

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

MEME KANSERLİ OLGULARDA
FGFR2 VE TNRC9 GEN POLİMORFİZMLERİNİN
RFLP YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PINAR EROL

YRD. DOÇ. DR. OĞUZ ÇİLİNGİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Pınar EROL' un Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "**Meme Kanserli Olgularda FGFR2 ve TNRC9 Gen Polimorfizmlerinin RFLP Yöntemi ile İncelenmesi**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

05.04.2011

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Prof.Dr. İrfan DEĞİRMENCI



Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR




Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS



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



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .11./04./20.11... tarih ve .894./...4034. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Türk meme kanserli kadın hastalarda (n=98) ve kontrol grubunda (n=56), FGFR2 genindeki rs2981582 ve TNRC9 genindeki rs3803662 polimorfizmlerini taramak ve bu polimorfizmlerin meme kanseri riski ile ilişkisini belirlemek amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada, Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji hastanesinde tanı konulan 98 meme kanseri hastasından ve ailesinde meme kanseri hikayesi olmayan 56 kontrol bireyinden alınan periferik kan örnekleri kullanıldı. FGFR2 genindeki rs2981582 ve TNRC9 genindeki rs3803662 SNP'lerinin belirlenmesi için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Yapılan analiz sonucunda, 98 hastanın FGFR2 genotip dağılımı CC (wildtype), CT (heterozigot) ve TT (polimorfik) genotipleri için sırasıyla, %39.8 (n=39), %49 (n=48), %11.2 (n=11) olarak bulundu. TNRC9 genotip dağılımı ise CC (wildtype), CT (heterozigot) ve TT (polimorfik) genotipleri için sırasıyla, %41.8 (n=41), %49 (n=48), %9.1 (n=9) olarak bulundu. Hastalar ve kontrol grubu arasında her iki polimorfizm için genotipik farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Östrojen reseptör durumuna göre hastalar karşılaştırıldığında her iki polimorfizmde T allel sıklığı dağılımı açısından ER pozitif hastalar ER negatif hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P<0.05$). Meme kanseri hastalarının evre ve grad özellikleri arasında yapılan karşılaştırmalarda da genotip dağılımları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Sonuç: Bu çalışma Türk meme kanseri hastalarında, FGFR2 ve TNRC9 gen polimorfizmlerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Meme kanseri riski ile FGFR2 ve TNRC9 polimorfizmleri arasındaki bağlantının daha büyük popülasyonlarda ve daha ayrıntılı çalışılması meme kanserine yatkınlığı olan bireylerin belirlenmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, FGFR2, TNRC9, PZR-RFLP

SUMMARY

Purpose: The aim of the study was to determine the rs2981582 polymorphism exists in FGFR2 gene and rs3803662 polymorphism exists in TNRC9 gene for Turkish breast cancer patients (n=98) and healthy controls (n=56) and to investigate the relation between breast cancer risk.

Materials and Methods: In this study, the peripheral blood samples were used which were obtained from both 98 breast cancer patients and healthy controls whom were diagnosed in Bursa Ali Osman Sönmez Oncology Hospital. The PZR-RFLP method was used to determine the rs2981582 polymorphism exists in FGFR2 gene and rs3803662 polymorphism exists in TNRC9 gene.

Results: According to the analysis that have been made, the genotypic distribution for FGFR2 of the 98 patients for CC (wildtype), CT (heterozygote) and TT (polymorphic) genotypes were found to be respectively, % 39,8 (n=39),%49 (n=48) and %11,2 (n=11). The genotypic distribution for TNRC9 of the 98 patients for CC (wildtype), CT (heterozygote) and TT (polymorphic) genotypes were found to be respectively, % 41,8 (n=41), %49 (n=48) and %9,1 (n=9).No genotypical difference was observed for both polymorphisms between patients and healthy controls ($p>0,05$). As the patients were compared according to ER status, for both polymorphisms, statistically ER positive patients were more significant than ER negative patients according to T allele frequency ($P<0.05$). No significant difference was observed between the genotypical distribution during the comparison of stage and grade characteristics of breast cancer patients.

Conclusion: This is the first study investigating the FGFR2 and TNRC9 gene polymorphism in Turkish breast cancer patients. Studying the relation of the breast cancer risk and FGFR2 and TNRC9 polymorphisms on bigger populations in a more detailed way can greatly help to determine the people who have breast cancer susceptibility.

Key words: Breast cancer, FGFR2, TNRC9,PCR-RFLP

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iii
SUMMARY	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	2
2.2. Meme Kanseri Etiyolojisi	3
2.3. Meme Kanserinin Evrelendirilmesi ve Sınıflandırılması	4
2.4. Meme Kanseri Genetiği	8
2.2.1. Düşük Penetrans Meme Kanseri Yatkınlık Genleri	10
2.2.1.1. FGFR2 Geninin Yapısı ve Fonksiyonu	12
2.2.1.2. TNRC9 Geninin Yapısı ve Fonksiyonu	16
2.5. Genetik Polimorfizm Kavramı	16
2.5.1. Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmleri	17
2.5.2. Polimorfik Markırların Genotiplenmesinde	18
PZR'nin kullanımı	
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
3.1. Gereçler	20
3.1.1. Örnekler	20
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	20
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	21

İÇİNDEKİLER (Devam Ediyor)	Sayfa
3.1.4 Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler	22
3.2. Yöntemler	23
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	23
3.2.2. PZR ile gen bölgelerinin Çoğaltılması ve RFLP Yöntemi ile Polimorfizm Analizi	24
3.2.2.1. PZR' de Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.2.2.2. FGFR2 Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması	24
3.2.2.3. FGFR2 PZR Ürünlerin Restriksiyon Enzim Analizi	26
3.2.2.4. FGFR2 rs2981582 Polimorfizminin Acil Enzimi ile Kesimi	26
3.2.2.5. Kesim Ürünlerinin Kontrolü	26
3.2.2.6. TNRC9 Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması	27
3.2.2.7. TNRC9 PZR Ürünlerin Restriksiyon Enzim Analizi	28
3.2.2.8. TNRC9 rs3803662 Polimorfizminin Bpu10I Enzimi ile Kesimi	29
3.2.2.9. Kesim ürünlerinin Kontrolü	29
3.3. İstatistiksel Analiz	30
4.BULGULAR	31
4.1. PZR-RFLP Analiz Bulguları	32
4.1.1. Acil Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	32

İÇİNDEKİLER (Devam Ediyor)	Sayfa
4.1.2. Bpu10I Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	33
4.2. FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 Polimorfizm Verilerinin Dağılım Analizi	34
4.3. FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 Polimorfizmleri ile Meme Kanserine Yatkınlık Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	35
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ	47
7.KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2002-2005 Türkiye raporu	3
Şekil 2.2. FGFR2 gen yapısı	12
Şekil 2.3. FGFR2 protein yapısı	13
Şekil 2.4. FGFR2 dimerizasyonu	14
Şekil 2.5. Polimorfik markırların genotiplemesinde PZR'nin kullanımı.	19
Şekil 4.1. FGFR2 rs2981582 polimorfizminin AciI enzim ile kesim sonuçları % 2'lik agaroz jel görüntüsü	33
Şekil 4.2. TNRC9 rs3803662 polimorfizminin Bpu10 enzimi ile kesim sonuçları % 3'lük agaroz jel görüntüsü	34

TABLolar DİZİNİ	Sayfa
Tablo 2.1. Meme kanserinin histolojik sınıflaması (WHO sınıflaması)	7
Tablo 3.1. FGFR2 gen bölgesi için kullanılan PZR şartları	25
Tablo 3.2. Acil enzimi için kesim protokolü	26
Tablo 3.3. TNRC9 gen bölgesi için kullanılan PZR şartları	28
Tablo 3.4. Bpu10I enzimi için kesim protokolü	29
Tablo 4.1. Olgulara ilişkin demografik ve klinik özellikler	31
Tablo 4.2. Meme Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Polimorfizmlerinde Genotip Dağılımı	35
Tablo 4.3. FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 polimorfizmlerinin Allel Frekansları	36
Tablo 4.4. Meme Kanserli Hastaların Reseptör Durumuna Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Polimorfizmlerinde Genotip Dağılımı	37
Tablo 4.5. ER Durumuna Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Allel Dağılım Analizi	37

TABLolar DİZİNİ (devam ediyor)	Sayfa
Tablo 4.6. PR Durumuna Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Allel Dağılım Analizi	38
Tablo 4.7. Evrelere Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Allel Dağılım Analizi	39
Tablo 4.8. Grادلara Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Allel Dağılım Analizi	39
Tablo 5.1. Literatür ile çalışmamızın populusyon, metod ve hasta-kontrol sayıları açısından karşılaştırılması	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
A	Adenin
aa	Aminoasit
ATM	Mutant Ataksi-Telanjiektazi
bç	Baz çifti
BRCA1	Breast Cancer 1, early onset
BRCA2	Breast Cancer 2, early onset
BRIP1	BRCA1 intreaktin protein
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CHEK	Chek Point Homolog
Cm	Santimetre
dATP	Deoksi adenozin trifosfat
DCIS	Duktal Karsinoma in situ
dCTP	Deoksi sitidin trifosfat
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
dGTP	Deoksi guanin trifosfat
DSO	Dünya Sağlık Örgütü
dTTP	Deoksi timidin trifosfat
DNA	Deoksiribonukleik asit
dNTP	Deoksi Nukleozid Trifosfat
FGFR	Fibroblast Büyüme faktör Reseptörü
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EPR	Epiregulin
ER	Östrojen Reseptörü
g	Gram
G	Guanin

GDP	Guanozin Difosfat
GF	Büyüme Faktörü
GFR	Büyüme Faktörü Reseptörü
Glu	Glutamat
GTP	Guanozin Trifosfat
HB-EGF	Heparine-bağlanan Epidermal Büyüme Faktörü
LSP1	Lenfosit Spesifik Protein 1
IHC	İmmunohistokimya
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
ml	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
MgCl₂	Magnezyum klorür
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
µmol	Mikromol
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Mm	Mikrometre
N	Amino
NB	Nibrin
NF1	Nero Fibromatosis Tip1
Ng	Nanogram
nM	Nanomol
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
MAP3K1	Mitogen Activated Kinase Kinase Kinase1
PALB2	Partner And Lokalizer of BRCA2
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PR	Progesteron Reseptörü
PTB	Fosfotirozin bağlanma bölgesi
PTEN	Fosfataz and Tensin
RFLP	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi

Rpm	Revolutions per minute
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SNP	Tek nükleotid deęiřimi
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
STK11	Serin Trionin Kinaz 11
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TGF-α	Transforme edici büyüme faktörü-alfa
TP53	Tümör protein 53
TM	Transmembran
TNRC9	Trinukleotid Repeat Containing 9
U	Unite
UV	Ultraviyole
°C	Santigrad derece

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanserli hastaların yaklaşık % 10'nun ailesinde çoklu meme kanseri hikayesi vardır ve yatkınlık allelleri kalıtsaldır. Yaklaşık dördte birinin BRCA1 ve BRCA2 genlerinde germline mutasyon tanımlanmıştır. İki gende yüksek risk yatkınlık genleri olarak tanımlanmıştır. BRCA1 ve BRCA2 genleri dışında TP53, PTEN, STK11, CDH1, NF1, NBN genleri de meme kanserinde yüksek risk yatkınlık genleridir. Fakat bu genlerdeki mutasyonlar sadece birkaç ailesel meme kanserinde açıklanmıştır (57).

Orta risk yatkınlık genlerinde ise ilk tanımlanan CHEK2 geni olmuştur. CHEK2 genindeki mutasyonların yaygınlığı populasyonlar arasında farklılık göstermesine rağmen sıklığı meme kanseri ailelerinin %5'inde tanımlanmıştır. ATM, BRIP1, PALB2 ve RAD50 ise diğer orta risk yatkınlık genleridir. Bu genlerdeki mutasyonlar meme kanseri riskini 2-3 kat artırır ve ailesel meme kanserlerinin %1'inde her üç gendeki mutasyonlar tanımlanmıştır (57).

FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1 genleri ise 2007 yılında yapılan genom çalışmasında düşük penetrans yatkınlık genleri olarak tanımlanmıştır. Yapılan birçok çalışmada bu genlerde bulunan SNP'ler meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur. Düşük yatkınlık genlerindeki mutasyonların, meme kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan sporadik meme kanserlerinin oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir. Düşük penetrans yatkınlık genlerindeki varyantların frekansı genel popülasyonda yüksek penetrans genlerinde olduğundan daha yüksektir. Yapılan çalışmalarda meme kanseri riski ile ilişkilendirilen SNP'ler arasında istatistiksel olarak en güçlü ilişki FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 SNP'leri olmuştur.

