

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**MEME KANSERİNDE MGMT VE P16INK4A (CDKN2A)
GENLERİNİN METİLASYONLARININ METİLASYON
SPESİFİK PCR (MSP) YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Mustafa YILDIZ

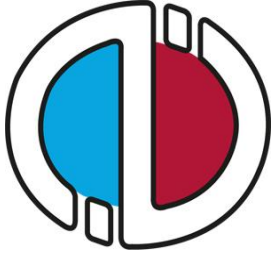
Yüksek Lisans

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU

BİLECİK, 2014

Referans No:10041629



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**MEME KANSERİNDE MGMT VE P16INK4A (CDKN2A)
GENLERİNİN METİLASYONLARININ METİLASYON
SPESİFİK PCR (MSP) YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Mustafa YILDIZ

Yüksek Lisans

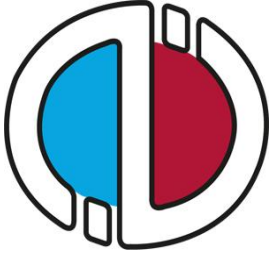
Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU

BİLECİK, 2014

Referans No: 10041629

Proje No: 2012-01-BİL.04-01



ANADOLU UNIVERSITY



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

Graduate School of Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

**METHYLATION OF MGMT AND P16INK4A (CDKN2A)
GENES WHICH ARE ASSOCIATED WITH BREAST
CANCER WERE INVESTIGATED BY TECHNIQUE OF
METHYLATION-SPECIFIC PCR (MSP).**

Mustafa YILDIZ

Graduate

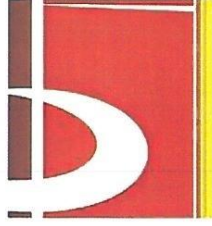
Supervisor

Assist. Prof. Dr. Onur EROĞLU

BİLECİK, 2014

Referans No: 10041629

Proje No: 2012-01-BİL.04-01

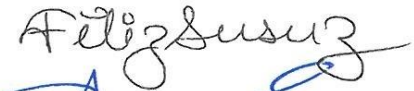
 BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	YÜKSEK LİSANS <u>JÜRİ ONAY FORMU</u>
--	--

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nuntarih ve sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafındantarihinde tez savunma sınavı yapılan Mustafa YILDIZ' ın "Meme Kanseri MGMT ve P16INK4A (CDKN2A) Genlerinin Metilasyonlarının Metilasyon Spesifik PCR (MSP) Yöntemiyle Belirlenmesi" başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

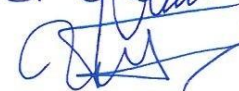
ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU 

ÜYE: Doç. Dr. Filiz Abıyıcı 

ÜYE: Doç. Dr. Elhan Dorcaç 

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Sema LEBLEBİCİ 

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Tuba YAĞCI 

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında çalışmamın her aşamasında bilimsel bakış açısıyla bana yol gösteren, fikirler veren ve destekleyen, beni yönlendiren, pozitif düşüncelerle ilerlememi sağlayan, destek ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU' na en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışmada kullanmak için klinik verilerin sağlanmasında tümörlü ve sağlıklı meme dokusu elde edilmesini sağlayan İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'ne, taze doku örneklerinin tespit edilip elde edilmesi ve hazırlanması için gösterdikleri gayretler nedeniyle Uzm. Dr. Ali MUHAMMEDOĞLU' na ve Asist. Dr. Gonca KAVŞUT' a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgileriyle bize ışık tutan hocalarım Sayın Yrd. Doç Dr. İsmail POYRAZ' a, Yrd. Doç. Dr. Aslıhan ÖRS GEVREKÇİ' ye ve Yrd. Doç. Dr. Dilek ÜNAL' a, yüksek lisans dönem arkadaşlarım İsmail GÜNGÖR' e ve Gülseren ŞEN' e teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her evresinde bana maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, sevgileri ile bana hep güç veren ve iyi kötü günlerimde her zaman yanımda olan çok değerli annem ve babama, attığım her adımda bana destek ve yardımcı olan, varlığıyla hayatıma en değerli anlamları katan, beni hep mutlu eden canım eşime canı gönülden sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Mustafa YILDIZ

Mayıs, 2014

ÖZET

Amaç: Bireysel tedavi yöntemlerinin giderek ön plana çıktığı yeni çağda, genetik temel üzerinde gelişen kanserin sınıflandırmasının moleküler düzeyde yapılmasının önemi kabul görürken, hasta tümör örneklerinin epigenetik durumlarının incelenmesi hastalık hakkında tanı, tedavi ve prognoz ile ilişkili detayların bilinmesine yol açacaktır.

Yöntem: İnvazif meme tümörlü dokularda tümör süpresör gen olarak kabul gören P16 (CDKN2A), MGMT genlerinin promotor bölgesinde metilasyon durumlarını inceleyerek, meme tümörünün histopatolojik prognostik bulguları ve hastaların bazı demografik bilgileri ile ilişkisi değerlendirildi. Epigenetik çalışmalar için ise MSP yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Çalışmada P16 (CDKN2A) geninde olguların % 43,8’inde, MGMT geninde olguların % 34,4’ünde promotor hipermetilasyonu farklı oranlarda gözlenmiştir. Bu sonuçlar ile olguların prognostik faktörlerine bakıldığı zaman P16 (CDKN2A), MGMT genleri tümörün yaş ile anlamsız, ER(+)'liği, PR(+)'liği ve C-erb-B2(+)'liği ile anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak MSP tekniğinin meme kanserinin metilasyon profillerinin taranmasında kullanılabilecek bir teknik olduğu görülmüştür.

Sonuç: Moleküler analizlerin meme kanserinin karakteri hakkında bilgi verici olduğu açıktır. Ancak hiç şüphe yok ki, daha güçlü istatistiksel sonuçları elde etmek için veri madenciliği olarak isimlendirilen, kümeleme ve çok değişkenli regresyon hesaplamalarının kombinasyonundan oluşan ileri istatistiksel analizlerin uygulanabileceği geniş hasta grupları ile çalışmalar yapılması son derece önemlidir. Bu sebeple, geniş gruplar ile çok değerli çalışmaların hızlı ve güvenilir şekilde yapılmasına imkan sağlayacak tümör biyobankalarının oluşturulması ve devamlılığının sağlanması öncelikli hedeflerden olmalıdır.

Anahtar kelimeler: Meme Kanseri, P16 (CDKN2A), MGMT, MSP, Epigenetik, Metilasyon.

ABSTRACT

Objective: In the era of personalized treatment methods when the molecular classification of the cancer which is developed on genetic basis, investigating the epigenetic status of tumor samples of patients will lead the details about diagnosis, treatment and prognosis to be valued.

Method: We investigated the methylation status of promoters of P16 (CDKN2A), MGMT genes which are accepted as tumor suppressors in invasive breast cancer tissue and evaluated with the histopathologic prognostic findings and demographic informations belongs to the patient. MSP technique were recruited for epigenetic studies.

Results: In this study the promoter hypermethylation status were observed at different rates; P16 (CDKN2A) gene with 43,8% of the cases, MGMT gene with 34,4%. With these results when the prognostic factors of the patients were analyzed, tumor stage and age were found to be meaningless with the hypermethylation of P16 (CDKN2A), MGMT genes but found to be significant with age, P16 (CDKN2A), MGMT, tumor stage and PR positivity, ER positivity, ≤ 30 Ki-67, E-Cadherin positivity and C-erb-B2 positivity were significant. To conclude with, MS-PCR makes this technique reliable for determination of the methylation profiles of breast cancer screening.

Conclusion: It is obvious that molecular analyses are informative about the character of breast cancer. But without doubt, performing studies in large patient groups where advanced statistical analysis of combination of clustering and multivariate regression calculations, called data mining, can be applied is extremely important. So, it has to be among primary goals to form and maintain tumor biobanks which can enable fast and reliable practicing of precious studies in large groups.

Key words: Breast cancer, P16 (CDKN2A), MGMT, MSP, Epigenetics, Methylation.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

ÖZET.....i

ABSTRACT.....ii

İÇİNDEKİLER.....iii

ÇİZELGELER DİZİNİ.....viii

ŞEKİLLER DİZİNİ.....x

SİMGELER VE KISALTMALAR.....xi

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

1.1 Kanser..... 1

1.2 Meme Kanseri 1

2. GENEL BİLGİLER.....2

2.1. Meme Kanseri Biyolojisi.....2

2.1.1. Normal gelişim2

2.1.2 Hormonlar ve reseptörleri2

2.1.3 Onkogenler.....3

2.1.3.1 Meme kanserinde onkogenler3

2.1.4 Tümör supressör genler4

2.2 Meme Kanserinin Epidemiyoloji ve Etiyolojisi5

2.3 Meme Kanserinin Patolojisi5

2.4 Prognoz.....7

2.4.1 Prognostik faktörler7

2.4.2. İmmunohistokimyasal belirleyiciler10

2.4.2.1. BRCA-110

2.4.2.2. BRCA-211

2.4.2.3. Cyclooxygenase-2 (Cox-2)	11
2.4.2.4. P53	12
2.4.2.5. Ki-67	13
2.4.2.6. C-erbB-2 (HER2/Neu)	14
2.4.2.7. Östrojen ve Progesteron reseptörleri.....	15
2.5. Epigenetik Mekanizmalar	15
2.5.1. Histon modifikasyonları	16
2.5.2. RNA aracılı gen susturulması	16
2.5.3. DNA metilasyonu	17
2.5.3.1. CpG adacıkları	18
2.5.3.2. Kanserde metilasyon profili.....	19
2.5.3.3. DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonun baskılanma mekanizmaları.....	20
2.5.3.4. DNA metilasyonunun kanser gelişiminde etkilediği mekanizmalar	21
2.6. P16 (CDKN2A) Geni	22
2.7. MGMT.....	24
2.8. Metilasyon-Spesifik PCR	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Hasta Grubu.....	28
3.2. Gereçler	28
3.2.1. Kullanılan aletler.....	28
3.2.2. Kullanılan kimyasal malzemeler	29
3.2.3. P16 (CDKN2A) geni metilasyon analizinde kullanılan primerler.....	30
3.2.4. MGMT geni metilasyon analizinde kullanılan primerler	30
3.3. Yöntemler	30
3.3.1. Parafinli doku örneklerinden DNA elde edilmesi.....	30

3.3.1.1. Deparafinizasyon işlemi	31
3.3.1.2. DNA izolasyonu	31
3.3.2. Bisülfid modifikasyon işleminin gerçekleştirilmesi	32
3.3.3. MSP	33
3.3.4. Agaroz jel elektroforezi	35
3.3.5. PCR ürünlerinin görüntülenmesi	35
3.3.6. İstatiksel analiz	36
3.3.7. Değerlendirme	36
4.BULGULAR	37
4.1. Olguların Demografik ve Patolojik Özellikleri.....	37
4.2. P16 (CDKN2A) Geninde Saptanan Bulgular.....	39
4.2.1. Olguların yaşları, evreleri, tümör tipleri, ER, PR, CERB-B2, E-cadherin ve Ki-67 durumlarının P16(CDKN2A) geni ile ilişkisi.....	40
4.2.1.1. Olguların yaşı ile P16(CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi....	40
4.2.1.2. Tümörün tipi ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi	42
4.2.1.3. Tümörün evresi ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi	44
4.2.1.4. Östrojen reseptör ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi.....	45
4.2.1.5. Progesteron reseptör ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi.....	47
4.2.1.6. C-erb-B2 ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi	49
4.2.1.7. E-Cadherin ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi.....	50
4.2.1.8. Ki-67 ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi.....	51
4.3. Metilguanin DNA Metil Transferaz (MGMT) Geninde Saptanan Bulgular.....	53
4.3.1. Olguların yaşları, evreleri, tümör tipleri, ER, PR, CERB-B2, E-cadherin ve Ki-67 durumlarının MGMT geni ile ilişkisi	54

4.3.1.1. Olguların yaşı ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi	54
4.3.1.2. Tümörün evresi ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi.....	56
4.3.1.3. Tümör tipi ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi.....	57
4.3.1.4. Östrojen reseptör ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi	59
4.3.1.5. Progesteron reseptör ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi	60
4.3.1.6. C-erbB-2 ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi.....	62
4.3.1.7. E-cadherin ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi	63
4.3.1.8. Ki-67 ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi.....	64
5. TARTIŞMA	66
5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması	67
5.1.1. Meme kanserli olgularda P16 (CDKN2A) geni metilasyonunun literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması	67
5.1.2. Meme kanserli olgularda MGMT geni metilasyonunun literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR	76
Ek 1. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda evre ile yaş dağılımı.....	85
Ek 2. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda ER ile yaş dağılımı.....	85
Ek 3. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda PR ile yaş dağılımı.....	86
Ek 4. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda C-erb-B2 ile yaş dağılımı.....	86
Ek 5. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda E-Cadherin ile yaş dağılımı.....	87
Ek 6. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda Ki-67 ile yaş dağılımı.....	87
Ek 7. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda evre ile ER dağılımı.....	88
Ek 8. Tümörlü dokuda evre ile PR dağılımı.....	88
Ek 9. P16 (CDKN2A) evre ile C-erb-B2 dağılımı.....	89

Ek 10. P16 (CDKN2A) evre ile E-Cadherin dağılımı.....	89
Ek 11. P16 (CDKN2A) evre ile Ki-67 dağılımı.....	90
Ek 12. MGMT evre ile yaş dağılımı.....	90
Ek 13. MGMT ER ile yaş dağılımı.....	91
Ek 14. MGMT PR ile yaş dağılımı.....	91
Ek 15. MGMT C-erb-B2 ile yaş dağılımı.....	92
Ek 16. MGMT E-Cadherin ile yaş dağılımı.....	92
Ek 17. MGMT Ki-67 ile Yaş Dağılımı.....	93
Ek 18. MGMT evre ile Ki-67 dağılımı.....	93
Ek 19. MGMT evre ile C-erb-B2 dağılımı.....	94
Ek 20. MGMT evre ile PR dağılımı.....	94
Ek 21. MGMT evre ile ER dağılımı.....	95
Ek 22. MGMT evre ile E-Cadherin dağılımı.....	95
Ek 23. Hastaların demografik ve klinik özellikleri.....	96
Ek 24. Meme karsinomlarında TNM evreleme sistemi.....	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Meme tümörlerinin histopatolojik sınıflaması.....	6
Çizelge 3.1. P16 genine ait metile ve unmetile primer çifti dizileri ve bölgeleri.....	30
Çizelge 3.2. MGMT genine ait metile ve unmetile primer çifti dizileri ve bölgeler.....	30
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların klinik özellikleri.....	38
Çizelge 4.2. Olguların yaşı ile tümörlü dokuların metilasyon dağılımı.....	40
Çizelge 4.3. Tümörlü dokularda metile olgularının yaş dağılımı.....	41
Çizelge 4.4. Olguların yaşı ile normal dokuların metilasyon dağılımı.....	41
Çizelge 4.5. Normal dokularda metile olgularının yaş dağılımı.....	42
Çizelge 4.6. Tümör tipi ile P16 (CDKN2A) geni metilasyon dağılımı.....	43
Çizelge 4.7. Olguların tümör tipleri ile metile durumları.....	44
Çizelge 4.8. Olguların tümör evresi ile P16 (CDKN2A) geninin metilasyon durumu dağılımı.....	45
Çizelge 4.9. Metile olan evre II, evre III olgularının dağılımı.....	45
Çizelge 4.10. Tümörlü dokularda ER ile P16 (CDKN2A)geni promotor metilasyon durumu dağılımı.....	46
Çizelge 4.11. Tümörlü dokularda metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı.....	47
Çizelge 4.12. Tümörlü dokularda PR ve P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyon durumu dağılımı.....	48
Çizelge 4.13. Tümörlü dokularda metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı.....	48
Çizelge 4.14. Tümörlü dokularda C-erb-B2 ile P16 (CDKN2A) geni metilasyon durumu dağılımı.....	49
Çizelge 4.15. Tümörlü dokularda metile olan C-erb-B2(+) ve C-erb-B2(-) olan olguların dağılımı.....	50
Çizelge 4.16. Tümörlü dokularda E-Cadherin ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyon durumu dağılımı.....	50
Çizelge 4.17. Tümörlü dokularda metile olan E-Cadherin(+) ve E-Cadherin(-) olan olguların dağılımı.....	51
Çizelge 4.18. Tümörlü dokularda Ki-67 ile P16 (CDKN2A) geni promotor	

metilasyon durumu dağılımı.	52
Çizelge 4.19. Tümörlü dokularda metile olan <% 30, % 30-% 60 ve <% 60 Ki-67 olguların dağılımı	53
Çizelge 4.20. Tümörlü dokularda yaş ile MGMT geni metilasyon durumu dağılımı	54
Çizelge 4.21. Normal dokularda yaş ile MGMT geni metilasyon durumu dağılımı	55
Çizelge 4.22. Metile olan tümörlü dokularda yaş dağılımı	55
Çizelge 4.23. Normal dokularda yaş ile MGMT geni metilasyon durumu dağılımı	56
Çizelge 4.24. Olguların tümör evresi ve MGMT geni promoter metilasyon durumlarının dağılımı.....	56
Çizelge 4.25. Metile olan evre II ve evre III olgularının dağılımı	57
Çizelge 4.26. Olguların Tümör tipi ve MGMT geni metilasyon durumlarının dağılımı ..	58
Çizelge 4.27. Metile olan olgularda tümör tipleri dağılımı	59
Çizelge 4.28. ER ile MGMT geni promoter metilasyon durumu dağılımı	60
Çizelge 4.29. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı	60
Çizelge 4.30. PR ve MGMT geni promoter metilasyon durumu dağılımı	61
Çizelge 4.31. Metile olan PR(+) ve PR(-) olguların dağılımı.....	61
Çizelge 4.32. C-erbB-2 ve MGMT geni promoter metilasyon durumu dağılımı	62
Çizelge 4.33. Metile olan C-erbB-2(+) ve C-erbB-2(-) olan olguların dağılımı	63
Çizelge 4.34. E-cadherin ve MGMT geni promoter metilasyon durumu dağılımı.....	63
Çizelge 4.35. Metile olan E-cadherin(+) ve E-cadherin(-) olan olguların dağılımı.....	64
Çizelge 4.36. Ki-67 ve MGMT geni promoter metilasyon durumu dağılımı	65
Çizelge 4.37. Ki-67 (<% 30, % 30-% 60, >% 60) promotor metilasyon durumu dağılımı	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-metilsitozin mutagenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi.....	18
Şekil 2.2. Kanserde metilasyon görünümü	19
Şekil 2.3. Sitozin metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel susturulma mekanizmaları.....	20
Şekil 2.4. Onkogeneizde, sitozin metilasyonunun neden olduğu mekanizmalar.....	22
Şekil 2.5. Kromozom 9’da P16 (CDKN2A) lokalizasyonu.....	23
Şekil 2.6. Hipermetile genlerin sinyal yolağı analizi	23
Şekil 2.7. MGMT geni lokalizasyon bölgesi	25
Şekil 2.8. Metilasyon spesifik PCR	26
Şekil 4.1. P16 (CDKN2A) geninin normal ve tümörlü dokularda metilasyon analizine ait jel görüntüsü.....	39
Şekil 4.2. MGMT geninin normal ve tümörlü dokularda metilasyon analizine ait jel görüntüsü.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ

Açıklama

Mikron

$^{\circ}\text{C}$

Santigrat derece

Kısaltmalar

Açıklama

A

Adenin bazı

APC

Adenomatous Polyposis Coli

bç

Baz çifti

BMP6

Bone Morphogenetic Protein 6

BRCA1

Breast cancer 1

BRCA2

Breast cancer 2

C

Sitozin bazı

cAMP

Siklik AMP

CCL

Columnar Cell Lesion

CCND2

cyclin D2

CDKN2A

cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

C-erbB-2 (HER2/neu)

Human Epidermal growth factor Receptor 2

Cox-2

Cyclooxygenase-2

DNA

Deoksiribonükleik asit

DNMT1

DNA metiltransferaz

DCI

Duktal Karsinom In situ

EGF

Epidermal büyüme faktörü

EGFR

Epidermal büyüme faktör reseptörü

ER

Östrojen reseptörü

Er α

Östrojen reseptörü α

Er β

Östrojen reseptörü β

FGF

Fibroblast büyüme faktörü

FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Guanin bazı
GSTP1	glutathione S-transferase
HAT	Histon Asetil Transferaz
HCPE	High Performance Capillary Electrophoresis
HDAC	Histon Deasetilaz
HIC1	hypermethylated in cancer 1
HIF-1	Hipoksi inducible factor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRM	High Resolution Melting
HTF	HpaII Tiny Fragment
IDC	İnvaziv Duktal Karsinoma
ILC	İnvaziv Lobüler Karsinoma
IGF-1 ve IGF-2	İnsulin ve insulin benzeri büyüme faktörleri 1 ve 2
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
LBA	Ligand bağlama yolu
MALDI-TOF	MS Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight, Mass Spectrometry
MC	Metaplastik Karsinom
MeCP-1 ve MeCP-2	Metil sitozine bağlanma proteini 1 ve 2
5-MeC	5-metilsitozin
MGMT	O6-methylguanine-DNA methyl transferase
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MMP-2	Matriks metalloproteinaz-2
MS-HRM	Methylation specific high resolution melting
MSP	Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NBS1	Nibrin, Nijmegen kırılma sendromu
ng	Nanogram
NSAİ	Non Steroid Anti İnflamatuvar İlaçlar
OK	Oral kontraseptifler

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PG	Prostaglandin
PGE2	Prostaglandin E2
PR	Progesteron reseptörü
RA	Retinoik asit
RAR β 2	Retinoik Asit Reseptörü β 2
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonükleik asit
siRNA	Small Interfering RNAs
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SUMO	Ubikutin benzeri proteinler
T	Timin bazı
TC	Tubuller karsinom
TGF- α	Transforme edici büyüme faktörü α
TNM	Tümör Node Metastaz
Tm	Erime sıcaklığı
μ l	Mikrolitre
UV	ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Kanser

Kanser, kendini göstermesi, gelişimi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine çok değişken olan, karmaşık bir hastalıktır. Aynı heterojenlik ve çeşitlilik hücresel ve moleküler düzeyde de kendini gösterir. Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve nihai olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar (Merlo vd., 2006).

1.2 Meme Kanseri

Meme kanseri % 30 sıklıkla kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin % 18'i meme kanseri nedeniyle meydana gelmektedir. Hormona bağımlı bir hastalıktır, insidansı üzerinde menarş yaşı, ilk gebelik yaşı ve menapoz yaşının etkisi görülmektedir (Darendeliler vd., 2003).

Tüm diğer kanserler gibi meme kanseri gelişiminde de genetik mekanizmalar rol oynar. Sporadik meme kanserinde onkogen amplifikasyonu sık görülen bir değişikliktir. Aşırı ekspresyonu görülen onkogenler MYC, RAS ailesi üyeleri (C-MYC, HA-RAS-1), INT-2, EMS1 ve epidermal büyüme faktör reseptörü ailesi üyeleri HER-2 (ERBB-2), HER-3 ve HER-4'dür. Özellikle siklin D olmak üzere hücre döngüsü kontrolünde görev alan genler de onkogen olarak davranabilir. Bu onkogenlerin aşırı ekspresyonu malin fenotipin hem inisiyasyonu hem de devam etmesine katkıda bulunabilir. Meme karsinogeneğinde tümör baskılayıcı genlerin rolü de önemlidir. BRCA1 ve BRCA2 ailevi meme kanseri ile ilişkili tümör baskılayıcı genlerdir. Sporadik kanserlerde P53 mutasyonu sık görülür. Birtakım tümör baskılayıcı genlerin (RB, PTEN, CHEK2, CDH1, ATM, NBS1 gibi) değişiklikleri meme kanserinde gösterilmiştir (Darendeliler vd., 2003).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri Biyolojisi

2.1.1. Normal gelişim

Meme bezi embriyoda gebeliğin erken evrelerinde gelişmeye başlar ve puberteden menapoza kadar hipofiz ve over hormonları etkisi altında değişim göstermeye devam eder. Pubertede lobul oluşumu ile belirginleşen gelişim ve diferensiyasyon ilk term gebeliğin sonunda tamamlanır (Güllüoğlu vd., 2003).

Normal meme büyümesi ve gelişimi östrojen, progesteron, androjen, glukokortikoid, prolaktin, tiroid hormonu, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1 ve IGF-2), fibroblast büyüme faktörleri (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF)/transforme edici büyüme faktörü α (TGF- α) dahil otokrin ve parakrin etkili pek çok hormon, büyüme faktörü ve TGF- β ve mammatatin gibi epitel kökenli büyüme inhibitörleri etkileşimi ile gerçekleşir (Russo vd., 2004, Turashvili vd., 2005).

2.1.2 Hormonlar ve reseptörleri

Hormonlar meme hücresi gelişiminde rol alan genlerin ekspresyonunu etkileyerek tümör gelişiminde rol alır. Östrojenler RNA, DNA ve protein sentezini ve önemli düzenleyici enzimlerin aktivitesini uyarır ve hücre döngüsünü düzenler. Progesteron ile beraber normal meme epitelinde proliferasyon ve diferensiyasyonu tetikler. Östrojenler doğrudan DNA hasarına neden olarak tümör inisiyatörü olarak davranabilir, mitozu tetikleyerek DNA hasarının birikmesine neden olabilirler (Kenemans vd., 2003, Russo vd., 2004).

Nükleer hormon reseptör ailesinin üyesi olan östrojen reseptörleri (ER) liganda bağlandıklarında transkripsiyon faktörleri olarak davranır. Östrojen reseptör ekspresyonu görülen hücrelerin oranı memenin lobular gelişimi ile ilişkilidir ve ekspresyonu memenin diferensiyasyon derecesi tarafından belirlenir. Östrojen reseptör'ün iki ayrı izoformu bulunur (ER α ve ER β) (Osborn vd., 2004). Meme kanserinin erken evrelerinde ER α aşırı ekspresyonu sıktır. Transkripsiyonu etkilenen genlerin çoğu proliferasyon, apoptoz, metastaz, invazyon ve anjiyogeneze rol alır. Östrojen reseptör β 'nın önemi ER α 'dan daha az bilinmekte ve tümör gelişimi üzerine ters etkisi var gibi görünmektedir. Östrojen reseptör'ler meme kanserlerinin % 60-80'inde tespit edilir. Östrojen reseptör-negatif tümörlerin visceral organlara metastaz olasılığı daha fazladır. Östrojen reseptör pozitifliği histolojik farklılaşma derecesi

(düşük nükleer grad), diploid DNA içeriği ve düşük proliferatif indeks (düşük SPF ya da Ki-67 ekspresyonu) ile korelasyon gösterirken, HER-2 ve EGFR ekspresyonu ile ters korelasyon gösterir (Russo vd., 2004).

2.1.3 Onkogenler

Kanser, hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen kritik genlerde gerçekleşen değişikliklerden kaynaklanır. Tümör virusları ile yapılan araştırmalar, belirli genlerin hücreleri transforme edebildiklerini göstererek, kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulguların elde edilmesini sağlamıştır. Buna rağmen insan kanserlerinin büyük çoğunluğu virusların etkisiyle değil, radyasyon ya da kimyasal karsinogenez gibi başka nedenlerle ortaya çıkar. Bu yüzden viral onkogenler ile yapılan araştırmaların önemli bir yönü de, virüslara bağlı olmayan kanserlerin oluşumunda rol oynayan hücresel onkogenlerin, bu çalışmalarla belirlenmiş olmasıdır. Viral ve hücresel onkogenler arasındaki temel ilişki, onkojenik retroviruslar üzerinde yapılan araştırmalar sayesinde tanımlanmıştır (Dalay, 2006).

2.1.3.1 Meme kanserinde onkogenler

Meme kanserinin gelişiminde yüksek riske sahip hastalarda bağlantı analizlerine dayanan çalışmalar onkogenlerin ailesel meme kanserlerinde primer lezyonlarda yeri olmadığı, fakat tümör baskılayıcı genlerdeki resesif değişimlerin primer lezyon oluşumuna katıldığını gösteren çalışmalar vardır. Bu modele göre onkogenlerdeki değişimler daha sıklıkla tümör invazyonu veya metastaz ile ilişkili olabilirler.

Çok adımlı tümöröenez hipotezinin benzeri bir model meme kanserleri için de düşünülebilir. Meme kanserinin ortaya çıkışına, ilerlemesine ve metastazına katılan birçok faktörün varlığı bilinmektedir. Meme kanserlerinin bir bölümü, yukarıda açıklanan mekanizmalar ile bazı onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen çeşitli değişimler sonucu ortaya çıkar. Meme kanserinde heterozigosite kaybı ve gen kopyalarının sayısındaki artış ile hiperplaziden in situ duktal karsinoma (DCIS) geçişte hatta daha ileri DCIS derecelerine geçişte ani artışlar gözlenir. Bu genetik değişimler tarafından etkilenen hücresel işlem yolları diğer birçok hücresel yol ile oldukça sıkı ilişkili olduğundan bu karmaşa nedeniyle teşhis ve tedavi uygulamaları da oldukça yavaş ilerlemektedir. Meme için ayırıcı özellikler taşıyan onkogenler vardır. Hem normal hem de kanserli meme dokularında çoğunlukla saptanan bu özel onkogenler ras ,myc ve cerbB-2 olarak sıralanabilir (Lüleyap, 2008).

2.1.4 Tümör supressör genler

Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunu gösteren ilk bulgular, Henry Harris ve arkadaşları tarafından 1969 yılında başlatılan, somatik hücre hibridizasyon deneyleriyle elde edilmiştir. Normal hücrelerin tümör hücreleri ile birleştirilmesiyle, iki hücreden de gelen kromozomları içeren hibrit hücreler ortaya çıkar. Bu hücreler genelde, hayvanlarda tümör oluşturma yeteneğine sahip değildir. Bu nedenle normal hücreden gelen genlerin tümör gelişimini baskıladığı düşünülmüştür. Ancak bu genlerin moleküler düzeyde tanımlanması başka bir yaklaşımla, ender görülen kalıtsal, insan kanser türlerinin analizi sayesinde mümkün olmuştur.

Rb ve INK4 tümör baskılayıcı genlerinin ürünleri, hücre döngüsünü siklin D1 ile aynı noktada etkiler. Rb, hücre döngüsünün ilerlemesini ve DNA sentezinin gerçekleşmesini sağlayan genlerin transkripsiyonunu baskılayarak, hücre döngüsünü G1 kontrol noktasında durdurur. Normal hücrelerde kontrol noktasından geçiş, Rb'yi fosforilleyerek inaktive eden CDK4,6/Siklin D kompleksi tarafından düzenlenir. Bu yüzden tümörlerde, Rb'nin mutasyon ile inaktifleşmesi hücre döngüsünün temel negatif düzenleyicisi rolünü ortadan kaldırır. Cdk inhibitörü P16'yı kodlayan INK4 tümör baskılayıcı geni de, aynı kontrol noktasından geçişi düzenler. P16 Cdk4,6/Siklin D aktivitesini baskılar. Bu yüzden INK4'ün inaktivasyonu, Cdk4,6/Siklin D kompleksinin aktivitesinde artışa yol açarak Rb'nin kontrolsüz fosforilasyonu ile sonuçlanır.

Tümör baskılayıcı genler, tümör gelişimini baskılama özelliğinden dolayı tümör supressör protein olarak tanımlanan ürünleri kodlayan genlerdir. İlk tümör supressör gen, bir çocukluk çağı göz tümörü olan retinoblastoma (Rb) çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır. İkinci tanımlanmış tümör supressör gen ise, 53 kDalton ağırlığında olmasından dolayı p53 olarak tanımlanmış bir genidir. Genom gardiyanı olarak da tanımlanan bu tümör baskılayıcı gen tüm kanserlerin % 50'sinde rol oynayabilmektedir. p53 proteini, hücre döngüsü kontrolü ve apoptozisde oynadığı önemli rolden dolayı, genomun bekçisi olarak fonksiyon görür (Lüleyap, 2008).

