tek zincirli hale geçer. Gözlemlenen erime karakteri her DNA örneği için karakteristiktir (60).

HRM'in 2 önemli avantajı vardır. Birincisi; araya giren boyalar hedef DNA dublekslerini tamamen doyurmak için gerekli olan PCR reaksiyon ürünlerinin konsantrasyonunu engellemez. İkincisi ise çalışma süresince floresan değişiklikleri yüksek doğruluk ile takip edilebilir (60).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Hasta Grubu

Çalışmamıza Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Kliniğinden meme kanseri tanısı almış 80 hastanın doku örnekleri dâhil edilmiştir. Örnekler Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından parafin bloğa sarılı doku kesiti olarak ependorf içinde laboratuvarımıza gelmiştir. Çalışmamız Aralık 2010-Nisan 2011 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Meme kanserli olguların doku örneklerinde GSTP1 ve CDH1 genlerinin promotor bölgelerindeki metilasyon durumları MS-HRM yöntemiyle incelenmiştir.

3.2.Gereçler

3.2.1.Kullanılan aletler

Pipet takımı (Gilson)

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

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

Light cycler 480 Multiwell plate 96 (Roche)

Su banyosu (Nüve)

Vorteks (Heidolph)

Buzdolabı (Arçelik)

Ependorf Tüpü (1,5 ml'lik)

Manga Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Nanodrop 1000 (peqLab)

LightCycler 480 real-time PCR (Roche)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

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

CpGenome Universal Methylated DNA

CpGenome Universal Unmethylated DNA

Bisülfite Modifikasyon Kiti (QIAGEN)

GSTP1 Forward ve Reverse Primer Çifti (Metabion)

CDH1 Forward ve Reverse Primer Çifti (Metabion)

Proteinaz K (QIAGEN)

Distile Su

Ksilol

%70'lik etil alkol

%100'lük etil alkol

PBS (phosphate buffered saline)

Parafilm

3.2.3. Kullanılan Primerler

3.2.3.1. GSTP1 Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler

GSTP1 geninin promotor bölge hipermetilasyonunu belirlemek için;

metile forward; 5'-TTC GGG GTG TAG CGG TCG TC-3'

metile reverse; 5'-GCC CCA ATA CTA AAT CAC GAC G-3'

unmetile forward; 5'-GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT-3'

unmetile reverse; 5'-CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA-3'

primerleri kullanılmıştır. Liyofilize halde ve 0.04 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan GSTP1 metile forward primeri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde firmanın önerisi

olan 323 µl; GSTP1 metile reverse primeri 347 µl, GSTP1 unmetile forward primeri 341 µl ve GSTP1 unmetile reverse primeri 378 µl PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözülmüştür ve bloklanarak eşit hacimler halinde -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2.CDH1 Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler

CDH1 geninin promotor bölge hipermetilasyonunu belirlemek için;

metile forward; 5’- TTA GGT TAG AGG GTT ATC GCC T-3’

metile reverse; 5’- TAA CTA AAA ATT CAC CTA CCG AC-3’

unmetile forward; 5’- TAA TTT TAG GTT AGA GGG TTA TTG T-3’

unmetile reverse; 5’- CAC AAC CAA TCA ACA ACA CA-3’

primerleri kullanılmıştır. Liyofilize halde ve 0.04 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan CDH1 metile forward primeri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde firmanın önerisi olan 298 µl; CDH1 metile reverse primeri 357 µl, CDH1 unmetile forward primeri 368 µl ve CDH1 unmetile reverse primeri 294 µl PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözülmüştür ve bloklanarak eşit hacimler halinde -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.3. Yöntemler

3.3.1.Parafinli Doku Örneklerinden DNA Elde Edilmesi

3.3.1.1.Deparafinizasyon İşlemi

-İçinde parafin bloğa sarılı dokular bulunan ependorflara 1200 µl ksilol eklenmiştir.

-15 sn vorteks yapılmıştır ve örnekler 14000rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.

- Süpernatant atılarak aynı işlem 2 defa tekrarlanmıştır.
- Pelet üzerine 1200 µl %100'lük alkol eklenmiştir.
- 15 sn vorteks yapılmıştır ve örnekler 14000rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılarak pelete 1200 µl %70'lik alkol eklenmiştir.
- 15 sn vorteks yapılmıştır ve örnekler 14000rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Alkol iyice uzaklaştırılıp örnekler 1 saat etüvde bırakılmıştır.
- Kuruyan örnekler 200 µl Tissue Lysis Buffer (ATL) ve 20 µl Proteinaz K eklenip vorteks yapılmıştır.
- Örnekler 70°C çalkalamalı su banyosunda 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında örnekler 200 µl Lysis Buffer (AL) eklenmiştir ve tekrar 70 °C'de 10 dk su banyosuna bırakılmıştır.
- Bu işlemlerden sonra elde edilen ürün 840 µl olmuştur 1000 µl tamamlanması için bir tampon çözelti olan 160 µl PBS eklenmiştir.

3.3.1.2.DNA İzolasyonu

Deparifizasyon işleminden sonra doku örneklerinden DNA elde edilmesinde robotik DNA izolasyon sistemi kullanılmıştır. Doku örnekleri ise doğrudan robotik DNA izolasyon sistemine yüklenmiştir. Sample volume 1000 µl, elution volume 100 µl ve 'DNA Tissue' protokolü seçilmiştir.

Robotik sistemde Proteinaz K, yıkama solüsyonları ve DNA'yı tutmak için manyetik parçacıkların ve pipetaj için boş kuyucukların bulunduğu bir kartuş sistemi, pipet uçlarının yerleştirilmesi için tip trayler ve örnek ve elüsyon tüpleri için bir rak bulunmaktadır.

Robotik sisteme kartuş ve tip trayler yerleştirilip örnek ve elüsyon tüpleri koyulduktan sonra bütün işlemleri otomatik gerçekleştirmektedir. İşlem yaklaşık 40 dakika sürmekte ve elde edilen DNA örnekleri -20 °C’de saklanmaktadır.

3.3.2. Bisülfite Modifikasyon İşleminin Gerçekleştirilmesi

Bir DNA sekansının metilasyon durumunu saptamak için kullanılan en iyi yöntem bisülfite modifikasyon işlemidir. Hedef DNA’nın sodyum bisülfite ile inkübasyonu sonucu unmetile olan sitozinler urasile dönüşürken metile sitozinler değişmeden kalır.

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

-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 ependorfa alınmıştır.

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

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

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

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

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

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

-Spin tüpüne 500 µl Wash Buffer (BW) eklenmiştir.

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

-Aynı işlem bir defa daha gerçekleştirilerek spin tüpleri 2 µl'lik toplama tüplerine aktarılmıştır.

-14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildikten sonra spin tüpleri ependorfa koyulmuştur.

-Spin tüpündeki filtreye 35 µl Elution Buffer (EB) filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konularak 12000rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir ve aynı işlem bir kere daha tekrarlanmıştır.

3.3.3. MS-HRM Cihazına Yükleme

Bisülfıt modifikasyon işlemi sonrasında MS-HRM tekniği uygulanmıştır. Bu teknikte modifikasyona tabi tutulan DNA'ların LightCycler 480 real-time PCR cihazı ile PCR amplifikasyonu ve yüksek rezolüsyonlu erime reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu algoritmada bilinmeyen PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri ile metile olmayanın metile olana oranının bilindiği kontrol PCR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri karşılaştırılmıştır.

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

10 µl Master Mix

3 µl Forward primer

3 µl Reverse primer

2,5 µl MgCl₂

1 µl H₂O konularak pipetaj yapılmıştır.

Ayrıca örneklerin metilasyon yüzdelerini saptamak için kontrol grupları kullanılmıştır. Kontrol grupları hazırlanırken CpGenome Universal Methylated DNA ve CpGenome Universal Unmethylated DNA kitlerinden yararlanılmıştır. Bu kitler bisülfıt

işleminde geçirilerek %100 metile, %75 metile, %50 metile, %25 metile ve %100 metile olmayan kontrol DNA'ları hazırlanmıştır.

%100 metile kontrol DNA'nın hazırlanması

10 µl Master mix
3 µl Forward primer
3 µl Reverse primer
2,5 µl MgCl₂
1 µl H₂O
10 µl %100 metile kontrol DNA

%75 metile kontrol DNA'nın hazırlanması

10 µl Master mix
3 µl Forward primer
3 µl Reverse primer
2,5 µl MgCl₂
1 µl H₂O
10 µl %75 metile (7,5 µl %100 metile kontrol DNA+2,5 µl %100 metile olmayan kontrol DNA) kontrol DNA

% 50 metile kontrol DNA'nın hazırlanması

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

1 µl H₂O

10 µl %50 metile (5 µl %100 metile kontrol DNA+5 µl %100 metile olmayan kontrol DNA) kontrol DNA

% 25 metile kontrol DNA'nın hazırlanması

10 µl Master mix

3 µl Forward primer

3 µl Reverse primer

2,5 µl MgCl₂

1 µl H₂O

10 µl %25 metile (2,5 µl %100 metile kontrol DNA+7,5 µl %100 metile olmayan kontrol DNA) kontrol DNA

%100 unmetile kontrol DNA'nın hazırlanması

10 µl Master mix

3 µl Forward primer

3 µl Reverse primer

2,5 µl MgCl₂

1 µl H₂O

10 µl % 100 metile olmayan kontrol DNA

Toplam 80 örnek ve 5 kontrol grubu playte konulduktan sonra LightCycler 480 real-time PCR cihazına yüklendi.

3.3.4.Değerlendirme

Çalışmamızda meme kanseri tanısı almış 80 olgudan alınan doku örneklerinin DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bu örneklerin bisüfit modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler GSTP1 ve CDH1 genlerinin metilasyon durumları incelenmek üzere MS-HRM cihazına yüklenmiş ve analizleri yapılmıştır. Örnekler ile aynı playte eklenen DNA kontrol grupları %100 metile, %75 metile, %50 metile, %25 metile ve %100 metile olmayan olarak belirlenmiştir. Kontrol DNA'lerden alınan pikler ile hasta örneklerinden alınan pikler karşılaştırılarak GSTP1 ve CDH1 genlerinin metilasyon seviyeleri tespit edilmiştir.

Hastalar yaş, hastalığın evresi, lenf nodu metastazı, östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve human epidermal reseptör (HER2/neu) gibi meme kanserinde önemli olan bazı biyolojik belirteçlere göre gruplandırıldıktan sonra örneklerin metilasyon seviyeleri ile bu biyolojik belirteçler karşılaştırılmıştır.

