

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CDC25A* GEN POLİMORFİZMLERİNİN
MEME KANSERİ PATOGENEZİ VE
PROGNOZU İLE İLİŞKİSİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
DOKTORA TEZİ**

**İŞİK DİDEM KARAGÖZ
KASIM 2010**

***CDC25A* Gen Polimorfizmlerinin Meme Kanseri
Patogenezi ve Prognozu ile İlişkisi**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

PhD Tezi

Danışman

Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN

Işık Didem KARAGÖZ

Kasım 2010

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: **CDC25A Gen Polimorfizmlerinin Meme Kanseri Patogenezi ve Prognuzu İle İlişkisi**

Öğrencinin Adı Soyadı: **Işık Didem KARAGÖZ**

Tez Savunma Tarihi: **05 Kasım 2010**

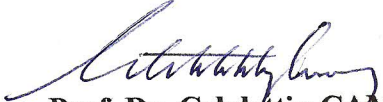
Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Prof. Dr. Ramazan KOÇ
FBE Müdürü

Bu tezin ~~Yüksek Lisans~~/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımca (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir ~~Yüksek Lisans~~/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Celalettin CAMCI
İkinci Tez Danışmanı


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir ~~Yüksek Lisans~~/Doktora tezi olarak oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

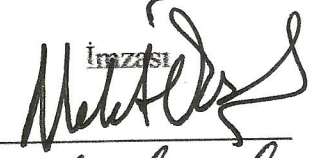
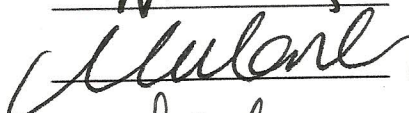



Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof.Dr. Mustafa CANLI

Doç.Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Yrd.Doç.Dr. Beyhan CENGİZ

Yrd.Doç.Dr. İbrahim Halil KILIÇ


İmzası





Rahmetli Babamın ve Onun Yeklugunda

Babalık Eden Eniřtemin Anısına. . . .

ÖZET
CDC25A GEN POLİMORFİZMİNİN MEME KANSERİ PATOGENEZİ VE
PROGNOZU İLE İLİŞKİSİ

KARAGÖZ, Işık Didem
Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Kasım 2010, 73 sayfa

Kontrol noktası temel elemanlarından biri olan hücre bölünme siklusu 25 (CDC25) fosfatazlar hücre siklusunun ilerlemesini düzenleyen önemli regülatörlerdir. Memeli hücrelerinde bu genin üç izoformu tanımlanmıştır: CDC25A, CDC25B ve CDC25C. CDC25A, S fazına girişte gereklidir ve bu fosfatazın aşırı ekspresyonu S fazına girişi hızlandırır. CDC25A'nın aşırı ekspresyonu tümör hücrelerini DNA replikasyon kontrol noktalarına daha az hassas hale dönüştürür ve böylece genomik kararsızlıklarına eşlik eder. Bu çalışmada, insan CDC25A genindeki tek gen polimorfizmlerinin metastatic ve metastatik olmayan meme kanserindeki sıklığının incelenmesi amaçlanmıştır. Meme kanseri tanısı konmuş toplam 281 hasta ve 137 meme kanseri olmayan sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. CDC25A gen polimorfizmlerinin belirlenmesi PCR ve RFLP tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. 263C/T bölgesindeki polimorfik değişim hem meme kanseri ile hem de metastazla ilişkili bulunmuştur. Özendirici bölgesinde yer alan -350C/T polimorfizmi ile meme kanseri arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır. Yine özendirici bölge içinde yer alan -51C/G polimorfizmi meme kanseri ile ilişkili bulunurken metastazla ilişkili bulunmamıştır. Bu sonuçlar CDC25A geninin 263C/T ve -51C/G polimorfizmlerinin meme kanserinin erken tanısı için aday belirteç olabileceklerini ve tedavide ideal hedefler olarak rol oynayabileceklerini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: CDC25A, Meme Kanseri, Hücre Siklusu, Polimorfizm.

ABSTRACT
**THE RELATION BETWEEN CDC25A GENE POLYMORPHISM AND BREAST
CANCER PATHOGENESIS AND PROGNOSIS**

KARAGÖZ, Işık Didem

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

November 2010, 73 pages

The family of cell division cycle 25 (*CDC25*) phosphatase is one of the important regulators of the cell cycle progression. In mammalian cells, three isoforms have been identified: *CDC25A*, *CDC25B*, and *CDC25C*. *CDC25A* is required to enter S period, and the overexpression of this phosphatase accelerates the entrance to S period. *CDC25A* overexpression could render tumour cells to be less sensitive to DNA replication checkpoints, thereby contributing to their genomic instability. We aimed to investigate the frequency of human *CDC25A* gene SNPs in metastatic and non-metastatic breast cancer. Totally 281 patients with histologically confirmed incident of breast cancer and 137 cancer-free controls were included. The *CDC25A* gene polymorphisms were detected by PCR and RFLP techniques. It was found that the 263C/T polymorphism is significantly associated both with breast cancer and the risk of metastasis. The -350C/T polymorphism in the promoter region of *CDC25A* gene was not found to be associated with breast cancer and metastasis. The other promoter polymorphism -51C/G in the *CDC25A* gene was associated with breast cancer but not with metastasis. These data suggest that 263C/T and -51C/G polymorphisms of *CDC25A* gene could be candidate markers for earlier diagnosis of breast cancer.

Keywords: *CDC25A*, Breast Cancer, Cell Cycle, Polymorphism.

TEŞEKKÜR

Akademik eğitimime başladığım günden beri bana baba sıcaklığı gösteren, daima destek olan, engin bilgi ve tecrübelerinin kapısını sonuna kadar açan ve kendisi gibi dürüst ve ilkeli bir bilim insanı olarak beni yetiştirmekte büyük çaba sarf eden çok saygıdeğer hocam ve danışmanım Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN'a;

Yüksek lisans ve doktora çalışmalarım boyunca bana her zaman vakit ayıran ve emek veren ikinci danışman hocam Prof.Dr. Celalettin CAMCI'ya; doktora çalışmalarım süresince laboratuvarlarını açarak desteklerini esirgemeyen hocam Prof.Dr. Ahmet ARSLAN'a ve tez çalışmalarımı büyük bir özveriyle takip edip yönlendirmeleri sayesinde bana yol gösterici olan hocalarım Prof.Dr. Mustafa CANLI ve Doç.Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER'e;

Tez çalışmamın konu seçimi ve planlanması aşamasında fikirleriyle destek veren sevgili hocam Yard.Doç.Dr. Beyhan CENGİZ'e ve tez materyallerinin toplanması konusunda destek olan sayın hocam Yard.Doç.Dr. Mehmet Emin KALENDER'E; laboratuvar çalışmalarım boyunca sıkça yardımlarını gördüğüm sevgili hocam Yard.Doç.Dr. Serdar ÖZTUZCU ve Uzm.Bio. Bülent GÖĞEBAKAN'a; tezimin istatistik açıdan değerlendirilmesinde bana zaman ayıran ve öğretici olan sayın hocam Prof.Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK'e;

Her zaman bana maddi ve manevi destek olan sevgili hocam, canım arkadaşım ve kardeşim Yard.Doç.Dr. İbrahim Halil KILIÇ'a;

Tüm bu süreç içerisinde karşılaştığım zorluklara benimle beraber göğüs geren ve her zaman özveriyle destek olan sevgili eşim Uzm.Dr. Alper KARAGÖZ'e ve tabi ki en büyük emeğin ve teşekkürün sahibi olan biricik ANNEME;

Doktora öğrenimim süresince bana burs imkanı sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına (BİDEB);

Teşekkürü bir borç bilirim...

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından FEF.09.06 proje no ile desteklenmiştir.

Işık Didem KARAGÖZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vii
RESİM LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Biyolojisi	2
2.2. Meme Kanseri	3
2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi	4
2.2.2. Meme Kanserinin Oluşumu	5
2.2.3. Meme Kanserinin Morfolojisi	8
2.2.4. Meme Kanserinin Patolojik Olarak Sınıflandırılması	8
2.2.4.1. İnvaziv Meme Kanseri	9
2.2.4.2. İnvaziv Olmayan (Karsinom in-situ) Meme Kanseri	9
2.2.5. Kalıtsal ve Sporadik Meme Kanserleri	9
2.2.5.1. Kalıtsal Meme Kanseri	10
2.2.5.2. Sporadik Meme Kanseri	10
2.2.6. Meme Kanserinde Etiyoloji	11
2.2.6.1. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri	11
2.2.6.1.1. Yaş	11
2.2.6.1.2. Boy ve Kilo	11
2.2.6.1.3. Coğrafik Varyasyon	11
2.2.6.1.4. Menarş ve Menopoz Yaşı	12
2.2.6.2. Çevresel Faktörler	12

2.2.6.2.1. Radyasyon	12
2.2.6.2.2. Diyet	12
2.2.6.2.3. Alkol	13
2.2.6.2.4. Sigara	13
2.2.6.3. Reprodüktif Faktörler	14
2.2.7. Meme Kanseri Evrelemesi	14
2.2.8. Prognostik Faktörler	15
2.3. CDC25 Fosfatazlar (Cell Division Cycle 25)	16
2.3.1.CDC25 Kristal Yapısı	17
2.3.2.Hücre Siklusu Kontrolünde CDC25 Fosfatazlar	17
2.3.3.CDC25 Aktivitesinin Düzenlenmesi	20
2.3.4.CDC25 Fosfatazlar ve Kanser	24
2.3.5.CDC25 ve Kanser Tedavisi	26
2.4.CDC25A Fosfataz	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM	32
3.1. CIHAZLAR, KİMYASAL MADDELER VE SOLÜSYONLAR	32
3.1.1. DNA İzolasyon Aşaması	32
3.1.2. DNA Amplifikasyonu	32
3.1.3. Enzim Kesimi	33
3.1.4. Agaroz Jel Elektforezi	34
3.2. YÖNTEM	34
3.2.1. Kan Örneklerinin Eldesi	34
3.2.2. DNA İzolasyonu	36
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	38
3.2.3.1. Primer Tasarımı	38
3.2.3.2. PCR Koşullarının Optimizasyonu	39
3.2.4. Agaroz Jel Elektforezi	42
3.2.5. RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) ile CDC25A genine ait P88S, -350C/T ve -51C/G Polimorfizmlerinin Analizi	43
3.2.6. İstatistiksel Analizler	44
4. BULGULAR	45

4.1. CDC25A Geni Ekzon 3'te Yer Alan P88S Bölgesi için Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları	45
4.1.1. P88S Bölgesinin PCR Bulguları	45
4.1.2. P88S Bölgesi PCR Ürünlerinin TfiI Enzimi İle Kesim Sonuçları	46
4.2. CDC25A Geni Özendirici Bölgede Yer Alan -350C/T Bölgesi için Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları	48
4.2.1. -350C/T Bölgesinin PCR Bulguları	48
4.2.2. -350C/T Bölgesi PCR Ürünlerinin MseI Enzimi İle Kesim Sonuçları	49
4.3. CDC25A Geni Özendirici Bölgede Yer Alan -51C/G Bölgesi için Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları	52
4.3.1. -51C/G Bölgesinin PCR Bulguları	52
4.3.2. -51C/G Bölgesi PCR Ürünlerinin BfaI Enzimi İle Kesim Sonuçları	53
4.4. Haplotip Analizi	55
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	64
7. KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1: Meme Anatomisinin Önden Görünüşü	3
Şekil 2.2: Meme Anatomisinin Yandan Görünüşü	3
Şekil 2.3: Meme Kanseri	4
Şekil 2.4: Kanser Oluşumu	6
Şekil 2.5: Kanser Hücrelerinin Yayılımı	7
Şekil 2.6: Meme Kanserinin Kadranlara Göre Görülme Sıklığı	8
Şekil 2.7: CDC25 Fosfatazlar Tarafından Cdkların Aktivasyonu	17
Şekil 2.8: CDC25 Ailesinin Evrimsel Perspektifi	18
Şekil 2.9: Hücre Siklusu Anahtar Geçiş Yolaklarında CDC25 Fosfatazlar	19
Şekil 2.10: G2-M Geçişinde CDC25B ve CDC25C'nin Rolü	20
Şekil 2.11: CDC25 Fosfatazların Regülasyon Şeması	20
Şekil 2.12: DNA Hasarına Karşı G2/M Kontrol Noktasındaki Cevapta CDC25 İnaktivasyonu	21
Şekil 2.13: DNA Hasarına Karşı Cdk-Cyc Kompleksinin İnhibisyonu	22
Şekil 2.14: DNA Hasarına Karşı ATM/ATR Kinazların Chkları İnhibisyonu	23
Şekil 2.15: İnsan Kanserlerinde CDC25 Fosfatazların Aşırı Ekspresyonu	25
Şekil 2.16: Kromozom 3p-terminalindeki İnsan CDC25A Geninin Genomik Organizasyonu	28
Şekil 2.17: CDC25A'nın A1 ve A2 İzoformları	28

RESİMLER LİSTESİ

RESİMLER

Sayfa

Resim 3.1: P88S Bölgesinin PCR Koşullarını Optimizasyonu	41
Resim 3.2: -350C/T Bölgesinin PCR Koşullarını Optimizasyonu	41
Resim 3.3: -51C/G Bölgesinin PCR Koşullarını Optimizasyonu	41
Resim 4.1: P88S Bölgesi PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	45
Resim 4.2: CDC25A Geninin P88S Bölgesi Polimorfizminin TfiI Enzim Kesimi ile Analizi	46
Resim 4.3: -350C/T Bölgesi PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	49
Resim 4.4: CDC25A Geninin -350C/T Bölgesi Polimorfizminin MseI Enzim Kesimi ile Analizi	49
Resim 4.5: -51C/G Bölgesi PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	52
Resim 4.6: CDC25A Geninin -51C/G Bölgesi Polimorfizminin BfaI Enzim Kesimi ile Analizi	53

TABLolar LİSTESİ

TABLolar	Sayfa
Tablo 3.1: Hastaların Demografik Özellikleri	35
Tablo 3.2: Hastaların TNM Evrelerine Göre Dağılımı	35
Tablo 3.3: Evre 4 Hastalarının Metastaz Yerleri ve Yüzdesel Dağılımları	36
Tablo 3.4: CDC25A Geni Ekzon 3 Bölgesi ve Özendirici Bölge İçerisindeki 2 Ayrı Bölge için Hazırlanmış Primerler	39
Tablo 3.5: P88S için Gradyent PCR Protokolü	39
Tablo 3.6: -350C/T için Gradyent PCR Protokolü	40
Tablo 3.7: -51C/G için Gradyent PCR Protokolü	40
Tablo 3.8: P88S, -350C/T ve -51C/G Bölgeleri için Kullanılan PCR Karışımı	42
Tablo 3.9: P88S, -350C/T ve -51C/G Bölgeleri için Kullanılan Primer Bağlanma Sıcaklıkları	46
Tablo 3.10: P88S Bölgesi için Kesim Protokolü	43
Tablo 3.11: -350C/T Bölgesi için Kesim Protokolü	43
Tablo 3.12: -51C/G Bölgesi için Kesim Protokolü	44
Tablo 4.1: Hasta ve Kontrol Grubunda P88S Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları	46
Tablo 4.2: Metastatik Hastalar ve Remisyon Hastalarında P88S Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları	47
Tablo 4.3: P88S Allel Frekansları ile Östrojen ve Progesteron Reseptörlerinin Pozitiflik Durumları Arasındaki İlişki	48
Tablo 4.4: Hasta ve Kontrol Grubunda -350C/T Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları	50
Tablo 4.5: Metastatik Hastalar ve Remisyon Hastalarında -350C/T Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları	51
Tablo 4.6: -350C/T Allel Frekansları ile Östrojen ve Progesteron Reseptörlerinin Pozitiflik Durumları Arasındaki İlişki	52
Tablo 4.7: Hasta ve Kontrol Grubunda Arasında -51C/G Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları	53

Tablo 4.8: Metastatik Hastalar ve Remisyon Hastalarında -51C/G Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları	54
Tablo 4.9: -51C/G Allel Frekansları ile Östrojen ve Progesteron Reseptörlerinin Pozitiflik Durumları Arasındaki İlişki	55
Tablo 4.10: Haplotip Analizi	56

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

ADH	Antidiüretik Hormon
AJCC	Amerikan Birleşik Kanser Komitesi
APC/C	Anafaz Başlatıcı Kompleks/Siklozom
ATM	Ataxia-telangiectasia Mutated Yolağı
ATR	Ataxia-telangiectasia ve Rad-3 İlişkili Yolak
BRCA1	Meme Kanseri 1 Geni
BRCA2	Meme Kanseri 2 Geni
CAMP	Katolisidin Antimikrobiyal Peptit
Cdc	Siklin
CDC25	Hücre Bölünme Siklusu 25 Fosfatazlar
CDC25A	Hücre Bölünme Siklusu 25A
CDC25B	Hücre Bölünme Siklusu 25B
CDC25C	Hücre Bölünme Siklusu 25C
cdc-Cdk	Siklin-Siklin Bağımlı Kinaz Kompleksi
Cdks	Siklin Bağımlı Kinazlar
Chk1	İnsan Kontrol Noktası Kinaz 1
Chk2	İnsan Kontrol Noktası Kinaz 2
CI	Güven Aralığı
COMT	Katekol O-metil Transferaz
C-TAK1	İlişkili Protein Kinaz
CYP17	Sitokrom P17
CYP19	Sitokrom P19
CYP1A1	Sitokrom P4501A1
CYP1B1	Sitokrom P4501B1
dATP	Deoksi Adenozin Trifosfat
dCTP	Deoksi Sitozin Trifosfat
ddH ₂ O	Dideoksi Su

dGTP	Deoksi Guanozin Trifosfat
dNTP	Deoksi Nükleozid Trifosfat
dsPTPase	Çift Özgüllüklü Protein Tirozin Fosfataz
dTTP	Deoksi Timidin Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ER	Östrojen Reseptör
EtBr	Etidyum Bromid
G1	Büyüme Fazı 1
G2	Büyüme Fazı 2
GSK-3 β	Glikojen Sentaz Kinaz 3 β
GST	Glutasyon S Transferaz
GSTM1	Glutasyon S-Transferaz Mu 1 Geni
GSTM3	Glutasyon S-Transferaz Mu 3 Geni
GSTP1	Glutasyon S-Transferaz P 1 Geni
GSTT1	Glutasyon S-Transferaz Teta 1 Geni
Guanidin-HCl	Guanidin Hidro Klorikasit
HAA	Heterosiklik Aromatik Aminler
HER1	Herseptin 1
HER2	Herseptin 2
HER3	Herseptin 3
HER4	Herseptin 4
17 β -HSD17 β	Hidroksi Steroid Dehidrogenaz
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu
IHC	İmmünohistokimya
M	Mitoz
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	Biyoteknoloji Bilgileri Ulusal Merkezi
NES	Nükleer Salım Sinyalleri
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyali

OR	Olasılık Oranı
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PAS	Plazminojen Aktivatör Sistem
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PR	Progesteron Reseptör
RB	Retinoblastoma
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
S	Sentez
SCF	Skp1/Cul1/F-box Kompleksi
Ser/Thr-Pro	Serin/Treonin-Prolin
SMC1	Kromozom Yapısal Korunum 1
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TBE	Tris Borat EDTA
Thr 160	Treonin 160 Rezidüsü
TNM	Tümör Lenf Metastaz
Tris-HCl	Tris Hidro Klorikasit
Tyr15	Tirozin 15 Rezidüsü
u-PA	Urokinaz Plazminojen Aktivatör
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

BÖLÜM 1

1.GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malign tümördür. Özellikle sanayileşmiş ülkelerde akciğer kanseriyle birlikte yüksek mortaliteye neden olan bir kanser tipidir.

Meme kanserinin çok çeşitli çevresel faktörlerin yanı sıra (gen polimorfizmlerin veya tek nükleotid değişimlerinin de (SNP)) gibi genetik değişikliklerden de kaynaklanabileceği konusunda fikir birliğine varılmıştır. Ancak meme kanserinin moleküler mekanizması hala net değildir. Malignensinin en belirgin niteliği hücre bölünmesindeki kontrolün ortadan kalkmasıdır.

Bu çalışmada, hücre siklusu kontrol noktası temel elemanlarından olan CDC25 fosfatazların üç izoformundan biri olan ve S fazına giriş için mutlaka gerekli olan CDC25A genindeki tek gen polimorfizmlerinin metastatik ve metastatik olmayan meme kanserindeki sıklığının incelenmesi amaçlanmıştır. Meme kanserli hastalarda 263C/T (P88S), -350C/T ve -51C/G polimorfizmlerinin genotip dağılımlarını ve allel frekanslarını belirlemek ve bu polimorfizmler ile tümör oluşum ve metastazı arasındaki ilişkiyi ortaya koymak hedeflenmiştir.

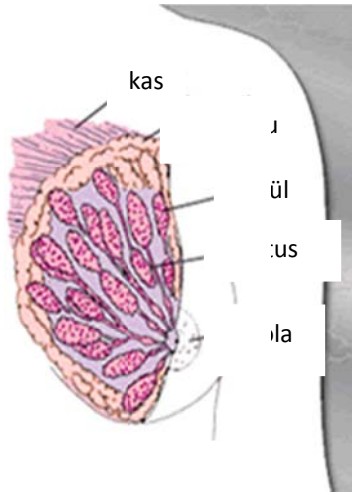
BÖLÜM 2

2.GENEL BİLGİLER

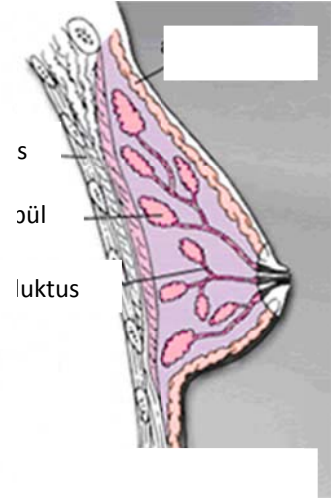
2.1. Meme Biyolojisi

Meme bezleri 5 haftalık fetüsün ventral yüzeyinde epidermis kalınlaşması ile beliren ve aksilladan uyluğun üst medial bölgesine kadar uzanan süt çizgisinden gelişir. Meme bezleri modifiye apokrin ter bezleridir. Her meme ‘lob’ adı verilen 15-20 bölümden oluşur. Her lob daha küçük alt bölümleri ‘lobül’lere sahiptir. Her bir lobülde düzinelerce bezden süt salgılanmaktadır. Loblar, lobüller ve süt salgı bezleri ‘duktus’ denen ince tüplerle birbirine bağlıdır. Bu tüpler meme dokusunun ortasındaki meme başına ‘areola’ya ulaşır. Lobüller ve duktusların çevresini yağ dokusu sarar. Meme dokusu içinde kas yoktur. Kaslar meme dokusunun hemen altında yer alır, kaburgaların üzerini sarar. Tüm dokular gibi memelerin de kendilerine ait kan ve lenf damarları bulunmaktadır. Lenf bezleri kümeler halinde koltuk altında ‘aksilla’ da kümelenmiştir [1].

Memeler ergenlik öncesi dönemde gelişmemiştir, ergenlikten sonra yumurtalıklarda östrojen hormonu üretiminin başlaması ile hızlı bir şekilde gelişim gösterirler. Bu dönemde o zamana kadar olgunlaşmamış duktuslar uzamaya başlar ve bunları çevreleyen doku içerisine 15–20 arasında lob oluşur. Her lob kendi içinde 20–40 adet lobüllere ayrılır (Şekil 2.1-2.2).