Tümör baskılayıcı genler olan BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları ailevi meme kanseri olgularının yaklaşık % 60'ından sorumludur. Germ hücre mutasyonları meme ve over kanserine yatkınlığa neden olur. Sporadik meme kanserinde mutasyon nadirdir ama işlevsel bozukluklar görülür. Meme kanserinde P53 mutasyonu % 50 (56), Rb (13q14.1) mutasyon ya da kaybı % 30 sıklıkla görülürken; PTEN (10q23) germ hücre

mutasyonlarında görülen Cowden Sendromunda da meme kanseri görülür ancak sporadik meme kanserinde somatik mutasyonlar nadirdir. Hücre döngü kontrol noktası kinaz geni olan CHEK2 BRCA1/2 DNA onarım yolağı ile etkileşir. Ailevi meme kanserinde 1100delC varyantı düşük penetranslı yatkınlığa neden olur. Epitelyal-Cadherin adezyon molekülünü kodlayan CDH1'in (16q22.1) sporadik lobular meme kanserinde rol aldığı düşünülmektedir (Kenemans vd., 2004).

2.2 Meme Kanserinin Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

Meme kanseri, memenin duktus ya da lobullerini kaplayan epitel hücrelerinin malin proliferasyonudur. Kadınlarda en sık görülen kanser olmakla beraber, erkeklerde oldukça nadirdir (Darendeliler vd., 2003).

Meme kanserinin oluşum nedenleri arasında endokrin mekanizmalar, diyet, çevresel etkenler ve genetik değişiklikler üzerinde durulmaktadır. Hormonal karsinogenez konusunda en yararlı veriler ülkeler arasındaki görülme sıklığı farklarının incelenmesiyle elde edilmiştir (Lippman vd., 1997).

2.3 Meme Kanserinin Patolojisi

Meme kanseri bağ ya da epitel dokusundan köken alabilir. Ancak sık görülenler epitelyum kökenli olanlardır. Hastaların % 4 kadarında primer tümör iki taraflıdır ya da ikinci primer gelişir. Tümörler en sık üst dış kadranda görülür (% 50), bunu santral (% 20), alt dış (% 10), üst iç (% 10) ve alt iç kadranda izler (% 10). Tümörlerin çoğu duktus epitelinden (% 90), diğerleri lobul epitelinden köken alır. Karsinogenezin bu iki formda farklı şekillerde geliştiği düşünülmektedir. Her iki grup kanser bazal membran infiltrasyonu yapıp yapmamalarına göre iki gruba ayrılırlar (Crum vd., 2002).

Çizelge 2.1. Meme tümörlerinin histopatolojik sınıflaması (Crum vd., 2002).

İnfiltrasyon Yapmayan	1. İntraduktal karsinom (komedokarsinom)
	2. Paget hastalığında intraduktal karsinom
	3. Lobuler karsinoma in situ
İnfiltrasyon Yapan	1. İnvaziv duktal
	1a. Baska bir özelliği olmayan (Not Otherwise Specified - NOS) skiro karsinom
	1b. Paget hastalığı içeren invaziv duktal karsinom
	2. İnvaziv lobuler karsinom
	3. Medüller karsinom
	4. Kolloid (musinöz) karsinom
	5. Tubuler karsinom
	6. Diğer nadir tipler

Tüm meme kanserlerinin % 20-25 kadarını oluşturan noninvaziv (in situ) karsinom (komedokarsinom) intraduktal ve lobuler olmak üzere iki tiptir. Meme duktusları anaplastik tümör hücreleri ile dolmuştur. Nadiren hücreler papiller yapılar oluşturur ya da meme başına yayılarak meme başı Paget hastalığına neden olurlar. Anaplastik hücreler duktus bazal membranını penetre etmez ve noninvaziv in situ olarak kalırlar. Yüksek dereceli olanların % 40'ında zamanla invazyon gerçekleşir (Crum vd., 2002). Lobuler karsinoma in situ terminal duktus ve duktüllerden gelişir ve bu yapıları anaplastik tümör hücreleri doldurur. Lezyonlar fibrokistik değişiklikler ile beraber ya da intraduktal karsinomlarla beraber invaziv karsinom alanlarının komşuluğunda olabilir, fibroadenom zemininde gelişebilir ve sıklıkla çok sayıda ve bilateralidirler. Üçte birinde aynı taraf ya da karşı tarafta invaziv karsinom gelişir. Genellikle ER ve PR pozitif ve

CERB-B2 negatiftirler ve premenapozal dönemde rastlantısal bulunurlar (Crum vd., 2002).

Kolloid (müsinöz) karsinom, memenin paget hastalığı, medüller karsinom ve infiltratif lobuler karsinom invaziv infiltratif karsinomlardır. İnvazyona neden olan genetik değişiklik net olarak bilinmemektedir (Crum vd., 2002, Kenemans vd., 2004).

İnfiltratif duktal karsinom en sık görülen şekildir. Kullanılan morfolojik kriterlere göre değişmekle birlikte % 44-75 sıklıkla görülür. Sertliği ve yoğun stroması nedeniyle skiröz karsinom olarak da adlandırılır. Stroma içine dağılmış yuvarlak, poligonal ya da sıkışmış ve uniform, küçük, çok az mitotik figür içeren koyu nukleuslu tümör hücre küme ve kordonlarından oluşur. Çevre doku infiltrasyonu, kan damarları, perivasküler ve perinöral alanların invazyonu gözlenir (Crum vd., 2002, Ünal, 2006).

2.4 Prognoz

Seyri hastadan hastaya değişen meme kanseri hızlı gidişli ya da gizli seyirli olabilir. Uzun dönem prognozu belirleyen nüks ya da metastazın yerleştiği dokudur. Tümörün büyüme hızı, tedavilere duyarlılığı ve biyolojik özellikleri prognozu etkiler (Lane, 1979).

2.4.1 Prognostik faktörler

Meme karsinomlarının prognozunu belirlemede birçok klinik ve patolojik ölçüt bulunmaktadır. Prognozun kötü olacağını düşündüren bazı bulgular şu şekilde sıralanabilir:

1. Meme derisinde yaygın ödem ve deri üzerinde multipl nodüllerin bulunması
2. Göğüs duvarına fiksasyon
3. Arteria mammae interna çevresi ve supraklaviküler lenf düğümlerinin tutulması
4. İnflamatuvar karsinom
5. Uzak metastazların bulunması

Bu bulguların izlenmediği durumlarda prognozu belirlemede birçok değişken değerlendirilir. Başlıcaları şunlardır:

Yaş: Meme karsinomu tanısı alındığında 50 yaşın altında olan kadınlarda iyi prognoz gözlenirken 50 yaş üstü ve ileri yaş olgularda sağkalım oranları daha düşüktür. Benzer şekilde 35 yaş altı olgularda da sağkalım oranları düşüktür (Lester, 2005, Rosai, 2004). Nüks ve uzak metastaz riski daha yüksektir. Bu durum olguların daha yüksek dereceli tümörlere sahip olmalarıyla ilişkilidir.

İnvazyon: Meme karsinomlarında tek başına en önemli prognostik etkidir. İnvaziv komponentin bulunmadığı in situ karsinomlarda mastektomi ile % 100 sağkalım sağlanmaktadır. Hem in situ hem de invaziv komponenti bulunan olgularda invaziv komponentin oranı ile lenf düğümü metastaz olasılığı arasında ilişki bulunmaktadır.

Tümör boyutu: Tümör boyutu en önemli prognostik faktörlerden biridir ve lenf düğümü metastazlarından bağımsızdır. Ancak aksiller lenf düğümü metastazı riski tümör boyutu ile birlikte artar. In situ ve invaziv komponenti bulunan tümörlerde total tümör ölçüsünden çok invaziv komponentin boyutu daha iyi bir göstergedir. Mikroskopik tümör ölçüsü makroskopik ölçüden daha önemli olduğu bilinmektedir.

Yerleşim yeri: Yapılan birçok çalışmada prognoz ile tümörün kadranslara göre yerleşimi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ancak son zamanlarda yayımlanan bir çalışmada medial yerleşimli tümörler, lateral yerleşimlilerle karşılaştırıldığında % 50 nüks ve ölüm riski bulunmuştur (Rosai, 2004).

Histolojik tip: Klasik duktal ve lobüler tip invaziv meme karsinomları arasında istatistiksel belirgin bir prognostik fark bulunmadığı bildirilmektedir. Bazı invaziv duktal karsinomun morfolojik varyantları ise iyi prognoz göstermektedir. Bunlar tubuler karsinom, kribriform karsinom, medüller karsinom, müsinöz karsinom, papiller karsinom, adenoid kistik karsinom ve sekretuar karsinomdur. Taşlı yüzük hücreli karsinom ve inflamatuvar karsinom da ise prognoz kötüdür.

Derece: Tümörün histolojik derecesi ile sağkalım oranları arasında bağlantı bulunmaktadır. İyi diferansiye derece I tümörlerde 10 yıllık sağkalım oranları % 85 iken orta derece diferansiye derece II tümörlerde % 60 ve az diferansiye derece III tümörlerde ise % 15'tir (Rosai, 2004). İnvaziv meme karsinomlarında en yaygın olarak kullanılan derecelendirme sistemi Patley ve Scarf tarafından tanımlanan, önce Bloom ve Richardson sonra da Elston ve Ellis tarafında modifiye edilen sistemdir. Bu sistem tubuler diferansiyasyon, nükleer atipi ve mitozdan oluşan üç parametrenin ayrı ayrı değerlendirilmesi ve elde edilen puanların toplanması temeline dayanır.

Tubuler diferansiyasyon: Tümörün tümü değerlendirilerek tubuler yapıların tüm tümör alanındaki oranı belirlenir. Puanlama ölçütleri aşağıda belirtilmiştir.

- 1: Tubul yapıları tümörün % 75'inden fazla
- 2: Tubul yapıları tümörün % 75-10'u
- 3: Tubul yapıları tümörün % 10'undan az

Nükleer atipi: Tümör hücreleri normal meme epiteli ile karşılaştırılır, atipi ve pleomorfizm değerlendirilir.

1: Nükleuslar küçük ve normale göre hafif büyüktür. Nükleus konturları hafif düzensizdir.

2: Nükleuslar normale göre büyük ve vezikülerdir. Nükleolus belirginliği bulunur. Orta derecede biçim ve boyut farklılığı gözlenir.

3: Veziküler nükleuslu, genellikle nükleoluslu, belirgin biçim ve boyut farkı bulunan hücrelerdir. Bazen çok büyük ve bizar hücreler de bulunur.

Mitoz: 10 büyük büyütme alanında mikroskop alanının çapı dikkate alınarak sayım yapılır. Mitoz sayısı 1, 2 ve 3 olarak puanlanır.

Derece I: Toplam puan 3-5, iyi diferansiye

Derece II: Toplam puan 6-7, orta derece diferansiye

Derece III: Toplam puan 8-9, az diferansiye olarak değerlendirilir.

Lenf düğümü metastazı: Uzun dönem sağkalım oranlarının en önemli belirleyicilerinden biridir. Lenf düğümü metastazı olan olgularda olmayanlara göre mortalite riskinin 4-8 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Tutulan lenf düğümü sayısı da önemli olup yüksek metastatik lenf düğümü sayısı kötü prognozla ilişkilidir. 10 ya da daha fazla lenf düğümü metastazı olan olgularda 1-3 lenf düğümü metastazı olanlara göre 10 yıllık sağkalım oranlarının % 70 daha kötü olduğunu belirten yayınlar bulunmaktadır.

Lenfovasküler invazyon: Tümör çevresinde lenfatik ve kapiller damarlar içinde tümör hücreleri görülebilir. Bu bulgu lenf düğümü metastazı ve kötü prognozla ilişkilidir. Lenfatikler içinde tümör embolüsünün varlığı rekürrens riskini, tümör içinde ve çevresinde yeni damar yapımının fazla olması ise tümörün metastaz yapma olasılığını arttırmaktadır.

Hormon reseptörleri: Hücrel diferansiyasyona bağlı olarak östrojen ve progesteron reseptörlerinin miktarı değişkenlik göstermektedir. Bir tümör ne denli diferansiye ise hücrelerdeki östrojen ve progesteron reseptörü o denli fazla miktarda saptanmaktadır. Meme karsinomlarının % 85'inde östrojen reseptörü pozitifliği saptandığı bildirilmiş ve bu tümörlerin çoğunu postmenopozal dönemdeki kadınların oluşturduğu gösterilmiştir. Hormon reseptör pozitifliği antiöstrojen olarak kullanılan tamoksifene yanıtı belirlediği için sağkalımı etkilemektedir.

Proliferasyon hızı ve anöploid: İmmünohistokimyasal olarak saptanabilen bazı belirleyicilerin (Ki-67) yanı sıra akım sitometrisi (flow cytometry) yöntemiyle DNA değerlerine bakılarak bir tümörün proliferasyon hızına ilişkin bilgiler elde edilebilmektedir. Tümör hücrelerinde DNA miktarının artması ya da yüksek Ki-67 indeksi kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilmektedir (Tavassoli, 1999).

C-erbB-2: C-erbB-2'nin amplifikasyonu sonucunda aşırı ekspresyonu kötü bir prognoz göstergesi olduğunu belirten çok sayıda yayın bulunmaktadır. Bu durum özellikle lenf düğümü metastazı ve tümör derecesi ile ilişkilidir (Millis vd., 1999).

Evre: En önemli prognostik faktörler olan tümör boyutu, lenf düğümü metastazı ve uzak metastazı temel alan evrelendirme sistemleri bulunmaktadır (Lester, 2005, Rosai, 2004).

2.4.2. İmmunohistokimyasal belirleyiciler

2.4.2.1. BRCA-1

Bir tümör süpresör gen olan BRCA-1 17q21.3'de lokalizedir. Bu protein DNA çift zincir kırılmalarının onarımı, transkripsiyon regülasyonu, hücre siklus kontrolü, kromatin yeniden şekillenmesi gibi çok sayıda işleve sahiptir. Bu gen 24 exondan oluşur ve 1853 amino asitten oluşan bir protein kodlar (Bane vd., 2006, Honrado vd., 2005). Bu proteinin NH₂ (amino uç; N-terminal) ve COOH (karboksi uç; C-terminal) uçları bulunmaktadır (Kashima, 2000).

Bu proteinin yerleşimi konusunda farklı çalışmalar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda BRCA-1 proteininin amino ve karboksi uç antikörlerinin nükleusta bulunduğu belirtilmiştir. Ancak bazı çalışmalar da ekson 11'de bulunan nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLSS) ve ekson 11'siz BRCA splice varyantının (BRCA1-Δ ekson 11) sitoplazmada yer aldığını göstermişlerdir (Kashima, 2000). Çok sayıda BRCA-1 germ-line mutasyonlar tanımlanmış olmakla birlikte intrasellüler lokalizasyonu hakkında az bilgi bulunmaktadır.

Yapılan bir çalışmada BRCA-1 proteinin amino ve karboksi uçlarına etkili antikörler ile BRCA-1 mutasyonları ile boyanma lokalizasyonları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Karboksi uca etkili antikör (GLK-2) ile ekson 11 mutasyonlarında sitoplazmik boyanma elde edilirken diğer mutasyonlarda boyanma saptanmamıştır. BRCA-1 mutasyonu olmayan olgularda ise nükleer boyanma gözlenmiştir. Amino ucuna etkili antikörle (Ab-2) NLSS'nin bulunduğu ekson 11'in aşağısındaki

mutasyonlarda nükleer boyanma izlenirken üstündeki mutasyonlarda ise boyanmanın saptanmadığı bildirilmiştir (Kashima, 2000).

2.4.2.2. BRCA-2

İlk kez 1994 yılında tanımlanmış olan BRCA-2 geni 13. kromozomun uzun kolunda yerleşmiştir. Ayrıca BRCA-2 geni geniş bir gen olup 27 eksondan oluşur ve 3418 aminoasitten oluşan protein kodlar. Transkripsiyon regülasyonu, DNA zincir kırılmalarının onarımı, hücre siklus kontrolü gibi işlevlere sahiptir (Bane vd., 2006, Fruscaizo vd., 2006). Bu genin mutasyonları BRCA-1'e benzer şekilde meme ve over kanseri riskini artırır. Ancak BRCA-2 BRCA-1'e göre over kanseri gelişiminde daha düşük riske sahiptir. BRCA-2 ilişkili meme kanserleri erkeklerde de görülebilir (Bane vd., 2006).

Bir çalışmada BRCA-2 geninin immunohistokimyasal yöntemlerle meme epitel hücreleri, endometrium, timus, lenfoid dokuda folliküllerin germinal merkezlerinde bulunan tingible body makrofajlarda ve dalak retiküloendotelial hücrelerde boyanma gözlenmiştir (Moll vd., 1999).

2.4.2.3. Cyclooxygenase-2 (Cox-2)

Cyclooxygenase bir enzim olup araşidonik asitten prostaglandin (PG) sentezini katalizleyen prostaglandin sentetaz kompleksinin bir parçasıdır. Cyclooxygenase, Cox-1 ve Cox-2 olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. Bunlarda Cox-1 normal dokuda hücre membranında yer alır, sürekli olarak salgınır ve mide mukaza bütünlüğünün korunması, trombosit agregasyonun düzenlenmesi gibi fizyolojik olaylarda etkilidir. Diğer bir alt tipi olan Cox-2 ise birçok normal dokuda saptanamamakla birlikte yangı ve neoplastik süreçte sitoplazmada ortaya çıkar. Büyüme hormonları, tümör ilerleticileri, bakteriyel endotoksinler ve sitokinler tarafından Cox-2 salgınımı indüklenir. Kolon, akciğer, mide ve özofagus adenokarsinomları gibi birçok malignitede Cox-2 ekspresyonu artmıştır. Bunun yanı sıra Cox-2'nin kanser gelişiminde rolü olduğuna ilişkin çok sayıda bulgu bulunmaktadır (Larkins vd., 2006, Ranger, 2007). Ayrıca genetik ve farmakolojik çalışmalar Cox-2'nin erken dönem tümör gelişiminde etkili olduğunu belirtmektedir. Half ve arkadaşları invaziv tümöre komşu DKIS alanlarında invaziv tümöre göre daha yüksek ekspresyon gözlemişlerdir (Half vd., 2002).

Cyclooxygenase enzimleri, Cox-1; 9. kromozomda, Cox-2; 1. kromozomda olmak üzere farklı genlerde yer almaktadır. Cyclooxygenase-1 576, Cox-2 ise 587

aminoasitten oluşturmaktadırlar. Cyclooxygenase-2 salınımı PG sentezini uyarır. Bu moleküller hücresel fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yardımcı olan lokal hormonlardır. Yarılanma ömürleri kısadır (sıklıkla sadece dakikalar), etkilerini sentezlendikleri hücrede ve komşu hücrelerde gösterirler. Bu moleküller hücre proliferasyonunu stimüle ederler, özellikle meme epitel hücrelerinin mitotik aktivitesini arttırırlar (Larkins vd., 2006, Ranger, 2007). Bununla birlikte Prostaglandin E2 (PGE2) immunregülatör lenfokinlerin üretimini, T ve B hücre hücre proliferasyonunu ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin sitotoksik aktivitelerini inhibe eder. Prostaglandin E2 aynı zamanda tümör nekroz faktörünü de inhibe eder. Ek olarak immünsüpresif etkisi olan interleokin 10'u aktive eder (Ranger, 2007).

Prostaglandin düzeylerinin yükselmesi sellüler siklik AMP (cAMP) artışına neden olur. Bu da apoptozisin azalması ve hücre yaşam süresinin artmasına yol açar. Aynı zamanda Cox-2 artışı doğal substratı olan araşidonik asit düzeyinin de azalmasına yol açar ki bu da apoptozisin azalmasıyla sonuçlanmaktadır (Ranger, 2007).

Cyclooxygenase'ın araşidonik asidi metabolize etmesiyle bazı mutajenler oluşmaktadır. Araşidonik asidin oksidasyon ürünleri örneğin melandialdehit oldukça reaktif olup bu madde DNA'da hasara yol açabilmektedir (Ranger, 2007).

Tümör hücrelerinde Cox-2 aşırı salınımı olduğunda, PG düzeyi artar ve hücreler daha invaziv hale gelirler. Yapılan bazı çalışmalarda Cox-2 ekspresyonu ile matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) arasında ilişki bulunmuştur. Matriks metalloproteinaz-2 bazal membranın kollajen matriksini sindirmekte ve tümör hücrelerinin dokudaki invazivliğini arttırmaktadır (Ranger, 2007).

Cyclooxygenase-2, hücre proliferasyonu, mitoz, hücre adezyonu, apoptozis, immünsüpresyon ve anjigenezis üzerinde etkileri ile malign transformasyon ve tümör progresyonunda yer almaktadır. Cyclooxygenase-2 düzeylerinin artması bazı meme kansinomlarında kötü prognozla ilişkilidir. Bilindiği gibi NSAİ ilaçların hedefi cyclooxygenase (Cox) enzimidir (Ranger, 2007, Sivula vd., 2005).

2.4.2.4. P53

Lane ve Crawford tarafından 1979 yılında, daha sonra Liozer ve Levine tarafından Simian virus 40'un büyük transformasyon antijeniyle (SV40T antijeni) sıkı bir kompleks oluşturmuş bir fosfoprotein olarak tanımlanan P53 geni hala kanser patogeneğinde en çok çalışılan genlerden biridir (Lane, 1979, Levine, 1991).

On yedinci kromozomun kısa kolunda lokalize P53 tümör süpresör geni 393 amino asitten oluşan P53 proteinini kodlar. Bu protein aracılığıyla DNA replikasyonu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü düzenler. Yabanıl tip P53 immunoreaktivitesi genellikle normal hücrelerde görülmemektedir. Çünkü ubiquitin aracılı proteolizis nedeniyle proteinin yarılanma ömrü (20 dakika) kısaltmakta ve saptanabilir birikim olmamaktadır. Deoksiribonükleik asit (DNA) radyasyon, UV ışınları ve mutajenik kimyasallarla hasarlandığında P53 proteini stabil hale gelir ve nükleusta birikir. Biriken vahşi P53 DNA'yı bağlar, hücre siklusu duraklaması ve apoptozise aracılık eden birkaç genin transkripsiyonunu uyarır. Tümör protein 53'ün uyardığı hücre siklus duraklaması G1 fazının geç döneminde ortaya çıkar. Bu duraklama hasarlı DNA'nın onarımı için hücreye zaman kazandırır. Eğer onarım olmazsa P53 apoptozis yoluyla hücreyi ölüme götürür. Bu nedenle P53'e "genomun gardiyanı" denmektedir (Lane, 1979, Moshin, 2006).

Tümör gelişiminde P53 tümör süpresör geninde mutasyonlar ve allelik kayıplarla fonksiyonunun inaktive olması önemli rol oynar. Birçok olguda P53 genindeki mutasyonlar, bir bazın diğeri ile yer değiştirmesiyle gelişen "missense" mutasyonlardır. Bu mutant proteinler hücre siklusunda birikir ve immunohistokimyasal olarak saptanabilir.

Tümör protein 53'ün tümörlerdeki yaygınlığı malignite belirleyicisi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu da immuohistokimyasal yöntemle tümör hücrelerindeki mutant P53 proteininin aşırı miktarlarının saptanması temeline dayanır. Vahşi tip P53'ün tümör süpresör fonksiyonunun kaybı ile tümörün radyoterapiye ve kemoterapiye direnç kazanması ya da kötü prognozlu olması arasında ilişki saptanmıştır (Adıgüzel, 2003, Moshin, 2006).

2.4.2.5. Ki-67

Gerdess ve arkadaşları tarafından 1984 yılında saptanan Ki-67, hücre siklusuna özgü antijenlerin önemli bir örneğidir (Baştürk, 2003, Gerdess, 1984). Onuncu kromozomun uzun kolunda lokalize bir gen tarafından kodlanan, 345 ve 395 kd ağırlığında ki ayrı bölümden oluşan bu protein siklusa girmeyen hücrelerde bulunmazken, siklustaki hücrelerin G1 fazında artarak geç G1, S, G2 ve M fazlarında eksprese edilir (Baştürk, 2003, Gerdess, 1984).

İmmunohistokimyasal yöntemlerle dondurulmuş kesitlere ve/veya parafin bloklara uygulanabilen Ki-67 antijenine karşı geliştirilmiş MIB-1, MIB-2 ve MIB-3 monoklonal ve poliklonal antikorlar tümörlerin proliferasyon aktivitesini belirlemek için kullanılır. Antijen Ki-67 ile nükleer boyanma gösteren tümör hücrelerinin tüm tümör hücrelerine oranı yüzde olarak belirlenip Ki-67 proliferasyon indeksi saptanır. Genel olarak Ki-67 proliferasyon indeksi yüksek olan tümörlerin daha agresif seyrettiği gözlenmektedir (Baştürk, 2003, Ellis, 2006).

Meme kanserlerinde yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi yüksek histolojik derece, hormon reseptörlerinin yokluğu, büyük tümör boyutu ve lenf düğümü metastazı gibi kötü prognostik faktörlerle de ilişkilidir (Lester, 2005, Millis, 1999, Moshin, 2006, Rosai, 2004).

2.4.2.6. C-erbB-2 (HER2/Neu)

C-erbB-2 veya p185 olarak isimlendirilen bu onkogen 17. kromozomda q12 ye yerleşmiştir ve protein ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasına katılır. Ancak gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyon nedeniyle kanser patogeneze katılan bu onkogen, meme kanserleri için önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir. CerbB-2 onkoproteini plazma membranına yerleşmiş EGFR'ne benzer bir membran reseptördür. CerbB-2, meme kanseri araştırmalarında ve tedavisinde en yoğun çalışılan onkogenlerden biridir. HER2 ve diğer üyeler (HER1, HER3 veya HER 4) arasındaki liganda bağlı bir heterodimerizasyon cerbB-2 sinyal yolunu aktifler. CerbB-2 geninin amplifikasyonu veya proteinin aşırı ekspresyonu meme kanserlerindeki neoplastik hücrelerin % 10-40'ında gösterilmiştir. Erken dönem meme kanserinde cerbB-2 gen amplifikasyonu kötü prognoz ile yakın ilişkili bulunmuştur.

Çok sayıdaki çalışma ile C-erb-B2 amplifikasyonunun diğer kötü prognostik faktörlerin varlığı, tedaviye düşük cevap ve lenf nodu pozitif meme kanserlerinde hastaların yaşam süreleriyle ilişkili olduğu, tek başına bir prognostik faktör olabileceği desteklenmiştir. C-erb-B2 ekspresyonu ile ilgili verilerin çoğu lenf nodu pozitif hastalardan elde edilmesine rağmen uzun süreli takip sonrasında lenf nodu negatif hastalarda da C-erb-B2 amplifikasyonu olanların daha kötü prognoza sahip oldukları gözlenir. İnvazif meme kanserlerinin alt tipleri arasında sadece invazif duktal karsinomlarda C-erb-B2 amplifikasyonu gösterilmiştir. Genellikle invazif lobular karsinomlarda C-erb-B2 aktivasyonu görülmez. İn situ lobuler karsinomlarda da aşırı

üretimine rastlanmamıştır. Buna karşılık in situ duktal karsinomların alt tipi olan komedo tipte C-erb-B2 aşırı üretiminin prevalansı % 90'ın üzerindedir. Bu tipteki karsinomlarda bu proteinin çok miktardaki üretimi ile gen amplifikasyonu arasında bağlantı olduğu ve gen amplifikasyonunun meme kanserinin komedo tipi için erken bir genetik bulgu olduğu gösterilmiştir (Öztürk, 2006).

2.4.2.7. Östrojen ve progesteron reseptörleri

Pubertede meme büyümesi östrojenin doğrudan etkisine bağlıdır. Östrojenler memenin hem yağ oranını artırarak hem de bezlerin proliferasyonuna yol açarak memede büyüme sağlamaktadır. Östrojen özellikle duktusların ve stromanın gelişimini arttırırken, progesteron daha çok asinusların gelişimine neden olmaktadır (Tavassoli, 1999).

Östrojen reseptörü meme gelişimi, büyümesi ve diferansiyasyonunda rol alan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. Östrojen ve progesteron reseptörleri intrasellüler proteinler olup, konsantrasyon değişimine bağlı olarak dolaşımdan hücre içine alınan hormon molekülüne seçici olarak bağlanır ve hormon-reseptör kompleksini oluştururlar. Aktive olan hormon-reseptör kompleksi nükleus içinde hormon yanıt elementleri olarak adlandırılan DNA dizilerine bağlanır ve hormon aktivitesini sağlayan transkripsiyonu gerçekleştirir (Moshin, 2006, Tavassoli, 1999).

Meme kanserlerinde hormon reseptörlerini göstermenin iki önemli yolu bulunmaktadır. Bunlar frozen kesitlerde ligand bağlama yolu (LBA) ve immunohistokimyasal boyamadır. Son yıllarda immunohistokimya daha tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. İmmunohistokimyasal yöntemle östrojen ve progesteron reseptörü ile nükleer boyanma gözlenmektedir.

2.5. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar; DNA dizisinde bir değişim içermeyen ve hücre döngüsü boyunca gerçekleşen kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik değişiklikler; genetik modifikasyonlardan farklı olarak geri dönüşebilme potansiyellerine sahip olma, genomda yakındaki bir diğer gen grubunu etkileyebilme ve çevre ile modifiye edilebilme gibi ortak özelliklere sahiptirler (Feinberg, 2004).

Epigenetik değişiklikler; Histon modifikasyonları, RNA aracılı gen susturulmaları ve DNA metilasyonu olarak 3 temel grupta toplanır (Peedicayil, 2006).

2.5.1. Histon modifikasyonları

Histonların post-transkripsiyonel modifikasyonları, metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubikutinasyon/sumolasyon ve ADP-ribozilasyonudur (Lu vd., 2006).

Metilasyon: Histonlarda Lizin ve Arjininin azot atomlarında post-translasyonel olarak gerçekleşen kovalent bir modifikasyondur. Histon H3 ve H4'te birkaç rezidüde meydana gelen Lizin metilasyonu; transkripsiyon aktivasyonu boyunca nükleozom değişikliklerini sağlayan "Chromatin Remodeling"e neden olur. Arjinin metilasyonu ise çeşitli genlerin transkripsiyonel aktivitesi ile ilişkili olup, bu aktivasyonun histon asetilasyonu ile olan birlikteliği gösterilmiştir (Santos-Rosa vd., 2005).

Asetilasyon/deasetilasyon ile kromatin katlanmalarının değişimi ve transkripsiyon koregülatörler için spesifik bağlanma yüzeylerinin oluşumu sağlanarak gen ifadesi düzenlenir. Histonların asetilasyonu, transkripsiyon faktörleriyle promotora özgü gen ifadesinin aktivasyonunu sağlar. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu; Histon Asetil Transferaz (HAT) ile Histon Deasetilaz (HDAC) enzimleri ile regüle edilir (Ducasse vd., 2006).

Fosforilasyon: Kovalent bir post-translasyonel modifikasyon olan bu mekanizma için fosforillenecek olan başlıca substrat histon H3'tür. Histon H3'ün amino terminalinde bulunan 10. pozisyonundaki Serin'in fosforillenmesi, perisentrik heterokromatide, kromozom kondensasyonunun başlatılması için gereklidir (Santos-Rosa vd., 2005).

Ubikutinasyon ve Sumolasyon: Histon Lizin rezidülerinin amino grubu ubikutin ve ubikutin benzeri proteinler (SUMO) yoluyla modifiye edilebilir. Histon ubikutinasyonu genellikle artan gen ifadesiyle ilişkili iken, Histon sumolasyonu ise azalmış gen ifadesi ile ilişkilidir (Santos-Rosa vd., 2005).

