



T. C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MEME KANSERİNDE PIWIL-1 PIWIL-2, DICER-1, VE
DDX-4 GEN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. SEVDA YEŞİM ÖZDEMİR

KAYSERİ-2013



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MEME KANSERİNDE PIWIL-1 PIWIL-2, DICER-1, VE
DDX-4 GEN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sevda Yeşim ÖZDEMİR

Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

KAYSERİ-2013

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR.....	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. MEME VE MEME KANSERLERİNE KISA BİR BAKIŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.Memenin Anatomisi.....	2
2.1.1.Meme Fizyolojisi	3
2.2. MEME KANSERİ VE RİSK FAKTÖRLERİ.....	5
2.3. MEME KANSERİNDE GENETİK FAKTÖRLERİN ETKİSİ	8
2.3.1.Genetik Faktörler	8
2.3.2.Meme Kanserinde Etkili Olan Onkogenler	9
2.3.3.Meme Kanserinde Etkili Olan TümörBaskılayıcı Genler	9
2.3.4.Meme Kanserinde Etkili Olan DNA Tamir Genleri	9
2.3.5.Epigenetik Faktörler	9
2.4. MEME KANSERİNİN TANISI VE PATOLOJİK SINIFLANDIRMASI	10
2.4.1. Meme Kanserinin Patolojik Sınıflandırması	10
2.4.1.1. Karsinoma in situ	10
2.4.1.2.İnvaziv Duktal Karsinom (İDK)	11
2.4.3. İnvaziv LobülerKarsinoma	11

2.4. B: MEME KANSERİ EVRELEMESİ.....	11
2.4.1. B- i Meme kanseri AJCC Evrelemesi	12
2.5. EPİDEMİYOLOJİ	12
2.5.1. Türkiye’de Kanser İle Mücadele	13
2.5.2. Meme Kanseri ve Erken Tanı.....	13
2.6.KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ	17
2.6.1.Kanser Genomunun Destabilizasyonu:	17
2.7.KANSER GENLERİ, KANSER GEN MUTASYONLARI VE KANSER GENLERİNİN BELİRLENMESİ	18
2.8.KANSER GENOM ANALİZİYLE SOMATİK DÖNÜŞÜMLERİN BELİRLENMESİ VE YENİ TÜMÖR TAKSONOMİSİ.....	19
2.8.1.Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi:	20
2.9.KANSER EPİGENETİĞİ, EPİGENETİK SÜREÇ VE EPİGENETİK TEDAVİ	21
2.10.MEME KANSERİ VE GENETİK.....	22
2.10.1.Meme kanserinde genetik yatkınlık	23
2.10.2.Kalıtımsal Meme Kanseri.....	23
2.10.3.Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Nadir Görülen, Etkinliği Yüksek Genler.....	25
2.10.4.Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Etkinliği Orta Düzeyde, Az- Sıklıkta Görülen Genler	25
2.10.5.Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Etkinliği Düşük, Sık Görülen Gen ve Lokuslar.....	26
2.10.6.Meme Kanseri Somatik Değişiklikler	26
2.10.7.Meme Kanseri Gen Ekspresyon Paterni	27
2.11.ÇALIŞMAMIZDA DEĞERLENDİRİLEN GENLER VE FONKSİYONLARI	28
2.12.PIWIL2.....	28

2.10.3.DICER-1	30
2.10.4.PIWIL-1	30
2.10.5. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN LABORATUVAR YÖNTEMLERİ....	31
2.10.5.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	31
2.10.5.2.Real Time PCR teknolojisi	32
2.10.5.3.Bölgeye Spesifik Olmayan PCR Problemleri.....	34
3.GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1.ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE GRUPLANDIRILMASI.....	44
3.2.ARAŞTIRMADA KULLANILAN LABORATUVAR TEKNİKLERİ	44
3.3.KATILIMCILARIN ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ.....	45
3.4.KATILIMCILARIN ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLMEME KRİTERLERİ...45	
3.5.PARAFİNİZE DOKU BLOKLARINDAN KESİT HAZIRLANMASI	45
3.6.PARAFİNİZE DOKULARDAN RNA İZOLASYONU	46
3.7.DNA SENTEZİ.....	51
3.8.PRE-AMPLİFİKASYON.....	54
3.9.REAL-TİME PCR PROTOKOLÜ	56
4.BULGULAR	58
4.1.GRUPLAR ARASI İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	65
5.TARTIŞMA.....	67
6.KAYNAKLAR	73
ONAY	82

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi, deneyim ve destekleri ile eğitimimde büyük katkıları olan tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi, Gen-Kök Genom ve Kök Hücre Merkezi Müdürü Prof. Dr. Yusuf Özkul'a ve değerli hocalarım Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Munis Dünder ve Doç. Dr. Çetin Saaatçi'ye, Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda ilk deneyimlerimde bana bilgi ve tecrübeleriyle destek olan sevgili arkadaşlarım Yard. Doç. Dr. Serpil Taheri ve Dr. Funda Şener'e, tezimin hazırlanmasında emeği geçen Kezban Korkmaz, Hilal Akalın, Mustafa Akkuş'a, beş yıl boyunca kendileri ile birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Figen Öztürk'e, Prof. Dr. Karim Nayernia'ya ve son üç yıldır her konuda bana destek ve önder olan İstanbul Bilgi Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Galip Beygü İsen'e ve hayatım boyunca iyi kötü her anımda beni yalnız bırakmayan en büyük desteğim annem ve bütün aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Doğdukları günden beri varlıklarıyla sevginin ve emeğin önemini bana öğreten, yaşam amacımı değiştiren, zorluklar karşısında direnme gücümü artıran, minicik öpücükleriyle bizi güçlü, kocaman bir aile yapan minik meleklerim Ada Naz ve Duru'ya ise teşekkürlerin en büyüğünü sunarım.

ÖZET

Meme kanseri, kadınlarda sıklık bakımından değerlendirildiğinde birinci, kanserden kaynaklanan ölümler dikkate alındığında ise akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir. Meme kanseri, memenin duktus ve lobüllerini örten epitel hücrelerin kontrolsüz proliferasyonudur. Her kanser tipi gibi, meme kanseri de meme hücrelerinin büyümesinden ve sağlıklı kalmasından sorumlu olan genlerindeki nokta mutasyonları, kromozomal amplifikasyonlar, delesyonlar, yeniden düzenlenmeler, translokasyonlar ve dublikasyonlar ve ekspresyon değişimlerini de içeren genetik anormalliklerin progresif birikimi sonucu meydana gelir. Ailevi meme kanseri tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20–%30'unu oluşturmaktadır. BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyonları, kalıtsal meme kanserinin yaklaşık yarısını teşkil etmektedir. Bunlar dışında meme kanseriyle ilişkisi kanıtlanmış pek çok gen bulunmaktadır. Bu araştırmada, memenin İnvaziv Duktal Karsinomu'nda PIWIL-2, PIWIL-1, DICER-1 ve DDX-4 genlerinin ekspresyonları Real-Time PCR yöntemi ile çalışılmıştır. PIWIL-2 ve DICER gen ekspresyonu normal dokulara göre beklediğimiz gibi anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. PIWIL-1 ekspresyonu ise sınırda anlamlı değerlerdedir. miRNA'ların oluşumunda ve maturasyonunda görevli bir gen olan. DICER-1 ekspresyonunda ise iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak; PIWIL-2 ve DDX-4'ün normal dokuda görülmeyen ekspresyonunun meme kanserinde artmış olması, meme kanserinin teşhis ve tedavisinde ve tedavi sonrası hastalığın takibinde bir markır olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Meme kanserinde DICER-1 geninin fonksiyonunu anlayabilmek için genin ekspresyonu yerine spesifik miRNA'ların çalışılmasının daha bilgilendirici olabileceği de anlaşılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Meme Kanseri, İnvaziv Duktal Karsinom, PIWIL-1, PIWIL-2, DICER-1, DDX-4, Real-Time PCR

ABSTRACT

Breast cancer, which basically is the unchecked proliferation of the epithelial cells covering the ductus and the lobules of the breast, is the most common form of cancer in women and ranks second after lung cancer among total deaths from that disease. As all other carcinomas, mammary cancer results from the progressive accumulation of genetic anomalies that include point mutations, chromosomal amplifications, deletions, reorganizations, translocations and duplications of the genes responsible for the healthy growth and development of mammary cells. Familial breast cancer accounts for 20 % to 30 % of all breast cancers. BRCA1 and BRCA2 mutations cause approximately half of all hereditary cancers of the breast. Outside of those, several genes exist that have been associated positively with breast cancer.

This study examines the expressions of the PIWIL-2, PIWIL-1, DICER-1 and DDX-4 genes in the Invasive Ductal Carcinoma of the breast. As predicted, PIWIL-2 and DICER expressions were found to be significantly higher compared to normal tissues. PIWIL-1 expression on the other hand, was recorded at borderline levels of significance. The expression of DICER-1, a gene responsible for the formation and maturation of miRNAs, revealed no significant difference.

It was concluded that the increased expression of PIWIL-2 and DDX-4 in breast cancer cases that is not visible in normal tissue enables its use as a marker in the diagnosis and treatment of mammary cancer and the post-therapy follow up of the disease. It appears to be more informative to study the specific miRNAs of the gene rather than its expression in order to discern the function of the DICER-1 gene in breast cancer.

Keywords: Breast Cancer, Invasive Ductal Carcinoma, PIWIL-1, PIWIL-2, DICER-1, DDX-4, Real-Time PCR

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1:	Meme kanseri risk faktörleri	5
Tablo 2:	ABD’de en sık görülen 4 kanser tipinin 2012 yılı için yeni kanser vaka sayıları.....	14
Tablo 3:	ABD’de en sık görülen 4 kanser tipinin 2012 yılı için kansere bağlı ölüm oranları ve sayıları	15
Tablo 4:	Meme Kanserine Yatkınlık Yaratan Gen ve Lokuslar	23
Tablo 5:	RNA izolasyon kitinde bulunan solüsyon ve kimyasallar	47
Tablo 6:	c-DNA sentez kitinde bulunan solüsyon ve kimyasallar	52
Tablo 7:	Genomik DNA uzaklaştırma solusyonu karışımı için kullanılan malzemeler	53
Tablo 8:	Reverse TraskripsiyonMiksi içeriğindeki malzemeler ve miktarları	53
Tablo 9:	RT ² qPCR Primer Assay karışımı	54
Tablo 10:	Pre-amplifikasyon karışımının hazırlanması.....	54
Tablo 11:	Pre-amplifikasyon için siklus sayısı ve ısı şartları	54
Tablo 12:	BirReal-Time PCR reaksiyon için gerekli karışımı içeriği ve miktarları.....	57
Tablo 13:	Real-Time PCR döngüleri ve ısı değerleri.....	57
Tablo 14:	Araştırmaya alına toplam hasta ve kontroller ile bunların %’ lik dağılımları.....	58
Tablo 15:	İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların lenf nodu metastazı durumuna göre değerlendirilmesi.....	59
Tablo 16:	İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların progesteron reseptörü durumuna göre değerlendirilmesi.....	60
Tablo 17:	İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların östrojen reseptörü durumuna göre değerlendirilmesi.....	60
Tablo 18:	İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların c-erbB-2 durumuna göre değerlendirilmesi	60
Tablo 19:	İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların ki-67 durumuna göre değerlendirilmesi	61

Tablo 20:	İDK dokularının genlere göre ekspresyon cT değerleri.....	62
Tablo 21:	Araştırılan genlerin ortalama Ct değerleri ve standart deviasyonu	65
Tablo 22:	Araştırılan genlerin Ortalama Delta-Ct değerleri ve standart deviasyonu	66
Tablo 23:	Araştırılan genlerin Delta-Delta Ct değerleri ve standart deviasyon.....	68
Tablo 24:	Man Whitney-U Testine göre genler arası istatistiksel sonuçlar, p değerleri	68

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1:	Memenin anatomik lokalizasyonu.....	2
Şekil 2:	Meme glandının yapısı.....	3
Şekil 3:	1975-2008 yılları arasında en sık gözlenen kanser türlerinin cinsiyete göre oranları.....	15
Şekil 4:	Amerika’da 1930-2008 yılları arasında kadınlarda kanserlere bağlı ölüm oranları	16
Şekil 5:	PIWIL-1,PIWIL2, DICER1 ve DDX genlerinin interaksiyon grafiği....	29
Şekil 6:	RNA izolasyonu protokolü.....	48
Şekil 7:	c-DNA ve Pre-amplifikasyon Protokolü.....	56
Şekil 8:	ACTB ve PIWIL-2 genlerine ait ekspresyon eğrileri.....	64
Şekil 9:	PIWIL-1 ve Dicer-1 genlerine ait ekspresyon eğrileri	64
Şekil 10:	DDX-4 genine ait ekspresyon eğrisi.....	65

KISALTMALAR

DNA	Deoksiribon�kleikasit
RNA	Ribon�kleikasit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
İDK	İnvaziv Duktal Karsinom
DCIS	Duktal karsinoma in situ
LCIS	Lobüler karsinoma in situ
E1	Estron
DNMT	DNA metil transferaz
��AB	önce i�ne aspirasyon biyopsisi
USG	Ultrasonografi
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
AJCC	American Joint Committee on Cancer
HDAC	Histon deasetilazlar
HAT	Histon asetiltransferazlar
BRCA 1	Breast kanser-1 geni
ER	�strojen reseptörü
PR	Progestreron reseptörü
SNP	Tek nükleotid polimorfizmleri
RT-PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NMD	Normal meme dokusu
piRNAs	Piwi-interacting RNA
miRNA	Mikro RNA

1.GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. MEME VE MEME KANSERLERİNE KISA BİR BAKIŞ

Meme kanseri kadınlarda sıklık bakımından değerlendirildiğinde en sık, kanserden kaynaklanan ölümler dikkate alındığında ise akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. ABD’de 2008 verilerine göre meme kanserinin görülme sıklığı 190 bin dolayındadır. Yine ABD verilerine göre yıllık kanser insidansı 1,5 milyon, kansere bağlı ölüm rakamının ise 500 bin civarında olduğu açıklanmıştır. Meme kanserine bağlı ölümler ise tüm kanser ölümleri arasında 3. sırada yer almaktadır. Ömür boyu kadınlarda meme kanseri görülme riski ortalama % 12 ve ölüm riski % 5’tir [1].

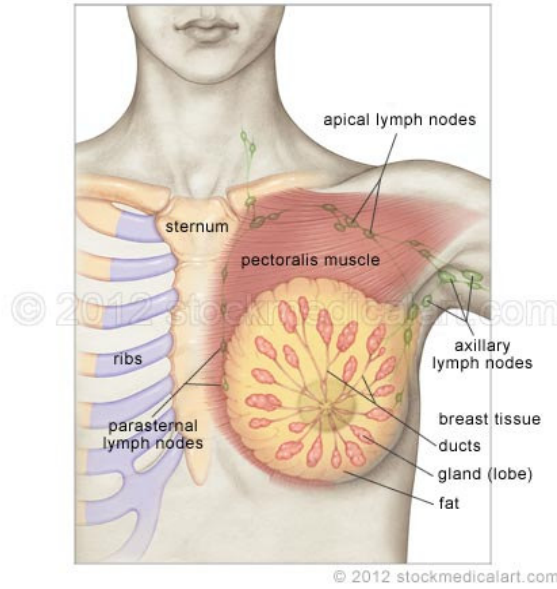
Amaç

Meme kanseri diğer kanser türlerinde olduğu gibi kanser kök hücrelerden kaynaklanmaktadır. Kök hücrelerin kendi kendini yenilemesinde görevli proteinler tümör başlangıcında esansiyel rol oynar. Bu çalışmada amaç meme kanserinin gelişiminde bir kanser kök hücre geni olan PIWIL-2 ve bu gen ile çeşitli yollarda ortaklıkları olan PIWIL-1, DICER-1 ve DDX-4 genlerinin rolü olup olmadığını aydınlatmaya çalışmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

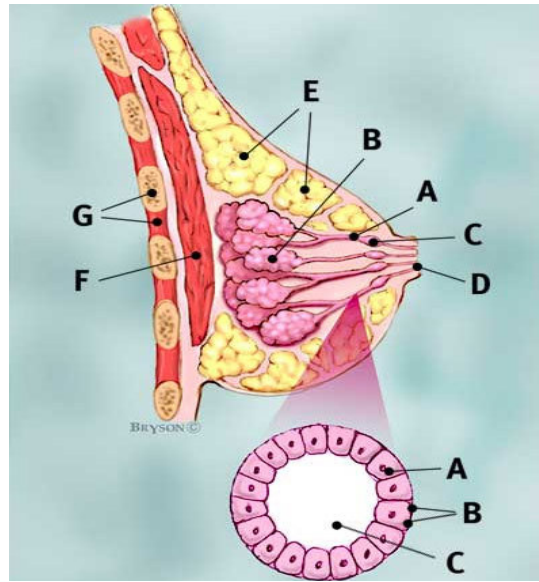
2.1.Memenin Anatomisi

Meme aslında gelişim açısından bakıldığında, deriye bağlı apokrin bir bezdir, aynı zamanda da reproduktif sistemin fonksiyonel bir parçasıdır. Meme üç temel yapı tarafından oluşturulur. Bunlar 1. Cilt, 2. Cilt altı yağ dokusu, 3. Meme dokusu'dur. Lokalizasyon olarak yetişkin bir kadında 2-6. kaburgalar arasında yerleşmiştir. Medial sınırını sternum, lateral sınırını ise orta ve ön aksiller hat oluşturur.



Şekil 1: Memenin anatomik lokalizasyonu (www.stockmedicalart.com)

Meme göğüs ön duvarında yüzeysel fasya içerisinde yer alır. Cooper ligamentleri denilen fibröz bantlarla septalara ayrılmıştır ve bu bağlar cilt ile yüzeysel fasyanın yüzeysel tabakası arasında dik bir şekilde uzanarak meme parankimini sarar. Cooper ligamentlerinin klinik önemi, memenin malign tümörlerinde bu ligamentlerin tümörün infiltrasyonu ile fibrozis sonucu ksalması ve deride çekilmelere neden olması sonucu, ciltte malign tümörlere spesifik bir görüntü olan “Portakal kabuğu (Peau D’orange)” görüntüsüne yol açmalarıdır.



Şekil 2: Meme glandı. A. Süt kanalı B. Süt Bezi C. Kanalın sütü muhafaza etmek için genişlediği bölge D. Meme ucu E. Yağ dokusu F. Pektoralis Majör Kası G. Göğüs Kafesi **Alt figür:** A. Normal süt kanalı hücreleri B. Membran C. Kanal Merkezi [2].

2.1.1.Meme Fizyolojisi

Meme bezi, parankimatöz doku, lobları birbirine bağlayan fibröz destek dokusu (stroma) ve aralarındaki yağ dokusundan oluşur. Fibröz doku ve yağ dokusu miktarı bireyin yapısal özelliklerine göre değişir. Asinüslerin lümeni tek sıralı kübik ya da silindirik epitelyum ile döşelidir. Lümen epitelinin altında miyoepitel hücre bulunur. Asinüsün en dışında ise bazal membran mevcuttur. İçteki silindirik hücreler süt salgısından sorumludur. Miyoepitel hücreleri ise kasılarak sütü asinüslerden kanallara iterler.

Meme gelişmesi ve fonksiyonu birçok hormonun etkisi ile olur. Bu hormonların en önemlileri östrojen, progesteron, prolaktin, oksitosin, tiroid hormonları, kortizol ve büyüme hormonudur. Bu hormonların salgısı hipotalamus, hipofiz ve overlerin nörohümorale kontrolündedir [3, 4].

Östrojenin meme üzerine etkisi sitoplazma ve çekirdekdeki reseptörlere bağlandıktan sonra görülür. Östrojen reseptörlerinin sentezini hem östrojen hem de progesteron uyarır. Prolaktin olmadan östrojenin meme gelişimini başlatamayacağı düşünülmektedir. Laktasyon için prolaktin mutlaka gereklidir. Hamilelik sırasındaki yüksek östrojen ve progesteron seviyeleri prolaktin salınımını baskılar. Plasenta çıktıktan sonra progesteron ve östrojen düşüşü laktasyonu başlatır. Östrojen meme epiteli, özellikle duktal epitelin gelişiminde etkilidir [4, 5].

Progesteronun memeye tek başına etkisi yoktur. Östrojen reseptörlerinin sentezini uyarır. Prolaktin ile sinerjistik etki gösterir. Epitel hücrelerinin diferansiyasyonunda lobulus ve asinüs gelişiminde etkilidir. Laktasyonu inhibe eder. Memede bulunan progesteron reseptörlerini de östrojen kontrol eder [4].

Prolaktin hipofizde yapılır. Hamileliğin son döneminde doğumdan hemen sonra yükselir ve lohusalık döneminde yüksek kalır. Meme gelişiminin her safhasında önemlidir. Memedeki östrojen reseptörlerinin sayısını artırır. Progesteronla birlikte lobulus ve asinüs gelişimini uyarır. Süt salınımını ve süt proteinlerinin sentezini kontrol eder [6]. Menstruasyonu hemen takip eden endometriyal proliferatif fazda meme stroması yoğun ve ödemlidir. Lobüller yalındır, mitozla rastlanmaz ve salgılama yoktur. Endometriyal salgılama fazında meme lobüllerinin hem büyüklüğü hem de sayısı artar. Menstruasyonun başlaması ile epitel dejenerasyonu ve döküntüsü ortaya çıkar. Menarşla başlayan bu değişiklikler artarak ya da azalarak menopoza kadar devam eder. İlerleyen yaşla beraber meme glandüler elemanlarını kaybetmeye başlar ve bunların yerini yağ dokusu alır. Menopozla beraber bu kayıp hızla artar ve atrofi, dejenerasyon ve hiyalinizasyon sonucu meme bezlerinde büyük kayıplar meydana gelir. Bu kayıpların yerini yağ dokusu alır [4].

2.2. MEME KANSERİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

Meme kanseri memenin duktus ve lobüllerini örten epitel hücrelerin kontrolsüz proliferasyonudur [7].

Her kanser tipi gibi meme kanseri de meme hücrelerinin büyümesinden ve sağlıklı kalmasından sorumlu olan genlerindeki mutasyonlar, ifade (ekspresyon) değişimleri sonucu oluşur. Histolojik olarak süt bezlerinde veya sütü, süt bezinden meme uçlarına taşıyan kanalda ortaya çıkmaya başlar.

