



**T.C.  
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİMDALI**

**MEME KANSERLERİ ÜZERİNE SURVİVİN GENİ PROMOTOR  
POLİMORFİZMİNİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. M. Deniz ALTIPARMAK**

**ANKARA 2013**



**T.C.  
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİMDALI**

**MEME KANSERLERİ ÜZERİNE SURVİVİN GENİ PROMOTOR  
POLİMORFİZMİNİN ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. M. Deniz ALTIPARMAK**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Cenap DENER**

**ANKARA 2013**

## TEŞEKKÜR

Genel cerrahi uzmanlık tezimin oluşması sırasında tezin her aşamasında bana güler yüzle yardımcı olup, sıcak ilgisini hiç eksik etmeyen, poliklinik, ameliyat, servisteki hastaların takibi, öğrenci ve asistan eğitimi gibi sayısız işleri arasında kendisinin ve ailesinin şahsi özel zamanlarından çalarak, bu çalışmanın belirlenmesinde, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında büyük emek veren, aynı zamanda asistanlık sürecimde mesleki eğitimime büyük katkı sağlayan, cerrahinin esaslarını bana öğreten Prof. Dr. Cenap Dener'e,

Çalışmanın genetik ayağının oluşmasında, her an kapısını bizlere açarak, bilgisini ve vaktini bizlere paylaşan, her defasında güler yüzünü bizden eksik etmeden, çalışmanın olgunlaşması için bütün imkanları bize sunan, fakültemiz Tıbbi Genetik Bölümü öğretim görevlisi Doç. Dr. Esra Gündüz'e

Genetik çalışmaların yürütülmesindeki emeği ve “materyal ve metod” yazımındaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Muradiye Acar'a,

Çalışmanın patoloji ile ilgili olan kısmında, sabırla her tür imkanı bizlere sunan, fakültemiz Patoloji Bölümü öğretim görevlisi Doç. Dr. Sibel Yenidünya'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca;

Doğru düzgün bistüri tutmayı bilmiyorken benden çok iyi bir cerrah olacağına beni inandıran, asistanlık hayatımda gerek mesleki sorumluluk alırken, gerekse insani ilişkilerimde bana olan sonsuz güvenini her defasında tekrar tekrar hissettiren, Cerrahi

Onkoloji'nin ülkemizde bir yan-dal uzmanlığı olarak kurumsallaşmasında büyük çabaları olan, tevazuyu en büyük zenginlik olarak gören, kendisinden hem mesleki anlamda hem de insanlık anlamında çok şey öğrendiğim hocam, fakültemiz Dekan'ı, Prof. Dr. Mikdat Bozer'e,

Genel cerrahi eğitimim sırasında, engin hoşgörülü sabırlarıyla bana bildiklerini aktaran, kapılarını her an düşünmeden çaldığımız, Genel Cerrahi'nin kendi etik değerlerini bizlere öğreten Prof. Dr. Aydın İnan'a ve Doç. Dr. Önder Sürgit'e,

Asistanlığım boyunca, yoğun çalışma sürecimde her bunaldığımda sadece bakışlarımdan durumu anlayarak sıcacık ilgisiyle her defasında mesleğime yeniden ısınmamı sağlayan, bir hocadan çok her zaman bizlere ablalık yapan, varlığıyla bizlere güven veren, iyi hekim ve iyi cerrah olmanın önce iyi insan olmaktan geçtiğini bizlere öğreten, mesleki açıdan kendisine çok şey borçlu olduğum Doç. Dr. Meral Şen'e,

Asistanlık eğitimime katkı sağlayan birlikte çalıştığım yandal uzmanlarımıza, mesleğe bizden daha önce atılan ancak bitirmeden önce tüm mesleki deneyimlerini bizlere aktaran cerrahide birlikte çalıştığım ağabeylerime, cerrahinin zor ve ciddi emek isteyen ama bir o kadar da eğlenceli olan çetin yollarında birlikte omuz omuza yürüdüğümüz asistan arkadaşlarıma,

Asistanlık sürecim boyunca büyük bir saygı ve sevgi ile birlikte çalıştığımız hemşire arkadaşlarımdan, servis ve ameliyathane personeline kadar herkese teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim...

Son olarak; uzakta da olsalar bana olan sevgilerini, güvenlerini ve desteklerini hep üzerimde hissettiğim anne ve babama, Genel Cerrahi asistanlık eğitim sürecimin zorlu yollarına, benimle birlikte birebir şahit olan ve desteğini benden hiç eksik etmeyen biricik kardeşime sevgilerimi sunarım...

Bu alışma Turgut zal Üniversitesi Tıp Fakóltesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu tarafından desteklenmiştir. BAP koordinasyon kuruluna sağladığı finansal destek nedeniyle ayrıca teşekkür ediyorum...

**M. Deniz ALTIPARMAK**

**ANKARA, 2013**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iv
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Kanserın Moleküler Biyolojisi.....	4
2.2. Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	11
2.3. Kanser Genleri, Kanser Gen Mutasyonları ve Kanser Genlerinin Belirlenmesi .....	18
2.4. Kanser Genom Analiziyle Somatik Dönüşümlerin Belirlenmesi ve Yeni Tümör Taksonomisi.....	19
2.5. Kanser Epigenetiği, Epigenetik Süreç ve Epigenetik Tedavi .....	21
2.6. Onkoloji Tanı Uygulamalarında Tıbbi Genetik .....	23
2.7. Meme Kanseri .....	24
2.7.1. Moleküler genetik ve meme kanserinin tarihsel ilişkisi.....	26
2.7.2. Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisi.....	27
2.8. Apoptozis .....	30
2.8.1. Apoptozis tanımı .....	30
2.8.2. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar.....	31
2.8.3. Fizyolojik koşullarda apoptozis .....	32
2.8.4. Patolojik koşullarda apoptozis .....	33
2.8.5. Apoptoziste morfolojik özellikler .....	35
2.8.6. Apoptoziste biyokimyasal özellikler.....	36
2.8.7. Apoptozis mekanizmaları.....	37

2.9. IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) Ailesi.....	39
2.9.1. IAP –aracılı inhibisyonun mekanizmaları .....	39
2.9.2. IAP’ların regülasyonu .....	40
2.10. Survivin .....	40
2.10.1. Survivin’in yapısı .....	41
2.10.2. Meme kanserinde survivin .....	43
2.10.3. Survivin’in prognostik ve diagnostik önemi .....	45
2.10.4. Survivin promotör bölge polimorfizmleri .....	46
2.10.5. Survivin gen ekspresyonunun regülasyonu .....	47
2.10.6. İnsan malignitelerinde survivin .....	47
3. MATERYAL - METOD.....	48
3.1. Parafin Bloktan Dna İzolasyonu .....	49
3.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu .....	50
3.3. DNA Amplifikasyonu .....	51
3.3.1. Primerlerin sulandırılması .....	52
3.3.2. Reaksiyon karışımı .....	52
3.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	53
3.5. DNA’nın Enzimatik Kesimi ve Polimorfizmin Belirlenmesi .....	54
3.5.1. Survivin -31 G>C (rs 9904341) polimorfizmi için enzim kesimi .....	55
3.5.2. Survivin geni -31 G>C (rs9904341) polimorfizminin incelenmesi.....	56
3.6. İstatistiksel Analiz Metodu.....	58
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ VE ELDE EDİLEN BULGULAR .....	59
5. TARTIŞMA .....	66
6. SONUÇ .....	78
7. ÖZET .....	79
8. SUMMARY .....	82
9. KAYNAKLAR .....	85

## **SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

IAP	: Apoptoz İnhibitörü Proteinler
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKN	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör
CDE/CHR	: Cell Cycle Dependent Element / Cell Cycle Gene Homology Region
RB	: Retinoblastoma
BIR	: Baculovirus IAP Repeat (Baculovirus Inhibitor Of Apoptosis Protein Repeat)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RE	: Restriksiyon Enzimleri
cDNA	: Komplementer DNA
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmleri
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
MRM	: Modifiye Radikal Mastektomi
MF	: Multifokal
MS	: Multisentrik
DCIS	: Duktal Karsinoma İn Situ
LCIS	: Lobuler Karsinoma İn Situ
CA	: Kanser
HNPCC	: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Çift sarmal oluşturan DNA'nın şematik resmi .....	9
Şekil 2. DNA replikasyonu .....	10
Şekil 3. Genetik bilginin DNA'dan proteine ve hücre fonksiyonlarına dönüşümü.....	10
Şekil 4. Ökaryotik gen ekspresyonunun kontrolündeki dört önemli basamak .....	11
Şekil 5. Hücre döngüsü ve kontrol sistem.....	14
Şekil 6. Apoptozis yollarının basitleştirilmiş şeması .....	15
Şekil 7. Hücre yüzeyi ve hücre içi reseptör basamakları .....	16
Şekil 8. Apoptozun mekanizması*.....	38
Şekil 9. Hasta gruplarının PCR amplifikasyon ürünlerinin Agaroz jel elektroforez görüntüleri. (-K, kontrol amaçlı) .....	54
Şekil 10. SURVİVİN geni polimorfizminin enzim kesimine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	56
Şekil 11. SURVİVİN geni homozigot wild type (GG) örneğine ait elektroferogram görüntüsü.....	57
Şekil 12. SURVİVİN geni homozigot (CC) polimorfizmine ait elektroferogram görüntüsü.....	57
Şekil 13. SURVİVİN geni heterozigot (GC) polimorfizmine ait elektroferogram görüntüsü.....	58
Şekil 14. Kontrol ve Kanser Gruplarına Göre Olguların Survivin 31GC Promotor Polimorfizmi Yönünden Yüzesel Açıdan Şematik Dağılımı	61

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No:

<b>Tablo 1.</b> PCR reaksiyon karışımı .....	53
<b>Tablo 2.</b> İzlenen PCR programı .....	53
<b>Tablo 3.</b> Msp I enzimi için kesim koşulları .....	55
<b>Tablo 4.</b> Kontrol ve Kanser Gruplarına Göre Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri Yönünden Dağılımı .....	59
<b>Tablo 5.</b> Kontrol ve Kanser Gruplarına Göre Olguların Survivin Promotor Polimorfizmi Yönünden Dağılımı.....	60
<b>Tablo 6.</b> Kontrol ve Kanser Gruplarında Olguların Survivin Promotor Polimorfizmi (GC+CC) Yönünden Dağılımı Ve Odds Oranı İlişkisi.....	61
<b>Tablo 7.</b> Kanser Grubu İçerisinde Survivin Promotor Polimorfizmi Yönünden Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri Yönünden Dağılımı .....	62
<b>Tablo 8.</b> Kanser Grubu İçerisinde Survivin Promotor Polimorfizmi Yönünden Olguların Patolojik Özellikleri .....	64
<b>Tablo 9.</b> Kanser Grubu İçerisinde Survivin Promotor Polimorfizmi Yönünden Olguların Nüks Ve Sağkalım Özellikleri .....	65

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra en sık görülen 2. kanserdir. Kadınlar arasında ise, dünyada en sık görülen malign tümör, meme kanseridir. Meme kanseri, tüm kadın kanserlerinin %23'ünü oluşturmaktadır (1,2,3,4,5,6,7). Ülkemizde ise, kadınlar arasında en sık görülen on kanser tipi içerisinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır (8). Survivin, IAP (Apoptosis İnhibitör Protein) ailesinin üyesi olan bir antiapoptotik proteindir. Survivin hem apoptozisi baskılayan hem de hücre bölünmesini düzenleyen çift fonksiyonlu bir proteindir. Eskiden Survivin'in sadece fetal dokularda eksprese edildiği düşünülürken, son araştırmalarda erişkinlerde deri, endometrium, endotelial hücreler, normal kan hücreleri, pankreas, dalak, kolon gibi normal dokularda da düşük Survivin ekspresyonu gösterilmiştir (9). İnsanlardaki çeşitli malignitelere Survivin'in yoğun eksprese olduğu ancak normal erişkin dokularda oldukça az, hatta tesbit edilebilir düzeyin altında olduğu bilinmektedir (9, 10). Survivin hücre siklusunun G2/M fazında eksprese olur. Apoptoz düzenini bozarak, anormal hücrenin yaşamasını teşvik etmek yoluyla tümör hücrelerine anlamlı bir avantaj sağladığı düşünülür (12). Survivin düzeyinin artmasının tümörler için negatif bir prognostik faktör olduğu öne sürülmektedir. Survivin'in aşırı ekspresyonunun, kısalmış sağkalım ile ilişkili olduğu ayrıca kemoterapiye veya radyoterapiye dirençli olan tümörlerin artmış rekürrens hızı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (13, 19). Survivin; tümör hücrelerinde normal dokuya oranla farklı ekspresyonu olan birkaç proteinden biridir. Survivin'in akciğer, mide, kolon, meme, prostat, non-Hodgkin lenfoma gibi pek çok yaygın kanser türünde

eksprese olduğu gözlenmiştir (10). Survivin'in tümörlerde aşırı ekspresyonu; sağkalımın kısılması, kemoterapi ile radyoterapiye direnç ve tümör rekürrensleri ile ilgilidir (13). Survivin'in mitoz ve apoptozdaki fonksiyonları, bu proteinin, tümörün büyüme ile ilgili olan hücrelerinde eksprese edildiğini ve tümör oluşması ile tümörün büyümesinde etkili olduğunu düşündürür. Bu açıdan Survivin, potansiyel bir kanser markerıdır. Survivin, biyolojik sıvılarda tesbit edilebilir. Mesela Survivin, mesane kanserinde hastaların idrarında tesbit edilmiş ve bunun spesifik ve sensitif bir diagnostik gösterge olduğu saptanmıştır (17). Kolorektal karsinomlarda ve nöroblastomlarda yapılan immunohistokimyasal çalışmalar, hastalığın kötü gidişatı ile Survivin ekspresyonu arasında klinik korelasyon olduğunu, dolayısıyla da Survivin'in potansiyel bir prognostik faktör olduğu düşündürür (18,19). Survivin'in artması, tümörlü hastalar için negatif bir prognostik faktördür. Survivin molekülünü kodlayan genin promotor bölgesi içinde birkaç nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır. Bunlardan biri de bizim çalışmamızda araştırdığımız CDE/CHR (Cell cycle dependent element/cell cycle gene homology region) repressör bağlama bölgesinde (ATG başlangıç kodununun ilk nükleotidine 31 baz çifti uzaklıkta) lokalize olan o bölgeye ait Survivin promotor 31G/C polimorfizmidir. Bu polimorfizmin, Survivin'in hem mRNA hem de protein seviyelerindeki aşırı ekspresyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (20). Survivin promotor 31G/C gen polimorfizmi ile literatürde çeşitli kanser tiplerinde yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (20). Survivin'in 31G/C promotor polimorfizminin çeşitli tümörlerde yüksek oranda eksprese edildiği, tümörlerin oluşumu, progresyonu ve prognozuyla ilgisi olduğu bilinmektedir.

Biz de yapmış olduğumuz bu çalışmada, meme kanserlerinde ve kontrol grubunda Survivin 31G/C promotor polimorfizmini araştırdık. Bunun için,

hastanemizde ameliyat edilmiş olan unifokal ve multifokal/multisentrik meme kanserli hastaların patolojik spesmenlerindeki tümörlü dokulardan almış olduğumuz örneklerde ve 30 yaş üstü sağlıklı kadınlardan kişisel onamları alındıktan sonra alınan kan örneklerinde, Survivin geni 31G/C promotor polimorfizmini araştırdık. Elde ettiğimiz verilerle, bu polimorfizmin meme kanserine yakınlık yaratıp yaratmadığını ve yine bu polimorfizmin meme kanserli hastaların prognozuyla olan ilişkisini araştırmayı amaçladık. Ayrıca bu çalışma, Survivin 31G/C promotor polimorfizmi ile multifokal-multisentrik meme kanserleri arasındaki ilişkinin incelenmesi bakımından bildiğimiz kadarıyla literatürdeki ilk çalışmadır.

Kanser hastalarının yaşam sürelerinin uzamasına özellikle katkıda bulunan erken teşhis, günümüzde pek çok kanser tipinde olduğu gibi meme tümörlerinde de oldukça önem taşımaktadır. Hastalıkların genetiğinin ve moleküler patogenezinin tam olarak aydınlatılmasının, ilgili hastalıkların erken tanısına da katkı sağlayacağı kanaatindeyiz. Ayrıca hastalığın genetik temelleri ve hastalıkla ilgili moleküler mekanizmaların aydınlatılması ile potansiyel tedavi hedefleri de belirlenebilecektir. Bu sayede daha az yan etkisi olan, hedefe yönelik spesifik tedaviler uygulanabilecek ve hastalığın tamamen eradikasyonu sağlanabilecektir. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızın meme tümörlerinin tanısında, patogenezinde, prognozunda ve tedavisinde Survivin'in önemini araştırarak yeni çalışmalara da ışık tutacağı kanaatindeyiz.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kanserin Moleküler Biyolojisi**

Moleküler yapıyı analiz ederek, hücrelerin, organların, organizmaların normal ve patolojik koşullarda nasıl işlev gösterdiğini anlamak modern biyolojinin hedeflerinden biridir. Moleküler çalışmalar sayesinde, insanlardaki metabolizma yolları, gen ekspresyonu, hücrelerdeki sinyalleşme ve organ gelişimine yönelik olan anlamlı ilerlemeler sağlanmıştır. İnsan Genom Projesinin tamamlanması, rekombinant DNA teknolojisi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniklerinin geliştirilmesi ile hastalıkların gelişimi günümüzde daha iyi kavranmaktadır. Ayrıca bu ilerlemeler sayesinde, hastalıkların tedavi metodlarında da yeni gelişmeler olmuştur (21).

Son yıllarda, hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji alanlarında hızlı ilerlemeler oldu. Bunlara bağlı olarak hastalıklarla ilgili bilgilerimizde de önemli artışlar oldu. Bu bilgiler cerrahi uygulamalarda da radikal değişiklikler yaratacaklardır. İlerleyen yıllarda, cerrahi hastalıklarda, giderek artan şekilde moleküler teknikler uygulanacak, bu da bize cerrahi tedavilerin seçimi ve uygulamasında yeni stratejiler sağlayacaktır. Bu yüzden cerrahların moleküler ve hücre biyolojisinin temel ilkelerine aşina olmaları gerekir (21).

Günümüzde kanserin temelinde yatan moleküler mekanizmalar da daha iyi anlaşılmaktadır. Bu sayede klinikte, moleküler laboratuvar yöntemlerinin kullanımı çok hızlı bir şekilde artmıştır. Yeni teknolojiler, bu genetik değişiklikleri incelemek

için bizlere çok geniş olanaklar sağlamışlardır. Hasta değerlendirilirken günümüzde tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve metastaz varlığı temel kriterler olarak kullanılmaktadır. Ancak mevcut patolojik yaklaşımlarla her zaman sağlıklı bir evreleme gerçekleştirilememektedir. Çoğu PCR temeline dayanan yeni moleküler yöntemlerin sağladığı olanaklar, mikroskopik incelemeler sonucu elde edilen bilgilerin sınırını çok aşmaktadır. Klasik morfolojik kriterlerin yerini alan veya bu kriterleri tamamlamayı sağlayan daha duyarlı moleküler yöntemler geliştirilmektedir. Bu sayede hemen her tip tümörde moleküler evreleme yapılabilmekte, mikro düzeydeki metastazlar saptanabilmekte, 'Minimal Rezidüel Hastalık' kavramı tanımlanmakta, bazı kanser türlerinde patolojik değerlendirmeden bağımsız olarak daha başarılı sonuçlar veren moleküler test panelleri kullanılmaktadır. İlerleyen yıllarda moleküler teknolojiler birçok patolojik değerlendirmenin yerini alacak, hastalar moleküler teknolojiler sayesinde çok daha ayrıntılı ve doğru sınıflandırılarak değerlendirilecektir (22).

Moleküler biyolojideki en büyük ilerlemeler, DNA analizi ve manipülasyon alanlarında olmuştur (21). Rekombinant DNA'yı ortaya çıkaran, enzimatik ve mikrobiyolojik tekniklerin bulunması, moleküler biyoloji dünyasında çok önemli değişiklikler yaratmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi, DNA'nın enzimatik manipülasyonunu ve daha sonra DNA'nın klonlanmasını içerir. DNA molekülleri birçok amaçla klonlanabilir. Örneğin; DNA örneklerinin saklanması amacıyla, dizi analizini kolaylaştırma amacıyla, problemler elde etmek amacıyla, bir veya daha fazla organizmada rekombinant proteinlerin ekspresyonu amacıyla DNA molekülleri klonlanabilir. Mevcut bir vektörün sınırlı kesimi (Restricted digestion), PCR ve cDNA sentezi gibi birçok yolla DNA elde edilebilir. Son yıllarda DNA klonlama teknikleri

geliştirildiğinden, araştırmacılar DNA çalışmalarından proteinlerin fonksiyonları üzerindeki çalışmalara geçmişlerdir. Ayrıca hücre ve hayvan modellerinden, insanlardaki moleküler tedavilere geçilmiştir. Gen regülasyonu, yapısı ve fonksiyonunu incelemek için rekombinant proteinlerin ekspresyonu için bir yöntem sağlar. Rekombinant proteinlerin kullanımı son yıllarda, gen tedavisi ve biyofarmasötik ajanlar gibi yeni uygulamaları kapsayacak şekilde genişlemiştir (21).

Günümüzde, kanserlerin kaynaklandığı hücre tipine ve dokuya göre yapılan klasik sınıflamanın yanında, tümörlerde çoğalmayı uyaran kusurlu yolaklara göre de sınıflandırma yapılması gerektiğini söyleyen yeni görüşler ortaya atılmıştır (22). Belirli kanserlere karşı etki gösteren ilaçlar, ilgili kanserlerin temelinde yatan bozuk moleküler yolakları da işaret etmektedir. Bazı genlerde bulunan polimorfik değişiklikler, kişinin verilen ilaca cevabını etkiler. Bu yüzden, ilaçların etkinliği ve hastanın ilaca vereceği cevabın öngörülmesi açısından farmakogenetik de büyük önem taşımaktadır. İlerleyen yıllarda, hedefe yönelik tedavide kullanılan ilaçların, bu ilaçlara cevabı belirlemeye yönelik testler ile birlikte geliştirileceği düşünülmektedir (22).

Kanser temelde genetik bir hastalıktır. Kanseri iyi anlayabilmek için kansere yol açan DNA değişimlerinin ortaya konulması gerekir. Karsinogenezin anlaşılabilmesi için; büyüme, invazyon ve metastaza neden olan, hücresel programdaki dönüşüme yol açan genetik değişikliklerin nasıl gerçekleştiğini bilmek gerekir. Çoğu somatik hücre genomunda biriken çok sayıda moleküler değişiklik kanser gelişimine yol açmaktadır (23).

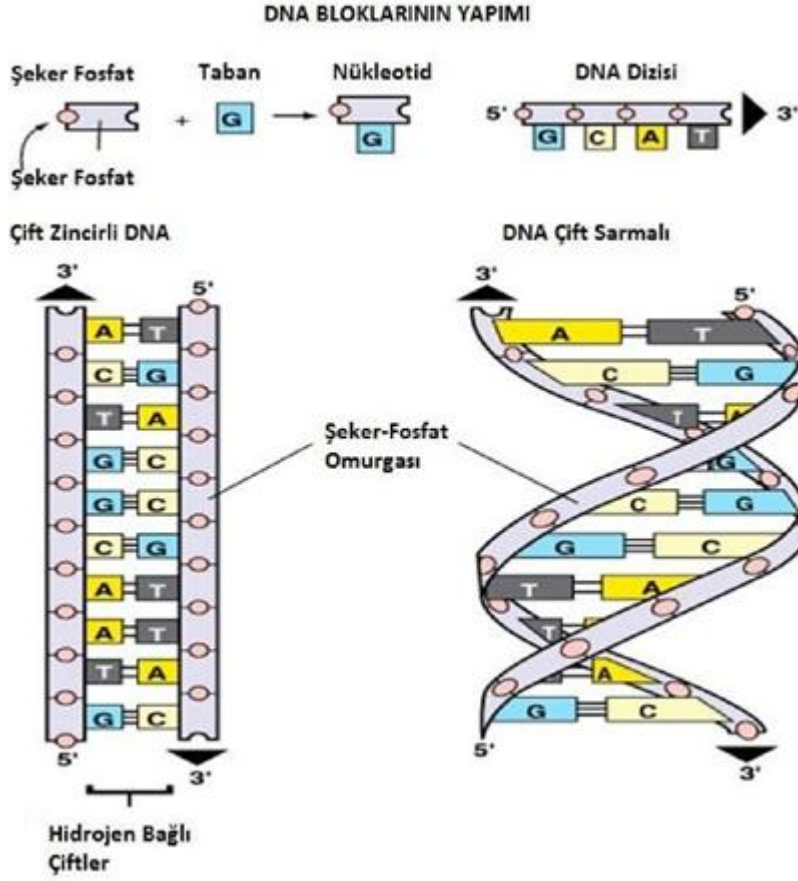


‘DNA’, genetik materyalin hücre çekirdeği içerisinde kromozomlar şeklinde paketlenmesine verilen isimdir. Moleküler yapısı ilk olarak J. D. Watson ve F. Crick tarafından aydınlatılmıştır. DNA’ nın genetik materyal olarak önemli özelliklerinden birisi, bir hücrenin tüm fonksiyonları için önemli olan bilgiyi kodlama becerisidir. DNA; ‘Transkripsiyon’ adı verilen RNA sentezi için kalıp işlevi görür ve elçi RNA (mRNA veya protein kodlayan RNA), ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA (tRNA)’yı içerir. mRNA, ‘Translasyon’ adı verilen, protein yapımı için gerekli bilgiyi rRNA ve tRNA yardımıyla DNA’dan taşır. Bu basamakların her biri, her hücrede, spesifik yer ve zamanda, genlerin doğru şekilde eksprese edilmesi için kontrol edilir. Bir hücredeki farklı gen aktivitesi, onun özelliklerini, etkilerini ve işlevlerini belirler (21).