ADP-Ribozilasyonu; DNA hasarına karşı oluşan hücresel cevaplarda yer alan post-translasyonel bir modifikasyondur. Negatif yüklü poli-ADP-riboz zincirinin, DNA ile histonlar arasındaki etkileşimi azaltarak, kromatide bölgesel açılmalara neden olduğu düşünülmektedir (Morin, 1999).

2.5.2. RNA aracılı gen susturulması

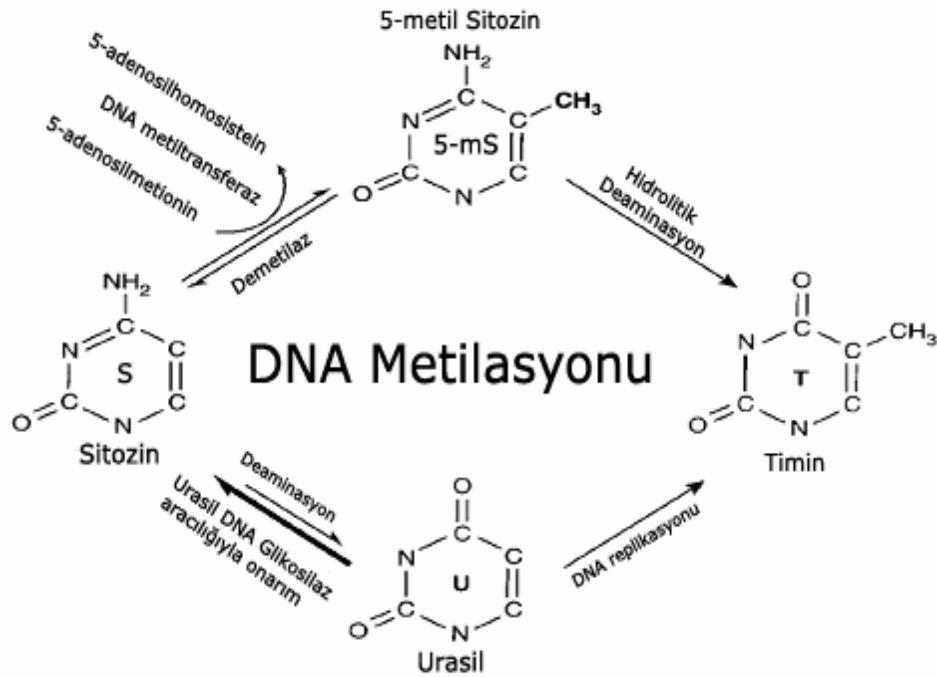
Antisense transkript, kodlanmayan RNA ve siRNA'lar olarak çeşitli formlarda bulunan RNA; histon modifikasyonu ve DNA metilasyonunu kolaylaştırarak, gen ifadelerinin susturulmasını indükleyebilir (Peedicayil, 2006).

Promotor bölgelerinde CpG adacıklarını hedef alan kodlanmayan (Non-Coding) RNA, gen ifadesinde etkili olan DNA ve Histon Metilasyonu ile birliktelik göstererek etki eder. Ancak, transkripsiyonel aktivite açısından non-coding RNA'nın etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir (Ducasse vd., 2006). Küçük müdahaleci RNA (siRNA) (Small Interfering RNAs) ise mRNA degradasyonunun hedeflenmesi yoluyla genlerin sessizleştirilmesinde etkin olan bir molekül olarak tanımlanmıştır (Lu vd., 2006). Bu RNA'nın, gen aktivasyonunun fizyolojik regülasyonu ve immün savunma olmak üzere iki önemli işlevi vardır. Ribonükleik asit interferansın akciğer ve meme kanser hücrelerinde, DNMT1 protein ekspresyonunu “downregüle” ettiği tespit edilmiştir (Lu vd., 2006).

2.5.3. DNA metilasyonu

İnsanda başlıca epigenetik değişiklik, CpG dinükleotitleri içinde bulunan sitozinlerin metilasyonudur (Etseller vd., 2002). Bazı memeli genleri, DNA dizilerindeki metilasyonla sessizleştirilir. Ayrıca, memeli genomunun büyük bölümü bu yolla işaretlenir (imprint) ve DNA metilasyonu sıklıkla heterokromatin bölgelerde görülür (Watson vd., 2004). Epigenetik bir mekanizma olan genlerin CpG adacıklarının metilasyonu, kanserde gen susturulmalarında; gen delesyonu ve gen mutasyonları ile eşit öneme sahip olarak görülmektedir (Melki vd., 2002).

Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon, DNA replikasyonundan sonra meydana gelir ve bu olay DNMT1 (DNA metiltransferaz) enzimi tarafından katalizlenir. Deoksiribonükleik asit metiltransferaz enzimi, genomik DNA'daki CpG dinükleotitlerini (CpG adacıkları) substrat olarak kullanır. Memeli DNMT1 enzimi, DNA'daki hemimetile bölgelere karşı yüksek afiniteye sahip olmasına karşı ayrıca metile olmamış bölgelerde de de novo metilasyona neden olabilmektedir (Melki vd., 2002).



Şekil 2.1. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-metilsitozin mutagenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi (Singal vd., 1999).

2.5.3.1. CpG adacıkları

İnsan genomunda CpG dinükleotidince zengin bölgelere CpG adacıkları denir. Bu adacıklar, genellikle tüm normal dokularda metile değildir ve genlerin 5' ucunda (promotor, ifade edilmeyen bölge- UTR, ekzon- 1) bulunur (Etseller vd., 2002).

Bu adacıklar ilk olarak, restriksiyon enzimi HpaII için kesim bölgesine sahip kısa genomik DNA bölgeleri olarak tanımlanarak, "HpaII Tiny Fragment (HTF) adacıkları" olarak adlandırılmıştır. Genomun yaklaşık % 2'sini oluşturan bu adacıklar 1-2 kb uzunluğunda kısa DNA bölgeleridir. Bu bölgeler, % 60- 70 oranında guanin ve sitozone (GC) zengin dizilere sahiptir (Melki vd., 2002). Adacıkların metilasyon içeriği ve modeli hem türe, hem de dokuya özgüdür. Normal insan doku DNA'sında 5-metilsitozinin oranı; HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ve HCPE (High Performance Capillary Electrophoresis) ile yapılan ölçümlerde % 0.75-1 olarak bildirilmektedir (Etseller vd., 2002).

Genomun yaklaşık % 2'sini oluşturan bu adacıklar, "housekeeping" genleri olarak bilinen temel genlerde, dokuya özgü genlerin 5'promotor bölgelerinde ve ayrıca bazı genlerin 1.ekzonlarında bulunmaktadır. İnsan genomunda bu şekilde tanımlanmış 45.000 CpG adacığı bulunmaktadır (Melki vd., 2002). Genomun yaklaşık % 2'sini

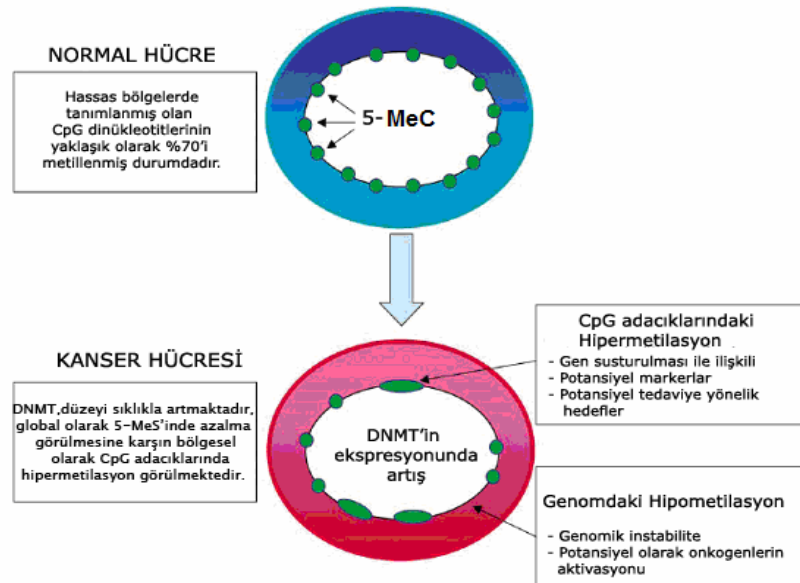
oluşturan bu adacıklar normalde; işaretlenmiş (imprint) genler, kadınlarda X kromozom genleri, eşey hücrelerine özgü genler ve dokuya özgü genler olmak üzere 4 durumda metiledir (Etseller vd., 2002).

Metilasyon durumunun hücre tipine özgülüğü, farklı malignansiler arasında sıklıkla görülür. Lösemide, CpG adacıklarındaki sitozinlerde metilasyon artışları; hipermetilasyon ve hücre tipi özgülüğünden kaynaklanır (Melki vd., 2002).

Hipermetilasyonla gerçekleşen sessizleşme; DNA tamiri (hMLH1, BRCA1, MGMT), hücre döngüsü ve apoptoz (DA PK, APAF-1) gibi, hücresel iletişimdeki tüm yolları etkiler (Etseller vd., 2002).

2.5.3.2. Kanserde metilasyon profili

Genelde tümör baskılayıcı genlerde, metilasyonun artması, DNMT enzimlerinin yükselmesi ile birlikte gözlenir. Deoksiribonükleik asit metiltransferaz 1'in artışı, ilk kez kolon kanserinde rapor edilmiştir. Ayrıca DNMT1 aktivitesinin insan kolon kanseri dışında akciğer kanserlerinin ileri aşamasında ve lösemili hastaların olgunlaşmamış hücrelerinde de arttığı gösterilmiştir (Melki vd., 2002). Kanserli hücrelerin DNA'sında 5-metilsitozin (5-MeC) miktarında azalma görülmektedir. Ancak bazı bölgelerde; örneğin tümör baskılayıcı genlerde, DNA hipermetilasyonu saptanmıştır. Buna karşın DNA hipometilasyonu ile de onkogen aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu değişim solid tümörlerde olduğu gibi lösemilerde de bildirilmektedir (Melki vd., 2002).



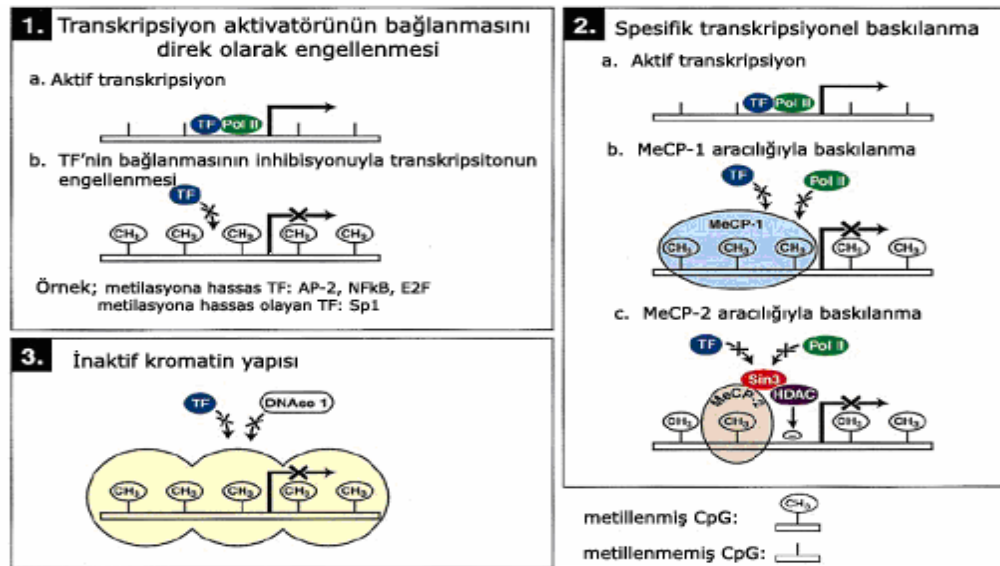
Şekil 2.2. Kanserde metilasyon görünümü (Herrmann vd., 2006).

2.5.3.3. DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonun baskılanma mekanizmaları

Transkripsiyon aktivatör faktörünün bağlanmasına direk müdahale: AP-2, C-MYC/MYN, cAMP-bağımlı aktivatör CREB, E2F ve NF- κ B gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin tanıyıp bağlandığı bölgeler, CpG rezidüleri içermektedir. Bu bölgelerde meydana gelen metilasyon sayesinde transkripsiyon faktörleri bağlanamadığından transkripsiyon inhibe olur. Buna karşın, bazı transkripsiyon faktörleri (örneğin; Sp1 ve CTF) bağlanma bölgelerindeki metilasyona duyarlı değildir ve birçok faktöründe bağlanma bölgesinde CpG dinükleotid rezidüleri bulunmamaktadır (Singal vd., 1999).

Spesifik transkripsiyonel baskılanma: Spesifik transkripsiyonel represörün, metillenmiş DNA'ya direk bağlanmasıyla meydana gelir. Bu özelliğe sahip iki faktör MeCP-1 ve MeCP-2 (metil sitozine bağlanma proteini 1 ve 2), herhangi bir dizide metillenmiş CpG rezidülerine bağlanarak inaktivasyona neden olur (Singal vd., 1999).

İnaktif Kromatin Yapısı: DNA metilasyonu, kromatin yapısında değişiklikler meydana getirerek transkripsiyonu engelleyebilir. Heterokromatin bölgelerin oluşumunda ve genomun sıkı bir şekilde paketlenmesinde DNA metilasyonu önemli rol oynamaktadır. Heterokromatin bölge içerisinde yer alan genler genellikle ifade bulamazlar (Singal vd., 1999).



Şekil 2.3. Sitozin metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel susturulma mekanizmaları (Singal vd., 1999).

2.5.3.4. DNA metilasyonunun kanser gelişiminde etkilediği mekanizmalar

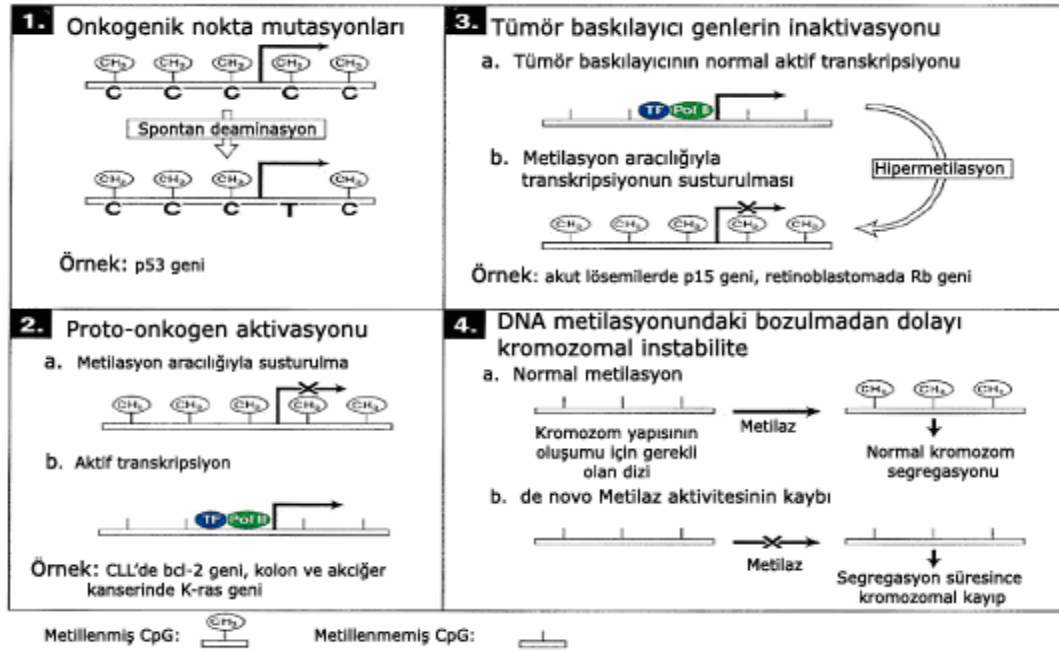
Kanser hücrelerindeki C _ T dönüşümü: Metile olmamış C, deaminasyon sonucu U'ye dönüşür. Ancak Urasil-DNA glikosilaz enzimi sayesinde G:U yanlış eşleşmesi tanınır ve onarılır. Bununla birlikte, DNMT enzimi bu onarımı bloklamaktadır. Deoksiribonükleik asit metiltransferaz enzimi CpG adacıklarındaki sitozinlere (C) metil grubu ekler. 5MeC'in deaminasyonu sonucunda T bazı oluşur. Ancak bu dönüşüm DNA'da tanınarak onarılamaz ve böylece nokta mutasyonları meydana gelir. Bu olaya tümör baskılayıcı gen olan P53 örnek verilebilmektedir.

İnsan solid tümörlerinin % 50'sinden fazlasında P53 tümör baskılayıcı geninde mutasyon görülmektedir ve bunların % 24'ünü, CpG adacıklarındaki CT dönüşümü oluşturmaktadır (Singal vd., 1999).

DNA hipometilasyonu: Genomik metilasyon düzeyindeki düşüş bir diğer mekanizmadır. Bu olay sonucunda metilasyon aracılığıyla inaktifleşmiş olan genler, metilasyonun kalkması ile aktif duruma geçerler. Bunlara kronik lenfoid lösemilerdeki BCL-2 onkogeninin reaktivasyonunu örnek verebiliriz (Singal vd., 1999).

Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu: Deoksiribonükleik asit metiltransferaz1 düzeyindeki artış sonucunda, tümör baskılayıcı genler promotor dizilerindeki CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyon sonucunda inaktive olabilmektedir (Singal vd., 1999).

DNA metilasyonundaki bozulmadan dolayı kromozomal instabilite: Kanser gelişimi ve ilerleyişinde kromozomal instabilite oldukça önemlidir. Deoksiribonükleik asit metilasyonu ayrıca DNA'nın sıkı bir şekilde paketlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sıkı paketlenmeden dolayı örneğin transpozonların genom içerisinde hareket etmeleri engellenmiş olmaktadır. Ancak metilasyon kaybıyla, DNA sıkı bir şekilde paketlenemeyeceği için transpozonlar genomda rahatlıkla hareket ederek kromozomal instabiliteye neden olmaktadır. Ayrıca metilasyon paternindeki değişimler sonucunda ortaya çıkabilen DNA onarım genlerindeki anomaliler ve kromozomal instabiliteye neden olmaktadır (Singal vd., 1999).



Şekil 2.4. Onkogeneze, sitozin metilasyonunun neden olduğu mekanizmalar (Singal vd., 1999).

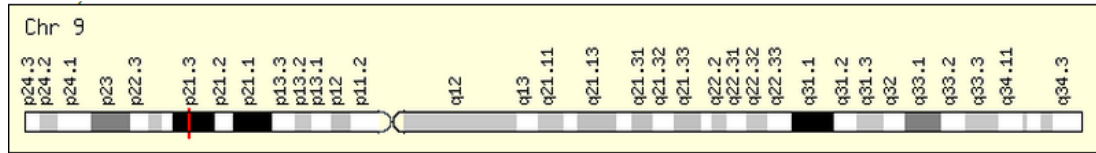
Deoksiribonükleik asit metilasyon belirteçleri (marker) , hem hastalığın sınıflandırılması hem de saptanması için kullanılabilir. Ayrıca her bir gen promotorunun DNA metilasyon durumunun belirlenmesi özel bir tedaviye cevabı tespit etmek için de kullanılabilir (Laird, 2005). Kanserdeki genetik değişikliklerin aksine epigenetik mekanizmalar geri dönüşü olabilen değişikliklerdir. Metilasyonun tersinir sürecinde, DNA'nın demetilasyonu ve sessiz genlerin yeniden etkinleştirilmesinde bazı DNA metiltransferaz inhibitörleri kullanılmaktadır.

2.6. P16 (CDKN2A) Geni

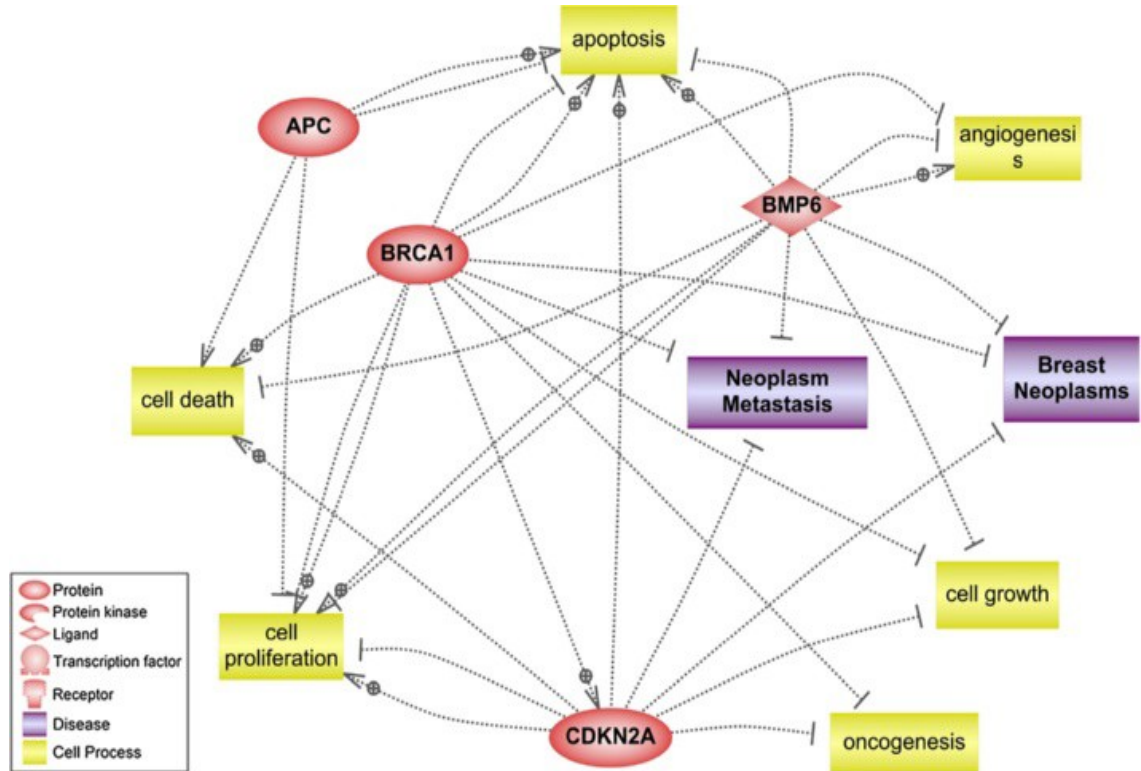
9 numaralı kromozomun kısa kolunun uzaktaki ucunda bulunan son derece özel bir kromozom lokusu tarafından sağlanır. Bu lokus CDKN2A adlı bir gen içerir ve RNA ve protein sentezi için şablon olarak aynı DNA parçalarını kullanan, birbiriyle örtüşen iki genden oluşması açısından benzersizdir. Başka bir deyişle, bu lokus, tek bir tane bile ortak amino asidi olmayan iki farklı proteinin sentezini yönetebilmektedir. Bunlardan biri p16'dır ve hücre çevriminin negatif bir regülatörüdür. P16 proteini, CDK inhibitörleri olarak adlandırılan, yani hücreleri daha hızlı çoğalmaya zorlayan enzimleri (sikline bağımlı kinazları) inhibe eden unsurlar olan bir regülatörler ailesinin üyesidir. CDK inhibitörleri, bu enzimleri bloke ederek, hücre bölünmesini engeller ve hücre

çevriminin durdurulmasını içeren bir mekanizmayı harekete geçirirler (Şekil 2.5.) (Erenoglu, 2008).

Yapılan bazı çalışmalar p16INK4a (CDKN2A) tümör baskılayıcı genin insan kanserlerinde kanserle ilişkili olup, en sık susturulan genler arasında olduğunu ve susturulmanın promotörün hipermetillenmesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. p16INK4a promotöründe metil markörlerinin plansız eklenmesi (de novo metillenme), geniş bir insan kanserleri yelpazesinde en sık saptanan epigenetik değişikliklerden biridir. Ayrıca, promotörün hipermetillenmesiyle p16INK4a geninin susturulması son derece tümöre özgüdür ve bazı kanser tiplerinde en erken olay olarak görülmektedir; bu da, bu geni önleyici stratejiler için çekici bir hedef yapar. (Erenoglu, 2008).



Şekil 2.5. Kromozom 9'da P16 (CDKN2A) lokalizasyonu (Erenoglu, 2008).



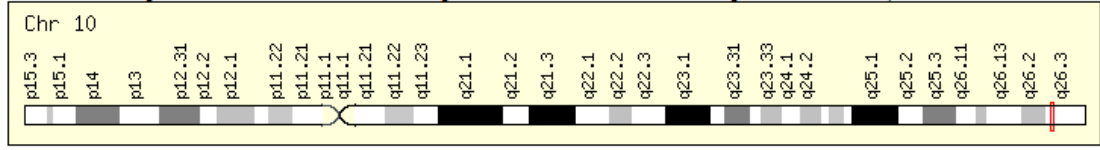
Şekil 2.6. Hipermetile genlerin sinyal yolağı analizi (Huang vd., 2013).

2.7. MGMT

Genomun 10q pozisyonunda bulunan O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) geni MGMT adı verilen bir alkil transferazı kodlar (Şekil 2.7.) (Natarajan vd., 1992). MGMT, Guaninin 6. pozisyonundaki oksijenine bağlı alkil grubunu, Cys (sistein) içeren aktif merkezine transfer ederek, metilasyonu ve diğer alkillenmeleri hızlıca geri döndürür (Pegg, 2000). İnaktif MGMT geni, alkilleyen ajanların en sitotoksik hasarı olan O⁶-alkil guanin birikmesine müsaade eder; takibinde Timidin ile yapılan yanlış eşleşme sonucu mismatch tamir tetiklenir ve DNA hasarı indüklenerek hücre ölümüne sebep olur (Ochs ve Kaina, 2000).

Proteinin translasyonu promotor bölgesinin metillenmesi ile kontrol edilmektedir. MGMT geninin metillenerek sessizleştirildiği durumda alkil gruplarının oluşturduğu DNA hasarı engellenemez ve hücre ölümü gerçekleşir. Alkilleyici ilaçlar tümör hücrelerine karşı savaşta sık kullanılırlar. Bu ilaçların oluşturacağı DNA hasarı ile tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması sağlanmaktadır. MGMT anlatımı tedaviye verilen yanıtta da önemli rol oynamaktadır. Anlatımın artışı hücrelerin DNA hasarını onararak ilacın etkisinden kurtulmaları ile sonuçlanırken, anlatımın azaldığı, proteinin metillenme yoluyla sessizleştiği hücrelerde yıkım gerçekleşir. Bu nedenle MGMT anlatımının artışı kemoterapiye karşı direnç neden olmaktadır (Watanabe vd., 2005). MGMT sessizleşmesi bulunan tümörlerde alkilguanin uzaklaştırılmadığı için replikasyon sırasında alkilguanin, sitozin yerine timin ile eşleşir ve daha sonra hasarlı guaninin yerine adeninin yerleştirilmesi ile G-C den A-T ye dönüşüm gerçekleşir (Nakamura vd., 2001).

Kolorektal kanserler başta olmak üzere birçok kanser türünde MGMT geninin ekspresyonunun düşük olduğu gözlenirken (Cordeiro vd., 2012), meme kanserinde ekspresyon düzeyinin lenfatik tutulum, östrojen reseptörü negatifliği ve uzak metastaz ile ilişkisi gösterilmiştir (Osanaı vd., 2005). Hatta, meme kanserinde prognostik belirteç olarak da önerilmiştir (Neto vd., 2012). Ancak bazı diğer çalışmalarda ise MGMT ekspresyon durumu ile fenotipi açıklamak mümkün olmamıştır (Fumagalli vd., 2012). Primer meme kanserlerinde ayrıca, MGMT ve p53 ekspresyon düzeylerinin ters orantılı olduğu da gösterilmiştir (Osanaı vd., 2005).

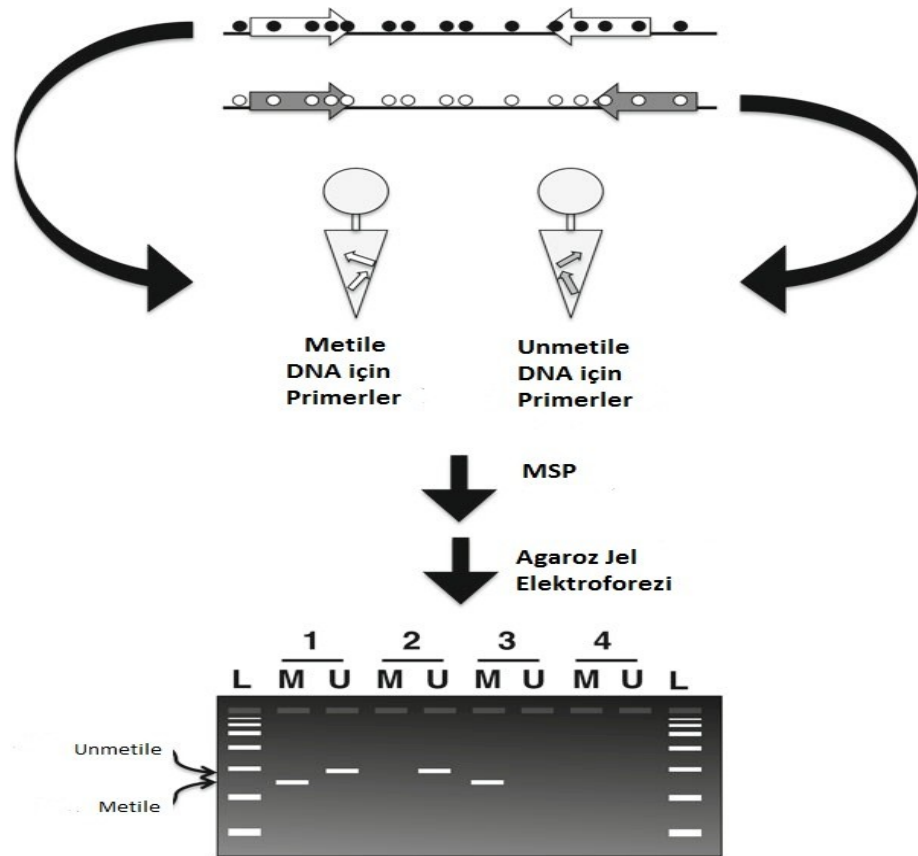


Şekil 2.7. MGMT geni lokalizasyon bölgesi (Natarajan vd., 1992).

2.8. Metilasyon-Spesifik PCR

MSP, tasarım ve uygulama kolaylığı, metillenmiş DNA'nın çok küçük miktarını tespit etmedeki hassasiyeti ve pahalı laboratuvar ekipmanlarının alımına ihtiyaç duymadan örneklerin büyük bir çoğunluğunu hızlıca tarama yeteneğini de içeren pek çok avantajıyla nitel DNA metilasyon analizi için kullanışlı bir yöntemdir (Barekati vd., 2012).

MSP, bisülfitle değiştirilmiş DNA'da metilasyon varlığının saptanması için kullanılan kalitatif bir tekniktir. Bu prosedür analiz edilecek bölgede CpG dinükleotid içeren dizilerin oturması için dizayn edilen metilasyon spesifik primer çiftlerinin 2 setini eklemek için değiştirilen standart bir PCR protokolüne dayanır. Metillenmiş DNA'yı tespit etmek için dizayn edilen primer (M primer) hedef bölgenin tamamen metillendiği varsayımı altında dizayn edilmiştir ve bu bölge CG dinükleotid sekanslarında sitozinler içerecektir. Bunun tersine, metillenmemiş DNA'yı tespit etmek için dizayn edilen primer (U primer) hedef bölgenin tamamen metillenmemiş olduğu varsayılarak dizayn edilmiştir ve bu nedenle CG dinükleotidlerinde sitozinler yerine timinleri içerir. M primerler için annealing sıcaklığı U primerden daha yüksek olacaktır. Bu, aynı CG pozisyonlarında U primerdeki timinlere karşı M primerde sitozinlerin bulunmasından dolayıdır ve DNA'da T-A hidrojen bağlarına karşı C-G hidrojen bağlarını eritmek için daha yüksek sıcaklık gereklidir. Annealing sıcaklığı U primerin 5' ucundaki bazların sayısı basit olarak arttırılarak M primere benzer şekilde U primer için arttırılabilir (Barekati vd., 2012).