Yapılan epidemiyolojik araştırmalarla meme kanseri için bir takım risk faktörleri tanımlanmıştır. Yaş, ailede meme kanseri öyküsü, kanseri öyküsü, reproduktif öykü, karsinogenlere maruz kalma tanımlanmış risk faktörleridir [8, 9].

Tablo 1: Meme kanseri risk faktörleri (Selcuk Aslan. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD. Uzmanlık Tezi, 2011)

Risk Faktörü	Açıklama
İrk	Beyaz
Yaş	İleri yaş
Pozitif aile hikayesi	Birinci derece akrabalarda meme kanseri olması ve ard arda üç kuşakta meme kanseri görülmesi
Genetik Faktörler	BRCA1 veya BRCA 2 mutasyonu, LiFraumeni Sendromu vs.
Özgeçmiş	Endometrial kanser Fibrokistik hastalığın proliferatif formu Diğer memede kanser
Östrojen maruziyeti	Erken menarş (12 yaşından önce) Geç menopoz (50 yaşından sonra)
Reproduktif Durum	Hiç doğum yapmamış olmak İlk doğum yaşının geç olması

Meme kanserinin insidansı yaşla birlikte artmaktadır ve gelişiminden genetik, çevresel, hormonal ve fizyolojik faktörler sorumlu tutulmaktadır. Meme kanseri gelişiminde çeşitli faktörlerin etken olduğu bilinmesine rağmen, olguların %70-80'inde hiç bir risk faktörü saptanamamaktadır.

İlk kez 1950'li yıllarda, meme kanseri ile steroid hormonların ilişkisine değinilmiştir. Giderek, 80'li yıllarda büyüme faktörleri, hastalık progresyonu, hücresel adezyon hakkında daha etkin bilgi elde edilmeye başlanmıştır. Ailesel meme kanseri olgularına sebep olan genler ise 90'lı yıllarda belirlenmeye başlamıştır. Aynı yıllarda hücre siklusu, DNA tamiri, apoptozis düzenlenmesi hakkında yeni bilgilere ulaşılmıştır. 2000'lerin başında ise tedavi başarısızlığının moleküler sebepleri, kemoterapiye direnç mekanizmaları, anti-östrojenik moleküller, anjiogenez, invazyon ve metastaz hakkında ciddi veriler ve dolayısı ile tedavi alternatifleri ortaya çıkmıştır.

a. Ailesel Faktörler

Kadınlarda görülen meme kanseri açısından birinci derece akrabalarda meme kanseri olması veya ailede ard arda üç kuşakta meme kanseri görülmesi önemli bir risk faktörüdür. Bununla birlikte ailesel meme kanseri olgularında özellikle BRCA-1 (17q21), BRCA-2 (13q14) ve TP-53 gen mutasyonlarının varlığı ile meme kanseri riski de artmaktadır.

Ailevi meme kanseri olgularının çoğunda BRCA-1 ve BRCA-2 gen mutasyonları saptanmıştır. TP-53 ve PTEN mutasyonları ise ailevi meme kanseri olgularının %1'inden daha az kısmından sorumludur [10].

b. Hormonal Faktörler

Meme kanseri gelişiminde risk faktörlerinden biri de, intrauterin dönem de dahil olmak üzere kişinin uzun süre östrojen hormonuna maruz kalmasıdır. Menarşın geç yaşta başlaması, doğurganlık sayısının yüksekliği ve menopoz meme kanseri riskini azaltmaktadır.

İlk doğum yaşının erken olması ile meme kanseri gelişme riski arasında da negatif bir korelasyon gözlenmiştir. Yani ilk doğumunu 30 yaşından sonra yapmış bir

kadında meme kanseri gelişme riski, ilk doğumunu 18 yaş ve öncesinde yapmış bir kadına göre 2-5 kat daha fazla saptanmıştır [11].

Postmenopozal dönemde hormon tedavisi kullananlarda meme kanseri riski kullanmayanlara göre artmaktadır. Özellikle ailede meme kanseri öyküsü olan kadınlarda oral kontraseptif kullanımı, meme kanseri gelişimi açısından risk faktörüdür [12].

c. Yaşam Tarzı ve Diyet

Yüksek yağ içerikli diyetle meme kanseri riskinin arttığı düşünülmektedir. Sebze tüketiminin meme kanserine karşı hafif bir koruyucu etkisi olabilir. Bununla birlikte özellikle tüketilen miktara bağlı olarak alkol kullanımı ile meme kanseri riski arasında anlamlı pozitif ilişki vardır. Tüm dünyada meme kanseri vakalarının %25'inin aşırı kilo, obezite ve sedanter yaşam tarzına bağlı olduğu belirtilmektedir.

Postmenopozal obez kadınlarda seks-hormonu bağlayıcı globulin oranı daha düşük olduğundan bu kadınlarda dokularda estrone (E1) oranı daha yüksektir. Yine, hiperinsülinemi ve yüksek düzeyde insulin benzeri büyüme faktör-1 salınımı olan kişilerde, overlerde androjen üretimi artar ve bunun sonucunda yağ dokularında aromatisasyon ile östrojen düzeyinde artış meydana gelir. Bu da obezite ve hiperinsülinemi ile östrojen yüksekliği arasındaki bağlantıyı açıklayan mekanizmadır. Dolayısı ile bu kadınlarda da meme kanseri görülme riski artmıştır [13, 14].

d. Radyasyona Maruziyet

Radyasyona maruziyet birçok patolojik durumda olduğu gibi meme kanserinde de etkilidir. Özellikle 40 yaşından önce, nükleer patlama, medikal tanı veya tedavi amaçlı iyonize radyasyona maruz kalma ile meme kanseri riski artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanseri olgularının yaklaşık %1'inin tanı amaçlı mammografiye bağlı geliştiği düşünülmektedir [15]. Hodgkin lenfoma tanısı ile 15 yaşından önce kemoterapi ile kombine olarak mantle radyoterapi uygulanan genç kadınlarda, meme kanseri riski belirgin olarak artmaktadır ve bu kişilerde sıkı takip gerekmektedir [16].

e. Meme Dansitesi ve Mammografik Özellikler

Mammografik parankimal özellik ile meme kanseri riski arasında ilişki vardır [17]. Mammografide radyodens meme dokusu oranı yüksek olan kadınlarda, radyolüsent meme dokusu oranı yüksek olan kadınlara göre meme kanseri riski daha fazladır.

f. Premalign Lezyonlar

Benign meme lezyonları, proliferatif ve non-proliferatif lezyonlar olarak ikiye ayrılır. Non-proliferatif lezyonlar genellikle meme kanseri riskinde artışa sebep olmazlar. Proliferatif lezyonlardan atipi içerenlerinde meme kanser riski 4-5 kat, atipi içermeyenlerde ise bu risk 2 kat artmıştır. Özellikle proliferatif, atipi içeren lezyonu olan ve birinci derece akrabada meme kanseri öyküsü olan kadınlarda bu risk 11 kat artmıştır [17].

2.3. MEME KANSERİNDE GENETİK FAKTÖRLERİN ETKİSİ

2.3.1.Genetik Faktörler

Hücresel düzeyde bakıldığında kanser gelişimi çok basamaklı bir olaydır. Her basamakta, hücreye, kanser hücresi olma yolunda özellikler kazandıran önemli genetik olayların gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu değişiklikler sonucu tümör oluşumuna ya da ilerlemesine neden olan genlerin ekspresyonunda ya da gen ürünlerinin fonksiyonunda değişiklik meydana gelebilir. Reseptörlerin veya sinyal yollarındaki proteinlerin mutasyonları veya aşırı üretimleri, hücrelerin, büyüme faktörlerinden ve diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine ve böylece kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur. Tümör baskılayıcı genlerdeki herhangi bir anormallik neticesinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Meme kanseri oluşumuyla ilgili genetik değişiklikler arasında bazı genlerin amplifikasyonu, delesyonları, nokta mutasyonları, epigenetik değişiklikler, kromozomal yeniden düzenlenmeler ve anöploidiler yer alır [18]. Yapılan çalışmalarda meme kanserlerinin oluşumunda birçok onkogen, tümör baskılayıcı gen ve DNA tamir genlerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir.

2.3.2.Meme Kanserinde Etkili Olan Onkogenler

Protoonkogenler, hücre büyümesi ve bölünmesinden sorumlu normal hücresel işlevi olan genlerdir. Protoonkogenlerin mutasyona uğramasıyla kanserleşmeden sorumlu olan onkogenler oluşur. Meme kanseri oluşumunda siklin, c-myc, c-fos, cmyb, c-jun, Rar α , bcl-1, H-ras gibi onkogenlerin rolü olduğu gösterilmiştir [19].

Meme kanserinde en sık görülen değişikliklerden biri c-myc geninin amplifikasyonudur. Ancak c-myc geni tarafından kodlanan proteinin yarı ömrünün çok kısa olması hastaların yaklaşık üçte birinde gözlenen bu değişikliğin izlenmesini güçleştirir.

2.3.3.Meme Kanserinde Etkili Olan Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını baskılayan genlerdir. Meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'i kalıtsaldır ve bu kanserlerin oluşumuna tümör supressör genlerdeki mutasyonlar yol açmaktadır. Kalıtsal meme kanserli kadınların ortalama yarısında BRCA1 geninde, 1/3'ünde de BRCA2 geninde mutasyon görülür [20]. Ayrıca TP53, PTEN, p16 (MTS1), RB1, DCC, CHEK2, ATM, FOXP1 gibi tümör supressör genlerdeki mutasyonların da kalıtsal meme kanserine yol açtıkları gösterilmiştir [21].

2.3.4.Meme Kanserinde Etkili Olan DNA Tamir Genleri

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, akciğer, baş-boyun, meme kanserleri ve glioblastomalarda DNA tamir genlerinin mutasyonlarının sorumlu olduğu gözlenmiştir [22]. Yapılan moleküler genetik çalışmalarda meme kanserinin oluşumunda önemli rol oynayan BRCA-1 ve BRCA-2 tümör supressör genlerinin aynı zamanda DNA'nın tamirinde de rol oynadığı gösterilmiştir. Meme kanserinin oluşumunda BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinin rolü büyük olmakla beraber NBS-1, RAD-51, PTEN ve BAP-1 gibi bazı genlerin de etkili olduğu bilinmektedir [23].

2.3.5. Epigenetik Faktörler

Son yıllarda meme kanseri ve epigenetik üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça artmıştır. 80'lerde metilasyon kelimesinden çok nadiren bahsedilirken özellikle 2000'lerin başlarından itibaren bu konuya olan ilgi artarak 2010 yılında sadece meme

kanserinin epigenetik mekanizmaları ile ilgili 150 den fazla araştırma yapılmıştır [24]. Çalışmalar arttıkça meme kanseri ve epigenetik anormallikler arasındaki ilişki daha net anlaşılmaya başlanmıştır. Meme kanseri tanı ve tedavisinde epigenetik faktörlerin kullanılması gerekliliği önem kazanmaktadır.

Normal hücrelerde tümör supressör genler aktif halde olup metilasyon gözlenmez. Metastaz genleri metile olup inaktiftirler. DNA metil transferaz ile (DNMT) DNA’da metilasyon sonucu tümör baskılayıcı ve metastaz genleri metillenir ve invaziv olmayan meme kanseri oluşur. Farklı bir onkogenik yolağın demetilasyon aktivitesine neden olması durumunda ise invaziv meme kanserlerinin oluşumuna sebep olmaktadır [25].

2.4. MEME KANSERİNİN TANISI VE PATOLOJİK SINIFLANDIRMASI

Memede muayene veya görüntüleme yöntemleri ile saptanan şüpheli bir lezyondan, tanı için biyopsi yapılmalıdır. Biyopsi palpabl lezyonlarda ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) veya eksizyonel biyopsi ile yapılabilir. Palpabl olmayan lezyonlarda ultrasonografi (USG) eşliğinde İİAB, biyopsi veya eksizyonel biyopsi yöntemleri ile tanıya ulaşılabilir. Bunun dışında memede saptanan mikrokalsifikasyonlarda, stereotaktik biyopsi veya lezyonun radyolojik tespiti sonrası eksizyonel biyopsi yöntemleri uygulanabilir. USG yetersiz kalırsa lezyon lokalizasyonu için meme manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yöntemi kullanılabilir.

2.4.1. Meme Kanserinin Patolojik Sınıflandırması

Meme kanserinin patolojik sınıflaması sıklıkla patolojik materyalin hematoksil-eosin ile boyanması ve ışık mikroskobu ile incelenmesi ile yapılır. Tümör tipinin belirlenmesi tedavi planı yapılmasında çok önemlidir. Meme kanseri konvansiyonel olarak 2 gruba ayrılır: Duktal (meme kanseri vakalarının %85’ini oluşturur) ve lobüler (meme kanseri vakalarının yaklaşık %15’ini oluşturur) patern.

2.4.1.1. Karsinoma in situ

Karsinoma in situ tanımında duktus ve lobüllerde asiner malign epitel hücre proliferasyonu söz konusudur. Ancak malign hücreler bazal membranı henüz invaze etmemiştir. Karsinoma in situ, duktal karsinoma in situ (DCIS) ve lobüler karsinoma in situ (LCIS) olmak üzere iki gruba ayrılır. DCIS, genellikle mamografide

mikrokalsifikasyonlar şeklinde bulgu verir ve fizik muayenede çoğunlukla ele gelen kitle saptanmaz. Buna karşılık LCIS’ da ise mamografide patolojik bulguya nadiren rastlanır ve tanı genellikle başka sebeple yapılan biyopsi sonucu tesadüfen konur. LCIS, artmış meme kanseri riski için bir belirteç kabul edilir.

2.4.1.2.İnvaziv Duktal Karsinom (İDK)

İnvaziv duktal karsinom, tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 65-80’lik kısmını oluşturur ve hemen her zaman DCIS komponenti de içerir. Prognoz için önemli olan patolojik özellikleri, tümör boyutu, aksiller lenf nodu tutulumu, evre ve lenfatik-vaskülerin vaziyondur. Tümör evresi (grade) üçe ayrılır:

Evre 1 (iyi differansiye),

Evre 2 (orta derecede differansiye)

Evre 3 (kötü differansiye).

Evre tanımlaması Bloom-Richardson Sisteminin Nottingham modifikasyonu ile yapılır.

2.4.3. İnvaziv LobülerKarsinoma

İnvaziv lobüler karsinom, tüm meme kanserlerinin % 5-10’unu oluşturur. Mammografi ve fizik muayenede kitle veya asimetrik dansite olarak saptanır ve genellikle mikrokalsifikasyon özelliği göstermezler. Tümör genellikle diffüz ve infiltratif özellik gösterdiğinden, operasyon sonrası tümör boyutu genellikle beklenenden büyük saptanır. Bu sebeple invaziv lobüler karsinomda lumpektomi (memenin tamamı yerine tümör olan bölge ve bir miktar normal meme dokusu çıkarılması) ile güvenli cerrahi sınır elde etmek İnvaziv Duktal Karsinoma göre daha zordur. Operasyon öncesi dönemde, tümör boyutlarını daha doğru saptayabilmek için MRI tetkiki kullanılmalıdır. İnvaziv lobüler karsinomda bilateral tümör riski daha yüksektir. Metastazlarını daha çok meningeal ve peritoneal yüzeyler gibi metastaz sıklığı düşük olan bölgelere yapar.

2.4. B: MEME KANSERİ EVRELEMESİ

Meme kanseri evrelemesi hem patolojik hem de klinik bulgulara göre yapılabilir ve en sık kullanılan evreleme yöntemi “American Joint Committee on Cancer” (AJCC)

kuruluşunun önerdiği evreleme sistemidir. Bu sistemde TNM evrelemesi kullanılır (T; Tümör, N; Lenf nodu, M; Metastaz).

2.4.1. B- i Meme kanseri AJCC Evrelemesi

Klinik evreleme; fizik muayene, meme derisinin dikkatli inspeksiyonu ve palpasyonu, meme glandları, aksiller, servikal ve supraklaviküler lenf nodlarının muayenesi; görüntüleme yöntemleri; meme veya diğer organlardan elde edilen biyopsi materyallerinin patolojik incelemesi ile yapılır. Patolojik evrelemede ise klinik evrelemede kullanılan yöntemlere ek olarak, meme, lenf nodları veya metastazlardan elde edilen cerrahi eksizyon preparatlarının patolojik incelemesi ile yapılır.

AJCC tarafından tanımlanan meme kanseri evrelemesinde primer tümör boyutu, rejyonel lenf nodu metastazı ve uzak metastaz mevcudiyeti kullanılmaktadır

2.5. EPİDEMİYOLOJİ

Kanser tüm dünyada en önemli sağlık problemlerinden biridir. Amerika’da her 4 ölümden birinin kansere bağlı nedenlerle olduğu bildirilmiştir. Meme kanseri insidansı ülkeler arasında farklılık göstermekte ve batı ülkelerinde daha yüksek oranda görülmektedir. İngiltere ve İskandinav ülkelerinde ve ABD’deki insidans birbirlerine benzemektedir. Japonya gibi Doğu ülkelerinde ve Afrika’da hastalığın insidansı daha düşük görülmektedir. Kanser insidansı yanında, mortalite ve sağkalım da dünyada coğrafi bölgesel değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenliğin yaş, etnik köken, diyet, yaşam tarzı farklılıkları gibi birçok nedenle ilişkili olabileceği rapor edilmiştir [26]. Türkiye’de Sağlık Bakanlığı 2005 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre meme kanseri ülkemizde en sık görülen dördüncü kanser türü, kadınlarda ise en sık görülen kanserdir. Kanserle Savaş Daire Başkanlığı verilerine göre 2004-2006 yıllarında toplam 6597 yeni hastalık tespit edilirken insidansı 35.8/100 bin olarak hesaplanmıştır [27].

Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı’nın verilerine göre 2008 yılında dünya genelinde 12 milyon kişiye kanser teşhisi konulurken, bu rakamın 2030 yılında 26 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir. Önümüzdeki yıllarda karşılaştığımız bu artışın önemli bir bölümü ne yazık ki gelişmekte olan ülkelere

görülebilecektir. Türkiye kanser haritası incelendiğinde her yıl yaklaşık 150.000 yeni kanser olgusu teşhis edilmektedir. Erkeklerde en sık akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri görülmektedir. Bölgelerimiz ve şehirlerimiz arasında kanser sıklığı arasında belirgin bir fark söz konusu değildir (www.saglik.gov.tr).

2.5.1. Türkiye’de Kanser İle Mücadele

Ülkemizdeki mevcut kanser politikaları ile mücadele eylem planı geçtiğimiz yıl Ulusal Kanser Kontrol Programında yayımlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü ile ortaklaşa hazırlanan bu eylem planı beş ana başlıktan oluşmaktadır:

Kanser kayıtçılığı,

Kanser Önleme,

Kanser Erken Teşhis ve Tarama,

Kanser Tedavileri

Son dönem hastalar için Palyatif Bakım Hizmetlerinin güçlendirilmesi.

Kanser taramaları ve erken teşhise yönelik yurt genelinde her ilimizde KETEM adı verilen Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim merkezleri kurulmuştur [27].

Meme kanserinin gelişmesinde kişiden kişiye farklılık gösteren pek çok risk faktörünün (genetik, çevresel, sosyo-biyolojik ve psikolojik etkenler v.b) etkili olduğu kabul edilmektedir. Amerikan Kanser Derneği’nin yaptığı bir araştırmada, meme kanseri teşhisi konulan kadınlardan % 75’inin yüksek risk grubunda yer almadığı ve aslında tüm kadınların meme kanseri riski taşıdığı belirtilmiştir.

2.5.2. Meme Kanseri ve Erken Tanı

Meme kanserinin oluşumuna yol açan ya da gelişimini hızlandıran birçok etken ileri sürülmektedir. Bu etkenlerle kanser arasındaki ilişki, bazılarında belirgin biçimde ortaya konurken, bazılarının netliği konusunda hala tartışma devam etmektedir.

Meme kanserinin nedeni tam bilinmese de literatürde bildirildiği üzere, menopoza sonrası kadınlarda normalden fazla kilo artışı, aşırı yağlı beslenme, aşırı alkol tüketimi, overler ve diğer salgı bezlerinde fonksiyon bozukluğu ve çevresel etkenler insidansı arttıran nedenler arasındadır.

Meme kanserinin tanısının erken konması ve etkin tedavinin uygulanması sonucu hastaların yaşam süresi uzamıştır. Bu nedenle diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinin erken tanısı ile tedavi sonrası yaşam kalitesini koruma, geliştirme ve sürdürme önemli hale gelmiştir.

