



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERLİ HASTALARDA CASP8 VE CASP9 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Asuman ÇELEBİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Recep ERÖZ

DÜZCE-2011



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERLİ HASTALARDA CASP8 VE CASP9 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Asuman ÇELEBİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Recep ERÖZ

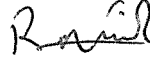
DÜZCE-2011

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Meme Kanserli Hastalarda CASP8 ve CASP9 Gen Polimorfizimlerinin Araştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 21/12/2011

TEZ SINAV JÜRİSİ



Yrd. Doç Dr. Recep ERÖZ
Düzce Üniversitesi
Başkan



Yrd. Doç. Dr. Kürşat Oğuz YAYKAŞLI
Düzce Üniversitesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Anzel BAHADIR
Düzce Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 01/02/2012 tarih ve 2015 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.




Yrd. Doç. Dr. Talat BAHÇEBAŞI
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

21.12.2011


Asuman ÇELEBİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilgisini ve deneyimini esirgemeyen, danışmanım, saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Recep ERÖZ' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sürecinde hoşgörü ve yönlendirmesiyle destek veren Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kürşat Oğuz YAYKAŞLI' ya teşekkür ederim.

Çalışmalarımızda bize destek veren, çalışma materyalinin sağlanmasında yardımcı olan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ali Kemal UZUNLAR, Yrd. Doç. Dr. Havva ERDEM ve Yrd. Doç. Dr. Ümran YILDIRIM' a, Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İsmet ÖZAYDIN' a ve Aile Hekimliği Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Davut BALTACI'ya teşekkür ederim.

Bu araştırmanın yapılması ve tezin hazırlanması sırasında başta maddi ve manevi olarak en büyük desteği gördüğüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİL, TABLO, GRAFİK VE RESİM LİSTESİ.....	vii
1. ÖZET	1
1. ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	5
2.2 Meme Kanseri Etiyolojisi	7
2.2.1. Meme kanseri etiyolojisinde önemli risk faktörleri.....	8
2.2.1.1. Endokrin nedenler.....	8
2.2.1.2. Çevresel faktörler.....	10
2.2.1.3. Aile öyküsü	11
2.2.1.4. Diğer nedenler.....	12
2.3. Meme Dokusunun Gelişimi ve Anatomisi.....	12
2.4. Meme Kanserinin Sınıflaması	14
2.5. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler	15
2.6. Meme Kanseri Genetiği	16
2.7. Apoptozis Tanımı ve Tarihçesi.....	17

2.7.1. Apoptozis ve nekrozis arasındaki farklar.....	18
2.7.2. Apoptozis ve kaspaz ailesi.....	19
2.7.3. Kaspazların yapısı.....	20
2.7.4. Prokaspaz Aktivasyonu.....	22
2.7.4.1. Ölüm reseptörü bağımlı prokaspaz aktivasyonu (Ekstrinsik yol).....	24
2.7.4.2. Mitokondri aracılı prokaspaz aktivasyonu (İntrinsik yol).....	25
2.8. Kaspaz 8 (CASP8) Geni.....	26
2.9. Kaspaz 9 (CASP9) Geni.....	27
2.10. Polimorfizm.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Gereçler.....	29
3.1.1. Biyolojik materyal.....	29
3.1.2. Cihazlar ve teknik malzemeler.....	29
3.1.3. Sarf malzemeler.....	30
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltiler.....	31
3.2. Yöntemler.....	32
3.2.1. DNA izolasyonu.....	33
3.2.2. DNA saflığı ve konsantrasyonunun ölçümü.....	34
3.2.3. PCR amplifikasyonu.....	34
3.2.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ve yorumlanması.....	36
3.2.5. RFLP yöntemi ile PCR ürünlerinin kesimi ve görüntülenmesi.....	36
3.2.6. İstatistiksel analizler.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Çalışma Grubu Bireylerinin Genel Bilgileri.....	38
4.2. Meme Kanseri Bireylerinde CASP8 D302H G/C ile CASP9 Q221R G/A, 83 C/T ve 5969 C/T Polimorfizmleri Sıklıkları Dağılımı.....	39

4.2.1. Meme kanserli bireylerde CASP8 geni SNP D302H G/C PCR ve enzim kesim sonuçları.....	39
4.2.2. Meme kanserli bireylerde CASP9 geni SNP Q221R G/A PCR ve enzim kesim sonuçları.....	42
4.2.3. Meme kanserli bireylerde CASP9 geni SNP 83 C/T PCR ve enzim kesim sonuçları.....	44
4.2.4. Meme kanserli bireylerde CASP9 geni SNP 5969 C/T PCR ve enzim kesim sonuçları.....	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
6. KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGE VE KISALTMALAR

A	Adenin
AIF	Apoptozisi indükleyici faktör
Apaf-1	Apoptozisi aktive edici faktör
Bax	Bcl-2 ile ilişkili X-proteini
Bcl	B hücre lenfoma onkogeni
bç	Baz çifti
BH-3	Bcl-2 homoloji domaini 3
Bid	Sadece BH-3 bölgesi içeren pro apoptotik protein
C	Sitozin
°C	Santigrat Derece
CARD	Kaspaz aktive eden bölge
CASP	Sistein Aspartat Proteaz
Ced	Hücre ölüm geni
DD	Ölüm bölgesi
DED	Ölüm oluşturan bölge
DIABLO	Doğruda AIP'a bağlanan düşük pI'lı protein
DISC	Ölüm başlatıcı sinyalleme kompleksi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Endo-G	Endonükleaz G
EtBr	Etidyum Bromid
FADD	Fas'a bağlı ölüm bölgesi
G	Guanin
HtrA2/Omi	Yüksek sıcaklık gereksinim proteini A2
IAP	Apoptozisi inhibe eden proteinler
ICE	İnterlökin 1b dönüştürücü enzim
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

NaCl	Sodyum klorür
NK	Doğal Öldürücü
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PK	Proteinaz K
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribo Nükleik Asit
Smac	İkinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SSCP	Tek iplikli komformasyon polimorfizmi
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
tBid	Kesik Bid
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TRADD	TNFR bağlı ölüm bölgesi
UV	Ultra Viyole

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
2.1 Normal meme dokusunun anatomik yapısı	13
2.2 Kaspaz ailesi üyelerinin temel yapısı.....	22
2.3 Apoptozisin moleküler mekanizması.....	23
2.4 DISC'te reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu	24
2.5 Apoptozomda mitokondri aracılı kaspaz aktivasyonu.....	26

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
2.1 Türkiye'de kadınlarda gözlenen tahmini meme kanser olgu sayısının yıllara göre dağılımı	7
2.2 Meme kanserinin histolojik sınıflandırılması	14
2.3 Kaspaz üyelerinin karakteristik yapısı ve fonksiyonu	21
3.1 Kaspaz 8 geni SNP D302H ve kaspaz 9 geni SNP'leri Q221R G/A, 83 C/T ve 5969 /T için kullanılan primer çiftleri.....	34
3.2 Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu	35
3.3 Optimal amplifikasyonların gerçekleştiği PCR programı ısı döngüleri	35
3.4 Amplifikasyon sonrası beklenen PCR ürün büyüklükleri	36
3.5 CASP8 ve CASP9 geni SNP'leri için uygun reaksiyon koşulları	36
3.6 Enzimlerin uygun bağlanma sıcaklıkları, tanıma bölgeleri ve kesim sonrası oluşan parça büyüklükleri.....	37
4.1 Meme kanserli bireylerin histopatolojik ve demografik bilgileri	40

4.2 Meme kanserli ve kontrol grubu bireylerde CASP8 D302H G/C polimorfizmi sıklık dağılımının gösterimi	41
4.3 Meme kanserli bireylerde CASP9 Q221R G/A polimorfizmi sıklık dağılımının gösterimi.....	43
4.4 Meme kanserli bireylerde CASP9 83 C/T polimorfizmi dağılımının gösterimi	44
4.5 Meme kanserli bireylerde CASP9 5969 C/T polimorfizminin sıklık dağılımının gösterimi.....	46

GRAFİK LİSTESİ

Sayfa no

2.1 Dünyada yaşa bağlı meme kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranı	6
---	---

RESİM LİSTESİ

Sayfa no

4.1 Meme kanserli bireylerde kaspaz 8 D302H G/C bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	41
4.2 Meme kanserli bireylerde kaspaz 8 D302H G/C bölgesi PCR ürünlerinin BstUI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü	41
4.3 Meme kanserli olmayan bireylerde kaspaz 8 D302H G/C bölgesi PCR ürünlerinin BstUI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü.....	42
4.4 Meme kanserli ve kontrol grubu bireylerde kaspaz 9 Q221R G/A bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	42
4.5 Meme kanserli bireylerde kaspaz 9 Q221R G/A bölgesi PCR ürünlerinin MspI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü	43
4.6 Meme kanserli olmayan bireylerde kaspaz 9 Q221R G/A bölgesi PCR ürünlerinin MspI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü.....	43

4.7	Meme kanserli ve kontrol grubu bireylerde kaspaz 9 83 C/T bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	44
4.8	Meme kanserli bireylerde kaspaz 9 83 C/T bölgesi PCR ürünlerinin AatII enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü	45
4.9	Meme kanserli olmayan bireylerde kaspaz 9 83 C/T bölgesi PCR ürünlerinin AatII enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü	45
4.10	Meme kanserli ve kontrol grubu bireylerde kaspaz 9 5969 C/T bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	46
4.11	Meme kanserli bireylerde kaspaz 9 5969 C/T bölgesi PCR ürünlerinin TaqI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü	46
4.12	Meme kanserli olmayan bireylerde kaspaz 9 5969 C/T bölgesi PCR ürünlerinin TaqI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü.....	47

ÖZET

MEME KANSERLİ HASTALARDA CASP8 VE CASP9 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Asuman ÇELEBİ

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Yrd. Doç. Dr. Recep ERÖZ

Aralık 2011, 72 sayfa

Meme kanseri tüm kanser türleri arasında kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. Meme kanserine neden olan risk faktörlerinin %5-10'luk kısmını kansere yatkınlık genlerinde meydana gelen kalıtsal mutasyonlar ve değişiklikler oluşturur. Kansere yatkınlık genlerindeki bu değişimlerin bir kısmı apoptozis mekanizmasının işlemesi esnasında gerçekleşir. Apoptozis (programlanmış hücre ölümü) doku homeostazından sorumlu olan, hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir süreçtir. Apoptozis mekanizmasının tetiklenmesi aşamasında veya herhangi bir basamağında meydana gelen değişiklikler tümör gelişimine katkıda bulunur. Kaspazlar olarak bilinen sistein proteazların büyük bir ailesi, yüksek organizmalarda apoptozisin yürütülmesinden sorumludur. CASP8 geni D302H polimorfizminin, meme kanseri oluşumu üzerine etkili olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Ancak bildiğimiz kadarıyla CASP9 geni Q221R G>A, 83 C/T ve 5969 C/T polimorfizmleri ile meme kanseri arasındaki ilişkiye ait araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, apoptotik hücre ölümü esnasında rol oynayan kaspaz genlerinden olan CASP8 (D302H) ve CASP9 (Q221R G>A, 83 C/T ve 5969 C/T) genlerinde bahsedilen polimorfizmler ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere planlanmıştır. Bu amaçla, çalışmamızda meme kanseri tanısı konularak ameliyat edilmiş olan 55 hasta ve meme kanseri dışı bir etkenden dolayı opere edilen 32 sağlıklı bireyin parafine gömülü doku örnekleri kullanıldı. Bu bireylerin parafine gömülü doku örneklerinden DNA izolasyon işlemi yapıldıktan sonra ilgili polimorfizmlerin araştırılması için PCR-RFLP yöntemi uygulandı. CASP8 geni D302H polimorfizmi C allelinin meme kanseri riskini azaltıcı etkiye sahip olduğu bulundu (p: 0.067). CASP9 geni 83 C/T polimorfizmi T alleli (p: 0.000) ve 5969 C/T polimorfizmi C allelinin (p: 0.000) meme kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bulundu. Ancak CASP9 geni Q221R polimorfizmi ile meme kanseri riski arasında bir ilişki bulunamadı.

Anahtar sözcükler: Meme kanseri, CASP8, CASP9, Polimorfizm

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CASP8 AND CASP9 GENE POLYMORPHISMS IN BREAST CANCER PATIENTS

Asuman ÇELEBİ

Master of Science Thesis, Department of Medical Biology and Genetic

Supervisor Asist. Prof. Dr. Recep ERÖZ

December 2011, 72 pages

Breast cancer is the most common type of cancer in women among all types of cancer. Inherited mutations and alterations in cancer susceptibility genes constitute 5-10 % of risk factors that cause breast cancer. Some of the changes in cancer susceptibility genes come into being during the process of the apoptosis mechanism. Apoptosis (programmed cell death) also known as suicide of cells is physiological event which is responsible for tissue homeostasis. In the triggering stage of the mechanism of apoptosis or alterations in any step of apoptosis could promote development of tumor tissue. A large family of cystein proteases, termed caspases, is responsible for the execution of apoptosis in higher eucaryotes. It has been identified in previous studies that D302H polymorphism of CASP8 gene effect the formation of breast cancer, but as far as we know no information was found for the relationship between breast cancer and Q221R G>A, 83 C/T and 5969 C/T polymorphisms of CASP9 gene. This study was planned to investigate the relationship between risk of breast cancer and mentioned polymorphisms of CASP8 (D302H) and CASP9 (Q221R G>A, 83 C/T, 5969 C/T) genes which play important role during cell death. For this aim, in our study, paraffin-embedded tissue samples belonging to 55 patients who had been operated by diagnosed breast cancer and 32 healthy individuals who had been operated caused of non-breast cancer was studied. After the isolation of DNA from this individuals' paraffin-embedded tissue samples, PCR-RFLP method was applied for investigation of related polimorphisms. C allele of CASP8 gene, D302H polymorphism, was found to be associated with a reduced risk of breast cancer (p:0.067). C allele of 83 C/T polymorphism (p:0.000) and T allele of 5969 C/T polymorphism (p:0.000) of CASP9 gene was found to have a protective effect towards breast cancer. But not found to be associated with breast cancer risk and CASP9 gene Q221R G/A polymorphism.

Key words: Breast cancer, CASP8, CASP9, Polymorphism

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, ekonomik olarak gelişmiş olan ülkelerde önde gelen ölüm nedeni olmasına rağmen, gelişmekte olan ülkelerde ölüme yol açan ikinci etkindir. Meme kanseri, tüm dünyada kadınlar arasında en sık tanı alan kanser türüdür ve kanserden ölümlerin önde gelen sebebidir¹.

Meme kanserine neden olan pek çok risk faktörü vardır. Bilinen risk faktörlerinin başında hormonların yaşam düzeylerini etkileyen yaş, ilk normal zamanlı gebelik, erken menarş, geç menopoz ve meme yoğunluğu gelir^{2,3}. Ancak meme kanseri olgularının büyük bir yüzdesi bu risk faktörleriyle açıklansa da bazılarında cevap olamaz³. Bu olguların % 5-10'una meme kanserine yatkınlık genlerinde meydana gelen kalıtsal mutasyonların ve değişikliklerin sebep olduğu düşünülmektedir². Kansere yatkınlık genleri apoptozis mekanizmasının da aralarında bulunduğu pek çok işlevlere aracılık ederler. Bu işlevlerin herhangi bir basamağında meydana gelen değişimler kişilerin meme kanserine duyarlılıklarını arttırır.

Apoptozis olayı; hücre ölümünü yöneten, programlanmış sinyal yollarının aracılık ettiği, aktivasyonu ekstraselüler ya da intraselüler uyaranların bir çeşidi ile başlatılan aktif bir süreçtir⁴. Çoklu gen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzim olan kaspazlar apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynamaktadır⁵. Kaspazlar normal hücrede inaktif zimojenler (prokaspaz) olarak ifade edilirler ve kaspaz enzim kaskadının işlemesi için aktive olmaları gereklidir⁶. Memelilerde apoptozisi başlatan kaspazlar, hücre dışı ligantlar tarafından (ekstrinsik yol [reseptör-aracılı]) veya hücre dışı/ içi streslerin (intrinsik [mitokondriyal]) biri tarafından aktive edilirler. Aktivasyon sonrasında apoptozis olayı başlar^{7,8}. Başlatıcı kaspazlar (CASP6, 8, 9, 10) apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara (CASP2, 3, 7) iletirler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar⁹.

