



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDOMETRİYUM KANSERİNDE *RASSF1A* VE
RASSF2A TÜMÖR BASKILAYICI GENLERİNİN
PROMOTOR METİLASYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Habibe Nur ATMACA

**Samsun
Haziran-2019**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDOMETRİYUM KANSERİNDE *RASSF1A* VE
RASSF2A TÜMÖR BASKILAYICI GENLERİNİN
PROMOTOR METİLASYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Habibe Nur ATMACA

**Danışman
Doç.Dr. Şengül TURAL**

**Samsun
Haziran-2019**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Habibe Nur ATMACA tarafından Doç.Dr. Şengül TURAL danışmanlığında hazırlanan Endometriyum Kanserinde *RASSF1A* ve *RASSF2A* Tümör Baskılayıcı Genlerinin Promotor Metilasyon Analizi başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 10/06/2019 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet Elbistan

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Nevin Karakuş

Gazi Osman Paşa Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Şengül Tural

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

...../...../.....

Prof. Dr. Ahmet UZUN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans tez danışmanım sayın Doç.Dr. Şengül Tural'a her zaman göstermiş olduğu nezaketi, hoşgörü ve içtenliğinden dolayı, ayrıca tez sürecinde verdiği destek, tavsiye ve rehberliğinden dolayı çok teşekkür ederim.

Yine yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım OMÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Nurten Kara ve öğretim üyesi Prof.Dr.Mehmet Elbistan'a ve diğer tüm OMÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmamıza klinik olarak destek veren OMÜ Patoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Seda Gün ve OMÜ Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Davut Güven ile Öğr. Gör. Dr. Ayşe Zehra Özdemir'e teşekkür ederim.

Özel olarak tez çalışmam boyunca her türlü yardımı sağlayan ve bu çalışmaya en büyük desteği veren OMÜ Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği çalışanı arkadaşım Asist. Dr. Yunus Katırcı'ya, yüksek lisans arkadaşım Zelifa Koçoğlu'na, ayrıca OMÜ Patoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Laboratuvarı çalışanı Seher Kara'ya ve OMÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Arş.Gör. Zülfinaz Betül Çelik'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Son olarak maddi ve manevi desteklerini, inançlarını ve sevgilerini hep hissettiğim, hep yanımda olan kıymetli anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.18.012 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

ENDOMETRİYUM KANSERİNDE *RASSF1A* VE *RASSF2A* TÜMÖR BASKILAYICI GENLERİNİN PROMOTOR METİLASYON ANALİZİ

Amaç: Çalışmamızda *RASSF1A* ve *RASSF2A* tümör baskılayıcı genlerinin hipermetilasyon durumlarının endometriyal kansere etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal Metod: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde Endometriyal CA tanısı konan 15 hasta çalışmaya dâhil edildi. EDTA'lı tüplere periferik kan örnekleri alındı. Ayrıca, Endometriyal CA tanısı konulmuş bu 15 hastanın Ondokuz Mayıs Üniversitesi Patoloji bölümünden, formaline fikse edilmiş parafin gömülü tümör doku örnekleri temin edildi. Kontrol grubu için, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden sezeryan doğum sırasında 10 sağlıklı kadından rahim doku örnekleri alındı. Periferik kan, rahim doku ve parafine gömülü tümör doku örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra DNA örneklerine bisülfid modifikasyon yöntemi uygulandı ve metilasyon spesifik PCR yapıldı. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek, *RASSF1A* ve *RASSF2A* genlerinin promotor CpG metilasyon analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar SPSS ve Ki-kare analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: *RASSF1A* geni promotor bölgesi metilasyona spesifik PCR analizi sonuçları, hasta kanı, tümör dokusu ve kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken ($p=0,08$), *RASSF2A* geni promotor bölgesi metilasyona spesifik PCR analizi sonuçları, hasta kanı, tümör dokusu ve kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark görüldü ($p<0,001$).

Sonuç: Çalışmamızın sonucuna göre, Türk popülasyonunda *RASSF1A* geni promotor bölgesi metilasyonu endometrium kanseri gelişiminde önemli bir rol oynamazken, *RASSF2A* geni promotor bölgesi metilasyonunun önemli derecede rol oynadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Endometriyal kanser; *RASSF1A* tümör baskılayıcı geni; *RASSF2A* tümör baskılayıcı geni; metilasyon; promotor bölge

Habibe Nur ATMACA, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran - 2019

ABSTRACT

PROMOTER METHYLATION ANALYSIS OF *RASSF1A* AND *RASSF2A* TUMOR SUPPRESSOR GENES IN ENDOMETRIUM CANCER

Aim: In this study, it is aimed to evaluate effects of *RASSF1A* and *RASSF2A* tumor suppressor genes hypermethylation status in endometrial cancer.

Material and Method: We evaluated 15 endometrial CA diagnosed patients in Ondokuz Mayıs University Obstetrics and Gynecology Clinic. Peripheral blood samples were taken into EDTA tubes. Besides, formalin fixed paraffin embedded tumor tissue samples of these 15 patients were collected from Ondokuz Mayıs University Pathology Department. For control group, womb tissue samples of 10 healthy women were taken in Cesarian section delivery operation from Ondokuz Mayıs University Obstetrics and Gynecology Clinic. DNA isolations were performed from peripheral blood, womb tissue and paraffin embedded tumor tissue samples. Then, bisulfite modification method was applied to DNA samples and methylation specific PCR was performed. PCR products were analyzed in agarose gel and *RASSF1A* and *RASSF2A* genes' promoter CpG methylation status were registered. The results were evaluated with SPSS and Chi square statistical analysis.

Results: As a result of the study, there is no statistical significant difference of *RASSF1A* gene promoter region methylation status between patients' blood and tumor tissue samples and healthy womb tissue samples ($p=0.08$). Also according to results of *RASSF2A* gene promoter region methylation status, there is statistical significant difference when comparing patients' blood and tissue samples and healthy womb tissue samples ($p<0.001$).

Conclusion: According to results of our study, *RASSF1A* gene promoter region methylation status doesn't have an important role in endometrium cancer cases in Turkish population. However, *RASSF2A* gene promoter region methylation status has an important role in endometrium cancer cases in Turkish population.

Keywords: Endometrial cancer; *RASSF1A* tumor suppressor gene; *RASSF2A* tumor suppressor gene; methylation; promoter region

Habibe Nur ATMACA, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, June – 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bp	: Baz Çifti
CA125	: Kanser Antijeni 125
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
Chk	: Kontrol Noktası Kinazı
COCP	: Kombine Kontraseptif İlaç
CTNNB1	: Beta Catenin
Cyc	: Siklin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNMT	: DNA Metil Transferaz
DNMTi	: DNA Metil Transferaz İnhibitör
DNDME	: DNA Demetilaz
DNDMEi	: DNA Demetilaz İnhibitör
dNTP	: Deoksinükleosit trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ED	: Endometriyal Doku
EK	: Endometriyal Kan
EtBr	: Etidium Bromür
FM	: Forward Metile
FU	: Forward Unmetile
FFPE	: Formalin Fikse Edilmiş Parafin Gömülü
FGFR2	: Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör

HRT	: Hormon Değiştirme Tedavisi
HNPCC	: Kalıtsal Nonpolipozis Kolorektal Kanser
H	: Histon
HHSCC	: Baş ve Boyun Skuamöz H¼cre karsinomu
HAT	: Histon Asetil Transferaz
HDAC	: Histon Deasetilaz
HMT	: Histon Metil Transferaz
IUD	: Intrauterine Device (Rahimiçi aygıt)
lncRNA	: Uzun Kodlamayan RNA
LH	: Lutein Hormon
miRNA	: Mikro RNA
MgCl	: Magnezyum Klor¼r
mL	: Mililitre
¼L	: Mikrolitre
siRNA	: Kısa M¼dahaleci RNA
PD	: Parafin Doku
PTM	: Post Translasyonel Değişim
PCOS	: Polikistik Yumurtalık Sendromu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribon¼kleikasit
RASSF	: Ras Bağımlı Domain Ailesi
Rpm	: Revolution per minute / Dakikada devir sayısı

RM : Reverse Metile
RU : Reverse Unmetile
TBE : Tris Borate EDTA
UV : Ultraviolet



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	
.....	ix
.....	1
.....	12
BİLGİLER.....	3
2.1 Endometriyal Kanser.....	3
2.2 Endometriyal Kansere Neden Olan Etkenler.....	4
2.2.1 Hormonel Etkenler.....	5
2.2.2 Genetik Etkenler.....	5
2.3 Endometriyal Kanserden Korunma Yolları.....	7
2.4 Endometriyal Kanseler ve Sınıflandırmaları.....	8
2.4.1 Karsinoma.....	9
2.4.2 Sarkoma.....	11
2.5 Endometriyal Kanserde Evreleme (FIGO 2009 Evrelemesi).....	11
2.6 Epigenetik Değişimler.....	13
2.6.1 DNA Modifikasyonları.....	15
2.6.2 Kromatin Yeniden Şekillenmesi.....	17
2.6.3 Histon Modifikasyonları.....	18
2.6.4 Kodlamayan RNA (Noncoding RNA).....	21
2.7 Epigenetik Değişimler ve Endometriyal Kansere İlişkisi.....	24
2.7.1 DNA Modifikasyonları.....	24
2.7.2 Histon Modifikasyonları.....	28
2.8 Endometriyal Kansere ve miRNA.....	33
2.9 RASSF Tümör Baskılayıcı Gen Ailesi.....	34
2.9.1 RASSF Proteinlerinin Biyolojik Fonksiyonları.....	36
2.9.2 RASSF Proteinlerinin Epigenetik Düzenlenmesi.....	48
2.9.3 RASSF Proteinlerinin Düzenlenmesinde Diğer Mekanizmalar.....	56
3.MATERYAL VE METOD.....	62
3.1 Klinik Örneklerin Toplanması ve Karakterizasyonu.....	62

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler, Solüsyonlar ve Cihazlar.....	62
3.3 DNA İzolasyon Yöntemi.....	65
3.3.1 Hazırlık.....	65
3.3.2 Protokol.....	65
3.3.3 Hazırlık.....	66
3.3.4 Protokol.....	67
3.3.5 Hazırlık.....	68
3.3.6 Protokol.....	68
3.4 DNA Miktar Tayini.....	69
3.5 Bisülfid Modifikasyonu.....	69
3.5.1 Hazırlık.....	70
3.5.2 Protokol.....	70
3.6 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Amplifikasyonu.....	71
3.6.1 <i>RASSF1A</i> PCR Protokol.....	72
3.6.2 <i>RASSF2A</i> PCR Protokol.....	74
3.7 PCR Ürünlerinin Analizi.....	75
3.7.1 Protokol.....	75
3.8 İstatistiksel Analiz.....	75
4. BULGULAR.....	76
4.1 Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri.....	80
4.2 <i>RASSF1A</i> ve <i>RASSF2A</i> Tümör Baskılayıcı Genleri Metilasyon Spesifik PCR Analiz Sonuçları.....	83
4.3 Hasta ve Kontrol Gruplarında <i>RASSF1A</i> ve <i>RASSF2A</i> Genleri Metilasyon Durumlarının İstatistiksel Analiz Sonuçları	87
5. TARTIŞMA.....	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR.....	99
EKLER.....	118
ÖZGEÇMİŞ.....	122

1. GİRİŞ

Endometrium; rahim iç zarı olarak bilinir ve endometriyal kanser dendiğinde rahim iç zarı kanseri kastedilmektedir. Uterus (rahim), alt kısımda vajinaya uzanan serviks (rahim ağzı) ve üst kısımda korpus (gövde) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Korpusun da iki kısmı vardır ve endometrium gövdenin iç kısmıdır. Neredeyse tüm endometriyal kanserler, endometriumun salgı yapan hücrelerinde oluşur ve bu kanser türüne endometrium adenokarsinoma denir. Endometrium adenokarsinoma en yaygın endometriyal kanser türü olmakla beraber diğer türler daha nadir görülür.

Menopoz bir hastalık olmayıp, kadınlarda yaşlanmanın doğal bir belirticidir. Sağlıklı her kadında belli bir yaştan sonra yumurtlama süreci sonlanır. Bu da östrojen üretimini azaltır ve yumurtalıkların küçülmesine, sonucunda da adet kanamalarının kesilmesine yol açar. Yunanca mens (ay) ve pause (durmak) sözcüklerinden türemiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre menopoz; yumurtalıkların aktivitelerinin kaybolması sonucu adet döngüsünün kalıcı olarak kesilmesidir. Dünya genelinde menopoz yaşı ortalama 45-55 yaş arasındadır. Türkiye' de ortalama menopoz yaşı ise 45-48 yaş arası olarak seyrederek.

Menopoza girmeyi etkileyen faktörlerin arasında genetik faktörler, genital faktörler, psikolojik faktörler, fiziki ve çevresel faktörler ayrıca sosyo-ekonomik faktörler gelir. Bir ailedeki kadınların menopoza girme yaşları ortalama aynı yaşlar olarak seyrediyorsa bu durumda genetik faktörlerden söz etmek mümkündür. Yine düzensiz adet gören kadınların, düzenli adet görenlere kıyasla daha erken menopoza girmesinde genital faktörlerden söz edilir. Ayrıca doğurganlık durumları, ilk adet yaşları, doğum kontrol ilacı kullanmaları ve iki yıldan uzun emzirme de menopoz yaşını etkileyen etkenler arasındadır. Bunun yanı sıra, savaş, göç, deprem ve travmaların da erken menopozu tetikleyen birer psikolojik faktör olduğu düşünülmektedir. Fiziki ve çevresel faktörler arasında soğuk iklim ve aşırı yağış gibi ağır iklim koşullarının yaşandığı bölgeler göz önünde bulundurulur ve buralarda yaşayan kadınların erken menopoza girdiği görülür. Sosyo-ekonomik faktörler arasında da kırsal ve kentsel toplumlar, ayrıca beslenme ve yaşam koşulları ele alınır ve menopozda bunların da etkili olabileceği düşünülür. Tüm bu faktörlerin yanında ek olarak, sigara tüketiminin yoğun olduğu kadınlarda olmayanlara oranla 1-2 sene erken menopoza girdiği görülmektedir.

Tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenlerler ve apoptoz sürecini başlatırlar. Bu genler tarafından kodlanan proteinler, DNA hasarına veya dış çevreden gelen büyümeyi baskılayan sinyallere yanıt olarak hücre döngüsü sürecini durdurabilmektedir. Fakat bu genler mutasyona uğradıklarında veya inaktif olduklarında işlevlerini kaybederler. Bunun sonucunda da hücreler kontrolsüz bir şekilde büyüme ve bölünmeye giderler.

RASSF1A ve *RASSF2A* da tümör baskılayıcı genler olup, endometriyal kanserde promotor bölgede hipermetilasyona uğradığı yani değiştiği, bu değişimin de ekspresyonlarını inaktive ettiği düşünülür. Böylece kanser oluşumunu önleyici proteinlerin oluşumunu da azaltır, kanser hücrelerinin metastazına katkı sağlar.

Bu çalışmada, Türk kadın hastalarda *RASSF1A* ve *RASSF2A* tümör baskılayıcı genlerinin endometriyal kanserde etkisini, genlerin promotor bölgelerindeki metilasyon durumlarını ve kanser ile aralarındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

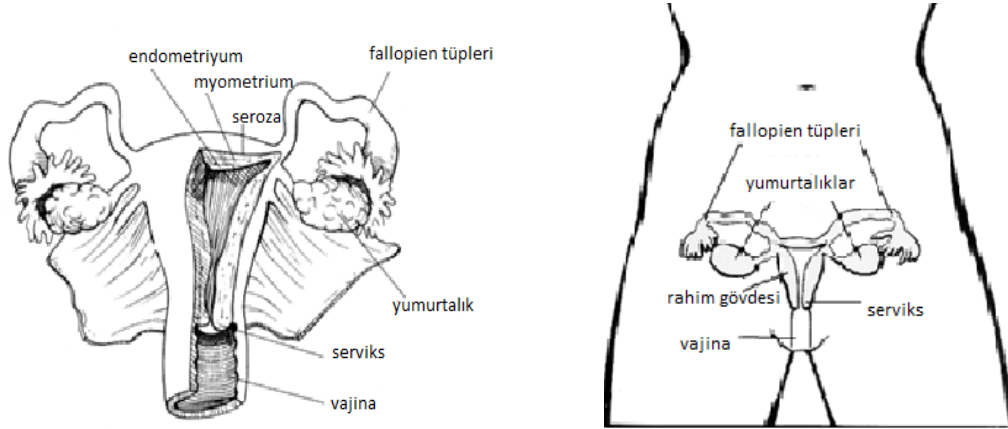
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Endometriyal Kanseri

Endometriyal kanser; endometriumda oluşan, hücrelerin kontrolsüz ve anormal şekilde gelişimini, vücudun diğer bölgelerine yayılmasını sağlayan ve yaygın malignansiler arasında 7. sırada olan bir kadın hastalığıdır (Yeremian ve ark., 2013; Llobet ve ark., 2009; Bray ve ark., 2018). Endometrium ise; rahim (uterus) boyunca uzanan, rahim içi zarı olarak bilinen ve belirli periyodlarla adet kanamasında rahim içinden dökülen dokudur (Richard ve ark., 2014; Rick ve ark., 2019).

Endometriyal kanseri ve endometriumu iyi tanımlayabilmek için kadın üreme sisteminin iyi bilinmesi gerekir.

Örneğin; rahim yani uterus oyuk şekilde bir organ olup, hamilelikte fetusun geliştiği kısımdır. Vajinaya uzanan alt kısmı serviks, üst kısmı ise korpus olarak bilinir. Rahim kanserinden bahsedilirken, serviks değil korpus kastedilir. Korpus; iç katman olan endometrium ve dış katman olan myometrium olmak üzere iki kısımdan oluşur. Kalın dış katman olan myometrium; doğumda bebeği iten kaslardan oluşur ve burada uterus dışını çevreleyen doku tabakası seroza bulunur (Rick ve ark., 2019). Şekil 1 ve 2' de kadın üreme sistemi gösterilmektedir.



Şekil 1 ve 2. Kadın üreme sistemi (Richard ve ark., 2014; Rick ve ark., 2019)

Kadınların adet döngüsünde hormonlar endometriumu değiştirirler. Döngünün ilk zamanlarında yumurta salınımından önce yumurtalıklar, **östrojen** hormonu üretirler. Östrojen endometriumu kalınlaştırır ve hamilelik durumu varsa embriyonun beslenmesine katkı sağlar. Hamilelik yoksa östrojen az üretilir, bunun yerine yumurtlamadan sonra daha çok üretilen ve dökülmeyi sağlayan **progesteron** hormonu vardır (Rick ve ark., 2019). Bu hormon; kadın rahmini her ay düzenli bir şekilde hazırlayan, embriyogenez, gebelik ve adet döngüsüne etki eden ve lutein hormonunun (LH) denetiminde yumurtalıklarda salgılanan bir cinsiyet ve steroid hormonudur (Margueritte ve ark., 1995). Adet döngüsü sonunda endometriyal hat rahimden dökülürken, adet akıntısı periodu gerçekleşir. Menopoza kadar bu döngü devam eder (Rick ve ark., 2019).

Endometriyal kanserin ilk belirtisi, menstrual periyod yani adet döngüsü ile bağlantılı olmayan menopoz sonrası bir vajinal kanama olarak kendini gösterir (Reynolds ve Loar, 2010). Ayrıca dizüri olarak bilinen idrar yapılırken ağrı, disparoni olarak bilinen ağrılı cinsel birleşme ve pelvis ağrısı da diğer semptomlardır (Saso ve ark., 2011)

Endometriyal kanser, uterus iç epitel tabakadan doku örneği almak suretiyle biyopsi veya dilatasyon (serviks genişletilmesi) ve küretaj (rahim duvarından parça alınması) ile teşhis edilebilir (Hoffman ve ark., 2012). Abdominal histerektomi yani rahimin tamamen alınması, ayrıca yumurtalıktan rahime yumurta taşınmasını sağlayan fallopien tüpleri ile her iki yumurtalığın da rahimle beraber alınması olan salpingo oofektomi, ilk tercih edilen tedavi yoludur. İleri vakalarda kemoterapi, radyasyon terapisi ve hormon tedavisi uygulanır.

2.2 Endometriyal Kansere Neden Olan Etkenler

Yaygın olarak menopozdan sonra oluşan endometriyal kansere çeşitli etkenler yol açar. Bunların başında hormonal etkenler ve genetik etkenler olmak üzere, popülasyonlar arası farklılık ve çevresel faktörler gelir (Ma ve ark., 2013). Çünkü popülasyonlar arası yaşam stilleri, sosyo-ekonomik imkânlar ve beslenme alışkanlıkları farklılık gösterir. Ayrıca kimyasallar, UV ve radyasyon gibi zararlı etkenlere maruz kalmak da tüm kanserlerde olduğu gibi endometriyal kansere yol açabilir.

2.2.1 Hormonel Etkenler

Endometriyal kanser vakalarının yaklaşık %40' ı obezite ile ilişkilendirilir. Obezitede, adipoz dokusunun fazlalığı ile androstenedion' un östrojene dönüşümünde artış olur (Bernard ve ark., 2014). Kandaki fazla östrojen de az yumurta oluşumuna veya hiç oluşturmamaya yol açabilir (Soliman ve ark., 2013). Bu sebeple östrojen maruziyeti başta olmak üzere kan basıncı değişimi, diyabet, meme kanseri ve tamoxifen kullanımı kanserli hastalarda yaygın görülen belirtilerdir (Richard ve ark., 2014; Saso ve ark., 2011) . Östrojen; tek başına endometriyal kanser riskini artıran bir faktördür. Fakat progesteron ile birlikte bu riski azalttığı gözlemlenmiştir (Bernard ve ark., 2014). Bunun sebebi; menopozda progestin (sentetik progesteron) ile östrojenin dengeli bir şekilde hormon değiştirme tedavisinde (HRT) uygulanmasıdır. Dengeli uygulanmazsa da bir o kadar risk oluşturur. HRT, bu hormonların dolaşımının azalmasıyla ortaya çıkan rahatsızlığı önlemek için uygulanır. Dengeli verilmediği takdirde progestinin asıl etkisi olan adet döngüsü, gebelik ve embriyogenezde gerekli progesteron hormonu ile östrojenin dolaşımının azalması ortaya çıkar (Soliman ve ark., 2013).

Obezite ile aynı sebeplerle düzensiz yumurta oluşumuna veya hiç oluşmamasına sebep olan ve yüksek androjen fazlalığı görülen polikistik yumurtalık sendromu (PCOS) da endometriyal kanser ile büyük oranda ilişkilidir (Reynolds ve ark., 2010).

2.2.2 Genetik Etkenler

Genetik faktörlerin de endometriyal kansere neden olduğu düşünülmektedir. Kalıtımın %2-10' unun endometriyal kanserde etkisi bilinmektedir. Başta gelen Lynch Sendromu (HNPCC) otozomal dominant kalıtmı bir hastalık olup, öncelikle kolon kanseri ayrıca menopoz öncesi endometriyal kanserle de ilişkilendirilir (Kastrinos ve ark., 2009). Yumurtalık kanseri, abdominal kanser olan karın kanseri, bağırsak kanseri, beyin ve cilt kanseri ile ilişkili olan bu sendromun, DNA tamir mekanizmalarından yanlış eşleşme mekanizmasının bozulmasıyla ortaya çıkabildiği bildirilmiştir (Bellizzi ve Frankel, 2009).

Lynch Sendrom' lu kadınların %40-60' ı endometriyal kansere yakalanma eğilimindedirler ve bu kadınlarda kolon ve yumurtalık kanserinin gelişme eğilimi daha düşüktür (Hoffman ve ark., 2012). Endometriyal kanserle yumurtalık kanseri eş zamanlı gelişirken, kolon kanseri erken gelişir (Ma ve ark., 2013).

Yanlış eşleşme tamirine katılan *MLH1* ve *MLH2* genlerinin mutasyonları, Lynch Sendromu' nun temel sebebidir. Mutasyona uğrayan diğer genler ise *MSH2*, *MSH6* ve *PMS2* olup bunlar da yanlış eşleşme tamir mekanizmasının genleridir. *MLH1* gen mutasyonunun endometriyal kanser için risk faktörü olma oranı %54 iken, bu oran *MSH2* gen mutasyonunda %21, *MSH6* gen mutasyonunda ise %16' dır (Burke ve ark., 2014).

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinin, kadınlarda başka kanserlere yol açtığı, fakat endometriyal kansere yol açmadığı bildirilmiştir (Burke ve ark., 2014).

Otozomal dominant kalımlı Cowden Sendromu endometriyal kansere yol açabilir. Bu sendromu taşıyan kadınların endometriyal kanser riskinin %5-10, etkilenmeyen kadınların endometriyal kanser riskinin ise %2-3 olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Ma ve ark., 2013). Cowden Sendromu, tümör baskılayıcı bir gen olan *PTEN*' deki mutasyondan kaynaklanmaktadır ve *PTEN* proteininin doğru çalışmayarak mTOR yolağının hiperaktivitesine yol açmaktadır (Eng, 1998).

Normal endometrium hücre gelişimindeki hatalar endometriyal kansere yol açabilir. Genelde yaşlanan ve hasar gören hücreler ölür ve yeni hücreler eskilerinin yerini alır. Fakat ölmesi gereken hasarlı hücrelerin ölmemesi ve yeni hücrelerin üretilmesi ile kanser gerçekleşir. Böylece fazla hücre ve doku birikimi ile tümör gelişiminin önü açılır. Bu hücreler kanser hücreleri olup, normal hücrelerden farklı gelişme ve yayılma gösterirler (Coleman ve ark., 2013; Kurra ve ark., 2013).

Endometriyal kanserlerin %10-20' sinde genelde en yüksek olan üçüncü seviye mutasyonlar bulunmaktadır. Bunlara, tümör baskılayıcı genlerden *PTEN* veya *P53* gen mutasyonları yol açar.

Endometriyal hiperplazilerin, yani rahim astarı veya endometriumda aşırı hücre üretiminin %20' sinde ve endometroid kanserlerin %50' sinde, *PTEN* null mutasyonu veya aktif olmayan mutasyon tespit edilmiştir. Null mutasyon; lokusta genin normal fonksiyonu olmayan mutant bir gen kopyasının bulunması sonucunda gen ürününün tamamen eksikliğine yol açarken, aktif olmayan mutasyon ise fonksiyonunu kaybeden gen ürününe sebep olan mutasyondur.

Alel fonksiyonunu tamamen kaybederse null alel olarak isimlendirilir. Bu mutasyonlar sonucu *PTEN* az etkili veya etkisiz hale gelmiştir (Thaker ve Sood, 2012).

PTEN fonksiyonunun kaybı ile PI3k/Akt/mTOR yolağı yeniden düzenlenir ve hücre gelişimine sebep olur (Chappel ve ark., 2011). Endometriyal kanserde P53 yolağı da baskılanmış veya fazla aktive edilmiştir. Mutant *P53*'ün fazla ekspresyonu ile kanser agresif bir hal alır (Thaker ve Sood, 2012).

Obez kadınlarda, *PTEN* ve *P27* genlerinin fonksiyonunu kaybetmesine yol açan mutasyonlar görülür. Bunun yanı sıra, endometriyal kanserde eksprese edilen epidermal gelişim faktörü *Her2/neu* onkogeni tanı ve teşhis için düşük veriler sağlarken, *CTNNB1* (*β -catenin*) bir transkripsiyon geni olup, mutasyonu endometriyal kanserlerin %14-44'ünde görülmektedir. *Beta catenin* mutasyonlarına endometriyal kanser epitel hücrelerinde rastlanmaktadır (Thaker ve Sood, 2012). Aynı şekilde, embriyonik gelişim, doku tamiri, hücre bölünmesi ve farklılaşmasında önemli rolü olan *FGFR2* (fibroblast growth factor receptor2) mutasyonlarına endometriyal kanserlerin %10'unda rastlanmaktadır. Ancak verileri henüz güvenilir değildir. Bir başka tümör baskılayıcı gen olan *SPOP*'un (speckle type BTB/POZ protein) ise endometriyal kanserlerin %9'unda mutasyona uğradığı bildirilmiştir (Mani, 2014).

2.3 Endometriyal Kanserden Korunma Yolları

Sigara kullanımı endometriyal kanser için koruyucu görev görür. Çünkü östrojen metabolizmasının değişikliğini engeller, erken menopoz ve kilo kaybına yol açar. Bu etki, kullanım durdurulduğunda son bulur. Ayrıca, progestin kullanımı da endometriyal kanser için koruyucu bir faktördür (Winner ve ark., 2012).

Progestin, doğum kontrol ilaçları olarak bilinen ve gebelik önleyici olan kombine oral kontraseptif (COCP) ilaç grubunda östrojenle birlikte, ayrıca rahim içine yerleştirilen gebelik önleyici IUD (intrauterine device) cihazında bulunur. Bu ilaçların kullanımı endometriyal kanser riskini erteler (Winner ve ark., 2012; Richard ve ark., 2014).

Obez kadınlara endometriyal kanserden korunmak için yüksek dozda progestin kullanması önerilmektedir. Ayrıca fazla doğum yapmak riski %35 azaltırken, 18 aydan fazla anne sütü vermek endometriyal kanser riskini %23 azaltmaktadır. Bunun yanı sıra, fiziksel aktivitelerin artırılması da kadınlarda bu riski % 38 oranında azaltmaktadır (Aune ve ark., 2015; Bergström ve ark., 2001).

2.4 Endometriyal Kanserler ve Sınıflandırmaları

Endometriyal kanser; servikte tümör oluşumu ile oluşan servikal kanser, rahimdeki bağ doku ve düz kaslarda tümör oluşumu ile oluşan uterin sarkoma ve hamilelikte kontrolsüzce rahim içinde çoğalan tümör hücrelerinin yol açtığı trofoblastik hastalıklar gibi çeşitli uterin kanserlerden ayrılır (Bernard ve ark., 2014). En yaygın endometriyal kanser çeşidi endometrioid karsinomadır (adenokarsinoma) ve vakaların %80' den fazlasını kapsar (Richard ve ark., 2014). Diğer tipler ise az yaygın olup, daha agresiftirler ve rahim dışına çabuk yayılma gösterirler (Rick ve ark., 2019).

Kanserler görüldükleri yer ve yayılma oranına göre sarkoma ve karsinoma olmak üzere 2' ye ayrılırlar. **Sarkoma**; kas, yağ, kemik, tendon ve bağlardan oluşan fibroz dokuda görülen kanserlerdir. **Karsinoma** ise; epitel hücrelerde başlayan ve organlara yayılan kanserdir. Rahim kanserlerinin %95' i karsinomadır. Servikte başlarsa servikal karsinoma, endometriumda başlarsa endometriyal karsinoma olarak adlandırılır (Murali ve ark., 2014).

Endometriyal kanser, rahimin üst bölgesinde ise yumurtalıklara ve fallopien tüplerine yayılır fakat rahimin alt bölgesinde ise servikse yayılır. Kanser öncelikle döl yatağı kası olan myometriuma ve epitel hücrelerin ince zarı olan serozaya, ardından üreme ve lenfatik sisteme de yayılır. Metastazların daha ötesi kan yoluyla akciğer, karaciğer, beyin ve kemiğe de yayılmasıdır (Hoffman ve ark., 2012).

Endometriyal karsinomalar için geleneksel sınıflandırma klinik veya endokrin özelliklerine göre gerçekleştirilir. Bunlar tip I ve tip II olmak üzere 2' ye ayrılırken, histolojik özelliklerine göre ise seröz (salgı), şeffaf hücre ve yumuşak doku malignansileri olmak üzere 3' e ayrılır. Yaygın olanı Tip I ve II olarak sınıflandırmadır (Murali ve ark., 2014).

1. ve 2. seviye olan düşük seviyeli kanserlerde kanser dokuları bez ya da kese biçimindedir. 3. seviye yüksek dereceli kanserlerde ise bez şeklinde olmayıp gelişigüzel bir formdadır.

1. ve 2. seviye endometrial kanserler **Tip I** olarak değerlendirilir. Bu kanserler çok agresif olmayan ve diğer dokulara çabuk yayılmayan özelliktedirler. Tip I endometriyal kanserler, aşırı östrojen sebebiyle oluşur. Endometrium hücrelerinde fazla gelişme ve hiperplazi görülür (Hoffman ve ark., 2012). Hiperplazi; kanamanın progesteronla değil östrojen etkisiyle ve kalınlaşan rahim duvarının dökülmesiyle oluşması anlamına gelir. **Tip II** kanserler ise rahim dışına yayılır ve zor tanı imkânı verir. Bu kanserlerin içine 3. seviye kanserler girer (Rick ve ark., 2019).

2.4.1 Karsinoma

Adenokarsinoma olarak da bilinir ve en yaygın endometrioid kanser tipidir. Vakaların %75-80' ini kapsar. Endometriumda bulunan epitel hücrelerdeki tek katmandan ortaya çıkarlar ve kese şeklinde hücrelerden oluşan ve normal endometriuma benzeyen bir görüntüsü vardır. Bazı kanserler ise yassı hücrelerden oluşan ve serviksin dış yüzeyinde ince katman şeklinde görülen keselerdir. Düşük seviyeli olan türleri myometriumu istila etmez ve diğerlerinden ayırt edilir, fakat yüksek seviyeli olan türleri ayırt edilmez, çünkü tümör hücreleri daha kalın tabakaya sahiptir ve bezler içinde organize halde değildirler. Ayrıca zayıf ve körelmiş bir endometrium vardır (Hoffman ve ark., 2012).

Endometrioid adenokarsinomalar ile özdeşleşmiş genetik mutasyonların başında *PTEN* geni gelir. *PTEN* bir tümör baskılayıcı gendir. Ayrıca bir kinaz (fosforilasyon enzimi) olan *PIK3A*, *KRAS* geni ve sinyal transduksiyonunda görevli GTP hidrolizleyen GTPaz da bu kanserler ile alakalıdır. Hücre sinyalinde ve yapışmada gerekli *CTNNB1* (beta catenin) de endometrioid adenokarsinomada mutasyona uğrayan ve alakalı bir diğer gendir (Colombo ve ark., 2013).

Endometriyal karsinomaların Tip I ve II versiyonları olup, genetik olarak birbirlerinden farklıdır (Hoffman ve ark., 2012; Rick ve ark., 2019).

Tip I endometriyal karsinomalar genelde menopozda veya öncesinde oluşur. Tip I endometriyal kanserleri düşük seviyeli olup, myometrium yani rahim duvarını, en az işgal eden tiptir. Östrojen bağımlı olup tedaviye sonuç verebilir. Endometriyal kanserlerin %70-90 ı Tip I karsinomalarıdır (Hoffman ve ark., 2012). Tip II endometriyal karsinomalar ise menopoz sonrası yaşlılarla sıklıkla oluşur ve östrojen maruziyeti ve endometriyal dokuda normal hücre sayısının artışı olan hiperplazi ile alakalıdır.

Tip II endometriyal kanserler, yüksek seviyede görülür ve myometrium yani rahim duvarını fazla etkilerler. Bu tipler genelde seröz (serous) veya şeffaf hücre (clear cell) tiplerini kapsarken az tanı ve teşhis şansı sunar. Semptomlar görülmeye başladığında epitel yumurtalık kanseri oluşmuştur. Tip I tümörlerine oranla Tip II tümörleri görülmeye yatkınlardır ve daha şiddetlidirler, ayrıca metastaz yani yayılmaya meyillidirler (Saso ve ark., 2011).

Seröz Karsinoma

Seröz karsinomalar Tip II endometriyal tümörlerdir ve endometriyal kanserlerin %5-10' unu kapsar. Menopoz sonrası kadınlarda görülür ve endometrium zayıf ve körelmiş haldedir. Agresiftirler ve myometriumu işgal ederler, ayrıca karın boşluğunu örten zar olan peritoneum ve lenfatik sistemde metastaza yol açarlar. Pek çok atipik çekirdekleri vardır. Diğer endometriyal kanserlerden farklı yayılırlar, rahim dışında myometriuma doğru bir yayılma gösterirler (Soliman ve ark., 2013). Seröz karsinomada görülen genetik mutasyonlar kromozom kararsızlığı ve tümör baskılayıcı gen olan *TP53* gen mutasyonudur (Colombo ve ark., 2013).