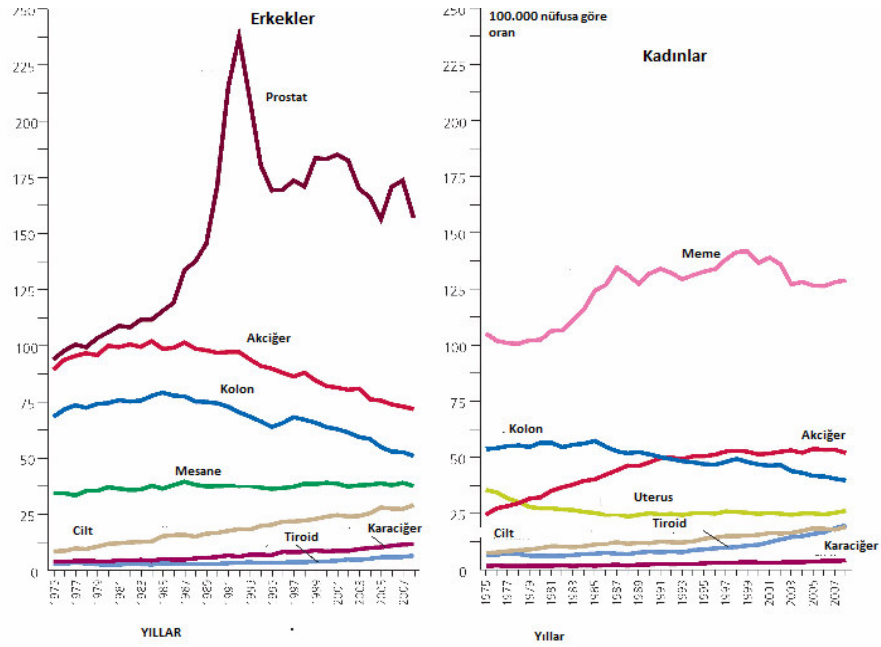
Amerikan Kanser Derneği, her yıl Amerika'daki yeni kanser vakalarının sayısını ve kansere bağlı ölümlerin oranını açıklamaktadır. Buna göre 2012 yılında erkeklerde en sık görülen kanser tipi sıralamasında ilk üç sırayı prostat, akciğer ve bronş ve kolorektal kanserleri almaktadır. Bu üç tür, tüm kanser vakalarının yarısını oluşturmaktadır. Yeni tanı koyulan kanserler göz önünde bulundurulduğunda erkeklerde, prostat kanseri tek başına % 29' luk bir oranı kapsamaktadır. Kadınlar için bakıldığında ise en sık görülen ilk üç kanser meme, akciğer ve bronş ve kolorektal kanserleridir. Bu üçü, tüm kanser vakalarının yarısını oluşturmaktadır. Çalışmalara göre, 2012 yılında 226,870 kadın meme kanseri tanısı alırken, yeni tanı koyulan tüm kanser vakalarının içinde meme kanseri tek başına kadınlarda görülen tüm kanser tiplerinin ile % 29'unu oluşturmaktadır. Kansere bağlı ölümler değerlendirildiğinde ise her iki cinsiyette de akciğer ve bronş kanserleri birinci sırayı almaktadır. Erkeklerde ikinci sırada ölüme neden olan kanser prostat kanseri iken, kadınlarda meme kanseri ölüme en sık neden olan kanser tipi olarak belirlenmiştir. Yani bir yıl içinde yaklaşık 40.000 kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Bu durum meme kanserinin erken tanısının ya da engellenmesinin önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Tablo 2: ABD'de en sık görülen 4 kanser tipinin 2012 yılı için yeni kanser vaka sayıları[28]

ERKEKLER	Sayı	%	KADINLAR	Sayı	%
Prostat	241,740	29	Meme	226,870	29
Akciğer	116,470	14	Akciğer	109,690	14
Kolon ve rektum	73,420	9	Kolon ve rektum	70,040	9
Mesane	55,600	7	Uterus	47,130	6

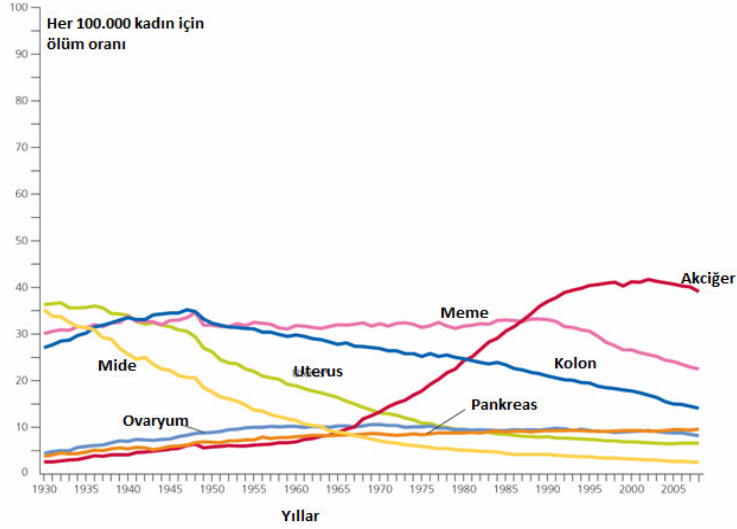
Tablo 3: ABD’de en sık görülen 4 kanser tipinin 2012 yılı için kansere bağlı ölüm oranları ve sayıları [28]

ERKEKLER	Sayı	%	KADINLAR	Sayı	%
Akciğer	87,750	29	Akciğer	72,590	29
Prostat	28,170	9	Meme	39,510	14
Kolon ve rektum	26,470	9	Kolon ve rektum	25,220	9
Pankreas	18,850	6	Uterus	18,540	6



Şekil 3: 1975-2008 yılları arasında en sık gözlenen kanser türlerinin cinsiyete göre oranları [29]

Yıllara göre kanser vakalarının görülme sayıları değerlendirildiğinde 1999-2008 yılları arasında 5 major kanser türü (akciğer, meme, kolorektal, uterin corpus maligniteleri ve tiroid kanserleri) arasında görülme sıklığı azalmayan kanser türleri, kadın meme ve akciğer kanserleridir.



Şekil 4: Amerika’da 1930 -2008 yılları arasında kadınlarda kanserlere bağlı ölüm oranları grafiği [28]

Kansere bağlı ölümlere bakıldığında, olumlu bir gelişme olarak, tüm kanser türleri için ölüm oranlarının düşüşte olduğu görülmektedir. Burada esas sebep olarak tanının erken konulması, tedavi yöntemlerinin de gelişmesi ve ilerlemesi belirtilebilir. Burada etkili faktörler arasında kanser tarama programlarının ülkelerin sağlık politikalarına dahil edilmesi ile erken tanının sağlanması, riskli hastaların saptanması ve önlemler alınması ve tedavi yöntemlerinin etkinliğinin belirli ölçüde artmış olması sayılabilir. Meme kanserinin erken tanısı ve etkin tedavi ile hastaların yaşam süresi uzamaktadır. Böylece meme kanseri tedavisi sonrası yaşam kalitesini koruma, geliştirme ve sürdürme önemli hale gelmiştir.

Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü, Hastalıklardan Korunma ve Önleme Merkezi, Ulusal Sağlık İstatistikleri bilgilerini kullanarak, 2012 verilerine göre geçtiğimiz yıl 1.638.910 yeni kanser vakası ve 577.190 kanserlerden kaynaklanan ölüm vakası

görülmüştür. Son beş yılın verilerine bakılacak olursa (2004-2008) kanser insidansı erkeklerde yılda % 0,6 azalırken, kadınlarda 4 major kanser tipi(kolorektal, akciğer, uterus ve deri) insidansında azalma görülmüştür. Meme kanserinde ise, azalma kaydedilmemiştir. Kanserlere bağlı ölüm oranları kadınlarda yılda % 1,6 azalırken, erkeklerde yılda %1,6 oranında artmıştır.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve dünyada yaklaşık 400.000 kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir [30]. Meme kanseri insidansında Amerika Birleşik Devletlerinde 2002 yılına kadar tarama yöntemlerinin kullanımının artması ile artış izlenmiş, sonrasında ise postmenopozal hormon replasman tedavisinin kullanımının azalmasıyla ilişkili olabileceği belirtilen bir düşüş rapor edilmiştir [31].

2.6.KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ

Kanser temelde genetik bir hastalıktır ve kansere yol açan DNA değişimlerinin ortaya konması ile kanserin oluşum mekanizması anlaşılmaya başlanmıştır. Karsinogenezin tam anlaşılabilmesi; büyüme, invazyon ve metastaza yol açan hücre programdaki dönüşüme yol açan genetik değişikliklerin nasıl gerçekleştiğini bilmekle mümkündür. Somatik hücrelerin genomunda meydana gelen çok sayıdaki moleküler değişiklik, kanser gelişimine yol açmaktadır [32].

2.6.1.Kanser Genomunun Destabilizasyonu:

Kansere neden olan genetik dönüşümler; kendi kendine büyüme, var olan hücre siklusundan kaçma, apoptozise resistans, hücre ölümüne ve sonunda; anjiogenesis, invazyon ve metastaz yapmayı kolaylaştıran özellikler sağlar. Örneğin; Li-Fraumeni Sendromu ve Ailevi Meme Kanseri “Checkpoint defekti”, HNPCC/Lynch Sendromunda “Mismatch repair” birçok kanserin gelişmesine neden olmaktadır. Genomik instabiliteye neden olan çok geniş ve çok farklı mekanizmalar mevcuttur. Genomik destabilizasyon, karsinogenezisi başlatır. Fakat spesifik tümörün sağlamlılığını da tehlikeye atar. Bu konuda ilerleyen çalışmalar kişiye göre planlanmış daha iyi tedavi olanakları sunacak noktadadır.

2.7.KANSER GENLERİ, KANSER GEN MUTASYONLARI VE KANSER GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Kanser genleri, onkogenler ve tümör supresör genler olarak iki sınıfa ayrılır. Klasik analogiye göre, onkogenler bir otomobilin akseleratörleri gibidir; onkogendeki mutasyon bir akseleratörün devamlı basıncı gibi işlev görür. Buna karşın, tümör supresör genler, “frenler” gibi davranır, eğer mutasyona uğramazlarsa fonksiyonları tümörögenезisi durdurmak yönündedir [33].

Onkogendeki mutasyon, tipik olarak spesifik bölgelerde oluşur, sıklıkla aynı kodonu etkiler. Genellikle tek bir allelin etkilenmesi etkinin ortaya çıkması için yeterlidir. Buna karşılık, tümör supresör genlerde etkinin ortaya çıkması için her iki allelin de fonksiyonunu kaybetmesi gereklidir. Malign tümörlerde bulunan major somatik mutasyonlar; nükleotid yer değişimleri (substitutions), küçük insersiyon ve delesyonlar, kromozomal yeniden düzenleme ve kopya sayısındaki dönüşümlerdir. İnsan genom projesinin tamamlanması, biyomedikal bilimler için yeni bir alan oluşturmuş durumdadır.

Genom dizilimi ve organizasyonu ile ilgili bilgi birikimindeki zenginleşme, tümörlerin orijin ve evrimlerinin altında yatan genetik dönüşümlerin sistematik analizine imkan sağladı. İnsan genomu aydınlatılmadan önce de, birçok kanser geni (KRAS, TP53 ve APC gibi), onkovirus analizleri, bağlantı çalışmaları, heterozigosite kaybı ve sitogenetik temelli yaklaşımlarla başarıyla keşfedildi. 2004 yılında “İnsan Genom Projesi”nin tamamlanması kanserdeki somatik mutasyonlara ait bilginin sanal ortamda kataloglanmasına imkan sağladı [34, 35].

Bu proje günümüzde insan kanserleri ile ilgili tüm genetik değişikliklerin belirlenmesinde önemli bir fırsat sayılabilir. İnsan DNA’sının nükleotid dizisinin belirlenmesi ile kanserler ve diğer hastalıklardaki moleküler değişikliklerin incelenme ve ortaya konma olasılığı doğdu. Dolayısı ile önümüzdeki yıllarda pek çok hastalığa ait moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması sağlanacak gibi görünmektedir.

2.8.KANSER GENOM ANALİZİYLE SOMATİK DÖNÜŞÜMLERİN BELİRLENMESİ VE YENİ TÜMÖR TAKSONOMİSİ

Kanser genomundaki tüm genomik dizinin ortaya konması malign tümörlerde somatik mutasyonların tüm major tiplerini görmeyi sağlar. Nükleotidlerdeki değişimleri, küçük insersiyon ve delesyonlar, kromozomal yeniden düzenlemeler ve kopya sayısı değişiklikleri genomik anormalliklerin başta gelenleridir.

Nükleotid değişimleri, malign tümörlerde en sık karşılaşılan somatik mutasyondur. Aynı hastanın normal ve tümörlü dokusundan alınan örneklerde somatik nükleotid değişimlerini etkili bir şekilde belirleyen birçok genetik ve biyoinformatik araç geliştirilmiştir. Kanser örneklerinde belirlenen mutasyonla ilgili fonksiyonel değişiklikleri hesaplamada kullanılan birçok yöntem buna paralel olarak geliştirilmiştir [36].

Kanser örneklerinde ortaya konan tüm genomik dizinle keşfedilen somatik mutasyonların ikinci kategorisini küçük insersiyon ve delesyonlar temsil eder. Bu mutasyonlar nükleotid değişimlerden on kat daha az görülmesine karşın kanser progresyonunda oldukça etkilidir.

Kanser genomunda kromozomal yeniden düzenlemelerinin sistematik olarak ortaya konması, yeni nesil sekans metodolojilerinin en önemli uygulamalarından biridir. Bununla ilgili önceki stratejiler hematopoetik tümörlerdeki rekürren translokasyonları sitogenetik yöntemlerle ortaya koymaya dayanıyordu. Son zamanlarda, biyoinformatik ve fonksiyonel yöntemlerin kombine kullanımının devreye girmesi sağlanarak, solid epitelyal tümörlerde rekürren translokasyonları tesbit etme imkanı sağlandı [37].

Gelecekte beklenenler, yeni metodolojiler mikroyarray temelli çalışmalara göre daha fazla avantaj sağlayacak, hasarlı alanların daha iyi tanımlanması, saturasyon yokluğu, malign hücrenin genomik bölgelerindeki değişiklikleri daha doğru tahmin etmeyi kolaylaştıracağı yönündedir [36].

2.8.1.Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi:

Canlı hücre, enzimatik yollarla DNA'dan RNA transkripsyonu ve mRNA'yı proteine dönüştürmek (translasyon) için gerekli mekanizmaya sahiptir. Buna gen ekspresyonu denir. Gen ekspresyonunun düzenlenmesi, gelişimin ya da hayat döngüsünün herhangi bir aşamasında bir hücrede ifade edilen gen ürünlerinin miktar ve ifade zamanlarının geri döndürülebilen mekanizmalarla kontrolüdür.

İnsan genomunda bulunan yaklaşık 23.000 gen, belirli hücrelerde ve belirli zamanlarda ifade edilmektedir. Hücreler gen ifadesindeki bu kontrolü sağlayabilmek için yukarıda sözü edilen mekanizmaları kullanmanın yanı sıra nükleozom yapılanmalarını da değiştirerek gen ekspresyonlarını düzenleyebilirler. Nükleus içerisinde DNA, histon ve non-histon proteinleri ile kademeli olarak paketlenerek kromatin şeklinde organize edilir. Kromatin yapısındaki değişiklikler gen ifadesini kontrol eder: genel olarak kromatin yapı sıkılaşır yoğunlaştığında (heterokromatin) genler inaktive olur (sessizleşme, susturulma), kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında (ökromatin) ise genler aktive olarak ifade edilir. Kromatin yapısındaki bu dinamik durum ise, temel olarak geri dönüştürülebilir.

Kanser genomunun tanımlanması klinik pratiği birçok düzeyde devamlı olarak etkilemektedir. Bir tarafta yeni kanser genleri tanımlanırken, diğer taraftan tümör taksonomisi yeniden düzenlenmektedir. Genomik devrim öncesine kadar, tümör iki kritere göre sınıflandırılırdı; lokalizasyon (tümörün ortaya çıktığı alan) ve tümörün görünümü (histolojik yapısı). Bu iki kriter, prognozun belirlenmesinde ve en iyi tedavi şeklinin olgunlaştırılmasında günümüzde de hala kullanılmaktadır. Oysa histolojik olarak benzerlik arz eden tümörlerin klinik olarak farklı sonuçlar doğurduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Daha da ötesi, histolojik analizle farklılıkları ortaya konamamış tümörler, tedavilere çok farklı cevaplar verebilmektedir. Tüm bu farklılıklar dokulardaki genetik farklılıklar ile açıklanabilir [38].

Genetik değişimlerin major kriter olduğu yeni tümör taksonomisi; genom bazlı bilgi sayesinde daha iyi teşhis olanağı sağlayacak ve kişiye özgü tedavi planlamasını mümkün kılacaktır.

2.9.KANSER EPIGENETİĞİ, EPIGENİTİK SÜREÇ VE EPIGENETİK TEDAVİ

Epigenetik, genlerin ekspresyonlarında meydana gelen, kalıtıma tâbi ancak DNA dizisinden bağımsız değişimlerdir. DNA dizisinde meydana gelen çok sayıda mutasyona ilave olarak, tüm kanserler epigenetik değişiklikler de içerir. Epigenetik değişiklikler onkogeneze neden olan gen mutasyonlarının erken döneminde ortaya çıkar ve bu nedenle erken teşhis için olanak sağlar. Epimutasyonlar ilaç tedavileriyle geri döndürülebilir, dolayısı ile epigenetik tedavileri olanaklı kılar.

İnsan genomunda bulunan yaklaşık 23.000 gen, belirli hücrelerde ve belirli zamanlarda ifade edilmelidir. Hücreler gen ifadesindeki bu kontrolü sağlayabilmek için yukarıda sözü edilen mekanizmaları kullanmanın yanı sıra nükleozom yapılanmalarını da değiştirerek gen ekspresyonlarını düzenleyebilirler. Nükleus içerisinde DNA, histon ve non-histon proteinleri ile kademeli olarak paketlenerek kromatin şeklinde organize edilir. Kromatin yapısındaki değişiklikler gen ifadesini kontrol eder: genel olarak kromatin yapı sıklaşıp yoğunlaştığında (heterokromatin) genler inaktive olur (sessizleşme, susturulma), kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında (ökromatin) ise genler aktive olarak ifade edilir. Kromatin yapısındaki bu dinamik durum ise, temel olarak geri dönüştürülebilir. DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik mekanizmalar ile gerçekleştirilir. Epigenetik mekanizmalar şu şekilde sınıflandırılabilir:

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

Bu işlemlerde görevli alan enzimler arasında, DNA metiltransferazlar (DNMT), histon deasetilazlar (HDAC), histon asetiltransferazlar (HAT), histon metiltransferazlar (HMT), histon demetilazlar ve metil CpG bağlanma proteini MECP-2 sayılabilir. Normal epigenetik paternlerden bir sapma olduğunda ortaya çıkan gen ifadesindeki anormallikler çeşitli klinik sonuçlara yol açabilir.

Kanser, genetik ve epigenetik hataların birikimiyle ortaya çıkan ve normal hücrenin metastatik tümör hücresine dönüşmesiyle sonuçlanan çok basamaklı bir olaydır. DNA metilasyonundaki değişiklikler kanserle ilişkili genlerin ifadesinde değişikliklere neden olur. DNA hipometilasyonu onkogenleri aktive eder ve kromozom yapısının kararlılığını yitirmesine neden olurken, DNA hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açar.

Kanser hücrelerinde, histonlardaki lizinlerin asetilasyonunda ve metilasyonunda artış ve azalmalar olmaktadır. Kanser hücrelerinde H4-K16 asetilasyonunun ve H4-K20'deki trimetilasyonun ortadan kaybolduğu ve heterokromatin yapısında bozulmaya yol açtığı saptanmıştır. Farklı kanser tiplerinde, hatta aynı kanser tipinin değişik evrelerindeki histon modifikasyon paternleri özdeş değildir. Tümör tiplerini farklı epigenetik paternlere göre sınıflandırmak, farklı tipleri birbirinden ayırmada yardımcı olabilir, hatta gelecekte histon modifikasyon paternlerini incelemek kanserin erken tanısına yardımcı olabilir.

Genomun epigenetik durumundaki değişikliklerin ters çevrilebilir olması kanser tedavisinde yeni bir umut ışığı yaktmaktadır. DNA metil transferazlar ile histon deasetilazlar gibi enzimleri inhibe ederek, tümör-supresör genlerinin epigenetik olarak susturulmasını engelleyebilecek ya da bu genlerin yeniden aktivasyonunu sağlayabilecek yeni kanser ilaçlarının geliştirilmesi üzerine yoğun çalışmalar başlamıştır. Günümüzde, epigenetik inhibisyon için geliştirilmekte olan ilaçların ana hedefleri DNA metil transferazlar ve histon deasetilazlardır. Epigenetik gen susturulmasında rol alan karmaşık etkileşimler ağı, klinik olarak etkin bir tedavi için çeşitli ilaçların beraber kullanılmasının daha doğru olacağını göstermektedir. Gerçekten de, DNA metiltransferazlar ile histon deasetilazların inhibitörlerinin birlikte kullanımının epigenetik olarak susturulmuş genlerin yeniden aktivasyonunda başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür.

2.10.MEME KANSERİ VE GENETİK

Meme kanseri heterojen bir hastalık olup nokta mutasyonları, kromozomal amplifikasyonlar, delesyonlar, yeniden düzenlenmeler, translokasyonlar ve

dublikasyonları da içeren genetik anormaliklerin progresif birikimi sonucu oluşur [39, 40].

Meme karsinogenezi için büyüme, invazyon ve metastazla sonuçlanan hücre program dönüşümüne neden olan genetik değişikliklerin bilinmesi gerekir. DNA'dan RNA'ya ve RNA'dan proteine aktarılan genetik bilgi akışında, herhangi bir adımdaki bozukluk meme karsinogeneziye katkı sunar.

Germline mutasyonlar tüm meme kanserlerinin sadece %10'luk kısmını oluştururken, meme kanserlerinin çoğu sporadiktir ve somatik genetik değişikliklerle oluşur [41].

2.10.1.Meme kanserinde genetik yatkınlık

Ailevi meme kanseri tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20–%30'unu oluşturmaktadır. BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyonları, kalıtsal meme kanserinin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. CHEK-2, TP53, PTEN ve STK-11 diğer şüphelenilen genlerdir. Yeni keşfedilen genler, ailevi meme kanserinin %5'in altında bir oranını oluşturmaktadır. Ailevi meme kanserinin yaklaşık yarısı hala açıklanamamıştır [41].

2.10.2.Kalıtsal Meme Kanseri

Aile öyküsü meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir. Ailevi form meme kanserinin yaklaşık % 20'lik bir kısmını oluşturur. Ailevi kansere neden olan birçok gen yakın zamanda ortaya konmuştur. Meme kanseri gelişiminde duyarlı genler sağladıkları risk düzeyi ve sıklıklarına göre üç kategoride sınıflandırılmaktadır: Nadir görülen ama etkinliği yüksek genler, nadir ama orta düzeyde etkin genler ve düşük etkinlikli genler [42].