Şekil 2.8. Metilasyon spesifik PCR (Barekati vd., 2012).

Metilasyon spesifik PCR bisülfitle modifiye edilmiş DNA'nın metillenmiş ve metillenmemiş versiyonu için tasarlanmış primer çiftinin 2 setinin kullanımını gerektirir. Primerlerin, ampikon ürünlerinde farkedilebilecek şekilde farklı boyutlarda dizayn edilmesi yararlıdır. PCR amplifikasyonunu takiben ampikonlar agaroz jel elektroforezinde çözülür. Varsayımsal sonuçlar şekilde gösterilmektedir. ÖRNEK 1'de hem metillenmiş hem de metillenmemiş primer setleri için ampikonlar gösterilmektedir; ÖRNEK 2 sadece unmetile DNA'yı içerir; ÖRNEK 3 sadece metile DNA'yı içerir; ÖRNEK 4 negatif kontrol; L DNA ladder (Barekati vd., 2012).

İki primer seti genel olarak ayrılmış reaksiyonlarda template DNA'yı amplifiye etmek için kullanılır, dikkatli dizayn ve optimizasyon ile de MSP'de iki primer setinin multiplekslenmesi mümkündür. Bu durumda, dizayn edilen M ve U primer çiftleri öyleki üretilen ampikonların agaroz jel elektroforezinde ayrımın net olarak sağlanabilmesi için yeterince farklı boyutlarda olmalıdır. Bu aynı template ve reaksiyon mix'inden amplifikasyon sağlanmasının yararı vardır. (Fakat bu yaklaşım bazı

kısıtlamalara sahiptir. PCR'ı takiben template DNA'da metilasyonun varlığını ya da yokluğunu tespit etmek amacıyla etidyum bromid boyamasından sonra bantların kalitatif olarak varlığı UV altında görüntülenir. Burada açıklandığı gibi MSP kantitatif olmadığı için, burada sonuçlar metilasyonla ilgili olarak “var ya da yok” şeklinde bilgi verir. Metilasyon analizi için primer tasarlamak zor olabilir, çünkü analiz edilecek sekans genellikle CG zengindir ve non-CG sitozinlerin urasile dönüşümü nedeniyle bisülfite modifikasyonundan sonra karmaşıklık azaltılmıştır. MethPrimer, özellikle metilasyon çalışmaları için bir primer tasarım aracıdır. Bu software aynı zamanda MSP ve bisülfite dizileme için primer tasarımında öneriler sunar. Seçilen genomik dizi basit bir şekilde kopyalanıp yapıştırılabilir; bu software sonra bir siliko bisülfite dönüşümünde gerçekleştirir ve primer pozisyonları ve sekansları için öneriler sağlar. Parametre ayarları hedef boyut, hariç bölgeler, ürün olan primer çiftlerinin sayısı, primer Tm'si, primerde bulunan CG sayısı, primerde bulunan non-CG sayısı ayrıca MSP için max farklılığını içerir (Barekati vd., 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hasta Grubu

Çalışmamızda Bağcılar Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Ana Bilim Dalı'ndan meme kanseri tanısı alan ve Bağcılar Araştırma ve Uygulama Hastanesi genel cerrahide opere edilen 96 hastanın doku örnekleri çalışılmıştır. Örnekler parafin bloğa gömülü doku kesiti olarak 1,5 ml'lik tüpler içinde laboratuvarımıza gelmiştir. Çalışmaya aynı hastaların normal doku kesitleri de dahil edilmiştir. Çalışmamız Temmuz 2012-Mayıs 2014 tarihleri arasında Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Meme kanserli olguların doku örneklerinde P16 (CDKN2A), MGMT geninin promotor bölgelerindeki metilasyon durumları MSP yöntemi ile incelenmiştir.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan aletler

- Pipet takımı (Thermo Scientific, Biohit Proline Plus)
- PCR aleti (Thermal Cycler) (Thermo Scientific ARTIK, Techne Tc-Plus)
- Vorteks (JEIO TECH, Lab Companion)
- Santrifüj (Thermo Scientific, MicroCL 21R)
- Jel dökümantasyon cihazı (Gel Logic, 212 PRO Carestream)
- Hassas Terazı (Pioneer, Ohaus)
- Deep- freze (-20, Bosch)
- Buzdolabı (+4, Regal)
- Panasonic (-86)
- Jel elektroforez (Cleaver Scientific, MAX FILL)
- Mikro dalga (Kenwood)
- Buz makinası (Hoshizaki)
- BioSpec-Nano (Shimadzu-Biotech)
- Otoklav (Nüve Steam Art, OT-90L)
- Pastör Fırını (Lab Companion, ON-12)
- Distile Su Cihazı (Nüve, NS103)
- Termal Çalkalamalı İnkübatör
- Ph metre (Lab Companion, ST-310 Onaus)

- Ependorf tüpü (1.5 ml'lik)
- Micro amplifikasyon tüpü (0.2 ml'lik)
- Collection tüp (2 ml'lik)

3.2.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

- DNA Methylation-Gold Kit (Zymo-Research)
- DNA Isolation Nucleospin FFPE DNA Kit (Macherey-Nagel)
- CpGenome Universal Methylated DNA
- CpGenome Universal Unmethylated DNA
- MGMT ve P16 genleri Forward ve Reverse Primer Çifti
- Proteinaz K
- Lizis Buffer
- 1x TAE
- DNase/RNase Free Water (Gibco)
- Distile Su
- Ksilol
- % 70' lik etil alkol
- % 100' lük etil alkol
- SIGMA Trizma Base
- EDTA (Carlo Erba Reagents)
- Agarose Basic (AppliChem)
- Ethidium Bromide (AppliChem)
- 6x loading Dye Solution (Intron Biotechnologiy)
- 50 bp DNA Leadder (Invitrogen)
- 10x PCR Reaction Buffer (Invitrogen)
- 50 mm MgCl₂ (Invitrogen)
- Platinum Taq DNA polimeraz (Invitrogen)

3.2.3. P16 (CDKN2A) geni metilasyon analizinde kullanılan primerler

Çizelge 3.1. P16 genine ait metile ve unmetile primer çifti dizileri ve bölgeleri.

Metile Forward	5'-CAGGGCTCAGAGCCGTTCCGA-3'	(-172, -152)
Metile Reverse	5'-AGGGTCACCAAGAACCTGCGCA-3'	(+78, +99)
Unmetile Forward	5'-GTAGGGTTTAGAGTCGTTTCGA-3'	(-173, -152)
Unmetile Reverse	5'-AAAATCACCAAAAACCTACGCA-3'	(+78, +99)

P16 genindeki promotor bölge hipermetilasyonunu belirlemek için; Çizelge 3.1. deki primerler kullanılmıştır. Liyofilize halde ve 0.04 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan P16 (CDKN2A) metile forward primeri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde firmanın önerisi olan 1131 µl; PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözülmüştür ve bloklanarak eşit hacimler halinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. MGMT geni metilasyon analizinde kullanılan primerler

Çizelge 3.2. MGMT genine ait metile ve unmetile primer çifti dizileri ve bölgeleri.

Metile Forward	5'-GCCCCGCTCTAGACCCCGCC-3'	(-68, -45)
Metile Reverse	5'-GCGGGCTGTCCCAGCATATCCGG-3'	(-6, +17)
Unmetile Forward	5'-TTTCGT TTTAGATTTCGTTTTACG-3'	(-67, -44)
Unmetile Reverse	5'-CGCGAACTATCCCAACATAT-3'	(-6, +18)

MGMT genindeki promotor bölge hipermetilasyonunu belirlemek için; Çizelge 3.2. deki primerler kullanılmıştır. Liyofilize halde ve 0.04 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan MGMT metile forward primeri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde firmanın önerisi olan 1314 µl; PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözülmüştür ve bloklanarak eşit hacimler halinde -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Parafinli doku örneklerinden DNA elde edilmesi

Çalışmamıza Bağcılar Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan meme kanseri tanısı alan ve Bağcılar Araştırma ve Uygulama Hastanesi genel

cerrahide opere edilen meme karsinomu olarak rapor edilen 96 hastanın tümörlü ve komşu normal dokuları, parafin bloğa gömülü doku kesiti olarak 10 mikrotom'luk incelikte kesilmiş 1,5 ml'lik tüpler içinde laboratuvarımıza gelmiştir. Çalışmamız Temmuz 2012-Mayıs 2014 tarihleri arasında Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.1. Deparafinizasyon işlemi

- İçinde parafin bloğa gömülü dokular bulunan 1,5ml'lik tüplere 1200 µl ksilen eklenmiştir.
- .-20 sn vorteks yapılmış ve örnekler 20 °C'de 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılarak aynı işlem 2 defa tekrarlanmıştır.
- Pelet üzerine 1200 µl % 100'lük etanol eklenmiştir.
- 20 sn vorteks yapılmış ve örnekler 20 °C'de 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılarak pelete 1200 µl % 70'lik alkol eklenmiştir.
- 20 sn vorteks yapılmış ve örnekler 20 °C'de 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Alkol iyice uzaklaştırılıp örnekler 30 dk pastör fırınında bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında örneklere 200 µl Lysis Buffer (FL), 20 µl P roteinaz K eklenmiştir.
- Bu işlemlerden sonra elde edilen ürün 70-72 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatöre 16 saat boyunca bırakılır.

3.3.1.2. DNA izolasyonu

- Deparafinizasyon işleminden sonra doku örneklerinden DNA eldesi manuel DNA izolasyonu ile yapılmıştır.
- Bir gece çalkalamalı inkübatörde bekletilen ependorflara 100 µl decrossling buffer eklenir ve ependorflar 5- 10 sn vorteks edilmiştir.
- Ependorflar 90 °C'de pastör fırınında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrası 5- 10 sn vorteks edilmiştir.
- Ependorflara 200 µl % 96'lık etanol eklenir, 5- 10 sn vorteks edilmiştir.
- 11.000 g 'de spin yapılır ve tüp içindeki sıvı pipetaj yapılarak kolonlara aktarılmıştır.
- 7000 rpm'de 3dk santrifüj yapılmıştır.
- 400 µl wash buffer eklenir ve 11.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılır. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

- Son olarak 32 µl elution buffer eklenerek DNA kolon membranından geçirilmiştir.
- DNA izolasyon işlemi tamamlanmış DNA örnekleri Nanodrop (Shimadzu-Biotech)'da ölçümleri yapıldıktan sonra -20 °C'de saklanır.

3.3.2. Bisülfıt modifikasyon işleminin gerçekleştirilmesi

Bir DNA sekansının metilasyon durumunu saptamak için kullanılan en iyi yöntem bisülfıt modifikasyon işlemidir. Hedef DNA'nın sodyum bisülfıt ile inkübasyonu sonucu unmetile olan sitozinler urasile dönüşürken metile sitozinler değişmeden kalır.

	Orijinal sekans	Bisülfıt işlemi sonrası
Unmetile DNA	A-C-G-A-C-G-A-C-G-A	A-U-G-A-U-G-A-U-G-A
Metile DNA	A-C-G-A-C-G-A-C-G-A	A-C-G-A-C-G-A-C-G-A

CT conversion reagent

Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA'dan 20 µl alınmıştır. Alınan örnekler 200 µl'lik PCR tüplerine aktarılmıştır.

- 900 µl distile su
- 300 µl M-dilution buffer
- 50 µl M-dissolving buffer

konularak hazırlanmıştır.

CT conversion reagent homojen hale gelene kadar 15 dk kadar vortekslenir.

PCR tüplerine 20 µl DNA eklenir. Pipetaj yapılarak CT conversion reagent ile DNA'nın karışması sağlanır.

Hazırlanan örnekler ile PCR başlatılır.

PCR şartları:

98 °C	10 dk	denatürasyon
64 °C	150 dk	bağlanma
4 °C	∞	inkübasyon

- 600 µl M -Binding Buffer kolon tüplerine aktarılmıştır.
- Üzerine PCR ürününün hepsi eklenerek 9000 g'de 1dk santrifüj edilmiştir.
- 100 µl Wash Buffer eklenir ve 9000 g'de 1dk santrifüj edilmiştir.
- 200 µl M-Desulphination Buffer eklenir ve oda sıcaklığında yaklaşık 15-20 dk beklenir.
- 9000 g'de 1dk santrifüj edilerek spin filtresinden alt tarafa süzülen sıvı dökülmüştür.

- 200 µl M -Wash Buffer eklenir ve 9000 g'de 1dk santrifüj edilerek spin filtresinden alt tarafa süzülen sıvı dökülmüştür.
- Tekrar 200 µl M–Wash Buffer eklenir ve 9000 g'de 1dk santrifüj edilerek spin filtresi 1.5 µl'lik toplama tüplerine aktarılmıştır.
- 16 µl Elution Buffer filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konularak 9000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Modifikasyon ürünleri -20 °C'de saklanır.

3.3.3. MSP

Bisülfıt modifikasyon işlemi sonrasında MSP tekniğı uygulanmıştır. Bu teknikte modifikasyona tabi tutulan DNA'ların Thermo SCIENTIFIC PCR cihazı ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bisülfıt işleminden sonra elde edilen ürünlerin PCR amplifikasyonu için:

- PCR tüpü içerisine sırasıyla:

38.9 µl H₂O

5 µl Buffer

1 µl dNTPmix

1,5 µl MgCl₂

0.2 µl Forward primer

0.2 µl Reverse primer

0.2 µl Taq polimeraz (Platinum) konularak pipetaj yapılmıştır.

3 µl modifiye edilen DNA örneğı eklenmiştir ve pipetaj yapılmıştır.

Ayrıca yapılan PCR işleminin kontrolü için kontrol grupları kullanılmıştır. kontrol grupları hazırlanırken CpGenome Universal Methylated DNA ve CpGenome Universal Unmethylated DNA kitlerinden yararlanılmıştır. Bu kitler bisülfıt işleminden geçirilerek % 100 metile ve % 100 unmetile kontrol grupları hazırlanmıştır.

% 100 metile kontrol grubunun hazırlanması

Bisülfıt işleminden sonra elde edilen % 100 metile kontrol grubunun PCR amplifikasyonu için:

- PCR tüpü içerisine sırasıyla:

38,9 µl H₂O

5 µl Buffer

1 µl dNTPmix

1.5 µl MgCl₂

0,2 µl Forward primer

0,2 µl Reverse primer

0,2 µl Taq polimeraz (Platinum)

3 µl modifiye edilen %100 metile DNA örneği eklenmiştir ve pipetaj yapılmıştır.

% 100 unmetile kontrol grubunun hazırlanması

Bisülfid işleminden sonra elde edilen %100 unmetile kontrol grubunun PCR amplifikasyonu için:

-PCR tüpü içerisine sırasıyla:

38,9 µl H₂O

5 µl Buffer

1 µl dNTPmix

1,5 µl MgCl₂

0,2 µl Forward primer

0,2 µl Reverse primer

0,2 µl Taq polimeraz (Platinum)

3 µl modifiye edilen % 100 unmetile DNA örneği eklenmiştir ve pipetaj yapılmıştır.

-PCR koşulları:

% 100 metile kontrol, % 100 unmetile kontrol, 96 hastaya ait tümörlü ve normal dokudan elde edilmiş DNA örnekleri aşağıda belirtilen koşullarda PCR işlemi yapılmıştır.

-P16 (CDKN2A) geni için;

94 °C 7 dk ilk denatürasyon

94 °C 30 sn denatürasyon

60 °C 30 sn bağlanma

72 °C 45 sn elongasyon

72 °C 5 dk son elongasyon

4 °C ∞ inkübasyon

35 döngü

-MGMT geni için;

94 °C 7 dk ilk denatürasyon

94 °C 30 sn denatürasyon

62 °C 30 sn bağlanma

72 °C 45 sn elongasyon

72 °C 5 dk son elongasyon

4 °C ∞ inkübasyon

35 döngü

3.3.4. Agaroj jel elektroforezi

1 litrelik 50x TAE buffer içeriği:

- 242 g Tris base

- 100 ml 0,5 M EDTA(Etilen Diamin Tetra Asetik asit) pH 8,0

- 57,1 ml Glasiyal Asetik Asit

Tris base'dan 242 g tartılır. Glasiyal asetik asitten 57,1 ml, 0,5 M EDTA'dan 100 ml alınır ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır. Böylece 50x stok TAE elde edilir. Kullanılırken stoktan 20 ml alınıp, 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır. Böylece 1x TAE elde edilmiş olur.

% 3'lük jel hazırlanması

- 6 g agaroj

- 200 ml 1x TAE buffer

- 2,5 µl etidyum bromid

6 g agaroj hassas terazi yardımıyla tartılmıştır. Bir erlen içerisine eklenmiş ve üzerine 200 ml 1x TAE buffer eklenmiştir. Agarozun buffer içerisinde karışması sağlanmıştır ve mikrodalga fırında homojenize hale getirilmiştir. Homojenize hale getirilen jel içerisine 2,5 µl etidyum bromid eklenip, karıştırılmıştır. Tarak yerleştirilip, agaroj jel tablasına dökülüp jelin donması beklenmiştir.

3.3.5. PCR ürünlerinin görüntülenmesi

PCR amplifikasyonundan sonra kuyucuklara sırasıyla; 1 µl loading buffer + 2 µl 50 bp DNA marker (invitrogen), 1 µl loading buffer + kontrol amaçlı 2 µl H₂O, 1 µl loading buffer + 5 µl metile kontrol, 1 µl loading buffer + 5 µl unmetile kontrol ve 1 µl loading buffer + 5 µl PCR ürünleri 2.5 µl etidyum bromid ile boyanmış % 3'lük agaroj jeline yüklenen örnekler 90 V'da 1 saat yürütülmüştür.

Yürütülen örnekler jel görüntüleme cihazında görüntülenir.

3.3.6. İstatiksel analiz

Tüm veri analizleri SPSS 17.0 paket programı ile yapılmıştır. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, Nitel veriler ise n ve oran olarak ifade edilmiştir. Normal dağılım gösteren sürekli veriler grup sayısına bağlı olarak bağımsız yapıdaki verilere t testi ile analiz edilmiş olup normal dağılım göstermeyen verilerin grup sayılarına göre bağımsız gruplardan oluşan verilere ise, Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Kategorik yapıdaki veri setlerine ise 2 Proportions Testi yapılmıştır. Olasılık değerleri;

$P > 0,05$ ns

$P < 0,05$ önemli düzeyde farklılık

$P < 0,01$ çok önemli düzeyde farklılık

$P < 0,001$ ileri düzeyde farklılık olarak değerlendirilmiştir.

3.3.7. Değerlendirme

Çalışmamızda meme kanserli 96 olgudan alınan parafin bloğa gömülü doku örneklerinin DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bu örneklerin bisülfite modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler P16 geninin metilasyon durumu incelenmek üzere Thermo Scientific cihazına yüklenmiş ve analizleri yapılmıştır. Örnekler kontrol grupları % 100 metile ve % 100 unmetile olarak belirlenmiştir. Kontrol gruplarından P16 (CDKN2A), MGMT genlerinin metilasyon durumu tespit edilmiştir.

Hastalar yaş, hastalığın evresi, tümör tipi, ER, PR, Cerb-B2, E-Cadherin, Ki-67 gibi meme kanserinde önemli olan bazı prognostik faktörlere göre gruplandırıldıktan sonra örneklerin metilasyon durumu ile bu prognostik faktörler karşılaştırılmıştır.

4.BULGULAR

Çalışmamızda Temmuz 2012-Mayıs 2014 tarihleri arasında Bağcılar Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan gelen meme kanseri tanısı almış 96 olgudan alınan doku örneklerine MSP yöntemi kullanılarak metilasyon analizi yapılmıştır. Olguların yaşları, evreleri, tümör tipleri, ER, PR ve C-erb-B2 gibi prognostik faktörleri hasta dosyalarından temin edilmiştir. Çalışmamız meme kanserli hastaların P16 ve MGMT genlerinin metilasyon durumunu belirleyerek meme kanseri için geliştirilecek tedavi yöntemlerine de ışık tutmak, hastalığın evresi ve prognozu arasında ilişki kurabilmek, hastalarımıza ait demografik ve histopatolojik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek amacıyla yapılmıştır.

4.1. Olguların Demografik ve Patolojik Özellikleri

İncelemeye alınan 96 olgunun 43/96'sü (% 44,8) ≥ 50 yaş iken; 53/96'sü ise (% 55,2) < 50 yaş olarak saptanmıştır.

Olgular TNM sınıflandırmasına göre evre II, evre III olarak gruplandırılmıştır. Tümör örneklerinin evrelerine göre dağılımlarında ise en çok evre III, 83/96 (% 86,5) gözlenmiştir. 13/96 (% 13,5), evre II olarak belirlenmiştir.

Olgular tümör tipine göre değerlendirildiğinde; 88/96 (% 91,7) olgu invaziv duktal karsinom 3/96 (% 3,1) olgu invaziv lobüler karsinom, olgu duktal karsinom in situ 1/96 (% 1,0), olgu tubüler karsinom 1/96 (% 1,0), olgu metaplastik karsinom 2/96 (% 2,1), olgu müsinöz karsinom 1/96 (% 1,0) tümör tipindedir.

Östrojen reseptör (ER) durumu ve meme kanserinde metilasyon arasındaki ilişki incelenmek amacıyla hastalar ER(+) ve ER(-) olarak gruplandırıldığında ise; olguların 73/95 (% 76,8) ER(+) iken, 22/95 (% 23,2) olguda ER(-) olarak saptanmıştır.

Progesteron reseptör (PR) durumları değerlendirildiğinde olguların 70/95 (% 72,9) PR(+) iken, 25/95 (% 26) olgu PR(-) olarak belirlenmiştir.

Meme kanserinde önemli bir prognostik faktör olarak değerlendirilen C-erb-B2 durumları değerlendirildiğinde ise olguların 71/95 (% 74,7) C-erb-B2(+) iken, 24/95 (% 25,3) C-erb-B2(-) olarak saptanmıştır.

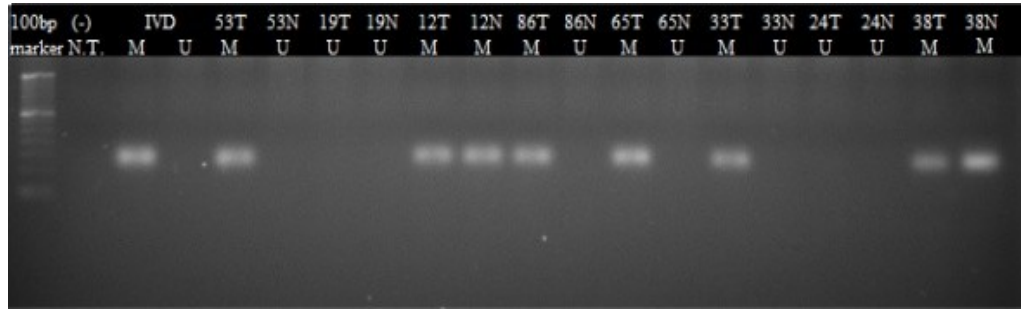
E-Cadherin durumları değerlendirildiğinde olguların 62/66'si (% 93,9) (+) iken, 4/66'si (% 6,1) (-) olarak belirlenmiştir.

96 hastanın metilasyon analizine ait jel görüntüleri bulunmaktadır fakat tezimizde sadece belirli sayıdaki jel görüntüsüne yer verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların klinik özellikleri.

HASTALARIN DEMOGRAFİK	HASTA SAYISI
YAŞ	
< 50	43
≥50	53
CİNSİYET	
K	95
E	1
TÜMÖR TİPİ	
IDC	88
DCI	1
MC	2
ILC	3
MÜSİNÖZ	1
TC	1
ER	
POZİTİF	73
NEGATİF	22
PR	
POZİTİF	70
NEGATİF	25
E-CADHERİN	
POZİTİF	62
NEGATİF	4
Kİ-67	
<%30	39
%30-60	9
>%60	6
CERB-B2	
POZİTİF	71
NEGATİF	24

4.2. P16 (CDKN2A) Geninde Saptanan Bulgular



Şekil. 4.1. P16 (CDKN2A) geninin normal ve tümörlü dokularda metilasyon analizine ait jel görüntüsü

* N.T: No Template (su), IVD: İnvitro metillenmiş DNA (Pozitif Kontrol), M: Metile, U: Unmetile

Tümörlü doku değerlendirildiğinde ise; 42/96'sı (% 43,8) metile, 54/96'sı (% 56,2) unmetile olarak tespit edilmiştir. Normal doku değerlendirildiğinde ise; 7/96'sı (% 7,3) metile, 89/96'sı (% 92,7) unmetile olarak tespit edilmiştir.

6/96 olgunun normal dokularında promotor metilasyonu saptanmıştır. Patolojiden gelen normal dokular, tümörlü dokuların tümörleşme olmadığı düşünülen bölgelerinden alınan doku kesitlerinin normal doku olarak adlandırılması ile elde edilmektedir. Bu sebeple patolojiden gelen normal doku olarak laboratuvarımıza gönderilen örneklerin aksine tümörlü doku olduğu düşünülmektedir.

69 hasta içinde tek erkek hasta olan 53 nolu olguda metilasyon bulunmuştur.

4.2.1. Olguların yaşları, evreleri, tümör tipleri, ER, PR, CERB-B2, E-cadherin ve Ki-67 durumlarının P16(CDKN2A) geni ile ilişkisi

4.2.1.1. Olguların yaşı ile P16(CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi

Olguların yaşı ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisine bakıldığında; tümörlü dokuda P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu gözlenen metile olan olguların yaş ortalamaları 53,86 iken, unmetile olan olguların yaş ortalamaları 47,24 olarak saptanmıştır. Normal dokuda P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu gözlenen metile olan olguların yaş ortalamaları ise 39,8 iken, unmetile olan olguların yaş ortalamaları 51,4 olarak saptanmıştır.

Yaşı ≥ 50 olan tümörlü dokuların P16 (CDKN2A) geninde 19/53'ünün promotor metilasyonu gözlenirken, 24/53'ünde promotor metilasyonu gözlenmemiştir. Yaşı < 50 olan tümörlü dokuların P16 (CDKN2A) geninde 23/53'ünün promotor metilasyonu gözlenirken, 30/53'ünde ise promotor metilasyonu gözlenmemiştir. Yaş ile P16 (CDKN2A) geni arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.2. Olguların yaşı ile tümörlü dokuların metilasyon dağılımı.

		P16 (CDKN2A)		Total
		METİLE	UNMETİLE	
YAŞ ≥ 50	Sayı	19	24	43
	% within YAŞ	44,2%	55,8%	100,0%
< 50	Sayı	23	30	53
	% within YAŞ	43,4%	56,6%	100,0%
Total	Sayı	42	54	96
	% within YAŞ	43,8%	56,3%	100,0%

P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında; ≥ 50 olan 19/42 olgulara göre < 50 olan 23/42 olgular daha yüksek metilasyon oranına sahiptir. Yaş ile P16 (CDKN2A) geni arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.3. Tümörlü dokularda metile olgularının yaş dağılımı.

		P16 (CDKN2A)		Total
		METİLE	UNMETİLE	
YAŞ ≥ 50	Sayı	19	24	43
	% within P16T	45,2%	44,4%	44,8%
<50	Sayı	23	30	53
	% within P16T	54,8%	55,6%	55,2%
Total	Sayı	42	54	96
	% within P16T	100,0%	100,0%	100,0%

Yaşı ≥ 50 olan normal dokuların P16 (CDKN2A) geninde 2/43'ünün promotor metilasyonu gözlenirken, 41/43'ünde promotor metilasyonu gözlenmemiştir. Yaşı <50 olan normal dokuların P16 (CDKN2A) geninde 5/53'ünün promotor metilasyonu gözlenirken, 48/53'ünde ise promotor metilasyonu gözlenmemiştir. Çalışmamıza göre yaş ilerledikçe metilasyon oranı azalmaktadır. Yaş ile P16 (CDKN2A) geni arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.4. Olguların yaşı ile normal dokuların metilasyon dağılımı.

		P16 (CDKN2A)		Total
		METİLE	UNMETİLE	
YAŞ ≥ 50	Sayı	2	41	43
	% within YAŞ	4,7%	95,3%	100,0%
<50	Sayı	5	48	53
	% within YAŞ	9,4%	90,6%	100,0%
Total	Sayı	7	89	96
	% within YAŞ	7,3%	92,7%	100,0%

P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında; <50 yaş aralığına sahip olgularda metilasyon oranı ≥ 50 yaş aralığına sahip olgulara göre daha yüksektir. Yaş ile metilasyon oranı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.5. Normal dokularda metile olgularının yaş dağılımı.

		P16 (CDKN2A)		Total
		METİLE	UNMETİLE	
YAŞ ≥ 50	Sayı	2	41	43
	% within P16N	28,6%	46,1%	44,8%
<50	Sayı	5	48	53
	% within P16N	71,4%	53,9%	55,2%
Total	Sayı	7	89	96
	% within P16N	100,0%	100,0%	100,0%

4.2.1.2. Tümörün tipi ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi

Tümörün tipi ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; invaziv ductal karsinomda (IDC) 37/88 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 51/88 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir ($p<0,001$). İnvaziv lobüler karsinomda (ILC) 3/3 olguda promotor metilasyonu gözlenmektedir. Duktal karsinom in situ da ise 1/1 unmetile olgu ($p<0,001$), tubüler karsinomda da 1/1 unmetile olgu ($p<0,001$) metaplastik karsinomda 2/2 metile olgu, müsinöz karsinomda ise 1/1 unmetile olgu ($p<0,001$) tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.6. Tümör tipi ile P16 (CDKN2A) geni metilasyon dağılımı.

			P16 (CDKN2A)		Total
			METİLE	UNMETİLE	
TÜMÖR IDC TİPİ	Sayı		37	51	88
	%	within	42,0%	58,0%	100,0%
	TÜMÖRTİPİ				
	ILC	Sayı	3	0	3
	%	within	100,0%	,0%	100,0%
	TÜMÖRTİPİ				
	DCI	Sayı	0	1	1
	%	within	,0%	100,0%	100,0%
	TÜMÖRTİPİ				
	TC	Sayı	0	1	1
	%	within	,0%	100,0%	100,0%
	TÜMÖRTİPİ				
	MC	Sayı	2	0	2
	%	within	100,0%	,0%	100,0%
	TÜMÖRTİPİ				
	MÜSİNÖZ	Sayı	0	1	1
	%	within	,0%	100,0%	100,0%
	TÜMÖRTİPİ				
Total	Sayı		42	54	96
	%	within	43,8%	56,3%	100,0%
TÜMÖRTİPİ					

Tümörün tipi ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında IDC 37/42 olguda (% 88,1), ILC 3/42 (% 7,1), DCI, TC ve müsinöz karsinomda metile olgu bulunmadığı tespit edilmiştir. IDC 37/42 (% 88,1) en yüksek değere sahip olduğundan IDC tümör tipi ile P16 metilasyonu yüksek oranda ilişki bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 4.7. Olguların tümör tipleri ile metile durumları.

			P16 (CDKN2A)		Total
			METİLE	UNMETİLE	
TÜMÖR TİPİ	IDC	Sayı	37	51	88
		% within P16T	88,1%	94,4%	91,7%
	ILC	Sayı	3	0	3
		% within P16T	7,1%	,0%	3,1%
	DCI	Sayı	0	1	1
		% within P16T	,0%	1,9%	1,0%
	TC	Sayı	0	1	1
		% within P16T	,0%	1,9%	1,0%
	MC	Sayı	2	0	2
		% within P16T	4,8%	,0%	2,1%
	MÜSİNÖZ	Sayı	0	1	1
		% within P16T	,0%	1,9%	1,0%
Total	Sayı	42	54	96	
	% within P16T	100,0%	100,0%	100,0%	

4.2.1.3. Tümörün evresi ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi

Tümörün evresi ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; Evre II’de 3/13 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 10/13 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir. Evre III’de 39/83 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 44/83 olguda metilasyon gözlenmemiştir. Yapılan istatistiksel analizde, Evre II ve evre III’de P16 (CDKN2A) geninin unmetile olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir ($P<0,001$).