Şekil 2.1: Meme Anatomisinin Önden Görünüşü

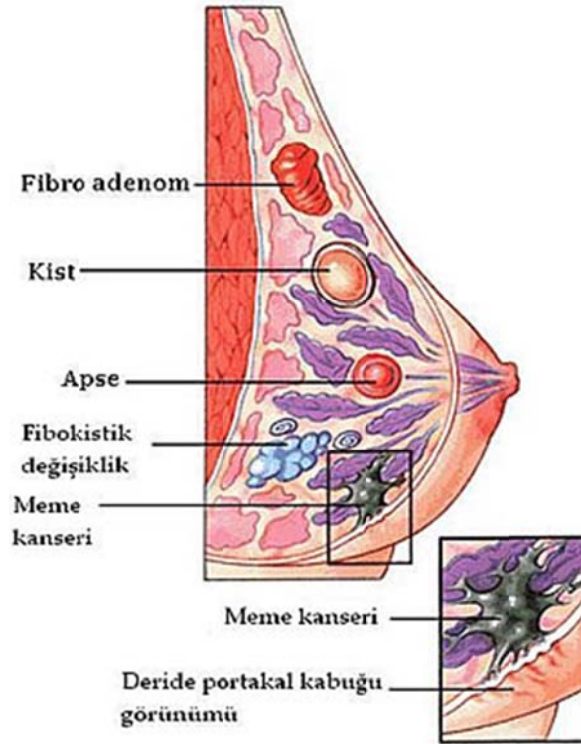


Şekil 2.2: Meme Anatomisinin Yandan Görünüşü

Hamilelikte duktuslar bağ dokusunun içine doğru iyice uzayarak alveolleri oluşturur. Böylece salgı hücreleri farklılaşır ve duktuslar olgunlaşır. Emzirme salgı bezlerinin büyümesine neden olmaktadır ve daha sonra da özellikle alveollerde bulunan luminal salgı hücreleri apoptozis geçirmektedir. Bu şekilde doku tekrar bir düzenlemeye gitmektedir. Tüm bu sikluslar lokal olarak oluşturulan büyüme faktörleri ve hormonların birlikte çalışması ile kontrol edilmektedir [2].

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malign tümördür (Şekil 2.3). Özellikle sanayileşmiş ülkelerde akciğer kanseriyle birlikte yüksek mortaliteye neden olan bir kanser tipidir. Dünyada her yıl 10 milyon yeni kanser olgusunun geliştiği bilinmektedir. Bu olguların yaklaşık 1 milyonu meme kanseridir ve bunların da yaklaşık 400.000 kadarı ölümlle sonuçlanmaktadır [3]. Meme kanseri görülme sıklığı ve mortalitesi coğrafik bölgeye, ırka, etnik kökene ve sosyo-ekonomik duruma göre değişiklik göstermektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı'nın 2004-2006 yılları verilerine göre, meme kanseri kadınlarda görülen kanserler arasında % 23,8 (6597 vaka) oranıyla en sık görülen kanser türüdür [4]. Hastalığın diğer bir özelliği, görülme sıklığının artıyor olmasıdır [3]. Meme kanseri gelişiminde çeşitli faktörlerin etken olduğunun bilinmesine rağmen, olguların %70-80'inde hiçbir risk faktörü saptanamamaktadır [5].



Şekil 2.3: Meme Kanseri

1950’li yıllarda yapılan çalışmalarda meme kanseri etyolojisinde steroid hormonlarının önemi gösterilmiştir. 1980 yılına kadar büyüme faktörleri hakkında pek fazla bilgi yok iken bu yıllardan itibaren onkogenler, tümör baskılayıcı genler, hastalık progresyonu, hücresel adhezyon, büyüme faktörleri hakkında daha fazla bilgiler elde edilmeye başlanmıştır. 90’lı yıllarda ise ailesel meme kanseri olgularına sebep olan genler saptanmış ve ayrıca yine aynı dönemde hücre siklusu, DNA tamiri, apoptozis ve apoptozis düzenlenmesi hakkında yeni bilgiler elde edilmiştir. Yirmi birinci yüzyıl başında ise tedavi başarısızlığının moleküler sebepleri, kemoterapiye direnç mekanizmaları, antiöstrojenler, anjiyogenez, invazyon ve metastaz hakkında ciddi veriler ve yeni tedavi başarıları elde edilmiştir [5].

2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türü olup, her yıl dünyada 1 milyon yeni olguya tanı konmaktadır [6]. Kadınlarda görülen yeni kanser olgularının yaklaşık %20’sini oluşturur. Meme kanseri sıklığı ülkeler arasında farklılık göstermekte ve bu fark özellikle menopoz sonrası kadınlarda daha belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri 50 yaşına kadar yaş artışına paralel olarak doğrusal eğimle yükseliş gösterirken daha sonra bu artış oranı azalır. Meme kanseri

görülme sıklığı 1973'den itibaren dünyanın çeşitli ülkelerinde %1-2 oranında bir artış göstermektedir. 1950'den beri bir yandan meme kanser insidansı artarken diğer yandan bu artışa paralel olarak mortalite oranı da artmış ve kadınlarda kansere bağlı ölümler %18'e ulaşmıştır. İnsanlarda genel olarak meme kanserine bağlı ölümler, akciğer kanseri ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır. Kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri ile yaş grupları arasındaki ilişki araştırıldığında 40-44 yaş arasında meme kanserinin birinci sırayı aldığı görülmektedir. Görülme sıklığı yanında mortalite de yaşa bağlı olarak artmakta; 60 yaşındaki 25 kadından 1'i ve 80 yaşındaki 10 kadından 1'i meme kanserinden ölmektedir [6].

2.2.2. Meme Kanserinin Oluşumu

Hücresel düzeyde kanserin gelişimi çok basamaklı bir olaydır. Klinik ve histopatolojik olarak meme kanserinde tümörün oluşumundan metastaza kadar çeşitli basamaklar tanımlanmıştır:

1. Klonal Orjin: Birinci basamak tümörün başlaması olup nedeni tek bir hücrenin anormal bölünmesine sebep olan genetik değişikliktir. Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğar. Bazı kanserler birden fazla sayıda malign klonlardan doğar. Bu klonlar ya dokunun birden fazla hücrelerinin karsinojene maruz kalmasıyla oluşan bir saha hasarı sonucu ya da bazı genlerdeki kalıtsal hasarlar sonucu oluşurlar. Hücre bölünmesi daha sonra klonal olarak türemiş tümör hücre popülasyonunun artmasına sebep olur.

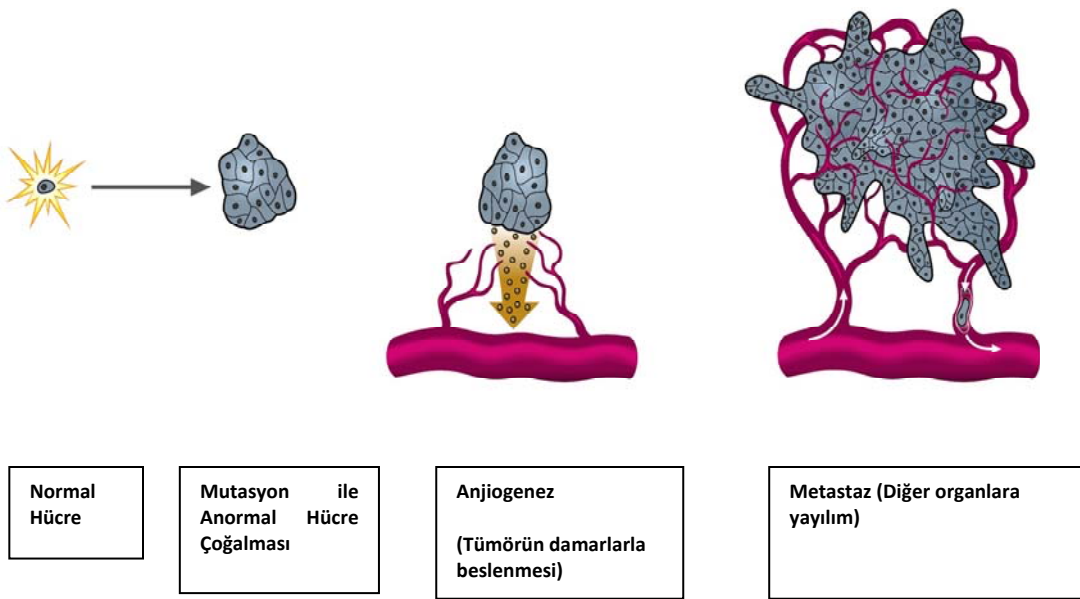
2. Ölümsüzlük: İkinci basamak, klinik olarak yüksek meme kanseri riskini işaret eden atipik hücre proliferasyonuna geçiştir. Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler ve çok sayıda hücre oluştururlar. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerin kısalmasıdır. Hücre farklılaşırken, çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim normal olarak hücreler farklılaşırken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe azalır. Tamamıyla farklılaşmış bir hücre istirahat durumuna girer ve sonunda ölür. Oysa birçok kanser tipinde telomeraz enzimi etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuçta telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır ve ölümsüz hale gelir.

3. Genomik Kararsızlık: Bu durum, DNA tamirindeki ve DNA hatalarını tanımadaki eksikliklerden dolayı ortaya çıkar ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açar. Kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt veren klonlar oluştururlar. Bu klonların ayrıca yabancı ortamlarda yaşama yeteneği de gittikçe artar ve böylece metastaz yaparlar.

4. Kontakt İnhibisyonun Kaybı: Normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde doldurduklarında bölünme özelliklerini kaybederler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını ihtiva etse bile bölünmezler. Kanser hücreleri ise substratuma yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye devam edebilirler. Hatta birden fazla tabaka oluşsa bile büyümeye devam edebilirler.

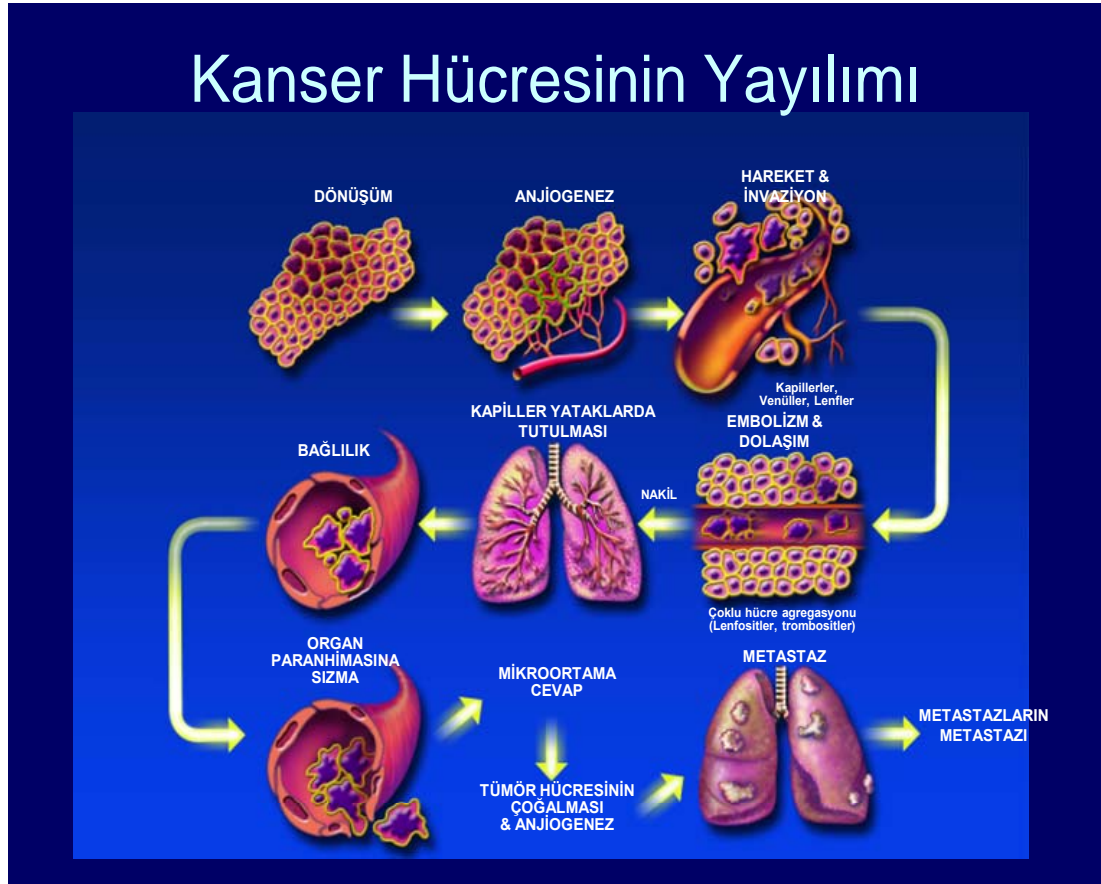
5. İn situ Karsinom: Bir sonraki basamak malignansinin sitolojik özelliklerini gösteren ancak stromal invazyonun henüz gözlenmediği in situ karsinom'un gelişimidir.

6. İnvaziv Karsinom: Daha sonra hücrelerin artışıyla stromal invazyonun gerçekleşmesi sonucu invaziv tümör oluşur. Kan ve lenf kanalları aracılığıyla bu hücrelerin yayılması da metastaza neden olur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Kanser Oluşumu

6. Metastaz. Benign tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücre proteinlerinin kaybı ya da anormalliklerinden, hücreler arası interaksiyonun bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metalloproteaz gibi bazı enzimlerle (kolejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir (Şekil 2.5) [7].



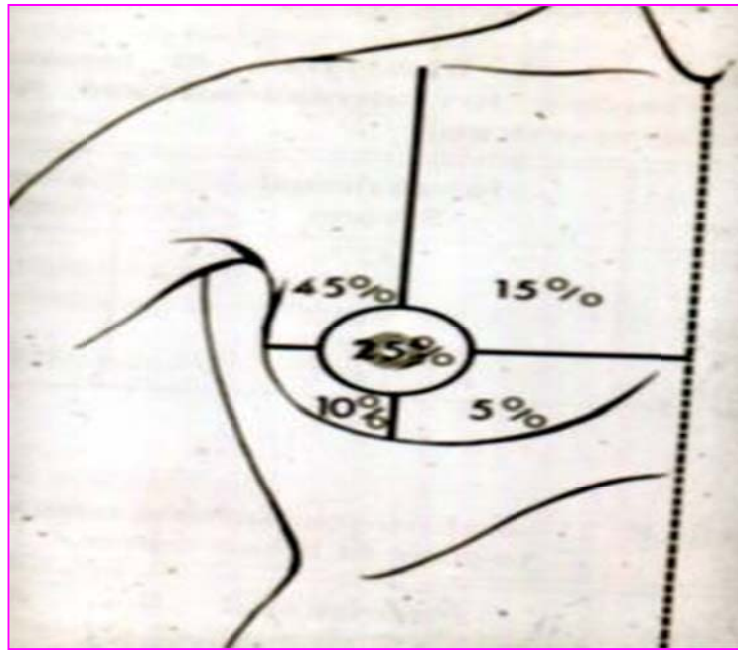
Şekil 2.5: Kanser Hücrelerinin Yayılımı

Her basamakta, hücreye kanser hücresi olma yolunda özellikler kazandıran önemli genetik olayların gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu değişiklikler sonucu tümör oluşumuna ya da ilerlemesine neden olan genlerin ekspresyonunda ya da gen ürünlerinin fonksiyonunda değişiklik meydana gelebilir [3]. Reseptörlerin veya sinyal aktarıcı proteinlerin mutasyonları veya aşırı üretimleri hücrelerin büyüme faktörlerinden veya diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine ve böylece kontrolsüz hücre bölünmesine yol açarlar. Bu gen anormallikleri genellikle dominanttır. Kısaca anormal hücre ile hibritlenen bir normal hücre fenotipik olarak malign hale gelir. Tümör baskılayıcı genlerdeki herhangi bir anormallik neticesinde

organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Tümör baskılayıcı genler arasında en önemli olanı p53 genidir. Bu genin ürünü olan p53 proteini birçok kompleks aktivitesi olan ve hücre siklusunu baskılayan bir proteindir. Bu protein DNA hasarlarını saptar ve hücreleri G1 fazında durdurur, böylece hücrenin S fazına girişini önler. Ardından ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apoptozise yol açan proteinleri indükler. p53 geninde meydana gelen bir mutasyon sonucu bu genin baskılayıcı etkisi görülmez ve hücreler bölünmeyi sürdürür [7].

2.2.3. Meme Kanserinin Morfolojisi

Meme kanseri çok fazla morfolojik özellikler sergileyebilen heterojen bir hastalıktır [4]. Meme kanseri sol memede sağ memeye göre daha sık görülür. Hastaların %4'ünde iki taraflı birincil tümörler vardır ya da sonradan ikinci bir primer tümör gelişir. Meme içinde tümör en sık üst dış kadranda yerleşir (Şekil 2.6). Çoğu kanserler (%90) duktus epitelinden, geri kalan küçük bir kısmı ise lobül epitelinden köken alır [6].



Şekil 2.6: Meme Kanserinin Kadranlara Göre Görülme Sıklığı

2.2.4. Meme Kanserinin Patolojik Olarak Sınıflandırılması

Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. İn situ karsinomda habis epitelial hücreler bazal membranla

çevrili iken, invaziv (infiltratif) karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedirler. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenfatik ve kan damarlarını geçerek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir. En sık rastlanan duktal karsinoma, memenin süt kanallarında başlar. Meme kanseri metastazında koltuk altındaki lenfatik nodüller en sık görülen yayılım yerleridir. Kanser hücrelerinin en sık yayıldığı yerler; memenin diğer lenf nodları, kemik, karaciğer ve akciğerdir. Erken evrede bir tümörün, meme içinde henüz olduğu yerle sınırlı olması in situ veya noninvaziv olarak tanımlanır. Benzer bir yaklaşımla, tümörün memenin başka kısımlarına yayılması ise invaziv veya infiltratif olarak isimlendirilir [8].

2.2.4.1. İnvaziv meme kanseri

İnvaziv meme kanseri meme kanserleri 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 organlara yayılmasını olanaklı kılmaktadır [8].

2.2.4.2. İnvaziv olmayan (Karsinom in-situ) meme kanseri

“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. Karsinom in situnun kanser öncesi bir durum olduğu düşünülmektedir; daha ciddi invaziv bir kansere çevrilebilmekte ya da bu yöndeki riski arttırabilmektedir [8].

2.2.5. Kalıtsal ve Sporadik Meme Kanseri

Kanser, esas olarak genetik ve çevresel bir çok etkenin etkileşimiyle ortaya çıkan multifaktöryel etyolojili bir hastalıktır. Dolayısıyla ailesel kümelenme görülse bile mendelyan kalıtım paterni (otozomal dominant, otozomal resesif gibi) çoğu kez saptanamaz. Ancak, bütün kanser olgularının yaklaşık %5-10 kadarının kalıtsal olduğu gözlenmiştir [9]. Meme kanseri oluşumuna birçok gen karışır ancak kalıtsal meme kanserlerinden sorumlu olarak, özellikle genom devamlılığının

koruyuculuğunda iş gören proteinleri üreten bazı genlerin germ hücrelerindeki mutasyonları gösterilmiştir [10]. Ancak kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleriyle gelecek nesillere aktarılamaz (sporadik kanserler) [3].

Kalıtsal meme kanserinin aksine sporadik meme kanserine yüksek sıklıkta (%70-80) rastlanmaktadır [10]. Sporadik kanserlerle yapılan çalışmalarda en çok üzerinde durulan nokta kanser oluşumunda eksojen ve endojen karsinojenler ve bunların sebep olduğu genetik değişikliklerdir. Kanser gelişimine katkıda bulunan bir diğer özellik ise düşük penetranslı genlerdeki polimorfizmler ve mutasyonlara bağlı olarak oluşan genetik değişikliklerdir. Örneğin, östrojen biyosentezi ve metabolizmasında rol alan genler, meme kanserinin gelişimi için, düşük penetranslı kansere yatkınlık genleridir. Bu genlerde meydana gelen polimorfizmler, tıbbi ve yaşamsal faktörlerle birlikte sporadik meme kanseri için yüksek risk oluşturmaktadırlar [3].

2.2.5.1. Kalıtsal meme kanseri

Nesilden nesile aktarılan ve az sıklıkta görülen kanser türüdür. Kalıtsal meme kanserlerinde en sık rastlanan; kalıtsal meme kanseri oluşumunda etkili iki tümör baskılayıcı gen olan *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları, kalıtsal meme kanseri vakalarının çok büyük bir kısmının nedeni olmalarına rağmen, toplam meme kanseri vakalarının sadece %5'inden sorumludur. *BRCA1* ve *BRCA2* kalıtsal meme kanserinin oluşumunda etkili en önemli iki tümör süpresör genidir. *BRCA1* olarak adlandırılan gen kalıtsal meme kanserinde rol oynadığı tespit edilen ilk genidir. *BRCA1*'deki mutasyonlar, meme kanserine yatkınlık ile ilişkilidir ve bu yatkınlık otozomal dominant olarak kalıtılır. *BRCA1* geninde, proteininin fonksiyon kaybına neden olan çok fazla sayıda mutasyon tanımlanmıştır. Mutant bir *BRCA1* geni taşıyan kadında meme kanseri gelişme riski yüksektir [3].

2.2.5.2. Sporadik meme kanseri

Kalıtsal meme kanserinin aksine yüksek sıklıkta görülen sporadik meme kanserinde, mutasyon somatik hücrelerde meydana gelir, bu kişilerde ve ailelerinde kanser riskinin görülme olasılığı ailesel değil, tıbbi, yaşamsal ve çevresel faktörlerin etkisi altındadır. Kadınlarda görülen sporadik meme kanserinin bilinen başlıca risk faktörleri, östrojen seviyesindeki artış ya da östrojene uzun süre maruz kalma ile ilişkilidir. Östrojen biyosentezinde (*CYP17*, *CYP19*, *17β-HSD*) ve östrojenin

metabolitlerine ve ürünlerine dönüşümünde (*COMT*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *GSTT1*) rol alan polimorfik genler, meme kanserine bireysel yatkınlıkla yakından ilişkilidir [3].

2.2.6. Meme Kanserinde Etiyoloji

Meme kanserlerinin 1/4'ü kalıtsal nedenlere bağlı iken 3/4'ü maruz kalınan biyolojik ve çevresel faktörlere bağlıdır [11]. Meme kanserine neden olan faktörler arasında östrojene maruz kalma süresi, iyonize radyasyona maruz kalma, hareketsiz yaşam tarzı, yüksek miktarda yağ içeren besinlerle beslenme, alkol ve sigara tüketimi ve genetik yatkınlık (BRCA1, BRCA2 ve diğer genlere bağlı olan yatkınlık) sayılabilir [11].

2.2.6.1. Değiştirilemeyen risk faktörleri

2.2.6.1.1. Yaş

Yaşla birlikte meme kanseri riskinin yükseldiği ve menopoz dönemine kadar her 10 yılda ikiye katlandığı daha sonra ise dramatik bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. Akciğer kanseri ile karşılaştırıldığında genç yasta görülme sıklığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [12].

2.2.6.1.2. Boy ve kilo

Postmenopozal dönemdeki kadınlarda obezitenin meme kanseri riskini iki kat arttırdığı, bununla birlikte premenopozal dönemdeki kadınlar arasında ise bu insidansın azaldığı gösterilmiştir [1]. Memenin büyüklüğünü genellikle glandular dokuyu saran yağ miktarı belirlemektedir. Büyük hacimli memelerde kanser gelişiminin fazla olduğuna yönelik yaygın bir görüş bulunmasına rağmen, meme boyutu ve kanser riski arasında net bir ilişki bulunamamıştır. Bunun yanında proliferatif hastalığı ya da ailede meme kanseri hikayesi olan kadınlarda, meme boyutu ile kanser riski arasında ilişki olduğu da saptanmıştır [1].

2.2.6.1.3. Coğrafik varyasyon

Batı ülkeleri ile uzak doğu ülkeleri arasında meme kanseri görülme sıklığı birbirinden oldukça farklıdır ve bu fark gittikçe azalmaktadır. Japonya'dan Hawai'ye göç eden göçmenlerle yapılan çalışmalarda, göçmenlerin meme kanseri oranının bir veya iki jenerasyon sonra göç ettikleri yerlerin oranına yaklaştığı görülmüştür. Bu da

çevresel faktörlerin genetik faktörlere göre oldukça önemli olduğunu düşündürmektedir [12].