Bu çalışmada, kaspaz gen ailesinin başlatıcı kaspazlarından olan kaspaz 8 (D302H;rs1045485) ve kaspaz 9 (Q221R G/A;rs1052576, 83 C/T;rs1052571, 5969 C/T;rs4646008) genlerine ait 4 farklı tek nükleotid polimorfizminin Türk

populasyonunda meme kanseri üzerindeki olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece Amerika, Birleşik Krallık ve Almanya populasyonlarında meme dokusunda çalışılmış olan kaspaz 8'deki D302H polimorfizmi¹⁰ ve bildiğimiz kadarıyla meme dokusunda hiç çalışılmamış olan kaspaz 9 daki Q221R G/A, 83 C/T ve 5969 C/T polimorfizmlerinin Türk populasyonundaki taşınma sıklığı ve bunların meme kanseriyle ilişkisi tespit edilerek literatürdeki bu eksiklik giderilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

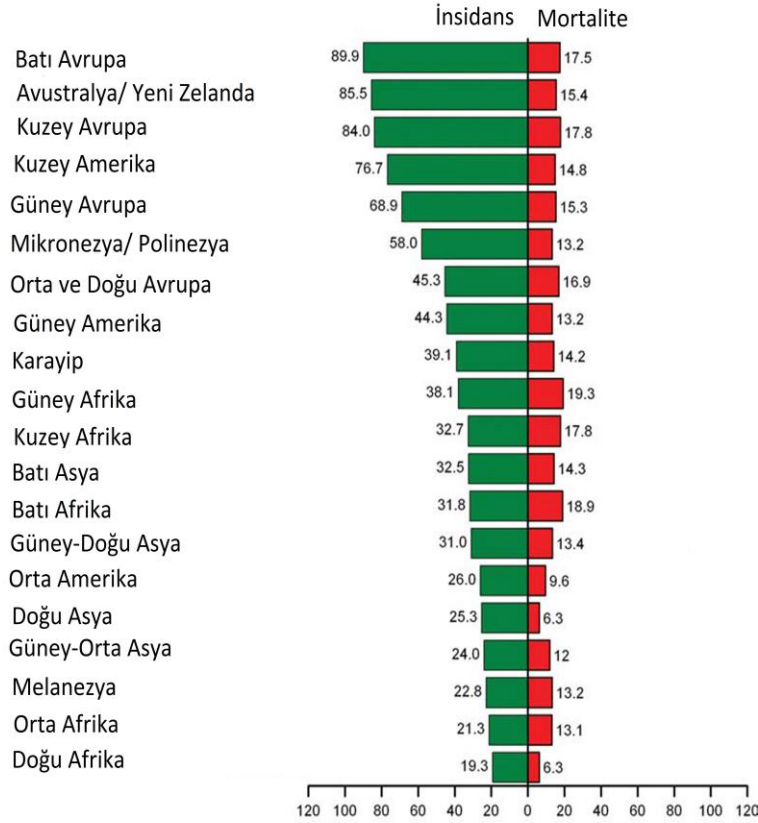
2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri kadınlarda görülen tüm kanserlerin %33'ünü ve kansere bağlı ölümlerin ise % 20'sini oluşturması ile en yaygın kanser türü haline gelmiştir. Ancak erkeklerde tüm kanserlerin % 1'den daha az bir kısmını oluşturmaktadır^{11,12}. Meme kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranları farklı coğrafik bölgelere göre değişkenlik gösterir. Gelişmiş ülkelerde bu oranlar en yüksektir. Ancak düşük gelirli ve Türkiye'nin de dahil olduğu orta gelirli ülkelerde meme kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranları büyük farklılıklar gösterir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO-World Healthy Organization) ülkeleri, kaynaklarına göre dört farklı kategoride sınıflandırmıştır. Bu kategoriler; basit, kısıtlı, gelişmiş ve en büyük şeklinde sınıflandırılmaktadır. Türkiye kaynakları ile ilgili olarak, kısıtlı ve gelişmiş düzeyleri arasında bulunan orta gelirli bir ülke olarak kabul edilmektedir¹³.

Batı ülkelerinde (İngiltere, Fransa, US, Avustralya gibi), 1980'lerin sonu ve 1990'larda gözlenen meme kanseri görülme sıklığı artışları; tarama mamografisi ile erken teşhis, menopozal hormon yerine koyma (replasman) tedavisi uygulamasındaki değişiklikler ve gelişmiş tedavi yöntemleri sayesinde 2000'li yılların başlarında azalmaya başlamıştır^{1,14,15}. Ancak çoğu Afrika ve Asya ülkesinde reproduktif faktörler, beslenme, meme kanseri tanısının konulması gibi birçok etken nedeniyle bu oran artış göstermektedir^{1,16}. Sadece 2000 yılında 1 milyondan fazla kadına meme kanseri tanısı konulmuş (kadınlarda kanser tanısı konmuş olguların % 22'si) ve bunların 373000'i (kadınlar arasındaki tüm kanser ölümlerinin % 14'ü) hayatını kaybetmiştir¹⁴.

Dünya çapında 2008'de yapılan araştırmalar sonucunda 12.7 milyon kanser olgusunun tespit edildiği ve 7.6 milyon (tüm ölümlerin yaklaşık % 13'ü) kansere bağlı ölümlerin meydana geldiği tahmin edilmektedir. Olguların % 56'sı ve ölümlerin % 64'ü ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (Grafik 2.1). Kadınlarda meme kanseri, erkeklerde akciğer kanseri en sık tanı konulan kanserler olmasının yanı sıra hem

gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde her iki cinsiyet için de bu kanserler başlıca ölüm nedenini oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde bu kanserleri erkeklerde mide ve karaciğer, kadınlarda rahim ağzı ve akciğer kanserleri; gelişmiş ülkelerde ise erkeklerde akciğer ve prostat, kadınlarda kolon ve akciğer kanserleri izlemektedir¹.



Grafik 2.1: Dünyada yaşa bağlı meme kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranı. Yaş standardize edilmiş ve veriler her iki koşul için de 100000 alınmıştır¹.

Meme kanseri insidansı yılların ilerlemesine bağlı olarak artış göstermektedir. Batı Türkiye’de 1992 yılında yapılan kanser verilerine göre, kadınlarda meme kanseri insidansı 24.4/100000 iken, 2000 yılında bu oran 50/100000 olarak tespit edilmiştir. Türkiye’nin batı kesimindeki bu oran, Türkiye’nin doğusu (20/100000) ile kıyaslandığında iki kat daha fazla olduğu gözlemlenmektedir. Meme kanseri insidans dağılımı; coğrafik, ekonomik, sosyal, kültürel faktörler nedeni ile Türkiye’nin farklı bölgelerinde değişkenlik göstermektedir¹³. Böylesi bir farkın oluşmasında batılılaşmış yaşam tarzı (erken menarş, geç menopoz, ilk doğum yaşı > 30, daha az emzirme vb.),

çocuk doğurma şekilleri, ekzojen hormonlara maruz kalma, beslenme alışkanlığının etkin rol oynadığı düşünülmektedir. Sağlık Bakanlığı kaynaklarının tahminlerine göre; 2007-2012 dönemi meme kanseri hasta sayısı tablo 2.1’de verilmiştir^{13,17}.

Tablo 2.1: Türkiye’de kadınlarda gözlenen tahmini meme kanser olgu sayısının yıllara göre dağılımı¹⁷.

Yıllar	Meme kanseri olgu sayısı
2007	44253
2008	45696
2009	47205
2010	48809
2011	50399
2012	51990

Batı Avrupa ve Amerika’da 40 yaş altı kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı % 5 iken, Türkiye’de bu oran % 20 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Türkiye’de meme kanseri sağkalım oranları ile ilgili olarak coğrafik heterojenlik de söz konusudur. Beş yıllık sağkalım oranlarına bakılacak olursa Batı’da bu oran % 85 iken, Doğu’da % 60’tır¹³.

2.2. Meme Kanseri Etiyolojisi

Bugüne kadar sürdürülen çoğu epidemiyolojik çalışmalar gösteriyor ki, diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinin de nedeni tüm boyutlarıyla bilinmemektedir. Genetik, hormonal, çevresel ve reproduktif faktörlerin meme kanseri gelişiminde rol oynadığı kabul edilmektedir. Ancak meme kanseri risk faktörleri mevcut verilerine rağmen, bu kansere sahip kadınların % 75’inin risk faktörleri hala tanımlanamamıştır¹¹.

2.2.1. Meme kanseri etiyolojisinde önemli risk faktörleri

2.2.1.1. Endokrin nedenler

Endokrin nedenler reproduktif faktörler ve hormonal faktörler olarak iki alt başlık altında sınıflandırılabilir.

2.2.1.1.A. Reproduktif faktörler

Yapılan çalışmalar, endojen hormonlar ile meme kanseri riski arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, bazı hormon (östrojen, progesteron, prolaktin, testosteron, androstenedion vb.) serum düzeylerinin önemli faktörler olduğu düşünülmektedir. Kadınlar yaşamlarının herhangi bir döneminde (menarş, ilk gebelik dönemi, menopoz dönemi) en az bir kez bu endojen seks hormonlarına maruz kalmaktadır. Erken dönemde başlayan menstrual siklus, menarştan sonraki birkaç yıl içinde yüksek düzeyde östrojen seviyesi sonucunda meme epitelinin uzun süre östrojene maruz kalmasına bağlı olarak meme kanseri riski artmaktadır. Aynı şekilde menopozun ileri yaşlara sarkması da ovuluar siklus sayısını artırmakta, bu durum da meme kanseri riskinin artmasına neden olmaktadır¹⁸.

Meme kanserinin sadece % 0.8'i 30 yaşın altındaki bayanlarda görülmektedir. Yaklaşık % 6.5'i 30-40 yaşları arasındadır. Genellikle menopoz öncesinde meme kanseri görülme olasılığı düşüktür. Kadınlarda erken menarş veya geç menopoz yaşı artan meme kanseri riski ile ilişkilidir. İlk menarş yaşının 12'den küçük olması durumunda, meme kanseri riski iki kat artmaktadır. Menopoza girme yaşının 30'dan küçük olması, 55 yaşından sonra menopoza girmeye oranla iki kat daha fazla kanser riski taşır¹¹. Nulliparite (hiç çocuk doğurmamış olma hali) görülmesi ve ilk doğum yaşının geç olması da meme kanseri riskini artıran etmenlerdendir. İlk doğum yaşının 30'dan küçük olması meme kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahiptir. İlk doğum yaşının 35'ten büyük olmasında

ise risk en üst düzeydedir. Bu da gösteriyor ki uzun süreli laktasyonun meme kanseri oluşumuna karşı koruyuculuğu vardır^{11,18,19}.

2.2.1.1.B. Hormonal faktörler

Hormon düzeyi meme kanseri gelişiminde önemli bir yere sahiptir. Erken gebelik ve erken ooforektominin meme neoplazm insidansı düşüktür. Buna karşın geç menopoza, meme kanseri insidansının artışı ile ilişkilidir. Reprodüktif yaşamın uzun sürmesi, birden fazla doğum, ilk doğum yaşının geç olması gibi çoğu hormonal risk faktörleri, menstrual siklus sırasında yüksek oranda östrojene maruz kalma anlamına gelmektedir. Östrojen üzerinde duran fonksiyonel over tümörleri, postmenopozal kadınlarda artmış meme kanseri riski ile ilişkilidir. Oral kontraseptif kullanımı ve menopoza sırasında hormon tedavisi gibi etmenler hormonal dengeyi etkileyebilir, bu bozukluk da meme kanseri gelişimi ile sonuçlanabilir^{19,20}.

Oral kontraseptif kullanan bayanların meme kanseri riskinde küçük bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. On yıllık kullanımın ardından kontraseptifin kesilmesi riskin azalmasına neden olmaktadır. İleri yaşlarda kullanımı ise tanı konan meme kanseri vaka sayısındaki artışla bağlantılı bulunmuştur^{19,20}.

Hormon replasman tedavisinin mevcut kullanıcıları ve yakın zamanda kullanıcılarında meme kanseri gelişme riski, hormon tedavisi hiç kullanmamış olanlara göre daha yüksektir. Hormon kullanım süresi ile risk doğru orantılıdır, tedavinin önemli ölçüde kesilmesi ile risk azalmaktadır. ABD’de 5 yıllık bir süreçte 160.000 kadın üzerinde yapılan, yaygın olarak kullanılan birleştirilmiş hormon tedavilerinin yararları ve riskleri konulu bir araştırmaya göre; östrojen progesteron tedavisi alanlar ile almayanlar karşılaştırıldığında meme kanseri riskinin % 26 oranında arttığı gözlenmiştir. Bu çalışma, menopoza sonrası kadınların 5.2 yıllık bir izlem için hormon tedavisinin risklerinin faydalarını geçtiğini göstermiştir^{19,20}.

2.2.1.2. Çevresel faktörler

2.2.1.2.A. Alkol

Çalışmalar alkol tüketimi miktar ve süresinin meme kanseri riskinde artış ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Günlük alınan 1-5 bardaklık alkolün meme kanseri riskini artırdığı, alkolik kadınlarda ise meme kanserine yakalanma riskinin % 15 oranında arttığı gösterilmiştir. Alkolün karsinojenik etki mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte alkol kullanan kadınlarda, östrojen seviyesinin yükseldiği ileri sürülmüştür¹⁸.

2.2.1.2.B. Sigara

Sigara ile meme kanseri duyarlılığı üzerine yapılan çoğu araştırmada birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Meme kanseri riski ile sigara kullanımı arasında zayıf bir ilişki bulunmaktadır. İstatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunan grupta ise meme kanseri gelişiminde; sigara kullanımının küçük yaşta başlanması aşırı oranda kullanımı ve pasif içiciliğin etkin rol oynadığı belirtilmiştir¹⁸.

2.2.1.2.C. Beslenme ve ağırlık

Günlük alınan diyet, çok çeşitli doğal karsinojenleri ve karsinojen olmayan besinleri içermektedir. Bunların çoğu DNA hasarına yol açmakta ve oksijen radikallerinin üretimi ile harekete geçebilmektedir. Yüksek yağ alımının, özellikle çoklu doymamış yağ asiti alımının meme kanseri riskini artırdığı, buna karşılık doğal antioksidan olan sebze ve meyve alımının ise riski azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda et tüketiminin de kanser riskini artırıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir¹⁸.

Meme kanseri-obezite ilişkisinin altında yatan etken endojen hormon (seks hormonları, insülin, insülin benzeri büyüme faktörleri [IGF-insulin-like growth factors]) metabolizmasındaki değişimlere dayandırılmaktadır. Bu hormonlar hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozis arasındaki normal dengenin bozulmasına neden

olabilmektedir. Obez bireylerde östrodiolün serum konsantrasyonu artış gösterir ve menopoz sonrası adipöz doku östrojenin ana kaynağı haline gelir. Menopoz sonrası östrojen düzeyleri normal kilolu kadınlara karşı obez kadınlarda % 50-100 arasındadır. Fazla kilolu ve obez kadınlarda östrojene duyarlı dokular daha fazla östrojen stimülasyonuna maruz kalmaktadır. Böylece östrojene duyarlı meme tümörleri daha hızlı büyüme göstermektedir. Obez kadınlar, meme kanseri tanısı sonrası uzak metastaz gelişimi ve artmış kontralateral meme kanseri ile daha yüksek gelişim gösterme oranına sahiptir²¹. Menopoz öncesi kadınlarda obezite; total kan östrodiol seviyeleri üzerine çok az etkilidir ve meme kanseri riskini azaltır. Ancak obezite progesteron üretimini de düşürür. Menopoz sonrası kadınlarda ise obezite tam tersine meme kanseri riskini artırır²².

2.2.1.3. Aile öyküsü

Meme kanseri görülme sıklığının ve ölüm oranının ülkeden ülkeye ve hatta aynı ülkedeki farklı etnik gruplar arasında değişkenlik göstermesi, meme kanserine sahip bireylerin ailelerinde de bu kanserin görülmesi, meme kanseri oluşumunda genetik faktörlerin önemli bir rol oynadığını göstermektedir^{11,20,23}.

Pozitif aile öyküsüne sahip birinci derece akrabalarda (anne, kız veya kız kardeş) meme kanseri riski artmaktadır. Risk, kanserin bilateral olup olmadığına ve menopoz öncesi/sonrasında ortaya çıkıp çıkmadığına bağlıdır. Eğer kanser oluşumu menopoz öncesi dönemde ortaya çıkarsa, yakın akrabalarda meme kanseri riski, meme kanseri aile öyküsü olmayanlara oranla yaklaşık üç kat daha fazla olmaktadır. Meme kanseri aile öyküsü olan olguların % 5-10'unda meme kanseri, kalıtsal otozomal genlere bağlanmaktadır. Eğer birden fazla etkilenen akraba varsa genetik kalıtım olasılığı artar ve genç yaşlarda kanser ortaya çıkabilir. Akrabalarında birden fazla meme kanseri vakası bulunan ailelerin çoğunda, sırasıyla 17. ve 13. kromozomların uzun kollarına yerleşmiş olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinde bozukluk olduğu sıklıkla rapor edilmiştir^{11,20,23,24,25}.

2.2.1.4. Diğer faktörler

2.2.1.4.A. Sosyo ekonomik durum

Meme kanseri insidansı, yüksek sosyo-ekonomik duruma sahip kadınlarda daha yüksektir. Bu ilişki büyük olasılıkla farklı yaşam tarzı (ilk doğum yaşı ve yağlı beslenme gibi) ile ilgilidir. Ancak bu etken tek başına değerlendirilemez, reproduktif alışkanlıklardaki değişimlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır¹¹.

2.2.1.4.B. Coğrafik varyasyon

Meme kanseri insidans oranlarında dikkat çekici bir farklılık vardır, bu oran Kuzey Amerika ve Avrupa'da en yüksek, Afrika ve Asya'da en düşüktür. Farklı ülkelerde bildirilen meme kanseri görülme sıklığı çok büyük değişimler göstermektedir. Örneğin; Japonya, Tayland, Nijerya ve Hindistan'da meme kanseri insidansı, Danimarka, Hollanda, Yeni Zelanda, İsviçre, Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devletlerinden önemli ölçüde düşüktür. Kuzey Amerika'da yaşayan kadınlarda meme kanseri riski en yüksektir^{11,26}.

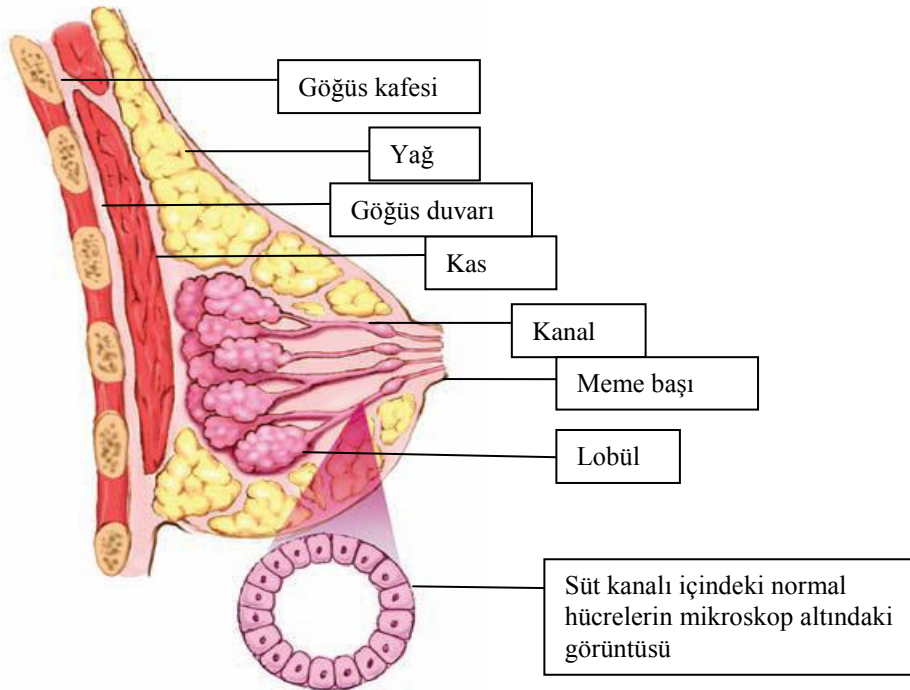
2.3. Meme Dokusunun Gelişimi ve Anatomisi

İnsanlarda meme dokusu, gebeliğin 6. haftasında aksilladan inguinal bölgeye doğru uzanan kalınlaşmış ektodermal çizgiden (süt çizgisi) gelişir. Meme bezlerinin oluşumunu sağlayan bu çizginin gelişimi, göğüs bölgesinin 2. ve 6. kaburgası arasında meydana gelir. Kadınların % 2-6 'sında oluşan bu bezler ya meme bezleri olarak gelişir ya da meme başı olarak kalır. Gebeliğin 7. ve 8. haftasında meme parankiması stromaya yayılır, meme diski olarak adlandırılan belirgin bir şekil alarak memenin ilk taslağını oluşturur. 10. ve 12. haftalarda epitelyal tomurcuklar gelişir ve gebeliğin 13. ve 20. haftasına kadar parankimal dallanma meydana gelir. 12. ve 16. haftalarda aerola ve meme başının düz kası gelişir, yaklaşık 20. haftalarda deri altı dokuda 15-25 solid kord oluşur. Dallanma devam ederken 32. haftada primer süt kanalı ve kordların

kanalizasyonu oluşur. Yine bu haftada kanallar meme başına açılır. Lif oluşturma kabiliyeti azalan bağ dokusundan meme bezinin yağ dokusu gelişir²⁷.