Çizelge 4.8. Olguların tümör evresi ile P16 (CDKN2A) geninin metilasyon durumu dağılımı.

		P16 (CDKN2A)		Total
		METİLE	UNMETİLE	
EVRE II	Sayı	3	10	13
	% within EVRE	23,1%	76,9%	100,0%
III	Sayı	39	44	83
	% within EVRE	47,0%	53,0%	100,0%
Total	Sayı	42	54	96
	% within EVRE	43,8%	56,3%	100,0%

Metile olgular evre II ve III ile karşılaştırıldığında; evre III 39/42 olguda, evre II ise 3/42 olguda metile bulunması ile evre ilerledikçe promotor metilasyon oranının arttığını görülmektedir. Yapılan istatistiksel analize göre, tümör evresi ile metilasyon dağılımı ilişkili bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Metile olan evre II, evre III olgularının dağılımı.

		P16 (CDKN2A)		Total
		METİLE	UNMETİLE	
EVRE II	Sayı	3	10	13
	% within P16T	7,1%	18,5%	13,5%
III	Sayı	39	44	83
	% within P16T	92,9%	81,5%	86,5%
Total	Sayı	42	54	96
	% within P16T	100,0%	100,0%	100,0%

4.2.1.4. Östrojen reseptör ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi

Östrojen reseptör ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; ER(+) olan 30/73 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, 43/73 olguda metilasyon saptanmamıştır. ER(-) olan 11/22 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, 11/22 olguda metilasyon saptanmamıştır. Yapılan istatistiksel analize göre, ER(+) olan olguların metile ve unmetile durumları

karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu bakımından unmetile olan olguların metile olan olgulara göre daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Östrojen reseptör negatif olguların ise metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında unmetile olan olgular ile metile olan olguların oranının eşit olduğu görülmektedir ($P>0,05$).

Çizelge 4.10. Tümörlü dokuda ER ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyon durumu dağılımı.

			P16 (CDKN2A)		Total
			METİLE	UNMETİLE	
ER POZİTİF	Sayı		29	43	72
	% within ER		40,3%	59,7%	100,0%
NEGATİF	Sayı		11	11	22
	% within ER		50,0%	50,0%	100,0%
Total	Sayı		40	54	94
	% within ER		42,6%	57,4%	100,0%

Östrojen reseptörü ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu gözlenen 30/41 olguda ER(+) iken 11/41 olguda ER(-) olarak saptanmıştır. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı çizelge 4.11’de gösterilmiştir. Metile olan olguların % 73,2’si ER(+) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında ER(+) olan olguların ER(-) olan olgulara göre P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($P<0,05$).

Çizelge 4.11. Tümörlü dokuda metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı.

		P16 (CDKN2A)		Total
		METİLE	UNMETİLE	
ER POZİTİF	Sayı	29	43	72
	% within ER	40,3%	59,7%	100,0%
NEGATİF	Sayı	11	11	22
	% within ER	50,0%	50,0%	100,0%
Total	Sayı	40	54	94
	% within ER	42,6%	57,4%	100,0%

4.2.1.5. Progesteron reseptör ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi

Tümörlü dokularda progesteron reseptörü ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında, PR(+) olan 28/70 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, 42/70 olguda metilasyon saptanmamıştır. PR(-) olan 13/25 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, 12/25 olguda metilasyon saptanmamıştır. Yapılan istatistiksel analize göre PR(+) olan olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu bakımından unmetile olan olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Progesteron reseptörü negatif olguların ise metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında unmetile olan olguların metile olan olgulara göre düşük oranda görüldüğü sonucuna varılmıştır ($p<0,01$).

Çizelge 4.12. Tümörlü dokularda PR ve P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyon durumu dağılımı.

			P16 (CDKN2A)		Total
			METİLE	UNMETİLE	
PR POZİTİF	Sayı		28	42	70
	% within PR		68.3%	78%	73.7%
NEGATİF	Sayı		13	12	25
	% within PR		31.7%	22%	26.3%
Total	Sayı		41	54	95
	% within PR		100%	100%	100,0%

Tümörlü dokularda progesteron reseptörü ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu gözlenen 28/41 olguda PR(+) iken, 13/41 olguda PR(-) olarak saptanmıştır. Metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı tablo 4.13.'de gösterilmiştir. Ayrıca P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu gözlenen olguların % 68,3'ü PR(+), % 31,7'si PR(-) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında PR(+) olan olguların PR(-) olan olgulara göre P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,05$).

Çizelge 4.13. Tümörlü dokularda metile olan PR(+) ve PR(-) olan olguların dağılımı.

			P16 (CDKN2A)		Total
			METİLE	UNMETİLE	
PR POZİTİF	Sayı		28	42	70
	% within P16T		68,3%	77,8%	73,7%
NEGATİF	Sayı		13	12	25
	% within P16T		31,7%	22,2%	26,3%
Total	Sayı		41	54	95
	% within P16T		100,0%	100,0%	100,0%

4.2.1.6. C-erb-B2 ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi

Tümörlü dokularda C-erb-B2 ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; C-erb-B2(+) olan 33/71 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, 38/71 olguda metilasyon saptanmamıştır. C-erb-B2(-) olan 8/24 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, 16/24 olguda metilasyon saptanmamıştır. Yapılan istatistiksel analize göre C-erb-B2(+) olan olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu bakımından unmetile olan olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Ayrıca C-erb-B2(-) olan olguların ise metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında unmetile olan olguların metile olan olgulara göre yüksek oranda görüldüğü sonucuna varılmıştır ($p<0,001$).

Çizelge 4.14. Tümörlü dokuda C-erb-B2 ile P16 (CDKN2A) geni metilasyon durumu dağılımı.

			P16 (CDKN2A)		Total
			METİLE	UNMETİLE	
C-ERB-B2	POZİTİF	Sayı	33	38	71
		% within C-erb-B2	46,5%	53,5%	100,0%
	NEGATİF	Sayı	8	16	24
		% within C-erb-B2	33,3%	66,7%	100,0%
Total		Sayı	41	54	95
		% within C-erb-B2	43,2%	56,8%	100,0%

Tümörlü dokularda C-erb-B2 ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu gözlenen 33/41 olguda C-erb-B2(+) iken, 8/41 olguda C-erb-B2(-) olarak saptanmıştır. Metile olan C-erb-B2(+) ve C-erb-B2(-) olan olguların dağılımı çizelge 4.15.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında C-erb-B2(+) olan olguların C-erb-B2(-) olan olgulara göre P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,05$).

Çizelge 4.15. Tümörlü dokularda metile olan C-erb-B2(+) ve C-erb-B2(-) olan olguların dağılımı.

			P16 (CDKN2A)		Total
			METİLE	UNMETİLE	
C-erb-B2	POZİTİF	Sayı	5	66	71
		% within P16N	71,4%	75,0%	74,7%
	NEGATİF	Sayı	2	22	24
		% within P16N	28,6%	25,0%	25,3%
Total		Sayı	7	88	95
		% within P16N	100,0%	100,0%	100,0%

4.2.1.7. E-Cadherin ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi

Tümörlü dokularda E-Cadherin ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; E-Cadherin(+) olan 25/62 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, 37/62 olguda metilasyon saptanmamıştır. E-Cadherin (-) olan 4/4 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, unmetile olgu saptanmamıştır. Yapılan istatistiksel analize göre E-Cadherin(+) olan olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu bakımından unmetile olan olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Aksine E-Cadherin(-) olan olguların ise metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında metile olan olguların unmetile olan olgulara göre yüksek oranda görüldüğü sonucuna varılmıştır ($p<0,001$).

Çizelge 4.16. Tümörlü dokuda E-Cadherin ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyon durumu dağılımı.

			P16 (CDKN2A)		Total
			METİLE	UNMETİLE	
E-Cadherin	POZİTİF	Sayı	25	37	62
		% within E-Cadherin	40,3%	59,7%	100,0%
	NEGATİF	Sayı	4	0	4
		% within E-Cadherin	100,0%	,0%	100,0%
Total		Sayı	29	37	66
		% within E-Cadherin	43,9%	56,1%	100,0%

Tümörlü dokularda E-Cadherin ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu gözlenen 25/29 olguda E-Cadherin(+) iken, 4/29 olguda E-Cadherin(-) olarak saptanmıştır. Metile olan E-Cadherin(+) ve E-Cadherin(-) olan olguların dağılımı çizelge 4.17.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında E-Cadherin(+) olan olguların E-Cadherin(-) olan olgulara göre P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu daha yüksek oranda (% 86,2) saptanmıştır ($p<0,001$).

Çizelge 4.17. Tümörlü dokularda metile olan E-Cadherin(+) ve E-Cadherin(-) olan olguların dağılımı.

			P16 (CDKN2A)		Total
			METİLE	UNMETİLE	
E-Cadherin	POZİTİF	Sayı	25	37	62
		% within P16T	86,2%	100,0%	93,9%
	NEGATİF	Sayı	4	0	4
		% within P16T	13,8%	,0%	6,1%
Total		Sayı	29	37	66
		% within P16T	100,0%	100,0%	100,0%

4.2.1.8. Ki-67 ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu ilişkisi

Tümörlü dokularda Ki-67 ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; $< \% 30$ olan 11/39 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, 28/39 olguda metilasyon saptanmamıştır. $\% 30$ - $\% 60$ olan 6/10 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, 4/10 olguda metilasyon saptanmamıştır. $> \% 60$ olan 5/5 olguda P16 (CDKN2A) geninde metilasyon saptanırken, unmetile olgu saptanmamıştır. Yapılan istatistiksel analize göre Ki-67 $< \% 30$, $\% 30$ - $\% 60$ ve $> \% 60$ olan olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu bakımından Ki-67 yüzdesi arttıkça unmetile olguların yüzdesi azalmakta, metile olguların sayısı artmaktadır ($P<0,001$).

Çizelge 4.18. Tümörlü dokuda Ki-67 ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyon durumu dağılımı.

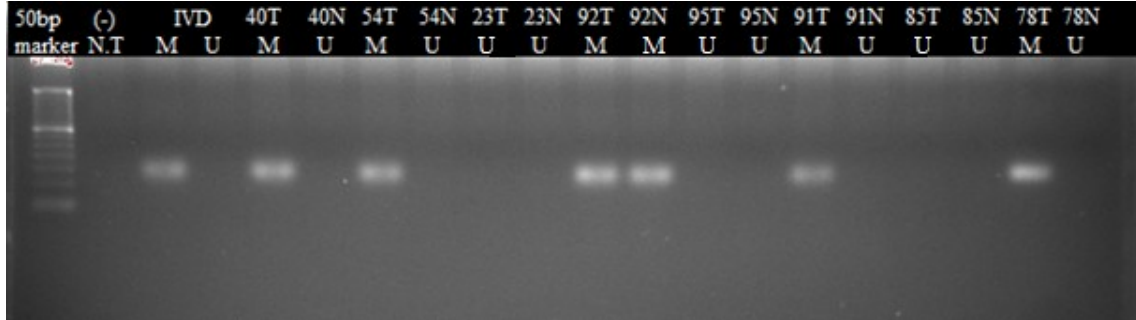
		P16 (CDKN2A)		Total
		METİLE	UNMETİLE	
Ki-67 <%30	Sayı	11	28	39
	% within Ki-67	28,2%	71,8%	100,0%
%30-%60	Sayı	6	4	10
	% within Ki-67	60,0%	40,0%	100,0%
>%60	Sayı	5	0	5
	% within Ki-67	100,0%	,0%	100,0%
Total	Sayı	22	32	54
	% within Ki-67	40,7%	59,3%	100,0%

Tümörlü dokularda Ki-67 ile P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu gözlenen Ki-67 <% 30 11/22, % 30-% 60 6/22, <% 60 5/22 olan olguların dağılımı çizelge 4.19.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında P16 (CDKN2A) promotor metilasyonu <% 30 Ki-67 yüzdesine sahip olan tümörlü dokularda % 50 metilasyon oranı en yüksek değer olarak saptanmıştır. Ki-67 yüzdesi azaldıkça metilasyon yüzdesi artmaktadır ($P<0,001$).

Çizelge 4.19. Tümörlü dokularda metile olan <% 30, % 30-% 60 ve <% 60 Ki-67 olguların dağılımı.

		P16 (CDKN2A)		Total
		METİLE	UNMETİLE	
Kİ-67 <%30	Sayı	11	28	39
	% within P16T	50,0%	87,5%	72,2%
%30-%60	Sayı	6	4	10
	% within P16T	27,3%	12,5%	18,5%
>%60	Sayı	5	0	5
	% within P16T	22,7%	,0%	9,3%
Total	Sayı	22	32	54
	% within P16T	100,0%	100,0%	100,0%

4.3. Metilguanin DNA Metil Transferaz (MGMT) Geninde Saptanan Bulgular



Şekil. 4.2. MGMT geninin normal ve tümörlü dokularda metilasyon analizine ait jel görüntüsü.

* N.T: No Template (su), IVD: İnvitro metillenmiş DNA (Pozitif Kontrol), M: Metile, U: Unmetile

Yapılan metilasyon çalışmaları sonucunda, 96 hastaya ait tümörlü dokularda MGMT promotor metilasyon oranı 33/96 (% 34,4); çevre normal dokularda 6/96 (% 6,3) oranında saptanmıştır.

6/96 olgunun normal dokusunda promotor metilasyonu bulunmuştur.

4.3.1. Olguların yaşları, evreleri, tümör tipleri, ER, PR, CERB-B2, E-cadherin ve Ki-67 durumlarının MGMT geni ile ilişkisi

4.3.1.1. Olguların yaşı ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi

Olguların yaşı ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisine bakıldığında; MGMT geni promotor metilasyonu gözlenen olguların yaş ortalamaları 48,55 iken, unmetile olan olguların yaş ortalamaları 51,59 olarak saptanmıştır. Tümörlü dokularda, Yaşı ≥ 50 olan 12/43 olguda metilasyon gözlenirken 31/43 olguda metilasyon gözlenmez. Yaşı < 50 olan 21/53 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 32/53 olguda metilasyon gözlenmez (Çizelge 4.2.). Normal dokularda ise Yaşı ≥ 50 olan 1/43 olguda metilasyon gözlenirken, 42/43 olguda metilasyon göstermez. Yaşı < 50 olan 5/53 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 48/53 olguda metilasyon gözlenmez. (Çizelge 4.3.). Normal ve tümörlü dokularda, yapılan *Mann-Whitney U testi* ile normal ve tümörlü dokularda yaş ve MGMT promotor metilasyonu arasında ilişki bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Çizelge 4.20. Tümörlü dokularda yaş ile MGMT geni metilasyon durumu dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
YAŞ	≥ 50	Sayı	12	31	43
		%within YAŞ	27,9%	72,1%	100,0%
	< 50	Sayı	21	32	53
		%within YAŞ	39,6%	60,4%	100,0%
Total	Sayı		33	63	96
	% within YAŞ		34,4%	65,6%	100,0%

Çizelge 4.21. Normal dokularda yaş ile MGMT geni metilasyon durumu dağılımı.

		MGMT		Total
		METİLE	UNMETİLE	
YAŞ ≥ 50	Sayı	1	42	43
	% within YAŞ	2,3%	97,7%	100,0%
<50	Sayı	5	48	53
	% within YAŞ	9,4%	90,6%	100,0%
Total	Sayı	6	90	96
	% within YAŞ	6,3%	93,8%	100,0%

Yaş ile MGMT geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında tümörlü dokularda MGMT promotor metilasyonu gözlenen 12/33 olguda yaş ≥ 50 iken, 21/33 olguda yaş <50'dir (Çizelge 4.22.). Metile olan normal dokuya sahip olgular karşılaştırıldığında ise 1/6 olguda yaş ≥ 50 iken, 5/6 olguda yaş <50'dir (Çizelge 4.5.). Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında yaşı ≥ 50 olan ve <50 olan olgularla MGMT promotor metilasyonu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır .($p>0,05$).

Çizelge 4.22. Metile olan tümörlü dokularda yaş dağılımı.

		MGMT		Total
		METİLE	UNMETİLE	
YAŞ ≥ 50	Sayı	12	31	43
	% within MGMT	36,4%	49,2%	44,8%
<50	Sayı	21	32	53
	% within MGMT	63,6%	50,8%	55,2%
Total	Sayı	33	63	96
	% within MGMT	100,0%	100,0%	100,0%

Çizelge 4.23. Normal dokularda yaş ile MGMT geni metilasyon durumu dağılımı.

		MGMT		Total
		METİLE	UNMETİLE	
≥50	Sayı	1	42	43
	% within MGMT	16,7%	46,7%	44,8%
<50	Sayı	5	48	53
	% within MGMT	83,3%	53,3%	55,2%
Total	Sayı	6	90	96
	% within MGMT	100,0%	100,0%	100,0%

4.3.1.2. Tümörün evresi ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi

Tümörün evresi ile MGMT geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; Evre II’de 1/13 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 12/13 olguda ise metilasyon gözlenmemiştir. Evre III’de 32/83 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 51/83 olguda metilasyon gözlenmemiştir (Çizelge 4.24.). Yapılan istatistiksel analize göre, Evre II MGMT geninin unmetile olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Evre III’de ise MGMT geninin metile olguların unmetile olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

Çizelge 4.24. Olguların tümör evresi ve MGMT geni promotor metilasyon durumlarının dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
EVRE II	Sayı		1	12	13
	% within EVRE		7,7%	92,3%	100,0 %
III	Sayı		32	51	83
	% within EVRE		38,6%	61,4%	100,0 %
Total	Sayı		33	63	96
	% within EVRE		34,4%	65,6%	100,0 %

Tümörün evresi ile MGMT geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında MGMT geninde promotor metilasyonu gözlenen evre II’de % 3 oranında metilasyon gözlenirken, evre III’de % 32 oranında metilasyon saptanmıştır (Çizelge 4.25.). Buna göre evre II ve evre III’de sadece metile olan olgular arasında yapılan istatistiksel analiz sonucu göre evre III’ün evre II’ye göre çok daha yüksek oranda MGMT geni promoter hipermetilasyonu görüldüğü sonucuna varılmıştır ($p<0,001$).

Çizelge 4.25. Metile olan evre II ve evre III olgularının dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
EVRE	II	Sayı	1	12	13
		% within MGMT	3,0%	19,0%	13,5%
	III	Sayı	32	51	83
		% within MGMT	97,0%	81,0%	86,5%
Total		Sayı	33	63	96
		% within MGMT	100,0%	100,0%	100,0%

4.3.1.3. Tümör tipi ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi

Tümörün tipi ile MGMT geni promoter metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; invaziv ductal karsinomda (IDC) 31/88 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 57/88 olguda ise metilasyon saptanmamıştır. Metaplastik karsinoma(MC) 1/2 olguda promotor metilasyonu gözlenirken, 1/2 olguda ise metilasyon saptanmamıştır. İnvaziv lobüler karsinomda (ILC) 0/3 olguda; Duktal karsinoma in situ (DCIS) 0/1 olguda; Tübüler karsinoma (TC) 0/1 olguda; Müsinöz karsinoma 0/1 olgularda promotor metilasyonu saptanmamıştır (Çizelge 4.26.). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda MGMT geninin invaziv duktal karsinom tümör tipinde unmetile olan olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda görüldüğü sonucuna varılmıştır ($p<0,001$); invaziv lobüler karsinom, duktal karsinoma in situ, tübüler karsinom, metaplastik karsinom, müsinöz karsinom tümör tiplerinde ise unmetile olan olguların metile olan olgulara göre önemli bir fark görülemediği ve anlamsız olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0,05$).

Çizelge 4.26. Olguların Tümör tipi ve MGMT geni metilasyon durumlarının dağılımı.

		MGMT		Total
		METİLE	UNMETİLE	
TÜMÖR IDC TİPİ	Sayı	31	57	88
	% within TÜMÖRTİPİ	35,2%	64,8%	100,0%
	ILC	Sayı	0	3
	% within TÜMÖRTİPİ	,0%	100,0%	100,0%
	DCI	Sayı	1	0
	% within TÜMÖRTİPİ	100,0%	,0%	100,0%
	TC	Sayı	0	1
	% within TÜMÖRTİPİ	,0%	100,0%	100,0%
	MC	Sayı	1	1
	% within TÜMÖRTİPİ	50,0%	50,0%	100,0%
	MÜSİNÖZ	Sayı	0	1
	% within TÜMÖRTİPİ	,0%	100,0%	100,0%
	Total	Sayı	33	63
	% within TÜMÖRTİPİ	34,4%	65,6%	100,0%

Tümörün tipi ile MGMT geni promoter metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında MGMT geninde promotor metilasyonu gözlenen 31/33 olgu invaziv ductal karsinom, 1/33 olgu duktal karsinoma in situ, 1/33 olgu ise metaplastik karsinoma tümör tiplerinde saptanmıştır (Çizelge 4.27.). Yapılan istatistiksel analize göre sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında invaziv duktal karsinom tümörün tipinin Invaziv lobuler karsinoma, duktal karsinoma in situ, tübüler karsinoma, metaplastik karsinoma, Müsinöz karsinoma tümör tiplerine göre MGMT geni promoter hipermetilasyonunun çok daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

Çizelge 4.27. Metile olan olgularda tümör tipleri dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
TÜMÖR TİPİ	IDC	Sayı	31	57	88
		% within MGMT	93,9%	90,5%	91,7%
	ILC	Sayı	0	3	3
		% within MGMT	,0%	4,8%	3,1%
	DCI	Sayı	1	0	1
		% within MGMT	3,0%	,0%	1,0%
	TC	Sayı	0	1	1
		% within MGMT	,0%	1,6%	1,0%
	MC	Sayı	1	1	2
		% within MGMT	3,0%	1,6%	2,1%
	MÜSİNÖZ	Sayı	0	1	1
		% within MGMT	,0%	1,6%	1,0%
Total	Sayı	33	63	96	
	% within MGMT	100,0%	100,0%	100,0%	

4.3.1.4. Östrojen reseptör ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi

Östrojen reseptör ile MGMT geni promoter metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; ER(+) olan 23/73 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 50/73 olguda metilasyon saptanmamıştır. Östrojen reseptör negatif olan 10/22 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 12/22 olguda metilasyon saptanmamıştır (Çizelge 4.10.). Yapılan istatistiksel analize göre, ER(+) olan olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında MGMT geni promoter metilasyonu bakımından unmetile olan olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Östrojen reseptör negatif olguların ise metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında unmetile olan olguların metile olan olgulara göre yüksek oranda görüldüğü sonucuna varılmıştır ($p<0,003$).

Çizelge 4.28. ER ile MGMT geni promotor metilasyon durumu dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
ER	POZİTİF	Sayı	23	50	73
		% within ER	31,5%	68,5%	100,0%
	NEGATİF	Sayı	10	12	22
		% within ER	45,5%	54,5%	100,0%
Total		Sayı	33	62	95
		% within ER	34,7%	65,3%	100,0%

Östrojen reseptörü ile MGMT geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında MGMT promotor metilasyonu gözlenen 23/33 olguda ER(+) iken 10/33 olguda ER(-) olarak saptanmıştır. Metile olan olguların % 69,7'si ER(+) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.29.). Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında ER(+) olan olguların ER(-) olan olgulara göre MGMT promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,05$).

Çizelge 4.29. Metile olan ER(+) ve ER(-) olan olguların dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
ER	POZİTİF	Sayı	23	50	73
		%within MGMT	69,7%	80,6%	76,8%
	NEGATİF	Sayı	10	12	22
		%within MGMT	30,3%	19,4%	23,2%
Total		Sayı	33	62	95
		%within MGMT	100,0%	100,0%	100,0%

4.3.1.5. Progesteron reseptör ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi

Progesteron reseptörü ile MGMT geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında, PR(+) olan 21/70 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 49/70 olguda metilasyon saptanmamıştır. Progesteron reseptörü negatif olan 12/25 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 13/25 olguda metilasyon saptanmamıştır (Çizelge 4.30.). Yapılan istatistiksel analize göre PR(+) olan olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında MGMT geni promotor metilasyonu bakımından

unmetile olan olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Progesteron reseptörü negatif olguların ise metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında unmetile olan olgular ile metile olan olgular arasında önemli bir fark görülmemiştir. ($p<0,05$).

Çizelge 4.30. PR ve MGMT geni promotor metilasyon durumu dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
PR	POZİTİF	Sayı	21	49	70
		% within PR	30,0%	70,0%	100,0%
	NEGATİF	Sayı	12	13	25
		% within PR	48,0%	52,0%	100,0%
Total	Sayı	33	62	95	
	% within PR	34,7%	65,3%	100,0%	

Progesteron reseptörü ile MGMT geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında MGMT promotor metilasyonu gözlenen 21/33 olguda PR(+) iken, 12/33 olguda PR(-) olarak saptanmıştır. Ayrıca MGMT promotor metilasyonu gözlenen olguların % 63,6'ı PR(+), % 36,4'ü PR(-) olarak saptanmıştır (4.31.). Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında PR(+) olan olguların PR(-) olan olgulara göre MGMT promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,05$).

Çizelge 4.31. Metile olan PR(+) ve PR(-) olguların dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
PR	POZİTİF	Sayı	21	49	70
		%within MGMT	63,6%	79,0%	73,7%
	NEGATİF	Sayı	12	13	25
		% within MGMT	36,4%	21,0%	26,3%
Total		Sayı	33	62	95
		% within MGMT	100,0%	100,0%	100,0 %

4.3.1.6. C-erbB-2 ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi

C-erbB-2 ile MGMT geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında; C-erbB-2(+) olan 28/71 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 43/71 olguda metilasyon saptanmamıştır. C-erbB-2(-) olan 5/24 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 19/24 olguda metilasyon saptanmamıştır (Çizelge 4.32.). Yapılan istatistiksel analize göre C-erbB-2(+) olan olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında MGMT geni promotor metilasyonu bakımından unmetile olan olguların metile olan olgulara göre çok daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Ayrıca C-erbB-2(-) olan olguların ise metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında unmetile olan olguların metile olan olgulara göre yüksek oranda görüldüğü sonucuna varılmıştır ($p<0,001$).

Çizelge 4.32. C-erbB-2 ve MGMT geni promotor metilasyon durumu dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
CERBB2	POZİTİF	Sayı	28	43	71
		%within CERBB2	39,4%	60,6%	100,0%
	NEGATİF	Sayı	5	19	24
		%within CERBB2	20,8%	79,2%	100,0%
Total	Sayı	33	62	95	
	%within CERBB2	34,7%	65,3%	100,0%	

C-erbB-2 ile MGMT geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında MGMT promotor metilasyonu gözlenen 28/33 olguda C-erbB-2(+) iken, 5/33 olguda C-erbB-2(-) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.33.). Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında C-erbB-2(+) olan olguların C-erbB-2(-) olan olgulara göre MGMT promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,001$).

Çizelge 4.33. Metile olan C-erbB-2(+) ve C-erbB-2(-) olan olguların dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
CERBB2	POZİTİF	Sayı	28	43	71
		%within MGMT	84,8%	69,4%	74,7%
	NEGATİF	Sayı	5	19	24
		% within MGMT	15,2%	30,6%	25,3%
Total		Sayı	33	62	95
		% within MGMT	100,0%	100,0%	100,0%

4.3.1.7. E-cadherin ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi

E-cadherin ile MGMT geni promoter metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında, E-cadherin(+) olan 24/62 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 38/62 olguda metilasyon saptanmamıştır. E-cadherin negatif olan 1/4 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 3/4 olguda metilasyon saptanmamıştır (Çizelge 4.16.). Yapılan istatistiksel analize göre E-cadherin (+) olan olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında MGMT geni promoter metilasyonu bakımından unmetile olan olguların metile olan olgulara göre önemli bir fark saptanmıştır ($p<0,05$). E-cadherin negatif olguların ise metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında unmetile olan olguların metile olan olgular arasında önemli bir fark görülmemiştir. ($p<0,05$).

Çizelge 4.34. E-cadherin ve MGMT geni promoter metilasyonu durumu dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
ECADHERİN	POZİTİF	Sayı	24	38	62
		%within ECADHERİN	38,7%	61,3%	100,0%
	NEGATİF	Sayı	1	3	4
		%within ECADHERİN	25,0%	75,0%	100,0%
Total		Sayı	25	41	66
		%within ECADHERİN	37,9%	62,1%	100,0%

E-Cadherin ile MGMT geni promoter metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında MGMT promoter metilasyonu gözlenen 24/25 olguda E-Cadherin(+)

iken, 1/25 olguda E-Cadherin(-) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.17.). Ayrıca MGMT promotor metilasyonu gözlenen olguların % 96'sı E-Cadherin(+), % 4'ü E-Cadherin(-) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.35.). Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında E-Cadherin(+) olan olguların E-Cadherin(-) olan olgulara göre MGMT promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,001$).

Çizelge 4.35. Metile olan E-cadherin(+) ve E-cadherin(-) olan olguların dağılımı.

			MGMT		Total
			METİLE	UNMETİLE	
ECADHERİN	POZİTİF	Sayı	24	38	62
		%within MGMT	96,0%	92,7%	93,9 %
	NEGATİF	Sayı	1	3	4
		%within MGMT	4,0%	7,3%	6,1 %
Total	Sayı	25	41	66	
	%within MGMT	100,0%	100,0%	100,0%	

4.3.1.8. Ki-67 ile MGMT geni promotor metilasyonu ilişkisi

Ki-67 ile MGMT geni promotor metilasyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında Ki-67 < % 30 olan 15/39 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 24/39 olguda metilasyon saptanmamıştır. Ki-67 % 30-% 60 olan 6/10 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 4/10 olguda metilasyon saptanmamıştır. Ki-67>% 60 olan 3/5 olguda MGMT geninde metilasyon saptanırken, 2/5 olguda metilasyon saptanmamıştır. (Çizelge 4.11.). Yapılan istatistiksel analize göre, Ki-67 <% 30, % 30-% 60, >% 60 olan olguların metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında MGMT geni promotor metilasyonu bakımından metile ve unmetile durumları karşılaştırıldığında unmetile olan olguların metile olan olgular arasında önemli bir fark görülmemiştir. ($p<0,05$).

Çizelge 4.36. Ki-67 ve MGMT geni promotor metilasyon durumu dağılımı.

		MGMT		Total
		METİLE	UNMETİLE	
<%30	Sayı	15	24	39
	%within KI67	38,5%	61,5%	100,0%
%30 - %60	Sayı	6	4	10
	%within KI67	60,0%	40,0%	100,0%
> %60	Sayı	3	2	5
	%within KI67	60,0%	40,0%	100,0%
Total	Sayı	24	30	54
	%within KI67	44,4%	55,6%	100,0%

Ki-67 ile MGMT geni promotor metilasyonu arasında metile olan olgular karşılaştırıldığında MGMT promotor metilasyonu gözlenen 15/24 olguda Ki-67 <% 30, 6/24 olguda Ki-67 % 30-% 60, 3/24 olguda ise Ki-67 >% 60 olarak saptanmıştır. Ayrıca MGMT promotor metilasyonu gözlenen olguların % 62,5'i Ki-67<% 30, % 25'inde Ki-67 % 30-% 60, % 12,5'inde Ki-67 >% 60 olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu sadece metile olan olgular karşılaştırıldığında Ki-67<% 30 olan olguların Ki-67 % 30-% 60, Ki-67 >% 60 olan olgulara göre MGMT promotor metilasyonu daha yüksek oranda saptanmıştır ($p<0,01$).

Çizelge 4.37. Ki-67 (<% 30, %30-% 60, >% 60) promotor metilasyon durumu dağılımı.