2.2.6.1.4. Menarş ve menopoz yaşı

Menstruasyona erken başlayan veya menopoza geç giren kadınlarda meme kanseri riskinin yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ellibeş yaşından sonra doğal bir menopoz geçiren kadınların, 45 yaşından önce menopoz tecrübesi geçiren kadınlara göre neredeyse iki kat meme kanseri gelişim riski taşıdığı bildirilmiştir [12].

2.2.6.2. Çevresel faktörler

2.2.6.2.1. Radyasyon

İyonizan radyasyona maruz kalmanın da meme kanser riskini artırdığı bulunmuştur [2]. İyonize radyasyonun bayan uçuş görevlileri, hemşireler, kimyacılar ve yalıtım işçilerinde meme kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir [12]. İkinci Dünya savaşı süresince radyasyona maruz kalmış genç kızlarda meme kanseri açısından artmış bir risk gözlemlenmiştir [12].

2.2.6.2.2. Diyet

İnsanların aldığı günlük besinler çok çeşitli doğal karsinojenler ve anti-karsinojenleri içermektedir. Bu bileşiklerin birçoğu DNA hasarına neden olan oksijen radikalleri oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle aşırı yağ kullanımı özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin alınımı meme kanser riskini arttırmaktadır [6]. Popülasyonlarda günlük yağ alımı ve meme kanseri insidansı arasında yakın bir korelasyon olsa da, meme kanseri ve yağ alımı arasındaki ilişki tam olarak güçlü ya da tutarlı değildir [12].

Doğal antioksidan kaynağı olan vitamin ve sebzelerin kullanımının meme kanser riskini azalttığı gösterilmiştir [6]. Askorbik asit, α -tokoferol ve karotenoidleri içeren antioksidan besinlerin yüksek tüketimi ile ters ilişkilendirilmesi kadar, meyve ve sebze alımı ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi destekleyen nispeten tutarlı bilgiler de vardır. Bu besinlerin prooksidan hücre aktivitesi ve antioksidan savunmaları arasındaki dengeyi değiştirerek oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini etkilediğine dair bir hipotez vardır. ROS'lar normal hücre solunumu, hücre stresi ve inflamasyonu sonucu üretilmektedir [6]. Toksik ajanlardan etkilenim veya patolojik süreçte savunma mekanizmasındaki yetersizlik ROS'un

yoğun üretimine neden olduğundan oksidatif stres oluşabilmektedir. Lipit peroksidasyon, protein değişikliği, membran hasarı ve mitokondrial hasar kırılmalarına kadar varan DNA hasarı ile sonuçlanmaktadır [6]. Karotenoidlerden A vitamini hücre farklılaşmasında regülatör olarak rol oynadığı için hücrelerin malign forma geçişini önleyebilir. Retinol in vitro koşullarda insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini önlemiştir [6]. Diyetle alınan α - tokoferol lipid peroksidasyona karşı korur ve steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir. Ancak; Vitamin C ve E'nin artmış lipid peroksidasyon ve serbest radikallere karşı savunmada yetersiz kaldığı belirtilmiştir [6].

2.2.6.2.3. Alkol

Bazı çalışmalarda alkol tüketimiyle meme kanseri insidansı arasında bir bağlantı olabileceği öne sürülmektedir. Örneğin yüksek oranda alkol kullanan kadınlarla yapılan bir çalışmada alkol alımının meme kanseri riskini %15 arttırabileceği bildirilmiştir [12].

Alkol kullanımının özellikle yetişkinlik çağının erken dönemlerinde zararlı olduğu gösterilmiştir [6]. Alkolün karsinojenik etkisinin mekanizması tam anlaşılamamıştır. Ancak alkol kullanan kadınlarda östrojen seviyesinin arttığını bildiren görüşler vardır. Bununla birlikte meme kanseri insidansı ile alkol tüketimi arasındaki bu bağlantının tam tutarlı olmadığı ve bu bağlantının alkolden başka diğer diyet faktörlerinden de kaynaklanabileceği öne sürülmektedir [12].

2.2.6.2.4. Sigara

Sigara kullanımının meme kanseri etiyolojisindeki önemi tartışmalı bir konu olsa da, meme kanseri riski ile sigara kullanımı arasında çok zayıf bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir [12]. Sigara ve meme kanserine yatkınlık üzerine yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Meme kanserinin gelişme riskinin sigara içiciliği ile ilişkisinin zayıf olduğu bilinmektedir. İstatistiksel olarak önemli etkileriye; erken yaşlarda başlayanlarda, aşırı kullananlarda ve pasif içicilerde gözlenmiştir. Öte yandan tütün dumanında bulunan bazı ajanlar antiöstrojenik etkilere sahiptirler. Örneğin; nikotinin *CYP19* enzimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir ki bu enzim normal meme epitelyum hücrelerinin farklılaşma ve çoğalmasının düzenlenmesinde rol alan östrojen hormonunun biyosentezinde, C19 androjenlerinin C18 östrojenlerine dönüşümünü katalizleyen sitokrom P450 aromataz enzimini

kodlar ve bu enzim östrojen biyosentezinde son basamaklarda rol oynar [6]. Bu nedenle sigara kullananlarda menopoz kullanmayanlara göre daha erken yaşlarda gerçekleşmektedir. Sigara katranı 3000'den fazla bileşik içermektedir. Bunların 30 tanesinin karsinojen olduğu bilinmektedir.

Sigara dumanındaki en önemli karsinojenler; polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aril aminler, heterosiklik aromatik aminler (HAA) ve N-nitrosaminlerdir [10,13]. Sigara dumanı ile vücuda alınan PAH'lar ilk evrede: Sitokrom P4501A1 (*CYP1A1*), ikinci evrede ise Glutasyon S transferaz (GST) enzimleri tarafından detoksifiye edilerek suda çözünebilir türevlerine dönüştürülür. PAH'lar meme hücreleri için mutajenik etkiye sahiptirler ve lipofilik bileşikleri memeyi de içeren adipoz dokularda depo edilir. Bu nedenle, PAH-DNA hasarı normal meme dokusunda meme kanserli dokuda belirlenmiştir [6].

2.2.6.3. Reprodüktif faktörler

Meme kanseri gelişiminde risk faktörlerinden birisi de, intrauterin hayat dahil olmak üzere kadının uzun süre östrojen gibi üreme hormonlarına maruz kalmasıdır [14]. Menarşın ileri yaşta başlaması, doğurganlık sayısının yüksekliği ve menopoz meme kanseri riskini azaltmaktadır.

İlk doğum yaşı ile meme kanseri gelişme riski arasında da ilişki gözlenmiştir. Örneğin ilk canlı doğumunu 30 yaşından sonra yapmış bir kadında meme kanseri gelişme riski, ilk doğumunu 18 yaş ve öncesinde yapmış bir kadına göre 2-5 kat daha fazla saptanmıştır [15].

Postmenopozal dönemde hormon tedavisi kullananlarda kullanmayanlara göre meme kanseri riski artmaktadır. Özellikle ailede meme kanseri öyküsü olan kadınlarda oral kontraseptif kullanımı, meme kanseri riskini arttırmaktadır [16].

2.2.7. Meme Kanseri Evrelemesi

Meme kanseri evrelemesi hem patolojik hem de klinik bulgulara göre yapılabilmektedir. Ancak, en sık kullanılan evreleme yöntemi "American Joint Committee on Cancer" (AJCC) kuruluşunun önerdiği evreleme sistemidir. Bu sistemde TNM evrelemesi kullanılmaktadır (T; Tümör, N; Lenf nodu, M; Metastaz).

Memenin medüller kanseri hariç, tüm invaziv meme kanserlerinde histolojik grad belirtilmelidir. Histolojik grad için önerilen yöntem, “Elston-Ellis modification of Scharff-Bloom-Richardson grading system” yöntemidir [17]. Meme kanseri evresi tümörün tubul formasyonu, nükleer polimorfizm ve mitoz sayısı gibi morfolojik özelliklerine göre yapılır.

2.2.8. Prognostik Faktörler

Meme kanserinin ileri dönemlerinde sistemik hastalık gelişim riski için en önemli gösterge, **lenf nodu tutulumunun sayısı**dır [18]. Lenf nodu metastazı bölgesel lenf nodlarında metastaz geliştiğini gösterir. Hastalık seyri hakkında önemli ikinci faktör ise **tümör boyutudur**. Prognostik göstergelerden üçüncüsü tümörün **histolojik gradıdır**. Grad 1 meme kanserlerinde, genellikle uzak metastaz ve meme kanserine bağlı ölüm olayı düşük oranda beklenir.

Hastanın yaşı da bağımsız bir prognostik faktördür. Çok genç yaştaki meme kanseri hastalarında prognoz, yaşlı hastalara göre daha kötüdür.

Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu meme kanseri tedavi planlamasında en önemli prediktif faktörlerdir. ER ve PR ekspresyonu olmayan invaziv meme kanserleri hormonal tedavilere yanıt vermezler. ER ve PR pozitifliği hormonal tedaviye yanıtın en önemli belirleyici faktörüdür.

HER2/neu durumu: *HER2*, “epidermal growth factor receptor” (*EGFR*) ailesinin bir üyesidir ve bu aile *HER1*, *HER2*, *HER3* ve *HER4*’den oluşur. *HER2* geni 17q21’de yerleşiktir ve aktivasyonu ile 185-kD transmembran glikoprotein sentezi olur ve bu glikoproteinin intrasellüler kısmını tirozin kinaz oluşturur. Bu glikoproteinin aktivasyonu ile tirozin kinaz yolağı aktive olur ve hücre içi sinyal ileti yolları üzerinden hücre proliferasyonuna sebep olur. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20’sinde *HER2* gen amplifikasyonu vardır ve transmembran glikoproteinin aşırı ekspresyonuna yol açar. *HER2* amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, yüksek tümör gradı, ER negatifliği, artmış tümör proliferasyon oranı ve kötü prognoz ile ilişkilidir [19].

Lenfovasküler İnvazyon: Lenfatik damar invazyonu, lenf nodu metastazı ile ilişkilidir. Lenfovasküler invazyon, hem lenf nodu tutulumu pozitif hem de lenf nodu tutulumu negatif meme kanserli hastalar için bağımsız bir prognostik faktördür [20].

Proliferasyon Oranı: Çok sayıda çalışmada, ploidi (tümör hücresindeki DNA miktarı), S fazındaki tümör hücresi sayısı, tümör hücrelerinin mitotik indeksi vb. tümör proliferasyon indeksleri ile prognoz ve tedaviye yanıt arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çoğu çalışmada ploidi ile prognoz arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır, ancak S fazındaki artmış tümör hücresi sayısı ile azalmış yaşam süresi arasındaki ilişki gösterilmiştir [21]. Yüksek proliferasyon göstergeleri ile yüksek tümör gradı, genç yaş, ER/PR ekspresyon negatifliği ve *HER2* pozitifliği arasında güçlü şekilde ilişki saptanmıştır [21].

Plazminojen aktivatör sistem: Urokinaz plazminojen aktivatör (*u-PA*) ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (*PAI-1*) konsantrasyonlarının güçlü birer prognostik faktör oldukları gösterilmiştir [22].

Diğer prognostik faktörler: Meme kanserinde bunlar dışında, başka prognostik ve prediktif faktörler de değerlendirilmiştir. Tümör dokusundaki kapiller damarlar sayılarak tümör anjiyogenezi değerlendirilmiş ve yüksek tümör anjiyogenezi olan hastalarda, düşük tümör anjiyogenezi olan hastalara göre daha yüksek oranda nüks ettiği gözlenmiştir.

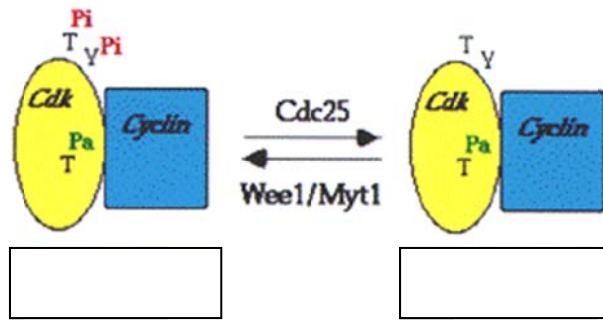
Malignitelere *p53* gen mutasyonuna sıklıkla rastlanır ve yapılan çalışmalarla *p53* gen mutasyonunun da prognostik ve prediktif faktör olarak kullanılabileceği belirtilmektedir [23]. Bunun yanında bir çalışmada, siklin D1'in Western Blot yöntemi ile ölçülen düşük molekül ağırlıklı formunun artmış ekspresyonu ile nüksüz sağkalım ve genel sağkalım oranlarının düştüğü bildirilmiştir [23].

Meme kanserli hastalarda kemik iliğindeki mikrometastazlar immünohistokimyasal çalışma (IHC) yöntemi ile değerlendirilmiş ve prognostik önemi araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada, evre 1-3 meme kanserli 552 hastanın kemik iliği biyopsi materyalleri sitokeratin ile değerlendirilmiş ve hastaların %32'sinde kemik iliğinde mikrometastazlar saptanmıştır (kontrol grubunda %1) [24].

2.3. CDC25 Fosfatazlar (Cell Division Cycle 25)

Ökaryotik hücre döngüsü G1, S, G2 ve M olarak isimlendirilen dört ayrı hücre siklus fazının birbirini takip etmesi neticesinde gerçekleşir. Bu fazlar çeşitli fosforilasyon ve defosforilasyon olaylarıyla düzenlenmektedir. Hücre siklusu boyunca süren fosforilasyon olayları uygun siklin moleküllerinin (cdc) bağlanmasıyla ve korunmuş

bir treonin rezidüsünde (Thr 160) Cdk-aktive edici kinazların stimülatör fosforilasyonu ile pozitif olarak regüle edilen siklin-bağımlı kinazlar (Cdks) tarafından gerçekleştirir. Cdkların negatif regülasyonu çok komplikedir ve geniş aralıklı cdc-Cdk kompleks inhibitörleri *p21*, *p27* ve *p57* ve Cdk4/Cdk6 inhibitörleri *p15*, *p16* ve *p18* gibi Cdk inhibitörleriyle gerçekleştirir. WEE1/MİK1 protein kinazlar tarafından Cdkların ATP bağlanma bölgelerinin yakınında korunmuş treonin ve tirozin rezidülerinin (Thr14 ve Tyr15) inhibitör fosforilasyonu da Cdkların negatif regülasyonu için önemlidir. Cdk'ların defosforilasyonu için yalnız bir tip fosfataz bulunmuştur: *CDC25* fosfataz ailesi (Şekil 2.7) [25].



Şekil 2.7: *CDC25* Fosfatazlar Tarafından Cdkların Aktivasyonu

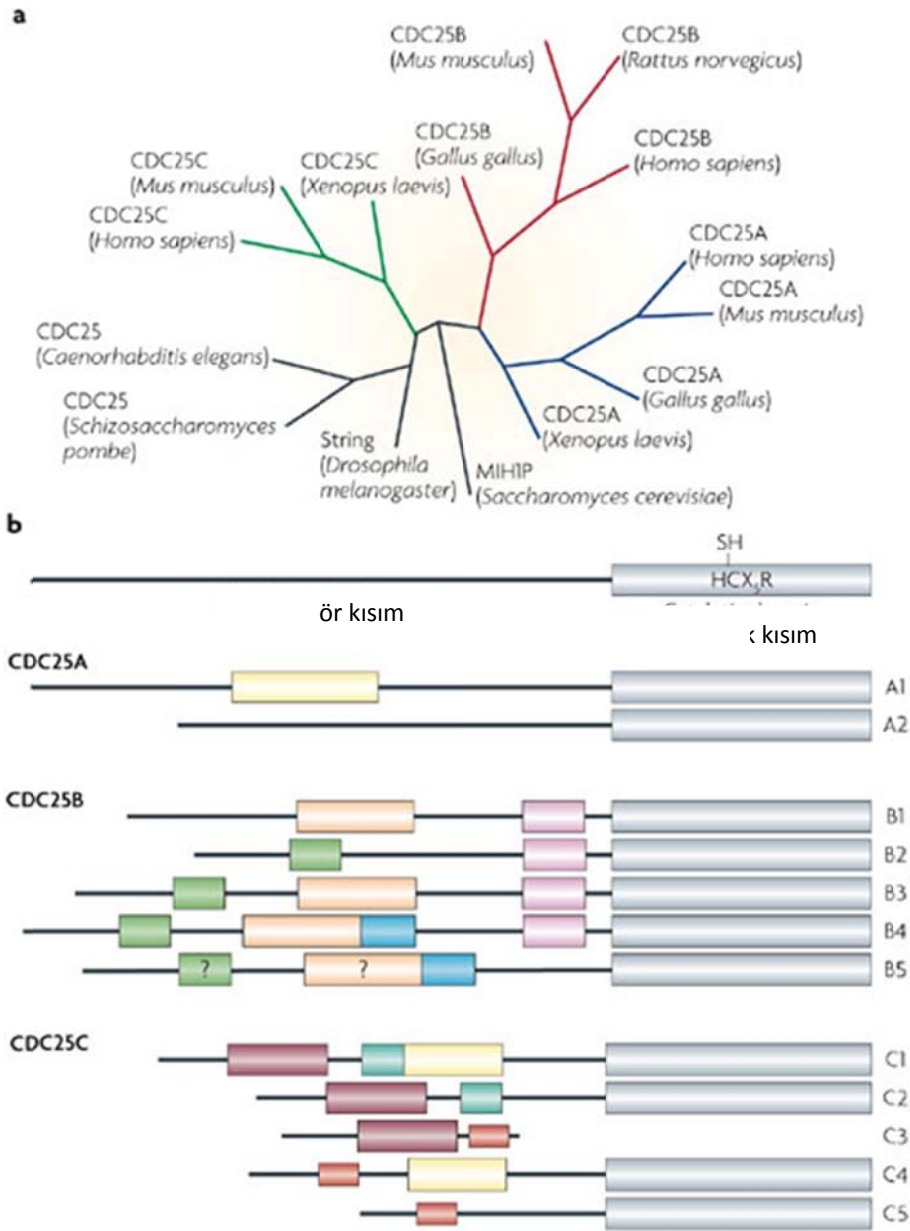
Bu aile Cdk'ların ATP bağlanma bölgesindeki treonin14 ve tirozin15 rezidülerini defosforile ederek aktive olmalarını ve hücre siklusunun ilerlemesini sağlar. *CDC25*'ler Cdk aktive edici fosfatazların bir ailesidir [26].

2.3.1. *CDC25* Kristal Yapısı

CDC25 çift özgülüklü protein tirozin fosfatazdır (dsPTPase). *CDC25*'lerin katalitik bölgesinin kristal yapısı bu proteinin tanımlanmış diğer fosfatazlarla aynı topolojiye sahip olmadığını gösterir fakat bir sülfür transfer proteini olan Rhodanazlarla çok benzerdir [27].

2.3.2. Hücre Siklusunu Kontrolünde *CDC25* Fosfatazlar

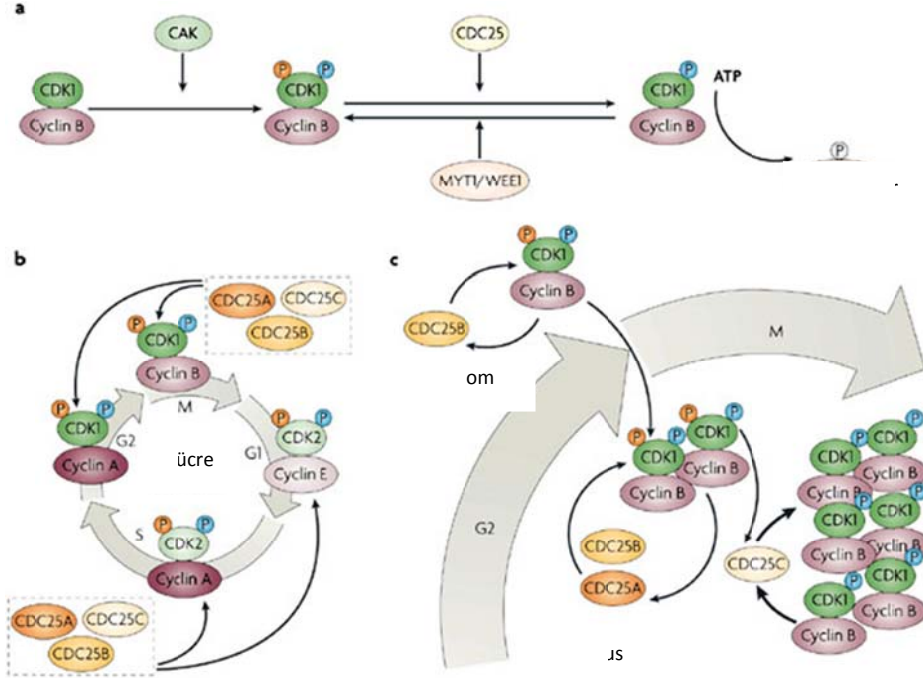
CDC25 protein ailesi hücre siklusunun ilerlemesinde regülatör olan Cdk komplekslerini aktive eden yüksek derecede korunmuş çift özgülü fosfatazlardır. Bitkiler dışında tüm ökaryotik organizmalarda bulunurlar. Memeli hücrelerinde üç izoformu tanımlanmıştır: *CDC25A*, *CDC25B* ve *CDC25C* (Şekil 2.8) [28].



Şekil 2.8: CDC25 Ailesinin Evrimsel Perspektifi

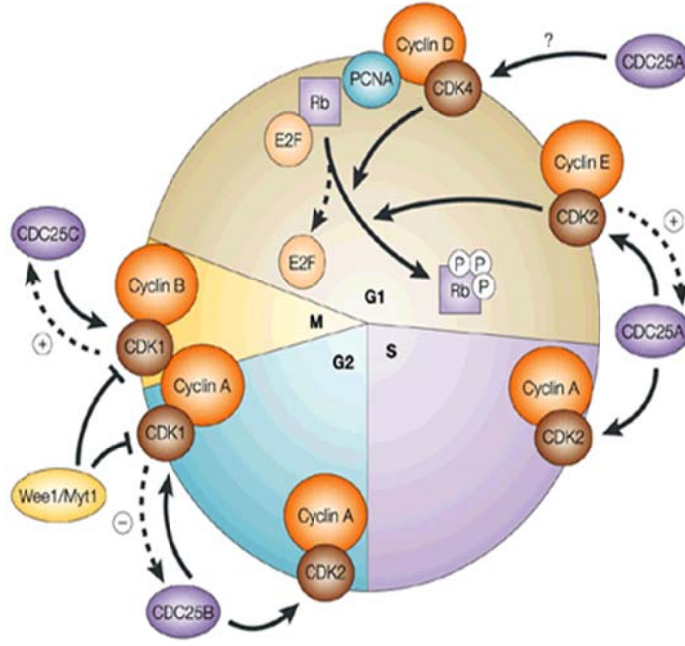
Bu üç izoformun her biri bir çeşit Cdk'yı defosforile edebilir, hücre siklusunun farklı zamanlarında eksprese edilir ve aktive olurlar ve farklı cyc-Cdk komplekslerini aktive etmek için planlanmışlardır [29]. Her biri Cdk1 ve Cdk2 aktivitelerini regüle ederek G1-S ve G2-M geçişlerinin kontrolünde görev alırlar [28]. Memeli hücre siklusunun CDC25 fosfatazlar tarafından düzenlenmesinin ilk modellerinde CDC25A'nın yalnızca G1-S fazı geçişinde görev alan erken regülatör protein olduğu, CDC25B ve CDC25C'nin ise yalnızca geç G2 ve mitozda aktif olduğu

düşünülmekteydi. Fakat son kanıtlar göstermiştir ki, üç CDC25 izoformu da G1-S ve G2-M geçişlerinde ve de mitozda esensiyal rollere sahiptirler (Şekil 2.9) [30].