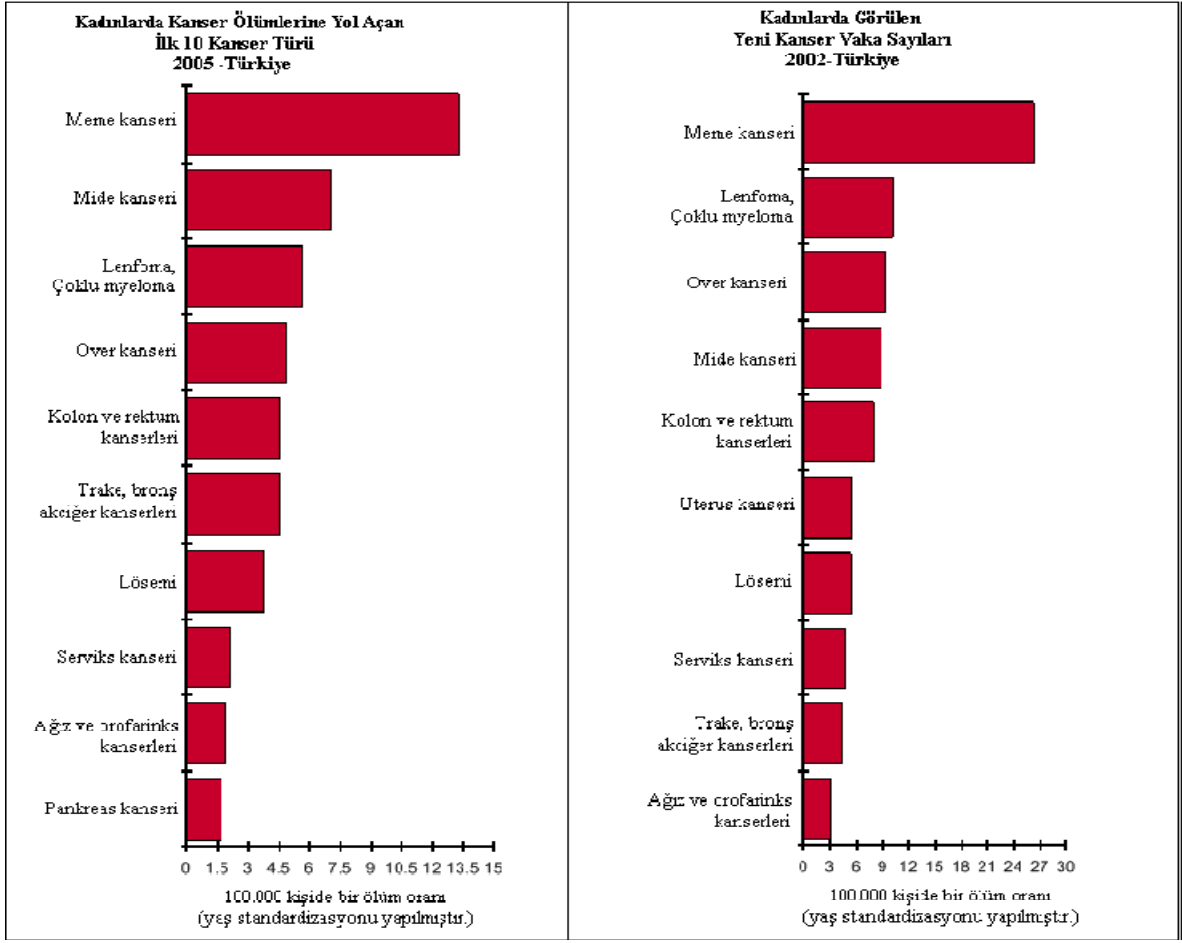
Bu bilgiler ışığında çalışmamızda meme kanseri tanısı almış hastalarda FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 SNP'lerinin meme kanseri riski ile ilişkisinin olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, gerek gelişmiş gerekse gelişmekte olan ülkelerde kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kadınlarda kanser nedenli ölümler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir. American Kanser Birliği 2008 tahmini verilerine göre, ABD'deki olgu sayısı 182.460 olup, meme kanserinden ölen kadın sayısı 40.480 olarak bildirilmiştir (26). 2006 yılı verilerine göre Avrupa'da 429.900 meme kanseri tanısı konulmuş olgu bildirilmiş ve bunlardan 131.900'i meme kanserinden ölmüştür. Meme kanseri tüm kanser olgularının %13.5'ini oluşturmaktadır. Avrupa'da yeni kanser olgularının toplam sayısının 2004'den beri 300.000 kadar arttığı bildirilmiştir (18).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Türkiye'deki kadınlarda meme kanserinin 2002 yılında en sık rastlanan kanser türü olduğu ve 2005 yılında da en çok ölüme sebebiyet veren kanser tipi olduğu ön görülmüştür (Şekil-2.1.) (29). Ülkemizde henüz düzenli bir meme kanseri kayıt programı olmadığından, kesin sıklığının belirlenmesi güçtür. Ancak mevcut verilere göre, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığın olduğu tahmin edilmektedir. Bu sıklık farkı, Türkiye'nin batısındaki yaşamın Avrupa'dakine benzerliğinden kaynaklanmaktadır (50).



Şekil- 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2002-2005 Türkiye raporu (27)

Her ne kadar günümüzde teşhisi konulan vaka sayısı, 1960'ın sonlarındakinin 3 katı kadar olsa da, son 10 yılda ölüm oranı beşte bir oranında azalmış ve 2007 yılı itibariyle azalmaya devam etmektedir. Geçen yılın ilk altı ayında 1,6 milyon kadın meme kanserinden dolayı hayatını kaybetmiştir. Bu rakam 2006 yılının aynı döneminden %5 daha düşüktür (Şekil-2.1.) (27). Bu durum günümüzde artık hastalığın etkili görüntüleme sistemleri sayesinde erken teşhis edilebilmesi ve eskiye göre daha gelişmiş tedavi yöntemlerinin kullanılmasıyla açıklanabilir (44).

2.2. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri bayanlarda özellikle menopoz sonrası ortaya çıkmaktadır fakat son zamanlarda menopoz öncesi vakalarda da artış görülmektedir.

Ortalama menopoz yaşı yaklaşık 50'dir ve menopoz hemen hemen tüm kadınlarda 45–55 yaşları arasında görülmektedir. Meme kanseri de özellikle 40–60 yaşları arasında kadınlarda en sık görülen hastalıktır (8).

Meme kanserinin halen yeni bilgilerin ortaya çıktığı ve gelişmelerin yaşandığı oldukça geniş bir alan olduğu ifade edilmektedir. Bununla birlikte meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekte, tüm dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Birçok risk faktörü ile ilişkili olan meme kanserinin, risk faktörlerinin azalmasına ve artmasına göre, görülme sıklığı da farklılık göstermektedir (24).

Meme kanserine neden olan faktörler arasında östrojene maruz kalma süresi, iyonizan radyasyona maruz kalma, hareketsiz yaşam tarzı, menarş ve menopoz yaşı, ilk doğurganlık yaşı, yüksek miktarda yağ içeren besinlerle beslenme, alkol, sigara, aile öyküsü ve genetik yatkınlık (BRCA1, BRCA2 ve diğer genlere bağlı olan yatkınlık) sayılabilir (3,5).

2.3. Meme Kanserinin Evrelendirilmesi ve Sınıflandırılması

Klinisyenler 20. yy başlarında tüm meme kanserlerinin aynı prognozları paylaşmadığı ve farklı tedavilere ihtiyaç duyduklarını fark etmişler, zamanla daha agresif tümörleri diğerlerinden ayırmada kullanılacak karakteristikler tanımlanmaya başlamışlardır. İlk olarak 1904'de Alman hekim Steinhil meme kanserinin üç prognostik evreye bölünmesini önermiştir. Buna göre I. Evre memede lokalize olmuş küçük tümörleri, II. Evre aksiler lenf nodları da dahil daha geniş tümörleri, III. Evre ise meme çevresindeki dokuyu sarmış tümörleri tanımlamaktadır.

1942'de Haagensen ve Stout (22), Steinhil'in evrelerine tüm vücuda yayılmış tümörleri de ekleyerek meme kanseri için dört basamaklı Columbia Klinik Sınıflandırma Sistemini sunmuşlardır. 1956 da Pierre Denoix, Tümör-Nod-Metastaz sistemini geliştirmiştir (11).

Bu sistem malign tümörlerin prognoza etkisi olabilecek ana morfolojik özelliklerini temel almaktadır. TNM evrelendirmesinde (T) primer tümörün büyüklüğü, (N) bölgesel lenf nodu içeriği ve boyutları, (M) ise uzak metastazları belirtir. Günümüze kadar TNM sistemi çeşitli güncellemelerle kullanılmaya devam etmiştir (64). Evreler arasında prognostik açıdan anlamlı derecede farklılıklar bulunmaktadır. Bu yüzden bir klinisyen prospektif olarak evrelerden yola çıkarak prognoz tahmininde bulunabilir. Bu özelliği ile meme kanseri evrelendirmesi oldukça işlevseldir (64). Örneğin evre I-II hastalarının sadece %5-12'si tanı sonrası 10 yıl içerisinde hayatını kaybederken, evre III hastalarında bu oran %60'a, evre IV de ise %90'a çıkmaktadır. Bunun yanında meme kanseri evrelendirmesi her evre için uygun tedavi seçeneklerini belirlemede de işlevseldir (4).

Meme kanseri için uzun yıllar kullanılan histopatolojik sınıflandırma artık yerini genetik sınıflandırmaya bırakmaktadır. Yapılan mikro-dizi ve immün histokimya çalışmaları sonrasında meme tümörleri aktif olan genlerine ve ifade ettikleri hormon reseptörlerine göre (ör. PR+, ER+, HER2+, üçlü negatif vb.) sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırma sonucu oluşturulan 'luminal A, luminal B, HER-2-yüksek-eksprese, bazal ve "normal" meme benzeri grupları ile hastalığın prognozu arasında çok büyük tutarlılık söz konusudur (69). Genomik değişiklikler farklılaşma derecesi (evre) ile de güçlü bir şekilde örtüşmektedir (63).

Lenf nodu metastazı, tümör çapı, histolojik grade ve histolojik tip klinikte rutin olarak kullanılan prognostik parametrelerdir (54). Buna ek olarak steroid hormon reseptörleri (östrojen ve progesteron reseptörü), moleküler belirteçler (HER-2/neu, TP53, c-Myc, RAS) meme kanseri prognozu üzerine etkilidir (10).

Aksiller Lenf Nodu Metastazı

Erken evre meme kanserlerinde aksiller lenf nodu negatif ya da pozitif olsun en önemli prognostik faktördür. Lenf nodu sayısı ile uzak metastaz yinelemesi arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır (40).

National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) verilerine göre 4 nodal grup bulunmaktadır: negatif nod, 1-3 pozitif nod, 4-9 pozitif nod ve 10 ya da daha fazla pozitif nod. Aksiller lenf nodu negatif olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım %82.8 iken, lenf nodu 13'den fazla olan hastalarda sağ kalım %28.4'e düşmektedir (7).

Tümör Çapı

Aksiller lenf nodu varlığı ve sayısı ile korelasyon gösteren bağımsız bir prognostik faktördür. 1 cm'den küçük tümörü olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %99 iken, 1-3 cm arası tümörlerde %89 ve 3-5 cm arası tümörlerde ise %86'dır (16).

Tümör Grade

Tümörlerin evrenmesinde çoğunlukla Scarff-Bloom-Richardson (SBR) sistemi kullanılır. Tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdukları tubulus yapılarının oranı ve mitoz sayısı 1'den 3'e kadar skorlanarak elde edilen skora göre evre elde edilir. Toplam skor 3-5 arasında ise evre I, 6 ya da 7 ise evre II ve 8 ya da 9 ise evre III tümör olarak belirlenir (31).

Histolojik Tip

Günümüzde meme karsinomlarının histolojik sınıflamasında en çok Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun öngördüğü sınıflama kullanılmaktadır (Tablo 2.1) (27).

Tablo 2.1. Meme kanserinin histolojik sınıflaması (WHO sınıflaması)

<p>1. In Situ Karsinom</p> <ul style="list-style-type: none">• In situ duktal karsinom• In situ lobuler karsinom
<p>2. İnvaziv karsinom</p> <ul style="list-style-type: none">• İnvaziv duktal karsinom• İnvaziv lobuler karsinom• Tubular karsinom• İnvaziv kribriform karsinom• Meduller karsinom• Musinoz karsinom• İnvaziv papiller karsinom• İnvaziv mikropapiller karsinom• Apokrin karsinom• Sekretuar (juvenil) karsinom• Adenoid kistik karsinom• Metaplastik karsinom• Noroendokrin karsinom• İnflamatuvar karsinom

Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Erken evrede bir tümörün, meme içinde henüz oluştuğu yerle sınırlı olması in situ veya invaziv olmayan olarak tanımlanır. Benzer bir yaklaşımla, tümörün memenin başka kısımlarına yayılması ise invaziv veya infiltratif olarak isimlendirilir. İn situ karsinomda kötü huylu epitelyal hücreler bazal membranla çevrili iken, invaziv karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya yayılma göstermektedirler. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenfatik ve kan damarlarını geçerek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir.

Meme kanseri memenin dışına yayıldığında koltuk altındaki lenfatik nodüller, memenin diğer lenf nodları, kemik, karaciğer ve akciğer en sık görülen yayılım yerleridir.

“In situ”, “özgün yerinde” anlamına gelmektedir. Bu tip meme kanserinde kanser hücreleri orijinal lokasyonlarında kaldığı, çevre dokulara ya da daha ötelere metastaz yapmadıkları ya da yayılmadıkları için “in situ” ifadesi kullanılmıştır. Başlıca iki tip karsinoma in situ bulunmaktadır. Anormal hücreler lobül içerisinde çoğaldıklarında lobüler karsinom in situ olarak adlandırılmaktadır. Buna karşın anormal hücreler süt kanallarının içinde çoğaldıklarında duktal karsinom in situ olarak tanımlanmaktadır.

İnvaziv meme kanseri ise iki tip meme kanseri içinde en ciddi olanıdır. Lobüllerin ya da kanalların içindeki anormal hücreler çevre meme dokusuna yayıldığında ortaya çıkmaktadır. Bu süreç kanserin lenf düğümlerine, daha ileri evrelerde ise karaciğer, akciğer ve kemik gibi alanlara yayılmasını olanaklı kılmaktadır (23).

İnvaziv duktal karsinom, invaziv meme karsinomlarının en sık görülen tipidir (%70-80). Herhangi bir özel tip morfoloji göstermeyen tüm invaziv karsinomlar bu gruba alınır (32).

İnvaziv lobular karsinom, tüm invaziv meme karsinomlarının %5-15’ini oluşturmaktadır ve hormon replasman tedavisi alan kadınlarda daha sık görülür (32).

2.2. Meme Kanseri Genetiği

Meme kanseri 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, bazı özel hücrel genlerin değişimleri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar onkogenler olarak isimlendirilirler ve protoonkogenlerden türevlenirler. Proto-onkogenler normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı proteinlere ait kodlar içerirler. Eğer bir mutasyon sonucu proto-onkogenin yapısı değişirse oluşan hasar, genin dolayısı ile gen ürününün yapısının değişmesine neden olur ve çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkarak malignite gelişebilir. Kanser oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu tümör-baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu kanserojenezde birbiriyle zıt etkilidir. Onkogenler habis transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde işlev gören genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerler. Tümör baskılayıcı genlerde oluşan bir hasar, büyüme kontrolünü ortadan kaldıracağından kanser oluşumu başlar (12,20).

Onkogenlerin kanser oluşumuna katılması hakkında iki öne sürüm vardır. Birincisi; onkogenin ifade seviyelerindeki sayısal değişiklikler, ikincisi onkogen yapısında meydana gelen değişikliklerdir. Onkogenlerdeki değişiklikler; nokta mutasyonu, gen delesyonu, kromozomlarda yeni düzenlenmeler, gen amplifikasyonu (gen çoğaltımı) ve insersiyonal mutagenез (yeni DNA katılımı) olarak sıralanabilir.

Proto-onkogenler, DNA dizilerindeki sadece bir bazın değişmesi (nokta mutasyon) ile onkogenlere dönüşebilirler. Somatik hücrelerde bu olay anormal gen ürününün (onkoprotein) sentezine yol açar ve bu ürün, hücre bölünmesini ve gelişimini uyararak kansere neden olur. Kromozomlardaki yapısal değişiklikler proto-onkogenlerin etkinleşmesini 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 çoğalır (replikasyona uğrar). Bu işlem normal hücrelerde ya hiç gözlenmez ya da seyrek olarak gözlenir. Kanserli hücrelerde ise, sık rastlanan bir olaydır.

