

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, **YÜKSEK LİSANS TEZİ**;
Doktora ise **DOKTORA TEZİ** ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**MEME KANSERİNDE HISTON 4 LİZİN 20 ÜÇLÜ
METİLENMESİNİN (H4K20ME3) ÖNEMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

HÜSNİYE İŞİN

**DANIŞMAN
PROF. DR. UĞUR GEZER**

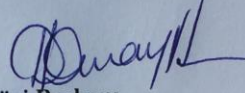
**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
ONKOLOJİK BİYOLOJİ VE İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

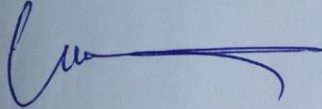
DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Onkolojik Biyoloji ve İmmünoloji Bilim Dalı Programında Doktora öğrencisi Hüsniye İŞİN tarafından Prof.Dr.Uğur GEZER'in danışmanlığında hazırlanan "Meme Kanseri Histon 4 Lizin 20 Üçlü Metillenmesinin (H4K20me3) Öneminin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 23 /09/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



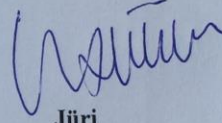
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Derya DURANYILDIZ
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

Prof.Dr.Uğur GEZER
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof.Dr.Mustafa AKKİPRİK
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri

Doç.Dr.Ebru Esin YÖRÜKER
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Jüri

Prof.Dr. Matem ZUNÇİDEMİR
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

iv

BEYAN

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

HÜSNIYE İŞİN



İTHAF

Küçük çekirdek ailemin bireyleri, kızım *ZERRİN İŞİN* ve eşim *Doç. Dr. MUSTAFA İŞİN* a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul üniversitesi Onkoloji Enstitüsünde bana Doktora yapma olanağı sağlayan müdürümüz Sn. *Prof. Dr. Ahmet KİZİR*' e

Temel Onkoloji Anabilim dalı başkanımız değerli hocam Sn. *Prof. Dr. Hatice BİLGE BECERİR*' e

Eğitimimin her aşamasında bana yol gösteren bilgi, katkı ve tavsiyelerini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Sn. *Prof. Dr. Uğur GEZER*' e,

Tez izleme komitemde yer alan ve bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan değerli hocalarım,

Sn. *Prof. Dr. Derya DURAN YILDIZ*' a

Sn. *Prof. Dr. Rasim MERAL*' e,

Çalışmamın gerçekleşmesinde destek ve katkılarını benden esirgemeyen, bana güvenen, saygıdeğer hocalarım,

Sn. *Doç. Dr. Didem KARAÇETİN*,

Sn. *Doç. Dr. E. Canan KELTEN TALU*,

Sn. *Uzm. Dr. Didem CAN TRABULUS*' a

Değerli bilgilerini benimle paylaşan çalışma arkadaşım Sn. *Arş. Gör. Dr. Emre ÖZGÜR* 'e

Temel Onkoloji ABD' da bulunan ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım ve arkadaşlarıma,

Eğitimim süresince desteklerini ve emeklerini esirgemeyen, her daim yanımda olan, Sevgili eşim *Doç. Dr. Mustafa IŞIN*' a, Biricik kızım *Zerrin IŞIN*' a ve canım annem *Rahime YILMAZ* ve babam *Hüseyin YILMAZ*' a,

Hasta materyallerini toplamamda bana olanak sağlayan SB. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Başhekimliği' ne,

Doktora eğitimim süresince bana burs sağlayan 100/2000 YÖK DOKTORA BURSUSU Projesine,

Çalışmama maddi kaynak sağlayan ‘İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne,

TEŞEKKÜR EDERİM.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-27336



İÇİNDEKİLER

HÜSNİYE İŞİN	i
TEZ ONAYI	İİİ
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	Vİİİ
TABLolar LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.2. Meme Kanserinde Moleküler Sınıflama	5
2.2.1. Luminal A ve Luminal B Meme Kanseri.....	5
2.2.2. HER2+ Meme Kanseri.....	6
2.2.3. Bazal Benzeri Meme Kanseri	6
2.2.4. Normal Benzeri Meme Kanseri	7
2.2.5. Claudin-düşük Meme Kanseri	7
2.3. Meme Kanserinin Moleküler Genetiği	7
2.3.1. Onkogenler.....	8
2.3.1.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER2)	8
2.3.1.2. c-MYC.....	9
2.3.1.3. RAS Sinyal Yolu.....	9
2.3.1.4. Siklin D1	10
2.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler (TBG'ler).....	11
2.3.2.1. TP53	11
2.3.2.2. PTEN.....	11
2.3.2.3. BRCA1 ve BRCA2 Genleri	12

2.4. Meme Kanserinde Epigenetik.....	12
2.4.1. DNA Metilasyonu	13
2.4.2. Post-Translasyonel Histon Modifikasyonları.....	14
2.4.2.1. Histon Asetilasyonu	17
2.4.2.2. Histon Metilasyonu	18
2.4.2.3. Histon 4 Lizin 20 (H4K20)	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. GEREÇ	22
3.1.1. Hasta Dokuları	22
3.1.2. Hücre Soyları	22
3.1.3. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	24
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	25
3.2. YÖNTEM	26
3.2.1. Meme Tümörleri ve Eşlenik Normal Dokulardan RNA İzolasyonu	26
3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	27
3.2.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR).....	28
3.2.4. Tümör ve Eşlenik Normal Dokulardan Histon Proteinlerinin İzolasyonu.....	29
3.2.5. Doku Örneklerinde H4K20me3 Düzeyinin Belirlenmesi	30
3.2.6. Hücre Kültürü	31
3.2.7. Hücrelerin siRNA Oligonükleotidleri ile Transfeksiyonu	31
3.2.8. Hücre Çoğalmasının Gerçek Zamanlı Analizi	32
3.2.9. Klonojenik Test.....	33
3.2.10. İstatistiksel Analizler.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Meme Kanserli Hastaların Tümör ve Eşlenik Normal Dokularında SUV420H2 Gen İfadesinin İncelenmesi.....	35
4.2. Meme Kanserli Hastaların Tümör ve Eşlenik Normal Dokularında Histon H4 Lizin 20 Üçlü Metillenme (H4K20me3) Düzeyinin İncelenmesi.....	40
4.3. Meme Kanserli Hastalarda SUV420H2 Gen İfadesi ve Histon Metilasyonunun (H4K20me3) Prognostik Değeri	45
4.4. Kültür Hücrelerinde SUV420H2 Geninin siRNA Oligonükleotidleri ile Baskılanması	46
4.5. SUV420H2 Baskılanmasının Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi....	48

5. TARTIŞMA.....	51
KAYNAKLAR	56
ETİK KURUL KARARI.....	63
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	66
ÖZGEÇMİŞ	67



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Hastaların yaş bilgileri ve klinopatolojik özellikleri.....	23
Tablo 3-2: Dokudan total RNA izolasyonu	26
Tablo 3-3: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri	27
Tablo 3-4: GZ-PZR bileşenleri	28
Tablo 3-5: Çalışmada kullanılan primer dizileri	28
Tablo 3-6: GZ-PZR reaksiyon koşulları.	29
Tablo 3-7: Çalışmada kullanılan siRNA dizileri	32
Tablo 4-1: SUV420H2 gen ifadesinin hastaların klinopatolojik özellikleri ile ilişkisi ..	36
Tablo 4-2: H4K20me3 miktarı ile hastaların klinopatolojik özelliklerinin ilişkisi	41
Tablo 4-3: SUV420H2 geninin baskılanmasının hücre sağkalımı üzerine etkileri	49
Tablo 4-4: Meme kanseri hücre soylarının kolonojenik test ile belirlenen % canlılık oranları.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Meme kanserinin gelişimi [16].	4
Şekil 2-2: Meme kanseri gelişiminde görev alan genler ve yolakları [29].....	8
Şekil 2-3: Aberan DNA metilasyonunun onkojenik etkisi [48].	14
Şekil 2-4: Histon modifikasyonları [7].	15
Şekil 2-5: Post translasyonel histon modifikasyonlar [43].	16
Şekil 2-6: Histon modifikasyonlarının şematik gösterimi ve biyolojik işlevleri [54]. ...	17
Şekil 2-7: Histon lizin demetilazların görevleri [64].	20
Şekil 4-1: SUV420H2 geninin tümör ve normal dokulardaki ifade düzeyi.	35
Şekil 4-2: SUV420H2 gen ifade düzeyinin nod durumu ile ilişkisi.	37
Şekil 4-3: SUV420H2 ifade düzeyinin evrelere göre dağılımı.	37
Şekil 4-4: SUV420H2 geni ifade düzeyinin moleküler alt tiplere göre dağılımı.	38
Şekil 4-5: SUV420H2 gen ifade düzeyinin hormon reseptörleri ve HER2 ekspresyonuna göre dağılımı	39
Şekil 4-6: SUV420H2 gen ifade düzeyinin histolojik grada göre dağılımı.	39
Şekil 4-7: Meme dokularında H4K20me3 düzeyinin dağılımı.	40
Şekil 4-8: H4K20me3 düzeyinin tümör evresine göre dağılımı.	42
Şekil 4-9: Lenf nodu tutulumu ile H4K20me3 düzeyinin ilişkisi.	43
Şekil 4-10: Moleküler alttiplere göre H4K20me3 düzeyinin dağılımı.	43
Şekil 4-11: Hormon reseptörleri ve HER2 ekspresyon durumuna göre H4K20me3 düzeyleri.....	44
Şekil 4-12: Histolojik grada göre H4K20me3 düzeyinin dağılımı.	45
Şekil 4-13: Tümör dokularında H4K20me3 düzeyinin genel sağkalımla ilişkisi.....	46
Şekil 4-14: siRNA oligonükleotidleri ile transfekte edilen MCF-7 hücrelerinde <i>GAPDH</i> ve <i>SUV420H2</i> genlerinin çoğalma eğrileri.	47
Şekil 4-15: siRNA ile transfekte edilen hücrelerde <i>SUV420H2</i> geninin ifade düzeyi. ..	47
Şekil 4-16: Meme kanseri hücrelerinde gerçek zamanlı hücre çoğalma eğrileri.....	48
Şekil 4-17: MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri.	50
Şekil 4-18: MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri.....	50

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- H4K20me3: Histon 4 Lizin 20 üçlü Metillenmesi
SUV420H2: Suppressor of variegation 4-20 geni
H1, 2A, 2B, 3, 4: Histon proteini 1, 2A, 2B, 3, 4
K4, 9, 27, 36, 79: Lizin 4, 9, 27, 36, 79
H4K20me1: Histon 4 Lizin 20 tekli Metillenmesi
H4K20me2: Histon 4 Lizin 20 ikili Metillenmesi
H4K16ac: Histon 4 Lizin 16 asetilasyonu
ACR: Amerikan Radyoloji Koleji
ACOG: Amerikan Kadın Doğum ve Jinekologlar Koleji
ER: Östrojen Reseptörü
PR: Progesteron Reseptörü
HER2: Epidermal Büyüme Faktör Reseptör 2
CDK: Siklin Bağımlı Kinaz
CKI: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
TBG: Tümör Baskılayıcı Gen
RTK: Reseptör Tirozin Kinaz
PI3K: Fosfatidilinositol 3 Kinaz
c-MYC : Miyelositomatozis Viral Onkogen Homolog
MAX: Myc- ilişkili Faktör X
GTPaz : Guanozin Trifosfataz
PTEN: Fosfataz ve tensin homologu
EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
GATA3: GATA Bağlayan Protein- 3
CDH1: Kadherin 1
RAS: Ras Ailesi Proto-onkogeni
RAF: RAF-1 Proto- onkogeni
MAPK: Mitojen-aktive protein kinaz
ERK: Ekstrasellüler sinyal regüle kinaz

RB : Retinoblastom

TP53 : Tümör baskılayıcı protein p53

BRCA1/2 : DNA Onarım ilişkili gen 1/ 2

SAM: Sitozin- Adenosil Metiyonin

CpG: Sitozin Guanin Dinükleotidi adacığı

DNMT: DNA Metil Transferaz

HAT: Histon Asetil Transferaz

HDAC: Histon Deasetilaz

HMT: Histon Metil Transferaz

HKMT: Histon Lizin Metil Transferaz

HDM: Histon Demetilaz

PRMT: Arjinin metil transferazlar

KDM/ LSD: Lizin Spesifik Demetilaz

SIRT1: Sirtuin 1

SUV39H2: Suppressor of Variegation 3-9 homolog 2

SET domain: Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax Domaini

NSD: Histon Lizin N-Metiltransferaz

EZH2: Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit

SMYD3: SET ve MYND domain içeren 3

JMJC: Jumanji C Domaini

T Evre: Tümör Evresi

N Evre: Lenf Nodu Tutulumu Evresi

DKIS: Duktal Karsinoma İn Situ

IDK: İnvaziv Duktal Karsinom

mRNA: mesajcı RNA

miRNA: mikroRNA

siRNA: Küçük İnterferans RNA

GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat Dehidrogenaz

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GZ-PZR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RISC: RNA indüklü susturucu kompleks

kb: Kilobaz

kDa: kilo Dalton

ng: Nanogram

nm: Nanometre



ÖZET

IŞIN H. (2019). Meme Kanserinde Histon 4 Lizin 20 Üçlü Metillenmesinin (H4K20me3) Öneminin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Kadınlarda en sık görülen malign hastalık olan meme kanserinin gelişiminde genetik ve epigenetik değişiklikler birlikte rol oynamaktadır. Histon modifikasyon yollarında meydana gelen bozulmalar, birçok kanserde olduğu gibi, meme kanserinin gelişimi ve progresyonuyla da ilişkilidir.

Memeli hücrelerinde H4 lizin 20 (H4K20) metillenmesi 3 farklı düzeyde gerçekleşir: tekli (H4K20me1), ikili (H4K20me2) ve üçlü metillenme (H4K20me3). Bunlardan H4K20me3 genomda heterokromatik bölgeler, telomerler, damgalı bölgeler ve tekrarlanan elementlerde yoğunlaşmıştır ve bu bölgelerin transkripsiyonel olarak sessizleştirilmesinde görev alır. H4K20'nin üçlü metillenmesi, SUV420H2 olarak kısaltılan metil transferaz tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimin anlatım düzeyinin birçok kanserde değiştiği rapor edilmiştir.

Literatürde yer alan çalışmaların bir kısmı H4K20me3 işaretlenmesinin farklı kanserlerde azaldığını bildirirken, bu modifikasyonun insan tümörlerinde arttığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır.

Tez çalışmasında, meme kanserli hastaların tümör ve eşlenik normal dokularında SUV420H2 ekspresyonu ve H4K20me3 miktarının incelenmesi amaçlandı. Ayrıca, deneysel olarak SUV420H2 geninin susturulmasının meme kanseri hücrelerinin sağ kalımları üzerine etkisi araştırıldı. SUV420H2 gen ifadesi mRNA düzeyinde yarı nicel olarak belirlendi; H4K20me3 ise dokulardan elde edilen histon proteinlerinde ELİZA-benzeri yaklaşımla ölçüldü.

Tez çalışmasının bulguları, SUV420H2'nin tümör dokularında eşlenik normal dokulara göre daha fazla ifade edildiğini göstermektedir. Hastaların hormon reseptör durumu ile SUV420H2 ifade düzeyi arasında dikkat çekici bir ilişki saptandı. H4K20me3 miktarları tümör dokularında, normal dokulara göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu. Hastalığı daha ileri evresinde bulunan hastaların tümörlerinin daha fazla H4K20me3 düzeyine sahip olma eğiliminde oldukları belirlendi. Meme kanseri hücre soylarında SUV420H2 geninin baskılanması hücre çoğalmasının uyarılması ile sonuçlandı.

Çalışmada elde edilen veriler, SUV420H2 ve H4K20me3 düzeylerinin meme kanserinde değişime uğradığını ve SUV420H2'nin hücre çoğalması ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Epigenetik, Histon metillenmesi, H4K20me3, SUV420H2

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-27336

ABSTRACT

ISIN H. (2019). Investigation of Histone 4 Lysine 20 Triple Methylation (H4K20me3) in Breast Cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. Doctorate Thesis. Istanbul.

Genetic and epigenetic changes play a role in the development of breast cancer, the most common malignant disease in women. Alterations in histone modification pathways, as in many cancers, are associated with the development and progression of breast cancer. In mammalian cells, H4 lysine 20 (H4K20) methylation occurs at 3 different levels: mono- (H4K20me1), di- (H4K20me2) and tri- (H4K20me3). Of these, H4K20me3 is enriched in heterochromatic regions of the genome, telomeres, imprinted regions, and repeat elements, and is involved in transcriptional silencing of these regions. H4K20me3 is catalyzed by the SUV420H2 methyl transferase whose expression level has been reported to be altered in many cancers. While some studies report that H4K20me3 mark decrease in different cancers whilst others demonstrated an increase. In this study, we aimed to investigate SUV420H2 expression and H4K20me3 amounts in breast cancer. Additionally, the effect of SUV420H2 gene silencing on the survival of breast cancer cells was investigated. SUV420H2 gene expression was determined semi-quantitatively at mRNA level; the amount of H4K20me3 was measured in extracted histone proteins by ELISA-like approach.

We found higher SUV420H2 expression in tumor tissues than in adjacent normal tissues. There was a remarkable relationship between hormone receptor status and SUV420H2 expression. The amount of H4K20me3 was also significantly higher in tumor tissues. Patients with advanced disease tend to have higher levels of H4K20me3. Inhibition of SUV420H2 gene resulted in stimulation of cell proliferation.

The data of this study reveals that SUV420H2 and H4K20me3 levels are altered in breast cancer and SUV420H2 is associated with cell proliferation.

Key Words: Breast Cancer, Epigenetic, Histone Methylation, H4K20me3, SUV420H2

The present work was supported by the Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project No. TDK-2017-27336

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, meme epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile gelişen, çoğu zaman invaziv özellikte olan bir malignitedir ve dünya çapında kadınlarda en sık (tüm kanserlerin yaklaşık %25'i) görülen kanser türüdür [1]. Sağlık bakanlığı'nın 2013 yılı verilerine göre 100.000 kişide 46 vaka ile Türkiye'de de kadınlarda en sık görülen malign hastalıktır [2]. İnsidansı yaşla birlikte belirgin olarak artan meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alır. Gelişmiş ülkelerde daha sık gözlenen meme kanserinden ölümler bu ülkelerde azalırken, mortalite az gelişmiş ülkelerde artmaktadır [3]. Tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir toplumsal sağlık sorunu olmaya devam eden meme kanserinde yapılan tüm araştırmalara karşın, hastalığın erken dönemde saptanmasında ya da tedavi cevabının değerlendirmesinde yararlı olabilecek biyobelirteç sayısı çok sınırlıdır [4].

Meme kanseri gelişiminde genetik ve epigenetik değişiklikler birlikte rol oynar. Histon proteinlerinin modifikasyonu epigenetik düzenlenmenin önemli bir grubunu oluşturur ve kromatin paketlenmesinin temel birimi nükleozomlarda gerçekleşir. Nükleozom, temel histon proteinleri olan H2A, H2B, H3 ve H4'ün ikiye katlanmış kopyalarının oluşturduğu oktamer yapının etrafını DNA'nın iki defa dolanması ile oluşan yapıdır. Histon 1 (H1) proteini ise, nükleozomlar arasında DNA bağlayıcı olarak görev yapar [5]. Histon proteinlerinin N-terminal uçları, protein sentezi sonrası bir seri modifikasyona maruz kalır. Bunların başlıcaları; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ve ubikütinasyondur. Bu modifikasyonlar, DNA'nın histonlarla olan etkileşimini değiştirerek kromatin yapısını ve diğer proteinlerin modifikasyon bölgelerine bağlanma afinitesini etkilemektedir [5]. Böylece histon proteinlerinin modifikasyonu, işaretlemenin tipi ve gerçekleştiği genomik bölgeye göre, gen ifadesi, DNA replikasyonu ve onarımı, kromatin sıkışması ve heterokromatin oluşumu, hücre bölünmesi sırasında kromatidlerin ayrılması ve hücre ölümü gibi bir çok hücresel süreçte düzenleyici olarak görev alırlar. Bu süreçlerdeki bozulmalar karsinogenez ile doğrudan ilişkilidir [5]. Histon modifikasyon yolağındaki bozulmaların meme kanseri dahil bir çok kanser tipinde sıkça görülmesi, bu değişimlerin kanser gelişimi ve progresyonu ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir [6]. Bu nedenle histon

modifikasyonlarının incelenmesi kanser araştırmalarının önemli bir parçası haline gelmiştir [5].