Puberteye kadar meme kanallarında çok az bir değişiklik olur. Puberte ile birlikte meme bezlerine ait elemanların, yağ ve bağ dokusu oranlarının artması ile meme gelişimi başlar. Puberte sırasında meme gelişiminin hormonal düzenlenmesi, östrojen, prolaktin, luteinleştirici hormon, folikül uyarıcı hormon ve büyüme hormonlarının plazma konsantrasyonlarında artış ile ilişkilidir²⁷.

Normal bir meme dokusu, glandüler (salgı) ve adipöz (yağ) dokusundan oluşur. Bu yapı, cooper ligamenti olarak adlandırılan fibröz bağ dokusu tarafından çevrilidir. Ayrıca kan damarları, lenfatikler ve sinirleri de içinde barındırır. Glandüler doku 15- 20 adet lob içerir. Her bir lob süt üretiminden sorumlu 20-40 kadar lobül içerir. Lob ve lobüller kanallar aracılığı ile birbirine bağlanır ve üretilen süt yine kanallar aracılığı ile meme başına taşınır^{27,28}.



Şekil 2.1: Normal meme dokusunun anatomik yapısı²⁹.

2.4. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kansinimleri histolojik olarak iki ana gruba ayrılmaktadır; in situ ve invaziv kansinimler. İn situ (non-invaziv) kansinimler, oluştuğu kanal veya lobül içerisinde kalır, büyüme göstermez ve meme içinde veya dışındaki normal dokuları istila etmezler. İnvaziv (infiltratif) kansinomda ise, neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya yayılım göstermektedir. Bu nedenle invaziv meme kansinimleri, kan damarları ve lenfatikleri istila ederek çevresel dokulara, bölgesel lenf düğümlerine ve diğer uzak organlara metastaz yapma eğilimi gösterirler. Günümüzde meme kansinimlerinin histolojik sınıflamasında en çok kullanılan Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen sınıflandırmadır^{29,30} (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Meme kanserinin histolojik sınıflandırılması³⁰.

İn situ kansinom -İn situ duktal kansinoma (DCIS-Ductal Carcinoma In Situ) -İn situ lobüler kansinoma (LCIS-Lobular Carcinoma In Situ)
İnvaziv kansinom -İnvaziv duktal kansinom (IDC-Invasive Ductal Carcinoma) -İnvaziv lobüler kansinom (ILC-Invasive Lobular Carcinoma) -Tübüler kansinom -İnvaziv kribriform kansinom -Medüller kansinom -Müsinöz kansinom -İnvaziv papiller kansinom -İnvaziv mikropapiller kansinom -Apokrin kansinom -Sekretuar (juvenil) kansinom -Adenoid kistik kansinom -Metaplastik kansinom -Neroendokrin kansinom -İnflamatuar kansinom

Meme şikayetleri ile kliniklere başvuran 40-65 yaş arası 100 kadının; % 30'u hiçbir meme lezyonuna sahip değil iken, % 40'ı fibrokistik değişikliklere, % 7'si iyi huylu tümöre ve % 10'u da meme karsinomuna sahiptir²⁰. Meme kanseri teşhisi alan olguların yaklaşık % 70-80'i invaziv duktal karsinoma, % 5-15'i ise invaziv lobüler karsinoma sahiptir. Ayrıca invaziv lobüler karsinom hormon replasman tedavisi alan kadınlarda da sıklıkla gözlenmektedir³⁰.

2.5. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler

Meme kanseri tanısı konulduktan sonra bireyler arasında hastalık seyri boyunca farklılıklar gözlenmektedir. Aynı tümör çapına sahip hastaların bazısında tümör oluşumu veya gelişimi kısa sürede gerçekleşir iken bazısında sağlıklı yaşam devam etmektedir. Bundan dolayı meme kanserli bireylerdeki bu klinik ve biyolojik farklılıkları ve yüksek riskli hastalık grubunu belirlemek için çeşitli prognostik faktörler kullanılır³¹. Lenf nodlarının durumu, tümör çapı, histolojik tip, histolojik derecelendirme, meme kanseri için bilinen en önemli prognostik faktörlerdir. Ayrıca steroid hormon reseptörleri (östrojen ve progesteron reseptörü- ER ve PR), protoonkogen c-erb-B2 (HER-2/neu), tümör supresör genler (p53), proliferasyon belirleyicileri, anjiyogenez ve proteazlar da meme kanseri prognozu üzerine etkilidir^{30,32}.

Östrojen ve progesteron reseptörleri (ER ve PR) immünohistokimyasal olarak tümör dokusunda saptanabilmektedir. Bu reseptörler başta meme kanseri olmak üzere bir grup neoplastik hastalıkta prognostik öneme sahiptirler ve PR pozitif tümörler hormonal tedaviye daha iyi yanıt verir ve daha iyi prognoz gösterirler. Primer meme kanserlerinin % 55-65'i, metastatik meme kanserlerinin % 45-55'i ER (+)'dir. ER ve PR pozitifliği menopoz öncesi dönem ile kıyaslandığında menopoz sonrası dönemde daha fazladır. ER (+) tümörler hormonal tedaviye % 55-60 oranında yanıt verirken, ER (-) tümörlerden % 8 yanıt alınmaktadır^{33,34}.

Meme kanserinin moleküler bir prognostik faktörü olan C-erb-B2 protoonkogeni 17. kromozom üzerinde lokalize olup, moleküler ve immünohistokimyasal yöntemler ile

tespit edilmektedir. C-erb-B2'nin aşırı ekspresyonu kötü prognostik bir parametre olup, yüksek histolojik derecelendirme, ER ve PR negatif, lenf nodu pozitif ve yüksek proliferasyon oranı gösteren meme kanserlerinde karşımıza çıkmaktadır. C-erb-B2 pozitifliği ile sağkalım oranının azalması arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır^{35,36,37}.

2.6. Meme Kanserinin Genetiği

Meme kanseri, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör supresör genlerin inaktivasyonu sonucu oluşan genetik değişikliklerle, kümülatif genetik hasarlar sonucunda kontrolsüz hücre çoğalması ve apoptozisin bozulması ile ortaya çıkmaktadır. Genetik değişiklikler ya germline mutasyonlar olarak kalıtılır ya da somatik mutasyonlar olarak sonradan kazanılabilir. Sonradan kazanılan mutasyonlar çevresel karsinojenlere maruz kalınması sonucu ortaya çıkabilir. Bu çevresel karsinojenler, fiziksel (örneğin; iyonize radyasyona aşırı maruz kalınması), kimyasal (örneğin; polisiklik hidrokarbonlar) ve biyolojik (örneğin; virüsler)'tir³⁸.

Moleküler genetik alanındaki gelişmeler sayesinde, kansere yatkınlığa neden olan birçok gen tanımlanmıştır. Bu kansere yatkınlık genleri; DNA tamiri, üreme hormonu sentezi ve metabolizma yolları, hücre büyümesi ve hücre sinyal kontrolü üzerine etkili genlerdir³⁹. Bu genleri, tek başına meme kanseri riskini artıran allelik varyantlı genler (yüksek penetranslı) BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN/MMAC1, STK11, CDH1; riski orta düzeyde etkileyen genler PALB2, BRIP1, ATM, CHEK2; tek başına kanser riskini daha az etkileyen (düşük penetranslı) genler CASP8, FGFR2, TOX3, MAP3K1, LSP1, 8q24 rs13281615 olmak üzere 3 gruba ayırmak mümkündür^{11,20,23,39}.

Meme kanserine duyarlılık, çok sayıda lokusun her birinin poligenik özelliği nedeni ile kanser riski üzerine küçük bir etkisi ile artmakta ve azalmaktadır. Bu model, meme kanserinin ailesel olarak kümelenmesi olgusu ile uyumludur. Meme kanserine duyarlılığı etkileyen BRCA1 ve BRCA2 genleri 1990 yılında tespit edilmiştir. Bu genlerdeki yüzlerce germline mutasyonlar, kadınlarda meme kanseri riskini

artırmaktadır. Ancak bu genlerdeki yüksek penetrant mutasyonlar, tüm meme kanseri olgularının sadece küçük bir bölümünü oluşturmaktadır. Asıl riski artıran unsur birden fazla lokusun orta derecede etkileri sayesinde^{39,40}. Tüm bu bilgiler ışığında, tümörlerin sadece küçük bir bölümü yalnızca kalıtsal olmasına karşılık, çoğu kanserler çevresel ve kalıtsal faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Tespit edilen genetik değişiklikler, tanının doğrulanmasına imkan verir ve hatta tedavi yaklaşımlarını da belirler. Bu nedenle kansere özgü spesifik genetik değişikliklere bağlı tedaviler kanser problemini çözmede yeni bir dönem başlatmıştır⁸.

2.7. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi

Apoptozis, Yunanca'da apo (=ayrı) ve ptosis (=düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelime olup ilk kez 1972 yılında Kerr ve Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Apoptozis çok hücreli organizmaların gelişimi, farklılaşması ve sağlığının bir bileşeni olarak, homeostazın sürdürülmesinde ve yeterli hücre siklusunda kritik bir role sahiptir^{20,41,42,43}.

Hurvitz ve Sulston'ın 1970'lerin sonlarında *Caenorhabditis elegans* hücre çalışmaları, *C. elegans*'in embriyogenezisi sırasında somatik hücrelerinin 1090'ından 131'inin öldüğünün ortaya çıkarılmasına ve bu tespitin ardından apoptotik moleküler mekanizmaların genetik olarak tanımlanmasına yol açmıştır^{41,44}.

Programlanmış sinyal yollarının aracılık ettiği, kusurlu hücrelerin ve normalden fazla sayıdaki hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan, enerji-bağımlı, aktivasyonu çeşitli ekstraselüler ve intraselüler uyarılar tarafından başlatılan fizyolojik bir süreçtir. Normal fizyolojik şartlarda gerçekleşmesinin yanında çeşitli patolojik etkenler tarafından da tetiklenebilir. Apoptozise giden hücrede ilk sitoplazma büzülmesi ve çekirdekte kromatin yoğunlaşması olmakta, bunu sitoplazmik membranda kabarcıkların

oluşması takip etmektedir. Ardından hücre küçülmesi, kromozomal DNA fragmentasyonu ve son olarak da hücrenin apoptotik cisimcikler (apoptozom) adı verilen küçük veziküllere parçalanması ile sonuçlanmaktadır. Apoptozise uğrayan hücre makrofajları uyarır ve böylece apoptozomların fagosite edilmesi sağlanır^{4,44,45,46}.

Çok hücreli organizmalar hücrelerin eliminasyonu için apoptozisin yanında nekroz adı verilen bir başka mekanizmayı da kullanır. Apoptozis ve nekroz, hücre ölüm mekanizmalarının iki zıt biçimleri olarak kabul edilmektedir.

2.7.1. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar

Gerek apoptozis gerekse nekrozun her ikisi de hücre ölüm mekanizması olarak görev yapmasına rağmen bu iki mekanizma birbirinden aşağıda ifade edilen farklılıkları göstermektedir.

Nekrozis fizyolojik olmayan ajanlar ile uyarılan hücre ölümünün pasif bir formunu oluşturmaktadır. Apoptozis ise hücre ölümünün aktif bir formu olup, hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelmektedir. Nekroza uğrayan hücrede şişme ve vakuol oluşumu gözlenir iken, apoptotik hücrede nekrozun tersine küçülme görülmektedir.

Nekroz ile hücre ölümü, plazma membranındaki kırılma ve kopma gibi bozukluklar ile tetiklenir iken, bu durum hücrede yırtılmalar sonucu hücre bütünlüğünün kaybedilmesine neden olmaktadır. Apoptoziste ise, hücre membranı sağlamdır ve apoptotik mekanizmanın indüklenmesi, tümör hücrelerinde antiapoptotik faktörlerin ifadesini azaltıp pro-apoptotik faktörlerin ifadesini teşvik ederek ya da özellikle transforme olmuş hücrelerde viral infeksiyon yoluyla gerçekleşmektedir.

Nekrotik hücrede hücresel ve nükleer parçalanma meydana gelir. Hücre otolize yönelir. Apoptik hücre küçük apoptotik cisimciklere parçalanır, makrofajlar tarafından fagosite edilir ve lizozomlarda sindirilir.

Nekrozda inflamatuvar hücrel içeriğin kontrolsüz bir şekilde serbest kalması ile tesadüfi hücre ölümleri meydana gelir. Apoptoziste ise hasarlı veya biyolojik görevini tamamlamış hücre inflamasyon oluşmaksızın fagosite edilir^{8,42,44,45,47}.

2.7.2. Apoptozis ve kaspaz ailesi

Apoptozis bazı hallerde bir dizi sinyal kaskadı tarafından düzenli bir şekilde yürütülen hücre ölümü türüdür. Bu olay büyüme, gelişme ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde ve organizmalarda gereksiz veya anormal hücrelerin temizlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda apoptozis, organizmaların sağlıklı bir şekilde yaşaması için hücre miktarının dengesini düzenleyebilen bir yoldur. Apoptozisin yürütülmesi ve indüksiyonu; sinyal molekülleri, reseptörler, enzimler ve gen düzenleyici proteinler de dahil olmak üzere bir dizi moleküllerin işbirliğini gerektirmektedir. Bunların arasında, apoptozis protein (IAP-Inhibitors of Apoptosis) inhibitörü, Bcl-2 ailesi proteinleri ve kalpain gibi çeşitli moleküller tarafından düzenlenen kaspaz kaskadı sinyal sistemi, apoptozis sürecinde hayati önem taşımaktadır⁴⁸.

Kaspazlar düzenli bir şekilde hücre parçalanmasından sorumlu proteazlardır. Kaspazlar; morfolojik ve biyokimyasal olarak apoptozisi tanımlayan kromatin yoğunlaşması, hücre adhezyon kaybı, hücre küçülmesi, membranda kabarcık oluşumu (blebbing), DNA fragmantasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi değişikliklere yol açmakta ve fagositler tarafından sindirilmektedir⁶.

Ellis ve Horvitz'in çalışmaları apoptozis sürecinin anlaşılması adına genetik birçok çalışmayı beraberinde getirmiş ve yeni keşiflere yol açmıştır. Yapılan çalışmalarda bu süreçte yer alan 10 *ced* (cell death defective) geni tespit edilmiştir. Bunlardan *Ced-3*, *Ced-4* ve *Ced-9* apoptoziste önemli rol oynamaktadır. *Ced-9* apoptozisi inhibe ederken, *Ced-4* proapoptotik adaptör molekülü olarak görev yapmaktadır. *Ced-3* ise, apoptozis mekanizmasından sorumlu sistein proteazlardır. *Ced-3* proteaz için bir substrat olan *Ced-9*'un memelilerdeki homoloğu Bcl-2, apoptoziste mitokondriyal yolun önemli bir düzenleyicisidir. *Ced-4*'ün memelilerdeki homoloğu olan Apaf-1, sitokrom-c bağımlı

yolun mitokondri sonrası düzenleyicidir. *Ced-3* proteinin memelilerdeki analogu ise sistein bağımlı proteazlar (İnterlökin 1b Dönüştürücü Enzim [ICE-Interleukin 1b converting enzyme]'dir. ICE'nin kaspazlar (sistein aspartat) olarak adlandırılan çok sayıda sinonimi tespit edilmiştir. Büyük bir aile olan bu sistein aspartat proteazlar (kaspazlar), gelişmiş ökaryotların çoğunda apoptozisin yürütülmesinden sorumludurlar^{41,44,50}.

2.7.3. Kaspazların yapısı

Kaspazlar normal hücrelerde inaktif zimojenler (prokaspaz) olarak sentezlenirler. İki büyük ve iki küçük altünite içeren heterotetramer yapı aktif kaspazı oluşturur. Normalde kaspazlar; NH₂- terminal pro-domain molekül ağırlığı yaklaşık 20 kDa olan büyük alt ünite, molekül ağırlığı yaklaşık 10 kDa'luk küçük alt ünite ve bu katalitik alt üniteleri birbirine bağlayan bağlayıcı bölge olmak üzere 4 bölge içerirler⁴⁵.

Resmi terminolojide memelilerde 14 kaspaz (aspartat-spesifik sistein proteazlar) tanımlanmış ve fonksiyonlarına göre kaspazlar başlatıcı, efektör ve inflamatuvar kaspazlar olarak üç alt gruba ayrılmıştır⁸ (Tablo 2.3).