Tablo 4: Meme Kanserine Yatkınlık Yaratan Gen ve Lokuslar

Gen/Lokus	İlişkili Sendrom/ Klinik Özellikler	Meme Kanseri Riski	Allel Sıklığı
ETKİNLİĞİ YÜKSEK GENLER			
BRCA1 (17q21)	Kalıtımsal meme/over kanser	% 60–% 85 (yaşamboyu)	1/400
BRCA2 (13q12.3)	Kalıtımsal meme/over kanser: erkek meme kanseri,	% 60–% 85 (yaşamboyu)	1/400
TP53 (17p13.1)	Li-Fraumeni Sendromu	% 50–% 89 (50 yaş ile)	<1/10,000
PTEN (10q23.3)	Cowden Sendromu	% 25–% 50 (yaşamboyu)	<1/10,000
CDH1 (16q22.1)	Ailevi diffüz mide kanseri	Göreceli risk 6.6	<1/10,000
STK11/LKB1 (19p13.3)	Peutz-Jeghers Sendromu	% 30–% 50 (70 yaş ile)	<1/10,000
ETKİNLİĞİ ORTA DÜZEYDE GENLER			
CHEK2(22q12.1)	Li-Fraumeni 2 Sendromu	Genel risk 2.6	1/100–200
BRIP1 (17q22)	Meme kanseri Fanconi anemisi	Göreceli risk 2.0	<1/1000
ATM (11q22.3)	Ataksi-telejeiktazi	Göreceli risk 2.37	1/33–333
PALB2 (16p12)	Meme, pankreas, prostat kanserleri	Göreceli risk 2.3	<1/1000
DÜŞÜK ETKİNLİĞİ OLAN GEN VE LOKUSLAR			
FGFR2 (10q26)	Meme kanseri	genel risk 1.26	0.38
TOX3 (16q12.1)	Meme kanseri	genel risk 1.14	0.46
LSP1 (11p15.5)	Meme kanseri	genel risk 1.06	0.3
TGFB1 (19q13.1)	Meme kanseri	genel risk 1.07	0.68
MAP3K1 (5q11.2)	Meme kanseri	genel risk 1.13	0.28
CASP8 (2q33-34)	Meme kanseri (koruyucu)	genel risk 0.89	0.13
6q22.33	Meme kanseri	genel risk 1.41	0.21

2.10.3.Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Nadir Görülen, Etkinliği Yüksek Genler

Dominant geçişli ailevi meme kanseri olgularının yarısına yakınında BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları gözlenmektedir. Bu mutasyon genel kadın populasyonunda meme kanseri gelişme riskini 10-30 kat artırmakta, yaşam boyu meme kanseri gelişimini yaklaşık % 85 oranına çıkarmaktadır. BRCA-1 ve BRCA-2'ye bağlı binden fazla germline mutasyon belirlenmiştir. Patolojik mutasyonu en sık daha kısa bir protein üretilmesine, ya da protein fonksiyonunun değişmesiyle sonuçlanır.

BRCA-1 ilişkili meme kanseri BRCA-2 ilişkili ve sporadik meme kanserinden farklılık gösterir. BRCA-1 ilişkili meme kanseri daha agresif karakterlidir, daha genç hastalarda görülür, yüksek histolojik grade, yüksek proliferasyon oranı, anöploidi, ve ER (-), PR (-), HER2 (-) ("triple-negatif") karakteri daha yüksektir. BRCA-1 ilişkili "triple-negatif" fenotip "basal-like" gen ekspresyon paterni gösterir. BRCA-1 ve BRCA-2 tümör supresör genler olup fonksiyonları genomik stabilitenin devamını sağlamaktır. Yaban tip BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyonuna bağlı olarak heterozigotluk kaybı (LOH) yaşandığında DNA onarımında defekt oluşur ve kanser gelişimine zemin hazırlanır. BRCA-1 ve BRCA-2'nin DNA onarımındaki rolü BRCA ilişkili meme kanserinde terapötik hedefler için imkan sağlar. Platinyum ajanlarla DNA replikasyonu bloke edilebilir ya da PARP1 selüler enzim inhibitörleri kullanılarak DNA onarımı için alternatif yollar sağlanabilir. Bu sınıfa giren diğer genler TP53, PTEN, STK11/LKB1 ve CDH1 genleridir. Bu genler meme kanseri gelişme riskini 8-10 kat artırmaktadır. Hepsi de otozomal dominant geçiş gösteren, tümör supresör fonksiyonu olan genlerdir.

2.10.4.Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratan Etkinliği Orta Düzeyde, Az-Sıklıkta Görülen Genler

Meme kanser gelişiminde orta derecede risk yaratan dört adet gen belirlenmiştir. CHEK2, TM, BRIP1 ve PALB2. Bu genlerin her biri mutasyona uğramış bireylerde meme kanser gelişimini 2-3 kat artırmaktadır (18). Bu genler kalıtsal meme kanser olgularının % 2,3'ünü oluşturmaktadır. Genel populasyonda mutasyon sıklıkları düşük (% 0,1- %1) olduğundan ilgili çalışmalarda belirlenmeleri oldukça zordur.

2.10.5.Meme Kanseri Gelişimine Yatkınlık Yaratın Etkinliği Düşük, Sık Görülen Gen ve Lokuslar

Meme kanseri olan kadınlarda %15-%40 oranında düşük risk paneline sahip yaklaşık on farklı allel ve lokus belirlenmiştir (18). Çok sık görülmelerine karşın, bu genlere bağlı meme kanseri gelişme riski oldukça düşüktür (17). Buna karşın, bu allel ve lokuslar muhtemelen diğer orta ve yüksek risk yaratan genlerle etkileşerek klinik olarak önemli hale gelmektedir. BRCA ailesi içinde EFGFR-2, MAP3K1 tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) BRCA-2 mutasyon varlığında risk artırıcı rol oynamaktadır.

2.10.6.Meme Kanseriinde Somatik Değişiklikler

Meme kanserlerinin büyük çoğunluğu sporadiktir ve çok sayıda somatik genetik değişikliğin birikimi sonucu gelişir. Son bilgiler ışığında meme kanserli bireyde herhangi bir yerde ve zamanda yerleşmiş 50-80 farklı somatik mutasyon tarif edilmiştir. Bu mutasyonların çoğu DNA'nın hatalı replikasyonu sonucu oluşurken, bir kısmı da muhtemelen endojen ya da eksojen mutagenlerle oluşmaktadır. "Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları /Genom-wide association studies" (GWAS) yüzlerce somatik meme kanser aday geni tariflemiştir [43].

Günümüzde, tüm somatik mutasyonların açığa çıkarılması ve genetik değişiklerin kataloglanması için yoğun çalışmalar ve çabalar uluslararası düzeyde sürdürölmektedir. Meme kanserinde ortaya konan her mutasyonun rolünü belirlemede hala birçok zorluk bulunmaktadır. Tümörlerdeki somatik DNA mutasyonlarının çoğu zararsız ve onkogeneze katkı olmayan doğal biyolojik değişiklikler olan "passenger" mutasyonlardır. Buna karşın,"driver" mutasyonlar hücrede büyüme avantajları yaratan ve kanser gelişimine etki eden mutasyonlardır. Bu mutasyonlar aday kanser genlerinde bulunur [44].

Meme kanserinde DNA mutasyonları oldukça heterojen karaktere sahiptir; bu da meme kanserindeki geniş fenotip varyasyonu, değişken tümör davranışı ve tedaviye cevap vermedeki farklılıkları açıklar mahiyettedir.

2.10.7.Meme Kanserinde Gen Ekspresyon Paterni

DNA tarafından kodlanmış ve hücresel programı yönlendiren genetik bilgi akışı, canlı hücrenin enzimatik yollarla DNA'dan RNA'yı yazdırması (transkripsiyon) ve mRNA'yı proteine dönüştürmesi (translasyon) için gerekli mekanizmaları çalıştırmasıyla sağlanır. DNA yapısındaki değişiklikler onunla ilişkili mRNA ifadesinin (ekspresyon) düşüklüğü ya da yüksekliğine (overekspresyon) yol açabilir. Anormal gen ekspresyon paterni, meme kanserinin yaygın bulgusudur. Gen ekspresyon profili yaklaşık 10 yıldır klinik uygulama alanına girmiş olup, çeşitli tümörlerden alınan örneklerle gen ekspresyon profillerinin değerlendirilmesi, hücresel program dönüşümlerine ve tümör davranışını etkileyen gen değişikliklerinin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Elde edilen moleküler bulgular, tanı koymayı geliştirme, rekürrensleri tahmin etme ve kişiye-özel tedavi planlamasında önemli katkılar sağlamaktadır ve sağlayacağı benzetilmektedir.

Meme kanserinin gen ekspresyon paternine göre sınıflandırılması Perou ve ark. ile Sorlie ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir [45, 46]

Araştırmacılar bu sınıflamaları için meme kanserinin "moleküler portreleri" tanımını kullanırlar. Bu kategori içinde ER(+) ya da PR(+) luminal A ve luminal B tümör tipi, HER2 gen-amplifiye tümör, ve bazal kreatinin ekspresyonu gösteren "basal-like" tümör sınıflandırması yapılmıştır. Basal tümör tipik olarak ER (-), PR (-), HER2 (-) olduğundan, sıklıkla "triple negatif" olarak adlandırılırsa da tüm basal-like tümörler triple-negatif değildir.

Aynı zamanda van't Veer ve ark. ve van de Vijyer ve ark., muhtemel metastaz yapma oranı yüksek meme kanser hastalarını gen ekspresyon analiziyle saptayarak tümörleri alt gruplara ayırdılar [47, 48].

Gen ekspresyon profilinin analiziyle tedavide sağlanacak faydanın daha iyi belirlenmesi pratiğe geçmiştir. Bu prediktif işaretler klinisyenlere hastalarıyla tedavi planlaması yaparken önemli ölçüde kolaylık sağlar. Oncotype DX testi, formalin fikse parafin bloklardan alınan örneklerin RT-PCR yöntemiyle gen analizi yapılması ve bu sonuçlara göre antiöstrojen tedavinin planlanması esasına dayanır. Bu test için, literatürdeki 250 aday genin genomik datasından, 16 kanser ilişkili gen ve 5 referans

gen kullanılarak, teşhisten sonraki 10 yıl içinde gelişebilecek rekürens tahmin etmede, 0 ile 100 arasında değişen rekürens skoru hesaplayan algoritmalar geliştirilmiştir [49].

2.11.ÇALIŞMAMIZDA DEĞERLENDİRİLEN GENLER VE FONKSİYONLARI

Meme kanseri diğer kanser türlerinde olduğu gibi kanser kök hücrelerden kaynaklanmaktadır. Kök hücrelerin kendi kendini yenilemesinde görevli proteinler tümör başlangıcında esansiyel rol oynar. Bu projede amaç meme kanserinin gelişiminde bir kanser kök hücre geni olan PIWIL-2 ve bu gen ile çeşitli yollarda ortaklıkları olan PIWIL-1, DICER-1 ve DDX-4 genlerinin rolü olup olmadığını aydınlatmaya çalışıldı.

2.12.PIWIL-2

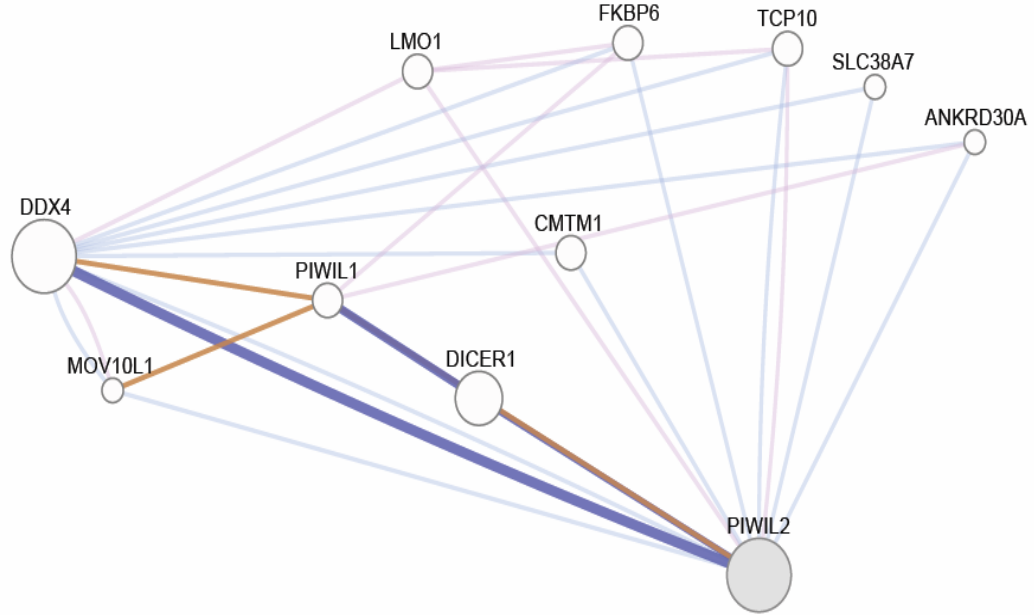
PIWIL-2 Argonaute Protein Ailesinin bir üyesidir. Bu gen ailesi ilk genetik olarak keşfedilmiştir ve son yıllarda yapılan çalışmalarla, small RNA'lar sayesinde gen susturulmasında anahtar rolü oynadıkları açığa çıkarılmıştır. PIWIL-2 8p 21.3 bölgesinde lokalizedir. Kodladığı protein 973 aminoasit; 109 849 Da ağırlığındadır. Piwi gen ailesi PAZ ve Piwi adıyla bilinen “Kök hücrelerin kendi kendini yenilemesi (stem-cell self-renewal), RNA susturulması ve transkripsiyon”dan sorumlu iki domain içerir. Piwi gen ailesinin üyesi olan PIWIL-2'nin, ilk olarak normal dokular içerisinde sadece testis dokusunda eksprese olduğu tespit edilmiştir. Spermatogenezde spermatositlerin, germ hücrelerinin ve spermatogonial kök hücrelerin farklılaşmasında temel bir rol oynar. Kadınlarda da oogenez sırasında benzer bir fonksiyon görüyor olabileceği düşünülmektedir.

Piwi genleri evrim sürecinde korunmuş, Arapidopsis bitkisinden insana kadar değişen aralıkta farklı organizmalarda kök hücrelerin kendilerini yenilemesinde, gametogenezde ve RNA interferansında rol oynadığı bilinmektedir. Piwi germline kök hücre bölünmesinde otonomik organizatör olarak rol oynar.

PIWIL-2 kanser kök hücrelerinde sinyal ileti yollarında proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen anahtar görevindedir. PIWIL-2, Piwi ailesinin çeşitli organizmalarda kök hücrelerin kendi kendilerini yenilemesi için gerekli olan

üyesidir. Son çalışmalar PIWIL-2'nin germ hücrelerinin proliferasyonunda rol oynadığını göstermiştir. Germ hücrelerinde bu genin aşırı ekspresyonu germ cell malignitelerine yol açmaktadır. Bu bulgu PIWIL-2'nin kanser gelişimini de içine alan diğer kök hücrelerde de aynı etkiye neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca epitelial solid kanserlerde etkisi ve rolü konusunda bir bilgi bulunmamaktadır.

PIWIL-2'nin farklı organlardaki rolünü anlamak için majör adult organlarında Northern Blot analizi yapıldığında normal yetişkin insan dokularından (dalak timus, prostat, testis, over, ince bağırsak, kolon, periferik kan ve lökositler) yalnızca testisinde PIWIL-2 proteininin ekspresyonu gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda memenin benign ve malign lezyonlarında PIWIL-2 ekspresyonu tespit edilmiştir. Meme kanser tipleri arasında ekspresyon açısından bir fark tespit edilmemiştir. Ancak memenin benign lezyonlarından fibroadenoma ve fibrokistik hastalıkta ekspresyon gözlenmemiştir.



Şekil 5: PIWIL-1,PIWIL2, DICER1 ve DDX genlerinin interaksiyon grafiği
(www.genemania.org)

PIWIL-2'nin somatik hücrelerde sessiz durumda iken, kanser kök hücrelerinde neden ve nasıl aktiflendiği konusu tam olarak açıklık kazanmamıştır. Bu gen DNA tamir mekanizmalarının başlangıcında kritik bir noktada görev yaptığına göre genin öncelikli aktiflenme nedeni onkogenезin durdurulmasına yönelik DNA tamirinin başlatılması olabilir. Bu hipotezin doğruluğunu memenin invaziv duktal karsinomlarında göstermek amacıyla ve dört genin ekspresyonlarındaki normal dokuya göre ve genlerin kendi aralarındaki farklanmalar incelenerek invaziv duktal karsinomaların moleküler patogenezi aydınlatılmaya çalışılmış olacaktır [50-53].

2.10.3.DICER-1

DICER memeli gelişiminde ve hücre farklılaşmasında miRNA ve siRNA biyosentezinde anahtar bir ribonükleazdır. Son çalışmalar DICER-1'in onkogeneзде görevli olabileceğini ortaya koymaktadır. DICER geni susturulmuş farelerde kök hücrelerin tükenmesi sonucu ölüm gerçekleşmiştir. DICER eksikliği olan embriyonik kök hücre ise hayatta kalabilir ancak diferansiyasyon kabiliyetini ve proliferasyon yeteneğini kaybeder. Dolayısı ile DICER-1 kök hücrelerin kendilerini yenilemelerinde proliferasyonunda temel teşkil etmektedir.

Onkogeneзде etkili bu genlerin (PIWIL-2 ve DICER-1) birçok genle etkileşimde olduğu, birlikte ekspresse olduğu bilinmektedir. Bunların arasında onkogenik mekanizmalarda etkili olduğu en çok düşünülen genlerden ikisi bu çalışmada invaziv duktal karsinomalı hastalarda ekspresyon düzeyleri ölçülen PIWIL-1 ve DDX-4'tür.

2.10.4. PIWIL-1

Bu gen Argonuate proteinlerinin bir alt grubu olan PIWI gen ailesinin bir üyesidir. Germ-line kök hücrelerinin gelişimi ve onarımından sorumlu bir üyesidir. Piwi gen ailesi PAZ ve Piwi adıyla bilinen “stem-cell self-renewal, RNA silencing ve translasonal regulasyon” dan sorumlu iki domain içerir. Kodlanan protein germline ve hematopoetik hücrelerin kendini yenileme kapasitesinde intrinsik regülatuar olarak rol oynar. Bu genin alternatif splicing ile oluşan farklı izoformları bulunmaktadır.(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9271>)

12q24.33 bölgesinde lokalize olan PIWIL-1, 34,751 bazdan oluşur ve 861 aminoasit uzunluğundaki 98,603 Da ağırlığındaki proteini kodlar. Transposable elemanları

baskılayarak ve onların mobilizasyonunu engelleyerek germline hücrelerin bütünlüğü için spermatogenez sırasında santral bir rol oynar.

DICER bağımsız bir mekanizma ile oluşturulan ve primer olarak transpozon ve diğer tekrarlayan sekans elemanlarından oluşan 24-30 nükleotidlik RNA parçaları olan piRNA'ların metabolik proseslerinde rol alır. piRNA'lar transpozonları baskılama fonksiyonlarının yanında muhtemelen mayoz bölünme sırasında bazı fonksiyonel pozisyonlarda ve translasyonel regülasyonda da görev almaktadır. Ayrıca miRNA'nın stabilizasyonunda ve kromatid cisimciğinin oluşumunda rol oynar. Shortinterfering RNAs (siRNAs), microRNAs (miRNAs) veya Piwi-interacting RNAs (piRNAs) gibi small RNA'lar spesifik bağlanma bölgelerine bağlanarak, hedef mRNA'da susturma ve destrüksiyona yol açarlar. Small RNA'lar ve Argonaute proteinleri yüksek ökaryotlarda bulunmuştur ve transpozon susturulması, hücre farklılaşması ve embriyonik gelişim gibi çok farklı fonksiyonlara sahiptirler. Argonaute protein evrim sürecinde korunmuş ve filogenetik olarak Ago ve Piwi alt sınıflarına bölünmüştür. Piwi proteinin ekspresyonu germline hücre hatlarıyla sınırlıdır ve transpozonların susturulmasını sağlayan pi RNA'larla ilişkilidir. Her ne kadar Argonaute protein fonksiyonları çeşitli yönleriyle anlaşılrsa dahi, henüz tanımlanamayan pek çok Argonaute proteini bulunmaktadır [54].

2.10.5. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN LABORATUVAR YÖNTEMLERİ

2.10.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bir DNA molekülünün bir çok kopyasının üretimi amacıyla, DNA polimeraz ve oligonükleotid primerler kullanılarak uygulanan bir siklus prosesi ile, teorik fikri ilk olarak 1971' de Kleppe ve arkadaşlarının yayınında açıklanmıştır[55]. O zamanlar böyle bir prosesin uygulanabilirliği, yayını okuyan araştırmacılara uzak görünmüştü. Bunun nedeni, oligonükleotid üretiminin maliyeti ve zorluğu ısıya dayanıklı DNA polimerazların ve otomatik ısı döngü cihazlarının olmayışından kaynaklanıyordu. 1985 yılında Saiki ve arkadaşları tarafından PCR'nun ilk defa gösterimiyle, otomatik oligonükleotid sentezleyiciler üretilmeye başlamıştı. Bu durum, birçok uygulamada PCR potansiyelinin tanınması anlamına gelmekteydi. Ancak, her elongasyon aşaması öncesi taze termolabil polimerazın enjeksiyonu gerekmekteydi ve ısı döngü cihazı

hala geliştirilme aşamasındaydı. Son olarak potansiyel PCR' ın gerçekleşmesinde belki de anahtar basamak 1988 yılında ilk olarak tanımlanan ısıya dayanıklı polimeraz enzimi kullanımıydı [56]

DNA amplifikasyonunun ilk olarak tanımlanmasından bu yana birçok ayrıntı tanımlanmış durumdadır ve otomatik ısı döngü cihazları standart laboratuvar cihazları haline gelmiştir. PCR şu an bir çok araştırmacı için gerekli bir prosedür olup standart protokollerin uygulanması ve cihazın kullanımı oldukça kolaydır.

PCR yöntemi biyolojik materyallerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve DNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilmek amacıyla yapılır.

Ayrıca tek nokta mutasyonlarını belirleme, kromozom bozukluklarının tespiti, metilasyon tespiti patojen belirleme, viral yük tayini, DNA hasarı belirleme gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur. Prenatal tanıda X'e bağlı genetik geçişli hastalıklarda fetal cinsiyet tayini, Rh izoimmünizasyonunda fetal kan grubu tayini için RT-PCR %100 tanı koydurucu özelliği nedeniyle günümüzde rutin uygulamalar arasına girmiştir [57].