Histonların metilasyonu, bir çok düzenleyici görevinden dolayı hücrenin fizyolojik işlevlerini yerine getirebilmesi için son derece önemlidir ve genellikle H3 ve H4'ün kuyruk kısımlarındaki lizin aminoasitlerinde gerçekleşir [7]. H4 lizin 20 (H4K20) metillenmesi memeli hücrelerinde evrimsel olarak korunmuştur ve 3 farklı düzeyde gerçekleşir: tekli (H4K20me1), ikili (H4K20me2) ve üçlü metillenme (H4K20me3). Tezin konusunu oluşturan H4K20me3, genomda gen fakir bölgeler olan heterokromatin, telomerler, damgalı bölgeler ve tekrar elementlerde yoğunlaşmıştır ve bu bölgelerin transkripsiyonel olarak sessizleştirilmesinde görev alır [8, 9]. H4K20'nin üçlü metillenmesini katalizleyen histon metil transferaz enzimi olan SUV420H2'nin anlatım düzeyi bir çok kanserde değişmektedir. Bununla ilişkili olarak H4K20me3 işaretlenmesinin kaybı farklı kanser türlerinde bildirilmiştir [6, 9, 10]. H4K20me3 düzeylerinin meme kanseri hücre hatlarında tümörojenik olmayan meme epitelyum hücre hatlarına göre azaldığı bildirilmiştir [11, 12].

H4K20me3'ün kanser gelişimi açısından öneminden ve meme kanserinde konu ile ilgili verinin sınırlı olmasından hareketle, tez projesinde bu belirtecin meme kanserinde araştırılması amaçlanmıştır. Tez projesinin birinci aşamasında, meme kanserli hastalardan alınan tümör doku örnekleri ile eşlenik normal dokularda, H4K20me3'ü katalizleyen enzim olan SUV420H2'nin ekspresyonu mRNA düzeyinde incelenmesi planlanmıştır. Buna ilaveten, tümör dokularında H4K20me3 düzeyi araştırılacaktır. Elde edilen bulgular hastaların klinik özellikleri ile ilişkilendirilecektir. Deneysel çalışma olan 2. aşamada ise, meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında) SUV420H2 geninin susturulmasının meme hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada elde edilecek bulguların, H4K20me3'ün meme kanserindeki önemi konusunda yararlı bilgiler sağlayacağı öngörülmektedir.

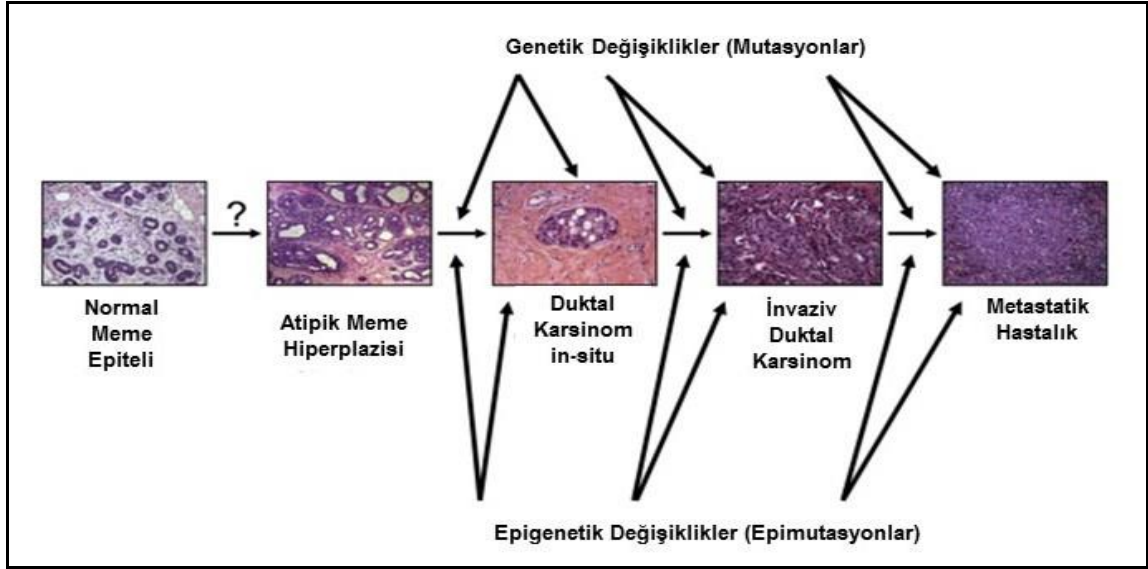
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alır [1, 13]. Meme kanserinin en yaygın belirtisi, memede küçük bir kitle veya yumrunun ele gelmesi olmakla birlikte daha az yaygın olarak memede deformasyonlar, incelmeler, şişkinlikler, deride iritasyon, kızarıklıklar, meme ucunda değişiklikler veya akıntı gözlemlenmektedir [14]. Meme kanseri sıklığı, artan yaşla birlikte hızla artar. Amerikan Kanser Derneğinin verilerine göre, ABD’de 2017 yılında istatistiksel olarak 271,270 yeni meme kanseri vakası tahmin edilmiştir. Buna göre, 62,930 yeni in situ meme kanserinin teşhis edileceği, ayrıca 41,760’ı kadın olmak üzere 42,260 kişinin meme kanseri nedeniyle hayatını kaybedeceği öngörülmüştür [13].

Amerikan Radyoloji Koleji (ACR), Uygunluk Kriterleri ve Amerikan Kadın Doğum ve Jinekologlar Koleji (ACOG), kadınların 40 yaşında yıllık taramaya başlamalarını tavsiye etmektedir. ACR, ortalama risk taşıyan kadınların, yaşam boyu meme kanseri riskinin % 15’den az olduğunu bildirmektedir. ACOG, 20-39 yaş aralığındaki kadınlara her 1-3 yılda bir, 40 ve üstü yaştaki kadınlara ise her yıl klinik meme muayenesi yapılmasını önermektedir. Ayrıca, ACR kriterlerine göre birinci derece akrabalarında premenopozal meme kanseri olan ve/veya BRCA1 mutasyon taşıyıcısı olan ya da aile öyküsü bulunan kadınların 25-30’lu yaşlarından itibaren taranması gerektiği bildirilmiştir [15].

Normal meme epiteli, atipik hiperplaziye, Duktal karsinoma in situ ya da invaziv meme kanserine dönüşebilir [16] (Şekil 2-1). Meme kanseri gelişimi uzun zaman alan ve agresif fenotipik karakterizasyona sahip hücrelerin olduğu bir süreçtir. Bu süreçte, kanserin gelişimine ve ilerlemesine yol açan çok sayıda moleküler genetik ve epigenetik değişiklikler meydana gelir [16]. Bunun sonucunda, aşağıda detaylandırıldığı üzere memenin oldukça heterojen karakterli malin hastalığı ortaya çıkar [17].



Şekil 2-1: Meme kanserinin gelişimi [16].

Meme kanseri tanı sürecinde ilk olarak klinik muayene ve meme görüntülemesi (mamografi, meme ultrasonu) yapılır. Malignite tanısı genellikle biyopsi ile doğrulanır. Belirlenebilir uzak metastazları olmayan erken meme kanseri, potansiyel olarak tedavi edilebilir bir hastalıktır. Cerrahi müdahale ile tümörün çıkarılması ilk tedavi seçeneğini oluşturur. Hastalığın biyolojisi ve yaygınlık durumuna göre, kemoterapi, hormonal terapi, radyoterapi ve hedefe yönelik biyolojik ajanlar farklı tedavi seçeneklerini oluşturur [18]. Örneğin, tümör hücrelerinde östrojen reseptörü (ER) pozitif olan hastalarda, adjuvan olarak hormonal tedavinin hastalığın nüks riskini azalttığı bilinmektedir [18].

Meme kanseri invazivlik durumuna göre, in situ karsinom ve invaziv kanser olarak sınıflandırılır. *In situ* meme kanseri, sitolojik ve büyüme özelliklere göre, duktal ve lobüler olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Duktal karsinoma in situ, en yaygın invaziv olmayan meme kanseri türüdür. Süt kanalları içinde atipik hücreler geliştiğinde ortaya çıkar, ancak çevrelerindeki dokulara doğru uzanmazlar [19]. İnvaziv kanserler, histolojik olarak farklılaşmış heterojen tümörleri içerir. İnvaziv duktal meme kanseri, kadınlarda en sık görülen karsinomdur ve tüm invaziv meme kanserlerinin % 70-80 kadarını oluşturur. İnvaziv duktal karsinom, süt kanallarının içindeki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ile başlar ve çevre meme dokularına yayılır. Diğer invaziv tümör

tipleri invaziv lobüler, duktal/lobüler, müsinöz, medullar, papiller karsinomlar [1] ve Filloid tümörlerdir [20].

2.2. Meme Kanserinde Moleküler Sınıflama

Günümüzde invaziv meme kanserlerinin sınıflandırılmasında temeli hala histopatoloji oluştursa da tümör biyolojisinin, hastaların tedaviye yanıtını ve hastalığın prognozunu doğrudan etkileyen parametreler olduğu artık net olarak bilinmektedir. Son 15 yılda yapılan sayısız gen ifade çalışmaları hormon reseptör durumu ile epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2) ifade düzeyinin meme kanserinin moleküler sınıflamasında temel faktörler olduğu belirlenmiştir. Invasiv meme tümörlerinin çoğu östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) açısından pozitif; ancak reseptörlerin ekspresyon düzeyi hastadan hastaya farklılık gösterir. HER2 ekspresyonu tüm invaziv meme tümörlerinin yaklaşık %20'sinde pozitif ve hormon reseptörlerinde olduğu gibi ekspresyon düzeyi değişkenlik gösterir. Hastaların % 15-25 kadarında meme tümörleri bu hormon reseptörleri ve HER2 açısından negatiftir ve bu durum 'üçlü-negatif' meme kanseri olarak adlandırılır. Üçlü-negatif meme kanserinde prognoz diğer gruplara göre daha kötüdür [16, 21]. Bunun nedeni, ER ifadesinin yokluğunun tümörün agresifleşmesine yol açmasıdır [21].

Meme kanserinin moleküler sınıflamasında tam olarak uzlaşmış değildir ve farklı kaynaklarda farklı sınıflamalar yapılabilmektedir. Kapsamlı gen ifade profillemeye çalışmalarının sonuçlarına göre meme kanserinde 5 ana moleküler alt tip ortaya konmuştur. Bunlar; bazal benzeri, luminal A, luminal B, HER2+/ER- ve normal meme benzeri tümörlerdir [17, 22]. Yukarıda da ifade edildiği gibi, moleküler farklılıklar, hastaların tedaviye yanıtlarını ve dolayısıyla meme kanseri prognozunu doğrudan etkileyebilmektedir.

2.2.1. Luminal A ve Luminal B Meme Kanseri

Luminal A meme kanseri en yaygın görülen alt tiptir ve tüm meme kanserlerinin %28-31' ini oluşturur [16]. Bu kanser tipi, meme kanallarını kaplayan luminal epitelde ifade edilen ER tarafından aktive edilen genlerin ifadesiyle karakterizedir. Bununla birlikte, hücre çoğalmasında görev alan genlerin ifadesi düşüktür [16, 23]. Luminal A meme tümörlerinin immünohistokimyasal olarak incelemesinde ER, PR, CK8/18 ve Bcl-2 proteinlerinin ifadesi görülürken, HER2 ifadesi yoktur. Bu tümörlerde

ayrıca, GATA3 ifadesi yüksektir [23] ve sıklıkla PIK3CA, MAP3K1, GATA3, TP53, CDH1 ve MAP2K4 genlerinde mutasyonlar gözlenir [24]. En fazla (%45) mutasyon saptanan gen PIK3CA'dır .Luminal A alt tipi tümörlere sahip hastalarda, prognoz diğer alt tiplere oranla daha iyidir ve nüks oranı % 27,8'dir [24].

Luminal B meme kanseri %10-20 oranında görülür. ER ifadesi Luminal B tümörlerde de mevcuttur. Ancak bu alt tipde belirleyici olan, HER2 ifadesinin olması ya da HER2 ifadesinin bulunmadığında Ki-67 ifadesinin yüksek olmasıdır [16, 23]. Bu tip tümörler, Luminal A tümörlere oranla daha agresif seyirlidir [16, 17, 23]. Luminal B meme kanserinde, metastatik nüks oranı değişmekle birlikte %30 civarındadır ve genellikle kemik ve karaciğere yayılım görülür. Luminal B kanserleri, çeşitli genlerde mutasyonlar içerir; TP53 ve PIK3CA, yaklaşık % 29 oranı ile en sık mutasyon saptanan genlerdir [24].

2.2.2. HER2+ Meme Kanseri

HER2 insan epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin bir üyesidir. Meme kanseri ve diğer bazı kanserlerde, HER2, onkogen gibi davranır. Meme kanseri vakalarının %15-20' sinde HER2 gen amplifikasyonu nedeniyle, tümörlerde reseptörün aşırı ekspresyonu görülür [16]. HER2+ meme kanseri hücreleri yüksek çoğalma kapasitesine sahiptirler; bununla ilişkili olarak %75 oranında yüksek histolojik grad ve sık p53 mutasyonları görülür [16, 23]. HER2+ meme kanserleri tipik olarak ER negatiftir. Dolayısıyla, bu alt tipde anti-östrojenik hormonal tedaviler yer almaz. Bunun yerine tedavi, anti-HER2 monoklonal antikoru içeren hedefe yönelik ilaçlar ve sitotoksik kemoterapilerin kombinasyonuna dayanır [16].

2.2.3. Bazal Benzeri Meme Kanseri

Bazal benzeri meme kanseri tüm meme kanserlerinin yaklaşık olarak %10-20'sini oluşturur. Bu kanserler, erken yaşta başlayan menarş, ilk dönem gebelikte daha genç yaş, emzirme eksikliği ile birlikte yüksek parite ve abdominal yağlanma gibi belirgin risk faktörleriyle ilişkilidir. Bu alt tipin en belirgin özelliği, meme tümörlerinde üç ana reseptörün (ER, PR ve HER2) ifadesinin olmamasıdır. Bu nedenle, bu moleküler alt tip üçlü-negatif meme kanseri olarak tanımlanır [16- 26]. Bazal benzeri meme kanserleri, yüksek hücre çoğalma oranları ile karakterizedir ve genel olarak tedavide elde edilen sonuçlar zayıftır. Yüksek p53 mutasyon sıklığı, bazal benzeri alt tip

tümörlerin kötü prognozu açıklayabilen etmenlerden bir diğeridir. Ayrıca, BRCA1 geninde ‘germ-line’ mutasyonlar bu alt tip ile ilişkilidir [24, 25].

2.2.4. Normal Benzeri Meme Kanseri

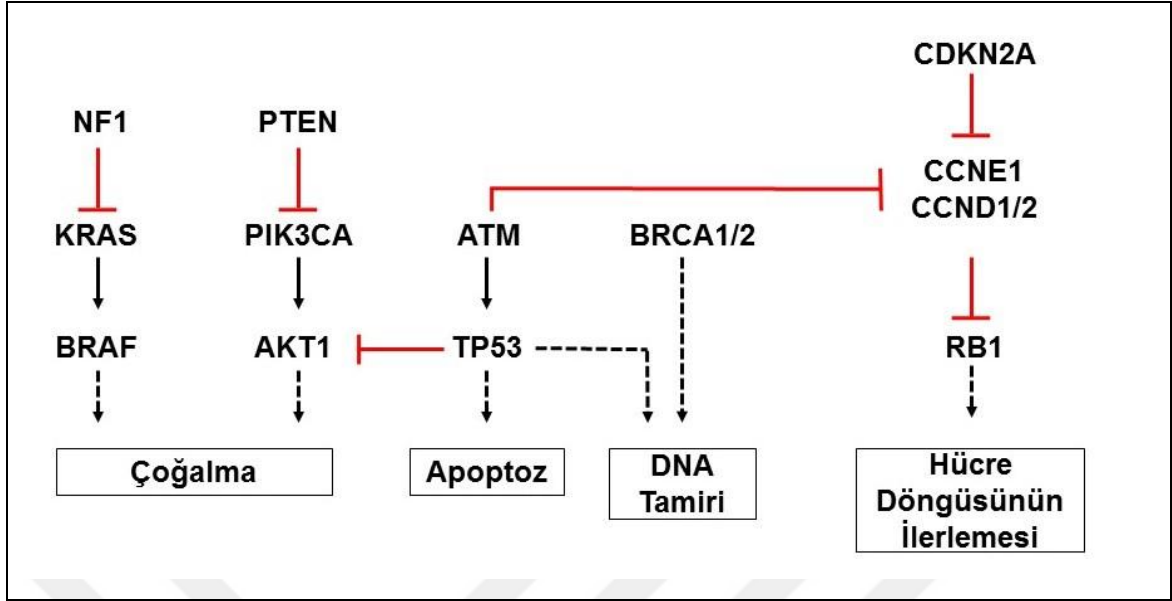
Normal benzeri meme tümörleri, tüm meme karsinomlarının yaklaşık %5-10'unu oluşturur. ER, PR ve HER2 ifadesinden yoksundurlar, CK5 ve EGFR ifadesi yoktur. Bu nedenle bazal tip olarak kabul edilmeden üçlü-negatif olarak da sınıflandırılabilirler [22]. Bu tümörler, adipoz dokunun tipik genlerini ifade ederler. Hastalarda prognoz bazal benzeri alt tipden daha iyidir ve genellikle neoadjuvan kemoterapiye cevap söz konusudur. Bu tümörlerin klinik önemi henüz belirlenmemiştir ve nadir olmaları nedeniyle bu alt tip üzerine yapılan çalışma sayısı azdır [23].

2.2.5. Claudin-düşük Meme Kanseri

Yukarıda anlatılan moleküler sınıflandırma dışında, 2007'de yeni bir özgün alt tip olarak “Claudin-düşük Meme Kanseri” tanımlanmıştır [26]. Bu tipteki tümörler, tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 10'unu teşkil eder ve epitelyal-mezenkimal geçiş belirteçleri, kök hücre benzeri ve/veya tümör başlatan hücre özelliklerini içerirler. Claudin-düşük meme tümörleri, bazal benzeri kanserlere benzer şekilde bazı kemoterapötik ajanlara cevap verir, ancak hastalarda nüks gözlenebilmesi nedeniyle bu kanserlerin mezenkimal özellik taşıdığı ve dolayısıyla standart kemoterapi ajanlarına duyarlı olmadığı düşünülmektedir [27].

2.3. Meme Kanserinin Moleküler Genetiği

Malign meme kanseri, hücre çoğalmasını düzenleyen genlerde değişikliklerin meydana geldiği, karmaşık, moleküler bir hastalıktır (Şekil 2-2). Meme kanseri çoğunlukla sporadik olarak gelişmekle birlikte, hastalığın %5-10'u kalıtsal veya ailevi meme kanseridir. Meme kanseri gelişiminde, mutasyona uğramış onkogenlerin kontrolsüz hücre çoğalmasını uyarması, bunun devamında ise, özellikle tümör baskılayıcı genlerde (TSG'ler) meydana gelen mutasyonların maligniteye yol açmasının temel mekanizma olduğu düşünülmektedir [28].