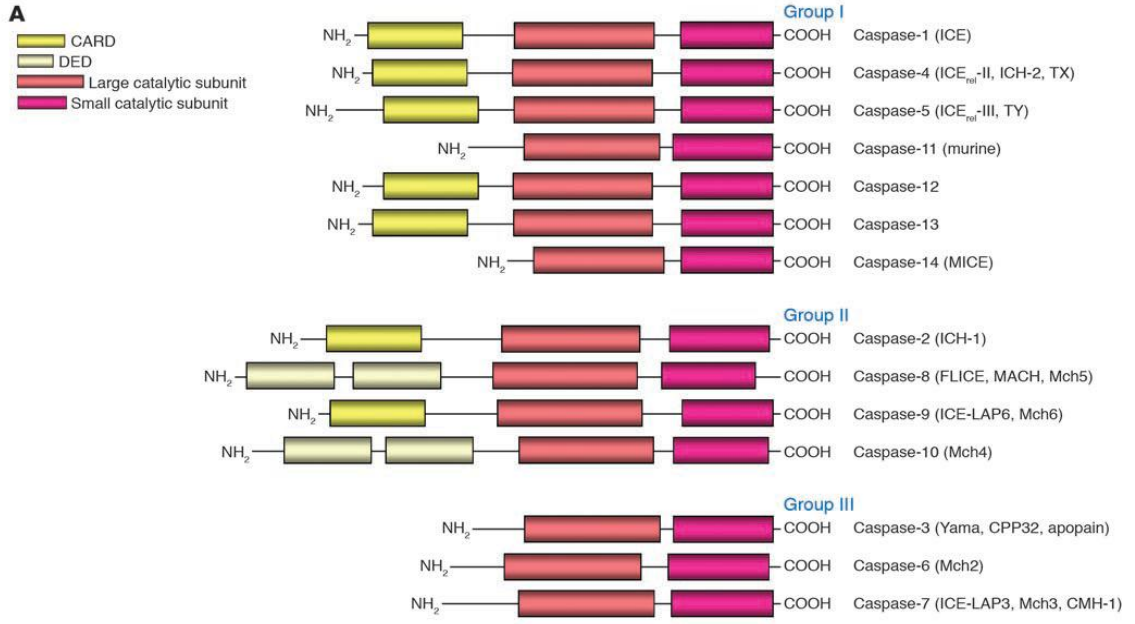
Kaspazların fonksiyonu tamamen kendi yapısıyla ilgilidir. Tüm kaspazlarda ortak yapı P1 pozisyonunda aspartat bulunmasıdır. Kaspazlar adaptör proteinleri ile etkileşime girebilmek için kısa (20-30 aminoasit rezidüleri) veya uzun (90 ve daha fazlası aminoasit rezidüleri) NH₂-prodomain aminoasit dizisinde farklılıklar gösterir. Uzun prodomain ölüm oluşturan bölge (DED- Death effector Domain) ve kaspaz toplama domaini (CARD- Caspase Recruitm Domain) olmak üzere iki modüler bölge içermektedir. Prokaspaz 3, 6, 7 ve 14 kısa NH₂- pro-domain içerir. Bazı prokaspazlar (prokaspaz-8, -10) iki adet DED bulundururken, bazıları (prokaspaz-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12,) bir adet CARD pro-domainine sahiptir^{8,45}. Kaspaz ailesi üyelerinin üç temel grubundan; grup I: İnflamatuvar kaspazlar, grup II: Apoptozisi başlatıcı kaspazlar ve grup III: Apoptozisi etkileyen kaspazların CARD, DED, büyük katalitik alt ünite (p20)

ve küçük katalitik alt üniteye (p10) sahip olmalarına göre sınıflandırılması (Şekil 2.2)'de gösterilmiştir⁵¹.

Tablo 2.3: Kaspaz üyelerinin karakteristik yapısı ve fonksiyonu^{8,45,51,52}.

Alt Grubu	Fonksiyonu	Kaspaz Üyeleri	Pro-domain tipi
I	İnflamatuar Arabulucular (İnflamasyonda görevli)	Kaspaz-1 Kaspaz-4 Kaspaz-5 Kaspaz-11 Kaspaz-12 Kaspaz-13 Kaspaz-14	Uzun, CARD bölgesi Uzun, CARD bölgesi Uzun, CARD bölgesi Uzun, CARD bölgesi Uzun, CARD bölgesi Uzun, CARD bölgesi Kısa
II	Başlatıcı (upstream) Kaspazlar (Apoptozisi aktive edenler)	Kaspaz-2 Kaspaz-8 Kaspaz-9 Kaspaz-10	Uzun, CARD bölgesi Uzun, DED bölgesi Uzun, CARD bölgesi Uzun, DED bölgesi
III	Efektör (downstream) Kaspazlar (Apoptozisi gerçekleştirenler)	Kaspaz-3 Kaspaz-6 Kaspaz-7	Kısa Kısa Kısa

Caenorhabditis elegans'ta tek bir kaspaz tanımlanmış (CED-3) olmasına karşılık, memelilerde kaspaz ailesinin 14 üyesi mevcuttur. Bunlardan kaspaz 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 13 insanlarda bulunmaktadır. Kaspaz 11, 12 ve 14 farelerde bulunmaktadır ve bu kaspaz türlerinin insanlarda karşılığı yoktur.



Şekil 2.2: Kaspaz ailesi üyelerinin temel yapısı. Tüm kaspazlar –COOH ucunda küçük katalitik alt üniteye ve küçük alt üniteye bitişik büyük katalitik alt üniteye sahiptirler. Kaspaz 3, 6, 7 dışındaki tüm kaspazlar -NH₂ ucunda ya CARD veya DED olmak üzere iki modüler bölge içerirler ⁵¹.

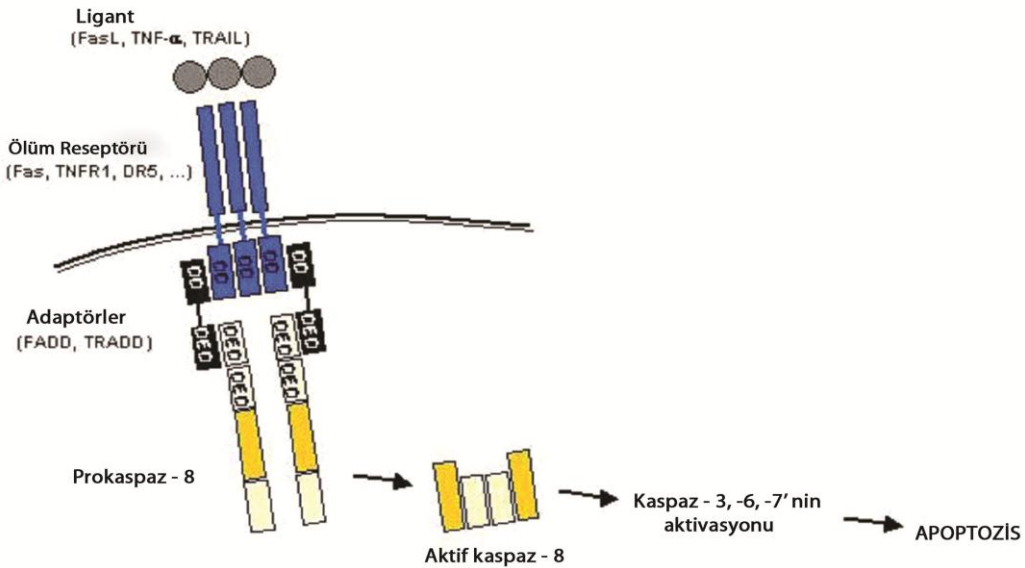
Kromozomal yerleşimleri açısından; Kaspaz 1, 4, 5 molekülleri 11q22.2-q22.3, Kaspaz 8, 10 molekülleri 2q33-34 ve Kaspaz 9 molekülü ise 1p36.1-36.3 lokuslarında yer almaktadır⁵³. Tüm bu 14 kaspazın tamamı programlanmış hücre ölümüne katılmaz ve hücre ölümünün tüm formları kaspazları gerektirmez. Gerçekte bazı kaspazlar apoptozis için önemlidir ancak bazıları gerekli değildir. Çoğu kaspaz apoptozisin yürütülmesinde yer almaktan daha başka işlevlere de sahiptir. Bu işlevler hücre sağkalımı, proliferasyonu, farklılaşması ve inflamasyondur^{8,45,48}.

2.3.1. Prokaspaz aktivasyonu

Kaspaz ailesi aktivasyonunu ve memelilerde apoptozisin başlatılmasını sağlayan iki yol bulunmaktadır. Bu yollardan biri ekstrinsik yol olarak ifade edilen ölüm sinyali ile başlatılan ölüm reseptör yolu iken, diğeri intrinsik yol olarak isimlendirilen stres kaynaklı mitokondri aracılı yoldur. Ölüm reseptörlerinin uyarılması, reseptör agregasyonu ve adaptör proteini Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD- Fas-associated protein with death domain) ve kaspaz 8'in katılımını gerektirir. Kaspaz 8'in dahil

2.3.1.1. Ölüm reseptörü bağımlı prokaspaz aktivasyonu (ekstrinsik yol)

Kaspaz kaskadını aktiveleştirmek için apoptotik uyarılar ile hücre yüzeyinden başlatılan aktivasyon yolu kullanılmaktadır. Tümör nekroz faktörü (TNF) ve Fas-L kendi membran reseptörlerine (sırasıyla TNF reseptör-1 [TNFR1- Tumor Necrosis Factor Receptor-1] ve Fas) bağlanıp bu molekülleri aktive ederek kaspaz kaskadını indüklemektedir. TNFR1, TNFR2, Fas/Apo-1/CD95, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK2, DR6, p75 sinir büyüme faktörü reseptörü ve CD40 gibi reseptörler TNF reseptör (TNFR) ailesine aittir. Çoğu TNFR ailesi üyesi hücre membranının sitoplazmik yüzündeki ölüm bölgeleri (DD- Death Domain) aracılığı ile adaptör moleküllerine bağlanırlar. Adaptör molekülleri, ayrıca prokaspaz-8'in ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (DISC- Death Inducing Signaling Complex) adı verilen reseptör kompleksine dahil edilmesini sağlayan DED içerirler. Prokaspaz-8 DED aracılığı ile DISC'e katılmaktadır. Prokaspaz-8, DISC'ten oto proteolitik ayrılma ile aktif hale gelmekte ve aktif kaspaz-8 adını almaktadır. Aktif kaspaz-8 iki büyük ve iki küçük alt üniteye sahip heterotetramerdir. Aktive olan başlatıcı kaspaz-8 efektör kaspazlara (kaspaz-3,-7) tutunarak onları aktive etmektedir. Böylece apoptozis olayının yürütülmesi sağlanmaktadır^{4,45,48,54} (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu⁵⁴.

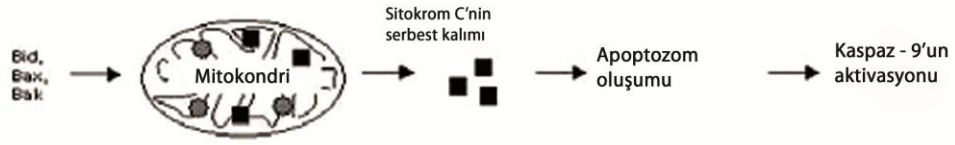
2.3.1.2. Mitokondri aracılı prokaspaz aktivasyonu (intrinsik yol)

İntrinsik veya mitokondriyal yol; oksidatif stres, radyasyon ve sitotoksik ilaçlar ile tedavi dahil olmak üzere çeşitli hücre içi ve dışı stresler tarafından aktive edilir. Ölüm reseptörü bağımlı yolun aksine, A) mitokondri bağımlı yol; apoptotik uyarıların (Bax veya Bak) mitokondri membranına insersiyonuna ve sitokrom C'nin mitokondrinin ara membranından sitozole salınmasına aracılık etmektedir. Sitokrom C, apoptozom oluşumunu ve prokaspaz-9'un aktivasyonunu sağlamaktadır^{8,54} (Şekil: 2.5).

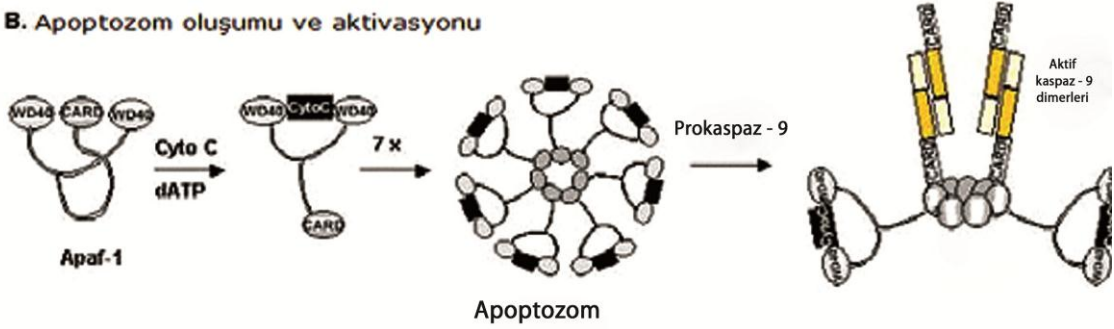
Bazı Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, Bax ve Bak'ın inhibisyonu ve bağlanması sonucu sitokrom c'nin salınımını önlemektedir. BH3 proteinlerinden olan Bid ve Bim, Bax ve Bak'ın homo-oligomerizasyonunu uyararak Bax/ Bak'ın pro-apoptotik işlevine katkı sağlamaktadır⁸.

B) Apaf 1 proteini, sitokrom C ve dATP etkileri ile heptamerik bir oluşum olan, apoptozom olarak adlandırılan tekerlek benzeri yapıyı oluşturur. Prokaspaz-9 molekülü apoptozomun iç bölgesine bağlanarak dimer oluşumu ile aktive edilmektedir (Şekil 2.5)⁵⁴. Kompleks oluşumu ardından aktif kaspaz 9, efektör kaspaz 3'ü aktive ederek proteolitik kaskadı başlatmaktadır. Mitokondri sitokrom C'yi salmasının yanında; Apoptosis İndükleyici Faktör (AIF- Apoptosis Inducing Factor) ve Endonükleaz G (Endo G)'yi, zarlar arası alandan HtrA2/ Omi ve SMAC/ DIABLO'yi içeren diğer polipeptitlerin büyük bir kısmını serbestleştirmektedir. AIF ve Endo G, DNA hasarı ve yoğunlaşmasına sebep olurken, HtrA2/ Omi ve SMAC/ DIABLO apoptozis protein inhibitörlerinin (IAPs-Inhibitors of Apoptosis) etkilerini nötralize ederek kaspaz aktivasyonunu teşvik etmektedir^{4,8,54}.

A. Kaspaz aktivasyonunun mitokondrial yolu



B. Apoptozom oluşumu ve aktivasyonu



Şekil 2.5: Apoptozomda mitokondri aracılı kaspaz aktivasyonu⁵⁴.

2.3.2. Kaspaz-8 (CASP8)

İnsan kaspaz 8, kromozomun 2q33-34 üzerinde yer almakta ve yaklaşık 30 kb'lık bir bölgeyi kapsayan en az 11 ekzon içermektedir. Yapısal olarak kaspaz 8, ilgili sistein proteazın katalitik domainin yanı sıra iki adet DED ve uzun bir pro-domaine sahiptir⁵⁵.

Ölüme neden olan sinyal komplekslerinin (DISC) oluşumu kaspaz 8'in aktivasyonuna neden olmaktadır. Böylece aktive olan kaspaz 8, kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktivasyonunu indükleyen downstream apoptotik süreci başlatır. TNF ailesi tarafından indüklenen apoptozisin yanında kaspaz 8; makrofaj farklılaşması, T hücre, B hücre ve doğal öldürücü (NK) hücre çoğalması, kalp kası gelişimi gibi apoptotik olmayan işlevlere de sahiptir^{8,56}.

Kaspaz 8 geninin bilinen en az 474 varyantı vardır. Kaspaz 8'in en yaygın varyantlarından; ekzon 10'da D302H, promotorda -652 6N del ve 3' UTR bölgesinde Ex14-271A>T, kaspaz 8'in apoptozisi düzenleyen diğer moleküllerle etkileşimi

üzerinde etkin rol oynamaktadır. Sonuç olarak kaspaz 8'in ifadesini veya aktivasyonunu değiştirebilmektedir¹⁰.

Kaspaz 8'e ait bazı varyantlar ile farklı kanser türleri arasındaki ilişkinin incelendiği birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bir çalışmada; promotor bölgesinde yer alan bir varyantın Çin popülasyonunda akciğer, meme, yemek borusu, mide, kolorektal, rahim kanserleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir⁵⁷. Aynı varyant Birleşik Krallık'ta yapılan bir çalışmada ise; meme, kolorektal ve prostat kanserleri ilişkili olduğu belirlenmiştir⁵⁸.

Kolon kanserli 180 olgudan invaziv karsinoma sahip bireylerin % 5.1'inde kaspaz 8 geninde çerçeve kayma, nonsense ve missense mutasyonların varlığı tespit edilmiştir. Bu mutasyonlara sahip bireylerin de yaklaşık % 60'ında kaspaz 8'in aktivitesinde azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Kaspaz 8 geni stop kodonunda meydana gelen bir mutasyon sonrası Alu tekrarları ile kodlanan uzun diziler oluşturduğu bulunmuştur. Bu mutasyonunda baş ve boyun kanserleri hücre hatlarında gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu veriler, kaspaz 8 gen mutasyonlarının farklı kanserlerin patogenezeine katkı sağlayabileceğini göstermektedir⁴⁵.

2.3.3. Kaspaz-9 (CASP9)

Kaspaz 9, kromozomun 1p36.1-p36.3 üzerinde yer alır, 9 ekzon ve 8 intron içermektedir. Molekül ağırlığı 45 kDa olan kaspaz-9 proteini, fetal ve yetişkin insan dokularında tespit edilmiş, memeli sistein proteaz (kaspaz) ailesinin pro-apoptotik bir üyesidir. *Ced-4*'ün memeli homologudur. Fareler üzerinde yapılan kaspaz-9'un hedef gen çalışmaları, kaspaz-9'un in vivo şartlarda beyin gelişiminin ve kaspaz kaskadının önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. Kaspaz-9 enzimi sitozolde lokalize olup, apoptotik bir uyarı tarafından uyarılmadan önce inaktif zimojen (prokaspaz) halindedir. Mitokondriyal yol aktif olduğunda, sitokrom c mitokondriden serbest bırakılır ve sitoplazmik reseptör Apaf-1'e (dATP veya ATP varlığında) bağlanır. Kompleks içinde bir araya gelen sitokrom c ve Apaf-1 apoptozom olarak adlandırılır. Prokaspaz-9, CARD domaini aracılığı ile Apaf-1'e bağlanarak başka bir prokaspaz-9 ile

karşılıklı etkileşimi sonrası aktif hale gelmektedir. Aktif apoptozom bağlı kaspaz-9 efektör (downstream) enzim kaspaz 3'e yapışarak kaspaz-3'ü aktive etmektedir^{8,53,59,60}.