3.3.5.İstatiksel Analiz

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

4.BULGULAR

Çalışmamızda Aralık 2010- Mayıs 2011 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Kliniğinden gelen meme kanseri tanısı almış 80 olgudan alınan doku örneklerine MS-HRM yöntemi kullanılarak metilasyon analizi yapılmıştır. Olguların yaşları, evreleri, lenf nodu metastazları, ER, PR ve HER2/neu gibi biyolojik belirteçleri hasta dosyalarından temin edilmiştir. Tablo 4.1.'de hastalarımızın demografik özellikleri verilmiştir. Çalışmamız meme kanserli hastaların GSTP1 ve CDH1 genlerindeki metilasyon durumlarını belirleyerek meme kanseri için geliştirilecek tedavi yöntemlerine de ışık tutmak, hastalığın evresi ve prognozu arasında ilişki kurabilmek, hastalarımıza ait demografik ve histopatolojik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek amacıyla yapılmıştır.

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

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

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

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

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

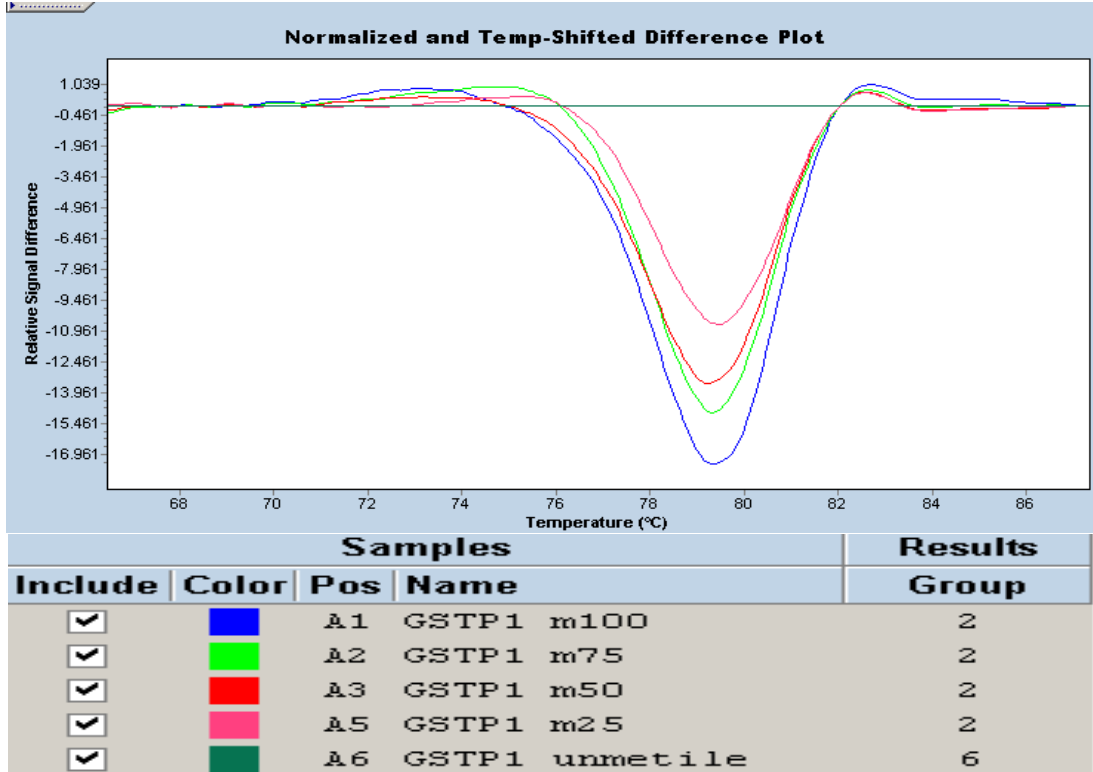
Meme kanserinde önemli bir biyolojik belirteç olarak gösterilen HER2/neu durumları değerlendirildiğinde ise olguların 30/80 (%37,5) HER2/neu(+) iken, 50/80 (%62,5) HER2/neu(-) olarak saptanmıştır

Tablo 4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Olguların Demografik Özellikleri

Hastaların demografik özellikleri	HASTA SAYISI
YAŞ	
≤ 50 YAŞ	19
>50 YAŞ	61
EVRE	
EVRE II	30
EVRE III	44
EVRE IV	6
LENF NODU METASTAZI	
POZİTİF	68
NEGATİF	12
ER	
POZİTİF	54
NEGATİF	26
PR	
POZİTİF	42
NEGATİF	38
HER2/neu	
POZİTİF	30
NEGATİF	50

4.1.GSTP1 Geninde Saptanan Bulgular

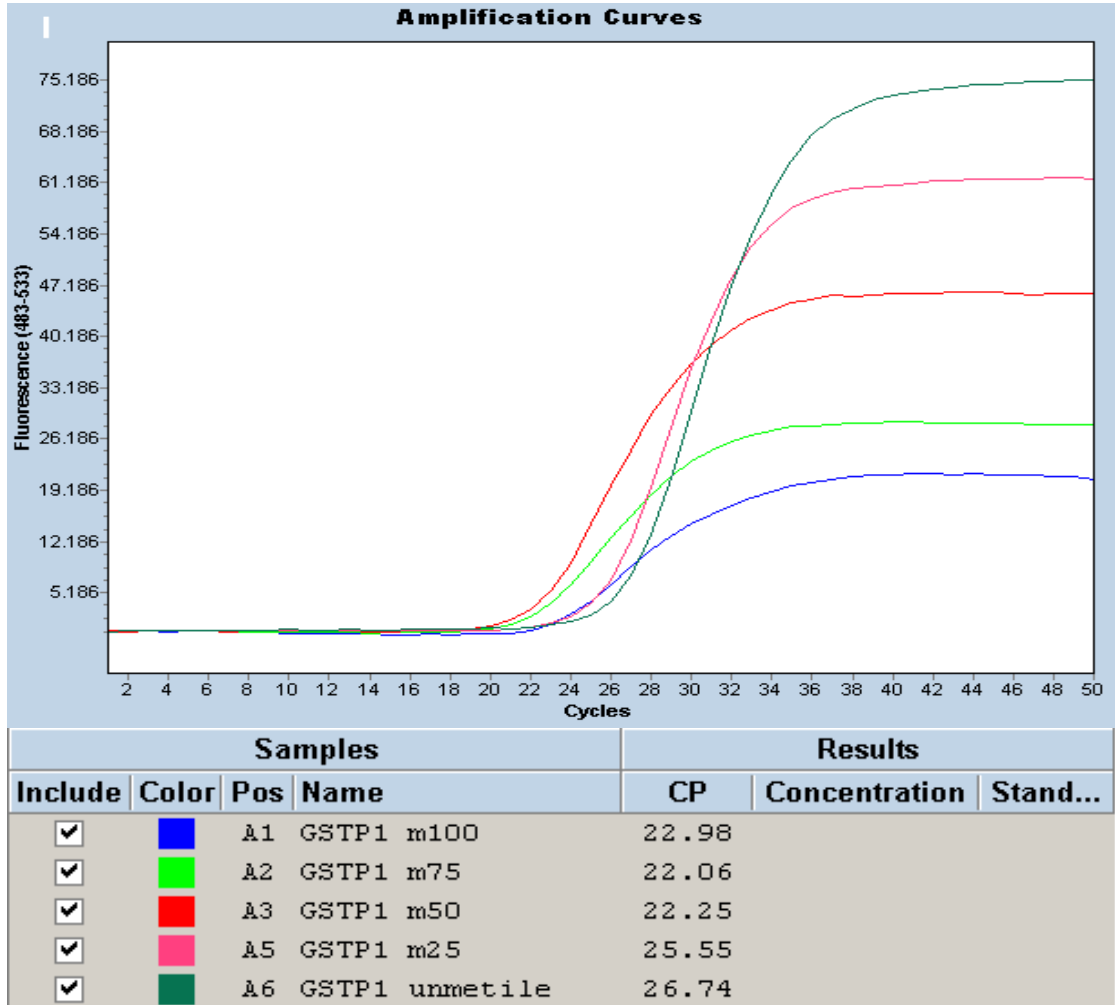
LightCycler 480 real-time PCR cihazı ile çalışma tamamlandıktan sonra ilk önce negatif grupları ortaya çıkartılır. Düşük floresan sinyali veren bu örneklerin erime eğrileri yoktur. Cihazdaki negatif filtre negatif örnekleri gruplandırır ve bu örnekler çalışmaya dahil edilmez. Bizim çalışmamızda negatif örnek saptanmamıştır. 'Difference plot' ile analiz bölümünde ise referans eğri üzerinden örneklerin erime eğrileri karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamızda metile olmayan kontrol DNA'sı referans eğri olarak kullanılmıştır. Erime eğrileri benzer olan örnekler otomatik olarak aynı gruplara kümelendi. Metilasyona uğrayan örnekler metile kontrol gruplarının yanında, metile olmayan örnekler ise metile olmayan kontrol grubunun yanında pik vermiştir.



Şekil 4.1. GSTP1 Geni Metile Olan ve Metile Olmayan Kontrol DNA'larından Alınan Pikler

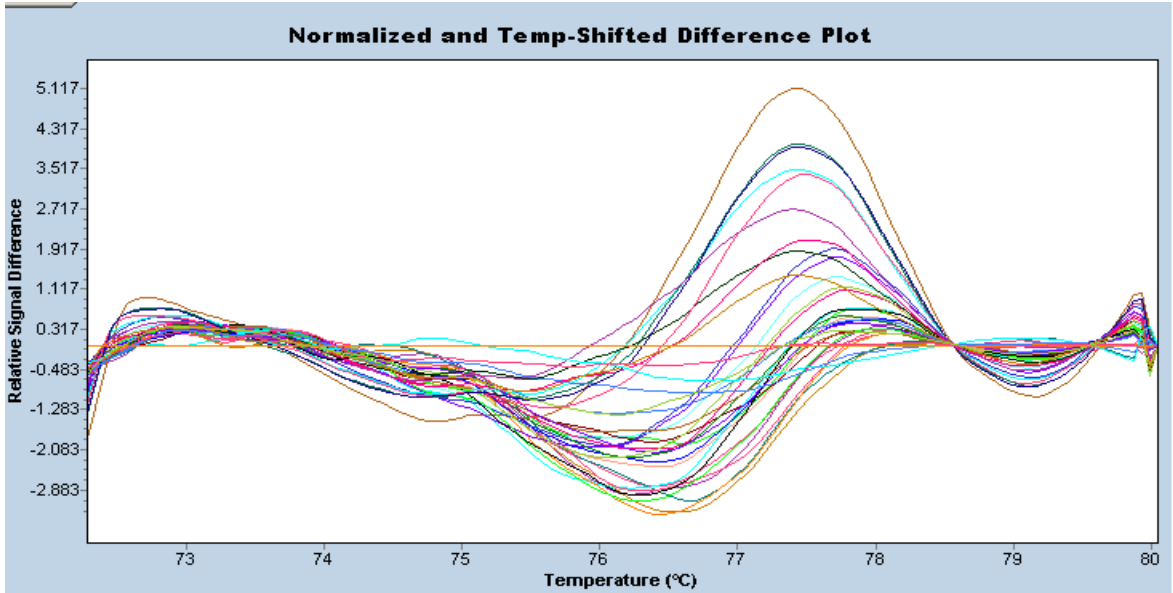
Çalışmamızda kullandığımız kontrol DNA'larına ait pikler şekil 4.1'de verilmiştir. Kontrol DNA'ları metile olmayan, %25 metile, %50 metile, %75 metile ve %100 metile olarak farklı pikler vermiştir.