Şekil 2-2: Meme kanseri gelişiminde görev alan genler ve yolakları [29]

2.3.1. Onkogenler

Onkogenler, moleküler olarak iyi çalışılmış ilk “kanseri” genleridir. Hücre büyümesi ve çoğalmasının normal düzenlenmesinde görev alan proto-onkogenlerin mutasyona uğramasıyla ortaya çıkarlar. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar hücreye büyüme ve çoğalma özelliği kazandırır [28].

2.3.1.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER2)

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi dört üyeden oluşur. Bunlar, HER1 (EGFR), HER2, HER3 (erbB3) ve HER4 (erbB4)’tür ve reseptör tirozin kinaz (RTK) aktivitesine sahiptirler. Tüm RTK’lar, hücre dışı bir ligand bağlayıcı bölge, bir zar geçen bölge ve hücre içi bir tirozin kinaz aktivitesine sahip bölge olmak üzere 3 farklı fonksiyonel domain içeren zar geçen glikoproteinlerdir. Ligandın reseptöre bağlanmasıyla reseptör aktifleşir ve reseptör proteinlerinin homodimer veya heterodimerler haline gelmesine yol açar. Bunu, Ras/mitojenle aktive olan protein kinaz yolu, fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K)/ Akt yolu gibi hücre içi gibi birkaç hücre içi sinyal yolunu aktive eden otofosforilasyon takip eder. Sonuçta, hücre dışından alınan sinyal, hücre çoğalması, hücre sağ kalımı, hareket kabiliyeti ve hücre adezyonunu etkiler. HER2 reseptörlerinin homodimerler oluşturmak için bilinen bir ligandı yoktur [30].

HER2 proto-onkogeni, 17. kromozomunda q12 bölgesinde yerleşiktir. HER2 ekspresyonunu etkileyen gen ya da protein seviyesindeki anormallikler, hem lenf nodu negatif hem de lenf nodu pozitif meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmaların % 88'inde yapılan tek değişkenli veya çok değişkenli analizlerde, HER2 gen amplifikasyonu ya da HER2 proteini aşırı ekspresyonunun, HER2+ meme kanserinin anti-HER2 ajanlarla tedavi sonucunu öngörmeye yararlı olduğu bildirilmiştir [31].

2.3.1.2. c-MYC

c-MYC geni, viral onkogen v-MYC'in hücrel homologudur ve 8q24'te lokalizedir. c-MYC gen ürünü, üç izoformu (c-MYC1, c-MYC2 ve c-MYCS) olan bir nükleer fosfoproteindir. Baskın izoform, 62 kDa'luk bir protein olan c-MYC2'dir. Amino terminali, transkripsiyonel düzenlemeden sorumlu MYC kutu I ve kutu II elemanlarını içerir, karboksi ucu da DNA bağlanmasında ve transkripsiyon faktörü MAX ile heterodimerizasyonda rol oynayan bazik, sarmal ilmek-sarmal ve lösün fermuar motiflerini içerir. MYC-MAX heterodimeri, büyüme ile ilişkili genlerin düzenleyici elemanı olan E kutusuna (CACGTG) bağlanır ve böylece transkripsiyonu uyarır. c-MYC normalde sadece hücre bölünmesi sırasında ifade edilir ve hücrenin, özellikle uyarı yoluyla hücre döngüsünün S fazına girişini hızlandırır. c-MYC gen ürünü, insan genlerinin yaklaşık % 15'ini temsil eden geniş bir gen ağının düzenlenmesinde rol oynayan nükleer bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Bu genler, çoğalma, apoptoz, farklılaşma ve metabolizma dahil olmak üzere çeşitli hücrel işlemlerden sorumludur [28].

Yapılan bir meta-analiz sonucuna göre, c-MYC, meme kanseri vakalarının % 1 ile % 94'ünde (ortalama % 15,5) 3 kat veya daha fazla ifade edilmektedir [32]. Ayrıca, çeşitli oranlarda (%4-52) saptanan c-MYC amplifikasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir [32].

2.3.1.3. RAS Sinyal Yolu

RAS genleri üç ayrı kromozomda yerleşiktir. İlki, 11. kromozom p15.5 bölgesindedir ve HRAS kinazı kodlar. Diğeri, 12. kromozom p12.1'de yer alır ve KRAS4A ve KRAS4B olmak üzere iki varyantı oluşturur. Üçüncüsü ise, kromozom 1p13.2'de yerleşiktir ve NRAS kinazı kodlar. RAS kinazlar, 21 kDa büyüklüğünde monomerik GTPaz ailesinin üyesidirler [33, 34]. Kinazlar, iki katalitik domaini yüksek

oranda korunmuş üç domain içerirler. Üçüncü domain, karboksil ucunda bulunur ve hücre zarına bağlanan bölgedir. Sentez sonrası modifikasyonlara uğrayan RAS kinazlar, daha sonra plazma zarının sitoplazmik tarafına gömülür. RAS kinazlar, reseptör tirozin kinazlar gibi büyüme faktörlerinin reseptörlere bağlanması yoluyla aktive edilir [33, 34]. GTP'nin GDP'ye dönüşmesi ile aktifleşen RAS proteini daha sonra hücre çoğalması, farklılaşma ve ölümünde görev yapan çeşitli hücresel yolda yer alan bir dizi ikincil haberciyi fosforile eder. Bunlardan en önemlisi, RAF/MEK/ERK yoludur [33]. RAS, sırayla ERK 1 ve 2' yi fosforile eden MEK1 ve 2 kinazları fosforile eden RAF serin/treonin kinazlarını fosforiller, bu da fosforile ERK 1 ve 2'yi fosforile eder. Fosforillenmiş ERK, hücre çoğalmasında yer alan çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktifleştirir. Bir diğer önemli yolak PI3K/ AKT/ mTOR' dur. Bu yolağın aktifleşmesi, hücre apoptozunun inhibisyonu yoluyla hücrenin hayatta kalmasına neden olmaktadır [28].

K-RAS onkogeninin aktifleşmesine yol açan mutasyonlar tüm kanserlerin yaklaşık %30'unda görülür. Onkogenik K-RAS mutasyonları meme tümörlerinde seyrek (yaklaşık % 5) olarak saptanmasına karşın, genomik çalışmalar EGFR/ HER2 /K-RAS yolağının agresif meme kanserlerinin büyük bir kısmında aktifleştiğini göstermiştir. EGFR/ HER2/ K-RAS aktifleşmesi, meme kanserinde agresif tedavilere rağmen, kısa sağkalım, tedaviye direnç ve tümör nüksü ile ilişkilidir [34].

2.3.1.4. Siklin D1

Hücre döngüsü, hücrenin büyümesi ve bölünme ile sonuçlanan ve çeşitli fazlardan oluşan hücresel bir süreçtir. G1 fazı, DNA sentezinin gerçekleştiği S fazına hazırlık aşamasıdır. S fazından sonra, hücreler mitozu uğramadan önce G2 fazına veya doğrudan hücre bölünmesinin gerçekleştiği M fazına girerler. Hücre döngüsünün aşamaları, çeşitli faktörlerle dinamik bir şekilde düzenlenir. Siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar), hücre döngüsü olaylarının güç kaynağı olan “motorlar” olarak adlandırılabilir. Bu proteinler, serin/ treonin protein kinaz ailesinin üyeleridir. CDK'lar, kendilerine bağlanan ve sentezleri hücre döngüsüne göre değişen siklinler ile birlikte çalışırlar. Diğer bir düzenleme yapan molekül grubu ise, CDK inhibitörleridir (CKI'ler). CKI'ler, CDK/Siklin holoenzimlerinin etkisizleştirilmesinde kritik öneme sahiptirler [28, 35].

Karsinogenezde, hücre döngüsünün düzenlenmesindeki anahtar kavşak G1'den S fazına geçiştir [28, 35]. Siklin D1 ve E, G1 siklinleridir ve hücrenin G1 fazından S fazına geçişinde önemli düzenleyici elemanlardır. Siklin D1, EGF ve östrojen gibi büyüme faktörleriyle düzenlenir ve CDK 4/6' ya bağlanarak, retinoblastom (RB) proteinini fosforile eder ve böylece E2F serbest kalır. E2F, hücrenin S fazına geçişi için gerekli olan genleri aktive eder. E2F proteini tutması nedeniyle, RB, hücre döngüsünün düzenlenmesinden sorumlu olan “ana anahtar”dır [28, 35]. Son olarak, CKI' ler p21 ve p27, G1' den S' ye geçişte önemli düzenleyici rol oynamaktadır [28, 35].

Kanser, hücre döngüsü kontrolünde yer alan genlerin düzensizliğinin bir sonucudur [28]. Bununla uyumlu şekilde, Siklin D1, meme kanseri vakalarının % 13-20' sinde amplifikasyona uğrarken, % 50'sinden fazlasında aşırı ifade edilir [28, 36].

2.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler (TBG'ler)

2.3.2.1. TP53

Tümör baskılayıcı gen p53 (TP53), hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen ve tetramer yapıda işlev gören bir transkripsiyon faktörü kodlar. Protein, stres ve/veya DNA hasarı varlığında hücre döngüsünün durmasını, DNA onarımını, apoptozu, hücre yaşlanma gibi süreçleri düzenleyerek tümör oluşumunu baskılar [37].

TP53 geninde mutasyon taşıyan bireylerin yaşam boyu herhangi bir kanser geliştirme riski, kadınlarda % 90'a kadar ulaşabilmekle beraber, bu oran meme kanseri için yaklaşık % 50'dir [37, 38]. 35 yaşından önce meme kanseri tanısı almış kadınlarda bildirilen TP53 mutasyonlarının sıklığı < % 1 ile % 7 arasında değişmektedir; 30 yaşından önce tanı alan hastalarda ise bu oran % 30'a kadar çıkabilmektedir [37, 38].

2.3.2.2. PTEN

Fosfataz ve tensin homologu (PTEN) geni, PI3K/ Akt/ mTOR yolağını baskılayan ve hücre yaşamını, çoğalmasını ve metabolizmasını düzenleyen bir tümör baskılayıcı protein kodlar. Meme kanseri, Cowden Sendromu tanısı alan kadınlarda en sık görülen malignitedir. Ayrıca, yaşam boyunca meme kanseri geliştirme riski % 85'tir ve tanı yaşı 38 ila 46 arasında olduğu bilinmektedir. Bu hastalarda, daha sonra tiroid ve endometriyum tümörleri de ortaya çıkabilmektedir. Literatürde PTEN mutasyonu

taşıyan 40 yaşın altındaki kadınlarda metastatik meme kanserinin görülebildiği bildirilmiştir [37].

2.3.2.3. BRCA1 ve BRCA2 Genleri

BRCA1 ve BRCA2 genleri, tümör baskılayıcı genlerdir ve proteinleri, DNA çift zincir kırık onarımı ve hücre döngüsü kontrol noktasının kontrolü gibi temel hücre işlemlerinde yer alır. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar, tüm meme kanserlerinin sadece % 2'sinden sorumlu olsalar bile, bu genlerde “germ-line” mutasyon taşıyan aile bireylerinin meme kanseri geliştirme riski önemli ölçüde artmaktadır [39, 40].

BRCA1 genindeki mutasyonlar, özellikle erken yaşta meme kanseri, yumurtalık kanseri ve fallop tüpü kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir. BRCA1 mutasyonu olan bir kadın için yaşam boyu meme ve yumurtalık kanseri gelişme riskleri genellikle sırasıyla % 85 ve % 40 olarak verilmiştir. BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında risk biraz daha düşüktür [41]. BRCA2'deki patojenik varyantlar ayrıca, pankreas kanseri, sarkom ve malign melanom ile de ilişkilidir. BRCA mutasyonu taşıyan erkeklerde, prostat kanseri riski artmaktadır. BRCA1 ile ilişkili meme kanserleri, yüksek gradlı ve üçlü negatif tümörler olma eğilimindedir [40].

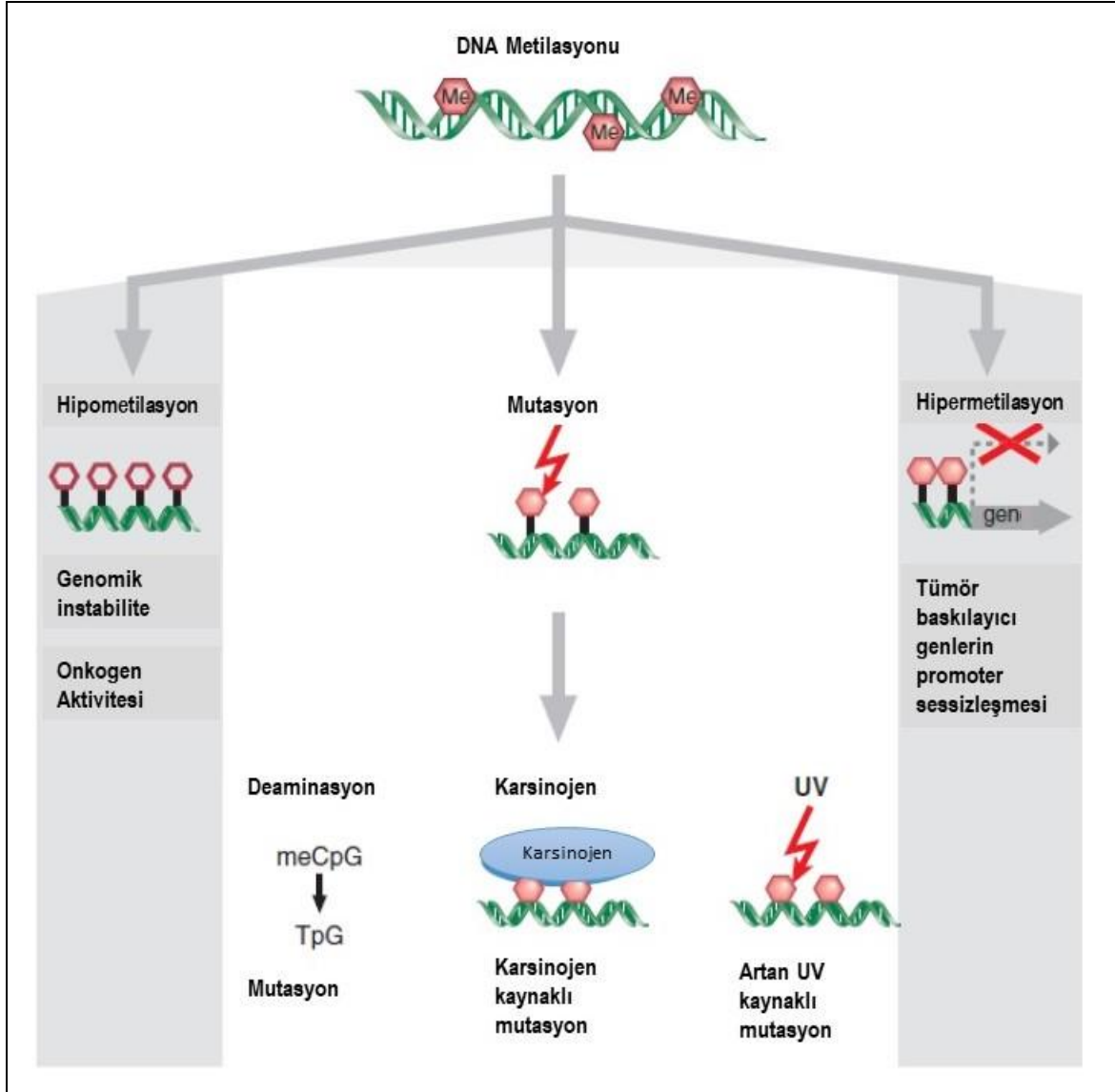
2.4. Meme Kanserinde Epigenetik

Epigenetik terimi, DNA dizisinde bir değişim meydana gelmeden, gen ifadesinde kalıtılabilen değişikliklerin oluşumunu tanımlar. İlk tanımlanan epigenetik parametre DNA metilasyonudur [42]. DNA metilasyonu dışında, histonların kovalent modifikasyonları, kodlamayan RNA'lar (özellikle mikroRNA ve uzun kodlamayan RNA'lar) ve kromatin yeniden modellenmesi epigenetik olarak gen ifadesini değiştirebilen etmenler arasında yer alır [43]. Bu bölümde, kısaca DNA metilasyonu ve akabinde tezin konusu olması itibarı ile daha detaylı olmak üzere histon modifikasyonları konularından bahsedilecektir.

2.4.1. DNA Metilasyonu

İnsanlarda bugüne kadar en çok çalışılan epigenetik parametre, DNA'nın sitozin metilasyonu olmuştur. DNA metilasyonu, S-adenosilmetiyoninden (SAM) 'bir' metil grubunun DNA üzerinde birbirini takip eden sitozin ve guanin dinükleotidinde (CpG olarak adlandırılır) sitozinin 5. karbon pozisyonuna kovalent eklenmesi işlemidir. Bu enzimatik reaksiyon, DNA sentezi sırasında DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) adı verilen bir enzim ailesi tarafından gerçekleştirilir [43]. DNMT3a ve DNMT3b SAM'den metil grubunu (-CH₃) önceden metillenmemiş olan sitozine transfer eder. Buna karşın, DNMT1, DNA replikasyonu esnasında kalıp zincirdeki metilasyon proliferine göre yeni sentezlenen zincirin metilasyonundan ("maintenance methylation") sorumludur [21, 42,43]

Kanser hücrelerinde DNA metilasyon yolağında temel olarak 2 tip değişiklik meydana gelir [42, 44- 47] (Şekil 2-3). Bunlardan birincisi, normal hücrelerin genomlarında yüksek oranda metile olan, gen içermeyen heterokromatin ya da tekrar dizilerinin kanser hücrelerinde metilasyon kaybına uğramasıdır. Buna hipometilasyon adı verilir [42, 44- 48]. DNA'da global bir demetillenme işlemi, onkogenlerin aktivasyonu ile sonuçlanabilmektedir [49]. İkincisi ise, kanser hücrelerinde mutasyona alternatif bir mekanizma olarak tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde yer alan ve normal hücrelerde metile olmayan CpG adacıklarının metillenmesidir. Buna DNA hipermetilasyonu adı verilir ve genel olarak tümör baskılayıcı genlerin sessizleşmesiyle sonuçlanır [42, 44 - 49].



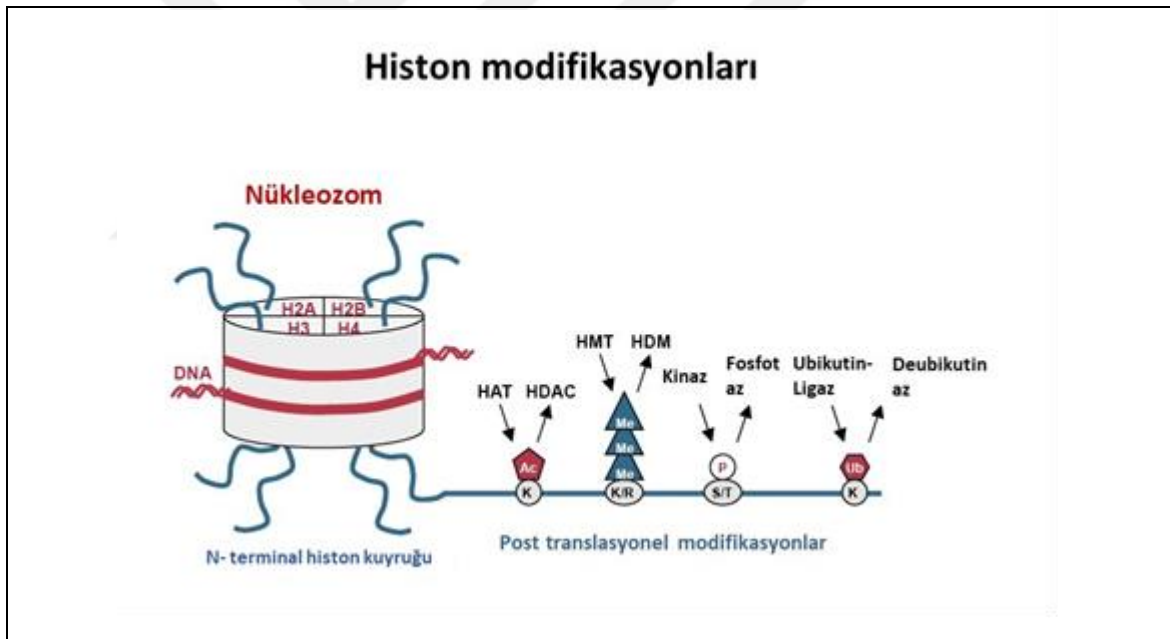
Şekil 2-3: Aberan DNA metilasyonunun onkojenik etkisi [48].