		MGMT		Total
		METİLE	UNMETİLE	
KI67 <%30	Sayı	15	24	39
	%within MGMT	62,5%	80,0%	72,2%
%30 - %60	Sayı	6	4	10
	%within MGMT	25,0%	13,3%	18,5%
> %60	Sayı	3	2	5
	%within MGMT	12,5%	6,7%	9,3%
Total	Sayı	24	30	54
	%within MGMT	100,0%	100,0%	100,0%

5. TARTIŞMA

Çalışmamıza Bağcılar Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan meme kanseri tanısı alan ve Bağcılar Araştırma ve Uygulama Hastanesi genel cerrahide opere edilen 96 hastanın doku örneklerinde çalışılmıştır. Örnekler parafin bloğa gömülü doku kesiti olarak 1,5 ml'lik tüpler içinde laboratuvarımıza gelmiştir.

Olguların yaşları, hastalığın evresi, tümörün tipi, ER, PR ve C-erbB-2, E-cadherin ve Ki-67 gibi klinikopatolojik durumları hasta dosyalarından temin edilmiştir. Doku örnekleri DNA eldesinden sonra bisülfıt modifikasyon işlemine tabii tutulmuştur. Modifiye edilen örneklerin metilasyon spesifik MSP yöntemiyle, P16 ve MGMT genleri için thermal cycler Thermo Scientific ARTIK, Techne Tc-Plus cihazında metilasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları literatür ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

Bugüne kadar pek çok gende epigenetik mekanizmaların incelendiği çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu epigenetik değişimler içerisinde en önemli çalışma sahası metilasyon olmuştur. Araştırmacıların geçmişte yoğunlaştıkları alanlar gen düzeyindeki mutasyonlar ve sonuçları iken, metilasyonun kanser genetiğindeki rolünün anlaşılması nedeniyle son yıllarda farklı kanser genlerinin metilasyon profilleri ve sonuçları üzerine yoğunlaşmıştır.

Araştırmacılar genomdaki metilasyon profillerindeki değişimleri incelerken birçok farklı teknik kullanmışlardır. Bu tekniklere her geçen gün yeni yöntemlerin ilave edilmesiyle bu araştırma sahası geniş boyutlara ulaşmış ve birçok gendeki metilasyon değişimleri net bir şekilde tanımlanmıştır.

Metilasyon çalışmalarında MSP, son derece hassas olması (1/1000), ortaya çıkan epigenetik değişikliği kalitatif olarak “evet” “hayır” diye ifade edebilmesi nedeniyle spesifik olması, kolay uygulanabilir olması, ucuz ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir moleküler araştırma tekniğidir (Baylin, 2000). MSP'nin mikrosatellit ya da nokta mutasyon temelli genetik testlere göre bazı avantajları bulunmaktadır. Öncelikle MSP'nin sensitivitesi çok yüksektir ve bu erken, küçük, prekürsör lezyonların tanınmasında çok önemlidir. Ayrıca baz değişiklikleri durumlarında sıklıkla karşılaşılan mutasyon/polimorfizm ikilemine de metilasyon çalışmalarında karşılaşılmamaktadır (Battagli, 2003). Bu nedenle MSP kanserlerle

ilişkili olarak yapılan metilasyon uygulamalarında gerek dünyada gerekse de ülkemizde en sık tercih edilen yöntem olarak yerini korumaktadır.

5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması

5.1.1. Meme kanserli olgularda P16 (CDKN2A) geni metilasyonunun literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

35-79 yaş aralığındaki kadınların yaş ve ırk faktörleri 1170 hastada değerlendirilmiştir. E-Cadherin, **P16** ve RAR-b2 genlerinin promotör metilasyonu, RT MSP kullanılarak 803 menapoz öncesi ve sonrası olgularda değerlendirilmiştir. Promotör metilasyon sıklığı P16 için % 25,9 olarak gösterilmiştir (Tao vd., 2011).

193 meme karsinomu frozen doku örnekleriyle metilasyon spesifik PCR yöntemiyle 7 genin (RAR β 2, CDH1, ESR1, BRCA1, CCND2, **P16** ve TWIST) metilasyon durumları incelenmiştir. Çalışma sonucunda 193 olgunun (% 23) P16 geni promotör hipermetilasyonu saptanmıştır (Li vd., 2006).

Meme kanserinde p16INK4A geninin 100/200 olguda hipermetilasyonu tespit edilmiştir. MSP yöntemi uygulanarak metilasyon oranı % 50 olarak belirlenmiştir (Munot vd., 2006).

Klinik kanser araştırmasına göre 2004 yılında yayımlanan bir çalışmada 10 bening lezyon ve 54 primer meme kanserinin 10 gen lokusunda (ESR1, BRCA1, TR1 **P16**, HIC1, RAR2, CCND2, APC, GSTP1 ve CDH1) anormal promotör metilasyonu araştırılmıştır. En az 1 gen için anormal promotör metilasyonu bening lezyonların 7/10 olguda (% 70) ve meme kanserleri ise 46/54 olguda tespit edilmiştir. Bening ve malign dokulardan genomik DNA sodyum bisülfid dönüşümü BRCA1, P16, ESR1, GSTP1, TR1, RAR2, HIC1, APC, CCND2 ve CDH1 genleri için MSP kullanılarak yapılmıştır. Malign tümörlerde test edilen tüm gen lokusları örneklerinin önemli kısmında metilasyon görülmüştür. P16 için % 18 olarak düşük frekansta metilasyon tespit edilmiştir (Parrella vd., 2004).

P16INK4A geni promotörünün metilasyon inaktivasyonunun analizi sporadik meme kanseri olan, yaşları 19-68 İranlı 70 hastada MSP ve REP yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Örnekler, MSP yöntemi kullanılarak incelendiğinde % 37,5 hipermetile, benzer şekilde REP yöntemi kullanılarak da örnekler % 40 hipermetile olarak saptanmıştır. REP yöntemi ile MSP verileri doğrulanmıştır (Vallian vd., 2009).

MSP ile 63 meme kanseri hastasının tümörlü dokusunda ve serumunda P16 ve BRCA1 genlerinin metilasyon profilleri incelenmiştir. P16 geninin metilasyon oranı % 60,3 olarak tespit edilmiştir (Sturgeon vd., 2012).

Meme kanserli 48 hastadan normal meme kanseri örnekleri ve 96 kanser hastasında 22 meme kanseri aday genlerinin metilasyon modelleri analiz edilmiştir. MALDI-TOF MS tekniği kullanılmıştır. Bu teknik; duyarlı ve otomatiktir ayrıca tek bir teknik içinde metilasyon durumunun yüksek verimle tespiti ve kantitatif birleştirme için uygundur. 17 genden kanserli ve komşu normal dokular ($P<0.05$) arasında metilasyonun önemli derecede farklı seviyelerde saptanmıştır. Çalışılan 96 adet örneğin metilasyon boyunca yüksek derecesi ile ilk 10 gen istatistik analiz ile seçilmiştir. 22 çalışılmış genden mesafe analizi ile meme kanseri için belirlenmiş hipermetile ilk 10 gen APC, BIN1, BMP6, BRCA1, CST6, ESRb, GSTP1, **P16**, P21 ve TIMP3'tür. P16'nın % 60 metile olduğu tespit edilmiştir (Radpour vd., 2009).

2009 yılında Hindistan'da P16 ve FHIT geninin hipermetilasyonu incelenmiştir. 351 hasta üzerinde yapılan bu araştırma da MSP yöntemi kullanılarak 112 hasta da metilasyon tespit edilmiştir. Metilasyon oranı % 31,9 olarak saptanmıştır (Raish vd., 2009).

2008 yılında yapılan bir çalışmada biyolojik örnekler 25 meme kanseri hastasından (42-62 yaş) cerrahi yöntemler ile elde edilmiştir. P16 için literatüre göre promotor metilasyonu ve ekzon 1 bölgeleri primer meme kanserlerinin % 20-30'unda ve insan meme kanseri hücre hatlarının her ikisi için de gözlenmiştir. DNA örnekleri, p16 geninin unmetile ve metile olgularının her ikisine de bisülfid uygulanmıştır. P16 promotörü olgularının % 48'i metile bulunmuştur (Botezatu vd., 2008).

Bizim çalışmamızda olgular tümör tipine göre değerlendirildiğinde, 88/96 (% 91,7) olgu invaziv duktal karsinom, 3/96 (% 3,1) olgu invaziv lobüler karsinom, olgu duktal karsinom in situ 1/96 (% 1,0), olgu tubüler karsinom 1/96 (% 1,0), olgu metaplastik karsinom 2/96 (% 2,1), olgu müsinöz karsinom 1/96 (% 1,0) tümör tipindedir. Tümörlü doku değerlendirildiğinde 42/96'sı (% 43,8) metile, 54/96'sı (% 56,3) unmetile olarak tespit edilmiştir. Normal doku değerlendirildiğinde ise 7/96'sı (% 7,3) metile, 89/96'sı (% 92,7) unmetile olarak tespit edilmiştir. Buna göre yaptığımız çalışmadaki metilasyon oranımız yapılan diğer çalışmaların arasında bir değer olarak bulunmuştur. *Tao, Li, Munot, Parrella, Vallian, Sturgeon, Raish* ve arkadaşları

metilasyon spesifik PCR yönteminden faydalanmışlardır. *Radpour, Vallian* ve arkadaşları farklı yöntemler kullanmışlardır. Sırasıyla bu yöntemler; MALDI-TOF MS ve REP'tir. REP analizi ile aynı çalışma da kullanılan MSP yöntemi birbirleriyle karşılaştırıldığında birbirine yakın değerlerde metilasyon oranı belirlenmiştir. Yöntemler arasında tutarlı sonuç görülmektedir. *Parella* ve arkadaşlarının bizim çalışmamızdan farklı olarak, invaziv tümör meme dokusunun yerine primer dokularda çalışmasının metilasyon oranının daha düşük saptanmasındaki neden olarak görülebilir. Metilasyon oranlarındaki farklılık; olgu sayısı, tümör tipi, populasyon heterojenitesi ve kullanılan yöntemden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

5.1.2. Meme kanserli olgularda MGMT geni metilasyonunun literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması

2005 yılında yapılan bir çalışmada, sporadik meme kanserleri için yaygın olarak bilinen on tümör baskılayıcı genin (RB1, P14, P15, P16, CDH1, **MGMT**, HIC1, N33, LAMC3, TGFBR1) promoter bölgelerinde CpG metilasyonlarını gösterilmiştir. Multipleks metilasyon spesifik PCR (MSP) yöntemi ile 105 meme kanserli hasta numunesi, 5 normal meme bezi dokusu örneği ve 30 sağlıklı hastanın periferik kan lenfositlerinde metilasyon profilleri incelenmiştir. 105 tümörlü dokunun 8 tanesinde (% 8) MGMT metilasyonu saptanmıştır (Zemlyakova vd., 2005).

49 tane snap-frozen primer meme tümör dokusunda 8 genin metilasyon durumunun incelendiği bir çalışmada DCR1, DAPK1, RASSF1A ve DCR2 genleri MSP yöntemi kullanılarak metilasyon durumları incelenirken, APC, **MGMT**, GSTP1 ve PTEN genlerinde ise metilasyon sensitif yüksek çözünürlüklü erime (MS-HRM) yöntemi kullanılarak metilasyon durumları incelenmiştir. MGMT geni ile ilgili MS-HRM ile elde edilen sonuçlar bisülfid pirosekanslama tarafından doğrulanmıştır. 34 invaziv duktal karsinoma (IDC); 8 tanesinde (% 23,5), 9 invaziv lobüler karsinoma (ILC) 1 tanesinden (% 11,1) ve toplamda 49 olgunun 11'inde (% 22,44) MGMT promotor metilasyonu gözlenmiştir. Çalışmanın ilginç bir bulgusu, daha agresif bir fenotip ediniminde MGMT metillenmesini göstermesi açısından ileri tümör derecesi ile MGMT anormal metilasyonu arasında marjinal korelasyon görülmektedir ve MGMT promotor metilasyon ile hastanın yaşı arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur (Tserga vd., 2012).

2011 yılında incelenen bir olguda, 13 yaşında İspanyol bir kızdan alınan 10×10 cm büyüklüğündeki dev fibroadenom üzerinde 49 genin CpG adalarının metilasyonunu değerlendirilmiştir. Dev fibroadenomdan, 3 normal büyüklükteki fibroadenomlardan ve 6 normal meme dokusundan izole edilen DNA'lar metilasyona özgün çoklu bağlanmış prop amplifikasyonu (MS-MLPA) yöntemiyle metilasyon durumları incelenmiş ve normal boyuttaki fibroadenomlarda ve normal meme dokusunda 49 genin CpG adalarında hiçbir metilasyon gözlenmezken dev fibroadenomda ESR1, **MGMT**, WT-1, BRCA2, CD 44 genlerinde promotor metilasyonu belirlenmiştir. Dev fibroadenom epitelyum hücrelerinde % 15 ER (+) boyanması gözlenmiştir (Maezese vd., 2011).

Farklı meme kanser alt tiplerindeki promotor metilasyonun araştırıldığı 2012 yılında yapılan bir çalışmada, 15 kolumnar hücre lezyonu (CCL) ve buna eşlik eden duktal karsinoma in situ (DCIS) (N:12) ve IDC (N:14)'de 50 gen grubunun promotor hipermetilasyonu MS-MLPA kullanılarak incelenmiştir. Normal meme dokusu ve lezyonal doku arasındaki metilenmiş **MGMT** oranı, 12 DCIS olgusunun 2 tanesinde (% 9), 14 IDC olgusunda 8 tanesinde (% 57,1) oranında gözlenmiştir (Verschuur Maes vd., 2012).

Serumda ve tümörlü dokularda metile olan genlerin metilasyon seviyeleri arasındaki ilişkisinin incelediği bir çalışmada, 100 invaziv duktal meme kanserli hastaların tümör ve serum DNA'larından MSP aracılığıyla DNA onarım genlerinin (BRCA1, **MGMT**, GSTP) metilasyon durumları incelenmiştir. Promotor metilasyonun protein ekspresyonu üzerine etkisi immünohistokimyasal açıdan değerlendirmiştir. Tümör hipermetilasyon oranı serum DNA'sındaki metilasyonu ile orantılı olarak % 32 olarak bulunmuştur. **MGMT** hipermetilasyonu 50 yaşın altındaki hastaların % 22 sinde (13/59) , daha ileri yaşlardaki hastaların % 46 sında (19/41) gözlenmiştir. Bu çalışmada **MGMT** metilasyonu ile ERa, PR, Her-2/neu arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Sharma vd., 2010).

Kornegor ve ark. 2012 yılında yapılan bir çalışmada, 108 erkek meme kanserli bir grup hastada 25 genin metilasyon durumu, MS-MLPA yöntemi ile araştırılmıştır. 108 hastadan 8 hastada (% 7) **MGMT** metilasyonu görülmüştür. Metilasyon durumları klinikopatolojik özellikler ile 28 kadın meme kanserli olgunun hasta sonuçları ile korelasyon göstermiştir. **MGMT** metilasyon yüzdesi düşük olmasına rağmen **MGMT** metile olan tümörlerin genişliği (3,2 cm), **MGMT** dışındaki metile genlere sahip

tümörlerle (2,1 cm; $P = 0.002$) karşılaştırıldığında daha büyük bir genişliğe sahip olduğu görülmüştür (Kornegoor vd., 2012).

Tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilen 23 genin invazif meme tümörü dokusundaki ekspresyon ve promotor bölgelerinin metilasyon durumunun incelendiği bir çalışmada, MLPA yöntemi ile 20 tümörlü, 5 komşu normal doku, 3 sağlıklı doku olmak üzere 23 kişiden alınan 28 dokuda, **MGMT** geni promotor bölgesinde % 11 metilasyon saptanmıştır. MGMT promotor metilasyonu ile ER, PR, C-erbB-2 arasında bir ilişki bulunamamıştır (Kılıç, 2012).

Üçlü negatif (ER, PR, Her2/neu negatif) fenotipe sahip meme kanserli hastalarda (bu fenotipe genellikle BRCA1 mutasyonu eşlik eder) **MGMT** promotor metilasyon durumu incelenmiştir. 92 üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hastadan alınmış formalinle fiske edilip parafine gömülmüş tümör numunelerinde MSP yöntemi ile MGMT promotor metilasyon oranı değerlendirilmiştir. Hastalarda MGMT metilasyon prevalansı; BRCA mutasyonu görülen TNBC'lerde % 30,2 (13/43), BRCA1 yönünden mutant olmayan TNBC'lerde % 63,6 (14/22), BRCA1 mutasyonu belirsiz olanlar TNBC'lerde ise % 58,3 (14/24) olarak gözlenmiştir (Fumagalli vd., 2012).

Farklı meme kanser alttiplerinin metilasyon durumlarının incelendiği bir çalışmada, ABCB1, CDKN2A/p16INK4a, ESR1, FOXC1, GSTP1, IGF2, **MGMT**, MLH1, PPP2R2B, PTEN ve RASSF1A genlerinin kantitatif DNA metilasyonu analizi pirosekanslama ile 27 DCIS, 28 IDCs, 34 karma tümör (hem DCIS hem de IDC özelliği gösteren tümörlü doku) ve 5 normal meme dokusu örneklerinden analizi yapıldı. Bu çalışmadaki temel amaç, meme kanser hücre hattı veya meme tümörlerinde metile olduğu bilinen 11 genin metilasyon analizi ile bilgi verici progresyon markerları tanımlamak hem de meme kanseri alt tiplerinde gen ekspresyon profillerin farklılıklarını göstermektir. MGMT metilasyon yüzdeleri sırasıyla DCIS özellikteki tümörler % 3,7, IDC özellik gösteren tümörlerde % 3,6, karma özellik gösteren tümörlerde % 5,9 oranında belirlenmiştir (Muggerud vd., 2010).

Bizim çalışmamız sonucunda araştırmaya dahil edilen 96 olgunun 88'i invaziv duktal karsinom, 3'ü invaziv lobüler karsinom, 1'i duktal karsinom in situ, 1'i tubüler karsinom, 2'si metaplastik karsinom, 1'i müsinöz karsinom tümör tipindedir. Çalışmamızda olguların tümörlü dokularında % 34,4'ünde (33/96) MGMT geninde promoter hipermetilasyonu görülürken; olguların % 65,6'sında (63/96) genin unmetile

konumda olduğu saptanmıştır. Aynı hastalara ait normal dokularda ise % 6,3'ünde (6/96) MGMT geninde promotor hipermetilasyonu görülürken; % 93,8'inde (90/96) genin unmetile olduğu saptanmıştır. Verschuur Maes ve arkadaşlarının MS-MLPA yöntemini kullandıkları çalışmada bizim çalışmamızdan daha yüksek oranda MGMT geni promotor hipermetilasyonu görülmesinin sebebi yöntem farklılığı olabilir. Sharma, Fumagalli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda bizim çalışmamızdan daha yüksek oranda görülen MGMT geni promoter hipermetilasyon durumunun görülmesinin olgu sayısındaki farklılıktan ve tümör tipi farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tserga ve arkadaşlarının MS-HRM yöntemini kullandıkları, Kornegor, Kılıç ve arkadaşlarının MS-MLPA yöntemlerini kullandıkları, Muggerud ve arkadaşlarının pirosekanslama ile yaptıkları çalışmadaki metilasyon oranı bizim çalışmamızdan daha düşük orandadır. Bu farklılığın yöntem farklılığından kaynaklandığını düşünmeteyiz. Zemlyakova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızdan daha düşük metilasyon oranı göstermesinin tümör tipi farklılığından kaynaklanabileceği, bu çalışmada normal doku örneklerinde metilasyon görülmezken bizim çalışmamızda normal dokularda (% 6,3) metilasyon gözlenmesi patolojik çalışmalardaki belirleyiciliğin yetersizliğinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda MGMT geni promotor hipermetilasyonunun prognostik faktörlerle karşılaştırıldığında yaş durumuyla ilişki kurulamamıştır. Yaptığımız çalışmamızla uyumlu olarak Sharma ve arkadaşları yaş ile hipermetilasyon arasında anlamlı bir ilişki saptamamışlardır. Tserga ve arkadaşları ise yaş ve hipermetilasyon arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Çalışmamızda Tümör evresi ile metilasyon ilişkisine bakıldığında ise Evre III'de diğer evrelere göre daha yüksek oranda hipermetilasyon saptanmıştır ve sonuç Tserga ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumludur. Çalışmamızda İnvaziv duktal karsinoma tümör tipi ile MGMT promotor hipermetilasyonu arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür bu ilişki Tserga, Maezese ve arkadaşlarının sonuçları ile korelasyon gösterirken, Muggerud ve arkadaşları tümör tipi ile hipermetilasyon arasında bir ilişki saptamamışlardır. Sharma ve arkadaşları ER pozitifliği, PR pozitifliği, C-erbB-2 pozitifliği ile hipermetilasyon arasında anlamlı bir ilişki saptamışlardır ve bu sonuç bizim verilerimizle uyumluyken, Kılıç ve arkadaşları ER pozitifliği, PR pozitifliği, C-erbB-2 pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki

bulmamıştır. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın çalışılan tümör tipinden kaynaklanabileceğini düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırma grubunu oluşturan 96 meme kanseri olgusunun tümör dokusu örneklerinde P16, MGMT geninin metilasyonunu değerlendirmek üzere metilasyon spesifik PCR analizi yapılmıştır.

1. Çalışılan tümör dokularında MSP analizi ile P16 (CDKN2A) geni % 43,8 promotor metilasyonu oranında saptanmıştır.

2. Olgularda saptanan metilasyon ile prognostik faktörler karşılaştırıldığında yaş durumuyla P16 (CDKN2A) geni promotor metilasyonu arasındaki ilişki anlamsız olarak bulunmuştur.

3.ER(+)'liği, PR(+)'liği, C-erb-B2(+)'liği, E-Cadherin(+)'liği ile P16 (CDKN2A) geni promotor hipermetilasyonu arasındaki ilişki anlamlı olarak bulunmuştur.

4. Epigenetik değişimlerin kanserin ilk evrelerinde daha etkili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda P16 (CDKN2A) promotor hipermetilasyonu ile Ki-67 <% 30 oranı ilişkili bulunmuştur. Ki-67 prognostik faktöründe tümörün erken evrelerinin epigenetik değişimleri daha yüksek olması sebebiyle tümörün metilasyonunun yüksek oranı ile Ki-67'nin düşük yüzdesi ilişkili bulunmuştur. Ki-67 düşük yüzdelerinde P16(CDKN2A) geni ile ilişkili olması epigenetik değişimleri kanserin ilk evrelerinde etkin olduğuna bir işarettir. Ki-67 ve P16 (CDKN2A) arasındaki bu ilişki kanser prognozunda biomarker olarak işlev görür.

5. Çalışılan tümör dokularında MSP analizi ile tümörlü dokularda MGMT geni promoter hipermetilasyonu % 34,4 (33/96) oranında, normal dokularda % 6,3 (6/96) oranında saptanmıştır.

6. Olgularda saptanan metilasyon ile prognostik faktörler karşılaştırıldığında yaş durumuyla MGMT geni promoter hipermetilasyonu arasındaki ilişkisi anlamlı olarak bulunamamıştır.

7. ER(+)'liği, PR(+)'liği ve C-erbB-2(+)'liği, E-cadherin(+)'liği ile MGMT geni promotor hipermetilasyonu arasındaki ilişki anlamlı olarak bulunmuştur.

8.Epigenetik değişimlerin kanserin ilk evrelerinde daha etkili olduğunu bilinmektedir. Çalışmamızda MGMT promotor hipermetilasyonu ile Ki-67 <% 30 oranı ilişkili bulunmuştur. Ki-67 düşük yüzdelerinde MGMT geni ile ilişkili olması

epigenetik değişimlerin kanserin ilk evrelerinde etkin olduğuna bir işarettir. Ki-67 ve MGMT arasındaki bu ilişki kanser prognozunda biomarker olarak işlev görebilir.

Bu çalışma sonrasında metilasyon durumları belirlenmiş olan bu genlerin ekspresyon profillerinde çalışılması bir sonraki basamak olarak düşünülebilir. Ayrıca bu yapılan çalışmanın bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel, G.L., “Kolon adenokarsinomlarında CD44, E-Cadherin, nm23 ve P53 ekspresyonunun tümörün metastazı ve prognozu ile ilişkisi”, **Celal Bayar Üniversitesi**, Manisa, 19-20 (2003).
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., “Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells”, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 100(7):3983-3988 (2003).
- Bane, A., O’Malley, F.P., “Familial Breast Cancer”, In O’Malley, F.P., Pinder, S.E., Breast Pathology, A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology, **Churchill Livingstone**, Philadelphia, 241-247 (2006).
- Barekati, Z., Radpour, R., Lu, O., Bitzer, J., Zheng, H., Toniolo, P., Lenner, P., and Zhong, X.Y., “Methylation signature of lymph node metastases in breast cancer patients”, **BMC Cancer**, 12:244 (2012).
- Baştürk, O., “Mesanenin değişici epitel karsinomlarında P53, Ki-67, bcl-2 ve p27Kip1 ekspresyonunun dercelendirme sistemleriyle ve prognozla ilişkisi”, **Celal Bayar Üniversitesi**, Manisa, (2003).
- Botezatu, A., Iancu, I., Popa, I., Constantin, M., Cucu, N., and Anton, G., “Epigenetic modifications of P16, E-CADHERIN, RAR β AND DAPK gene promoters in breast cancer”, **Proceedings of the Romanian Academy**, Series B, 3:163–167 (2008).
- Battagli, C., Uzzo, R.G., Dulaimi, E., Ibanez, de Caceres, I., Krassenstein, R., Al-Saleem, T., Greenberg, R.E., Cairns, P.“ Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients”, **Cancer Research**, 63(24):8695- 9 (2003).
- Baylin, S.B., Belinsky, S.A., Herman, J.G.“Aberrant methylation of gene promoters in cancer concepts, misconcepts, and promise”, **Oxford Journals | Medicine**, 92(18):1460- 1 (2000).
- Claus, E.B., Risch, N., Thompson, W.D., “Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study,” **American Journal of Human Genetics**, 48:232–242 (1991).
- Cordeiro, A.T., Silva, C.M., Bartchewsky Júnior, W., Ribeiro, M.L., “Evaluation of the expression of the MGMT gene in normal and neoplastic tissue of patients with colorectal cancer”, **Revista Colegio Brasileiro Cirurgioes** 39(1):48-53 (2012).
- Crum, C.P., Lester, S.C., Cotran, R.S., “The Female Genital System and Breast”, (Editors)Cotran, R.S., Robbins, S.L., Kumar V.C., Pathologic basis of disease, **Saunders**, Philadelphia pennsylvania 7:679-719 (2002).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Cullen, R., Maguire, T.M., McDermott, E.W., Hill, A.D., O'Higgins, N.J., Duffy, M.J., "Studies on oestrogen receptor-alpha and -beta mRNA in breast cancer", *Europa Journal Cancer*, 37:1118-22 (2001).
- Dalay, N., "Kanser", Hücre Moleküler Yaklaşım, Sakızlı M., Atabey, N., *İzmir Tıp Kitapevi*, İzmir, 3: 661 (2006).
- Darendeliler, E., Agaoglu, F., "Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etiyojisi", Meme Kanseri., (Editörler)Topuz, E., Aydnır, A., Dinçer, M., *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 13-34 (2006).
- Ducasse, M., and Brown, M., "Epigenetic aberrations and cancer", *Molecular Cancer*, 5; 60 (2006).
- Ellis, I.O., Elston, C.W., "Histologic grade", (Editörler)Malley, F.P., Pinder, S.E., Breast Pathology, A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology, *Churchill Livingstone*, Philadelphia, 225-233 (2006).
- Etseller, M. and Herman, J., "Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours", *Journal Pathology*, 196; 1- 7 (2002).
- Feinberg, A., "The Epigenetics of cancer etiology", *Cancer Biology*, 14: 427- 432 (2004).
- Feng, J., Hu, L.H., Ju, J., Li, Y.R., Xie F., " Diagnostic value of BRCA1 and P16 gene methylation in sporadic breast cancer", *Chinese Journal of Cancer*, 28(4); 3-8 (2009).
- Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., "Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families", *The Breast Cancer Linkage Consortium American Journal Human Genetics*, 62(3):676-689 (1998).
- Fruscaizo, A., Damante, G., Calcagno, A., Di Loreta, C., Marchesoni, D., "Four primary malignancies successively occurred in a BRCA2 mutation carrier: A case report", *Cancer Investigation*, 24:611-614 (2006).
- Fumagalli, C., Pruneri, G., Possanzini, P., Manzotti, M., Barile, M., Feroce, I., Colleoni, M., Bonanni, B., Maisonneuve, P., Radice, P., Viale, G., Barberis, M., "Methylation of O 6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter gene in triple-negative breast cancer patients", *Breast Cancer Research and Treatment*, 134: 131-137 (2012).
- Garcia, M., Jemal, A., Ward, E.M., Center, M.M., "Global Cancer Facts & Figures", *GA: American Cancer Society*, Atlanta, 2-11 (2007).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Gerdes, J., Leemke, H., Baisch, H., “Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67”, *Immunol*, 133:1710-1715 (1984).
- Güllüoğlu, M.G., İplikçi, A., “ Meme Anatomisi”, (Editörler)Topuz, E., Aydın, A., Dinçer, M., “Meme Kanseri”, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 13-34 (2003).
- Half, E., Tang, X.M., Gwyn, K., Sahin, A., Wathrn, K., Sinicrope, F.A., “Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ”, *Cancer Research*, 62:1676-1681 (2002).
- Hayashi, S.I., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yoshida, N., Yamaguchi, Y., “The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application”, *Endocrine-Related Cancer*, 10(2):193-202 (2003).
- Haydaroglu, A., Dubova, S., Özşaran, Z., Bölükbaşı, Y., Yılmaz, R., Kapkaç, M., Özdedeli, E., “Ege Üniversitesinde Meme Kanseri: 3897 Olgunun Değerlendirilmesi”, *Meme Sağlığı Dergisi*, 1(1):6-11 (2005).
- Herman, J.G ., “Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 93:9821–9826 (1996).
- Herrmann, M.G., Durtschi, J.D., Bromley, L.K., Wittwer, C.T. ve Voelkerding, K.V., “Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes”, *Clinical Chemistry*, 52, 494-503 (2006).
- Hodgson, S.V., Morrison, P.J., Irving, M., “Breast Cancer Genetics”, Unsolved Questions and Open Perspectives in an Expanding Clinical Practice, *American Journal Medical Genetic Semin Medical Genetics*, 129C: 56–64 (2004).
- Honrado, E., Benitez, J., Palacios, J., “The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications”, *Modern Pathology*, 18:1305-1320 (2005).
- Huang, Z., Bassil, C.F. ve Murphy, S.K., “Anastasia Malek and Oleg Tchernitsa, Ovarian Cancer: Methods and Protocols”, *Methods in Molecular Biology*, 1049, (2013).
- Hulka, B.S., Moorman, P.G., “Breast cancer: hormones and other risk factors” *Maturitas*, 38(1):103-113; 113-116 (2007).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kashima, K., Oite, T., Aoki, Y., Takakuwa, K., Aida, H., Nagata, H., Sekine, M., Wu, H., Hirai, Y., Wada, Y., Yamamoto, K., “Screening of BRCA1 mutation using immunohistochemical staining with C-terminal and N-terminal antibodies in familial ovarian cancers”, *Japanese Journal Cancer*, 91:399-409 (2000).
- Kenemans, P., Bosman, A., “Breast cancer and post-menopausal hormone therapy”, *Best Practic Research Clinical Endocrinol Metab*, 17:123–37 (2003).
- Kenemans, P., Bosman, A., “Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer”, *Maturitas*, 49: 34–43 (2004).
- Kılıç, Y., “Meme Kanseri Olgularında İlişkili Tümör Süpressör Genlerin Metilasyon ve Ekspresyon Durumlarının Karşılaştırılması”, Doktora Tezi, *Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 2012.
- Knudson, A.g., J.r., “Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma”, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 68:820-823 (1971).
- Kordon, E.C., Smith, G.H., “An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell”, *Development*, 125(10):1921-1930 (1998).
- Kornegoor, R., Moelans, C.B., Anoek HJ Verschuur-Maes, A.H.J., Hogenes, M.C.H, Bruin, P.C., Oudejans, J.J., ve van Diest, P.J., “Promoter hypermethylation in male breast cancer: analysis by multiplex ligation-dependent probe amplification”, *Breast Cancer Research*, 14: R101 (2012).
- Laird, P., “Cancer epigenetics”, *Human Molecular Genetics*, 14; 65- 76 (2005).
- Lane, D.P., “p53, guardian of the genome”, *Nature*, 358:15-16 (1979).
- Larkins, T.L., Nowell, M., Singh, S., Sanford, G.L., “Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression”, *BMC Cancer*, 6:181-193 (2006).
- Lester, S.C., “The Breast”, (Editörler) Kumar V., Abbas, A.K., Fausto, N., Pathologic basis of disease, *Elsevier Saunders*, Philadelphia, 7:1120-1149 (2005).
- Levine, A., Momend, J., Finlay, C., “The P53 supressor gene”, *Nature*, 351:453-456 (1991).
- Li, L.C., Dahiya, R., “MethPrimer: designing primers for methylation PCRs”, *Bioinformatics*, 18:1427–1431 (2002).
- Li S., Rong M., Iacopetta B., “DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features”, *Cancer Letters*, 237:272–280 (2006).
- Lippman, M.E., “Breast Cancer”, Fauci, Harrison’s Principals of Internal Medicine, *Mc-Graw Hill Companies*, USA, 14:562-568 (1997).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Liu, E., Thor, A., Hem, Barcos, M., Ljung, B.M., Benz, C., “The Her 2 (cerb B2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast”, *Oncogene*, 7:1027-1032 (1992).
- Lu, Q., Qiu, X., Hu, N., Wen, H., Su, Y. and Richardson, B., “Epigenetics, diseases and therapeutic interventions” *Ageing Research Rewievs*, 5; 449- 467 (2006).
- Lüleyap, H.Ü., “Kanser Biyolojisi ve Genetiği”, Moleküler Genetiğin Esasları, *Nobel Kitapevi*, Adana, 309-310 (2008).
- Marzese, D.M., Gago F.E., Orozco, J.I., Tello, O.M., Roqué M. ve Vargas-Roig L.M., “Aberrant DNA methylation of cancer-related genes in giant breast fibroadenoma: a case report”, *Journal of Medical Case Reports*, 1-10 (2011).
- Melki, J. and Clark, S., “DNA methylation changes in leukaemia”, *Seminars in Cancer Biology*, 12: 347-357 (2002).
- Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid, B.J., “Cancer as an evolutionary and ecological process”, *Nature Reviews Cancer*, 6: 924-935 (2006).
- McGee, S.F., Fiona Lanigan, F., Emer Gilliga, E., Bernd Groner, B., “Mammary gland biology and breast cancer”, *EMBO reports*, 7:(11) 1084-88 (2006).
- Millis, R.R., Hanby, Am., Oberman, H.A., “The Breast”, (Editörler)Sternberg S., Diagnostic Surgical Pathology, *Lippincott Williams&Wilkins*, Philadelphia, 3:319-379 (1999).
- Moll, U., Lau, R., Sypes, M.A., Gupta, M.M., Anderson, C.W., “DNA-PK, the DNA-activated protein kinase, is differentially expressed in normal and malignant human tissues”, *Oncogene*, 18:3114-3126 (1999).
- Momparler, R. and Bovenzi, V., “DNA methylation and Cancer”, *Journal of Cellular Physiology*, 183:145- 154 (2002).
- Morin, V., Diaz, F., Montecino, M., Fothergill-Gilmore, L., Puchi, M. And Imschenetzky, M., “Poly (ADP-ribosylation) protects maternally derived histones from proteolysis after fertilization” *Biocheical Journal*, 343; 95- 98 (1999).
- Moshin, S.K., “Molecular markers in invasive breast cancer”, In O’Malley F.P, Pinder S.E., Breast Pathology, A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology, *Churchill Livingstone*, Philadelphia, 265-273 (2006).
- Muggerud, A.A., Rønneberg, J.A., Wärnberg, F., Botling, J., Busato, F., Jovanovic,J., Solvang, H., Bukholm, I., Børresen-Dale, A.L., Kristensen, V.N., Sørlie,T., ve Tost J., “Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer”, *Breast Cancer Research*, 12:R3 1-10 (2010).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Munot, K., Bell, S.M., Lane, S., Horgan, K., Hanby, A.M., Speirs, V., “Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer”, *Hum Pathol*, August, 37(8):989-99 (2006).
- Murphy, S.K. “Epigenetic detection of human chromosome 14 uniparental disomy”, *Human Mutat*, 22:92–97 (2003).
- Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H., “Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C→A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene”, *Carcinogenesis*, 22(10), 1715-1719 (2001).
- Natarajan, A.T., Vermeulen, S., Darroudi, F., Valentine, M.B., “Chromosomal localization of human O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (Mgmt) gene by in situ hybridization”, *Mutagenesis*, 7:83–85 (1992).
- Nemtsova, M., Zemlyakova, V., Kusnetsova, E., Strelnikov, V., Lyubchenko, L., Zaletayev, D., “Methylation profiling of carcinogenesis-associated genes in sporadic breast cancer”, *Breast Cancer Research*, 7(2):4-17 (2005).
- Neto, J.C., Ikoma, M.M., Carvalho, K.C., Vassallo, J., “MGMT and PTEN as potential prognostic markers in breast cancer”, *Experimental and Molecular Pathology*, 92(1):20-6 (2012).
- Nicoletto, M.O., Donach, M., De Nicole, A., Artioli, G., Banna, G., Monfardini, S., “BRCA-1 and BRCA-2 mutations as prognostic factors in clinical practise and genetic counselling”, *Cancer Treatment Reviews*, 27:295-304 (2001).
- Ochs, K., Kaina, B., “Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent”, *Cancer Research*, 60:5815–5824 (2000).
- Ormandy, C.J., Musgrove, E.A., Hui, R., Daly, R.J., Sutherland, R.L. “Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer”, *Breast Cancer Research*, 78:323–35 (2003).
- Osanai, T., Takagi, Y., Toriya, Y., Nakagawa, T., “Inverse correlation between the expression of O6-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) and p53 in breast cancer”, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 35(3):121-5 (2005).
- Osborn, C., Wilson, P., Tripathy, D., “Oncogenes and tumor supressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications”, *The Oncologist*, 9:361-377 (2009).
- Öztürk, M., “Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri”, Meme Kanseri, *Sempozyum Dizisi*, 54: 15 – 26 (2006)