Kaspaz genlerinin susturulması (silencing) ve bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kansere neden olmaktadır. Kolon ve mide kanserlerinde kaspaz 9 geninde ifade kaybının olduğu tespit edilmiştir⁶. Yine kaspaz 9 geni promotor bölgesindeki 4 farklı tek nükleotid değişim polimorfizminin (SNP-Single Nucleotide Polymorphism) Kore popülasyonunda akciğer kanserine karşı duyarlılığı ve kaspaz 9 ifade düzeyini etkilediği bildirilmiştir⁴⁹.

2.4.Polimorfizm

Herhangi iki insanın genom sekansı % 99.9 oranında benzerdir. Geriye kalan % 0.1'lik fark bireysel genotip ve fenotip değişiklerinden sorumludur. Popülasyonda bir allelin % 1'den daha fazla sıklıkta bulunması polimorfizm olarak adlandırdığımız tek nükleotid değişimlerini içermektedir. Tek nükleotid değişimleri insan genomunda en çok gözlenen DNA dizi değişimleridir. Mutasyonlar ise kalıtsal genetik kusurlardır⁶¹. Kalıtsal hastalıklara yol açan gen mutasyonları popülasyonda nadir olarak ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı mutasyonlar çeşitliliğin çok az bir kısmından sorumlu olmaktadır. Büyük bir kısmı ise, çeşitli ve farklı varyantların (allel) oldukça yaygın olduğu sekans polimorfizmlerinden oluşmaktadır. Bu polimorfik sekans varyasyonunun yaklaşık % 95'i genlerdeki tek bir nükleotidin bir diğeri ile değişmesi sonucu oluşan tek nükleotid polimorfizmi (SNP- Single Nucleotide Polymorphism) olarak tanımlanmaktadır⁶². İnsan genomunda bilinen yaklaşık 7 milyon SNP'in olduğu tahmin edilmektedir. Yeni teknolojik gelişmeler, yüz binlerce SNP'in çalışılmasına imkan sağlamıştır. Böylece pozisyonu ve fonksiyonu ile ilgili önceden bilgi sahibi olunmadan orta derecede riskli allellerin tespit edilmesi sağlanmış olmaktadır³⁹.

Genlerde oluşan bu polimorfik yapılar fenotipte kendini gösterebildiği gibi daha karmaşık bir şekilde fenotip/ genotipi etkileyebilmektedir. Bireylerin genomundaki bu tür değişikliklerin; kanser riski, hastalığa yatkınlık, ilaca verilen yanıt gibi birçok faktör üzerine etkileri vardır⁶¹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Biyolojik materyal

Bu çalışmaya; Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından meme kanseri tanısı konulan 55 hasta ve meme kanseri dışında başka sebeplerden dolayı opere edilen, meme kanserli olmayan 32 sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. Dokuların tamamı Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarından alındı.

3.1.2. Cihazlar ve teknik malzemeler

Bu çalışmada, aşağıda listelenmiş ve Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı bünyesinde bulunan cihazlar ve teknik malzemeler kullanılmıştır.

1. Rotary Mikrotom (LEICA RM2145)
2. Etüv (Heraeus)
3. Su Banyosu (PolyScience)
4. Santrifüj (Heraeus)
5. Mikrosantrifüj (Eppendorf)
6. Vorteks (IKA MS1)
7. Manyetik Karıştırıcı (Fisher Scientific)
8. Hassas Terazî (Boeco)
9. Spektrofotometre (BIO-RAD)

10. PCR cihazı (BIO-RAD)
11. Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Cleaver)
12. Termal Cyclers (EPPENDORF)
13. UV jel görüntüleme cihazı (SYNGENE)
14. pH ölçüm cihazı (Seven Easy)
15. Mikrodalga (Vestel)
16. Buzdolabı (Vestel)
17. Otoklav (TOMY SX-500E)
18. Distile su cihazı (TKA-Pacific)
19. Otomatik mikropipetler (Eppendorf)

3.1.3. Sarf malzemeler

1. Borik asit (Sigma)
2. Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)
3. Tris HCl (Sigma)
4. Tag DNA polimeraz enzimi (5U/ μ l) (Fermentas)
5. Magnezyum klorür ($MgCl_2$) (25 mM) (Fermentas)
6. PCR tamponu (10X) (Fermentas)
7. Primerler (100 pmol/ μ l) (Fermentas)
8. dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (2mM) (Fermentas)
9. Marker DNA (50 bç- 100 bç) (Fermentas)
10. Restriksiyon enzimleri BstUI, AatII, MspI, TaqI (10U/ μ l) (Fermentas)
11. Etidyum Bromür (EtBr) (10mg/ml) (Sigma)
12. Agaroz (PRONA)
13. Loding Dye (6X) (Fermentas)

14. DNA İzolasyon Kiti (analytikjena blackREP FFPE)
15. Pipet Ucu
16. PCR tüpü
17. Ependorf tüp

3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

3.1.4.1. 10X TBE çözeltisi hazırlanışı

Trizma Baz (890 mM) 108 gr

Borik Asit (890 mM) 55 gr

EDTA (20 mM) 7.4 gr

Bileşenler tartıldı ve behere alındı. Üzerine hacim 1L olacak şekilde steril distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülerek pH 8.0'e ayarlandı. Otoklavda sterilizasyonu yapıldıktan sonra 10X TBE çözeltisi elde edildi. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

3.1.4.2. 1X TBE çözeltisi hazırlanışı

100 ml 10X TBE, steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Işığa hassas olduğu için etrafı alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'de saklandı.

3.1.4.3. Stok etidyum bromür çözeltisi hazırlanışı

10 mg etidyum bromür (10mg/ml) 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.1.4.4. % 1.5'lik agaroz jel hazırlanışı

1.5 g agaroz tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 100 ml olacak şekilde 1X TBE eklendi. Mikrodalga fırında kaynatılarak çözündürüldü.

Mikrodalgadan çıkarıldıktan sonra elle tutulabilir sıcaklığa düştüğünde (50-55 °C) çözünen agaroz jel içine son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde stok etidyum bromür (10mg/ml) çözeltisinden etidyum bromür eklendi.

Hazırlanan jel, yatay jel yatağına kuyucukların oluşmasını sağlayan taraklar yerleştirildikten sonra döküldü ve donmaya bırakıldı.

Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı ve örneklerin yüklenmesi için jel hazır hale getirildi.

3.1.4.5. % 2'lik agaroz jel hazırlanışı

2 g agaroz tartılarak erlene konuldu ve son hacim 100 ml olacak şekilde üzerine 1X TBE eklendi. Diğer tüm işlemler % 1.5'lik agaroz jel hazırlanış aşamasındaki protokol takip edilerek gerçekleştirildi.

3.2. Yöntemler

Bu araştırma Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvar'ında yapılmıştır. Araştırmaya 55 meme kanserli ve 32 kontrol dahil edilmiştir.

Bu çalışmada öncelikle meme kanseri tanısı konmuş hastalara ait parafine gömülü doku örneklerinden tümör doku parçaları ve meme kanseri dışında başka sebeplerden dolayı opere edilen, meme kanseri olmayan bireylerin normal doku parçaları 2x5 µ kesitler halinde ependorf tüplerine alınarak numaralandırıldı, oda sıcaklığında muhafaza edildi. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Patoloji Anabilim Dallarında hasta raporlarından hastalığın oluşumuna ve gelişimine katkısı olduğu düşünülen sosyodemografik bilgiler (yaş, aile öyküsü, sigara alkol kullanımı, östrojen-progesteron düzeyleri) alındı. Daha sonra doku örneklerinden, analitikjena blackREP FFPE izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lerden PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi ve agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun olup olmadığı kontrol edildi. PCR ürünleri parça uzunluk kesim polimorfizmi (RFLP-

Restriction Fragment Length Polymorphism) reaksiyonuna tabi tutularak agaroz jelde yürütüldü. Jel üzerindeki bantlara bakılarak polimorfizm olup olmadığı belirlendi. Elde edilen sonuçların istatistiksel verileri, SPSS 15.0 programında Pearson Ki-kare ya da Fisher's Exact testi ile belirlendi.

3.2.1. DNA izolasyonu

Meme kanserli hastalara ve kontrol grubu bireylere ait dokulardan DNA izole edildi. Parafine gömülü dokulardan DNA izolasyonu için DNA izolasyon kiti (analytikjena blackREP FFPE) kullanılarak aşağıdaki protokol aşamaları uygulandı.

Parafine gömülü dokulardan mikrotom ile yaklaşık olarak 2x5 µ boyutlarında kesit alınarak ependorf tüpüne konuldu.

- 1- Alınan kesitler üzerine 400 µl liziz solüsyonu ve 25µl proteinaz K eklenerek bu karışım 5 saniye vortekslendi. 50 °C'de 1 saat ve 90 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından maksimum hızda (13.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.
- 2- Santrifüj sonrası karışımın üst kısmı 1,5 ml'lik tüpe alınarak üzerine 200 µl bağlama solüsyonu eklenerek vortekslendi. Farklı bir tüpe spin filtre takıldı ve karışım bu tüpe alındı. Daha sonra yaklaşık 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- 3- Karışımın üzerine 700 µl yıkama solüsyonu eklenerek yaklaşık 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Aynı işlem iki kez tekrarlandı.
- 4- Tüpten filtre çıkarılarak yeni bir tüpe alındı. Maksimum hızda (13.000 rpm) 1 dk. santrifüj edildi.
- 5- Daha sonra filtre çıkarılarak elüsyon tüpüne alındı ve 100 µl elüsyon tamponu eklendi. 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Ardından filtre çıkarılarak atıldı. Elde edilen DNA, 20 °C'de saklandı.

3.2.2. DNA saflığı ve konsantrasyonunun ölçümü

Stok DNA tüpünden 1 µl örnek alındı spektrofotometre küvetine aktarıldı. Üzerine 99 µl distile su eklendi.

1. Örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm UV dalgaboyunda absorpsiyon değerleri okundu.
2. DNA miktarı formüle göre hesaplandı:
Konsantrasyon= 100 (Sulandırma) x 50 (sabit) x OD 260= ng/µl DNA
3. OD 260/280>2 ng/µl RNA, <1.8 ng/µl protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

3.2.3. PCR amplifikasyonu

Çalışmada CASP 8 geni (D302H G/C) ve CASP 9 geni (Q221R G/A,83 C/T ve 5969 C/T) bölgelerini çoğaltmak için T. Hlavaty ve ark.⁶³ ve Zhibin Hu ve ark.⁶⁴'nın çalışmalarında kullandıkları primerler seçilmiştir. Kullanılan primer çiftlerinin dizileri tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Kaspaz 8 geni SNP D302H ve kaspaz 9 geni SNP'leri Q221R G/A, 83 C/T ve 5969 /T için kullanılan primer çiftleri

Gen	Pozisyon ve Baz Değişimi	Primerler	PCR ürün Uzunluğu (bp)
CASP8	D302H G/C (rs1045485)	5'-CATTTTGAGATCAAGCCCCGC-3' (forward)	132
		5'-CCCTTGTCTCCAT GGAGAGGA-3' (reverse)	
CASP9	Q221R G/A (rs1052576)	5'-GGCTTTGCTGGAGCTGGCCC-3' (forward)	121
		5'-AGTACCCAATGCCTGCCAGGG-3' (reverse)	
	83 C/T (rs1052571)	5'-ACCTGGATGTCCTCGATCAT-3' (forward)	164
		5'-GCGGCCTGGAGTCTTAGTT-3' (reverse)	
	5969 C/T (rs4646008)	5'-GTCCACTGGTCTGGGTGTTT-3' (forward)	197
		5'-GAGGGAGTCAGGCTCTTCCT-3' (reverse)	

PCR aşamasında; 1.2 µl MgCl₂ (25mM), 3 µl dNTP (2mM), her bir primerden (10 pmol/µl) 1'er µl, 3 µl PCR tampon (10X), 0,5 µl Taq DNA polimeraz (5U/µl), 2.5 µl saflaştırılan genomik DNA (150-200ng) ve toplam hacim 25 µl olacak şekilde dH₂O eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

SNP	DNA (150- 200ng)	PCR tamponu (10X)	Primerler (F ve R) (10 pmol)	MgCl ₂ (25mM)	dNTP (2mM)	Taq DNA polimeraz (5U/µl)	dH ₂ O	Toplam hacim
D302H G/C	5 µl	6 µl	1+1 µl	2.4 µl	6 µl	1 µl	27.6 µl	50 µl
Q221R G/A	2.5 µl	3 µl	1+1 µl	1.2 µl	3 µl	0.5 µl	12.8 µl	25 µl
83 C/T	3 µl	4.2 µl	1.4+1.4 µl	1.6 µl	4.2 µl	0.7 µl	18.5 µl	35 µl
5969 C/T	2.5 µl	3 µl	1+1 µl	1.2 µl	3 µl	0.5 µl	12.8 µl	25 µl

Her bir bölgenin amplifikasyonunu gerçekleştirmek amacıyla PCR programı ısı döngüleri tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Optimal amplifikasyonların gerçekleştiği PCR programı ısı döngüleri

SNP	Ön Denatürasyon Aşaması (1 döngü)	Tepkime Döngüsü (35 Döngü)			Son sentez Aşaması (1 döngü)
		Denatürasyon Aşaması	Hibridizasyon Aşaması	Sentez (uzama) Aşaması	
D302H G/C	95 °C'de 5 dk	95 °C'de 30 sn	61 °C'de 35 sn	72 °C'de 30 sn	72 °C'de 12 dk
Q221R G/A	95 °C'de 5 dk	95 °C'de 30 sn	65 °C'de 35 sn	72 °C'de 30 sn	72 °C'de 12 dk
83 C/T	95 °C'de 5 dk	95 °C'de 30 sn	60 °C'de 35 sn	72 °C'de 30 sn	72 °C'de 12 dk
5969 C/T	95 °C'de 5 dk	95 °C'de 30 sn	59 °C'de 35 sn	72 °C'de 30 sn	72 °C'de 12 dk

Elde edilen PCR ürünleri % 1.5'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

3.2.4. PCR Ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ve yorumlanması

Dört farklı bölgeye özgü PCR ürünleri % 1.5'lik agaroz jelde, 100 volt, 30 dakika elektroforez sisteminde yürütüldü. Her bir bölgeye özgü PCR ürün büyüklükleri tablo 3.4'de verilmektedir.

Tablo 3.4: Amplifikasyon sonrası beklenen PCR ürün büyüklükleri

SNP	PCR Ürün Büyüklüğü
CASP8 D302H G/C	132 bç
CASP9 Q221R G/A	121 bç
CASP9 83 C/T	164 bç
CASP9 5969 C/T	197 bç

3.2.5. RFLP yöntemi ile PCR ürünlerinin kesimi ve görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforezi ile amplifikasyon kontrolü yapılan örnekler; T. Hlavaty ve ark.⁶³ ve Zhibin Hu ve ark.⁶⁴'nin yöntemine göre BstUI, MspI, AatII ve TaqI restriksiyon enzimleri ile uygun sıcaklık ve sürede kesim reaksiyonuna alındı. Tablo 3.5'de belirtilen oranlarda reaksiyon bileşenleri hazırlandı.

Tablo 3.5: CASP8 ve CASP9 geni SNP'leri için uygun RFLP reaksiyon koşulları

SNP-Enzim	Tampon (10X)	Restriksiyon Enzimi (10U/ μ l)	PCR Ürünü (0.2 μ g/30 μ l)	dH ₂ O	Toplam Hacim (μ l)	Reaksiyon Süresi
D302H G/C -BstUI	2 μ l	1 μ l	10 μ l	17 μ l	30 μ l	37°C, 5dk.
Q221R G/A -MspI	2 μ l	1 μ l	10 μ l	17 μ l	30 μ l	37°C, 15dk.
83 C/T -AatII	2 μ l	1 μ l	10 μ l	17 μ l	30 μ l	37°C, 5dk.
5969 C/T -TaqI	2 μ l	1 μ l	10 μ l	17 μ l	30 μ l	65°C, 5dk.

Reaksiyon ürünleri % 2'lik agaroz jele yüklenerek 100 volt'luk akımda 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elde edilen kesim ürünlerine ait elektroforez sonuçları UV görüntüleme cihazı ile görüntülenerek değerlendirildi. Her bir enzim bölgesi özellikleri ve o bölgelere özgü elde edilen parça büyüklükleri tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6: Enzimlerin uygun bağlanma sıcaklıkları (annealing sıcaklığı), tanıma bölgeleri ve kesim sonrası oluşan parça büyüklükleri

SNP	Restriksiyon enzimi	Enzim çalışma sıcaklığı (°C)	Enzim tanıma bölgesi	PCR ürün büyüklüğü (bç)	Enzim kesiminden elde edilen parça büyüklüğü (bç)
D302H G/C	BstUI	61	5' -CG CG- 3' 3' -GC GC- 5'	132	G: 112 + 20 C: 132
Q221R G/A	MspI	65	5' -C CGG- 3' 3' -GGC C- 5'	121	G: 102 + 19 A: 121
83 C/T	AatII	60	5'-GACGT C- 3' 3'-C TGCAG- 5'	164	C: 116 + 48 T: 164
5969 C/T	TaqI	59	5' -T CGA- 3' 3'-AGC T- 5'	197	T: 197 C: 102 + 95

3.2.6. İstatistiksel analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 15.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde (%) olarak özetlendi. Hasta ve kontrol grupları içinde kategorik ölçümlerin genlerle etkileşimini incelemede Pearson Ki-kare ya da Fisher's Exact testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi $p \leq 0.05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubu Bireylerinin Genel Bilgileri

Bu çalışmaya meme kanseri tanısı konulan 55 hasta ve meme kanseri dışında başka sebeplerden dolayı opere edilen, meme kanseri olmayan 32 kontrol dahil edildi.