2.10.5.2.Real Time PCR teknolojisi

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR) teknolojisini kısaca özetlemek gerekirse, PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla “Sayımsal Gerçek Zamanlı –Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)”, “İzlenebilir Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT)”, “Floresan Sayımsal RT-PZR” gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir [57, 58]. Aslında yöntemin temeli 1990'ların başına dayanmaktadır. Higuchi ve arkadaşları PCR ürünlerinin eldesi sırasında her çoğaltma işlemi için etidyum bromür kullanarak UV ışığıyla her örneği aydınlatarak termal döngü adaptörü ve Floresan ışımının sonuçlarını toplayacak bir kamera ve buna bağlı bilgisayar sistemini keşfettiler [59].

PCR tekniğindeki bu önemli gelişmeler, eş zamanlı olarak hem amplifikasyon hem de spesifik nükleik asit dizilerinin aşama aşama ölçümüne olanak veren yeni jenerasyon PCR platformlarının ve reaktiflerinin geliştirilmesine öncülük etti.

Real-Time PCR pek çok disiplinde büyük bir etkiye sahip olup, teknoloji ve mevcut cihazların geliştirilmesine öncülük etmektedir. İlk kez 1990 yılının ortalarında ticari olarak piyasaya sürülen iki modelin ardından, bugün artık düzineleri aşan cihaz seçenekleri söz konusudur. Gelişmeler arasında, daha hızlı ısı döngü aşamaları, daha yüksek verimlilik, fleksibilite, çeşitli optik sistem seçenekleri, artmış multipleksing ve kullanımı daha kolay yazılım yer almaktadır.

1990' ların ortalarında ilk tanımlanmalarından bu yana nispeten kısa bir zaman içerisinde Real-Time PCR cihazları, araştırmacılar için geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu metot aplikasyonlarını tanımlayan yayınların sayısında bir patlamaya yol açmıştır. Gerçekten zamana karşı yayın sayısının grafiği bir Real-Time PCR grafiği oluşturmaktadır. Real-Time PCR'dan yararlanan temel aplikasyonların çoğu öncelikli olarak standart PCR'a ve klinik mikrobiyoloji ve insan genetik analizini de içeren temel alanlara dayanmaktaydı. Fakat, laboratuvarlarda harcanan zamanın kısa olması, güvenilirlikteki artış ve Real-Time PCR metotlarındaki kantitatif uyumluluğun yükselmesi, öncelikli olarak PCR' ın önceleri kullanılmadığı alanlarda da kullanımlarının artmasına sebep olmuştur. Örneğin, gen ekspresyon analizinde bu yöntemden yararlanılmıştır [60].

Real Time PCR, reaksiyon sırasında her bir PCR döngüsünün yeterli miktarda ürünün verdiği floresan ışığa göre çalışan ve her aşamada reaksiyon sonuna kadar oluşan ürünün kontrol edildiği bir yöntemdir.

Bu sistemde çoğaltılmak istenen diziye özgü problemler ve diziye özgü olmayan floresan boyalar kullanılır. Floresan boyaların verdiği ışımlar sayesinde nicel ve nitel olarak analizler yapılabilir [61].

Real Time PCR farklı yöntemlerle yapılabilir. Bu birimlerin toplamdaki görevi PCR sırasında oluşan floresan ışımayı ölçmektir. Çünkü floresan ışımaya miktarı oluşan PCR ürünü miktarı ile orantılıdır [62].

2.10.5.3.Bölgeye Spesifik Olmayan PCR Problemleri

Bu sistemlerden en ucuzu ve basiti, çift zincirli DNA arasına giren boya teknolojisine dayanmaktadır. Önceden hazır olan DNA ürününün üzerine boya kolayca uygulanabilir ve ayrıca floresan işaretli oligonükleotid ilavesi gerekmez. Bu sistem hem spesifik hem de non-spesifik PCR ürünlerini taramaktadır. Bu sebeple PCR koşulları çok iyi optimize edilmeli ve melting curve (erime eğrisi)analizinde spesifik ve spesifik olmayan örnekler çok iyi ayrıştırılmalıdır. Bu yöntemde SYBR Green boyası kullanılır.

Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak Real-Time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eşzamanlı olarak artar. Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve “SYBR Green I” boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışıma yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış Real-Time PCR cihazının monitöründen izlenebilir. Bu yöntem floresan işaretli problemlere ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur ancak istenmeyen bölgelerin de çoğalmasına neden olabilir [58, 63, 64]

Bölgeye Spesifik PCR Problemleri

Bu yöntemde DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesine floresan işaretli oligonükleotidlerin eklenmesi söz konusudur.

Bu tekniklerin başında “TaqMan” prob, “Molecular beacon”, “Light-up” prob, hibridizasyon prob ve “Scorpion” primer gibi floresan işaretli problemler kullanılır.

“TaqMan® Probe” Yöntemi

TagMan probe” yönteminde çoğaltılmak istenilen DNA bölgesinin 3' ve 5' uçlarına florokrom madde ile işaretlenmiş problemler aplat edilir. Floresan işaretli probun 5' ucunda raportör “fluorophore” (6-karboksifloresin=6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) denir. 3' uçtaki basılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Probun hedef

DNA'ya bağlanması durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerlerin bağlanma bölgeleri arasında bir yere “Taq Man” probolar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir sentezi başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder. Bir başka deyişle probun iki ucunda fluorescein ve quencher boyalar bulunmaktadır. Bu boyalar birbirlerini baskırlar. Uzama esnasında prob kırılır ve boyaların birbiri üzerindeki baskılayıcı etkisi ortadan kalkar ve ışımaya gözlenir. “TagMan® probe” yönteminde mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabilirdiğinden, araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolü ve kolay bir dizaynı olduğu ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştirdiği için gen ifadesi şemasının çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır [58, 65].

Kantitatif PCR Analizi

Mutlak kantitatif yöntem:

RT-PCR ile elde edilen sonuçlar mutlak ve göreceli (relative) olmak üzere iki şekilde değerlendirilir [66]

Mutlak kantitasyon yönteminde, ele alınan örnek içinde belirli bir genin (hedef gen) miktarı, aynı gen için derişimi bilinen bir çözelti ile karşılaştırılır. PCR döngüsü, araştırılan örnek ve derişimi bilinen çözelti için eş zamanlı uygulanır ve elde edilen Ct değerleri standart eğri kullanılarak karşılaştırılır.

Klinik kullanımda sıklıkla herhangi bir dokudaki viral yük tayini için kullanılmaktadır [67].

Göreceli kantitatif yöntem:

Göreceli kantitasyon yönteminde ise DNA miktarları bilinmeyen iki örneğe eş zamanlı olarak Real-Time PCR uygulanır. Kalibrasyon için bu örneklerden biri araştırılan hastalığın veya ilacın etkisine maruz kalmamış, yani kontrol grubu-kalibratör, diğeri ise etkisi araştırılan çalışma grubudur. Miktar tayini araştırılan örnekte hedef genin “house keeping” gene göre düzeyi, kontrol grubundaki hedef

genin “house keeping” genine göre düzeyine oranlanır. Burada en önemli husus hedef gen ve “house keeping” genin tepkime içerisinde aynı etkinliğe sahip olmasıdır. Böylece her tepkime döngüsünde iki gen de eş zamanlı çoğaltılır [68].

Real-Time PCR’ da Temel Prensiptir

Real-Time PCR cihazları, siklus boyunca spesifik ürünlerin birikiminin monitörize edilmesini sağlayıp, amplikon tanımlanmasını büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır. Real-Time PCR için dizayn edilmiş mevcut tüm cihazlar PCR tüpündeki floresansdaki değişiklikleri monitörize ederek, amplifikasyondaki ilerlemeyi ölçmektedir. Floresansdaki değişiklikler ürün birikiminin bir göstergesidir. Amplifikasyon ile giderek artan miktarlarda çift iplikli DNA üretilmekte ve etidyum bromide bağlanan bu DNA’lar floresansta bir artışa neden olmaktadır. Sistem sayesinde floresanstaki artıştan ve döngü sayısından faydalanılarak, sabit bir döngü sayısında yapılan ürün birikimi analizlerine oranla daha geniş kapsamlı amplifikasyon grafikleri oluşturulmaktadır.

Real-Time PCR' ın Avantajları:

1. Entegre bir sistemde amplifikasyon ve analiz
2. Sabit reaksiyon monitörizasyonuna olanak veren floresan boyalar ve probalar
3. Hızlı siklus süresi (35 siklus için 20-40 dakika)
4. Yüksek numune verimliliği (Günde yaklaşık 200 ila 5000 numune)
5. Kapalı reaksiyon ortamlarına bağlı olarak düşük kontaminasyon riski; PCR amplikonlarının ve diğer hedef moleküllerin laboratuvar ortamına dağılma riski olmaksızın, çalışılan tüpün açılmadan analizin tamamlanabilmesidir.
6. Artmış sensitivite (Yaklaşık 3 pg veya 1 genoma eşit DNA)
7. 10-10¹⁰ kopya geniş dinamik aralığına sahip analiz
8. % 2’nin altında bir CV ile (sabit hız) amplifikasyon
9. Sonuçların kantitatif analizine olanak
10. Yazılım ile çalışma

Real Time PCR' ın Dezavantajları:

1. Tüm kimyasalları kullanarak gerçekleştirilen çoğaltmada sınırlı kapasite
2. Protokol geliştirilmesi yüksek derecede bir teknik yetenek ve /veya destek gerektirir.
3. Yüksek cihaz maliyeti
4. Analizlerin yetenek ve tecrübe gerektiriyor olması

Real-Time PCR Platformları

Bir Real-Time PCR cihazı, ısı döngü cihazı, hem floresans uyarımı, hem de yayılımını toplayan optik gözler, bir bilgisayar ve verilerin toplanması ve analizi için gerekli bir yazılımdan oluşur. Kullanıcılar için format, reaksiyon aşamaları, emisyon ve eksitasyon dalga boyları, verim, kontrol aşaması, kullanılan kimyasal, yazılım, hız ve uygulamalar gibi farklı bir çok seçenek söz konusudur. Mevcut tüm platformlar, floresans monitörizasyon kullanarak reaksiyonun eksponansiyel fazında PCR ürününün toplanmasının ölçümünü gerçekleştirebilmektedir. Amplifikasyon ve analiz tek bir reaksiyon tüpünde meydana geldiği için, PCR sonrası çeşitli manuel manipülasyonlara olan ihtiyacı elimine ettiği gibi kontaminasyon ve değişkenlik olasılığını da en aza indirmektedir. Diğer teknik avantajları, hem kalitatif, hem de kantitatif PCR mutasyon analizi ve yüksek verimlilikli analiz şeklindedir.

Real-Time PCR için florometre entegre edilmiş ve bir kaynaktan reaksiyon tüpüne, sonrasında örnekten detektöre eksitasyon ışık transferi için bazı aparatlar eklenmiş ısı döngü cihazları gerekmektedir.

Ana problem ışığın blok kapağı ve hava kapağı karşısında, reaksiyon tüpü kapağı ve sonrasında örnek içerisine doğru programlanması gerekliliğidir. Salıverilmiş ışık daha sonra aynı yoldan geri dönmelidir. Bloklarla ilgili ilk ticari cihaz ABI 7700 olup, karşılaşılan zorluklar doğrultusunda alternatif yeni bloklar geliştirilmiştir. Light Cycler (LC24) ısıtma /soğutma ortamı olarak havayı kullanan cihazların ilkidir. Hava yoluyla ısı transferi ışığın yolunu kısaltmasının yanında, blok temelli yapılmış ısı döngü cihazlarından daha hızlı ve daha uniform olması yönü ile daha avantajlıdır.

Isıtma ortamı seçimindeki farklılıkların yanında Real-Time PCR cihazları ayrıca ışık kaynağı ve floresansın belirlenmesi seçenekleri için de geniş bir aralık sunmaktadır. Şu anda mevcut cihazlar, birden fazla boyanın belirlenmesi ve eksitasyonuna izin vermekte olup, böylece internal standartlar ve multipleks reaksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir.

Real Time Isı Döngü Aşaması

PCR platformunda ilk düşünülmesi gereken komponent termal döngüleri oluşturacak bir cihazdır. Numune aşamalarında ısının ve bu ısının elde edilmesini sağlayan hızın doğru olarak ayarlanması başarılı bir ısı döngüsü için şarttır. İnce duvarlı plastik reaksiyon tüplerinin içine ve dışına ısının tam olarak transfer edilebilmesi için, Real-Time PCR platformlarının birçoğu Peltier-effect'e dayalı ileri ısıtmalı blok teknolojisini kullanmaktadır. Peltier cihazları ısıyı yarı iletkenin bir tarafından diğer tarafına transfer eder. Genel olarak, bloklar önemli kütleler olup, sonuç itibariyle termal bir iç momente sahiptirler. Ayrıca, reaksiyon tüpü ile ısıtıcı arasındaki plastik yalıtkan tabaka, ek bir termal yalıtandır. Bunun sonucunda, ısı geçişleri nispeten yavaş olup bloklar çok dikkatli bir şekilde dizayn edilmelidir.

Real-Time PCR Optik Detektörleri ve Real-Time PCR ile Mutasyon Analizi

Real-Time PCR için PCR aşamaları esnasında floresans düzeylerini ölçen ve monitorize eden entegre bir florometre gerekmektedir. Florofor eksitasyona neden olan ışık kaynakları, dar veya geniş spektrumlu olarak sınıflandırılabilir. Real-Time PCR tek nükleotid polimorfizmlerinin analizi için mükemmel olarak tasarlanmıştır ve bu amaçla sık olarak kullanılmaktadır. Kullanılan yöntem, hızlı, sensitif, özgün ve ucuzdur. Real-Time PCR tekniği kolaylıkla otomatize edilebilmekte ve PCR sonrası işlemleri ortadan kaldırmaktadır. Erime eğrisi analizine dayalı hibridizasyon problemleri, hidroliz problemleri, Molecular Beacons ve Scorpion primerleri gibi farklı formatlar uygulanabilmektedir. Real-Time PCR adli tıpta, hastalıkların teşhisinde, farmakogenetikte ilaç dirençlilik genlerinin taranmasında, klinik mikrobiyolojide ve ilaç geliştirilmesinde kullanılmakta ve dizileme, tek iplik konformasyon polimorfizmi (SSCP) ve restriksiyon enzim kesimleri (RFLP) gibi tekniklerin yerini almıştır.

Kantifikasyon

Standart PCR gibi Real-Time PCR cihazları da her bir reaksiyon tüpündeki ürün amplifikasyonunu ölçebilmektedir. Genel olarak ilk birkaç sıcaklık siklusu boyunca floresans sinyal, cihazın eşik değerinin altında olduğundan hiç ürün belirlenmesi olmamaktadır. Fakat birçok cihaz ve floresan raportör kombinasyonları amplifikasyon fazının sonlanmasından önce amplikonların birikimini belirleyebilmektedir. Bu süre boyunca her bir siklustaki ürün miktarı iki katına çıktığından PCR etkinliği sıklıkla % 100'dür. Ürün konsantrasyonları artarken, amplifikasyon etkinliği primer olarak düşer, çünkü amplikonlar ayrılma basamağı (annealing step) boyunca tekrar birleşir. Bu birleşme, ürünlerin birikimi boyunca yaklaşık olarak her bir siklustaki net sentezin belirgin seviyesi ile lineer olan bir faza yol açmaktadır. Son olarak net sentez yaklaşık olarak sıfırken plato fazına ulaşılır. Real-Time PCR'daki kantifikasyon, eşik değere veya siklus eğrisine karşı, floresans sinyal için gerekli siklus sayısı ölçülerek yapılır. Bu siklus sayısı örnekteki kalıp kopyanın sayısı ile orantılıdır.

Real-Time PCR Veri Analizi

Real-Time PCR cihazları ile birlikte sağlanan yazılım, başlıca üç tip data analizine imkan vermektedir.

- 1) Her bir reaksiyon tüpü içerisindeki floresans artışı, siklus sayısının ölçümü belli bir öneme sahiptir.
- 2) Veri eksternal standartlardan, kalıp kopyanın asıl sayısının tahminine kadar sonuçların birleştirilmesinde kullanılmaktadır.
- 3) Erime eğrileri, her bir dubleks için eşit sıcaklıkta bir pikin olduğu T'ye karşı $-dF/dT$ nin grafiğini (plot) sağlamak için dönüştürülmektedir. Genel olarak farklı yazılımlar, hızlı ve kopyalanabilir veri analizine imkan sağlamaktadır ve kullanımları kolaydır.

Real-Time PCR Uygulamaları

Son yıllarda Real-Time PCR birçok biyolojik aplikasyonda kullanılmıştır. Bu uygulamalar basitçe haberciler olarak veya dizi varyantları arasındaki ayrım

probların kullanımına göre, genellikle hem kalitatif hem de kantitatif metot olarak sınıflandırılabilir. Real-Time PCR' ın en basit uygulaması bir karışımdaki spesifik gen dizilerinin belirlenmesidir. DNA dizi analizleri gelişen birçok patojen için özgün iken, bu tarz analizler enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde oldukça kullanışlıdır.

Kantitatif Real-Time PCR' ın diğer bir önemli uygulaması, gen ekspresyonunu değerlendirmek için RNA transkript seviyesinin ölçümüdür. Bu uygulama, enfeksiyon sırasında mikrop ve konak yanıtlarının karşılıklı etkisini anlamamıza önemli bir katkıda bulunmaktadır.

Gen ekspresyon çalışmaları ayrıca enfeksiyöz olmayan hastalıkların patogenezinin aydınlatılmasında ve normal dokuların fonksiyonlarının anlaşılmasında yardımcı olabilmektedir. Kantitatif Real-Time PCR'ın diğer önemli uygulama alanları, tümör dokularındaki gen oranının değerlendirilmesi ve klinik örneklerdeki patojen sayısının ölçümünü içermektedir [69].

Real-Time PCR insanların ve insan patojenlerinin genotiplendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Kesin epidemiyolojik çalışmalarda, bireyler arasındaki ayrım veya belirgin fenotipler ile bağlantıların belirlenmesinde de bu yöntem oldukça spesifiktir. SNP'lerin belirlenmesi için oligonükleotid problemler kullanan Real-Time PCR analizler, günümüzde geniş bir biçimde kullanılmaktadır. Bakteriyel tiplendirme analizleri [70] ilaç direnci belirleme [71] ve insan genetik hastalıklarının tanısı örnekleri arasında yer almaktadır.

PCR uygulaması için kullanılan reaktiflerin optimizasyonu güvenilir ve çoğaltılabilir sonuçlar için çok önemlidir. Bir Real-Time PCR analizinin optimizasyonu için harcanacak zaman, uzun süreli uygulama için faydalı olabilir. Real-Time PCR sonuçlarının analizi aynı zamanda önemli bir faktör olup böylece geleneksel blok temelli ısı döngüleme işleminden ayrılır. Real-Time PCR siklusa hangi amplifikasyonun gerçekleştiği konusunda ve prob veya ampikonun belirlenebilen erime sıcaklığı gibi platformlar hakkında bilgi verir.

Real-Time PCR Analizlerinin Optimizasyonu

Hedef DNA primer veya prob içeriğindeki normal değişikliklerden etkilenmeyen doğru analizlerin yapılabilmesi için Real-Time PCR analizlerinin optimizasyonu

gerekir. İyi bir analiz,'normal' varyasyonların aynı zamanda çapraz nokta (crossing point) (CP) olarak da bilinen çapraz eşik değerde (crossing threshold) (Ct), herhangi bir etkiye neden olmadığı ve sadece görünen floresans miktarında küçük bir etkiye sahip analiz demektir. Optimizasyonda önemli kriterler; özgüllük, duyarlılık, etkinlik, ve oğaltılabilirliktir. Optimizasyona başlamadan önce belirli bir aplikasyon için hangi tip analizin gerektiğine karar vermek önemlidir. Örneğin; eğer basit bir kalitatif analiz yapılacaksa, kantitatif bir analiz geliştirmek gibi küçük bir ayrıntı bilgi verici olacaktır. Ürün ayırımında erime eğrisi analizi de gerekli olabilir ve bu durumda planlama aşamasında bu da göz önünde bulundurulmalıdır. Eğer Real-Time analiz, var olan blok temelli analizin dönüştürülmesi esasına dayanıyorsa, konvansiyonel blok temelli ısı döngüleme için kullanılan durumların, her zaman Real-Time formata kolayca çevrilemeyeceğine dikkat edilmeli ve bu %n analizin tekrar optimizasyonu düşünölmelidir. Aynı optimizasyon prensipleri tüm real-time platformunda yapılan analizlere uygulanmalıdır. Şu kriterler optimize edilmelidir: tampon içeriğı, siklus koşulları, MgCl konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, prob konsantrasyonu ve kalıp konsantrasyonu. Şu an için geniş şekilde mevcut olan ticari esas karışımlar (master miks) uygundur ve optimizasyonu kolaylaştırmaktadır.

Real-Time PCR Sonuçlarının Analizi

Real-Time PCR sonuçları aplikasyona bağılı olarak çok çeşitli yollarla analiz edilebilir. Kantitatif standartların analizi, PCR eğrileri oluşturmak için kullanılabilir ve bunlardan arka plan floresanı üzerinde hangi floresan sinyalin yükseldiğine bağılı olarak, siklus sayısı belirlenebilir.

Bu siklus sayıları sonuçların değeriendirilmesinde ve kalitatif pozitif/negatif sonuçların elde edilmesinde kullanılabilir. Kantitatif analizlerde standart eğri bilinmeyen örneklerin kopya sayısının belirlenmesinde kullanılabilir ve yine bu diğer örneklerle karşılaştırılabilir. Real-Time PCR reaksiyonları aynı zamanda hibridizasyon problemleri ve SYBR Green I interkalasyonu içeren metotlar kullanıldığı zaman, erime ısısı eğrisi belirlenerek analiz edilebilir. Erime eğrileri spesifik PCR ürünlerinden primer dimerlerin ayırımı için (primer dimerler genellikle spesifik PCR ürünlerinden daha düşük sıcaklıklarda erirler) veya mutasyon belirlenmesinde, farklı farklı PCR ürünlerinin ayırımında faydalıdır.