Şeffaf Hücre Karsinomu

Tip II endometriyal tümörler olup endometriyal kanserlerin yaklaşık %5' ini kapsar. Seröz karsinomalar gibi agresiftirler. Düşük tanı imkânları vardır. *P53* hücre sinyal sistemi aktif değildir. Menopoz sonrası kadınlarda bu tip karsinomlar yaygındır (Saso ve ark., 2011; Soliman ve ark., 2013).

Müsinöz Karsinoma

Aşırı müsin üretimiyle belirgin salgı epitel hücreleri, bağ doku hücreleri tarafından üretilen tümörlerdir. Endometriyal kanserlerin %1-2' sini kapsar. 1. aşamadaki kanser oluşumları olduğu için iyi tanı ve teşhis sağlar. Müsin; epitel ve bağ doku hücrelerini zedelenmeye karşı koruyan glikoprotein ve mukoprotein karışımından oluşan jele benzer sıvıdır. Bu kanser aslında servikal kanserden türer (Hoffman ve ark., 2012).

Karışmış veya Farklılaşmamış Karsinomalar

Karışmış karsinomalar tip I ve II hücrelerinin her ikisini de bulundururlar. Tümörlerin %10' unu kapsarlar. Mixed Müllerian tümör (rahim, yumurtalıklar, fallopien tüpleri, epitel ve bağ dokuları kapsayan ve kötü huylu ve anormal gelişen dokulardan oluşan tümör) bu kategoriye örnektir (Johnson ve ark., 2011).

Farklılaşmamış endometriyal karsinomalar ise %1-2' den az endometriyal kanserleri kapsar. 3. seviye tümörlerdir ve teşhisi zordur. Tanımlanamayan ve normal epitel hücrelere çok benzeyen görüntüleri vardır (Hoffman ve ark., 2012).

Diğer Karsinomalar

Endometriyumda çok sık gözlenmeyen ve metastaza yatkın olmayan epitel hücrelerin bozulması ile oluşan skuamöz hücre karsinomu ve idrar yollarında görülen tranzisyonel hücre karsinomu bunlara örnektir. Bunlar nadir görülen kanserler olduklarından, nasıl tedavi edileceğine ilişkin bilgi azdır. Genetik sebepler de tam bilinmemektedir (Goodrich ve ark., 2013; Mariño-Enríquez ve ark., 2008).

2.4.2 Sarkoma

Endometriyal karsinomaların aksine, endometriyumda bağ dokusuz kanserlerdir. Agresif değildirler ama akciğer ve pelvise yayılma yapabilirler. Düşük seviye sarkomaların teşhisi kolaydır. Fakat yüksek seviye ve farklılaşmamış sarkomaların teşhisi zordur (Hensley, 2012).

2.5 Endometriyal Kanserde Evreleme (FIGO 2009 Evrelemesi)

FIGO kanser evreleme (cancer staging) sistemi ile endometriyal kanserin aşaması anlaşılabilir. Bu sisteme göre;

Evre I: Tümör uterusu sınırlıdır.

- IA: tümör uterusu hapsedilmiştir ve myometriumun yarısından azına yayılmıştır. Yani tümör derinliği myometriumun yarısını geçmemektedir.
- IB: tümör uterusu hapsedilmiştir ve myometriumun yarısından fazlasına yayılmıştır.

Evre II: Tümör uterus ve yumuşak doku olan servikal stromaya yayılmıştır ancak uterus dışına çıkmamıştır.

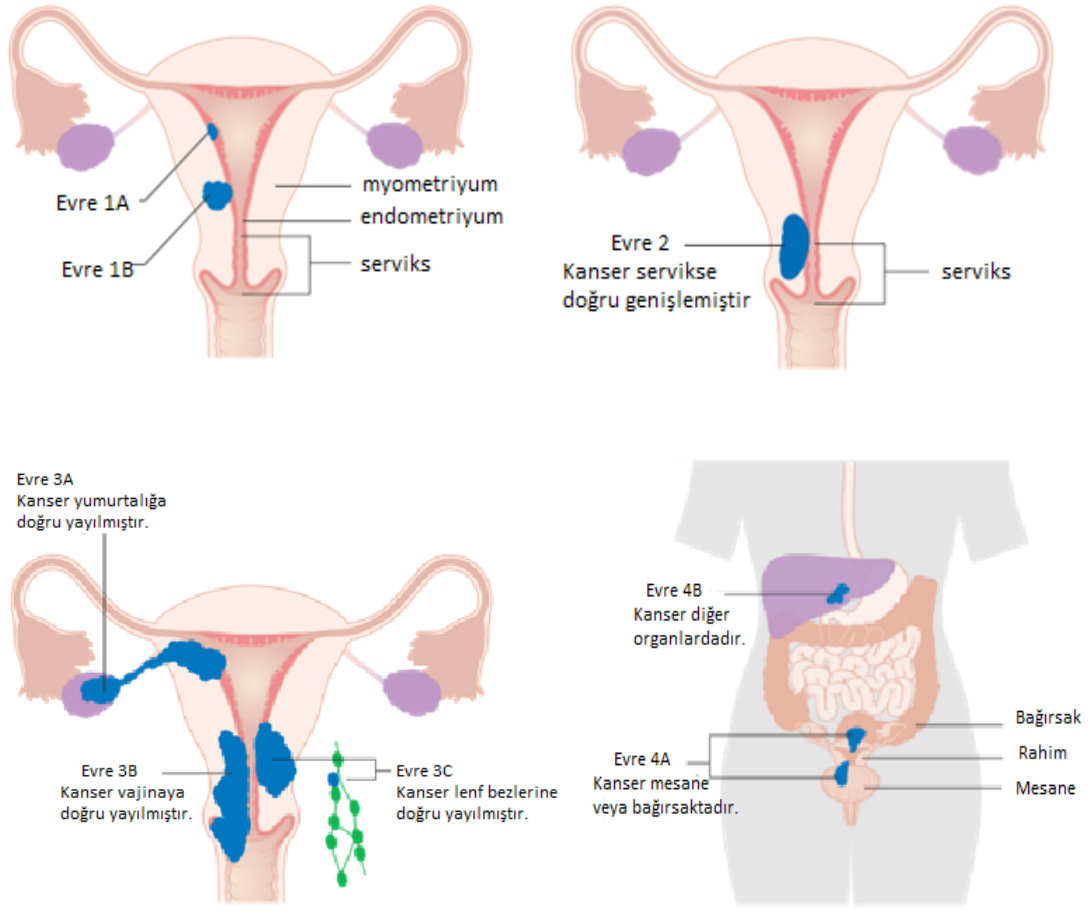
Evre III: Tümörün lokal ve bölgesel yayılımı vardır.

- IIIA: Tümör seroza ve adneksaya (uterusa işlev ve anatomik olarak bağlı yapılar, uterus eklentileri) yayılmıştır.
- IIIB: Vajinal ve parametrial (mesaneden serviksi ayıran doku) yayılım vardır.
- IIIC: Pelvik ve paraaortik lenf noduna metastaz vardır. IIIC1, pelvik lenf bezleri yayılımı, IIIC2, paraaortik (aorta yakın) lenf bezlerine yayılma mevcuttur.

Evre IV: Mesane ve bağırsak mukozası tutulumu ve uzak organ yayılması vardır.

- IVA: Mesane ve bağırsak mukozasına yayılma vardır.
- IVB: Uzak metastaz, karın içi abdominal yayılım ile kasıklardaki lenf bezlerine yayılım vardır (Richard ve ark., 2014).

Endometriyal kanser evreleri Şekil 3, 4, 5 ve 6' da sırasıyla görülmektedir.



Şekil 3, 4, 5 ve 6. Endometriyal kanser aşamaları (Richard ve ark., 2014)

Endometriyal kanser yayılırken ilk olarak tüpler, yumurtalıklar ve lenf nodlarına yayılır. Serviks, vajina ve akciğerlere de yayılabilir. İlerlemiş kanser mesane ve kalın bağırsağı tutabilir (Solmaz ve ark., 2016). Myometrial yayılma ve pelvikle para aortik lenf bezlerine yayılma hastalarda en yaygın görülen yayılmadır (Kong ve ark., 2012).

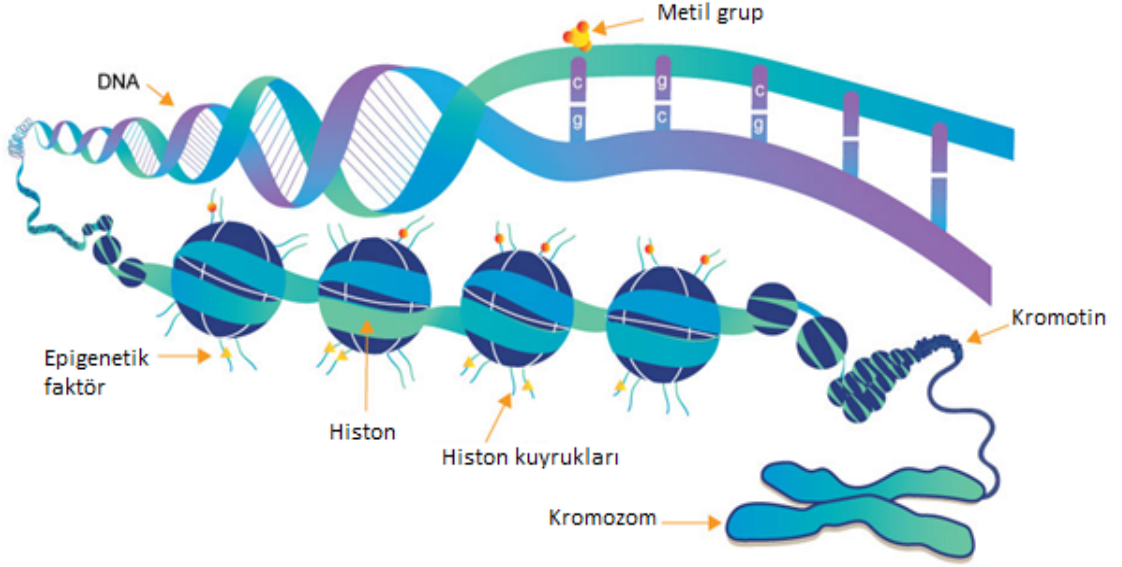
2.6 Epigenetik Değişimler

Kelime kökeni olarak “epi” Latince “üstünde” anlamına gelir ve “epigenetik” de “genlerin üstünde” olarak tanımlanabilir. DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaz fakat kromatin yapıda kalıtsal değişiklikler meydana gelerek gen ekspresyonu düzenlenir. Bir diğer ifadeyle epigenetik, DNA’nın yapı veya diziliminde herhangi bir değişiklik olmaksızın DNA’da kodlu olan genetik bilginin açığa çıkmasında meydana gelen değişikliklerdir. Genler üstü genetik anlamına geldiği için “epigenetik” olarak adlandırılmıştır.

Epigenetik; gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikler üzerine araştırma yürüten bir bilim olup, DNA zincirindeki değişiklikleri kapsamaz. Yani genotipte herhangi bir değişiklik olmaksızın, genotipin farklı okunması ya da okunamaması sonucunda fenotipteki değişiklikleri konu eder. Bu da aslında hücrelerin genleri nasıl okuduğu ile ilişkilidir. Epigenetik değişimler düzenli ve doğal oluşumlardır. Fakat yaş, çevresel etkenler, yaşam stilleri ve hastalık durumları gibi faktörlerle de etkilenebilirler (Egger ve ark., 2004).

Epigenetiğin tarihçesi aslında 20. yüzyılın ortalarına dayanır. Genetik ve gelişimsel biyolojinin birleşimi, geniş çapta yapılan araştırmalar ve bunlara önderlik eden ve aralarında H.Waddington ve E. Hadorn ‘un da dâhil olduğu saygın bilim insanlarının çalışmaları, 20. yüzyılın ortalarında bizim şu an epigenetik olarak tanımladığımız alana dönüşmüştür. Epigenetik terimi, 1942’ de Waddington tarafından icat edilip, genetik süreçlerin gelişim üzerindeki etkisini ilk olarak tarif eden Latince “epigenesis” sözcüğünden türetilmiştir (Waddington, 2012). 1990’ larda, çevresel olarak baskılanan fenotipik çeşitliliğin yapısal olarak üretildiği, yani ifade edilmek için daha fazla çevresel sinyal gerektirmeyen bir süreç olan genetik asimilasyona yani değişime yeniden ilgi duyulmuştur (Massimo ve ark, 2006). Bu da Conrad Waddington’ ın, Drosophila meyve sinekleri üzerine yaptığı çevresel stres kaynaklı genetik asimilasyonun fenotipik özelliklere etkisi ile ilgili gözlemleri ve araştırmalarının moleküler temelli açıklamalarını makul kılmıştır. O zamandan beri de bu tür değişikliklerden faydalanarak epigenetik mekanizmaların çözülmesine odaklanılmaktadır (Brouwer, 2012).

Epigenetik değişiklikler genelde karaciğer hücresi, beyin hücresi, cilt hücresi gibi hücrelerin son farklılaşma aşamasında ortaya çıkabildiği gibi, aynı zamanda daha zararlı bir etki gösterebilir ve kanser gibi problemler yaratabilir. DNA metilasyon, histon modifikasyon ve kodlamayan RNA ile genin susturulması epigenetik değişiklikleri başlatan ve sürdüren üç temel sistemdir (Egger ve ark., 2004). Histonlar ve DNA’ nın bulunduğu kromatin yapısı epigenetik olarak etkilenir (Şekil 7).



Şekil 7. Histon ve DNA içeren kromatin yapısının epigenetik etkilenmesi (Egger ve ark., 2004)

2.6.1 DNA Modifikasyonları

1969' da Griffith ve Mahler tarafından uzun süreli hafıza fonksiyonunda önemli olduğu düşünülen DNA metilasyonu, günümüzde en çok üzerinde durulan epigenetik değişikliklerden biridir (Holliday, 2006).

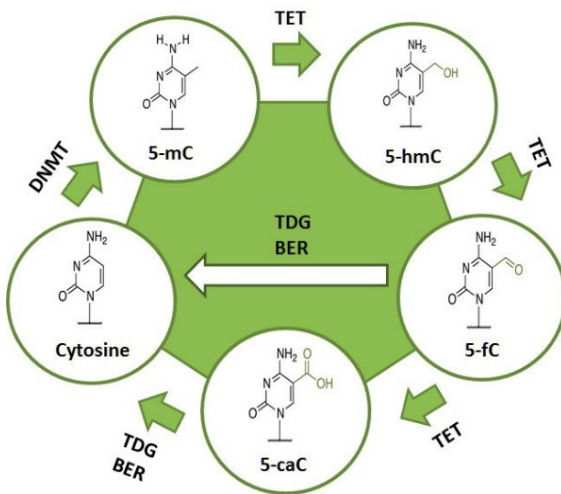
DNA metilasyonu; bir metil (CH_3) grubunun DNA' ya eklenmesiyle oluşan, dolayısıyla genlerin fonksiyonunu değiştiren ve gen ekspresyonunu etkileyen bir epigenetik mekanizmadır. DNA metilasyonu, sitozin halkasının 5-karbonuna metil grubunun kovalent olarak eklenmesi ile oluşur. Bu da DNA' nın "beşinci bazı" olarak bilinen 5-metilsitozinin (5-mC) oluşumunu sağlar. Bu metil gruplar, DNA'nın major groove'una dönüşür ve transkripsiyonu engeller (Lister ve ark., 2009).

Metil grupların eklenmesi, hücrelerde birkaç farklı seviyede kontrol edilir ve DNA metiltransferaz (DNMT) enzim ailesi tarafından gerçekleştirilir. DNA metilasyon modellerinin oluşturulması ve bakımı için üç DNMT enzimi (DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b) gereklidir. Ek iki enzim de (DNMT2 ve DNMT3L) yardımcı görev üstlenirler. DNMT1; DNA metilasyonunun yerleşik kalıplarının sürdürülmesinden sorumluyken, DNMT3a ve 3b; yeni veya de novo denem DNA metilasyon modellerinin oluşturulmasına aracılık eder.

Kanser hücreleri gibi hastalıklı hücrelerde, normal gen hipermetilasyonunun devamını sağlamada DNMT1 ve 3b enzimleri birlikte sorumludur (Lister ve ark., 2009).

DNA demetilasyonu, bir metil grubun DNA' dan uzaklaştırılmasıdır. Bu mekanizma aynı derecede önemlidir. Demetilasyon işlemi, genlerin epigenetik olarak yeniden programlanması için gereklidir. Aynı zamanda, tümör gibi birçok önemli hastalığın mekanizmasında da doğrudan rol alır. DNA' nın demetilasyonu pasif, aktif veya her ikisinin bir kombinasyonu şeklinde olabilir (Lister ve ark., 2009).

Pasif DNA demetilasyonu, çoğaltma döngüleri sırasında genellikle yeni sentezlenen DNA şeritleri üzerinde DNMT1 ile gerçekleşir. Aktif DNA demetilasyonu ise esas olarak, TET (ten eleven translocation) enzim aracılı oksidasyon tarafından dönüştürülmüş olan sitozin bazlarının ardışık modifikasyonu yoluyla, 5-metilsitozin (5-mC) çıkarılarak oluşur. Her modifikasyondan sorumlu ve ilgili enzim ile değişen sitozinler gösterilmiştir (Şekil 8). 5-mC hidroksilazların translokasyon (TET) ailesi, TET1, TET2 ve TET3 içerir. Bu proteinler, istenmeyen DNA metiltransferaz aktivitesini önlemek için CpG açısından zengin bölgelere bağlanır ve hidroksilaz aktivitesi ile 5-mC' yi (5-metilsitozin) 5-hmC' ye (5-hidroksimetilsitozin), 5-hmC' yi 5-fC' ye (5-formilsitozin) ve 5-fC' yi 5-caC' ye (5-karboksilsitozin) dönüştürerek DNA demetilasyonunu destekleyebilir. TET proteinleri transkripsiyonel aktivasyon ve baskılamada (TET1), tümör baskılamada (TET2) ve DNA metilasyon programlamasında (TET3) önemlidir (Lister ve ark., 2009).



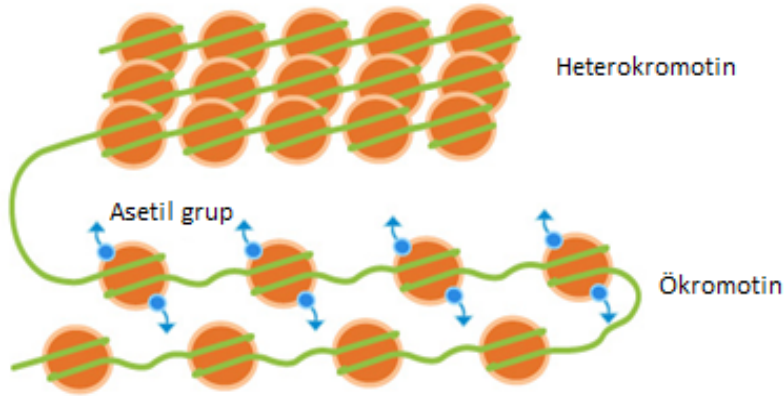
Şekil 8. Sitozin metilasyon ve demetilasyon süreçlerinin gösterimi (Holliday. 2006)

DNA metilasyonundan başka kromatin şekillenmesi, histon değişiklikleri ve kodlamayan RNA mekanizması da epigenetik değişikliklerin diğerleridir.

2.6.2 Kromatin Yeniden Şekillenmesi

Kromatin şekillenmesi; kromatinin, yoğunlaştırılmış durumdan, transkripsiyonel olarak erişilebilir duruma dönüştürülmesidir. Bu, transkripsiyon faktörlerinin DNA' ya ve diğer kontrol proteinlerinin de DNA ekspresyonuna katılmasına izin verir. Kromatin, hücrelerin çekirdeğinde bulunan DNA ve proteinlerin oluşturduğu komplekstir. Kromatin oluşturmak için DNA, histon adı verilen nükleer proteinlerin etrafına sarılarak sıkı bir şekilde yoğunlaşır. Sekiz histon proteinine sarılmış 146 baz çiftinden oluşan bu kompleks, nükleosom olarak adlandırılır (Strahl ve Allis, 2000).

Genel olarak, kromatin ne kadar yoğunlaşırsa, transkripsiyon faktörlerin ve diğer DNA bağlayıcı proteinlerin DNA' ya erişimi ve görevlerini yerine getirmeleri zorlaşır. Kromatinin sıkı paketlendiği ve aktif transkripsiyon yapılmadığı hali heterokromotin, gevşek paketlendiği ve transkripsiyon için erişilebilir olduğu haline ökromotin denir. Histon asetilasyonları kromatin erişilebilirliğini etkiler ve gen ekspresyonunu değiştirir (Strahl ve Allis, 2000) (Şekil 9).



Şekil 9. Sıkı heterokromotin ve gevşek ökromotin gösterimi (Strahl ve Allis, 2000)

2.6.3 Histon Modifikasyonları

Histon değişiklikleri; histon proteinlerde metilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, ubikitilasyon ve sumolasyon içerecek şekilde, translasyon sonrası kovalent değişimdir. Histonlara yapılan PTM (translasyon sonrası modifikasyonlar), kromatin yapısını değiştirirler veya histon değiştiriciler aracılığı ile gen ekspresyonunu etkilerler. Histon proteinleri, sekiz histonun etrafını saran DNA' yı paketleyerek kromozomlara geçer. Histon modifikasyonları, transkripsiyon aktivasyonu / inaktivasyonu, kromozom paketlemesi ve DNA hasarı / onarımı gibi çeşitli biyolojik işlemlerde etkilidir.

Çoğu türde histon H3; 9, 14, 18, 23 ve 56. Lizinden asetillenir, 2. Arjinin ve 4, 9, 27, 36 ve 79. Lizinden metillenir, 10 ve 28. Serinden ve 3 ve 11. Treoninden fosforillenir. Histon H4 ise; 5, 8, 12 ve 16. Lizinden asetillenir, 3.Arjininden ve 20.Lizinden metillenir, 1.Serinden fosforillenir. Böylece histon modifikasyonlarının tespiti ile hücresel süreçteki epigenetik düzenlemelerin anlaşılması sağlanır (Wood, 2004).

Histon Asetilasyonu ve Deasetilasyonu

Histon asetilasyonu, asetil grup COCH_3 ' ün asetil koenzim A' dan enzimatik olarak etkilenmesiyle oluşur. Histon asetilasyonu; kromatin dinamiği, transkripsiyon, gen susturulması, hücre döngüsünün ilerlemesi, apoptoz ve farklılaşma dâhil birçok moleküler düzenlemede önemlidir. Ayrıca DNA replikasyonu, DNA onarımı, nükleer alım ve nöronal baskılamada da etkilidir. Histon asetilasyonunda rol oynayan enzimler histon asetiltransferazlardır (HAT). Histon H3 ve H4 asetilasyonunu kontrol ederler. GNAT1, MYST, TAFII250, P300/CBP ve ACTR gibi nükleer reseptör koaktivatörleri şeklinde 5 aileye ayrılan 20' den fazla HAT tanımlanmıştır (Kuo ve Allis, 1998).

Histon H3 asetilasyonu, histon deasetilazların (HDAC) inhibisyonu ile arttırılabilir ve HAT inhibisyonu ile azaltılabilir. Histon deasetilazlar (HDAC), asetil grupların (COCH_3), histon Lizin kalıntılarından hidrolitik olarak uzaklaştırılmasını katalize eder. Histon asetilasyonundaki herhangi bir dengesizlik tümör oluşumu ve kanser ilerlemesini kolaylaştırır. Bu sebeple histon H3' ün Lizin kalıntılarındaki (rezidülerindeki) asetilasyonun saptanması sonraki veri ediniminde yarar sağlar.

Böylece HAT hedefli ilaç geliştirmede ve gen aktivasyonunun epigenetik düzenlenmesinde daha iyi bilgi edinilir. HAT' lara benzer şekilde, HDAC' ler de H3 ve H4 histonlarında hücrenel süreçlerde kritik rol oynar.

şimdiye kadar en az 4 sınıf HDAC tespit edilmiş olup, **sınıf I HDAC' leri** 1, 2, 3 ve 8' den, **sınıf II HDAC' leri** ise 4, 5, 6, 7, 9 ve 10' dan oluşur. Sirtuinler olarak bilinen **sınıf III HDAC enzimleri** NAD⁺ kofaktörleri gerektirir ve SIRT 1-7' yi içerir. Sadece HDAC 11 içeren **sınıf IV enzimleri**, sınıf I ve II' nin özelliklerine sahiptir. HDAC inhibisyonu, kanser hücrelerinde apoptozda, hücre döngüsü tutumu (cell cycle arrest) ve farklılaşmada önemlidir. HDAC inhibitörleri antikanser ajanlar olarak geliştirilmektedir (Dokmanovic ve ark., 2007).

Histon Metilasyonu ve Demetilasyonu

Histon metilasyonu; bir, iki veya üç metil grubun S adenosil L Metioninden, histon proteinlerin Lizin veya Arjinin rezidülerine (şekil 10), histon metiltansferazlar (HMT) yoluyla aktarılmasıdır. HMT' ler kromatin bağımlı transkripsiyonel baskılama veya aktivasyon ile DNA metilasyonunu kontrol eder veya düzenlerler.

Hücre çekirdeğinde, histon metilasyonu meydana geldiğinde, histonla komplekslenen DNA içindeki spesifik genler aktive edilebilir veya susturulabilir (Greer ve Shi, 2012).

Lizin ve Arjinin rezidülerinin içinde spesifik olarak var olan farklı birkaç histon metiltransferaz vardır. Örneğin histon H3' de; SET1, SET7/9, Ash1, ALL-1, MLL, ALR, Trx ve SMYD3 histon metiltransferazları vardır ve memeli hücrelerinde Lizin 4' te (H3-K9) histon H3' ün metilasyonunu sağlarlar (Wood, 2004).

ESET, G9a, SUV39-h1, SUV39-h2, SETDB1, Dim-5 ve Eu-HMT' lar ise, memeli hücrelerinde lizin 9' da (H3-K9) histon H3' ün metilasyonunu katalize eden histon metiltransferazlardır. Yine bunlar gibi memeli hücrelerinin lizin 27' sinde (H3-K27) histon H3 metilasyonunu katalizleyen EZH2, G9a ve polycomb grup enzimleri vardır (Wood, 2004).

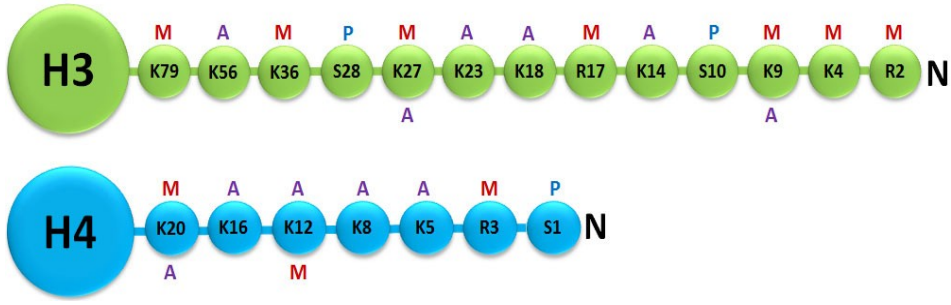
Hem H3-K9 hem de H3-K27 metilasyonu, heterokromotin oluşumuna aracılık eder, ayrıca ökromotin bölgelerde gen ekspresyonunu susturur. H3-K27 metilasyon artışının da kanser oluşumunda bazı patolojik süreçleri etkilediği bulunmuştur (Wood, 2004).

Öte yandan, H3 ve H4 histonların arjinin metilasyonu, transkripsiyonel aktivasyona teşvik eder ve protein arjinin metiltransferaz ailesi (PRMT) buna aracılık eder. İnsanlarda 9 tip PRMT bulunur; ancak sadece 7 üyenin, histonları metile ettiği bulunmuştur. Arjinin rezidülerinin mono veya dimetilasyonunu sağlayabilirler. Metil grup eklemenin pozisyonuna bağlı olarak PRMT'ler; **tip I** (CARM1, PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT6, PRMT8) ve **tip II** (PRMT5, PRMT7) olarak sınıflandırılır. Tip II PRMT'ler kanser gibi hastalıklarda önemli rol oynarlar (Chen ve ark., 1999).

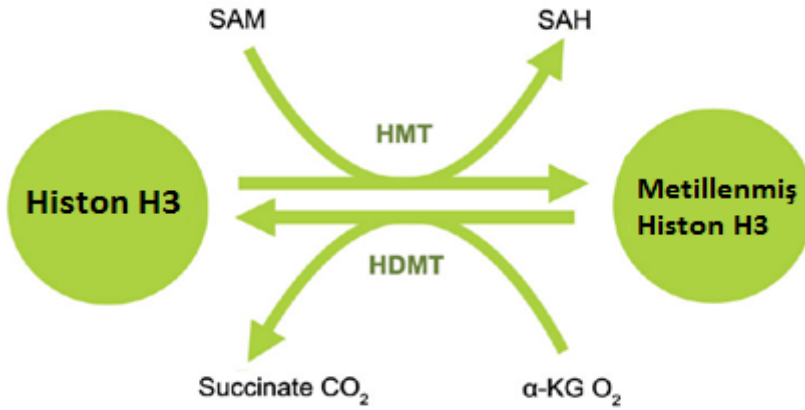
Örneğin PRMT5; RB (retinoblastoma) tümör baskılayıcıları gibi belirli tümör baskılayıcı genlerin baskılanması ve işlevinin durdurulmasında önemli rol oynar. Yine PRMT7'nin fazla ekspresyonu göğüs kanseri ile ilişkilendirilir. Diğer HTM'ler gibi, tip II PRMT'lerin inhibisyonu ve aktivelerinin tanımlanması da gen aktivasyonu ve susturulması, epigenetik düzenleme mekanizmaları, ayrıca kanser teşhisi ve terapötiklerin faydalarını anlamak için oldukça yararlı ve önemlidir (Rotili ve Mai, 2011).

Histon demetilasyonu, histon proteinlerindeki metil grupların histon demetilazlar aracılığıyla uzaklaştırılmasıdır. Şekil 11' de histon metilasyon ve demetilasyon reaksiyonları gösterilmektedir. Bu demetilazların patolojik vakalarda, potansiyel onkojenik fonksiyonlara sahip oldukları bulunmuştur. Demetilazların 2 ailesi vardır; bunlar lizin spesifik demetilaz 1 (LSD1) ve Jumonji domain içeren (JmjC) histon demetilazdır (JMJD2, JMJD3/UTX ve JARID).

Aminoasit rezidüsü ve metilasyon derecesi, demetilasyon enzimini belirler. Örneğin, histon H3' de mono veya dimetillenmiş Lizin 4, LSD1 tarafından demetile edilir. Yine üç kez metillenmiş Lizin 4 JARID tarafından; iki ve üç kez metillenen Lizin 27 ise JMJD3 ve UTX tarafından demetillenir. Ayrıca, mono ve dimetillenmiş Lizin 9 JMJD1 tarafından, üç kez metillenmiş Lizin 9 da JMJD2 tarafından dimetillenir (Rotili ve Mai, 2011).



Şekil 10. H3 ve H4 'ün N ucundaki sonlanmalardaki değişiklikler (Dokmanovic ve ark., 2007)
(M=Metillenmiş, A=Asetilenmiş, P=Fosforillenmiş)

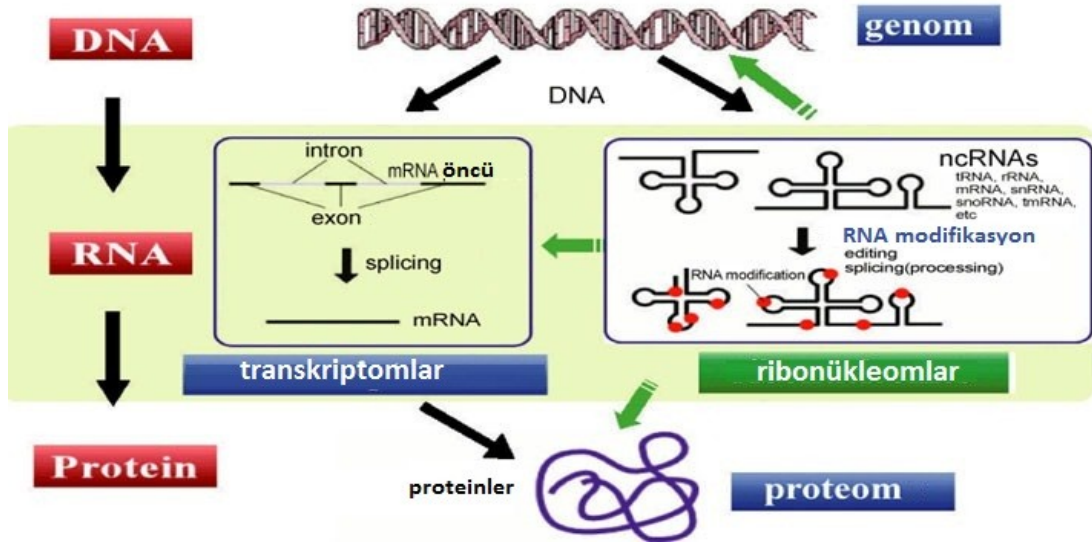


Şekil 11. Enzim bağımlı histon metilasyon ve demetilasyon reaksiyonları (Rotili ve Mai, 2011)

2.6.4 Kodlamayan RNA

Kodlamayan RNA (ncRNA) DNA' dan kopyalanan ancak proteine çevrilmeyen işlevsel bir RNA molekülüdür. Epigenetik bağlantılı ncRNA' lar; miRNA, siRNA, piRNA ve lncRNA' ları içerir. Genel olarak, ncRNA' lar transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenlemeye çalışır (Şekil 12). Epigenetik süreçlerde yer alan bu kodlamayan RNA 'lar iki gruba ayrılır: kısa kodlamayan RNA'lar (short ncRNA- (<30 nt)) ve uzun kodlamayan RNA' lardır (long ncRNA- (>200nt)).

Kısa ncRNA' lar üçe ayrılır: mikroRNA (miRNA), kısa müdahaleci RNA (siRNA) ve Piwi etkileşimli RNA (piRNA). Her iki ana grubun da heterokromotin oluşumundaki histon değişimlerinde, DNA metilasyon hedeflenmesi ve gen susturmada önemli olduğu bilinmektedir (Collins ve ark., 2011).



Şekil 12. ncRNA'nın in vivo fonksiyonu (Collins ve ark., 2011).

MikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar (miRNA) genellikle bölünmeyi durdurmak, translasyonu bozmak veya bloke etmek amacıyla tamamlayıcı bir dizi ile hedef mRNA'lara bağlanır. Örneğin, miRNA genleri olan *mir-127* ve *mir-136* farelerde plasenta oluşumunda gerekli bir gen olan *Rtl1* geninin etkisini düzenlemede gereklidir. Paternal kromozomda belirli bir bölgenin metilasyonu, *Rtl1*'in ifadesi ile sonuçlanır. Bu da paternal kromozom için iyi değildir çünkü plasenta oluşumu doğurur. Eğer koromozom bu şekilde maternal koromozomdaki gibi metillenmemişse, *mir-127* ve *mir-136* üretilir ve *Rtl1* transkriptine bağlanır ve degradasyon yapar. Epigenetik değişiklikler sebebiyle *Rtl1* protein ekspresyonundaki eksiklik ise farelerde ölüme götürür (Collins ve ark., 2011).

Kısa Müdahaleci RNA (siRNA)

Kısa müdahaleci RNA'ların fonksiyonu (siRNA), miRNA'ların transkripsiyon sonrası gen susturulmasına (PTGS) ve sonucunda mRNA'nın bozulmasına yol açmaya benzer. Bu işleve ek olarak, siRNA'lar heterokromotin oluşumunu teşvik eder ve bunu RNA kaynaklı transkripsiyonel susturma (RITS) kompleksi ile yapar. Bu kompleks siRNA'ya bağlandığında H3K9 metilasyonunu ve kromotin yoğunlaşmasını teşvik eder (Carthew ve Sontheimer, 2009).