2.4.2. Post-Translasyonel Histon Modifikasyonları

DNA metilasyonunun yanı sıra kanser gelişimi ve progresyonu ile ilgili olarak en çok çalışılan epigenetik mekanizmalardan biri de histon modifikasyonlarıdır [42]. Ökaryotik DNA'nın proteinlerle birlikte oluşturduğu yapı kromatin adını alır. Kromatin, DNA sentezi, hücre bölünmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, farklılaşma gibi bir çok yaşamsal hücre faaliyeti ile doğrudan ilişkilidir. Nükleozomlar, kromatinin temel birimidir ve DNA sentezi, transkripsiyon ve DNA onarımına izin vermek için dinamik olarak yeniden yapılandırılır. Böylece, nükleozomlar, genetik bilginin düzenlenmesini ve zamanında erişilebilir olmasını yönetmek için çeşitli hücre sinyallerini bir araya getirir.

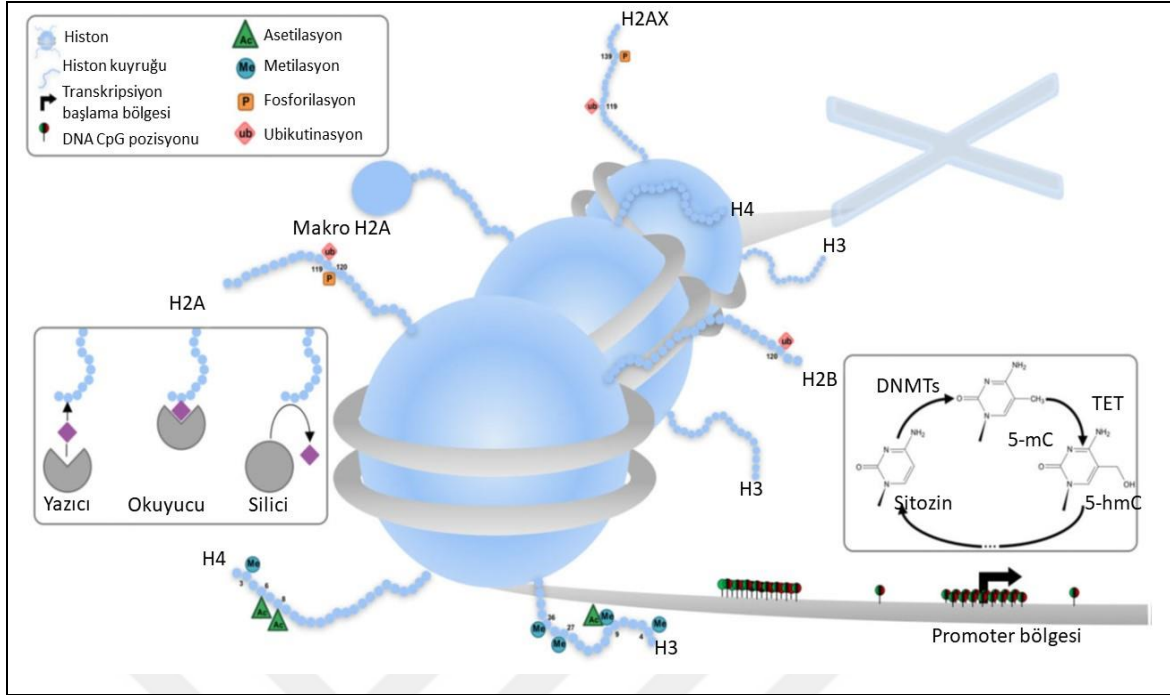
Bu entegrasyonun merkezinde, DNA ile birlikte nükleozomu oluşturan histon proteinleri yer alır [50].

Histonlar, pozitif yüklü, küçük (<20 kDa) proteinlerdir. Dört temel ('core') histon proteininin (H2A, H2B, H3, H4) ikiyeşerli kopyalarının oluşturduğu oktametrik yapının etrafını, DNA'nın 2 defa dolanması ile nükleozom oluşur [7, 50, 51]. Histon proteinlerinin, N-terminal uç kısımları nükleozomlardan dışarı doğru uzanırlar ve "histon kuyruğu" ismini alırlar. Bu kısımlar, histonların sentezleri sonrası, kovalent olarak modifikasyona (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon gibi) uğrarlar (Şekil 2- 4) [7, 43, 50]. Bu modifikasyonlar kromatinin sıkılaşma ("condensation") düzeyini etkileyerek, kromatinin farklı kompleks ve proteinlerle etkileşme afinitesini etkilerler [43].



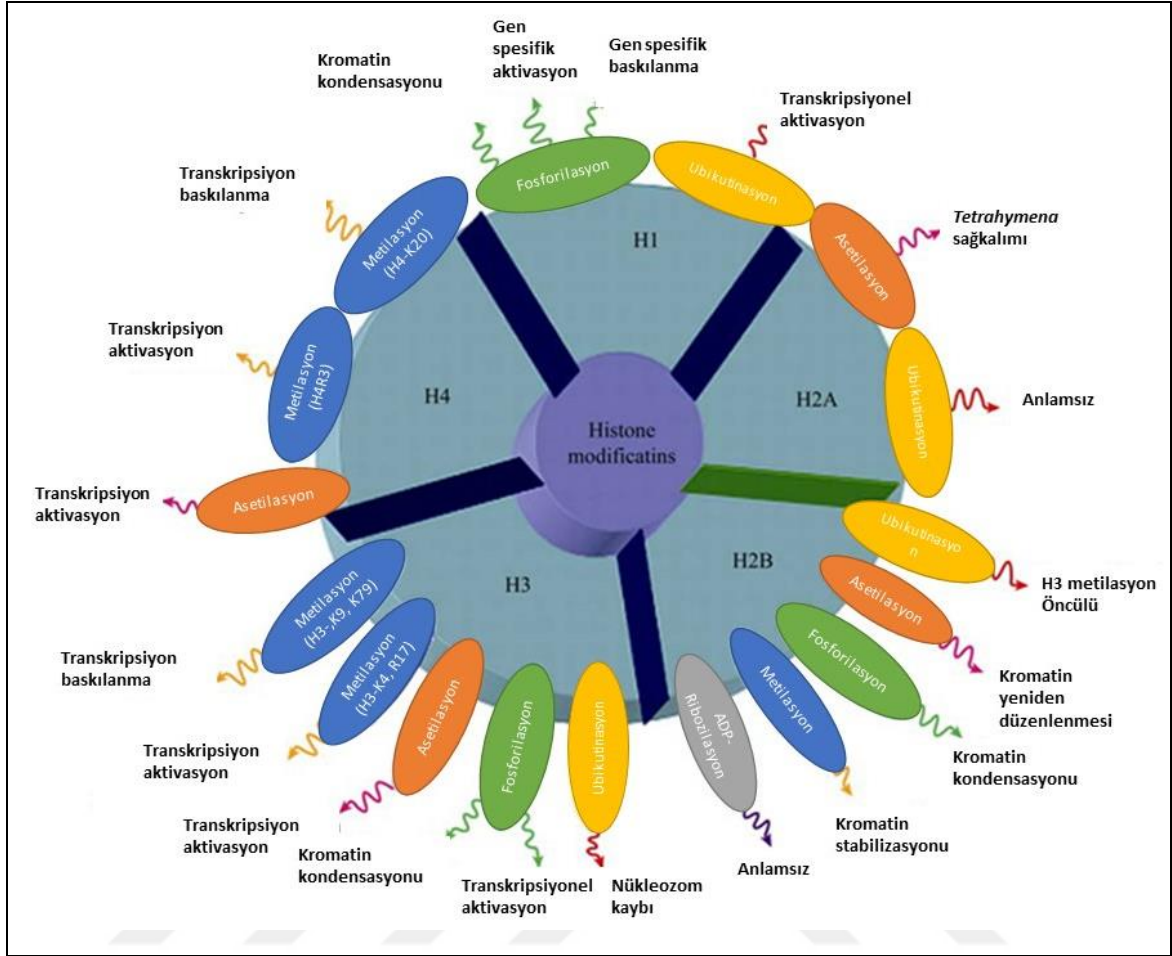
Şekil 2-4: Histon modifikasyonları [7].

3 farklı grup histon modifiye edici enzim grubu tanımlanmıştır. Bunlar; yazıcılar ("writers"), okuyucular ("readers") ve siliciler ("erasers") olarak adlandırılırlar (Şekil 2- 5) [43, 51, 52]. Yazıcılar, histon işaretlerinin birikmesinden sorumludurlar. Okuyucular, bu işaretleri tanırlar ve kromatin içeriğine bağlı olarak farklı işlevlerdeki çeşitli proteinleri toplarlar [5]. Siliciler ise histon işaretlerinin uzaklaştırılmasıyla görevlidirler [43, 52, 53].



Şekil 2-5: Post translasyonel histon modifikasyonlar [43].

Histonlar sadece DNA'yı paketleyen proteinler değildir; aynı zamanda gen ifadesinin düzenlenmesine katılan moleküler yapılarıdır [42]. Gen ifadesinin düzenlenmesi, histon kuyruklarında çeviri sonrası (post-translasyonel) gerçekleşen kovalent modifikasyonlar yolu ile sağlanır. Bu modifikasyonların başlıcaları şunlardır; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikütinasyon, sumoilasyon, prolin izomerizasyon ve ADP-ribozilasyon [21, 42, 43, 47]. Histon işaretlemesinin tipi ve gerçekleştiği aminoasidin pozisyonu, modifikasyonların işlevlerini belirler (Şekil 2- 6) [54]. Örneğin histon 3 lizin 4 üçlü metillenmesinde (H3K4me3) olduğu gibi, bazı modifikasyonlar gen ifadesini aktifleştirici rol oynarken, diğer bazıları (örn. H3K9me3) gen ifadesini baskılayıcı yönde görev yaparlar [43, 52, 53, 54].



Şekil 2-6: Histone modifikasyonlarının şematik gösterimi ve biyolojik işlevleri [54].

2.4.2.1. Histon Asetilasyonu

Histon asetilasyonu ilk defa 1964 yılında Allfrey ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [55]. Bu modifikasyon, histon asetil transferazlar (HAT) ve histon deasetilazlar (HDAC) olarak bilinen iki enzim ailesi arasındaki denge ile düzenlenir [47, 53, 55, 56]. Lizin asetiltransferaz olarak da bilinen HAT'lar "yazıcı" olarak işlev görürken HDAC'ler "silici" yönde görev yaparlar [52, 53].

Histon asetilasyonu, temel olarak H3 ve H4 histonlarının lizin aminoasitlerinde meydana gelir. HAT'ler, asetil CoA'yı kofaktör olarak kullanarak bir asetil grubunu lizinin ϵ -amino grubuna transferini katalize ederler. Bu, lizinin yükünün nötralize edilmesi ile sonuçlanır ve histonlarla DNA arasındaki etkileşimi zayıflatır [47, 53, 55, 56]. Histon deasetilaz (HDAC) enzimleri, HAT'ların etkilerini tersine çevirerek asetil gruplarını uzaklaştırırlar. Asetil gruplarının uzaklaştırılması kromatin yapısının

yoğunlaşması ile sonuçlanır. Böylece, transkripsiyonel baskılayıcı olan HDAC'ler, kromatin yapısını transkripsiyon için uygun olmayan duruma getirirler [55].

H4 histon asetilasyonu en fazla çalışılan modifikasyondur. Meme kanseri, kolon kanseri, özofagus skuamöz hücreli karsinom, gastrik kanser, testis kanseri ve akut promiyelositik lösemi dahil bir çok kanser tipinde tümör hücrelerinde lizin 16 asetilasyon (H4K16ac) düzeyinin azaldığı bildirilmiştir [47]. H4K16ac, HDAC SIRT1 tarafından deasetillenir ve SIRT1'in artan ifadesi çeşitli tümörlerde bildirilmiş ve prognostik gösterge olarak kullanılması önerilmiştir [5]. Histon H3'ün lizin 9 ve 18'deki düşük asetilasyon seviyeleri, yüksek prostat kanseri nüksü ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca H3 asetilasyonunun insan primer kolon tümörlerinde ve birçok kolon kanseri hücre hattında azaldığı gösterilmiştir [5, 47].

Meme kanserinde, histon metilasyonu ile birlikte H3K4 ve H3K9 asetilasyonlarının, meme kanseri alt tiplerinin ayırımında faydalı olduğu raporlanmıştır [21]. H3K4 asetilasyonunun normalden fazla olması, meme kanseri progresyonu, östrojen cevabı, epitelyel-mezenkimal geçiş ile ilişkili bulunmuş ve tümör progresyonunun güçlü bir belirleyicisi olarak ortaya çıkmıştır [21, 57].

2.4.2.2. Histon Metilasyonu

Histon metilasyonu temel olarak histon kuyruğunda yer alan lizin ve arjinin aminoasitlerinde meydana gelir. Ancak asetilasyon ve fosforilasyonun aksine, histon metilasyonu histon proteininin yükünü değiştirmez [55]. Bu modifikasyon türünde, lizinler mono-, di- veya tri-metillenme olmak üzere 3 farklı düzeyde modifikasyona maruz kalabilmektedir. Arjininler ise, mono-, simetrik veya asimetric olarak di-metillenmiş olabilmektedirler [47, 55]. En çok çalışılan lizin modifikasyon noktaları H3'te K4, K9, K27, K36 ve K79 ve H4'te K20 olmuştur [58].

Histon metilasyonu transkripsiyonel aktivasyon ya da baskılanma ile ilişkili olabilir. Bu değişkenlik, modifikasyona uğrayan aminoasidin yerleşimi ve metilasyon derecesine göre olmaktadır. Örneğin, H3'ün K4'teki metillenmesi tamamen transkripsiyonel aktivasyon ile sonuçlanırken, H3'teki K9 veya K27 ve H4'teki K20 metillenmeleri ise transkripsiyonel baskılanmaya yol açmaktadır (Şekil 2-6) [42, 54].

Histon metilasyonu, histon metil transferazlar (HMT'ler) olarak adlandırılan enzim ailesi tarafından katalizlenir [47, 53, 55, 56]. HMT'ler S- adenosil metiyoninden

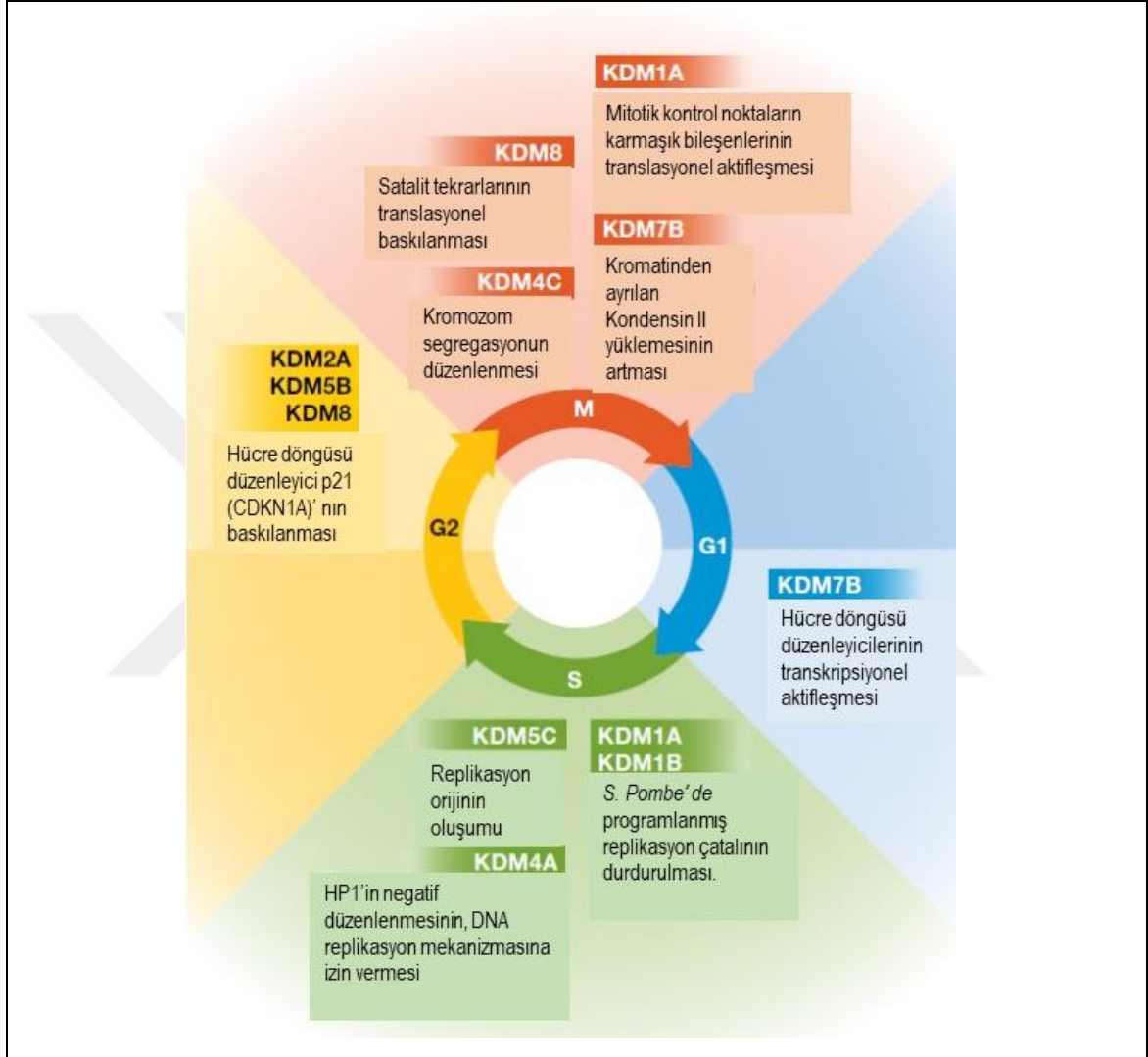
(SAM) metil grubunu alarak lizin ve arjinin aminoasitlerine transfer ederler [59]. Bu enzimler, lizin metil transferazlar (HKMT) ve arjinin metil transferazlar (PRMT) olarak sınıflandırılırlar [53, 59]. HKMT'ler, SET domaini içeren ve içermeyenler olarak ayrıca alt sınıflara ayrılmışlardır [60]. SET domaini ve etrafındaki dizi homolojisine dayanarak, HKMT'ler ayrıca SUV39, EZH, SET1, SET2, PRDM ve SMYD, SET 7/ 9 (G9a), NSD dahil olmak üzere çeşitli alt ailelere sınıflandırılırlar [61, 62].