Real-Time PCR sonuçları, her bir komponentin karşılıklı ilişkisi kadar, reaksiyon bileşenlerinin her birinin optimum konsantrasyonuna da bağlıdır. Zaten optimize olan ticari olarak mevcut esas karışımların kullanımı, güçlü bir analiz için temel sağlar. Maksimum duyarlılık ve PCR etkinliği elde etmek için. MgCl₂, primer ve prob konsantrasyonunun optimizasyonu gerekmektedir ve bu oldukça kolay uygulanabilir. Platform ve prob formatına bağlı olarak bazı siklus koşullarının optimizasyonu gerekebilir. Çalışmamızda kullandığımız, Chemicon International firması tarafından üretilen Amplifluor® SNP Genotipleme Sisteminin evrensel olmasının nedeni, Amplifluor® SNP Primeri olarak adlandırılan, enerji transfer eden floresan bir hairpin primeri kullanmasıdır. İlgilenilen her SNP için floresan işaretli bir prob veya primer çiftidizayn etmektense, Amplifluor® Sistemi, herhangi bir SNP için, genotipleme amacıyla, kullanıcıya floresan işaretli aynı primerlerin kullanılabilmesi olanağını vermektedir. Standart, işaretlenmemiş, tuz içermeyen Z kuyruğuna sahip oligonükleotidler, hedeflenen SNP'in izlenebilmesini sağlar. Amplifluor® molekülü dört birimden oluşur: florofofor, hairpin yapısı, DABSYL quencher (söndürücü) ve bir "Z" kuyruğu. Amplifluor® primeri, doğal kapalı halinde çok az floresan aktiviteye sahiptir. Ancak. PCR sırasında bir amplikon ile birleşme durumunda, hairpin açılır ve florofofor ile quencher'in ayrılması ile kolaylıkla analiz edilebilen güçlü bir sinyal meydana getirir.

AMAÇ

Bu çalışmada kadınlarda en sık görülen ve kansere bağlı ölümlerin ikinci sıklıktaki nedeni olan meme kanserinin moleküler patogeneze katkıda bulunabilmeyi amaçladık. Bilindiği üzere PIWIL-2 germline hücrelerin gelişiminde, kök hücrelerin kendi kendini yenilemesinde görevlidir. Bu genle alakalı çeşitli kanserlerde yapılan çalışmalarda bir kanser kök hücre geni olduğu, pek çok kanser türünde ekspresyonunun arttığı, çeşitli mekanizmalarla DNA tamirinde fonksiyon gördüğü tespit edilmiştir. Normal dokularda testis dokusu dışında ekspresse olmamaktadır. Çalışma sonucunda daha önce PIWIL-2 ile alakalı yapılan çalışmalarda olduğu gibi gen ekspresyonunun meme kanserinde de artmış olmasını beklemekteyiz. DICER-1 miRNA'ların kontrolünde temel görevli konumundadır. miRNA' lar da kanser patogenezinde görevli olduğuna göre ve kanser hücreleri sürekli bölünen hücreler

olduğuna göre DICER-1 geninin ekspresyonunun da kanser dokularında artması gerekir. PIWIL-1 zaten PIWIL-2 ile fonksiyonel ve yapı olarak aynı gen ailesinin (Argonaute) bir ürünüdür. PIWIL-2 ve PIWIL-1 için sonuçların yaklaşık aynı veya birbirine yakın çıkması beklenmektedir. DDX-4 yapısal olarak normal dokularda testis dışında ekspresse olmayışı ve germline hücrelerin gelişiminde görev alması ile PIWIL-2 ye benzemektedir. Dolayısı ile DDX-4 ekspresyonunun da meme kanserinde artmış olmasını beklemekteyiz.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma “Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu” nun 10.02.2012 tarih ve 2012/130 numaralı olumlu kararı doğrultusunda yapıldı.

3.1.ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE GRUPLANDIRILMASI

Çalışmaya alınan araştırma ve kontrol gruplarına ait doku örnekleri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi’nden 2009-2012 yıllarına ait parafin bloklardan elde edildi. Çalışmaya 41 adet İnvaziv Duktal Karsinom (IDKD) tanısı konmuş tümör dokusu ve 14 adet normal meme dokusu (NMD) dahil edildi. Alınan tüm dokular yaş ve östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), lenf nodu metastazı, ki-67, c-erbB-2 pozitifliği açısından değerlendirildi. Hücre proliferasyon indeksi ki-67 kötü prognoz göstergesi c-erbB-2 ve lenf nodu metastazı yönünden hastalar gruplandırıldı.

3.2.ARAŞTIRMADA KULLANILAN LABORATUVAR TEKNİKLERİ

Özet

Bu araştırmada, memenin IDKD’ nda PIWIL-2, PIWIL-1, DICER-1 ve DDX-4 genlerinin ekspresyonları Real-Time PCR yöntemi ile çalışıldı. Ekspresyon çalışması sırasında kontrol geni olarak bir house-keeping gen olan Beta-Actin (ACTB), kontrol doku örneği olarak da mamoplasti operasyonlarından elde edilen normal meme doku örnekleri alındı. Genlerin ekspresyon çalışmaları için dokulardan RNA

izolasyonu, RNA'dan c-DNA sentezi yapıldı, preamplifikasyon yöntemi ile bölgesel çoğaltma ve son olarak Real Time PCR yöntemi ile ekspresyon çalışması uygulandı.

3.3.KATILIMCILARIN ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

1. Tüm katılımcılar kadın cinsiyette seçildi.
2. Katılımcıların yaş ortalaması 35-60 arasında olması şartı arandı.
3. Araştırma Grubu, Meme Kanseri nedeniyle opere edilmiş kişilerden, kontrol grubu ise mammoplasti (meme küçültme-redüksiyon) yapılan kişilerden seçildi.
4. Araştırma grubu için patoloji raporunda “İnvaziv Duktal Karsinom” tanısı alanlar, kontrol grubu için ise patoloji raporunda “normal meme dokusu” tanısı alanlar araştırmaya dahil edildi.

3.4.KATILIMCILARIN ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLMEME KRİTERLERİ

1. Erkekler,
2. Patoloji raporunda “İnvaziv Duktal Karsinom ve Normal Meme Dokusu” dışında ilave veya tek başına başka patolojik tanıları olanlar araştırmaya dahil edilmediler.

3.5.PARAFİNİZE DOKU BLOKLARINDAN KESİT HAZIRLANMASI

Örnekler doku büyüklüklerine göre 5-10 sayıda kesit parafine gömülü doku bloklarından, mikrotom ile 5µm kalınlığında, alındı. Alınan kesitler 1,5-2 ml'lik epandorf tüplerde RNA izolasyonu yapılncaya kadar muhafaza edildi.

Kullanılan Aletler

- Santrifüj cihazları
- Vortex
- Isıtıcı blok 80°C ve 55°C inkübasyon için
- Termal cyclers (Isı döngü cihazı)

Kullanılan Sarf Malzemeleri

- Steril, Nükleaz içermeyen pipet uçları
- 1.5 ml or 2 ml santrifüj tüpleri
- Ependorf Tüp 1.5mL,
- Ependorf Tüp 2.0mL,
- Falcon Tüp 50 mL,
- Falcon Tüp 15 mL,
- Filtreli Mikropipet Uçları
- % 96-100 etanol
- Ksilen (Deparafinizasyon için)
- RT First Strand Kit
- Rneasy FFPE Kit
- RT q PCR Primer Assay
- RTSYBR Green ROXFAST Mastermix 2

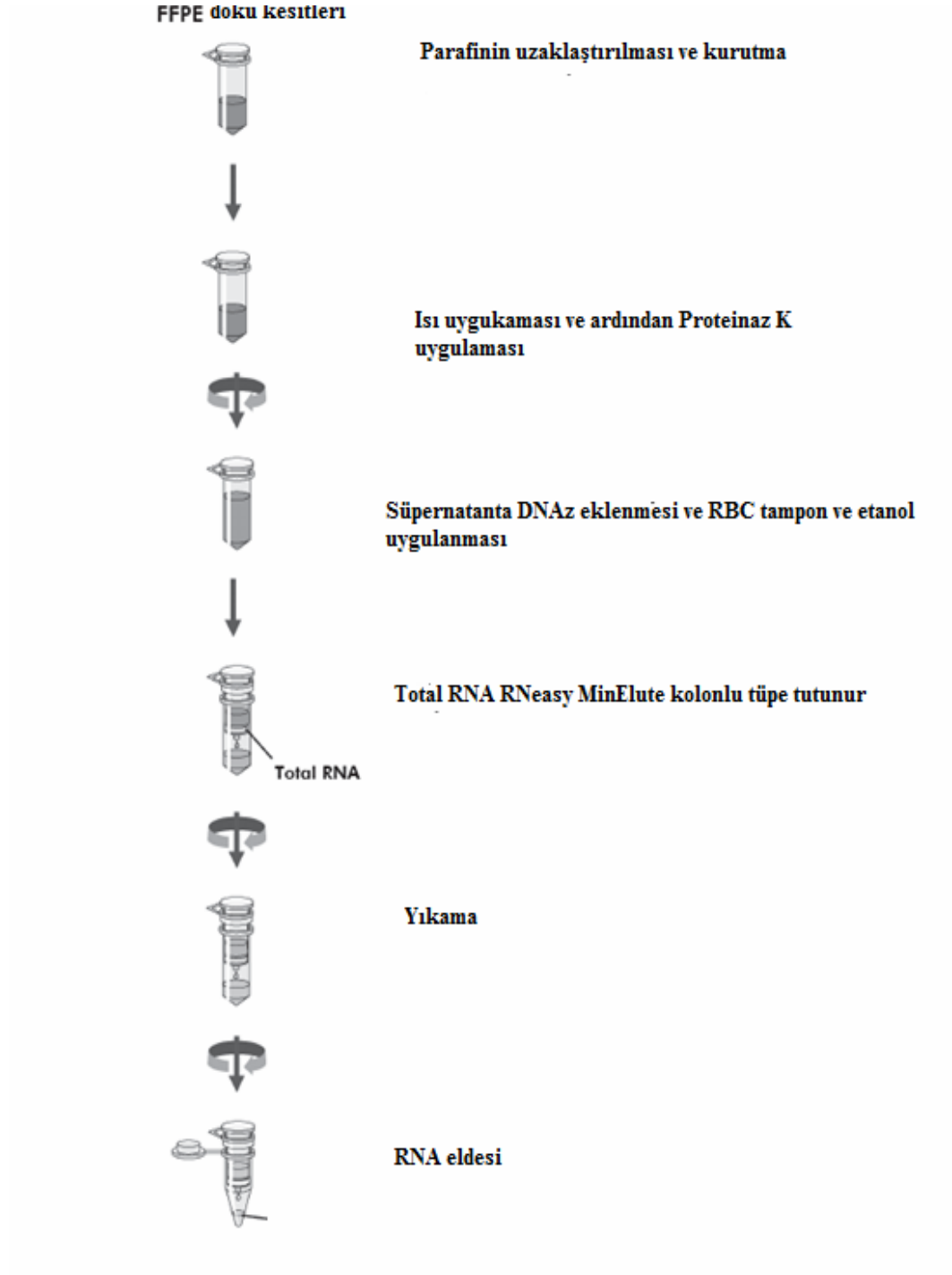
3.6.PARAFİNİZE DOKULARDAN RNA İZOLASYONU

Dokulardan RNA izolasyonu için RNeasy FFPE Kit kullanıldı. Kit içeriği ve solüsyonlar tabloda görülmektedir.

Tablo 5: RNA izolasyon kitinde bulunan solüsyon ve kimyasallar

RNeasy FFPE Kit	
RNeasy MinElute Kolonlu Tüp (pembe)	50
Toplama Tüpleri (1.5 ml)	50
Toplama Tüpleri (2 ml)	50
Tampon RBC (Guanidin hidroklorid içerir)	45 ml
Tampon PKD	15 ml
Proteinaz K	1.25 ml
RNAaz içermeyen DNAaz I (liyofilize)	1500 ünite
RNAaz içermeyen su (RNAaz içermeyen DNAaz I ile birlikte kullanılacak)	1.5 ml
DNAaz Booster Tampon	2 ml
Tampon RPE† (Konsantre) (4 volum %100 alkol eklendi)	11 ml
RNAaz içermeyen su	10 ml

RNA izolasyonu işlemi kısaca aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.



Şekil 6: RNA izolasyonu

Deparafinizasyon İşlemi

- RNA izolasyonuna başlamadan önce dokulardan parafini uzaklaştırmak gereklidir.
- Doku büyüklüğüne göre (5-8 µm kalınlığında) alınan 4-5 parafin kesit üzerine 1 ml ksilen eklenir.
- 10 saniye vortekslenir ve 2 dk 25 °C’de maksimum hızda santrifüj edilir.
- Pellete dokunulmadan yüzeyde bulunan süpernatant pipetle alınır ve atılır.
- Aynı işlem 1 ml ksilen eklenerek vorteks ve santrifüj yaparak tekrarlanır. Bu şekilde dokudan parafin uzaklaştırılmış olur.
- Tüpte kalan pellet üzerine 1 ml % 100 etanol eklenir ve 10 saniye vortekslenir. Bu aşamada eklenen etanol dokudaki ksilen kalıntılarını temizlemiş olur.
- 2 dk 25 °C maksimum hızda santrifüj edilir. Yüzeyde kalan süpernatant atılır. Kalan etanolü uzaklaştırmak üzere 10-30 dk 37°C de inkübe edilir. Bu aşamada etanolün tamamen uzaklaştırılması önemlidir. Sonuçta elde edilecek RNA miktarını ve kalitesini etkiler.

Protein ve DNA’nın Denatürasyonu ve Uzaklaştırılması

- 150-240 µl PKD Tampon eklenir ve vortekslenir.
- 10 µl Proteinaz K eklenir ve pipetaj yapılarak iyice karıştırılır.
- 56°C de 15 dakika ve hemen ardından 80°C de 15 dakika inkübe edilir. 80°C lik inkübasyonun uzun tutulması RNA fragmantasyonu artırabilir. Bu yüzden bu süreye dikkat edilmelidir.
- İnkübatörden çıkarılan materyal, dondurulmuş blok içerisinde 3 dk bekletilir ve daha sonra 15dakika 13.500 rpm (20.000xg) de santrifüj edilir.

- Yüzeyde kalan süpernatant başka bir santrifüj tüpüne alınır. Dipte kalan pellet içinde çözünmeyen doku debris ve çapraz bağlı DNA parçacıkları bulunmaktadır.
- 16 µl DNAz Booster Tampon ve 10 µl DNAaz I eklenir. (DNAaz I özellikle fiziksel denetürasyon içindir) DNAaz ve Tampon eklenmiş örnekler kısa süreli santrifüjün ardından 15 dk. oda ısısında inkübasyona bırakılır. Bu aşamada hem genomik DNA hem de formalin fiksasyonu ve uzun bekleme zamanına bağlı olarak oluşan fragmente DNA parçacıkları uzaklaştırılmış olur.
- Lizat üzerine 320 µl RBC Tampon eklenir.
- 720 µl % 100'lük etanol eklenir ve pipetaj yapılarak karıştırılır. Santrifüj yapılmaz. Etanol RNA'yı kolona uygun bağlama koşullarını elde etmek için kullanılır.

Total RNA'nın kolona bağlanması

- Örneğin 700 µl si, oluşan çöktiller da dahil olmak üzere, 2 ml'lik bir toplama tüpü içine yerleştirilmiş bir RNeasy MinElute spin kolonu içine aktarılır, 15 saniye süre ile 8000 x g(>10.000 RPM) hızda santrifüj edilir.
- Altta toplama tüpünde kalan sıvı atılır.
- Örneğin tamamı RNeasy MinElute spin kolondan geçene kadar bu aşama tekrar edilir.
- Bu aşamada Total RNA'nın kolona tutunması sağlanır.

Spin Kolon Zarına tutunmuş RNA'nın yıkanması

- RNeasy MinElute spin kolonuna 500 µl RPE Tampon eklenir. Spin kolon zarını yıkamak amacı ile 15 saniye süre ile $\geq$ 8000 x g (>10.000 rpm) hızda santrifüj edilir.
- Toplama tüpünde kalan sıvı atılır.

- RNeasy MinElute spin kolonuna 500 µl RPE Tampon eklenir. Spin kolon zarını yıkamak amacı ile 2 dakika süre ile $\approx 8000 \times g$ (>10.000 rpm) hızda santrifuj edilir.
- RNeasy MinElute spin kolonu yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirilir ve 5 dakika maksimum hızda santrifuj edilir. Bu şekilde toplama tüpüne zarda kalan tüm yıkama solüsyonları ve artıklar geçirilmiş yani zarda tutunmuş olan RNA'dan uzaklaştırılmış olur. Spin kolon zarının kurutulması, reziduel etanolün ekspresyonu bloke etmesi ihtimaline karşı önem taşımaktadır.

RNA'nın Eldesi

- Kalıntılardan yıkamalar yoluyla arındırdığımız RNeasy MinElute spin kolon yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirilir. Spin kolon zarına 14-30 µl RNAaz içermeyen su eklenir. RNA'yı ayrıştırmak üzere maksimum hızda 1 dakika süreyle santrifuj edilir.

RNA'lar filtre tüpten alınmış olur ve c-DNA sentezi yapılncaya kadar -20°C 'de saklanır.

3.7. c-DNA SENTEZİ

Parafinize dokularda bulunan RNA, formaldehit kullanımı yüzünden fragmente olabilir, ya da protein, DNA ve RNA ile kuvvetli çapraz bağlar oluşturabilir. Bu tür RNA hasarları geri dönüşüzdür ve mevcut RNA miktarını önemli ölçüde azaltabilir. Dolayısı ile daha sonra yapılacak olan RT-PCR analizinin performansını ve hassasiyetini etkileyebilir. Bu yüzden 1 ng/ml dondurulmuş doku RNA'sı veya 100 ng/ml parafinize doku, RNA konsantrasyonlarında preamplifikasyon ekspresyon çalışmasının performansını, kalitesini ve hassasiyetini önemli ölçüde artırır. Daha önce aldığımız dokulardan elde ettiğimiz RNA'lardan primer zincir komplementer DNA (first strand c-DNA) sentezi yapılması gereklidir. Bu çalışmada c-DNA sentezi ve preamplifikasyon RT² PreAMP c-DNA Sentez Kit ile yapılmıştır. Kit içeriği aşağıdaki listede bulunan kimyasallardan oluşmaktadır.

Tablo 6: c-DNA sentez kitinde bulunan solüsyon ve kimyasallar

RT2 PreAMPcDNA Sentez Kit	
GE Tampon	24 µl
5x Tampon BC3	48 µl
c-DNA Sentez Enzim Karışımı	12 µl
RNAaz İnhibitörü	12 µl
Kontrol P2	12 µl
RNAaz içermeyen Su	1 ml
RT² PreAMP PCR Karışımı	600 µl
Side Reaction Reducer	96 µl

Protokol

1. Öncelikle tüm kimyasallar homojenize olması için vortekslenir ve kısa santrifüj yapılır.
2. Genomik DNA uzaklaştırma karışımı hazırlanır.
 - Her bir RNA örneğinden PCR tüplerine aşağıda verilen ölçülerde karışım hesaplanarak hazırlanır ve 42°C’ de 5 dakika inkübe edilir ve daha sonra örnekler buz kalıbı içine alınır.

Tablo 7: Genomik DNA uzaklaştırma solusyonu karışımı için kullanılan malzemeler

	Her bir örnek için gerekli miktar
RNA	100 ng–1 µg
Tampon GE	2 µl
RNAaz içermeyen su	Değişken
Toplam hacim	10 µl

3. Revers Transkripsiyon Miksi hazırlanır.

Tablo 8: Reverse Traskripsiyon Miksi içeriğindeki malzemeler ve miktarları

Revers Transkripsiyon Miksi	1 reaksiyon	2 reaksiyon	4 reaksiyon
BC3 (5X RT Tampon 3)	4µl	8µl	16 µl
P2 (Primer ve External Kontrol Karışımı)	1µl	2µl	4 µl
c-DNA Sentez Enzim Karışımı	1µl	4µl	8 µl
RNAaz İnhibitörü	1µl		
Su	3µl	6µl	12 µl
Son Hacim	10µl	20µl	40 µl

4. Primer Zincir c-DNA Sentezi reaksiyonu

- Her 10 µl genomik DNA uzaklaştırma Karışımı içine 10 µl RT Karışımı eklenir.
- Pipetaj yapılarak karıştırılır.
- Isı döngü cihazı c-DNA sentez programında 42 °C ‘de 30 dakika, 95°C’ de 5 dk inkübe edilir.
- c-DNA sentez edilmiştir, pre-amplifikasyon protokolüne geçilebilir veya kullanılıncaya kadar -20 °C dondurucuda muhafaza edilebilir.

3.8.PRE-AMPLİFİKASYON

Pre-amplifikasyon RNA miktarı çok düşük olan lazer mikro diseksiyon yapılmış dokularda ve formalinle fikse edilmiş parafinize dokularda degrade olmadan kalan küçük RNA konsantrasyonlarında PCR öncesinde hedef bölgeye yönelik çoğaltma işlemidir. İşlem protokolü aşağıdaki basamaklardan oluşur

1. Öncelikle primer miksları, çalışılacak gen sayısına göre aşağıdaki tabloda olduğu gibi seyreltilir. Bu çalışmada kontrol geni de dahil olmak üzere toplam 5 gen (PIWIL-1, PIWIL-2, DICER-1, DDX-4 ve kontrol geni olarak bir house-keeping gen olan ACTB) çalışılacağı için 5 gene göre dilüsyon yapıldı.

Tablo 9: RT² qPCR Primer Assay karışımı

Ekspresyonu yapılacak gen sayısı	RT ² qPCR Primer Assay (10 µM)	Nükleaz içermeyen su
1 gen	1 gen x 40 µl = 40 µl	960 µl
2 gen	2gen x 40 µl = 80 µl	920 µl
3 gen	3gen x 40 µl = 120 µl	880 µl
4 gen	4 gen x 40 µl= 160 µl	840 µl
5 gen	5 genx 40 µl = 200 µl	800 µl

2. RT² PreAMP PCR Karışımı oda ısısında çözünmeye bırakılır. Vortex ve kısa santrifüj yapılır.
3. Pre-amplifikasyon karışımı aşağıdaki tabloya göre hazırlanır.