Şekil 2.9: Hücre Siklusu Anahtar Geçiş Yolaklarında CDC25 Fosfatazlar

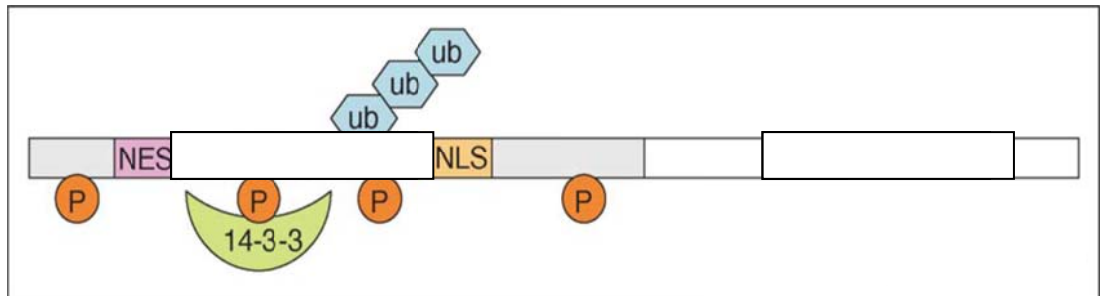
CDC25A esas olarak G1-S geçişi boyunca Cdk2-cycE ve Cdk2-cycA komplekslerini aktive eder fakat aynı zamanda kromozom kondensasyonunu başlattığı düşünülen Cdk1-cycB kompleksini aktive ederek G2-M geçişinde de rol oynar. DNA sentez aktivasyonunda yer alan Cdk2 kinaz cycA ya da cycE ile ilişki kurar ve bu bileşiğin aktivitesi S ve G2 fazları boyunca maksimumdur. Bu bileşik aktive olmadan önce Cdk2-cycA kompleksi CDC2'de bulunan bölgelere analog yerlerden fosfatlanır. CDC25C Cdk2'yi Thr14 ve Tyr15 bölgelerinden defosforiller ve böylece onun kinaz aktivitesini artırır [31]. Bu defosforilasyon Cdk aktivasyonu ve S fazı başlaması için gereklidir [29]. Bununla birlikte CDC25B ve CDC25C esasen mitoz giriş için gereklidir (Şekil 2.10) [28].



Şekil 2.10: G2-M Geçişinde CDC25B ve CDC25C'nin Etkin Rolü

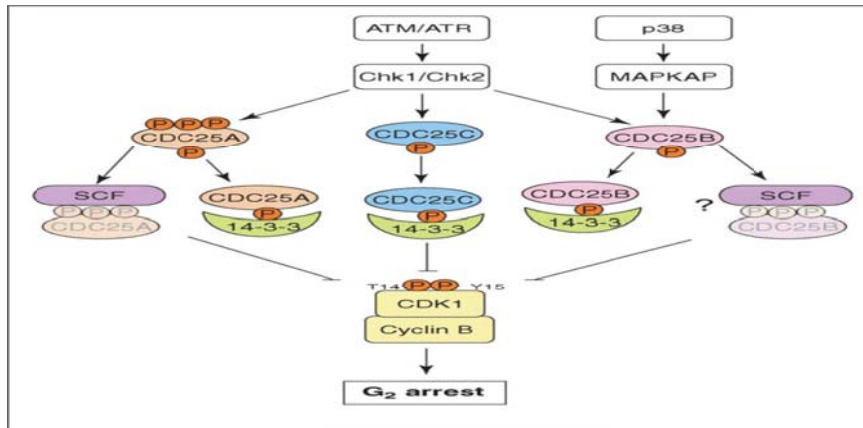
2.3.3.CDC25 Aktivitesinin Düzenlenmesi

CDC25 bir fosfoproteindir ve hücre siklusu boyunca fosforilasyonu zorunludur. CDC25 fosfatlar kendi substratları (Cdklar) tarafından fosfatlanırlar [32]. Her bir hücre siklus basamağında doğru Cdk-cyc aktivasyon seviyesini sağlamak için CDC25 fosfat aktivite hücresindeki bollukları, subelüler lokalizasyonları (kısmen 14-3-3 proteinine bağlanarak regüle edilir) ve fosforilasyon durumları gibi çoklu mekanizmalar tarafından sıkıca regüle edilir (Şekil 2.11) [30].



Şekil 2.11: CDC25 Fosfatların Regülasyon Şeması

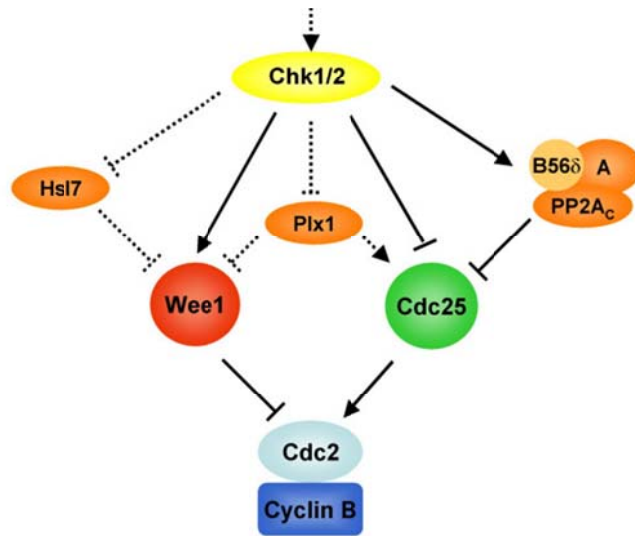
Cdk-cyc komplekslerinin yüksek yoğunluklu Ser/Thr-Pro motifleri olarak karakterize edilen N-terminal regülatör bölgelerinden fosforilasyonu CDC25 fosfatazların aktivitelerini regüle eder [28]. Oto-amplifikasyon ilmek mekanizması yaratan bu fosforilasyon cycE-Cdk2 bağımlıdır ve S fazına girecek hücreler için zorunludur [33]. Hücre siklus basamaklarında eksprese edilen CDC25 protein seviyeleri protein sentezi ve yıkımı arasındaki dengeye bağlıdır. CDC25C protein seviyesi normal hücre bölünmesi boyunca oldukça sabit kalırken CDC25A ve CDC25B seviyeleri hücre siklusunun basamaklarına bağlı olarak değişir [30]. CDC25B ve CDC25C fosfatazlar Cdk1-cycB kompleksinin fosforilasyonuna bağlı olarak aktive edilirler ve bu durum geri dönüşümsüz bir oto-amplifikasyon ilmeği meydana getirerek hücreleri mitozla sürükler. CDC25A için de benzer bir oto-amplifikasyon mekanizması Cdk2-cycE kompleksleri aracılığıyla G1-S geçişi için geçerlidir. Bu durumun aksine Chk1 fosfatlanmış CDC25A'nın Cdk1-cycB interaksyonunu engellemek için 14-3-3 bağlanma bölgesi yaratarak mitotik girişin uygun zamanlamasını kontrol eder. CDC25A çoğunlukla G1'de eksprese edilir ve Cdk1-cycB aracılı fosforilasyon boyunca mitozda sabit kalır. Mitozun sonunda APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) aracılı ubiquitinyasyon aracılığıyla yıkımına bağlı olarak hızla azalır. S ve G2 fazlarında ise CDC25A'nın yıkımından SCF kompleksi (Skp1/Cul1/F-box) sorumludur [28]. Buna ilaveten bu kompleks tarafından S fazında CDC25A'nın yıkımı Chk1/Chk2 ve başka bir bilinmeyen kinaz tarafından en az üç serin rezidüsünden fosfatlanmasını gerektirir ve bu yıkım işlemi DNA hasarına cevapta gelişir (Şekil 2.12) [30].



Şekil 2.12: DNA Hasarına Karşı G2/M Kontrol Noktasındaki Cevapta CDC25 İnaktivasyonu

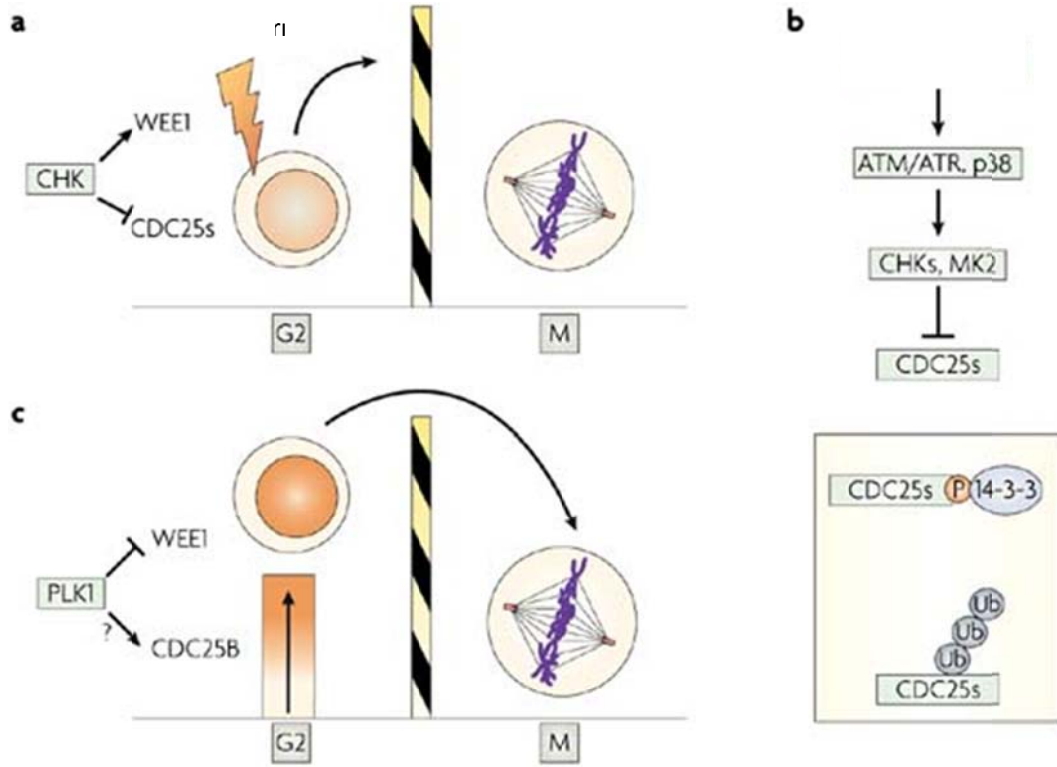
Esas olarak APC mitotik regülatörlerin fazlalığının kontrolünde görev alırken SCF ligazlar hücre siklusunun regülasyonunda ve sinyal transdüksiyonunda yer alan ubiquitilleyici proteinler tarafından yürütülen çok sayıda fizyolojik olayda sınırlayıcı fonksiyona sahiptir. Ubiquitilizasyon ve proteozomlar aracılığıyla bunu takip eden yıkım geriye dönüşümsüz bir mekanizma aracılığıyla protein fazlalığını düzenleme için esas mekanizma olarak görünmektedir [34].

DNA hasarı olduğu durumlarda aktive olan CDC25 fosfatazlar kontrol noktalarının anahtar bileşenleridir. Bütün hücreler potansiyel olarak DNA hasarına neden olabilen serbest O₂ radikalleri üretimi ya da UV radyasyon gibi stres faktörlerine sürekli maruz kalırlar. Genellikle hücre bu duruma hücre siklusunun durmasına neden olan ve hasarlı DNA'nın tamiri ya da programlanmış hücre ölümüne neden olan ilgili kontrol mekanizmasını aktive ederek cevap verir. DNA hasarına karşı cevapta G1-S veya G2-M geçişlerini ya da S fazını ilerlemesini durdurmak için çoklu kontrol noktası yolları aktive edilir. Başlangıç zararı ne olursa olsun net sonuç hücre siklusu ilerlemesini durdurmak için Cdk-cyc kompleksinin inhibisyonudur (Şekil 2.13) [28].



Şekil 2.13: DNA Hasarına Karşı Cdk-Cyc Kompleksinin İnhibisyonu

G2 regülasyonunun başlıca mekanizması mayalardan memelilere kadar yüksek derecede korunmuştur [13]. Memeli hücrelerinde G2-M kontrol noktası cevabı kompleksdir ve ATM (ataxia-telangiectasia mutated) ve ATR (ataxia-telangiectasia ve Rad-3 related) yolları ve çok yeni olan mitojen aktif protein kinaz p38 yolu gibi çok sayıda sinyal yolları tarafından yürütülür [30]. Tamamlanmamış DNA replikasyonu ya da iyonize radyasyon veya UV ışığının neden olduğu gibi DNA hasarı ATM (ataxia-telangiectasia mutated) ve ATR (ataxia-telangiectasia ve Rad-3 related) kinazlar aracılığıyla DNA hasar kontrol noktasını aktive eder. ATM özellikle çift zincir DNA kırıklarına cevapta aktive edilirken bazı fazlalıklar ve ATM ve ATR sinyal yolları arasında birliktelikler olmasına rağmen ATR'nin esasen tek zincirli DNA bölgelerinde aktive edildiği görülmektedir. ATM ve ATR kinazlar da kontrol noktası kinazları olan Chk1 ve Chk2'yi fosfatlar ve aktive eder (Şekil 2.14) [28].



Şekil 2.14: DNA Hasarına Karşı ATM/ATR Kinazların Chk1'i İnhibisyonu

CDC25 potansiyel olarak Chk1'in direk hedefidir ve spesifik bir serin rezidüsünden (Ser216) Chk1'in fosforilasyonu Cdc25'in 14-3-3 proteinine bağlanmasıyla sonuçlanır [32]. Üç CDC izoformu da hücre bölünmesi boyunca subselüler lokalizasyonlarında hızlı değişiklikler geçirirler ve bu NES (nuclear export signals) ve NLS (nuclear localisation sequence) varlığı tarafından olduğu gibi kısmen 14-3-3 aracılığıyla da olur. Chk1 ve/veya C-TAK1 tarafından her bir CDC25 proteininin spesifik bir serin rezidüsünün fosforilasyonu bir 14-3-3 bağlanma bölgesi yaratır. 14-3-3 bağlanmasının CDC25 aktivitesi üzerine çoklu inhibitör etkileri olmasına rağmen primer rolü CDC25 fosfatazları kendi substratlarından uzakta çökertmektir [30].

Chk1 ve Chk2 CDC25 fosfatazların inhibisyonu ve/veya yıkımına aracılık eder. Chk1 kimyasal olarak, UV veya iyonize radyasyonun indüklediği DNA hasarına cevap olarak CDC25A'nın yıkımı aracılığıyla S ve G2 fazlarının durmasına aracılık eder. CDC25 fosfatazların inhibisyonuna ilaveten Chk1 Cdk-cyc komplekslerinin inhibisyon desteğini iletirmek için Wee1 aktivitesini de artırır [28]. Bu Chk1 aracılı CDC25A'nın yıkımının hücre siklusunun durması ya da G1, S ve G2 fazlarında gecikmenin p53'ten bağımsız asıl mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizma hücre siklusu boyunca Cdkların aktiflenmesinde CDC25A'nın rolünü göstermektedir [35].

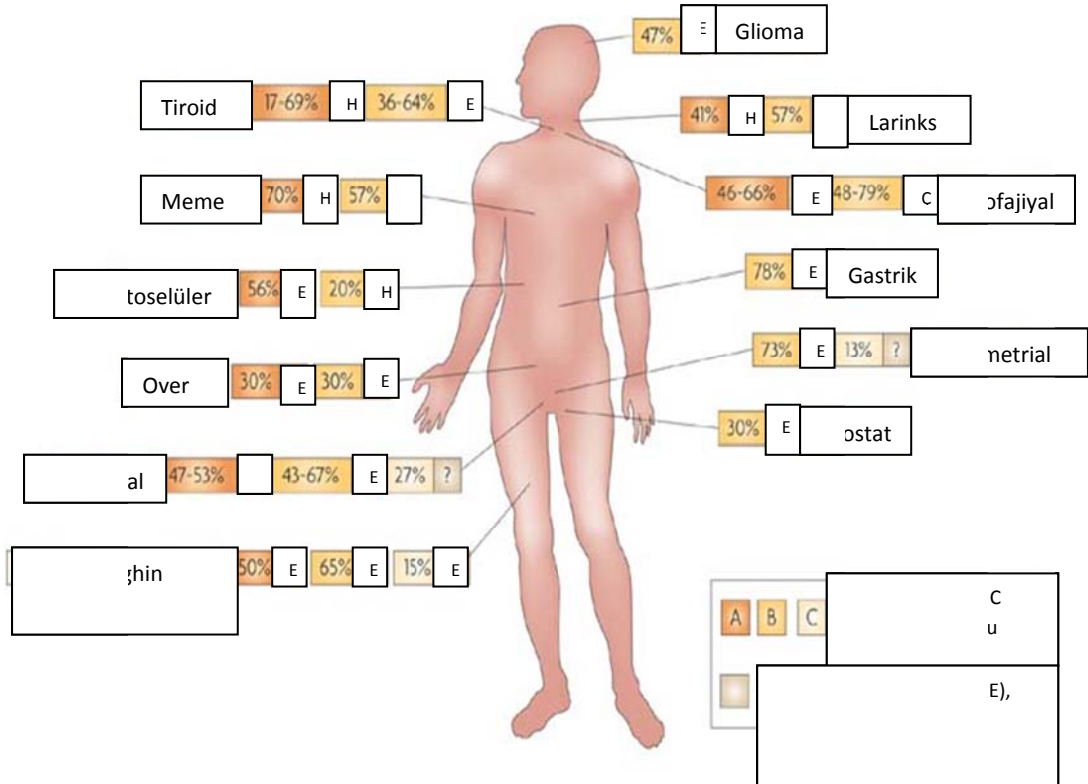
CDC25 fosfatazların aktiviteleri doğru bir Cdk-cyc aktivite seviyesinin korunmasını sağlamak için hem normal hücre bölünme siklusu hem de kontrol noktası aktivasyon cevabında yüksek derecede regüle edilir. Bu durum düzgün bir şekilde bölünme siklusu boyunca hücre çoğalmasını kontrol eder ve genomik kararlılığın korunmasını sağlar. Bu kontrol mekanizmalarından herhangi birinin yanlış regülasyonu genomik mutasyonların artışı ve böylece tumorigenezis katkıda bulunmayla sonuçlanır [28].

2.3.4.CDC25 Fosfatazlar ve Kanser

Hücre siklusundaki regülasyon kaybı kanserleşmedeki en önemli göstergedir. Hücre siklus mekanizmasının düzenleyici bileşenleri genellikle karsinogenez süresince genetik değişimlerin hedefleri olurlar. Cdklar hücre siklusunun başlamasında merkezi roller üstlenirler ve Cdkların kontrolsüz aktivasyonu kanser hücrelerini çoğalmaya itici güçtür. Cdk inhibitörlerinin down-regülasyonu gibi Cdkların ve siklinlerin aşırı ekspresyonu insan kanserlerinin çoğunda görülür [36-41]. Tümör başlangıcı süresince onkojenik hücre siklusunun ilerlemesi yüksek kapasitede toplam

Cdk aktivitesi ya da spesifik Cdk komplekslerinin gerekenden fazla olmayacak şekilde düzenlenmesini gerektirir. Cdk aktivasyonu sadece bir cdc alt ünitesiyle ilişkiye değil aynı zamanda katalitik alt ünitenin uygun fosforilasyonuna da bağlıdır. CDC25 fosfatazlar hücre siklusunda Cdk aktivasyon zamanlaması için kritiktir. Bu proteinlerin ekspresyon modelleri çoğunlukla çakışmaktadır ve her bir CDC25 proteinin fonksiyonu hakkındaki bilgiler sınırlıdır [35].

CDC25 fosfatazlar hücre farklılaşması, tümörjenez, kontrol noktası ve apoptoziste görev alır [27]. Hücrenin akıbetinin ne olacağı yönündeki rollerinden dolayı CDC25 fosfatazlar hücre bölünme siklusunu boyunca sıkıca regüle edilmelidirler. Ayrıca hücre siklusunun ilerlemesini durdurmak ve hücreye DNA tamiri ya da apoptozis için zaman tanımak amacıyla kontrol noktası aktivasyon cevabında CDC25 fosfatazlar inaktive edilmelidirler. Bu işlemlerden herhangi birinin yanlış düzenlenmesi genomik kararsızlıkla sonuçlanabilir. Bu durumla uygun olarak CDC25'lerin aşırı ekspresyonu pek çok insan kanserinde bildirilmiş ve aynı zamanda çok agresif hastalıklarla ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.15) [28].



Şekil 2.15: İnsan Kanserlerinde CDC25 Fosfatazların Aşırı Ekspresyonu

Ayrıca insan kanserlerinde sıklıkla değişime uğrayan en az iki onkogenin (Raf1 ve c-Myc) potansiyel hedefleridirler ve diğer onkogenlerle de işbirliği yaparlar. Böylece iyi niyetli (*bona fide*) proto-onkogenler olarak isimlendirilmişlerdir [27].

Kanserde CDC25 aşırı ekspresyonuyla ilgili ilk, en önemli ve en kritik tespit spesifik kanser alt tiplerinde CDC25 seviyesi ve ileri dereceli ve kötü prognozlu-az surveyli gibi spesifik patolojik özellikler arasında bir korelasyonun varlığıdır [28].

Tümörjenez süresince CDC25 izoformlarının bozulmuş regülasyon mekanizmaları halen net değildir. Kanserdeki bozulmuş CDC25 fosfataz aktivitelerinden sorumlu olabilecek gen amplifikasyonu ya da yeniden düzenlenmesi veya herhangi bir diğer genetik mutasyondan kaynaklanan CDC25 aşırı ekspresyonu için son zamanlarda bulunan bir kanıt yoktur. Ayrıca transkript ve protein seviyeleri arasındaki önemli korelasyon eksikliği CDC25 fosfatazların transkripsiyon ve translasyon arasındaki herhangi bir basamakta hatta post-transkripsiyonel seviyede bile yanlış düzenlenebileceğini göstermektedir. Her bir hücre siklus fazı arasındaki geçişler genomik kararlılığın korunması için yer zaman açısından sıkıca kontrol edilmelidir. CDC25A ya da CDC25B'nin aşırı ekspresyonu artan fosfataz aktivitesi eşliğinde hedef Cdk-cyc komplekslerinin aşırı aktivitesiyle sonuçlanabilir. Sonuç olarak hücreler hücre siklus geçişlerine zamansız itilirler ve genetik bozukluk meydana gelir. İnsan kanserleriyle yapılan son çalışmalar CDC25 aşırı ekspresyonunun büyük bir olasılıkla tümörjenik yolağın farklı basamaklarında oluşabileceğini ve hücre bölünme siklusunun bozulmuş regülasyonu ve/veya normal sinyal yollarındaki diğer onkogenlerle birliktelikten dolayı oluşan genomik kararsızlığın neden olduğu hastalıkların ilerleyişiyle ilişkili olabileceğini göstermiştir. CDC25 fosfatazlar mitojenik sinyal yolları ve hücre bölünme siklusu arasında direk bir bağlantı sağlanmasında hücre farklılaşmasını kolaylaştırmak için ideal olarak tasarlanmışlardır. Bu onları yeni bir anti-kanser tedavi için ideal hedefler yapar [28].