Piwi Etkileşimli RNA (piRNA)

Piwi etkileşimli RNA' lar (piRNA); proteinlerin piwi familyası ile etkileşimi nedeniyle bu şekilde adlandırılmıştır. Bu RNA moleküllerinin asıl işlevi, germline ve somatik hücrelerde kromatin düzenlenmesi ve transpozon aktivitesinin bastırılmasıdır. Nükleer proteinler olarak sınıflandırılırlar. Yaklaşık 25-33 nt uzunluğundadırlar. Transpozonlara karşı antisense olan piRNA' lar, PIWI proteinleri ile yaptıkları komplekslerde transpozonu hedefleyip parçalar. Bu parçalanma, yeni transpozonları hedefleyen yeni piRNA' lar üretir. Bu döngü piRNA' ların devamlı üretimi ve transpozon susturulması şeklinde devam eder (Collins ve ark., 2011).

Uzun Kodlamayan RNA (lncRNA)

Birçok lncRNA, kromatin değiştirici proteinler ile kompleks oluşturup, katalitik aktivitelerini genomda belirli bölgelere aktarabilir. Böylece kromatin yapıları değişir ve gen ekspresyonu etkilenir (Mercer ve Mattick, 2013). Kodlamayan RNA transkriptlerinin çoğu, lncRNA' lara aittir. Uzun ncRNA' lar kromatin şekillenmesinde, transkripsiyonel düzenlemede ve transkripsiyon sonrası düzenlemede işlev görür. Ayrıca siRNA' lar için de öncü görevi görürler (Kaikkonen ve ark., 2011).

lncRNA' ların belirli bir alt grubu, geniş gen içi kodlamayan RNA (lincRNA)' dır ve epigenetik durumları teşvik etmek için hedef genomik bölgelere bağlanır ve kromatin değiştirme kompleksleri ile etkileşir (Kaikkonen ve ark., 2011).

Bunun bilinen bir örneği, X inaktif spesifik transkript geninin (*Xist*), X kromozom inaktivasyonundaki (XCI) rolüdür. Bu işlem, iki tane lncRNA içerir; *Xist* ve onun antisense transkripti yani negatif düzenleyicisi olan *Tsix*. Farklılaşmadan önce *Xist* ve *Tsix*, *Xist* geninin H3K4 dimetilasyonu sebebiyle kopyalanır. Bu durumda XCI rastgele bir olaydır. Farklılaşmadan sonra ise *Xist* ekspresyonu yükselir ve *Xist* RNA' sı inaktif X kromozomunu kaplar ve böylece histon metilasyonu ve kromozom inaktivasyonuna teşvik eder (Collins ve ark., 2011).

2.7 Epigenetik Değişimler ve Endometriyal Kanserle İlişkisi

Endometriyal kanser, rahimin endometriumundan kaynaklı ve kadınlar arasında en yaygın malignansilerden biridir. Genetik değişimlerin yani DNA zincirindeki değişikliklerin önemi endometriyal kanserde dikkate değer bir hal almıştır (Yeramian ve ark., 2013; Llobet ve ark., 2009). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, epigenetik düzenlemelerin de endometriyal kanserde önemine vurgu yapılmaktadır. Fakat bu düzenlemeler yani epigenetik modifikasyonlar DNA zincirini değiştirmez. DNA bazlarının histon proteinlerini, yan zincir gruplarını ve hücrelerin biyolojik fonksiyonlarını etkiler (Arafa ve ark., 2010).

Epigenetik düzenlemeler ve değişimler diğer pekçok kanserde önemli olduğu gibi endometriyal kanserde de öneme sahiptir.

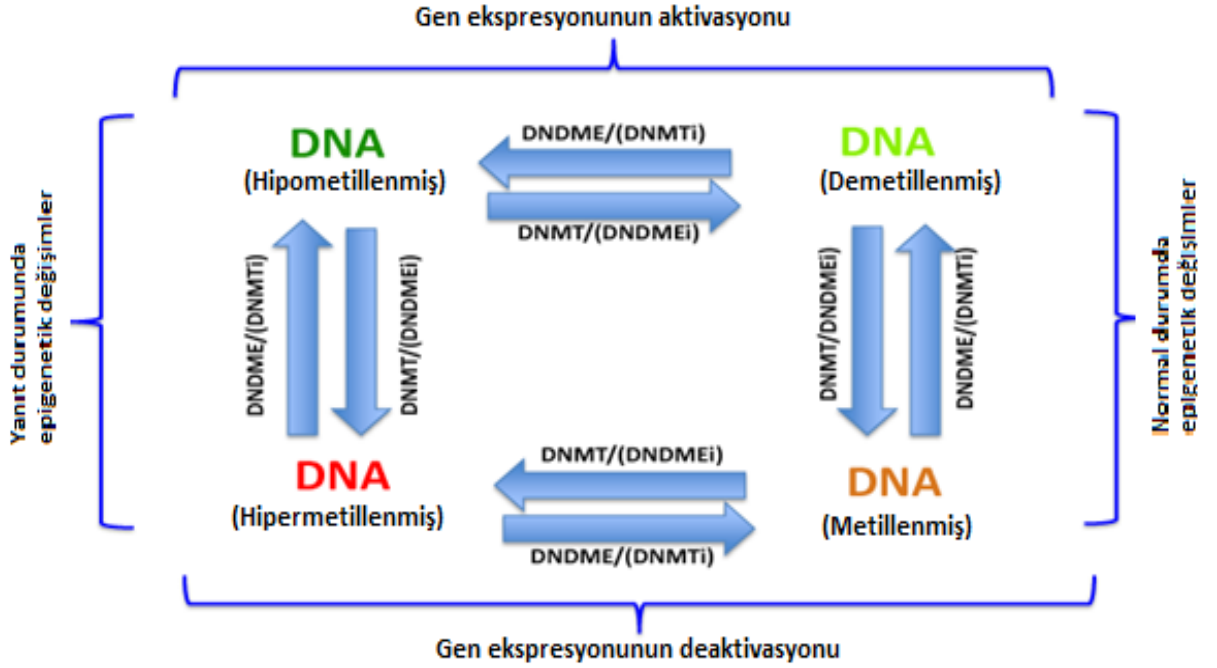
2.7.1 DNA Modifikasyonları

Memelilerde DNA metilasyonu ve demetilasyonu önemli epigenetik modifikasyonlardan biridir ve gen ekspresyonunda hayati önem taşır.

Promotor bölgenin metilasyonu gen aktivasyonu veya inhibisyonunu belirlerken, ekspresyon seviyesini de kontrol eder. Anormal metilasyonlar, yani normalden az veya çok gerçekleşenler tümör oluşumu ile ilişkilendirilir (Tao ve Freudenheim, 2010).

Endometriyal Kanserde Tümör Baskılayıcı Gen Hipermetilasyonu

Metilasyon, DNA metiltransferaz enzimi ile katalizlenir ve bu enzimin 3 farklı çeşidi vardır; DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B. DNMT1 en yaygın DNA metiltransferaz enzimidir. Bu enzim, CpG dinükleotit zincirinde 5' sitozin metillenmesini katalizler. Hücre bölünmesinde de DNA metilasyonunu devam ettirir (Szyf ve ark., 1991). DNMT3A ve 3B ise yeni metilasyonları katalizler (Okano ve ark., 1999). Bu üç enzimde CpG adasındaki metilasyon reaksiyonlarından sorumludur ve bu adalar genelde hedef genlerin promotor bölgelerindedirler (Jones, 2012).



Şekil 13. DNA metiltransferaz (DNMT) ve DNA demetilaz (DNDME) tarafından katalizlenen DNA metilasyon ve demetilasyon reaksiyonları (Xianyong ve Xiaobin, 2014).

Tümör baskılayıcı gen promotorunda hipermetilasyon oldukça yaygın bir epigenetik değişimdir ve endometriyal kanserde önemli rolü vardır. DNA hipermetilasyonu biyokimyasal olarak DNA metiltransferaz inhibitörleri (DNMTi) tarafından doğrulanır ve tümör baskılayıcı gen promotorunun yeniden normal metilasyona dönüşmesi ile bu genlerin ekspresyonlarının yeniden aktifleşmesi kanser hücrelerinin malignant fenotipine yol açar. Aynı şekilde DNA demetilaz inhibitörleri (DNDMEi) demetilasyonu inhibe eder ve onkogenlerin inaktivasyonuna götürür (Şekil 13).

Hipermetilasyon hedef DNA' nın fazla metilasyonudur ve promotor hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu inaktive eder. Böylece kanser oluşumunu önleyici proteinlerin oluşumunu da azaltır, kanser hücrelerinin metastazına katkı sağlar.

Endometriyal kanserde promotor bölgelerdeki hipermetilasyona uğrayan tümör baskılayıcı genler Tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1. Endometriyal kanserde tümör baskılayıcı genler ve özellikleri (Xianyong ve Xiaobin, 2014)

Hedef gen	Fonksiyonları	Hipermetilasyon bölgesi	Regülasyon tipi
<i>14-3-3, APC, AR, C/EPRA, CDH13, HOPX, CDH1/E-cadherin, CDKN2A/P16, CHFR, CIDEA, COMT, EFEMP1, ERa, FHIT, GATA5, GSTP1, HAAO, HAND2, MGMT, MiR129-2, MiR130a/b, MiR152, MiR196b, MiR200b, MiR203, MiR222, MiR34b, MiR625, MLH1, MSH2, MT-1E, OX2R, P14-ARF, P73, Par-4, CASP8, RASSF1A, RASSF2A</i>	Tümör baskılayıcı	Promotor	İnaktivasyon, Down regülasyon

DNA metilasyonu için assay metodları; MLPA (methylation specific multiplex ligation dependent probe amplification), Mass ARRAY, MethylCap seq. olarak bilinir. Tümör örneklerinde metilasyon gözlemlenmesini sağlarlar. MethylCap seq. DNA fragmentlerinde CpG bölgelerinin metilasyonunun afinite saflaştırmasına dayanır. Bunu, işaretli metilasyon bağlanma proteini olan meCP2 ile yapar. Böylece saflaştırılmış DNA fragmentlerinde metilasyona bakılır (Bock ve ark., 2010; Jurinke ve Denissenko, 2005).

Jones A. ve ekibi global ölçekli hipermetilasyon assay ile 64 endometriyal kanser ve 23 kontrol örneklerinde, 27.000 den fazla CpG bölgesinde *HAND2* genine bakmışlardır. Bu gen normal endometriumda eksprese olurken, kanser hücrelerinde hipermetillenmiş ve susturulmuştur (Jones ve ark., 2013).

Promotor hipermetilasyonlara tümör baskılayıcı genler olan *MLH1*, *Tig*, *C/EBRa*, *PRs*, *ERs* ve microRNA da girer (Takai ve ark., 2005; Ghabreau ve ark., 2004).

Tümör baskılayıcı genlerden biri olan *PTEN* de, endometriyal kanserde promotor bölge hipermetilasyonu ile baskılanmış durumdadır. Bu gen, PI3K-AKT yolağını düzenler (Dellas ve Jundt, 2009).

Ayrıca CDK4 ve CDK6 kinazlarının inhibitörü olan *P16INK4a* ve *CDKN2A*, endometriyal kanserde tümör baskılayıcıdır. Bu genin promotor hipermetilasyonu sporadik yani çevre etkisiyle çıkan endometriyal kanserlerin %11-75' ini oluşturur (Furlan ve ark., 2006; Guida ve ark., 2009).

Endometriyal kanserde promotor hipermetilasyonuna uğrayan diğer tümör baskılayıcı genler *RASSF1A*, *RASSF2A* %33-85, *APC* (adenomatous polypopis coli) %46, *RUNX3* %86, *CDH13* (cadherin 13) %90, *E cadherin* ise %79 oranında endometriyal kanserlerde epigenetik etkisi olan genlerdir (Fiolka ve ark., 2013; Kang ve ark., 2006). *HOX* gen ailesi de tümör baskılayıcı olup, *Hox10* ve *Hox11* promotorleri endometriyal kanserle ilişkilendirilir (Shah ve Sukumar, 2010).

Endometriyal Kanserde Onkogen Hipometilasyonu

Hipermetilasyon gibi, promotor hipometilasyonu (demetilasyonu) memeli hücrelerinde görülür. Karsinogenezde; DNA metilasyonlarına global DNA hipometilasyonu (demetilasyonu) veya lokal hipermetilasyon olarak rastlanır. Epigenetik modifikasyonların başında tümör baskılayıcı genlerin promotor hipermetilasyonları gelse de, hipometilasyon da kanserlerde rastlanan epigenetik değişimlerden biridir.

Onkogenlerin hipometilasyonu endometrium karsinogenezin erken evresinde görülür ve hücrelerin çoğalma yeteneğini artırır. *CTCF/BORIS* geninin promotor bölgesinin hipometilasyona uğradığı ve genin fazla ekspresyonu ile endometriyal tümör oluşumunun ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hoivik ve ark., 2014).

Kemik morfogenetik proteinlerinden olan *BMP2*, *3*, *4* ve *7* nin metillenmesi endometriyal tümörlerin tekrarlamayan tiplerinde görülürken, tekrarlayan tiplerin hipometilasyonu biyomarkır olarak endometriyal kanser tedavisinde kullanılır (Hsu ve ark., 2013).

Ayrıca bazı kodlamayan DNA zincirleri (LINE (long interspersed element) ve retrotranspozonlar) endometriyal kanserde hipometilasyona uğramıştır. LINE1' in hipometilasyonu kanser teşhisi için biyomarkır olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Pavicic

ve ark., 2012). Fakat bu genin endometriyal kanserde onkogen olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

Endometriyal kanserde hipometilasyona uğrayan genler Tablo 2’ de gösterilmektedir.

Tablo 2. Endometriyal kanserde hipometilasyona uğrayan genler ve özellikleri (Xianyong ve Xiaobin, 2014)

Hedef genler	Fonksiyonları	Hipometilasyon bölgeleri	Ekspresyona etkileri
<i>BMP 2,3,4,7, CASP8, CTCLF/BORIS, HOXB13, LICAM, LINE-1, MMP-2, PARP1, PAX2, s100A4</i>	Onkogen	Promotor bölge	Aktivasyon

2.7.2 Histon Modifikasyonları

Histonlar; DNA’ nın kendini kromatin oluşturmak için sardığı proteinlerdir. Histon proteinlerinin kuyrukları, normal ökaryotik hücrelerde çoğunlukla kromatin fonksiyonunun devamını sağlamak için, post translasyonel değişime uğrar. Histon modifikasyonlarında lokus spesifik değişimler, yani başındaki genlerin ekspresyonunu etkiler. Kanser hücrelerinde bu değişimler global seviyededir. Histonlarda epigenetik değişimler, asetilasyon, deasetilasyon, metilasyon, demetilasyon ile gerçekleşir ve endometriyal kanserde bu değişimler büyük öneme sahiptir.

Endometriyal Kanserde Histon Metilasyonu

Histon metilasyonları histon metiltransferaz (HMT) ile gerçekleşir, SET domain içeren bu enzim reaksiyonu katalizleyip, H3 ve H4 histonlarındaki S-adenosil metionin’ den metil grubunu lizin ve arjinine transfer eder.

HMT iki gruba ayrılır; 1. grupta *EZH2* (Zeste Homolog 2)’ nin enhansırı bulunur, HMT’ler histonların lizin rezidülerine metil grup ekler. 2. grupta ise PRMT

(Protein Arjinin Metiltransferaz) bulunur, HMT' ler H3 ve H4 arjinin rezidülerine metil grup ekler (Trievel ve ark., 2003; Thomas ve Lakowski, 2010).

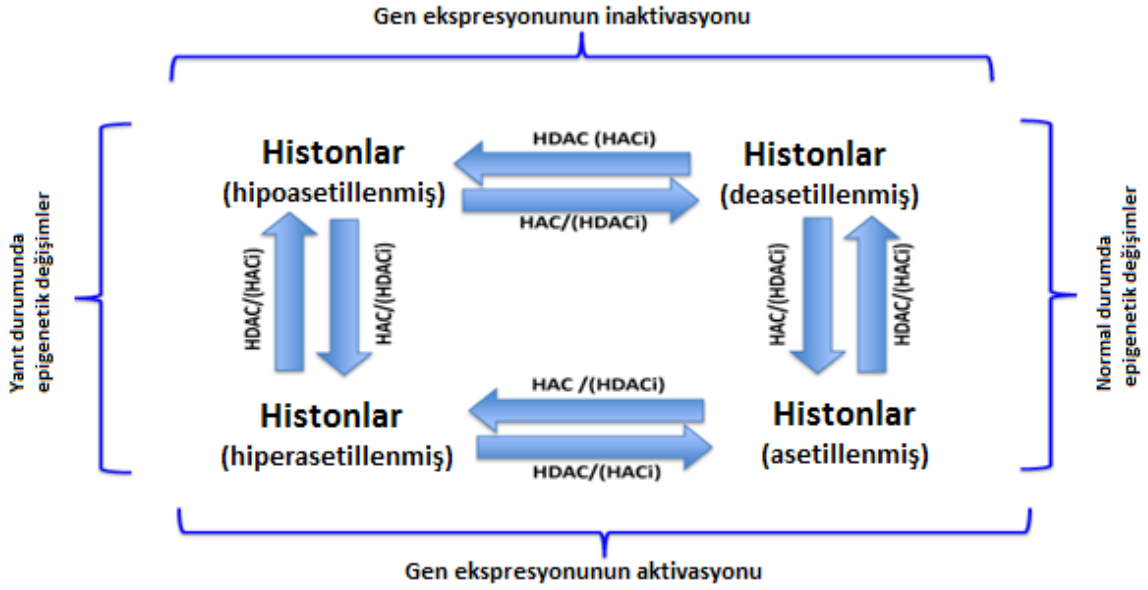
Kromatin baskı kompleksi olan *PRC2* ve komponentleri *EZH2*, *EED*, *SUZ12*; H3 histonunun 27 ve 9.lizin rezidülerine metil grup eklerler. *EZH2* karsinojenezde onkoprotein olarak bilinmektedir (Breuer ve ark., 2004).

Endometriyal kanserde de *EZH2*' nin upregülasyonu ile histon 32' nin 27. lizininde *APC* promotorunda hipermetilasyon saptanmıştır (Yang ve ark., 2013). Ayrıca *EZH2*' nin yüksek seviyeli endometrial kanserde fazla ekspresyonu gözlemlenmiştir. Bu yüzden *EZH2*, endometriyal kanserde onkogenik role sahiptir, tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu inhibe eder.

PRC2 ve *EZH2* birlikte onkogen ve tümör baskılayıcı genleri histon metilasyonu ile inaktif edebilir, fakat *EZH2*' nin onkogenik rolü ile *PRC2*' nin tümör baskılayıcı fonksiyonu arasındaki ilişki henüz netleştirilmemiştir (Yang ve ark., 2013).

Endometriyal Kanserde Histon Asetilasyonu ve Deasetilasyonu

Histon asetilasyon ve deasetilasyon reaksiyonları gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan post translasyonel modifikasyonlardır. Histon asetiltransferaz (HAT) histon asetillasyonunu katalizleyen enzim olup, asetil koenzim A' dan asetil grubu histonlara transfer eder. Öte yandan, histon deasetilaz (HDAC) histon deasetilasyonu katalizler ve hidroliz ile histon proteinlerden asetil grupları kaldırır (Şekil 14). Bu reaksiyonların endometriyal kanser gelişiminde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (Ropero ve Esteller, 2007; Chen ve ark., 1999).



Şekil 14. Histon asetilasyon ve deasetilasyonu (Xianyong ve Xiaobin, 2014)

Tümör baskılayıcı gen bölgesinde hipoasetilasyon ve onkogen bölgesinde hiperasetilasyon endometriyal kansere yol açabilir. Bu prosedür biyokimyasal olarak enzimatik inhibitörler tarafından doğrulanmıştır. Histon deasetilaz inhibitörü (HDACi) deasetilasyonu inhibe eder ve tümör baskılayıcı genin yeniden aktifleşmesini sağlar. Aynı şekilde histon asetiltransferaz inhibitörü (HACi) asetilasyonu ve onkogen inaktivasyonunu inhibe eder (Şekil 14). Bu aktiviteler endometriyal kanserde tedavi yolu olarak düşünülebilir (Xianyong ve Xiaobin, 2014).

Endometriyal Kanserde Tümör Baskılayıcıda Histon Deasetilasyonu

Histon deasetilasyonu ile tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu sağlanır ve bu da kansere sebep olur. Tablo 3' de endometriyal kanserle ilişkili görülen tümör baskılayıcı genler gösterilmiştir.

Tablo 3. Endometriyal kanser oluşumuna etki eden genler ve özellikleri (Xianyong ve Xiaobin, 2014)

Hedef Genler	Fonksiyonları	Histon Modifikasyonları	Ekspresyona etkileri
<i>APC</i>	Tümör baskılayıcı	Metilasyon	Down regülasyon
<i>Bcl-2</i>	Onkogen	?	Up regülasyon
<i>C/EBPa</i>	Tümör Baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>Caspase-9</i>	Tümör Baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>CDK</i>	Onkogen	?	Up regülasyon
<i>Cyclin A</i>	Onkogen	?	Aktivasyon
<i>Cyclin D1</i>	Proto onkogen	?	Up regülasyon
<i>E- Cadherin</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Down regülasyon
<i>Glycodelin</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>IGF-IR</i>	Onkogen	?	Aktivasyon
<i>MMP-2</i>	Onkogen	?	Aktivasyon
<i>Mmp-9</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>P16</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>P21(WAF1)</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>P27</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>PR-B</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Up regülasyon
<i>pRB</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Up/Downregülasyon
<i>pTEN</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>TIG1</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>TIMP-1</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon
<i>TIMP-3</i>	Tümör baskılayıcı	Deasetilasyon	Deaktivasyon

Histon deasetilasyonu ile inaktive edilen tümör baskılayıcı genlerin çeşitli çalışmalar neticesinde HDAC inhibitörleri ile deasetilasyon işleminin önlenmesi ve neticesinde tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktivasyonunun sağlandığı bildirilmiştir

(Ahn ve ark., 2008). HDAC inhibitörü ile endometriyal kanserde tümör baskılayıcı genler yeniden aktive edildiği gözlemlenmiştir. HDAC inhibitörü ile deasetilasyon önlediğinde, *PTEN* ve *P21* (WAF1) tip I endometriyal kanserde, *IGF-IR* ve *P21* de tip II endometriyal kanserde upregüle olmuşlardır (Sarfstein ve ark., 2011).

Tümör baskılayıcı diğer genler olan *P53* (Ishikawa hücrelerinde; asyalı 39 yaşında endometriyal adenokarsinomalı bir kadının hücrelerinden oluşturulmuş hücre hattı) ve *PTEN* (USPC-2 hücrelerinde; Arkansas Üniversitesi Kadın Doğum ve Jinekoloji Departmanı Dr.Santin tarafından sağlanan hücre hattı), HDAC inhibitörü (vorinostat; oral HDAC inhibitörü) sonrasında downregüle durumda görülmüştür. Fakat mekanizma tam olarak anlaşılammıştır (Konency ve ark., 2008).

Endometriyal Kanserde Onkogen Promotorde Histon Asetilasyonu

Asetilasyon, histon asetiltransferaz (HAT) enzimi ile katalizlenir. Tümör baskılayıcı genlerin deasetilaz ile deasetillenmesi gibi, onkogenlerde histon asetilasyonu kanserde önemli bir role sahiptir. Kang ve ekibi tarafından bulunan HAT inhibitörü (curcumin); histon H3 ve H4 hipoasetilasyonunu teşvik eder, onkogen *PARP* ve *Caspase-3*' ün ekspresyonunu downregüle eder ve apoptoza götürür (Kang ve ark., 2006).

Öte yandan endometriyal kanserde onkogen asetilasyonu çalışmaları yetersizdir ve endometriyal kanser ile onkogen asetilasyonu arasındaki ilişki tam çözülememiştir. Zhu ve ekibi endometriyal kanserdeki *IGBT3* protoonkogenin, K338 ve K339' daki *HOXA10* (homeobox A 10) yoluyla ekspresyonunu, asetilasyonun önlediğini bulmuşlardır (Zhu ve ark., 2013). Endometriyal kanserde, onkogenlerin promotor bölgelerindeki kor histon asetilasyon durumu aydınlatılamamıştır.

Histon asetilasyonu ve promotor DNA hipometilasyonu endometriyal kanser ve diğer kanser çeşitlerinde de onkogen ekspresyonunu aktive eder. Çalışmalar sadece asetillenmiş histonların metillenmeyen *MLH1* promotor ile bağlandığını gösterir. Bu da hipometilasyon ile promotor aktivasyonu ve asetilasyonla histon aktivasyonunun

ikisinde gen ekspresyonunda gerekli olduğu sonucunu çıkarmıştır (Wischnewski ve ark., 2006).

2.8 Endometriyal Kanser ve miRNA

MicroRNA' lar (miRNA) küçük ve kodlamayan, yaklaşık 22 baz çifti uzunluğunda diziler olup, genlerin ekspresyonlarını düzenleyen ajanlardır. Bu düzenlemeyi hedef mRNA' ya tamamlayıcı olacak şekilde yapar. Gen ekspresyonunun miRNA'lar tarafından düzenlenmesi hücrel gelişim ve farklılaşmada önem arz eder.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar neticesinde, hastalıklar ve miRNA' daki anormallikler sebebiyle gen susturma mekanizmasındaki bozulmalar arasındaki ilişki dikkate değer bir hal almıştır.

Özellikle anormal miRNA ekspresyonu çeşitli kanserlerde olduğu gibi endometriyal kanser ve hedef genlerde de göze çarpmaktadır. Bu da miRNA' ların onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde önemi ve kanserde biyomarkır olarak kullanıldığını gösterir (Megumi ve ark., 2010).

MiRNA genelde CpG adalarına yakın yerde bulunur ve promotor bölgelerinden metillenmesi sonucu histon asetil transferaz (HAT) enziminin işlevini yapamamasına, bu enzime ait proteinlerin bağlanamamasına neden olup, anormal gelişim ve çoğalma sağlayıp tümör baskılayıcı genleri inaktive etme ve onkogenleri aktive etme özelliği gösterir (Megumi ve ark., 2010).

Karsinogeneze genelde oncomiR' ler upregüle durumdadır ve hedef genleri tümör baskılayıcı genlerdir. Bu genleri inaktif yaparak fonksiyonlarını yapmalarını engellerler. Tümör baskılayıcı miR' ler ise downregüle durumdadır ve hedef genleri onkogenlerdir. Onkogenlerin aktivasyonları artar, tümör hücrelerinin yayılması kolaylaşır. Metastaza ve onkogeneze gidilir.

Tablo 4' de upregüle olan oncomiR' ler ve downregüle olan tümör baskılayıcı miR'ler gösterilmektedir.

Tablo 4. Endometriyal kanserde upregüle ve downregüle olan miRNA' lar (Megui ve ark., 2010)

Upregüle olanlar	Downregüle olanlar
miR-185	miR-Let7e
miR-106a	miR-221

miR-181a	miR-30c
miR-20	miR-152
miR-423	miR-193
miR-103	miR-204
miR-107	miR-99b
miR-Let7c	miR-193b
miR-205	
miR-449	
miR-429	

Myatt ve ekibi *FOXO1* tümör baskılayıcı genin endometriyal kanser hücrelerinde normal endometriyum ile karşılaştırıldığında baskılanmış olduğunu yaptıkları çalışmaları neticesinde görmüşlerdir. Bu baskılanma *miR-9*, *miR-27*, *miR-96*, *miR-153*, *miR-183* ve *miR-186* ile edilir. Bu miRNA'ların ekspresyonlarının inhibe edilmesiyle *FOXO1* geninin yeniden indüklenmesi sağlanmış olup endometriyum tümör hücrelerinden kurtulması hedeflenmiştir (Megumi ve ark., 2010). Dai ve ekibi ise adenokarsinoma hücre hattında *miR-200b* ile çalışmış, tümör baskılayıcı *TIMP2* de azalmış ekspresyon, onkogen *MMP2* de ise fazla ekspresyonla karşılaşmışlardır. Böylece *miR-200b*'nin, endometriyal kanserde metastazda önemi anlaşılmıştır (Dai ve ark., 2013). Yine başka bir çalışmada da, *miR-34b* dâhil 6 farklı miRNA ile adenokarsinomada ekspresyon profili incelenmiş, promotor bölgeden metillenip çoğalması ve kanserde etkisi gözlemlenmiştir (Chung ve ark., 2009).

2.9 RASSF Tümör Baskılayıcı Gen Ailesi

Allelik kayıp, nükleik asit veya protein modifikasyonları yoluyla oluşan genetik değişiklikler, tümör baskılayıcı proteinlerin işlev kaybına sebep olmaktadır. Özellikle, genlerin promotor hipermetilasyon ile epigenetik olarak susturulması, tümör şiddetini artırmaktadır (Volodko ve ark., 2014).

RASSF (Ras associated domain family) protein ailesi; lösemi, melanoma, meme, prostat, boyun, akciğer hatta beyin, kolorektal, böbrek ve yumurtalık gibi çok sayıda kanser türünde promotor metilasyonu yoluyla ekspresyon kaybına uğrayan 10 üyeye sahip tümör baskılayıcı protein ailesidir (Volodko ve ark., 2014).

Tümör baskılayıcı fonksiyonlarına ek olarak, *RASSF* proteinleri mikrotübül stabilitesinde iskele ajanları olarak hareket eder, mitotik hücre bölünmesini ve

apoptozisi düzenler, hücre göçünü ve hücre yapışmasını kontrol eder. Ayrıca NFκB aktivitesini ve inflamasyon süresini ayarlar (Volodko ve ark., 2014).

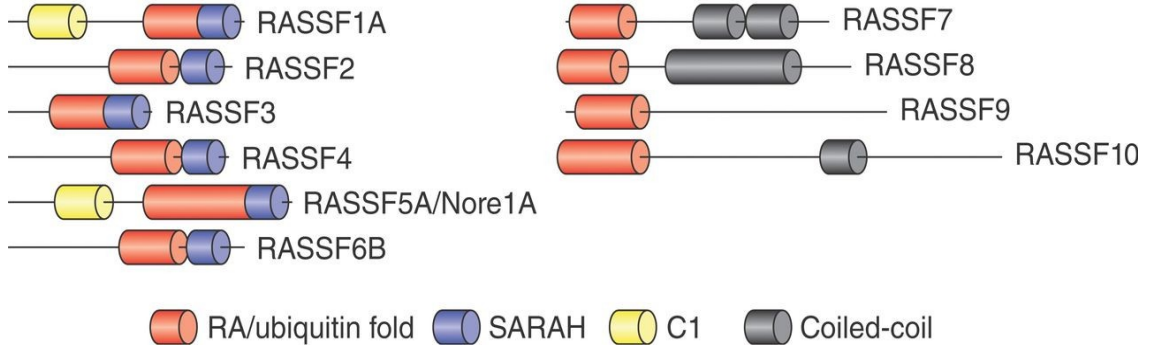
RASSF proteinleri, N terminalleri veya C terminallerinde bir Ras bağlanma alanlarının varlığından dolayı bu şekilde adlandırılmıştır. RA domaini, hücre zarı trafiği, apoptoz ve çoğalma yani proliferasyon gibi çeşitli hücresel süreçleri kontrol eden Ras GTPaz ailesi proteinleri ile etkileşime girer (Gordon ve Baksh, 2010; Sherwood ve ark., 2009). K-Ras ile direk bağlanma, sadece *RASSF2*, *4*, *5A*, *6* ve *9* da gözlemlenir (Richter ve ark., 2009). Buna ek olarak, *RASSF* proteinleri diğer proteinler ile etkileşim sağlayacak başka fonksiyonel domainlere de sahiptir. Bunlar, Salvador-RASSF-Hippo (SARAH) domain olup protein-protein etkileşimleri ve *RASSF* izoformlarının homo veya heterodimerizasyonu için önemlidirler. Şekil 15' de bu domainler gösterilmektedir.

RASSF, SARAH domaini aracılığı ile, *STK4* ve *STK3* olarak da bilinen memeli steril 20 benzeri kinaz olarak adlandırılan *MST1* ve *MST2* (memeli hipposu) ve tümör baskılayıcı Salvador'un memeli ortoloğu yani farklı türdeki homolog zinciri SAV1 gibi downstream (aşağı) kinazlar ile bağlanır ve apoptozu başlatır (Avruch ve ark., 2009). *RASSF* böylece çok sayıda moleküler yapıya katılıp tümör baskılayıcı fonksiyonunu devreye sokarak biyolojik yollarda etki sağlar.

RASSF1A ve *RASSF1C* gibi bazı *RASSF* proteinleri, üzerinde ATM fosforilasyon bölgesi bulundurur. Aynı zamanda bu proteinler mikrotübüller ile ortak bulunan bir N terminal protein kinaz C1 domain de içerir (Gordon ve Baksh, 2010). C1 domain, *RASSF1A* proteininin TNF-R1 ve TRIAL gibi ölüm reseptörü kompleksleri ile bağlanmasını sağlar (El-Kalla ve ark., 2010). DNA hasar ve tamirinde, *RASSF* proteinlerinin bazılarında ATM fosforilasyon bölgesinin varlığı saptanmıştır (Hamilton ve ark., 2009).

Classical RASSF proteins

N-terminal RASSF proteins



Şekil 15. *RASSF* proteinleri ve domainleri (Sherwood ve ark., 2010)

2.9.1 *RASSF* Proteinlerinin Biyolojik Fonksiyonları

RASSF1A

2000 yılında Dammann ve arkadaşları kromozomun 3p21.3 numaralı bölgesinde bulunan ve akciğer kanserinde genomik kararsızlığına sıklıkla rastlanan bir gen klonladılar. Bu gen Ras bağımlı domain (RA) içerdiği için de *RASSF1* olarak adlandırılmıştı (Dammann ve ark., 2000). *RASSF1* alternatif ekleme ve farklı promotör kullanımı ile A-H arası 8 ayrı transkripte sahiptir. *RASSF1* alt gruplarının arasında 1A ve 1C en çok çalışılanlardır ve ikisi de mikrotübüller içinde yer alır. Ayrıca hücre gelişimi ve göçünün düzenlenmesinde önemlidirler (Dallol ve ark., 2005; Dallol ve ark., 2004). *RASSF1C* ayrı olarak göğüs ve akciğer kanserinde, kanser hücrelerinin üreme kapasitesini artırırken, *RASSF1A* daha iyi niyetli bir tümör baskılayıcıdır (Amaar ve ark., 2006; Reeves ve ark., 2010). Bu sebeple, *RASSF1A* ve *RASSF1C* aminoasit yoğunluğu farkları, bu ikisini biyolojik özellikleri itibariyle birbirinden ayırır.

RASSF1A, MAP1B (microtubule associated protein 1B) ve MAP1S (microtubule associated protein 1S) gibi pekçok mikrotübül bağımlı proteinler ile etkileşime girer (El-Kalla ve ark., 2010; Dallol ve ark., 2004). *RASSF1A* mikrotübül bölge kaybı; tümör baskılayıcı özelliklerinin yok olmasına, tubulin dengesinin kaybına, ölüm reseptörü bağımlı hücre ölümünün baskılanmasına yol açar. Bu da sentrozom kaybı ve mitoz ve mayozda var olan mitotik iğ ipliği yapılarının kaybı sonucu genomik kararsızlığa yol açar (El-Kalla ve ark., 2010; Vos ve ark., 2004).

RASSF1A'nın mikrotübül dengesi mekanizmalarından biri RAN GTPaz ve diğeri de tubulin deasetilaz gibi işlev gören histon deasetilaz 6' nın baskılanmasıdır (Dallol ve ark., 2009; Jung ve ark., 2013). *RASSF1A*'nın mikrotübül dengesi düzenlemesi, iğ ipliği yapması ve kromozom bağlaması onun tümör baskılayıcı fonksiyonunu, hücre gelişimi, dönüşümü, devamlılığı ve yayılmasına etkisinin ötesine götürür (Vos ve ark., 2004; Korah ve ark., 2013).