Tablo 10: Pre-amplifikasyon karışımının hazırlanması

	Her bir örnek için
RT2 PreAMP PCR Karışımı	12.5 µl
RT2 qPCRPrimerKarışımı	7.5 µl
Toplam volüm	20 µl

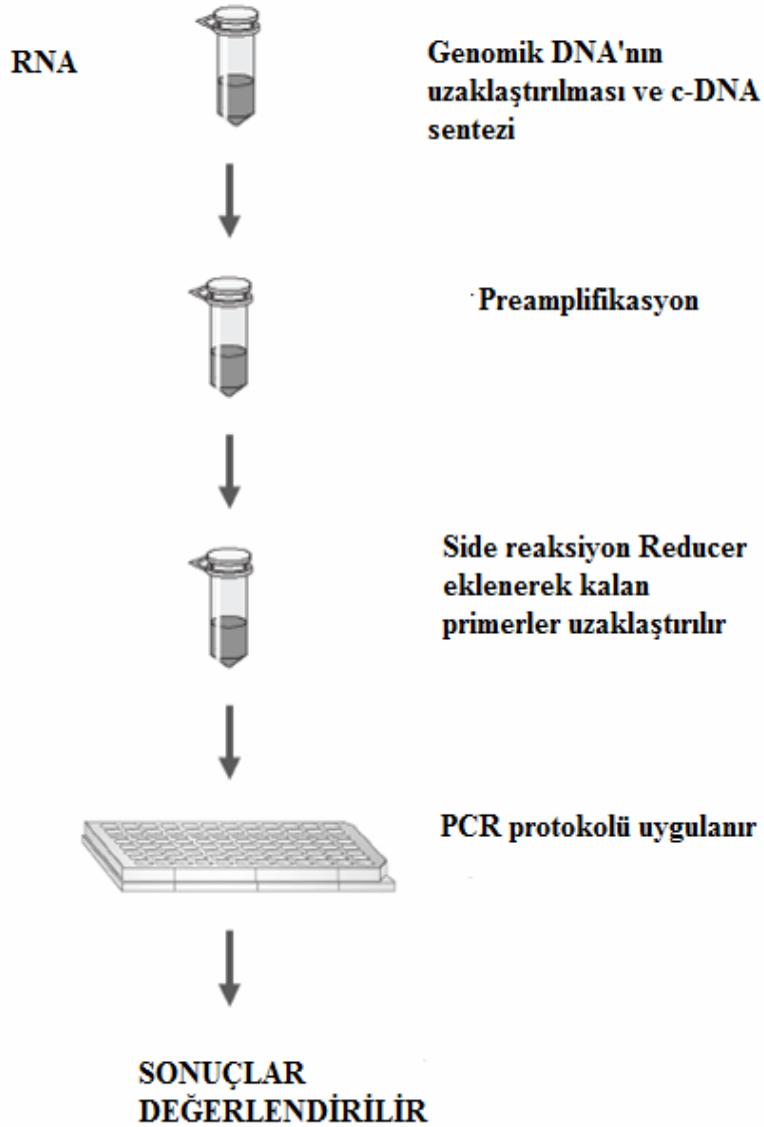
4. Daha önce elde ettiğimiz her bir c-DNA örneğinden 5µl PCR tüplerine konur.
5. Her birine 20 µl pre-amplifikasyon karışımından eklenir ve tüp tabanında hava veya baloncuk kalmamasına dikkat edilerek kısa santrifüj yapılır.
6. Isı döngü cihazında aşağıdaki protokole göre pre-amplifikasyon gerçekleştirilmiş olur.

Tablo 11: Pre-amplifikasyon için siklus sayısı ve ısı şartları

Döngü Sayısı	Süre	Isı	Yorum
1 döngü	10 min	95°C	Bu aşamada DNA Taq Polimeraz bu ısıda aktive olarak çalışmaya başlar.
8 döngü	15 s 2 min	95°C 60°C	
Saklama		4°C	

7. Döngüler bittikten sonra tüpler ısı döngü cihazından alınarak buz içine konur.
8. Kalan primerleri yok etmek için her bir tüpe 2 µl Side Reaction Reducer eklenir ve pipetaj yapılarak karıştırılır. Kısa santrifüj sonrası 37°C’ de 15 dakika ve ardından 95°C’ de 5 dakika ısı ile inaktivasyon yapılır. Bu aşamada pre-amplifikasyonda kullanılmamış olan kalan artık primerler uzaklaştırılmış olur.
9. 84 µl nükleaz içermeyen su eklenir ve karıştırılır. Real-Time PCR aşamasına geçilir ya da pre-amplifiye örnekler -20°C’ de muhafaza edilebilir.

c-DNA ve PRE-AMPLİFİKASYON PROTOKOLÜ



Şekil 7: c-DNA ve Pre-amplifikasyon Protokolü

3.9.REAL-TİME PCR PROTOKOLÜ

Real Time PCR protokolü, araştırmayı planladığımız her bir gen için ayrı ayrı uygulandı. Her seferinde araştıracağımız gene ait primerler kullanıldı. Böylece hem araştırdığımız gene ait spesifik bölge çoğaltılmış ve o dokudaki bir house-keeping gen ile ekspresyonu kıyaslanmış olur. Öte yandan araştırmada kullanılan kontrol

grubundaki (normal meme dokusu) gen ekspresyon düzeyi ile kanserli dokularda bulunan ekspresyon düzeyi de kıyaslanmış olur. Bunun için aşağıda tariflenen protokol uygulanır.

1. PCR miksi tablo 12’deki değerlere göre 5 µl’lik PCR tüplerine hazırlanır.

Tablo 12: Bir Real-Time PCR reaksiyon için gerekli karışımı içeriği ve miktarları.

KOMPONENT	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermiks	12.5 µl
Preamplifikasyon ürünü	3 µl
RT ² qPCRPrimer (10 µM)	1 µl
Nükleaz içermeyen su	10.5 µl
Toplam hacim	25 µl

2. Tablo13’da görülen PCR koşullarına göre ısı döngü cihazına PCR tüpleri yerleştirilerek PCR gerçekleştirilmiş olur.

Tablo 13: Real-Time PCR döngüleri ve ısı değerleri

Döngü Sayısı	Süre	Isı Derecesi	Açıklama
1	10 dk	95°C	Bu basamakta DNA Taq Polimeraz ısı ile aktive olmaktadır.
40	15 s	95°C	DNA zincirinin uzaması
	1 dk	60°C	Floresan ile veri toplama işlemi gerçekleştirilir.

4.BULGULAR

Çalışmaya katılan 55 olgunun, 41 tanesi patolojik raporu İnvaziv Duktal Karsinom idi. 14 olgu ise mamoplasti operasyonu yapılarak normal meme dokusu raporu almıştı (Tablo 14). İnvaziv duktal karsinoma tanısı olan dokuların preparatları incelenerek duktal karsinoma insitu alanları görülmeyen saf invaziv duktal karsinoma olanları çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan dokular total mastektomi veya lumpektomi operasyon materyalleri idi. İğne biyopsi materyalleri çalışmaya alınmadı. İnvaziv duktal karsinoma tanılı dokular gradeleri açısından değerlendirildiğinde % 51'i grade 3, % 49'sı grade 2 idi.

Tablo 14: Araştırmaya alına toplam hasta ve kontroller ile bunların %' lik dağılımları

GRUP	SIKLIK	%
Kontrol	14	25
Hasta	41	75
Toplam	55	100

Çalışmaya alınan dokular prognostik değerlendirmede kullanılan parametreler açısından da değerlendirildi. Bunlar; lenf nodu metastazı varlığı, prognozun kötü olacağını gösteren c-erbB-2 pozitifliği, hücre proliferasyonunun en önemli göstergelerinden olan ki-67 indeksi ve tümörün hormonal tedaviye cevap verip

veremeyeceğini değerlendirmede kullanılan hormon reseptör (östrojen ve progesteron reseptörü) pozitiflikleri idi.

İnvaziv duktal karsinom olguları içerisinde lenf nodu eksizyonu bulunan olgu sayısı 27 (% 65,9) idi. Bu olguların %73'ünde 1 veya daha fazla lenf nodunda metastaz bulunurken, %34,1 olguda metastatik lenf nodu mevcut değildi (Tablo 15)

Tablo 15: İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların lenf nodu metastazı durumuna göre değerlendirilmesi

Lenf Nodu Metastazı	SAYI	%
Pozitif (+)	27	65,9
Negatif (-)	14	34,1
Toplam	41	100

İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokularda iyi prognoz göstergesi olan östrojen reseptör pozitifliği oranı %70 (Tablo 17), progesteron reseptör pozitifliği oranı ise % 58'di (Tablo 16). Kötü prognostik kriterlerden c-erbB-2 tümör dokularının % 46'sında pozitif % 53'ünde ise negatifti (Tablo 18).

Tablo 16: İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların progesteron reseptörü durumuna göre değerlendirilmesi

PROGESTERON RESEPTÖRÜ	SAYI	%
Pozitif(+)	24	58,5
Negatif(-)	17	41,5
Toplam	41	100

Tablo 17: İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların östrojen reseptörü durumuna göre değerlendirilmesi

ÖSTROJEN RESEPTÖRÜ	SAYI	%
Pozitif (+)	12	70
Negatif(-)	29	29,3
Toplam	41	100

Tablo 18: İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların c-erbB-2 durumuna göre değerlendirilmesi

c-erbB-2 RESEPTÖRÜ	SAYI	%
Pozitif(+)	19	46,3
Negatif(-)	22	53,7
Toplam	41	100

Hücre proliferasyon indeksini gösteren ki-67 ise olguların % 95 gibi oldukça yüksek bir bölümünde pozitif (Tablo 19). Bu da aldığımız tümör dokularında hücre proliferasyonunun hızlı bir şekilde devam ettiğinin kanıtıdır.

Tablo 19: İnvaziv duktal karsinoma tanısı alan dokuların ki-67 durumuna göre değerlendirilmesi

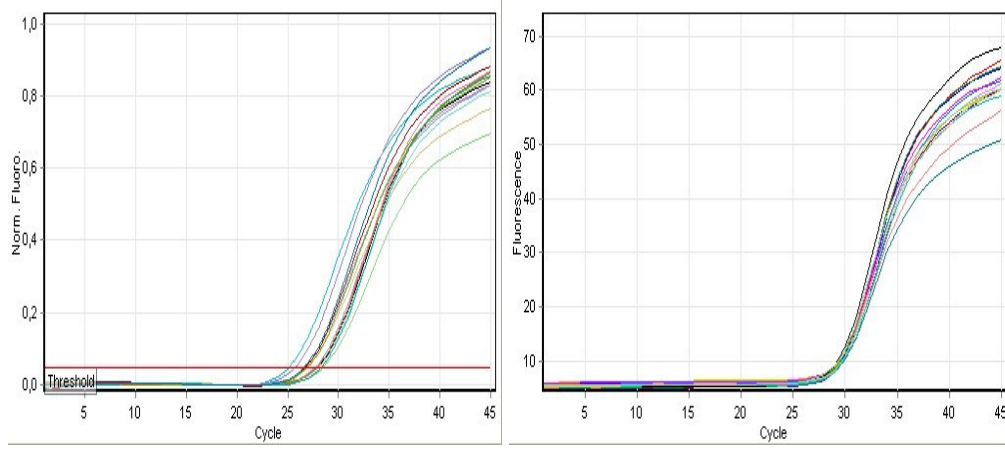
ki-67 indeksi	SAYI	%
Pozitif(+)	39	95,1
Negatif(-)	2	4,9
Toplam	41	100

Tablo 20’de, kullanılan primerler ve genler ile hasta ve kontrol grubundan elde edilen Ct değerleri görülmektedir.

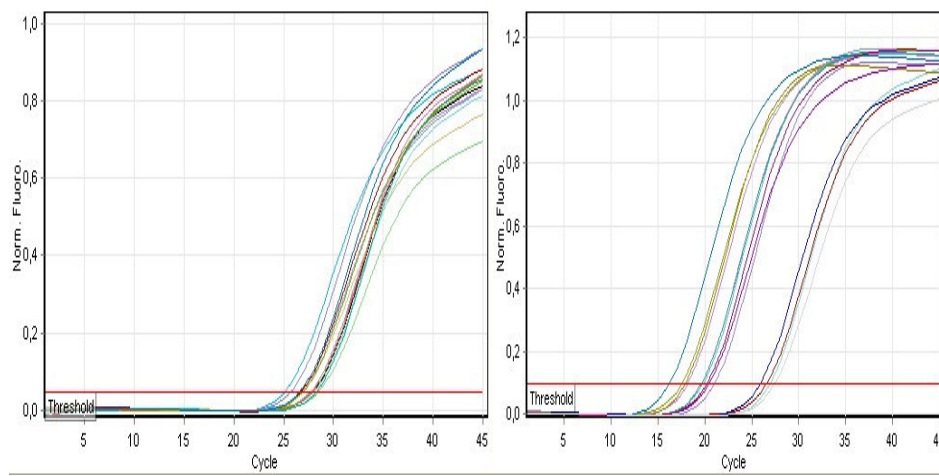
Tablo 20: İDK dokularının genlere göre ekspresyon cT değerleri

<i>Araştırma Grubu</i>	DDX4	DICER1	PIWIL1	PIWIL2	ACTB
	28,14	19,3	24,9	27,83	15,6
		23,1	31,63	32,1	22,5
	30,58	20,95	26,9	26,99	18,36
		24,52	28,47		20,4
	30,14	20,95	27,11	27,26	17,4
		21,65	29,52	31,24	18,94
		22,11	29,04	31,24	18,89
		30,86	33,1		26,81
	35,77	23,62	28,84	38,86	20,24
	29,1	19,98	26,39	28,24	15,98
	34,4	28,8	32,26		27,32
	32,72	30,07	31,6		28
	28,16	27,18	23,64	27,01	29,13
	22,83	20,78	19,82	21,45	23,17
	27,51	27,11	23,54	26,99	28,96
	27,85	27,48	23,3	27,13	29
	28,13	25,92	23,83	27,48	22,45
	28,41	27,96	23,77	27,13	28,71
		27,83	29,26	36,12	28,96
	29,28	26,08	26,05	28,84	28,84
			32,33		
	25,64	22,31	20,64	22,86	25,25
		25,74	40,28	30,3	24,06
		26,94	32,13		26
		28,8	31,9		28,43
		30,35	30,92	32,37	29,1
	21,28	19,51	19,71	21,51	18,52
		28,58	33,04		28,48

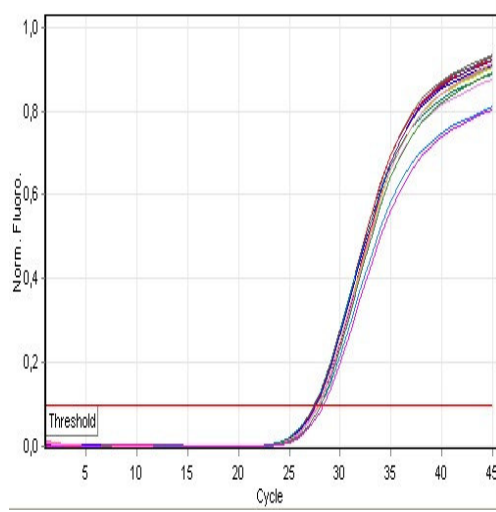
		27,54	32,74		27,2
			33,84	38,81	33,85
				42,21	39,08
	31,74	28,64	26,59	30,98	29,5
		29,54	33,44		27,98
		32,92	33,72	33,56	31,18
	26,58	25,32	22,54	25,12	26,68
	32,58	27,16	28,63	33,07	26
			33,04	30,94	29,37
	27,65	25,09	23,84	29,44	26,04
		22,16	28,06	30	19,39
Kontrol grubu	DDX4	DICER1	PIWIL1	PIWIL2	ACTB
	29,34	27,02	23,96	28,7	26,04
	27,24	19,87	23,49	27,15	17,88
	29,38	21,05	24,03	28,71	19,79
	27,66	18,19	23,59	24,95	16,19
	28,21	19,7	23,05	26,2	17,73
	28,82	26,66	23,87	28,29	25,69
	26,77	17,93	23,35	24,42	15,32
	26,98	17,6	22,98	24,61	16,19
	28,67	19,71	23,56	25,62	18,45
	25,59	16,26	22,37	23,44	14,76
	29,18	25,96	23,71	28,8	25,94
	28,8	20,48	23,19	26,89	19,22
	28,55	20,28	23,19	25,84	19,19
	29,59	27,48	23,87	28,68	28,25



Şekil 8: ACTB ve PIWIL-2 genlerine ait ekspresyon eğrileri



Şekil 9: PIWIL-1 ve DICER-1 genlerine ait ekspresyon eğrileri



Şekil 10: DDX-4 genine ait ekspresyon eğrisi

4.1.GRUPLAR ARASI İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmamızda memenin invaziv duktal karsinoma hastalığında moleküler patogenezin aydınlatılmasına katkısı olması amacı ile 4 gendeki (PIWIL-2, PIWIL-1, DICER-1 ve DDX-4) ekspresyon düzeyi farklılıklarını bir house keeping gen olan ACTB geni ile ve kontrol grubu olarak da normal meme dokularını kullanarak karşılaştırdık. Ct (cycle threshold) değeri PCR sırasında florwsan sinyallerin görüldüğü eşik değerini ifade eder. Bu değer ne kadar küçükse genin ekspresyon (ifade) olma oranı o kadar yüksektir. Bu çalışmada araştırılan PIWIL-2, PIWIL-1, DICER-1 ve DDX-4 genleri ile bu genlerin kontrol gruplarına göre Man Whitney –U Testi kullanılarak yapılan istatistik sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 21: Araştırılan genlerin ortalama Ct değerleri ve standart deviasyonu

		AVG Ct		Standard Deviasyon	
Pozisyon	Gen	IDK grubu	Kontrol Grup	IDK grubu	Kontrol Grup
A01	DDX4	30,4	28,2	3,239208	1,184222
A02	DICER1	25,24	21,3	3,338477	3,826878
A03	PIWIL1	27,47	23,44	4,080582	0,459274
A04	PIWIL2	29,59	26,59	3,51102	1,847849
A05	ACTB	24,41	20,05	4,528655	4,505767

Tablo 22: Araştırılan genlerin Ortalama Delta-Ct değerleri ve standart deviasyonu

		AVG Delta(Ct) (Ct(GOI) - Ave Ct(HKG))		Standard Deviasyon	
Pozisyon	Gen	IDK grubu	Kontrol Grup	IDK grubu	Kontrol Grup
A01	DDX4	5,995152	8,152857	5,242976	3,63775
A02	DICER1	0,836061	1,253571	2,133982	0,847463
A03	PIWIL1	3,063333	3,397857	5,615143	4,197456
A04	PIWIL2	5,182727	6,547143	5,031562	3,032844
A05	ACTB	0	0	0	0

5.TARTIŞMA

Günümüzde oldukça gelişmiş olan tanı ve tedavi olanaklarına rağmen meme kanserinin insidans ve mortalite hızlarının artarak devam ediyor olması dikkate değer noktadır. Tüm tanı ve tedavi çabalarına rağmen yaşam oranlarında çok az olumlu gelişme sağlanabilmiştir. Bu bize kanseri anlama ve kanserle savaşmada yetersiz kalındığını ve paradigmatik bir değişimin zorunlu olduğunu hissettirmektedir. Moleküler genetik çalışmalar kanseri, kanserin moleküler mekanizmasını, hücre içi ve arası iletişim sinyalleri, yolaklarının ve daha da önemlisi DNA'nın nasıl kullanıldığını anlamamıza yardımcı olacaktır.

Çalışmamızda kullanılan PIWIL-1, PIWIL-2, DICER-1 ve DDX-4 genlerinin IDKD' da ekspresyon düzeyleri bireylerarasında kıyaslandığında çok ciddi farklılıklar göstermiştir. Buradan şöyle bir yargıya ulaşabiliriz. Her kanser dokusu fonksiyonel ve genetik açıdan birbirinden çok farklı özellikler sergiler. Ayrıca bu ekspresyonları, birbirinden bağımsız kişilere ait bu kanser dokularını ve belki de hastanın fizyolojik durumunu etkileyen değerlendirmeye alamadığımız pek çok etken bulunmaktadır. Bu farklılıklar sebebiyle ekspresyon düzeyleri ile lenf nodu metastazı, ki-67, ER ve PR, c-erbB-2 (+)' liği arasındaki korelasyon istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Normal ve invaziv duktal karsinomali dokularda ekspresyon düzeylerini kıyasladığımız Delta-Delta Ct yöntemine göre Tablo 23'de görüldüğü üzere araştırmaya aldığımız tüm genlerde ekspresyon düzeyi normal meme dokularına göre IDKD dokularında artmıştır. Bu durum istatistiksel olarak Mann Whitney-U testi ile

değerlendirildiğinde elde ettiğimiz p değerlerine baktığımızda DDX-4 ve PIWIL-2’deki artış oranının istatistiksel olarak anlam ifade ettiğini ($p<0.05$), PIWIL-1 genindeki ekspresyon oranındaki artışın tam sınırdaki olduğunu ve belki de anlamlı sayabilmek için araştırma grubundaki doku sayılarının artırılması gerektiğini, DICER-1 genindeki ekspresyon artışının ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığını söyleyebiliriz (Tablo 24).

Tablo 23: Araştırılan genlerin Delta-Delta Ct değerleri ve standart deviasyon

		$2^{(-Avg.(Delta(Ct))}$	
Pozisyon	Gen	IDK grubu	Kontrol Grup
A01	DDX4	0,015678	0,003514
A02	DICER1	0,560171	0,419409
A03	PIWIL1	0,119631	0,094873
A04	PIWIL2	0,027532	0,010693
A05	ACTB	1	1

Tablo 24: Man Whitney-U Testine göre genler arası istatistiksel sonuçlar, p değerleri

		p-değeri (kontrol grubu ile kıyaslandığında)
Pozisyon	Gen Adı	
A01	DDX4	0,027
A02	DICER1	0,657
A03	PIWIL1	0,073
A04	PIWIL2	0,039
A05	ACTB	0

Oh ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kolorektal kanserlerde PIWIL-2 ekspresyonunun normal dokuya göre yüksek olduğunu ve bunu da prognoz ile kıyasladıklarında prognozu önemli ölçüde kötüleştirdiğini tespit ettiler [72].