Örneklerin amplifikasyona girme döngüleri de değerlendirilmiştir. Metile örnekler daha erken döngülerde amplifikasyona girerken, metile olmayan örnekler daha geç döngülerde amplifikasyona girmiştir. Şekil 4.2'de metile kontrol DNA'larının ve metile olmayan kontrol DNA'larının amplifikasyona girme döngüleri gösterilmiştir.



Şekil 4.2. GSTP1 Geni Metile Olan ve Metile Olmayan Kontrol DNA'larının Amplifikasyona Girme Eğrileri

Genel olarak bakıldığında meme kanseri tanısı almış olan 80 olgunun 66'sının (%82'sinin) GSTP1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, olguların 14'ünde (%18'inde) metilasyon gözlenmemiştir. Şekil 4.3'de metile olan ve metile olmayan örnekler için pikler gözlenmektedir. Metile olmayan örnekler referans eğrisinin üstünde gözlenirken, metile örnekler referans eğrisinin altında gözlenmiştir. Metile örneklerde ise alınan pikler ile kontrol gruplarının pikleri karşılaştırılarak örneklerin metilasyon seviyeleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.3.Olgularımızdaki Metile Olan ve Metile Olmayan Pikler

GSTP1 geninin promotor bölge metilasyonu 17/80 olguda %100 metile, 2/80 olguda %75 metile, 14/80 olguda %50 metile, 13/80 olguda %25 metile, 20/80 olguda ise %25'in altında metile olarak saptanmıştır. Ayrıca olguların 14/80'ünün GSTP1 geninde promotor bölge metilasyonu saptanmamıştır. Tablo 4.2.'de olgularımızın GSTP1 geni promotor metilasyonu yüzdeleri gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Olgularımızın GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu Yüzdeleri

METİLASYON ORANI	HASTA ORANI(%)
%100 METİLE	%21
%75 METİLE	%3
%50 METİLE	%17
%25 METİLE	%16
%25 ALTI METİLE	%25
UNMETİLE	%18

4.1.1. Yaş ile GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

GSTP1 geni promotor metilasyonu gözlenen olguların yaş ortalamaları $58 \pm 11,07$ iken, metile olmayan olan olguların yaş ortalamaları $57,36 \pm 11,56$ olarak saptanmıştır.

Yaşı ≤ 50 olan 15/19 olgunun GSTP1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 4/19 olguda promotor metilasyonu gözlemlenmemiştir. Yaşı > 50 olan 51/61 olgunun GSTP1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 10/61 olguda ise promotor metilasyonu gözlenmemiştir. Yapılan ‘2 Proportions Testi’ ile yaş ve GSTP1 promotor metilasyonu arasındaki ilişki anlamsız kabul edilmiştir. ($p > 0,05$)

4.1.2. Tümörün Evresi ile GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

GSTP1 geninde promotor metilasyonu gözlenen 25/66 olgu evre II, 37/66 olgu evre III ve 4/66 olgu evre IV olarak saptanmıştır. Metile olan ve metile olmayan olguların, tümörlerin evresi ile dağılımı tablo 4.3’de gösterilmiştir. GSTP1 geninde promotor metilasyonu gözlenen olguların %56’sı evre III olarak saptanmıştır. Evre IV’de daha yüksek metilasyon oranı beklenmiştir fakat evre IV’deki olguların sayısının azlığı nedeni

ile tam olarak karşılaştırma yapılamamıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu tümörün evresi ile GSTP1 geni promotor metilasyonu ilişkisi anlamsız kabul edilmiştir. ($p>0,05$)

Tablo 4.3. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların Tümörlerin Evresine Göre Dağılımı

Evre	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Evre II	25 (%38)	5	30
Evre III	37 (%56)	7	44
Evre IV	4 (%6)	2	6
Toplam	66 (%100)	14	80

4.1.3. Lenf Nodu Metastazı ile GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

GSTP1 promotor hipermetilasyonu gözlenen 57/66 olgunun lenf nodu metastazı pozitif iken, 9/66 olgu lenf nodu bakımından negatiftir. Metile olan ve metile olmayan olguların lenf nodu metastazı ile dağılımı tablo 4.4’de gösterilmiştir. Metile olan olguların %86,4’ünde lenf nodu pozitifliği saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda GSTP1 promotor metilasyonu ile lenf nodu metastazı pozitifliği anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$)

Tablo 4.4. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların Lenf Nodu Tutulumuna Göre Dağılımı

Lenf nodu	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Pozitif	57(%86,4)	11	68
Negatif	9(%13,6)	3	12
Toplam	66(%100)	14	80

4.1.4. ER ile GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

GSTP1 promotor metilasyonu gözlenen 44/66 olguda ER(+) iken 22/66 olguda ER (-) olarak saptanmıştır. Metile olan ve metile olmayan olguların ER durumlarına göre dağılımları tablo 4.5’de gösterilmiştir. Metile olan olguların %66,7’si ER(+) olarak saptanmıştır. Yapılan istatikselsel analiz sonucu GSTP1 promotor metilasyonu ile ER pozitifliği anlamlı kabul edilmiştir. ($p<0,05$)

Tablo 4.5. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların ER Durumlarına Göre Dağılımı

ER	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Pozitif	44(%66,7)	10	54
Negatif	22(%33,3)	4	26
Toplam	66(%100)	14	80

4.1.5. PR ile GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

GSTP1 promotor metilasyonu gözlenen 33/66 olguda PR(+) iken, 33/66 olguda PR (-) olarak saptanmıştır. Metile olan ve metile olmayan olguların PR durumlarına göre dağılımları tablo 4.6'da gösterilmiştir. GSTP1 promotor metilasyonu gözlenen olguların %50'si PR(+), %50'si PR(-) olarak saptandığından karşılaştırma yoluna gidilememiştir.

Tablo 4.6. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların PR Durumlarına Göre Dağılımı

PR	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Pozitif	33(%50)	9	42
Negatif	33(%50)	5	38
Toplam	66(%100)	14	80

4.1.6. HER2/neu ile GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

GSTP1 promotor metilasyonu gözlenen 26/66 olguda HER2/neu(+) iken, 40/66 olguda HER2/neu(-) olarak saptanmıştır. Metile olan ve metile olmayan olguların HER2/neu dağılımları tablo 4.7'de gösterilmiştir. GSTP1 promotor metilasyonu gözlenen olguların % 60,6'sı HER2/neu(-) olarak saptanmıştır. Yapılan istatikselsel analiz sonucu HER2/neu negatifliği ile GSTP1 promotor metilasyonu anlamlı bulunmuştur. (p<0,05)

Tablo 4.7. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların HER2/neu Durumlarına Göre Dağılımı

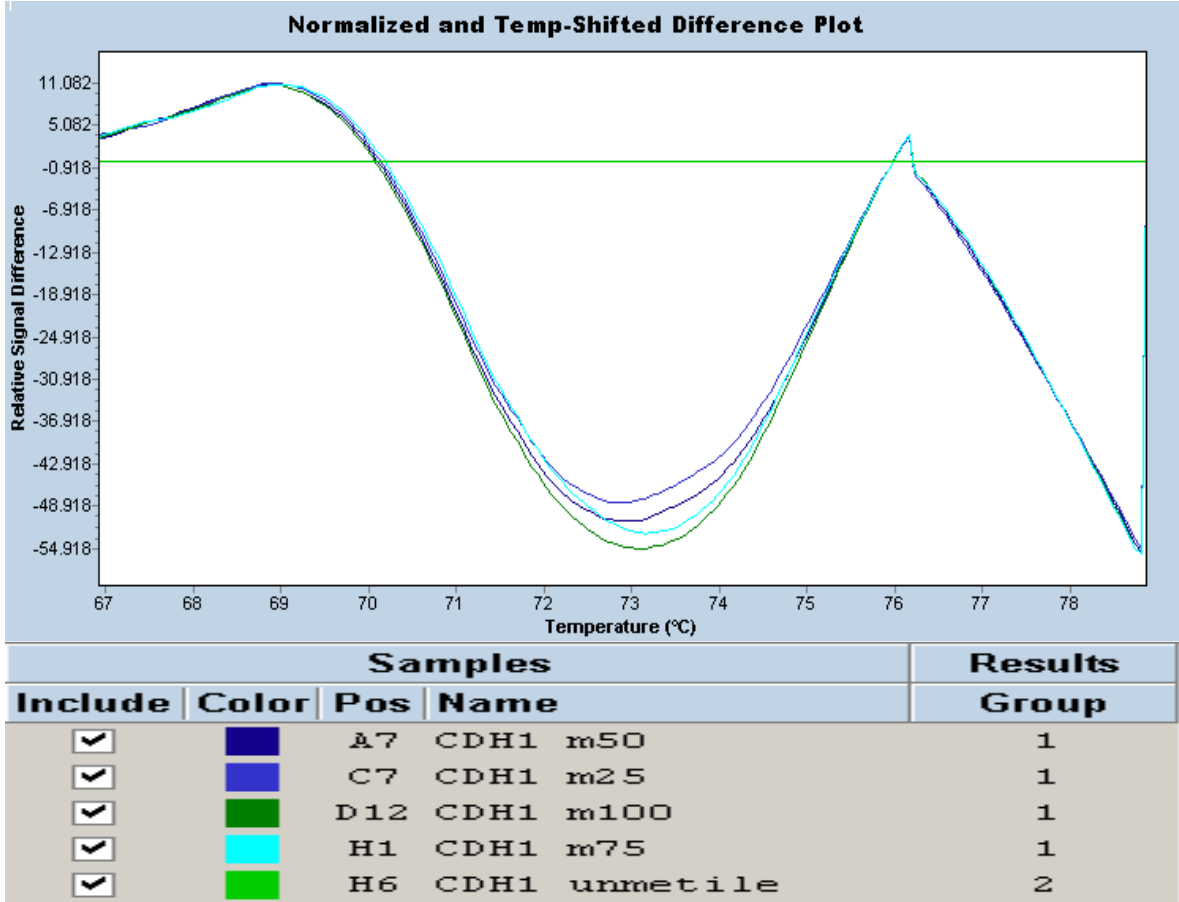
HER2/neu	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Pozitif	26(%39,4)	4	30
Negatif	40(%60,6)	10	50
Toplam	66(%100)	14	80