HMT'ler tümör gelişimi ile ilişkilidirler [59]. HMT'lerin yanlış düzenlenmesi, onların ifade düzeylerini değiştirmekte ve böylece bir çok hücrel süreç bundan etkilenerek tümör oluşumuna yol açmaktadır [59, 63]. G9a ve SETDB1 tarafından metillenen H3K9, heterokromatin ve transkripsiyonel sessizleşme ile ilişkili bir epigenetik biyobelirteçtir. H3K9 metilasyon düzeyinin artması kanserde kritik genlerin susturulmasına yol açmaktadır [5, 59, 63]. Meme, prostat, akciğer, karaciğer ve kolon kanserlerinde H3K9'un 3'lü metillenmesini sağlayan metil transferaz olan G9a'nın aşırı ifade edildiği gösterilmiştir [5, 59]. Benzer şekilde, transkripsiyonel baskılama için önemli bir modifikasyon olan H3K27me3'ü katalizleyen enzimin (EZH2) çeşitli kanserlerde aşırı ifade edildiği bildirilmiştir [5, 58, 59]. Diğer taraftan, gen yazılımını aktive eden H3K4me3'ü katalizleyen SMYD3'ün çeşitli kanserlerde onkojenik rol oynadığı bildirilmiştir [5, 59].

Histon demetilazlar (HDM'ler) olarak adlandırılan enzimler, histon proteinlerinden metil grubunun uzaklaştırılmasını katalizler [47]. İki histon demetilaz enzim ailesi tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi aminoksidaz homolog proteinleri (KDM/ LSD), diğeri Jumonji C (JMJC) domaini içeren demir bağımlı dioksijenazlardır [53, 64]. Aminoksidazlar, lizin spesifik demetilaz aile üyelerini içerir. LSD1 ve LSD2 olmak üzere iki üyesi vardır [65]. LSD1, aktif olarak H3K4me1 ve H3K4me2'den metil gruplarını uzaklaştırmaktadır [64]. Histon lizin demetilazlar, gen düzenlemesi, DNA replikasyonu, hücre döngüsü ve hücre bölünmesi ve diğer bir çok hücrel süreçlerde temel işlevleri yerine getirirler (Şekil 2-7) [64]. Bununla ilişkili olarak, LSD1'in, ER negatif meme kanseri, mesane, kolorektal ve prostat kanserleri gibi farklı malignitelerde yüksek oranda ifade edildiği rapor edilmiştir [65].

JMJC domaini içeren demetilazlar, mayalardan insanlara kadar korunmuşlardır ve lizin ve arjininden metil gruplarını uzaklaştırırlar [60]. H3K9me3 ve H3K9me2 modifikasyonlarında demetilleyici olarak görev yapan JMJD2 alt ailesi üyeleri kanserde

aşırı ifade edilmektedir. Örneğin, JMJD2C genini içeren genomik bölgenin kopya sayısı, meme kanseri, skuamöz hücreli karsinom ve medulloblastomda artmaktadır [65, 66].



Şekil 2-7: Histon lizin demetilazların görevleri [64].

2.4.2.3. Histon 4 Lizin 20 (H4K20)

Histon 4 lizin 20 (H4K20) metilasyonu ilk kez 1969 yılında tanımlanmıştır [67] ve mayalardan insanlara kadar evrimsel olarak korunmuş bir epigenetik modifikasyondur [9]. H4K20'nin metilasyonu tekli-, ikili-, ve üçlü düzeyde gerçekleşebilirken, SET8 (PR-Set7), SUV420H1, SUV420H2, NSD1, ve NSD2/WHSC1 gibi farklı HMT'ler tarafından katalizlenirler [9, 58, 59, 68, 69]. Fare

embriyonik fibroblast hücrelerinde, SUV420H1, H4K20me2'yi katalizlerken, SUV420H2 H4K20me3'ten sorumludur. *In vitro* histon metiltransferaz (HMT) deneyleri, her iki enzimin de substrat olarak H4K20me1'i tercih ettiğini göstermiştir [5, 63,67, 68].

Bu metillenmelerden her biri, transkripsiyonel gen düzenlemesi, hücre döngüsü, genomik bütünlüğün sağlanması gibi farklı biyolojik süreçlerde rol alır [59]. Tekli (H4K20me1) ve ikili metillenme (H4K20me2), DNA replikasyonu ve DNA hasar tamirinde işlev görürken [9], üçlü metillenme (H4K20me3) genomda heterokromatik bölgelerde, telomerlerde ve tekrar elementlerinin bulunduğu genomik bölgelerden yoğun şekilde bulunur ve bu bölgelerin sessizleştirilmesinde temel mekanizmalardan birini oluşturur [9, 68]

H4K20'nin farklı metilasyon düzeyleri arasında kanserle en çok ilişkilendirilen işaretlenme üçlü metillenmedir. Genom çapında H4K20me3 düzeyinin yaş ile arttığı, kanser hücrelerinde ise global olarak azaldığı bildirilmiştir [6, 10, 11]. Tümör hücrelerindeki söz konusu azalma, global DNA metilasyonu ve H4K16ac ile ilişkili olan genomun tekrar dizilerinde meydana gelir [5]. Beklenebileceği üzere, kanser hücrelerinde azalmış H4K20me3 seviyelerine genellikle SUV420H2'nin ifadesinde bir azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir [70]. H4K20me3 kaybının temel onkogenik etkisinin, genom bütünlüğünün kaybolması nedeniyle olduğu kabul edilir [9]. Ayrıca H4K20me3 kaybı gen ifade profillerini değiştirmekte ve böylece hücre invazyonunun artmasına neden olmaktadır. Meme kanseri hücrelerinde, SUV420H1 ve SUV420H2'nin aşırı ifadesi, hücre invazyonunu baskımlarken, SUV420H2'nin sessizleştirilmesi, normal meme epitelyal hücre invazyonunu *in vitro* olarak aktive ettiği bildirilmiştir [12].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hasta Dokuları

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi (İ.Ü.) Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı. Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmada, 14.09.2012 tarih, 1453 sayı ve 2012/1413-1201 dosya numaralı, İ.Ü. Kinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi (S.B.Ü.) İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden, Yüksek Lisans tezi kapsamında 2012-2013 yılları arasında, meme kanseri teşhisi konmuş, ikinci bir malignite taşımayan, tedavi almamış hasta bireylerden alınmış dokular kullanıldı. İ.Ü. Kinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan izin yenilenmiştir (23.08.2017 tarihli, 915 Sayı ve 2017/887 dosya numarası). Çalışma ayrıca, S.B.Ü. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Doku örnekleri, hastadan cerrahi girişimle çıkartılan piyesten elde edilen tümör ve eşlenik normal dokularından oluşmaktadır ve kürsümüzdeki derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilmektedir. Çalışmaya, tümör ve eşlenik normal dokuları alınmış olan 102 hasta dahil edildi. Hastaların yaş aralığı 20-87, yaş ortalaması ise 53 idi. Meme tümörlerinin klinik özellikleri Tablo 3-1'de gösterilmektedir.

3.1.2. Hücre Soyları

Tez çalışmasında, MCF-7 ve MDA-MB-231 olmak üzere iki farklı meme kanseri hücre soyu kullanıldı. MCF-7 hücre soyu, 1970 yılında, Michigan Cancer Foundation araştırmacıları tarafından meme kanserli bir hastanın metastatik dokusundan (göğüs duvarı ve plevral effüzyon) alınan örneklerden geliştirilmiştir. Bu hücreler, invaziv duktal karsinom özelliğindedir ve hormon reseptörü pozitif olmasından dolayı, deneysel çalışmalarda oldukça sık kullanılır [71,72].

MDA-MB-231 hücre soyu, metastatik meme adenokarsinomu metastatik meme kanserli bir hastanın plevral effüzyonundan elde edilen hücrelerden geliştirilmiştir. Östrojen ve progesteron reseptörleri ile HER2 reseptörü açısından negatif olması nedeniyle bu hücre soyu, çalışmalarda üçlü negatif meme kanseri modeli olarak kullanılır [73].

Tablo 3-1: Hastaların yaş bilgileri ve klinopatolojik özellikleri

PARAMETRELER		n= 102	%
YAŞ	≤ 53	52	51
	>53	50	49
MENSTRÜEL DURUM	Premenopozal	36	35,2
	Postmenopozal	66	64,7
EVRE	0	1	1
	I	19	18,6
	II	52	50,9
	III	29	28,4
	IV	1	1
T EVRESİ	T0- T2	94	92,1
	T3- T4	8	7,8
N EVRESİ	N = 0	42	41,2
	N ≥ 1	58	56,8
	Bilinmeyen	2	1,9
MOLEKÜLER ALT TİP	Luminal A	34	33,3
	Luminal B	40	39,2
	Her-2 benzeri	10	9,8
	Bazal benzeri	13	12,7
	Bilinmeyen	5	4,9
TÜMÖR HİSTOLOJİSİ	DKİS (Duktal Karsinom in situ)	8	7,8
	İDK (İnvaziv Duktal Karsinom)	83	81,3
	MİKS TİP KARSİNOM	9	8,8
	Filloid Tümör	2	1,9

3.1.3. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Proteinaz K (SIGMA)

TriPure RNA İzolasyon Kiti [ROCHE]

RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti [THERMO SCIENTIFIC]

Lightcycler DNA Master SYBR Green I [ROCHE]

Lightcycler 480 Multiwell Plak [ROCHE]

Primer [IDT]

EpiQuik total Histone Extraction Kit [EPIGENTEK]

EpiQuik Global Tri-Methy Histone H4-K20 Quantification Kit [EPIGENTEK]

DMEM Besiyeri [BIOCHROM]

Opti-MEM Medium [GIBCO]

Fötal Sığır Serumumu [BIOCHROM]

Penisilin/Streptomisin [BIOCHROM]

Tripsin/EDTA [BIOCHROM]

siRNA [DHARMACON]

Lipofectamine 2000 [INVITROGEN]

Kristal Viyole

6X Yükleme Boyası [FERMENTAS]

100-bç Marker [FERMENTAS]

0,5X TEB [Laboratuar Stok]

PBS [SIGMA]

Havan ve eli

Bistüri

Eppendorf Tüpleri (0,2ml, 0,5ml ve 2 ml)

Petri Kabı (6 well plate) [GREİNER BIO-ONE]

Kültür Kapları (25, 75 cm²) [TPP]

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

-20 Derin Dondurucu [ARISTON, BOSCH]

-80 Derin Dondurucu [SANYO]

Thermal Cyclers [TECHNE]

LightCycler 480 [ROCHE]

Soğutmalı Santrifüjler [HETTICH, JOUAN]

Vorteks [SNIJDERS]

Nanodrop Spektrofotometre [THERMO SCIENTIFIC]

Agaroz Jel Elektroforez Tankı [BRL LIFE TECHNOLOGIES]

Jel Dökümentasyon Cihazı [VILBER- LOURMAT]

Mikrodalga Fırın [ARÇELİK]

Etüv [HEREAUS]

Hassas Terazi [CHYO]

Mikropipetler [THERMO]

Otoklav [HİRAMAYA]

ELISA Okuyucu [THERMO]

Sınıf II Laminar Akım Hücre Kültür Kabini [TEZSAN]

CO₂ İnkübatör [HERAEUS]

Ters Mikroskop [SEDIVAL]

Thoma Lamı [HAUSSER]

iCELLigence [ACEA BIOSCIENCES]

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Meme Tümörleri ve Eşlenik Normal Dokulardan RNA İzolasyonu

Tez çalışmasında ilk olarak meme tümör ve eşlenik normal dokularında SUV420H2 geninin ifade düzeyleri incelendi. Bu amaçla, 20 mg olarak tartılan doku parçaları, bir gece boyunca -80 °C’de bekletilen havanlara alındı ve dövülerek parçalandı. Elde edilen lizata (2 mg/ml) Proteinaz K eklenerek 2 ml’lik tüplere aktarıldı; doku örnekleri hemen kullanılmayacaksa -80 °C’de muhafaza edildi. Parçalanmış dokulardan, ticari olarak temin edilen “TriPure RNA İzolasyon Solüsyonu” yardımı ile, üretici firmanın protokolüne göre Total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İşlemin akışı Tablo 3-2’de özetlenmiştir.

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlüğü, agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelendi. Bu amaçla, 0,5X TBE tamponu ile % 1,5’lik agaroz jel ile hazırlandı ve RNA bantlarının jelde izlenebilmesi için 0,5 mg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Jel, polimerleştikten sonra 0,5X TBE tamponu içeren elektroforez tankına alınıp, örnekler, son derişimi 1X olacak şekilde yükleme tamponu ile jele yüklendi ve 160 voltluk elektrik akımında 3 cm yürütülerek UV ışık altında incelendi.

Elde edilen RNA örneklerinin miktar tayini spektrofotometrik olarak NanoDrop cihazında yapıldı. Örneklerin saflık dereceleri 260/280 nm dalga boyunda incelendi. İzole edilen RNA’ların saflıkları 1,7-1,9 aralığında ölçüldü ve örnekler cDNA sentezi için kullanılmaya kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

Tablo 3-2: Dokudan total RNA izolasyonu

1.	Doku parçası (20 mg) üzerine 1 ml RNA solüsyonu eklendi ve pipet yardımı ile homojenize edildi.
2.	Lizat 1.5 ml’lik tüplere aktarıldı ve oda sıcaklığında 25 dk. inkübe edildi. Karışımın üzerine 200 µl kloroform eklenerek oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi.
3.	Karışım, 15 dk. süre ile +4°C’de 12000g’de santrifüjlendi.
4.	Üst faz toplanarak yeni tüpe aktarıldı. Üzerine 600µl propanol eklendi.

5. Oda sıcaklığında 10 dk'lık inkübasyonun ardından, santrifüjleme yapıldı (+4°C'de 12000g' de 10 dk.).
6. Üst faz atıldı; RNA içeren pellet üzerine 1 ml % 75' lik soğuk (-20 °C) etanol eklendi. Vorteksleme işlemini takiben, örnek 5 dk. boyunca +4°C'de 7500g'de santrifüjlendi.
7. Etanol uzaklaştırıldı; pellet oda ısısında kurutuldu.
8. RNA pelleti üzerine, 30 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 56 °C'de 15 dk. boyunca çözünmesi sağlandı.
9. İzole edilen RNA -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Gen ifade analizinde, RNA izolasyonunu takip eden işlem cDNA sentezidir. Bu amaç için ticari olarak temin edilen “RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti” kullanıldı. İşlem, üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi: 6 µl total RNA (yaklaşık 200ng/µl olacak şekilde seyreltildi), 0,2 ml'lik PZR tüplerine aktarıldı. Bunu takiben, Tablo 3-3'te gösterilen reaksiyon bileşenleri sırasıyla eklendi; karışımı içeren tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi. cDNA sentezi reaksiyon koşulları 105 °C'de 5 dk., 25 °C'de 5 dk., 42 °C'de 60 dk ve 70 °C'de 5 dk. şeklinde idi. Elde edilen cDNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere 20 °C'de muhafaza edildiler.

Tablo 3-3: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek
5X Reaksiyon Tamponu	4 µl
dNTP miks (10mM)	2 µl
rRNasin Ribonükleazin (20u/ ml)	1 µl
Reverse Transkriptaz (200u/ml)	1 µl
Random Primer	1 µl
Distile su	6 µl
Toplam	20 µl

3.2.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)

Meme kanserli hastaların tümör ve eşlenik normal dokularında H4K20me3 modifikasyonunun gerçekleştiren metiltransferazı kodlayan SUV420H2 geninin ifade düzeyleri nicel olarak incelendi. Analiz, laboratuvarımızda bulunan LC480 PZR platformunda gerçekleştirildi SUV420H2 ifade düzeyi “yarı-nicel” (“semi-quantitative”) olarak ölçüldü. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni, SUV420H2 ifade düzeyinin normalizasyonunda referans gen olarak kullanıldı. Gerçek zamanlı PZR’de floresan molekül olarak SYBR Green seçildi.

GZ-PZR bileşenleri Tablo 3-4’de gösterilmiştir. Tablo 3-5’de ise SUV420H2 [12] ve GAPDH genlerini çoğaltmak için seçilen primer dizileri yer almaktadır.

Tablo 3-4: GZ-PZR bileşenleri

GT-PZR Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek (µl)
10X LightCycler® 480 SYBR Green I Master	10 µl
Primer F (30 nM)	0,2 µl
Primer R (30 nM)	0,2 µl
Distile su	6,6 µl
cDNA	3 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3-5: Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen Adı	Primer Dizileri
SUV420H2	F- 5'-GGCCCGCTACTTCCAGAG-3'
	R- 5'-GCAGGATGGTAAAGCCACTT-3'
GAPDH	F- 5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3'
	R- 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'

GZ-PZR işleminde, seçilen primerlerin erime sıcaklıkları (T_m) ve kullanılan SYBR Green kitinin talimatına göre belirlenen reaksiyon koşulları Tablo 3-6’da

gösterilmektedir. GZ-PZR, amplifikasyon aşamasını takiben Erime Eğrisi Analizi (“Melting Curve Analysis”) içermektedir. Bunun amacı, GZ-PZR’de primer dimerleri veya özgül olmayan ürünlerin dışlanarak istenilen uzunluktaki ürünlerin oluştuğunun teyit edilmesidir.

Tablo 3-6: GZ-PZR reaksiyon koşulları.

Pre-inkübasyon	95 °C	5 dk.	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	10 sn.	45 döngü
Primer bağlanma	60 °C	20 sn.	
Uzama	72 °C	30 sn.	
Erime Eğrisi Analizi	95 °C	1 sn.	1 döngü
	65 °C	15 sn.	
	95 °C	devamlı	
Soğuma	40 °C	10 sn.	1 döngü

SUV420H2 geninin meme tümörü ve normal dokulardaki ifade düzeyi yarı-nicel olarak göreceli hesaplandı. Bu yaklaşımda, GZ-PZR reaksiyonunda, hedef gen ve referans gen için, cihazın ölçebildiği florasan düzeyinin eşik değerini aşan döngü olan Ct (“cycle threshold”) değerleri kullanılarak her bir örnekteki göreceli ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(C_{thedef} - C_{trefers})}$ formülüne göre hesaplandı. Tüm örneklerin ölçülmesini takiben, elde edilen göreceli değerler gruplar arasında (tümör vs kontrol) istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

3.2.4. Tümör ve Eşlenik Normal Dokulardan Histon Proteinlerinin İzolasyonu

Tez çalışmasında, SUV420H2 gen ifadesinin incelenmesi dışında, bu metiltransferazın katalizlediği H4K20me3 modifikasyonun düzeyi incelendi. Bu amaçla, öncelikle dokulardan histon proteinlerinin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. İşlem ticari olarak temin edilen ‘EpiQuik Total Histone Extraction Kit’ yardımı ile yapıldı. Öncelikle, yukarıda anlatılan RNA izolasyonu işlemi sırasında yapıldığı gibi doku lizatları oluşturuldu. 2 ml’lik tüplere alınan doku lizatının üzerine 1 ml, seyreltilmiş (1x) lizis tamponu eklendi ve lizat, +4 °C 10,000 rpm’de 1 dk. santrifüjlendi. Üst sıvı fazın uzaklaştırılmasını takiben, hücre çekirdeklerini içeren pellet üzerine 200 µl lizis tamponu eklenerek 30 dk. boyunca buz üzerinde inkübasyon yapıldı. Bunu, yeniden

santrifüjleme aşaması (+4 °C’de 12,000 rpm’de 5 dk.) takip etti. Histon proteinlerini içeren üst fazı başka tüpe aktarılarak 60 µl Balance-DTT tamponu eklendi.

Elde edilen histon proteinlerinin miktar tayinleri spektrofotometrik olarak 280 nm dalga boyunda ölçüldü. Standard olarak BSA (Fötal Sığır Serum) kullanıldı. Örneklerin saflık dereceleri 260/280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ile belirlendi. Elde edilen ürünler alikot edilerek daha sonra kullanılmak üzere -80 °C’ de muhafaza edildi.