DNA molekülü, sağa dönüşümlü, çift sarmallı bir yapıda bulunmaktadır. Çift sarmallı oluşturan her bir DNA zinciri, birbirlerine 3’-5’ fosfodiester bağları ile bağlanmış, çok sayıda nükleotid (azotlu baz-şeker-fosfat) molekülünden oluşmaktadır. Her bir zincire bu yüzden ‘**Polinükleotid zinciri**’ adı da verilmektedir. Çift sarmallı yapıda her iki polinükleotid zinciri birbirine antiparalleldir. Bir zincir 5’-3’ yönünde bulunurken, buna komplementer olan ikinci zincir 3’-5’ yönünde bulunur. DNA molekülünü oluşturan nükleotid birimleri temel olarak 5 karbonlu bir deoksiriboz şekeri ve buna 5’ C atomundan bağlı bir fosfat ve 1’ C atomundan bağlı bir azotlu bazdan oluşmaktadır. DNA molekülünde 4 çeşit azotlu baz bulunmaktadır. Bu 4 farklı azotlu baz; Adenin (A), Guanin (G), Sitozin (C) ve Timin (T)’ dir. İki polinükleotid zinciri birbirine antiparallel gelecek şekilde çift sarmal yapıyı oluştururlar. Bu çift sarmal yapının oluşumunda bazların komplementerik özelliği son derece önemlidir. DNA molekülünde, Adenin’in karşısında Timin, Sitozin’in karşısında ise Guanin

bulunur. Bazlar arasında bulunan hidrojen bağları ile iki polinükleotid zinciri birarada tutulur. Guanin ile Sitozin arasında 3, Adenin ile Timin arasında 2 hidrojen bağı bulunur (Şekil 1). ‘**Replikasyon**’ olarak isimlendirilen DNA’nın kendini eşlemesi semi-conservative (yarı korunumlu) olarak gerçekleşir. Replikasyonda önce DNA’nın iki zinciri birbirinden ayrılır. Daha sonra herbir zincirin karşısına bazların komplementerlik esasına uygun olarak yeni zincirler sentezlenir (Şekil 2).

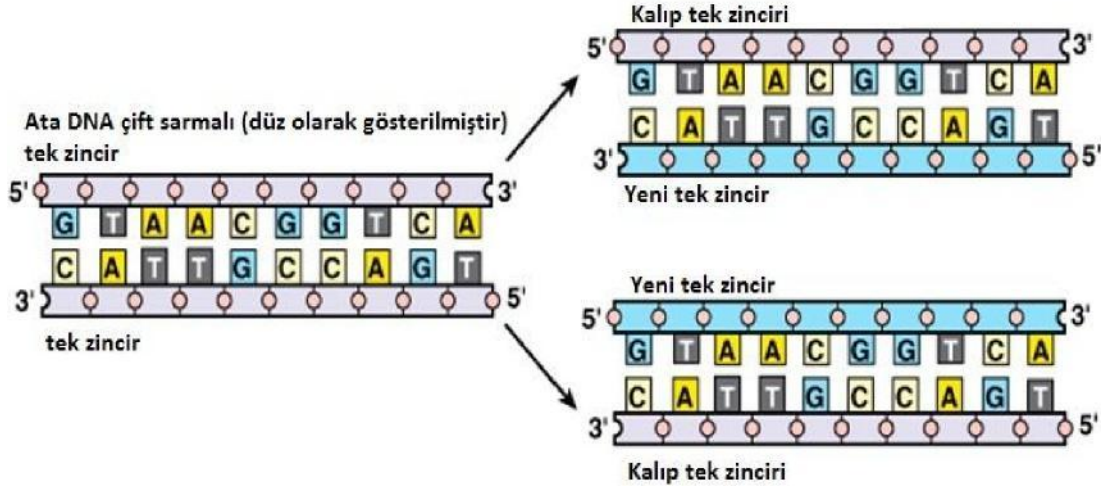
Bir hücrenin tüm fonksiyonları için gerekli olan bilgi DNA tarafından kodlanır. Daha sonra bu bilgi hücre içerisinde protein bilgisine dönüştürülür. ‘**Gen ekspresyonu**’ olarak adlandırılan bu süreçte ilk olarak DNA’daki bilgi, ‘Transkripsiyon’ adı verilen işlemle mRNA bilgisi şeklinde yazılır. Oluşan bu mRNA molekülü belirli işlemlerden geçirilip olgunlaştırıldıktan sonra sitoplazmaya aktarılır. Daha sonra mRNA’daki bu bilgi ribozom adı verilen organellerde tRNA (transfer RNA) moleküllerinin de yardımıyla protein bilgisine çevrilir. Bu işleme ‘Translasyon’ adı verilir (şekil 3). Bu basamakların her biri, genlerin her hücrede spesifik yer ve zamanda doğru eksprese edilmesini (ifade edilmesini) sağlamak üzere dikkatli bir şekilde kontrol edilir (Şekil 4). Tüm basamaklar, hata saptama (proofreading) mekanizmaları ile kontrol edilir.



**Şekil 1.** Çift sarmal oluşturan DNA'nın şematik resmi

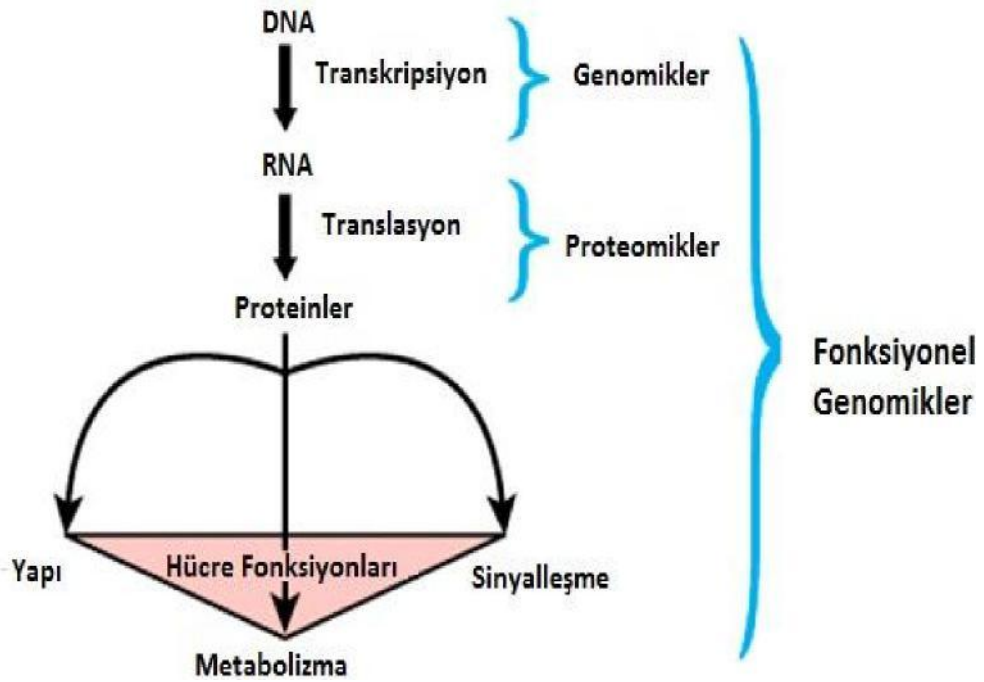
(DNA 4 nükleotid tipinden oluşur. Her bir polinükleotid zincirinde bunlar birbirine kovalent bağlarla {fosfodiester bağı} bağlıdır. Çift sarmal yapılı DNA molekülü, birbirine bazlar arasındaki hidrojen bağları ile bağlanmış iki polinükleotid zincirden oluşur. DNA zincirlerinin sonlarında bulunan oklar iki zincirin kutupsallıklarını göstermektedir. Şeklin sol alt tarafındaki resim düzeltilmiş DNA molekülünü gösterir. Gerçekte DNA molekülü çift sarmal şeklini alacak şekilde bükülür ve her dönüş sağda gösterildiği gibi 10,4 baz çiftinden oluşur) (24).

### DNA Kendini Kalıp Olarak Kullanarak Kendini Çoğaltır



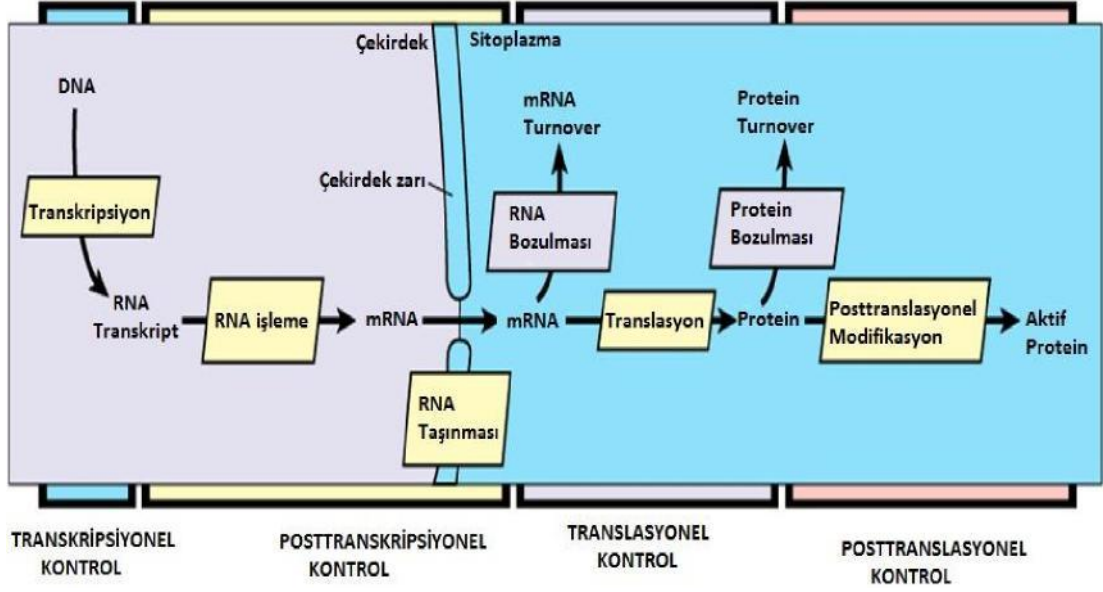
Şekil 2. DNA replikasyonu

(Nükleotid A sadece T ile ve G nükleotidi C ile eşleştiğinden, DNA'nın her bir zinciri komplementer zincirindeki nükleotid dizisini belirleyebilir. Bu yolla çift sarmallı DNA özdeş şekilde kopyalanabilir) (24).



Şekil 3. Genetik bilginin DNA'dan proteine ve hücre fonksiyonlarına dönüşümü

(DNA'dan RNA'ya genetik bilginin aktarılmasına 'Transkripsiyon' denir. RNA'nın proteine aktarılma işlemine ise 'Translasyon' denir. Proteinler hücre yapısının, hücreler arası sinyal iletiminin ve metabolizmanın önemli kontrol bileşenleridir) (24).



**Şekil 4.** Ökaryotik gen ekspresyonunun kontrolündeki dört önemli basamak

(Transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası kontrol, bir proteinin üretilmesi için var olan mRNA düzeyini belirler; translasyonel ve translasyon sonrası kontrol ise fonksiyonel proteinlerin nihai akıbetini belirler. Transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası kontrollerin birçok basamak içerdiğine dikkat ediniz) (24).

## 2.2. Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

İnsan organizması birçok farklı hücre tipinden oluşur. Bunlar farklı özellikleri olmasına rağmen aynı genetik maddeyi içerirler. Genom bu hücresel çeşitliliği kontrol eder ve gen ekspresyonunun sıkı regülasyonu bu durum sağlanır. Farklı RNA komplementleri bu yolla sentezlenip birikir ve farklı hücre tiplerinde bulunan proteinlere yol açarlar. Çevreden gelen sinyaller, belirli bir hücrede, belirli bir zaman diliminde, hangi genlerin eksprese edileceğini belirlerler. DNA'dan RNA'ya ve proteine giden yolda gen ekspresyonunun kontrol edilebileceği birçok düzey vardır (21).

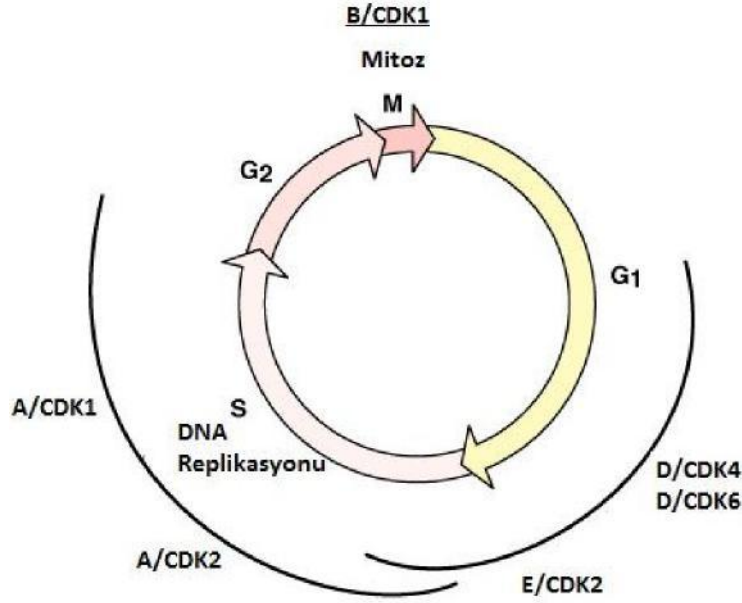
Canlı hücre, enzimatik yollarla, transkripsiyon (DNA'dan RNA'yı yazdırmak) ve translasyon (mRNA'yı proteine dönüştürmek) için gerekli mekanizmaya sahiptir. Tüm organizmalarda bu mekanizma, gen ekspresyonu için gereken iki önemli aşamada (Transkripsiyon ve translasyon) gerçekleşir. Fakat özellikle ökaryotik organizmalarda gen regülasyonu çok daha karmaşıktır. Mesela, aradaki dizilerin çıkarılması için '**Splicing**' (Birçok gen transkriptinin kesilmesi) gerekir. '**İntronlar**', kesilip çıkarılan bu dizilere verilen addır. Bunlar yararsız gibi görünürler ancak gerçekte bazı düzenleyici bilgilerin taşınmasını sağlarlar. '**Ekzonlar**' ise, biraraya getirilip sonunda proteine dönüştürülen dizilere verilen addır. Daha ileri düzeyde gen ekspresyonunun regülasyonu, mRNA'nın modifikasyonunu, mRNA stabilitesinin kontrolünü ve mRNA'nın sitoplazmaya (burada translasyon için ribozomlar şeklinde biraraya getirilir) taşınmasını içerir. mRNA'nın protein içine translasyonundan sonra daha ileri düzeyde, protein düzeyleri ve fonksiyonları düzenlenebilir.

Hayat döngüsünün ya da gelişimin herhangi bir aşamasında, bir hücrede ifade edilen gen ürünlerinin miktar ve ifade zamanlarının geri döndürülebilir mekanizmalarla kontrolü, gen ekspresyonunun düzenlenmesidir.

**İnsan Genomu**; Bir organizmanın sahip olduğu kalıtsal bilginin tümünü ifade etmek için '**Genom**' terimi kullanılır. İnsan genomu, 23 kromozom çifti tarafından taşınan, yaklaşık 3 milyar baz çifti uzunluğundaki DNA dizisinden oluşmaktadır. Tahminen insan genomunda 25.000 – 30.000 gen bulunur. Bu yapının % 99,9'unun tüm insanlarda özdeş olduğuna inanılmaktadır (21). DNA'da, Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP) adı verilen, tek baz farklılıklarının olduğu, yaklaşık 3 milyon bölge tanımlanmıştır. Bu tek

nükleotid polimorfizmleri, hastalık eğilimi bakımından, insanlar arasındaki farklılıkların ve çevresel faktörlere yanıtların kritik belirleyicileri olabilmektedirler.

**Hücre Döngüsü:** Organizmalarda çok sayıda farklı hücre tipi bulunur. Birçok hücre çoğalırken, bazı hücreler (Örneğin; sinir hücreleri ve çizgili kas hücreleri) çoğalmazlar. Çoğalma yeteneğine sahip olan hücreler, genomik DNA'larını çoğaltma ve her kardeş hücreye bu genetik bilginin özdeş kopyalarını aktarma becerisine sahiptirler. Bundan dolayı doku dengesinin korunmasında hücre döngüsü temel bir mekanizmadır (21). Şekil 5'de hücre döngüsünün basamakları gösterilmiştir. İlk olarak hücre proliferasyona karar verir ve gerekli molekülleri sentezlemeye hazırlanır. Daha sonra büyüme faktörleri sentezlenir ve yeni sentezlenen ya da yeni açığa çıkan her büyüme faktörü kendisine özgü büyüme faktörü reseptörlerine bağlanır. Proliferasyon sinyali, sinyal iletilici moleküller aracılığıyla, bu reseptörlerden nükleusa taşınır ve nükleusta DNA eşleşmesi gerçekleşir. G0 Fazında (İstirahat Fazı); hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar. G1 Fazında (Ara Faz, İnter Faz), spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G1 Fazında bol miktarda RNA sentezlenir ve DNA sentezi için gerekli birçok enzim üretilir. S Fazında (DNA Sentezi Fazı) hücredeki DNA miktarı ikiye katlanır. G2 Fazında DNA sentezi durur, RNA ve protein sentezi devam eder. Ayrıca G2 Fazında 'mitotik spindle' ların mikrotübüler prekürsörleri üretilir. M Fazında (Mitozis) RNA ve protein sentez hızı aniden yavaşlar. Yine M Fazında, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Oluşan yeni hücreler mitozisi takiben ya G0 ya da G1 fazına girerler.



**Şekil 5.** Hücre döngüsü ve kontrol sistem

(M; çekirdek ve sitoplazmanın bölündüğü mitoz fazıdır.

S; DNA'nın sentez fazıdır.

G1; M ile S arasındaki fazdır.

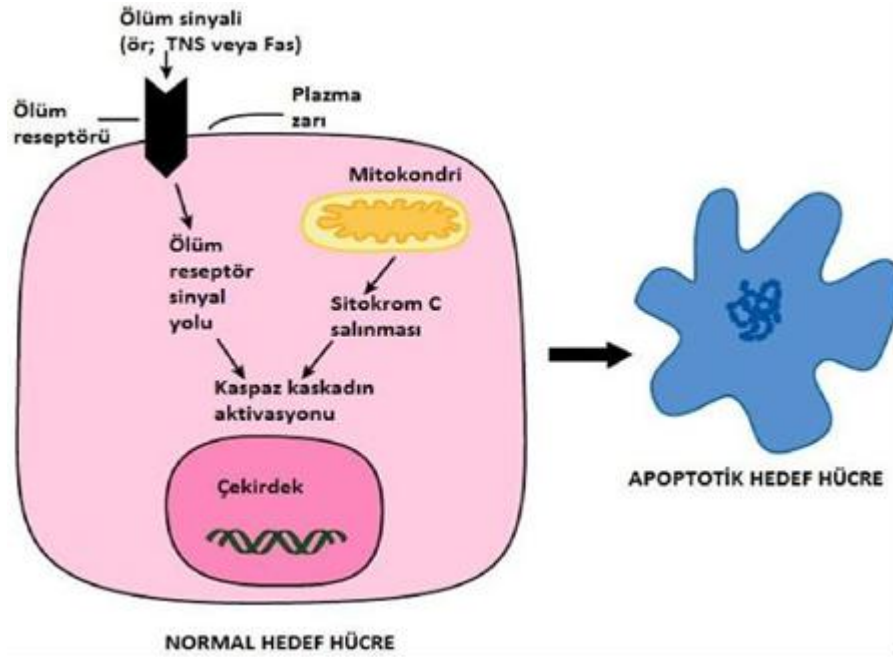
G2; S ile M arasındaki fazdır.

Her fazdaki spesifik olayları, siklin ve sikline bağımlı kinaz (CDK) kompleksleri kontrol eder. Hücre döngüsündeki farklı siklin/CDK kompleksleri gösterilmektedir. A, B, D ve E sırasıyla siklin A, siklin B, siklin D ve siklin E'yi simgeler) (24).

**Apoptozis:** Hücre döngüsü kontrolüne ilave olarak, hücreler genetik olarak programlanan mekanizmaları kullanarak da kendilerini öldürürler. Bu sürece 'Apoptozis' veya 'Kontrollü Hücre Ölümü' adı verilir. Apoptozis, doku dengesinin korunması için şarttır. Normal dokular, istenmeyen hücreleri ortadan kaldırmak için ve görevlerini bitiren, hasara uğrayan, uygunsuz biçimde çoğalan hücreleri uzaklaştırmak için apoptozise uğrarlar (21). Ölüm reseptör sinyalleri (Fas veya sitokin Tümör Nekroz Faktör [TNF] gibi), büyüme faktörü eksikliği, DNA hasarı ve stres sinyalleri (Şekil 6) gibi pek çok fizyolojik uyarın ile apoptozis aktive olabilir. Apoptozis mekanizması karmaşıktır. Bu karmaşık mekanizma sıkı şekilde kontrol edilmelidir. Bu süreçlerde



yaşanan bozukluklar neoplastik transformasyonlara neden olurlar. Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptozisin düzenleyicileridir. Bu ailenin bazı üyeleri apoptozisi indükler, bazı üyeleri ise apoptozisi inhibe eder. Onkogenler içerisinde sadece Bcl-2, doğrudan hücresel proliferasyonu arttırmak yerine apoptozisi inhibe ederek etkisini gösterir.

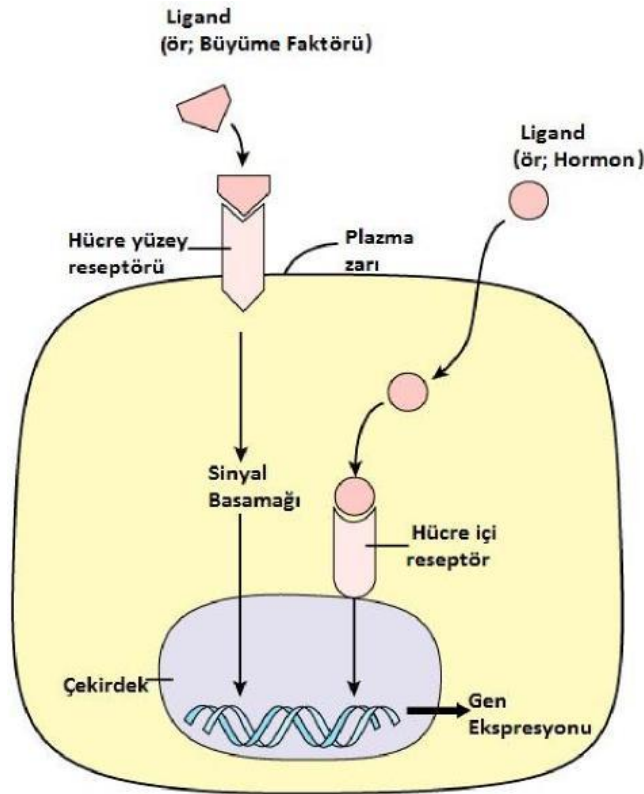


**Şekil 6.** Apoptozis yollarının basitleştirilmiş şeması

(Fas ve TNF reseptörlerinin aktivasyonu ve buna bağlı olarak Kaspaz yolunun aktivasyonu, hücre dışı ölüm reseptörü yollarıdır. Hücre içi ölüm yolunda ise, mitokondriden Sitokrom c açığa çıkar. Kontrollü hücre ölümü sırasında hücrelerde DNA fragmantasyonu olur, çekirdek ve hücre zarı parçalanır, daha sonra da diğer hücreler tarafından yok edilirler) (24).