2.3.5.CDC25 ve Kanser Tedavisi

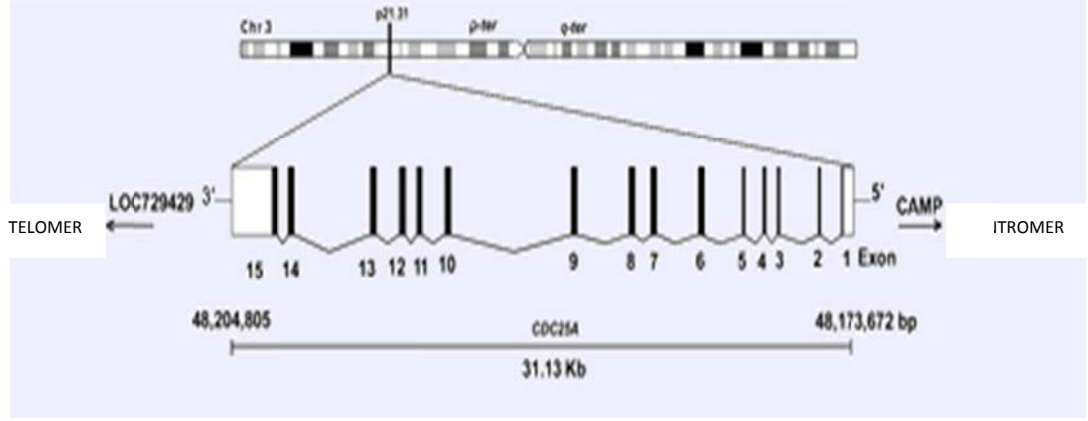
Hücre siklus kontrolünde Cdkların üstlendiği kritik rollerinden dolayı anti-proliferatif ilaç geliştirmede ilgi çekici farmakolojik hedefler haline gelmişlerdir. Birkaç yıldır bu enzimlerin aktivitelerini direk ya da indirek inhibe etmek için çok çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Direk inhibisyon her ikisi de tek başına ya da son

zamanlarda kullanılan terapötik ajanlarla birlikte tekrar etmiş ya da tedaviye yanıt vermeyen tümörlü hastalarda yapılan faz I ve II klinik çalışmalarda kullanılan Flavopiridol ve Roscovitin gibi çok iyi bilinen bileşiklerle kompetitif ATP analoglarının kullanımına dayanır. Cdkların aktivatörleri olan CDC25 fosfatazlar indirek olarak Cdk kinazları ve hücre siklus kontrolündeki etkilerini inhibe etmek için orijinal yaklaşımlar geliştirmede açıkça adaydırlar [28]. Çok sayıda bildirilen CDC25 inhibitörleri doğal ürünler ya da onların türevleridirler. Çok sayıda metal anyonu da spesifik olmayan fosfataz inhibitörleridirler [27]. Bununla beraber etkili bir şekilde kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden ve fare, rat veya benzeri ksenograft insan tümörlerinde aktif olan CDC25 fosfatazların potansiyel inhibitörlerinin sayısı hala sınırlıdır ve quinonlu bileşiklerle kısıtlıdır. Bundan dolayı geçici protein-protein etkileşimler inhibitörlerinin geliştirilmesi CDC25 inhibisyonuna dayanan bir kanser tedavisi için alternatif stratejiler sağlayabilir [28].

CDC25 proteinlerinin yarı ömürleri kısadır. Bundan dolayı CDC25 inhibitör bileşiğiyle muamele edilen hücreler spesifik bir kontrol geçiş noktasında durdurulur fakat inhibitör madde ortadan kalkınca hücre siklus ilerlemesi eski halini alacaktır. Bu durum teorik olarak böyleyken çeşitli modellerde hücre siklus durdurulmasının uzaması gibi bu durdurulmadan zamansız ya da kısmen kaçış hücreleri apoptotik programa itilmesi gibi eninde sonunda zararlı olabilir. Bununla beraber kemoterapide son zamanlarda kullanılan bileşiklere gelince CDC25 fosfataz inhibitörleri tümör hücrelerinin seçimini öngörmez ve böylece herhangi bir hücre tipinin hücre siklus ilerlemesini inhibe edebilir. Fakat pek çok tümör tipinde bulunan CDC25A ve CDC25B'nin aşırı regülasyonu bu durumlarda hassasiyet artışının oluşabileceğini öngörür [28].

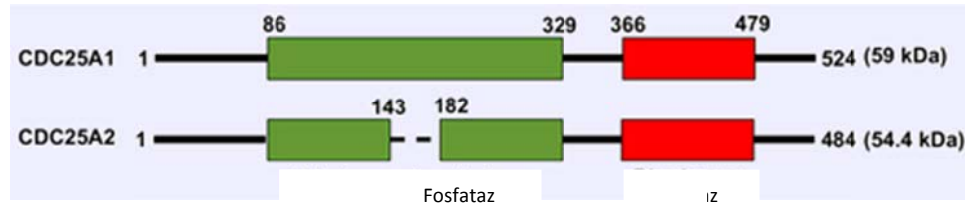
2.4.CDC25A Fosfataz

CDC25A geni kromozom 3p21 bölgesinde belirlenmiştir [42]. Lokasyonu 48173672 bp'de başlar ve 48204805bp p-terminalden biter. Bu gen telomerik olarak CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide) ve sentromerik olarak LOC729349 (60S ribozomal protein L17(L23)'e benzer bir psödojen) arasında lokalize olmuştur. Toplam büyüklüğü 31,133 bazdır (Şekil 2.16) [43].



Şekil 2.16: Kromozom 3p-terminalindeki İnsan CDC25A Geninin Genomik Organizasyonu

15 ekzonu vardır ve başlama kodonu ekzon1'in sonunda dur kodonu ise ekzon15'in başlangıcında yer alır. CDC25A transkripti 3704 bp uzunluğundadır. Bugüne kadar 2 büyük transkript varyantı tanımlanmıştır: CDC25A1 ve A2 (Şekil 2.17).



Şekil 2.17: CDC25A'nın A1 ve A2 İzofomları

CDC25A proteinin toplam uzunluğu yaklaşık 59kDa moleküler ağırlıkla 524 amino asitten oluşur. Proteinin N-terminal ve C-terminal uçları iki splice varyantında da aynıdır ve benzer katalitik aktiviteye sahiptirler. N-terminal regülatör bölge birkaç fosforilasyon bölgesi içerir ve CDC25 aile üyeleri arasında düşük sekanslı homolojiye sahiptir, oysa C-terminal uç aktif sistein bölgesi içeren Rodanaz homology bölgesini korumuştur. Katalitik bölge tüm protein tirozin fosfatazlar da genel olan CX5R motifi (C: sistein, X: herhangi bir a.a., R: arjinin) içerir [43].

CDC25A geni memeliler arasında yüksek derecede korunmuştur. İnsan CDC25A geni şempanze de %99, köpek de %90, rat de %86 ve fare de yaklaşık %85 homoloji göstermektedir. Memelilerde CDC25A'nın CDC25B ve CDC25C olmak üzere iki ortologu vardır. Bunlar arasında N-terminal regülatör bölge az oranda homoloji gösterirken (%20-25 benzerlik) C-terminal katalitik bölge daha yüksek bir homolojiye sahiptir (CDC25B ile yaklaşık %64, CDC25C ile yaklaşık %58) [43].

CDC25A embriyonik dönemde erken eksprese edilir ve yetişkinlerde ise normal hücre ve dokuların pek çoğunda eksprese edilir. CDC25A'nın son zamanlara kadar nükleer bir protein olduğuna inanılmaktaydı. Fakat yapılan çalışmalarla CDC25A'nın nükleer salım sinyali (NES) ve iki kısımlı nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) sinyallerinin ikisinin sayesinde nükleus ve sitoplazma arasında gidip geldiğini göstermiştir [30]. NES 38-59 a.a.leri arasında yer alan N-terminal uca yer alır, oysa NLS 272-294 a.a.leri arasında yer alır ve bu iki sinyal CDC25A'nın nükleer lokalizasyonunu sağlamada önemlidir [43].

CDC25A S fazına girişte gereklidir ve bu fosfatazın aşırı ekspresyonu S fazına girişi hızlandırır [13,31]. CDC25A'nın biyolojik fonksiyonlarının araştırıldığı bir çalışmada bu fosfatazın baskın olarak geç G1 fazında eksprese edildiği gösterilmiştir. Hatta spesifik bir antikorun mikroenjeksiyonuyla rat hücrelerinde CDC25A'nın seviyesinin azalması hücrelerin G1 fazından S fazına girişini bloke etmiştir. Bu sonuçlara dayanarak CDC25A'nın mitotik bir regülatör değil de hücre siklusunun başlamasında kritik rol oynayan bir fosfataz olduğu bildirilmiştir [13]. Fakat daha sonra yapılan çalışmalarla CDC25A'nın G1-S geçişinde önemli olduğu kadar aynı zamanda bir M-fazı indükleyici (MPI) fosfataz protein ailesinin bir üyesi olduğu gösterilmiştir [30]. Benzer bir çalışmada CDC25A'nın S fazı boyunca fosfataz aktivitesinin artmasıyla sonuçlanan bir fosforilasyona uğradığı ve bu fosforilasyonun CDC2-CYCE kinaz aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir. İnsan fibroblast hücrelerinde anti-CDC25A antikorlarının mikroenjeksiyonuyla G1 fazı hücrelerinin S fazına geçişi bloke edilmiştir. Bu sonuçlar insan hücrelerinde CDC25A fosfatazın S fazına giriş için gerekli olduğunu ve aynı zamanda bu enzimin G2/M fazı geçişinde tanımlanan bir oto-amplifikasyon ilmeğinin bir parçası olduğunu göstermiştir [31].

DNA hasarına cevapta Chk1/Chk2 aracılı fosforilasyonu yürütür, ardından p53'ten bağımsız olarak büyümenin durmasına yol açan ubiquitine bağlı yıkım meydana gelir. DNA hasarı veya DNA replikasyon blokları CDC25A fosforilasyonunu ve takiben ubiquitin-proteazom yolağı aracılığıyla yıkımını uyarır. Hücre siklusunda CDC25A'nın düzenlenmesinin araştırıldığı bir çalışmada mitoz çıkışı ve erken G1 safhalarında CDC25A'nın yıkımının APC/C ligaz tarafından başlatıldığı ve proteinin N-terminal ucundaki KEN kutusunun yıkım için gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca SCF inaktivasyonunun da CDC25A birikimini ve stabilize olmasını sağladığı bildirilmiştir [34]. Başka bir çalışmada da CDC25A'nın ubiquitillendiği ve hızlı bir şekilde

proteazomlar tarafından yıkıldığı ve G1'den mitozaya kadar seviyesinin arttığı bildirilmiştir. DNA sentez inhibitörü hidroksi-üre ile muamele edilen hücrelerde CDC25A'nın fazlalığında hızlıca azalma olur ve bu duruma Cdk2 fosfotirozin içeriğinde artış ve Cdk2 kinaz aktivitesinde azalma eşlik eder. Hidroksi-üre varlığında CDC25A aşırı ekspresyonu hücrelerin durmaya karşı eğilimlerini değiştirir ve hücreleri erken kromozom kondensasyonuna iter. CDC25A aşırı ekspresyonu tümör hücrelerini DNA replikasyon kontrol noktalarına daha az hassas hale dönüştürür, böylece genomik kararsızlıklarına eşlik eder [44].

CDC25A'nın aşırı ekspresyonu çok agresif hastalıklar ve kötü prognozla ilişkilidir. Son yapılan in vivo da kontrol noktası yolakları ile ilgili çalışmalar kontrol noktası hasarlarından kaynaklanan genomik kararsızlığın tümör başlangıcı ve ilerlemesinde temel mekanizma olduğunu ileri sürmektedir. Tümörjenik olaylar insan kanserlerinde gözlenen DNA hasar cevabını harekete geçirir. cycE'nin aşırı ekspresyonu karsinomalarda gözlenen genel bir durumdur ve genomik kararsızlığı arttırdığı rapor edilmiştir. cycE ekspresyonu indüklenmiş hücrelerin biyokimyasal analizleri hepsi DNA hasar cevabı kinazları olan ATM ve ATR'nin hedefleri olan Ser15-fosfatlanmış p53, γ -H2AX ve Ser-966-fosfatlanmış kohezin SMC1'in zamana bağlı artışını göstermiştir. cycE'ye analog pek çok kanserde aşırı eksprese olan diğer bir proto-onkogen CDC25A'nın aşırı ekspresyonu bir DNA hasar cevabını harekete geçirir. Benzer bir cevap bir S fazı başlatıcı transkripsiyon faktörü olan östrojen reseptörü E2F'in RB yolağında sapmalar olan kanserlerde kontrolü kalktığında tamoksifen eklenmiş ortamda hücre içine taşındığı gözlenmiştir. cycE, CDC25A ve E2F1'in aşırı ekspresyonu zamansız S fazına girişi başlatma kabiliyetini beraber yürütürler. CDC25A bir E2F hedef genidir ve kanser dokularındaki yüksek ekspresyonu basitçe kanser hücrelerinin çoğalmasının artışını yansıtabilir [45]. Benzer bir çalışmada E2F hedef genleri CDC25A ve cycE'nin hareketsiz fibroblastlarda S fazına girişi indüklemek için yeterli oldukları gösterilmiştir [46].

CDC25A meme, özofajiyal, gastrik, akciğer, tiroid, baş ve boyun kanserleri ve lenfomaların dahil olduğu pek çok insan kanserinde aşırı eksprese olur. CDC25A'nın aşırı ekspresyonu en azından meme kanserinde gen amplifikasyonu ya da aşırı transkripsiyonel regülasyona zıt olarak çoğu zaman post-transkripsiyonel stabilizasyona bağlıdır. Hücre siklusunun erken evreleri boyunca glikojen sentaz kinaz 3-beta (GSK-3 β) CDC25A'yı fosforile edebilir ve yıkabilir, böylece

CDC25A'nın hücre içindeki seviyesinin düşük tutulmasını sağlar. Ayrıca, insan kanserlerindeki CDC25A'nın aşırı ekspresyonunun GSK-3 β inaktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [43].

CDC25A için gen mutasyonu ya da amplifikasyon yaygın olarak bildirilmemiştir. Fare Cdc25A geninde doğal olarak meydana gelen bir nokta mutasyonun (C-A) Histidin 128 (CAC)'i Glutamin (CAA)'e dönüştürdüğü bildirilmiştir. Bu değişim CDC25A fosfataz aktivitesinde artışa neden olur [43].

BÖLÜM 3

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. CİHAZLAR, KİMYASAL MADDELER ve SOLÜSYONLAR

3.1.1. DNA İzolasyon Aşaması

- DNA İzolasyon kiti (Roche Applied Science, Germany)
- Su Banyosu (Nüve, Türkiye)
- Santrifüj (P Selecta Centronic-BL II)
- Vorteks (BioMetra)
- Mikropipetler (1-10 μ l, 10-100 μ l ve 100-1000 μ l Scorex, Eppendorf, Pipette4u)
- Steril filtreli 10 μ l, 100 μ l ve 1000 μ l'lik mikropipet uçları (Gilson)
- 0,2ml, 0,5ml ve 1,5ml'lik ependorf tüpler (Grenier)
- Steril lateks eldiven
- Buzdolabı (Arçelik) ve Derin Dondurucu (Uğur, Türkiye)

3.1.2. DNA Amplifikasyonu

- Thermal Cycler Gradient PCR (Takara, Japan)
- Mikropipetler (1-10 μ l, 10-100 μ l ve 100-1000 μ l Scorex, Eppendorf, Pipette4u)
- Steril filtreli 10 μ l, 100 μ l ve 1000 μ l'lik mikropipet uçları (Gilson)
- 0,2ml, 0,5ml ve 1,5ml'lik ependorf tüpler (Grenier)
- Vorteks (BioMetra)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)

- Otoklav Bandı
 - Buz Makinesi
 - Steril kavanozlar
 - 0,5ml ve 1,5ml'lik Tüplükler
 - Steril lateks eldiven
 - Deiyonize su
 - DNA Taq Polimeraz (Tampon [(NH₄)₂SO₄] ve MgCl₂ (25mM, 1,0 ml) (MBI- Fermentas #EP0402)
 - dNTP karışımı (MBI- Fermentas #R0181)
 - 2mM stok için; 2 µl dATP
 - 2 µl dGTP
 - 2 µl dCTP
 - 2 µl dTTP
 - Primerler: P88S bölgesi için; 5'-TAT TTG TTG CCT GAC TTA-3' (İleri)
 - 5'-CTC CAG TCC AGT GTA TGA-3' (Geri)
 - -350 C/T bölgesi için; 5'-GGA AGA AAG GGG TCC ACA A-3' (İleri)
 - 5'-CAA TGA AAA CTC CCA GCA GAA-3' (Geri)
 - -51C/G bölgesi için; 5'- AGC CTA GCT GCC ATT CGG-3' (İleri)
 - 5'- TTC GCT GTT CTC CCA CCC-3' (Geri)
- *Primerler stok olarak 100 pmol / µl olacak şekilde sulandırılmış ve 50 pmol/µl konsantrasyonunda hazırlanarak kullanılmıştır.

3.1.3. Enzim Kesimi

- Mikropipetler (1-10µl, 10-100µl ve 100-1000µl Scorex, Eppendorf, Pipette4u)
- Steril filtrelili 10µl, 100µl ve 1000µl'lik mikropipet uçları (Gilson)
- 0,2ml, 0,5ml ve 1,5ml'lik ependorf tüpler (Grenier)
- Etüv (Memmert)
- Kesim Enzimleri: MseI, BfaI ve TfiI (MBI-Fermentas,)

3.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi

- Yatay Elektroforez (Cleaver MP-250V)
- Güç Kaynağı (Cleaver MP-250V)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik)
- Erlen mayer (250ml)
- Mezürler (100ml, 250ml)
- 10X Tris Borat Tamponu (TBE): -Tris baz 108 gr. (Sigma)
-Borik asit 55 gr. (Merck)
-Disodium-EDTA 9,37 gr. (Amresco)

* pH: 8,3 olacak şekilde ayarlanır. Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Agaroz jel elektroforezi için deiyonize su ile seyreltilerek 1XTBE olarak kullanılır.

- 6X Yükleme Tamponu (Fermentas)
- Agaroz (Prona Nu Micropor)
- Etidyum Bromür (10mg/ml) (Sigma): Etidyum bromür 1 gr
Deiyonize su 100 ml
- DNA markır: 100 bp DNA Ladder (Fermentas, EP0402)
- Görüntüleme Cihazı (Translüminatör) (Vilber Lourmat)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kan Örneklerinin Eldesi

Çalışmaya Ocak 2007 ve Temmuz 2009 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı Onkoloji Bilim Dalında meme kanseri tanısı konmuş ve metastazı olan 100 hasta, meme kanseri tanısı konmuş ancak tedaviye yanıt vermiş ve 4 yıldır nüks etmemiş 181 remisyon hastası ve 137 adet meme kanseri olmayan sağlıklı birey olmak üzere toplam 418 birey dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bireylerin yaş, menopoz durumları, TNM evreleri, kemoterapi, radyoterapi ve hormon terapi alıp almadıkları, östrojen ve progesteron reseptörlerinin pozitiflik durumları ve ayrıca metastazlı hastalar için metastaz yerleri sorgulanmıştır (Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3).

Tablo 3.1: Hastaların Demografik Özellikleri

	Remisyon Hastaları (n=181)	Metastazlı Hastalar (n=100)	P Değeri
Ortalama Yaş	50,9±11,51	50,9±11,69	0,999
Premenopozal	76	41	0,8721
Postmenopozal	105	59	
Kemoterapi-almış	153	98	0,0002
Kemoterapi-almamış	28	2	
Radyoterapi-almış	79	51	0,2365
Radyoterapi-almamış	102	49	
Hormon terapi-almış	130	42	0,0001
Hormon terapi-almamış	51	58	
Östrojen reseptör-pozitif	113	53	0,1237
Östrojen reseptör-negatif	68	47	
Progesteron reseptör-pozitif	104	54	0,5758
Progesteron reseptör-negatif	77	46	

Tablo 3.2: Hastaların TNM Evrelerine Göre Dağılımı

TNM Evreleri	Hasta Sayısı
1	15 (%5,34)
2A	67 (%23,84)
2B	50 (%17,79)
3A	26 (%9,25)
3B	10 (%3,56)
3C	13 (%4,63)
4	100 (%35,59)
Toplam	281 (%100)

Tablo 3.3: Evre 4 Hastalarının Metastaz Yerleri ve Yüzdesel Dağılımları

Metastaz Yeri	Hasta Sayısı
Kemik	52 (%30,06)
Akciğer	48 (%27,75)
Karaciğer	34 (%19,65)
Beyin	10 (%5,78)
Plevra	10 (%5,78)
Aksilla	8 (%4,62)
Lokal	3 (%1,73)
Periton	2 (%1,16)
Servikal	2 (%1,16)
Perikard	1 (%0,58)
Over	1 (%0,58)
Karşı meme	1 (%0,58)
Kemik iliği	1 (%0,58)

Bireylerden toplanan periferik kan örnekleri steril EDTA'lı tüpler içerisine alınmıştır. Toplanan kanlar DNA izolasyon aşamasına kadar -20°C'de saklanmıştır. Çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Etik Kurulu'nun onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (04-2009/96).

3.2.2. DNA İzolasyonu

Toplanan kan örneklerinin DNA'larının izole edilmesi DNA izolasyon kiti (Roche Applied Science, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

“High Pure PCR Template Preparation” Kit İçeriği:

1. Doku Parçalama Çözeltisi (Tissue Lysis Buffer): 4 M üre, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7,4, 25 °C.
2. Bağlanma Çözeltisi (Binding Buffer): 6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100, pH 4,4, 25 °C.
3. Proteinaz K
4. İnhibitör Uzaklaştırıcı Çözelti (Inhibitor Removal Buffer): 5 M guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6, 25 °C (80 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı.)
5. Yıkama Çözeltisi (Wash Buffer): 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 25°C (80 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı).

6. Elüsyon Çözeltisi (Elution Buffer) : 10 mM Tris, pH 8,5, 25°C.
7. High Pure filtre tüpleri
8. Toplama (Collection) tüpleri.

DNA İzolasyon Aşamaları:

1. EDTA' lı tüplere alınan kandan 200 µl alınıp, üzerine 200 µl bağlanma çözeltisi ve 40 µl Proteinaz K ilave edildi; pipetle süspanse edilerek homojenizasyon sağlandı.
2. Tüpler 70°C' de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonunda, karışım üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve pipetaj ile iyice karıştırıldı.
4. Eppendorf tüp içinde bulunan örneğin tamamı, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş filtrelili tüpün içinde pipetlendi.
5. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrasında filtrelili kısım yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
7. Filtrelili tüpün üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı çözeltisi eklendi.
8. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrasında filtrelili kısım yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
10. 500 µl yıkama çözeltisi eklenerek, 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Filtrelili tüpler yeni toplama tüplerine aktarıldı ve üzerlerine ikinci kez 500 µl yıkama çözeltisi eklendi.
12. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Santrifüj bittikten sonra, tüplerin alt kısmında biriken süpernatant uzaklaştırıldı ve tekrar 13.000 rpm' de 10 saniye santrifüj edildi.

14. Filtreli tüpler, temiz birer Eppendorf tüpün içine yerleştirildi ve 70°C' de ısıtılmış olan elüsyon çözeltisinden 200 µl ilave edilerek 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.

15. Santrifüj sonrasında filtreli tüp atıldı. Eppendorf tüpte geri kalan çözelti genomik DNA' dır.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışmada DNA analizi için tercih edilen PCR tekniği, ilgilenilen DNA dizisinin in vitro şartlarda çoğaltılmasına dayanan, pratik ve güvenilir olmasından dolayı günümüzde moleküler biyolojik çalışmalarda geniş kullanım alanına sahip bir tekniktir. PCR tekniğinin prensibi; tekrarlanan üç basamağa bağlıdır. Bir PCR döngüsü; denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) basamaklarından oluşur [47]. CDC25A gen bölgelerinin çoğaltılması işlemi PCR tekniği ile başarılmıştır.