Tablo 4.8. GSTP1 Geni Promotor Metilasyonu ile Prognostik Faktörler

P. Faktörler	METİLE	UNMETİLE	TOPLAM	P DEĞERİ
EVRE				p>0,05
EVRE II	25 (%38)	5	30	
EVRE III	37 (%56)	7	44	
EVRE IV	4 (%6)	2	6	
LENF NODU				
POZİTİF	57 (%86,4)	11	68	P<0,05
NEGATİF	9 (%13,6)	3	12	
ER				
POZİTİF	44 (%66,7)	10	54	P<0,05
NEGATİF	22 (%33,3)	4	26	
PR				değerlendirilemedi
POZİTİF	33 (%50)	9	42	
NEGATİF	33 (%50)	5	38	
HER2/neu				
POZİTİF	26 (%39,4)	4	30	
NEGATİF	40 (%60,6)	10	50	P<0,05

4.2.CDH1 Geninde Saptanan Bulgular

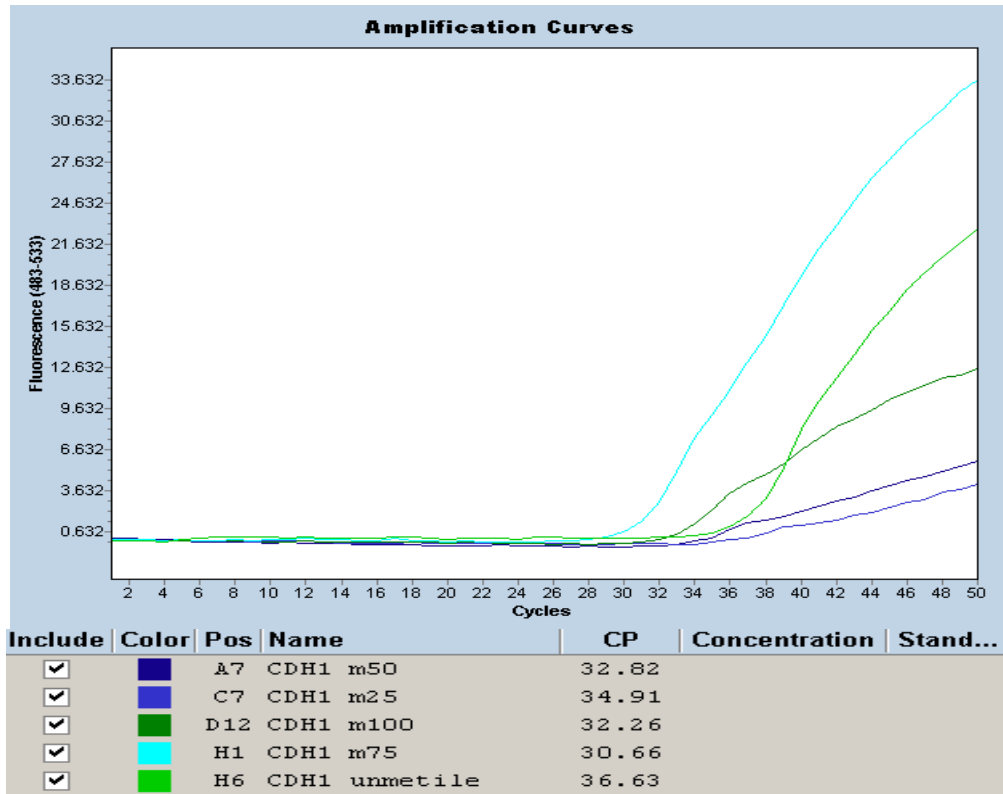
CDH1 geni metilasyon analizinde negatif örnek saptanmamıştır çalışılan bütün örnekler değerlendirmeye alınmıştır. 'Difference plot' ile analiz bölümünde metile olmayan kontrol DNA'sı referans eğri olarak kullanılmıştır. Erime eğrileri benzer olan örnekler otomatik olarak aynı gruplara kümelenmiştir. Metilasyona uğrayan örnekler metile kontrol DNA'larının yanında, metile olmayan örnekler ise metile olmayan kontrol DNA'sının yanında pik vermiştir.



Şekil 4.4. CDH1 Geni Metile Olan ve Metile Olmayan Kontrol DNA'larından Alınan Pikler

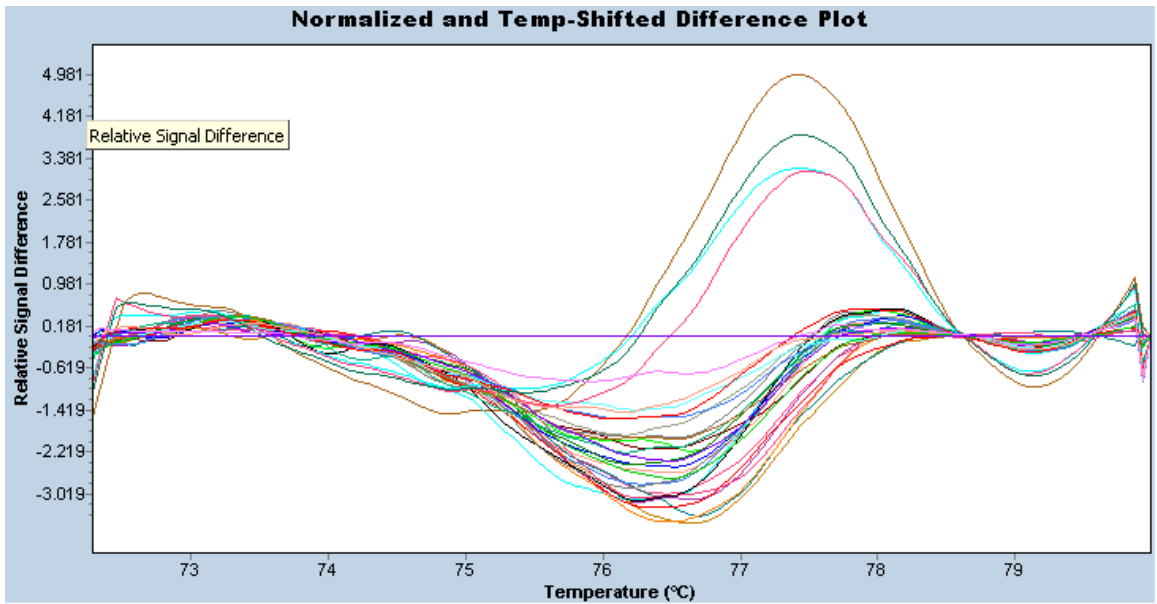
Çalışmamızda kullandığımız CDH1 geni kontrol DNA'sına ait pikler şekil 4.4'de verilmiştir. Kontrol grupları metile olmayan, %25 metile, %50 metile, %75 metile ve %100 metile olarak farklı pikler vermiştir.

Örneklerin amplifikasyona girme döngüleri değerlendirildiğinde metile örnekler daha erken döngülerde amplifikasyona girerken, metile olmayan örnekler daha geç döngülerde amplifikasyona girmiştir. Şekil 4.5'de metile kontrol DNA'larının ve metile olmayan kontrol DNA'larının amplifikasyona girme döngüleri gösterilmiştir. GSTP1 genindeki kontrol grupları ile CDH1 genindeki kontrol gruplarının amplifikasyona girme döngüleri karşılaştırıldığında CDH1 genine ait kontrol gruplarının daha geç döngülerde amplifikasyona girdiği görülmüştür. Bu 2 genin primer farkından ve bu primerlerin diziyeye oturmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.5. CDH1 Geni Metile Olan ve Metile Olmayan Kontrol DNA'larının Amplifikasyona Girme Eğrileri

Genel olarak bakıldığında meme kanseri tanısı almış olan 80 olgunun 76'sının (%95'inin) CDH1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, olguların 4'ünde (%5'inde) metilasyon gözlenmemiştir. Şekil 4.6'da metile olan ve metile olmayan örnekler ait pikler gözlenmektedir. Metile olmayan örnekler referans eğrisinin üstünde gözlenirken, metile örnekler referans eğrisinin altında gözlenmiştir. Metile örneklerde ise alınan pikler ile kontrol gruplarının pikleri karşılaştırılarak örneklerin metilasyon seviyeleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Olgularımızdaki Metile Olan ve Metile Olmayan Pikler

CDH1 geninin promotor bölge metilasyonu 15/80 olguda %100 metile, 32/80 olguda %75 metile, 21/80 olguda %50 metile, 8/80 olguda %25 metile olarak saptanmıştır. Ayrıca olguların 4/80'ünün CDH1 geninde promotor bölge metilasyonu saptanmamıştır. Tablo 4.9'da CDH1 geni promotor metilasyonu seviyeleri % olarak belirtilmiştir.

Tablo.4.9. Olgularımızın CDH1 Geni Promotor Metilasyonu Yüzdeleri

METİLASYON ORANI	HASTA ORANI(%)
%100 METİLE	%19
%75 METİLE	%40
%50 METİLE	%26
%25 METİLE	%10
METİLE OLMAYAN	%5

4.2.1. Olguların Yaşı ile CDH1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

CDH1 geni promotor metilasyonu gözlenen olguların yaş ortalamaları $58,92 \pm 10,80$ iken, metilasyon görülmeyen olguların yaş ortalamaları $49,25 \pm 14,29$ olarak saptanmıştır.