**Sinyal İleti Yolları:** Bir genomdaki gen ekspresyonu en azından kısmen sinyal yollarıyla kontrol edilir (21). Genellikle sinyal yolu hücre yüzeyinde başlar, hücre çekirdeğinde sonlanır ve DNA ile transkripsiyon aparatına etki eder (Şekil 7). Hücreler kendi dış ortamlarındaki değişiklikleri algırlar. Hücreler, proteinler, kısa peptidler, aminoasitler, yağ asitleri, steroidler, nükleotidler/nükleozidler, retinoidler,

çözünmüş gazlar gibi biyoaktif maddelere yanıt verirler. Bunların içerisinde lipofilik özellikte olanlar, difüzyon yoluyla plazma membranından geçip, sitoplazmada bulunan kendilerine özgü bir hedef proteine (hücre içi reseptör) bağlanırlar. Diğer maddeler ise, doğrudan bir transmembran proteine (hücre yüzey reseptörüne) bağlanırlar. Ligandın reseptöre bağlanması ile bir seri biyokimyasal reaksiyon (sinyal iletimi) başlar. Bu olay proteinler arası etkileşimleri ve yüksek enerjili fosfat gruplarının transferini içerir. Bu olaylar çeşitli nihai sonuçlara yol açar. Hücrelerin sinyal istemindeki anormal değişiklikler kansere neden olabilir. Sinyal ağlarının anlaşılmasında ilerlemeler olmuştur. Bu ilerlemeler ve edinilen bilgi, klasik yaklaşımları aşan yeni araştırma yöntemlerini gerektirmektedir (Tıbbi Matematik ve Fizik, Tıbbi enformatik, Bilgisayarlı Biyoloji v.b. bilimleri içeren multidisipliner araştırma ve işbirliği).



**Şekil 7.** Hücre yüzeyi ve hücre içi reseptör basamakları

**Hücre Dışı Sinyalleşme Yolu:** Büyüme faktörlerinin birçoğu ve diğer hidrofilik sinyal molekülleri plazma membranından geçemezler. O yüzden bunlar hücre yüzeyi reseptörlerini (Örneğin; G proteini ile eşleşmiş reseptörler ve enzime bağlı reseptörler gibi) doğrudan aktive ederler. Alıcı işlevi gören reseptör, hücredeki aşağı doğru (downstream) sinyalleri aktive eder.

**Hücre İçi Sinyalleşme Yolu:** Hormonlar veya diğer yayılabilen moleküller hücreye girer. Bunların reseptörleri hücre içinde sitoplazma veya çekirdekte bulunur. Bu reseptörlere bağlanırlar.

Gen ekspresyonunu kontrol etmek üzere hücre dışı veya hücre içi sinyaller çekirdeğe ulaşır (24).

**Kanser Genomunun Destabilizasyonu:** Kansere yol açan genetik dönüşümler, kendi kendine büyüme, var olan hücre siklusundan kaçma, apoptozise direnç, hücrelölümsüzleşme ve sonunda; angiogenesis, invazyon ve metastaz yapmayı kolaylaştıran özellikler sağlar. Örneğin; Li-Fraumeni Sendromu ve Ailevi Meme Kanseri “Checkpoint defekt”, HNPCC/Lynch Sendromunda “Mismatch repair” birçok kanserin gelişmesine neden olmaktadır. Çok sayıda geniş ve farklı mekanizma genomik instabiliteye neden olur. Genomik destabilizasyon kanser oluşumunu başlatır fakat spesifik tümörün sağlamlığını da tehlikeye atar. Bu konuda yapılan çalışmalar kişiye göre planlanmış daha iyi tedavi olanaklarını sunmayı amaçlamaktadır.

### **2.3. Kanser Genleri, Kanser Gen Mutasyonları ve Kanser Genlerinin Belirlenmesi**

‘**Onkogenler**’ ve ‘**Tümör Supresör Genler**’ olarak kanser genleri iki gruba ayrılır. Onkogenlerdeki mutasyon sıklıkla aynı kodonu etkiler ve tipik olarak spesifik bölgelerde oluşur. Tek bir allelin etkilenmesi genelde etkinin ortaya çıkmasına sebep olur. Tümör supresör genlerde ise etkinin ortaya çıkması için her iki allelin de fonksiyonunu kaybetmesi gerekir. Kötü huylu tümörlerdeki somatik mutasyonlar, nükleotid yer değişimleri (substitutions), küçük insersiyon ve delesyonlar, kromozomal yeniden düzenlenme ve kopya sayısındaki dönüşümlerdir.

Biyomedikal bilimler, insan genom projesinin tamamlanmasıyla yeni bir alana sahip oldu. Genom dizilimi ve organizasyonu ile ilgili bilgilenmeler sayesinde, tümörlerin orjininin ve evriminin altında yatan genetik dönüşümlerin sistematik incelenmesi hız kazandı. İnsan genomu ile ilgili çalışmalar tamamlanmadan önce, KRAS, TP53 ve APC gibi birçok kanser geni, onkovirus analizleri, bağlantı çalışmaları, heterozigot kaybı ve sitogenetik temelli yaklaşımlarla başarılı olarak keşfedildi. ‘İnsan Genomu Projesi’ 2004 yılında tamamlandı. Bu çalışma kanserdeki somatik mutasyonlara ait bilginin sanal ortamda kataloglanmasına imkan verdi (25, 26). İnsan Genomu Projesi insan kanserleriyle ilgili genetik değişikliklerin belirlenmesinde çok önemli bir fırsat sağlamıştır.

## **2.4. Kanser Genom Analiziyle Somatik Dönüşümlerin Belirlenmesi ve Yeni Tumor Taksonomisi**

Günümüzde cerrahlar, güncel cerrahi uygulamaların birçoğunun moleküler araştırmalardan elde edilen bilgilere dayandığını giderek daha çok kavramaktadırlar. Zararlı olabilecek dokuları, hastalara zarar vermeden önce ortadan kaldırmak için profilaktik prosedürlere yönlendirmek amacıyla, BRCA ve RET-protoonkogen gibi genomik bilgiler kullanılmaktadır. Moleküler mühendislik, tümörün cerrahi yolla çıkarılmasına, radyoterapi ve kemoterapiden daha etkili bir destek olarak, yakın gelecekte işlev görebilecek ‘Kansere spesifik gen tedavisini’ ortaya çıkarmıştır. Bu sayede cerrahlar, temel biyokimyasal ve biyolojik ilkelerin, moleküler biyoloji alanıyla olan ilişkilerini daha yakından görebilecek ve bundan yarar sağlayacaklardır (21).

Kanser genomundaki tüm genomik dizinin ortaya konması, kötü huylu tümörlerde somatik mutasyonların majör tiplerini görmeyi sağlar. Nükleotid yer değişimleri, kromozomal yeniden düzenlenme ve kopya sayısındaki dönüşümler, küçük insersiyon ve delesyonlar genomik anormalliklerin geniş repertuarını oluşturur. Malign tümörlerde en sık karşılaşılan somatik mutasyonlar, nükleotid yer değişimleridir. Birçok genetik ve biyoinformatik araç, aynı kişinin normal ve tümörlü dokusundan alınan örneklerde somatik nükleotid yer değişimlerini belirlemek için geliştirilmiştir. Buna paralel olarak, kanser örneklerinde belirlenen mutasyonla ilgili fonksiyonel değişiklikleri hesaplamada kullanılan birçok yöntem geliştirilmiştir (27).

Kanser örneklerinde ortaya konulan genomik dizine keşfedilen somatik mutasyonların ikinci grubunu küçük insersiyon ve delesyonlar temsil eder. Bunlar,

nükleotid yer değişimlerinden on kat daha az görölmesine rağmen, kanser progresyonunda oldukça etkilidir.

Yeni nesil dizin metodolojilerinin en önemli uygulamalarından biri, kanser genomunda kromozomal yeniden düzenlenmelerin sistematik olarak ortaya konulmasıdır. Daha önceki stratejiler, sitogenetik yöntemlerle, hematopoetik tümörlerde bulunan rekürren translokasyonları ortaya çıkarmaya dayanıyordu.

Biyoinformatik ve fonksiyonel yöntemlerin kombine kullanımı son gelişmeler sayesinde sağlanmıştır. Bu da solid epitelyal tümörlerde rekürren translokasyonları saptama imkanı sunmuştur (28). Kanser spesmeninde oluşan kromozom içi ve kromozomlar arası yeniden düzenlenmenin sistematik araştırması, genom ve transkriptomların yeni dizin analizlerinin kullanımı sayesinde olacaktır. Bu sayede de, bazı tümör ve kanser hücrelerinde, yeni gen füzyonlarının tespit edilmesi ve majör yapısal yeniden düzenlemelerin sanal ortamda kataloglanması sağlanacaktır (29). İlerde yapılacak yeni metodolojiler, microarray temelli çalışmalara göre daha fazla avantaj sağlayacaktır.

Kanser genomu çalışmaları, klinik pratiği birçok düzeyde etkiler. Bir yandan tümör taksonomisi yeniden düzenlenirken, diğer yandan da yeni kanser genleri tanımlanmaktadır. Genomik devrimden önce tümörler, tümörün ortaya çıktığı alan (lokalizasyon) ve tümörün görünümü (histolojik yapısı) olmak üzere iki kritere göre sınıflandırılırlardı. En iyi tedavi şeklinin seçilmesinde ve prognozun belirlenmesinde günümüzde halen bu iki kriter kullanılmaktadır. Ancak uzun yıllardır, histolojik olarak benzer yapıda olan tümörlerin klinik olarak farklı sonuçlar doğurduğu, ayrıca histolojik incelemelerle farklılıkları ortaya konulamamış tümörlerin tedavilere farklı cevaplar

verdiği bilinmektedir (30). Yeni tümör taksonomisinde, genetik lezyon varlığı majör kriter olarak kabul edilmektedir. Yeni tümör taksonomisinde, genom bazlı bilgi sayesinde daha iyi teşhis olanağı sağlanacak ve kişiye özgü tedavi planlaması mümkün olacaktır.

## **2.5. Kanser Epigenetiği, Epigenetik Süreç ve Epigenetik Tedavi**

‘**Epigenetik**’; genlerin ekspresyonlarında meydana gelen, DNA dizisinden bağımsız olan, kalıtılabilir değişimlerdir. Tüm insan kanserleri, DNA dizisinde meydana gelen çok sayıda mutasyona ilave olarak, esaslı epigenetik değişiklikler içerir. Epigenetik değişiklikler, erken teşhis için olanak sağlar. Çünkü bu değişiklikler karsinogeneze neden olan gen mutasyonlarının erken dönemlerinde ortaya çıkarlar. İlaç tedavileriyle epimutasyonlar geri döndürülebilir. Bu da epigenetik tedavileri olanaklı kılar.

İnsan genomunda yaklaşık 20.000 - 22.000 gen bulunur. Bu genler belirli hücrelerde ve belirli zamanlarda ifade edilmelidir. Hücreler, yukarıda bahsedilen mekanizmaları kullanmanın yanı sıra nükleozom yapılanmalarını da değiştirerek gen ekspresyonlarını düzenleyebilirler. DNA, histon ve non-histon proteinleri ile nükleus içerisinde kademeli olarak paketlenerek, kromatin şeklinde organize edilir. Kromatindeki değişiklikler gen ekspresyonunu kontrol eder. Kromatin yapı sıkılaşp yoğunlaştığında (Heterokromatin) genelde genler inaktive olur (Sessizleşme, Susturulma). Kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında (Ökromatin) ise genler aktive olur. Temel olarak, reversibl DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile

sağlanan epigenetik mekanizmalar ile kromatin yapısındaki bu dinamik durum gerçekleştirilir. Epigenetik mekanizmalar řu şekilde sınıflandırılabilir;

- DNA metilasyonu
- Histon modifikasyonları
- Kromatin yeniden modellendirilmesi (remodeling)
- Kodlamayan RNA'lar aracılığı ile epigenetik dzenlenme

DNA metiltransferazlar (DNMT), Histon deasetilazlar (HDAC), Histon asetiltransferazlar (HAT), Histon metiltransferazlar (HMT), Histon demetilazlar ve Metil CpG bağlanma proteini 2 (MECP2) bu işlemlerde grev alan enzimler arasında bulunurlar. Epigenetik paternlerde bir sapma olunca, gen ekspresyonunda anormallikler meydana gelir. Bunlar da çeşitli klinik sonuçlara yol aabilirler. Genetik ve epigenetik hataların birikimiyle kanser ortaya çıkar. Kanser normal hücrelerin, metastatik tümör hücrelerine dönüşmesiyle sonuçlanan çok basamaklı bir olaydır. DNA metilasyonunda değişikliler olunca, kanser ile ilişkili genlerin ekspresyonunda da değişiklikler olur. Onkogenler, DNA hipometilasyonu ile aktive olurlar ve kromozom yapısının kararlılığını yitirmesine neden olurlar. DNA'nın hipermetilasyonu ise tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açar.

Kanser hücrelerinde, histonlardaki lizinlerin asetilasyonunda ve metilasyonunda artış ve azalmalar olmaktadır. Kanser hücrelerinde, H4-K16 asetilasyonunun ve H4-K20'deki trimetilasyonun ortadan kaybolduğu ve heterokromatin yapısında bozulmaya yol açtığı saptanmıştır. Histon modifikasyon paternleri, farklı kanser tiplerinde hatta aynı kanser tipinin değişik evrelerinde özdeş değildir. Farklı tümör tiplerini birbirinden ayırmada, tümör tiplerini farklı epigenetik paternlere göre sınıflamak faydalı olabilir.



Histon modifikasyon paternlerini incelemek gelecekte kanserin erken tanısına da katkı sunabilir.

Genomun epigenetik değişiklikleri reversibldir. Bu kanser tedavisinde yeni bir umut doğurmaktadır. Günümüzde, Histon deasetilazlar ve DNA metilazlar gibi enzimleri inhibe ederek, tümör supresor genlerin epigenetik olarak susturulmasını engelleyecek ya da bu genlerin yeniden aktivasyonunu sağlayabilecek yeni kanser ilaçları için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. DNA metil transferazlar ve Histon deasetilazlar, epigenetik inhibisyon için geliştirilen ilaçların ana hedefidir. Epigenetik gen susturulmasında karmaşık bir etkileşim ağı mevcuttur. Bu nedenle etkin bir tedavi için çeşitli ilaçların beraber kullanımı daha doğru olacaktır. Burdan yola çıkılarak yapılan çalışmalarda, DNA metil transferazlar ile Histon deasetilaz inhibitörlerinin birlikte kullanımının epigenetik olarak susturulmuş genlerin yeniden aktivasyonunda başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu yaklaşım klinik olarak test edilmeye başlamak üzeredir.

## **2.6. Onkoloji Tanı Uygulamalarında Tıbbi Genetik**

Kanser klonal bir hastalıktır. Kanser gelişim süreci de çok basamaklıdır. Mikro ve makro çevredeki çeşitli faktörlerin, genetik materyal üzerine yaptığı değişiklikler sonucu kanser gelişir. Bazı kanser türlerinde genetik faktörler bu çok basamaklı sürecin kolayca başlamasına neden olur. Böyle durumlarda, söz konusu kanser için bir ‘Genetik yatkınlık’ söz konusudur. Kansere yatkınlığın kalıtılmasına yol açan farklı genler, moleküler genetik alanındaki ilerlemeler sayesinde tanımlanmıştır. Bu genlere ait

mutasyonları taşıyan ailelerin/bireylerin yüksek kanser riskine sahip olduğu bilinmektedir. Farklı kanserlerde yapılan aile çalışmaları, hasta olan kişinin birinci ve ikinci derece yakınlarında, normal popülasyona göre artmış kanser riski olduğunu göstermiştir (31). Kanserin kalıtsal formu; yüksek penetranslı olması, tanı yaşının erken olması, çift olan organlarda bilateral görülmesi, her iki ebeveynden kalıtılabilmesi ve diğer tip tümörlerle birlikte görülebilmesi ile karakterizedir (31). Ailede farklı tip kanserlerin görülmesi durumunda 'Kanser ailesi', aynı tip kanserin görülmesi durumunda ise 'Kalıtsal kanser' olarak tanımlanmaktadır. Kansere yatkınlığa neden olan genetik değişikliklerin onkolojik tanı uygulamalarında gözönünde bulundurulması gerekir. Kanser genetiğindeki gelişmeler, normal doku ile kanserli doku arasındaki moleküler farklılıkların keşfedilmesini sağlamıştır. Bunun sonucu olarak da, tümörlerde yapılan moleküler genetik incelemeler hastalıkların tanı ve tedavi kararında günümüzde önemli araçlardan birisi haline gelmiştir (31).

## **2.7. Meme Kanseri**

Meme kanserinin klinik seyri kişisel farklılıklar gösterir ve değişkendir. Çünkü görünüm olarak benzer olan tümörler arasında, moleküler düzeyde farklılıklar bulunmaktadır. Hastaya en uygun tedavinin seçiminde çeşitli prognostik faktörler kullanılır. Özellikle erken evre meme kanserinin adjuvan tedavisinin belirlenmesinde prognostik faktörler büyük önem taşır. Erken evre meme kanserinin prognozunu belirlemede kullanılan standart prognostik faktörler; tümörün çapı, tutulan lenf nodu sayısı, hormon reseptörlerinin durumu ve human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2)' dir. Fakat bu prognostik faktörlerin yetersiz kaldığı genel olarak kabul

edilmektedir. Bu nedenle de birçok hasta gereğinden fazla veya gereğinden daha az tedavi almaktadır (32). Hastaların bireysel tedavilerinin daha iyi yapılabilmesi için, Ravdin ve arkadaşları, Surveillance Epidemiology End Results (SEER) veri bankasından, klinik çalışmaların sonuçlarını alıp bir bilgisayar programı ile değerlendirilmişlerdir. Daha sonra da online kullanıma açık olan ‘Adjuvant! Online ([www.adjuvantonline.com](http://www.adjuvantonline.com))’ı geliştirmişlerdir. Bu geliştirilen sistem sayesinde, hastaların özel parametreleri girilerek, klinisyenlerin karar vermesinin kolaylaştırılması amaçlanmıştır. Fakat girilecek veriler arasında, HER-2 durumu ve lenfovasküler invazyon gibi prognoz hakkında yararlı olacak bilgiler bulunmamaktadır. Ayrıca bu sistem birçok hastada da yetersiz kalmaktadır. Bu eksikliklerinden dolayı da ihtiyacı tam olarak karşılayamamaktadır (32).

2005 verilerine göre, ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser tipi, yüzde 35,47 insidans ile meme kanseridir. Genetik, hormonal ve çevresel etkileşim sonucu gelişen meme kanseri klinik ve biyolojik olarak değişkenlikler gösterir. En invaziv meme karsinomları sporadiktir. En sık görüleni ise Duktal Adenokarsinom’dur (31). Çeşitli sinyal yollarındaki büyüme faktörleri, membran reseptörlerinin de içlerinde yer aldığı birçok onkogen ve tümör baskılayıcı gendeki mutasyonlar bu karsinomların oluşumuna neden olur.

Tüm meme kanserlerinin % 18-20’sinde Cerb B2 (HER2/neu), yaklaşık % 20-50’sinde ise somatik P53 geni mutasyonları bulunmaktadır (31). HER2/neu dışındaki gen mutasyonları sporadik meme kanseri için rutin olarak incelenmemektedir. Sadece prognostik değerlendirme amacıyla P53 gen analizi ve sekreter karsinomlarda ETV6-NTRK3 translokasyonunun incelenmesi önerilmektedir (31).

Cerb B2 (HER2/neu), 17q21.1'de yer alır. Cerb B2 (HER2/neu), bir reseptör tirozin kinazı kodlar. Bu reseptör tirozin kinaz, Epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) ailesinin bir üyesidir (31).

İfade artışı (overexpression) genellikle genin kopya sayısındaki artışa (amplifikasyona) yol açmaktadır. Özellikle Östrojen reseptörü negatif olan İnvaziv meme kanserli hastalarda, ilk tanı sırasında bu genin ekspresyonundaki artışın saptanması, kötü prognostik belirteçtir. Öte yandan tedavi açısından bakılacak olursa, Cerb B2 aşırı ekspresyonu saptanan hastaların, özellikle selektif östrojen reseptör modülatörü (Örneğin Tamoksifen) gibi endokrin tedavilere dirençli oldukları fakat bir monoklonal antikor olan Transtuzumab ve Paclitaxelle tedaviye yanıtlarının ise iyi olduğu bilinmektedir (31).

P53 geni bir tümör baskılayıcı gendir ve 17p13.1'de yer alır. Bu genin ürünü olan p53 proteini, apoptozis, hücre döngüsü, yaşlılık, DNA metabolizması ve DNA onarımında rol oynar. P53 gen mutasyonu sıklığı, çeşitli sporadik meme kanseri serilerinde, % 19-59 arasında bildirilmektedir (31). P53 gen mutasyonları kötü klinik prognoz belirteçidir. Radyoterapi ve özel kemoterapi rejimlerine kötü yanıt ile ilişkilidir (31).

### **2.7.1. Moleküler genetik ve meme kanserinin tarihsel ilişkisi**

Meme, muayene sırasında göz ve elle ulaşılması en kolay organlardan biridir. Bundan dolayı memede ortaya çıkan patolojik değişiklikler ilk çağlardan beri hekimlerin dikkatini çekmiştir. 20. yüzyıl bittiğinde hala meme kanserinin gerçek

nedeni tam olarak saptanamamıştır. Ancak tümörün oluşumuna yol açabilecek hücrenel büyüme faktörleri, hücre içi haberleşme yolları ve genlerin ekspresse ettikleri proteinler açığa çıkarılmıştır.

21. yüzyılın başında, ‘İnsan Genomunun Çözümlemesi’ amacıyla uygulanan ileri teknoloji, genetik laboratuvarları tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Gen Ekspresyon Taramalarını, Komperatif Genom hibridizasyonu(CGH) ve Tek nükleotid Polimorfizm (SNP) taramaları izledi. Bu sayede, onbinlerce genetik lokasyon, aynı anda tarandı. ‘Tek Nükleotid Polimorfizm Taramaları’, DNA’nın polimorfik dizilerinin incelenemediği önemli bir tekniktir (33,34).

Genetik ve moleküler araştırmalar sayesinde, meme kanserinin tek tip bir hastalık olmadığını anlaşılmıştır. Bu çalışmalar, Östrojen ve Progesteron reseptörleri ile Cerb B2 nin (+) veya (-) olmasına göre ‘Lüminal Hücreli’ ve ‘Bazal Hücreli’ olmak üzere iki alt grubun bulunduğunu bize göstermiştir (33). Bu yeni moleküler sınıflama ile meme tümörünün biyolojik davranışı, kemoterapilere ve hormonoterapilere nasıl cevap vereceği önceden saptlanabilir hale gelmiştir (33,34). Ancak hala birçok çalışma yapılması gerekmektedir. Genomik çalışmalar ilerledikçe, meme kanseri daha iyi anlaşılacaktır. Bu sayede de spesifik hedefe yönelik daha etkili tedaviler geliştirilecektir.

### **2.7.2. Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisi**

Meme kanseri, Akciğer kanserinden sonra en sık görülen 2. kanserdir. Kadınlar arasında ise, dünyada en sık görülen malign tümör, meme kanseridir. Meme kanseri, tüm kadın kanserlerinin %23’ünü oluşturmaktadır (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Ülkemizde ise, kadınlar

arasında en sık görülen on kanser tipi içerisinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır (8). Sağlık Bakanlığı 1997 yılı sağlık istatistiklerine göre, ülkemizdeki kadınlarda meme kanseri; 1995 yılında % 23,5, 1998 yılında % 23,1, 1999 yılında ise % 24,1 oranında görülmekte ve sıklık açısından ilk sırada yer almaktadır.

Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) yılda 184 bin, Avrupa'da ise yılda 180 bin yeni olgu saptanmaktadır (2).

Kadınlarda kanser nedeniyle oluşan ölümlerin, 1948-1985 yılları arasında % 80'i meme kanserine bağlı iken, 1985'ten itibaren akciğer kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri sıralamasında meme kanserini geçmiştir (35). Erkeklerde meme kanseri nadirdir. Tüm meme kanserleri içinde, erkek meme kanseri oranı % 1 civarındadır (36). Amerika Birleşik Devletlerinde, 1998 yılında, 1600 erkek meme kanserli hasta saptanmış olup, 400 kişi de meme kanseri nedeniyle ölmüştür (1).

Meme kanserinin görülme sıklığı yaşla orantılı olarak artar. Meme kanseri, 25 yaşın altında nadir görülür. En sık 45-74 yaşları arasında görülür (37).

Meme kanseri sıklığı coğrafi farklılık da gösterir. En sık gelişmiş olan ülkelerde görülür. En az ise Doğu Asya'daki az gelişmiş ülkelerde görülür. Orta ve alt gelir düzeyindeki ülkelerde de meme kanseri sıklığında artışlar görülmektedir.