Proto-onkogenin amplifikasyonu aynı zamanda çok fazla miktarda gen ürünlerinin de (m-RNA ve onkoproteinler) ortaya çıkmasına neden olmaktadır (20).

Onkogenler hücre seviyesinde baskın bir etkiye sahiptir. Bu genler etkinleştiklerinde tek bir mutant allel bile, bir hücrenin normalden habis şekile dönüşmesine yeterli etkidedir (47). Proto-onkogenlerin ürünleri, büyüme ve gelişmeyi ilerletici işlemlere sahiptirler. Ancak, bunlara zıt yönde çalışan tümör-baskılayıcı genler, anormal büyümeyi ve habis gelişmeyi engeller (12).

Hem normal hem de kanserli meme dokularında çoğunlukla saptanan bu özel onkogenler RAS, Myc ve CerbB-2 (veya HER2/neu) olarak sıralanabilir. Ayrıca, büyüme faktörü reseptörlerinden Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), CerbB-2 (HER2/Neu), sinyal iletimi ile ilişkili çekirdek onkogenleri (c-Fos, c-Myc, c-Myb ve c-Jun) proto-onkogenleri, RAS, siklinler, sikline bağımlı kinazlar (CDK) ve inhibitörleri (CDKI), steroid reseptörleri (östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR)), tümör baskılayıcı genler (TP53, ATM geni) ve BCL-2 ailesel yatkınlık genleri BRCA1-2 gibi diğer genler meme kanseri üzerinde etki etmektedir (13, 35).

Kanser vakalarının yaklaşık % 5 i, BRCA1-2 gibi kalıtımla bir sonraki kuşağa geçen yüksek penetrans genlerinde meydana gelen mutasyonlar ile oluşmaktadır. Çevre ve yaşam tarzına bağlı gelişen, kalıtımı daha az olan düşük penetranslı genlerdeki değişimler sonucu ortaya çıkan vakalar kanserin büyük oranda oluşum sebebidir (14).

2.2.1. Düşük Penetrans Meme Kanseri Yatkınlık Genleri

Meme kanserli hastaların yaklaşık % 10'nun ailesinde çoklu meme kanseri hikayesi vardır ve yatkınlık allelleri kalıtsaldır. Yaklaşık dörtte birinin BRCA1 ve BRCA2 genlerinde germline mutasyon tanımlanmıştır.

BRCA1-2 mutasyonu taşıyan bayanların hayat süreleri boyunca yaklaşık olarak % 50-90 arasında meme kanseri gelişme riski vardır. Bu iki gende yüksek penetrans yatkınlık genleri olarak tanımlanmıştır.

BRCA1-2 genleri dışında TP53, PTEN, STK11, CDH1, NF1, NBN genleri de meme kanserinde yüksek penetrans yatkınlık genleridir. Fakat bu genlerdeki mutasyonlar sadece birkaç ailesel meme kanserinde açıklanmıştır (57).

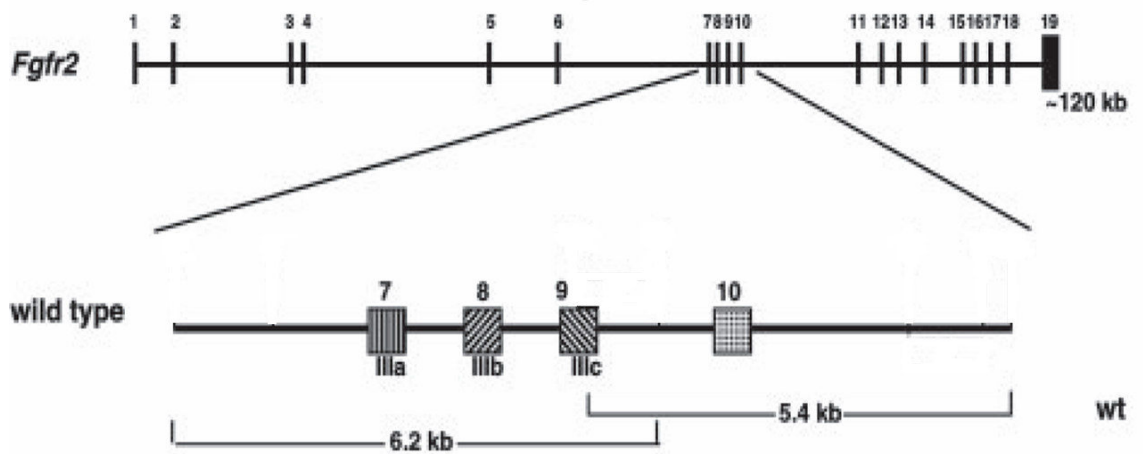
Orta penetrans yatkınlık genlerinde ise ilk tanımlanan CHEK2 geni olmuştur. Bu gendeki mutasyonların yaygınlığı populasyonlar arasında farklılık göstermesine rağmen sıklığı meme kanseri ailelerinin %5'inde tanımlanmıştır. CHEK2 mutasyonu bayan taşıyıcılarının 2-3 kat meme kanseri gelişme riski vardır. ATM, BRIP1, PALB2 ve RAD50 ise diğer orta penetrans genleridir. Bu genlerdeki mutasyonlar meme kanseri riskini 2-3 kat artırır ve ailesel meme kanserlerinin %1'inde her üç gendeki mutasyonlar tanımlanmıştır (57).

Düşük penetrans yatkınlık genlerindeki varyantların frekansı genel popülasyonda yüksek penetrans yatkınlık genlerinde olduğundan daha yüksektir. Son yapılan çalışmalarda FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1 düşük penetrans yatkınlık genleri olarak tanımlanmıştır. Bu genlerdeki birçok SNP meme kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. Genel popülasyonda yüksek penetrans yatkınlık genlerinde mutasyonların nadir görüldüğü ve bu mutasyonların özellikle ailesel meme kanserlerine neden olduğu bilinmektedir. Oysa düşük penetrans yatkınlık genlerdeki mutasyonların, meme kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan sporadik meme kanserlerinin oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir (47). Finlandiya, İsveç ve Danimarka'da yapılan 44788 çift ikiz çalışmalarına göre meme kanseri hastalığının %27 si genetik faktörlere bağlıdır. Yüksek penetrans yatkınlık genlerinin bu genetik faktörlerin bir parçası olduğuna inanılmaktadır, Ayrıca modifier gen olarak bilinen düşük penetrans meme kanseri yatkınlık genlerindeki polimorfizmlerin, meme kanseri vakalarında daha yüksek pay sahibi olduğu varsayılmaktadır (41).

2.2.1.1. FGFR2 Geninin Yapısı ve Fonksiyonu

Fibroblast büyüme faktör reseptör (*FGFR*) gen ailesi *FGFR1* (NM_136350), *FGFR2* (NM_176943), *FGFR3* (NM_134934) ve *FGFR4* (NM_134935) genlerini kapsamaktadır.

FGFR gen ailesinden olan *FGFR2* geni 10q23.5-q26 da yer almakta, büyüklüğü yaklaşık 120 kb (kilobaz) olup 20 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 2.2) (62).

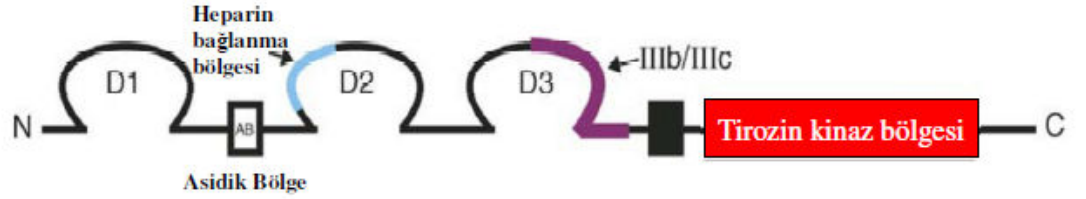


Şekil 2.2. FGFR2 gen yapısı

FGFR2 geninin iki alternatif gen ürünü mevcuttur. Bu iki izoform arasındaki farklılık, transaktin faktörlerinin etkisi ile oluşan alternatif kırılma ile meydana gelir. Bu izoformlar, IgIII bölgesinin ikinci yarısını oluşturan IIIb (b) ya da IIIc (c) ekzonik bölgelerinden birini içermesine göre birbirinden ayrılır (51). Oluşan izoformların ligant bağlanma özelliklerine göre ekspresyon gösterdikleri dokular farklılık göstermektedir. Yapılan araştırmalar, c izoformunun mezenşimal kökenli hücrelerde, b izoformunun ise epitelyal kökenli hücrelerde eksprese olduğunu göstermiştir (48).

FGFR2 gen ailesinin protein yapıları da birbirlerine benzer özellikler göstermektedir. FGFR2 gen ürünü olan reseptör 135 kD büyüklüğündedir.

Bu reseptör, ekstraselüler kısımda üç adet immünoglobulin-benzer bölge (D1, D2 ve D3), transmembran bölge ve intraselüler kısımda ise tirozin kinaz bölgesinden oluşur (Şekil 2.4.) (48).



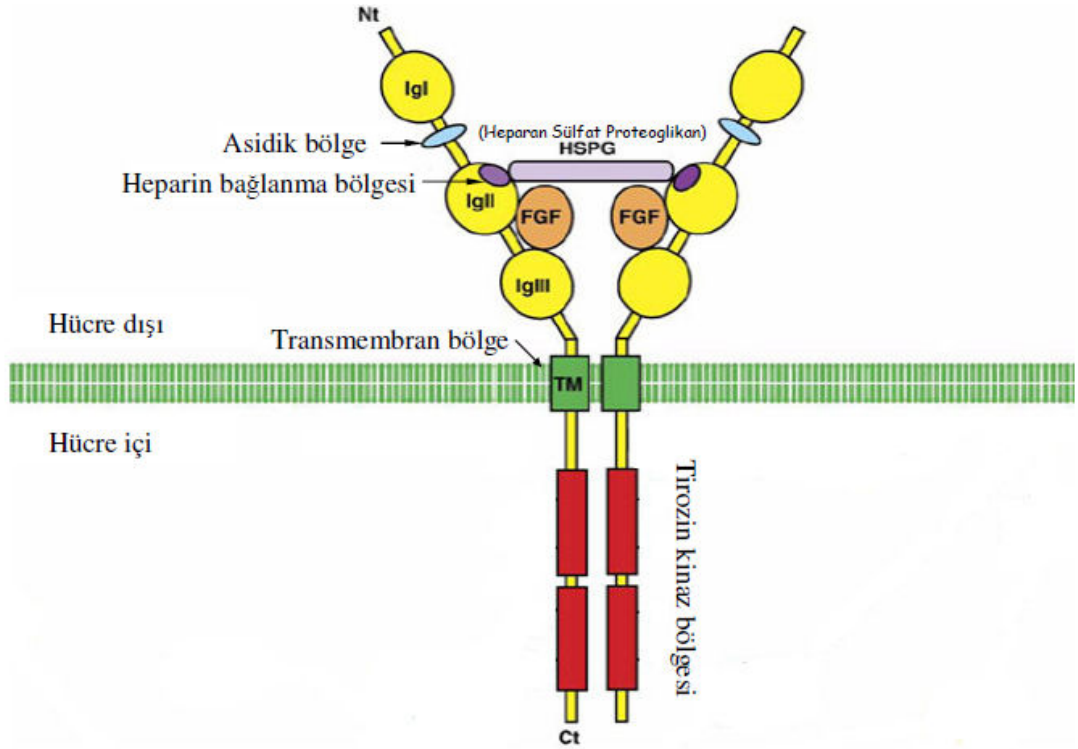
Şekil 2.3. FGFR2 protein yapısı

FGFR2 proteinin fonksiyonu, fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ile etkileşim sonucunda gerçekleşir. FGF molekülleri, embriyo ve yetişkinlerde hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi ve apoptozisi ile ilgili birçok hücrel biyolojik işlevleri yürütmektedir (9). Bu moleküller, 23 üyesi bulunan FGF protein ailesi (FGF1-FGF23) içerisinde ele alınmaktadır (48). FGF genlerinden sentezlenen FGF proteinlerinin hepsi 120 aminoasitten oluşan bir kor kısmı taşırlar. Bu kor kısmı; heparin ve sindekanlar, glipikan ve perlikan gibi heparan sülfat proteoglikanların (HSPG) FGF moleküllerine bağlanmasını sağlamaktadır (17). Hücre yüzeyinde ve ekstraselüler matrikste bulunan HSPG molekülleri, FGF moleküllerinin aktivitesini ve özgüllüğünü belirleyici önemli özellikleri vardır (51). Ayrıca, HSPG'lar FGF ligantlarını termal, proteolitik ve pH bağımlı yıkımdan koruyarak, bu moleküllerin stabilizasyonunu sağlarlar (48).

FGFR2 proteininin fonksiyon görebilmesi için reseptörün dimerizasyonu gerekmektedir. Dimerizasyon olayında ligant-reseptör etkileşimi arasındaki özgüllük oldukça önemlidir. Bu özgüllük, reseptörün N-terminal bölgeleri, FGF ligantlarının merkez bölgeleri ve IgIII (D3) bölgesinin yapısı ile belirlenmektedir (Şekil 2.4). Yapılan çalışmalar, FGF1 ve FGF2 ligantlarının bağlanmasında FGFR2'nin IgII (D2) ve IgIII (D3) bölgelerinin belirleyici rol aldığı anlaşılmıştır (53). Ayrıca memelilerde yapılan çalışmalarda, FGF-FGFR bağlanma özgüllüğünün alternatif olarak kırılmaya uğrayan ekzon IIIb ve ekzon IIIc bölgeleri tarafından düzenlendiği belirlenmiştir (48).

Reseptör dimerizasyonu için FGF-FGFR-heparin üçlü kompleksinin oluşması şarttır (52). Bu dimerizasyon fibroblast büyüme faktör (FGF) moleküllerinin reseptöre ligant bağlanma bölgelerine tutunmaları ile mümkündür. FGFR yapısında bulunan IgII (D2) ve IgIII (D3) bölgeleri ligandın bağlanması açısından önemli bölgelerdir (1). Ayrıca FGFR2 dimerizasyon olayında HSPG molekülleri iki adet FGF ligandına bağlanır. Bu bağlanma sonucunda iki FGFR arasında bir köprü oluşumu sağlanır ki, bu yapı reseptörlerin dimerizasyonunu gerçekleştirmektedir (Şekil-2.4) (52).