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Parrella, P., Poeta, M.L., Gallo, A.P., “Nonrandom Distribution of Aberrant Promoter Methylation of Cancer-Related Genes in Sporadic Breast Tumors”, *Clinical Cancer Research*, 10:5349-5354 (2004).
- Peedicayil, J., “Epigenetic therapy-a new development in pharmacology”, *Indian Journal Medical Research*, 123:17- 24 (2006).
- Pegg, A.E., “Repair of O(6)-alkylguanine by alkyl transferases”, *Mutat Research*, 462:83–100 (2000).
- Polyak, K., “Breast cancer: origins and evolution”, *Journal Clinical Invest*, 117:3155–3163 (2007).
- Radpour, R., Kohler, C., Haghighi, M.M., Fan, A.X.C., Holzgreve, W., and Zhong, X.Y., “Methylation profiles of 22 candidate genes in breast cancer using high-throughput MALDI-TOF mass array”, *Oncogene*, 28:2969–2978 (2009).
- Raish, M., Dhillon, V.S., Ahmad, A., Ansari, M.A., Mudassar, S., Shahid, M., Batra, V., Gupta, P., Das, B.C., Shukla, N.K., and Husain, S.A., “Promoter Hypermethylation in Tumor Suppressing Genes p16 and FHIT and Their Relationship with Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Status in Breast Cancer Patients from Northern India”, *Transl Oncology*, 264–270 (2009).
- Ranger, G.S., Salhab, M., Mokbel, K., “The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review”, *Breast Cancer Research Treatment*, (2007).
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., “Stem cells, cancer, and cancer stem cells”, *Nature*, 414:105-111 (2001).
- Rodriguez-Boulau, E., Salas, P.J., “External and internal signals for epithelial cell surface polarization”, *Annual Review of Physiology*, 51:741–754 (1989).
- Rosai J. Breast, In ROSAI, “Rosai and Ackerman’s surgical pathology”, *Mosby*, Edinburgh, 9:1763-1827 (2004).
- Russo, J., Russo, I.H., “Development of the human breast”, *Maturitas*, 49: 2–15 (2004).
- Santos-Rosa, H. and Caldas, C., “Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer”, *European Journal of Cancer*, 41:2381- 2402 (2005).
- Sharma, G., Mirza, S., Parshad, R., Srivastava, A., Datta Gupta, S.D., Pandya, P., Ralhan R., “Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients”, *Elsevier* 87:83–91 (2010).
- Singal, R. and Ginder, G., “DNA methylation”, *Blood*, 93; 4059- 4070 (1990).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

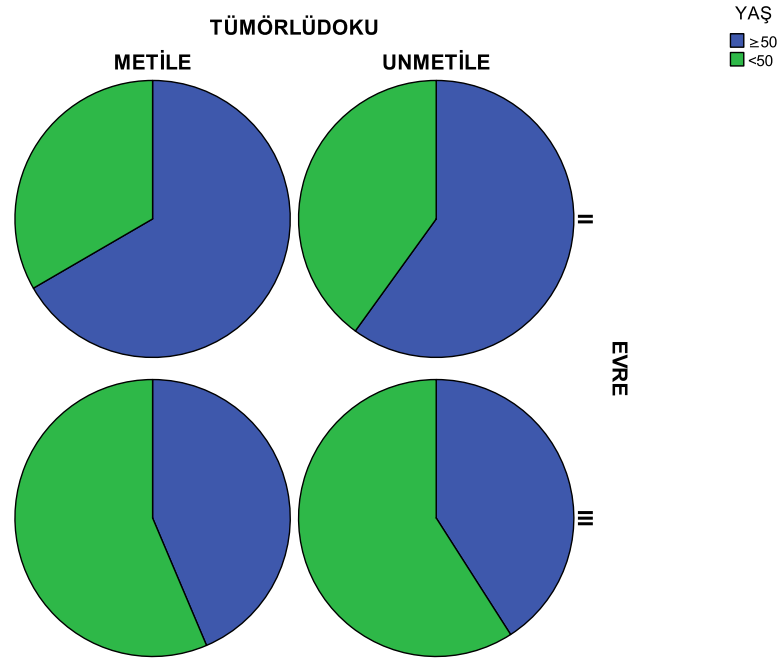
- Sivula, A., Talvensaaari-Mattila, A., Lundin, J., Joensuu, H., Haglung, C., Ristimaki, A., Turpeenniemi-Hujanen, T., “Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase in human breast cancer”, *Breast Cancer Research and Treatment*, 89:215-220 (2005).
- Sturgeon, S.R., Balasubramanian, R., Schairer, C., Muss, H.B., Ziegler R.G. and Arcaro K., F., “Detection of promoter methylation of tumor suppressor genes in serum DNA of breast cancer cases and benign breast disease controls”, *Epigenetics*, 7(11): 1258–1267 (2012).
- Tao, M.H., Marian, C., Nie, J., Ambrosone, C., Krishnan, S.S., Edge, S.B., Trevisan, M., Shields, P.G., and Freudenheim, J.L., “Body mass and DNA promoter methylation in breast tumors in the Western New York Exposures and Breast Cancer Study”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(3):831-8 (2011).
- Tavassoli, F.A., “Pathology of the breast”, *Appleton&Lange*, 112-118 (1999).
- Tchurikov, N., “Molecular mechanisms of epigenetics”, *Biochemistry*, Moscow, 70:406- 423 (2004).
- Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G., Kolar, Z., “Mammary gland development and cancer”, *Cesk Patol*, 41(3):94-101 (2005).
- Tuzlalı, S., “Memenin Malign Tümörlerinin Patolojik Özellikleri”, (Editörler)Topuz, E., Aydiner, A., Dinçer, M., Meme Kanseri, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 242-262 (2003).
- Tserga, A., Michalopoulos, N.V., Levidou, G., Korkolopoulou, P., Zografos, G., Patsouris, E. ve Saetta, A.A., “Association of aberrant DNA methylation with clinicopathological features in breast cancer”, *Oncology Reports*, 27: 1630-1638 (2012).
- Ünal, H., “Meme Kanserinin Tanı ve Tedavisinin Tarihsel Gelişimi”, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Meme Kanseri Sempozyumu Dizisi*, (54):9-13 (2006).
- Vallian, S., Sedaghat, M., Nassiri, I., Frazmand, A., “Methylation status of p16INK4A tumor suppressor gene in Iranian patients with sporadic breast cancer”, *Journal Cancer Research Clinical Oncology*, 135:991-996 (2009).
- Verschuur-Maes, A.H., de Bruin, P.C., van Diest, P.J., “Epigenetic progression of columnar cell lesions of the breast to invasive breast cancer”, *Breast Cancer Res Treat*, 136:705-715 (2012).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

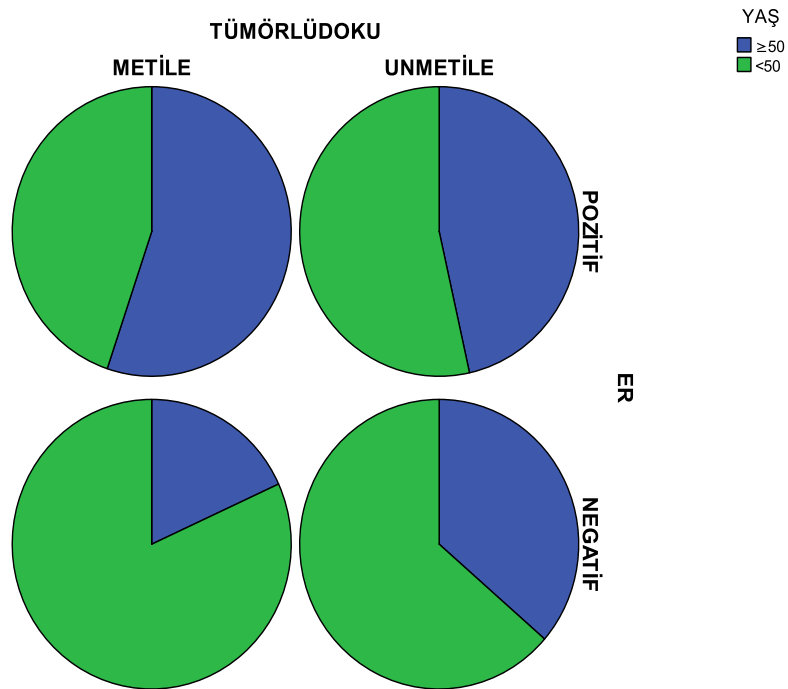
- Watanabe, T., Katayama, Y., Komine, C., Yoshino, A., Ogino, A., Ohta, T., Fugushima, T., "O6 methylguanine-DNA Methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course", *International Journal of Cancer*, 113: 581-587 (2005).
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. and Losick, R., "Molecular Biology of the Gene", *Benjamin Cummings*, 5:732(2004).
- Weissman, I.L., "Anderson, D.J., Gage, F., Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and trans differentiation," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17:387-403 (2001).
- Yang, X., Lippman, M.E., "BRCA 1 and BRCA 2 in breast cancer", *Breast Cancer Research and Treatment*, 54:1-10 (1999).

8.EKLER

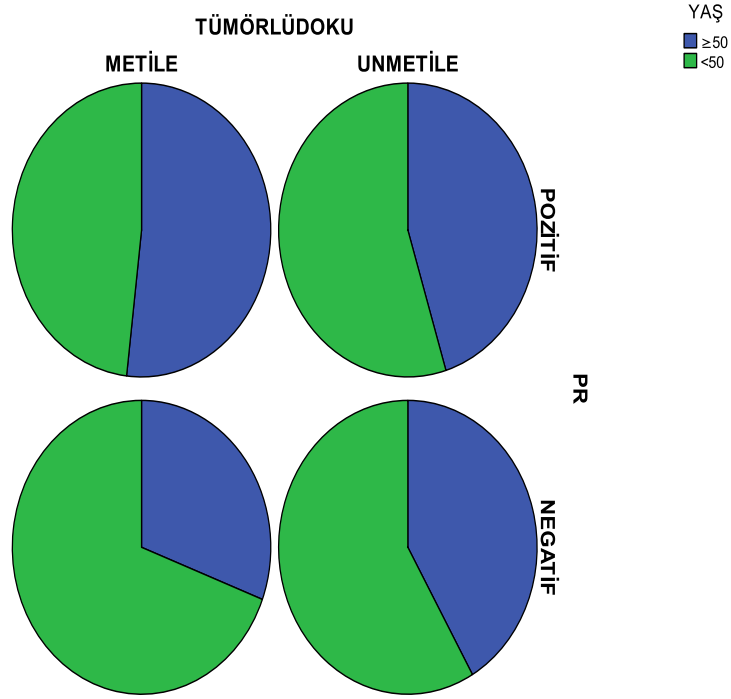
Ek 1. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda evre ile yaş dağılımı.



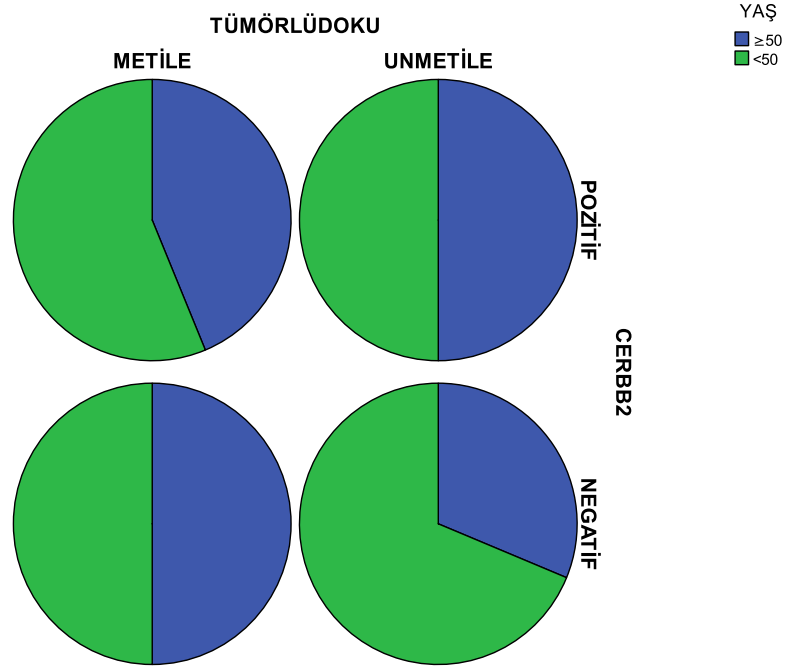
Ek 2. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda ER ile yaş dağılımı.



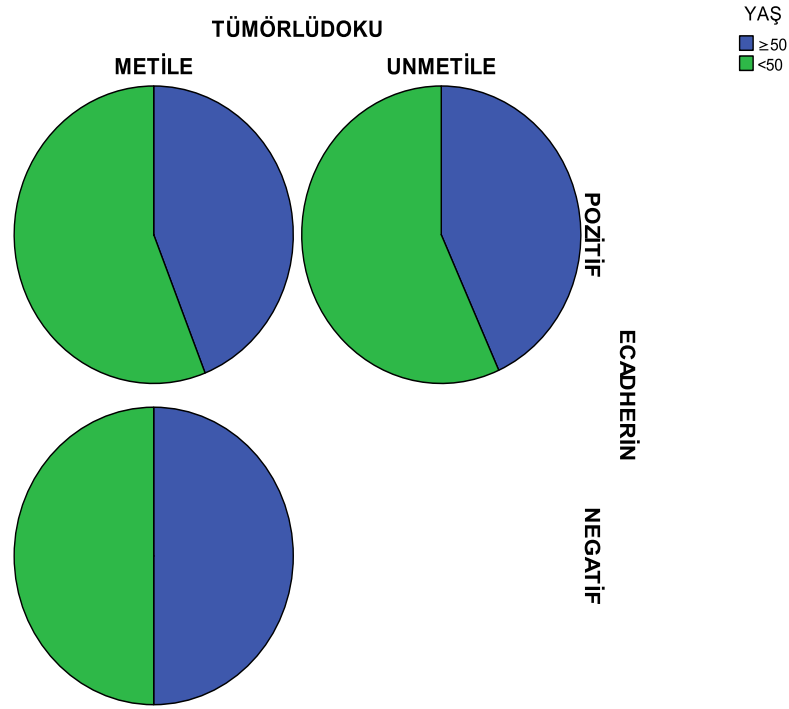
Ek 3. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda PR ile yaş dağılımı



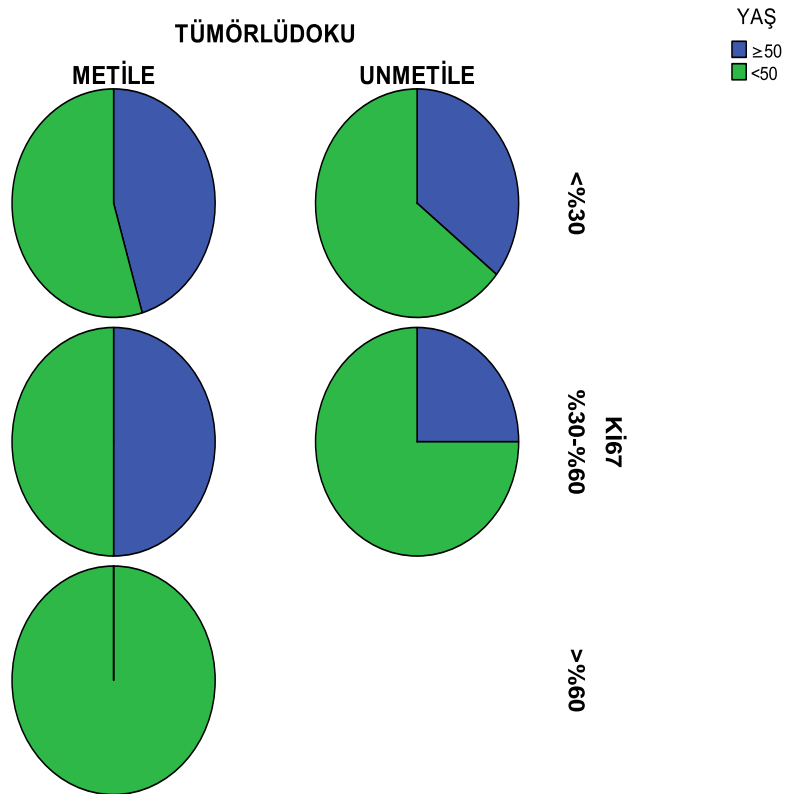
Ek 4. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda C-erb-B2 ile yaş dağılımı.



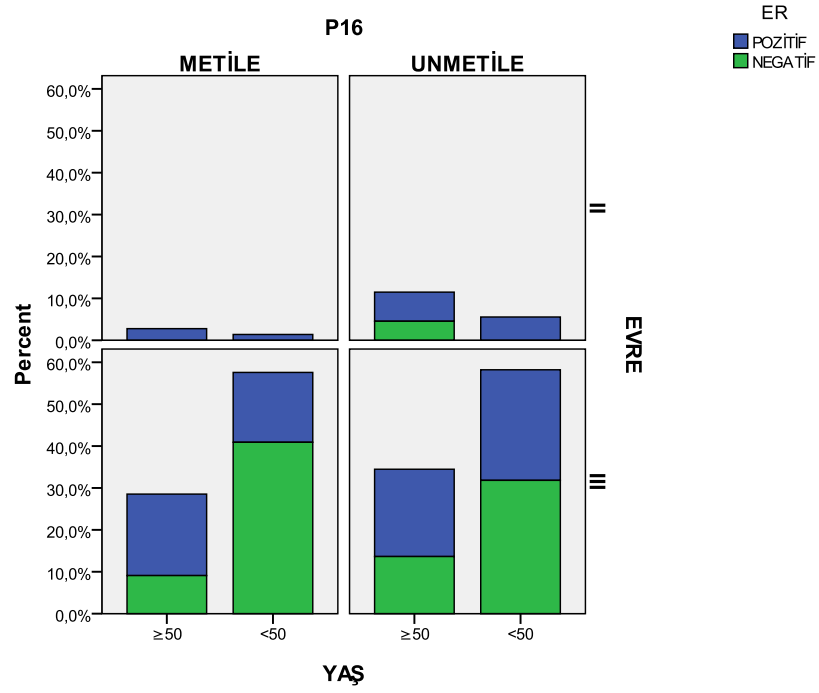
Ek 5. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda E-Cadherin ile yaş dağılımı.



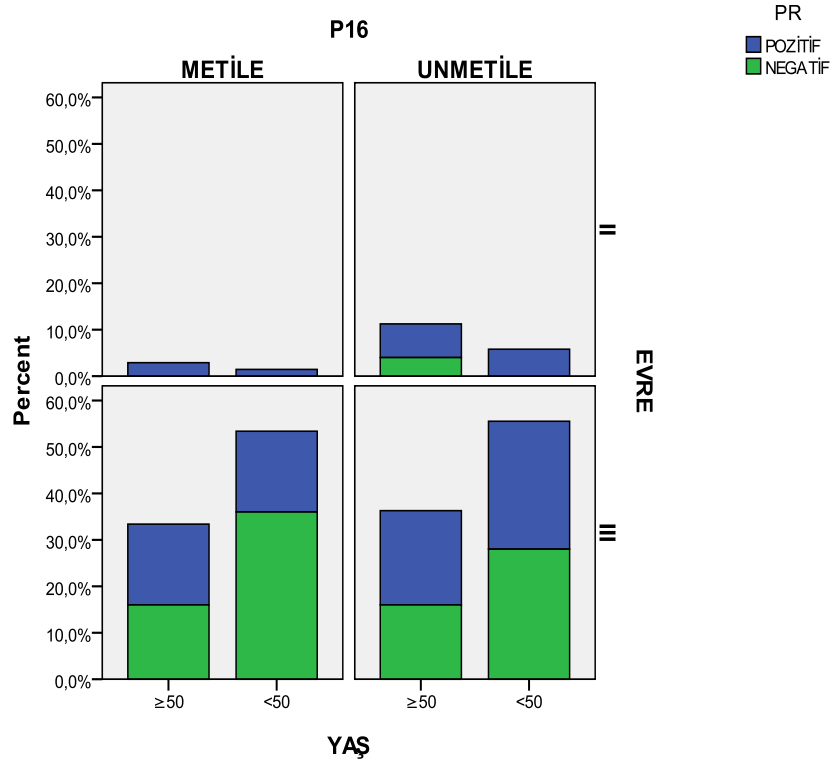
Ek 6. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda Ki-67 ile yaş dağılımı.



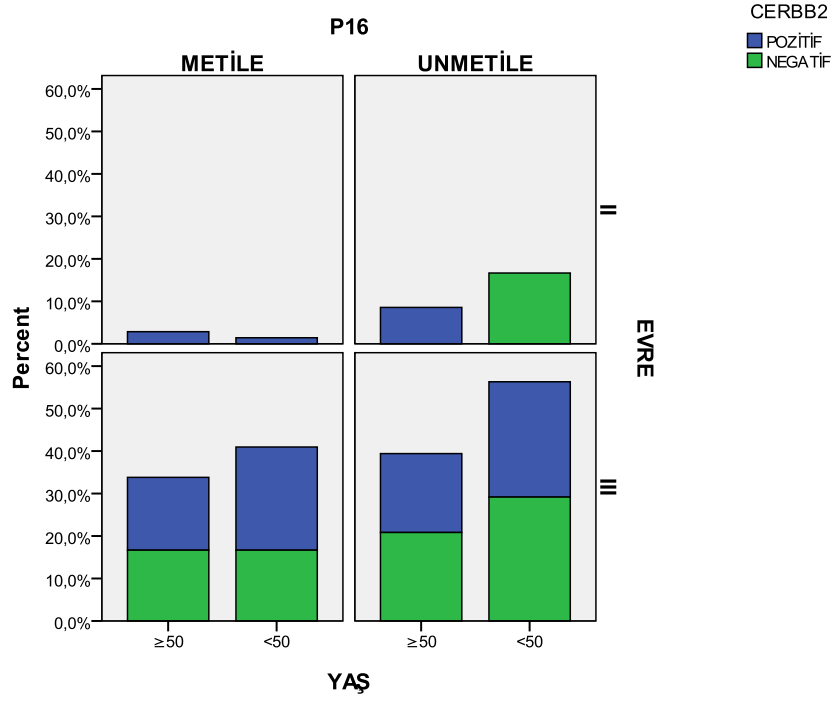
Ek 7. P16 (CDKN2A) tümörlü dokuda evre ile ER dağılımı



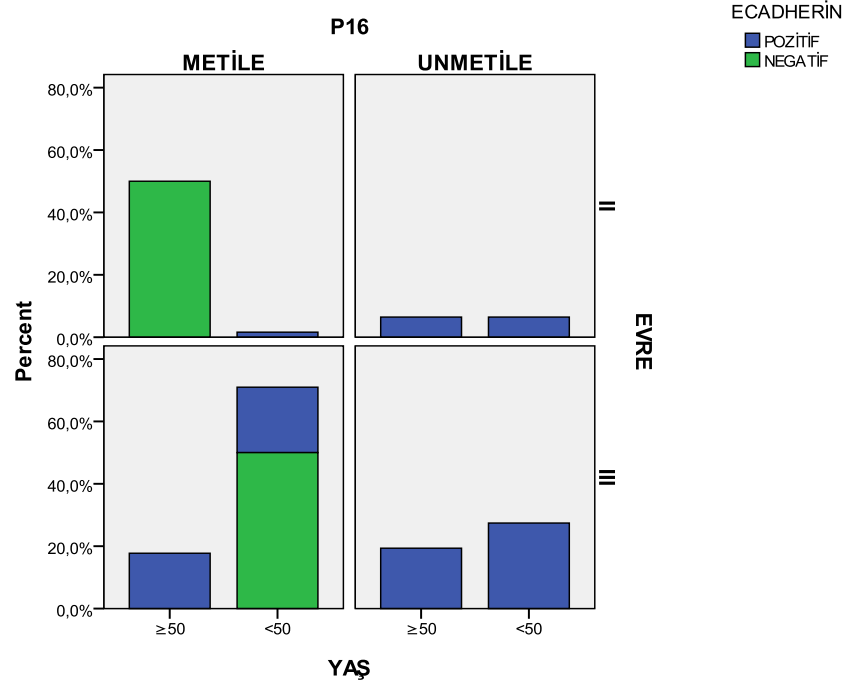
Ek 8. Tümörlü dokuda evre ile PR dağılımı.