Gelişmiş olan ülkelerde, meme kanserli hastalarda, tüm evrelere göre, 5 yıllık sağkalım oranı %83 iken, gelişmekte olan ülkelerde bu oran %53' dür. Aradaki bu fark;

- 1) Gelişmiş ülkelerde uygulanan tarama mamografisi sayesinde erken tanıya
- 2) Gelişmiş olan ülkelerdeki daha iyi tedavi olanaklarına bağlanmaktadır.

Ülkemizdeki verilere göre, doğu bölgelerimizde meme kanseri sıklığının 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 olduğu tahmin edilmektedir (4, 5, 6, 7, 38). Bu rakamlardan yola çıkılarak, Türkiye’de her yıl meme kanserine yakalanan kadın sayısının, on bin kadar olduğu hesaplanabilir (39).

İnsanlarda meme kanserinin nedeni bilinmemektedir. Meme kanseri oluşumunda, genetik, hormonal, çevresel, psikolojik ve sosyobiyojik etkenler rol alır. Ancak meme kanserli kadınların % 70-80’inde bu risk faktörleri mevcut değildir. Hayvanlarda ise bazı kimyasal maddeler, virüsler ve iyonizan radyasyon kanser oluşumunda rol oynar. Bu ajanların mutasyonlara neden olduğu ayrıca kanserin ortaya çıkış ve gelişiminin insanlarda kromozomal mutasyonlar ile yakın ilişkili olduğu da gösterilmiştir (40).

1990 ile 2002 yılları arasındaki 12 yıllık sürede, dünyada meme kanserlerinin sıklık ve mortalite oranlarında %25’lik bir artış görülmüştür. Ancak, ABD’de, son 25 yıl içerisinde bunun aksi şekilde mortalitede oranlarında %50’lik bir azalma görülmüştür. Gelişmiş bir ülke olan Amerika’daki bu azalma, tarama sayesinde olan erken tanıya ve hastalığın bu erken tanılar sayesinde etkin tedavisine bağlanmıştır (41).

Kadınlarda erken menarş (<12 yaş), geç menopoz (>55 yaş), geç doğum yaşı (>30 yaş), daha fazla hormon replasman tedavisi almak, daha kısa laktasyon süresi, beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler ve batı tipi yaşam biçiminin benimsenmesi, meme kanseri insidans hızının artmasının nedenleri arasında sayılabilir.

Meme kanseri sıklığı, 1990 yılından itibaren, dünyada, her yıl % 0,5’lik bir artış göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) GLOBOCAN ( Dünya Sağlık Örgütü’ne

bağlı bir birim olan; Uluslar arası Kanser Araştırma Organı'nın Yayınladığı Küresel Kanser İstatistikleri) 2008 veritabanı tahminine göre, 2015 yılında meme kanserli yeni hasta sayısı 1.620.000, meme kanserinden kaybedilecek kadın sayısı 540.000 olacaktır (42). Türkiye'de ise beklenen yeni hasta sayısı 12.000, meme kanserinden kaybedilecek kadın sayısı ise 5.300 olarak öngörülmüştür (Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri) (42).

## **2.8. Apoptozis**

### **2.8.1. Apoptozis tanımı**

Apoptozis, 'Programlanmış hücre ölümü' olarak da bilinir. Yaşam ve ölüm içiçe olan süreçlerdir. Apoptozis, Eski Yunanca'da "yaprak dökümü" anlamına gelir. İlk olarak İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından, 1972 yılında 'canlılarda hücre azalmasının özgün bir tipi' olarak tanımlanmıştır (43). Genetik ve biyokimyasal açıdan sıkı bir şekilde kontrol edilen, biyolojik ömrünü tamamlamış ya da genetik yapısı bozulmuş hücrelerin komşu hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasında kullanılan, programlı hücre ölümü şekline 'Apoptozis' denilir (44). Apoptozis embriyonik dönemde, bazı dokuların diferansiyasyonunda, bazı dokuların ise involüsyona gitmesinde önemli rol oynar. Hücre apoptotik sinyali alınca, genetik olarak kodlanmış apoptotik program çalışmaya başlar. Daha sonra, bir seri kontrollü biyokimyasal reaksiyonla hücre ölümü gerçekleşir.

Hücrelerin yaşam süreleri tiplerine göre değişiklik gösterir. Kardiyak miyositler ve nöronlar genelde ömür boyu yaşarken, barsak hücrelerinin yaşam süresi ise 3-5 gün gibi kısa bir süreyi kapsar. Apoptozis, dokulardaki hücre sayısını belirli bir düzeyde



tutmayı sağlar. Hücre ölümü 'Nekroz' ve 'Apoptozis' gibi iki farklı yolla meydana gelir. Her ikisi de tamamen farklı mekanizmalarla meydana gelir ancak her ikisinde de son nokta ölümdür.

### **2.8.2. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar**

1- Apoptozis ve nekroz etyolojik olarak farklı kavramlardır. Hücre yaşlanması, büyüme faktörü eksikliği, glukokortikoidler, anti-neoplastik ajanlar, HIV ve Hepatit gibi bazı viral enfeksiyonlar, TNF grubu reseptörlerin çeşitli sebeplerle aktivasyonu ve Sitotoksik T lenfositler hücrede apoptozisi indükler. Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları, şiddetli oksidatif stres, iskemi, hipoksi, hipertermi, litik viral enfeksiyonlar ise hücreyi nekroza götürür.

2- Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda ortaya çıkar. Nekroz ise hemen daima patolojik şartlarda gözlenir (45).

3- Apoptozis ve nekrozda morfolojik görünümler de farklıdır. Apoptoziste, hücre sıvı kaybederek büzülür. Nekrozda ise, hücre içine su girişi olur ve hücre şişer. Nekrozda hücre membran bütünlüğü kaybolur. Bunun sonucu olarak da hücre içi içerik dışarıya sızar ve inflamatuvar reaksiyona neden olur. Hücrenin kromatin yapısı morfolojik olarak normal hücreye benzer ancak DNA rastgele parçalanır. Sonuç olarak hücre lizisi oluşur. Oysa apoptoziste hücre membran bütünlüğü korunmuştur ancak küçük sitoplazmik kesecikler oluşur (46,47). Hücre apoptotik cisimcikler şeklinde parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla çevrilidirler. Bu nedenle hücre içeriği hücre dışına sızmaz ve inflamatuvar reaksiyon oluşmaz. Apoptotik hücrede ayrıca, Fosfotidil Serin (normalde plazma membranının iç yüzünde bulunur), erken evrede,

membranın dış yüzüne doğru yer değiştirir. Apoptotik hücre artıkları bu değişim sayesinde, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagositoza uğrar (48,49). Nükleer kromatin çekirdek membranının hemen altında yoğunlaşır ve DNA rastgele değil de internükleozomal bölgelerinden 180-200 baz çifti veya katları olacak şekilde kırılır. Bu durum Agoroz Jel Elektroforezde klasik merdiven görünümüne (ladder patern) neden olur (50,51).

4- Apoptozis aktif bir olaydır ve ATP bağımlıdır. Nekroz ise pasif bir olaydır ve ATP gerektirmez.

5- Apoptoziste hücreler tek tek ölür. Nekrozda ise ölüm, hücre grupları şeklinde olur.

### **2.8.3. Fizyolojik koşullarda apoptozis**

Apoptozisin embriyonik dönemde organogenez ve morfogenezde önemli rolü vardır. Apoptozisin embriyogenezdeki önemi, bir nematod olan *C. elegans* üzerinde çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. *C. elegans*, hermafrodit haldeyken 1090 hücreye sahiptir. Bu nematodun 131 hücresi erişkin döneme geçerken programlı hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılır. *C. elegans* model alınarak, organogenez ve hücre ölüm mekanizmaları ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (52). Bu çalışmaların sonucunda Sdney Brenner, Robert Horwitz ve John Sulston 2002 yılında Nobel Tıp ödülü kazanmıştır.

İnsanda, embriyonik dönemde, santral sinir sisteminin olgunlaşması sırasında, uygun sinaptik ağı oluşturamayan nöronlar, programlı hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılırlar (53). Embriyonik dönemde, el tomurcuğundaki bir dizi hücre de yine

apoptozis yoluyla ortadan kaldırılarak nihai parmak formu oluşturulur (54). Yetişkin dönemde de bazı dokularda apoptozis, yaşam boyu yoğun bir şekilde devam eder. Örneğin menstrüasyon sırasında uterus, endometriyum hücrelerindeki apoptozis sonucu, bu hücreler menstrüel kanama yoluyla vücuttan uzaklaştırılırlar. Yine ince barsaklarda kripta tabanlarında bulunan hücreler önce apikal kısımlara doğru göç ederler. Daha sonra bu hücreler apoptozisle öler ve barsak lümenine dökülürler. Derinin stratum korneum tabakası da, yine apoptozisle ölen hücrelerin oluşturduğu bir tabakadır.

Bağışıklık sistemi için de apoptozis çok önem taşır. Lenfositler olgunlaşırken, defektif veya oto-reaktif lenfositler apoptozis yoluyla ölürler. Ayrıca Timik involusyonda da apoptozis görev alır. Programlı hücre ölümü; ‘immün ayrıcalıklı bölgelerde (beyin, kornea ve testis)’ bu durumu sağlayan kritik mekanizmadır. Bu dokularda bulunan hücreler, FAS ligandı salgılayarak veya eksprese ederek, bağışıklık sisteminin, kilit hücreleri olan lenfositlerde apoptozisi indüklerler (55).

#### **2.8.4. Patolojik koşullarda apoptozis**

Apoptozis ile mitoz arasındaki denge bozulursa doku homeostazisi de bozulur. Bu durum da birçok patolojiye zemin hazırlar. Apoptozisin artması birçok dejeneratif hastalığa eşlik ederken, bazı otoimmün hastalıklarda, enfeksiyonlarda ve malignitelerde apoptozis defekti vardır.

1- Bir hücre virüs ile enfekte olunca, kendisi için gerekli olan proteinleri sentezleyemez ve hücrenin biyolojik olarak işlevi bozulur. Buna bağlı olarak, apoptotik

yolaklar indüklenir, hem işe yaramayan hücre ortadan kaldırılır hem de virüs yok edilir. Fakat papilloma virüste durum biraz daha farklıdır. Bu virüs, p-53'ü (p53; güçlü bir apoptozis uyarıcısıdır) inaktive eder. Bu sayede enfekte hücreler apoptozisten korunur. Ebstein-Barr Virüsü (EBV) gibi bazı virüsler ise hücrede, bcl-2 benzeri bir molekül üretirler (bcl-2; apoptozisi bloke eden bir moleküldür) ya da hücrenin endojen bcl-2 ekspresyonunu artırır. Dolayısıyla bu hücreler malign transformasyona aday hücreler haline gelirler.

2- HIV enfeksiyonlarında ise virüs, 'env geni'nin kodladığı, gp120 glikoproteini aracılığı ile CD4 moleküllerine bağlanır ve CD4 T lenfositlerinde apoptozisi indükler (56).

3- Embriyonik dönemde nöronlar, sinaptik ağ kurulduktan sonra, bölünme yeteneklerini kaybederler ve ömür boyu yaşarlar. Fakat, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda ise, apoptozisin indüklendiği ve nöron kaybı geliştiği kabul edilmektedir. Alzheimer'lı hastalarda AIF'nin (Apoptosis inducing factor) arttığı, bcl-2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (136).

4- Tip1 Diabette, pankreas adacık hücrelerinin de apoptozis yoluyla öldüğü düşünülmektedir. Bundan, Fas-FasL aracılı apoptozis mekanizması sorumlu tutulmaktadır (57). Yine diabetik nefropatili hastalarda da Fas-FasL düzeyleri yüksek bulunmuştur (58).

5- Apoptozisin, Miyokard infarktüsünden sonra arttığı da gösterilmiştir. Miyokard infarktüsü sonrası bax ve sit-c gibi pro-apoptotik moleküllerin arttığı, bcl-2 gibi anti-apoptotik moleküllerin ise azaldığı gösterilmiştir (59).

6- Yaşam süreleri bitip, ölme zamanları gelen hücreler, apoptotik kontrol mekanizmalarındaki bozukluklar nedeniyle ortadan kaldırılamayıp, yaşamaya devam

ederlerse, genomlarında bu mutasyonları biriktirirler. Sonuç olarak da malign transformasyona aday hücreler haline gelirler. Apoptozisin azalması, malign hastalıkların gelişiminde olduğu kadar, tedavi direncinin gelişiminde de önem taşır (60,61).

### **2.8.5. Apoptoziste morfolojik özellikler**

**Hücre büzülmesi:** Hücre daha küçük boyutta ve sitoplazması daha yoğundur. Hücre organelleri ise göreceli olarak normal olmalarına karşın daha sıkı paketlenmişlerdir.

**Kromatin kondansasyonu:** Apoptozisin en karakteristik özelliği kromatin kondansasyonudur. Kromatin, periferde, çeşitli şekil ve büyüklüklerde, nükleer membranın altında, iyi sınırlı, yoğun kitleler olarak kümelenir. Nükleus ise iki veya daha fazla parçaya ayrılabilir.

**Sitoplazmik baloncuklar veya apoptotik cisimlerin oluşumu:** Apoptotik hücre önce sitoplazmik baloncuklar oluşturur. Daha sonra ise, çok sayıda nükleer parça içerebilen, membranla çevrili sitoplazma ve organel parçacıklarına dönüşür.

**Apoptotik cisimler ve hücrelerin fagositozu:** Yakındaki komşu hücreler, parankimal hücreler ve makrofajlar, apoptotik cisimleri fagosite ederler. Apoptotik cisimler hızla lizozomlar içinde parçalanır. Komşu hücreler migrasyonla veya proliferasyonla apoptotik hücrenin boşluğunu doldururlar (62).

Apoptoz tek bir hücreyi veya hücre kümelerini tutabilir. Hematoksilin-eozin ile boyanmış dokularda, apoptotik hücreler oval veya yuvarlak, yoğun eozinofilik

sitoplazmalı, dens nükleer kromatin parçaları ile birlikte görülür. Hücre küçülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşması hızlıdır. Parçalar hızla fagosite edilir, parçalanır veya lümene dökülür. Histolojik kesitlerde görünür olmadan önce dokuda anlamlı apoptoz meydana gelebilir. Apoptoz, nekrozdan farklı olarak inflamasyon oluşturmaz, bu da histolojik olarak saptanmasını güçleştirir (62,63).

### **2.8.6. Apoptoziste biyokimyasal özellikler**

Apoptotik hücreler genellikle daha önce tanımlanmış patolojik değişikliklerin altında yatan farklı biyokimyasal modifikasyonlar gösterirler. Bu özelliklerin bazıları nekrotik hücrelerde de görülebilir.

Apoptozun spesifik bir özelliği '**Kaspaz**' adlı bir enzim grubu ile protein hidrolizidir. Transglutaminaz aktivitesi ile aşırı protein çapraz bağlanması, sitoplazmik proteinleri kovalent bağlı olan büzölmüş tabakalara çevirir. Bu tabakalar apoptotik cisimler haline parçalanabilir. Apoptotik hücreler 50-300 kilobazlık büyük parçalar halinde, karakteristik DNA yıkımı gösterirler. Daha sonra ise, DNA'nın,  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  bağımlı endonükleazlar ile internükleozomal parçalanması sonucunda, 180-200 bazlı oligonükleozom parçalarına dönüşürler. Apoptotik hücrelerde, plazma membranlarının dışında, Fosfatidil serin ve Trombospondin bağları bulunur (62,64). Bu özellikler sayesinde, proinflamatuvar hücresel içerik salınmaksızın, ölü hücreler makrofajlar ve diğer komşu hücreler tarafından kolayca tanınır ve fagositoza uğrar (63).

### **2.8.7. Apoptozis mekanizmaları**

Apoptoz enerji bağımlı bir süreçtir. Belli olaylar ile başlar, birbiriyle çakışan ancak ayrılabilen dört komponentten oluşur.

Sinyal yolu; Apoptotik uyarın ilk olarak bir sinyal yaratır. Transmembran sinyaller apoptozun pozitif veya negatif belirleyicileri olabilirler.

Kontrol ve İntegrasyon fazı; Hücre içindeki, pozitif veya negatif düzenleyici moleküller apoptozu uyarabilir, başlatabilir veya inhibe edebilirler.

Bunlar spesifik proteinlerle gerçekleştirilir. Bu proteinlerin önemi, aksiyonlarının potansiyel olarak hücre ölümü ile sonuçlanabilmesinden gelmektedir. Büyük ölçüde, mitokondrial fonksiyonu düzenleyerek, apoptotik süreçte yer alırlar.

Apoptoz mitokondriyi iki yolla etkiler;

1- Mitokondrial şişme: Apoptotik sinyal mitokondrial permeabilite değişimine neden olur.

2- Sitokrom C (Sit-c), sitozol içine salınır. Bunun sonucu olarak da proteolitik olayların gelişimi hazırlanır (62,64).

Uygulama (İnfaz) fazı: Büyük ölçüde, Proteazların Kaspaz ailesi sorumludur. Kalsiyum Bağımsız Hücre İçi Sistein Proteaz Sınıfı'nın en önemli bölümünü Kaspazlar (Sistein Bağımlı Aspartat Spesifik Proteaz) oluştururlar. Bunlar hücre sitoplazmasında, inaktif prekürsörler olarak bulunurlar ve bunların çoğu proapoptotiktir. Biyolojik fonksiyonlarına göre 3 gruba ayrılırlar:

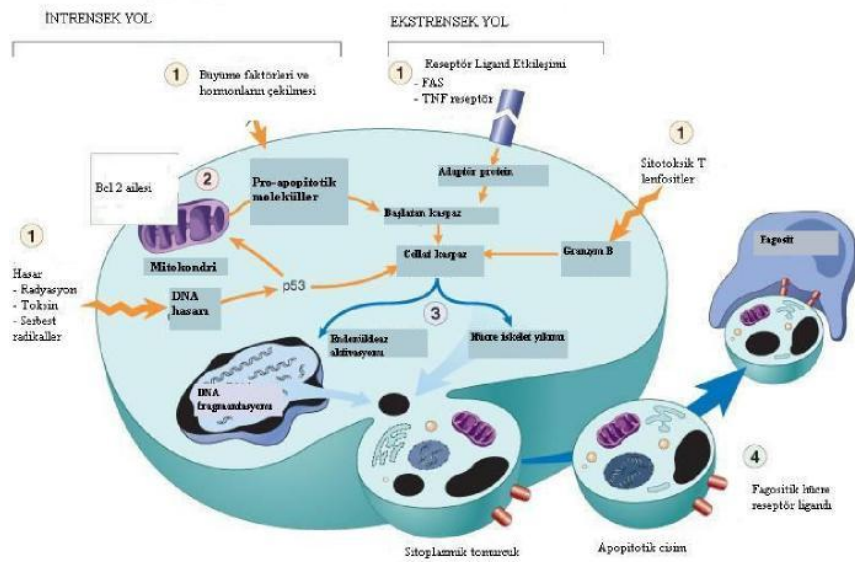
1- Sitokin aktivasyonu yapanlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 14

2- Apoptozu başlatanlar: Kaspaz 2, 8, 9, 10

3- Apoptozu yürütenler (Efektör grup): Kaspaz 3, 6, 7

Apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyalleri, Başlatıcı Kaspazlar tarafından Efektör Kaspazlar'a iletilirler. Efektör kaspazlar ise proteolitik etki oluşmasına neden olurlar ve bunun sonucunda da apoptotik hücre morfolojisi meydana gelir (65,66). Apoptozisin Uygulama Fazı ise son yoldur ve proteolitik bir kaskattır. Kaspazlar hücre iskeletini ve nükleer matriks proteinlerini parçalarlar ve hücre iskeletini yıkarlar (Şekil 8).

Ölü hücrelerin fagositozla eliminasyonu: Apoptotik hücre ve parçalarının yüzeylerinde bulunan işaretleyici moleküller, komşu hücreleri ve fagositleri uyarırlar (62,64).



Şekil 8. Apoptozun mekanizması\*

\* Kumar V. Abbas A, Fausto N. Cellular Adaptations, Cell Injury and Cell Death. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N., eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Philadelphia, 2005;7th ed:26-32.



## **2.9. IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) Ailesi**

Hücre ölümünü düzenleyen diğer bir aile de inhibitör apoptotik protein (IAP) ailesidir (16). IAP'ların baculoviral genomdaki keşiflerini, mayadan nematodlara, sineklerden insanlara kadar pek çok türde bulunmaları izlemiştir. IAP gen ailesinin üyeleri, endojen kaspaz inhibitörleri olarak görev görürler. İnsanlarda IAP gen ailesinin 8 üyesi belirlenmiş olup, Survivin de bunlardan birisidir. Bu 8 IAP üyesi; c-IAP1, c-IAP2, X-IAP, NAIP, Survivin, Apollon/Bruce, ML-IAP (Livin;K-IAP), ve ILP-2 (TS-IAP)'dir (9, 14, 67). IAP ailesi üyeleri, amino-terminalde yerleşen, bir veya daha fazla sayıda tekrarlayan, 70 amino asitlik, yüksek oranda korunmuş, domainden oluşurlar. Bunlara 'Baculovirüs IAP Repeat' (BIR) adı verilir. NAIP ve Survivin dışındaki insan IAP'ları, karboksi terminalde, 'RING finger' adı verilen ve yine korunmuş olan bir sekans içerirler. IAP'lar, pek çok uyaran neticesinde apoptozu inhibe edebilirler. Esas olarak bu etkilerini, bazı kaspazlara doğrudan bağlanıp, onları inhibe ederek gösterirler (68). IAP'lar, kaspaz bağımlı veya bağımsız şekilde apoptotik saldırının regülasyonunu sağlamalarının yanı sıra protein degradasyonunda da görev alırlar.

### **2.9.1. IAP –aracılı inhibisyonun mekanizmaları**

IAP'lar;

- ✓ spesifik kaspazları bloke ederek (XIAP, c-IAP1, c-IAP2 ve Survivin, kaspaz 3, 7 ve 9'a direkt olarak bağlanırlar),
- ✓ bazı sinyal ileti yolları üzerinden (mitojen-aktive protein [MAP] Jun kinaz

1 [JNK1] gibi kaspaz bağımsız yollardan) veya

- ✓ sahip oldukları E-3 ligaz aktivitesiyle (Kaspazların ubiquitinasyonunu sağlar) apoptozu engellerler (69).

### **2.9.2. IAP'ların regülasyonu**

IAP'lar birçok mekanizmayla pozitif veya negatif olarak regüle edilirler. IAP'ların ekspresyonları, gen transkripsiyonu seviyesinde sıkı olarak kontrol edilir. Yapısal ve fonksiyonel olarak birbirlerine benzeseler de, farklı gen ekspresyon paternleri mevcuttur. Bu da, bu multigen ailenin bireylerinin kendilerine has özelliklerinin olduğu ve gereksiz olmadıklarını gösterir (69).

### **2.10. Survivin**

Survivin, apoptoz ve hücre bölünmesinde anahtar rol oynar. IAP ailesinin en küçük üyesidir (70, 12). Tek BIR domaini vardır ve protein yapısındadır. Karboksi ucunda RING finger domaini bulunmaz (10, 71). Embriyonik dokularda ve pek çok tümörde yaygın olarak bulunur (10). Survivin, hızlı bölünmeyi desteklemek amacıyla hücre siklusunun G2/M fazında eksprese edilmektedir (10, 12). Hücre bölünmesi sırasında kromozomların düzgün ayrılmasına yardım eder (72,73). Kanserde Survivin'in aşırı ekspresyonu, hücre siklusu kontrol noktalarını hızla geçip hücrelerin mitozaya gitmesine neden olmaktadır.

Apoptotik hücre ölümü yolakları üzerinde yapılan araştırmalar, kanser tedavisi için yeni ilaçların keşfini ve geliştirilmesini sağlayacaktır. Birçok ilaç apoptozu indükleyerek tümör hücrelerini öldürür. Fakat bazı tümörler bu ajanlara karşı direnç gösterirler. Kemoterapötik ilaçlara karşı olan dirençlerin önemli bir nedeni de Survivin'dir (74). Birçok çalışmada, Survivin eksprese eden tümörlerin, anti-kanser ilaçların indüklemesiyle oluşan apoptozise karşı da dirençli oldukları gösterilmiştir (75, 76). Survivin antisense tedavisi ile, tümör hücreleri kemoterapi ve radyoterapiye oldukça hassas hale gelebilmektedirler (77). Survivin sinyal yolağının açıklığa kavuşturulması kanser tanısında yeni prediktif ve prognostik bilgiler sağlayacak ve kanser tedavisinde yeni terapötik alternatifler sunacaktır (17,78).