3.2.5. Doku Örneklerinde H4K20me3 Düzeyinin Belirlenmesi

Dokulardan ekstraksiyonu yapılan histon proteinleri, H4K20me3 düzeyinin ölçülmesi için kullanıldı. H4K20me3 düzeyi ELİZA-benzeri ölçüm yapan ticari olarak temin edilen ‘EpiQuik Global Tri-Methylation Histone H4- K20 Quantification Kit’ ile gerçekleştirildi. İşlemler kitin protokolüne göre yapıldı. Buna göre, ELİZA plakının her bir kuyucuğuna 50 µl C2 solüsyonu pipetlendi; üzerine izole edilen histon proteini (200 ng) ilave edildi. Standard kuyucuklarına, 1 ml C2 ile seyreltilmiş Standard proteinden 6 farklı konsantrasyon (1-100 ng/ml) aktarıldı. Parafilm ile kapatılan plak oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı fazla uzaklaştırılarak, kuyucuklar 3 defa yıkandı. Her bir kuyucuğa, 50 µl Deteksiyon solüsyonu eklenerek oda ısısındaki orbital karıştırıcı üzerinde 100 rpm’de 1 saat inkübe edildi. Sıvı kısımlar uzaklaştırılarak kuyucuklar 6 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bunun akabinde, her bir kuyucuğa enzim içeren 100 µl C4 eklendi ve oda ısısında 10 dk. karanlıkta inkübe edildi. Standard kuyucuklardaki maviye dönen renk değişimi izlendi. Bu aşamadan sonra her kuyucuğa 50 µl C5 solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Örneklerin absorbans değerleri 15 dk. içinde 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucusunda okutuldu. Ölçülen absorbans değerleri histon H4K20me3 miktarı ile doğru orantılı olduğundan, elde edilen sayısal değerler histon modifikasyonunun göreceli değeri olarak kabul edildi. Her bir örnek çift olarak çalışıldı.

3.2.6. Hücre Kültürü

Tezin ikinci aşaması, deneysel bir çalışma niteliğindedir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında SUV420H2 geninin susturulmasının, meme kanseri hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkileri araştırıldı.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin büyütülmeleri için, literatürde önerildiği üzere DMEM besiyeri kullanıldı. DMEM besiyeri amino asitler, vitaminler, tuzlar, ve glukoz içerir. DMEM besiyeri içerisine % 10 fetal sığır serumu (FBS) ve % 1 penisilin/streptomisin eklenerek çalışma besiyeri oluşturuldu. Hücreler, standart hücre kültür koşulları olan 37 °C ısı ve % 5 CO₂'li ortamda büyütüldüler; kültür kabının yaklaşık % 80'lik kısmını kapladığında pasajlama işlemi yapıldı. Hücre sayımı, Thoma Lamı olarak adlandırılan, 1 mm²'lik alanı ve 0,1 mm derinliğe sahip, üzerinde üçlü çizgilerle ayrılmış, 16 büyük kareden oluşan yivlere sahip olan lamlar yardımı ile yapıldı.

3.2.7. Hücrelerin siRNA Oligonükleotidleri ile Transfeksiyonu

RNA interferans (RNAi), ökaryotlarda korunmuş, doğal gen düzenleyici mekanizma olarak görev yapan bir yoldur ve deneysel çalışmalarda hedef genlerin susturulması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [74]. Gen susturma çalışmalarında, yaklaşık olarak 21 nükleotid uzunluğunda RNA dupleksleri (siRNA'lar) kullanılır. siRNA oligonükleotidleri, hücreye transfekte edildiğinde RNAi mekanizmasında yer alan bileşenler tarafından tanınır. "RNA tarafından uyarılan susturucu kompleks" (RISC) ile siRNA'nın antisens iplikçisi etkileşir. Böylece aktifleşen protein ve nükleik asit kompleksi, hedef mRNA dizisine bağlanır ve onun yıkımına yol açar [75].

Tez çalışmasında, SUV420H2 genine özgü, genin 4 farklı kodlayan bölgesini hedef alan ve ticari olarak temin edilen siRNA oligonükleotidleri (Dharmacon SMARTpool siRNA) kullanıldı. Negatif kontrol olarak "scramble" siRNA (siScrb1) olarak adlandırılan ve herhangi bir genomik bölgeyi hedeflemeyen siRNA seçildi (Tablo 3-7).

Tablo 3-7: Çalışmada kullanılan siRNA dizileri

siRNA (SUV420H2)	5'-GUGAAGGUGCUCCGGGACA-3' 5'-GCGGUGAAGAGCUGUGACA-3' 5'-CGACAGAGUGACAGCACGA- 3' 5'-CUCAGCGCUGGAAACUUU- 3'
siScrbl	5'- GCACGCUCCUACGAAUGCUAGUAAA- 3'

Transfeksiyon deneyleri için yaklaşık 200.000 hücre kullanıldı. Hücreler, 35x10 mm boyutundaki petri kaplarına antibiyotik içermeyen besiyeri ile ekildi ve standart hücre kültürü koşullarında büyümeleri sağlandı; 40 sa. sonra transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon ajanı olarak, çalışmalarda sıkça kullanılan katyonik lipid bazlı ticari transfeksiyon ajanı olan Lipofectamine 2000 seçildi. Transfeksiyon karışımı, Opti-MEM besiyeri, transfeksiyon ajanı ve siRNA oligonükleotidi (100 nM siSUV420H2 veya kontrol siScrbl) içerir. Hazırlanan transfeksiyon karışımı (toplam hacim 200 µL) oda ısısında 20 dk. bekletildi. Bu aşama lipozomların oluşması ve siRNA enkapsülasyonu için gereklidir. Bunu takiben, transfeksiyon karışımı hücrelerin üzerine eklendi ve inkübatöre kaldırılarak 6 sa. inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, besiyeri uzaklaştırıldı ve yeni hazırlanan % 1 antibiyotik içeren normal besiyeri eklendi. Hücreler standart kültür koşullarında 48-72 sa. boyunca büyütüldüler. Sürenin tamamlanması ile petri kaplarındaki hücreler hasat edildi ve sonraki işlemler için -80 °C'de muhafaza edildi.

Transfeksiyon yapılan hücrelerde SUV420H2 gen ifadesi yukarıda anlatıldığı gibi incelendi. Bunun için hücrelerden total RNA izole edildi, bunu cDNA sentezi izledi. SUV420H2 gen ifadesi yarı-nicel olarak GZ-PZR'de belirlendi.

3.2.8. Hücre Çoğalmasının Gerçek Zamanlı Analizi

Hücre çoğalmasının gerçek zamanlı analizi, kültürdeki hücrelerin çoğalma kinetiklerini takip edebilmemizi sağlamaktadır. Bu analizler için laboratuvarımızda bulunan "iCELLigence" Sistemi kullanıldı. Hücrelerin elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin ölçülmesi temeline dayanan bu sistemde mikroelektrodlar

elektiriksel empedansı ölçerler. Bu sistemde “E- Plaka” adı verilen, alt yüzeyinde altın mikroelektrodları olan ve 8 kuyudan oluşan plaka kullanıldı. Bu plakanın yüzeyine tutunan hücrelerin sayısındaki değişiklikler ölçülen direnç ile doğru orantılıdır. Böylece hücrelerin çoğalma özellikleri devamlı olarak kaydedilerek veriler bilgisayar ortamına aktarılır ve hücre çoğalması, gerçek-zamanlı ve nicel olarak ölçülür.

Tez çalışmasında, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde SUV420H2 geninin siRNA ile susturulmasının hücre çoğalmasına olan etkileri gerçek-zamanlı analiz ile değerlendirildi. E-Plakaya 100 µL hücre içermeyen besiyeri aktarılarak cihazda bazal ölçüm yapıldı. E-plakanın her bir kuyucuğuna 500 µL besiyeri içinde yaklaşık 20.000 hücre ekildi. E-plaka iCELLigence cihazına yerleştirildi ve hücreler normal kültür koşullarında büyümeye bırakıldılar. Cihaz her 30 dk.’da bir ölçüm yapacak şekilde ayarlandı. 40 sa. sonunda daha önce anlatıldığı gibi siRNA transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi ve transfeksiyon sonrası 48- 72 sa. boyunca hücrelerin çoğalma kinetikleri takip edilerek deney tamamlandı.

3.2.9. Klonojenik Test

Klonojenik test, kültür hücrelerine uygulanan sitotoksik ajanların hücre sağkalımına olan etkisini belirlemek amacıyla yapılan in vitro bir yaklaşımdır ve hücrelerin kültür koşullarında koloni oluşturabilme kapasiteleri araştırılır. Tez çalışmasında, meme kanseri hücrelerinde SUV420H2 geninin susturulmasının hücre sağkalımına etkisinin koloni oluşturma kapasitesi üzerinden araştırmak amacıyla bu test uygulandı [76], Bu amaçla, 6 kuyucuklu kültür plaklarının her bir kuyucuğuna 10.000 hücre ekildi. Üç farklı hücre grubu oluşturuldu: 1-hiç muamele edilmeyen hücreler, 2-siRNA ile transfekte edilen hücreler ve 3- kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler. Transfeksiyon işlemi yukarıda anlatıldığı gibi yapıldı ve hücreler 10 gün süreyle standart kültür koşullarında büyütüldüler. Süre sonunda kaplardan besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Oda sıcaklığında metanol (% 100) ile 20 dk. fikse edilen hücreler, bu işlemin ardından kristal viyole ile 5 dk. boyunca boyandılar. Yıkama sonrası, plaklar gece boyunca kurumaya bırakıldı. Hücreler ertesi gün mikroskop altında sayılarak, SUV420H2 geninin gen susturulmasının etkisi, koloni sayısı üzerinden belirlendi.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Petri başına düşen ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

3.2.10. İstatistiksel Analizler

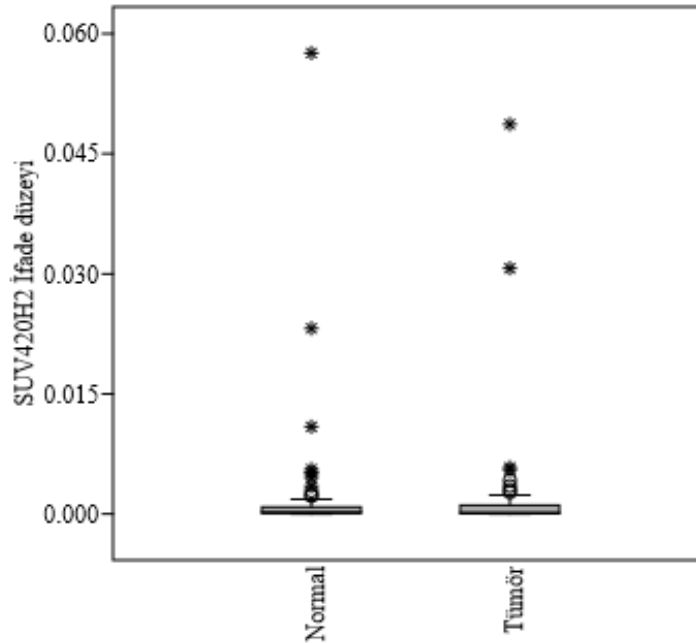
Doku örneklerinde yapılan gen ekspresyon ve histon metilasyonu ölçüm sonuçları (normal vs. tümör) bağımlı T-testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen verilerin hastalık alt gruplarındaki karşılaştırmaları ise varyans analizi ile yapıldı. Sağkalım analizleri için Kaplan-Meier testi kullanıldı. Çalışmada, gen ekspresyonu ve histon metilasyon düzeyleri bar grafikleri ile gösterilmiştir. Grafiklerde parametrenin dağılımı, % 75'lik yüzdeliği ve ortanca değerler gösterilmekte; ayrıca uç değerler yer almaktadır. Analizler SPSS version 18 ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Meme Kanserli Hastaların Tümör ve Eşlenik Normal Dokularında SUV420H2 Gen İfadesinin İncelenmesi

Tez çalışmasında, SUV420H2 gen ifadesinin incelenmesi amacıyla, 102 meme kanserli hastanın tümör ve eşlenik normal dokularından total RNA izole edildi. Elde edilen RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesini takiben, SUV420H2 geninin ifade düzeyi, nicel GZ-PZR ile göreceli olarak belirlendi. Hastaların bir kısmında, eşlenik normal dokulardan elde edilen RNA miktarlarının düşük olması nedeniyle, GZ-PZR'da referans gen için döngü eşik değerinin (Ct, "threshold") >32 olduğu gözlemlendi. Bu hastalar (n=20), tümör dokusu-eşlenik normal doku karşılaştırmasına dahil edilmediler. Böylece, SUV420H2 gen ifade düzeyi 102 yerine 82 hastada tümör dokuları ile eşlenik normal dokularda karşılaştırıldı. Diğer taraftan, SUV420H2 gen ifadesinin tümörün klinik özellikler ile ilişkilendirilmesi 102 hastanın tümünde gerçekleştirildi.

SUV420H2 geninin ifade düzeyinin, hem normal hem de tümör dokularında, referans gen olarak kullanılan *GAPDH*'a kıyasla genel olarak oldukça düşük olduğu gözlemlendi. SUV420H2'nin ortalama göreceli ifade düzeyi normal dokularda 0,00017, tümör dokularında ise 0,00022 olarak belirlendi (Şekil 4-1); ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,91$).

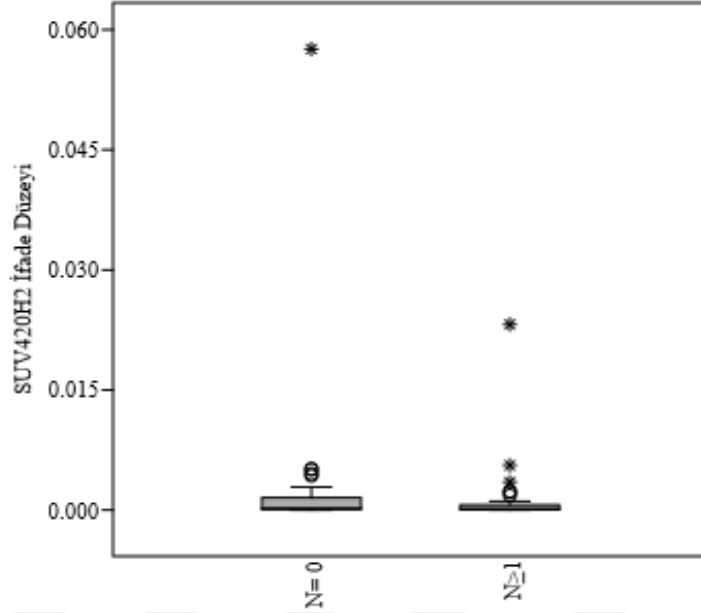


Şekil 4-1: SUV420H2 geninin tümör ve normal dokulardaki ifade düzeyi.

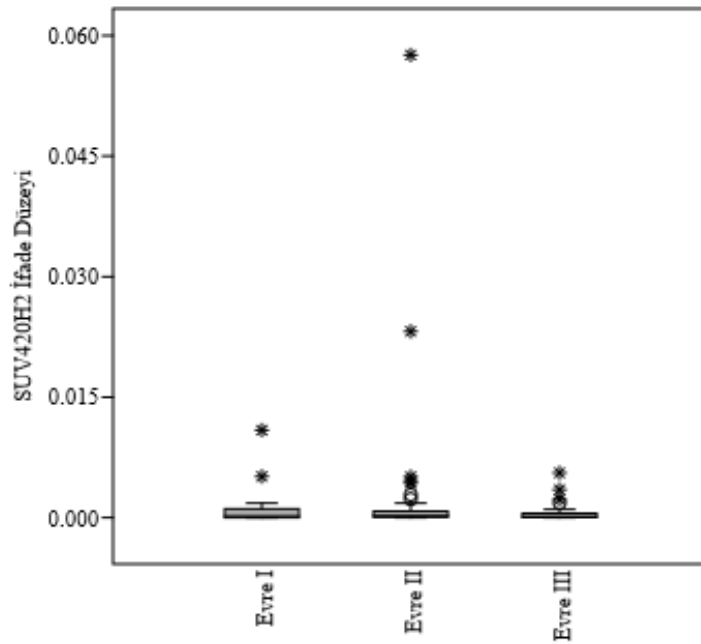
Tablo 4-1: SUV420H2 gen ifadesinin hastaların klinopatolojik özellikleri ile ilişkisi

DEĞİŞKENLER		n= 102	Ortanca SUV420H2	<i>p</i>
Yaş	≤ 53	52	0,000185	0,748
	>53	50	0,000231	
Menapozal durum	Premenopozal	36	0,000178	0,106
	Postmenopozal	66	0,000231	
Evre	I	19	0,000183	0,550
	II	52	0,000231	
	III	29	0,000139	
T evresi	T0- T2	94	0,0002	0,154
	T3- T4	8	0,00073	
N evresi	N = 0	42	0,000235	0,242
	N ≥ 1	58	0,000176	
Moleküler Alt tip	Luminal A	34	0,000193	0,191
	Luminal B	40	0,000269	
	Her2 benzeri	10	0,000177	
	Bazal benzeri	13	0,000034	
Histolojik Grad	1	7	0,00054	0,174
	2	62	0,000221	
	3	24	0,000209	
Nükleer Grad	1	2		0,997
	2	62	0,0002	
	3	34	0,000222	
ER	Pozitif	77	0,000226	0,249
	Negatif	20	0,000094	
PR	Pozitif	70	0,000268	0,047
	Negatif	27	0,000096	
HER2	Pozitif	24	0,000177	0,359
	Negatif	71	0,000226	

Tablo 4-1’de, SUV420H2 gen ifadesinin, hastaların yaş, menapozal durumu ve tümörlerin klinik özellikleri ile ilişkisi gösterilmektedir. Buna göre, SUV420H2 gen ifadesi ile tümörün büyüklüğü ($p= 0,154$) veya nod pozitifliği (Şekil 4-2; $p= 0,242$) arasında anlamlı ilişki saptanmadı.



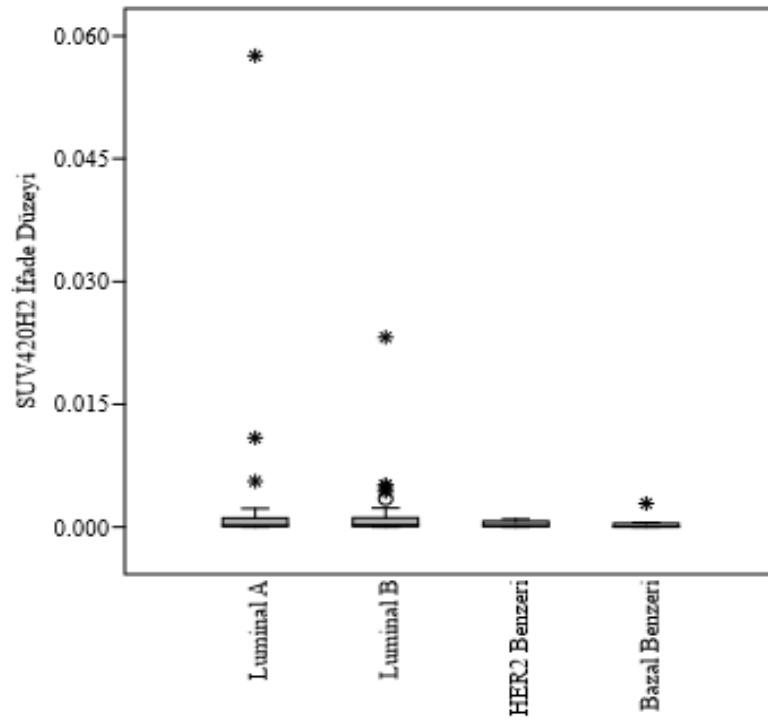
Şekil 4-2: SUV420H2 gen ifade düzeyinin nod durumu ile ilişkisi.