Reseptör dimerizasyonu gerçekleştikten sonra tirozin reziduları otofosforilasyon mekanizması ile fosforillenirler. Fosforilasyon sonucunda reseptör aktive olur ve FGFR2 sinyal yolağının aktivasyonu gerçekleşir (48).



Şekil 2.4. FGFR2 dimerizasyonu

Düşük penetrans genlerinin çevresel ve kalıtsal faktörler ile birleşiminin karsinogenez için önemli olduğu belirtilmiştir.

Son zamanlarda; düşük penetrans geni olan FGFR2, potansiyel bir meme kanseri yatkınlık geni olarak tanımlanmıştır. FGFR2 hücre büyümesinde rol oynayan bir reseptör tirozin kinaz süper ailesinin üyesidir.

FGFR2 geninin over ekspresyonu meme kanseri hücre hatlarında olduğu gibi meme tümör dokularında da gözlenmemiştir. FGFR2 insan memeli epitelyum hücrelerini değiştirebilir ve FGFR2 sinyal inhibisyonunu meme tümör hücre proliferasyonunu engeller.

Kadınları meme kanserine karşı önceden hazırlamak için genetik varyasyonları ayırt etme amaçlı birçok çalışmada FGFR2 geninin meme kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir ancak varyantların artmış riske nasıl dönüştüğü bilinmemektedir.

FGFR2 geninin kendisine bağlanan regülatör molekülleri değiştirdiği ve daha fazla gen ekspresyonuna yol açtığı bununda meme kanseri riskini yükselttiği bilinmektedir. Küçük genetik değişimlerin moleküler seviyede ne anlama geldiği konusunda yapılan çalışmalar FGFR2 geninin değiştiği iki spesifik noktada bazı transkripsiyon faktör düzenleyici proteinlerin daha fazla bağlanma eğilimi olduğu ve bu genin ekspresyon yolunu etkilediği gösterilmiştir. Ekstra bağlanma yüzünden daha fazla FGFR2 proteini mutasyonlu hücrelerde üretilmekte ve bu kanser riskini küçük ama önemli miktarda yükseltmek için yeterli olmaktadır (46).

Son zamanlarda yapılan genom çalışmalarında FGFR2 genindeki intronik SNP'ler meme kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmalarda Avrupa ve Asya populasyonlarında FGFR2 geni meme kanseri yatkınlık geni olarak tanımlanmıştır. Daha sonra ki bazı çalışmalar FGFR2'de ki 3 SNP'yi (rs2981582, rs1219648, rs2420946) meme kanseri riskiyle ilişkilendirmiştir. Bu ilişkiyle ilgili daha kesin bir tahmin elde edebilmek için 16 yayınlanmış çalışmadan 46.747 hasta ve 87.342 kontrol grubundan meta analiz yapılmıştır. Bu polimorfizmler wild tiplerle karşılaştırıldığında heterozigotlar ve homozigotlar için anlamlı sonuçlar gözlenmiştir (71).

FGFR2 polimorfizmi ve meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi bulmak için birçok çalışma yürütülmektedir. Şimdiye kadar hiçbir sayısal sistematik inceleme meme kanseri ve FGFR2 varyantları arasındaki ilişkiye odaklanmamıştır.

2.2.1.2. TNRC9 Geninin Yapısı ve Fonksiyonu

TNRC9 (trinucleotide repeat-containing) geni ve kromozom 16q12 bölgesinde yer alır. Sekiz ekzona ve 108 kb'lik bir uzunluğa sahiptir ve 589 amino asitlik bir proteini kodlar. TOX3 olarak ta adlandırılmaktadır.

16. kromozomun q kolu meme kanserlerinde sıklıkla kaybolmaktadır ve bir veya birden fazla tümör süpresör genin burada yer alabileceğine dair şüpheler bulunmaktaydı. 16q12'deki rs3803662 SNP'si yeterince tanımlanmamış mRNA'nın 4. ekzonunda yer almaktadır. TNRC9 geninin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. HMG box motifini içermekte ve transkripsiyon faktörü olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Ve meme kanserinin kemiğe metastazında görev almaktadır. TNRC9'un artmış ekspresyonu meme kanserinin kemik metastazı için belirteçtir. Dikkat çekici derecede östrojen reseptör pozitif tümörler diğer yerlerden çok kemiğe metastaz etme eğilimindedir; Östrojen reseptör pozitifliği kemik metastaz belirteci olarak bilinen en kuvvetli histopatolojik belirteçtir. TNRC9, östrojen reseptör pozitifliği, kemik metastazı ve rs3803662 arasındaki ilişki açığa kavuşturulmayı beklemektedir (66).

Son zamanlarda yapılan genom çalışmalarında TNRC9 geninde yer alan SNP'ler meme kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında rs3803662, istatistiksel olarak en güçlü ilişkiyi gösteren SNP'dir.

2.5. Genetik Polimorfizm Kavramı

2001 yılında insan genom projesinin tamamlanmasıyla iki insan genomu karşılaştırıldığında genomları arasında %99.9 benzerlik olduğu kanıtlanmıştır.

Geriye kalan % 0.1'lik fark, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak bilinen ve bireysel genotip ve fenotipik değişikliklerin sorumlusudur. Toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi ya da gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanır.

İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotid polimorfizmleridir. İnsan genomunda her bin nükleotidde bir SNP bulunmaktadır. Polimorfizmlere mutasyonlardan daha sık rastlanır. Genetik polimorfizmler, tıpta bazı hastalıklara karşı duyarlılıkta kişisel farklılıkları belirlememizi sağlar. Bazı gen polimorfizmleri bir hastalık riskini arttırırken bazıları azaltabilmekte, bazı polimorfik alleller ise yalnızca çevresel bir faktörün etkisi altındayken riski etkileyebilmektedir.

2.5.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

RFLP, polimorfizm çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. PZR ile çoğaltılan DNA molekülü, uygun bir Restriksiyon enzimi (RE) ile kesilerek jelde yürütülür. Ethidium bromide ile boyanarak kesilen DNA fragmentleri görünür hale getirilir. Restriksiyon enzimleri DNA molekülünde spesifik tanıma dizilerine sahiptir. DNA molekülünde kalıttan veya yeni bir mutasyondan kaynaklanan dizi, spesifik kesim bölgelerinin kaybolmasına veya ortaya çıkmasına sebep olacaktır. Restriksiyon enzim tanıma bölgeleri 4-8 baz uzunluğunda olabilir. RFLP tekniğinde birkaç yüz enzim tanıma şansı olduğu için, verilen DNA fragmentinin geniş analizi mümkün olur.

En basit DNA polimorfizmi tek baz değişikliğidir. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), DNA'yı restriksiyon enzimi ile parçalara ayırarak incelenmesine olanak tanıyan bir yöntemdir. DNA polimorfizmlerinin çoğunu tek baz çifti değişimleri oluşturur. Bunlar restriksiyon enziminin tanıma bölgesi oluşturan değişimlerdir. Enzimin iki tanıma bölgesi arasındaki delesyon veya insersiyon enzim kesimiyle oluşan fragmentlerin boylarındaki farklılıklar restriksiyon fragmentlerinin uzunluk polimorfizmi (RFLP) olarak isimlendirilir.

RFLP'ler tek nükleotid değişimlerinden çok delesyon veya insersiyondan dolayı da olabilir. Eğer iki restriksiyon bölgesinde DNA fragmenti delesyon veya insersiyona uğramışsa restriksiyon fragmentlerinin boyları farklı olacaktır (49).

RFLP, insan genomunda her 1 kb'da bir tek gen polimorfizmi göstermek amacıyla kullanılır. Tek nükleotid polimorfizmleri genetik haritalar için belirleyici olabilir. Kompleks hastalıklardan sorumlu belirli genlerin kalıtımını incelemek için tek nükleotid polimorfizmlerine gerek vardır.

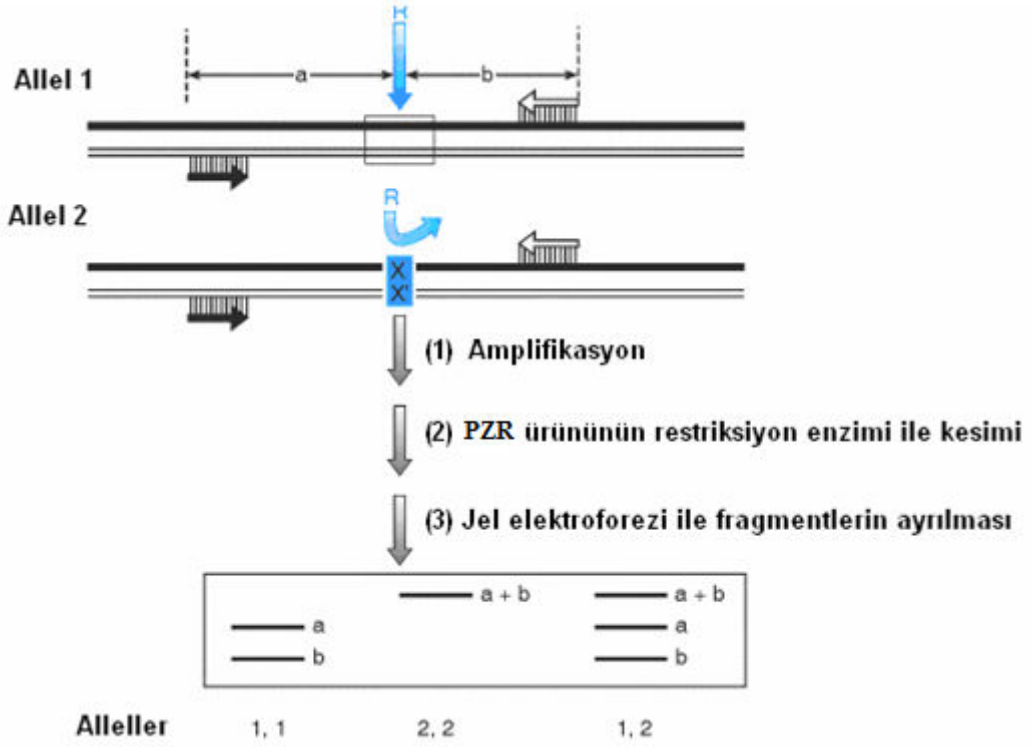
DNA sarmalı özgül restriksiyon enzimleri ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda fragmentler oluşur ve bu fragmentler, elektroforetik davranışlarındaki farklılıklar ile jel elektroforezinde gözlemlenebilirler (49).

2.3.2. Polimorfik Markırların Genotiplenmesinde PZR'nin Kullanımı

Tek nükleotid polimorfizmleri Southern blot ile ortaya konabildiği gibi, polimeraz zincir reaksiyonunun ardından restriksiyon enzim kesimi yöntemi kullanılarak da belirlenebilir. Bunun için polimorfik bölgeyi içine alan primerler kullanılarak PZR aracılığıyla bölge çoğaltılır. Uygun restriksiyon enzimi ile PZR ürününün kesiminin ardından elde edilen fragmentler agaroz jel elektroforezinde yürütülür ve analiz edilir (Şekil-2.5) (67).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), herhangi bir DNA örneğinde istenen bölgenin çoğaltılmasını sağlayan hızlı bir in vitro yöntemdir. PZR, elde bulunan DNA örneklerinde seçici olarak istenen bölgenin çoğaltılmasını sağladığı için, çoğaltılacak bölge hakkında önceden bilgi sahibi olunmasını gerektirmektedir. Bu bilgi, istenen bölgeyi çoğaltmak için gereken, 15-25 nükleotid arasında değişen uzunluklarda bir çift primerin belirlenebilmesi için şarttır. Denatüre edilen kalıp DNA içerisine primerler eklendikten sonra, bu primerler tamamlayıcı dizilerine bağlanırlar.

Uygun bir polimeraz enzimini ve dört çeşit deoksिनükleozid trifosfattan (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) yeterli miktarda bulunması halinde, primerler hedef DNA'nın komplementerinin sentezlenmesini sağlarlar (67).



Şekil 2.5. Polimorfik markırların genotiplenmesinde PZR'nin kullanımı.

(1,1: Wild, 1, 2: Polimorfik, 1,2: Heterozigot)

(Strachan, T., Read, A.P., 1999, Human Molecular Genetics 2, 2nd Edition, BIOS Scientific Publishers, Ltd., Oxford, UK,'den modifiye edilerek alınmıştır.)

PZR, bir zincir reaksiyonudur çünkü yeni sentezlenen DNA dalları, ardışık döngülerde sentezlenecek diğer DNA'lar için kalıp görevi yapmaktadırlar. Isı ile bozulmayan polimeraz enzimlerinin kullanımı gerekmektedir ve ısı değişimlerine dayanan üç temel basamaktan oluşmaktadır:

- i. Denatürasyon : Yaklaşık 93-95 °C'de gerçekleşir. DNA tek dal haline gelmektedir.
- ii. Bağlanma : 50-70 °C arasında gerçekleşen ve primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasının gerçekleştiği basamaktır.
- iii. Uzama : 70-75 °C arasında gerçekleşir ve yeni DNA dallarının elde edildiği aşamadır (67).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda moleküler yöntemler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarlarında, histopatolojik değerlendirme ise Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi Patoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen DNA örneklerinde FGFR2 ve TNRC9 genlerine ait rs2981582 ve rs3803662 polimorfizmleri; Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında genotip ve allel dağılımları istatistiksel analizle incelenmiş ve hastalık gelişiminde risk oluşturup oluşturmadıkları tespit edilmeye çalışılmıştır.