### **2.10.1. Survivin'in yapısı**

Survivin 142 amino asidden oluşan, 16,5 kD (Kilodalton) ağırlığında olan bir hücre içi bir proteindir. Memelilerdeki IAP ailesinin en küçük üyesidir. AP14 veya BIRC5 olarak da bilinir. Apoptozis inhibisyonu tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır. Son zamanlarda apoptozisi inhibe eden aileye mensup yeni proteinler tanımlanmıştır. Survivin de bunlardan biridir. Tek bir BIR ( Baculovirus tekrarlayıcı dizisi ) domaini içerir. IAP ailesinde bulunan çinko bağlayıcı domain bulunmaz. BIR içeren maya ve C. Elegans ile benzerlik gösterir. BIR domaini uzun bir alfa heliks yapısı içerir (79, 80, 81, 82). Survivin geni kromozom 17q25'de bulunmuştur. Üç intron ve dört exondan oluşur. Hücrenin bölünmesinden ve apoptozisin inhibisyonundan sorumludur (10, 17, 71). Hücre siklusunun G2/M fazında nükleusta eksprese edilir. Mitotik içcikler ile mikrotübüllerin oluşumunda ve kontrol noktasında görev alır (71). Fetal gelişim

döneminde ve insan kanserlerinde ekspresyonu artmaktadır (12). Apoptoziste görevli Proteaz, Kaspaz 3 ile Kaspaz 7 ve mitokondrial kaynaklı ikinci kaspaz aktivatörünü (Smac/DIABLO) inhibe eder. Survivin ekspresyonunun meme, mide, kolorektal, özafagus, mesane, pankreas, karaciğer, akciğer, serviks, over, mol hidatiform, endometriyum karsinomlarında, non-Hodgkin lenfoma, lösemiler, nöroblastom, glioblastom, melanom, osteosarkom, prostat, tiroid, oral ve larinks malignitelerinde artışı saptanmıştır (83, 84). Ayrıca bazı çalışmalarda, fetal akciğer, kalp, böbrek, GİS (çok katlı yassı epitel, endokrin pankreas), timik medulladan da eksprese olduğu bildirilmiştir (83). Bu da Survivin'in hücre bölünmesi ve anti-apoptotik fonksiyonunun, karsinogenezisin erken döneminde olduğu kadar ileri döneminde de etkili olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda normal dokularda düşük veya fark edilmez seviyelerde saptanıp, bu olgularda mitozu düzenlediği ve Kaspaz aktivasyonunu engellediği görülmüştür (67). Tümörlü dokularda ise homojen olarak up-regüle edilen bir gen olduğu ve kanser vakalarında apoptoz inhibisyonu yolu ile hücre ömrü uzattığı saptanmıştır (67). Vasküler hasarın Survivin ile olan ilişkisi de araştırılmaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada, femoral arter hasarında, Survivin artışının, düz kaslarda hücre canlılığında rol oynadığı, Survivin'de oluşacak bir patolojide ise intimal neovaskülarizasyonun oluşmayacağı gösterilmiştir. Düz kaslarda yapılan bu deneysel çalışmalar, böbrekte oluşan iskemik hasar ve Alzheimer gibi nöronal apoptozisin regülasyonu ile ilgili patolojilerde de Survivin'in rolü konusunu gündeme getirebilir (85, 86, 87).

### **2.10.2. Meme kanserinde survivin**

İmmunohistokimyasal çalışmalarda, Survivin'in temel olarak sitoplazmik olarak eksprese edildiği gösterilmiştir. Buna rağmen hepatoselüler karsinom, mide ve osteosarkom gibi bazı kanserlerde nükleer boyama gözlenmiş ve bunun iyi prognostik bir faktör olduğu bildirilmiştir (88,89,90, 91, 92). Meme kanseriyle yapılan çalışmalarda da sitoplazmik boyanmanın kötü prognozla, nükleer boyanmanın da iyi prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir (89,90). Benign lezyonların da değerlendirildiği bir çalışmada, en fazla boyanmanın yüksek gradeli DCIS (Duktal karsinoma in situ) ve metastatik lenf nodu vakalarında gözlendiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, malign dokunun etrafındaki neoplastik olmayan hücrelerde aynı lokalizasyonda ama daha zayıf bir Survivin boyanması gözlenmiştir (93).

Meme kanserinde yapılan Survivinle ilgili genetik çalışmalar, Survivin-ΔEx3, Survivin 2α, Survivin-2B ve Survivin-3B olmak üzere 4 farklı varyant olduğunu göstermiştir. Tüm varyantlar, hormon reseptörü (-) olan hastalarda yüksek bulunmakla beraber, Survivin-ΔEx3, Survivin 2α genç, duktal kaynaklı, yüksek gradeli karsinomlarda yüksek olarak saptanırken, 4'ten az lenf nodu tutulanlarda, daha fazla sayıda lenf nodu metastazı olanlara nazaran daha fazla Survivin-2B saptandığı bildirilmiştir. Univariate analizde Survivin 2α ve Survivin-3B kısa relapssız sağkalım süresi ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (94).

Survivin'in en fazla ER(-), PR(-) veya HER2 pozitif tümörlerde boyandığı bildirilmektedir (93). İn vitro çalışmalar, Survivin'in östrojen ile up-regüle olduğunu göstermektedir (95). Premenapozal hastalarda Survivin, postmenapozal hastalardan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca hormon reseptörü (-) grupta daha yüksek oranda

eksprese edildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Bu da yorumcular tarafından Survivin'in östrojen aracılı supresyon hipotezinden ziyade bu gruptaki kanser hücrelerinin orjininin farklı olmasıyla ilişkili olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir (96, 97).

Survivinin kötü prognoz için öngördürücü özelliğinin Kaspaz inhibisyonu yaparak, hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptozis yolağını baskılaması ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür (9). Survivin ekspresyonu fazla olan hücrelerin, apoptozis başlatıcılarına karşı yanıtızsız kaldığı ve böylece sitotoksik tedaviye daha rezistan olduğu iddia edilmiştir (98). Dirençle ilgili yapılan bir çalışmada, VEGF aracılı dirençte de önemli rolü olduğu bildirilmektedir (76). VEGF, meme kanserinde hem radyoterapi hem de endokrin tedavi için, kötü hastalık prognozunda mükemmel bir prediktif faktördür (99, 100). Bu da Survivin'in önemini daha da arttırmaktadır.

Boyanma paterninin değerlendirildiği immunohistokimyasal çalışmalar, genel olarak nükleer boyanmanın iyi prognozla ilişkili olacağı yönünde olmakla beraber, özafagus epidermoid karsinomu ve mantle hücreli lenfomada kötü prognostik faktör olduğu yönünde çalışmalar da mevcuttur (101, 102). Proliferasyonu yüksek olan tümörler kemoterapiye daha duyarlıdır. Survivin ekspresyonu fazla olan tümörlerin kemoterapiye daha duyarlı olduğu düşünülmektedir. Tedaviye dirençte antiapoptotik etkinin rol oynayabileceği iddia edilmektedir. Yüksek Survivin ekspresyonu olan ve endokrin tedavi alan hastaların (nükleer veya sitozolik boyanma faktörüne bakılmaksızın), daha kısa sürede progrese oldukları ve bu hastalara kemoterapi verildiğinde, daha uzun bir progresyonsuz sağkalım elde edildiği bildirilmiştir (103).

Birçok çalışma, Survivin'in prediktif ve prognostik önemini vurgulamaktadır. Ancak bu konuda daha net veriler elde etmek için daha çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

### **2.10.3. Survivin'in prognostik ve diagnostik önemi**

Survivin'in fetal gelişim esnasında, antiapoptotik özelliğinden dolayı, hücre proliferasyonunu teşvik ettiği düşünülmüştür. Tümör hücrelerinin de, Survivin'in bu antiapoptotik özelliğinden yararlandıkları düşünülür. Kanserli hücreler, Survivin'in aşırı ekspresyonu sayesinde hücre siklusu kontrol noktalarını aşabilirler. Apoptoz çalışmaları sayesinde kanser tedavisinde yeni ilaçlar geliştirilmiştir. Birçok ilaç apoptozu uyararak tümör hücrelerinin ortadan kalkmasını sağlar. Fakat bazı tümörler, bu ilaçlara karşı dirençlidir. Yapılan çalışmalarda, yüksek Survivin ekspresyonu olan tümörlerde, apoptozu uyararak etkisini gösteren kanser ilaçlarına karşı direnç geliştiği gösterilmiştir (11,15,17).

Survivin; tümör hücrelerinde normal dokulara göre daha fazla eksprese edilen birkaç proteinden biridir. Survivin'in tümörlerde aşırı ekspresyonu; kemoterapi direnci, radyoterapi direnci, sağkalımın kısalması ve tümör rekürrensları ile ilgilidir (13). Survivin'in mitoz ve apoptozdaki fonksiyonları, bu proteinin tümörün büyüme ile ilgili olan hücrelerinde eksprese edildiğini, tümör oluşmasında ve tümörün büyümesinde etkili olduğunu düşündürür. Bu açıdan Survivin, potansiyel bir kanser markerıdır. Survivin biyolojik sıvılarda tesbit edilebilir. Örneğin Survivin, mesane kanserinde hastaların idrarında tesbit edilmiş ve bunun spesifik ve sensitif bir diagnostik gösterge

olduğu saptanmıştır (17). Kolorektal karsinomlar ve Nöroblastomlarda yapılan immunohistokimyasal alışmalar, Survivin ekspresyonu ile hastalığın kötü gidişati arasında klinik korelasyon olduğunu göstermiştir. Bu durum Survivin'in potansiyel bir prognostik faktör olduğu düşündür (18, 19). Survivin'in artması, tümörlü hastalar için negatif bir prognostik faktördür.

#### **2.10.4. Survivin promotor bölge polimorfizmleri**

Polimorfizm, terim kökeni bakımından Yunanca "ok" ve "biçim" kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Birden fazla biçimin bulunması olarak da tanımlanabilir. Doğada aynı türde organizmalar genellikle bazı görünümleri ile farklıdır. Bu farklılıklar genetik olarak belirlenmiştir ve 'Polimorfizm' olarak isimlendirilirler. Birçok gen lokusunda iki ya da daha fazla allel yer alabilir, buna '**Genetik Polimorfizm**' adı verilir.

Survivin genindeki, tek nükleotid polimorfizmlerinden (SNP) biri, CDE/CHR (Cell cycle dependent element/cell cycle gene homology region) repressör bağlama bölgesinde (ATG başlangıç kodonunun ilk nükleotidine -31 uzaklıkta) lokalize, genin promotor bölgesi içinde yer almaktadır. Bu polimorfizmin (G/C), Survivin'in hem mRNA hem de protein seviyesinin aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Survivin promotor 31G/C gen polimorfizmi ile literatürde çeşitli kanser tiplerinde yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (20) .



### **2.10.5. Survivin gen ekspresyonunun regülasyonu**

Survivin mitozda hücre siklusüne bağlı olarak eksprese edilir. Survivin geninin promotörü, bir hücre döngü bağımlı element (CDE) ve hücre döngü protein homolog bölgelere (CHR) sahiptir. Bu bölgeler, Siklin A ve Siklin B gibi hücre döngüsünün G2/M fazında eksprese olan genlerde mevcuttur. Survivin ekspresyonu, G2/M fazında, G2 veya S fazındakinden 10 kat daha yüksektir (104). Birçok normal diferansiye olmuş hücrede ekspresyonu tesbit edilemezken, CD34C kemik iliğinden derive kök hücreler, bazal epitelyal hücreler, timositler, normal uterin serviksini epitelyal hücreleri gibi hızlı bölünen normal hücrelerde yavaş eksprese olduğu bildirilmiştir (9,105,106).

### **2.10.6. İnsan malignitelerinde survivin**

Hemen hemen bütün kanserlerde (Mide, özofagus, akciğer, meme, karaciğer, over, beyin kanserleri ve hematolojik maligniteler gibi) Survivin'in fazla ekspresyonu bildirilmiştir (10,107). Kanser hücreleri, Survivin'in sitoprotektif özelliğini sürekli proliferasyon amacıyla kullanırlar. Survivin ekspresyonu, kanserli hastalarda, hastanın sağkalımı, hastalık rekürrensi, kemoterapi ve radyoterapi rezistansı ile de ilişkilidir. Yüksek Survivin ekspresyonu, kolorektal kanserde II. evrede (109), özofagus kanserinde (110), hepatosellüler karsinomda (111), akciğer kanserinde (112), gliomda (113), lösemide (114) ve diğer bazı kanser tiplerinde hastalık rekürrensi veya hastanın sağkalım süresinde kısalma ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, tümör hücrelerinde, bazal Survivin ekspresyonunun azalmasının, kanserli hastalarda tedaviye cevabı arttırabileceği yönünde sonuçlar bulunmuştur (115,116).

### 3. MATERYAL - METOD

Projenin kabulünden ve Klinik Araştırmalar Etik Kurul'una başvurulardan onay alındıktan sonra, Ocak 2004 - Mayıs 2011 tarihleri arasında Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında invaziv meme karsinomu tanısıyla ameliyat edilen 111 hasta “Kanser Grubu” olarak çalışmaya alındı. Kanser grubu ayrıca kendi içinde unifokal meme kanser grubu (n=57) ve multifokal/multisentrik kanser grubu (n=54) olarak ikiye ayrıldı. Ayrıca 30 yaş üzeri, 101 sağlıklı kadın birey de (kontrol grubu), aydınlatılmış onamları alındıktan sonra, kan örnekleri alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Genetik incelemeler, kanser grubunda fakültemiz Patoloji Anabilim Dalı'nda saklanan parafin blok doku örneklerinden, kontrol grubunda ise gönüllülerin kan örnekleri üzerinde Tıp Fakültemiz Genetik Bilim Dalı Genetik Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Kanserli hastaların; yaş, menarş yaşı, menopoz durumu, östrojen hormon kullanımı, emzirme durumu, sigara kullanımı, ailede meme kanseri öyküsü, tümör tipi, tümör çapı, grade, lenf kanal invazyonu, vasküler invazyon, perinöral invazyon, multifokal/multisentrik tümör varlığı, lenfatik metastaz varlığı, metastatik lenf nodu sayısı, östrojen/progesteron reseptör durumu, C-erb B2 durumu, nüks ve sağkalım bilgileri, anabilim dalımız meme kanseri veritabanından elde edildi.

Kanser grubu dışlama kriterleri: Başlangıçta sistemik hastalığı olan hastalar, neoadjuvan kemoterapi alan hastalar, pür in situ karsinomlu hastalar, takipler sırasında ilişkisi kopan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Tanımlamalar:

- **Multifokal Meme Kanseri:** Memede aynı kadranda yer alan, aralarında normal meme dokusu bulunan iki veya üzeri invaziv kanser odakları, 'Multifokal' olarak adlandırılırlar.
- **Multisentrik Meme Kanseri:** Farklı kadranlarda yer alan veya odaklar arasında 2 cm'den fazla mesafe olan, iki veya üzeri invaziv kanser odakları 'Multisentrik' olarak adlandırılırlar.
- **Yaygın intraduktal komponent:** İnvaziv karsinomun en az % 25'ini intraduktal karsinom oluşturuyorsa yaygın intraduktal komponent varlığından söz edilir.

## **GENETİK METOD;**

### **3.1. Parafin Bloktan Dna İzolasyonu**

Parafin dokudan DNA izolasyonu İnvitrogen PureLink™ Genomic DNA Kit For purification of genomic DNA (Kat no: K1820-02) kiti kullanılarak yapıldı. DNA izolasyonu, dokuları parafinden arındırma işlemi ve proteinaz aşaması olarak iki kısımda gerçekleştirildi. Dokular küçük parçalara ayrılarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne kondu. 80 °C'de 15-20 dk inkübe edildi. Dokular üzerine 1-1,5 ml ksilol eklenip, 55 °C'de 1 saat bekletildi. Ksilol uzaklaştırılıp, 1 ml ksilol eklenip, 55 °C'de 1 saat bekletildi. Aynı işlem bir de yarım saat bekletilerek yapıldı. Dokular yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve ksilolden arındırmak için alkol serilerinden geçirildi. %100' lük etanol 1 ml eklenip, 37 °C'de 30 dk tutuldu. Süpernatant uzaklaştırılıp,

sirasıyla %80'lik, %60'lık ve %40'lık etil alkol serilerinde 37 °C'de 15-30 dk tutuldu. 1 ml distile suda 15 dk tutulduktan sonra 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Dokular yeni bir mikrosantrifüj tüpe aktararak proteinaz aşamasına geçildi. Parafinden arındırılan dokuların üzerine 40 µl proteinaz K ve 380 µl genomik digestion buffer eklendi, vortekslendi ve 55 °C'de benmaride 15 saat inkübe edildi. 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilip, süpernatant yeni tüpe aktarıldı. 40 µl RNase A ilave edildi, vortekslendi, 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 400 µl genomik lysis/binding buffer eklenerek homojen solüsyon elde edinceye kadar iyice vortekslendi. 400 µl %96 etanol eklendi ve tekrar homojen solüsyon elde edinceye kadar vortekslendi. Lizat eşit miktarda 2 tane spin kolona aktarıldı. 10.000 g'de 1 dk 25 °C'de santrifüj edildi ve toplama tüpü boşaltıldı. Spin kolona 500 µl wash buffer 1 konuldu ve 10.000 g'de 1 dk 25 °C'de santrifüj edilip, toplama tüpü boşaltıldı. Spin kolona 500 µl wash buffer 2 eklendi, 13.000 rpm de 3 dk 25 °C'de santrifüj edildi. Spin kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 100 µl genomik elution buffer eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 1 dk 25°C'de santrifüj edildi. Nano drop'da ölçüm yapıldıktan sonra elde edilen DNA PCR 'da kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

### **3.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu**

Kontrol grubuna ait periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu Fenol-Kloroform yöntemi kullanılarak yapıldı. Steril 15 ml' lik falkon tüpüne 9 ml RBC Lysis Buffer (1x) ve üzerine 3 ml periferik kan konuldu. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip, 2000g' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra pellet korunacak şekilde,

süpernatant yavaş yavaş dökülerek uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 350 µl 10-10 TE konuldu, pipetaj yapılarak pellet temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 20 µl %10 SDS ve 8 µl proteinase K (Qiagen Lot No: 136259198) eklenip vorteks yapıldı. 15 dakika 70°C’ de inkübe edildikten sonra örnekler 37 °C’ de overnight inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyon sonrası pellet tamamen çözüldükten sonra geri kalan işlemlere devam edildi. 5000 rpm’ de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın üzerine 20 µl 5 M NaCl konuldu. 400 µl Fenol (Sigma P4557) eklendi. 15000 rpm’ de 15 dakika 4°C’ de santrifüj edildi. İki faz görüldü, üstteki şeffaf faz temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. 400 µl CIA (Sigma C0549-1PT) eklendi ve hızlıca alt üst edildi. 15000 rpm’ de 15 dakika 4°C’ de santrifüj edildi. İki faz görüldü, üstteki şeffaf faz temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. Bu aşama iki kez tekrarlandı. Santrifüj sonrası üstte ki şeffaf kısım temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 1ml %100 etanol eklendi ve DNA elde edildi. DNA 200 ul 1-1 TE içinde çözümlenerek -20 °C’de saklandı.

### **3.3. DNA Amplifikasyonu**

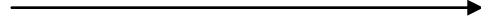
Survivin geni **-31 G>C (rs 9904341)** polimorfizminin araştırılması için;

Forward 5’ AAGAGGGCGTGCGCTCCCGACA 3’

Reverse 5’ GAGATGCGGTGGTCCTTGAGAAA 3’ primerler kullanılarak

aşağıdaki 151 bp’lik bölge çoğaltıldı.

Forward

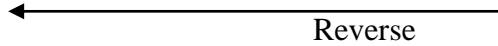


AAGAGGGCGTGCGCTCCCGACA TGCCCCGCGGGCGCGCCATTAACCGCCAGA  
TTTG

“ Polimorfizm”



AATCGCSGGACCCGTTGGCAGAGGTGGCGGGCGGCATGGGTGCCCCGAC  
GTCTGCCTGGCAGCCC TTTCTCAAGGACCACCGCATCTC



Reverse

### **3.3.1. Primerlerin sulandırılması**

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda 1XTE (Tris EDTA) eklenerek ve 100 pikomol/mikrolitre’lik stok çözeltiler hazırlandı. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 20 pikomol/mikrolitre’lik konsantrasyonlu 100 mikrolitrelik sulandırılmış primerler hazırlandı.

### **3.3.2. Reaksiyon karışımı**

Total PCR reaksiyon karışımı her bir örnek için 25 mikrolitre olacak şekilde hazırlandı. 10X NH<sub>4</sub> buffer, MgCl<sub>2</sub> (25mM), dNTP, primerler, H<sub>2</sub>O ve Taq Polimerazdan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi.

**Tablo 1.** PCR reaksiyon karışımı

	<b>SURVİVIN</b>
<b>10X NH<sub>4</sub> Buffer</b>	2,5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2,5µl
<b>dNTP</b>	0,5 µl
<b>Forward Primer</b>	0,5 µl
<b>Reverse Primer</b>	0,5 µl
<b>Taq polimeraz</b>	0,2 µl (Thermo)
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	16,3µl
<b>DNA</b>	2 µl

**Tablo 2.** İzlenen PCR programı

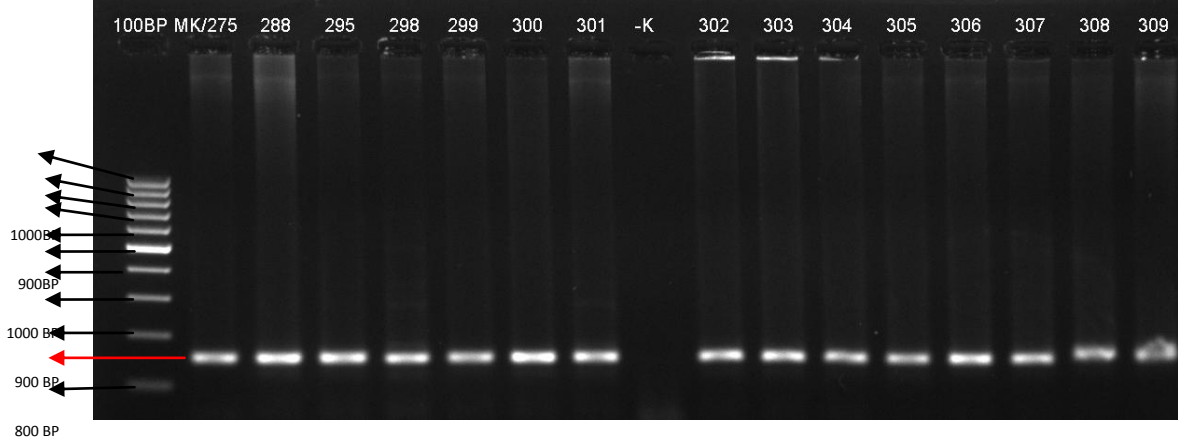
<b>Denatürasyon</b>	94 °C	5 dakika	35 döngü
<b>Denatürasyon</b>	94 °C	30 saniye	
<b>Primer bağlanma</b>	62.2 °C	30 saniye	
<b>Uzama</b>	72 °C	1 dakika	
<b>Son uzama</b>	72°C	5 dakika	

Techne TC-3000 model PCR cihazında yukarıdaki reaksiyon koşullarında amplifikasyon gerçekleştirildi.

### **3.4. Agaroz Jel Elektroforezi**

Araştırdığımız gen bölgesinin PCR ürünlerinin çoğalıp çoğalmadığını kontrol etmek için %3'lük agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü. 100 ml 1X TAE (Tris/ Asetik Asit / EDTA) tamponunun içine 3 gr agaroz (İnvitrogen kat no: 16500-100g) konuldu. Mikrodalgada agaroz iyice eriyinceye kadar tutuldu. 2,5 µl etidyum bromid ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek 30 dakika donmaya bırakıldı. PCR ürünlerinden 5

$\mu$ l alınarak 1  $\mu$ l 6XLoading dye ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Jel, 110 V'de 15 dk yürütüldükten sonra U.V. transliminatörde görüntüledi.



**Şekil 9.** Hasta gruplarının PCR amplifikasyon ürünlerinin Agaroz jel elektroforez görüntüleri. (-K, kontrol amaçlı)

### 3.5. DNA'nın Enzimatik Kesimi ve Polimorfizmin Belirlenmesi

PCR sonucunda elde ettiğimiz PCR ürünleri bize sadece polimorfizmin olduğu bölgenin dizisini vermektedir. Araştırdığımız tek nükleotid polimorfizmlerini tespit etmek için bu bölgeleri tanıyan Restriksiyon Enzimleri (RE) kullanılarak allel tespiti yapıldı.

Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin amplifikasyonlarının kontrolü yapıldıktan sonra enzimatik kesim işlemine geçildi. Kesim sonucunda 5  $\mu$ l DNA, 1  $\mu$ l 6XLoading dye ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve 100 V'de 30 dk yürütüldükten sonra U.V. transliminatörde görüntüledi.