Çalışmalar, *RASSF1A*'nın RABP1 (RASSF1A binding protein 1) ile bağlanmasının metafazda iğ iplerine gitmesine ve *Cdc20* ile etkileşime girmesine, APC (anaphase promoting complex) baskılamaya, mitotik siklinler olan A ve B'nin birikmesi ve sonunda mitozaya yakalanmasına dikkat çekmiştir. Aurora A tarafından fosforilasyon ile *RASSF1A*, *Cdc20* ile etkileşemez ve APC baskılanmasına yol açar (Song ve Lim, 2004; Song ve ark., 2005). Ayrıca siklin bozulmalarına ve mitotik ilerlemeye neden olur (Song ve ark., 2009). İlginç şekilde, RABP1 / MAP1S'nin genomik kararsızlık ve tümör oluşumunu baskılayarak otofajı artırdığı görülmüştür. Böylece mikrotübüllerde *RASSF1A* dengesi otofaj düzenlemesinde önemli görülmektedir (Xie ve ark., 2011).

Mitotik ilerlemenin yanısıra *RASSF1A*, hücre döngüsünün diğer yönlerini de düzenlemektedir. *RASSF1A*, siklin D1 birikmesini engeller, bunu da JNK kinaz yolağı veya AP-1 aktivitesini baskılamak veya her ikisiyle de yapar. Ayrıca hücre döngüsünü G1/S fazında bloke eder (Shivakumar ve ark., 2002; Whang ve ark., 2005).

RASSF1A, siklin A2 promotöre ve p21^{Cip/Waf1} siklin bağımlı kinaz inhibitörüne bağlanan ve bir transkripsiyon faktör olan p120^{E4F} aktivitesini artırma özelliğine de sahiptir (Fenton ve ark., 2004; Choudhury ve ark., 2005). *RASSF1A*'nın hücre döngüsü ve apoptozu kontrol etme mekanizmalarından bir diğeri ise, MDM2-DAXX-HAUSP kompleksini bozup MDM2 ubiquitinasyon ve P53 dengesini sağlamaktır (Song ve ark., 2008).

2014' de Volodko ve ekibi yaptıkları çalışmalar ile *RASSF1A*'nın, ölüm reseptörü bağımlı hücre ölümünde önemine değinmişlerdir. *RASSF1A*; TNF-R1, TRIAL-R1 ve apoptoz modülatörü (MOAP-1) aracılığıyla hücre ölümüne götürmüştür (Baksh ve ark., 2005; Foley ve ark., 2008). Buna ek olarak, *RASSF1A* apoptotik kinaz olan MST1/2 ile bağlanıp onun kinaz aktivitesini değiştirir ve hücre ölümüne götürür (Oh ve ark., 2006; Khokhlatchev ve ark., 2002).

RASSF1A'nın diğer mekanizma ve moleküllerle tüm bu bağlantıları, hücreleri aşırı büyümelerden koruyup, *RASSF1A*'nın da bir tümör baskılayıcı olarak görev yapmasına vesile olur. 2014'de Volodko ve ekibi akut bağırsak inflamasyonu üzerinde yaptıkları çalışmalar ile *RASSF1A*'nın, NFκB aktivitesini, hücrede TLR/MyD88/TRAF6/IRAK2/4 kompleksi yoluyla sınırlandırdığına değinmişlerdir (Khokhlatchev ve ark., 2002).

NFκB aktivitesinin sınırlandırılması, hücre çoğalmasıyla alakalı olduğu düşünülen bir Hippo bağımlı transkripsiyon faktör olan Yes bağımlı protein'in (YAP) tirozin 357 (Y357) fosforilasyonunun da engellenmesine yol açar. YAP'ın Y357 fosforilasyonu artan inflamasyon ile ve DNA hasarı ile ortaya çıkar ve ikisi de bağırsak yaralanma ve inflamasyonlarında göze çarpar (Khokhlatchev ve ark., 2002).

RASSF1C

RASSF1A'nın tersine, *RASSF1C* tümör baskılayıcı özelliklere sahip değildir ve onkogen olarak fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir. *RASSF1C*'nin fazla ekspresyonu, meme kanserinde fazlaca gelişmiş hücre göçü ve istilasına yol açar (Reeves ve ark., 2010). Yine yapılan çalışmalar göstermiştir ki; *RASSF1C* IGF1R ile etkileşimi sayesinde, osteoblast hücrelerin çoğalmasını sağlar (Amaar ve ark., 2005). Son çalışmalar ile, *RASSF1C*'nin stabil olmayan bir protein olduğu, Mule E3 ligaz tarafından poliubikitinasyon ile düzenlendiği desteklenmiştir.

RASSF1C, *DAXX* ile kompleks bir yapı oluşturur ve promyelositik lösemi nükleer cisimler ile çekirdekte yer edinebilir. PML bir akut myeloid lösemi çeşididir ve Promyelositik nükleer cisimler, ortak proteinleri değiştirip bozabilir. DNA hasarı sırasında, *DAXX* degrades olur ve *RASSF1C* sitoplazmaya salınır. Bu da SAPK/JNK yolağını aktiveleştirir (Kitagawa ve ark., 2006). Chen ve ekibinin mayalarda yaptığı çalışmada, *RASSF1C*'nin bir serin proteinaz inhibitörü olan (tohum ve yumru gibi depo dokularında bulunur) TFPI-2 ile (tissue factor pathway inhibitor 2) etkileşime girdiği ve çekirdekte lokalize olduğu bulunmuştur (Chen ve ark., 2012).

TFPI-2 inflamasyonda, anjiyogenezde, tümör gelişimi ve metastazında önemlidir. Henüz *RASSF1C* geni için knockout fare geliştirilmemiştir.

RASSF2

RASSF2 geni, A ve C izoformlarına transkribe olmuştur ve bu izoformlar *RASSF1A* geninde var olan C1 ve ATM domainleri bulundurmazlar (Richter ve ark., 2009). *RASSF1A* ve *IC*' nin tersine *RASSF2* bir nükleer proteindir (Cooper ve ark., 2008). Bu genin promotor metilasyonu ve ekspresyon eksikliği pekçok kanser ile ilişkilendirilir (Akino ve ark., 2005; Hesson ve ark., 2005). Ayrıca, 293T embriyonik böbrek hücrelerinde *RASSF2*' nin geçici ekspresyonu, aktive olan K-Ras tarafından güçlendirilen belirgin büyümenin baskılanmasını gösterir (Vos ve ark., 2003). Yine in situ boyama ve floresan mikroskopunda, *RASSF2* ekspresyon sistemlerinde hücre büyümesinin azalmasına ve apoptozun ortaya çıkmasına rastlanmıştır. *RASSF2* tarafından hücre büyümesinin düzenlenmesinin MAPK yolağı aracılığıyla olduğu, yapılan çalışmalar ile bulunmuştur. Buna göre, MAPK/ERK-2 yolu ile fosforilasyonun, CRM-1 bağımlı nükleer salım yolağı aracılığı ile çekirdekte etkili bir *RASSF2* salımını teşvik ettiği sonucuna varılır.

Nükleer alımda kusurlu olan bir mutant *RASSF2*' nin, nükleer sürdürme hücre gelişimi düzenlenmesinde ve böylece tümör baskılamada önemli olmasına rağmen, G1/S fazında hücre döngüsünde ve apoptozda başarısız olduğu görülmüştür (Kumari ve ark., 2009). *RASSF2* ayrıca prostat apoptoz yanıt proteini 4 (PAR-4) için önemli rol oynar. Çünkü bu protein apoptozu başlatmak için çekirdeğe transloke edilmek zorundadır (Donninger ve ark., 2010).

MST1 (macrophage stimulating 1), *RASSF2* proteininin kararlılığını düzenler. Kanser hücrelerinde *MST1*'in susturulması *RASSF2*' nin kararlılığını bozar. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar ile *MST1* eksikliği olan farelerde azalmış *RASSF2* protein seviyesi görülmüştür (Song ve ark., 2010). Bunun aksine, *RASSF2* *MST1* ile kompleks olursa, aktive olan *MST1*, MST-FOXO3 sinyal yolağını bozar. *RASSF2* aynı zamanda, JNK yolağı ile de kompleks yapabilir, ve *MST1* bağımsız bir apoptoza teşvik edebilir (Song ve ark., 2010).

RASSF3

RASSF3' ün aminoasit açısından *RASSF1A*' ya benzerliği %60' tır, hem normal hem de tümör hücrelerinde bulunabilir (Tommasi ve ark., 2002). *RASSF* proteinleri ailesinin en küçük üyesidir. Bu protein promotor bölgesinde CpG adasına sahiptir. Ama onun hipermetilasyonu şimdiye dek sadece hipofiz adenomlarında rastlanılmıştır (Peng ve ark., 2013). Ayrıca toplam 140 küçük hücre dışı akciğer kanserinin (non small cell lung carcinoma-NSCLC) 125' inde, *RASSF3* ekspresyon seviyesi indirgenmiştir (Fukatsu ve ark., 2014).

HER2/Neu pozitif insan ve fare meme kanseri hücre hatlarında *RASSF3* fazla eksprese edildiğinde, hücre çoğaltılması baskılanır (Jacquemart ve ark., 2009). Bu da *RASSF3*' ün tümör oluşumunda koruyucu görevini gösterir. Öte yandan, *RASSF3* ekspresyonu, *MDM2*' nin ubiquitinasyonunu kolaylaştırarak *P53*'ü uyarır (Kudo ve ark., 2012). *MDM2*, *P53* için E3 ligazıdır. Böylece, *RASSF3* tümör baskılayıcı özelliğini dışa vurur, bunu da *P53* bağımlı apoptoz ve DNA hasar kontrol mekanizması ile yapar. Henüz hiç *RASSF3* knockout fare geliştirilmemiştir.

RASSF4

RASSF4 proteini *RASSF1A* ile %25, *RASSF2* ile %60 benzerliğe sahiptir. Yapılan çalışmalarda *RASSF4*' ün yoğunlukla normal dokularda eksprese edildiği gözlemlenmiştir (Eckfeld ve ark., 2004; Steinmann ve ark., 2009). Ayrıca promotor özel hipermetilasyon için, *RASSF4* ekspresyonunun azaltılması da tümör hücre hatlarında rastlanır. *RASSF4* bunlarda tümör baskılayıcı görevi görür (Steinmann ve ark., 2009). Alveolar rabdomisarkoma (aRMS) iskelet kaslarıyla alakalı ve genelde çocuklarda görülen yumuşak doku tümörleridir. *RASSF4*' ün bu tümörlerde ise büyüme yanlısı bir tavır sergilediği görülmektedir (Croese ve ark., 2014). aRMS alt tiplerinden biri *PAX3-FOXO1* (paired box 3 forkhead box protein O1) ile karakterize edilir ve kromozomal translokasyona sebebiyet verebilir (Sorensen ve ark., 2002; Michifuri ve ark., 2013).

Son yıllarda aRMS hastalarının %8' inde bu proteinin ilişkili olduğu saptanmıştır. *PAX3-FOXO1*, *RASSF4*' ü düzenler aktive eder ve bu da hücrel yaşlanmayı baskılayıp, hücre çoğalmasına teşvik eder (Croese ve ark., 2014).

Yine *RASSF4*, tümör baskılayıcı *MST1/Hippo* ile etkileşir ve baskılar, bu da Hippo yolağının devamını engeller. aRMS hastalarında Hippo sinyal yolağının baskılanması, *YAP* (Yes associated protein 1) üretimini artırır. *YAP* proteini, hücrelerde yaşlanma düzenlenmesinde önemlidir (Croce ve ark., 2014).

RASSF4' ün ERK fosforilasyonunu baskılayarak, MAP kinaz sinyal yolağını baskılayabildiği ve tümör baskılanmasını kolaylaştırıcı etkisi de bilinmektedir (Michifuri ve ark., 2013). Henüz hiçbir *RASSF4* knockout fare geliştirilmemiştir.

RASSF5

RASSF5, *NORE1* veya *RAPL* olarak da isimlendirilir. *RASSF* protein ailesinin klonlanan ilk üyesidir (Vavvas ve ark., 1998). Farklı promotör ve alternatif sprints ile eksprese edilen 3 transkripti vardır (A-C). En uzun formu olan *RASSF5A*, *RASSF1A* ile %40 aminoasit benzerliğine sahiptir. *RASSF5A*, RA domaini sayesinde hücre iskeleti proteinleri ile bağlantılıdır. ERK yolağı aracılığı ile de büyümeyi baskılamaya yardım eder (Moshnikova ve ark., 2006).

RASSF5A aynı zamanda, TNF α ve TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) de bulunan MST1 kinaz ile kompleks oluşturur ve apoptoza götürür (Park ve ark., 2010). Ras benzeri GTPazlar ile bağlanarak hücre ölümüne de yol açabilir. Ayrıca, hücre döngüsü gecikmesi boyunca Ras-GTPazlar ve MST 1/2 kinazlardan bağımsız olarak hücre çoğaltılmasını da engeller (Artiz ve ark., 2002; Aoyama ve ark., 2004). Tüm bunlar apoptoz öncesi rolü ve apoptoz kontrolündeki önemini vurgular.

RASSF5' in en kısa izoformu *RASSF5C*' dir. Genelde lenf dokularında eksprese edilir (Katagiri ve ark., 2003). İntegrin kümelenmesindeki Rap1 uyarılmasında aracı olarak görev yapar. Yine T hücre reseptör uyarılmasından sonra Rap1 aktivasyonunda da aracı görevi görür (Katagiri ve ark., 2003). Rap1, küçük bir GTPaz' dır ve hücreler arası bağlantının düzenlenmesinde önemlidir. *RASSF5*' ler genelde RAPL diye isimlendirilir. RAPL (regulator for cell adhesion and polarization in lymphoid tissues); lenf dokularında hücre yapışma ve kutuplaşma düzenleyici demektir.

RAPL, antijen reseptör uyarılmasında lenfositlerde *P27* nükleer lokalizasyon için önemlidir. Çünkü *P27*, hücre döngüsü ilerlemesinde düzenleyici proteindir. RAPL eksikliği, *P27*' nin sitoplazmik lokalizasyonuna ve T ile B hücrelerinin fazla üretilmesine yol açar. *RASSF5C* eksik farelerde, bağlanmayan lenfosit trafiği ve lenf organ anormallığı gözlemlenmiştir (Katagiri ve ark., 2011; Katagiri ve ark., 2004).

RASSF6

RASSF1A' nin keşfinden birkaç yıl sonra onunla aynı yapısal özelliklere sahip yeni bir Ras efektör proteini bulundu. Şimdiye kadar *RASSF6* proteininin üç izoformu (A-C) keşfedilmiştir. (Allen ve ark., 2007; Weyden ve Adams, 2007). Diğer *RASSF*' ler gibi *RASSF6* da, tümör baskılayıcı protein olarak görev yapar ve çocukluk çağı lösemisinde ve nöroblastomada epigenetik olarak susturulmuş durumdadır (Djos ve ark., 2012; Volodko ve ark., 2014). HeLa hücrelerindeki *RASSF6*' nin aşırı ekspresyonu Bax aktivasyonu ve sitokrom C salınımı ile bağlantılı olan sinyal mekanizmasının aracılığı ile apoptozu artırır (İkeda ve ark., 2007).

RASSF6, *MDM2* ile bağlanır ve kendi ubiquitinasyon ve degradasyonunu kolaylaştırır. *RASSF1A* ve *RASSF3* gibi *P53* stabilize eder ve böylece apoptoz ve hücre döngüsünü düzenler (Iwasa ve ark., 2013). Yine *RASSF1A* ve *RASSF2* gibi, *RASSF6* NFκB aktivitesini baskılar ve inflamasyona yol açar (Allen ve ark., 2007). Şimdiye kadar hiçbir *RASSF6* knockout fare geliştirilmemiştir.

RASSF7

1994' de Weitzel ve Patel kromozom 1p15' de kümelenmiş şekilde genler keşfetti ve bunlar HRAS1 küme 1 şeklinde isimlendirildi. Bu kümenin en yukarisındaki gen önceleri *HRC1* (HRAS1 related cluster protein 1) olarak adlandırılıp sonradan *RASSF7* olarak yeni bir isim aldı (Weitzel ve Patel, 1994). Alternatif splyas sebebiyle, *RASSF7* üç transkripte bölündü.

Bunlar N sonlu RA domainleri olup *RASSF1*' den *RASSF6*' ya kadar tüm proteinlerde bulunan SARA domain eksikliği olan proteinlerdir (Weyden ve Adams, 2007). *RASSF7* özellikle insanlarda beyin, akciğer olmak üzere hücre hatlarında bulunur ve hücre tümörü adacıkları, pankreatik duktal karsinom, endometriyal kanser ve yumurtalıkta meydana gelen şeffaf hücre karsinomları gibi pek çok karsinomda karşımıza çıkar (Mutter ve ark., 2001; Tan ve ark., 2009; Friess ve ark., 2003).

Recino ve ekibinin yaptığı bir çalışmada yaklaşık 57 hücre hattında *RASSF7* geninin promotor metilasyonuna rastlanmamıştır (Recino ve ark., 2010). Fakat Djos ve ekibinin nöroblastoma hücre hatlarında yaptığı çalışmada ise, *RASSF7* geninin CpG adası yüksek oranda metillenmiş durumdadır ve bunun da tümör oluşumunun düzenlenmesinde *RASSF7*' nin rolü ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Djos ve ark., 2012). *RASSF7* üzerine yapılan fonksiyonel analizler sonucu bu genin mitotik ilerlemeye teşvik eden iğ ipliği oluşumunun düzenlenmesi yoluyla hücre büyümesini artırdığı gözlemlenmiştir (Recino ve ark., 2010).

Yapılan bir başka çalışmada ise, *RASSF7*' nin stres periyodunda hücre kurtarmada etkisine değinilir. Başlangıç stresi boyunca, *RASSF7* önce N-Ras ile bağlanır, MKK7/JNK sinyal yolağını baskırlar böylece hücre gelişimini tetiklerler (Takahashi ve ark., 2011).

RASSF7' nin apoptoz karşıtı özelliğinin de uzun süreli UV radyasyon maruziyetinde önemi vurgulanır. Fakat bununla ilgili kesin veriler henüz yoktur. Şimdiye kadar geliştirilmiş herhangi bir *RASSF7* knockout fare bulunmamaktadır.

RASSF8

RASSF8' in şimdiye kadar yedi tane transkripti bulunmuştur. Aynı *RASSF7* gibi, *RASSF8* izoformları N sonlu RA domain içerir ve SARA domain içermez (Weyden ve Adams, 2007). *RASSF8*' in tümör baskılayıcı rolünün önemi en çok akciğer adenokarsinomunda karşımıza çıkar. Çünkü bu genin transkript seviyesi bu karsinomda düşüktür ve baskılayıcı görev yapmamaktadır (Falvella ve ark., 2006).

RASSF8' in tümör baskılayıcı rolünün yanısıra, hücre-hücre yapışmasında da önemine vurgu yapılır. Bunu β -catenin/E-cadherin fonksiyonuna bağlı bir yapışma sağlar. Bu yapışma, epitel hücrelerin plazma membranında farklı protein ve yağlarla polarite oluşturmaya yardımcıdır (Lock ve ark., 2010). Çalışılan yara tedavisi assaylerinde *RASSF8* eksikliğinin tümör agresifitesini artırdığı gözlemlenmiştir.

Yine meme kanserli hastalar ve sağlıklı bireyler üzerinde yapılan serum analizleri verilerine göre, kanda *RASSF8*' in mRNA seviyesi ölçülüp bu genin tümörlerdeki etkisine dikkat çekilmiştir. *RASSF8*, bir adaptör protein olan 14-3-3 ile etkileşime girip iskele proteini üretirler ve apoptoz ve hücre döngüsünü düzenlerler (Rykova ve ark., 2008). Bu görevi itibarıyla diğer *RASSF* ailesi üyelerine benzemektedir. Henüz hiçbir *RASSF8* knockout fare geliştirilmemiştir.

RASSF9

RASSF9 önceden *P-CIP1* (COOH-terminal interactor protein-1) yani bir peptidilglisin α amitadin mono oksijenaz olarak bilinirdi. Bu enzim büyük ve yoğun çekirdek veziküllerinde bulundurur ve biyosentezin son aşamasında peptidil Gly'yi peptid NH₂'ye dönüştürür (Chen ve ark., 1998; Alam ve ark., 1996). Yapılan BLAST çalışmalarıyla *P-CIP1* proteininin *RASSF7* ve *RASSF8* ile yapısal olarak benzerliği tespit edilmiştir. Daha sonra da bu protein *RASSF9* olarak yeniden adlandırılmıştır.

RASSF9, aynı *RASSF7*, *8* ve *10* gibi karbon ucunda lokalize olmuş bir RA domaine sahiptir. *RASSF9* proteini fonksiyon ve tanımlanması ile ilgili çok bilgi vardır.

2011' de Lee ve ekibi, epitel dokularda bu proteininin yoğun ekspresyonuna rastlamıştır. *RASSF9* eksik farelerde yapılan deneylerde, bu farelerde yaşlılık belirtileri, artan alopesiya (30 veya 40' lı yaş yetişkinlerde görülen inflamatuvar bir deri hastalığı), daha kısa yaşam süresi ve büyüme geriliği görülmüştür. Bunlar da epidermal gelişim ile bağlantılı olarak düşünülmüştür (Lee ve ark., 2011).

RASSF10

RASSF10, *RASSF7-8* ve *9* ile benzer yapısal özelliklere sahiptir. Onlar gibi N uçlu RA domain içerir ve SARAH bölgesi bulundurmaz (Volodko ve ark., 2014).

RASSF10 kemik iliği, tiroid, beyin ve prostatta ayrıca böbreklerde eksprese edilir. Aynı zamanda, *RASSF10* hipermetilasyonu çocukluk çağı lösemileri, tiroid karsinom ve gliomaları gibi kanserlerde gen ve protein ekspresyon kaybıyla ilişkilendirilmiştir (Hill ve ark., 2011; Schagdarsurengin ve ark., 2009).

Glioma hücrelerinde yapılan in vitro analizlerde RNAi ile müdahale edilen *RASSF10* ekspresyonu sonucu, artan hücre çoğalması ve hücrelerin hayatta kalması gözlemlenmiştir. Sonrasında *RASSF10*' un yeniden eksprese edilmesi ile bu hücrelerin gelişimi ve koloni oluşumu baskılanmıştır. Bu da göstermiştir ki, *RASSF10* glioma hücrelerinde tümör baskılayıcı fonksiyon rolüne sahiptir (Hill ve ark., 2011).

Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, *RASSF10*' un tümör baskılayıcı aktivitesi mide kanserinde incelenmiştir. Mide kanseri hatlarında *RASSF10*' un üretimi ile hücre devamlılığını azaltma ve apoptozu kolaylaştırma sağlanmıştır (Wei ve ark., 2013).

Ek olarak, *RASSF10* mitotik ilerlemenin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bunu sentrozomlardaki lokalizasyonuna ve mikrotübül bağlantısındaki önemine borçludur (Hill ve ark., 2011). İlerleyen yıllarda bu proteinin karsinomalardaki önemi ile ilgili daha çok veri sağlanacaktır.

Tablo 5' de *RASSF* izoformları, herbirinin biyolojik fonksiyonları ve etkileşime girdiği proteinler verilmiştir. Tablo 6' da ise *RASSF* ailesi genlerinin genel özellikleri gösterilmektedir.

Tablo 5. *RASSF* izoformlarının listesi (Volodko ve ark., 2014)

<i>RASSF</i> İzoformu	Kromozomda Yeri/ Protein Miktarı	Biyolojik Fonsiyonu	Etkileşime Girdiği Protein
1A	3p21/ 39.2 kDa	** MST kinaz bağımlı apoptoz ** Ölüm reseptörü bağımlı apoptoz ** Mikrotübül oluşumu ve stabilizasyonu ** Hücre döngüsü ** Mitoz ** Mitotik siklin stabilizasyonu ve APC-Cdc20 inhibisyonu ile mitotik ilerleme zamanlaması ** Kardiyak hipertrofi ** NFκB aktivite düzenleme ** β-catenin birikimi engelleme ** DNA tamiri ** P53 ve P73 stabilizasyonu ** Yaralanmalarda inflamasyondan koruma	MST1, MST2, MOAP1, RABP1, Cdc20, Aurora A/B, MAP1B, MAP1S, MDM2, Ran, Rap1A, RASS1A, RASSF5A, p120E4F, Chk1, DDB1, H-Ras, ATM, Skp2,
1C	3p21/ 31.2 kDa	** Hücre gelişimine etki ** Metastaz ve kanser hücrelerinin yaşamasını kolaylaştırma ** Hücre göçünü kolaylaştırma ** Osteosarkoma ve akciğer kanserinde hücre çoğalmasını azaltma ile sonuçlanan susturma ** β-catenin bozulmasını engelleme ** SAPK/JNK sinyal yolağını aktive etme	MST1, MST2, IGFBP5, TFPI-2, βTrCP, DAXX
2	20p13/ 37.8 kDa	** Hücre gelişimi engelleme ve hücre döngüsünden kurtarma ** Aktin hücre iskeleti organizasyonu ** Apoptoz ** NFκB nin transkripsiyonel aktivitesini baskılama ** MST2 aktivitesini baskılama	K-Ras, PAR4, MST1, MST2

Tablo 5. *RASSF* izoformlarının listesi (Volodko ve ark., 2014) (devamı)

<i>RASSF</i> İzoformu	Kromozomda Yeri	Biyolojik Fonsiyonu	Etkileşime Girdiği Protein
3	12q4.1/ 28.6 kDa	** Apoptoz düzenleme ** P53 stabilitesi ile hücre döngüsü düzenleme ** DNA tamiri	MOAP1, Mdm2, MST1, MST2
4	10q11.21 / 36.7 kDa	** Apoptoz ** MST2 aktivitesini baskılama ** Ras sinyali aşağısındaki MAP kinaz sinyalini düzenleme	K-Ras, ST1, MST2, MST1
5A	1q32 / 47.1 kDa	** Apoptoz başlatıp veya hücre döngüsü geciktirip tümör gelişimini baskılama ** Mikrotübül oluşumunu düzenleme ** HIPK1 onkoprotein bozulmasına yol açma ** TNF α bağımlı apoptoz ve MST1 aktivasyonu düzenleme	Ras, Carma1, MST1, MST2, tubulin, Aurora A, Mdm2, Itch,
5C	1q32 / 30.4 kDa	** Lenfosit yapışmasını düzenleme ** T hücre göçü ve reseptörü düzenleme ** Endotel hücre göçünü kontrol etme	Ras, Carma1, Rap1, Rap2, MST1
6	4q13 / 43.4 kDa	** Apoptoz düzenleme ** Hücre döngüsü düzenleme ** NF κ B yolağı baskılama ** P53 stabilizasyonu ** Obezite düzenleyici	MST2, K-Ras, MOAP-1, MST1, MST2, MDM2
7	11p15 / 39.9 kDa	** Mitoz ve hücre gelişimi düzenleme ** Apoptoz karşıtı etki	N-Ras, MST1, MST2, CHMP1B, DISC1
8	12p12 / 48.3 kDa	** Hücre gelişimi engelleme ** Wnt ve NF κ B yolaklarını düzenleme ** Hücre- hücre etkileşimi düzenleme	14-3-3 γ , FRMD4A, PSMD4
9	12q21.31 / 50 kDa	** Epidermal homeostazi ** Endozom geri dönüşümü	Peptidylglycine α -amidating monooxygenase, N-, K- and R-Ras

Tablo 5. *RASSF* izoformlarının listesi (Volodko ve ark., 2014) (devamı)

<i>RASSF</i> İzoformu	Kromozomda Yeri/ Protein Miktarı	Biyolojik Fonsiyonu	Etkileşime Girdiği Protein
10	11p15 / 56.9 kDa	** Tümör hücre gelişimini baskılama / Apoptoza teşvik ** Wnt/ β -catenin yolağı baskılama	Tanımlanmamıştır.

Tablo 6. *RASSF* ailesi genlerinin özellikleri (www.ncbi.gov, 13.06.2019 tarihinde edinilmiştir)

Gen Adı	Gen ID	Protein Adı	Aminoasit Sayısı	Nükleotit Sayısı	Exon Sayısı
<i>RASSF1</i>	11186	Ras Associated Domain Family Member 1	344	1,9 kbp	9
<i>RASSF2</i>	9770	Ras Associated Domain Family Member 2	326	5,4 kbp	15
<i>RASSF3</i>	283349	Ras Associated Domain Family Member 3	238	3,5 kbp	8
<i>RASSF4</i>	83937	Ras Associated Domain Family Member 4	321	3,6 kbp	12
<i>RASSF5</i>	83593	Ras Associated Domain Family Member 5	418	3,5 kbp	7
<i>RASSF6</i>	166824	Ras Associated Domain Family Member 6	369	5,9 kbp	17
<i>RASSF7</i>	8045	Ras Associated Domain Family Member 7	373	2,0 kbp	7
<i>RASSF8</i>	11228	Ras Associated Domain Family Member 8	419	2,7 kbp	11
<i>RASSF9</i>	9182	Ras Associated Domain Family Member 9	435	5,5 kbp	3
<i>RASSF10</i>	644943	Ras Associated Domain Family Member 10	507	2,8 kbp	1

2.9.2 *RASSF* Proteinlerinin Epigenetik Düzenlenmesi

Epigenetik, son dönemlerde kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve şizofreni için önemli bir faktör haline gelmiştir. Nükleotit dizisini veya organizmanın bir sonraki nesile aktarma kabiliyetini değiştirmeksizin gen ekspresyonunda yaptığı değişiklik mekanizmasıdır. Epigenetik değişiklikler bir sonraki nesile direk olarak transfer edilmemesine rağmen, çoğu durumda belirli bir bölgede meydana gelen değişime olan yatkınlık transfer edilebilir ve ailesel bağ oluşabilir.

Epigenetik değişiklikler, önceki bölümde belirtildiği gibi, kromatinin yeniden şekillenmesi veya DNA ya da histon modifikasyonları ile olabilir. Histon modifikasyonlarının başında sitozinin 5-metilsitozine dönüşmesi gelir. Yine promotör bölgede CpG adaları olarak bilinen ve CG bakımından zengin DNA uzantıları üzerinde

de gerçekleşebilir ve normal transkripsiyona müdahale eder (Hu ve ark., 2013). DNA metilasyonu genelde DNA metiltransferaz 1 enzimi (DNMT1) ile gerçekleştirilir ve yarı metillenen DNA' yı metiller. DNMT3a ve 3b metiltransferazlar ise metillenmemiş CpG bölgelerindeki yeni metilasyondan sorumludur. Metilasyon şiddetli bir değişiklik de olsa, bir sitidin analogu olan 5-Aza-2'-deoksisitidin tarafından baskılanabilir (Christman, 2002). Bu sitidin analogunun kullanımında sınırlamalar vardır ve etkilenen bölgeye potansiyel bir terapötik ajan olarak gitmesinde zorluklar olabilir.

Yine daha önce belirtildiği gibi, pekçok *RASSF* ailesi üyeleri promotor spesifik epigenetik değişiklikler ile düzenlenir. *RASSF1A* ilk tanımlanan ve insan kanserlerinde en çok metilasyona uğrayan genlerden biri olarak düşünülür. Çok sayıda kanserde epigenetik olarak susturulmakla kalmaz, aynı zamanda kanserde en erken saptanabilen değişikliklerden biri olarak tanımlanır (Klajic ve ark., 2013).

Epigenetik değişimler exon 1 ve *RASS1A* promotorunu kapsayan >60 CpG bölgesinde gerçekleşir. Susturulma farklı hücre hatlarında tanımlanabileceği gibi, 5-aza-2'-deoksisitidin, makhanin(machanine), kurkumin ve desitabin gibi çeşitli kanserler için onaylanan ilaçlar ile onarılabilir (Sorensen ve ark., 2002; Du ve ark., 2012).

RASSF1A metilasyonunun, farklı tümörlerin özellikleri ile ilişkisi pek çok araştırmanın konusudur. Örneğin servikal adenokarsinomada ve tiroid kanserlerinde *RASSF1A* promotor metilasyonu, K-Ras ve B-Raf mutasyonları ile ters orantılı olarak ilişkilendirilmiştir (Kang ve ark., 2007; Brait ve ark., 2012).

RASSF1A metilasyonu ayrıca *TP53* mutasyonu ile da ters orantılı olup, tümör oluşumunda bağımsız mekanizmalar olarak görülür (Klajic ve ark., 2013). *RASSF1A* metilasyonu ile yüksek tümör dereceleri arasındaki ilişki, derin myometriyal istila ve endometriyal kanserde pelvik lenf bezlerinin pozitif metastatik gelişiminde karşımıza çıkar (Duan ve ark., 2013). İlginç bir şekilde, *RASSF1A* hipermetilasyonu Wilms tümörlerinde de kromozom dengesizliği ile bağlantılı şekilde görülür. Bu da *RASSF1A*'nın genomik dengeyi kontrol etmedeki rolünü ortaya koyar (Haruta ve ark., 2008).

Akciğer kanserinde, alt tip spesifik olarak fark yaratan metilasyon değişiklikleri *RASSF1A*'nın NSCLC' de (nonsmall cell lung cancer) düşük metilasyonu, SCLC' de (small cell lung cancer) yüksek metilasyonu ile kendini gösterebilir. Yine göğüs kanserinde *HER2* pozitifte, *HER2* negatife kıyasla, *RASSF1A* daha yüksek

metilasyonludur (Klajic ve ark., 2013). Akut myeloid lösemide ise, *RASSF1A* metilasyonu hiç veya az oluşur ve *RASSF1A*'nın ekspresyonu etkilenmezse patojenezde bu metilasyon önemli değildir. *RASSF1A*'nın aksine lösemide, *RASSF6*, *7* veya *10*'un epigenetik susturulmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Kanserin yanısıra, *RASSF1A*'nın epigenetik susturulması, inflamatuvar bağırsak hastalığının (IBD) bir formu olan ülseratif kolit (ulcerative colitis, UC) hastalarında da görülmüştür (Abouzeid ve ark., 2010). UC ve Crohn hastalığı (CD) idiopatik kronik bağırsak hastalıklarıdır ve sebepleri bilinmemektedir. Sindirimde önemli GI yolunun inflamasyonu sonucu karın ağrısı, kronik diyare ve kilo kaybına neden olur.

Moleküler olarak inflamasyon, NFκB gibi transkripsiyon faktörlerin hiperaktivasyonu ve inflamatuvar yanıt oluşturmak için sitokinlerin yüksek üretimi olarak açıklanır (Ridder ve ark., 2007; Baumgart ve ark., 2007). NFκB'nin aktivasyonu, Toll benzeri reseptörler (TLR) veya tümör nekroz faktörü α (TNF α) gibi çoklu yüzey reseptörlerinden kaynaklanabilir, bu da sonuçta IL-6 üretimi gibi sitokin üretimi ile sonuçlanır. IL-6'nin DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) upregülasyonu ile *RASSF1A*'nın epigenetik kaybına yol açabileceği, bunun da inflamasyonun *RASSF1A* ekspresyon kaybına sebep olacağı ve UC hastalarının neden *RASSF1A* epigenetik kayıplara sahip olduğunun açıklanabileceği düşünülmektedir (Braconi ve ark., 2010; Goran ve ark., 2010).

Önemli bir şekilde, IBD hastaları (inflamatuvar bağırsak hastalığı) hayatlarının geç evrelerinde kolorektal kanser gelişimine sahip olurlar ve *RASSF1A* promotor metilasyonu kolorektal kanserde karşımıza çıkar. Bu da *RASSF1A* kaybının kolorektal kanser gelişiminde erken bir belirti olmasını düşündürür. Yine *RASSF1A*'nın benzer bir epigenetik susturulması pankreatitli hastaların %44'ünde saptanmaktadır (Abouzeid ve ark., 2011).

Pankreas kanserinde, pankreas inflamasyonu belirtileri bir çeşit yatkınlık faktörüdür yani kanser eğilimi gösterebilecek durumdadır. Bu hastaların %83'ünde *RASSF1A* epigenetik susturulmaya uğramıştır. Böylece, kanser öncesi bir durum sırasında yani inflamasyonda *RASSF1A* epigenetik kaybı, kronik inflamasyonun

yayılmayı artırmak üzere *RASSF1A*' yı epigenetik olarak susturduğu bir moleküler mekanizmayı gösterir (Dammann ve ark., 2003).