Yaşı ≤ 50 olan 17/19 olgunun CDH1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 2/19 olguda promotor metilasyonu gözlemlenmemiştir. Yaşı > 50 olan 59/61 olgunun CDH1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 2/61 olguda ise promotor metilasyonu gözlenmemiştir. Yapılan '2 Proportions Testi' ile yaş ve CDH1 promotor metilasyonu anlamsız kabul edilmiştir. ($p > 0,05$)

4.2.2. Tümörün Evresi ile CDH1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

CDH1 geninde promotor metilasyonu gözlenen 28/76 olgu evre II, 42/76 olgu evre III ve 6/76 olgu evre IV olarak saptanmıştır. Metile olan ve metile olmayan olguların, tümörlerin evresi ile dağılımı tablo 4.10'da gösterilmiştir. CDH1 geninde promotor metilasyonu gözlenen olguların %55'i evre III olarak saptanmıştır. Evre IV'de daha yüksek metilasyon oranı beklenmiştir fakat evre IV'deki olguların sayısının azlığı nedeniyle tam olarak karşılaştırma yapılamamıştır. Ayrıca evre IV'teki olguların hepsinin metile

olduğu saptanmıştır. Yapılan istatiksels analiz sonucu tümörün evresi ile CDH1 geni promotor metilasyonu ilişkisi anlamsız kabul edilmiştir. ($p>0,05$)

Tablo 4.10. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların Tümörlerin Evresine Göre Dağılımı

Evre	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Evre II	28(%37)	2	30
Evre III	42(%55)	2	44
Evre IV	6(%8)	0	6
Toplam	76(%100)	4	80

4.2.3. Lenf Nodu Metastazı ile CDH1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

CDH1 promotor hipermetilasyonu gözlenen 65/76 olgunun lenf nodu metastazı pozitif iken, 11/76 olgu lenf nodu bakımından negatiftir. Metile olan ve metile olmayan olguların lenf nodu metastazı ile dağılımı tablo 4.11'de gösterilmiştir. Metile olan olguların %85,5'inde lenf nodu pozitifliği saptanmıştır. Yapılan istatiksels analiz sonucunda CDH1 promotor metilasyonu ile lenf nodu metastazı pozitifliği anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo.4.11. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların Lenf Nodu Tutulumuna Göre Dağılımı

Lenf nodu	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Pozitif	65(%85,5)	3	68
Negatif	11(%14,5)	1	12
Toplam	76(%100)	4	80

4.2.4. ER ile CDH1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

CDH1 promotor metilasyonu gözlenen 51/76 olguda ER(+) iken 25/76 olguda ER(-) olarak saptanmıştır. Metile olan ve metile olmayan olguların ER durumlarına göre dağılımları tablo 4.12’de gösterilmiştir. Metile olan olguların %67,1’i ER(+) olarak saptanmıştır. Yapılan istatikselsel analiz sonucu CDH1 promotor metilasyonu ile ER pozitifliği anlamlı kabul edilmiştir. ($p<0,05$)

Tablo 4.12. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların ER Durumlarına Göre Dağılımı

ER	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Pozitif	51(%67,1)	3	54
Negatif	25(%32,9)	1	26
Toplam	76(%100)	4	80

4.2.5. PR ile CDH1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

CDH1 promotor metilasyonu gözlenen 39/76 olguda PR(+) iken, 37/76 olguda PR(-) olarak saptanmıştır. Metile olan ve metile olmayan olguların PR durumlarına göre dağılımları tablo 4.13'de gösterilmiştir. CDH1 promotor metilasyonu gözlenen olguların %51'i PR(+), %49'u PR(-) olarak saptandığından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0,05$)

Tablo 4.13. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların PR Durumlarına Göre Dağılımı

PR	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Pozitif	39(%51)	3	42
Negatif	37(%49)	1	38
Toplam	76(%100)	4	80

4.2.6. HER2/neu ile CDH1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

CDH1 promotor metilasyonu gözlenen 29/76 olguda HER2/neu(+) iken, 47/76 olguda HER2/neu(-) olarak saptanmıştır. Metile olan ve metile olmayan olguların HER2/neu dağılımları tablo 4.14'de gösterilmiştir. CDH1 promotor metilasyonu gözlenen olguların % 61,8'i HER2/neu(-) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu HER2/neu negatifliği ile CDH1 promotor metilasyonu anlamlı bulunmuştur. ($p<0,05$)

Tablo 4.14. Metile Olan ve Metile Olmayan Olguların HER2/neu Durumlarına Göre Dağılımı

HER2/neu	Metile	Metile Olmayan	Toplam
Pozitif	29(%38,2)	1	30
Negatif	47(%61,8)	3	50
Toplam	76(%100)	4	80

Tablo 4.15. CDH1 Geni Promotor Metilasyonu ile Prognostik Faktörler

P. Faktörler	METİLE	UNMETİLE	TOPLAM	P DEĞERİ
EVRE				p>0,05
EVRE II	28 (%37)	2	30	
EVRE III	42 (%55)	2	44	
EVRE IV	6 (%8)	0	6	
LENF				
POZİTİF	65 (%85,5)	3	68	P<0,05
NEGATİF	11(%14,5)	1	12	
ER				
POZİTİF	51 (%67,1)	3	54	P<0,05
NEGATİF	25 (%32,9)	1	26	
PR				değerlendirilemedi
POZİTİF	39 (%51)	3	42	
NEGATİF	37 (%49)	1	38	
HER2/neu				
POZİTİF	29 (%38,2)	1	30	
NEGATİF	47(%61,8)	3	50	P<0,05

5.TARTIŞMA

CpG dinükleotidlerinde gözlenen DNA metilasyonu, memelilerdeki epigenetik değişikliklerin başında gelir. Epigenetik mutasyon, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ifadesini kalıtlılabilir şekilde değiştirir ve kanser oluşumunda genetik değişiklikler kadar etkilidir. Promotor bölge hipermetilasyonu, devamındaki genin susturulmasına neden olur, özellikle tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesinde önemlidir. Kanser hücrelerinde gözlenen epigenetik değişikliklerin saptanması, konuyla ilgili bilgilerin artması hem kanserin önlenmesi hem prognozunun belirlenmesi hem de tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından giderek önem kazanmaktadır (52).

Meme kanseri, tanısı konulduktan sonra farklı klinik seyirler gösteren bir hastalıktır. Hastalığın nüks riskini hesaplamak, kötü seyirli alt grupları belirleyebilmek, verilecek tedaviye karar verebilmek için bazı biyolojik belirteçlere ihtiyaç vardır. Bu sayede prognozu çok iyi olup sistematik tedaviden fayda göremeyecek ya da prognozu çok kötü olup agresif tedaviye ihtiyaç duyacak hasta gruplarını belirlemek mümkün olmaktadır. Meme kanserinde kullanılan standart biyolojik belirteçler; tümör büyüklüğü, lenf nodu tutulumu, histolojik grade, ER ve PR durumudur. Lenf nodu tutulumu meme kanserli hastalarda bilinen en güçlü prognostik faktördür. Klinik olarak tespit edilen meme kanserli hastalarda %50 oranında lenf nodu tutulumu saptanır. Lenf nodu tutulumunun tümör büyüklüğü ile ilişkili fakat ER ve PR gibi steroid reseptörlerden bağımsız olduğu tespit edilmiştir. Steroid reseptörler ise uzun yıllardır meme kanserlerinin tedavi kararlarını vermek için kullanılmaktadır. Yayılmı olan kanserlerde % 37-80 oranında ER, %45-69 oranında PR pozitifliği bildirilmiştir. ER pozitif hücrelerin oranı, tümörün farklılaşma derecesi ve hormonal tedaviye vereceği yanıt ile ilişkilidir. Genel olarak ER düzeyi yüksek olan tümörler iyi prognoza sahiptir (21).Tümörün prognozu açısından ER tayininin daha güvenilir olması için östrojen ile düzenlenen PR protein düzeyine de bakılır. Tedaviye en yüksek cevap oranı hem ER, hem PR pozitif tümörlerdedir (45,46). PR muhtemel hastalığın tekrar etmesi durumunda endokrin tedaviye daha iyi yanıt göstergesi olduğundan, genel sağkalımla ilişkili bulunmaktadır (46). Meme kanserlerinde HER2'nin de prognostik ve prediktif önemi

bulunmaktadır. Meme kanserli hastalarda % 25-30 oranında HER2 amplifikasyon ve overekspresyonu bildirilmiştir. HER2 pozitifliği tümörün agresif davranışı ve kötü prognoz ile yakından ilişkilidir (46).

Yaptığımız çalışmada meme kanserinde hipermetilasyonu gözlenen GSTP1 ve CDH1 genlerinin metilasyon durumları ile meme kanserinde kullanılan lenf nodu tutulumu, tümörün evresi, ER, PR ve HER2/neu gibi bazı prognostik faktörler karşılaştırılarak bunlar arasındaki ilişkinin saptanması amaçlanmıştır.

5.1. GSTP1 ve CDH1 Genlerinin MS-HRM Yöntemi Sonuçları İle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

Lee ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada meme kanserinin gelişim sürecinde GSTP1 promotor hipermetilasyonunu incelemişlerdir. 124 meme kanseri hastası ve 15 kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada GSTP1 geninin metilasyon durumunu Nested metilasyon spesifik PCR ile belirlemişlerdir. Çalışılan 124 meme kanseri hastasının 36/124 (29%)'unun GSTP1 geninde metilasyon saptamışlardır. Metilasyon oranları; invaziv duktal hiperplazide 4/24 (16.7%), in situ duktal karsinomada 18/49 (36.7%), invaziv duktal karsinomada 14/36 (38.9%) olarak gözlenirken normal meme dokusunda metilasyon gözlenmemiştir. Yaptıkları çalışmada GSTP1 promotor hipermetilasyonun meme kanserinin erken evrelerinde görüldüğü ve meme kanserinde normal dokudan, invaziv duktal karsinomaya gidene kadar GSTP1 metilasyon oranının arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca invaziv duktal karsinomada yaş, evre ve östrojen reseptörü gibi risk faktörleriyle GSTP1 promotor metilasyonu arasında bir ilişki kurulamamıştır (33).

Çalışmamızda incelediğimiz bütün örneklerin invaziv karsinom olması nedeni ile in situ karsinomlardaki metilasyon oranları belirlenememiştir. Fakat Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada GSTP1 promotor hipermetilasyonu erken evre tümörlerde de gözlemlendiğinden meme kanserinin evrelenmesinde bir biyomarkır olarak düşünülebilir. Yapılan çalışmada 36/124 (%29) oranında GSTP1 hipermetilasyonu

saptanırken bizim çalışmamızda 66/80 (%82) oranında metilasyon saptanmıştır. Bu durumun metilasyon analizde kullanılan yöntemlerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. MS-HRM yöntemi diğer yöntemlerden daha spesifik bir yöntemdir. Ayrıca diğer yöntemlerin saptayamadığı az miktardaki metilasyon değişiklikleri bu yöntem ile saptanabilmektedir. Çalışmamızda 17/80 (%21) olgu %100 metile, 2/80 olgu (%3) %75 metile, 14/80 (%17) olgu %50 metile, 13/80 (%16) olgu %25 metile, 20/80 olgu (%25) ise %25'in altında metile olarak saptanmıştır. Olgularımızın %58'i düşük seviyede ya da orta seviyede metiledir. %24'ü ise diğer yöntemlerinde saptayabildiği yüksek seviyede metiledir. Bu yüzden çalışmamızda GSTP1 hipermetilasyonu yüksek oranda bulunmuştur. Benzer şekilde biyolojik belirteçler ile karşılaştırıldığında yaş ve tümörün evresi ile GSTP1 hipermetilasyonu ilişkisi anlamsız bulunmuştur. Fakat çalışmamızda metile olan 44/66 olguda (%66,7) ER(+) iken, 22/66 olguda (%33,3) ER(-) olarak saptanmış ve GSTP1 metilasyonu ER pozitifliği ile anlamlı bulunmuştur.