Hasta bireylere ait, hastalığın oluşumunda ve ilerlemesinde etkili olduğu düşünülen yaş, obezite, sigara kullanımı, alkol kullanımı, aile öyküsü ve histopatolojik bilgileri tablo 4.1’de gösterilmektedir.

Çalışmamızda deney grubunu 26- 83 yaş aralığındaki bireyler oluşturdu. Bu bireylerin; 46 (% 84)’i 40 yaşın üzerinde iken, sadece 9 (% 16)’i 40 yaşın altındaki bireylerden oluştu. Bireyler obezitenin varlığına göre değerlendirildiğinde; 55 bireyin 43 (% 78.2)’ü kilolu ve aşırı kilolu olarak bilinen obez, 12 (% 21.8)’ü ise normal kilolu olarak tespit edildi. Deney grubunda sigara kullanımına bakıldığında; 11 (% 20) sigara kullanan bireye karşılık, 44 (% 80) kullanmayan birey tespit edildi. Alkol kullanımı açısından bireyleri değerlendirdiğimizde ise, bireylerin tamamının alkol kullanmayanlardan oluştuğu tespit edildi. Ailede meme kanseri/kanser varlığı açısından deney grubu bireyleri değerlendirdiğimizde; 12 (% 21.8) bireyde aile öyküsü var, 43 (% 78.2) bireyde ise ailede kanser olgusuna rastlanmamıştır. Kontrol grubunu oluşturan bireyler 39-82 yaş aralığında idi. Bu bireylerin sadece ikisi 40 yaşın altındaki bireylerden oluşmaktaydı. Kontrol grubu bireylerde obeziteye sahip olan 23 (% 71.9) birey, normal kilolu birey sayısı ise 9 (% 28.1) olarak bulundu. Sigara kullanımı açısından bakıldığında; 5 (% 15.6) bireyin sigara kullandığı 27 (% 84.4) bireyin ise kullanmayan bireylerden oluştuğu tespit edildi. Alkol kullanımı deney grubunu oluşturan bireylerde olduğu gibi kontrol grubunda da hiçbir bireyde gözlenmedi. Ailesinde meme kanseri/kanser varlığı açısından kontrol grubu bireyleri değerlendirdiğimizde sadece 5 (% 15.6) bireyde ailesinde kanserli olguya rastlanmıştır (Tablo 4.1).

Histopatolojik özelliklerden tümörün histolojik tipi açısından değerlendirme yapıldığında; invaziv duktal karsinomalı 36 (% 65.5), invaziv lobüler karsinomalı 6 (%

10.9), invaziv mikst karsinomlu 7 (% 12.7), inflamatuvar karsinomlu 3 (% 5.5) ve diğer tümör tiplerine sahip 3 bireyin olduğu tespit edildi. Hastalarda metastaz varlığına bakıldığında 17 (% 31) metastaz gözlenen bireye karşılık 38 (% 69) gözlenmeyen birey saptandı. Endojen hormonlardan ER'nin durumu açısından bakıldığında; ER (+) birey sayısı 41 (% 75) iken, ER (-) birey sayısı 14 (% 25) olarak tespit edildi. Diğer bir endojen hormon olan PR varlığına bakıldığında ise; 43 (% 78.2) PR (+) bireye karşılık, 12 (% 21.8) PR (-) birey tespit edildi. Son olarak Cerb-B2 değeri açısından bireyleri kıyasladığımızda; 43 (% 78.2) birey (+), 12 (% 21.8) birey (-) olarak belirlendi (Tablo 4.1).

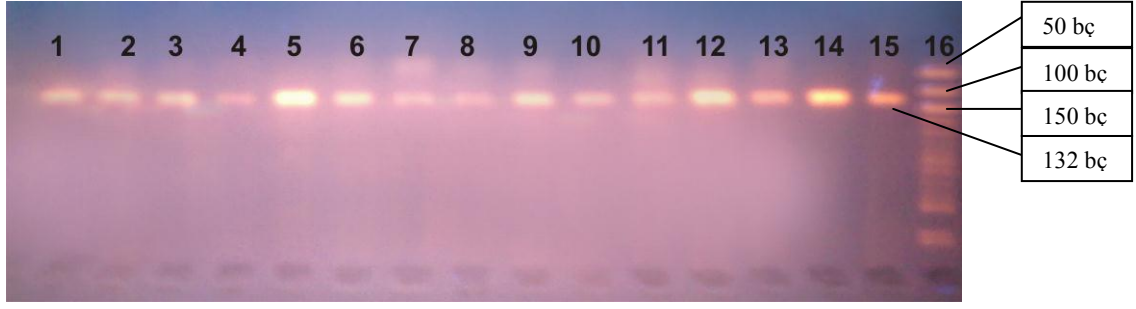
4.2. Meme Kanserli Bireylerde CASP8 D302H G/C ile CASP9 Q221R G/A, 83 C/T ve 5969 C/T Polimorfizleri Sıklıkları Dağılımı

4.2.1. Meme kanserli bireylerde CASP8 geni SNP D302H G/C PCR ve enzim kesim sonuçları

CASP8 genine özgü primerler ile belirtilen koşullarda söz konusu polimorfizmi belirlemek amacıyla 132 bç'lik DNA bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı (Resim 4.1). Bu çoğaltılmış DNA fragmentleri BstUI restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edildi. Elde edilen enzim kesim ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek amacı ile % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. PCR ürünlerinin BstUI restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonrası, bu polimorfizmi heterozigot taşıyan vakalarda (132, 112, 20 bç) ve homozigot formda taşıyan olgularda (132 bç veya 112, 20 bç) elde edilen kesim ürünlerinin parça büyüklükleri resim 4.2 ve resim 4.3'de gösterildi. 20 bç'lik bant küçük bir kesim ürünü boyutu olduğu için resimlerde görülmemektedir. Tüm meme kanserli ve kontrol grubu bireylerin homozigot G, heterozigot G ve homozigot C alleli açısından değerlendirilmesi tablo 4.2'de gösterildi.

Tablo 4.1: Meme kanserli hasta grubunu oluşturan bireylerin histopatolojik ve demografik bilgileri.

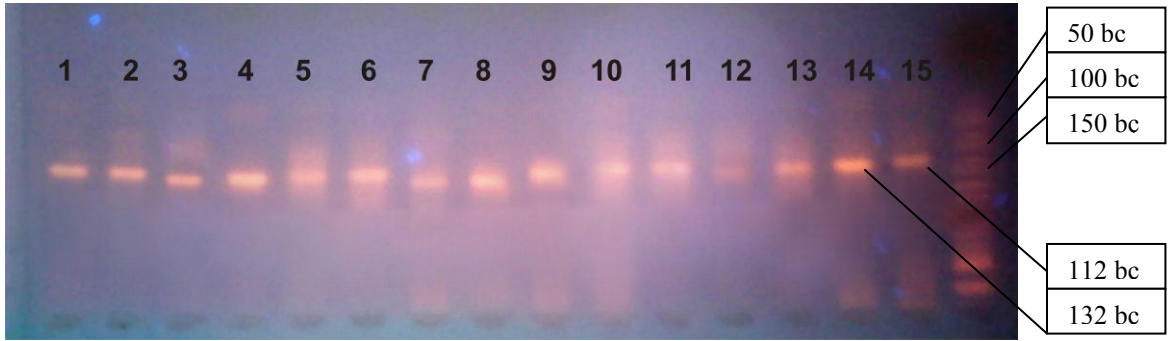
Özellik	Hasta Sayısı (n=55)	Oran (%)	Kontrol (n= 32)	Oran (%)
Yaş				
>40	46	84.0	2	6.3
<40	9	16.0	30	93.7
Obezite				
Var	43	78.2	23	71.9
Yok	12	21.8	9	28.1
Sigara kullanımı				
Var	11	20.0	5	15.6
Yok	44	80.0	27	84.4
Aile Öyküsü				
Var	12	21.8	5	15.6
Yok	43	78.2	27	84.4
Histolojik Tip				
İnvaziv Duktal	36	65.5		
İnvaziv Lobüler	6	10.9		
İnflamatuar Ca.	3	5.5		
İnvaziv Mikst	7	12.7		
Diğer	3	5.4		
Metastaz				
Var	17	31.0		
Yok	38	69.0		
ER durumu				
Pozitif	41	75.0		
Negatif	14	25.0		
PR durumu				
Pozitif	43	78.2		
Negatif	12	21.8		
Cerb-B2				
Pozitif	43	78.2		
Negatif	12	21.8		



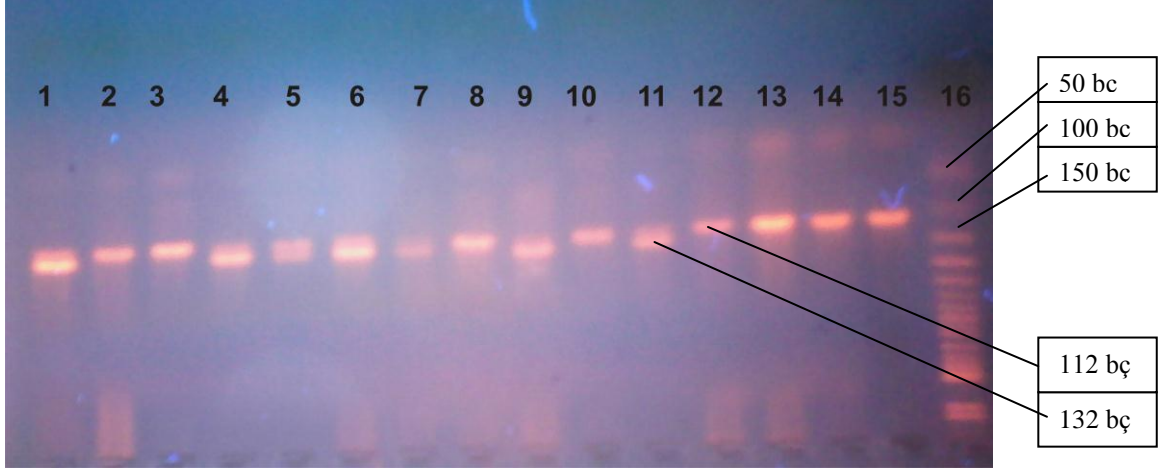
Resim 4.1: Meme kanserli bireylerde kaspaz 8 D302H G/C bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 1-15: PCR ürünü, 16: 50 bç'lik marker.

Tablo 4.2: Meme kanserli ve kontrol grubu bireylerde CASP8 D302H G/C polimorfizmi sıklık dağılımının gösterimi

Kaspaz 8 D302H genotipleri	HASTA GRUBU		KONTROL GRUBU		TOPLAM
	Birey Sayısı (N=55)	Oran (%)	Birey Sayısı (N=32)	Oran (%)	
GG	30	54.6	24	75.0	54
GC	13	23.6	5	15.6	18
CC	12	21.8	3	9.4	15



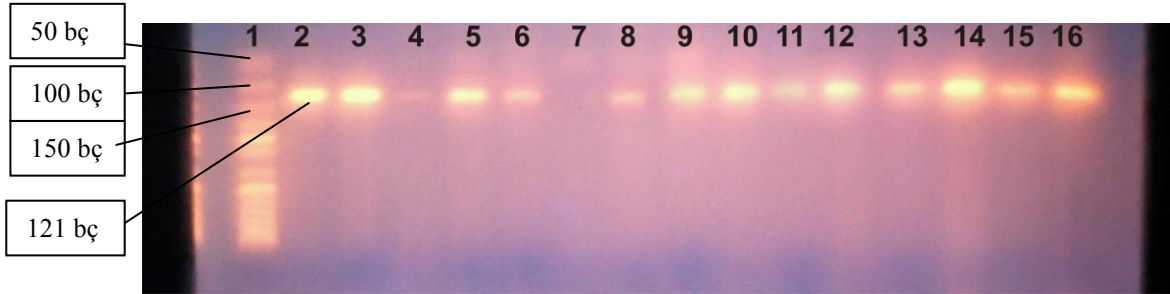
Resim 4.2: Meme kanserli bireylerde kaspaz 8 D302H G/C bölgesi PCR ürünlerinin BstUI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. 1-15: kesim ürünü, 16: 50 bç'lik marker.



Resim 4.3: Meme kanserli olmayan bireylerde kaspaz 8 D302H G/C bölgesi PCR ürünlerinin BstUI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. 1-15: kesim ürünü, 16: 50 bç'lik marker.

4.2.2.Meme kanserli bireylerde CASP9 geni SNP Q221R G/A PCR ve enzim kesim sonuçları

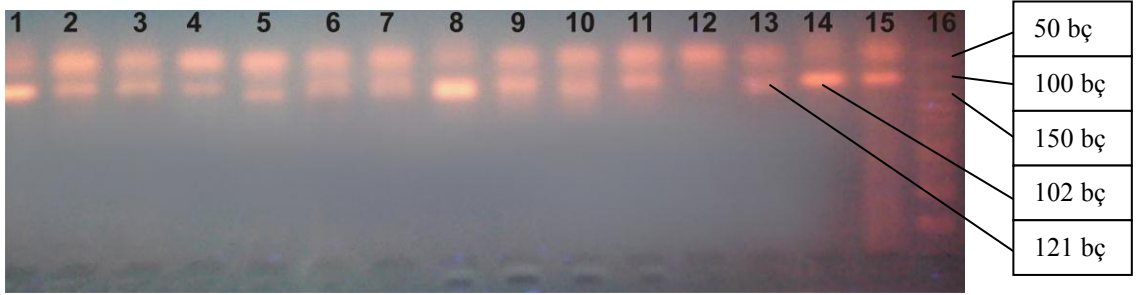
CASP9 geni Q221R G/A bölgesine özgü primerler ile belirtilen koşullarda söz konusu polimorfizmi belirlemek amacıyla 121 bç'lik DNA bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı (resim 4.4). Bu çoğaltılmış DNA fragmentleri MspI restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edildi. Elde edilen enzim kesim ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek amacıyla % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. PCR ürünlerinin MspI restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonrası, bu polimorfizmi heterozigot taşıyan vakalarda (121, 102, 19 bç) ve homozigot formda taşıyan olgularda (121 bç veya 102, 19 bç) elde edilen kesim ürünlerinin parça büyüklükleri resim 4.5 ve resim 4.6'de gösterildi. 19 bç'lik bant küçük bir kesim ürünü boyutu olduğu için resimlerde görülmemektedir. Tüm meme kanserli ve kontrol grubu bireylerin homozigot A, heterozigot A ve homozigot G alleli açısından değerlendirilmesi tablo 4.3'te gösterildi.



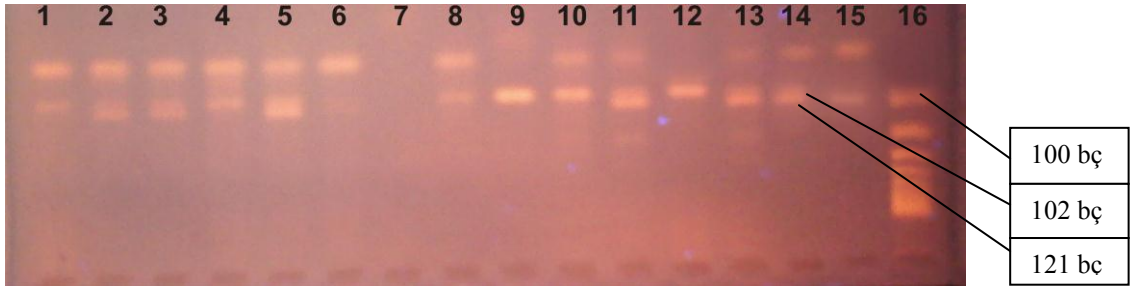
Resim 4.4: Meme kanserli ve kontrol grubu bireylerde kaspaz 9 Q221R G/A bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 1: 50 bç'lik marker, 2-16: PCR ürünü.

Tablo 4.3: Meme kanserli bireylerde CASP9 Q221R G/A polimorfizmi sıklık dağılımının gösterimi

Kaspaz 9 Q221R G/A genotipleri	HASTA GRUBU		KONTROL GRUBU		TOPLAM	
	Birey (N=55)	Sayı	Oran (%)	Birey (N=32)		Sayı
GG	23		41.8	9		32
AG	25		45.5	21		46
AA	7		12.7	2		9



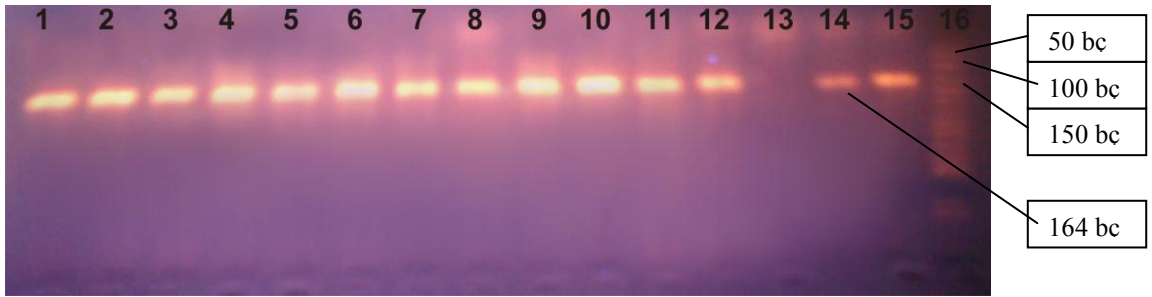
Resim 4.5: Meme kanserli bireylerde kaspaz 9 Q221R G/A bölgesi PCR ürünlerinin MspI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. 1-15: kesim ürünü, 16: 100bç'lik marker.



Resim 4.6: Meme kanserli olmayan bireylerde kaspaz 9 Q221R G/A bölgesi PCR ürünlerinin MspI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. 1-15: kesim ürünü, 16: 100bç'lik marker.