Li ve arkadaşlarının yine kolorektal kanserlerde yaptığı çalışmada PIWIL 2 ekspresyonunun 5 yıllık sağ kalımı olumsuz yönde etkilediği ve metastaz oranını artırdığını tespit ettiler [73].

Greither ve arkadaşlarının Piwi proteinleri ile ilgili yaptığı çalışmada yumuşak doku tümörlerinde PIWIL-2 ve PIWIL-4 mRNA düzeylerinin kadın hastalarda anlamlı derecede artarken erkek hastalarda anlamsız olduğunu, ve PIWIL-2 ve PIWIL-3 artışının kötü sağ kalım ile ilişkili olduğunu tespit ettiler [74].

Wang ve arkadaşları yaptıkları insan gastrik kanser ile ilgili yaptıkları çalışmada PIWIL1-4 ekspresyonlarının tümörlü dokularda çevre dokularla kıyaslandığında önemli oranda arttığını tespit ettiler. Ayrıca artmış PIWIL-1 ve PIWIL-2 ekspresyonlarının düşük ekspresyon olan grupla kıyaslandığında kötü prognozla korele olduğunu gösterdiler [75].

Yin ve arkadaşları ise papiller tiroid kanserlerinde, PIWIL-2 ekspresyon artışının invazyon ve metastaz ile korele olduğunu gösterdiler [76].

Nickpour ve arkadaşlarının mesane kanserlerinde yaptığı çalışmada ise PIWIL-2 ekspresyonunu bütün hücre serilerinde testis dokusundaki miktarına göre en az 240 kat daha düşük buldular. PIWIL-2 ekspresyonun çoğu dokuda bu oranda düşük olması bu genin ilerleyen dönemlerde bir tümör belirteci gibi düşünülmesini sağlayabilir. Bununla birlikte aynı araştırmacılar PIWIL-2'nin mesane kanserlerinde karsinogeneze herhangi bir rolü olmadığını gösterdiler [77].

Lee ve arkadaşları PIWIL-2'nin tümörlerde ekspresyonu olan ve STAT3-BCL-XL yolağını aktive ederek apoptozisi inhibe ettiğini tespit ettiler [53].

Bizim çalışmamızda ise memenin IDKD'da PIWIL-2 gen ekspresyonu normal dokulara göre beklediğimiz gibi anlamlı şekilde yüksek bulundu. PIWIL-1 ekspresyonu ise sınırda anlamlı bulundu. Bunun istatistiksel olarak sayı azlığına bağlı olacağı düşünülebilir. PIWIL-2 normal dokularda testis dokusu dışında ekspresyonu olmayan bir gen olması sebebiyle ile PIWIL-2'nin ekspresyonunun

herhangi bir şekilde gözlemlenmesi o dokuda veya vücudun herhangi bir yerinde bir kanser hücre varlığını düşündürebilir. Bu PIWIL-2'nin gelecekte bir “tümör belirteci” gibi kullanılabilmesine olanak sağlayabilir.

DDX-4 geni ile ilgili herhangi bir kanser çalışmasına literatürde rastlayamadık. Sadece 2002 yılında yapılan bir çalışmada üreme organı tümörlerinde maligniteyi belirleyebilecek bir marker olabileceği ile ilgili bir yayın bulunmaktadır [78]. Bu gen daha çok germ hücrelerinin gelişiminde ve fonksiyonlarını sürdürebilmesinde etkilidir [79]. DDX-4'ün normal dokularda ekspresyonu olmayışı, yalnızca testiste ekspresyonu bulunuşu PIWIL-2 ile benzerlikleri bulunması nedeniyle çalışmamıza dahil ettiğimiz DDX-4 tablodan da anlaşılacağı üzere DICER-1, PIWIL-1 ile direk etkileşime girerek (www.genemania.org) PIWIL-2 ile ilgili çalışmamıza bir şekilde katkıda bulunmaktadır. Bizim çalışmamız bu genin PIWIL-2 üzerine pozitif etki yaparak farklılaşma aşamasında birlikte çalıştıklarını düşündürebilir. Diğer taraftan normal dokuda ekspresyonlarının gözlenmemesi her iki genin de kanser dokusunda benzer şekilde artan ekspresyonlarının gözlenmesi bu hipotezimizi destekler niteliktedir. PIWIL-2 gibi bu gen de hücre proliferasyonunun ve onkogenizin gözlenmesinde bir markır olabilir.

DICER-1 miRNA'ların oluşumunda ve maturasyonunda görevli bir gendir. Çalışmamıza başlarken bu genin ekspresyonunu da IDKD'da NMD'ya göre artmasını bekliyorduk. Çünkü miRNA'ların kanser patogenezinde önemli bir rolü olduğu gerçeği inkar edilemezdi. Biz çalışmamızda DICER-1 geninin ekspresyonunda normal kişilere göre IDKD'da istatistiksel bir fark bulamadık. Araştırmamız derinleştikçe bunun normal bir bulgu olabileceğini düşündük. Çünkü DICER-1 yalnızca karsinogenez değil yüzlerce farklı mekanizmada görevli miRNA'ların oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Dolayısı ile global olarak hücrede bu genin ekspresyon farklanmasından daha çok bu genin yapmış olduğu spesifik miRNA'ların varlığı ve meme kanserindeki ilişkileri ayrı bir çalışma konusu olarak planlanmalıdır.

DNA teknolojisindeki ilerlemeler ve insan genom dizisinin belirlenmesi sayesinde kanserle ilgili bilginizde son 5 yılda dramatik olarak artmıştır.

Moleküler tıpta devam eden devrimsel gelişme, kanseri moleküler düzeyde anlama çalışmalarını öne çıkarmıştır. Genin keşfi ile başlayan bu süreç, daha önceden bilinmeyen genlerin ve gen dizimlerinin ortaya çıkartılmasıyla devam etmiş, günümüzde ise yeni bir boyuta taşınarak proteinlerin fonksiyonları ve protein-protein ilişkilerinin anlaşılması ve hücrelerin nasıl farklılaştıkları, sağlıklı hücrelerin nasıl sağlıklı kaldığı, nasıl bölünmesini ve farklılaşmasını kontrol ettiği soruları yanıt beklemektedir. Geliştirilen yeni genetik yaklaşımlar ile bugün bir insanın bütün genomu kısa sürede çözülmekte, mikroarray teknikleri ile de binlerce genin ekspresyonları belirlenebilmektedir. Ama zor olan genlerin birbirleri ile nasıl çalıştığının anlaşılmasıdır.

Genomik bilginin onkoloji alanında farklı tümör örneklerinin, normal doku örnekleri ve birbirleri ile genomik ve transkriptomik seviyede karşılaştırılmaları sonucunda tümörögenizde rol oynayan genlerin tanımlanması mümkün olmaktadır. Bu tip çalışmalardan elde edilen veriler; tümörlerin alt gruplara ayrılmasını ve kişiselleştirilmiş tedavi seçeneklerini olanaklı hale getirecektir.

Bu çalışmada PIWIL-1, PIWIL-2, DICER-1 ve DDX-4 genlerinin meme kanserinde nasıl bir ekip oluşturdukları anlaşılmaya çalışılmıştır. Bizim bulgularımıza göre özetle;

1. Bu genlerden, PIWIL-2 ve DDX-4'ün normal meme dokusunda ekspresyonları yok ya da çok az iken kanserli meme dokusunda ekspresyonları artmıştır. PIWIL-2 ve DDX-4 birbirleri ile paralel yönde çalışmaktadır. Biri artarken diğeri de artmasına rağmen DICER-1' deki artış gruplar arasında anlamlı düzeyde bulunamamıştır. PIWIL-2 ve DDX-4'ün normal dokuda görülmeyen ekspresyonunun meme kanserinde artan oranda ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde gözlenmesi sonucunun bu iki genin meme kanserinin teşhis ve tedavisinde ve tedavi sonrası hastalığın takibinde bir markır olarak kullanılabileceği kanısındayız.
2. DICER-1'in ekspresyonunun normal ve IDKD değişmemesi konusunda; Genin ekspresyonunun değil yapımında görev aldığı miRNA'ların araştırılması gerektiği kanısındayız.

3. Genomik devrim öncesine kadar, tümör iki kritere göre sınıflandırılırdı; lokalizasyon (tümörün ortaya çıktığı alan) ve tümörün görünümü (histolojik yapısı). Bu iki kriter prognozun belirlenmesinde ve en iyi tedavi şeklinin oluşturulmasında günümüzde de hala kullanılmaktadır. Oysa, histolojik olarak benzer tümörlerin klinik olarak farklı sonuçlar doğurduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir. Bu bilgilere ilaveten genetik lezyon varlığının major kriter olduğu yeni tümör taksonomisi, genom temelli bilgi sayesinde daha iyi teşhis olanağı sağlayacak ve kişiye özgü tedavi planlamasını mümkün kılacaktır. Gen ekspresyon profillerinin analizi teşhis ve tedavide sağladığı fayda nedeniyle diğer iki kriterin yanında daha ayırt edici bir kriter olarak genler ekspresyonları ve proteinleri de yeni sınıflandırmada yer alacaktır.

Bu sonuçlar meme kanserinin moleküler patogeneze ışık tutmada yardımcı olacak ve belki de ilerleyen süreçte bu genlerden bir veya bir kaçını İnvaziv Duktal Karsinoma tanısında henüz onkogeneze olmadan önce belirlenebilen moleküler belirteçler olarak kullanılabilecektir.

6.KAYNAKLAR

1. Harold J, Jay RH, Monica M: **Cancer; Principles & Practice of Oncology**, vol. two. Philadelphia; 2008.
2. DiSaia P, Creasman WT: **Clinical Gynecologic Oncology**; 2007.
3. Kirby IB, Coppeland EM (eds.): **Breast**. New York: Mc Graw Hill 1994.
4. Haagensen CD (ed.): **The normal physiology of the breast**, 3 edn. Philadelphia: W.B.Saunders 1986.
5. Rosenbloom AL (ed.): **Breast physiology: Normal and abnormal development and function.** , 2 edn: W.B.Saunders; 1988.
6. Haagensen CD (ed.): **Physicians role in detection and diagnosis of breast disease.** , 3. edn. Philadelphia, London: W.B. Saunders; 1986.
7. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL (eds.): **BreastCancer**, 16 edn. New York: TheMcGraw-HillCompanies; 2005.
8. DeVita V, Lawrence T, Rosenberg CPoS (eds.): **Cancer of TheBreast** 7edn.
9. Colditz GA, Hankinson SE: **The Nurses' Health Study: lifestyle and health among women.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(5):388-396.
10. Fackenthal JD, Marsh DJ, Richardson AL, Cummings SA, Eng C, Robinson BG, Olopade OI: **Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations.** *J Med Genet* 2001, **38**(3):159-164.

11. Melbye M, Wohlfahrt J, Olsen JH, Frisch M, Westergaard T, Helweg-Larsen K, Andersen PK: **Induced abortion and the risk of breast cancer.** *N Engl J Med* 1997, **336**(2):81-85.
12. Grabrick DM, Hartmann LC, Cerhan JR, Vierkant RA, Therneau TM, Vachon CM, Olson JE, Couch FJ, Anderson KE, Pankratz VS *et al*: **Risk of breast cancer with oral contraceptive use in women with a family history of breast cancer.** *JAMA* 2000, **284**(14):1791-1798.
13. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M: **Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer.** *Lancet* 1998, **351**(9113):1393-1396.
14. Jasienska G, Thune I: **Lifestyle, hormones, and risk of breast cancer.** *BMJ* 2001, **322**(7286):586-587.
15. Evans JS, Wennberg JE, McNeil BJ: **The influence of diagnostic radiography on the incidence of breast cancer and leukemia.** *N Engl J Med* 1986, **315**(13):810-815.
16. Bhatia S, Yasui Y, Robison LL, Birch JM, Bogue MK, Diller L, DeLaat C, Fossati-Bellani F, Morgan E, Oberlin O *et al*: **High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group.** *J Clin Oncol* 2003, **21**(23):4386-4394.
17. Page DL, Salhany KE, Jensen RA, Dupont WD: **Subsequent breast carcinoma risk after biopsy with atypia in a breast papilloma.** *Cancer* 1996, **78**(2):258-266.
18. Vistad I, Kristensen GB, Fossa SD, Dahl AA, Morkrid L: **Intestinal malabsorption in long-term survivors of cervical cancer treated with radiotherapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009, **73**(4):1141-1147.
19. Doğan AL, Güç D: **Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser.** *HacettepeTıp Dergisi* 2004, **35**:34-42.

20. Wooster R, Weber BL: **Breast and ovarian cancer**. *N Engl J Med* 2003, **348**(23):2339-2347.
21. Iau PT, Macmillan RD, Blamey RW: **Germ line mutations associated with breast cancer susceptibility**. *Eur J Cancer* 2001, **37**(3):300-321.
22. Wu J, Lu LY, Yu X: **The role of BRCA1 in DNA damage response**. *Protein Cell* 2010, **1**(2):117-123.
23. Borg A, Isola J, Chen J, Rubio C, Johansson U, Werelius B, Lindblom A: **Germline BRCA1 and HMLH1 mutations in a family with male and female breast carcinoma**. *Int J Cancer* 2000, **85**(6):796-800.
24. Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S: **Epigenetics in breast cancer: what's new?** *Breast Cancer Res* 2011, **13**(6):225.
25. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA: **DNA methylation and breast cancer**. *Biochem Pharmacol* 2004, **68**(6):1187-1197.
26. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, Khaled H, Liu MC, Martin M, Namer M *et al*: **The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival**. *Clin Breast Cancer* 2005, **6**(5):391-401.
27. istatistikleri hsgtTb-d-v-tkhvk: **Dünya ve Türkiye'de kanser- Kanser istatistikleri**. In.; 2013.
28. Siegel R, Naishadham D, Jemal A: **Cancer statistics, 2012**. *CA Cancer J Clin* 2012, **62**(1):10-29.
29. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ: **Cancer statistics, 2007**. *CA Cancer J Clin* 2007, **57**(1):43-66.
30. Glass AG, Lacey JV, Jr., Carreon JD, Hoover RN: **Breast cancer incidence, 1980-2006: combined roles of menopausal hormone therapy, screening mammography, and estrogen receptor status**. *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**(15):1152-1161.

31. 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.** *N Engl J Med* 2007, **356**(16):1670-1674.
32. Vogelstein B, Kinzler KW: **Cancer genes and the pathways they control.** *Nat Med* 2004, **10**(8):789-799.
33. Kinzler KW, Vogelstein B: **Lessons from hereditary colorectal cancer.** *Cell* 1996, **87**(2):159-170.
34. **Finishing the euchromatic sequence of the human genome.** *Nature* 2004, **431**(7011):931-945.
35. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, Varela I, Lin ML, Ordonez GR, Bignell GR *et al*: **A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome.** *Nature* 2010, **463**(7278):191-196.
36. Meyerson M, Gabriel S, Getz G: **Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**(10):685-696.
37. Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, Varambally S, Mehra R, Perner S, Demichelis F, Helgeson BE, Laxman B, Morris DS *et al*: **The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers.** *Cancer Cell* 2008, **13**(6):519-528.
38. Bleeker FE, Bardelli A: **Genomic landscapes of cancers: prospects for targeted therapies.** *Pharmacogenomics* 2007, **8**(12):1629-1633.
39. Bell DW: **Our changing view of the genomic landscape of cancer.** *J Pathol* 2010, **220**(2):231-243.
40. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J *et al*: **The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers.** *Science* 2007, **318**(5853):1108-1113.

41. Olopade OI, Grushko TA, Nanda R, Huo D: **Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(24):7988-7999.
42. Turnbull C, Rahman N: **Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008, **9**:321-345.
43. Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, Dawson E, Kok C, Clements J, Menzies A, Teague JW, Futreal PA, Stratton MR: **The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC).** *Curr Protoc Hum Genet* 2008, **Chapter 10**:Unit 10 11.
44. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA: **The cancer genome.** *Nature* 2009, **458**(7239):719-724.
45. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA *et al*: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**(6797):747-752.
46. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS *et al*: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(19):10869-10874.
47. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT *et al*: **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature* 2002, **415**(6871):530-536.
48. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ *et al*: **A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.** *N Engl J Med* 2002, **347**(25):1999-2009.
49. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T *et al*: **A multigene assay to predict recurrence of**

tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004, **351**(27):2817-2826.

50. Lee JH, Jung C, Javadian-Elyaderani P, Schweyer S, Schutte D, Shoukier M, Karimi-Busheri F, Weinfeld M, Rasouli-Nia A, Hengstler JG *et al*: **Pathways of proliferation and antiapoptosis driven in breast cancer stem cells by stem cell protein PIWIL-2.** *Cancer Res* 2010, **70**(11):4569-4579.
51. Liu JJ, Shen R, Chen L, Ye Y, He G, Hua K, Jarjoura D, Nakano T, Ramesh GK, Shapiro CL *et al*: **PIWIL-2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker.** *Int J Clin Exp Pathol* 2010, **3**(4):328-337.
52. Ye Y, Yin DT, Chen L, Zhou Q, Shen R, He G, Yan Q, Tong Z, Issekutz AC, Shapiro CL *et al*: **Identification of PIWIL-2-like (PL2L) proteins that promote tumorigenesis.** *PLoS One* 2010, **5**(10):e13406.
53. Lee JH, Schutte D, Wulf G, Fuzesi L, Radzun HJ, Schweyer S, Engel W, Nayernia K: **Stem-cell protein PIWIL-2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**(2):201-211.
54. Hock J, Meister G: **The Argonaute protein family.** *Genome Biol* 2008, **9**(2):210.
55. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG: **Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases.** *J Mol Biol* 1971, **56**(2):341-361.
56. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 1988, **239**(4839):487-491.
57. Zimmermann P, Thordsen I, Frangoulidis D, Meyer H: **Real-time PCR assay for the detection of tanapox virus and yaba-like disease virus.** *J Virol Methods* 2005, **130**(1-2):149-153.

58. Günel T, Aydın K: **Hibridizasyon problemleri** *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2009, **2**(2):43-45.
59. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology (N Y)* 1993, **11**(9):1026-1030.
60. Edwards KJ, Saunders NA: **Real-time PCR used to measure stress-induced changes in the expression of the genes of the alginate pathway of *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Appl Microbiol* 2001, **91**(1):29-37.
61. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS: **Real-time multiplex PCR assays.** *methods* 2001, **25**(4):430-442.
62. Klein D: **Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations.** *Trends Mol Med* 2002, **8**(6):257-260.
63. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: **Real time quantitative PCR.** *Genome Res* 1996, **6**(10):986-994.
64. Grove DS: **Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector.** *J Biomol Tech* 1999, **10**(1):11-16.
65. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K: **Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.** *PCR Methods Appl* 1995, **4**(6):357-362.
66. Tichopad A, Didier A, Pfaffl MW: **Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants.** *Mol Cell Probes* 2004, **18**(1):45-50.
67. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
68. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C: **An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression.** *methods* 2001, **25**(386):386-401.

69. Brechtbuehl K, Whalley SA, Dusheiko GM, Saunders NA: **A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus.** *J Virol Methods* 2001, **93**(1-2):105-113.
70. Edwards KJ, Kaufmann ME, Saunders NA: **Rapid and accurate identification of coagulase-negative staphylococci by real-time PCR.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(9):3047-3051.
71. Whalley SA, Brown D, Teo CG, Dusheiko GM, Saunders NA: **Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the LightCycler.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(4):1456-1459.
72. Oh SJ, Kim SM, Kim YO, Chang HK: **Clinicopathologic Implications of PIWIL-2 Expression in Colorectal Cancer.** *Korean J Pathol* 2012, **46**(4):318-323.
73. Li D, Sun X, Yan D, Huang J, Luo Q, Tang H, Peng Z: **PIWIL-2 modulates the proliferation and metastasis of colon cancer via regulation of matrix metalloproteinase 9 transcriptional activity.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2012, **237**(10):1231-1240.
74. Greither T, Koser F, Kappler M, Bache M, Lautenschlager C, Gobel S, Holzhausen HJ, Wach S, Wurl P, Taubert H: **Expression of human Piwi-like genes is associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients.** *BMC Cancer* 2012, **12**:272.
75. Wang Y, Liu Y, Shen X, Zhang X, Chen X, Yang C, Gao H: **The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer.** *Int J Clin Exp Pathol* 2012, **5**(4):315-325.
76. Yin DT, Li HQ, Wang YF, Cao SL, Zhou YB, Zheng LY, Jiang JH, Wang QD: **[Expression of PIWIL-2 and its relationship with tumor invasion and metastasis in papillary thyroid carcinoma].** *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2011, **46**(3):237-239.

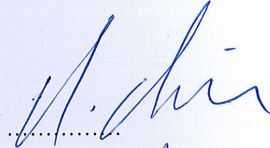
77. Nikpour P, Forouzandeh-Moghaddam M, Ziaee SA, Dokun OY, Schulz WA, Mowla SJ: **Absence of PIWIL-2 (HILI) expression in human bladder cancer cell lines and tissues.** *Cancer Epidemiol* 2009, **33**(3-4):271-275.
78. Zeeman AM, Stoop H, Boter M, Gillis AJ, Castrillon DH, Oosterhuis JW, Looijenga LH: **VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells.** *Lab Invest* 2002, **82**(2):159-166.
79. Okamura D, Maeda I, Taniguchi H, Tokitake Y, Ikeda M, Ozato K, Mise N, Abe K, Noce T, Izpisua Belmonte JC *et al*: **Cell cycle gene-specific control of transcription has a critical role in proliferation of primordial germ cells.** *Genes Dev* 2012, **26**(22):2477-2482.

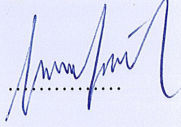
T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

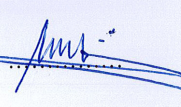
Dr. Sevdâ Yeşim ÖZDEMİR'e ait "MEME KANSERİNDE PIWIL-1 PIWIL-2, DICER-1, VE DDX-4 GEN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI"

adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : / / 2013

Başkan : Prof Dr. Munis Döndar 

Üye : Prof Dr. Yusuf Özkul. 

Üye : Doç Dr. Gökçe Saatçı 

Üye :

Üye :