Kim ve arkadaşları 2006 yılında kötü prognozlu meme kanseri ile GSTP1 geninin CpG adalarındaki hipermetilasyon arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmaya invaziv duktal ve invaziv lobüler karsinomalı toplam 174 primer meme kanserli örnek dahil edilmiştir. Metilasyon durumları MS-PCR yöntemi ile çalışılmış ve bu 174 örneğin 24 (%14)'ünde GSTP1 geninin CpG adalarında hipermetilasyon saptanmıştır. Ayrıca GSTP1 geni metilasyon durumu histolojik grade, lenf nodu metastazı, östrojen reseptör ve progesteron reseptör gibi biyolojik belirteçler ile karşılaştırılmıştır. Metile olan 3/24 olgunun (%13) histolojik grade'i 1 iken, 19/24 olgunun (%79) grade'i 2 ve 2/24 olgunun (%8) gradi 3 olarak belirlenmiştir. Gradi 2 olan hastalarda daha yüksek oranda metilasyon gözlemlendiğinden histolojik grade ile promotor hipermetilasyonu anlamlı bulunmamıştır. Metile olan 12/24 (%50) olgu PR(+) iken, 12/24 (%50) olgu PR(-) olarak saptandığı için PR ile GSTP1 hipermetilasyonu karşılaştırılamamıştır. Metile olan 19/24 (%79) olguda ER(+) iken, 5/24 (%21) olguda ER(-) olarak saptanmış ve GSTP1 promotor hipermetilasyonu ile ER pozitifliği anlamlı bulunmuştur. Ayrıca metile olan 11/24 (%46) olgunun lenf nodu metastazı yok iken, 13/24 (%54) olguda lenf nodu metastazı görülmüştür. Böylece lenf nodu metastazı ile GSTP1 promotor hipermetilasyonu anlamlı bulunmuştur. Yapılan çalışmanın sonucunda

GSTP1 geninin CpG adalarındaki hipermetilasyon durumunun diğer klasik biyolojik belirteçlerden bağımsız olarak meme kanserinde istatistiksel olarak anlamlı bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir (1).

Bizim çalışmamızda GSTP1 metilasyon oranı 66/80 (%82) olarak saptanmıştır. Bu durumun metilasyon analizinde kullanılan yöntemlerin farklı olmasından ve tümör heterojenitesinden kaynaklandığı düşünülebilir. Çalışmamızda benzer şekilde metile olan 25/66 olgu (%38) evre II, 37/66 olgu (%56) evre III ve 4/66 olgu (%6) evre IV olarak saptanmıştır ve evre IV'de daha yüksek metilasyon beklendiğinden GSTP1 hipermetilasyonu ile tümörün evresi ilişkilendirilememiştir. Metile olan 33/66 (%50) olgu PR(+) ve 33/66 (%50) PR(-) olduğundan yaptığımız çalışmada PR ile GSTP1 metilasyon durumu karşılaştırılamamıştır. Metile olan 44/66 (%66,7) olgu ER(+), 22/66 (%33,3) olgu ise ER(-) olarak saptanmıştır. Kim ve arkadaşlarının bulduğu sonuca benzer olarak ER pozitifliği ile GSTP1 hipermetilasyonu anlamlı bulunmuştur. Metile olan 57/66 (%86,4) olguda lenf nodu metastazı saptandığından lenf nodu metastazı varlığı ile GSTP1 hipermetilasyonu anlamlı bulunmuştur.

Caldeira ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada invaziv meme kanserlerinde CDH1 promotor hipermetilasyonu ile E-kaderin protein ekspresyon ve diğer immunohistokimyasal parametreler olan HER2/neu, ER ve PR ekspresyon düzeylerini karşılaştırmışlardır. MS-PCR ile yaptıkları çalışmaya 71 invaziv duktal, 5 invaziv lobüler, 1 metaplastik, 1 apokrin ve 1 papiller karsinoma dahil edilmiştir. Çalışılan örneklerin hepsi kötü prognozu histolojik ve klinik olarak gösteren, histolojik gradi 2 ve 3 olan, lenf nodu metastazı olan örneklerdir. Yapılan çalışmada CDH1 promotor hipermetilasyonu %72 olarak bulunmuştur. 52/72 duktal karsinomada, 4/5 lobüler karsinomada, 1 apokrin karsinomada metilasyon gözlenmiştir. E-kaderin protein düzeyinin ise tüm örneklerin %85'inde azaldığı saptanmıştır. CDH1 hipermetilasyonuna uğrayan invaziv duktal karsinoma örneklerinde ise ER ve PR protein ekspresyon düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. CDH1 geni hipermetilasyonu ile HER2/neu durumu arasında istatistiklere yansıyan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (8).

Bizim çalışmamızda CDH1 geni promotor hipermetilasyonu 76/80 (%95) olarak saptanmıştır. MS-PCR yöntemi metilasyon analizinde örnekler sadece metile olan ve metile olmayan olarak ayrılmaktadır. MS-HRM yöntemi ise çok daha spesifiktir. Örnekleri metile olan ve metile olmayan olarak ayırmaktan ziyade metile olan örneklerin metilasyon oranlarını saptayabiliriz. Çalışmamızda 15/80 (%19) olgu %100 metile, 32/80 (%40) olgu %75 metile, 21/80 (%26) olgu %50 metile, 8/80 (%10) olgu %25 metile olarak saptanırken iken 4/80 (%5) olguda metilasyon saptanmamıştır. CDH1 geni promotor hipermetilasyonu metile olan ve metile olmayan olarak ayrıldığında ya da metile örnekler kendi içlerinde yüksek ve düşük metilasyon olarak değerlendirildiğinde her 2 durumda da CDH1 geni metilasyon oranı yüksek bulunmuştur. Bu CDH1 geninin invazyon geni olması nedeniyle aslında beklenen bir sonuçtur. Çünkü CDH1 geninin metastatik lezyonlarda gösterdiği metilasyon oranı in situ duktal lezyonlardakinin yaklaşık olarak 2 katına çıkmaktadır bizim çalıştığımız örneklerin ise hepsi invaziv lezyondur. Caldeira ve arkadaşlarından farklı olarak bizim çalışmamızda ER pozitifliği ile CDH1 promotor hipermetilasyonunu anlamlı bulunmuştur. Metile olan 51/76 (%67,1) olgu ER(+) iken, 25/76 (%32,9) olgu ER(-) olarak saptanmıştır. PR(+) olan olgular 39/76 (%51) iken, PR(-) olgular 37/76 (%49) olarak saptanmış ve istatistiklere yansıyan anlamlı bir fark bulunmamıştır. Calderia ve arkadaşlarının aksine bizim çalışmamızda HER2/neu negatifliği ile CDH1 hipermetilasyonu anlamlı bulunmuştur. Metile olan 29/76 (%38,2) olgu HER2/neu(+) iken, 47/76 (%61,8) olgu HER2/neu (-) olarak saptanmıştır. Olgularımızın büyük tümör boyutları, evre III'deki olgu sayısı fazlalığı, lenf nodu pozitifliği düşünülürse HER2/neu negatifliği ile CDH1 hipermetilasyonunun anlamlı çıkması beklenen bir sonuçtur.

2008 yılında Sunami ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada meme kanserinde hipermetilasyonu gözlenen bazı genlerdeki epigenetik değişikliklerin ER(-) ve ER(+) durumları ile ilişkisi araştırılmıştır. 65 ER(+) ve 65 ER(-) invaziv meme kanserli hastanın RASSF1A, CCND2, **GSTP1**, TWİST, APC, NES1, RARbeta2 ve **CDH1** genlerindeki metilasyon durumlarındaki farklılıklar ile ER durumları arasındaki ilişki incelenmiştir. ER(+) hasta grubunda RASSF1A, CCND2, **GSTP1**, TWİST ve APC genlerinin metilasyon oranları ER(-) hasta grubundan önemli ölçüde daha yüksek

gözlenmiştir. Fakat NES1, RARBETA2 ve **CDH1** genlerinin metilasyon durumlarında önemli bir fark gözlenmemiştir. ER(+) ve ER(-) durumlarda farklı metilasyon oranları gösteren bu 5 gen biyolojik belirteçlere göre incelendiğinde hastaların menopozal dönemleri ve tümör boyutları ile ER(+) gruptaki metilasyon oranları ve ER(-) gruptaki metilasyon oranları birbirlerine çok yakın sonuçlar göstermiştir. Ayrıca bu 8 genin metilasyon oranlarındaki değişiklikler ile hastaların HER2 durumları incelenmiştir. RASSF1A, **GSTP1** ve APC genlerinde HER2(+) gruptaki metilasyon oranları HER2(-) gruptan daha yüksek gözlenirken; CCND2, TWIST, NES1 ve RARBETA2 genlerinde önemli bir fark görülmemiştir. Ayrıca bu 8 biyomarkır arasında **CDH1** geni HER2(-) grupta önemli ölçüde yüksek metilasyon frekansı göstermiştir. Bu çalışma sonucunda ER(+) tümörlerin epigenetik özelliklerinin ER(-) tümörlerden farklı olduğu sonucuna varılmıştır. GSTP1 hipermetilasyonu lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca lenf noduna bakılmaksızın GSTP1 hipermetilasyonunun ER(+) grupta ER(-) gruptan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular meme kanserindeki epigenetik değişikliklerin ER ekspresyonu tarafından etkilendiğini göstermiştir. Ayrıca RASSF1A, CCND2, **GSTP1**, TWIST ve APC genlerindeki promotor hipermetilasyonları birbiriyle benzerken yani bunlar birbiri ile ilişkili genler iken CDH1 geninin bu genlerden bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır (57).

Bizim çalışmamızda Sunami arkadaşlarının buldukları sonuçlara benzer olarak GSTP1 geni hipermetilasyonu ER(+) olgularda daha yüksek gözlenmiştir ve lenf nodu metastazı ile GSTP1 hipermetilasyonu anlamlı bulunmuştur. Farklı olarak HER2/neu(+) grup ile GSTP1 hipermetilasyonu ilişkilendirilirken bizim sonuçlarımızda HER2/neu(-) ile GSTP1 hipermetilasyonu ilişkilendirilmiştir. Bu farklılık tümörün agresifliği ve prognoz ile ilgili olabilir. Sunami ve arkadaşlarının sonuçlarına benzer olarak bizim çalışmamızda da CDH1 geni promotor hipermetilasyonu ile HER2/neu(-) anlamlı bulunmuştur. Fakat yaptıkları çalışma sonucunda Sunami ve arkadaşları CDH1 genini diğer genlerden bağımsız olarak rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızın sonucunda GSTP1 promotor hipermetilasyonu ile CDH1 promotor hipermetilasyonu birbirine çok yakın sonuçlar göstermiştir ve bu genlerin birbirinden bağımsız olduğu sonucuna

varılamamıştır. Böyle bir sonuca varmak için sadece GSTP1 değil, meme kanseri ile ilişkili diğer genlerde de birçok çalışma yapılarak bunları korele etmek gereklidir.