Şekil 4-3: SUV420H2 ifade düzeyinin evrelere göre dağılımı.

Şekil 4-3'de ise, SUV420H2 gen ifadesinin tümörün evresine göre dağılımı gösterilmektedir. Evre I, II ve III'de sırasıyla, 0,00018, 0,00023 ve 0,00014 olarak saptanan ortanca SUV420H2 gen ifade düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p= 0,550$).

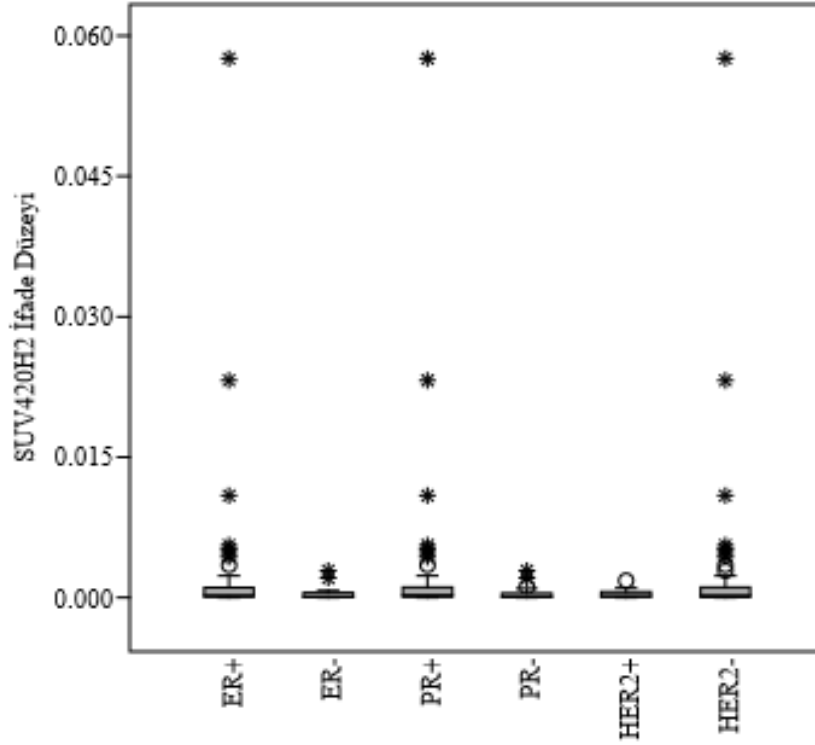
Meme tümörleri, moleküler özelliklerine göre Luminal A, Luminal B, HER-2 benzeri ve Bazal benzeri olarak 4 gruba ayrıldı (Tablo 4-1). Bu gruplarda, ortanca SUV420H2 ifade düzeyi sırasıyla, 0,00019, 0,00027, 0,00018 ve 0,00003 olarak ölçüldü (Şekil 4-4). Moleküler alt gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi ($p= 0,191$). Ancak, Bazal benzeri alt grupta ($n= 13$) SUV420H2 ekspresyonunun diğer gruplardan en az 6 kat daha düşük olduğu göze çarpmaktadır. Bu bulgunun daha büyük hasta gruplarında çalışılarak öneminin açığa kavuşturulması gerekmektedir.



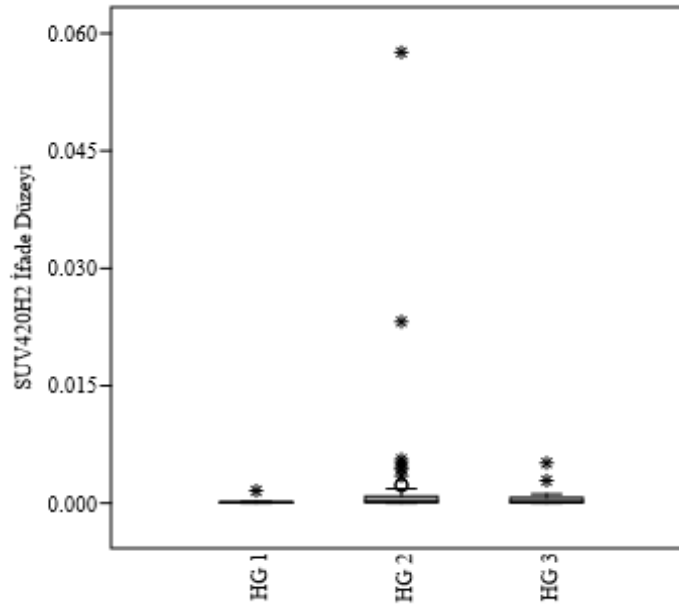
Şekil 4-4: SUV420H2 geni ifade düzeyinin moleküler alt tiplere göre dağılımı.

SUV420H2 gen ifadesi, hormon reseptör ekspresyonu ile HER2 ekspresyon durumuna göre değerlendirildiğinde (Şekil 4-5), tümörleri ER(+) olan hastalar ile ER(-) hastalar arasında yaklaşık 3 kat fark göze çarparken (ortanca değerler 0,000226 ve 0,000094) aradaki fark anlamlı bulunmadı ($p= 0,249$). Buna karşın, SUV420H2 gen

ifadesi, tümörleri PR(+) hastalarda (ortance değer 0,000268), PR(-) negatif olanlara göre yaklaşık 3 kat yüksek bulunurken, fark anlamlı idi ($p < 0,05$). SUV420H2 ifadesi HER2 ekspresyon durumuna göre farklılık göstermedi ($p = 0,359$).



Şekil 4-5: SUV420H2 gen ifade düzeyinin hormon reseptörleri ve HER2 ekspresyonuna göre dağılımı



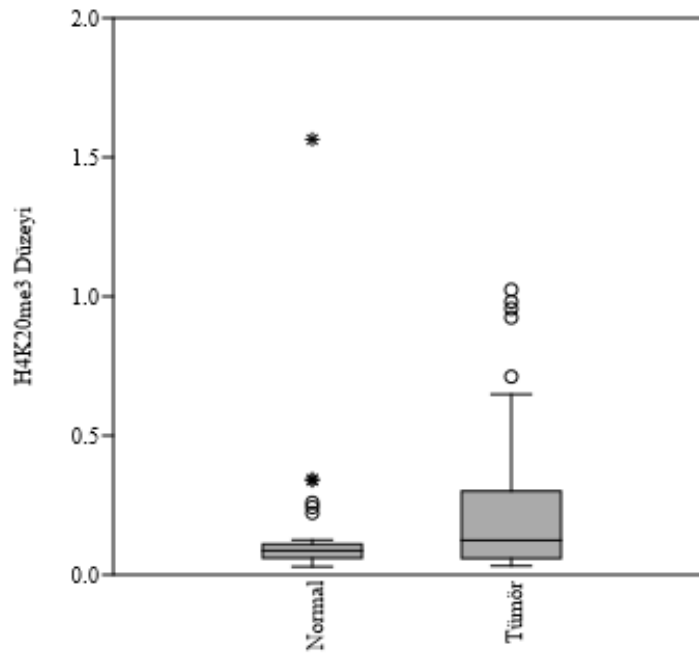
Şekil 4-6: SUV420H2 gen ifade düzeyinin histolojik grada göre dağılımı.

Şekil 4-6’da, SUV420H2 gen ifadesinin, tümörlerin histolojik gradlarına göre dağılımı gösterilmektedir. SUV420H2 ile histolojik grad arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p= 0,174$).

4.2. Meme Kanserli Hastaların Tümör ve Eşlenik Normal Dokularında Histon H4 Lizin 20 Üçlü Metillenme (H4K20me3) Düzeyinin İncelenmesi

Meme kanserli hastaların tümör ve eşlenik normal dokularında SUV420H2 gen ifadesinin incelenmesini takiben, tez çalışmasında, bu metil transferaz tarafından katalizlenen H4K20me3 düzeyinin incelenmesi amaçlandı. SUV420H2 gen ifadesi, 102 hastada çalışılırken, tez projesinin bütçesi nedeniyle, H4K20me3 düzeyi sadece 44 hastada (normal eşlenik doku ve tümör dokuları) çalışılabildi. Bu örnekler rastgele örneklem yaklaşımı ile seçildi. Bu amaçla, dokulardan histon ekstraksiyonu yapıldı; H4K20me3 düzeyi ELİZA-benzeri yöntemle ölçüldü.

H4K20me3 miktarının meme tümör dokuları ile eşlenik normal dokulardaki dağılımı Şekil 4-7’ deki grafikte gösterilmektedir. Tümör dokularında göreceli H4K20me3 miktarı, eşlenik normal dokulardaki miktardan anlamlı şekilde daha yüksek bulundu (ortanca değerler sırasıyla 0,124 ve 0,087; $p= 0,001$).

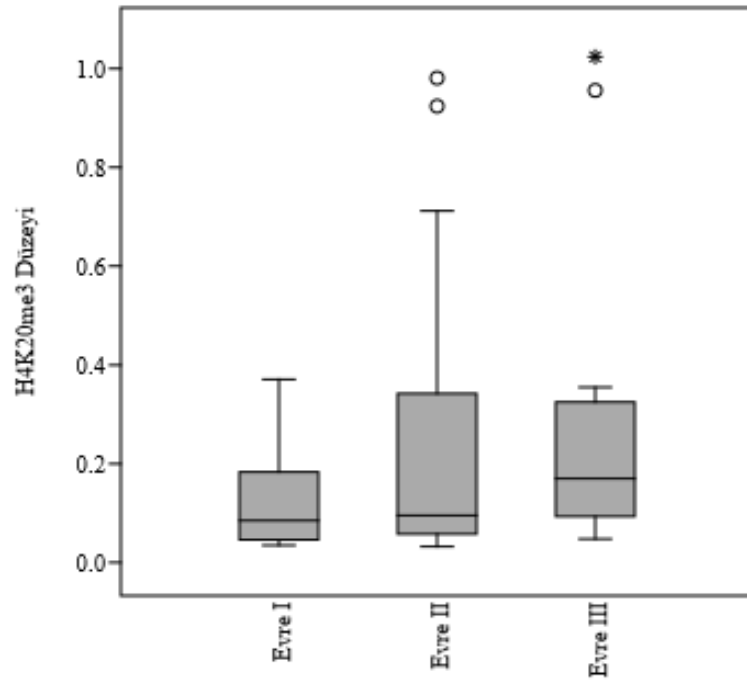


Şekil 4-7: Meme dokularında H4K20me3 düzeyinin dağılımı.

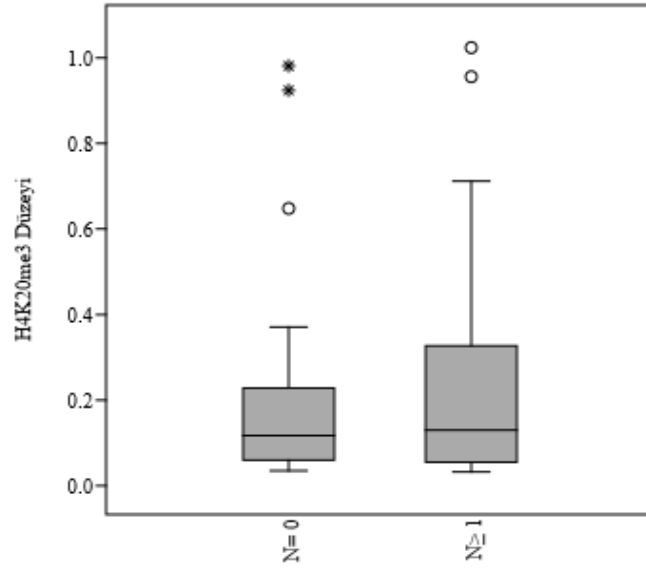
Tablo 4-2: H4K20me3 miktarı ile hastaların klinopatolojik özelliklerinin ilişkisi

DEĞİŞKENLER		n= 44	Ortanca H4K20me3	<i>p</i>
Yaş	≤ 53	23	0,092	<i>p</i> = 0,372
	>53	21	0,13	
Menstrüel durum	Premenopozal	14	0,074	<i>p</i> = 0,074
	Postmenopozal	30	0,132	
Evre	I	7	0,085	<i>p</i> =0,332
	II	22	0,095	
	III	15	0,17	
T evresi	T0- T2	41	0,12	<i>p</i> = 0,861
	T3- T4	3	0,17	
N evresi	N = 0	19	0,117	<i>p</i> = 0,991
	N ≥ 1	25	0,13	
Moleküler Alt tip	Luminal A	15	0,129	<i>p</i> = 0,353
	Luminal B	20	0,106	
	Her-2 benzeri	2	0,072	
	Bazal benzeri	6	0,368	
Histolojik Grad	1	3	0,048	<i>p</i> = 0,320
	2	25	0,129	
	3	14	0,124	
Nükleer Grad	1	1		<i>p</i> = 0,584
	2	25	0,099	
	3	16	0,125	
ER	Pozitif	36	0,124	<i>p</i> = 0,417
	Negatif	7	0,355	
PR	Pozitif	33	0,099	<i>p</i> = 0,273
	Negatif	9	0,137	
HER2	Pozitif	8	0,057	<i>p</i> = 0,289
	Negatif	34	0,13	

Meme tümör dokularındaki H4K20me3 düzeyleri ile hastaların klinopatolojik özellikleri arasındaki ilişki Tablo 4-2 özetlenmiştir. H4K20me3 miktarının evreye göre dağılımına göz atıldığında (Şekil 4-8), H4K20me3 miktarının evre III'te (ortanca değer 0,17), erken evrelere göre (ortanca değerler 0,085 ve 0,095) belirgin şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir. Ancak, muhtemelen alt gruplardaki örnek sayısının düşük olması nedeniyle, H4K20me3 miktarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p= 0,332$).

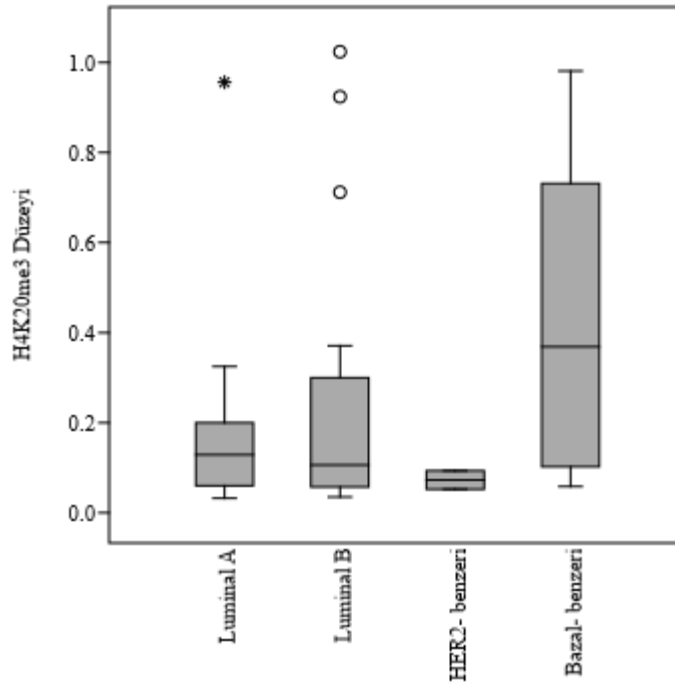


Şekil 4-8: H4K20me3 düzeyinin tümör evresine göre dağılımı.



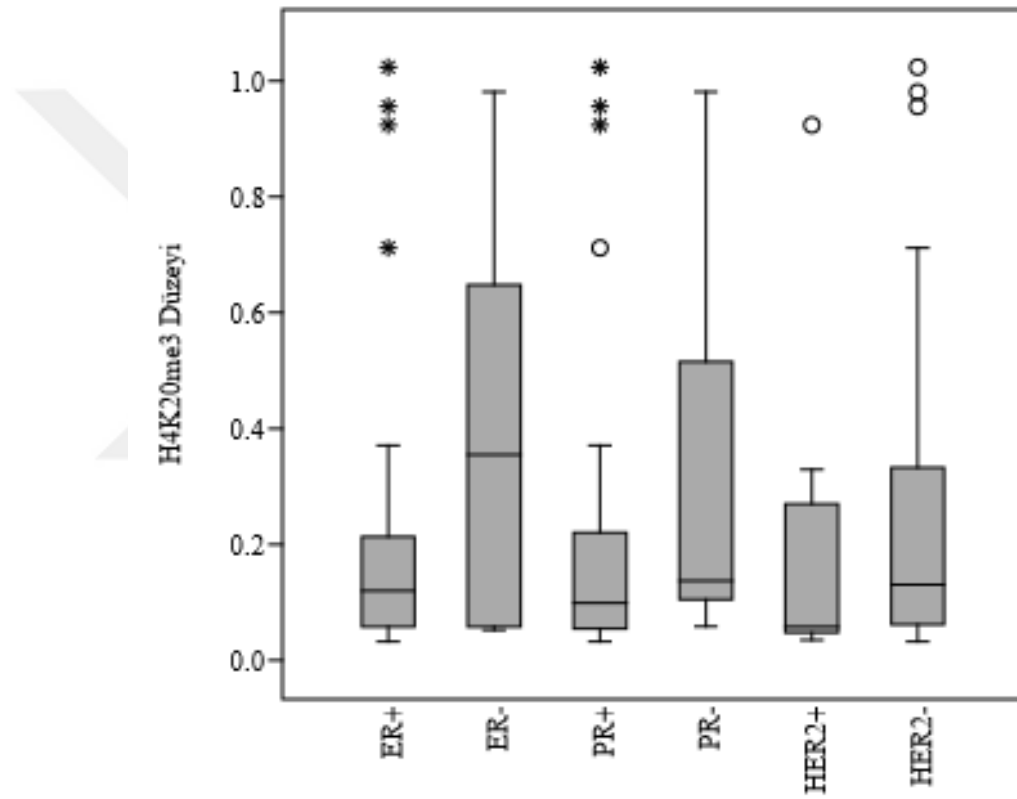
Şekil 4-9: Lenf nodu tutulumu ile H4K20me3 düzeyinin ilişkisi.

H4K20me3 düzeyi, lenf nodu negatif olan hastalar ile pozitif tutulumu olan hastalar arasında karşılaştırıldığında (ortanca değerler 0,117 ve 0,13), anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p= 0,991$) (Şekil 4-9). Meme tümörlerinin moleküler alt tiplerine göre H4K20me3 düzeyi incelendiğinde ise, en yüksek histon metillenmesi saptanan grup Bazal-benzeri (ortanca değer 0,368) olmuştur (Şekil 4-10). Ancak gruplar arasında farklar konusunda istatistiksel anlamlılığa ulaşılamadı ($p= 0,353$).



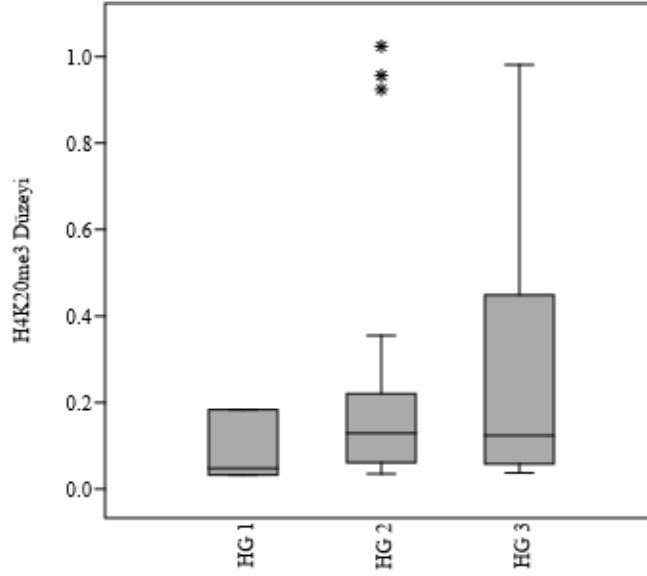
Şekil 4-10: Moleküler alt tiplere göre H4K20me3 düzeyinin dağılımı.