### **3.5.1. Survivin -31 G>C (rs 9904341) polimorfizmi için enzim kesimi**

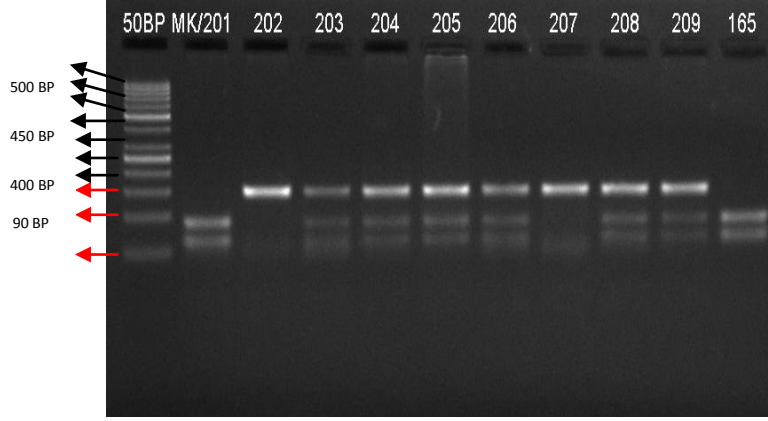
Msp I (Fermantas Thermo Scientific Fast Digest) enzimi ile 151 bp'lik genom bölümü, 90 ve 61 bp'lik parçalara kesildi. Enzim C bazını kesmekteydi.

Genotipleme: GG : 151 bp  
GC : 151 bp, 90 bp, 61 bp  
CC : 90 bp, 61 bp

GG=HOMOZİGOT WILD TYPE  
GC=HETEROZİGOT  
CC=HOMOZİGOT

**Tablo 3.** Msp I enzimi için kesim koşulları

<b>Msp I</b>		İnkübasyon süresi: 37 °C 20 dakika
<b>PCR ürünü</b>	5 µl	
<b>Msp I Fast digest enzyme (FD0544)</b>	0,2 µl	
<b>10X Fast digest Buffer</b>	1 µl	
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	8.8 µl	

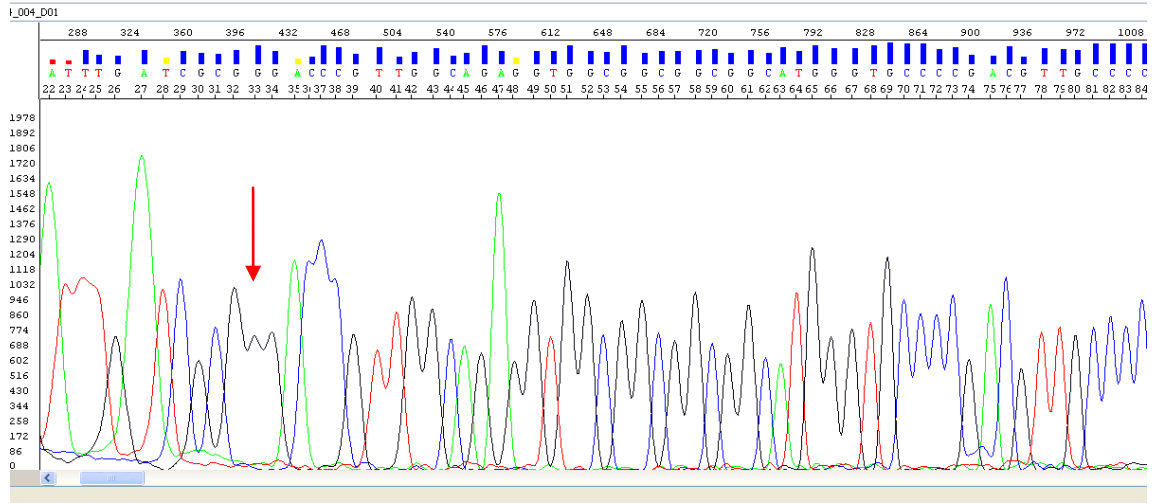


**Şekil 10.** SURVIVİN geni polimorfizminin enzim kesimine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

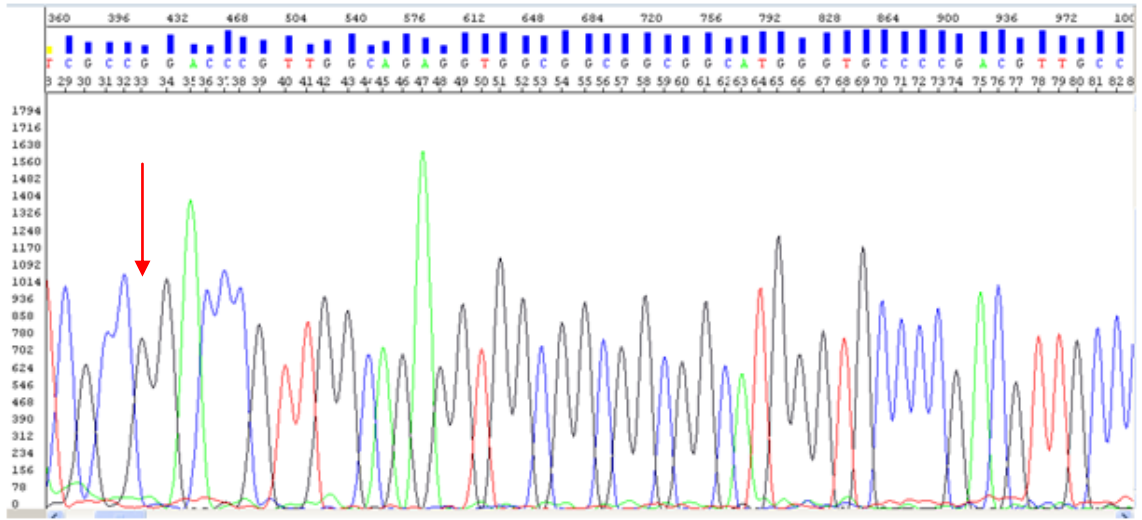
Bu örneklerin genotipleri 201=CC, 202=GG, 203=GC, 204=GC, 205=GC, 206=GC, 207=GG, 208=GC, 209=GC, 165=CC.

### **3.5.2. Survivin geni -31 G>C (rs9904341) polimorfizminin incelenmesi**

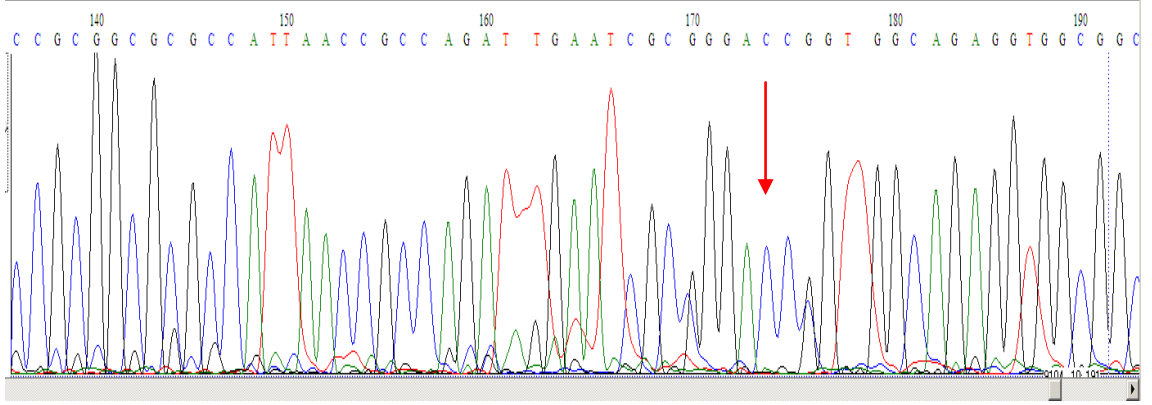
SURVIVİN geni G > C (rs9904341) polimorfizminin analizi için; PCR ürünün varlığı tespit edildikten sonra DNA sekans yapılarak genotip belirlendi. Örneklere RFLP sonuçlarını kontrol amaçlı sekans yapıldı. Sekans sonuçlarıyla RFLP sonuçları birbirini doğruladı.



**Şekil 11.** SURVIVİN geni homozigot wild type (GG) örneğine ait elektroferogram görüntüsü



**Şekil 12.** SURVIVİN geni homozigot (CC) polimorfizmine ait elektroferogram görüntüsü



**Şekil 13.** SURVIVİN geni heterozigot (GC) polimorfizmine ait elektroferogram görüntüsü

### 3.6. İstatistiksel Analiz Metodu

Verilerin analizi SPSS for Windows 16,0 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler kesikli ve sürekli sayısal değişkenler için ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde kategorik değişkenler ise gözlem sayısı ve (%) biçiminde ifade edildi. Gruplar arasında ortalama değerler yönünden farkın önemliliği Student's t-testi ile değerlendirildi. Kategorik değişkenler Pearson'un Ki-Kare, Fisher'in Kesin Sonuçlu Ki-Kare veya Olabilirlik Oran testi ile değerlendirildi. Kanser grubu içerisinde Survivin 31G/C polimorfizmi açısından nüksüz sağkalım ve genel sağkalım yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı Log-Rank testi kullanılarak Kaplan Meier sağkalım analizi ile değerlendirildi. Ortalama beklenen yaşam süreleri ve bu süreye ilişkin %95 güven aralıkları hesaplandı.  $p < 0,05$  için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ VE ELDE EDİLEN BULGULAR

Kontrol grubu ile kanser grubu arasında menarş yaş ortalaması yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,542$ ).

Kontrol grubu ile kanser grubu arasında menopoz yaş ortalaması yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,120$ ).

Gruplar arasında süt verme, sigara kullanma ve ailede meme kanseri öyküsü yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.** Kontrol ve Kanser Gruplarına Göre Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri Yönünden Dağılımı

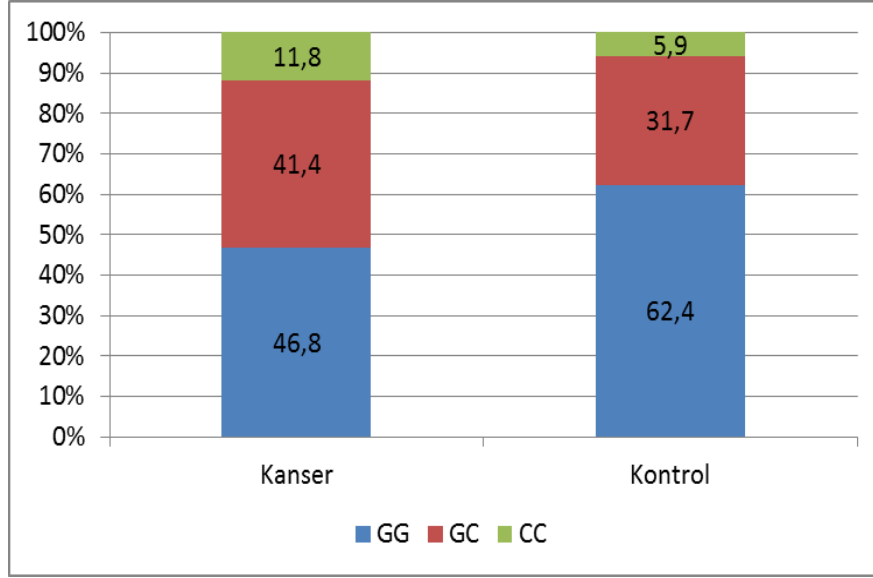
Değişkenler	Kanser Grubu (n=111)	Kontrol Grubu (n=101)	p-değeri
Yaş	52,9±14,3	40,2±7,3	<0,001
Menarş Yaşı	13,3±1,2	13,2±1,5	0,542
Menopoz Yaşı	47,9±5,6	44,1±9,0	0,120
Post-Menopoz	64 (%57,7)	13 (%12,9)	<0,001
Hormon Alımı	26 (%23,4)	54 (%53,5)	<0,001
Süt Verme	102 (%91,9)	89 (%88,1)	0,358
Sigara Öyküsü			0,286
Yok	93 (%83,8)	77 (%76,2)	
Var	17 (%15,3)	21 (%20,8)	
İçmiş Bırakmış	1 (%0,9)	3 (%3,0)	
Aile Öyküsü			0,166
Yok	88 (%79,3)	87 (%86,1)	
1.Derece Akraba	12 (%10,8)	4 (%4,0)	
Daha Uzak Akraba	11 (%9,9)	10 (%9,9)	

Kontrol ve kanser grupları arasında Survivin 31GC promotor polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,058$ ). Ancak istatistiksel fark, anlam sınırı olan  $p<0.05$ 'e çok yakın bulundu.

Kontrol grubuna göre kanser grubunda GC+CC genotipi (ya da C allelini) taşıma oranı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p=0,023$ ). 'GC+CC', kanserli hastaların %59'unda bulunurken, kontrol grubunun %38'inde bulunmaktadır. Bu sonuçlara göre, Survivin geninde promotor bölgede C allelini taşımak (31GC veya 31CC) meme kanserine yatkınlık açısından anlamlı bir fark oluşturmaktadır.

**Tablo 5.** Kontrol ve Kanser Gruplarına Göre Olguların Survivin Promotor Polimorfizmi Yönünden Dağılımı

Değişkenler	Kanser Grubu (n=111)	Kontrol Grubu (n=101)	p-değeri
<b>Survivin 31GC</b>			0,058
GG	52 (%46,8)	63 (%62,4)	
GC	46 (%41,4)	32 (%31,7)	
CC	13 (%11,8)	6 (%5,9)	
<b>Survivin</b>			0,023
GG	52 (%46,8)	63 (%62,4)	
GC+CC	59 (%53,2)	38 (%37,6)	



**Şekil 14.** Kontrol ve Kanser Gruplarına Göre Olguların Survivin 31GC Promotor Polimorfizmi Yönünden Yüzdesele Açından Şematik Dağılımı

	Kanser	Kontrol
GG	46,8	62,4
GC	41,4	31,7
CC	11,8	5,9

GG genotipine karşı, GC veya CC genotipini taşıyanlarda (GC+CC) kanser gelişme riski istatistiksel açıdan anlamlı olarak 1,413 kat (%95 Güven Aralığı: 1,040-1,918) artmaktadır.

**Tablo 6.** Kontrol ve Kanser Gruplarında Olguların Survivin Promotor Polimorfizmi (GC+CC) Yönünden Dağılımı Ve Odds Oranı İlişkisi

Survivin Promotor Polimorfizmi	Kontrol (n=101)	Kanser (n=111)	Odds Oranı (%95 Güven Aralığı)
GC+CC	38 (%37,6)	59 (%53,2)	1,413 (1,040-1,918)

Kanser grubu içerisinde, Survivin promotor polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında yaş ortalaması,

menopoz yaş ortalaması, post-menopoz dönemde olma oranı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi (Sırasıyla  $p=0,287$ ;  $p=0,787$  ve  $p=0,445$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotor polimorfizmi açısından GG genotipini taşıyan gruba göre GC+CC genotipini taşıyan grupta ilk doğum yaşı ortalaması istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p=0,038$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotor polimorfizmi açısından GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında son doğum yaşı ortalamaları, hormon alımı, hormon alım süresi, süt verme, sigara öyküsü, ailede meme kanseri öyküsü ve ailede akrabalık derecesine göre tekrar incelenen aile öyküsü yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p>0,05$ ).

**Tablo 7.** Kanser Grubu İçerisinde Survivin Promotor Polimorfizmi Yönünden Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri Yönünden Dağılımı

Değişkenler	GG (n=52)	GC+CC (n=59)	p-değeri
Yaş	51,4±12,9	54,3±15,4	0,287
Menopoz Yaşı	48,3±7,4	47,6±4,0	0,787
Post-Menopoz	28 (%53,8)	36 (%61,0)	0,445
İlk Doğum Yaşı	21,4±3,4	24,3±5,6	0,038
Son Doğum Yaşı	30,2±5,2	29,6±4,7	0,701
Hormon Alımı	9 (%17,3)	17 (%28,8)	0,214
Hormon Süresi(ay)	12,5±9,0	38,9±48,9	0,075
Süt Verme	47 (%90,4)	55 (%93,2)	0,732
Sigara Öyküsü			0,455
Yok	45 (%86,5)	48 (%81,4)	
Var	7 (%13,5)	10 (%16,9)	
İçmiş Bırakmış	-	1 (%1,7)	
Ailede Meme CA Öyküsü (var/yok)	12 (%23,1)	11 (%18,6)	0,565
Aile Öyküsü			0,486
Yok	40 (%76,9)	48 (%81,4)	
1.Derece Akriba	5 (%9,6)	7 (%11,9)	
Daha Uzak Akriba	7 (%13,5)	4 (%6,8)	



Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında multifokal-multisentrik meme kanseri sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,159$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında İnvaziv Duktal CA veya İnvaziv Lobüler CA sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,409$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında tümör çapı (mm) ve tümör çapı evresi (TNM) yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,894$  ve  $p=0,508$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında grade yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,613$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında lenf kanalı invazyonu, vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenfatik metastaz ve metastatik lenf nodu sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p>0,05$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında lenfatik metastaz grubu (TNM), yaygın intraduktal komponent ve perinodal yayılım açısından da istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p>0,05$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında sırasıyla; Östrojen reseptör pozitifliği (ER), Progesteron Reseptör Pozitifliği (PR) ve C-Erb B2 pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi (Sırasıyla p=0,774; p=0,596 ve p=0,880).

**Tablo 8.** Kanser Grubu İçerisinde Survivin Promotör Polimorfizmi Yönünden Olguların Patolojik Özellikleri

<b>Değişkenler</b>	<b>GG (n=52)</b>	<b>GC+CC (n=59)</b>	<b>p-değeri</b>
<b>Gruplar</b>			
<i>Multifokal-Multisentrik</i>	29 (%55,8)	25 (%42,4)	0,159
<i>Unifokal</i>	23 (%44,2)	34 (%57,6)	
<b>Patoloji</b>			
<i>İnvaziv Duktal CA</i>	44 (%84,6)	53 (%89,8)	0,409
<i>İnvaziv Lobüler CA</i>	8 (%15,4)	6 (%10,2)	
<b>Tümör Çapı(mm)</b>	26,6±15,9	27,0±17,0	0,894
<b>Tümör Çapı Evre(TNM)</b>			
<i>≤2 cm</i>	22 (%42,3)	25 (%42,4)	0,508
<i>2&gt; - &lt;5 (2,1-4,9 cm)</i>	27 (%51,9)	27 (%45,8)	
<i>≥5 cm</i>	3 (%5,8)	7 (%11,9)	
<b>Grade</b>			
I-II	35 (%67,3)	37 (%62,7)	0,613
III	17 (%32,7)	22 (%37,3)	
<b>Lenf Kanalı İnvazyonu</b>	30 (%57,7)	34 (%57,6)	0,994
<b>Vasküler İnvazyon</b>	6 (%11,5)	8 (%13,6)	0,749
<b>Perinöral İnvazyon</b>	14 (%26,9)	20 (%33,9)	0,426
<b>Lenfatik Metastaz(var/yok)</b>	32 (%61,5)	34 (%57,6)	0,675
<b>Metastatik Lenf nodu Sayısı</b>	3,7±6,4	5,4±9,7	0,310
<b>Lenfatik Metastaz Grubu(TNM)</b>			
<i>(N0) Yok</i>	20 (%38,5)	25 (%42,4)	
<i>(N1) 1-3 nod pozitif</i>	19 (%36,5)	11 (%18,6)	0,158
<i>(N2) 4-9 nod pozitif</i>	7 (%13,5)	14 (%23,7)	
<i>(N3) 10 ve üzeri</i>	6 (%11,5)	9 (%15,3)	
<b>Yaygın İntraduktal Komponent</b>	19 (%36,5)	22 (%37,3)	0,935
<b>Perinodal Yayılım (Var/Yok)</b>	14 (%26,9)	16 (%27,1)	0,982
<b>ER Pozitifliği</b>	40 (%76,9)	44 (%74,6)	0,774
<b>PR Pozitifliği</b>	41 (%78,8)	44 (%74,6)	0,596
<b>C-erb B2 Pozitifliği</b>	15 (%28,8)	16 (%27,1)	0,880

Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında, kaba nüks, lokal nüks ve uzak nüks oranları yönünden de istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p>0,05$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında, nüks gelişen olgular içerisinde nükse kadar geçen ortalama süre yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,368$ ).

Kanser grubu içerisinde Survivin promotör polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında kaba mortalite ve toplam sağkalım süresi yönünden de istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,445$  ve  $p=0,471$ ).

**Tablo 9.** Kanser Grubu İçerisinde Survivin Promotör Polimorfizmi Yönünden Olguların Nüks Ve Sağkalım Özellikleri

<b>Değişkenler</b>	<b>GG (n=52)</b>	<b>GC+CC (n=59)</b>	<b>p-değeri</b>
<b>Nüks</b>	2 (%3,8)	5 (%8,5)	0,445
<b>Lokal Nüks</b>	1 (%1,9)	1 (%1,7)	1,000
<b>Uzak Nüks</b>	2 (%3,8)	5 (%8,5)	0,445
<b>Nüks Süresi(ay)</b>	36,0±22,6	25,2±9,2	0,368
<b>Mortalite</b>	2 (%3,8)	5 (%8,5)	0,445
<b>Sağkalım Süresi(ay)</b>	47,1±30,2	43,0±29,5	0,471

## 5. TARTIŞMA

Survivin, IAP ailesinin üyesi olan antiapoptotik bir proteindir. Survivin hem apoptozu baskılayan hem de hücre bölünmesini düzenleyen çift fonksiyonlu bir proteindir. İnsanlardaki çeşitli malignitelerde Survivin'in yoğun eksprese olduğu ancak normal erişkin dokularda oldukça az hatta tesbit edilebilir düzeyin altında olduğu bilinmektedir (10, 9). Survivin hücre siklüsünün G2/M fazında eksprese olur. Apoptoz düzenini bozarak, anormal hücrelerin yaşamasını teşvik etmek yoluyla tümör hücrelerine anlamlı bir avantaj sağladığı düşünülür (12). Survivin düzeyinin artmasının tümörler için negatif bir prognostik faktör olduğu öne sürülmektedir. Survivin'in aşırı ekspresyonunun kısalmış sağkalım ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yine yapılan çalışmalarda, Survivin aşırı ekspresyonunun, kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olan tümörlerin artmış rekürrens hızı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (13, 19). İnsanlarda görülen kolorektal kanser, hepatoselüler kanser, akciğer kanseri, pankreas kanseri ve osteosarkom gibi çeşitli hastalıklarda yüksek Survivin ekspresyonu tespit edilmiştir (122). Bunun yanında, yüksek Survivin ekspresyonunun bu kanserlerin kötü prognozu ile ilişkili olduğu da belirtilmiştir. Survivin'in transkripsiyonel seviyede ekspresyonunun büyük ölçüde kontrol altında olduğu bilinmektedir. Survivin'in transkripsiyonel kontrolünün, Survivin promotörünün proksimal bölgesinde lokalize olan, hücre siklüs bağımlı elementler (Cell Cycle Dependent Element) (CDE) ve hücre siklüs homolog bölgeler (Cell Cycle Homology region) (CHR) aracılığıyla olduğu öne

sürülmektedir (17). Survivin molekülünü kodlayan genin promotor bölgesi içinde tanımlanmış birkaç nükleotid polimorfizmi bulunmuştur. Bunlardan biri de, bizim çalışmamızda da araştırdığımız, CDE/CHR repressör bağlama bölgesinde (ATG başlangıç kodununun ilk nükleotidinde 31 baz çifti uzaklıkta) lokalize olan o bölgeye ait Survivin 31G/C promotor polimorfizmidir. Yapılan çalışmalarda, bu polimorfizmin, Survivin'in hem mRNA hem de protein seviyelerindeki aşırı ekspresyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (20). Bu amaçla biz de çalışmamızda meme kanserleri ve kontrol grubu arasında Survivin 31G/C promotor polimorfizmi ilişkisini araştırdık.

Survivin 31G/C promotor polimorfizminin, daha önceden, birçok farklı kanserle olan ilişkisi incelenmiş olmasına rağmen, bildiğimiz kadarıyla unifokal ve multifokal/multisentrik meme kanserlerinde bu polimorfizm daha önce çalışılmamıştır. Bu yüzden biz de, bu çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları, Survivin 31G/C promotor polimorfizminin ilişkisinin araştırıldığı diğer kanser türlerinin sonuçları ile karşılaştırdık.