3.2.3.1. Primer tasarımı

Bu çalışmada kullanılan primerleri tasarlamak amacıyla referans dizilimler NCBI veritabanındaki CDC25A geninin ekzon 3 bölgesi için NT_022517.17 kontig numaralı bölge içerisindeki dizilimler seçilmiştir. CDC25A geni ekzon 3 bölgesi ve özendirici bölge içerisindeki bölgelere ait primerler Primer Premier 5 online primer tasarım programı kullanılarak tasarlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerler ve restriksiyon enzimleri hedef gen bölgesine ve içerdikleri SNP'lere uygun olarak ilk kez tasarlandığı için yöntemin uygun şekilde çalışır hale gelebilmesi ve sonuçların doğrulundan emin olmak için ön çalışmalar yapılmıştır. Tasarlanan primerler Tabloda gösterildiği gibidir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: CDC25A Geni Ekzon 3 Bölgesi ve Özendirici Bölge İçerisindeki 2 Ayrı Bölge İçin Hazırlanmış Primerler

SNP	Lokasyon	SNP Referans No	Primer Dizileri	Ürün Büyüklüğü
P88S	Ekson 3	rs3731499	5'-TAT TTG TTG CCT GAC TTA-3' (Forward) 5'-CTC CAG TCC AGT GTA TGA-3' (Reverse)	253 bç
-350C/T	Promoter	rs3731482	5'-GGA AGA AAG GGG TCC ACA A-3' (Forward) 5'-CAA TGA AAA CTC CCA GCA GAA-3' (Reverse)	263bç
-51C/G	Promoter	rs3731485	5'-AGC CTA GCT GCC ATT CGG-3' (Forward) 5'-TTC GCT GTT CTC CCA CCC-3' (Reverse)	218bç

3.2.3.2. PCR koşullarının optimizasyonu

PCR tepkimesinde kullanılan primer çiftlerinin en verimli çalışabilecekleri bağlanma sıcaklıklarının tespit edilmesi ve tepkime koşullarının iyileştirilmesi amacı ile 418 örnek içerisinden 1 örnek DNA seçilmiş ve 3 çift primer takımı için iyileştirme ve gradiyent PCR yapılmıştır. 3 ayrı bölge için uygulanana gradiyent PCR protokolleri tabloda verildiği gibidir (Tablo 3.5, 3.6 ve 3.7).

Tablo 3.5: P88S için Gradiyent PCR Protokolü

Bölge	Sıcaklık Değerleri	Süresi	Döngü Sayısı
P88S	50	45 sn	35
	50,9		
	51,9		
	52,8		
	53,6		
	54,4		
	55,3		
	56,1		
	57,1		
	58		

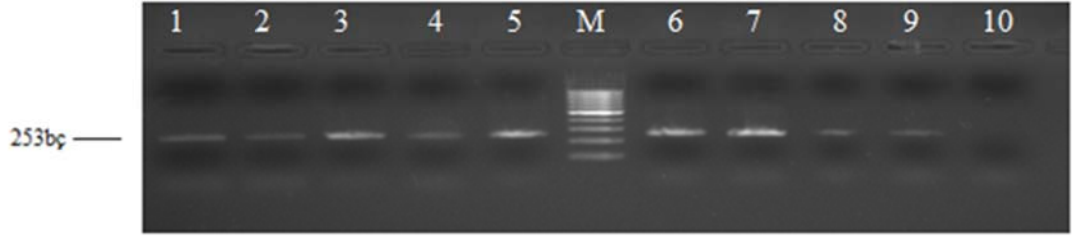
Tablo 3.6: -350C/T için Gradyent PCR Protokolü

Bölge	Sıcaklık Değerleri	Süresi	Döngü Sayısı
-350C/T	54	45 sn	30
	54,9		
	55,9		
	56,8		
	57,6		
	58,4		
	59,3		
	60,1		
	61,1		
	62		

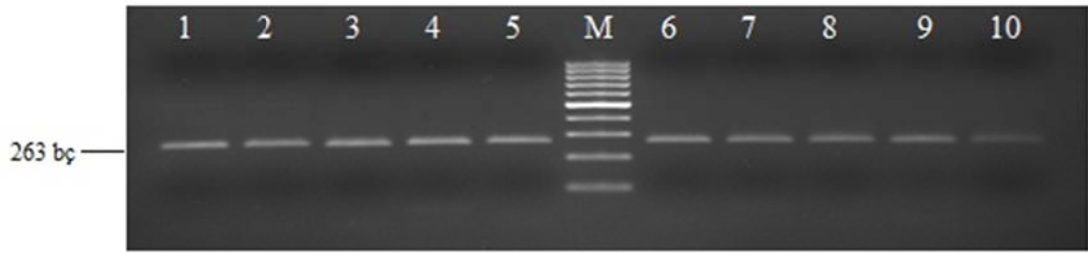
Tablo 3.7: -51C/G için Gradyent PCR Protokolü

Bölge	Sıcaklık Değerleri	Süresi	Döngü Sayısı
-51C/G	56	60 sn	35
	56,9		
	57,9		
	58,8		
	59,6		
	60,4		
	61,3		
	62,1		
	63,1		
	64		

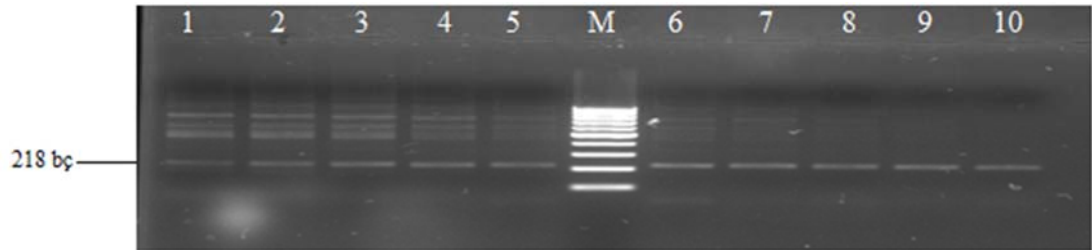
Gradyent PCR sonucu 3 ayrı bölge için elde edilen en net (parlak) bant sıcaklığı primer bağlanma sıcaklığı olarak seçilmiştir (Resim 3.1, 3.2 ve 3.3).



Resim 3.1: P88S Bölgesinin PCR Koşullarını Optimize Etmek İçin Yapılan Gradyent PCR Jel Görüntüsü. 10. kuyuda PCR ürünü gözlenmemektedir. 1, 2, 4, 8 ve 9 numaralı kuyulardaki PCR ürünleri zayıf; 3, 5, 6 ve 7 numaralı kuyulardaki PCR ürünleri ise istenen düzeydedir. Bunlar içerisinde 3 numaralı kuyudaki ürünün çoğaltıldığı sıcaklık (52 °C) tüm tepkimeler için tercih edilmiştir



Resim 3.2: -350C/T Bölgesinin PCR Koşullarını Optimize Etmek İçin Yapılan Gradyent PCR Jel Görüntüsü. 10. kuyudaki PCR ürünü zayıf olarak gözlenirken; diğer kuyulardaki PCR ürünleri ise istenen düzeydedir. Bunlar içerisinde 4 numaralı kuyudaki ürünün çoğaltıldığı sıcaklık (57 °C) tüm tepkimeler için tercih edilmiştir.



Resim 3.3: -51C/G Bölgesinin PCR Koşullarını Optimize Etmek İçin Yapılan Gradyent PCR Jel Görüntüsü. İlk 7 kuyudaki PCR ürünleri istenen bantın yanında ekstra bantlar da vermiştir. Diğer kuyulardaki PCR ürünleri ise istenen düzeydedir. Bunlar içerisinde 10 numaralı kuyudaki ürünün çoğaltıldığı sıcaklık (64 °C) tüm tepkimeler için tercih edilmiştir.

Gradyentli PCR cihazında tabloda belirtilen üç bölgeye ait primerlerin bağlanma (annealing) sıcaklıkları çalışılmış ve optimize edilmiştir. Bu bölgelere ait son optimizasyon PCR karışımlarının miktarları ve primerlerin bağlanma sıcaklıkları aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 3.8 ve 3.9).

Tablo 3.8: P88S, -350C/T ve -51C/G Bölgeleri İçin Son Optimizasyon PCR Karışımı

Kimyasallar	Konsantrasyon
ddH ₂ O	-
10X Tampon	1X
25mM MgCl ₂	1-4mM
2mM dNTP Karışımı	0,2 mM (her biri için)
İleri Primer (Fw)	0,1-1µM
Geri Primer (Rw)	0,1-1µM
Taq DNA Polimeraz	1,25u/50µl
DNA	10pg-1µg/50µl

Tablo 3.9: P88S, -350C/T ve -51C/G Bölgeleri İçin Son Optimizasyon Primer Bağlanma Sıcaklıkları

Bölge	Primer Bağlanma (Annealing) Sıcaklığı	Süresi	Döngü Sayısı
P88S	52 °C	45 sn	35
-350C/T	57 °C	45 sn	30
-51C/G	64 °C	60 sn	35

Toplam 418 örneğin tasarlanan üç çift primerin tamamı ile PCR'nın yapılması için 1350 PCR reaksiyonu tasarlanmıştır. PCR sonunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin kontrol edilmesi için %1,5'lük agaroz jel hazırlanıp 120 voltta 30 dk yürütülerek translüminatörde görüntülenmiştir.

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Hassas terazide tartılan 3 gr agaroz bir erlen içerisine alınmış ve üzerine 200 ml 1XTBE tampon solüsyonu ilave edilmiştir. Agaroz tampon solüsyon içerisinde tam olarak çözülene kadar mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Erlen el yakmayacak şekilde yani 50-55 °C'ye soğutulduktan sonra 5µl EtBr ilave edilmiş ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel tabağına dökülmüştür. Tarak yerleştirildikten sonra jel 40 dk donmaya bırakılmıştır. Jelin donmasını takiben jel elektroforez tankına yerleştirilip üzerini örtecek kadar 1XTBE tampon solüsyonu ilave edilmiştir. Her bir kuyucuğa üzerlerine 6X yükleme tamponu eklenen PCR ürünleri ve orta kuyucuğa

denk gelecek şekilde 100 bç'lik DNA belirleyici ayrı ayrı yüklenmiştir. Örnekler 120 V'ta 30 dk yürütülmüştür. Ardından UV ışık altında bantların gözlenmesi sağlanmıştır.

Üç ayrı bölgeye ait PCR ürünlerinin amplifikasyon sonrası kontrolünün yapılması için %1,5'luk agaroz jel elektroforezinden yararlanılmıştır.

3.2.5. RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) ile CDC25A genine ait P88S, -350C/T ve -51C/G Polimorfizmlerinin Analizi

PCR amplifikasyonu yapılan ve agaroz jelde görüntülenen örneklerden net bant görülemeyenler için tekrar PCR yapılmıştır. Bant gözlenebilen örnekler kesim (RFLP) reaksiyonuna tabi tutulmuş ve agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jel üzerindeki bantlara göre değerlendirme yapılmıştır. Her bir bölge için bant gözlenemeyen örnekler çalışma dışı bırakılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen CDC25A geninin 3 ayrı bölgesinin polimorfizmlerinin analizi için PCR ile çoğaltılan gen bölgeleri özgül restriksiyon endonükleaz enzimlerle üretici firmanın önerdiği koşullarda kesilmiş ve 37 °C'de 16 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Tablo 3.10, 3.11 ve 3.12).

Kesim sonucu oluşan DNA fragmanları agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş, etidyum bromür ile boyanmış ve UV ışık altında görüntülenerek büyüklüklerine göre yorumlanmıştır.

Tablo 3.10: P88S Bölgesi İçin Kesim Karışımı Protokolü

Kimyasallar	Miktar (µl)
PCR ürünü	10µl
10X Tampon O	1µl
ddH ₂ O	4µl
TfII	0,35u
Toplam	15,35 µl

Tablo 3.11: -350C/T Bölgesi İçin Kesim Karışımı Protokolü

Kimyasallar	Miktar (µl)
PCR ürünü	10µl
10X Tampon R	1µl
ddH ₂ O	4µl
MseI	0,2u
Toplam	15,2 µl

Tablo 3.12: -51C/G Bölgesi İçin Kesim Karışımı Protokolü

Kimyasallar	Miktar (µl)
PCR ürünü	10µl
10X Tampon Tango	2µl
ddH ₂ O	4µl
Bfal	0,2u
Toplam	16,2 µl

3.2.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler GraphPad InStat (version 3.05) program kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar standart sapma yada yüzde olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmış olup, genotip ve allellerinin görülme sıklığının, gruplar arası farklılıklarla beraber değerlendirilmesi için Ki kare (χ^2) testi ve Fisher's exact test kullanılmıştır. Gruplar arası farklar ve anlamlılık sınırları the unpaired Student's t test kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 4

4. BULGULAR

Remisyon hastaları ve metastazlı hasta grupları arasında yaş ortalamaları, menopoz durumları, östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Bu iki grup arasında terapi durumları dikkate alındığında radyoterapi almış olma durumu anlamlı bir fark yaratmazken ($p>0,05$) kemoterapi ve hormon terapi görmüş olmaları istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($p<0,05$).

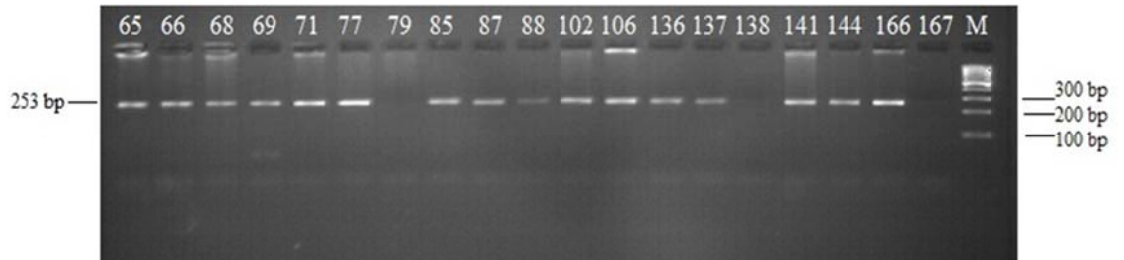
Hasta grubunda yer alan kadınların çoğunluğunun meme kanserinin 2. Evresinde oldukları (% 41,63) ve yarıdan fazlasının lenf nodlarının varlığı bakımından pozitif oldukları (% 55,5) görülmüştür.

Kontrol ve hasta grubundaki tüm bireyler için ayrı ayrı PCR ve RFLP yöntemleri ile CDC25A geninin 3. Ekzonunda yer alan Phe88Ser (P88S) polimorfizmi, özendirici bölgede yer alan -350C/T ve -51C/G polimorfizmleri allel ve genotip frekansları ve ayrıca haplotip analizleri yapılarak incelenmiştir.

4.1. CDC25A Geni Ekzon 3'te Yer Alan P88S Bölgesi için Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları

4.1.1. P88S Bölgesinin PCR Bulguları

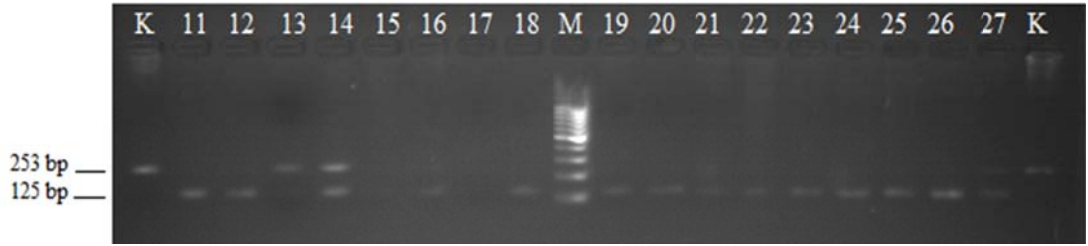
Bu bölgeye ait PCR ürünleri %1,5'luk agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve 253 bç uzunluğundaki bant UV ışık altında görüntülenmiştir (Resim 4.1).



Resim 4.1: P88S Bölgesi PCR Sonuçlarının Kontrol Edildiği Agaroz Jel Fotoğrafı. En son kuyucuğa 100 bç'lik DNA belirleyici yüklenmiştir. İlk 19 kuyucuğa ise örnek DNA'lar yerleştirilmiştir. 7., 15. ve 19. Kuyucuklarda PCR ürünü gözlenemezken geri kalan kuyucuklarda 253 bç uzunluğunda istenen yerde PCR ürünü gözlenmiştir

4.1.2. P88S Bölgesi PCR Ürünlerinin TfiI Enzimi ile Kesim Sonuçları

PCR tepkimesi sonrası 253 bç'lik PCR ürünü veren P88S bölgesi TfiI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede sitozin (C) içeren allel kesim noktası taşımaktadır. Homozigot C alleli taşıyan bireylerde (CC) enzim bir noktadan kesim yaparak 253 bç olan DNA parçasını 128 bç ve 125 bç olarak 2 parçaya ayırır. Sitozinden→Timine (C→T) bir nükleotit değişimi olması halinde 253, 128 ve 125 bç uzunluğunda 3 bant oluşur. Homozigot T alleli taşıyan bireylerde enzimin tanıdığı bölge ortadan kalkmaktadır. Bu bireylerde (TT) 253 bç'lik tek bant gözlenmektedir (Resim 4.2).



Resim 4.2: CDC25A Geninin P88S Bölgesi Polimorfizminin TfiI Enzimi İle Kesimi Sonucu Oluşan Bantlar

P88S polimorfizmi incelendiğinde hasta grubunda 235 bireyde CC genotipi (%90), 25 bireyde CT genotipi (%9,6), 1 bireyde TT genotipi (%0,4) saptanırken kontrol grubunda 112 bireyde CC genotipi (%99,1), 1 bireyde CT genotipi (%0,9) saptanmış ve TT genotipine (%0) sahip birey saptanmamıştır. Hasta grubunda C alleli görülme sıklığı %94,8 iken T alleli görülme sıklığı %5,2 olarak bulunmuş; kontrol grubunda ise C alleli görülme sıklığı %99,6 ve T alleli görülme sıklığı %0,4 olarak saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Hasta ve Kontrol Grupları Arasında P88S Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları

Genotipler/ Alleller	Kontrol Grubu (n=113) (%)	Hasta Grubu (n=261) (%)	P	OR (95% CI)
C/C	112 (99,1)	235 (90,0)		1,00
C/T + T/T	1 (0,9)	26 (10,0)	0,0008*	12,391 (1,660-92,522)
C	225 (99,6)	495 (94,8)		1,00
T	1 (0,4)	27 (5,2)	0,0006*	12,273 (1,657-90,923)

P88S bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında; hasta ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Metastatik hastalar ve metastatik olmayan remisyon hastaları ile kontrol grubu arasında P88S polimorfizmi incelendiğinde; remisyon hastaları arasında 156 bireyin CC genotipine (%90,2), 17 bireyin CT genotipine (%9,8) sahip olduğu tespit edilirken TT genotipine sahip birey bulunmamıştır (%0). Metastatik grup içerisinde ise 79 birey CC genotipine (%89,8), 8 birey CT genotipine (%9,1) ve 1 birey TT genotipine (%1,1) sahip olarak tespit edilmiştir. Remisyon grubunda C alleli görülme sıklığı %95,1 ve T alleli görülme sıklığı %4,9 iken; metastatik grupta C alleli görülme sıklığı %94,3 ve T alleli görülme sıklığı %5,7 olarak bulunmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Metastatik Hastalar ve Remisyon Hastalarında P88S Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları

Genotipler/ Alleller	Kontrol Grubu (n=113) (%)	Hasta Grubu (%)	P	OR (95% CI)
Remisyon (n=173)				
C/C	112 (99,1)	156 (90,2)		1,00
C/T + T/T	1 (0,9)	17 (9,8)	0,0019*	12,205 (1,600-93,103)
C	225 (99,6)	329 (95,1)		1,00
T	1 (0,4)	17 (4,9)	0,0022*	11,626 (1,535-88,028)
Metastatik (n=88)				
C/C	112 (99,1)	79 (89,8)		1,00
C/T + T/T	1 (0,9)	9 (10,2)	0,0056*	12,759 (1,584-102,80)
C	225 (99,6)	166 (94,3)		1,00
T	1 (0,4)	10 (5,7)	0,0015*	13,554 (1,717-106,97)

P88S bölgesinin polimorfik dağılımı metastatik ve metastatik olmayan remisyon grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, aradaki fark önemli derecede anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

Meme kanseri metastatik ve remisyon hastaları gruplarının östrojen ve progesteron reseptörleri pozitifliği veya negatifliği bulgusuna göre; ER pozitifliği P88S genotipleme açısından incelendiğinde ER pozitif veya negatif olma durumu

açısından CT ve TT genotipi taşıyan hastalar fark göstermemiştir ($p>0,05$). Progesteron reseptörü pozitifliği parametresi değerlendirildiğinde; P88S genotiplenmesinde yine CT ve TT genotipli hastalar anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.3).

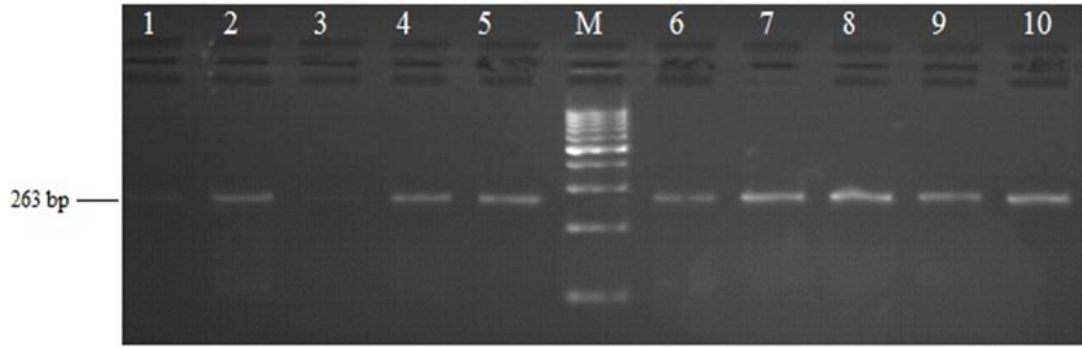
Tablo 4.3: P88S Allelik Frekansları İle Östrojen ve Progesteron Reseptörleri Pozitiflik Durumlarının Değerlendirilmesi

P88S	Remisyon	Metastaz	P	OR (95% CI)
ER(+)	n=107	n=49		
C/C	99	45		
C/T + T/T	8	4	1,00	1,100 (0,315-3,844)
C	206	94		
T	8	4	1,00	1,096 (0,322-3,730)
ER(-)	n=38	n=36		
C/C	31	32		
C/T + T/T	7	4	0,517	0,554 (0,147-2,081)
C	69	68		
T	7	4	0,535	0,580 (0,162-2,072)
PR(+)	n=99	n=49		
C/C	89	45		
C/T + T/T	10	4	1,00	0,791 (0,235-2,664)
C	188	94		
T	10	4	1,00	0,800 (0,244-2,619)
PR(-)	n=42	n=33		
C/C	38	29		
C/T + T/T	4	4	0,725	1,310 (0,302-5,688)
C	80	62		
T	4	4	0,731	1,290 (0,310-5,367)

4.2. CDC25A Geni Özendirici Bölgede Yer Alan -350C/T Bölgesi için Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları

4.2.1. -350C/T Bölgesinin PCR Bulguları

Bu bölgeye ait PCR ürünleri %1,5'lük agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve 263 bç uzunluğundaki bant UV ışık altında görüntülenmiştir (Resim 4.3).



Resim 4.3: -350C/T Bölgesi PCR Sonuçlarının Kontrol Edildiği Agaroz Jel Elektroferez Fotoğrafı. Ortadaki kuyucuğa 100bç'lik DNA belirleyici yüklenmiştir. 1. ve 3. kuyucuklardaki PCR ürünleri zayıf görünse de örneklerin hepsi istenen yerde 263 bç uzunluğunda bant vermiştir

4.2.2. -350C/T Bölgesi PCR Ürünlerinin MseI Enzimi ile Kesim Sonuçları

263 bç büyüklüğündeki -350C/T bölgesi MseI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede sitozin (C) içeren allel MseI enzimi tarafından tanınmamaktadır. Homozigot C alleli taşıyan bireylerde (CC) enzim kesim yapamaz ve toplamı 263 bç olan DNA parçası gözlenir. Sitozinden→Timine (C→T) bir nükleotit değişimi olması halinde bu bölgede MseI enzimi için bir kesim noktası oluşur ve bu genotipe sahip bireyler (CT) 263, 152 ve 111 bç uzunluğunda 3 bant verir (Resim 4.4).