3.1 Gereçler

3.1.1. Örnekler

Bu çalışmada Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi'ne başvuran ve meme kanseri tanısı almış olgulardan alınan 98 adet kan örneği kullanılmıştır. Kontrol grubu için ise; ailesinde meme kanseri hikayesi olmayan 56 adet sağlıklı bireyin periferik kan örnekleri kullanılmıştır. DNA izolasyon ve PZR çalışmaları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Thermal Cycler (PE GenAmp PCR System 9700)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)

Yatay jel elektroforez tankı (Consort E844)

Elektroforez için güç kaynağı (EKR)

Hassas terazi (Setra)
Mikropipetler (1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l skalasında) (Eppendorf)
Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı) (Heidolph)
Mikrosantrifüj (Eppendorf)
Pastör pipeti
Su banyosu (Nüve)
Vorteks (Heidolph)
Mezür (100'lük 1000'lik)
Beher (250'lik, 500'lük)
Deep-freeze (Arçelik)
Mikrodalga fırın (Arçelik)
Buzdolabı (Arçelik)
Falkon tüpü (50'lik)
Eppendorf tüpü (1,5 ml'lik)
PZR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)
Toplama tüpü (QIAGEN)
Spin kolonu (QIAGEN)
Enjektörlük bidistile su
EDTA'lı tüp

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Taq DNA polimeraz (Biotools, AppliedBiosystems)
dNTP seti (Biotools)
10XPCR buffer (Biotools)
MgCl₂ (PCR için) (Biotools)
AclI Restriksiyon enzimi (Biolabs)
Bpu10I Restriksiyon enzimi (Biolabs)
Rutin Agaroz (Sigma)
Borik asit (Sigma)
Etanol (95%) (Tekel)
Etidyum Bromür (Sigma)

6X Jel yükleme tamponu (Sigma)
TrismaBase (Sigma)
Proteinaz K (Mobio UltraClean)
Buffer B2 Solüsyonu(Mobio UltraClean)
Buffer B3 Solüsyonu (Mobio UltraClean)
Buffer B4 Solüsyonu (Mobio UltraClean)
Buffer B5 Solüsyonu (Mobio UltraClean)
Moleküler Weight Marker (Promega, GibcoBRL)

3.1.4. Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

- %2'lik Agaroz jel hazırlanması:

6 gram agaroz tartılıp bir beher içinde 1XTBE solüsyonu ile 300 ml'ye tamamlanmış ve mikrodalga fırında %100 lük güçten %10 luk güce kadar kademeli olarak azaltılarak 5 dakika kaynatılmıştır.

- %3'lük Agaroz jel hazırlanması:

9 gram agaroz tartılıp bir beher içinde 1XTBE solüsyonu ile 300 ml'ye tamamlanmış ve mikrodalga fırında %100 lük güçten %10'luk güce kadar kademeli olarak azaltılarak 5 dakika kaynatılmıştır.

- 20X TBE Stok Solüsyonunun Hazırlanması;

121 gr Tris (1M), 61.7 gr borik asit (1M) ve 7.44 gr EDTA(20mM) tartılarak, toplam hacim 1000 ml'e tamamlanarak distile su içinde çözündürülmüştür.

3.2. Yöntemler

3.2.1 Periferik Kandan DNA İzolasyonu

1. Olgulardan 200 µl taze kan, EDTA'lı tüplere alındı.
2. Su banyosunun ısısı 65°C ye getirildi.
3. Kan örnekleri ve diğer malzemeler oda sıcaklığına getirildi.
- 4.- 1,5 ml ependorf tüp strafora konulup üzerine protokol numarası yazıldı.
5. 1.5 ml'lik Ependorflara 20 µl Proteinaz K eklendi.
6. 200 µl'lik kan örneği, tüp içerisine eklenip 15 saniye vortekslendi.
7. 65 santigrat derecede 10 dakika inkübe edildi.
8. 1.5 ml'lik ependorf tüpünün kapağında oluşan damlacıkların ependorfun dibine düşmesi için kısa süreli spin atırıldı.
9. 200 µl B2 solüsyonu eklendi.
10. Dikkatli bir şekilde tüm karışım ependorf tüpünden kit ile birlikte gelen filtreli tüpe (1,5 ml'lik toplama tüpünün içerisinde bulunan) aktarıldı ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Filtreli tüp 1,5 ml'lik temiz başka bir toplama tüpü içerisine alındı.
11. Filtreli tüpün kapağı açılıp üzerine 500 µl B3 solüsyonu eklendi. Kapağı kapatılıp
12. 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
13. Filtreli tüp dikkatli bir şekilde toplama tüpü içerisinden çıkarılıp, toplama tüpü içerisindeki filtrat döküldü. Filtreli tüp tekrar toplama tüpüne yerleştirildikten sonra üzerine 500 µl B4 solüsyonu eklendi.
14. Filtreli tüp kapağı kapatılıp 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
15. Filtratl ı tüp atıldı ve filtreli tüp 1,5 ml'lik temiz ependorf tüpleri içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 200 µl B5 solüsyonu eklendi. 65 derecede 5 dakika inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
16. Filtreli tüp atılıp DNA içeren sıvı ependorf tüpü içinde -20°C ye kaldırıldı.

3.2.2. PZR İle Gen Bölgelerinin Çoğaltılması ve RFLP Yöntemiyle Polimorfizm Analizi

İzolasyon sonucu elde edilen DNA örnekleri FGFR2 ve TNRC9 genlerine özgü primerler kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltıldı.

3.2.2.1. PZR'de Kullanılan Kimyasal Maddeler:

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/µl) (Biotools)

PZR reaksiyonundaki final konsantrasyonu 2,5 ünite olacak şekilde 50 µl'lik PZR karışımına 0,2 µl eklendi.

10X DNA Taq PZR Tamponu (Biotools)

Tris-HCl'den 100mM (pH 8,8, 25°C'de), 500mM KCl ve %0,8 Nonidet P40 içeren 10X Taq PZR tamponundan 50 µl'lik PZR karışımına 5 µl eklendi.

MgCl₂ (25mM/ml, Biotools)

MgCl₂'den 50 µl'lik PZR karışımına 4 µl eklendi.

dNTP'ler (100 µmol/ml) (Biotools)

25mM'lık dNTP'den PZR karışımına 0.4 µl eklendi.

3.2.2.2 FGFR2 gen bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

FGFR2 gen bölgesini çoğaltmada kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Primerler kullanılmadan önce sulandırılarak 100pmol/µl'lik stoklar hazırlandı. PZR'da kullanılmadan önce 1 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldı.

Forward : 5' - GGTGTAAGTCCAATTACGAGGAC- 3'

Reverse : 5' -GGGTAAGTGTGCTGTTCATTCAC- 3'

FGFR2 geni için PZR bileşenleri aşağıdaki gibidir:

10xPZR buffer : 5 µl
dNTP mix : 0.4 µl
Primer F ve R : 4 µl
Taq pol : 0.2 µl
MgCl₂ : 4 µl
DNA : 5 µl

Son hacim steril distile su ile 50µl'ye tamamlandı. Taq polimeraz eklendikten sonra tüp içindeki bileşenler pipetleme işlemi ile karıştırıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 45µl PZR karışımı dağıtıldı daha sonra her tüpe 5µl DNA eklenerek yeniden pipetleme yapıldı ve PZR cihazına örnekler yerleştirildi. PZR işlemi, uygun program seçilerek başlatıldı.

FGFR2 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerlerin bağlanma derecesi 57°C olarak saptandı. Optimize edilmiş PZR şartları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. FGFR2 gen bölgesi için kullanılan PZR şartları

94 °C	2 dakika		
94 °C	30 saniye	→ Denatürasyon	} 35 döngü
57 °C	30 saniye	→ Bağlanma	
72 °C	30 saniye	→ Uzama	
72 °C	5 dakika		

3.2.2.3. *FGFR2 PZR Ürünlerinde Restriksiyon Enzim Analizi*

Acil Kesim enzimi (10.000 U/ μ l): (BioLabs R0551S) Acil enzimi 1X NEBuffer 3 ile birlikte kullanıldı. Acil enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:

5' C^ C G C3'

3' G G C^ G5'

3.2.2.4. *FGFR2 rs2981582 polimorfizminin Acil Enzimi ile Kesimi*

Tablo 3.2'de belirtilen miktarlarda kimyasallar kullanılarak toplam hacim 15 μ l olacak şekilde su eklenmesi ile kesim işlemi gerçekleştirildi. Kesim işlemi Acil enzimi için optimum sıcaklık olan 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

Tablo 3.2. Acil enzimi için kesim protokolü

Kimyasallar	Miktar (μ l)
PZR ürünü	5
Buffer	1
Acil enzimi	0.5
ddH ₂ O	8.5

3.2.2.5. *Kesim Ürünlerinin Kontrolü*

Kesim ürünlerin incelenmesi için %2 lik agaroz jel hazırlanarak örnekler jel elektroforezinde yürütüldü. %2 lik agaroz jel için hazırlanan agaroz mikrodalga fırın kullanılarak yüksek ısıda 1XTBE solüsyonu içinde çözündürüldü. Çözeltinin soğuması beklenerek içerisine %5'lik etidyum bromür eklendi.

- Elektroforeze başlamadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlenip, tankın benç üzerindeki dengesi ayarlandı, tarak ve jel küveti tanka yerleştirildi, hazırlanan jel küvete döküldü. Jel donduktan sonra tank 1XTBE çözeltisi ile dolduruldu.
- PCR ürünün tamamı alınıp, üzerine 6X lik yükleme tamponundan 2.5 µl konarak karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi. Her jelin ilk ve son kuyusuna marker yüklendi.
- Yükleme işlemi bittikten sonra elektrodlar takılarak, 1,5 saat yürütüldü.
- Elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alındı.

3.2.2.6. TNRC9 gen bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

TNRC9 gen bölgesini çoğaltmada kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Primerler kullanılmadan önce sulandırılarak 100pmol/µl'lik stoklar hazırlandı. PZR'da kullanılmadan önce 1 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldı.

Forward: 5'-TCATCCAAAGCACCAACTATGAG - 3'

Reverse : 5'-TGTTGTCCACAAAGACCACCG - 3'

TNRC9 geni için PZR bileşenleri aşağıdaki gibidir:

10xPCR buffer : 5 µl

dNTP mix : 0.4 µl

Primer F ve R : 4 µl

Taq pol : 0.2 µl

MgCl₂ : 4 µl

DNA : 5 µl

Son hacim steril distile su ile 50µl'ye tamamlandı. Taq polimeraz eklendikten sonra tüp içindeki bileşenler pipetleme işlemi ile karıştırıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 45µl PZR karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 5µl DNA eklenerek yeniden pipetleme yapıldı ve PZR cihazına örnekler yerleştirildi. PZR işlemi, uygun program seçilerek başlatıldı.

TNRC9 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerlerin bağlanma derecesi 57°C olarak saptandı. Optimize edilmiş PZR şartları tablo 3.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. TNRC9 gen bölgesi için kullanılan PZR şartları

94 °C	2 dakika		
94 °C	30 saniye	→ Denatürasyon	} 35 döngü
57 °C	30 saniye	→ Bağlanma	
72 °C	30 saniye	→ Uzama	
72 °C	5 dakika		

3.2.2.7. TNRC9 PZR Ürünlerinde Restriksiyon Enzim Analizi

Bpu10I Kesim enzimi (5.000 U/µl): (BioLabs R0649L) Bpu10I enzimi 1X NEBuffer 3 ile birlikte kullanıldı. Bpu10I enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:

5'.... C C ^T N A G C....3'

3'.... G G A N T ^ C G...5'

3.2.2.8 TNRC9 rs3803662 polimorfizminin Bpu10I Enzimi ile Kesimi

Tablo 3.4’de belirtilen miktarlarda kimyasallar kullanılarak toplam hacim 15µl olacak şekilde su eklenmesi ile kesim işlemi gerçekleştirildi. Kesim işlemi Bpu10I enzimi için optimum sıcaklık olan 37°C’de 1 saat inkübe edildi.

Tablo 3.4. Bpu10I enzimi için kesim protokolü

Kimyasallar	Miktar (µl)
PZR ürünü	5
Buffer	1
AciI enzimi	0.5
ddH ₂ O	8.5

3.2.2.9. Kesim Ürünlerinin Kontrolü

Kesim ürünlerin incelenmesi için %3’lük agaroz jel hazırlanarak örnekler jel elektroforezinde yürütüldü. %3’lük agaroz jel için hazırlanan agaroz mikrodalga fırın kullanılarak yüksek ısıda 1XTBE solüsyonu içinde çözündürülmüştür. Çözeltinin soğuması beklenerek içerisine %5’lik etidyum bromür eklendi.

- Elektroforeze başlamadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlenip, tankın benç üzerindeki dengesi ayarlanıp, tarak ve jel küveti tanka yerleştirilip, hazırlanan jel küvete döküldü. Jel donduktan sonra tank 1XTBE çözeltisi ile dolduruldu.
- PZR ürünün tamamı alınıp, üzerine 2.5 µl 6X lik yükleme tamponundan konarak karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi. Her jelin ilk ve son kuyusuna marker yüklenmiştir.
- Yükleme işlemi bittikten sonra elektrodlar takılarak 1,5 saat yürütüldü.

- Elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alındı.

3.3. İstatistiksel Analiz

FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarındaki allel dağılımları ve meme kanseri gelişimindeki olası riskleri odds ratio lojistik regresyon analizi (çoklu değişken analizi) kullanarak hesaplandı. Tüm analizler için SPSS 13.0 versiyonu kullanıldı. Meme kanseri üzerinde etkili olabileceği düşünülen polimorfizmlere ilişkin %95 güven aralıkları ve anlamlılık düzeyleri hesaplandı. Uygulanan istatistiksel analizlerde anlamlılık değeri olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Kontrol grubu olarak çalışmaya ailesinde meme kanseri öyküsü olmayan 56 kadın dahil edilmiştir. Kontrollerin yaş ortalaması 48.3, yaş aralığı 26-67'dir. Çalışma grubunda ise Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi'ne başvuran ve meme kanseri tanısı almış 98 olgu kullanılmıştır. Hasta grubunun yaş ortalaması 56.8, yaş aralığı 30-83'dir. Çalışmaya dahil edilen olguların demografik ve klinik özellikleri Tablo 4.1.'de görülmektedir.

Tablo 4.1. Olgulara ilişkin demografik ve klinik özellikler

	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)
Tümör karakteristiği		
Evre I	21	26
Evre II	32	40
Evre III ve IV	26	34
Toplam	79	100
Grad 1	16	20,5
Grad 2	35	44,3
Grad 3	28	35,2
Toplam	79	100
Reseptör durumu		
ER pozitif	70	71,5
ER negatif	28	28,5
Toplam	98	100
PR pozitif	81	81,6
PR negatif	17	18,4
Toplam	98	100
Menopoz durumu		
Premenopoz	27	28,1
Postmenopoz	69	71,9
Toplam	96	100
Aile öyküsü		
Var	11	12
Yok	81	88
Toplam	92	100

Tümör karakteristiğinin değerlendirildiği 79 olgunun 21'i (%26) evre I, 32'si (%40) evre II, 26'sı (%44) ise evre III yada IV idi. Histolojik grad açısından olguların 16'sı (%20,5) grad 1, 35'i (%44,3) grad 2, 28'i (%35,2) grad 3 idi. Olguların 19'unun evre ve histolojik grad bilgilerine ulaşamadı (Tablo 4.1).