Gazouli ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (117), 312 tane sporadik kolorektal kanser hastasının biyopsi örneklerine ait verileri ve 362 kişilik sağlıklı kontrol grubuna ait verileri incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, Yunan popülasyonundaki sağlıklı kontrol grubunda, Survivin promotor 31G/C gen polimorfizmine ait genotip frekanslarını sırasıyla GG %33,98, GC %45,03, CC %20,99 olarak tesbit etmişlerdir. Cheng ve arkadaşları (118) ise çalışmalarında, Çin popülasyonundaki sağlıklı kontrollerde Survivin promotor 31G/C genotip frekanslarını GG % 46,26, GC % 41,8, CC % 11,94 olarak saptamışlardır. Jang ve arkadaşları (119) yaptıkları çalışmada, Kore

populasyonunda sağlıklı kontrollerde Survivin promotor 31G/C genotip frekansları GG % 24,4, GC % 50,3, CC % 25,3 olarak saptanmışlardır. Borbely ve arkadaşları (120), Macar populasyonunda sağlıklı kontrollerde Survivin promotor 31G/C genotip frekanslarını GG % 39, GC % 47, CC %14 olarak saptamışlardır. Biz ise yaptığımız çalışmada, sağlıklı kontrollerde Survivin promotor 31G/C genotip frekanslarını GG % 62,4, GC % 31,7, CC %5,9 olarak saptadık. Çalışmamızda meme kanserli hastalar ve kontrol grubu arasında Survivin promotor 31G/C genotip dağılımları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak aralarındaki istatistiksel ilişki anlam sınırına çok yakın bulunmuştur.

Literatürde Survivin promotor 31G/C gen polimorfizmi ile çeşitli kanserlere yatkınlık ilişkisini inceleyen ya da bu polimorfizmin hastalığın prognostik parametreleriyle olan ilişkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Wagner ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (121), Akut Myeloid Lösemi'de (AML) yüksek Survivin ekspresyonunda rol alan moleküler mekanizmayı incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, Survivin promotorunun metilasyon statüsünün ve tek nükleotid polimorfizmlerinin, Survivin geninin promotor bölgesinde meydana gelmesinin, lösemi oluşumunda düşük bir öneme sahip olduğunu göstermiştir. Borbely ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada (120), Survivin promotor polimorfizmi ile servikal karsinogenez ilişkisini incelemişlerdir. Borbely ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Survivin promotor polimorfizminin, uterusun servix kanserinin oluşumunda artan bir risk oluşturmadığını bulmuşlardır (120). Bizim çalışma sonuçlarımızda da, Borbely ve arkadaşları (120) ile benzer şekilde kontrol ve meme kanseri grupları arasında Survivin 31G/C promotor polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı

bir farklılık görülmedi ( $p=0,058$ ). Fakat aralarındaki istatistiksel ilişki anlam sınırına çok yakın bulundu. Üzerinde çalışılan seri yeterince büyütülürse aralarındaki ilişkinin anlam seviyesinde çıkabileceği kanaatindeyiz.

Qin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (122), Survivin promotorundaki işlevsel 31G/C polimorfizmi ile renal hücreli karsinom riski ve prognozu arasındaki ilişkiyi incelenmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar, Survivin promotorundaki 31G/C polimorfizminin Çinli popülasyonda renal hücreli karsinom oluşumu ve ilerlemesi üzerinde önemli bir etkisinin bulunduğunu göstermiştir (122). Bizim yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlarda ise, Qin ve arkadaşlarının sonuçlarından (122) farklı olarak, Survivin promotorundaki 31G/C polimorfizmi ile meme kanseri prognozu arasında bir anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Ayrıca kontrol ve meme kanseri grupları arasında Survivin 31G/C promotor polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemesine karşın ( $p=0,058$ ), sonuçlar istatistiksel ilişki anlam sınırına çok yakın bulunmuştur.

Upadhyay ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (123) Kuzey Hindistan' daki bir popülasyonda Survivin 31G/C promotor polimorfizmi ile özofagus kanseri ilişkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Survivin 31G/C promotor polimorfizmi özellikle squamoz hücreli karsinom histopatolojisi bulunan erkek hastalarda özofagus kanseri hassasiyeti ile ilişkili olarak bulunmuştur. Ancak, Survivin geni genetik varyantlarının özofagus kanseri prognozunda önemli rollerinin olmadığı belirtilmiştir (123). Bizim çalışmamızda da Survivin 31G/C promotor polimorfizmi ile meme kanseri prognozu arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Yang ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada (124), Çinli bir popülasyonda, Survivin promotor

polimorfizmlerinin, özofagus'un squamoz (yassı) hücreli karsinomu ile olan ilişkisini incelemişlerdir. Yang ve arkadaşları bu çalışmada, yassı hücreli yemek borusu kanseri olan hastalarında ve bir kontrol grubunda 31G/C, 241T/C, 625G/C, ve 644T/C polimorfizmlerinin ilişkilerine bakmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, çalışma yapılan Çinli popülasyonda, Survivin promotor polimorfizmlerinden olan 625G/C'nin, yassı hücreli yemek borusu kanseri duyarlılığını, muhtemelen Survivin ekspresyonu üzerine nüfuz göstererek etkileyebileceğini belirtilmiştir. Yaptıkları bu vaka-kontrol grubu çalışması ile Survivin promotorundaki tek nükleotid polimorfizmi ile squamoz hücreli yemek borusu kanseri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermişleridir (124). Bizim sonuçlarımızda ise, Upadhyay ve arkadaşları (123) ile Yang ve arkadaşlarının (124) elde ettikleri bulgulardan farklı olarak, Survivin 31G/C promotor polimorfizmi ile meme kanseri oluşumuna yatkınlık açısından aralarında anlamlı bir ilişkili bulunmamıştır. Kontrol ve meme kanseri grupları arasında, Survivin 31G/C promotor polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemesine karşın ( $p=0,058$ ), sonuçlar istatistiksel ilişki anlam sınırına çok yakın bulunmuştur.

Borges ve arkadaşları Brezilyalı bir popülasyonda yaptıkları çalışmada (125), Survivin 31G/C polimorfizmi ile mide kanseri ilişkisini incelemişlerdir. Kanserli hastalar ve kontrol grupları arasında genotip ve allel sıklığı açısından fark bulamamışlardır. Benzer olarak bizim çalışmamızda da kontrol ve meme kanseri grupları arasında Survivin 31G/C promotor polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ( $p=0,058$ ). Fakat bizim çalışmamızda aralarındaki istatistiksel ilişki anlam sınırına çok yakın bulundu. Üzerinde çalışılan seri yeterince büyütülürse aralarındaki ilişkinin istatistiksel anlam seviyesinde çıkabileceği kanaatindeyiz. Li Yang ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada (126), Çinli bir



popülasyonda Survivin 31G/C polimorfizmi ile mide kanseri riski ilişkisini incelemişlerdir. Survivin 31G/C polimorfizminin, Çinli popülasyonda distal mide kanseri ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Varyant genotip ‘GG + CC’ de, iyi diferansiye tümör varlığı ile ve lenf bezi metastazının yokluğu ile ilişkili bulunmuştur. Bizim çalışma sonuçlarımızda ise kanser grubu içerisinde Survivin promotor polimorfizmi açısından GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında, tümör çapı evresi (TNM) yönünden ( $p=0,508$ ), grade yönünden ( $p=0,613$ ), lenf kanal invazyonu, lenfatik metastaz, metastatik lenf nodu sayısı, lenfatik metastaz grubu (TNM) ve perinodal yayılım açısından ( $p>0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Literatürde Survivin promotor bölgede C allelini içeren bir haplotid taşımanın çeşitli kanserlere yatkınlık ile olan ilişkisini ya da bu durumun hastalığın prognostik parametreleriyle olan ilişkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır.

Yazdani ve arkadaşları İranlı bir popülasyonda yaptıkları çalışmada (128); Survivin 31G/C polimorfizminin papiller tiroid kanseri ile olan ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçları, Survivin 31G/C polimorfizminin, çalışmanın yapıldığı İranlı popülasyonda papiller tiroid kanseri riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, papiller tiroid kanserli hastalarda, GC veya CC genotipinin sıklığı, kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada C allelerinin bulunması, papiller tiroid kanseri için predispozan bir faktör olarak kabul edilmiştir. Aynı zamanada, lenf bezi tutulumu, vasküler tutulum ve multifokalite gibi şiddetli belirtileri olan hastalarda, C allelinin sıklığı da, daha yüksek bulunmuştur. Zahedi ve

arkadaşları tarafından yine İran'lı bir popülasyonda yapılan çalışmada (129) ise, Survivin geni polimorfizminde bulunan C allelinin, endometriyal kanserli hastalarda anlamlı ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur. Zahedi ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmayla (129), Survivin'in endometriyal kanser patogenezinde rol oynadığını göstermişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada ise, GC veya CC genotipi taşıyanlarda, GG genotipini taşıyanlara oranla kanser gelişme riski istatistiksel açıdan anlamlı olarak 1,413 kat yüksek bulunmuştur (%95 Güven Aralığı: 1,040-1,918 ). Elde ettiğimiz sonuçlarda, kontrol grubuna göre kanser grubunda, GC+CC genotipi taşıma (31 GC veya 31CC genotiplerinden birine sahip olmak) (ya da C allelini taşıma) oranı istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p=0,023$ ). GC+CC, kanserli hastaların %59'unda bulunurken, kontrol grubunun %38'inde bulunmaktadır. Bu verilere göre, Survivin geninde promotor bölgede C allelini taşımak (31 GC veya 31CC) meme kanserine yatkınlık açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmaktadır. Bu açıdan sonuçlarımız, Yazdani ve arkadaşları (128) ile ayrıca Zahedi ve arkadaşları ile (129) uyumludur. Ancak Yazdani ve arkadaşlarından farklı olarak bizim çalışmamızda, kanser grubu içerisinde, Survivin promotor polimorfizmi açısından, GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında, multifokal-multisentrik meme kanseri sıklığı yönünden ( $p=0,159$ ), lenf kanal invazyonu, vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenfatik metastaz ve metastatik lenf nodu sayısı yönünden ( $p>0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi.

Gazouli ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada (117), Survivin gen promotorunda (31 G/C) yaygın olarak bulunan bir polimorfizmin, Survivin ekspresyonunu ve kanser riskini etkilediğini göstermişlerdir. Çalışmalarında, Survivin 31G/C polimorfizminin sporadik kolorektal kanserin prognozunda, ortaya çıkışında ve

sağ kalımda bir rolünün olup olmadığını incelemişlerdir. Survivin 31C alleli ve CC genotipinin frekansları, kolorektal kanserli hastalarda sağlıklı bireylere nazaran anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0,0001$ ). Çalışmanın sonucunda; 31CC genotipinin ve 31C allelinin anlamlı ölçüde artan kolorektal karsinom riski ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca 31CC varlığının kolorektal karsinom hastalarının sağ kalımını olumsuz yönde etkilediğini de belirtmişlerdir. Fuchao Ma ve arkadaşları tarafından Çin'deki Guangxi popülasyonunda yapılan çalışmada (130), 31CC genotipini taşıyan bireylerde nazofaringeal karsinoma yakalanma riski, GC veya GG genotiplerini taşıyanlara nazaran daha yüksek bulunmuştur. Yine son zamanlarda Jang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (119), akciğer kanserli hastalar ve kontrol grubu arasında Survivin promotor 31G/C genotip dağılımını istatistiksel olarak farklı bulmuşlardır. Çalışmaları sonucunda en azından bir G alleli taşıyan bireylerde, akciğer kanseri riskinin CC genotipi taşıyanlara göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha az olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada G allelinin, C allele göre anlamlı ölçüde daha az promotor aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Böylece Jang ve arkadaşları bu çalışmalarına, 31G allelinin, 31C allele nazaran anlamlı ölçüde daha az transkripsiyonel faaliyet gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca yine bu çalışmayla, 31G/C polimorfizminin Survivin ekspresyonunu etkilediğini ve bunun akciğer kanserine karşı genetik hassasiyete katkı yaptığını bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızın Survivin 31G/C polimorfizmi ile ilgili sonuçlarında ise, Jang ve arkadaşlarından farklı olarak, Survivin promotorundaki 31G/C polimorfizmi ile meme kanserine yatkınlık veya kanser prognozu arasında bir anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Kontrol ve meme kanseri grupları arasında Survivin 31 G/C promotor polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemesine

karşın ( $p=0,058$ ), sonuçlar istatistiksel ilişki anlam sınırına çok yakın bulunmuştur. Ayrıca, GC veya CC genotipi taşıyanların, GG genotipini taşıyanlara oranla kanser gelişme riski istatistiksel açıdan anlamlı olarak 1,413 kat yüksek bulunmuştur (%95 Güven Aralığı: 1,040-1,918 ). Elde edilen sonuçlarda, kontrol grubuna göre kanser grubunda, GC+CC genotipi taşıma (31 GC veya 31CC genotiplerinden birine sahip olmak ) (ya da C allelini taşıma) oranı istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p=0,023$ ). GC+CC, kanserli hastaların %59'unda bulunurken, kontrol grubunun %38'inde bulunmaktadır. Bu sonuçlara göre, Survivin geninde promotor bölgede C allelini taşımak (31 GC veya 31CC) meme kanserine yatkınlık açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmaktadır. Jang ve arkadaşları da (119), in vitro promotor analizini kullanarak, 31G allelinin, 31C allele nazaran anlamlı ölçüde daha az transkripsiyonel faaliyet gösterdiğini bulmuşlardır. Bu açıdan sonuçlarımız Jang ve arkadaşlarının bu çalışması ile de uyumludur.

Theodoropoulos ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada (131), Kaspaz-9 ve Survivin gen polimorfizminin, pankreas kanseri riskine ve tümör karakteristiğine olan etkilerini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonuçları, 31CC genotipinin ve 31C allelinin artmış pankreas kanseri riski ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Diğer taraftan, 31CC genotipi ile ileri T evresi ve lenf bezi pozitifliği arasında güçlü bir ilişki gözlemlenmiştir. Theodoropoulos ve arkadaşları ile benzer şekilde bizim çalışmamızda da, CC genotipini taşımanın, kanser görülme riski üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Ancak Theodoropoulos ve arkadaşlarından farklı olarak bizim çalışmamızda, kanser grubu içerisinde Survivin promotor polimorfizmi açısından GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında tümör çapı evresi (TNM) açısından ( $p=0,508$ ), lenf kanal invazyonu, lenfatik metastaz, metastatik lenf

nodu sayısı, lenfatik metastaz grubu(TNM) ve perinodal yayılım açısından ( $p>0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir.

Yang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (124), özofagus skuamöz hücreli karsinom ile Survivin promotor 31G/C gen polimorfizmi ilişkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, C allelini içeren bir haplotid taşımanın özofagus skuamöz hücreli karsinom olma riskini etkileyebileceği öne sürülmüştür. Wang ve arkadaşları (127) Tayvan populasyonunda ürotelyal karsinom riski ile Survivin promotor 31G/C gen polimorfizmi ilişkisini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucuna göre ise, GC genotipini ve CC genotipini taşıyan bireylerdeki risk, GG genotipini taşıyan bireylerdeki riske göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca kasa invazyon yapmış yüksek evreli tümör taşıyan bireylerdeki CC genotipi frekansı, GG genotipine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda sonuçlarımızda da, Yang ve arkadaşları (124) ile ayrıca Wang ve arkadaşları (127) ile benzer olarak, GC veya CC genotipi taşıyanlarda kanser gelişme riski, GG genotipini taşıyanlara oranla istatistiksel açıdan anlamlı olarak 1,413 kat yüksek bulunmuştur (%95 Güven Aralığı: 1,040-1,918 ).

Literatürde Survivin ekspresyonu ile çeşitli kanserlere yatkınlık ilişkilerini inceleyen ya da Survivin ekspresyonunun çeşitli kanserlerin prognostik parametreleriyle olan ilişkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır.

Span ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (134), meme kanseri hastalarında risk sınıflandırmasında Survivin'in bağımsız bir prognostik faktör olarak rolünü incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada Survivin'in, kötü prognozla güçlü ve bağımsız bir ilişki gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca yüksek Survivin konsantrasyonlarının

östrojen reseptörü veya progesteron reseptörü negatif olan tümörlerle güçlü şekilde ilişkili olduğu görülmüştür. Survivin, daha uygun tedavi metodları için meme kanseri hastalarını sınıflandırmak üzere yeni bir marker olarak kullanılabilir veya tedavi için ümit verici yeni bir hedef olabilir denilmiştir. Survivin 31 G/C promotor polimorfizmini incelediğimiz bizim çalışmamızda ise hastalık prognozu ile Survivin 31 G/C promotor polimorfizmi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ayrıca kanser grubu içerisinde, Survivin promotor polimorfizmi açısından GG genotipini taşıyan grup ile GC+CC genotipini taşıyan gruplar arasında sırasıyla; Östrojen reseptör pozitifliği (ER), Progesteron Reseptör Pozitifliği (PR) ve C-Erb B2 pozitifliği yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Sırasıyla  $p=0,774$ ;  $p=0,596$  ve  $p=0,880$ ).

Span ve arkadaşları daha sonra yaptıkları başka bir çalışmada (103) ise, ileri evre meme kanserlerinde, yüksek Survivin değerlerinin endokrin tedaviye ve kemoterapiye yanıt ile olan ilişkisini incelemiştir. Çalışma sonucunda, yüksek Survivin düzeylerinin temel olarak endokrin tedaviye verilen kötü yanıtla ancak kemoterapiye verilen iyi yanıtla ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Nassar ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada (133), meme kanserlerinde Survivin ekspresyonunun apoptozis ve prognozla olan ilişkisini incelemiştir. Meme karsinomlarının çoğunda, diğer bir antiapoptotik marker olan bcl-x'le korelasyon gösteren Survivin ekspresyonunun görüldüğünü belirtmişlerdir ve her iki markerın da prognozla korelasyon eğiliminde olduğunu göstermişlerdir.

Bayram ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (135), bir Türk popülasyonunda Survivin 31G/C polimorfizmi ile hepatoselüler karsinom ilişkisi incelenmiştir.

Yaptıkları çalışmanın sonucunda, hepatoselüler karsinomlu hastalar ve kansersiz bireyler arasında 31G/C polimorfizminin genotip dağılımları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Genetik polimorfizmler etnik gruplar arasında farklılık gösterebilir. Bu açıdan bakıldığında, bir Türk popülasyonu üzerinde gerçekleştirilmiş olan bizim çalışmamızda da, Bayram ve arkadaşlarının sonuçlarına benzer şekilde, kontrol ve meme kanseri grupları arasında, Survivin 31G/C promotor polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ( $p=0,058$ ). Fakat bizim çalışmamızda aralarındaki istatistiksel ilişki anlam sınırına çok yakın bulundu. O yüzden biz, çalışma yapılan popülasyon yeterince büyütülürse aralarındaki ilişkinin anlam seviyesinde çıkabileceği kanaatindeyiz.

Bulgularımızın doğrulanması için daha büyük örneklemeler kullanan başka çalışmalara gerek duyulmaktadır. Gelecekte yapılacak yeni çalışmalarla bulgularımızın desteklenmesi halinde, Survivin promotor bölge gen polimorfizmi, meme kanserinde tedavi yaklaşımlarına da yeni bir boyut katacaktır. Örneğin meme kanserine yönelik kuvvetli risk faktörü bulunan kadınlara, profilaktik mastektomi planlanırken, Survivin geni promotor bölge C alleli durumuna bakılmasının, böyle ciddi operasyonlara yönelik kararlar alınırken ilave destek sağlayacağı kanaatindeyiz. Genetik polimorfizmler etnik gruplar arasında farklılık gösterebileceği için, çeşitli etnik popülasyonlarda Survivin polimorfizmleri ve meme kanseri arasındaki ilişkinin açığa çıkarılmasına yönelik ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Bizim yapmış olduğumuz bu çalışma ise, gelecekte bu alanda yapılacak diğer çalışma ve incelemelere rehberlik edebilir diye düşünüyoruz.

## 6. SONUÇ

Bizim bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre, Survivin 31G/C promotor polimorfizmi ile meme kanserindeki tümör özellikleri arasında, meme kanserinin prognozu arasında ve multifokal-multisentrik meme kanserine yatkınlık açısından aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kontrol ve meme kanseri grupları arasında Survivin 31G/C promotor polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ( $p=0,058$ ). Fakat aralarındaki istatistiksel ilişki anlam sınırına çok yakın bulunmuştur. Üzerinde çalışılan seri yeterince büyütülürse aralarındaki ilişkinin anlam seviyesinde çıkabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca elde edilen sonuçlarda, GC veya CC genotipini taşıyanlarda, GG genotipini taşıyanlara oranla kanser gelişme riski istatistiksel açıdan anlamlı olarak 1,413 kat yüksek bulunmuştur. Survivin geni promotor polimorfizmleri açısından 31GG ile '31GC + 31CC' polimorfizmlerini kıyasladığımızda, Survivin geninde promotor bölgede C allelini taşımak meme kanserine yatkınlık açısından anlamlı bir fark oluşturmaktadır. Bulgularımızın doğrulanması için daha büyük örneklemeler kullanan başka çalışmalara gerek duyulmaktadır.



## 7.ÖZET

### MEME KANSERLERİ ÜZERİNE SURVİVİN GENİ PROMOTOR POLİMORFİZMİNİN ETKİSİ

**Dr. M. Deniz ALTIPARMAK**  
**Uzmanlık Tezi**  
**Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi**  
**Genel Cerrahi Anabilim Dalı**  
**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cenap DENER**  
**2013, ANKARA**

Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra en sık görülen 2. kanserdir. Kadınlar arasında ise, dünyada, en sık görülen malign tümör, meme kanseridir (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Ülkemizde, kadınlar arasında en sık görülen on kanser tipi içerisinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır (8). Survivin, IAP (Apoptozis İnhibitör Protein) ailesinin üyesi olan bir antiapoptotik proteindir. Survivin hem apoptozu baskılayan hem de hücre bölünmesini düzenleyen çift fonksiyonlu bir proteindir. Survivin; tümör hücrelerinde normal dokuya oranla farklı ekspresyonu olan birkaç proteinden biridir. Survivin'in akciğer, mide, kolon, meme, prostat, non-Hodgkin lenfoma gibi pek çok yaygın kanser türünde eksprese olduğu gözlenmiştir (10). Survivin'in tümörlerde aşırı ekspresyonu; sağkalımın kısalması, kemoterapiye direnç, radyoterapi direnci ve tümör reküransları ile ilgilidir (13). Survivin, potansiyel bir kanser markerı olup biyolojik sıvılarda tesbit edilebilir. Survivin molekülünü kodlayan genin, promotor bölgesi içinde tanımlanmış birkaç nükleotid polimorfizmi mevcuttur. Bunlardan biri de bizim çalışmamızda araştırdığımız CDE/CHR (Cell cycle dependent element/cell cycle gene homology region) repressör bağlama bölgesinde (ATG başlangıç kodununun ilk nükleotidine 31 baz çifti uzaklıkta) lokalize olan, o bölgeye ait Survivin promotor

31G/C polimorfizmidir. Bu polimorfizmin, Survivin'in hem mRNA hem de protein seviyelerindeki aşırı ekspresyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (20). Survivin promotor 31G/C gen polimorfizmi ile literatürde çeşitli kanser tiplerinde yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (20). Survivin'in 31G/C promotor polimorfizminin çeşitli tümörlerde yüksek oranda eksprese edildiği, tümör oluşumu, progresyonu ve tümörlerin prognozu ile ilgisi bilinmektedir. Biz de yapmış olduğumuz bu çalışmada meme kanserlerinde ve kontrol grubunda Survivin 31G/C promotor polimorfizmini araştırdık. Bu amaçla, hastanemiz genel cerrahi bölümü tarafından daha önceden ameliyat edilmiş, 54 multifokal-multisentrik meme CA hastasının ve 57 unifokal meme CA hastasının patolojik spesmenlerinden alınan doku örnekleri ile gerekli klinik bilgileri çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca 30 yaş üzeri, 101 sağlıklı kadın bireyin (Kontrol grubu) de aydınlatılmış onamları alındıktan sonra kan örnekleri alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Elde ettiğimiz verilerle, bu polimorfizmin unifokal ve multifokal-multisentrik meme kanserine yatkınlık yaratıp yaratmadığını ve yine bu polimorfizmin meme kanserli hastaların prognozuyla olan ilişkisini istatistiksel olarak ortaya koymayı amaçladık. Ayrıca bu çalışma, Survivin 31G/C promotor polimorfizminin, multifokal-multisentrik meme kanserlerinin oluşumuna yatkınlık yaratıp yaratmadığı hakkında da bize bilgi verecekti ki bu yönüyle de bildiğimiz kadarıyla literatürdeki ilk çalışma olarak tarafımızca planlanmıştı.