Resim 4.4: CDC25A Geninin -350C/T Bölgesi Polimorfizminin MseI Enzimi ile Kesimi

-350C/T polimorfizmi incelendiğinde hasta grubunda 280 bireyde CC genotipi (%99,6), 1 bireyde CT genotipi (%0,4) saptanırken TT genotipine (%0) rastlanmamıştır. Kontrol grubunda ise 124 bireyde CC genotipi (%100) gözlenmiş ve CT (%0) ve TT genotipine (%0) sahip birey gözlenmemiştir. Hasta grubunda C alleli görülme sıklığı %99,8 iken T alleli görülme sıklığı %0,2 olarak bulunmuş; kontrol grubunda ise C alleli görülme sıklığı %100 ve T alleli görülme sıklığı %0 olarak saptanmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Hasta ve Kontrol Grupları Arasında -350C/T Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları

Genotipler/ Alleller	Kontrol Grubu (n=124) (%)	Hasta Grubu (n=281) (%)	P	OR (95% CI)
C/C	124 (100,0)	280 (99,6)		1,00
C/T + T/T	0 (0)	1 (0,4)	1,000*	1,332 (0,054-32,940)
C	248 (100,0)	561 (99,8)		1,00
T	0 (0)	1 (0,2)	1,000*	1,328 (0,054-32,731)

-350C/T bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında; hasta ve kontrol grupları arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). Metastatik hastalar ve metastatik olmayan remisyon hastaları ile kontrol grubu arasında -350C/T polimorfizmi incelendiğinde; remisyon hastaları arasında 183 bireyin CC genotipine (%100) sahip olduğu ve CT (%0) ve TT genotipine (%0) sahip birey bulunmadığı tespit edilmiştir. Metastatik grup içerisinde ise 97 birey CC genotipine (%99) ve 1 birey CT genotipine (%1) sahipken TT genotipine sahip birey olmadığı (%0) tespit edilmiştir. Remisyon grubunda C alleli görülme sıklığı %100 ve T alleli görülme sıklığı %0 iken; metastatik grupta C alleli görülme sıklığı %99,5 ve T alleli görülme sıklığı %0,5 olarak bulunmuştur (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Metastatik Hastalar ve Remisyon Hastalarında -350C/T Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları

Genotipler/ Alleller	Kontrol Grubu (n=124) (%)	Hasta Grubu (%)	P	OR (95% CI)
Remisyon (n=183)				
C/C	124 (100,0)	183 (100,0)		
C/T + T/T	0 (0)	0 (0)		
C	248 (100,0)	366 (100,0)		
T	0 (0)	0 (0)		
Metastatik (n=98)				
C/C	124 (100,0)	97 (99,0)		1,00
C/T + T/T	0 (0)	1 (1,0)	0,4414*	3,831 (0,154-95,147)
C	248 (100,0)	195 (99,5)		1,00
T	0 (0)	1 (0,5)	0,4414*	3,813 (0,154-94,196)

-350C/T bölgesinin polimorfik dağılımı metastatik ve metastatik olmayan remisyon grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

Meme kanseri metastatik ve remisyon hastaları gruplarının östrojen ve progesteron reseptörleri pozitifliği veya negatifliği bulgusuna göre; ER ve PR reseptörlerinin pozitifliği -350C/T bölgesi genotipleme açısından incelendiğinde CT ve TT genotipi taşıyan hasta bulunmadığından hesaplanamamıştır. ER ve PR reseptörlerinin negatifliği parametresi değerlendirildiğinde; -350C/T genotiplemesinde CT ve TT genotipli hastalara ait anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.6).

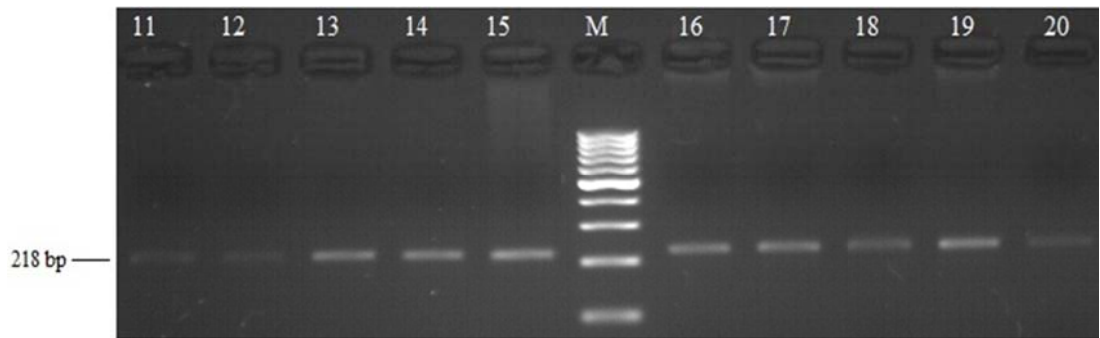
Tablo 4.6: -350C/T Allelik Frekansları İle Östrojen ve Progesteron Reseptörleri Pozitiflik Durumlarının Değerlendirilmesi

-350C/T	Remisyon	Metastaz	P	OR (95% CI)
ER(+)	n=112	n=51		
C/C	112	51		
C/T + T/T	0	0		
C	224	102		
T	0	0		
ER(-)	n=44	n=37		
C/C	44	36		
C/T + T/T	0	1	0,457	3,658 (0,145-92,572)
C	88	73		
T	0	1	0,457	3,612 (0,145-90,075)
PR(+)	n=103	n=52		
C/C	103	52		
C/T + T/T	0	0		
C	206	104		
T	0	0		
PR(-)	n=50	n=35		
C/C	50	34		
C/T + T/T	0	1	0,412	4,391 (0,174-111,07)
C	100	69		
T	0	1	0,412	4,338 (0,174-108,14)

4.3. CDC25A Geni Özendirici Bölgede Yer Alan -51C/G Bölgesi için Elde Edilen PCR ve RFLP Sonuçları

4.3.1. -51C/G Bölgesinin PCR Bulguları

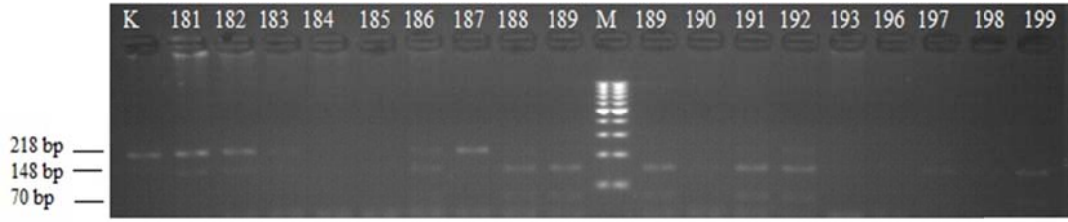
Bu bölgeye ait PCR ürünleri %1,5'luk agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve 218 bç uzunluğundaki bant UV ışık altında görüntülenmiştir (Resim 4.5).



Resim 4.5: -51C/G Bölgesi PCR Sonuçlarının Kontrol Edildiği Agaroz Jel Elektroforez Fotoğrafı. Ortadaki kuyucuğa 100bç'lik DNA belirleyici yüklenmiştir. 1. ve 2. kuyucuklardaki PCR ürünleri zayıf görünse de örneklerin hepsi istenen yerde 218 bç uzunluğunda bant vermiştir

4.3.2. -51C/G Bölgesi PCR Ürünlerinin BfaI Enzimi ile Kesim Sonuçları

PCR tepkimesi sonrası 218 bç'lik PCR ürünü veren -51C/G bölgesi BfaI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede sitozin (C) içeren allel kesim noktası taşımaktadır. Homozigot C alleli taşıyan bireylerde (CC) enzim bir noktadan kesim yaparak 218 bç olan DNA parçasını 148 bç ve 70 bç olarak 2 parçaya ayırır. Sitozinden→Guanine (C→T) bir nükleotit değişimi olması halinde 218, 148 ve 70 bç uzunluğunda 3 bant oluşur. Homozigot G alleli taşıyan bireylerde enzimin tanıdığı bölge ortadan kalkmaktadır. Bu bireylerde (GG) 218 bç'lik tek bant gözlenmektedir (Resim 4.6).



Resim 4.6: CDC25A Geninin -51C/G Bölgesi Polimorfizminin BfaI Enzimi İle Kesimi

-51C/G polimorfizmi incelendiğinde hasta grubunda 206 bireyde CC genotipi (%92), 17 bireyde CG genotipi (%7,6) ve 1 bireyde GG genotipine (%0,4) rastlanmıştır. Kontrol grubunda ise 102 bireyde CC genotipi (%98,1) ve 2 bireyde CG genotipine (%1,9) rastlanırken GG genotipine (%0) sahip bireye rastlanmamıştır. Hasta grubunda C alleli görülme sıklığı %95,8 iken G alleli görülme sıklığı %4,2 olarak bulunmuş; kontrol grubunda ise C alleli görülme sıklığı %99 ve T alleli görülme sıklığı %1 olarak saptanmıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Hasta ve Kontrol Grupları Arasında -51C/G Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları

Genotipler/ Alleller	Kontrol Grubu (n=104) (%)	Hasta Grubu (n=224) (%)	P	OR (95% CI)
C/C	102 (98,1)	206 (92,0)		1,00
C/G + G/G	2 (1,9)	18 (8,0)	0,0442*	4,456 (1,014-19,584)
C	206 (99,0)	429 (95,8)		1,00
G	2 (1,0)	19 (4,2)	0,030*	4,562 (1,052-19,777)

-51C/G bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında; hasta ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p<0,05$).

Metastatik hastalar ve metastatik olmayan remisyon hastaları ile kontrol grubu arasında -51C/G polimorfizmi incelendiğinde; remisyon hastaları arasında 133 bireyin CC genotipine (%90,5), 13 bireyin CG (%8,8) ve 1 bireyin GG genotipine (%0,7) sahip olduğu bulunmuştur. Metastatik grup içerisinde ise 73 birey CC genotipine (%94,8) ve 4 birey CG genotipine (%5,2) sahipken; GG genotipine sahip birey olmadığı (%0) tespit edilmiştir. Remisyon grubunda C alleli görülme sıklığı %94,9 ve G alleli görülme sıklığı %5,1 iken; metastatik grupta C alleli görülme sıklığı %97,4 ve G alleli görülme sıklığı %2,6 olarak bulunmuştur (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Metastatik Hastalar ve Remisyon Hastalarında -51C/G Polimorfizminin Genotip ve Allel Frekansları

Genotipler/ Alleller	Kontrol Grubu (n=104) (%)	Hasta Grubu (%)	P	OR (95% CI)
Remisyon (n=147)				
C/C	102 (98,1)	133 (90,5)		1,00
C/G + G/G	2 (1,9)	14 (9,5)	0,0171*	5,368 (1,193-24,162)
C	206 (99,0)	279 (94,9)		1,00
G	2 (1,0)	15 (5,1)	0,0114*	5,538 (1,252-24,491)
Metastatik (n=77)				
C/C	102 (98,1)	73 (94,8)		1,00
C/G + G/G	2 (1,9)	4 (5,2)	0,4039*	2,795 (0,498-15,672)
C	206 (99,0)	150 (97,4)		1,00
G	2 (1,0)	4 (2,6)	0,4080*	2,747 (0,496-15,198)

-51C/G bölgesinin polimorfik dağılımı incelendiğinde; metastatik olmayan remisyon grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) fakat metastatik grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

Meme kanseri metastatik ve remisyon hastaları gruplarının östrojen ve progesteron reseptörleri pozitifliği veya negatifliği bulgusuna göre; ER pozitifliği -51C/G genotipleme açısından incelendiğinde ER pozitif veya negatif olma durumu açısından CG ve GG genotipi taşıyan hastalar anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$). Progesteron reseptörü pozitifliği parametresi değerlendirildiğinde; -51C/G genotiplemesinde yine CG ve GG genotipli hastalara ait anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: -51C/G Allelik Frekansları İle Östrojen, ve Progesteron Reseptörleri Pozitiflik Durumlarının Değerlendirilmesi

-51C/G	Remisyon	Metastaz	P	OR (95% CI)
ER(+)	n=96	n=43		
C/C	88	41		
C/G + G/G	8	2	0,724	0,537 (0,109-2,641)
C	183	84		
G	9	2	0,512	0,484 (0,102-2,291)
ER(-)	n=30	n=33		
C/C	24	31		
C/G + G/G	6	2	0,137	0,258 (0,048-1,395)
C	54	64		
G	6	2	0,150	0,281 (0,054-1,452)
PR(+)	n=87	n=45		
C/C	81	43		
C/G + G/G	6	2	0,715	0,628 (0,122-3,246)
C	167	88		
G	7	2	0,723	0,542 (0,110-2,667)
PR(-)	n=37	n=28		
C/C	30	26		
C/G + G/G	7	2	0,280	0,330 (0,063-1,729)
C	67	54		
G	7	2	0,298	0,355 (0,071-1,777)

4.4. Haplotip Analizi

CDC25A geninin P88S, -350C/T ve -51C/G bölgelerinin haplotipleme SHESIS (<http://analysis.bio-x.cn>) programı kullanılarak yapılmıştır. Hasta grubunun bir bütün

olarak kontrol grubuyla kıyaslandığı analiz sonucu olası tüm allelik eşleştirmeler ortaya konmuştur. Bu olası allelik eşleştirmeler sonucunda C-C-C haplotip öbeğinin meme kanseri patogenezi ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Üç Farklı Nükleotid Değişiminin SHEsis Programı ile Gerçekleştirilen Haplotip Analizi Bulguları. 1 numaralı haplotip öbeğinin meme kanseri patogenezi ile ilişkili olduğu görülmektedir.

	P88S	-350C/T	-51C/G	Frekans	Olasılık Oranı (%95 Güven Aralığı)	Fisher's P Değeri	Pearson's P Değeri
1	C	C	C*	0,916	0,162 (0,038-0,683)*	0,004883	0,004878
2	C	C	G*	0,037	5,414 (1,005-29,154)	0,100526	0,100461
3	T	C	C*	0,044	6,495 (1,220-34,597)	0,055885	0,055842
4	T	C	G	0,001	-	-	-
5	T	T	C	0,002	-	-	-

SHEsis programına göre yapılan haplotip analizinin global sonucuna göre *(CCC, CCG ve TCC) haplotiplerinin meme kanseri patogenezi ile ilişkili olduğu ortaya konmuş ve bu ilişkinin anlamlılığı için Fisher's P değeri= 0,019 ve Pearson's P değeri= 0,019 olarak bulunmuştur.

BÖLÜM 5

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınların en sık görülen kanseri olup, tüm kadın kanserlerinin %23'ünü teşkil etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1990 yılında yaptığı çalışmada, 796.000 yeni meme kanserli olgu ve 314.000 meme kanserinden ölüm saptanmışken, yine WHO'ya bağlı International Agency on Cancer for Research'un (IARC) 2002 yılındaki değerlendirmesinde; 1.152.000 yeni meme kanserli olgu ve 411.000 meme kanserinden ölüm hesaplanmıştır. 1990-2002 arasındaki on iki yıllık süre içerisinde, dünyada meme kanserinin sıklık ve mortalite oranlarında %25'lik artış görülmektedir [48]. Türkiye'de elde edilen mevcut verilere göre, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığın olduğu tahmin edilmektedir [49]. Ancak, bunun aksine gelişmiş olan ülkelerden ABD'de son 25 yıl içerisinde mortalitede meydana gelen %50 azalma, tarama ile erken tanı ve etkin tedaviye bağlanmaktadır [50]. Bu açıdan meme kanseri patogenezi eşlik eden moleküler elemanların belirlenerek erken tanısının sağlanması ve aday genlerin tespitiyle beraber etkin tedaviye katkı sağlanması tarafımızca önemli bulunduğundan meme kanserinin konu olarak seçilmesi tercih sebebi olmuştur.

Bu çalışmada yer alan gönüllü bireylerden toplanan periferik kan örneklerinden DNA'ları izole edilmiştir. DNA izolasyon işlemi için, kaynak olarak parafine gömülmüş dokular yerine moleküler epidemiyolojik çalışmalarda gelenekselleşmiş bir yöntem olan kandan DNA izolasyon metodu seçilmiştir. Bu seçimde her iki yöntemin sahip olduğu avantaj ve dezavantajlar etkili olmuştur. DNA eldesi için parafine gömülü dokuların kullanılması mutasyon taramaları ve ekspresyon çalışmaları için şart ve bir o kadar da kıymetlidir fakat bu işlemin de başarısızlıkları vardır. Bunlar: (1) küçük doku ve biyopsi örneklerinden elde edilen DNA'nın miktarca yetersiz oluşu, (2) hemoglobin gibi inhibitör bileşenlerin varlığı, (3) dokunun cerrahi yolla çıkarılması ile fiksasyonu arasında geçen sürenin uzun olması, kullanılan fiksatif çeşidi ve fiksasyon süresi nedeniyle hedef DNA'nın yıkıma

uğrayabilmesi ve (4) formalin fiksasyonuna bağlı olarak nükleik asitlerin fragmentasyonudur [51]. Periferik kandan DNA izolasyon işlemi ise maliyetinin düşük oluşu, otomatize sistemler sayesinde zaman kazandırıcı kısa bir prosedürünün oluşu, maliyetinin düşük oluşu ve kısa zamanda daha fazla örnek toplanabilmesi yönünden avantajlıdır. Ayrıca yapılan çalışmalarla kanser hastalarının serum ve plazmalarında çift zincirli DNA fragmentlerinin önemli miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir [52]. Kanser hastalarının plazmasında bulunan DNA'nın karakteristik özellikleri araştırıldığında DNA'nın önemli bir miktarının tümör hücrelerinden köken aldığı bulunmuştur. Buna ilaveten plazma DNA'sında tümör hücrelerinin DNA'sını karakterize eden onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin varlığı tespit edilmiştir [53]. Bu ve benzeri bulgular dolaşımdaki DNA'nın önemli bir kısmının tümör hücrelerinden kaynaklandığını göstermektedir. Böylece plazma DNA'nın prognostik amaçla kanser taramalarında kullanılması erken tanı yönünden avantaj sağlayacaktır [54].

Tüm bireylerin DNA'ları izole edildikten sonra PCR-RFLP yöntemiyle meme kanseri ile ilişkili olduğu düşünülen CDC25A geninin polimorfik yapısı ortaya konmaya çalışılmıştır. Modern insanlardaki çeşitlilik genelde oldukça küçük bir atasal gruptan gelse de gözlenen çeşitlilik sayıca çok büyüktür. Bu çeşitliliklerin çoğu SNP şeklindedir. Bunlar insan genom dizisindeki belirli noktalardaki farklılıklardır ve insan vücudundaki haritalanmış polimorfik bölgeler genetik analizler için çok yararlıdır. Genomda farklılaşma olasılığının yüksek olduğu bölgeler tıbbi ve bilimsel amaçla özgül DNA dizilerini fenotip ile ilişkilendirmeye yarar. İnsan genom dizisindeki SNP'lerin çoğunun fenotipe etki etmediği düşünülse de bunların bir kısmının kalıtılan bireysel özelliklerden sorumlu olması beklenir. Bu noktada en zor olan ise insan genetiğinde doğal çeşitlilikten kaynaklanan farklar içinde işlevsel açıdan önem taşıyan çeşitlilikleri saptayabilmektedir [10].

İnsan kanserlerinin çok büyük bir kısmı dikkat çekici şekilde artmış mutasyon hızına sahip olduklarından hücrelerin genetik açıdan kararsız oldukları söylenir. Bu kararsızlık çeşitli şekillerde olabilir. Bazı kanser hücrelerinin bireysel nükleotitlerini etkileyen tıpkı yapım hatalarını düzeltme ya da bölgesel DNA hatalarını onarma yetenekleri kusurludur. Bu hücreler nokta mutasyonlarının ve küçük bölgesel DNA dizi değişikliklerinin birikimine, normal hücrelere göre daha fazla eğilim gösterirler

[10]. Meme kanser hücrelerinin genomu genellikle istikrarlı değildir ve bu durum genomik kararsızlık olarak adlandırılır [55].

Genel olarak kritik kanser genleri, içlerindeki tehlikeli mutasyonların işlev kaybına ya da kazanmasına sebep olmalarına göre iki grupta sınıflandırılabilirler. Tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybettiren mutasyonları, hücreleri normalde kendi sayılarını kontrol altında tutmaya yardım eden baskılardan kurtarıırken; onkogenlerin işlev kazanım mutasyonları, hücreleri olmayacak zamanda sayılarını arttırmaları için uyarır. Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, bireysel hücre üzerindeki etkilerinde genellikle çekiniktir. Her iki gen kopyası da devre dışı kalana kadar kontrolde kayıp olmaz. İkinci gruptaki yani onkogenlerdeki mutasyonlar ise baskın etkiye sahiptir ve sağlıklı hücre hatlarını kanser yapıcı çoğalmaya doğru yönlendirirler [10].

Kritik kanser genlerinin çoğu vücutta hücrenin sosyal davranışlarını; başlıca hücreleri komşularından gelen sinyaller yoluyla bölünmeye, farklılaşmaya ya da ölüme iten mekanizmaları düzenleyen yolakların bileşenlerini kodlar. Kanser mutasyonlarının çoğu, sinyal yolaklarının bileşenlerini bir yolla değiştirerek daha fazla hücreye ihtiyaç olmadığı zaman dahi bölünebilme sinyalleri vermesine sebep olur ve uygunsuz hücre çoğalması, DNA amplifikasyonu ve hücre bölünmesi yolunu açar. Bu nedendir ki hücre bölünmesini düzenleyen kritik kanser genlerinin en sonunda merkezi hücre döngüsü kontrol mekanizmalarında rol alarak etki göstermeleri şaşırtıcı değildir [10].

Meme tümörlerinde tek gen değişikliklerinin sıklığı oldukça düşüktür [55]. Bunlar; onkogenlerin amplifikasyonları ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar ya da diğer değişikliklerdir [55]. Bir kromozom bölgesindeki heterozigotluk kaybının diğer bir lokustaki heterozigotluk kaybıyla ilişkisi araştırıldığında kromozom 3p, 6q ve 8p'nin kararsız genomlu tümörlerde en sık değişen bölgeler olduğu bulunmuştur [55]. Kromozom 3p, 6q ve 8p kayıplarının anöploidi, uzamış S fazı ve kısalmış yaşam süresiyle ilişkili olduğu bulunmuştur [55]. Bozulmuş kontrol noktası genomik kararsızlığa, o da hücreleri kansere doğru giden yola sürükler [35]. Benzer şekilde CDC25A fosfatazın aşırı ekspresyonunun hidroksiüre varlığında faaliyetleri duran hücreleri erken kromozom kondensasyonuna ittiği ve CDC25A'nın aşırı ekspresyonunun tümör hücrelerini DNA replikasyon kontrol noktalarına daha az

hassas olmalarını sağlayarak onları genomik kararsızlığa götürdüğü bildirilmiştir [44]. Meme kanserinde hücre siklusunun ilerleyişi biyolojik agresifliğinin değerlendirilmesi için önemli bir parametredir [41].

Normal hücre siklusunda, G1-S, G2-M ve metafaz-anafaz geçişlerinde kontrol noktaları vardır. Hücre büyümesi G1 fazında kısıtlayıcı nokta (restriction point-R noktası) tarafından koordine edilir. Bu noktada hücre duracak ya da siklusu tamamlayacaktır. Radyasyon ya da toksin muamelesine uğrayan hücrelerde DNA'da meydana gelen hasara göre hücre siklusu kontrol noktaları G1'den S fazına veya G2'den M fazına geçişi engeller. Hücre siklusu cdc, cdk ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından kontrol edilir. Siklinlerin düzeyleri transkripsiyon seviyesinde düzenlenir ve aktif cdc-cdk kompleksleri oluşur. Bir kez aktive olan cdc-cdk kompleksi, DNA replikasyonu ve mitozdaki birçok işlemin kontrolünde rolü olan proteinleri fosforiller. Protein kinazlarla cdc-cdk alt birimlerinin fosforilasyonu ile kinaz kompleksi inaktive olur. CDC25 fosfatazlar, cdk'lardan inhibe edici fosfat gruplarını kaldıran fosfatazlardır ve hücre siklusunun çeşitli fazlarına ilerlemeyi kontrol ederler [56].