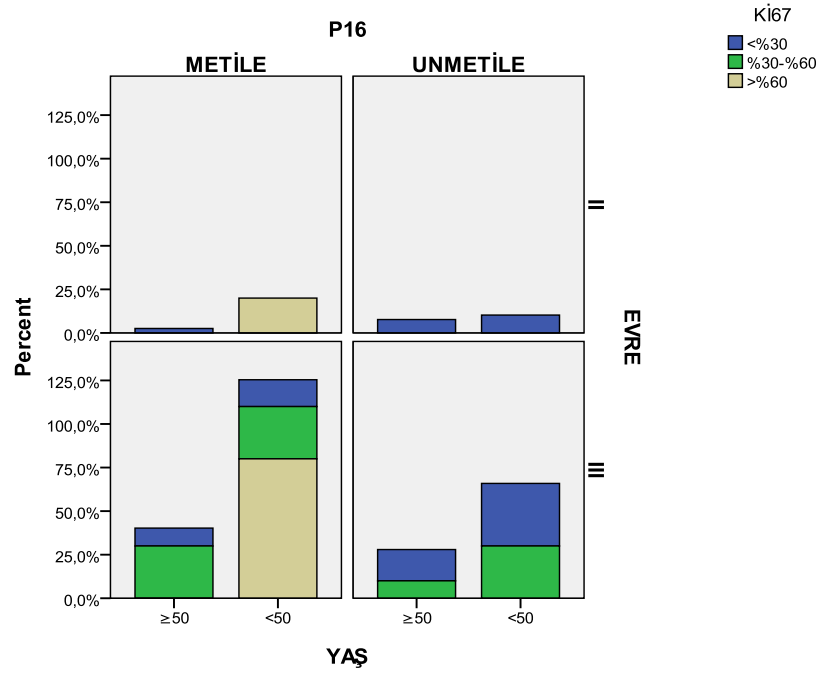
Ek 9. P16 (CDKN2A) evre ile C-erb-B2 dağılımı.



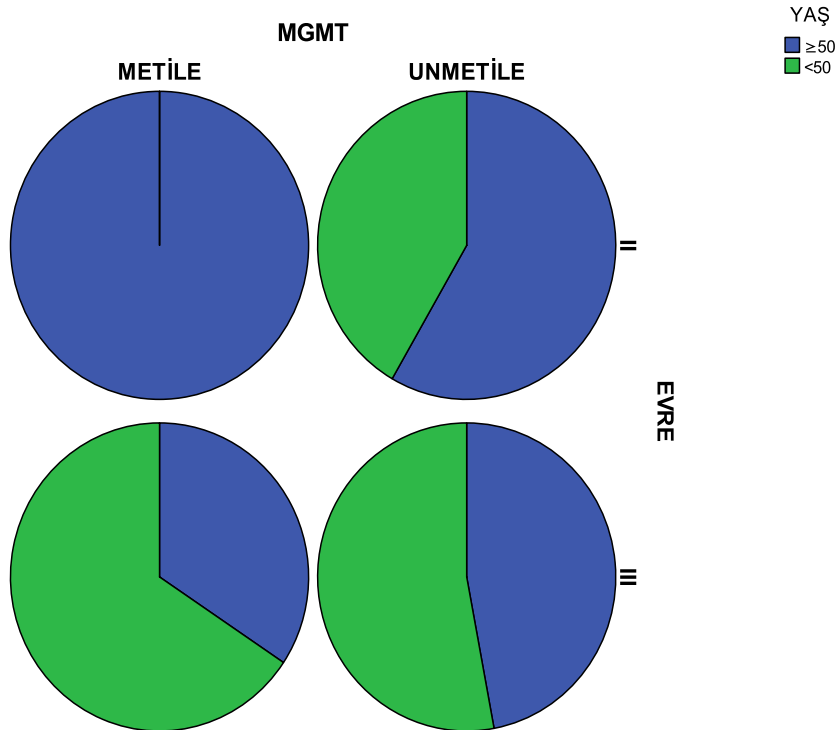
Ek 10. P16 (CDKN2A) evre ile E-Cadherin dağılımı.



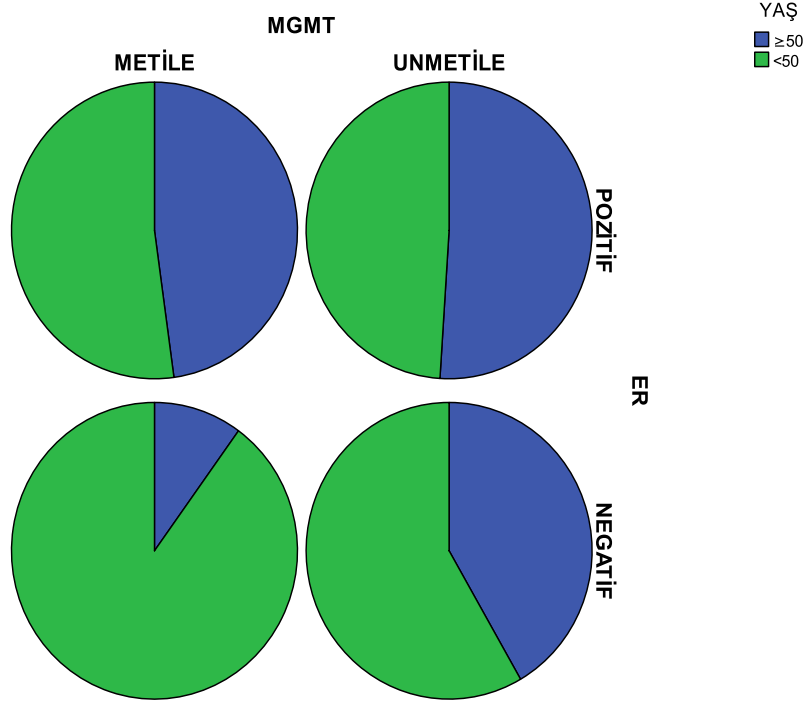
Ek 11. P16 (CDKN2A) evre ile Ki-67 dağılımı.



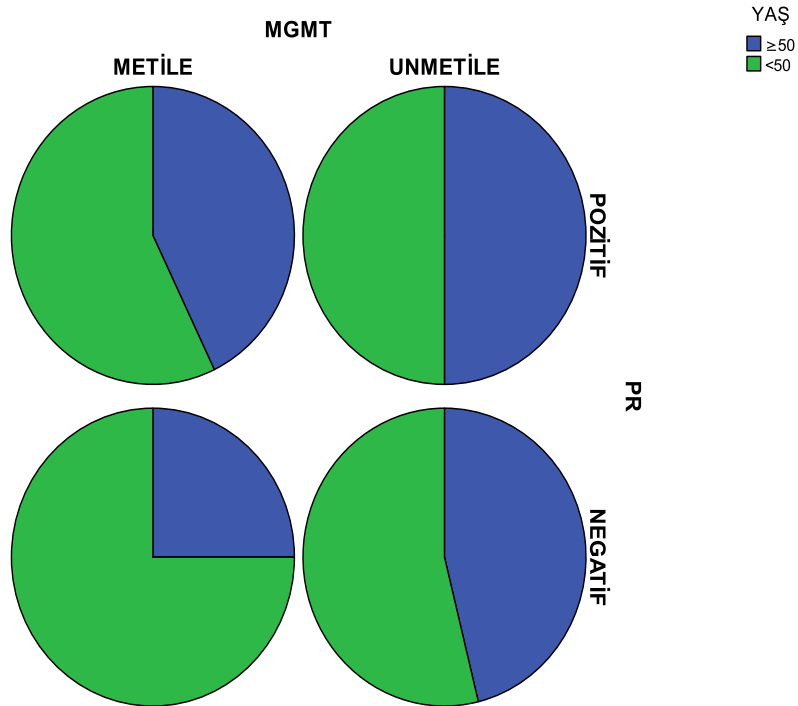
Ek 12. MGMT evre ile yaş dağılımı.



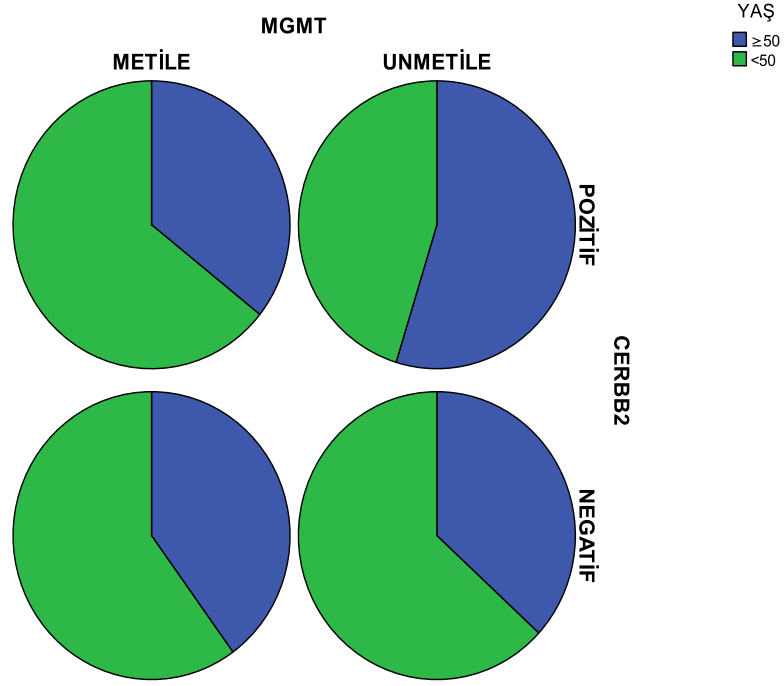
Ek 13. MGMT ER ile yaş dağılımı.



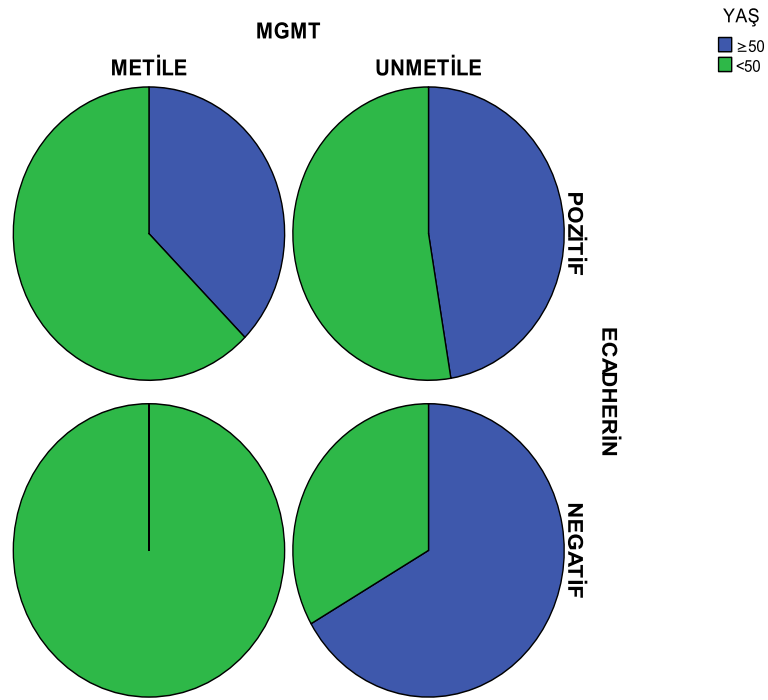
Ek 14. MGMT PR ile yaş dağılımı.



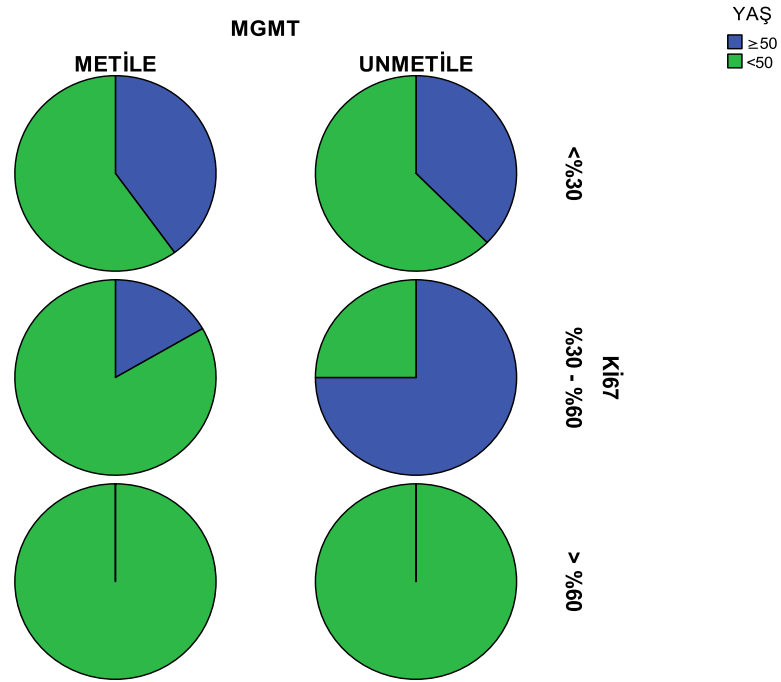
Ek 15. MGMT C-erb-B2 ile yaş dağılımı.



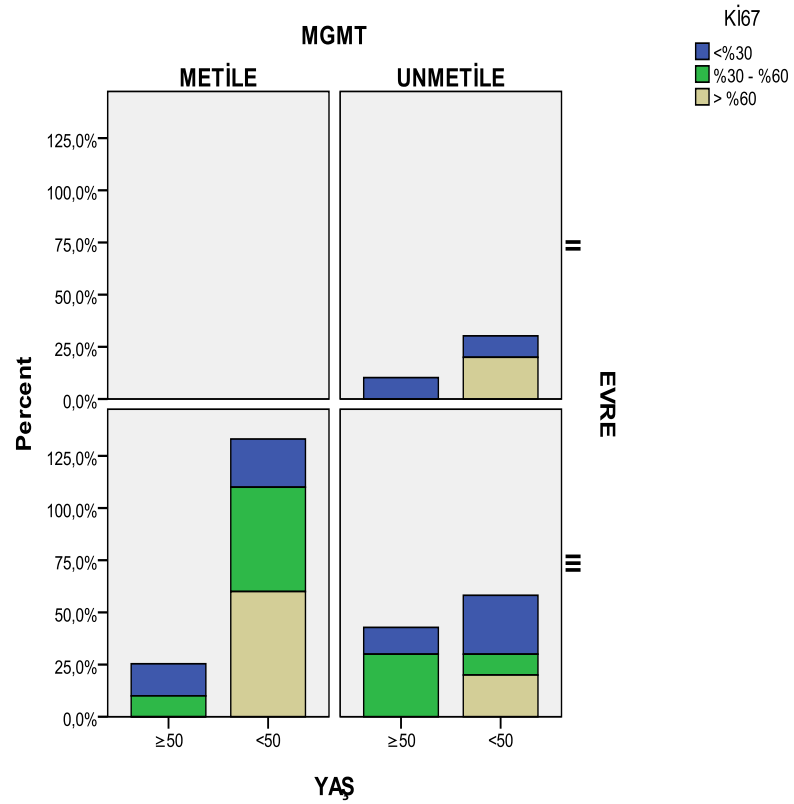
Ek 16. MGMT E-Cadherin ile yaş dağılımı.



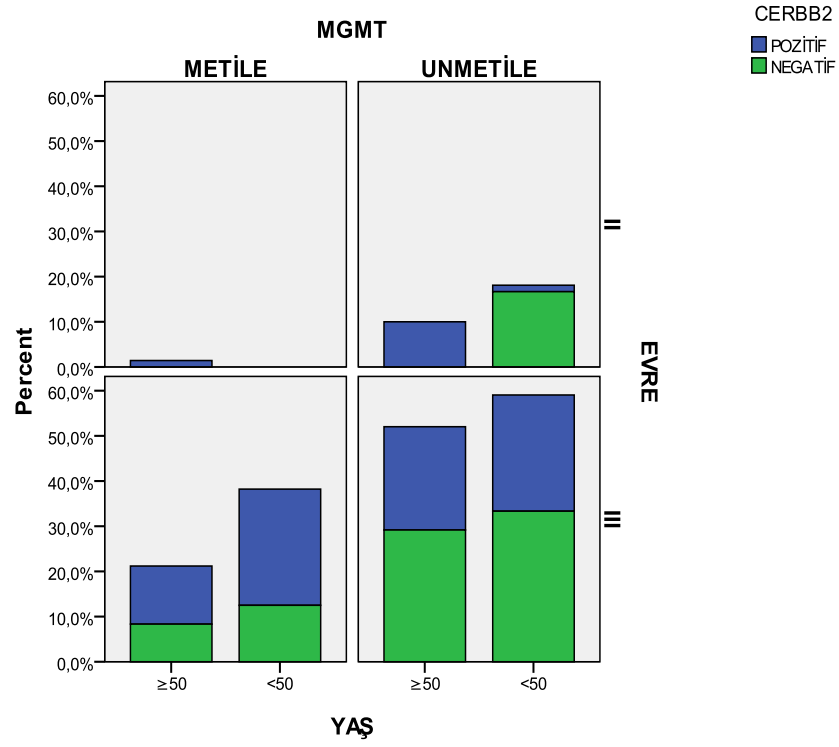
Ek 17. MGMT Ki-67 ile Yaş Dağılımı



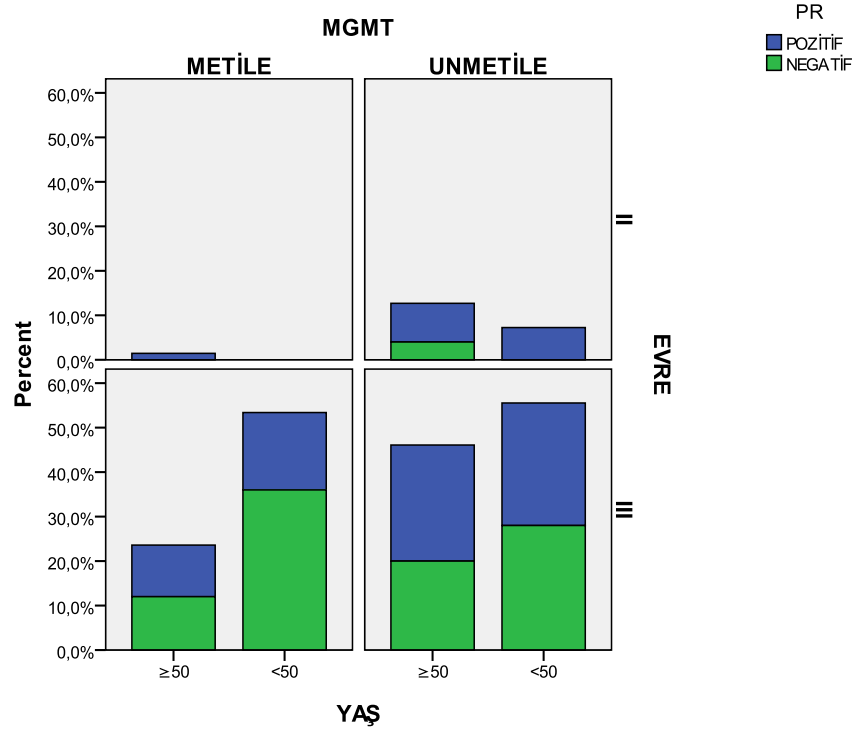
Ek 18. MGMT evre ile Ki-67 dağılımı.

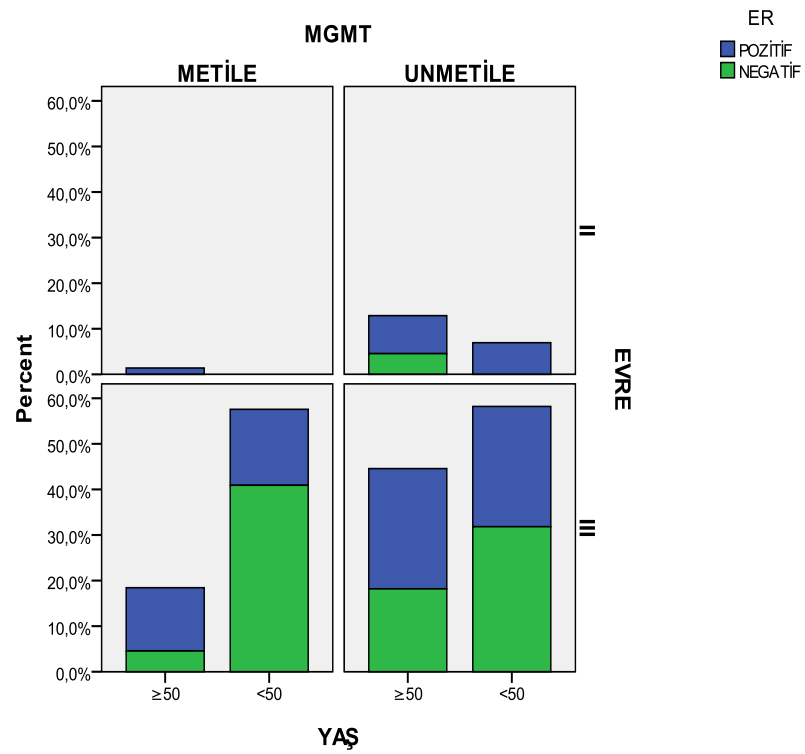
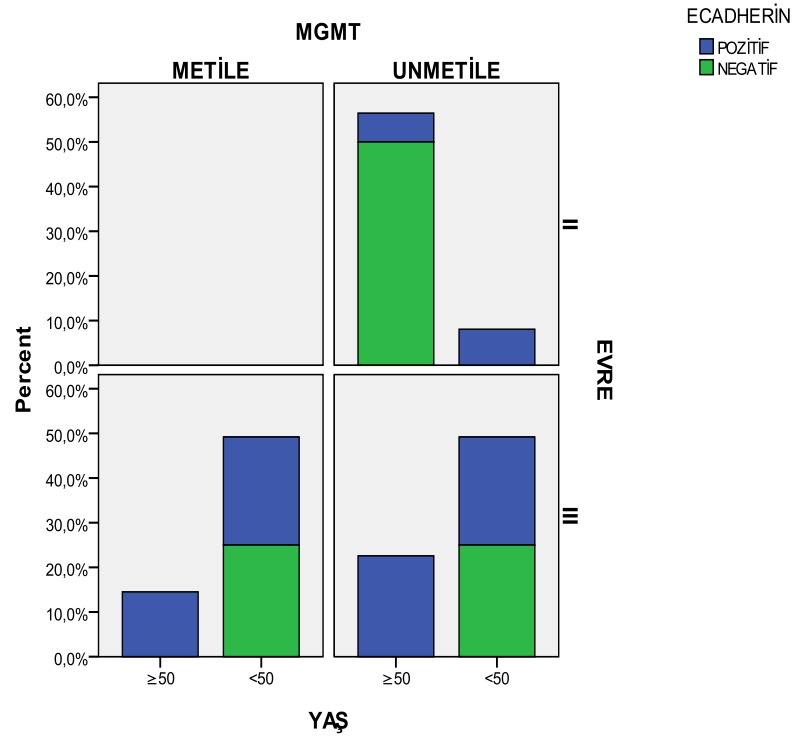


Ek 19. MGMT evre ile C-erb-B2 dağılımı.



Ek 20. MGMT evre ile PR dağılımı.



Ek 21. MGMT evre ile ER dağılımı.**Ek 22.** MGMT evre ile E-Cadherin dağılımı.

Ek 23. Hastaların demografik ve klinik özellikleri

NO	YAŞ	TÜMÖR TİPİ	EVRE	ER	PR	CERB-B2	E-CAD.	Ki-67	TNM	P16		MGMT	
										T	N	T	N
1	44	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT2 N3 Mx	-	-	(+)	-
2	73	IDC	II	(+)	(+)	(+)			PT1 N0 Mx	-	-	(+)	-
3	65	IDC	III	(+)	(+)	(-)			PT2 N2 Mx	-	-	-	-
4	56	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT2 N0 Mx	-	-	-	-
5	40	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)		PT2 N1 Mx	-	-	-	-
6	57	IDC	III	(-)	(-)	(+)			PT2 N0 Mx	(+)	-	(+)	-
7	45	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT2 N0 Mx	(+)	-	-	-
8	64	IDC	III	(-)	(-)	(+)			PT2 N1 Mx	-	-	-	-
9	42	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT2 N1 Mx	(+)	-	(+)	-
10	53	IDC	II	(+)	(+)	(+)	(+)		PT1 N0 Mx	-	-	-	-
11	65	IDC	III	(+)	(-)	(+)			PT2 N1 Mx	(+)	-	(+)	-
12	46	IDC	III	(+)	(+)	(-)			PT2 N2 Mx	(+)	(+)	-	-
13	42	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)		PT2 N1 _{ml} Mx	-	-	-	-
14	38	IDC	III	(-)	(-)	(+)			PT1 _c N1 Mx	(+)	-	-	-
15	39	IDC	III	(-)	(-)	(+)			PT1 _c N2 Mx	-	-	(+)	-
16	44	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT2 N0 Mx	(+)	-	-	-
17	47	IDC	III	(-)	(-)	(+)			PT2 N1 Mx	(+)	-	-	-
18	35	MC	III	(-)	(-)	(+)	(-)		PT4 N1 Mx	(+)	-	(+)	-
19	66	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT4 N3 Mx	-	-	-	-

20	67	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)		PT2 N1 Mx	(+)	-	(+)	-
21	39	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)		PT2 N1 Mx	-	-	-	-
22	41	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT3 N2 Mx	-	-	-	-
23	36	IDC	III	(+)	(+)	(-)			PT2 N0 Mx	-	-	-	-
24	70	MÜSİNÖZ KARSINOM	III	(+)	(+)	(+)	(+)		PT2 N0 Mx	-	-	-	-
25	64	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)		PT1c N1 Mx	(+)	-	(+)	-
26	47	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT1c N0 Mx	-	-	-	-
27	73	IDC	III	(+)	(+)	(-)		12%	PT2 N0 Mx	-	-	-	-
28	51	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT2 N0 Mx	(+)	-	-	-
29	57	ILC	II	(+)	(+)	(+)	(-)		PT2 N0 Mx	(+)	-	-	-
30	53	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)			(+)	-	-	-
31	48	IDC	III	(-)	(-)	(+)		40%	PT2 N2 M	-	-	(+)	-
32	66	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)		PT3 Nx Mx	(+)	-	-	-
33	40	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)		PT1 N1 Mx	(+)	-	-	-
34	32	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)	%20-25	PT2 NO Mx	(+)	-	(+)	(+)
35	58	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)		PT2 No Mx	-	-	-	-
36	72	IDC	III	(+)	(+)	(-)			PT2N2Mx	(+)	-	-	-
37	33	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	10%	PT2N1Mx	(+)	-	-	-
38	37	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	%40-50	PT4 N1 Mx	(+)	-	(+)	(+)
39	65	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	15%	PT2 N1 Mx	(+)	-	(+)	(+)
40	50	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)	%10-15	PT2 N3 Mx	-	-	(+)	-

41	57	IDC	III	(+)	(+)	(+)		15%		-	-	-	-
42	44	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)	15%	PT2 NO Mx	-	-	-	-
43	35	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	%10-15	PT1 Nx Mx	-	-	-	-
44	56	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)			-	-	-	-
45	44	IDC	III	(+)	(+)	(+)			PT2 N3 Mx	-	-	-	-
46	60	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)		PT3 N3a Mx	-	-	-	-
47	34	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)	%3-5		-	-	-	-
48	29	IDC	III	(+)	(+)	(-)		%10-12	PT2 N1 Mx	-	-	-	-
49	56	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+) (+)		PT2 No Mx	-	-	-	-
50	30	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	%40-50	PT3 N3 Mx	-	-	(+)	-
51	60	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)	10%	PT2 NO Mx	-	-	-	-
52	43	IDC	II	(+)	(+)	(-)	(+)	7%	PT1 Nx Mx	-	-	-	-
53	85	IDC	III						PT1 NO Mx	(+)	-	-	-
54	39	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	10%	PT3 N1 Mx	(+)	-	(+)	-
55	45	IDC	III	(+)	(+)				PT2 N2 Mx	(+)	-	-	-
56	78	IDC	III	(+)	(-)	(+)	(+)		PT4b N3 Mx	(+)	-	-	-
57	57	IDC	III	(-)	(-)	(+)			PT2 N0 Mx	(+)	-	-	-
58	62	IDC	II	(+)	(+)	(+)			PT2 N0 Mx	-	-	-	-
59	55	IDC	II	(+)	(+)	(+)	(+)	%5-7	PT1c N0 Mx	-	-	-	-
60	38	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)	%60-70	PT2 N0 Mx	(+)	(+)	(+)	-
61	70	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	30-35%	PT2 N0 Mx	-	-	-	-
62	43	MC	III	(-)	(-)	(-)	(+)	%75-80	PT2 N1 Mx	(+)	(+)	(+)	(+)

63	42	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)	%40-50	PT2 N0 Mx	(+)	-	(+)	(+)
64	37	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)	30%	PT4 N3 M0	-	-	-	-
65	76	ILC	II	(+)	(+)	(+)	(-)	%5-7	PT2 N0 Mx	(+)	-	-	-
66	49	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	%15-20	PT4 Nx Mx	(+)	-	-	-
67	49	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)	%15-20	PT2 N1a Mx	-	-	(+)	-
68	48	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)	%10-12	PT2 N0 Mx	-	-	-	-
69	39	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)	%7-10	PT2 N1a Mx	-	-	-	-
70	68	IDC	III	(+)	(+)	(-)	(+)	%40-45	PT2 N0 Mx	(+)	-	-	-
71	45	IDC	II	(+)	(+)	(-)	(+)	15%	PT1 N0 Mx	-	-	-	-
72	45	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	%15-20	PT2 N0 Mx	(+)	-	-	-
73	70	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	10%	PT4 N1 Mx	(+)	-	(+)	-
74	40	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	10%		-	-	(+)	-
75	50	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	15%	PT2 N2 Mx	-	-	-	-
76	31	IDC	II	(+)	(+)	(-)	(+)	%7-10	PT1 N1 Mx	-	-	-	-
77	78	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	%15-20	PT2 N3 Mx	(+)	-	(+)	-
78	64	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	20%	PT2 N3 Mx	(+)	-	(+)	-
79	24	IDC	III	(+)	(+)	(+)		%15-20	T2 N1 Mx	-	-	(+)	-
80	66	IDC	III	(+)	(-)	(+)	(+)	50%	PT4 N3 Mx	(+)	(+)	(+)	-
81	49	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	65%	PT2 N2 Mx	(+)	(+)	(+)	-
82	48	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)	20%	PT1C N2 Mx	-	-	(+)	-

83	36	IDC	III	(-)	(-)	(+)	(+)	%75-80	PT2 N1 Mx	(+)	(+)	(+)	-
84	73	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	15%	PT4 N2 Mx	-	-	-	-
85	57	IDC	II	(-)	(-)	(+)	(+)	25%	PT1 N0 Mx	-	-	-	-
86	34	IDC	III	(-)	(-)	(-)	(+)	%50-60	PT2 N1 Mx	(+)	-	-	-
87	42	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	15%	PT2 N1 Mx	-	-	-	-
88	56	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	60%	PT4 N3 Mx	(+)	-	-	-
89	44	ILC	III	(+)	(+)	(+)	(-)	%25-30	PT2 N3 Mx	(+)	-	-	-
90	33	DCI	III	(-)	(-)	(+)	(+)	%15-20	PTis (DCIS) NO Mx	-	-	(+)	-
91	59	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	15%	PT1 N0 Mx	-	-	(+)	-
92	39	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	10%	PT4 N2 Mx	-	-	(+)	(+)
93	44	IDC	II	(+)	(+)	(+)	(+)	70%	PT1c N0 Mx	(+)	-	-	-
94	36	IDC	II	(+)	(+)	(-)	(+)	%10-12	PT2 N0 Mx	-	-	-	-
95	55	TC	II	(+)	(+)	(+)	(+)	10%	PT1c N0 Mx	-	-	-	-
96	46	IDC	III	(+)	(+)	(+)	(+)	15%	PT2 N1 Mx	-	-	(+)	-

Ek 24. Meme karsinomlarında TNM evreleme sistemi.

Evre 0	T is	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N0	M0
	T3	N0	Mo
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIC	Herhangi T	N3	M0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı
Doğum Yeri ve Tarihi

: Mustafa YILDIZ
: Bozüyük/1986

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi
Bildiği Yabancı Diller

: İstanbul Üniversitesi/ Fen Bilgisi Öğretmenliği
: İngilizce

İletişim

Adres
Tel
E-Posta Adresi

: Sakarya Mah. Türbe Cd. No:15/4
Alibeyköy/İstanbul
: 05058590190
: mustafayildiz0000@hotmail.com

Tarih:

İmza