Östrojen reseptörü 70 olguda (%71,5) pozitif, 28 olguda (%28,5) negatif bulundu. Progesteron reseptörü 80 olguda (%81,6) pozitif, 18 olguda (%18,4) negatif olarak belirlendi (Tablo 4.1).

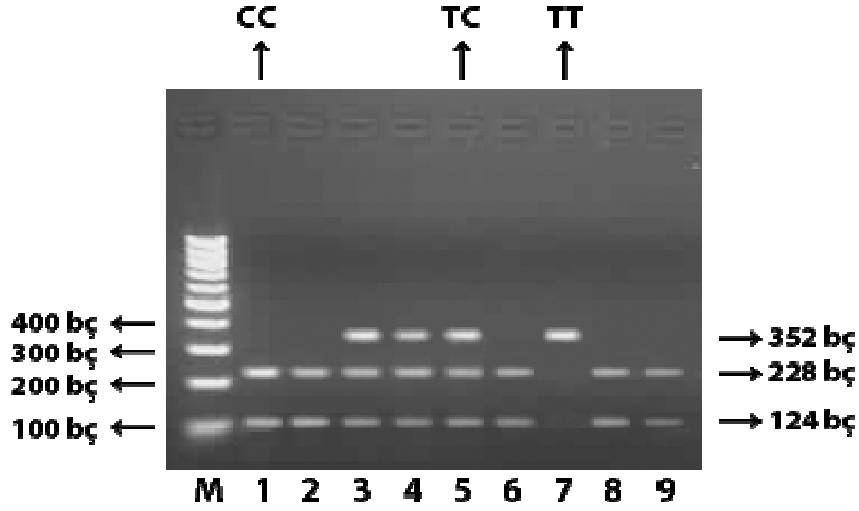
Olguların 27'si (%28,1) premenopozal, 69'u (%71,9) postmenopozal olarak belirlendi. Olguların 11'inde (%12) meme kanseri aile öyküsü varken 81'inde (%88) ise aile öyküsü yoktu. İki olgunun menopozal durumuna ve 6 olgunun aile öyküsüne ilişkin bilgiye ulaşamadı (Tablo 4.1.).

4.1. PZR-RFLP Analiz Bulguları

FGFR2 ve TNRC9 genlerine özgü primerler ile belirtilen koşullarda gerçekleştirilen PZR'yi takiben yapılan RFLP sonucunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. FGFR2 rs2981582 polimorfizmi için AcilI, TNRC9 rs3803662 polimorfizmi için Bpu10I enzimi kullanılmıştır.

4.1.1. AcilI Enzimi Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

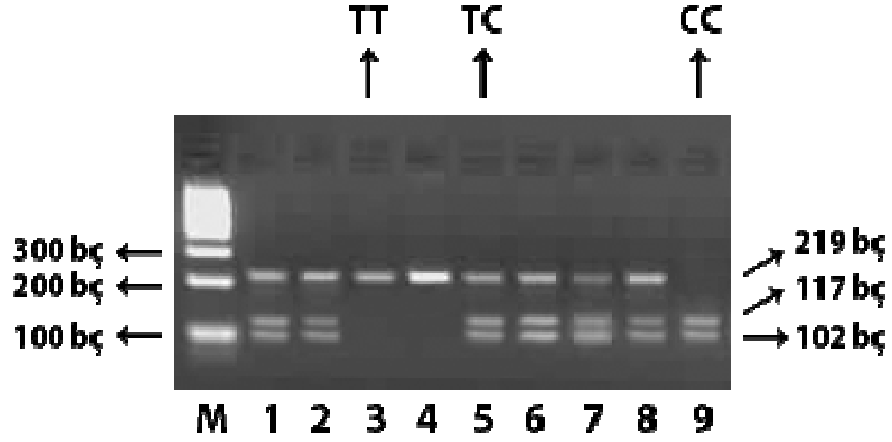
Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklükleri 352 bç olarak saptanmıştır. AcilI enzim kesim bölgesi, rs2981582 polimorfizmi olmayan (CC) PZR ürünlerinde bulunmaktadır. Polimorfik (TT) olan bireylerde PZR ürünleri kesim sonrası 352 bç büyüklüğünde tek bant görülürken, polimorfik olmayan (CC) bireylerde 228 ve 124 bç'lik iki bant görülmektedir. Heterozigot (CT) bireylerde ise 352, 228 ve 124 bç olmak üzere üç bant görülmektedir. Elde edilen jel fotoğrafları Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. FGFR2 rs2981582 polimorfizminin AclI Enzim ile Kesim Sonuçları % 2'lik agaroz jel görüntüsü. (1., 2., 6., 8. ve 9. sıra CC homozigot wildtype; 3., 4., ve 5. sıra heterozigot CT; 7. sıra polimorfik TT genotipindeki kesim ürünleri)

4.1.2. Bpu10I Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PZR ürünlerinin bant büyüklükleri 219 bç olarak saptanmıştır. PZR ürünlerinde rs3803662 polimorfizmi yok ise homozigot (C/C) genotipi için Bpu10I enzim kesim bölgesi bulunmaktadır. Polimorfizm olan (T/T) genotipine sahip bireylerde PZR ürünlerinde kesim sonrası 219 bç büyüklüğünde tek bant görülürken, polimorfizmi olmayan homozigot (C/C) genotipine sahip bireylerde 117 ve 102 bç'lik iki bant görülmektedir. FGFR2 rs2981582 polimorfizmi içeren heterozigot (T/C) genotipli bireylerde ise 219, 117 ve 102 bç olmak üzere üç bant görülmektedir. Elde edilen jel fotoğrafları Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2. TNRC9 rs3803662 polimorfizminin Bpu10 Enzimi ile Kesim Sonuçları % 3'lük agaroz jel görüntüsü. (1., 2., 5., 6., 7. ve 8. sıra heterozigot CT; 3. ve 4. Sıra polimorfik TT; 9. sıra homozigot wildtype CC genotipindeki kesin ürünleri)

4.2. FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 Polimorfizm Verilerinin Dağılım Analizi

Kontrol grubuna uygulanan PZR-RFLP yöntemi sonrası genotip bulguları değerlendirildiğinde rs2981582 polimorfizminin CC (wildtype), CT (heterozigot) ve TT (polimorfik) genotip dağılımı sırasıyla, %57.1 (n=32), %33.9 (n=19) ve %8.9 (n=5) olarak saptanmıştır (Tablo 4.2). Hasta grubunda ise CC (wildtype), CT (heterozigot) ve TT (polimorfik) genotip dağılımı sırasıyla, %39.8 (n=39), %49 (n=48), %11.2 (n=11) olarak saptanmıştır (Tablo 4.2.).

FGFR2 rs3803662 polimorfizmi için kontrol grubunda CC (wildtype), CT (heterozigot) ve TT (polimorfik) genotip dağılımı sırasıyla; %50 (n=28), %44.6 (n=25), %5.3 (n=3) olarak saptanmıştır. Hasta grubunda ise %41.8 (n=41), %49 (n=48), %9.1 (n=9) olarak saptanmıştır (Tablo 4.2).

4.3. FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 Polimorfizmleri ile Meme Kanseri Riski Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

Genotipleri belirlenen meme kanseri ve kontrol gruplarının FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 polimorfizmleri açısından genotip dağılımları karşılaştırıldı (Tablo 4.2). Bu karşılaştırma sonucunda grupların birbirlerinden anlamlı derecede farklılık göstermediği tespit edildi (P: 0.916; P:0.678).

Tablo 4.2. Meme Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Polimorfizmlerinde Genotip Dağılımı

Gen	SNP	Genotip	Kontrol n=56 (%)	Hasta n=98 (%)	OR (%95GA)	P
FGFR2	rs291582	CC	32 (%57.1)	39 (%39.8)	1.00	0.916
		CT	19 (%33.9)	48 (%49)	0.85 (0.61-1.30)	
		TT	5 (%8.9)	11 (%11.2)	1.13 (0.73-1.54)	
TNRC9	rs3803662	CC	28 (%50)	41 (%41.8)	1.00	0.678
		CT	25 (%44.6)	48 (%49)	0.98 (0.82-1.35)	
		TT	3 (%5.3)	9 (%9.2)	1.05 (0.92-1.33)	

Meme kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 polimorfizmleri allel frekansları açısından karşılaştırıldı. FGFR2 rs2981582 polimorfizmi allel frekansları C alleli için kontrol grubunda %74.1, hasta grubunda %64.3 ve T alleli için kontrol grubunda %25.9, hasta grubunda %35.7 olarak belirlendi.

TNRC9 rs3803662 polimorfizmi C alleli için kontrol grubunda %72.3, hasta grubunda %66.3, T alleli için ise kontrol grubunda %27.7, hasta grubunda %33.7 olarak belirlendi. Her iki polimorfizm için kontrol grubu ve hastalar arasında allel frekansı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (P:0.62; P:0.78). Elde edilen sonuçlar tablo 4.3’de görülmektedir.

Tablo 4.3. FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 polimorfizmlerinin allel frekansları

Polimorfizm	Kontrol allel (%) (n=112)	Hasta allel (%) (n=196)	OR (%95 GA)	P
FGFR2 rs2981582				
C Alleli	83 (%74.1)	126 (%64.3)	0.92 (0.79-1.25)	0.62
T Alleli	29 (%25.9)	70 (%35.7)		
TNRC9 rs3803662				
C Alleli	81(%72.3)	130(%66.3)	0.87 (0.61-1.19)	0.78
T Alleli	31(%27.7)	66(%33.7)		

FGFR2 rs2981582 polimorfizmi değerlendirilen 70 östrojen reseptör (ER) pozitif meme kanserli hastanın 25’inde (%35.7) CC genotipi, 36’sinde (%51.4) CT genotipi, 9’unda (%12.8) ise TT genotipi saptandı. ER negatif 28 meme kanserli hastanın ise 18’unda (%64.7) CC genotipi, 8’inde (%28.5) CT genotipi, 2’sinde (%7.1) TT genotipi saptandı (Tablo 4.4). TNRC9 rs3803662 polimorfizmi değerlendirilen 70 östrojen reseptör (ER) pozitif meme kanserli hastanın 29’unda (%41.5) CC genotipi, 34’ünde (%48.5) CT genotipi, 7’sinde (%10) TT genotipi saptandı.

Östrojen reseptör negatif 28 meme kanserli hastanın ise 12'sinde (%42.8) CC genotipi, 14'inde (%50) CT genotipi, 2'sinde (%7.2) TT genotipi saptanmıştır (Tablo 4.4). Her iki polimorfizim T allel sıklığı dağılımı açısından ER pozitif hastalar ER negatif hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4.5).

Tablo 4.4. Meme Kanserli Hastaların Reseptör Durumuna Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Polimorfizimlerinde Genotip Dağılımı

Gen	SNP	Genotip	ER(+) Hastalar n=70 (%)	ER(-) Hastalar n=28 (%)	PR(+) Hastalar n=81 (%)	PR(-) Hastalar n=17 (%)
FGFR2	Rs2981582	CC	25 (%35.7)	18 (%64.7)	38 (%46.9)	12 (%70.5)
		CT	36 (%51.4)	8 (%28.5)	43 (53.8)	5 (%29.5)
		TT	9 (%12.8)	2 (%7.1)	-	-
TNCR9	Rs3803662	CC	29 (%41.5)	12 (%42.8)	34 (%42)	6 (%35.2)
		CT	34 (%48.5)	14 (%50)	39 (%48)	10 (%58.8)
		TT	7 (%10)	2 (%7.2)	8 (%10)	1 (%5.8)

Tablo 4.5. ER Durumuna Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Allel Dağılım Analizi

Gen	SNP	ER – pozitif hastalar		ER – negatif hastalar		P
		N	OR (%95 GA)	N	OR(%95 GA)	
FGFR2	rs2981582	70	1.41 (1.21-1.74)	28	1.07 (1.01-1.21)	0.001
TNCR9	rs3803662	70	1.23 (1.19-1.31)	28	1.17 (0.98-1.32)	0.015

FGFR2 rs2981582 polimorfizmi değerlendirilen 81 progesteron reseptör (PR) pozitif meme kanserli hastanın 38'inde (%46.9) CC genotipi, 43'ünde (%53.8) CT genotipi saptandı (Tablo 4.4). TT genotipine ise bu hastalarda rastlanmadı. PR negatif 17 meme kanserli hastanın ise 12'sinde (%70.5) CC genotipi, 5'inde (%29.5) CT genotipi saptandı. TNRC9 rs3803662 polimorfizmi değerlendirilen 81 PR pozitif meme kanserli hastanın 34'ünde (%42) CC genotipi, 39'unda (%48) CT genotipi, 8'sinde (%10) TT genotipi saptandı. PR negatif 17 meme kanserli hastanın ise 6'sında (%35.2) CC genotipi, 10'nunda (%58.8) CT genotipi, 1'inde (%5.8) TT genotipi saptanmıştır. (Tablo 4.4). FGFR2 rs2981582 polimorfizmi T allel sıklığı dağılımı açısından PR pozitif hastalar PR negatif hastalara göre, TNRC9 rs3803662 polimorfizminde ise PR negatif hastalar PR pozitiflere göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. PR Durumuna Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Allel Dağılım Analizi

		PR – pozitif hastalar		PR – negatif hastalar		
Gen	SNP	N	OR (%95 GA)	N	OR(%95 GA)	P
FGFR2	rs2981582	81	1.38 (1.01-1.58)	17	1.15 (1.02-1.34)	0.01
TNRC9	rs3803662	81	1.19 (0.97-1.35)	17	1.21 (1.12-1.39)	0.08

Evre bilgilerine sahip meme kanseri hastaları T allel sıklığı açısından karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda her iki polimorfizm içinde evreler arasında anlamlı derecede farklılık bulunmadığı saptandı (Tablo 4.7). (P:092, P:079)

Tablo 4.7. Evrelere Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Allel Dağılım Analizi

		Evre I		Evre II		Evre III - IV		
Gen	SNP	N	OR(%95 GA)	N	OR(%95 GA)	N	OR(%95 GA)	P
FGFR2	rs2981582	21	1.05 (0.96-1.22)	32	1.09 (1.01-1.17)	26	1.12 (1.07-1.19)	0.92
TNCR9	rs3803662	21	1.14 (1.09-1.24)	32	1.07 (0.98-1.19)	26	1.09 (1.02-1.13)	0.79

Grad bilgilerine sahip meme kanseri hastaları T allel sıklığı açısından karşılaştırıldı (Tablo 4.8). Bu karşılaştırma sonucunda her iki polimorfizmde de gradlar arasında anlamlı derecede farklılık bulunmadığı saptandı. (P:0.79, P:0.73)

Tablo 4.8. Gradlara Göre FGFR2 rs2981582 ve TNCR9 rs3803662 Allel Dağılım Analizi

		Grad 1		Grad 2		Grad 3		
Gen	SNP	N	OR(%95 GA)	N	OR(%95 GA)	N	OR(%95 GA)	P
FGFR2	rs2981582	16	1.17 (1.01-1.32)	35	1.21 (1.10-1.39)	28	1.09 (0.98-1.24)	0.79
TNCR9	rs3803662	16	1.22 (1.07-1.35)	35	1.15 (1.03-1.37)	28	1.19 (0.99-1.29)	0.73

5.TARTIŞMA

Meme kanserinin halen yeni bilgilerin ortaya çıktığı ve gelişmelerin yaşandığı oldukça geniş bir alan olduğu ifade edilmektedir. Bununla birlikte meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekte, tüm dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Birçok risk faktörü ile ilişkili olan meme kanserinin, risk faktörlerinin azalmasına ve artmasına göre, görülme sıklığı da farklılık göstermektedir. BRCA1, BRCA2 ve benzeri birçok genin artan bir yakınlıkta meme kanseriyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak meme kanseri insidansının %5'i bu yüksek penetrans mutasyonları ile açıklanabilmektedir. Bu sebeple düşük penetrans yakınlık genleri meme kanseri riski tahminleri üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (58). Son yıllarda yapılan farklı yöntemlerin ve farklı hasta gruplarının kullanıldığı birçok çalışmada meme kanseriyle ilişkili birçok düşük penetrans yakınlık geninden söz edilmektedir. Bu çalışmaların bulguları doğrultusunda meme kanseri riski ile ilişkili 1 lokus ve 4 gen tanımlanmıştır (15).