CDC25A'nın meme kanserindeki etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar kısıtlı sayıdadır ve mevcut çalışmaların da tümü kanserli hücrelerde bu fosfatazın ekspresyon seviyesinin belirlenmesi yönündedir. Bu çalışma insanlarda CDC25A geninde tek gen polimorfizmlerinin belirlenmeye çalışıldığı ve bu polimorfizmlerin meme kanserindeki CDC25A ile ilişkilendirilmeye çalışıldığı ilk çalışma olması nedeniyle orijinallik taşımaktadır.

Bu çalışmada remisyon hastaları ve metastazlı hasta grupları arasında yaş ortalamaları, menopoz durumları, östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu iki grup arasında tedavi durumları dikkate alındığında ise radyoterapi almış olma durumu anlamlı bir fark yaratmazken kemoterapi ve hormon tedavisi görmüş olmaları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hasta grubunda yer alan kadınların çoğunluğunun meme kanserinin 2. evresinde oldukları (%41,63) ve yarıdan fazlasının lenf nodlarının varlığı bakımından pozitif oldukları (%55,5) görülmüştür. CDC25A geninin 3. ekzonunda yer alan 88. amino asitinin göstermiş olduğu tek nükleotid değişimli polimorfizmi (TCT>TTT) incelemesi sonucunda: Hasta grubunda CC ve CT genotiplerinin

görülme sıklığı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak da anlamlı ($p<0,05$) olmasıyla P88S bölgesindeki bu polimorfik değişimin meme kanseri ile ilişkisi ortaya konmuştur. Metastatik hastalar ve remisyon hastaları arasında bu bölgenin polimorfik yapısı incelendiğinde; Metastatik grupta CT ve TT genotipli hastaların frekansları remisyon grubundakilere göre yüksek bulunmuş ve yine T allel sıklığı da metastatik grupta daha yüksek bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel açıdan oldukça anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuçlar bize P88S bölgesindeki polimorfik değişimin metastazla ilişkili olduğunu göstermektedir.

İnsanlarda CDC25A'nın aşırı düzenlenmesinin mekanizması hala net değildir fakat bazı meme kanser hücre hatlarında CDC25A'nın aşırı ekspresyonu esasen gen amplifikasyonu ya da transkripsiyonel fazla düzenlenmeye zıt olarak artmış protein stabilizasyonuna bağlanmıştır [43].

İnsan genomundaki hücre bölünmesi ile ilgili genlerin sahip oldukları görevleri açısından incelendiğinde ya bölünmeyi durdurma yönünde ya da bölünmeyi hızlandırma yönünde bir fonksiyona sahiptir. Özellikle tümör engelleyici genlerde meydana gelen nokta mutasyonlar ve mikro kayıplar kanser gelişimi yönünde iken, kanser yapıcı genlerde meydana gelen genetik bir değişiklik ise kanser yapıcı genlerin fazlaca eksprese edilmesini sağlar ve hücrenin bölünmesini artırıcı yöndedir [44].

CDC25A için tanımlanmış bir gen mutasyonu ya da amplifikasyon yoktur. Yalnızca fare CDC25A geninde doğal olarak meydana gelen ve yanlış anlamlı mutasyona neden olan histidin 128 a.a (CAC)'ini glutamin (CAA)'e dönüştüren (C/A) bir nokta mutasyonun varlığı rapor edilmiştir. Bu değişiklik CDC25A fosfatazın aktivitesini arttırmıştır [43]. Çalışmalarımız neticesinde kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda anlamlı polimorfizm gösteren P88S bölgesinin meme kanseriyle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu bölgenin remisyon hastalarına kıyasla metastatik hastalarda polimorfizm sıklığının yüksek oluşu CDC25A geninin bu bölgesi ile metastaz arasında bağlantı olduğunu göstermektedir. Buradan yola çıkarak P88S bölgesinin meme kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda CDC25A geninin promotor bölgesinde yer alan ikinci bölge -350C/T polimorfizmi incelendiğinde; -350C/T genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve meme kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Metastatik hastalar ve metastatik olmayan remisyon hastaları arasında -350C/T genotip dağılımına bakıldığında da; -350C/T bölgesi ile meme kanseri metastazı arasında da anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmaya dahil edilen ve promotor bölge içinde yer alan bir diğer bölge -51C/G -51C/G polimorfizmi genotip dağılımlarına bakıldığında; meme kanserli hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p<0,05$).

Genellikle promotor bölge üzerinde yer alan tek gen polimorfizmi söz konusu proteinin düzenlenmesi ve ekspresyonu üzerine etki etmektedir. Cozma ve arkadaşları (2002) c-Myc ve CDC25A genlerinin Apmt meme tümörü latens modifiye edicilere aday olduğunu biyoinformatik temelli denemeleri ile ortaya koymuşlardır [57]. Araştırmacılar bu çalışmalarında CDC25A'nın özendirici bölgesinde kodlanmamış polimorfizmlerin genom analizlerini yapmışlar ve hem in vitro hem de moleküler analizler neticesinde bu polimorfizmlerin fonksiyonel olarak önemli olduğunu bildirmişlerdir. CDC25A'nın özendirici bölgesindeki kodlanmamış polimorfizmin bu G1-S kontrol proteininin sabit seviyesini arttırdığını göstermişlerdir. CDC25A'nın aşırı ekspresyonunun G1-S kontrol noktasını geçme olasılığını arttırarak hücreye proliferatif bir avantaj sağladığı ve sonuç olarak bu durumun çok hızlı tümör gelişimiyle sonuçlandığını önermişlerdir [12]. Buradan yola çıkarak CDC25A geninin promotor bölgesinde yer alan -51C/G polimorfizminin hücreye proliferatif özellik kazandırdığı ve meme kanseri gelişimiyle sonuçlanan bir süreçte yer aldığı söylenebilir.

Metastatik hastalar ve remisyon hastaları arasında -51C/G polimorfizmi genotip dağılımı göz önüne alındığında: remisyon grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) fakat metastatik grup ile kontrol grubu arasındaki fark ise istatistiksel açıdan anlamsızdır ($p>0,05$). -51C/G polimorfizminin meme kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu fakat meme kanseri metastazı ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Buradan yola çıkarak CDC25A geninin -51C/G polimorfizminin meme kanseri oluşumu için bir gösterge olabileceği fakat prognostik açıdan bir gösterge olamayacağı sonucu doğmuştur.

Östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif olan meme kanserli hastaların ER negatif ve/veya PR negatif hastalara kıyasla daha düşük motralite riskine sahip oldukları bildirilmiştir [58]. Meme kanserli hastalarının östrojen ya da progesteron reseptörü açısından pozitiflik veya negatiflik durumunda, CDC25A geninin P88S, -350C/T ve -51C/G polimorfizmleri açısından istatistiki bir anlamlılık tespit edilememiştir.

CDC25A geninin P88S, -350C/T ve -51C/G bölgelerinin olası tüm allelik eşleştirmelerini veren haplotip analizinin global sonucuna göre C-C-C, C-C-G ve T-C-C haplotip öbeklerinin meme kanseri patogenezi ile ilişkili olduğu ortaya konmuş ve bu ilişkinin anlamlılığı istatistiksel olarak doğrulanmıştır ($p<0,05$). Bu haplotip öbekleri arasından C-C-C haplotip öbeğinin meme kanseri gelişimi açısından risk oluşturduğu yapılan istatistiksel analizler sonucu ortaya konmuştur ($p<0,05$).

BÖLÜM 6

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

CDC25A geninin ikisi özendirici bölgede ve bir diğeri 3. ekzonda yer almak üzere üç polimorfik bölgesi çalışılmıştır.

1. Remisyon hastaları ve metastazlı hasta grupları arasında yaş ortalamaları, menopoz durumları, östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).
2. Yine bu iki grup arasında terapi durumları dikkate alındığında ise radyoterapi almış olma durumu anlamlı bir fark yaratmazken ($p>0,05$) kemoterapi ve hormon tedavisi görmüş olmaları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).
3. Hasta grubunda yer alan kadınların çoğunluğunun meme kanserinin 2. evresinde oldukları (% 41,63) ve yarıdan fazlasının lenf nodlarının varlığı bakımından pozitif oldukları (% 55,5) görülmüştür.
4. TNM sınıflaması yapılan metastatik hastaların büyük bir kısmının (%93,08) uzak metastaza sahip oldukları ve bunlar arasında %30,06'sının kemik metastazı olduğu tespit edilmiştir.
5. P88S bölgesinin polimorfik incelemesi sonucunda; meme kanserli hasta grubu ile kontrol grubu arasında T varyantı karşılaştırıldığında CT ve TT genotiplerinin görülme sıklığı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak da anlamlı ($p<0,05$) olmasıyla bu bölgedeki polimorfik değişimin meme kanseri ile ilişkisi ortaya konmuştur. Ayrıca metastatik grupta remisyon hastalarına kıyasla T allel sıklığının yüksek bulunuşu ve bu farkın istatistiksel açıdan oldukça anlamlı bulunmasıyla ($p<0,05$) bu bölgedeki polimorfik değişimin metastazla ilişkili olduğunu sonucuna varılmıştır.

6. Özendirici bölgede yer alan -350C/T bölgesinin genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve meme kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Sonuç olarak bu bölgenin meme kanseri ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir.
7. Özendirici bölgede yer alan diğer bir bölge -51C/G polimorfizmi genotip dağılımlarına bakıldığında; meme kanserli hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p<0,05$). Remisyon grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) fakat metastatik grup ile kontrol grubu arasındaki fark ise istatistiksel açıdan anlamsızdır ($p>0,05$). -51C/G polimorfizminin meme kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu fakat meme kanseri metastazı ile ilişkili olmadığı düşünülmüştür. Buradan yola çıkarak CDC25A geninin -51C/G polimorfizminin meme kanseri oluşumu için bir gösterge olabileceği fakat prognostik açıdan bir gösterge olamayacağı sonucu doğmuştur.

Hücre siklusunu düzenleyen ve kontrol eden etkileşimler çok sayıda ve oldukça karmaşıktır. Hücre siklus yolaklarının ve burada görev alan bileşenlerin anlaşılması yönünde ilerlemeler olmasına rağmen hala çok sayıda soru ve cevap beklemektedir. Biyolojik açıdan kontrolsüzce çoğalan hücreler ile tanımlanan kanser hastalığının tedavisi için hala etkin terapi yollarının araştırılıyor olması; araştırmacıların ilgilerini hücre siklus kontrol noktalarına yönlendirmiştir. Hücre siklus kontrol noktaları kanser tedavisinde büyük potansiyele sahip hedeflerdir. Burada yer alan moleküler bileşenlerin daha iyi anlaşılması ile kanserin moleküler mekanizmaları ile ilgili bilgi artışının sağlanmasının yanı sıra etkin tedavide hedef ve stratejilerin belirlenmesine de katkı sağlanacaktır. Kemoterapötik ajanlara karşı oluşan direncin aşılmasında hücre siklus kontrol noktalarının değişiminin önemi anlaşılmaktadır.

CDC25A geninin proliferasyon ve kontrol noktasındaki önemli düzenleyici fonksiyonlarının ortaya konmasıyla birlikte ilgili çalışmalar artmış ve bu genin düzenlenişindeki herhangi bir yanlışı normal hücreleri kanserleşmeye doğru götürdüğü ortaya konmuştur. Kanser hücrelerinin gelişimiyle sonuçlanan CDC25A'nın ekspresyon seviyesinin artışı spesifik inhibitör molekülleri geliştirilerek kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla özellikle kadınlarda yüksek CDC25A'nın polimorfik yapısının araştırılarak bu genin ekspresyon

seviyesinde artışa neden olan moleküler mekanizmaların açığa çıkarılması önemlidir. Çalışmamızda CDC25A geninin üç farklı bölgesinin polimorfik yapısının incelenmesiyle elde edilen bulgular, bu genin meme kanseri oluşumunun engellenmesinde rol oynayabilecek hedeflerden biri olabileceğini göstermiştir.

BÖLÜM 7

7. KAYNAKLAR

- [1] Apaydın, I. (2003). *Meme Kanseri ile Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF-1) Alfa Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi*. Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi.
- [2] Ergül, E. (2006). *Meme Kanserinde Mangan-Süperoksit Dismutaz (Mn-SOD) Gen Polimorfizminin Araştırılması*. Kocaeli Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi.
- [3] Görtünç, E. (2007). *Meme Kanserli Hastalarda CYP19 Geni Kodon 39 Trp/Arg Polimorfizminin ve Genotip Dağılımının Araştırılması*. Çukurova Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi.
- [4] T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı. 2004-2006 Yılları Türkiye Kansere İncidansı.
- [5] Kalender, M.E. (2008). *Meme Kanseri ve ROCK2 geni Thr431Asn Polimorfizmi Arasındaki İlişki*. Gaziantep Üniv. Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Yan Dal Uzmanlık Tezi.
- [6] Eras, N. (2006). *Manganez Süperoksit Dismutaz (MnSOD) Geninin ALA-9VAL Polimorfizmiyle Meme Kanseri Riski Arasındaki İlişkinin Araştırılması*. Mersin Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi.
- [7] Lowitz, B.B. and Casciato, D.A. (2000). Principles of Medical Oncology and Cancer Biology. In: Casciato, D.A. and Lowitz, B.B. *Manual of Clinical Oncology, 4th edition*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 3-28.
- [8] Özbek, Y.K. (2008). *Türk Toplumunda Detoksifikasyon Enzimlerinin Cyp1B1 ve NAT2 Gen Polimorfizmlerinin Meme Kanseri ile İlişkinin İncelenmesi*. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi.
- [9] Çefle, K. Kansere Genetiği. *Klinik Gelişim*. Syf: 50-59. İst.
- [10] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002). *Hücrenin Moleküler Biyolojisi*. 4. Baskı, 1313-1362.

- [11] Balcı, N. (2004). *Prohibitin Geni 3' Transle Edilmeyen Bölgedeki C-T Polimorfizmi ile Erken Yaş Meme Kanseri İlişkisi*. Ondokuz Mayıs Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi.
- [12] Yıldız, Y. (2008). *Meme Kanserli Hastalarda TNF ile İlişkili Apoptoz Uyarıcı Ligand ve Bcl-2 ile İlişkili X-Protein Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması*. İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Ens. Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi.
- [13] Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H. and Okayama, H. (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *The EMBO Journal* 13:1549-1556.
- [14] Ekblom, A., Hsieh, C.C., Lipworth, L., Adami, H.Q. and Trichopoulos, D. (1997). Intrauterine environment and breast cancer risk in women: a population-based study. *J Natl Cancer Inst.* 89:71-6.
- [15] Melbye, M., Wohlfahrt, J., Olsen, J.H., Frisch, M., Westergaard, T., Helweg-Larsen, K., et al. (1997). Induced abortion and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 336:81-5.
- [16] Grabrick, D.M., Hartmann, L.C., Cerhan, J.R., Vierkant, R.A., Therneau, T.M., Vachon, C.M., et al. (2000). Risk of breast cancer with oral contraceptive use in women with a family history of breast cancer. *JAMA.* 284:1791-8.
- [17] Weiss, M.C., Fowble, B.L. and Solin L.J. (1992). Outcome of conservative therapy for invasive breast cancer by histologic subtype. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 23:941-7.
- [18] Henderson, I.C. and Patek, A.J. (1998). The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 52:261-88.
- [19] Slamon, D.J., Clark, G.M. and Wong, S.G. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 235:177-82.
- [20] Demascarel, I., Bonichon, F., Durand, M., Mauriac, L., MacGrogan, G., Soubeyran, I., et al. (1998). Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. *Eur J Cancer.* 34:58-65.
- [21] Clark, G.M. (2001). Interpreting and integrating risk factors for patients with primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 30:17-21.
- [22] Keyomarsi, K., Tucker, S.L., Buchholz, T.A., Callister, M., Ding, Y., Hortobagyi, G.N., et al. (2002). Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med.* 347:1566-75.

- [23] Look, M.P., van Putten, W.L., Duffy, M.J., Harbeck, N., Christensen, I.J., Thomssen, C., et al. (2002). Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 94:116-28.
- [24] Braun, S., Pantel, K., Müller, P., Janni, W., Hepp, F., Kentenich, C.R., et al. (2000). Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med.* 342:525-33.
- [25] Wang, Z., Southwick, E.C., Wang, M., Kar, S., Rosi, K.S., Wilcox, C.S., Lazo, J.S. and Carr, B.I. (2001). Involvement of Cdc25A Phosphatase in Hep3B Hepatoma Cell Growth Inhibition Induced by Novel K Vitamin Analogs. *Cancer Research* 61:7211-7216.
- [26] Hernandez, S., Bessa, X., Bea, S., Hernandez, L., Nadal, A., Mallofre, C., Muntane, J., Castells, A., Fernandez, P.L., Cardesa, A. and Campo, E. (2001). Differential Expression of cdc25 Cell-Cycle-Activating Phosphatases in Human Colorectal Carcinoma. *Laboratory Investigation* 81:465-473.
- [27] Eckstein, J.W. (2000). Cdc25 as a potential target of anticancer agents. *Investigational New Drugs* 18:149-156.
- [28] Boutros, R., Lobjois, V. and Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature* 7:495-507.
- [29] Cangi, M.G., Cukor, B., Soung, P., Signoretti, S., Moreira, Jr.G., Ranashinge, M., Cady, B., Pagano, M. and Loda, M. (2000). Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 106:753-761.
- [30] Boutros, R., Dozier, C. and Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current Opinion in Cell Biology* 18:185-191.
- [31] Hoffmann, I., Draetta, G. and Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G₁/S transition. *The EMBO Journal* 13:4302-4310.
- [32] Eckstein, J.W. (1998). Cdc25 protein phosphatase: regulation and its role in cancer. *Gene Ther Mol Biol* 1:707-711.
- [33] Moreira, Jr.G., Colleoni, G.W.B., Cangi, M.G., Murphy, M., Sherburne, B., Bordin, J.O. and Loda, M. (2003). Reciprocal Cdc25A and p27 Expression in B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Diagnostic Molecular Pathology* 12(3):128-132.
- [34] Donzelli, M., Squatrito, M., Ganoth, D., Hershko, A., Pagano, M. and Draetta, G.F. (2002). Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *The EMBO Journal* 21:4875-4884.

- [35] Ray, D. and Kiyokama, H. (2008). CDC25A Phosphatase: a Rate-Limiting Oncogene That Determines Genomic Stability. *Cancer Res* 68(5):1251-1253.
- [36] Gasparotto, D., Maestro, R., Piccinin, S., Vukosavljevic, T., Barzan, L., Sulfaro, S. and Boiocchi, M. (1997). Overexpression of CDC25A and CDC25B in Head and Neck Cancers. *Cancer Research* 57:2366-2368.
- [37] Hernandez, S., Hernandez, L., Bea, S., Cazorla, M., Fernandez, P.L., Nadal, A., Muntane, J., Mallofre, C., Montserrat, E., Cardesa, A. and Campo, E. (1998). cdc25 Cell Cycle-activating Phosphatases and c-myc Expression in Human non-Hodgkin's Lymphomas. *Cancer Research* 58:1762-1767.
- [38] Kudo, Y., Yasui, W., Ue, T., Yamamoto, S., Yokozaki, H., Nikai, H. and Tahara, E. (1997). Overexpression of Cyclin-dependent Kinase-activating CDC25B Phosphatase in Human Gastric Carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 88:947-952.
- [39] Wu, W., Fan, Y., Kemp, B., Walsh, G. and Mao, L. (1998). Overexpression of cdc25A and cdc25B Is Frequent in Primary Non-Small Cell Lung Cancer but Is Not Associated with Overexpression of c-myc. *Cancer Research* 58:4082-4085.
- [40] Hernandez, S., Bessa, X., Bea, S., Hernandez, L., Nadal, A., Mallofre, C., Muntane, J., Castells, A., Fernandez, P.L., Cardesa, A. and Campo, E. (2001). Differential Expression of cdc25 Cell-Cycle-Activating Phosphatases in Human Colorectal Carcinoma. *Laboratory Investigation* 81:465-473.
- [41] Ito, Y., Yoshida, H., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Kuma, K. and Miyauchi, A. (2004). Expression of cdc25A and cdc25B Phosphatase in Breast Carcinoma. *Breast Cancer* 11:295-300.
- [42] Lock, L.F., Wickramasinghe, D., Ernst, M.K., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Donovan, P.J. (1996). The Cdc25 genes map to Mouse Chromosomes 2, 9, and 18. *Mammalian Genome* 7:771-772.
- [43] <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CDC25AID40004ch3p21.html>
- [44] Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F. and Draetta, G.F. (2000). Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Reports* 1:71-79.
- [45] Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J. and Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434:864-870.
- [46] Vigo, E., Müller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C. and Helin, K. (1999). CDC25A Phosphatase Is a Target of E2F and Is Required for Efficient E2F-Induced S Phase. *Molecular and Cellular Biology* 19:6379-6395.

- [47] <http://www.nlm.nih.gov/visibleproofs/education/dna/pcr.pdf>
- [48] IARC (2002). Breast cancer screening, *IARC handbooks for cancer prevention*, volume 7, Lyon, International Agency for Research on Cancer, IARC press.
- [49] Özmen, V. Dünya’da ve Türkiye’de Meme Kanseri Tarama (Screening) ve Kayıt Programları. *Ulusal Kanser Dayanışma Kurulu Kitap 28*.
- [50] Özmen, V. *Dünya’da ve Türkiye’de Meme Kanseri*. Meme Sağlığı Dergisi, 7-9.
- [51] Cao, W., Hashibe, M., Rao, J.Y., Morgenstern, H. and Zhang, Z.F. (2003). Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detection and Prevention 27*:397–404.
- [52] Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M. and Yaros, M.J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res. 37*:646–650.
- [53] Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Beljanski, M. (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology (Basel)*, 46:318–322.
- [54] Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.D. and Knippers, R. (2001). DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Research 61*:1659–1665.
- [55] Ingvarsson, S. (2003). Molecular Genetics of Breast Cancer. *Int J Hum Genet 3*(2):69-78.
- [56] Cabadak, H. (2008). *Hücre Siklusu ve Kanser*. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 9(3):51-61.
- [57] Cozma, D., Lukes, L., Rouse, J., Qiu, T.H., Liu, E.T. and Hunter, K.W. (2002). A Bioinformatics-Based Strategy Identifies c-Myc and Cdc25A as Candidates for the Apmt Mammary Tumor Latency Modifiers. *Genome Research 12*:969-975.
- [58] Bozdoğan, A., Özçınar, B., Özkan Gürdal, S., Müslümanoğlu, M., İğci, A., Keçer, M., Özmen, V. (2010). Evre 1 Meme Kanseri Hastalarında Mortaliteyi Etkileyen Faktörler. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi, İstanbul, Türkiye. *The Journal of Breast Health*. Vol: 6 • No: 3.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Işık Didem KARAGÖZ

Doğum Yeri ve Yılı: Gaziantep, 20 Mart 1981

Medeni Hali: Evli

Tel: 0342 317 19 43

E-mail: karagoz@gantep.edu.tr

20/03/1981 tarihinde Gaziantep ilinde doğdu. İlkokul eğitimini Antalya Dr. İlhami Tankut İlkokulu'nda, Ortaokul eğitimini Gaziantep Dayı Ahmet Ağa İlköğretim Okulu'nda ve Lise eğitimini Antalya Aldemir Atilla Konuk Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2003 yılında mezun olarak Biyolog ünvanını aldı. Aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD Moleküler Biyoloji BD'da yüksek lisans öğrenimine başladı. 2006 yılında yüksek lisans programını tamamlayarak aynı anabilim dalında doktora öğrenimine başladı. 2009 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde "Uzman Moleküler Biyolog" olarak göreve başladı. Halen aynı anabilim dalında görevine ve doktora öğrenimine devam etmektedir. Evli ve 1 çocuk annesidir.

TEZDEN ÇIKAN YAYIN

- Karagoz I.D., Ozaslan M., Cengiz B., Kalender M.E., Kilic I.H., Oztuzcu S., Gogebakan B. Ve Demiryurek A.T. (2010). *CDC25A* gene 263C/T, -350C/T, and -51C/G polymorphisms in breast carcinoma. *Tumor Biol.* 31:597-604.