Hoque ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada 8 tümör supresör genin (**GSTP1**, **CDH1**, APC, CTNNB1, TIMP3, ESR1, MGMT, THBS1, TMS1) promotor hipermetilasyonunu araştırmışlardır. Çalışmaya 32 normal doku (tümöre uzak bölgeden alınan), 26 atipik duktal hiperplazi, 50 in situ duktal karsinoma ve 62 invaziv duktal karsinoma örnek dahil edilmiştir. APC, CTNNB1, TIMP3, ESR1 **GSTP1** ve **CDH1** genlerinde hem preinvaziv hemde invaziv lezyonlarda promotor hipermetilasyonu gözlenmiştir. APC, CTNNB1, **CDH1** genlerinde ise patolojik örneklerle normal doku karşılaştırıldığında metilasyon seviyelerinin çok yüksek olduğu saptanmıştır. CDH1 metilasyonu preinvaziv lezyonların %30'nda gözlenirken invaziv tümörlerin %42'sinde gözlenmiştir böylece en çok **CDH1** geninde invaziv duktaldan preinvaziv lezyonlara gidene kadar metilasyon sıklığının azaldığı ve en büyük farkın bu gende görüldüğü saptanmıştır (25).

GSTP1 ve CDH1 genlerinde hem preinvaziv hemde invaziv lezyonlarda promotor hipermetilasyonu gözlenmesi bu genlerin meme kanserinde bir biyomarkır olabileceğini gösterebilir. Bizim çalışmamızda preinvaziv lezyonlar ile invaziv lezyonların metilasyon durumları ile bir karşılaştırma yapılamamıştır. Fakat her 2 gende de %25 ve %25'in altında metilasyon sıklığı yüksek oranda görülmüştür. Hoque ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada CDH1 promotor metilasyonu invaziv tümörlerde %42 olarak saptanırken, bizim çalışmamızda %95 olarak saptanmıştır. Bu durumun çalışılan yöntem farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir.

Shinozaki ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada biyolojik belirteçleri bilinen 151 primer meme kanserinde RASSF1A, APC, TWİST, **CDH1**, **GSTP1** ve RARbeta2 genlerindeki promotor hipermetilasyonunu araştırmışlardır. MS-PCR yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada hastaların yaş ortalaması 55, tümör boyutlarının ortalaması ise 3.1cm olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda CDH1 hipermetilasyonu meme tümörlerinin %53'ünde saptanırken, GSTP1 hipermetilasyonu %21'inde

saptanmıştır. Biyolojik belirteçlerle karşılaştırıldığında hastaların yaşı, menapozal durumu, tümör boyutu ve evresi çalışılan hiçbir gen ile ilişkili bulunmamıştır. GSTP1 hipermetilasyonu ile lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilirken, CDH1 hipermetilasyonu ise lenfovasküler invazyon ve ER(-) tümörle ilişkilendirilmiştir (54).

Shinozaki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada CDH1 promotor hipermetilasyonu %53, GSTP1 hipermetilasyonu %21 olarak saptanırken, bizim çalışmamızda CDH1 promotor hipermetilasyonu %95, GSTP1 promotor hipermetilasyonu ise %82 olarak saptanmıştır. Bu durumun analiz yönteminin farklı olmasından ve çalıştığımız örneklerin invaziv lezyonlar olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Shinozaki ve arkadaşlarının sonuçlarına benzer olarak bizim çalışmamızda da yaş ve tümör evresi ile hiçbir gen ilişkili bulunmamıştır. GSTP1 hipermetilasyonu yine benzer olarak lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Shinozaki ve arkadaşlarının çalışmalarının sonucunda CDH1 promotor metilasyonu ile lenfovasküler invazyonun ilişkilendirilmesinin sebebi tümör boyutlarının büyük olması olabilir. Ayrıca bizim çalışmamızda GSTP1 ve CDH1 promotor hipermetilasyonu ile ER(+) anlamlı bulunmuştur. Marrow ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma (29) bunu desteklemektedir.

Marrow ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kültüre edilen meme kanseri hücrelerinde GSTP1 ve ER genlerinin ekspresyon seviyeleri arasında bir ilişki rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada GSTP1 ekspresyonu sadece ER (-) meme kanseri hücre serilerinde görülmüştür ancak ER (+) hücre serilerinin GSTP1 ekspresyonu promotor bölge hipermetilasyonu ile baskılanmıştır. Bu sonuçlar GSTP1 gen regülasyonunun östrojen sinyal yolağı ile düzenlendiğini göstermektedir fakat GSTP1 metilasyonunun yaş, tümör büyüklüğü, histolojik tipi, metastaz durumu ve PR ekspresyon seviyesi gibi diğer klinik parametrelerle bir ilişkisi kurulamamıştır (29).

6.SONUÇ

Çalışmamızda 80 meme kanserli olgudan alınan doku örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra hedef DNA'lar sodyum bisüfit ile inkübasyona sokularak bisüfit reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu olgularda GSTP1 ve CDH1 genlerinin promotor metilasyon durumlarını saptayabilmek için MS-HRM yöntemi ile metilasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. MS-HRM yöntemi ile meme kanserinde sıklıkla hipermetilasyonu gözlenen bu genlerin hem metilasyon seviyelerini saptayabilmek hem de meme kanserinin tedavisinde kullanılan bazı biyolojik belirteçleri karşılaştırabilmek için bu çalışma yapılmıştır.

Çalışmamız sonucunda GSTP1 ve CDH1 genlerinin promotor hipermetilasyonu diğer literatürdeki çalışmalardan önemli oranda yüksek seviyede bulunmuştur. Ayrıca diğer çalışmalardan farklı olarak meme kanserinde bu genlerin metilasyon yüzdeleri de saptanabilmiştir.

Başarılı bir MS-HRM çalışması için kullanılacak DNA miktarının ve kalitesinin önemli olduğu çalışmamızda da gösterilmiştir. Özellikle MS-HRM reaksiyonuna giren DNA örneklerinin yüksek kalitede olması, sonuçların güvenilirliği ve doğruluğu açısından çok önemlidir. İncelediğimiz bütün örneklerin amplifikasyona girmesi ve negatif örnek saptanmaması elde ettiğimiz DNA'ların ve gerçekleştirdiğimiz bisüfit reaksiyonunun kalitesinden kaynaklanmaktadır.

GSTP1 ve CDH1 genlerinin metilasyon durumları tespit edildikten sonra hasta dosyalarından temin edilen bazı prognostik faktörler ile karşılaştırılmıştır.

Meme kanserinde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın sonucunda;

1) GSTP1 promotor hipermetilasyonu olguların %82'sinde saptanırken, CDH1 promotor hipermetilasyonu olguların %95'inde saptanmıştır.

- 2) GSTP1 promotor hipermetilasyonunda %25 ve %25'in altında metilasyon oranı sık gözlenirken, CDH1 promotor hipermetilasyonunda %50 ve %75 metilasyon oranı sık gözlenmiştir.
- 3) GSTP1 ve CDH1 promotor hipermetilasyonları ile yaş arasında ilişki kurulamamıştır.
- 4) Lenf nodu metastazı ile GSTP1 ve CDH1 promotor hipermetilasyonu anlamlı bulunmuştur.
- 6) Çalışılan her 2 genin promotor hipermetilasyonları ile tümörün evresi arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.
- 7) ER(+) olgularda GSTP1 ve CDH1 promotor hipermetilasyonları anlamlı bulunmuştur.
- 8) PR durumu ile GSTP1 promotor hipermetilasyonu istatistiksel olarak karşılaştırılamamıştır. CDH1 promotor hipermetilasyonu ise PR(+) olgularda daha anlamlı gözlenmiş fakat istatistiklere yansıyan önemli bir fark gözlenmemiştir.
- 9) HER2/neu(-) olgularda GSTP1 ve CDH1 genlerinin promotor metilasyonları ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen verilerin, daha da anlam kazanabilmesi için hasta sayısının artırılması, hastaların sağ kalımları, tedavi protokolleri ve hastalığın prognozu gibi verilerin de eklenmesiyle çalışmanın genişletilmesi gerekmektedir. Ayrıca GSTP1 ve CDH1 genlerinin protein düzeyleri belirlenerek bizim bulduğumuz sonuçlar ile korele edilebilir. Çalışmamız ve belirttiğimiz yönde yapılacak çalışmalar, ülkemizde meme kanserlerinin tedavisi amacıyla yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine ve bu protokollerin klinikte kullanımlarına ışık tutacaktır.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Arai, T., Miyoshi, Y., Kim, S.J., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S., 2006, Association of GSTP1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancer, *Breast Cancer Res Treat*, 100, 169-176 p.
2. Ballestar, E., Etseller, M., 2002, The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing, *Carcinogenesis*, 23, 1103-9 p.
3. Battagli, C., Uzzo, R.G., Dulaimi, E., Ibanez de Caceres, I., Krassenstein, R., Al-Saleem, T., 2003, Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients, *Cancer Research*, 63, 8695-9 p.
4. Baylin, S.B., 2005, DNA methylation and gene silencing in cancer, *Nature Clinical Practise Oncology*, 1, 4-11 p.
5. Berardo, M.D., Allred, D.C., O'Connell, P., 1998, Breast Cancer, Principles of molecular medicine, 31, 625- 632 p.
6. Berkarda, B., 2000, Meme kanserine giriş, İstanbul İ.Ü. Basımevi, 3-5 s.
7. Booth, J., Boyland, E., Sims, P., 1961, An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione, *Biochemical Journal*, 79, 516-524 p.
8. Caldeira, J.R.F., Prando, E.C., Quevedo, F.C., Neto, F.A.M., Rainho, C.A., Rogatto, S.R., 2006, CDH1 promotor hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer, *BMC Cancer*, 6, 48 p.
9. Colot, V., Rossignol, J.L., 1999, Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device, *BioEssays*, 21, 402-411 p.
10. Demirelli, F.H., 2003, Kanserin moleküler genetik temelleri güncel klinik onkoloji sempozyum dizisi, 37, 9-15 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