Çalışmamıza meme kanseri tanısı almış 98 hasta ve 56 kontrol dahil edilmiştir. Çalışmamızda asıl amacımız meme kanseri tanısı almış hastalarda FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 SNP'lerinin meme kanseri riski ile ilişkisini araştırmaktır. Ülkemizde her iki polimorfizmin de araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bulgularımız diğer toplumlarda gerçekleştirilen benzer çalışmaların eşliğinde tartışılacaktır.

İlişkilendirme için 2007 yılında yapılan çok aşamalı genom taraması farklı etnik kökenlerde 4 düşük penetrans genlerinin güçlü bir şekilde meme kanseriyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (15). Bu çalışmayla bilinen kansere yakınlık genlerine 4 meme kanseri geni daha eklemiştir (BRCA1 ve BRCA2 gibi). Uluslararası 15 araştırma takımının işbirliği ile yapılan bu çalışma, meme kanseri riskini arttıran yeni genleri tüm genomu inceleyerek gösteren ilk çalışma olmuştur.

Yatkınlık alellerini ayırt etmek için, Easton ve ekibi 4398 meme kanseri ve 4319 kontrol ile iki aşamalı ilişkilendirme çalışması yapmıştır. Bunu üçüncü aşama takip etmiş, 21.860 hasta ve 22.578 kontrolde 31 SNP test edilmiştir. Bu 31 SNP arasından istatistiksel olarak en yüksek P ve odds ratio değerlerine sahip FGFR2 geninde rs2981582 ve TNRC9 geninde bulunan rs3803662 SNP'leri olmuştur (15).

Hemminki ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada FGFR2, TNRC9 ve LSP1 genlerindeki SNP'ler, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları taşımayan 1415 ailesel meme kanserli hastada ve 1830 kontrolde incelenmiştir. Alınan sonuçlar Easton ekibin yaptığı çalışma ile paralellik göstermiştir (25).

Gorodnova ve arkadaşları aile öyküsü olmayan 140 meme kanserli hasta ve 174 kontrolde FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1 ve 8q24 bölgelerinde ki 5 SNP'yi Real-Time PCR yöntemiyle incelemişlerdir. En güçlü ilişki 1.59 kat risk ile FGFR2 rs2981582 bulunurken TNRC9 rs3803662 istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (OR:0.87) (21).

Östrojen reseptör pozitif 1049 meme kanserli hasta ve 1.073 kontrol ile 2010 yılında yapılan başka bir araştırmada ise Çin popülasyonunda TNRC9 genindeki üç SNP'nin (rs3803662, rs12443621, rs8051542) meme kanseri riski ile ilişkisi arasında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (37).

FGFR2 geninin intron 2 bölgesinde bulunan üç SNP (rs1219648, rs2420946 ve rs2981582) ile ilgili 2010 yılında iki meta analiz çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalar FGFR2 intronik SNP'lerinin meme kanseri gelişimi için düşük penetrans risk faktörü olduğunu göstermiştir (71,33).

Chen ve arkadaşlarının yaptığı 25.828 hasta ve 36.177 kontrolü kapsayan 8 çalışmanın meta analizde meme kanseri riski TNRC9'daki rs3803662 ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak bu meta analiz TNRC9 rs3803662 polimorfizminin meme kanseri riskiyle anlamlı şekilde ilişkili olduğunu ve rs3803662 T varyantının meme kanseri gelişiminde düşük yatkınlık risk faktörü olduğunu göstermiştir (6).

Hujits ve arkadaşları 2007 yılında 1.359 hasta ve 1.207 kontrol ile Hollanda populasyonunda FGFR2, TNRC9, MAP3K1 ve 8q24 bölgelerindeki SNP'ler ile hastaların klinik ve patolojik özelliklerini meme kanseri riski açısından değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmada FGFR2 geninde yer alan rs2981582 meme kanseri öyküsü bulunan hastalarda anlamlı bulunmuştur (P=0.005). TNRC9 rs3803662 heterozigot ve mutant taşıyıcılarının 60 yaş altı hastalarda, 60 yaş üstündekilere göre daha fazla görüldüğü saptanmıştır (P=0.025). Diğer klinik özellikler, tümör karakteristiği, östrojen ve progesteron reseptör durumları ile bu SNP'ler arasında bir ilişki bulunamamıştır (30).

Yapılan çalışmaların amacı bireysel riskte çok küçük etkisi olması beklenen bazı polimorfizmlerin tanımlanmasıdır. Varyantlar, araştırılan populasyonlarda yüksek frekanslarda çıkabilir ve meme kanseri riskinde önemli bir etkiye sahiptir ancak sıklıkla kontrol gruplarında da bulunabilirler. Bu genetik varyantların fonksiyon ve etkileşimini, çevresel risk faktörlerini nasıl değiştirdiklerini anlamak için bunların tümörogenezdeki rolünün karakterize edilmesi gerekir. FGFR2'deki meme kanseri riskinde hasta-kontrol çalışmaları sayesinde birçok önemli SNP'nin ilişkili olduğu tanımlanmıştır. Birçok SNP'nin biyolojik veya fonksiyonel sonuçları daha bilinmiyor olsa da FGFR2 ekspresyonunun artmasına neden olan FGFR2 intron 2 bölgesindeki meme kanseri yatkınlık SNP'lerinin (rs2981582, rs1219648) tanımlanmasının sonucu olarak; bu SNP'lerin transkripsiyon faktörleri olan OCT1, RUNX2 ve C/EBPb'nin bağlanma afinitesini değiştirdiği rapor edilmiştir (33).

Çalışmamızda ise Türk toplumunda meme kanseri riski ile FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 polimorfizmleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Genotipleri belirlenen meme kanseri ve kontrol gruplarının FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 polimorfizmleri açısından genotip ve allel dağılımları karşılaştırılmıştır (Tablo 4.2,4.3,4.4). Karşılaştırma sonucunda grupların birbirlerinden anlamlı derecede farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Sonuçlarımızın literatür bilgilerinden farklı olması örnek sayımızın az olmasından kaynaklanıyor olabileceğini akla getirmektedir.

Yapılan çalışmalarda rs2981582 ve rs3803662 SNP'lerinde östrojen reseptör durumuna göre meme kanseri riski açısından farklılık olduğu gösterilmiştir. Easton ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı 3 aşamalı genom ilişkilendirme çalışmasının tanımladığına göre 5 bölgedeki SNP'ler meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur. Meme kanseri riski ve SNP'ler arasındaki ilişkinin 20 çalışmadan alınan 23.000 meme kanserli hasta ve 26.273 kontrolün içinden klinik olarak önemli olan tümör karakteristiği arasında değişiklik olduğunu araştırmışlardır. Avrupa ve Asya orijinli vakalar kullanılmıştır. FGFR2 genindeki rs298158 SNP'si ER pozitif hastalarda (OR=1.74) negatiflere göre (OR=1.08) meme kanseri riskinin daha fazla olduğu görülmüştür (19). Minor allel frekansı toplam meme kanseri riski ve değerlendirilmiş 5 SNP arasındaki ilişki için yapılan değerlendirmede değişken genotipli homozigot kadınların ER pozitif tümör riski genel homozigot genotipli kadınlara göre 1.74 kat daha fazladır. TNRC9 rs3603662 ise diğer SNP'ler ile karşılaştırıldığında ER negatif hastalarda pozitiflere göre en güçlü ilişkiyi göstermiştir. Ayrıca PR pozitif, düşük grad ve node pozitif meme kanserli hastalar ile güçlü derecede bağlı bulunmuştur (19).

Meme kanseri riskini inceleyen diğer bir çalışmada; Simon Stacey ve ekibi 1600 meme kanseri hastası ve 11.563 kontrolde yaklaşık olarak 300.000 SNP'nin genotip analizini yapmışlardır. Daha sonra seçilen polimorfizmleri 5 örnek replikasyon setinde test etmişler, hem 2. hem de 16. kromozomda östrojen reseptör pozitif meme kanserli hastalarda negatiflere göre meme kanseri riskini arttıran genetik farklılıklar bulmuşlardır. Bu farklılıklardan biri daha önce Easton ve arkadaşları tarafından tanımlanan TNRC9 geninde bulunan rs3803662 SNP'si idi (66).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ise literatür bilgileriyle uygunluk göstermiştir. FGFR2 rs2981582 için ER pozitif hastalarda 1.41 kat risk, ER negatif hastalarda 1.07 kat risk bulunmuştur. TNRC9 rs3803662 için ise ER pozitif hastalarda 1.23 risk, ER negatiflerde ise 1.17 kat risk bulunmuştur. Her iki polimorfizm de T allel sıklığı dağılımı açısından ER pozitif hastalar ve ER negatif hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür.

FGFR2 ve TNRC9 genlerine ait polimorfizmlerin östrojen reseptör pozitifliği ile arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamış olsa da FGFR2 polimorfizminin, meme kanserinde östrojen reseptörü ekspresyon düzeyiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca FGFR2'yi aşırı eksprese eden meme kanseri orijinli hücre hatlarında, FGFR sinyal yolağının inhibisyonunun, bu hücrelerde çoğalmayı engelleyici etkisi olduğu saptanmıştır (42). Bu nedenle, FGFR2 geninin meme kanserinde onkogen benzeri işlev gördüğü düşünülmektedir. Meme kanseri hastalarının evre ve grad özellikleri arasında yaptığımız karşılaştırmalarda da genotip dağılımları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Meme kanseri için aday gen çalışmalarının ardından bu genlerin BRCA1-2 ile olan ilişkisini değerlendiren iki araştırma yapılmıştır. İlk çalışmada FGFR2 rs2981582 minör allelinin BRCA2 mutasyonu taşıyanlarda, TNRC9 rs3803662 allelinin ise BRCA mutasyonlarından her ikisini taşıyanlarda meme kanseri riskini arttığı saptanmıştır (2). Ayşe Latif ve arkadaşları ise meme kanseri öyküsü olan ancak BRCA1-2 mutasyonları taşımayan ve BRCA1-2 mutasyonlarından herhangi birini taşıyan bireyler arasında bu SNP'ler incelenmişlerdir. Meme kanseri aile öyküsü olan BRCA2 mutasyonu taşıyan bireylerde TNRC9 varyantının meme kanseri ile olan ilişkisini onaylamışlardır. Minör allelde heterozigot olan bireylerin artan riski 1.5 kat, homozigotlarda ise 2.5 kat bulunmuştur (36).

Her iki çalışmada BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarını taşımayan ailesel meme kanserli hastalarda FGFR2 ve TNRC9 varyantlarının meme kanseri riskini arttırdığını göstermiştir. Çalışmamızda hastaların BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarına ilişkin bilgi yetersiz olduğu için FGFR2 ve TNRC9 varyantlarıyla olan ilişkisi araştırılamamıştır.

Tablo 5.1. Literatür ile çalışmamızın popülasyon, metod ve hasta-kontrol sayıları açısından karşılaştırılması

Yazar	Yıl	Populasyon	Metod	Hasta	Kontrol
Easton ve ark. ⁽¹⁵⁾	2007	Avrupa	Array	21.860	22.578
Antoniou ve ark. ⁽²⁾	2008	Kafkas ve Arap	Array	4990	4301
Stacey ve ark. ⁽⁶⁶⁾	2008	Kafkas	Array	1.600	11.563
Garcia-Closas ve ark. ⁽¹⁹⁾	2008	Kafkas ve Asya	Microarray	23.000	26.273
Latif ve ark. ⁽³⁶⁾	2009	Afrika kökenli Amerikan ve Avrupa kökenli Amerikan	Taqman genotyping SNP assay	227	373
Hemminki ve ark. ⁽²⁵⁾	2010	Alman ve Kafkas	MALDI-TOF	1415	1830
Gorodnova ve ark. ⁽²¹⁾	2010	Rus ve Kafkas	RealTime PCR	140	174
Hujits ve ark. ⁽³⁰⁾	2010	Hollandalı	Array	1.359	1.207
Liang ve ark. ⁽³⁷⁾	2010	Japon	Array	1049	1073
*Zhang ve ark. ⁽⁷¹⁾	2010	-	-	14.628	16.319
*Chen ve ark. ⁽⁶⁾	2010	-	-	25.828	36.177
*Jia ve ark. ⁽³³⁾	2010	-	-	46.747	87.342
Çalışmamız	2011	Türk	RFLP	98	56

(* Meta-analiz çalışması)

Tablo 5.1’ de FGFR2 ve TNRC9 genlerinde bulunan sırasıyla rs2981582 ve rs3803662 polimorfizmlerinin meme kanseri ile ilişkisinin değerlendirildiği literatürler gösterilmektedir. Yapılan çalışmaların hepsinde FGFR2 ve TNRC9 genlerine ait polimorfizmlerin meme kanserinde önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Sonuçlarımızın literatür bilgilerinden farklı olması örnek sayımızın az olmasından kaynaklanıyor olabileceğini akla getirmektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda meme kanseri tanısı almış 98 hastanın ve 56 kontrolün FGFR2 ve TNRC9 genlerinin sırasıyla rs2981582 ve rs3803662 polimorfizmleri RFLP yöntemiyle incelenmiştir. Araştırmadaki asıl amacımız, bu polimorfizmlerin meme kanseri riskiyle ilişkisinin ve Türk toplumundaki sıklığının belirlenmesidir.