4.2.3. Meme kanserli bireylerde CASP9 geni SNP 83 C/T PCR ve enzim kesim sonuçları

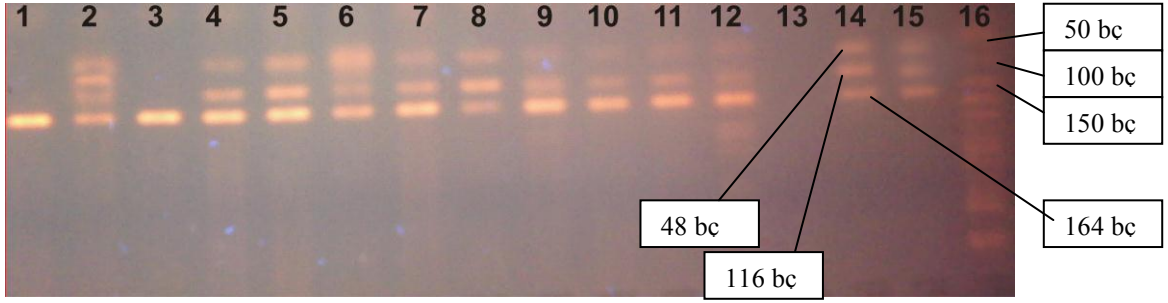
CASP9 geni 83 C/T'ye özgü primerler ile belirtilen koşullarda söz konusu polimorfizmi belirlemek amacıyla 164 bç'lik DNA bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı (Resim 4.7). Bu çoğaltılmış DNA fragmentleri AatII restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edildi. Elde edilen enzim kesim ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek amacıyla % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. PCR ürünlerinin AatII restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonrası, bu polimorfizmi heterozigot taşıyan vakalarda (164, 116, 48 bç) ve homozigot formda taşıyan olgularda (164 bç veya 116, 48 bç) elde edilen kesim ürünlerinin parça büyüklükleri resim 4.8 ve resim 4.9'de gösterildi. Tüm meme kanserli ve kontrol grubu bireylerin homozigot C, heterozigot C ve homozigot T alleli açısından değerlendirilmesi tablo 4.4'te gösterildi.



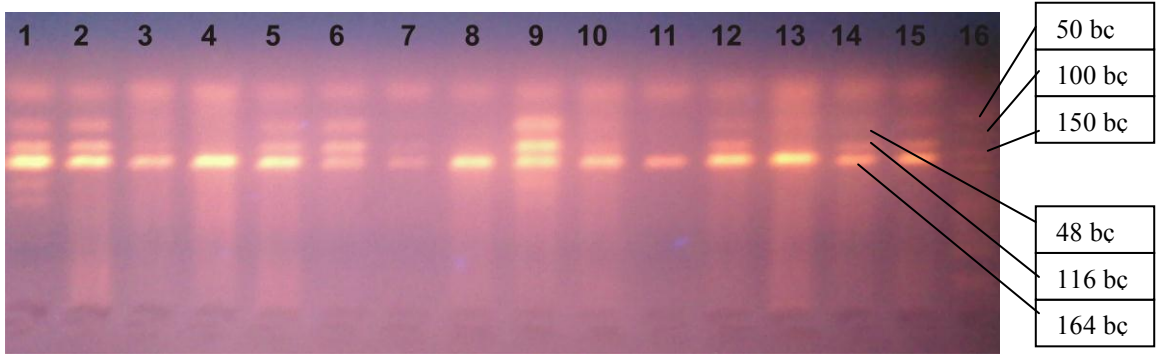
Resim 4.7: Meme kanserli ve kontrol grubu bireylerde kaspaz 9 83 C/T bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 1-15: PCR ürünü, 16: 50 bç'lik marker.

Tablo 4.4: Meme kanserli bireylerde CASP9 83 C/T polimorfizmi sıklık dağılımının gösterimi

Kaspaz 9 83 C/T genotipleri	HASTA GRUBU		KONTROL GRUBU			TOPLAM
	Birey Sayısı (N=55)	Oran (%)	Birey Sayısı (N=32)	Oran (%)	Oran (%)	
CC	0	0	10	31.3	10	
CT	35	63.6	20	62,5	55	
TT	20	36.4	2	6.2	22	



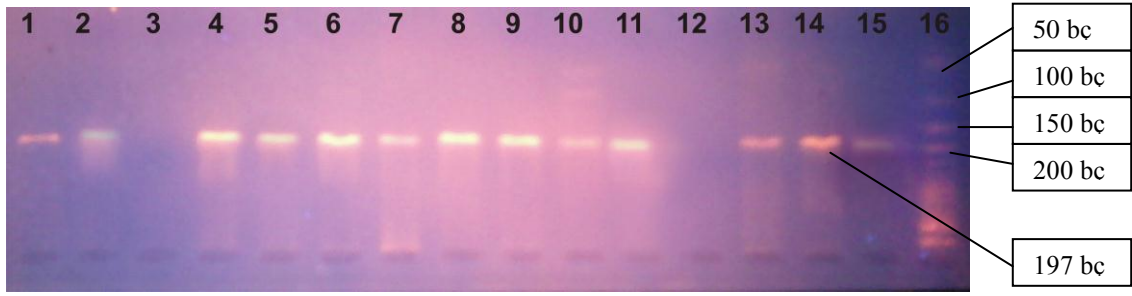
Resim 4.8: Meme kanserli bireylerde kaspaz 9 83 C/T bölgesi PCR ürünlerinin AatII enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. 1-15: kesim ürünü, 16: 50 bç'lik marker.



Resim 4.9: Meme kanserli olmayan bireylerde kaspaz 9 83 C/T bölgesi PCR ürünlerinin AatII enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. 1-15: kesim ürünü, 16: 50bç lik marker.

4.2.4.Meme kanserli bireylerde CASP9 geni SNP 5969 C/T PCR ve enzim kesim sonuçları

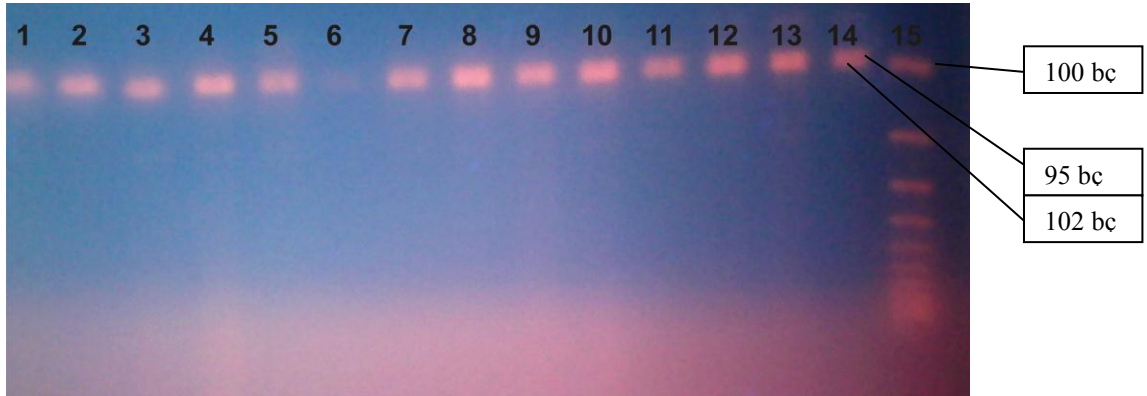
CASP9 geni 5969 C/T'ye özgü primerler ile belirtilen koşullarda söz konusu polimorfizmini belirlemek amacı ile 197 bç'lik DNA bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı (Resim 4.10). Bu çoğaltılmış DNA fragmentleri TaqI restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edildi. Elde edilen enzim kesim ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek amacı ile % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. PCR ürünlerinin TaqI restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonrası, bu polimorfizmi heterozigot taşıyan vakalarda (197, 102, 95 bç) ve homozigot formda taşıyan olgularda (197 bç veya 102, 95 bç) elde edilen kesim ürünlerinin parça büyüklükleri resim 4.11 ve resim 4.12'de gösterildi. Tüm meme kanserli ve kontrol grubu bireylerin homozigot C, heterozigot C ve homozigot T alleli açısından değerlendirilmesi tablo 4.5'te gösterildi.



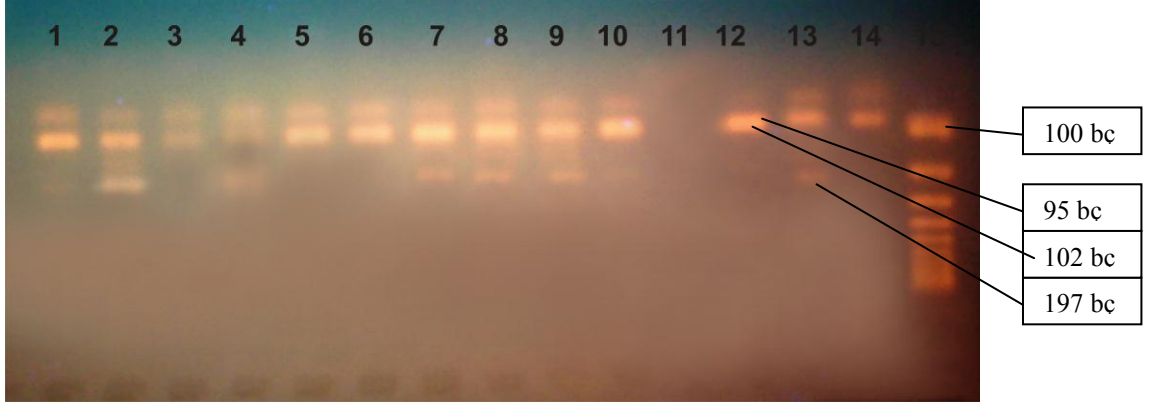
Resim 4.10: Meme kanserli ve kontrol grubu bireylerde kaspaz 9 5969 C/T bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. 1-15: kesim ürünü, 16: 100bç lik marker.

Tablo 4.5: Meme kanserli bireylerde CASP9 5969 C/T polimorfizmi sıklık dağılımının gösterimi

Kaspaz 9 5969 C/T genotipleri	HASTA GRUBU		KONTROL GRUBU			TOPLAM
	Birey (N=55)	Sayısı	Oran (%)	Birey (N=32)	Sayısı	
CC	55		100	10		65
TC	0		0	22		22
TT	0		0	0		0



Resim 4.11: Meme kanserli bireylerde kaspaz 9 5969 C/T bölgesi PCR ürünlerinin TaqI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. 1-15: kesim ürünü, 16: 100bç'lik marker.



Resim 4.12: Meme kanserli olmayan bireylerde kaspaz 9 5969 C/T bölgesi PCR ürünlerinin TaqI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. 1-15: kesim ürünü, 16: 100 bp'lik marker.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın malignite olmasının yanında, 40-50 yaş arası kadınlarda kanserden ölümlerin % 50'sini oluşturmaktadır. Her yıl 14000'den fazla kadın meme kanseri sebebiyle hayatını kaybetmektedir. Ancak meme kanserinde erken teşhisin sağkalım oranını artırdığı da bilinmektedir¹⁹.

Meme kanseri üzerine etkisi olan bazı risk faktörleri bulunmaktadır. Hormonların yaşam düzeylerini etkileyen yaş, sigara kullanımı, alkol alımı, obezite, ilk normal zamanlı gebelik, erken menarş, geç menopoz, aile öyküsü, coğrafik varyasyon vb. risk faktörlerinin meme kanserinin görülme olasılığını artırdığı bilinmektedir^{2,3}. Günümüzde meme kanseri için tedaviye yön vermek ve prognozu belirlemek amacıyla göz önüne alınan belli başlı prognostik ve prediktif faktörler bulunmaktadır. Bu faktörler hastanın genel ve hastalısız sağkalımı konusunda bilgilendirici ve dolayısı ile tedaviye karar verme aşamasında belirleyici rol oynamaktadır⁶⁵.

Sigara kullanımına küçük yaşlarda başlamanın ve pasif içiciliğin meme kanseri riskini artırdığını öne süren çalışmalara^{18,65,66} karşılık, sigara kullanımı ile meme kanseri riski arasında bağlantı olmadığını gösteren bazı çalışmalarda bildirilmiştir¹⁹. Günlük alınan 1-5 bardaklık alkolün meme kanseri riskini artırdığı ve buna bağlı olarak alkolik kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin % 15 arttığı ileri sürülmüştür¹⁸. Çalışmamızda hem meme kanserli hem de sağlıklı bireyler arasında sigara kullanımının düşük olmasının yanı sıra, vaka ve kontrol gruplarının ikisinde de alkol kullanan hiçbir bireye rastlanmamıştır. Sigara ve alkol kullanımının meme kanseri riski ile değerlendirilebileceği bir hasta ve kontrol grubu seçiminin bu konudaki yorumlamaya açıklık getireceği kanısındayız.

Obez bireylerde kandaki östradiol miktarı artış göstermektedir. Özellikle menopoz sonrası adipöz doku östrojenin ana kaynağı haline gelmektedir. Obez bireylerde menopoz sonrası östrojen düzeyleri, normal kilolu bireyler ile kıyaslandığında yaklaşık iki kat daha hızlı artış göstermektedir²². Çalışmamızda meme kanserli ve sağlıklı

bireyler obezite varlığı bakımından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir ($p>0.05$).

Çalışmamızda meme kanserli bireyler ile sağlıklı kontrol grubu, ailede kanser/ meme kanseri varlığı ve menopoz durumu açısından değerlendirildiğinde kaspaz 8 ve kaspaz 9 genotip dağılımı arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır. Böyle bir ilişkinin varlığının daha açık bir şekilde ortaya çıkarılabilmesi için hasta grubu ve kontrollerin bu özellikler göz önünde tutularak seçilmesi ve bu bireylerin biyolojik materyalleri kullanılarak başka çalışmaların yapılmasının faydalı olacağını düşünüyoruz.

Meme kanserinin moleküler bir prognostik faktörü olan C-erb-B2'nin aşırı ekspresyonu kötü prognostik bir parametre olup, steroid hormon reseptörlerinden ER ve PR negatif meme kanserlerinde karşımıza çıkmaktadır^{35,36,37}. Bu reseptörlerin pozitif veya negatifliği uzun yıllardır meme kanserinde tedaviye karar verme aşamasında kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda erken evre meme kanserlerinde ER (+) olguların sağkalım oranı ER (-) olgulara göre daha yüksektir. Primer meme kanserlerinin ortalama % 55-65'i ER (+), yaklaşık % 45-50'si PR (+) olgulardan oluşmaktadır³¹. Çalışmamızda olguların % 78.2'si C-erb-B2 (+), % 75'i ER (+), % 78.2'si PR (+) olarak belirlenmiş ve genel literatür oranlarından yüksek olduğu gözlemlenmiştir. C-erb-B2, ER ve PR (+/-) ile kaspaz 8 geni ve kaspaz 9 geni ilgili polimorfizmler açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p> 0.05$).

Kaspaz-8 geni D302H polimorfizmi ve kaspaz-9 geni Q221R G/A, 83 C/T ve 5969 C/T polimorfizmleri ile meme kanseri riski arasındaki ilişkinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen bulgular aynı zamanda Türk toplumunda Düzcce iline ait verileri oluşturmuştur. Bu amaçla, meme kanseri olan ve olmayan bireylere ait tümör ve normal dokularından izole edilen DNA örnekleri PCR-RFLP yöntemi ile analiz edilerek genotiplendirme yapılmıştır.

Apoptozis çok hücreli organizmalarda hasarlı, enfekte ve mutant hücrelerin seçici ve kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılması için temel bir biyokimyasal süreçtir. Ölüm reseptörü sinyali aracılığı ile başlatılan bu sürecin yürütülmesinde kaspazlar presipite

edici ajanlar olarak görev almaktadır⁶⁷. Apikal kaspaz olarak kaspaz 8, bir ölüm reseptörü-ligant etkileşiminden apoptozis sinyalini aldıktan sonra kaspaz kaskadının başlamasında merkezi bir role sahiptir. Kaspaz 8'in yaygın varyantlarından biri olan D302H ekzon 10'da yer almaktadır ve 302. pozisyonda aspartat amino asiti yerine histidin amino asitinin geçmesi sonucu polimorfik yapı oluşmaktadır. Bu varyant kaspaz 8 tarafından uyarılan apoptotik aktivasyonda bireyler arasında farklılığa katkıda bulunur ve bireylerin malignitelere karşı duyarlılıklarını artırır¹⁰.

MacPherson ve arkadaşlarının yürüttüğü kaspaz 8 D302H polimorfizm çalışması; İngiltere Sheffield bölgesine ait 954 meme kanserli hasta ve 964 kontrol grubunu içermektedir. Tüm vaka ve kontrol grubu bireyler beyaz Anglo-Sakson etnik kökenine ait bireylerden oluşmaktadır. Bu çalışmaya göre kaspaz 8 geni D302H polimorfizminde CC genotipine sahip kişilerde meme kanseri görülme riski diğerlerine oranla daha azdır. Aynı çalışma ayrıca İngiltere'nin Doğu-Anglia bölgesine ait 1848 meme kanserli ve 2082 kontrol grubu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları da İngiltere Sheffield bölgesine ait veriler ile örtüşmektedir. Sonuç olarak; C allelinin homozigot olduğu (CC) bireylerde meme kanseri görülme oranı, G allelinin homozigot olduğu (GG) bireyler ile karşılaştırıldığında C alleli homozigot taşıyıcılarında meme kanseri riski daha düşüktür⁶⁸.

Sigurdson ve arkadaşları Amerikalı radyoloji teknik uzmanlarından oluşan 859 meme kanserli birey üzerinde kaspaz 8 geni D302H polimorfizminin meme kanserine duyarlılığını incelemişlerdir. 660 vaka homozigot G allelini, sadece 7 vaka homozigot C allelini taşımakta idi. Çalışma sonucunda, bu polimorfizmin homozigot C allelinin meme kanseri riskini önemli ölçüde azalttığı tespitinde bulunmuşlardır⁶⁹.

Nail Duncan ve arkadaşlarının yaptığı İngiltere, Utah ve Almanyayı kapsayan bir çalışmada, kaspaz 8 geni D302H polimorfizmini 3200 meme kanserli birey ile 3324 sağlıklı kontrol grubu üzerinde meta-analiz yöntemi ile incelemişlerdir. $p=0.043$ olarak tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda kaspaz 8 D302H polimorfizminin meme kanseri riskini azalttığı öne sürülmüştür⁷⁰.

Theodoros ve arkadaşları Kafkas ve Çin popülasyonlarında, kaspaz8 D302H ve -652 6N polimorfizmleri ile meme kanserli 18.791 birey, 20.318 kontrol grubu üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma neticesinde her iki polimorfizmi taşıyan bireylerde meme kanseri riskinin azaldığı öne sürülmüştür⁷¹.