11. Dickson, R.B., Lipman, M.E., Haris, J.R., Morrow, M., Lippman, M.E., Hellman, S., 1996, Oncogenes and supressor genes in: disease of the breast, Philadephia-NewYork, 221-235 p.
12. DiPaola, R.S., Patel, J., Rafi, M.M., 2001, Targeting apoptosis in prostate cancer, Am Hematology Oncology Clinics of North America, 15, 509–24 p.
13. Ducasse, M., Brown, M.A., 2006, Epigenetic aberrations and cancer, Molecular Cancer, 5, 60 p.
14. Engin, K., Çetintaş, S.K., 2005, Meme kanserinin toplumsal önemi, Nobel Tıp Kitapevleri, 1-5 s.
15. Epstein, A.H., Conolly, J.L., Gelman, R., 1989, The predictors of distant relapse following conservative surgery and radiotherapy for early breast cancer are similar to those following mastectomy, International Journal Radiation Oncology Biology Physics, 17, 755-760 p.
16. Erdem, F., Alper, D., 1997, Adhezyon Molekülleri, Türkiye Klinikleri, 17, 75-77 s.
17. Ergüler, G., Demir, N., Demir, R., 2002, Adezyon Moleküllerinin Yapısal Özellikleri ve Fonksiyonları, Türkiye Klinikleri J Med Sci, 22, 313-327 p.
18. Erol, A., Çiğdem, Ç., Hülya, Ö.H., Gülsüm, E., Kadir, D., Tülin, F.T., Hakan, T., Cem, K., Nurdan, T., 1999, E-cadherin expression in hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma: Comparison of normal, chronic hepatitis and cirrhotic liver, The Turkish Journal of Gastroenterology, 10, 92-94 p.
19. Etseller, M., Corn, P.G., Urena, J.M., Gabrielson, E., Baylin, S.B., Herman, J.G., 1998, Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia, Cancer Research, 58, 4515–4518 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

20. Etseller, M., Herman, J.G., 2002, Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours, *Journal Pathology*, 196, 1-7 p.
21. Francis, G., Beadlet, G., Thomas, S., Mengersen, K., 2006, Evaluation of estrogen and progesterone receptor status in HER-2 positive breast carcinomas and correlation with outcome, *Pathology*, 38, 391-398 p.
22. Gelmann, E.P., 1998, Oncogenes in human breast cancer. In the breast: comprehensive management of benign and malignant diseases, Ed:Bland KI, Copeland EM. WB Saunders Company, USA, 499-517 p.
23. Graff, J.R., Herman, J.G., Lapidus, R.G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D.F., Isaacs, W.B., Pitha, P.M., Davidson, N.E., Baylin, S.B., 1995, E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas, *Cancer Research*, 55, 5195–5199 p.
24. Güç, D., 2004, Adezyon molekülleri, *Ankem Dergisi*, 18, 158-163 s.
25. Hoque, M.O., Prencipe, M., Poeta, M.L., Barbano, R., Valori, V.M., Copetti, M., Gallo, A.P., Brait, M., Maiello, E., Apicella, A., Rossiello, R., Zito, F., 2009, Changes in CpG islands promotor methylation patterns during ductal breast carcinoma progression, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 10 p.
26. <http://radonk.tripod.com/memevre>
27. Iacopetta, B., Grieu, F., Phillips, M., Ruzkiewicz, A., Moore, J., Minamoto, T., 2007, Methylation levels of LINE-1 repeats and CpG island loci are inversely related in normal colonic mucosa, *Cancer Science*, 98, 1454-60 p.
28. İlvan, Ş., 2006, Meme patolojisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 54, 65-71 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

29. Jhaveri, M.S., Morrow, C.S., 1998, Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells, *Gene*, 210, 1–7 p.
30. Kenemans, P., Verstraeten, R.A., Verheijen, R.H.M., 2004, Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer, *Maturitas*, 49, 34-43 p.
31. Keramopoulos, A., Davaris, P., Pignatelli, M., 2002, Abnormal α -catenin expression in invasive breast cancer correlates with poor patient survival, *Histopathology*, 40, 536–546 p.
32. Kotnis, A., Sarin, R., Mulherkar, R., 2005, Genotype, phenotype and cancer: Role of low penetrance genes and environment in tumour susceptibility, *Journal of Bioscience*, 30, 93-102 p.
33. Lee, J.S., 2007, GSTP1 promotor hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis, *Virchows Arch*, 450, 637-642 p.
34. Lim, S.C., Lee, M.S., 2002, Significance of E-cadherin / β -catenin complex and cyclin D1 in breast cancer, *Oncology reports*, 9, 915-928 p.
35. Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R., 1992, Nomenclature for human glutathione transferases, *Biochemical Journal*, 15, 282, 305–306 p.
36. McGarvey, K.M., Fahrner, J.A., Grene, E., Martens, J., Jenuwein, T., Baylin, S.B., 2006, Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state, *Cancer Research*, 66, 3541-9 p.
37. Mitrunen, K., Hirvonen, A., 2003, Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: The role of polymorphic genes involved in estrogen biosynthesis and metabolism, *Mutation Research*, 544, 9-41 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

38. Miyoshi, Y., Iwao, K., Ikeda, N., Egawa, C., Noguchi, S., 2000, Breast cancer risk associated with polymorphism in CYP19 in Japanese women, *International Journal of Cancer*, 89, 325-328 p.
39. Moss, T.J., Wallrath, L.L., 2007, Connections between epigenetic gene silencing and human disease, *Mutation Research*, 618, 163-74 p.
40. Nakopoulou, L., Gakiopoulou-Givalou, H., Karayiannakis, A.J., Giannopoulou, I., Osborne, C., Wilson, P., Tripathy, D., 2004, Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications, *Oncologist*, 9, 361-77 p.
41. Özel, R., 2006, Prostat kanserli olgularda GSTP1 geninin ILE105VAL polimorfizminin ve promotor bölge hipermetilasyonunun araştırılması, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 187 s.
42. Palmisano, W.A., Divine, K.K., Saccomanno, G., Gilliland, F.D., Baylin, S.B., Herman, J.G., 2000, Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum, *Cancer Research*, 60, 5954-8 p.
43. Park, S.Y., Kim, B.H., Kim, J.H., Cho, N.Y., Choi, M., Yu, E.J., 2007, Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers, *Journal of Korean Medical Science*, 22, 311-7 p.
44. Pambles, Schroeder, K., Spencer, S., Meyer, D., Hallier, H., Bollt, H., 1994, Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): c DNA cloning and the characterization of genetic polymorphism, *Biochemical Journal*, 282, 305-6 p.
45. Putti, T.C., Abd El-Rehim, D.M., Rakha, E., 2005, Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis, *Modern pathology*, 18, 26-35.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

46. Rakha A.E, El Sayed E.A, Green R.A, Lee H.S.A, 2007, Prognostic markers in Triple –Negative Breast Cancers, *Cancer*, 1, 109 p.
47. Rice, J.C., Allis, C.D., 2001, Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation, *Current Opinion Cell Biology*, 13, 263-73 p.
48. Robertson, K.D., 2001, DNA methylation, methyltransferases and cancer, *Oncogene*, 20, 3139-55 p.
49. Sakızlı, M., Atabey, N., 2006, Hücreye Moleküler Yaklaşım, 15, 636 s.
50. Sakızlı, M., Atabey, N., 2006, Hücreye Moleküler Yaklaşım, 15, 631-32 s.
51. Sanchez-Cespedes, M., Etseller, M., Wu, L., Nawroz-Danish, H., Yoo, G.H., Koch, W.M., 2000, Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients, *Cancer Research*, 60, 892-5 p.
52. Sayın, D.B., 2008, Methylation and Cancer, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 28, 513-524 p.
53. Schnitt, S.J., Connolly, J.L., Rech, A., 1985, Breast relaps following primary radiation for early breast cancer, *International Journal Radiation Oncology Biology Physics*, 1, 1277-1284 p.
54. Shinozaki, M., Hoon, H.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, *Clinical Cancer Research*, 15, 2156-62 p.
55. Strange, R.C., Spiteri, M.A., Ramachandran, S., Fryer, A.A., 2001, Glutathione-S-transferase family of enzymes, *Mutation Research*, 482, 21-6 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 56.** Sulewska, A., Niklinska, W., Kozlowski, M., Minarowski, L., Naumnik, W., Niklinski, J., 2007, DNA methylation in states of cell physiology and pathology, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45, 149-158 p.
- 57.** Sunami, E., Shinozaki, M., Sim, M.S., Nguyen, S.L., Vu, A.T., Giuliano, A.E., Hoon, D.S.B., 2008, Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors, *Breast Cancer Research*, 10, 3 p.
- 58.** Sundbealarg, K., Johansson, A.S., Stenberg, G., Widersten, M., Seidel, A., Mannervik, B., Jernstrom, B., 1998, Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Carcinogenesis*, 19, 3, 433–436 p.
- 59.** Szyf, M., Knox, D.J., Milutinovic, S., Slack, A.D., Araujo, F.D., 2000, How does DNA methyltransferase cause oncogenic transformation, *Annals of the New York Academy of Science*, 910, 156-74 p.
- 60.** Tobler, A.R., O'Donoghue, M., Skare, P., Application note of methylation analysis using methylation-sensitive HRM and DNA sequencing, *Applied Biosystems*
- 61.** Ünal, G., Ünal, H., 2001, Meme Hastalıkları, *Nobel Tıp Kitabevleri*, 42, 310-313 p.
- 62.** Warnecke, P.M., Bestor, T.H., 2000, Cytosine methylation and human cancer, *Current Opinion in Oncology*, 12, 68- 73 p.
- 63.** Wojdacz, T.K., Dobrovic, A., 2007, MS-HRM a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation, *Nucleic Acids Research*, 35, 6, 41 p.

64. Yang, X., Yan, L., Davidson, N.L., 2001, DNA methylation in breast cancer, Endocrine Related Cancer, 115–127 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

65. Zhu, J., Yao, X., 2007, Use of DNA methylation for cancer detection and molecular classification, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 40, 135-41 p.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Mine ERCİ

Doğum Tarihi ve Yeri : 24.03.1985- ESKİŞEHİR

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

İletişim Adresleri : Yenimahalle Mahallesi, Engin Sokak, Engin Apartmanı No:18

Kat:5 Küçükçekmece / İSTANBUL

myneergee@hotmail.com

0 541 924 33 08 / 0 222 221 41 26

Eğitim Durumu

2008 - 2011 ESOĞÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Lisans Sonrası Yüksek Lisans Programı

2004 - 2008 ESOĞÜ Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü-ESKİŞEHİR

Lisans

1996 – 2003 Eskişehir Fatih Anadolu Lisesi - ESKİŞEHİR

Ortaokul - Lise

1991 – 1996

Cumhuriyet İlkokulu - ESKİŞEHİR

İlkokul

Üye Olduğu Kuruluşlar:

- Türkiye Biyologlar Derneği