RASSF2'nin 5' CpG adası yaklaşık 1.6 kb' dır ve *RASSF2* tiroid hastalarının %88' inde epigenetik olarak susturulmuştur. Bu hastaların %63' ü, *RASSF5A* geninde de epigenetik susturulmaya uğramıştır (Schagdarsurengin ve ark., 2010). Guatr veya foliküler adenomlu hastalarda epigenetik susturulmaya rastlanmamıştır. Aynı örneklerde, *RASSF3* ve *4* epigenetik değişime uğramayıp, *RASSF5A* uğramıştır. Bu da tiroid bezlerinin fonksiyonunda *RASSF2* ve *RASSF5A*' nın ayırt edici özelliklerinin olduğunu gösterir. Ayrıca, tiroid kanser hücre hatlarında, 5-aza-2'-doksisitidin tedavisinin *RASSF2* ve *RASSF5A* ekspresyonunu düzelttiği görülmüştür.

RASSF2 metilasyonuna, kolorektal kanser (CRC), gastrik kanser ve oral skuamöz hücre karsinomunda (oral squamous cell cancer) da rastlanır. Skuamöz servikal kanserde (squamous cell cancer), *RASSF2* hipermetilasyonu ile daha kısa sağkalım süresi ilişkilidir (Guerrero-Setas ve ark., 2013). İlginç bir şekilde CRC (kolorektal kanser) hastalarında, histon modifikasyonu ile epigenetik mekanizma muhtemelen *RASSF2* susturulmasında rol oynar, çünkü hücrelerin histon deasetilaz inhibitörü ile güçlendirilmesi *RASSF2* ekspresyonunu artırır (Akino ve ark., 2005).

RASSF3' ün promotor metilasyonu, kanserde nadiren rastlanır. Yakın zamanda da sadece hipofiz adenomunun alt tipi olan somatotrof adenomda (somatotroph adenoma) rastlanmıştır (Peng ve ark., 2013). Yine başka bir güncel çalışmada, bazı polimorfizmlerin *RASSF3* ekspresyon seviyelerini değiştirerek baş ve boyun skuamöz hücre karsinomuna yol açabileceği saptanmıştır. Bu da *RASSF3* düzenlemesinin başka bir yoludur (Guo ve ark., 2013).

Baş ve boyun skuamöz hücre karsinomunda (head and neck squamous cell carcinoma) *RASSF4* promotor metilasyonu oldukça nadirdir. %13 oranında seyrederek (Steinmann ve ark., 2009). Yine daha az sıklıkla *RASSF4* promotor metilasyonu, nazofarenks kanserinde (nasopharyngeal cancer) %5 oranındadır (Chow ve ark., 2004).

Kıyaslandığında baş ve boyun skuamöz hücre karsinomu (HHSCC), *RASSF4* metilasyonuna daha yüksek bir eğilim gösterir. Bu da *RASSF4* ekspresyonunun, oral kanser kök benzeri hücrelerde (oral cancer stem like cells) yani kanser başlatıcı hücrelerde bastırıldığına dair bulgular içerir. Bu sebeple *RASSF4*' ün hücre göçündeki önemi ve yayılma (invasive) kontrolündeki rolü görülür (Michifuri ve ark., 2013).

Önceki çalışmalar, akciğer tümör hücre hatlarında ve primer akciğer tümörlerinde *RASSF5A* ekspresyonunun kaybına dikkat çeker (Vos ve ark., 2003). Ayrıca Wilms tümörü ve renal hücre karsinomu, kolon kanseri gibi diğer kanserlerde de *RASSF5A*'nın promotor spesifik hipermetilasyonu önem arz eder. Epigenetik susturmaya alternatif olarak *RASSF5A*, kalpain (calpain) proteinleri tarafından katalizlenen proteoliz ile downregüle olabilir. Tümör hücrelerinin büyümesine yani büyümeyi engelleyen durumlardan kaçınmaya yol açar (Kuznetsov ve ark., 2008). *RASSF5C* promotor metilasyonu ise nadirdir. Sebebi lenf dokularına ekspresyonunun limitli olmasıdır. Bu genin metilasyonu sadece, hepatosellüler karsinomada ve Merkel hücre karsinomunun %8'inde görülür.

RASSF5'e benzer şekilde, *RASSF6* da nöroblastoma ve çocukluk çağı lösemisinde epigenetik olarak susturulmuş durumdadır (Hesson ve ark., 2009). *RASSF6*'nın düzenlenmesinde bağışıklık sisteminin önemli olduğunu belirtmek için, *RASSF6* in vitro ortamda makrofajlarla downregüle edilmiştir (Sanada ve ark., 2013).

RASSF ailesinin bir diğer üyesi olan *RASSF10* da epigenetik olarak susturulur. Bugüne kadar, kötü huylu malignant melanoma hasta örneklerinin %68'i epigenetik olarak susturulmuş durumda bulunmuştur (Helmbold ve ark., 2012). Ayrıca, *RASSF10* promotor metilasyonu, prostat kanserli hastalarda ve pediatrik yani çocukluk lösemisinin %88'inde, yine kronik lenfosit lösemisinin %50'inde, tiroid kanserlerinin %66'sında ve melanomanın %68'inde rastlanmıştır.

RASSF7 ve *8* metilasyonu ile ilgili çok fazla bulgu yoktur, ayrıca *RASSF9* geni de CpG adası bulundurmaz.

RASSF proteinlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde epigenetiğin önemine vurgu yapılmasına rağmen, altında yatan mekanizmalar yeni yeni keşfedilmektedir. Son zamanlarda *RASSF1A*'nın promotor metilasyonunun *P53* ve ölüm bağımlı protein 6 (death associated protein 6/ *DAXX*) tarafından düzenlendiği bulunmuştur (Zhang ve ark., 2012). Yapılan çalışmalara göre *P53*, *RASSF1A* promotoruna bağlanır, *DAXX* ve DNMT1 proteinlerini toplar, DNA metilasyonuna ve sonunda *RASSF1A*'nın

inaktivasyonuna yol açar. *P53* protein seviyesindeki dalgalanmalar, *RASSF1A* metilasyonunu etkilemez. Tersine, *RASSF1A* promotorun metilasyonu, *DAXX* tarafından kontrol edilir, çünkü *DAXX*' in zorlanmış aşırı ekspresyonu *RASSF1A* promotor metilasyonunu başlatır, *DAXX*' in baskılanması ise *RASSF1A* metilasyonunu azaltır (Zhang ve ark., 2012).

RASSF1A mekanizmasında epigenetik susturulmayı daha iyi anlayabilmek için, Palakurthy ve ekibi genom ölçekli RNAi tarama yaptılar ve *RASSF1A* promotor hipermetilasyonu için homeobox protein 3' ün (*HOXB3*) gerekli olduğunu buldular (Palakurthy ve ark., 2009; Li ve ark., 2012). Bu buluş daha sonra miRNA çalışmalarıyla da desteklendi. Bulguya göre, *HOXB3 DNMT3B* genine bağlanır, ekspresyonunu artırır. *DNMT3B* geni sonra, *RASSF1A* lokusuna, polycomb represör kompleks 2 (polycomb repressor complex 2) ve MYC etkileşimi ile alınır. Bu etkileşim ile *RASSF1A* promotoru metillenir (Palakurthy ve ark., 2009).

Yine yakın çalışmaların bir diğerinde, bir başka etkenin, *RASSF1A* epigenetik düzenlemesinde önemi incelenmiştir. Beckedorff ve ekibi, *RASSF1A*' nın antisense zincirinden kopyalanan, uzun kodlamayan ve yapışmamış bir RNA' nın, *RASSF1A* transkripsiyon bölgesinde RNA/DNA hibridi oluşturduğunu ve polycomb represör kompleks 2' yi (polycomb repressor complex 2) *RASSF1A* promotoruna eklediğini bulmuşlardır (Beckedorff ve ark., 2013). Tüm bu bulgular da, *RASSF1A* promotorunda H3K27 histonunun metilasyonunda artış ve transkripsiyon aktivitesinin spesifik olarak azalması sonucuna vardırırmıştır. Bu çalışmada, *RASSF1A* promotoründe herhangi bir DNA hipermetilasyonuna rastlanmamıştır (Beckedorff ve ark., 2013). Tablo 7' de *RASSF* proteinlerinin herbirinin çeşitli kanserlerde promotor metilasyon durumları gösterilmektedir.

Tablo 7. *RASSF* proteinlerinin çeşitli kanserlerde promotor metilasyonu

Gen	Kanser Tipi	Metilasyon Yüzdesi
<i>RASSF1A</i>	• Adrenokortikal Karsinoma	• %60
	• Endometriyal Kanser	• %85
	• Ewing Sarkoma	• %68
	• Hepatoblastoma	• %44

	• Merkel Hücre Karsinomu	• %51
	• Papillar Tiroid Karsinomu	• *
	• Paratiroid Tümörler	• %52
	• Hipofiz Adenomları	• %20-50
<i>RASSF2</i>	• Meme Kanseri	• %38
	• Kolorektal Kanser	• %42
	• Endometriyal Kanser	• %60
	• Ewing Sarkoma	• *
	• Mide Kanseri	• %80
	• Akciğer Kanseri / NSCLC	• %31
	• Merkel Hücre Karsinomu	• %7
	• Nazofaringeal Karsinoma	• %51
	• Oral Skuamöz Hücre Karsinomu	• %26
	• Prostat Kanseri	• %67
	• Skuamöz Servikal Kanser	• %61
	• Tiroid Kanseri	• %63
<i>RASSF3</i>	• Somatotrof Adenomu	• *
<i>RASSF4</i>	• Meme Kanseri	• %27, %54 ise meme kanser hücre hatlarında
	• Hepatosellular Karsinoma	• %5
	• Karaciğer Kanseri	• %44 renal kanser karsinom hücre hatlarında
	• Akciğer Kanseri	• %21 SCLC, %22 NSCLC
	• Nazofaringeal Kanser	• %5

Tablo 7. *RASSF* proteinlerinin çeşitli kanserlerde promotör metilasyonu (devamı)

Gen	Kanser Tipi	Metilasyon Yüzdesi
<i>RASSF5A</i>	• Kolorektal Kanser	• %39
	• Feokromositoma ve Abdominal Paraganglioma	• *
<i>RASSF5C</i>	• Hepatosellular Karsinom	• %62

	• Merkel Hücre Karsinomu	• %8
<i>RASSF6</i>	• Çocukluk Çağı Lösemisi • Nöroblastoma	• %94 B-ALL, %41 T-ALL • *
<i>RASSF7</i>	• Kronik Lenfositik Lösemi • Nöroblastoma	• %16 • *
<i>RASSF8</i>	• Çocukluk Çağı Lösemisi • Farelerde Akciğer Adenokarsinomu	• %9 B-ALL, %10 T-ALL • *
<i>RASSF10</i>	• Çocukluk Çağı Lösemisi • Kronik Lenfositik Lösemi • Glioblastoma • Melanoma • Merkel Hücre Karsinomu • Prostat Kanseri • Tiroid Kanseri	• %16 B-ALL, %88 T-ALL • %50 • * • %68 • %23 • * • %66

* Taranan makalelerde, yüzdesi kesin olarak tanımlanamayan bu kanserlerin kontrol grubu hastalar ile kıyaslandığında daha yüksek *RASSF* metilasyonlarına denk gelinmiştir.

2.9.3 *RASSF* Proteinlerinin Düzenlenmesinde Diğer Mekanizmalar

RASSF düzenlenmesinde mikroRNA ve post translasyonel değişimler gibi farklı mekanizmalar da mümkündür. Yine tek nükleotit polimorfizmi de bazı *RASSF*'lerde proteinin biyolojisini değiştiren farklı mekanizmadır (Gordon ve ark., 2012).

MikroRNA Düzenlemesi

MikroRNA' lar (miRNA'lar) çok sayıda fizyolojik sürecin düzenlenmesi için önemli olan kısa (~22 nükleotit) RNA' lardır. İnsan protein kodlama genlerinin yaklaşık %60' ının miRNA' lar tarafından düzenlendiği görülmektedir (Freidman ve ark., 2009).

Birçok miRNA, CpG adaları ile ilişkili olarak epigenetik düzenlemeye uğramıştır. Ayrıca histon değişimleri ile de düzenlenirler. MiRNA' lar sıklıkla pek çok kanserde düzensiz durumdadırlar, ayrıca miRNA' ların hedef genlere bağlı olarak onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev gösterebileceği öne sürülür (Esquela-Kerscher ve ark., 2006).

Biyoinformatik analizler ile *RASSF1A* mRNA' sının, en az 15 miRNA ile hedeflenebileceği öngörülmüştür. Bu miRNA' lar; miR-326, -330, -149, -16, -497, -504, -410, -99a, -99b, -100, -124, -193, -193b, -182, -181a–d. Ancak deneysel olarak doğrulanan fakat tahmin edilmeyen tek miRNA mir- 602' dir.

Son zamanlarda, hepatoma hücrelerinde mir-602' nin ekspresyonunun engellenmesi ile *RASSF1A* ekspresyonunun artırıldığı ve bunun hepatoma hücre apoptozunu geliştirdiği, ayrıca mir-602' nin *RASSF1A* tümör baskılayıcı fonksiyonlarını baskılayarak HBV (Hepatit B virüs) aracılı hepatokarsinogenезin erken evresinde düzenleyici olarak rol aldığı ve hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Yang ve ark., 2010). Hepatokarsinogenезin erken evrelerinde anormal mir-602 ekspresyonu saptanmıştır ve *RASSF1A* protein kaybıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu da potansiyel bir erken durum saptayıcı markır olabileceği ve HBV pozitif hepatosellular karsinomda terapötik hedef olabileceği kanısını doğurur.

RASSF1A gibi epigenetik olarak susturulmuş genlerde, DNMT aktivitesini düzenlemek için daimi inflamasyon ve IL-6 seviyesi artar. mikroRNA hedefli DNMT' ler veya epigenetik düzenlemelerdeki diğer proteinler de *RASSF1A* ekspresyonunu etkiler. Yapılan bir çalışmada, DNMT1' in aşırı ekspresyonu kolorektal kanser dokularında ve hücre hatlarında mir-342 ile bağlantılı olarak bulunmuştur (Wang ve ark., 2010).

Mir-342 tamiri, DNMT1 ekspresyonunun azalmasıyla sonuçlanmış ve bu da promotor demetilasyonu sayesinde *ADAM23*, *Hint1* ve *RECKS* genleri ile *RASSF1A*' nın yeniden aktivasyonunu sağlamıştır. Li ve arkadaşları meme kanseri hücrelerinde, HOXB3 transkripsiyon faktörünün mir-7 ve mir-218 susturulmasından sonra, DNMT3b' nin *RASSF1A* promotoru ile bağlantılı olduğunu buldular (Li ve ark., 2012).

Ek olarak, hiler kolanjiokarsinomda mir-373' ün MBD2 (methyl-CpG-Binding Domain Protein 2) aracılığıyla *RASSF1A*' yı düzenlediği gösterilmiştir. QBC₉₃₉ hücrelerinde, mir-373 ile MBD2 baskılanması *RASSF1A* ekspresyonunu artırırken,

HIBE_{pic} hücrelerinde de anti- mir373 baskılayıcısı ile MBD2 aktivasyonu, *RASSF1A* ekspresyonunu azaltmıştır (Chen ve ark., 2011). Bir başka çalışmada Chen ve arkadaşları, mir-373 gen promotörünün CpG adası bulunduğunu ve metilasyonla düzenlendiğini ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2011). Bu tarz çalışmalar ile *RASSF1A* da, mikroRNA düzenlemelerinin önemi desteklenir. Diğer *RASSF* üyelerinin de miRNAlar tarafından düzenlendiği düşünülse de henüz bilimsel olarak ortaya konan veriler yoktur.

Post Translasyonel Değişimler

RASSF1A'nın translasyon sonrası değişimleri, bu genin biyolojik özelliklerini ve dengesini etkileyebilecek düzenleme mekanizmaları olarak tanımlanır. *RASSF1A*'nın fizyolojik koşullar altında, bazı Serin ve Treonin rezidülerinde fosforile olduğu bilinmektedir. Rong ve ekibi, mitotik bir kinaz olan Aurora-A'nın mitoz sırasında, *RASSF1A* ile Thr202 ve Ser203 numaralı rezidülerde doğrudan etkileşime girdiği ve bunun da, *RASSF1A*'nın mikrotübüllerle bağlanması ve hücre döngüsü ilerlemesini düzenlemesi kabiliyetini etkilediğini ortaya atmışlardır (Rong ve ark., 2007).

Yine *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), *CDK4* (cyclin-dependent kinase-4), *PKC* (protein kinase C), *MST1* (Mammalian STE20-like kinase 1), *Aurora A*, *Aurora B* ve *Chk1* (check point kinase 1) gibi diğer çeşitli kinazların, *RASSF1A*'yı fosforillediği çalışmalar ile desteklenmiştir (Rong ve ark., 2007; Song ve ark., 2009; Jiang ve ark., 2014). Bu kinazların herbiri, *RASSF1A*'nın değişik fonksiyonlarını değişik şekilde etkiler. *RASSF1A*'nın fosforilasyon ile düzenlenmesi, birden fazla kinazın ortak iş görmesiyle gerçekleşip, çeşitli hücresel süreçler için *RASSF1A* fonksiyonunu değiştirirler. Tablo 8' de *RASSF1A* için tanımlanan tüm kinazlar ve bu gene etkileri verilmiştir.

Tablo 8. *RASSF1A* için tanımlanan kinazların ve *RASSF1A*'ya etkilerinin özeti

Kinaz	Aminoasit Rezidüsü	<i>RASSF1A</i> Fonksiyonuna Etkisi
Aurora A (Song ve ark., 2009; Rong ve ark., 2007)	T202 ve S203	Fosforilasyon, <i>RASSF1A</i> 'nın mikrotübüller ile etkileşimini bozar ve <i>RASSF1A</i> 'nın M fazı hücre döngüsü tutması yeteneğini ortadan kaldırır. Ayrıca fosforilasyon, <i>RASSF1A</i> 'nın Cdc20'den kopmasına yol açar. Böylece Cdc20 ve APC etkileşimi doğurur. Siklin A azalması ve prometafaz ilerlemesi

		gerçekleşir.
Aurora B (Song ve ark., 200)	S203	Fosforilasyon, Syntaxin 16 ile etkileşime yol açar ve syntaxin16'nın geç mitozaya etki eder ve sitokin tamamlanması doğurur.
Cyc D- CDK4 (Song ve ark., 2008)	S203	<i>RASSF1A</i> 'nın Skp2 bağımlı bozulması için fosforilasyon gerekir.
Chk1 (check point kinase 1) (Jiang ve ark., 2014)	S184	Fosforilasyon, <i>RASSF1A</i> 'nın mikrotübüllerden kopmasına neden olur ve hücrede <i>RASSF1A</i> dağılımını değiştirir. Ayrıca <i>RASSF1A</i> 'nın M fazı tutumu (arrest) yol açma yeteneğini ortadan kaldırır.
ATM (Hamilton ve ark., 2009)	S131	<i>P73</i> dengesini sağlayan <i>MST2</i> ve <i>LATS1</i> aktivasyonu için fosforilasyon gereklidir.
PKC (Verma ve ark., 2008)	S197 ve S203	<i>RASSF1A</i> 'nın mikrotübül ağını yeniden organize etmesi için fosforilasyon gereklidir.
MST1 (Vichalkovski ve ark., 2008)	T202 ve S203	<i>RASSF1A</i> 'nın NDR1/2'yi aktive etmesi için fosforilasyon gereklidir.
GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) (Ghazaleh ve ark., 2010)	S175, S178 ve S179	<i>RASSF1A</i> 'nın TNF-R1 veya TRAIL-R1 ile bağlantıyı ortadan kaldırmak için 14-3-3 ile bağlanması amacıyla fosforilasyon gereklidir.

Daha önce bahsedildiği gibi, *RASSF1A* proteini, G1 fazında hücreleri tutar ve *RASSF1A*'nın kaybı kanserde kontrol edilemeyen hücre bölünmesine götürür. Normal hücrelerde *RASSF1A* ifade edilmeye başlandıktan sonra, bu hücreler *RASSF1A* azaltmak ve hücre döngüsü devam ettirmek için bir mekanizmaya sahip olmak zorunda kalırlar. Bunda, ubiquitinasyon mekanizması, hücre döngüsü ilerlemesi düzenlenmesinde önemli bir faktör olarak görülür (Teixeria ve ark., 2013).

Verilere göre, ubiquitinasyon enzim kompleksleri *RASSF1A*'yı düzenler. Hatta *RASSF1A* düzenlenmesinde, Skp1-Cul1-F kutusu (SCF box) ubiquitin ligaz kompleksinin tanımlanan ilk düzenleme kompleksi olduğu bilinir (Song ve ark., 2008).

Bu kompleksin Skp2 alt birimi, *RASSF1A* ile etkileşir ve hücre döngüsünün G1-S fazında degradasyona götürür. İlginç bir şekilde *RASSF1A*, Skp2 ile bağlanabilmek için, siklin D ve siklin bağımlı kinaz 4 tarafından Serin202' den fosforillenmelidir (Song ve ark., 2008).

Mitozda, Cullin 4A (CULL4A), *RASSF1A* degradasyonunu kolaylaştırır (Jiang ve ark., 2010). Bu durumda, DNA hasar bağlanma proteini 1 (DDBP1) *RASSF1A* ile direk etkileşime girer ve onu mitozda CUL4A E3 ligaz kompleksine getirir. Bu nedenle, ubikitinasyon, *RASSF1A* düzenlemesinde önemlidir ve ubikitinasyon mekanizmasının bozukluğu *RASSF1A* ekspresyon kaybına böylece bağlantılı hepatosellular karsinoma belirtilerine yol açar. Bu da aslında diagnostik bir markır görevi görür (Calvisi ve ark., 2009).

RASSF1A promotorunun *P53* bağlanma bölgesine sahip olduğu bilinmektedir, bu da ATG transkripsiyon başlama kodonunun 2718 baz yukarisındadır. *P53*, *RASSF1A* promotoruna bağlanabilir ve bu genin aktivasyonunu durdurabilir. Transkripsiyon faktör araştırmalarının çoğu, *RASSF4* hariç *RASSF* genlerinin hepsinin promotor bölgelerinde, *P53* ve NFκB bağlanma bölgelerine sahip olduklarını göstermektedir. Tablo 9' da tüm *RASSF* genleri ile bunların transkripsiyon bağlanma bölgeleri verilmiştir.

Tablo 9. Transkripsiyon faktör bağlanma bölgeleri ve *RASSF* genleri

<i>RASSF</i>	Potansiyel TF Bağlanma Bölgeleri
<i>RASSF1</i>	NFκB, p53, AP1, c-Jun, HoxA5
<i>RASSF2</i>	NFκB, p53, NFAT, IRF-1, SRY
<i>RASSF3</i>	p53, ITF-2, Tal-1β, c-Myc, Max1, CP1A, NF-Y, CBF(2)

<i>RASSF4</i>	SRF, Pax-5, SRY, HOAA3, E2F, STAT1, STAT2
<i>RASSF5A</i>	NFκB, p53, Elk-1
<i>RASSF5C</i>	NFκB, p53, AP4, c-Myb
<i>RASSF6</i>	NFκB, p53, FoxC1, Hlf, FOXO3, RFX1, RelA
<i>RASSF7</i>	NFκB, STAT3, c-Myc, c-Myb, Max-1, NF-1, HNF-1
<i>RASSF8</i>	RORα2, POU3F, POU2F, RSFC4, Cdc5, RFX1
<i>RASSF9</i>	Nkx2, RORα2, CHOP-10, c/EBPα, Lhx3, Pax-4, ER-α, Evi-1, Olf-1
<i>RASSF10</i>	Cart-1, NRSF, CREB, RFX1, ATF-2, CRE-BP1, FOXO1a, FOXO1, HNF-3β

Kısaca özetlersek, *RASSF* proteinleri tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahiptir ve hücre gelişimi ve çoğalmasını engellemede büyük önem arz ederler. Ayrıca hücre ölümüne de teşvik edebilirler. *RASSF* proteinleri, işlevlerinin çoğunu diğer proteinlerle etkileşime girerek ve kompleks mekanizmalar tarafından düzenlenerek gerçekleştirirler. Bu mekanizmaların başında, promotor hipermetilasyonu, histon modifikasyonu, protein translasyon sonrası değişiklikler, polimorfik değişimler ve miRNA düzenlemeleri gelir. *RASSF* genlerinin promotor spesifik metilasyon ile epigenetik susturulması, pek çok kanserde karşımıza çıkar. Yapılan çalışmalar ile, inflamasyonun epigenetik susturma için tetikleyici olduğu ve kanser gelişimine katkı sağladığı sonucu doğar. *RASSF* promotor hipermetilasyonlarının her biri çeşitli kanserlerde önemlidir.

Bu çalışmada da, *RASSF* ailesi proteinlerinden olan *RASSF1A* ve *RASSF2A*'nın promotor hipermetilasyon ile epigenetik olarak susturulmasının endometriyal kanserde tetikleyici bir etken olup olmadığı üzerinde durulmuştur.

RASSF ailesi ile ilgili Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ile kanser epigenetiğine ilişkin veriler elde edilmiştir. Gelecekte buna benzer ve ıŐık tutacak diğer çalışmalar ile *RASSF* ailesinin kanserde etkisi ve önemi daha da anlaşılabilir olacaktır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Klinik Örneklerin Toplanması ve Karakterizasyonu

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Bölümü'nden formaline fikse edilmiş parafine gömülü 15 doku çalışmaya dâhil edildi. Bu dokular endometriyal kanser teşhisi konmuş hastaların histerektomi sırasında alınan dokularıydı. Dokular laboratuvar sıcaklığında tutuldu. Endometriyal kanser teşhisi konan ve Patoloji Bölümü'nden dokuları temin edilen bu 15 hastanın her birinin ayrıca periferik kanları da, EDTA'lı tam kan tüplerine alındı. Bu kanlar da laboratuvar çalışmaları için -20°C'de saklandı.

Yine Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden kontrol grubu olarak düşünülen 10 doku çalışmaya dâhil edildi. Bu dokular, sağlıklı kadınların sezeryan doğum sırasında jinekologlar tarafından rahimlerinden alınmıştı. Alınan doku örnekleri cerrahi numune kaplarına konmuş şekilde teslim alındı. -20 °C'de laboratuvar çalışmaları için saklandı.

Hasta grubu için çalışmaya dâhil edilen 38-64 yaş arası 15 kadının yaş ortalaması 53 iken, kontrol grubu 26-37 yaş arası 10 kadının yaş ortalaması 32 idi. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamalarının yakın olmamasının nedeni, hasta grubunun özellikle 45 yaş üstü menopozlu kadınlar, kontrol grubunun da doğum yapan sağlıklı genç kadınlar olarak seçilmesidir.

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler, Solüsyonlar ve Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler temin edildikleri firmalar ile birlikte Liste 1'de, kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Liste 2'de, kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları ise Liste 3'de sıralanmıştır.

Liste 1. Kimyasal Maddeler ve Temin Edilen Firmalar

Firma İsmi	Kimyasal Madde İsmi
Thermo Scientific	MgCl ₂
	10X Taq Buffer
	Taq DNA Polimeraz
	dNTP Mix
	6X DNA Loading Dye
	Gene Ruler LR
Oligomer	RASSF1A FM Primer
	RASSF1A RM Primer
	RASSF1A FU Primer
	RASSF1A RU Primer
	RASSF2A FM Primer
	RASSF2A RM Primer
	RASSF2A FU Primer
	RASSF2A RU Primer
Prona Biomax	Ultra Pure™ Agaroz
Merck	EDTA
Riedel-de Haen	Saf Etanol
Sigma	EtBr
İnvitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit	DNA İzolasyon Kiti
Thermo Scientific GeneJET FFPE DNA Purification Kit	DNA İzolasyon Kiti
Thermo Scientific EpiJET Bisulfite Conversion Kit	Bisülfıt Modifikasyon Kiti

Liste 2. Kullanılan Cihazlar ve Kullanılma Amaçları

Kullanılma Amacı	Cihaz İsmi
İnkübasyon	VWR Digital Heatblock
İnkübasyon	Techne DRI-Block
Santrifüj	Nüve NF 048
Spektrofotometre	JENWAY Genova Nano
Vorteks	Clifton Cyclone
PCR	GeneAmp PCR System 9700
Otoklav / Sterilizasyon	Nüve
Bidistile Su Hazırlama	Nüve
Hassas Terazı	Mettler AJ 100
Otomatik Pipetler	Ependorf, Socorex, Rainin
Elektroforez Tankı	Scie-Plas
UV Görüntüleme Analiz	Biolab

Liste 3. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışları

Solüsyon İsmi	Hazırlanışı
10XTBE	108 gr Tris, 55 gr Borik Asit, 40 ml EDTA 0,5 M pH:8 karıştırılıp üzerine 1000 ml olacak şekilde bidistile su ilave edilir.
1XTBE	100 ml 10XTBE ile 900 ml bidistile su karıştırılır.
Agaroz Jel	2 gr agaroz ve 100 ml bidistile su karıştırılır. Mikrodalgada kaynatılıp üzerine 100 µl EtBr ilave edilir.
Etidium Bromüd Solüsyonu	Stoktan (1 gr EtBr ve 10 ml distile su) 100 µl EtBr alınıp 900 µl deiyonize su ile karıştırılır.

3.3 DNA İzolasyon Yöntemi

Endometriyal CA tanısı konan hastaların tümör doku ve periferik kan örnekleri ile sağlıklı kadınların doku örneklerinden ayrı ayrı DNA izolasyonu yapıldı.

Kontrol grubu olarak tayin edilen dokuların her biri önce ayrı ayrı petri kaplarına alınıp bistiiri ile küçük parçalara bölündü ve mikrosantrifüj tüplere alınmak üzere izolasyon için hazır hale getirildi. Thermo Fisher Scientific İnvitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit kullanılarak dokuların DNA izolasyonları yapıldı. Bu kitte bulunan kimyasallar; Genomik Yıkama Solüsyonu 1 ve 2, Genomik Elution Solüsyonu, Genomik Digestion Solüsyonu, Genomik Liziz/Bağlanma Solüsyonu, Proteinaz K ve RNaz A idi.

3.3.1 Hazırlık

- İnkübatör 55°C'ye ayarlandı.
- Bistiiri ile küçük parçalara bölünen doku örneklerinin herbirinden ≤25 mg ayrı ayrı mikrosantrifüj tüplere alındı.
- Genomik Yıkama Solüsyonu 1'e 75 ml %96-100 etanol eklendi. Genomik Yıkama Solüsyonu 2'ye ise 87.5 ml %96-100 etanol eklendi.

3.3.2 Protokol

Lizis:

1. Önceden hazırlanan mikrosantrifüj tüplere 80 µl Purelink Genomik Digestion Solüsyonu ve 20 µl Poteinaz K eklendi. (Doku parçalarının tüplerdeki solüsyon içinde kalmasına özen gösterildi.)
2. Mikrosantrifüj tüplerdeki örnekler 55°C inkübatörde 1 saat liziz için bırakıldı.
3. Herhangi kalıntı parçacıklarını gidermek için, lizat maximum hızda 3 dakika santrifüjlendi.
4. Süpernatant yeni ve steril mikrosantrifüj tüplere transfer edildi.
5. Lizatlara 20 µl RNaz A eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
6. Lizatlara 200 µl Purelink Genomic Lizis/ Bağlanma Solüsyonu eklenerek iyice karışması için vortekslendi.

DNA Bağlanma:

7. Lizatlara 200 µl %96-100 etanol eklenerek 5 saniye daha vortekslendi.
8. Lizatlar mikrosantrifüj tüplerden Purelink Spin Column 'lara aktarıldı. 1 dakika 10.000 rpm' de santrifüj edildi.

Yıkama:

9. Purelink Spin Column'lar kisten çıkan yeni koleksiyon tüplere geçirildi. Herbir lizat karışımına 500 µl Yıkama Solüsyonu 1 eklendi. 1 dakika 10.000 rpm' de santrifüj edildi.
10. Spin column' lar yeni koleksiyon tüplere geçirildi. Sonra herbir lizat karışımına 500 µl Yıkama Solüsyonu 2 eklendi. Maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi ve koleksiyon tüpler yenileriyle değiştirildi.

Ayrılma:

11. Spin column' lar 1.5-mL mikrosantrifüj tüplere geçirildi. Herbirine 25 µl Genomik Elution Solüsyon konarak oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
12. Maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapıldı ve saf genomik DNA'lar dokulardan elden edildi. Örnekler -20°C' de saklandı.

Endometriyal kanser teşhisi konan hastalardan alınan periferik kan örneklerinin izolasyonu için (Thermo Fisher Scientific Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit)

kullanıldı. Kite bulunan kimyasallar Genomik Yıkama Solüsyonu 1 ve 2, Genomik Elution Solüsyonu, Genomik Digestion Solüsyonu, Genomik Lizis/Bağlanma Solüsyonu, Proteinaz K ve RNaz A idi.

3.3.3 Hazırlık

- İnkübatör 55°C'ye ayarlandı.
- Steril mikrosantrifüj tüplere ayrı ayrı olarak 200 µL kan örnekleri koyuldu.
- Genomik Yıkama Solüsyonu 1'e 75 ml %96-100 etanol eklendi. Genomik Yıkama Solüsyonu 2'ye ise 87.5 ml %96-100 etanol eklendi.

3.3.4 Protokol

Lizis:

1. Önceden hazırlanan ve örneklerin olduğu mikrosantrifüj tüplere 20 µl RNaz A ve 20 µl Poteinaz K eklendi. İyi bir karışım sağlamak için vortekslendi.
2. 2 dakika oda ısısında bırakıldı.
3. 200 µL Purelink Genomick Lizis/Bağlanma Solüsyonu eklenerek homojen karışım sağlamak için yine vortekslendi.
4. Mikrosantrifüj tüplerdeki örnekler 50°C inkübatörde 10 dakika liziz için bırakıldı ve protein parçalanması sağlandı.

DNA Bağlanma:

5. Mikrosantrifüj tüplerdeki lizatların herbirine 200 µL %96-100 etanol eklendi ve homojen karışım için 5 saniye vortekslendi.
6. Tüplerdeki lizatlar Purelink Spin Column'lara aktarıldı ve 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

Yıkama:

7. Spin Column'lar yeni koleksiyon tüplere geçirildi ve 500 µL Yıkama solüsyonu 1 eklenip 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

8. Koleksiyon tüpler değiştirildi ve 500 µL herbir lizata Yıkama solüsyonu 2 eklenerek maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi.

Ayrılma:

9. Koleksiyon tüpler atıldı ve Spin column' lar steril 1.5-mL mikrosantrifüj tüplere geçirildi. 25 µL her bir tüpe Purelink Genomic Elution solüsyonu eklenerek 1 dakika süreyle oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

10. Maksimum hızda 1 dakika santifüj edildi ve saf genomik DNA' lar elde edildi. -20°C 'de saklandı.

Endometriyal kanser teşhisi konan hastalardan alınan ve formaline fikse edilmiş parafin gömülü dokuların izolasyonuna başlamadan önce, bu dokuların herbirinden ayrı ayrı kesit alınıp 1.5-mL mikrosantrifüj tüplere itinayla kondu. İzolasyon için (Thermo Scientific GeneJet FFPE DNA Purification Kit) kullanıldı. Kitte bulunan kimyasallar; Yıkama Solüsyonu 1 ve 2, Elution Solüsyonu, Digestion Solüsyonu, Proteinaz K ve RNaz A idi.

3.3.5 Hazırlık

- İnkübatörler 90°C 'ye ve 65°C' ye ayarlandı.
- Kesit alınan dokular'dan ≤ 25 mg steril mikrosantrifüj tüplere alındı.
- Yıkama solüsyonu 1 ve 2' ye ayrı ayrı 30 ml %96-100 etanol eklendi.

3.3.6 Protokol

Lizis:

1. Mikrosantrifüj tüplerdeki dokuların herbirine 200 µL Digestion solüsyonu eklendi ve 90°C' de 5 dakika inkübe edildi.
2. Ardından vortekslendi ve oda sıcaklığında örnekler soğumaya bırakıldı.
3. Lizatlara 20 µL Proteinaz K eklenip homojen karışım elde etmek için vortekslendi.
4. Örnekler 65°C 'de 70 dakika inkübasyona bırakıldı. Hemen peşinden 40 dakika yine 90°C' de inkübe edildi. (Sıcaklığın 90°C' nin üstüne çıkmamasına özen gösterildi.)