Daha önceden ameliyat edilmiş olan kanser hastalarının patolojik spesmenlerinden alınan dokularda ve kontrol grubu için sağlıklı kadınlardan alınmış kan örneklerinde PCR-DNA yöntemi kullanılarak Survivin 31G/C promotor polimorfizmi araştırıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, Survivin 31G/C promotor polimorfizmi ile meme kanserindeki tümör özellikleri arasında, meme

kanserinin prognozu arasında ve multifokal-multisentrik meme kanserine yakınlık açısından aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kontrol ve meme kanseri grupları arasında, Survivin 31G/C promotor polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ( $p=0,058$ ). Ancak sonuçlar istatistiksel ilişki anlam sınırına çok yakın bulunmuştur. Üzerinde çalışılan seri yeterince büyütülürse aralarındaki ilişkinin anlam seviyesinde çıkabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca elde edilen sonuçlarda, GC veya CC genotipini taşıyanlarda, GG genotipini taşıyanlara oranla kanser gelişme riski, istatistiksel açıdan anlamlı olarak 1,413 kat yüksek bulunmuştur (%95 Güven Aralığı: 1,040-1,918). Survivin geni promotor polimorfizmleri açısından 31GG ile (31GC + 31CC) polimorfizmlerini kıyasladığımızda, Survivin geninde promotor bölgede C allelini taşımak (31GC veya 31CC) meme kanserine yakınlık açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmaktadır. Fakat, bu çalışmada elde edilen bulgularımızın doğrulanması için, daha büyük örneklemeler kullanan başka çalışmalara gerek duyulmaktadır. Dahası, genetik polimorfizmler etnik gruplar arasında farklılık gösterebileceği için çeşitli etnik popülasyonlarda Survivin polimorfizmleri ve meme kanseri arasındaki ilişkinin açığa çıkarılmasına yönelik ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Bizim yapmış olduğumuz bu çalışma da gelecekte bu alanda yapılacak diğer çalışma ve incelemelere rehberlik edebilir diye düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri, Apoptoz inhibitör protein, Survivin, Survivin Geni promotor polimorfizmi

Bu çalışma Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

## **8.SUMMARY**

### **THE EFFECT OF SURVIVIN GENE PROMOTER POLYMORPHISM ON BREAST CANCER**

**Dr. M. Deniz ALTIPARMAK**  
**Thesis**  
**Turgut Özal University Medical Faculty**  
**Department of General Surgery**  
**Thesis Advisor: Prof. Dr. Cenap DENER**  
**2013, ANKARA**

Breast cancer is the 2nd most frequent type of cancer after lung cancer. Among women in the world, the most frequent type of malign tumor is breast cancer (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). In our country, breast cancer ranks first inside 10 most common cancer types among women (8). Survivin is a member of the IAP (Apoptosis Inhibitor Protein) family of antiapoptotic proteins. Survivin is a bifunctional protein that both suppresses apoptosis and regulates cell division. Survivin is one of the few proteins that has different expression in tumor cells compared to normal tissue. Survivin is observed to be expressed across most tumor cell types such as lung, gastric, colon, breast, prostate, non-Hodgkin lymphoma (10). Over expression of Survivin in tumors is related to survival contraction, resistance to chemotherapy, radiotherapy and tumor recurrence (13). Survivin, a potential marker of cancer, can be detected in biological fluids. The gene encoding Survivin molecule has a few nucleotide polymorphisms defined within the promoter region. In our study, we investigated one of those, the Survivin gene promoter 31G/C polymorphism of which is localized in the CDE/CHR (Cell cycle dependent element/cell cycle gene homology region) repressor binding site (-31 from the first

nucleotide of the ATG start codon). It is reported that this polymorphism can be associated with the over expression of Survivin in both mRNA and protein levels (20). In the literature, there are limited number studies done with Survivin promoter 31G/C gene polymorphism in different cancer types (20). It is known that Survivin 31G/C promoter polymorphism is highly expressed in a variety of tumors and there is relation between tumor formation, progression and prognosis of tumors. In our study, we investigated Survivin 31G/C polymorphism in breast cancer and control groups. For this reason, pathological specimens from tissue samples and necessary clinical data of 54 multifocal/multicentric breast CA patients and 57 unifocal breast CA patients who were operated in our hospital Department of General Surgery were included in the study. On the other hand, 101 healthy female subjects over the age of 30 (control group) were included in the study and their blood samples were taken after their informed consent. With the results we obtained, we aimed to determine whether this polymorphism causes susceptibility to unifocal and multifocal-multicentric breast cancer and the statistical relation of this polymorphism with the prognosis of patients with breast cancer. Moreover, as far as we know, this study was planned as the first study in the literature that would give us information about Survivin 31G/C promoter polymorphism creates a predisposition to the formation of multifocal-multicentric breast cancers.

Survivin 31G/C promoter polymorphism was investigated in pathological specimens taken from the tissues from cancer patients who underwent surgery before and blood samples taken from healthy women for the control group by using PCR-DNA. The results were analyzed statistically.

When obtained results were evaluated, no significant difference was found between Survivin 31G/C promoter polymorphism of tumor characteristics and breast cancer, prognosis of breast cancer and multifocal-multicentric breast cancer

susceptibility. Between the groups of control and breast cancer, Survivin promoter polymorphism 31G/C differences were not statistically significant ( $p = 0.058$ ). However, the results were very close to the limit of statistical significance relationship. We think that if the studied series enlarge enough, statistically significant difference between the two groups may occur. Due to results obtained, the risk of developing cancer, having the relevant GC or CC genotype, is 1,413 times higher than those having genotype GG (95% confidence interval: 1,040 to 1,918). In terms of Survivin gene promoter polymorphisms when compared to 31GG, (31G/C + 31CC) with polymorphisms, to carry C allele (31GC or 31CC) in the Survivin gene promoter region was found statistically significant in terms of susceptibility to breast cancer. But, in order to confirm our findings obtained in this study, other studies using larger samples are needed. Furthermore, since genetic polymorphisms may differ between ethnic groups, additional studies are needed to reveal the relationship between Survivin polymorphisms and breast cancer in various ethnic populations. We think that this study may guide future investigations in this area.

**Keywords:** Breast cancer, Apoptosis inhibitor protein, Survivin, Survivin gene promoter polymorphism

This study was supported by Turgut Ozal University Medical Faculty Scientific Research Projects Commission.

## 9. KAYNAKLAR

- 1) Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 2000; 50: 7-33.
- 2) Baring CC, Squires TS, Tang T. Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 1993; 43: 426.
- 3) Silvenberg E, Lubera J: Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 1987; 37: 19.
- 4) Contesso G. and Omar S. Breast Cancer. National Cancer Institute, Cairo University. 2001; 1-8.
- 5) Pisani P. Estimates of worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implication for prevention and projection of future burden. *Int J Cancer* 1993; 55: 891-903.
- 6) Ünal A. Meme Kanseri, bölüm 29. Ed: Ünal A. Klinik Cerrahi Onkoloji Ankara 1997; 389-404.
- 7) Ayhan F, Yorgancıoğlu R. Meme Kanseri ve Rehabilitasyon. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2006; 2: 39-48.
- 8) T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı. Kanser bildirimlerinin değerlendirilmesi, 1991-1992. Ankara 1994: 554
- 9) Altieri D.C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Lat Rev Cancer* 2003;3:46-54.
- 10) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3:917-921.
- 11) Sah N.K, Khan Z., Khan G.J., Bisen P.S Structural, Functional, Therapeutic Biology of Survivin, (Mini review) *Cancer Letters* 2006;244 : 164-171

- 12) Li Fengzili., Ambrosini G., Chu E.Y., Plescia J, Tognin S., Carlomarchisio P, Altieri D.C., Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998 396:580–584,
- 13) Takai N., Miyazaki T., Nishida M, Nasu K., I. Miyakawa, Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior, and survival rate in endometrial carcinoma, *Cancer Lett.* 2002;184:105–116.
- 14) Ziegler D.S., Andrew L. K, and Kieran M W .Anti-Apoptosis mechanisms in malignant glioms, *J Clin Oncol* , 2008;26,493-500.
- 15) Tetsuhisa Y., Nobuhiko T., The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer, *Med. Electron. Microsc.* 2001,34: 12–20.
- 16) Salvesen, G. S. & Duckett, C. S. IAP proteins: blocking the road to death“ s door. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2002;3, 401–410 .
- 17) Altieri D.C.The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy, *Trends Mol. Med.*2001;12:542-547.
- 18) Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998;351:882-883.
- 19) Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H J. Okuda, I. Watanabe, T. Yamamoto *ve ark.* Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001; 91: 2026–32
- 20) Xu Y, Fang F, Ludewig G, *ve ark.* A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DIA Cell Biol* 2004;23:527-37.
- 21) Schwartz’s Cerrahinin İlkeleri, Sekizinci Baskı, Tarlan Ltd. Şti., 2008, ISBN:978-605-895-12-0-4
- 22) Dr. Nejat Dalay, Temel Bilimler Ve Laboratuvar: Moleküler Biyolog Bakışı, Derleme-Review, Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics 2011;4(2):1-6



- 23) Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):789-99.
- 24) Schwartz's Principles of Surgery, Ninth Edition The McGraw-Hill Companies, Inc. Book ISBN 978-0-07-1547703
- 25) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004 Oct 21;431(7011):931-45.
- 26) Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature.* 2010 Jan 14;463(7278):191-6. Epub 2009 Dec 16.
- 27) Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second generation sequencing. *Nat Rev Genet* 2010;11(10);685
- 28) Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, et al. The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers. *Cancer Cell.* 2008 Jun;13(6):519-28
- 29) Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell.* 2011 Jan 7;144(1):27-40.
- 30) Bleeker FE, Bardelli A. Genomic landscapes of cancers: prospects for targeted therapies. *Pharmacogenomics.* 2007 Dec;8(12):1629-33
- 31) Dr. F. Ajlan Tükün, Onkoloji Tanı Uygulamalarında Tıbbi Genetik, *Türkiye Klinikleri J Med Oncol-- Special Topics* 2011;4(2):7—15
- 32) Dr. Canfeza Sezgin, Klinik Onkolojide Moleküler Tanı Kullanımı: Meme Tümörleri, *Türkiye Klinikleri J Med Oncol- Special Topics* 2011;4(2):37—42
- 33) Habel L, Shak S, Jacobs MK et al. A Population – based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node – negative patients *Breast Cancer Res.* 2006;8;25

- 34) Haagensen CD. Physicians role in detection and diagnosis of breast disease. In: Haagensen CD, ed. Disease of the breast. 3rd edition. Philadelphia, London. W.B.Saunders: 516-576; 1986.
- 35) Sivenberg E, Lubera J. Cancer Statistics 1987. C.A. *Cancer J Clin* 37: 19,
- 36) Fisher B. Malignancies of the Breast. In: Cameron RB (eds), Practical Oncology. Appleton & Lange, Connecticut 1994, pp 417-434.
- 37) Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX. Manuel of Clinical Oncology. (5 th ed).UICC, Genova 1990, pp 236-248. (Türkçeye çevrilmiş besinci baskı, 1992. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savas Dairesi Başkanlığı ve Türk Kanser Arastırma ve Savas Kurumu işbirliği ile yayınlanmıştır)
- 38) Saip P, Keskin S, Özkan M, Kaplan MA, Aydoğan F, Demirağ GG , Uzunoğlu S, Engin H, Başaran G, Güler N, Uygun K, Demirkan B, Özdemir F, Çubukçu E, Salepçi T, Çiçin İ. “Türkiye’de Meme Kanseri Hastalarının Tanı Ve Tedavi Yöntemlerine Ulaşım Hızı; Çok Merkezli Gözlemsel Çalışma”, Meme Sağlığı Dergisi 2011;7:2
- 39) Ozmen V, Breast cancer in the World and Turkey, J Breast Health, 2008; 4: 6–12.
- 40) Tannock IF, Hill RP(eds): *The Basic Science of Oncology*. 2nd ed. New York, McGraw - Hill, 1992
- 41) Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med 2007;356(16): 1670-4.
- 42) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: URL: <http://globocan.iarc.fr>

- 43) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26:239-257.
- 44) Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994; 73: 2013-2019.
- 45) Yılmaz S, Aylı M: Apoptozis. *Güncel Gastroenteroloji*, 2000; 25:362-368.
- 46) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 267: 1456-1462.
- 47) Behnia M, Robertson KA, Martin WJ: Lung infections: Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest*, 2000; 117: 1771-1777.
- 48) Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 1992; 148:2207-2212.
- 49) Martin SJ, Reuterlingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of bcl-2 and abl. *J Exp Med*, 1995; 182: 1545-1552.
- 50) Mountz JD, Zhou T: Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- 51) Sheikh MS, Fornace AJ Jr. : Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol*, 2000. 182:171- 181.
- 52) Horvitz HR: Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*, 1999; 59 Suppl:1701-1706.
- 53) Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR: Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmun hepatitis. *Liver*, 2001; 21(4):272-279.

- 54) Cotran RS, Kumar V, Collins T: Cell Injury and Cell Death. In: Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: *WB Saunders*: 18-25, 1999.
- 55) Griffith TS, Ferguson TA: The FasL-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 1995; 270: 1189-1192.
- 56) Wallis RS, Kalyjian R, Jacobson JM: Brief report: A study of the immunology, virology and safety of prednisone in HIV-1 infected subject with CD 4 cell counts of 200 to 700 mm<sup>3</sup>. *J Immune Defic Syndr*, 2003; 32(3): 281-286.
- 57) Savinov AY, Tcherepanov A, Gren EA, Flavel RA: Contribution of FAS to diabetes development. *Proc Natl Acad Sci*, 2003; 100(2): 628-632.
- 58) Guillot R, Bringer AF, Porokhov B, Guillausseau PJ, Feldman G: Increased levels of soluble Fas in serum from diabetic patients with neuropathy. *Diabetes Metab*, 2001; 27(3): 315-321.
- 59) Kumar D, Lou H, Singal PK: Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz*, 2002; 27(7):662-668.
- 60) Fisher DE: Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell*, 1994; 78:539-545.
- 61) Hannun YA: Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, 1997; 89:1845-1852.
- 62) Kumar V, Abbas A, Fausto N. Cellular Adaptations, Cell Injury and Cell Death. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N., eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Elsevier Philadelphia, 2005:26-32.
- 63) Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002;9:142-148.
- 64) Turgut B., Demir T., Çeliker Ü. Oftalmolojide Apoptoz. Fırat Tıp Dergisi 2006;11: 6-11.

- 65) Zhang H.J., Zhang Y. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Research Reviews* 2003;2:357-366.
- 66) Petak I., Houghton J.A., Kopper L. Molecular targeting of cell death signal transduction pathways in cancer. *Current Signal Transduction Therapy* 2006;1:113-131.
- 67) Jha K., Pandey M., Kumar M., Shukla V. K., Survivin expression and correlation with clinico-pathological parameters in breast cancer, *World J Pathol* 2012;1:23-30
- 68) Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, et al: Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 19:388-98, 1999
- 69) Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D: The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 14:231-43, 2004
- 70) Deveraux QL, Reed JC: IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-52, 1999
- 71) Verdecia MA, Huang H, Dutil E, et al: Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 7:602-8, 2000
- 72) Kaitna S, Mendoza M, Jantsch-Plunger V, et al: Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr Biol* 10:1172-81, 2000
- 73) Lens SMA, Wolthuis RMF, Klompaker R, et al: Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *Eur. Mol. Biol. Org. J* 22:2934–2947, 2003
- 74) Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, et al: Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* 59:1406-12, 2002

- 75) Rodel C, Haas J, Groth A, et al: Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: survivin as a radioresistance factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55:1341-7, 2003
- 76) Tran J, Master Z, Yu JL, et al: A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4349-54, 2002
- 77) Yamamoto T, Manome Y, Miyamoto A, et al: [Development of a novel gene therapy using survivin antisense expressing adenoviral vectors]. *Gan To Kagaku Ryoho* 30:1805-8, 2003
- 78) Yamamoto T, Tanigawa N: The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc* 34:207- 12, 2001
- 79) Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996;14:2685–2694
- 80) Clem RJ, Miller LK. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol Biol Cell* 1994;14:5212–5222
- 81) Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM. Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 1995;83:1253–1262
- 82) Takahashi R, Deveraux QL, Tamm I, et al. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 1998;273:7787–7790
- 83) Adida C, Crotty PL, McGrath J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 152: 43–49.

- 84) Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, Altieri DC. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 16;98(2):635-40.
- 85) Walsh K, Smith RC, Kim HS: Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. Circ Res 2000; 87: 184-188.
- 86) Toronyi E, Hemar J, Magyar K et al. Antiapoptotic effects of (-)-deprenyl in rat kidney after ischemia-perfusion. Med Sci Monit 2002; 8(2): BR65-68.
- 87) Peng Q, Buz'Zard A, Lau B. Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid- $\beta$  peptide induced apoptosis in vitro. Med Sci Monit, 2002; 8(8): BR328-337.
- 88) Treib K, Lehner R, Stulnig T, et al. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. Eur J Surg Oncol 2003;29:379–382.
- 89) Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer. Br J Cancer 2003; 88:1077-83.
- 90) Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. Clin Cancer Res 2000; 6:127-34.
- 91) Okada E, Murai Y, Matsui K, et al. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. Cancer Lett 2001;163: 109–116
- 92) Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 2000; 31: 1080–1085.
- 93) Singh M, Bleile MJ, Shroyer AL, Heinz D, Jarboe EA, Shroyer KR. Analysis of survivin expression in a spectrum of benign to malignant lesions of the breast. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2004;12(4):296-304.

- 94) Span PN, Tjan-Heijnen VC, Heuvel JJ, de Kok JB, Foekens JA, Sweep FC. Do the survivin (BIRC5) splice variants modulate or add to the prognostic value of total survivin in breast cancer Clin Chem. 2006 ;52(9):1693-700.
- 95) Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. Endocrinology 2003;144:4562–74.
- 96) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000;406:747–52.
- 97) Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. Cancer Res 2001;61:5979–84.
- 98) Zaffaroni N, Daidone MG. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. Drug Resist Updat 2002;5:65–72.
- 99) Manders P, Sweep CGJ, Tjan-Heijnen VCG, et al. Vascular endothelial growth factor independently predicts the efficacy of postoperative radiotherapy in node - negative breast cancer patients. Clin Cancer Res 2003; 9:6363–70.
- 100) Manders P, Beex LVAM, Tjan-Heijnen VCG, Span PN, Sweep CGJ. Vascular endothelial growth factor is associated with the efficacy of endocrine therapy in patients with advanced breast carcinoma. Cancer 2003;98:2125–32.
- 101) Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Hopfner M, et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 2003;88: 115–9.
- 102) Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, et al. Nuclear survivin expression in Mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. Am J Pathol 2004;164: 501–10.



- 103) Span PN, Vivianne C.G. Tjan-Heijnen, et al. High survivin predicts a poor response to endocrine therapy, but a good response to chemotherapy in advanced breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* (2006) 98: 223–230
- 104) Altieri D. C., Marchisio C. Surviving apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation. *J. Lab. Invest* 1999;79:1327-1333.
- 105) Konno R., Yamakawa H., Ito K., Sato S., Yajima A, Expression of survivin and bcl2 in the normal human endometrium, *Mol. Hum. Report* 2000;6:529–534.
- 106) Endoh A., Asanuma K., Moriai R., Yamada M., Koyanagi Y., Sato T., et al. Expression of survivin mRNA in CD34C cell, *Clin. Chim. Acta* 2001;306: 149–151.
- 107) Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adults tissues. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1087–98.
- 108) Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002; 21: 315–20.
- 109) Sarela AI, Macadam RCA, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645–50.
- 110) Ikeguchi M, Kaibara N. Survivin messenger RNA expression is a good prognostic biomarker for oesophageal cancer. *Br J Cancer* 2002; 87: 883–7.
- 111) Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2002; 11: 33–40.
- 112) Monzo M, Rosell R, Felip E, et al: A novel anti-apoptoz gene: reexpression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999;17:2100–2104,

- 113) Chakravarti A, Noll E, Black PM ve ark. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human glioms. *J Clin Oncol* 2002;20:1063– 1068.
- 114) Mori A, Wada H, Nishimura Y, Okamoto T, Takemoto Y, Kakishita E.Expression of the antiapoptoz gene survivin in human leukemia. *Int J Hematol* 2002; 75: 161–5.
- 115) Kato J, Kuwahara Y, Mitani M ve ark. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 2001;95: 92–5.
- 116) Rodel F, Hoffman J, Distel L ve ark. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 4881–7.
- 117) Gazouli M., Tzanakis N., Rallis G., Theodoropoulos G., Papaconstantinou I., Kostakis A., Anagnou N. P., Nikiteas N., Survivin -31G/C promoter polymorphism and sporadic colorectal cancer, *Int J Colorectal Dis* (2009) 24:145–150
- 118) Cheng ZJ, Hu LH, Huang SJ. Correlation of -31G/C polymorphisms of survivin promoter to tumorigenesis of gastric carcinoma. *Ai Zheng*. 2008;27(3):258-63.
- 119) Jang J. S., Kim K. M., Kang K. H., Choi J. E., Lee W. K., Kim C. H., Kang Y. M., Kam S., Kim I, Jun J. E., Jung T. H., Park J. Y., Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer, *Lung Cancer* (2008) 60, 31—39
- 120) Borbe'ly A. A., Murvai M., Szarka K., Ko'nya J., Gergely L., Herna'di Z., Veress G., Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis, *J Clin Pathol* 2007;60:303–306.
- 121) Wagner M., Schmelz K., Dörken B., Tamm I., Epigenetic and genetic analysis of the survivin promoter in acute myeloid leukemia, *Leukemia Research* 32 (2008) 1054–1060

- 122) Qin C., Cao Q., Li P., Ju X., Wang M., Chen J., Wu Y., Meng X., Zhu J., Zhang Z., Lu Q., Yin C., Functional promoter -31G>C variant in survivin gene is associated with risk and progression of renal cell cancer in a Chinese population, 2012, PLoS ONE 7(1): e28829. doi:10.1371/journal.pone.0028829
- 123) Upadhyay R., Khurana R., Kumar S., Ghoshal U. C. and Mittal B., Role of survivin gene promoter polymorphism (-31G>C) in susceptibility and survival of esophageal cancer in Northern India, *Ann Surg Oncol* (2011) 18:880–887
- 124) Yang X., Xiong G., Chen X., Xu X., Wang K., Fu Y., Yang K., Bai Y., Polymorphisms of survivin promoter are associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma, *J Cancer Res Clin Oncol* (2009) 135:1341–1349
- 125) Borges B. D. N., Burbano R. R., Harada M. L., Survivin -31C/G polymorphism and gastric cancer risk in a Brazilian population, *Clin Exp Med* (2011) 11:189–193
- 126) Yang L., Zhu H., Zhou B., Gu H., Yan H., Tang N., Dong H., Sun Q., Cong R., Chen G., Wang B., The association between the survivin C-31G polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese population, *Dig Dis Sci* (2009) 54:1021–1028
- 127) Wang YH, Chiou HY, Lin CT, Hsieh HY, Wu CC, Hsu CD, Shen CH. Association between survivin gene promoter -31 C/G polymorphism and urothelial carcinoma risk in Taiwanese population. *Urology*. 2009 ;73(3):670-4.
- 128) Yazdani N., Sayahpour F. A., Haghpanah V., Amiri P., Farahani M. S., Moradi M., Mirmiran A., Khorsandi M. T., Larijani B., Mostaan L. V., Amoli M. M., Survivin gene polymorphism association with papillary thyroid carcinoma, *Pathology – Research and Practice* 208 (2012) 100–103
- 129) Zahedi P., Aminimoghaddam S., Sayahpour F. A., Haghpanah V., Amiri P., Fereidoni F., Mahrampour E., Larijani B., Bazzaz J. T., and Amoli M. M., Association of survivin gene polymorphism with endometrial cancer, *Int J Gynecol Cancer* 2012;22: 35-37

- 130) Ma F., Zhan H., Zhai Y., Huang W., Zhao C., Ou S., Zhou H., Yuan W., Wang Z., Wang H., Yue W., Yu L., Li P., Xia X., Cai M., Zhang Y., Cui Y., He F., Ma Y., Zhou G., Functional polymorphism -31C/G in the promoter of BIRC5 gene and risk of nasopharyngeal carcinoma among Chinese, 2011, PLoS ONE 6(2): e16748.
- 131) Theodoropoulos G. E., Michalopoulos N. V., Panoussopoulos S. G., Taka S., and Gazouli M., Effects of caspase-9 and survivin gene polymorphisms in pancreatic cancer risk and tumor characteristics, *Pancreas* 2010;39: 976—980
- 132) Kleinberg L., Florenes V. A., Nesland J. M., and Davidson B., Survivin a member of the inhibitors of apoptosis family, is down-regulated in breast carcinoma effusions, *Am J Clin Pathol* 2007;128:389-397
- 133) Nassar A., Sexton D., Cotsonis G., and Cohen C., Survivin expression in breast carcinoma: correlation with apoptosis and prognosis, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008;16:221–226
- 134) Span P. N. , Sweep F. C. G. J., Wiegerinck E. T. G., Tjan-Heijnen V. C. G., Manders P., Beex L. V. A. M., and Kok J. B. D., Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients, *Clinical Chemistry* 50:11, 1986–1993 (2004)
- 135) Bayram S., Akkız H., Bekar A., Akgöllü E., The association between the survivin —31G/C promoter polymorphism and hepatocellular carcinoma risk in a Turkish population, *Cancer Epidemiology* 35 (2011) 555–559
- 136) Meng Y, Xu H, Wang R, Ji Z: Impairment of signal transduction pathway on neuronal survival brains of Alzheimer's disease. *Zhounghua Bing Li Xue Zhi*, 2002; 31(6):500-505.