_ Yaptığımız bu çalışmayla TNRC9 ve FGFR2 genlerindeki polimorfizmlerinin meme kanseri ile olan ilişkisi Türk toplumunda ilk defa değerlendirilmiştir.

_ Çalışmamızda Türk toplumunda meme kanseri riski ile FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 polimorfizmleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

_ Her iki polimorfizimde T allel sıklığı dağılımı açısından ER pozitif hastalar ve ER negatif hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

_ FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 polimorfizmleri ile hastaların klinik ve demografik özellikleri ve tümörün genel özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik bulunmamıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda hasta sayısının azlığı kısıtlılık kabul edilerek daha büyük hasta ve kontrol gruplarında FGFR2 rs2981582 ve TNRC9 rs3803662 SNP'lerinin değerlendirmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Anderson, J., Burns H.D., Enriquez-Harris P, Wilkie A.O., Heath J.K., 1998, Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand, *Hum Mol Genet*, 7, 1475–1483 p.
2. Antoniou, A., 2008, Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers, *The American Journal of Human Genetics*, 82, 937-948 p.
3. Bingham, S.A., Luben, R., Welch, A., Wareham, N., Khaw, K.T., Day N., 2003, Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer? *Lancet*. 362, 212-4 p.
4. Bland, K.I., Menck, H.R., Scott-Conner, C.E., Morrow, M., Winchester, D.J., Winchester, D.P., 1998, The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States, *Cancer*, 83 (6), 1262-1273 p.
5. Carpenter, C.L., Ross, R.K., Paganini-Hill, A., Bernstein, L., 2003, Effect of family history, obesity and exercise on breast cancer risk among postmenopausal women. *Int. J. Cancer*, 106, 96-102 p.
6. Chen, M., 2010, Association between polymorphisms of trinucleotide repeat containing 9 gene and breast cancer risk: evidence from 62005 subjects, *Breast Cancer Res Treat*, 76, 68-74 p.
7. Cianfrocca, M., Goldstein, L.J., 2004, Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist*, 9, 606-616 p.
8. Colditz, G.A., 1998, Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 814-23p.
9. David, M., Ornitz and Marie, J.P., 2002, FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & Dev*. 16, 1446-1465p.
10. Denley, H., Pinder, S. E., Elston, C.W., Lee, A.H., Ellis, I.O., 2001, Preoperative assessment of prognostic factors in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 54, 20-24 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

11. Denoix, P.F., Baclesse, F., 1996, Presentation of the project for clinical classification of malignant breast tumors by the International Union for Cancer Control, Mem Acad Chir, 82, 407-410 p.
12. Dickson, R.B., Lipman, M.E., 1996, Oncogenes and Suppressor Genes In: Disease of the Breast Ed.Harris JR, Morrow M, Lippman ME, Hellman S., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-NewYork, 221-235 p.
13. Dumitrescu, R.G. and Cotarla I., 2005, Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? J. Cell Mol. Med. 9, 208-21p.
14. Dunning, A.M., Healey, C.S., Pharoah, P.D.P., Teare, M. D., Ponder, B.A. J., Easton D.F., 1999, A Systematic Review of Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk. Cancer Epid, Biomarkers and Prev; 8, 843-854 p.
15. Easton, D., 2007, Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci, Nature, 447, 1087-1093 p.
16. Ellis, I.O., Pinder, S. E., Lee, A.H.S., Elston, C. W., 2000, Tumors of the breast. In: Diagnostic Histopathology of Tumors. Fletcher C D M (ed)., 865-930 p.
17. Faham, S., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Linhardt, R.J., and Rees, D.C., 1996, Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor, Science, 271, 1116-1120 p.
18. Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P., 2007, Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006, Annals of Oncology, 18, 581-592 p.
19. Garcia-Closas, M., 2008, Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics, Plos Genetics, 4, 71-78 p.
20. Gelmann, E.P., 1998, Oncogenes in human breast Cancer. In: The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases, 499-517 p.
21. Gorodnova, T.V., 2010, Distribution of FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1, and 8q24 alleles in genetically enriched breast cancer patients versus elderly tumor free women, J. Cancer Gen CYTO, 223, 153-155 p.
22. Haagensen, C.D., Stout, A.P., 1982, Carcinoma of the Breast-Part I

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

23. Hamilton, S.R., and Aaltonen, L.A., 2000, Pathology and Genetics of Tumors of Digestive System. Lyon: Who pres.
24. Hanf, V. and Gonder, U., 2005, Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 123, 139-49 p.
25. Hemminki, K., 2009, Low risk variants FGFR2, TNRC9 and LSP1 in German Familial Breast Cancer Patients, International Journal of Cancer, 113, 89-104 p.
26. <http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf>
27. <http://www.cbs.nl/enGB/menu/themas/bevolking/publicaties/artikelen/archief/2007/2007-2308-wm.htm>.
28. <http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/5588/polymorp.pdf?sequence=5>
29. <http://www.who.int/infobase/report.aspx?iso=TUR&rid=119&goButton=Go>.
30. Hujits, P., 2007, Clinical correlates of low-risk variants in FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1 and 8q24 in a Dutch cohort of incident breast cancer cases, Breast Cancer Res, 9, 129-134 p.
31. Ignatiadis, M., Sotiriou, C., 2008, Understanding the Molecular Basis of Histologic Grade, Pathobiology, 75, 104-111 p.
32. İlhan, S., 2006, Meme Karsinomu Patolojisi, İ.U. Cerrahpasa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri Sempozyum Dizisi, 54, 65 -71 s.
33. Jia, C., Chai, Y., Ma, Y., Fu, D., 2010, Quantitative assessment of the effect of FGFR2 gene polymorphism on the risk of breast cancer, Breast Cancer Res Treat, 149, 97-106 p.
34. Kawase, T., 2009, FGFR2 intronic polymorphisms interact with reproductive risk factors of breast cancer: Results of a case control study in Japan, Int. J. Cancer, 125, 1946 –1952 p.
35. Klijn, J.G.M., Berns P.M.J.J., Schmits, P.L.M., 1992, Foekens, J.A., The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. Endocr Rev., 13, 3-17 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

36. Latif, A., Hadfield, K., Roberts, S., Shenton, A., Lalloo, F., Black, G., Howell, A., Evans, G., Newman, W., 2009, Breast cancer susceptibility variants alter risks in familial disease, *J. Med. Genet.*, 114, 53-61 p.
37. Liang, J., Chen, P., Hu, Z., Shen, H., Wang, F., Chen, L., Li, M., Tang, J., Wang, H., Shen, H., 2010, Genetic variants in trinucleotide repeat-containing 9 (TNRC9) are associated with risk of estrogen receptor positive breast cancer in a Chinese population, *Breast Cancer Res Treat*, 111, 76-87 p.
38. Linder, M.W., Looney, S., Adams, J.E., Johnson, N., Antonino-Green, D.,Lacefield, 2002, Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms, *J. Thromb. Thrombolysis*, 14, 227–232 p.
39. McFadyen, M.C., Melvin, W.T., Murray, G.I., 2004, Cytochrome P450 enzymes:Novel options for cancer therapeutics, *Mol. Cancer. Ther.*,3, 363–371 p.
40. McGuire, W.L., Clark, G.M.,1992, Prognostic Factors and Treatment Decisions in Axillary-node negative Breast Cancer, *New Engl J Med*, 326, 56-64 p.
41. Mcinerney, N., 2009, Low penetrance breast cancer predisposition SNPs are site specific, *Breast cancer res treat*, 117, 151-159 p.
42. McLeskey, S.W., Zhang, L., El-Ashry, D., Trock, B.J., Lopez, C.A., Kharbanda, S., Kharbanda, S., Tobias, C.A., Lorant, L.A., Hannum, R.S., Dickson, R.B., Kern, F.G., 1998, Tamoxifen-resistant fibroblast growth factor-transfected MCF-7 cells are cross-resistant in vivo to the antiestrogen ICI 182, 780 and two aromatase inhibitors, *Clin Cancer Res*, 4, 697–711 p.
43. Mcpherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M., 2000, Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics, *BMJ*, 321,624-628 p.
44. Mettlin, C., 1999, Global breast cancer mortality statistics, *CA Cancer J. Clin.*, 49, 138–144 p.
45. Mettlin, C., Global breast cancer mortality statistics, 1999, *CA Cancer J. Clin.*,49, 138-144 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

46. Meyer, K., Maia, A., O'Reilly, M., Teschendorff, A., Chin, S., Caldas, C., Ponder, B., 2008, Allele-Specific Up-Regulation of FGFR2 Increases Susceptibility to Breast Cancer, *PLoS Biol.*, 108, 6-8 p.
47. Mitrunen, K. and Hirvonen, A., 2003, Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in estrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat. Res.*, 544, 9-41 p.
48. Mohammadi, M., Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A., 2005, Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation, *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(2), 107-37 p.
49. Nussbaum, R.L., Meinness, R.R., Willard, H.F., Cornelius, F.B.III., 2005, Thompson & Thompson Tıbbi Genetik, 6. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Saunders
50. Özmen, V., 2006, Dünya'da ve Türkiye'de Meme Kanseri Tarama (Screening) ve Kayıt Programları. *Meme Sağlığı Dergisi*, 2, 055-058 s.
51. Partanen, J., Schwartz, L., and Rossant, J., 1998, Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of Mouse embryos. *Genes Dev.*, 12, 2332-2344 p.
52. Pellegrini, L., Burke, D. F., Von Delft, F., Mulloy, B., Blundell, T. L., 2000, Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin, *Nature*, 407, 1029-1034 p.
53. Plotnikov, A.N., Hubbard, S.R., Schlessinger, J., Mohammadi, M., 2000, Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligandreceptor specificity. *Cell*.101, 413-424 p.
54. Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Lee, A. H., Elston, C. W., Grainge, M. J., Hodi, Z., Blamey R. W., Ellis, I. O., 2008, Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 3153-3158 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

55. Reeves, G., Travis, R., Green, J., 2010, Incidence of breast cancer and its subtypes in relation to individual and multiple low-penetrance genetic susceptibility loci, *JAMA*, 304, 426-434 p.
56. Reeves, G., Travis, R., Green, J., Bull, D., Tipper, S., Baker, K., Beral, V., Peto, R., Bell, J., Zelinika, D., Lathrop, M., 2010, Gene-environment interactions in 7610 women with breast cancer: prospective evidence from the million women study, *Lancet*, 375, 2143-2151 p.
57. Riaz, M., Elstrodt, F., Hollestelle, A., Dehghan, A., Klijn, J., Schutte, M., 2009, Low-risk susceptibility alleles in 40 human breast cancer cell lines, *BMC Cancer*, 9, 81-87 p.
58. Ripperger, T., Gadzicki, D., Meindl, A., Schlegelberger, B., 2009, Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling, 17, 722-731p.
59. Ross, R.K., Paganini-Hill, A., Wan, P.C., Pike, M.C., 2000, Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin, *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 328-32 p.
60. Schenke, J.G., Levisky, R., Ohel, G., 1984, Multiple Primary Malignant Neoplasms in Breast Cancer Patients in Israel. *Cancer*, 54, 145-50 p.
61. Schulz, W.A., 2005, Breast Cancer. *Molecular Biology of Human Cancers. An Advanced Student's Textbook* Netherland Springer, 357-382 p.
62. Shotelersuk, V., Mahatumarat, C., Ittiwut, C., Rojvachiranonda, N., Srivuthana S., Wacharasindhu, S., Tongkobetch, S., 2003, FGFR2 Mutations among Thai Children with Crouzon and Apert Syndromes, *J Craniofac. Surg.*, 14:101-104 p.
63. Simpson, P.T., Reis-Filho, J.S., Gale, T., Lakhani, S.R., 2005, Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*, 205 (2), 248-254 p.
64. Singletary, S.E., Connolly, J.L., 2006, Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin*, 56 (1), 37-47; quiz 50-31 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

65. Somunoğlu, S., 2007, Meme Kanserinde Risk Faktörleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi. 2,5 s.
66. Stacey, S., Manolescu, A., Sulem, P., Rafnar, T., Gudmundsson, j., Masson, G., Jakobsdottir, M., Thorlacius, S., Helgason, A., 2007, Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer, Nat Genet,39, 865- 869 p.
67. Strachan, T., Read, A.P., 1999, Human Molecular Genetics 2, 2nd Edition, BIOS Scientific Publishers, Ltd., Oxford, UK, Treatment. Ann Surg, 116 (6), 801-815 p.
68. Varghese, J., and Easton D., 2010, Genome-wide association studies in common cancers-what have we learnt?, COGEDE, 20, 1-9 p.
69. Vieira, D.S., Dufloth, R.M., Schmitt, F.C.,Zeferino, L.C., 2008, Breast cancer: new concepts in classification, Rev Bras Ginecol Obstet, 30 (1), 42-47 p.
70. Yeh, B. K., Igarashi, M., Eliseenkova, A. V., Plotnikov, A. N., Sher, I., Ron, D., Aaronson, S. A., Mohammadi, M., 2003, Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors. Proc. Nat. Acad. Sci., 100, 2266-2271 p.
71. Zhang, J., 2010, Current evidence on the relationship between three polymorphisms in the FGFR2 gene and breast cancer risk: a meta-analysis, Breast cancer res treat, 846, 7 p.

ÖZGEÇMİŞ

Pınar Erol

Adres: Hoşnudiye Mah. Sağın Sk. Park 1 Apt. No:54 Daire: 28 26000 –
Eskişehir – TÜRKİYE

Cep: 90 505 629 60 84

E-Posta: pnrerl@hotmail.com

GENEL BİLGİLER

Uyruğu: T.C.

Doğum Yeri: Bursa

Doğum Tarihi: 25/03/1984

Medeni Durum: Bekar

Eğitim Durumu: Yüksek Lisans

EĞİTİM

Yüksek Lisans: **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi**

09/2007 – 09/2010 Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı

Üniversite: **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi**

09/2003 – 06/2007 Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Lise: **Bursa Cumhuriyet Lisesi**

09/1999 – 09/2002 Fen Bilimleri

İŞ TECRÜBESİ

Biyolog: **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi**

09/2007 – 09/2010 Moleküler Genetik