5. Mikrosantrifüj tüplerdeki örnekler 6.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant bırakılarak sıvı kısım yeni mikrosantrifüj tüplere aktarıldı.

6. 10 µL RNaz A eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

Bağlanma:

7. 200 µL Bağlanma Solüsyonu eklenerek 10 saniye vortekslendi.

8. 400 µL %96-100 etanol eklendi ve 10 saniye yine vortekslendi.

9. Lizatlar GeneJet DNA Purification Column' lara aktarıldı. 6.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpleri değiştirildi.

Yıkama:

10. 500 µL Yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpteki sıvı boşaltılıp geri takıldı.

11. 500 µL Yıkama solüsyonu 2 eklenerek maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpler boşaltılıp geri takıldı.

Ayrılma:

12. Maksimum hızda 1 dakika yine santrifüj edildi ve purification column' lar steril 1.5 mL mikrosantrifüj tüplere geçirildi.

13. Herbir tüpe 60 µL Elution solüsyonu eklenip 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilip saf genomik DNA' lar elde edildi. -20°C'ye kaldırıldı.

3.4 DNA Miktar Tayini

Hasta grubumuza ait 15 adet parafin gömülü dokudan ve aynı kişilere ait 15 adet periferik kandan ayrı ayrı izole edilen DNA örneklerinin miktar tayinleri UV Spektrofotometre cihazı ile yapıldı ve bisülfid modifikasyonları için istenen miktarda DNA' lar mikrosantrifüj tüplere alınarak 20 µL 'ye tamamlamak için üzerlerine deiyonize su ilave edildi. Yine kontrol grubumuza ait ve sezeryan doğum sırasında rahimden alınan 10 adet sağlıklı dokudan izole edilen DNA örneklerinin de miktar

tainleri UV Spektrofotometre cihazı ile yapılıp, bisülfıt modifikasyonları için istenen miktarda DNA' lar mikrosantrifüj tüplere alınarak 20 µL'ye tamamlamak üzere deiyonize su ilave edildi.

3.5 Bisülfıt Modifikasyonu

Bisülfıt modifikasyonunda, DNA' daki metillenmemiş tüm sitozinler kimyasal reaksiyonla urasile çevrildi. DNA' daki metillenmiş olan sitozinler ise reaksiyon süresince değişmeden kaldı. Dönüşüm işlemi bittikten sonra DNA, PCR ile çoğaltıldı ve sekanslama işlemi yapılarak DNA' nın metilasyon statüsü belirlendi. Sekanslama esnasında urasile çevrilen metillenmemiş sitozinler timin olarak, metillenmiş sitozinler ise sitozin olarak ölçüldü.

Modifikasyon için Thermo Fisher Scientific EpiJET Bisulfite Conversion Kit kullanıldı. Kıtte bulunan kimyasallar; Modifikasyon Reaktifleri, Modifikasyon Solüsyonu 1 ve 2, Yıkama Solüsyonu, Desulfination Solüsyonu, Bağlanma Solüsyonu, Elution Solüsyonu idi.

3.5.1 Hazırlık

- Modifikasyon reaktiflerinin hazırlanması için kuru reaktife 0.9 mL deiyonize su, 200 µL modifikasyon solüsyonu 1 ve 60 µL modifikasyon solüsyonu 2 eklendi.
- Homojen karışım için reaktif 10 dakika hızlı olmayacak şekilde çalkalandı.
- İnkübatörler 98°C 'ye ve 60°C' ye ayarlandı.

3.5.2 Protokol

Lizis:

1. Önceden izole edilen 200-500 ng saf genomik DNA' lardan 20 µL alınarak steril mikrosantrifüj tüplere kondu.
2. Üzerlerine 120 µL önceden hazırlanan Modifikasyon reaktif solüsyon karışımından eklendi. Pipetaj ile karışım sağlandı.
3. 98°C' de 10 dakika inkübasyonun ardından 60°C' de 150 dakika inkübe edildi.

Bağlanma:

4. Ardından DNA Purification Micro Column' lara 400 µL Bağlanma Solüsyonu kondu.
5. Dönüştürülen DNA örnekleri mikrosantrifüj tüplerden alınıp Bağlanma solüsyonlara yüklendi ve pipetaj ile karışım sağlandı.
6. 12.000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve koleksiyon tüpler geri takıldı.

Yıkama:

7. 200 µL Yıkama solüsyonu eklendi, 12.000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve koleksiyon tüpler geri takıldı.
8. 200 µL Desulfonation solüsyonu eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
9. 12.000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve koleksiyon tüpler geri takıldı.
10. 200 µL Yıkama solüsyonu eklenip 12.000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi, aynı şekilde süpernatant atılıp koleksiyon tüpler geri takıldı.
11. İlave 200 µL Yıkama solüsyonu eklenip 12.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilip, column' lar steril 1.5-mL mikrosantrifüj tüplere geçirildi.

Ayrılma:

12. Column' lara 15 µL Elution solüsyonu konarak 12.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi ve dönüştürülmüş DNA' lar elde edildi. -20°C' de saklandı.

3.6 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Amplifikasyonu

Önce izole edilen sonra bisülfid modifikasyon ile dönüştürülen hasta ve kontrol grubu DNA' ları metilasyon spesifik PCR ile gözlemlendi. *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri için ilk zincirler, PCR ürün boyutları ve optimum sıcaklık dereceleri Tablo 10' da verilmiştir.

Tablo 10. *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri, primer zincirleri, PCR ürün boyutları ve optimum sıcaklık değerleri

GEN	PRİMER ZİNCİRİ 5' – 3'	PCR ÜRÜN BOYUTU, bp	SICAKLIK °C
<i>RASSF1A</i> (FM)	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	93	57,5
<i>RASSF1A</i> (RM)	AACCCCGCGAACTAAAAACGA		
<i>RASSF1A</i> (FU)	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	105	56
<i>RASSF1A</i> (RU)	CAAACCCACAACTAAAAACAA		
<i>RASSF2A</i> (FM)	GTTCGTCGTCGTTTTTTAGGCG	89	60,5
<i>RASSF2A</i> (RM)	A AAAACCAACGACCCCGCG		
<i>RASSF2A</i> (FU)	AGTTTGTGTTGTTTTTTAGGTGG	121	56
<i>RASSF2A</i> (RU)	AAAAAACCAACAACCCCA		

Herbir PCR amplifikasyon aşamasında 10' ar örnek çalışıldı ve herbir gen için ayrı ayrı metile ve unmetile durumları değerlendirildi. 10 örnek için reaksiyon hacmi toplamda 250 µL ayarlandı. Kullanılan kimyasallar miktarlarıyla birlikte Tablo 11' de sıralanmıştır.

Tablo 11. PCR Amplifikasyonu Protokol

Kimyasal adı	Örnek başına kullanılma miktarı		Çalışılan örnek sayısı		Tüm örnekler için total hacim
10 X Taq Buffer	2,5 µL	X	10	=	25 µL
DNTP	0,2 µL	X	10	=	2 µL
Forward Primer	0,3 µL	X	10	=	3 µL
Reverse Primer	0,3 µL	X	10	=	3 µL
MgCl₂	1,5 µL	X	10	=	15 µL
Deiyonize Su	15,2 µL	X	10	=	152 µL
Kalıp DNA	3 µL	X	10	=	30 µL
Enzim Karışımı	2 µL (0.50 µL Taq Polimeraz + 1,50 µL 1XTaq Buffer)	X	10	=	20 µL

3.6.1 *RASSF1A* PCR Protokol

1. Total karışım için 1 adet steril 1,5-mL mikrosantrifüj tüp ayarlandı.
2. İlk deiyonize su olmak üzere herbir kimyasaldan Tablo 10' da belirtilen miktarda kondu.
3. 10 adet steril PCR tüp ayarlandı ve total karışımdan 20 µL herbir PCR tüpe alındı.
4. Üzerlerine ayrı ayrı 3 µL kalıp DNA' lar eklenerek PCR cihazına kondu.

PCR döngüsü Tablo 12' de gösterilmektedir.

Tablo 12. *RASSF1A* PCR Döngüsü

Başlangıç Denatürasyonu	97°C	3 dakika
Denatürasyon	96°C	40 saniye
Bağlanma	**	40 saniye
Uzama	72°C	1 dakika
Son Uzama	72°C	7 dakika
Saklama	4°C	∞

** *RASSF1A* Met için bağlanma sıcaklığı; 57.5⁰ C / *RASSF1A* UnMet için bağlanma sıcaklığı; 56⁰ C

5. PCR amplifikasyonu Tablo 12' de gösterildiği gibi ön ısı döngüsü 97⁰ C' de 3 dk. olarak başladı.
6. 3 dakikalık başlangıç denatürasyonundan sonra cihaz durduruldu ve Tablo 10' da belirtilen miktardaki enzim karışımından herbir PCR tüpe 2 µL kondu. Döngü devam ettirildi.
7. 96⁰ C' de 40 sn. denatürasyon, ardından ayrı ayrı olacak şekilde *RASSF1A* Met için 57.5⁰ C ve *RASSF1A* Unmet için 56⁰ C' de 40 sn. bağlanma ve 72⁰ C' de 1 dk. uzama 40 döngü boyunca devam etti. Son uzama 7 dk. 72⁰ C' de tamamlanıp amplifikasyon gerçekleştirildi.

3.6.2 *RASSF2A* PCR Protokol

1. Total karışım için 1 adet steril 1,5-mL mikrosantrifüj tüp ayarlandı.

2. İlk deiyonize su olmak üzere herbir kimyasaldan tablo 10' da belirtilen miktarda kondu.
- 3.10 adet steril PCR tüp ayarlandı ve total karışımdan 20 µL herbir PCR tüpe alındı.
4. Üzerlerine ayrı ayrı 3 µL kalıp DNA' lar eklenerek PCR cihazına kondu.

PCR döngüsü Tablo 13' de gösterilmektedir.

Tablo 13. *RASSF2A* PCR Döngüsü

Başlangıç Denatürasyonu	97°C	3 dakika
Denatürasyon	96°C	40 saniye
Bağlanma	**	40 saniye
Uzama	72°C	1 dakika
Son Uzama	72°C	7 dakika
Saklama	4°C	∞

** *RASSF2A* Met için bağlanma sıcaklığı; 60.5⁰ C / *RASSF2A* UnMet için bağlanma sıcaklığı; 56⁰ C

5. PCR amplifikasyonu Tablo 13' de gösterildiği gibi ön ısı döngüsü 97⁰ C' de 3 dk. olarak başladı.
6. 3 dakikalık başlangıç denatürasyonundan sonra cihaz durduruldu ve hazırlanan enzim karışımından herbir PCR tüpe 2 µL kondu. Döngü devam ettirildi.
7. 96⁰ C' de 40 sn. denatürasyon, ardından *RASSF2A* Met için 60.5⁰ C ve *RASSF2A* Unmet için 56⁰ C' de 40 sn. bağlanma ve 72⁰ C' de 1 dk. uzama 40 döngü boyunca devam etti. Son uzama 7 dk. 72⁰ C' de tamamlanıp amplifikasyon gerçekleştirildi.

3.7 PCR Ürünlerinin Analizi

PCR ürünleri %2' lik agaroz jelde analiz edilmiştir. Agaroz jelin hazırlanışı protokolde anlatılmaktadır.

3.7.1 Protokol

1. 2 gr agaroz ile 100 mL 1XTBE buffer karıştırılarak mikrodalga fırında kaynatıldı.

2. Uygun sıcaklığa (80⁰ C) gelene kadar soğutulup karışıma 100 µL EtBr çeker ocakta eklendi.
3. Ilıklaşınca jel tarağı yerleştirilmiş kalıba döküldü. Soğumaya bırakıldı.
4. Jel donduktan sonra taraklar dikkatle çıkarılıp oluşan kuyucuklara PCR ürünleri ve markır yüklendi.
5. Yükleme aşamasında markır için 2 µL DNA ladder, 3 µL 6X Load Dye, 13 µL 1XTBE karıştırılarak ilk kuyucuğa yüklendi. Örnekler için ise 3 µL 6X Load Dye, 15 µL PCR ürünü karıştırılarak her biri ayrı ayrı yanyana kuyucuklara yüklendi.
6. Elektroforez tankı 125 Voltaj'da 25 dakika çalıştırıldı.

3.8 İstatistiksel Analiz

Hasta grubu 15 adet doku ve 15 adet kan örneklerinde ayrıca kontrol grubu sağlıklı 10 adet doku örneklerinde, *RASSF1A* ile *RASSF2A* genlerinin metilasyon sıklığı ile klinopatolojik parametreler istatistiksel olarak Ki-kare (X^2) ve Fisher exact testleri kullanılarak analiz edildi. $P < 0,05$ değerinin istatistiksel farklılığı gösterdiği düşünüldü. Tüm analizler SPSS (statistical package for the social sciences) istatistiksel yazılım kullanılarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Şubat 2018-Haziran 2019 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden, 38-64 yaş arası 15 endometriyal kanser hastasının periferik kan örnekleri alındı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Patoloji Bölümü'nden, yine aynı 15 endometriyal kanser hastasının formaline fikse edilmiş parafin gömülü doku örnekleri alındı. Ayrıca kontrol grubu için, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden 10 adet sağlıklı kadının sezeryan doğumda rahimlerinden sağlıklı doku örnekleri alındı.

Hasta grubu kadınların her birinin yaşları, kanser tip ve evreleri, tümör dereceleri, invazyon durumları, CA125 değerleri ile ilgili bilgiler toplandı. Yine hasta grubunun menopoz ve menarş yaşları, boy ve kilo değerleri, doğum sayıları ile sigara kullarımlarını içeren bilgiler de toplandı. 15 adet hastanın 14'ünde kanser tipi adenokarsinoma iken, 1'inde skuamöz karsinom idi. Kanser evreleri G1 ve G3 arasıydı. Tümör dereceleri ise 1A-3C arasıydı. Metastaz durumu olan hastaların çoğunda metastaz myometriuma doğruydu. 1 adet hastada metastaz uterus/ korpus' a, 1 adet hastada ise metastaz mesaneye doğruydu. Hastaların ortalama menopoz yaşları 34-51 yaş arası, menarş yaşları ise 11-15 yaş arasıydı. Yine bu hastaların 3 tanesi sigara kullanıyordu. Tablo 14 ve 15' de hasta grubu ile ilgili veriler gösterilmektedir.

Tablo 14. Hasta grubu yaş, kanser tip ve evreleri, tümör dereceleri, metastaz durumları ve CA125 değerleri

Sıra	Yaş	Kanser Tipi	Kanser Evresi	Tümör Derecesi	Metastaz	CA 125 değerleri
1	59	ADENOKARSİNOMA	G3	1B	MYOMETRİUM	17,29
2	55	ADENOKARSİNOMA	G1	1A	-	17,27
3	55	ADENOKARSİNOMA	G1	1A	-	19,71
4	49	ADENOKARSİNOMA	G2	3C	-	83,17
5	60	ADENOKARSİNOMA	G2	1A	MYOMETRİUM	8,01
6	52	ADENOKARSİNOMA	G1	1B	UTERUS / KORPUS	17
7	62	ADENOKARSİNOMA	G2	1A	-	19,8
8	54	ADENOKARSİNOMA	G1	3A	-	51
9	64	SKUAMÖZ KARSİNOM	G2	1A	-	9,07
10	57	ADENOKARSİNOMA	G2	1A	MYOMETRİUM	11,4
11	38	ADENOKARSİNOMA	G1	1A	MESANE	6,43
12	49	ADENOKARSİNOMA	G2	1A	-	10,71
13	53	ADENOKARSİNOMA	G1	1A	MYOMETRİUM	17,15
14	53	ADENOKARSİNOMA	G2	3A	MYOMETRİUM	8,59
15	45	ADENOKARSİNOMA	G1	1A	-	10,85

Tablo 15. Hasta grubu menopoz ve menarş yaşları, doğum sayıları, boy ve kilo değerleri, sigara kullanımları, diğer hastalık verileri

Sıra	Menopoz yaşı	Menarş yaşı	Doğum sayısı (G / SD)	Boy (cm)	Kilo (kg)	Sigara	Diğer Hastalık
1	42	13	5 / 3	156	70	-	-
2	41	14	3	158	70	-	-
3	51	15	3	150	50	-	-
4	41	12	2	152	80	-	-
5	47	12	0	163	73	+	-
6	41	13	2	162	92	-	-
7	52	15	2	170	60	-	-
8	45	14	2 / 1	157	105	-	Kolesterol aile öyküsü
9	49	15	3	160	90	-	-
10	49	11	4 / 1	154	65	+	-

11	34	12	3	162	80	-	Guatr / Astım
12	43	14	0	158	72	+	Meme kisti
13	46	11	0	154	68	-	Diyabet aile öyküsü
14	51	13	3	10	90	-	-
15	40	12	0	157	78	-	İnfertilite / Tip2 Diyabet

** Sigara kullananlar (+) işaretiyle, kullanmayanlar (-) işaretiyle gösterilmiştir.

** G / SD simgesi Gebelik sayısını / Sağlıklı doğum sayısını vermektedir.

Kontrol grubu olan 26-37 yaş arası 10 kişinin ise yaş, boy ve kilo değerleri, menarş yaşları ve doğum sayıları, ayrıca sigara kullanımları ile ilgili bilgiler toplandı. 10 kişinin menarş yaşları, 10-15 yaş arasıydı. 3 tanesi sigara kullanıyordu. Tablo 16' da kontrol grubu ile ilgili tüm veriler gösterilmektedir.

Tablo 16. Kontrol grubu yaş, menarş yaşı, doğum sayıları, boy ve kilo değerleri, sigara kullanımları, diğer hastalık verileri

Sıra	Yaş	Menarş yaşı	Doğum sayısı (G / SD)	Boy (cm)	Kilo (kg)	Sigara	Diğer Hastalık
1	32	12	2	170	72	-	-
2	36	13	4	175	82	-	-
3	33	14	4 / 3	172	80	+	-
4	37	12	6 / 3	158	60	-	-
5	30	11	2 / 1	166	85	+	İnfertilite
6	37	10	2 / 1	148	60	-	-
7	30	15	3 / 1	153	72	-	-
8	33	12	4 / 3	150	65	+	-
9	26	13	3 / 2	165	60	-	Demir Eksikliği Anemisi
10	26	14	3 / 1	160	59	-	-

** Sigara kullananlar (+) işaretiyle, kullanmayanlar (-) işaretiyle gösterilmiştir.

** G / SD simgesi Gebelik sayısını / Sağlıklı doğum sayısını vermektedir.

Hasta ve kontrol grubu tüm kadınların tanı ve teşhisleri konulan başka hastalıkları olup olmadığı da Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi arşivinden kontrol edildi ve veriler toplandı. 15 adet endometriyal kanser hastasının birkaçında başka hastalıklar da vardı. Bunlar guatr, diyabet, kolesterol ve infertilite idi. Sağlıklı 10 kadının 2 tanesinde infertilite ve demir eksikliği anemisi vardı. Diğer hastalıklara ilişkin veriler de yukarıda Tablo 15 ve 16’ da belirtilmiştir.

4.1 Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri

Çalışmada *RASSF1A* ve *RASSF2A* tümör baskılayıcı genlerinin promotor metilasyon analizleri yapılmak üzere 15 endometriyal kanserli kadın hasta ile endometriyal kanser teşhisi olmayan sağlıklı 10 kadın kontrol incelendi. Tablo 17’ de endometriyal kanser teşhisi konmuş 15 kadının yaşları, menopoz ve menarş yaşları, doğum sayıları, boy ve kilo değerleri ile klinik bilgilerinin ortalamaları, ortanca ve aralık değerleri hesaplanmıştır. Tablo 18’ de ise kontrol grubu sağlıklı 10 kadının yaşları, menarş yaşları, doğum sayıları, boy ve kilo değerleri bilgilerinin ortalamaları, ortanca ve aralık değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 17. Hasta grubu verilerinin ortalama, ortanca ve aralık değerleri

Hasta Grubu	Minimum	Maksimum	Ortalama± SS	Ortanca	Aralık (range)
Yaş	38	64	53,67 (±6,693)	54,00	26,00
Menopoz Yaşı	34	51	44,8000 (±5,101)	45,00	18,00
Menarş Yaşı	11	15	13,0667(±1,387)	13,00	4,00
Çocuk sayısı	0	3	1,8667(±1,245)	2,00	3,00
Boy (cm)	150	170	148,2000(±38,550)	157	160
Kilo (kg)	105	50	76,2000(±13,985)	73,00	55,00

CA125 değeri	6,43	83,17	20,4967(±20,356)	17,00	76,74
--------------	------	-------	------------------	-------	-------

Tablo 18. Kontrol grubu verilerinin ortalama, ortanca ve aralık değerleri

Kontrol Grubu	Minimum	Maksimum	Ortalama± SS	Ortanca	Aralık (range)
Yaş	26	37	32,00 (±4,05518)	32,50	11
Menarş Yaşı	10	15	13,4 (1,42)	13,5	4
Çocuk Sayısı	1	4	1,9 (0,99)	2,0	3,0
Boy (cm)	148	175	161,7 (9,41)	162,5	27
Kilo (kg)	59	85	69,5 (10,11)	68,5	26

Hasta grubu 15 endometriyal kanserli kadın hastanın klinik verilerinin yüzde hesapları analizi Tablo 19’ da belirtilmektedir.

Tablo 19. Hasta grubu klinik veriler yüzde değerleri

KLİNİK VERİ		HASTA (n=15) (%)
Kanser Tipi	Adenokarsinoma	14 (%93,3)
	Skvamöz Karsinoma	1 (%6,7)
Metastaz	+	7 (%46,7)
	-	8 (%53,3)
CA 125	≤10	4 (%26,7)
	>10	11 (%73,3)
Evre (Grade)	Evre 1	8 (%53,3)
	Evre 2	6 (%40)
	Evre 3	1(% 6,7)
Derece (Stage)	S1A	10 (%66,6)
	S1B	1(% 6,7)
	S3A	2(%13,33)

	S3B	1(% 6,7)
	S3C	1(% 6,7)

Hasta grubu endometriyal kanserli 15 kadın ile kontrol grubu sağlıklı 10 kadının, sigara kullanımları ile başka herhangi bir hastalıklarının olup olmadığı ile ilgili yüzde hesapları analizi Tablo 20’ de verilmiştir.

Tablo 20. Hasta ve kontrol grubu sigara kullanımı ve diğer hastalık verileri yüzde değerleri

VERİLER		Hasta Grubu (n=15)	Kontrol Grubu (n=10)
Sigara	+	3 (%20,0)	3 (%30)
	-	12 (%80,0)	7 (%70)
Diğer Hastalık	+	5 (%33,3)	2 (%20)
	-	10 (%66,7)	8 (%80)

4.2 *RASSF1A* ve *RASSF2A* Tümör Baskılayıcı Genleri Metilasyon Spesifik PCR Analiz Sonuçları

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Patoloji Bölümü’ nden temin edilen, 15 adet endometriyal kanser hastasının parafine gömülü doku örnekleri ile yine Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği’ nden temin edilen, aynı 15 endometriyal kanser hastasının periferik kan örnekleri ayrı ayrı hem *RASSF1A* hem de *RASSF2A* tümör baskılayıcı genleri için PCR analizi yapıldı. Bunun yanı sıra, kontrol grubu olarak ayarlanan 10 adet sağlıklı kadının sezeryan doğumda rahimlerinden alınan doku örnekleri de ayrı ayrı *RASSF1A* ve *RASSF2A* tümör baskılayıcı genleri için PCR analizi yapıldı ve metilasyon durumları incelendi.

Metile olup olmadıklarını teyit etmek ve kesin sonuç almak amacıyla hasta grubu doku ve kan örnekleri ile kontrol grubu doku örneklerinin ayrıca *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri için unmetile durumlarına bakılmak üzere PCR yapıldı. Böylece her iki gen için de tüm örneklerin metile ve unmetile durumlarını gösterir veriler elde edildi. Tablo 21 ve 22’ de sırayla hasta ve kontrol gruplarının metilasyon spesifik PCR analiz sonuçları gösterilmektedir.

Tablo 21. Hasta grubu *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri metilasyon analiz sonuçları

Hasta Grubu	<i>RASSF1A</i>	<i>RASSF2A</i>	Hasta Grubu	<i>RASSF1A</i>	<i>RASSF2A</i>
PD1	-	+	EK1	-	-
PD2	+	+	EK2	-	+
PD3	+	+	EK3	+	+
PD4	+	+	EK4	+	+
PD5	+	+	EK5	-	+
PD6	-	+	EK6	-	-
PD7	-	+	EK7	-	-
PD8	+	+	EK8	-	+
PD9	+	+	EK9	+	+
PD10	+	+	EK10	+	+
PD11	-	+	EK11	-	-
PD12	+	-	EK12	+	+
PD13	-	-	EK13	-	+
PD14	-	-	EK14	-	+
PD15	-	+	EK15	-	+

** (+) metilasyon durumu gözlenenler, (-) metilasyon durumu gözlenmeyenler için kullanılan imgelerdir.

** PD: Hasta parafine gömülü doku örnekleri / EK: Hasta periferik kan örnekleri

Tablo 22. Kontrol grubu *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri metilasyon analiz sonuçları

Kontrol grubu	<i>RASSF1A</i>	<i>RASSF2A</i>	Kontrol Grubu	<i>RASSF1A</i>	<i>RASSF2A</i>
ED1	-	-	ED6	-	-
ED2	-	-	ED7	-	-
ED3	-	-	ED8	-	-
ED4	-	-	ED9	+	-
ED5	-	-	ED10	-	-

** (+) metilasyon durumu gözlenenler, (-) metilasyon durumu gözlenmeyenler için kullanılan imgelerdir.

** ED: Sağlıklı kontrol doku örnekleri

Hasta grubu 15 adet endometriyal kanserli kadının parafine gömülü dokularında, *RASSF1A* tümör baskılayıcı geni için promotor bölge metilasyon durumlarına bakıldığında 8 (%53, 3) numunede metilasyon gözlemlenmiştir. Bu kadınların periferik kan örneklerinde, *RASSF1A* tümör baskılayıcı geni için promotor bölge metilasyon durumları incelendiğinde yalnızca 5 (%33, 3) numunede metilasyon gözlemlenmiştir.

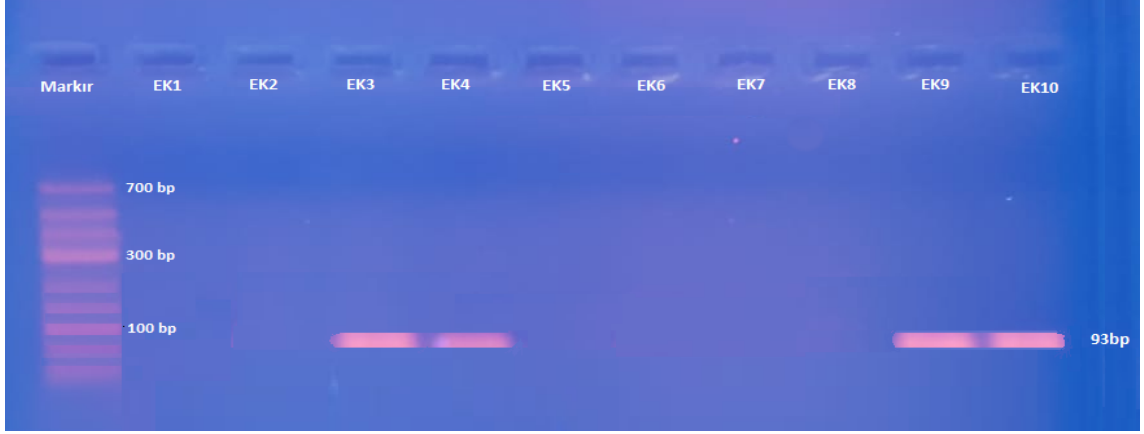
Kontrol grubu sağlıklı 10 kadının doku örneklerinde ise *RASSF1A* tümör baskılayıcı geni metilasyon durumu incelendiğinde yalnızca 1 (%10) numunede metilasyon gözlemlenmiştir.

Hasta grubu 15 endometriyal kanserli kadının parafine gömülü doku ve kan örneklerinde *RASS2A* tümör baskılayıcı geni için promotor bölge metilasyonu incelendiğinde, parafin gömülü doku örneklerinin 12' sinde (%80), periferal kan örneklerinin de 11' inde (%73, 3) metilasyon durumu gözlemlenmiştir. Kontrol grubu 10 kadının doku örneklerinde *RASSF2A* tümör baskılayıcı geni metilasyon analizinde ise hiçbir örnekte metilasyon saptanmamıştır.

Şekil 16, 17, 18, 19 ve 20' de sırasıyla *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri için hasta ve kontrol gruplarının PCR görüntüleri verilmektedir. *RASSF1A* PCR sonuçlarında ürün boyutu 93 bp iken, *RASSF2A* PCR sonuçlarında ürün boyutu 89 bp olarak görülmektedir.



Şekil 16. Hasta grubu 10 adet doku örneğinin *RASSF1A* geni için metile durumlarının görüntüsü (kullanılan markır ThermoScientific Gene Ruler LR)



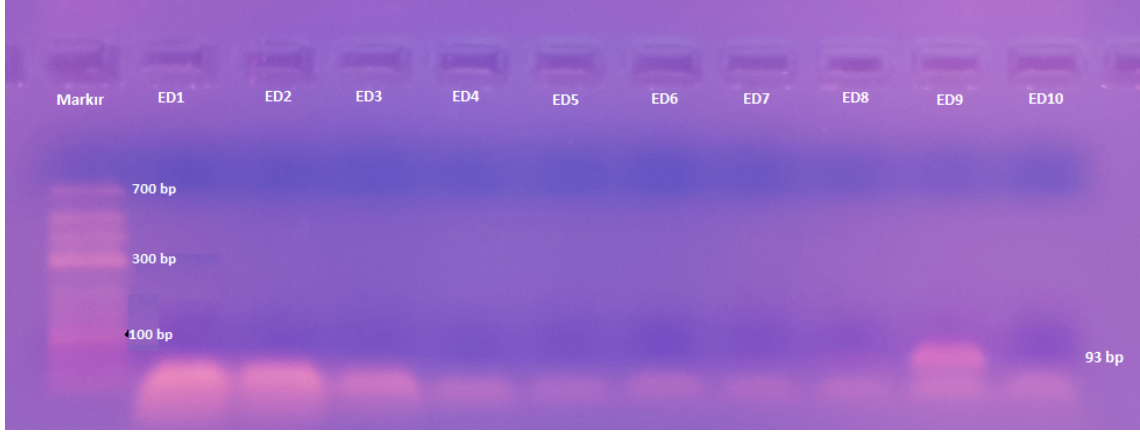
Şekil 17. Hasta grubu 10 adet kan örneğinin *RASSF1A* geni için metile durumlarının görüntüsü (kullanılan markır ThermoScientific Gene Ruler LR)



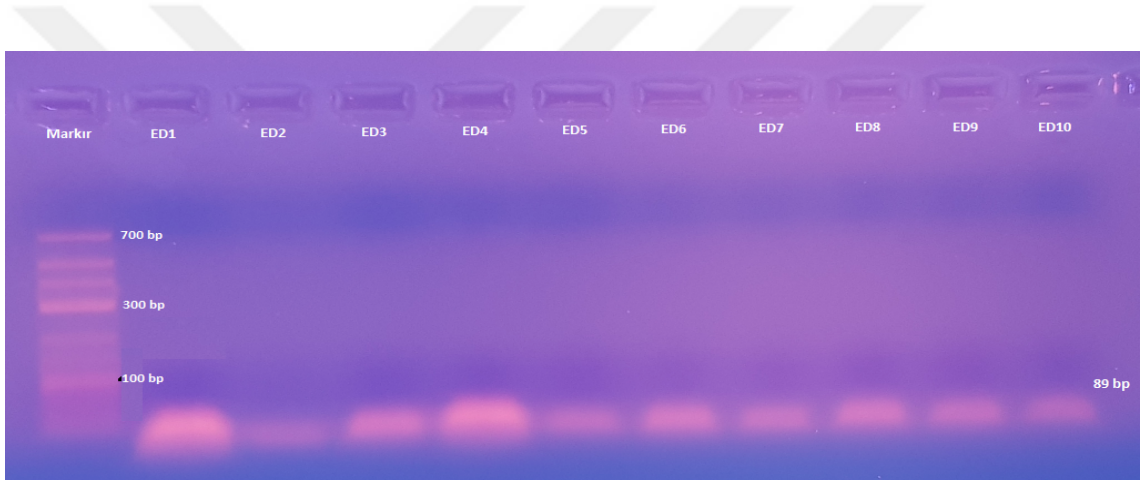
Şekil 18. Hasta grubu 10 adet doku örneğinin *RASSF2A* geni için metile durumlarının görüntüsü (kullanılan markır ThermoScientific Gene Ruler LR)



Şekil 19. Hasta grubu 10 adet kan örneğinin *RASSF2A* geni için metile durumlarının görüntüsü (kullanılan markır ThermoScientific Gene Ruler LR)



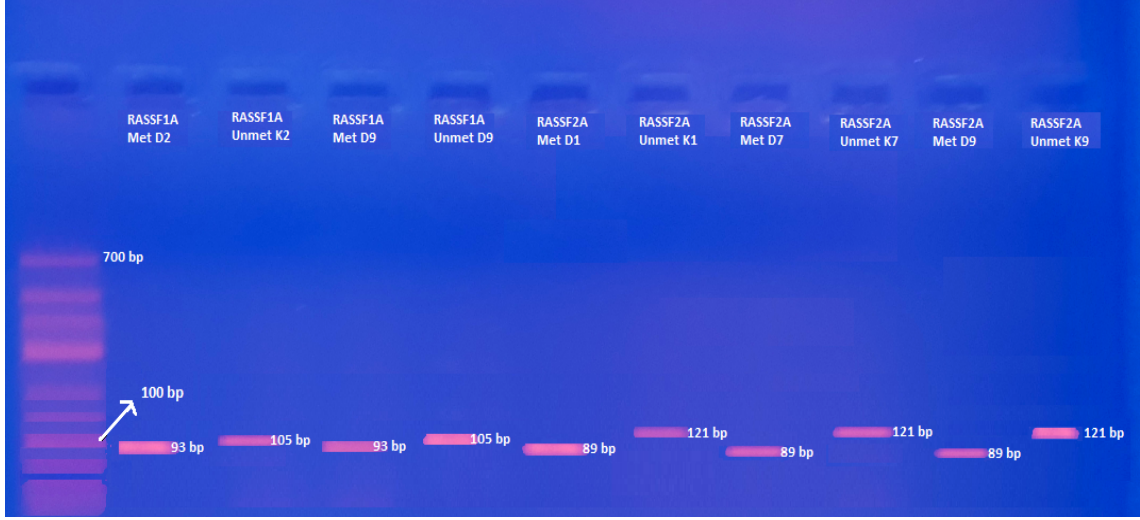
Şekil 20. Kontrol grubu 10 adet doku örneğinin *RASSF1A* geni için metile durumlarının görüntüsü (kullanılan markır ThermoScientific Gene Ruler LR)



Şekil 21. Kontrol grubu doku örneklerinin *RASSF2A* geni için metile durumlarının görüntüsü (kullanılan markır ThermoScientific Gene Ruler LR)

Bazı hastalar *RASSF1A* geni için doku veya kan örneklerinde hem metillenen (metile) hem de metillenmeyen (unmetile) bant vermişlerdir. Yine bazı hastalar *RASSF2A* geni için doku veya kan örneklerinde hem metillenen (metile) hem de metillenmeyen (unmetile) bant vermişlerdir. Tüm bu PCR görüntüleri ile elde edilen veriler toplanarak, her iki gen için de ayrı ayrı metillenen ve metillenmeyen bant veren örnekler bir araya getirilip, tekrar elektroforezde görüntülenmiştir. Şekil 22’ de *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri için ayrı ayrı her iki durumda da bant veren örnekler vardır. *RASSF1A* Met ürün boyutu 93 bp, *RASSF1A* Unmet ürün boyutu 105 bp, *RASSF2A* Met ürün boyutu 89 bp, *RASSF2A* Unmet ürün boyutu 121 bp olarak kaydedilmiştir.