Çalışmamız sonucunda kaspaz 8 D302H G/C genotip dağılımına göre; olguların 30 (%54.6)'u homozigot G alleli, 13 (%23.6)'ü heterozigot G alleli (GC) ve 12 (%21.8)'si homozigot C alleli taşıyıcılarıydı. Kontrol grubu olgularda ise, 24 (%75)'ü homozigot G alleli, 5 (%15.6)'i heterozigot G alleli ve 3 (%9.4)'ü de homozigot C alleli taşıyıcılarıydı. İstatistiksel olarak kıyaslama yapıldığında, p değeri anlamlıya yakın olarak bulunmuş (p:0.067) ve alleller açısından C allelinin meme kanserine karşı koruyuculukta etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu haliyle verilerimiz literatür bilgileri ile uyum göstermektedir.

Kromozomun 1p36.1-p36.3 bölgesinde yer aldığı bilinen kaspaz 9'a ait Q221R polimorfizmi; ekzon 5 te yer alan kodon 22'de glutamin yerine arjininin geçmesi ile oluşur⁷². Bu polimorfizm Landi ve arkadaşları tarafından akciğer kanserli bireyler ve sağlıklı kontrol grupları arasında çalışılmış, homozigot G ve A allelini (GG, AA) veya heterozigot G (GA) allelini taşıyan bireyler arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir⁷³.

Hosgood ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, 128 multipl miyelom ve 514 sağlıklı kontrol grubu bireyler ile kaspaz 9 Q221R polimorfizmi ilişkisi araştırılmıştır. Bireylerin 41'i homozigot G (GG), 65'i heterozigot A (AG) ve 20'si homozigot A (AA) allele sahiptir. Bu sonuca göre, AG ve AA allele sahip bireylerin azalmış multipl miyelom ile ilişkili olduğu bulunmuştur⁷.

Hu ve arkadaşları, kanserli olmayan 170 bireyde görünüş olarak normal olan primer lenfositler ile kaspaz 9 Q221R polimorfizmi ilişkisi üzerine yaptıkları çalışmada elde ettikleri verilere göre bireylerin 53'ü GG, 75'i GA ve 42'si AA allele sahiptir. Yapılan

bu çalışmada görünüşte normal olan primer lenfositler ile kaspaz 9 geni Q221R polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır⁶⁴.

Çalışmamızda kaspaz 9 geni Q221R polimorfizmi 55 meme kanserli birey ve 32 sağlıklı bireyde incelenmiştir. Olguların 23 (%41.8)'ü GG, 25 (%45.5)'i GA ve 7 (%12.7)'si AA alleli; kontrol grubu bireylerin de 9 (%28.1)'u GG, 21 (%65.6)'i GA, 2 (%6.3)'si AA alleli taşıyıcıydı. Hasta ve sağlıklı bireyler arasında istatistiksel olarak (p: 0.182) anlamlı bir fark olmamasına karşın GA ve AA alleli taşıyıcıları arasındaki farklılık anlamlı olarak düşünülebilir.

Çalışmamızda incelenen bir diğer kaspaz 9 geni 83 C/T polimorfizmi 555 bağırsak hastalığı (CD) olan ve 651 ülseratif koliti (UC) olan bireyler üzerinde çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmaya göre 83 C/T polimorfizminin CD ile bir ilişkisi bulunamamış, ancak UC ile zayıf bir ilişkisi olduğu tespit edilmiştir⁷⁴.

Hlavaty ve arkadaşları, 204 luminal CD ve 83 fistülizan CD olan bireylerde kaspaz 9 geni 83 C/T ve 5969 C/T polimorfizmlerini incelemişler. Polimorfizm 83 CT için sonuçlar; luminal CDli bireylerden 40'ı CC, 113'i CT, 40'ı TT alleleline sahip, fistülizan CD'li bireylerin 16'sı CC, 42'si CT ve 23'ü TT genotipe sahipti. Polimorfizm 5969 C/T için ise her iki bağırsak hastalığında da bireylerin tümü CC alleleline sahipti. Elde edilen bu veriler neticesinde bu iki bağırsak hastalığı ve kaspaz 9 geninde bahsedilen bu polimorfizmler açısından anlamlı bir ilişki bulunamamıştır⁶³.

Düzce ili meme kanserli bireyler üzerinde çalışılan kaspaz 9 geninin bir diğer polimorfizmi olan 83 C/T verilerine göre; olguların 20 (%36.4)'si TT, 35 (%63.6)'i TC genotipe sahipken CC genotipli hiçbir bireye rastlanmamıştır. Kontrol grubu bireylerin ise, 2 (%6.2)'si TT, 20 (%62.5)'si TC ve 10 (%31.3)'u CC genotipe sahipti. Hasta ve sağlıklı bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p:0.000). C alleli homozigot taşıyıcılarında meme kanseri gelişme riskinin oldukça düşük olduğu ve bu kansere karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen kaspaz 9 geni son polimorfizmi olan 5969 C/T verileri neticesinde hastaların tümünün (55 birey) homozigot C (CC) alleli taşıyıcısı olduğu, kontrol grubu bireylerin ise 22 (%68.7)'si heterozigot C (CT) ve 10 (%31.3)'u homozigot C (CC) alleli taşıyıcısı olduğu bulunmuştur. Barsak hastalığında⁶³ çalışılmış olan bu polimorfizm için tüm bireyler CC alleli taşıyıcısı idi ve barsak hastalığı ile kaspaz 9 geni 5969 C/T polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemişti. Bizim çalışmamızda meme kanserli bireyler ile kontrol grubu bireyler arasında C alleli taşıyıcılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p:0.000). Buna göre, bu polimorfizm açısından homozigot C alleli taşıyan bireylerin meme kanserine yakalanma riskinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; CASP8 geni D302H G/C polimorfizmi çalışmasında daha önceki çalışmalar gibi C alleli varlığının meme kanserine karşı koruyucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla daha önceden meme kanserinde hiç çalışılmayan CASP9 geni 83 C/T ve 5969 C/T polimorfizmlerinin meme kanseri ile ilişkili olduğu bulunurken bir diğer CASP9 geni polimorfizmi olan Q221R G/A'nın ise meme kanseri ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir.

Daha fazla sayıda denek ile farklı prognostik ve prediktif faktörlerde çalışmaya dahil edilerek, daha ileri genetik tarama yöntemleri kullanılarak yeni çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin.* 2011;6:69-90.
2. Breast Cancer Facts and Figures 2009-2010, <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/BreastCancerFactsFigures/breast-cancer-facts--figures-2009-2010>, Erişim tarihi: 22 Ocak 2011.
3. Kang D. Genetic polymorphisms and cancer susceptibility of breast cancer in Korean women. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 2003; 36(1): 28-34.
4. Cho SG, Choi EJ. Apoptotic signaling pathways: Caspases and stres-activated protein kinases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 2002;35(1):24-27.
5. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-1042.
6. Jager R, Zwacka RM. The enigmatic roles of caspases in tumor development. *Cancers.* 2010;2:1952-1979.
7. Hosgood HD 3rd, Baris D, Zhang Y, Zhu Y, Zheng T, Yeager M, Welch R, Zahm S, Chanock S, Rathman N, Lan Q. Caspase polymorphisms and genetic susceptibility to multiple myeloma. *Hematol Oncol.* 2008;26:148-151.
8. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M. Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 2009;46:497-510.
9. Tomatır A. Apoptoz: Programlı Huce lum. *Turk. Klinikleri J. Med. Sci.* 2003; 23:499-508.
10. Yin M, Yan J, Wei S, Wei Q. CASP8 polymorphisms contribute to cancer susceptibility: evidence from a metaanalysis of 23 publications with 55 individual studies. *Carcinogenesis.* 2010;31(5): 850-857.
11. Jardines L, Haffty BG, Fisher P, Weitzel J, Royce M. Cancer management: A multidisciplinary approach. Pazdur R, Coia LW, Hoskins WJ, Wagman LD (Eds.).

Chapter 8: Breast cancer overview: Risk factors, screening, genetic testing and prevention. 8th ed. US. The Oncology Group. 2003:p.175-202.

12. Koçak S, Çelik L, Özbaş S, Dizbay Sak S, Tükün A, Yalçın B. Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: İstanbul 2010 konsensus raporu. *The Journal of Breast Health*. 2011; 7(2):47-67.
13. Özmen V, Özçınar B, Karanlık H, Çabıoğlu N, Tükenmez M, Disci R, Özmen T, İğci A, Müslümanoğlu M, Keçer M, Soran A. Breast cancer risk factors in Turkish women – a University Hospital based nested case control study. *World Journal of Surgical Oncology*. 2009;7(37):1-8.
14. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Britton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *International Journal of Epidemiology*. 2005;34:405-412.
15. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *The New England Journal of Medicine*. 2007;356:1970-1974.
16. Colditz GA. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:768-772.
17. Özmen V. Breast cancer in the world and Turkey. *The Journal of Breast Health*. 2008;4:6-12.
18. Mitrunen K. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. 2001. University Helsinki, Finnish Institute of Occupational Health, Academic Dissertation, 87 pages, Finland (Dr. Ari Hirvonen).
19. McPerson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of Breast Diseases: Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000;321(7261):624-628.
20. Guidelines for the early detection and screening of breast cancer, http://www.emro.who.int/publications/Book_Details.asp?ID=530, Erişim Tarihi: 10 Şubat 2011.

21. Nahleh Z. Breast cancer, obesity and hormonal imbalance: a worrisome trend. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2011;11(6):817-819.
22. Sharpe C, Boivin JF. The etiology of female breast cancer. *Med Principles Pract.* 2000;9:1-24.
23. Tapper W, Hammond V, Gerty S, Ennis S, Simmonds P, Collins A. The influence of genetic variation in 30 selected genes on the clinical characteristics of early onset breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10 (6):1-10.
24. Unger MA, Weber BL. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol.* 200;12:521-526.
25. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BAJ, Gayther SA, Birch JM, Lindblom A, Stppa-Lyonnet D, Bignon Y, Borg A, Hamann U, Haites N, Scott RJ, Maugard CM, Vasen H, Seitz S, Cannon-Albright LA, Schofield A, Zelada-Hedman M. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am. J. Hum. Genet.* 1998;62:676-689.
26. Lipworth L, Bailey LN, Trichopoulos D. History of Breast-Feeding in Relation to Breast Cancer Risk: a review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:302–312.
27. Geddes DT. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. *Journal of Midwifery & Woman's Health.* 2007;52(6):556-563.
28. Breast cancer treatment, general information about breast cancer, <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/Patient/page1>, Erişim tarihi: 13 Ocak 2011.
29. Your guide to the breast cancer pathology report, <http://www.breastcancer.org>, Erişim tarihi: 25 Eylül 2011.
30. İlvan ř. Meme karsinomu patolojisi. İ.Ü. Cerrahpařa Tıp Fakóltesi S¼rekli Tıp Eđitimi Etkinlikleri. 2006;54;65-71.

31. Evcimik T. Meme kanserinde prognostik faktörlerin sağkalıma etkisi. 2008. İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 3. Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, 73 sayfa, İstanbul (Doç. Dr. M. Rafet YİĞİTBAŞI).
32. Fitzgibbon PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark MG, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:966-978.
33. Giri DD, Dundas SAC, Nothingam JF, Underwood JCE. Oestrogen receptors in benign epithelial lesions and intraductal carcinomas of the breast: An immunohistological study. *Histopathology.* 1989; 574-584.
34. Tavanssol FA. *Pathology of the breast*, 2nd Ed. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange. 1999; 52-3.
35. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Hold JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989; 244: 707-712.
36. Paik S, Byyant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N. Erb B-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Cancer Inst.* 1998; 90: 1361-1370.
37. Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S, Host H, Nesland JM. The prognostic value of p53 and c-erb B2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 2000; 88: 804-13.
38. Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH. Chapter 1: Developmental, Cellular, and Molecular Basis of Human Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000; 27:17-37.
39. Easton DF, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature.* 2007;447(7148):1087-1093.
40. Freedman ML, Penney KL, Stram DO, Marchand LL, Hirschhorn JN, Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE, Haiman CA. Common variation in BRCA2 and

- breast cancer risk: A haplotype-based analysis in the multiethnic cohort. *Human Molecular Genetics*. 2004;13(20):2431-2441.
41. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22:8543-8567.
 42. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*. 2005; 73(4): 1907–1916.
 43. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26 (4): 239-245.
 44. Cruchten SV, Broeck WVD. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anat.Histol.Embryol*. 2002;31: 214–223.
 45. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los M. Caspases and cancer: Mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Experimental Oncology*. 2004; 26:82-97.
 46. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*. 2005; 258: 479–517.
 47. Strasser A, Cory S, Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO Journal*. 2011;30:3667-3683.
 48. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Lian J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2005;37(11):719–727.
 49. Park JY, Park JM, Jang JS, hoi JE, Kim KM, Cha SI, Kim CH, Kang YM, Lee WK, Kam S, Park RW, Kim IS, Lee JT, Jung TH. Caspase 9 promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. 2006;15(12):1963-1971.
 50. Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death and Differentiation*. 1999;6:1060 -1066.

51. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: Pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005; 115(10): 2665-2672.
52. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000;157:1415-1430.
53. Hadano S, Nasir J, Nichol K, Rasper DM, Vaillancourt JP, Sherer SW, Beatty BG, Ikeda JE, Nicholson DW, Hayden MR. Genomic organization of the human caspase-9 gene on Chromosome 1p36.1-p36.3. *Mammalian Genome.* 1999;10:757-760.
54. Gewies A. Introduction to apoptosis. *ApoReview.* 2003; 1-26.
55. Grenet J, Teitz T, Wei T, Valentine V, Kidd VJ. Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene. *Gene.* 1999;226(2):225-232.
56. Takita J, Yang HW, Chen YY, Hanada R, Yamamoto K, Teitz T, Kidd V, Hayashi Y. Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. *Oncogene.* 2001;20:4424-4432.
57. Sun T, Gao Y, Tan W, Ma S, Shi Y, Yao J, Guo Y, Yang M, Zhang X, Zhang Q, Zeng C, Lin D. A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter is associated with susceptibility to multiple cancers. *Nat Genet* 2007;39:605–613.
58. Haiman CA, Garcia RR, Kolonel LN, Henderson BE, Wu AH, Marchand LL. A promoter polymorphism in the CASP8 gene is not associated with cancer risk. *Nat Genet* 2008;40:259–260.
59. Johnson CR, Jarvis WD. Caspase-9 regulation: An update. *Apoptosis.* 2004;9(4):423-427.
60. Abel F, Sjöberg RM, Ejeskar K, Krona C, Martinsson T. Analyses of apoptotic regulators CASP9 and DFFA at 1P36.2, reveal rare allele variants in human neuroblastoma tumours. *British Journal of Cancer.* 2002;86:596-604.
61. Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal.* 2008;21(3):282-295.

62. Genomik'e genel bakış, http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_genomiks.pdf, Erişim tarihi: 25 Eylül 2011.
63. Hlavaty T, Pierik M, Henckaerts L, Ferrante M, Joessens S, Schuerbeek NV, Noman M, Rutgeerts P, Wermeire S. Polymorphisms in apoptosis genes predict response to infliximab therapy in luminal and fistulizing Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:613-626.
64. Hu Z, Li C, Chen K, Wang LE, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. Single Nucleotide Polymorphisms in Selected Apoptotic Genes and BPDE-Induced Apoptotic Capacity in Apparently Normal Primary Lymphocytes: A Genotype-Phenotype Correlation Analysis. *J Cancer Epidemiol.* 2008;2008:1-8.
65. Palmer JR, Rosenberg L. Cigarette smoking and the risk of the breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1993;15:145-156.
66. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol.* 2005;205(2):248-254.
67. Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of "The End"? *IUBMB Life.* 2000;50:85-90.
68. MacPherson G, Healey CS, Teare MD, Balasubramanian SP, Reed MVR, Pharoah PDP, Ponder BAJ, Meuth M, Bhattacharyya NP, Cox A. Association of a Common Variant of the CASP8 Gene With Reduced Risk of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:1866-1869.
69. Sigurdson AJ, Bhatti P, Doody MM, Hauptmann M, Bowen L, Simon SL, Weinstock RM, Linet MS, Rosenstein M, Stovall M, Alexander BH, Preston DL, Struewing JP, Rajaraman P. Polymorphisms in Apoptosis- and Proliferation-Related Genes, Ionizing Radiation Exposure, and Risk of Breast Cancer among U.S. Radiologic Technologists. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:2000-2007.
70. Shephard ND, Abo R, Rigas SH, Frank B, Lin WY, Brock IW, Shippen A, SP Balasubramanian, Reed MWR, Bartram CR, Meindl A, Schmutzler RK, Engel C,

- Burwinkel B, Cannon-Albright LA, Allen-Brady K, Camp NJ, Cox A. A Breast Cancer Risk Haplotype in the Caspase-8 Gene. *Cancer Res.* 2009;69:2724-2728.
71. Sergentianis TN, Economopoulos KP. Association of two CASP8 polymorphisms with breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120:229-234.
72. Hirano A, Nagai H, Harada H, Haga S, Kajiwara T, Emi M. Two novel single-nucleotide polymorphisms of the Caspase-9 (CASP9) gene in the Japanese population. *Genes and Immunity.* 2001;2:117-118.
73. Landi S, Gemignani F, Canzian F, Gaborieau V, Barale R, Landi D, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Foretova L, Janout V, Bencko V, Gioia-Patricola L, Hall J, Boffetta P, Hung RJ, Brennan P. DNA Repair and Cell Cycle Control Genes and the Risk of Young-Onset Lung Cancer. *Cancer Res.* 2006;66(22):11062-11069.
74. Guo C, Ahmad T, Beckly J, Cummings JRF, Hancock L, Geremia A, Cooney R, Pathan S, Jewell DP. Association of caspase-9 and RUNX3 with inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens.* 2010;77:23-29.

ÖZGEÇMİŞ

Asuman ÇELEBİ. 1987 yılında Düzce’de doğdu. 2001 yılında Hacıyakup İlköğretim okulundan mezun oldu. Düzce Süper Lisesi’nden 2005 yılında mezun oldu. Aynı yıl Konya Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2009 yılında buradan mezun oldu. 2010 yılında Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda eğitimine başladı, şu anda halen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tez dönemi öğrencisidir.