Şekil 22. Hasta grubu *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri metile ve unmetile bant veren örneklerin görüntüsü



4.3 Hasta ve Kontrol Gruplarında *RASSF1A* ve *RASSF2A* Genleri Metilasyon Durumlarının İstatistiksel Analiz Sonuçları

Çalışılan 15 hastanın doku örneklerinde *RASSF1A* geni için metilasyon durumu 8 hastada (%53,3) gözlemlenirken, aynı kişilerin periferal kan örneklerinde 5 hastada (%33,3) gözlemlenmiştir. Çalışılan 10 kontrol grubu sağlıklı kadın doku örneklerinde *RASSF1A* geni metilasyon durumu yalnızca 1 örnekte (%10) gözlemlenmiştir.

Yine çalışılan 15 hastada doku örneklerinde *RASSF2A* geni için metilasyon durumu 12 hastada (%80) gözlemlenirken, aynı kişilerin periferal kan örneklerinde 11 hastada (%73) gözlemlenmiştir. Çalışılan 10 kontrol grubu sağlıklı kadın doku örneklerinde *RASSF2A* geni metilasyon durumu hiçbirinde gözlemlenmemiştir.

RASSF1A ve *RASSF2A* tümör baskılayıcı genlerinin promotor metilasyon analizleri hasta ve kontrol grubu sonuçlarına göre incelenip P değerleri (probability values) hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı aralık $p < 0,05$ olarak tayin edilmiştir.

RASSF1A geninin endometriyal kanser örneklerinde metilasyon durumunu gösteren p değeri 0,08 iken, *RASSF2A* geninin endometriyal kanser örneklerinde metilasyon durumunu gösteren p değeri $< 0,001$ olarak bulunmuştur. Bu veriler çerçevesinde *RASSF2A*'nın, *RASSF1A*'ya göre endometriyal kanserle istatistiksel olarak daha anlamlı bir ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 23, hasta ve kontrol grubunda *RASSF1A* ve *RASSF2A* genlerinin promotor metilasyon profillerini göstermektedir. Tablo 24 ise *RASSF1A* ve *RASSF2A* genlerinin, hasta grubu kan ve doku örneklerinde metilasyon profillerinin karşılaştırılmasını ve istatistiksel verilerini göstermektedir.

Tablo 23. *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri promotor metilasyon profillerinin hasta ve kontrol grubunda dağılımı

Gen	Sayı (n)	Metile (%)	Unmetile (%)	P değeri
<i>RASSF1A</i> Parafine gömülü doku	15	8 (53,3)	7 (46,7)	0,08
<i>RASSF1A</i> Hasta periferel kan örneği	15	5 (33,3)	10 (66,7)	
<i>RASSF1A</i> Sağlıklı endometriyal doku	10	1 (10)	9 (90,0)	
<i>RASSF2A</i> Parafine gömülü doku	15	12 (80,0)	3(20,0)	<0,001
<i>RASSF2A</i> Hasta periferel kan örneği	15	11 (73,3)	4 (26,7)	
<i>RASSF2A</i> Sağlıklı endomertiyal doku	10	0 (0)	10 (100)	

** p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı değerler koyu karakter ile yazılmıştır.

Tablo 24. Hasta grubu kan ve doku örneklerinin metilasyon durumlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

Örnek Grubu	<i>RASSF1A</i> Kan		P Değeri
<i>RASSF1A</i> Doku	Metillenmiş n (%)	Metillenmemiş n (%)	
Metillenmiş n (%)	5 (33,3)	3 (20)	0,01
Metillenmemiş n (%)	0	7 (46,7)	
Toplam	5 (33,3)	10 (66,7)	

Örnek Grubu	<i>RASSF2A</i> Kan		P Değeri
<i>RASSF2A</i> Doku	Metillenmiş n (%)	Metillenmemiş n (%)	
Metillenmiş n (%)	8 (53,3)	4 (26,7)	0,36
Metillenmemiş n (%)	3 (20)	0	
Toplam	11 (73,3)	4 (26,7)	

Tablo 25 ve 26, *RASSF1A* ve *RASSF2A* doku ve periferel kan örneklerinin hasta sayısına, kanser evre ve tümör derecesine ve metastaz durumuna göre metillenme ve metillenmeme durumlarını istatistiksel olarak özetlemektedir. Tablolarda ayrıca sigara kullanımlarının da istatistiksel analizi verilmiştir.

Tablo 25. *RASSF1A* geni hasta örneklerinde metillenme ve metillenmeme durumları istatistiksel veriler

		<i>RASSF1A</i> DOKU Hasta (n=15)			<i>RASSF1A</i> KAN (Hasta n=15)		
Klinik Veri	Parametre	Metillenmiş (%)	Metillenmemiş (%)	P Değeri	Metillenmiş (%)	Metillenmemiş (%)	P Değeri
Kanser Tipi	Adeno karsinoma	7 (46,6)	7 (46,6)	0,533	4 (26,6)	10 (66,6)	0,333
	Skuamöz Karsinoma	1 (6,6)	0		1 (6,6)	0	
Kanser Evresi	G1	3 (20)	5 (33,3)	0,348	1 (6,6)	7 (46,6)	0,08
	G2	4 (26,6)	2 (13,3)		4 (26,6)	2 (13,3)	
	G3	0	1 (6,6)		0	1 (6,6)	
Metastaz	Var	2 (13,3)	5 (33,3)	0,100	1 (6,6)	6 (40)	0,182
	Yok	6 (40)	2 (13,3)		4 (26,6)	4 (26,6)	
Sigara	Var	3 (20)	1 (6,6)	0,338	2 (13,3)	2 (13,3)	0,407
	Yok	5 (33,3)	6 (40,0)		3 (20)	8 (53,3)	
CA 125	≤10	2 (13,3)	2 (13,3)	0,662	1 (6,6)	3 (20)	0,593
	>10	6 (40)	5 (33,3)		4 (26,6)	7 (46,6)	

Tablo 26. *RASSF2A* geni hasta örneklerinde metillenme ve metillenmeme durumları istatistiksel veriler

		<i>RASSF2A</i> DOKU			<i>RASSF2A</i> KAN		
		Hasta (n=15)			Hasta (n=15)		
Klinik Veri	Parametre	Metillenmiş (%)	Metillenmemiş (%)	P Değeri	Metillenmiş (%)	Metillenmemiş (%)	P Değeri
Kanser Tipi	Adeno karsinoma	11 (73,3)	3 (20)	0,800	10 (66,6)	4 (26,6)	0,733
	Skvamöz Karsinoma	1 (6,6)	0		1 (6,6)	0	
Kanser Evresi	G1	7 (46,6)	1 (6,6)	0,549	5 (33,3)	3 (20)	0,563
	G2	4 (26,6)	2 (13,3)		5 (33,3)	1 (6,6)	
	G3	1 (6,6)	0		0	1 (6,6)	
Metastaz	Var	5 (33,3)	2 (13,3)	0,446	4 (26,6)	3 (20)	0,231
	Yok	7 (46,6)	1 (6,6)		7 (46,6)	1 (6,6)	
Sigara	Var	2 (13,3)	2 (13,3)	0,154	4 (26,6)	0	0,242
	Yok	10 (66,6)	1 (6,6)		7 (46,6)	4 (26,6)	
CA 125	≤10	3 (20)	1 (6,6)	0,637	3 (20)	1 (6,6)	0,725
	>10	9 (60)	2 (13,3)		8 (53,3)	3 (20)	

5. TARTIŞMA

Epigenetik; DNA zincirindeki değişikliklerden kaynaklanmayan aynı zamanda kalıtsal olan, gen ekspresyonundaki değişiklikleri inceleyen bir bilim dalıdır. Genotipte herhangi bir değişiklik olmaksızın, genotipin farklı okunması ya da okunamaması sonucunda fenotipteki değişiklikleri konu eder. Epigenetik değişimler düzenli ve doğal oluşumlardır. Fakat yaş, çevresel etkenler, yaşam stilleri ve hastalık durumları gibi faktörler ile de etkilenirler (Egger ve ark., 2004). DNA metilasyon, histon modifikasyon ve kodlamayan RNA ile gen susturulması epigenetik değişiklikleri başlatan ve sürdüren üç temel sistemdir (Egger ve ark., 2004).

Genetik değişimlerin önemi, endometriyal kanserde dikkate değer bir hal almıştır (Yeremian ve ark., 2013; Llobet ve ark., 2009). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda epigenetik düzenlemelerin de endometriyal kanserde önemine vurgu yapılmaktadır. Fakat bu düzenlemeler yani epigenetik modifikasyonlar DNA zincirini değiştirmez. DNA bazlarının histon proteinlerini, yan zincir gruplarını ve hücrelerin biyolojik fonksiyonlarını etkiler (Arafa ve ark., 2010).

RASSF (Ras associated domain family) protein ailesi, lösemi, melanoma, meme, prostat, boyun, akciğer hatta beyin, kolorektal, böbrek ve yumurtalık gibi çok sayıda kanser türünde promotor metilasyon yoluyla ekspresyon kaybına uğrayan 10 üyeye sahip bir tümör baskılayıcı protein ailesidir (Volodko ve ark., 2014). Pek çok *RASSF* ailesi üyeleri promotor spesifik epigenetik değişiklikler ile düzenlenir. *RASSF1A* ilk tanımlanan ve insan kanserlerinde en çok metilasyona uğrayan genlerden biri olarak düşünülür. Çok sayıda kanserde epigenetik olarak susturulmakla kalmaz, aynı zamanda kanserde en erken saptanabilen değişikliklerden biri olarak tanımlanır (Klajic ve ark., 2013).

Epigenetik değişimler exon 1 ve *RASS1A* promotorunu kapsayan >60 CpG bölgesinde gerçekleşir. *RASSF2A* da insan kanserlerinde metilasyona uğrayan genlerden biridir ve kanserde biyomarkır olarak kullanılmaktadır. Endometriyal kanserde bu iki tümör baskılayıcı genin önemi pek çok çalışmayla desteklenmiştir (Jabbara N ve ark., 2016; Seeber ve ark., 2010; Pallares ve ark., 2008; Arafa ve ark., 2008; Fiolka ve ark., 2013; Liao ve ark., 2008).

DNA metilasyonunun, sitoloji, RNA veya tümör değerlendirmesi ile elde edilen protein gibi geleneksel biyomarkırlara oranla daha da geliştirilmesi farklı avantajlara sahiptir. Örneğin DNA daha stabildir, ayrıca sınırlı miktarda doku veya sıvının mevcut olması durumunda inceleme yapılabilir. Buna ek olarak promotor hipermetilasyonu birden fazla ekzon içeren mutasyonlarla karşılaştırıldığında bölgesel analiz yapılan bağımsız CpG adalarında gerçekleşir. Ayrıca DNA metilasyonu çok çeşitli vücut sıvılarında çalışılabilir (Qian ZR ve ark., 2005; Pan Z ve ark., 2005).

Bu çalışmada, benzer çalışmalardan derlenen tüm veriler ışığında *RASSF* ailesi proteinlerinden olan *RASSF1A* ve *RASSF2A*'nın promotor hipermetilasyon ile epigenetik olarak susturulmasının Türk kadınlarında endometriyal kanserde de tetikleyici bir etken olup olmadığı üzerinde durulmuştur.

Çalışmaya göre, *RASSF1A* geninin metilasyon paterni hasta doku örneklerinin %53,3'ünde, hasta periferik kan örneklerinin ise %33,3'ünde tespit edilmiştir. İstatistiksel değeri 0,08 ($p=0.08$) olup anlamlı derecede fark saptanmamıştır. *RASSF2A* geninin metilasyon paterni ise hasta doku örneklerinin %80'inde, hasta periferik kan örneklerinin ise %73'ünde tespit edilmiştir. İstatistiksel değeri $<0,001$ ($p<0.001$) olup anlamlı derecede fark saptanmıştır. Sağlıklı normal dokularda *RASSF1A* geni metilasyon paterni %10 olarak bulunmuştur. *RASSF2A* geni için metilasyon paternine sağlıklı normal dokularda rastlanmamıştır.

Periferik kan metilasyon oranları, doku metilasyon oranlarına göre *RASSF1A* ve *RASSF2A* genlerinin her ikisi için de daha azdır. Bu; ekstraksiyon ve bisülfid dönüşümü, kararsızlık veya normal DNA geçmişine bağlı bir kayıp nedeniyle olası bulunmuştur.

Benzer çalışmalardan biri olan Jabbara ve ekibinin 2016' da endometriyal kanserde *RASSF1A* ve *RASSF2A* genlerinin hipermetilasyon durumları üzerine yaptıkları çalışmada, *RASSF1A* anormal promotor metilasyonu %65 ($p=0,494$), *RASSF2A* anormal promotor metilasyonu ise %11 ($p=0,09$) oranında kan numunelerinde gözlemlenmiştir. Jabbara ve ekibinin bu çalışmasında her iki gen için de metilasyon, endometriyal karsinom ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur.

Hasta dokularında metilasyon paternleri *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri için sırasıyla %53 ve % 42' dir. Normal dokularda metilasyon paterni *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri için sırasıyla %31 ve %9 ($p=0,03$, $p=0,003$) olarak saptanmıştır.Yaş, menopoz durumu, tümör seviye ve evreleri ile *RASSF1A* ve *RASSF2A* genleri promotor metilasyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (Jabbara N ve ark., 2016). 50 yaş üstü hastalarda, erken menopoza girenlerde, ayrıca düşük kanser seviye ve evreli (G1 ve S1) vakalarda metilasyon yüzdeleri daha yüksek bulunmuştur. Jabbara ve ekibinin çalışması ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada sadece *RASSF2A* geni metilasyonu endometriyum kanserinde anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, Jabbara ve ekibinin çalışmasının aksine, *RASSF2A* geni metilasyonu hasta grubu hem doku hem kan örneklerinde *RASSF1A* geni metilasyon paternine göre daha yüksek saptanmıştır. İlerlemiş yaş, erken menopoz, tümör evre ve seviyelerinin ise genlerdeki metilasyon paternlerini etkilemedikleri ve anlamlılığı değiştirmedikleri gözlemlenmiştir.

Seeber ve ekibinin yaptığı çalışmada, *RASSF1A* geni hipermetilasyonu yine endometriyal karsinomda analiz edilip, gözlemlenen gen için %79 oranında metilasyon rapor edilmiştir. Endometriyal kanser Tip I' de, Tip II' ye kıyasla tümör baskılayıcı genin metilasyonunun bu çalışmadan farklı olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Seeber ve ark., 2010).

Yapılan diğer çalışmalar da Seeber ve ekibinin bulgularını doğrulamıştır. Pallares ve ekibi, *RASSF1A* promotor bölgesinin endometriyum kanser hastalarının ortalama % 74' ünde metillendiğini bildirmiştir. Kanser ilerleyen evreleri ile metilasyon paterni arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (Pallares ve ark., 2008). Bu çalışmada, ne Seeber ve ekibinin ne de Pallares ve ekibinin tümör evreleri ve tipleri ile metilasyon paternleri arasındaki anlamlılığa ilişkin verilerine denk verilere rastlanmıştır. Bu parametreler ile metilasyon paterni arasında anlamlı derecede fark gözlenmemiştir.

Arafa ve ekibi endometriyal kanserde *RASSF1A* metillenmiş promotorun hastaların % 74' ünde gerçekleştiği ve azalmış gen ekspresyon düzeyi ile korozyona uğradığını gözlemiştir. Ayrıca anormal metilasyonun, kanser gelişimi, nüksü ve sağkalımı ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Yine yoğun ve anormal metilasyonun, endometriyal kanser vakalarında sıklıkla ortaya çıkan kromozom 3p' de LOH (heterozigotluk kaybı) ile bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir (Arafa ve ark., 2008).

Fiolka ve ekibi ise, *RASSF1A*'nın anormal promotör metilasyon sıklığının yüksek olduğunu yaptıkları çalışmalar ile desteklemiştir. Endometriyal kanser hasta ve kontrollerde sırasıyla % 85.5 ve %30 oranında metilasyon saptanmıştır (Fiolka ve ark., 2013).

Liao ve ekibi, 75 vakanın 25'inde %33 oranında *RASSF2A* gen promotör metilasyonu olan hastalarda, endometriyal kanser riskinde artış olduğunu yaptıkları çalışmalar ile göstermişlerdir. Ayrıca yaşlı hastalarda endometriyal kanser insidansında artış gözlenmiştir (Liao ve ark., 2008). Bu çalışmada Liao ve ekibinin çalışmasının aksine, yaşla orantılı şekilde artan veya azalan metilasyon durumu gözlenmemiştir.

Değişken histopatolojiye bağlı olarak, *RASSF1A* ve *RASSF2A* gen promotörü metilasyonu ile yüksek dereceli tümör arasında anlamlı ilişki bulunması beklenirken, myometrium, mesane veya uterus/ korpusta invazyon ile tümör derecesi arasında herhangi bir bağlantı saptanmamıştır. G1 evreli hastalarda invazyon gözlemlenirken, G2 ve G3 evreli hastalarda invazyon gözlemlenmediği durumlarla karşılaşılmıştır. Literatürde taranan çalışmalarda yaş, menopoz ve menarş yaşı, sigara tüketimi, boy kilo oranları ve tümör derecesi ile *RASSF1A* ve *RASSF2A* gen metilasyon paternleri arasında ilişki bildirilmiştir. Öneğin Jabbara ve ekibinin çalışmasında ilerlemiş yaşın, fazla kilo ve diyabetin, (Jabbara ve ark., 2016) metilasyon paternlerine etki ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ilerleyen yaşın, ek olarak menopoz veya menarş yaşları ve durumlarının, kilo ve boy endeksinin metilasyon paternleri ile ilişkili olmadığı gözlenmiştir. Yine bazı çalışmalarda CpG adalarının hipermetilasyonunun klinopatolojik parametrelerle (tümör derecesi, evresi, invazyon durumu) ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Seeber ve ark., 2010). Bu çalışmada, ne tümör evre ve dereceleri ne de invazyon ile ilgili parametrelerle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Daha büyük popülasyonla ve farklı etnik gruplarla çalışılmasının bu anlamlılıkları değiştirebileceği düşünülmektedir.

Çalışmanın sonucuna göre, *RASSF1A* geni promotör bölgesi metilasyonu endometriyum kanseri gelişiminde istatistiksel olarak önemli bir rol almadığı saptanmıştır. İstatistiksel p değeri 0,08 olup anlamlılığa çok yakındır. Vaka sayısının artırılmasıyla bu anlamlılık derecesinin artacağı düşünülmektedir. *RASSF2A* geni promotör bölgesi metilasyonunun ise endometriyum kanseri gelişiminde önemli derecede rol aldığı saptanmıştır. İstatistiksel p değeri 0,001 olup anlamlı bulunmuştur.

Hem doku hem de kan örneklerinde bu genlerin metilasyon paternleri incelendiğinde saptanan epigenetik değişimlerin kanser için moleküler bir markır olma potansiyeline sahip olduğunu ve endometriyal kanserde erken karsinogenez tespiti için diagnostik ve prognostik değer sağlayabileceğini vurgulamaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmaya, endometriyal kanser tanısı konulan 15 kadın hasta ile sağlıklı 10 kadın kontrol toplam 25 olgu dâhil edilmiştir. Hasta grubunun 15 adet parafine gömülü doku örnekleri ile 15 adet kan örnekleri olacak şekilde 30 örnek, ayrıca kontrol grubunun 10 adet sağlıklı doku örnekleri ile toplamda 40 örnek çalışılmıştır.

RASSF1A ve *RASSF2A* tümör baskılayıcı genlerinin endometriyal kanser vakalarında promotor bölgeden metilasyona uğradığı pek çok çalışma ile desteklenmiştir. Bu genlerdeki metilasyon durumlarının endometriyal kanserli Türk kadın hastalarda da yüksek oranda görüleceği düşünülmektedir.

Çalışmanın sonucuna göre, *RASSF1A* tümör baskılayıcı geni metilasyon spesifik PCR verileri ışığında, endometriyal kanserli kadın hastalar ve kontrol grubu sağlıklı kadınların karşılaştırılmasıyla anlamlı derecede fark saptanmamıştır ($p=0,08$). Metilasyon paterni, hasta doku örneklerinin %53,3'ünde, hasta periferik kan örneklerinin ise %33,3'ünde tespit edilmiştir. Bunun yanısıra, *RASSF2A* tümör baskılayıcı geni metilasyon spesifik PCR verileri ışığında ise, endometriyal kanserli kadın hastalar ve kontrol grubu sağlıklı kadınların karşılaştırılmasıyla anlamlı derecede fark saptanmıştır ($p=0,001$). Metilasyon paterni, hasta doku örneklerinde %80 iken, hasta periferik kan örneklerinde %73' tür. Sağlıklı kontrol grubu dokularında *RASSF1A* geni için metilasyon paterni %10 olarak bulunurken, *RASSF2A* geni metilasyon paterni saptanmamıştır.

Histopatolojik verilerin değerlendirilmesi sonucu, *RASSF1A* ve *RASSF2A* tümör baskılayıcı genlerinin metilasyon durumları ile hastaların kanser evreleri, tümör dereceleri ve metastaz durumları arasında herhangi bir bağlantı saptanmamıştır. Yine hastaların sigara kullanımları, doğum sayıları, menopoz ve menarş yaşları da bu genlerin metilasyon paternlerini etkileyen bir veri sağlamamıştır.

Çalışmanın sonucuna göre, Türk kadınlarında *RASSF1A* tümör baskılayıcı geni promotor bölgesi metilasyonu endometriyal kanseri gelişiminde önemli bir rol almazken, *RASSF2A* tümör baskılayıcı geni promotor bölgesi metilasyonunun önemli bir rol oynadığı saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma, *RASSF2A* geninin endometriyal kanser gelişiminde ve patogeneğinde önemli olduğunu göstermiştir. *RASSF1A* geninin anlamlı farklılık derecesini daha iyi saptayabilmek için, daha büyük popülasyonlarda doğrulanmasında fayda vardır.

Dahası, doku ve kan örneklerinde bu genlerin metilasyon paterni, bu epigenetik olayın kanser için moleküler bir markır olma potansiyeline sahip olduğunu ve endometriyal kanserde erken karsinogenez tespiti için diagnostik ve prognostik değerler sağlayabileceğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

- Abouzeid HE, Kassem AM, Abdel Wahab AH, El-mezayen HA, Sharad H, Abdel Rahman S. Promoter hypermethylation of RASSF1A, MGMT, and HIC-1 genes in benign and malignant colorectal tumors. *Tumour Biol* 2011; 32(5):845-52.
- Ahmed-Choudhury J, Agathangelou A, Fenton SL, Ricketts C, Clark GJ, Maher ER, Latif F. Transcriptional regulation of cyclin A2 by RASSF1A through the enhanced binding of p120E4F to the cyclin A2 promoter. *Cancer Res* 2005; 65(7):2690-7.
- Ahn MY, Jung JH, Na YJ, Kim HS. A natural histone deacetylase inhibitor, Psammaplin A, induces cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol* 2008; 108: 27-33.
- Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Tokino T. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 129(1):156-69.
- Alam MR, Caldwell BD, Johnson RC, Darlington DN, Mains RE, Eipper BA. Novel proteins that interact with the COOH-terminal cytosolic routing determinants of an integral membrane peptide-processing enzyme. *J Biol Chem* 1996; 271(45):28636-40.
- Allen NP, Donniger H, Vos MD, Eckfeld K, Hesson L, Gordon L, Birrer MJ, Latif F, Clark GJ. RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors. *Oncogene* 2007; 26(42):6203-11.
- Amaar YG, Baylink DJ, Mohan S. Ras-association domain family 1 protein, RASSF1C, is an IGF1R-5 binding partner and a potential regulator of osteoblast cell proliferation. [J Bone Miner Res 2005; 20\(8\):1430-1439.](#)
- Amaar YG, Minera MG, Hatran LK, Strong DD, Mohan S, Reeves ME. Ras association domain family 1C protein stimulates human lung cancer cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291(6):L1185-90.
- Aoyama Y, Avruch J, Zhang XF. Nore1 inhibits tumor cell growth independent of Ras or the MST1/2 kinases. *Oncogene* 2004; 23(19):3426-33.
- Arafa M, Kridelka F, Mathias V, Vanbellinghen JF, Renard I, Foidart JM, Boniver J, Delvenne P. High frequency of RASSF1A and RARb2 gene promoter methylation in morphologically normal endometrium adjacent to endometrioid adenocarcinoma. *Histopathology* 2008; 53(5):525-32.

- Arafa M, Somja J, Dehan P, Kridelka F, Goffin F, Boniver J, Delvenne P. Current concepts in the pathology and epigenetics of endometrial carcinoma. *Pathology* 2010; 42: 613-617.
- Aune D, Navarro Rosenblatt DA, Chan DS, Vingeliene S, Abar L, Vieira AR, Greenwood DC, Bandera EV, Norat T. Anthropometric factors and endometrial cancer risk: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol* 2015; 26(8):1635-48.
- Avruch J, Xavier R, Bardeesy N, Zhang XF, Praskova M, Zhou D, Xia F. RASSF family of tumor suppressor polypeptides. *J Biol Chem* 2009; 284(17):11001-5.
- Bae YK, Shim YR, Choi JH, Kim MJ, Gabrielson E, Lee SJ, Hwang TY, Shin SO. Gene promoter hypermethylation in tumors and plasma of breast cancer patients. *Cancer Res Treat* 2005; 37(4):233-40.
- Baksh S, Tommasi S, Fenton S, Yu VC, Martins LM, Pfeifer GP, Latif F, Downward J, Neel BG. The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Mol Cell* 2005; 18(6):637-50.
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369(9573):1627-40.
- Beckedorff FC, Ayupe AC, Crocci-Souza R, Amaral MS, Nakaya HI, Soltys DT, Menck CF, Reis EM, Verjovski-Almeida S. The intronic long noncoding RNA ANRASSF1 recruits PRC2 to the RASSF1A promoter, reducing the expression of RASSF1A and increasing cell proliferation. *PLoS Genet* 2013; 9(8):e1003705.
- Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Advances in Anatomic Pathology* 2009; 16 (6): 405-17.
- Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer* 2001; 91(3):421-30.
- Bernard S, Christopher W. International Agency for Research on Cancer (2014). *World Cancer Report 2014*. World Health Organization. 2014. ISBN 978-92-832-0429-9. Part 5.12.
- Bock C, Tomazou EM, Brinkman AB, Müller F, Simmer F, Gu H, Jäger N, Gnirke A, Stunnenberg HG, Meissner A. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1106-1114.
- Braconi C, Huang N, Patel T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology* 2010; 51(3):881-90.

- Brait M, Loyo M, Rosenbaum E, Ostrow KL, Markova A, Papagerakis S, Zahurak M, Goodman SM, Zeiger M, Sidransky D, Umbricht CB, Hoque MO. Correlation between BRAF mutation and promoter methylation of TIMP3, RARBeta2 and RASSF1A in thyroid cancer. *Epigenetics* 2012; 7(7):710-9.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6):394-424
- Breuer RH, Snijders PJ, Smit EF, Sutedja TG, Sewalt RG, Otte AP, van Kemenade FJ, Postmus PE, Meijer CJ, Raaphorst FM. Increased expression of the EZH2 polycomb group gene in BMI-1-positive neoplastic cells during bronchial carcinogenesis. *Neoplasia* 2004; 6: 736-743.
- Brouwer J.R. A Crash Course in Epigenetics Part 1: An intro to epigenetics. *Bitesize Bio*. 2012.
- Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, Brewer M, Boruta D, Vilella J, Herzog T, Abu Shahin F. Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part I. *Gynecologic Oncology* 2014; 134 (2): 385–392.
- Calvisi DF, Ladu S, Pinna F, Frau M, Tomasi ML, Sini M, Simile MM, Bonelli P, Muroli MR, Seddaiu MA, Lim DS, Feo F, Pascale RM. SKP2 and CKS1 promote degradation of cell cycle regulators and are associated with hepatocellular carcinoma prognosis. *Gastroenterology* 2009; 137(5):1816-26.e1-10.
- Carthew RW and Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136(4): 642–655.
- Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Bäsecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli AM, McCubrey JA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2011; 2(3):135-64.
- Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 1999; 284 (5423): 2174–7.
- Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 1999; 98: 675-686.

- Chen L, Johnson RC, Milgram SL. P-CIP1, a novel protein that interacts with the cytosolic domain of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase, is associated with endosomes. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33524-32.
- Chen X, Li Z, Zhang J, Mao Z, Ma D, Wang H. Tissue factor pathway inhibitor-2 may interact with nuclear protein RASSF1C. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2012; 44(2):183-5.
- Chen Y, Gao W, Luo J, Tian R, Sun H, Zou S. Methyl-CpG binding protein MBD2 is implicated in methylation-mediated suppression of miR-373 in hilar cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* 2011; 25(2):443-51.
- Chen Y, Luo J, Tian R, Sun H, Zou S. MiR-373 negatively regulates methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2) in hilar cholangiocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2011; 56(6):1693-701.
- Chow LS, Lo KW, Kwong J, Wong AY, Huang DP. Aberrant methylation of RASSF4/AD037 in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep* 2004; 12(4):781-7.
- Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002; 21(35):5483-95.
- Chung TK, Cheung TH, Huen NY, Wong KW, Lo KW, Yim SF, Siu NS, Wong YM, Tsang PT, Pang MW, Yu MY, To KF, Mok SC, Wang VW, Li C, Cheung AY, Doran G, Birrer MJ, Smith DI, Wong YF.. Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women. *Int J Cancer* 2009;124:1358–1365.
- Coleman RL, Ramirez PT, Gershenson DM. Neoplastic Diseases of the Ovary. In Lentz GM, Lobo RA, Gershenson DM, Katz VL (eds.). *Comprehensive Gynecology* (6. edition.). 2013. Mosby. ISBN 978-0-323-06986-1.
- Collins LJ, Schonfeld B, Chen XS. The Epigenetics of Non-Coding RNA. In T. Tollefsbol (Ed.), *Handbook of epigenetics: the new molecular and medical genetics*. 2011 (pp. 49-61). London: Academic.
- Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo A, Marini C, Sessa C. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2013. 24 Suppl 6: vi33–8.
- Cooper WN, Dickinson RE, Dallol A, Grigorieva EV, Pavlova TV, Hesson LB, Bieche I, Broggin M, Maher ER, Zabarovsky ER, Clark GJ, Latif F. Epigenetic regulation of the ras effector/tumour suppressor RASSF2 in breast and lung cancer. *Oncogene* 2008; 27 (12):1805-11.
- Dai Y, Xia W, Song T, Su X, Li J, Li S, Chen Y, Wang, Ding H, Liu X, Li H, Zhao Q, Shao N. MicroRNA-200b is overexpressed in endometrial adenocarcinomas

- and enhances MMP2 activity by downregulating TIMP2 in human endometrial cancer cell line HEC-1A cells. *Nucleic Acid Ther* 2013; 23:29–34.
- Dallol A, Agathangelou A, Fenton SL, Ahmed-Choudhury J, Hesson L, Vos MD, Clark GJ, Downward J, Maher ER, Latif F. RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule Dynamics. *Cancer Res* 2004; 64(12):4112-6.
- Dallol A, Hesson LB, Matallanas D, Cooper WN, O'neil E, Maher E, Kolch W, Latif F. RAN GTPase is a RASSF1A effector involved in controlling microtubule organization. *Curr Biol* 2009 ; 19(14):1227-32.
- Dallol A, Agathangelou A, Tommasi A, Pfeifer GP, Maher ER, Latif F. Involvement of the RASSF1A tumor suppressor gene in controlling cell migration. *Cancer Res.* 2005; 65(17):7653-9.
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25(3):315-9.
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22(24):3806-12.
- de Ridder L, Benninga MA, Taminiu JA, Hommes DW, van Deventer SJ. Infliximab use in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45(1):3-14.
- Dellas A, Jundt G. Combined PTEN and p27kip1 protein expression patterns are associated with obesity and prognosis in endometrial carcinomas. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009; 15: 2456-2462.
- Djos A, Martinsson T, Kogner P, Carén H. The RASSF gene family members RASSF5, RASSF6 and RASSF7 show frequent DNA methylation in neuroblastoma. *Mol Cancer* 2012;11:40.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular Cancer Research* 2007; 5(10):981-9.
- Donninger H, Hesson L, Vos M, Beebe K, Gordon L, Sidransky D, Liu JW, Schlegel T, Payne S, Hartmann A, Latif F, Clark GJ.. The Ras effector RASSF2 controls the PAR-4 tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 2010; 30(11):2608-20.
- Du L, Xie Z, Wu LC, Chiu M, Lin J, Chan KK, Liu S, Liu Z. Reactivation of RASSF1A in breast cancer cells by curcumin. *Nutr Cancer* 2012; 64(8):1228-35.

- Duan C, Liu M, Zhang J, Ma R. RASSF1A: a potential novel therapeutic target against cardiac hypertrophy. *Prog Biophys Mol Biol* 2013; 113(2):284-8.
- Eckfeld K, Hesson L, Vos MD, Bieche I, Latif F, Clark GJ. RASSF4/AD037 is a potential ras effector/tumor suppressor of the RASSF family. *Cancer Res* 2004; 64(23):8688-93.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429(6990):457-63.
- El-Kalla M, Onyskiw C, Baksh S. Functional importance of RASSF1A microtubule localization and polymorphisms. *Oncogene* 2010; 29(42):5729-40.
- Eng C. Genetics of Cowden syndrome: through the looking glass of oncology. *Int. J. Oncol* 1998; 12 (3): 701–10.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4):259-69.
- Falvella FS, Manenti G, Spinola M, Pignatiello C, Conti B, Pastorino U, Dragani TA. Identification of RASSF8 as a candidate lung tumor suppressor gene. *Oncogene* 2006; 25(28):3934-8.
- Fenton SL, Dallol A, Agathangelou A, Hesson L, Ahmed-Choudhury J, Baksh S, Sardet C, Dammann R, Minna JD, Downward J, Maher ER, Latif F. Identification of the E1A-regulated transcription factor p120 E4F as an interacting partner of the RASSF1A candidate tumor suppressor gene. *Cancer Res* 2004; 64(1):102-7.
- Fiolka R, Zubor P, Janusicova V, Visnovsky J, Mendelova A, Kajo K, Lasabova Z, Plank L, Danko J. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes RASSF1A, GSTP1 and CDH1 in endometrial cancer. *Oncol Rep* 2013; 30: 2878-2886.
- Foley CJ, Freedman H, Choo SL, Onyskiw C, Fu NY, Yu VC, Tuszynski J, Pratt JC, Baksh S. Dynamics of RASSF1A/MOAP-1 association with death receptors. *Mol Cell Biol* 2008; 28(14):4520-35.
- Foran E, Garrity-Park MM, Mureau C, Newell J, Smyrk TC, Limburg PJ, Egan LJ. Upregulation of DNA methyltransferase-mediated gene silencing, anchorage-independent growth, and migration of colon cancer cells by interleukin-6. *Mol Cancer Res* 2010; 8(4):471-81.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19(1):92-105.
- Friess H, Ding J, Kleeff J, Fenkell L, Rosinski JA, Guweidhi A, Reidhaar-Olson JF, Korc M, Hammer J, Büchler MW. Microarray-based identification of differentially expressed growth- and metastasis-associated genes in pancreatic cancer. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(6):1180-99.

- Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, Kudo T, Nakagawa K, Shinjo K, Kondo Y, Fujii M, Hasegawa Y, Tomizawa K, Mitsudomi T, Osada H, Hata Y, Sekido Y. RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2014; 83(1):23-9.
- Furlan D, Carnevali I, Marcomini B, Cerutti R, Dainese E, Capell C, Riva C. The high frequency of de novo promoter methylation in synchronous primary endometrial and ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3329-3336.
- [Ghabreau L, Roux JP, Niveleau A, Fontanière B, Mahe C, Mokni M, Frappart L.](#) Correlation between the DNA global methylation status and progesterone receptor expression in normal endometrium, endometrioid adenocarcinoma and precursors. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 2004; 445: 129-134.
- Ghazaleh HA, Chow RS, Choo SL, Pham D, Olesen JD, Wong RX, Onyskiw C, Baksh S. 14-3-3 Mediated regulation of the tumor suppressor protein, RASSF1A. *Apoptosis* 2010; 15(2):117-27.
- Goodrich S, Kebria-Moslemi M, Broshears J, Sutton GP, Rose P. Primary squamous cell carcinoma of the endometrium: two cases and a review of the literature. *Diagnostic Cytopathology* 2013; 41 (9): 817–20.
- Gordon M, Baksh S. RASSF1A: not a prototypical Ras effector. *Small GTPases* 2011; 2(3):148-157
- Gordon M, El-Kalla M, Baksh S. RASSF1 polymorphisms in cancer. *Mol Biol Int* 2012; 365213.
- Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics* 2012; 13, 343-357.
- Guerrero-Setas D, Pérez-Janices N, Blanco-Fernandez L, Ojer A, Cambra K, Berdasco M, Esteller M, Maria-Ruiz S, Torrea N, Guarch R. RASSF2 hypermethylation is present and related to shorter survival in squamous cervical cancer. *Mod Pathol* 2013; 26(8):1111-22.
- Guida M, Sanguedolce F, Bufo P, Di Spiezio Sardo A, Bifulco G, Nappi C, Pannone G. Aberrant DNA hypermethylation of hMLH-1 and CDKN2A/p16 genes in benign, premalignant and malignant endometrial lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 2009; 30: 267-270.
- Guo H, Liu H, Wei J, Li Y, Yu H, Guan X, Li-E W, Li G, Sturgis EM, Wei Q, Liu Z. Functional single nucleotide polymorphisms of the RASSF3 gene and susceptibility to squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* 2014; 50(3):582-92.

- Hamilton G, Yee KS, Scrace S, O'Neil E. ATM regulates a RASSF1A-dependent DNA damage response. *Curr Biol* 2009; 19(23):2020-5.
- Haruta M, Matsumoto Y, Izumi H, Watanabe N, Fukuzawa M, Matsuura S, Kaneko Y. Combined BubR1 protein down-regulation and RASSF1A hypermethylation in Wilms tumors with diverse cytogenetic changes. *Mol Carcinog* 2008; 47(9):660-6.
- Helmbold P, Richter AM, Walesch S, Skorokhod A, Marsch WCh, Enk A, Dammann RH. RASSF10 promoter hypermethylation is frequent in malignant melanoma of the skin but uncommon in nevus cell nevi. *J Invest Dermatol* 2012; 132(3 Pt 1):687-94.
- Hensley ML. Uterine sarcomas: histology and its implications on therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2012; 356-61.
- Hesson LB, Dunwell TL, Cooper WN, Catchpoole D, Brini AT, Chiaramonte R, Griffiths M, Chalmers AD, Maher ER, Latif F. The novel RASSF6 and RASSF10 candidate tumour suppressor genes are frequently epigenetically inactivated in childhood leukaemias. *Mol Cancer* 2009; 8:42.
- Hesson LB, Wilson R, Morton D, Adams C, Walker M, Maher ER, Latif F. CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations. *Oncogene* 2005; 24(24):3987-94.
- Hill VK, Underhill-Day N, Krex D, Robel K, Sangan CB, Summersgill HR, Morris M, Gentle D, Chalmers AD, Maher ER, Latif F. Epigenetic inactivation of the RASSF10 candidate tumor suppressor gene is a frequent and an early event in gliomagenesis. *Oncogene* 2011; 30(8):978-89.
- Hoffman, BL, Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Bradshaw KD, Cunningham FG. *Endometrial Cancer*. Williams Gynecology 2. edition. McGraw-Hill. 2012. ISBN 978-0-07-171672-7. p. 823.
- Hoivik EA, Kusunmano K, Halle MK, Berg A, Wik E, Werner HM, Petersen K, Oyan AM, Kalland KH, Krakstad C, Trovik J, Widschwendter M, Salvesen HB. Hypomethylation of the CTCFL/BORIS promoter and aberrant expression during endometrial cancer progression suggests a role as an Epi-driver gene. *Oncotarget* 2014; 5: 1052-1061.
- Holliday R. Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics* 2006; 1: 2 76-80.
- Hsu [YT](#), [Gu F](#), Huang [YW](#), Liu [J](#), Ruan [J](#), Huang [RL](#), Wang [CM](#), Chen [CL](#), Lai [HC](#), Mutch [DG](#), Goodfellow [PJ](#), Thompson [IM](#), Kirma [NB](#), Huang [T](#) Promoter hypomethylation of EpCAM-regulated bone morphogenetic protein gene family in recurrent endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 6272-6285.

- Hu S, Wan J, Su Y, Song Q, Zeng Y, Nguyen HN, Shin J, Cox E, Rho HS, Woodard C, Xia S, Liu S, Lyu H, Ming GL, Wade H, Song H, Qian J, Zhu H. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *Elife* 2013; 2:e00726.
- Ikeda M, Hirabayashi S, Fujiwara N, Mori H, Kawata A, Iida J, Bao Y, Sato Y, Iida T, Sugimura H, Hata Y. Ras-association domain family protein 6 induces apoptosis via both caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Exp Cell Res* 2007; 313(7):1484-95.
- Iwasa H, Kudo T, Maimaiti S, Ikeda M, Maruyama J, Nakagawa K, Hata Y. The RASSF6 tumor suppressor protein regulates apoptosis and the cell cycle via MDM2 protein and p53 protein. *J Biol Chem* 2013; 288(42):30320-9.
- Jacquemart IC, Springs AE, Chen WY. Rassf3 is responsible in part for resistance to mammary tumor development in neu transgenic mice. *Int J Oncol* 2009; 34(2):517-28.
- Jiang L, Rong R, Sheikh MS, Huang Y. Cullin-4A-DNA damage-binding protein 1 E3 ligase complex targets tumor suppressor RASSF1A for degradation during mitosis. *J Biol Chem* 2011; 286(9):6971-8.
- Jiang L, Rong R, Sheikh MS, Huang Y. Mitotic Arrest by Tumor Suppressor RASSF1A is Regulated via Chk1 Phosphorylation. *Mol Cancer Res* 2014; 12(1):119-29.
- Johnson N, Bryant A, Miles T, Hogberg T, Cornes P. Adjuvant chemotherapy for endometrial cancer after hysterectomy. *The Cochrane database of systematic reviews* 2011; 10:CD003175.
- Jones A, Teschendorff AE, Li Q, Hayward JD, Kannan A, Mould T, West J, Zikan M, Cibula D, Fiegl H, Lee SH, Wik E, Hadwin R, Arora R, Lemech C, Turunen H, Pakarinen P, Jacobs IJ, Salvesen HB, Bagchi MK, Bagchi IC, Widschwendter M. Role of DNA methylation and epigenetic silencing of HAND2 in endometrial cancer development. *PLoS Med* 2013; 10: e1001551.
- Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 484-492.
- Jung HY, Jung JS, Whang YM, Kim YH: RASSF1A suppresses cell migration through inactivation of HDAC6 and increase of acetylated alpha-tubulin. *Cancer Res Treat* 2013; 45(2):134-44.
- Jurinke C, Denissenko MF. A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutation research* 2005; 573: 83-95.
- Kaikkonen MU, Lam MTY, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Research* 2011; 90, 430–440.

- [Kang S, Kim JW, Kang GH, Lee S, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, Lee HP.](#) Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006; 118: 2168-2171.
- Kang S, Kim HS, Seo SS, Park SY, Sidransky D, Dong SM. Inverse correlation between RASSF1A hypermethylation, KRAS and BRAF mutations in cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2007; 105(3):662-6.
- Kang SK, Cha SH, Jeon HG. Curcumin-induced histone hypoacetylation enhances caspase-3-dependent glioma cell death and neurogenesis of neural progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2006; 15: 165-174.
- Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, Bandipalliam P, Stoffel EM, Gruber SB, Syngal S. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* Oct 2009; 302 (16): 1790–5.
- Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M, Kinashi T. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol* 2003; 4(8):741-8.
- Katagiri K, Ohnishi N, Kabashima K, Iyoda T, Takeda N, Shinkai Y, Inaba K, Kinashi T. Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 2004; 5(10):1045-51.
- Katagiri K, Ueda Y, Tomiyama T, Yasuda K, Toda Y, Ikehara S, Nakayama KI, Kinashi T. Deficiency of Rap1-binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through mislocalization of p27kip1. *Immunity* 2011; 34(1):24-38.
- Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, Nedwidek M, Chen T, Zhang XF, Seed B, Avruch J. Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol* 2002; 12(4):253-65.
- Kitagawa D, Kajiho H, Negishi T, Ura S, Watanabe T, Wada T, Ichijo H, Katada T, Nishina H. Release of RASSF1C from the nucleus by Daxx degradation links DNA damage and SAPK/JNK activation. *EMBO J* 2006; 25(14):3286-97.
- Klajic J, Fleischer T, Dejeux E, Edvardsen H, Warnberg F, Bukholm I, Lønning PE, Solvang H, Børresen-Dale AL, Tost J, Kristensen VN. Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. *BMC Cancer* 2013; 13: 456.
- Konecny GE, Venkatesan N, Yang G, Dering J, Ginther C, Finn R, Rahmeh M, Fejzo MS, Toft D, Jiang SW, Slamon DJ, Podratz KC. Activity of lapatinib a novel

- HER2 and EGFR dual kinase inhibitor in human endometrial cancer cells. *Br J Cancer* 2008; 98(6):1076-84.
- Kong A, Johnson N, Kitchener HC, Lawrie TA. Adjuvant radiotherapy for stage I endometrial cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013; 4: CD003916.
- Korah R, Healy JM, Kunstman JW, Fonseca AL, Ameri AH, Prasad ML, Carling T. Epigenetic silencing of RASSF1A deregulates cytoskeleton and promotes malignant behavior of adrenocortical carcinoma. *Mol Cancer* 2013;12:87.
- Kudo T, Ikeda M, Nishikawa M, Yang Z, Ohno K, Nakagawa K, Hata Y. The RASSF3 candidate tumor suppressor induces apoptosis and G1-S cell-cycle arrest via p53. *Cancer Res* 2012; 72(11):2901-11.
- Kumari G, Mahalingam S. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2) mediated phosphorylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling and cell growth control of Ras-associated tumor suppressor protein, RASSF2. *Exp Cell Res* 2009; 315(16):2775-90.
- Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 1998; 20(8):615-26.
- Kurra V, Krajewski KM, Jagannathan J, Giardino A, Berlin S, Ramaiya N. Typical and atypical metastatic sites of recurrent endometrial carcinoma. *Cancer Imaging* 2013; 113–22.
- Kuznetsov S, Khokhlatchev AV. The growth and tumor suppressors NORE1A and RASSF1A are targets for calpain-mediated proteolysis. *PLoS One* 2008; 3(12):e3997.
- Lee CM, Yang P, Chen LC, Chen CC, Wu SC, Cheng HY, Chang YS. A novel role of RASSF9 in maintaining epidermal homeostasis. *PLoS One* 2011; 6(3):e17867.
- Li Q, Zhu F, Chen P. MiR-7 and miR-218 epigenetically control tumor suppressor genes RASSF1A and Claudin-6 by targeting HoxB3 in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424(1):28-33.
- Liao X, Siu MK, Chan KY, Wong ES, Ngan HY, Chan QK, et al. Hypermethylation of RAS effector related genes and DNA methyltransferase 1 expression in endometrial carcinogenesis. *Int J Cancer* 2008; 123(2):296–302.
- [Lister R](#), [Pelizzola M](#), [Downen RH](#), [Hawkins RD](#), [Hon G](#), [Tonti-Filippini J](#), [Nery JR](#), [Lee L](#), [Ye Z](#), [Ngo Q](#), [Edsall L](#), [Antosiewicz-Bourget J](#), [Stewart R](#), [Ruotti V](#), [Millar AH](#), [Thomson J](#), [Ren B](#) and [Ecker J](#). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009; 462, 315-322.

- Llobet D, Pallares J, Yeramian A, Santacana M, Eritja N, Velasco A. Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *J Clin Pathol* 2009; 62: 777-785.
- Lock FE, Underhill-Day N, Dunwell T, Matallanas D, Cooper W, Hesson L, Recino A, Ward A, Pavlova T, Zabarovsky E, Grant MM, Maher ER, Chalmers AD, Kolch W, Latif F. The RASSF8 candidate tumor suppressor inhibits cell growth and regulates the Wnt and NF-kappaB signaling pathways. *Oncogene* 2010; 29(30):4307-16.
- Ma J, Ledbetter N, Glenn L. Testing women with endometrial cancer for lynch syndrome: should we test all?. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* 2013; 4 (5): 322–30. PMC 4093445. PMID 25032011.
- Mani RS. The emerging role of speckle-type POZ protein (SPOP) in cancer development. *Drug Discovery Today* 2014; 19 (9): 1498–1502.
- Margueritte W, Stacy Z, Troy S, Robert T, Joann L, Kimberly L, Lorna M. Estrogen, Progesterone, and Vascular Reactivity: Potential Cellular Mechanisms. 6.Edition, volume 16. *Endocrine Reviews* 1995; 739-751.
- Mariño-Enríquez A, González-Rocha T, Burgos E, Stolnicu S, Mendiola M, Nogales FF, Hardisson D. Transitional cell carcinoma of the endometrium and endometrial carcinoma with transitional cell differentiation: a clinicopathologic study of 5 cases and review of the literature. *Hum Pathol* 2008; 39(11):1606-13.
- Megumi Y, Kouji B, Yusuke K, Iori K, Arisa U, Asuka O, Kennta M, Hiyoruki N, Akira H, Nobuyuki S, Daisuke A. MicroRNA and endometrial cancer: Roles of small RNAs in human tumors and clinical applications. *Oncol Lett* 2010; 1(6):935-940.
- Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nature Structural & Molecular Biology* 2013; 20, 300-307.
- Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Fujino J, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kobayashi J, Sasaki T, Takahashi A, Nakamori K, Yamaguchi A, Hiratsuka H, Sato N. Small proline-rich protein-1B is overexpressed in human oral squamous cell cancer stem-like cells and is related to their growth through activation of MAP kinase signal. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 439(1):96-102.
- Moshnikova A, Frye J, Shay JW, Minna JD, Khokhlatchev AV. The growth and tumor suppressor NORE1A is a cytoskeletal protein that suppresses growth by inhibition of the ERK pathway. *J Biol Chem* 2006; 281(12):8143-52.

- Murali Rajmohan, Soslow Robert A, Weigelt Britta. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *The Lancet Oncology* 2014; 15 (7): e268–e278.
- Mutter GL, Baak JP, Fitzgerald JT, Gray R, Neuberg D, Kust GA, Gentleman R, Gulla SR, Wei LJ, Wilcox M. Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation. *Gynecol. Oncol* Volume 83, Issue 2, 2001, Pages 177-185
- Oh HJ, Lee KK, Song SJ, Jin MS, Song MS, Lee JH, Im CR, Lee JO, Yonehara S, Lim DS. Role of the tumor suppressor RASSF1A in Mst1-mediated apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66(5):2562-9.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-257.
- Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwidek M, Zhang XF, Dammann R, Pfeifer GP, Avruch J. The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene* 2002; 21(9):1381-90.
- Palakurthy RK, Wajapeyee N, Santra MK, Gazin C, Lin L, Gobeil S, Green MR. Epigenetic silencing of the RASSF1A tumor suppressor gene through HOXB3-mediated induction of DNMT3B expression. *Mol Cell* 2009; 36(2):219-30.
- Pallarés J, Velasco A, Eritja N, Santacana M, Dolcet X, Cuatrecasas M, Palomar-Asenjo V, Catusés L, Prat J, Matias-Guiu X. Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2008; 21(6):691–9.
- Pan ZG, Kashuba VI, Liu XQ, Shao JY, Zhang RH, Jiang JH, Guo C, Zabarovsky E, Ernberg I, Zeng YX. High frequency somatic mutations in RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(10):1116-22.
- Park J, Kang SI, Lee SY, Zhang XF, Kim MS, Beers LF, Lim DS, Avruch J, Kim HS, Lee SB. Tumor suppressor Ras-association domain family 5 (RASSF5/NORE1) mediates death receptor ligand-induced apoptosis. [J Biol Chem](#) 2010; 285(45):35029-38.
- Pavicic W, Joensuu EI, Nieminen T, Peltomäki P. LINE-1 hypomethylation in familial and sporadic cancer. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90: 827-835.
- Peng H, Liu H, Zhao S, Wu J, Fan J, Liao J. Silencing of RASSF3 by DNA hypermethylation is associated with tumorigenesis in somatotroph adenomas. *PLoS One* 2013; 8(3):e59024.

- Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology* 2006; 209: 2362-2367.
- Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Yamada S, Ishizuka A, Mizusawa N, Horiguchi H, Hirokawa M, Asa SL. Inactivation of RASSF1A tumor suppressor gene by aberrant promoter hypermethylation in human pituitary adenomas. *Lab Invest* 2005; 85(4):464-73.
- Recino A, Sherwood V, Flaxman A, Cooper WN, Latif F, Ward A, Chalmers AD. Human RASSF7 regulates the microtubule cytoskeleton and is required for spindle formation, Aurora B activation and chromosomal congression during mitosis. *Biochem J* 2010; 430(2):207-13.
- Reeves ME, Baldwin SW, Baldwin ML, Baldwin ST, Chen JM, Moretz RJ, Aragon X, Li DD, Mohan SS, Amaar YG. Ras-association domain family 1C protein promotes breast cancer cell migration and attenuates apoptosis *BMC Cancer* 2010; 10: 562.
- Reeves ME, Baldwin SW, Baldwin ML, Chen ST, Moretz JM, Aragon RJ, Li X, Strong DD, Mohan S, Amaar YG. Ras-association domain family 1C protein promotes breast cancer cell migration and attenuates apoptosis. *BMC Cancer* 2010; 10: 562.
- Reynolds K, Loar V. Gynecology. In Doherty, GM. *Current Diagnosis & Treatment: Surgery*. (13th ed.). McGraw-Hill 2010; ISBN 978-0-07-163515-8.
- Richard E, Margaret B, Lenora E. NCI's Physician Data Query (PDQ®) Cancer Information Summaries: History, Editorial Processes, Influence and Reach. 1. edition volume 29. *Journal of Cancer Education* 2014; 198-205
- Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796(2):114-28.
- Rick A, Mamta K, Lynn Y, Cynthia O. What is endometrial cancer?. *American Cancer Society* 2019; 03.
- Rong R, Jiang LY, Sheikh MS, Huang Y. Mitotic kinase Aurora-A phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. *Oncogene* 2007; 26(55):7700-8.
- Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007; 1: 19-25.
- Rotili D, Mai A. Targeting Histone Demethylases: A New Avenue for the Fight against Cancer. *Genes Cancer* 2011; 2(6):663-79.
- Rykova EIu, Skvortsova TE, Hoffmann AL, Tamkovich SN, Starikov AV, Bryzgunova OE, Permiakova VI, Warnecke JM, Sczakiel G, Vlasov VV, Laktionov PP.

- Breast cancer diagnostics based on extracellular DNA and RNA circulating in blood. *Biomed Khim* 2008; 54(1):94-103.
- Sanada Y, Kumoto T, Suehiro H, Nishimura F, Kato N, Hata Y, Sorisky A, Yanaka N. RASSF6 expression in adipocytes is down-regulated by interaction with macrophages. *PLoS One* 2013; 8(4):e61931.
- Sarfstein R, Bruchim I, Fishman A, Werner H. The mechanism of action of the histone deacetylase inhibitor vorinostat involves interaction with the insulin-like growth factor signaling pathway. *PLoS One* 2011; 6: e24468.
- Saso S, Chatterjee J, Georgiou E, Ditri M, Smith R, Ghaem-Maghami S. Endometrial cancer. *BMJ* 2011; 343:d3954.
- Schagdarsurengin U, Richter AM, Hornung J, Lange C, Steinmann K, Dammann RH. Frequent epigenetic inactivation of RASSF2 in thyroid cancer and functional consequences. *Mol Cancer* 2010; 9:264.
- Schagdarsurengin U, Richter AM, Wöhler C, Dammann RH. Frequent epigenetic inactivation of RASSF10 in thyroid cancer. *Epigenetics* 2009; 4(8):571-6.
- Seeber LM, Zweemer RP, Marchionni L, Massuger LF, Smit VT, van Baal WM, Verheijen RH, van Diest PJ. Methylation profiles of endometrioid and serous endometrial cancers. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(3):663-73.
- Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 361-371.
- Sherwood V, Recino A, Jeffries A, Ward A, Chalmers A. The N-terminal RASSF family: a new group of Ras-association-domain-containing proteins, with emerging links to cancer formation. *Biochem J* 2009; 425(2):303-11.
- Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 2002; 22(12):4309-18.
- Soliman T, Lu KH. Neoplastic Diseases of the Uterus. In Lentz, GM; Lobo, RA; Gershenson, DM; Katz, VL. *Comprehensive Gynecology* (6. edition.) 2013; Mosby. ISBN 978-0-323-06986-1.
- Solmaz U, Ekin A, Mat E, Dereli L, Gezer C, Gökçü M, Ayaz D, Sancı M. Endometriyum Kanserinde Güncel Yaklaşımlar. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi* 2016-1, Sayfa 7-16
- Song H, Oh S, Oh HJ, Lim DS. Role of the tumor suppressor RASSF2 in regulation of MST1 kinase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(1):969-73
- Song MS, Chang JS, Song SJ, Yang TH, Lee H, Lim DS. The centrosomal protein RAS association domain family protein 1A (RASSF1A)-binding protein 1 regulates

- mitotic progression by recruiting RASSF1A to spindle poles. *J Biol Chem* 2005; 280 (5):3920-7.
- Song MS, Lim DS. Control of APC-Cdc20 by the tumor suppressor RASSF1A. *Cell Cycle* 2004; 3(5):574-6.
- Song MS, Song SJ, Kim SJ, Nakayama K, Nakayama KI, Lim DS. Skp2 regulates the antiproliferative function of the tumor suppressor RASSF1A via ubiquitin-mediated degradation at the G1-S transition. *Oncogene* 2008; 27(22):3176-85.
- Song MS, Song SJ, Kim SY, Oh HJ, Lim DS. The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J* 2008; 27(13):1863-74.
- Song SJ, Song MS, Kim SJ, Kim SY, Kwon SH, Kim JG, Calvisi DF, Kang D, Lim DS. Aurora A regulates prometaphase progression by inhibiting the ability of RASSF1A to suppress APC-Cdc20 activity. *Cancer Res* 2009; 69(6):2314-23.
- Song SJ, Kim SJ, Song MS, Lim DS. Aurora B-mediated phosphorylation of RASSF1A maintains proper cytokinesis by recruiting Syntaxin16 to the midzone and midbody. *Cancer Res* 2009; 69(22):8540-4.
- Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002; 20(11):2672-9.
- Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2009; 22(6):1519-26.
- Strahl BD and Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000; 403(6765):41-5.
- Szyf M, Bozovic V, Tanigawa G. Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression. *J Biol Chem* 1991; 266: 10027-10030.
- Takahashi S, Ebihara A, Kajihara H, Kontani K, Nishina H, Katada T. RASSF7 negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7. *Cell Death Differ* 2011; 18 (4):645-55.
- [Takai N, Kawamata N, Walsh C, Gery S, Desmond J, Whittaker S, Said J, Popoviciu L, Jones P, Miyakawa I, Koeffler P.](#) Discovery of epigenetically masked tumor suppressor genes in endometrial cancer. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 261-269.
- Tan DS, Lambros MB, Rayter S, Natrajan R, Vatcheva R, Gao Q, Marchiò C, Geyer FC, Savage K, Parry S, Fenwick K, Tamber N, Mackay A, Dexter T, Jameson C, McCluggage WG, Williams A, Graham A, Faratian D, El-Bahrawy M, Paige AJ, Gabra H, Gore ME, Zvelebil M, Lord CJ, Kaye SB, Ashworth A, Reis-Filho

- JS. PPM1D is a potential therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (7):2269-80.
- Tao MH, Freudenheim JL. DNA methylation in endometrial cancer. *Epigenetics* 2010; 5: 491-498.
- Teixeira LK, Reed SI. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem* 2013; 82:387-414.
- Thaker PH, Sood AK. Molecular Oncology in Gynecologic Cancer. In Lentz, GM; Lobo, RA; Gershenson, DM; Katz, VL. *Comprehensive Gynecology* (6. edition). 2012. Mosby. ISBN 978-0-323-06986-1.
- Thomas D, Lakowski TM. Forster resonance energy transfer measurements of cofactor-dependent effects on protein arginine N-methyltransferase homodimerization. *Protein Sci* 2010; 19: 2141-2151.
- Tommasi S, Dammann R, Jin SG, Zhang XF, Avruch J, Pfeifer GP. RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. *Oncogene* 2002; 21(17):2713-20.
- Trievel RC, Flynn EM, Houtz RL, Hurley JH. Mechanism of multiple lysine methylation by the SET domain enzyme Rubisco LSMT. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 545-552.
- van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1776(1):58-85.
- Vavvas D, Li X, Avruch J, Zhang XF. Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J Biol Chem* 1998; 273(10):5439-42.
- Verma SK, Ganesan TS, Parker PJ. The tumour suppressor RASSF1A is a novel substrate of PKC. *FEBS Lett* 2008; 582(15):2270-6.
- Vichalkovski A, Gresko E, Cornils H, Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA. NDR kinase is activated by RASSF1A/MST1 in response to Fas receptor stimulation and promotes apoptosis. *Curr Biol* 2008; 18(23):1889-95.
- [Volodko N](#), [Gordon M](#), [Salla M](#), [Ghazaleh H](#), [Baksh S](#). RASSF tumor suppressor gene family: Biological functions and regulation. *FEBS Lett* 2014; 588(16):2671-84.
- Vos MD, Ellis CA, Elam C, Ulku AS, Taylor BJ, Clark GJ. RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor. *J Biol Chem* 2003; 278(30):28045-51.
- Vos MD, Martinez A, Elam C, Dallol A, Taylor BJ, Latif F, Clark GJ. A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability. *Cancer Res* 2004; 64(12):4244-50.

- Vos MD, Martinez A, Ellis CA, Vallecorsa T, Clark GJ. The pro-apoptotic Ras effector Nore1 may serve as a Ras-regulated tumor suppressor in the lung. *J Biol Chem* 2003; 278(24):21938-43.
- Waddington C.H. The epigenotype.1042. *Int J Epidemiol* 2012; 41(1):10-3.
- Wang H, Wu J, Meng X, Ying X, Zuo Y, Liu R, Pan Z, Kang T, Huang W. MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis* 2011; 32(7):1033-42.
- Wei Z, Chen X, Chen J, Wang W, Xu X, Cai Q. RASSF10 is epigenetically silenced and functions as a tumor suppressor in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432(4):632-7.
- Weitzel JN, Patel J. A single P1 clone bearing three genes from human chromosome 11p15.5: HRC1, HRAS1, and RNH. *Genet Anal Tech Appl* 1994; 11(5-6):165-70.
- Whang YM, Kim YH, Kim JS, Yoo YD. RASSF1A suppresses the c-Jun-NH2-kinase pathway and inhibits cell cycle progression. *Cancer Res* 2005; 65(9):3682-90.
- Winner B, Peipert JF, Zhao Q, Buckel C, Madden T, Allsworth JE, Secura GM. Effectiveness of Long-Acting Reversible Contraception. *N Engl J Med* 2012; 366(21):1998-2007
- Wischniewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 339-349.
- Wood A, Shilatifard A. Posttranslational Modifications of Histones by Methylation. In Conaway JW, Conaway RC. *Proteins in eukaryotic transcription*. *Adv Protein Chem*. 2004;67:201-22.
- Xianyong Ma, Xiaobin Gao, Epigenetic Modifications and Carcinogenesis of Human Endometrial Cancer. Department of Pathology, Yale University School of Medicine, USA. *Austin J Clin Pathol* 2014; 1(3): 1014.
- Xie R, Nguyen S, McKeegan K, Wang F, McKeegan WL, Liu L. Microtubule-associated protein 1s (MAP1S) bridges autophagic components with microtubules and mitochondria to affect autophagosomal biogenesis and degradation. *J Biol Chem* 2011; 286(12):10367-77.
- Yang L, Ma Z, Wang D, Zhao W, Chen L, Wang G. MicroRNA-602 regulating tumor suppressive gene RASSF1A is overexpressed in hepatitis B virus-infected liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2010; 9(10):803-8

Yang Y, Zhou L, Lu L, Wang L, Li X, Jiang P, Chan LK, Zhang T, Yu J, Kwong J, Cheung TH, Chung T, Mak K, Sun H, Wang H. A novel miR-193a-5p-YY1-APC regulatory axis in human endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Oncogene* 2013; 32: 3432-3442.


Yeramian A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, Catusus L, Abal M, Colas E. Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene* 2013; 32: 403-413.

Zhang H, He J, Li J, Tian D, Gu L, Zhou M. Methylation of RASSF1A gene promoter is regulated by p53 and DAXX. *FASEB J* 2013; 27(1):232-42.

Zhu LH, Sun LH, Hu YL, Jiang Y, Liu HY, Shen XY, Jin XY, Zhen X, Sun HX, Yan GJ. PCAF impairs endometrial receptivity and embryo implantation by down-regulating β 3-integrin expression via HOXA10 acetylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:4417-4428.

EKLER

Ek 1: Etik kurul onay belgesi



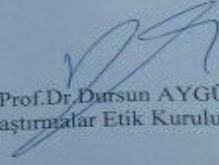
T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/ 1115-1376 25 .01.2018

Sayın Yrd.Doç.Dr.Şengül TURAL

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Endometriyum Kanserinde RASSF1A ve RASSF2A Tümör Süpresor Genlerinin Promotor Metilasyon Analizi** başlıklı OMÜ KAEK 2017/309 Karar nolu Patoloji çalışması+ Genetik çalışma nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 14.09.2017 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof.Dr.Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Ondokuz mayis Üniversitesi Tıp Fak. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Tel:(0362)3121919/2782 -4576007 Omutack@gmail.com
Hastane içi 1.Kat (Özel servis kürsüsü) Atakum/SAMSUN

Ek 2: Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ *

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

Endometriyum Kanserinde *RASSF1A* ve *RASSF2A* Tümör Süpresor Genlerinin Promotor Metilasyon Analizi

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR? Açıklayınız

Endometriyal kanser (Rahim kanseri) ; endometriumda oluşan, hücrelerin kontrolsüz ve anormal şekilde gelişimi ve vücudun diğer bölgelerine de yayılmasını takip eden sonuçlar doğuran ve yaygın kanserlerden 7.sırada olan kadın hastalığıdır. Rahim kanserinin ilk belirtisi menstrual periyod yani adet döngüsü ile bağlantılı olmayan menopoz sonrası bir vajinal kanama olarak kendini gösterir. Ayrıca dizüri olarak bilinen idrar yapılırken ağrı, disparoni olarak bilinen ağrılı cinsel birleşme ve pelvis ağrısı da diğer semptomlardır.

Yaygın olarak menopozdan sonra oluşan rahim kanserine çeşitli etkenler yol açar. Bunların başında hormonal etkenler ve genetik etkenler olmak üzere, popülasyonlar arası farklılık ve çevresel faktörler gelir. Çünkü popülasyonlar arası yaşam stilleri, sosyo-ekonomik imkânlar ve beslenme alışkanlıkları farklılık gösterir. Ayrıca kimyasallar ve UV, radyasyon gibi zararlılara maruz kalmak da tüm kanserlerde olduğu gibi endometriyal kanserde de önemli rol oynar. Epigenetik değişimleri DNA modifikasyonları ve histon modifikasyonları olarak çeşitlendirebiliriz. Bu düzenlemeler ve değişimler diğer pek çok kanserde söz sahibi olduğu gibi endometriyal kanserde de öneme sahiptir. Bu çalışmanın amacı da, bu değişimlerden birkaçının endometriyal kanserle ilişkisine ve etki yollarına genel bir bakış atmaktır.

Memelilerde DNA metilasyonu ve demetilasyonu önemli epigenetik modifikasyonlardan biridir ve gen ekspresyonunda hayati önem taşır. Promoter bölgenin metilasyonu gen aktivasyonu veya inhibisyonunu belirlerken, ekspresyon seviyesini de kontrol eder. Anormal metilasyonlar, yani normalden az veya çok gerçekleşenler tümör oluşumu ile ilişkilendirilir.

Hipermetilasyon hedef DNA nın fazla metilasyonudur ve promoter hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu inaktive eder. Böylece kanser oluşumunu önleyici proteinlerin oluşumunu da azaltır, kanser hücrelerinin metastazına katkı sağlar.

Özetle bu çalışmada temel amaç, yaygın kadın hastalıklarından biri olup menopoz öncesi ve sonrası kadınlarda görülebilen, anormal ve kontrolsüz hücre gelişimi ile vücudun diğer bölgelerine yayılarak seyreden rahim kanseri ile bu kanserde etkili olan *RASSF1A* ve *RASSF2A* tümör baskılayıcı genlerdeki promoter bölge metilasyonunun endometrial kanserli Türk hastalarda sıklığı ve etkisinin araştırılmasıdır.

Ek 2 (Devam): Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Araştırma sürecinde Hastaların patoloji ncelemesi için gönderdikleri dokudan bir miktar doku örneği alınarak ve aynı hastadan 2ml periferel kan örneği alınarak çalışma gerçekleştirilecektir. Bu doku örneklerinden DNA eldesi yapılarak PCR yöntemi ile promotor metilasyon profilleri incelenecektir.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Kan örnekleri için açlık durumunda (aç karnına) olmanız gerekmektedir. Çalışma doktorunuzu ziyarete belirlenen günlerde gelmelisiniz ve bir sonraki ziyaretiniz de, ziyaretten ayrılmadan önce planlanmalıdır. Yine çalışmadan önce veya çalışma sırasında aldığımız başka herhangi bir tıbbi tedaviyi de çalışma doktoruna söylemeniz önemlidir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Araştırmada uygulanacak patoloji laboratuvarına gönderilen doku örneğinden inceleme yapılacak aynı zamanda 2 ml periferel kan örneği alınarak inceleme yapılacaktır.

GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ

Eğer denek / hasta doğurganlık döneminde / emziren bir kadın ise çalışmaya dahil edilmeyecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR? (Varsa açıklayınız)

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabileceğim bilincindeyim. Çalışmadan her hangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma doktoru ziyaretleri ve çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyici tarafından karşılanacak ve size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir. Ayrıca çalışmaya bağlı makul miktardaki yol gideriniz makbuzları gösterildiği takdirde karşılanacaktır. Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi ("Çalışma Verileri") toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca Çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz. Çalışma destekleyicisi firma ile paylaşılan çalışma verileri size özel bir numara olan bir kod ("Kod") numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin çalışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma doktorunuzun denetimindedir. Çalışma destekleyicisi firma düzenleyici otorite veya diğer denetim kurumları tarafından atanmış kişiler doktorunuz tarafından tutulan çalışma verilerinizi inceleyebilirler.

Ek 2 (Devam): Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

Doktorunuz çalışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Çalışma destekleyicisi firma; çalışmanın yürütülmesi, teşhis ve tıbbi yardım gereçlerinin geliştirilmesi için çalışma verilerinizi kullanabilir. Doktorunuzun çalıştığı kurum ve çalışma destekleyicisi firmanın her ikisi de yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar.

Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Doktorunuz ya da çalışma destekleyicisi firmadan, toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahibsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahibsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen gerekirse sizin çalışma destekleyicisi firma ile temasa geçmenize yardımcı olabilecek doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Çalışma destekleyici firma onayınızdan vazgeçmeden önceki çalışma verilerinizi kullanmaya devam edebilir.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermektedirim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Yrd.Doç.Dr.Şengül Tural: 05334925282

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR: Yoktur gönüllü istediğinde çalışmadan ayrılabilir.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Habibe Nur ATMACA

Doğum Yeri : Merzifon / AMASYA

Doğum Tarihi : 23.09.1990

Medeni Hali : Bekâr

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce – Boşnakça/Sırpça

Eğitim Durumu : Uluslararası Saraybosna Üniversitesi / Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi / Genetik ve Biyomühendislik Bölümü / 2014

Çalıştığı Kurumlar : MEB Merzifon Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi / 2014-2015
GSB Merzifon İlçe Spor Müdürlüğü Gençlik Merkezi / 2018-

E posta : atmacahna@hotmail.com