Tümör dokularındaki H4K20me3 miktarının, tümörlerin hormon reseptör ve HER ekspresyon durumuna göre değerlendirilmesi Şekil 4-11’ de yer almaktadır. ER(+) olan hastalarda (ortanca değer 0,124), ER(-) negatif olanlara göre (ortanca 0,355) H4K20me3 miktarı daha düşük olmakla birlikte fark anlamlı değildi ($p= 0,417$). Benzer şekilde HER2 (+) olan hastalarda H4K20me3 miktarı HER2 (-) olanlara göre daha düşük gözükmele birlikte anlamlılık saptanmadı (ortanca 0,57 vs 0,13; $p= 0,289$) (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: Hormon reseptörleri ve HER2 ekspresyon durumuna göre H4K20me3 düzeyleri.

Meme tümörlerinin histolojik gradlarına göre H4K20me3 miktarları Şekil 4-12’de gösterilmektedir. Grad 1 grupta çok az hasta bulunmaktadır. Grad 2 ve 3 tümörler arasında H4K20me3 miktarının çok benzer olduğu gözle çarpmaktadır ($p= 0,320$).



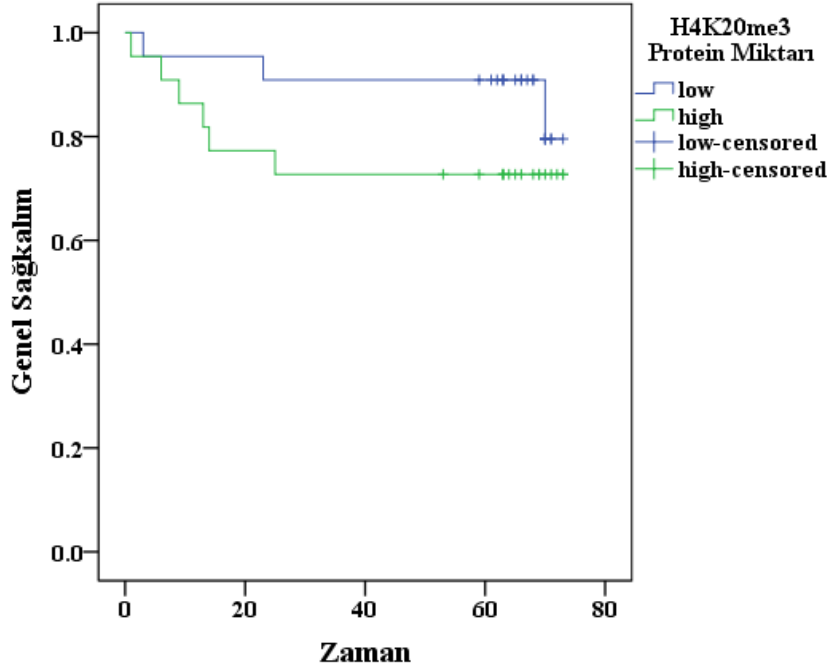
Şekil 4-12: Histolojik grada göre H4K20me3 düzeyinin dağılımı.

4.3.Meme Kanserli Hastalarda SUV420H2 Gen İfadesi ve Histon Metilasyonunun (H4K20me3) Prognostik Değeri

Tez çalışmasında incelenen paramterelerin meme kanserinde prognostik değeri de incelendi. SUV420H2 gen ifadesinin genel sağkalım ile ilişkisi 102 hastada, H4K20me3’ün önemi ise 44 hastada değerlendirildi. Hastaların tanı almasından itibaren en uzun takip süresi 75 ay idi. Her iki parametre için ortanca değerlerden daha küçük ölçüm değerlerine sahip hastalar (“düşük”) ile büyük olan hastalar (“yüksek”) arasında sağkalım süreleri karşılaştırıldı. SUV420H2 ekspresyonunun düşük olduğu grupta 51 hastadan 7’si hayatını kaybederken, yüksek olan grupta durum benzer idi (8/51). Ortanca yaşam süreleri 63 ve 65 ay olarak bulundu ($p= 0,734$). Bu bulgular SUV420H2 gen ifadesinin prognostik değerinin olmadığına işaret etmektedir.

Benzer analiz H4K20me3 için yapıldığında, H4K20me3 miktarı düşük olan grupta 22 hastadan 3’ü yaşamını yitirirken, ‘H4K20me3-yüksek’ grupta 22 hastadan 6’sının öldüğü görülmektedir. Her iki gruptaki ortanca yaşam süreleri 67,5 ve 63,5 ay

olarak gerçekleşti ($p= 0,15$; Şekil 4-13). H4K20me3 düzeyi incelenen hasta sayısının düşük olması, analizin istatistiksel gücünü etkilemiş olabileceğinden, daha yüksek hasta serilerinde H4K20me3'ün prognostik değerinin araştırılması gerekmektedir.



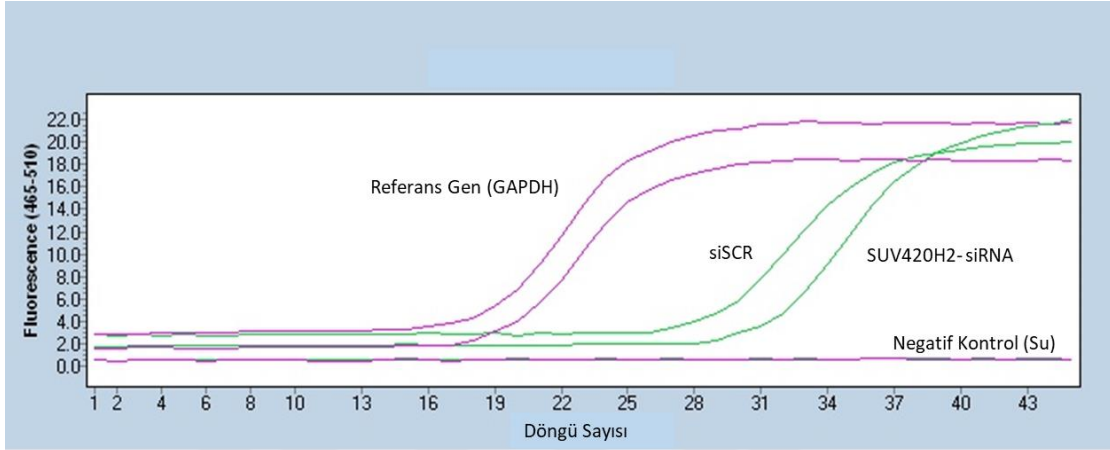
Şekil 4-13: Tümör dokularında H4K20me3 düzeyinin genel sağkalımla ilişkisi.

4.4. Kültür Hücrelerinde SUV420H2 Geninin siRNA Oligonükleotidleri ile Baskılanması

Tez çalışmasının 2. aşamasını deneysel kısım oluşturmaktadır. Meme kanseri hücrelerinde SUV420H2 geninin susturulmasının meme kanseri hücrelerinin sağ kalımları üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu aşamanın ilk bölümünü, hedef genin, siRNA ile etkin şekilde baskılanmasının optimizasyonunu içeren çalışmalar oluşturmuştur.

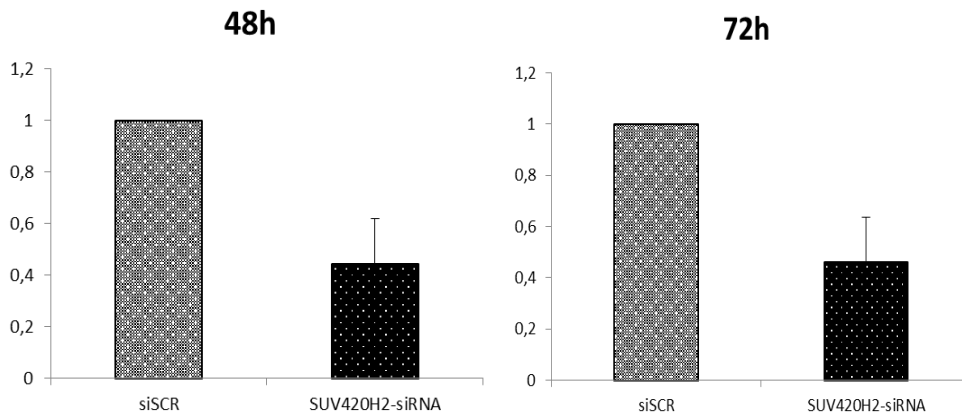
siRNA oligonükleotidleri ile gen baskılanması çalışmasının ayrıntıları, Bölüm 3.2.1'de verilmiştir. Hücreler, kontrol siRNA (siSCR) ve SUV420H2-siRNA ile transfekte edildi ve transfeksiyondan 48 sa. veya 72 sa. sonra hasat edildiler. Hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası, SUV420H2 geni ifadesi GZ-PZR ile incelendi. Gen susturma etkinliği açısından 48 saatlik inkübasyonun daha

uygun oluşu gösterildi. Şekil 4-14'te, yapılan bir baskılanma deney sonrası, GZ-PZR'de referans gen ve SUV420H2'nin çoğalma eğrileri gösterilmektedir. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücelere kıyasla, hedef genin susturulduğu MCF-7 hücrelerinde, SUV420H2 gen ifadesindeki azalma dikkat çekmektedir.



Şekil 4-14: siRNA oligonükleotidleri ile transfekte edilen MCF-7 hücrelerinde GAPDH ve SUV420H2 genlerinin çoğalma eğrileri.

siRNA ile gen susturma deneylerinin optimizasyonu sonrası, birbirinden bağımsız 2 deney yapılarak, SUV420H2 geninin ne oranda susturulduğu incelendi. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücelerdeki ifade düzeyi "1" kabul edilerek, SUV420H2-siRNA transfeksiyonu yapılan hücelerdeki ortalama ifade düzeyi hesaplandı. Buna göre, SUV420H2 geninin ifadesinin ortalama % 55 oranında baskılandığı saptandı (Şekil 4-14).

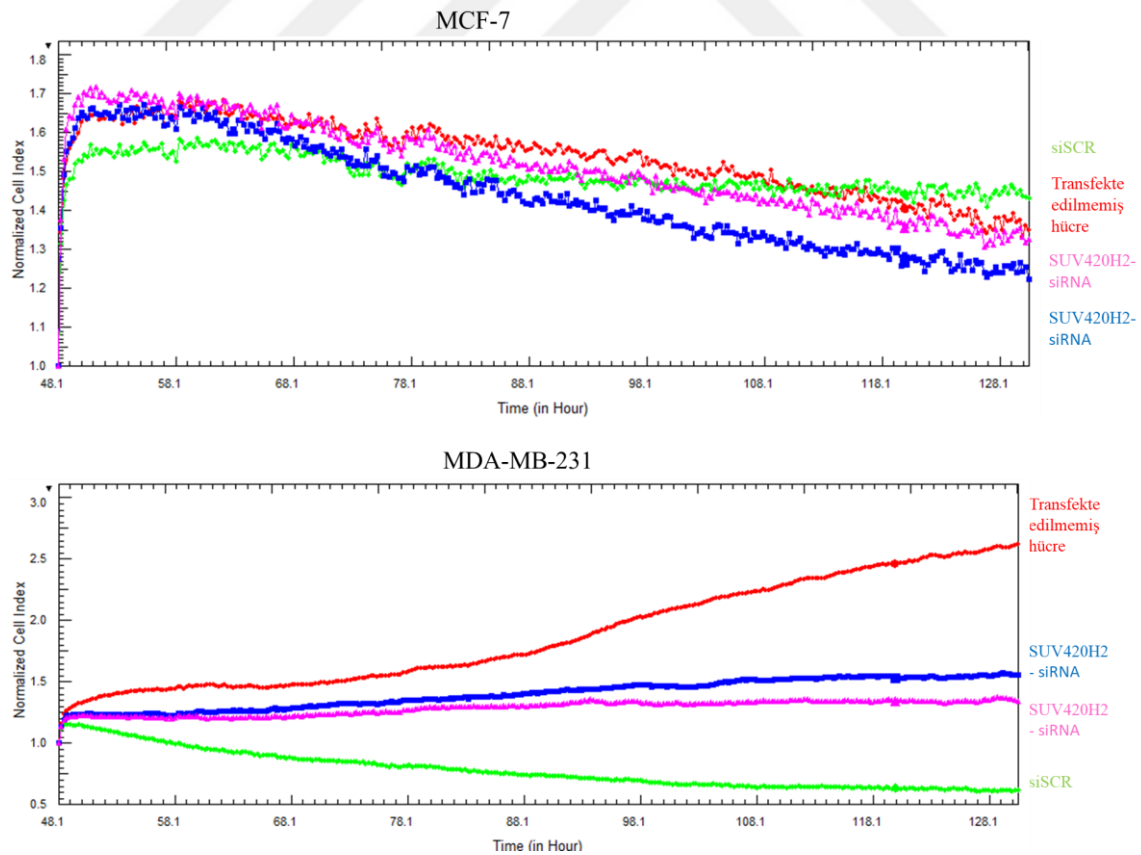


Şekil 4-15: siRNA ile transfekte edilen hücelerde SUV420H2 geninin ifade düzeyi.

4.5. SUV420H2 Baskılanmasının Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

SUV420H2 geninin baskılanmasının etkileri, MCF-7 ve MDA-MB-231 olmak üzere iki farklı hücre soyunda incelendi. Hücrelerin çoğalma özellikleri iCELLigence cihazında gerçek-zamanlı olarak takip edildi (Şekil 4-15).

Şekil 4-16' da görülebileceği üzere, MCF-7 soyunda hücrelerin etkin şekilde çoğalmadığı göze çarpmakta ve hücre sayısının, transfeksiyon yapılmayan grupta bile zamanla azaldığı görülmektedir. Buna karşın, transfeksiyon yapılmayan MDA-MB-231 hücrelerinin etkin şekilde çoğaldığı görülmektedir. Diğer taraftan, transfeksiyon işleminin MDA-MB-231 hücrelerinde oldukça toksik etki yaptığı ortaya çıkmıştır. Ancak, her hücre tipinde de SUV420H2 geninin baskılanması, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere kıyasla hücre çoğalmasının artması ile sonuçlanmıştır. Bu etki MCF-7 hücrelerinde, muhtemelen hücrelerin çoğalma kinetiği nedeniyle, oldukça sınırlı oranda (yaklaşık % 10) gerçekleşti. Buna karşın MDA-MB-231 hücrelerin etki daha belirgin (yaklaşık % 80) olarak görülmektedir. Tablo 4-3'te SUV420H2 geninin baskılanmasının hücrelerin canlılığı üzerindeki etkileri özetlenmektedir.



Şekil 4-16: Meme kanseri hücrelerinde gerçek zamanlı hücre çoğalma eğrileri.

Tablo 4-3: SUV420H2 geninin baskılanmasının hücre sağkalımı üzerine etkileri

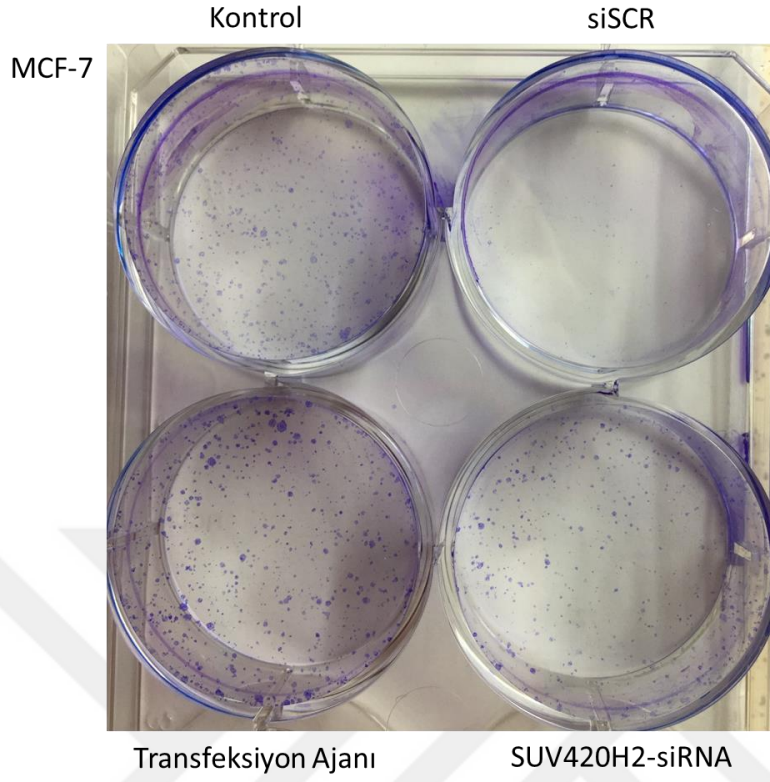
Hücre Soyları	siSCR		SUV420H2-siRNA(1)		SUV420H2-siRNA(2)	
	48 sa	72 sa	48 sa	72 sa	48 sa	72 sa
MCF-7	100	100	108	108	111	111
MDA-MB-231	100	100	188	237	174	212

Meme kanseri hücrelerinde SUV420H2 geninin baskılanmasının hücre sağkalımına etkisinin koloni oluşturma kapasitesi üzerinden araştırmak amacıyla kolonojenik test uygulandı. Bu amaçla, hücreler siRNA transfeksiyonu sonrasında standart büyüme koşullarında 10 gün boyunca büyütüldüler ve hücreler tarafından oluşturulan koloniler boyanarak sayımları yapıldı (Şekil 4-17 ve Şekil 4-18) .

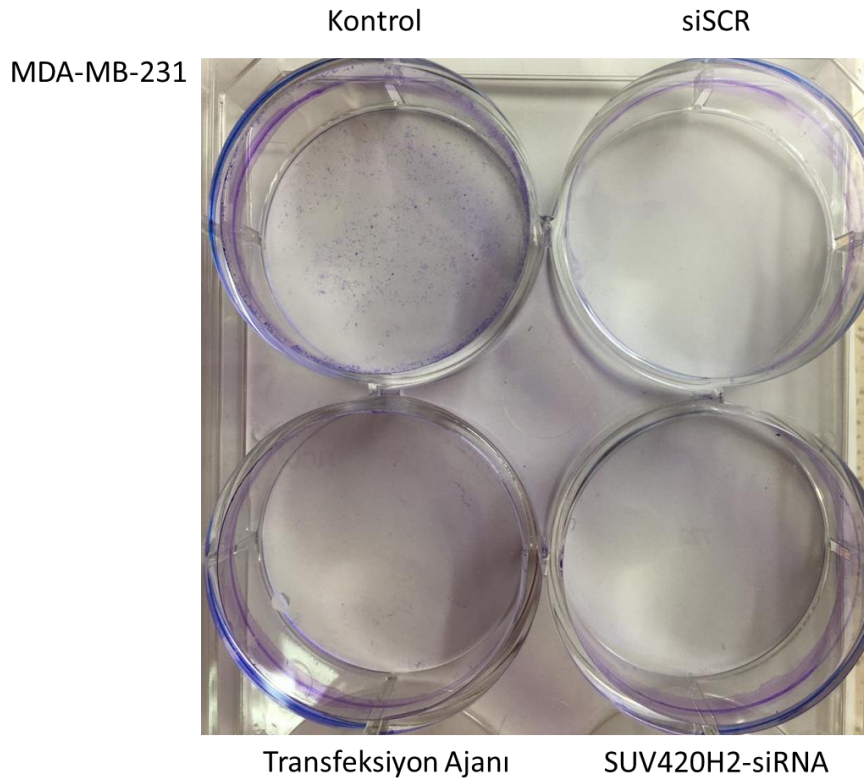
Sayım sonucu elde edilen bulgular Tablo 4-4' te yer almaktadır. Transfeksiyon işleminin toksik etkisi koloni oluşturma deneyinde daha belirgin olarak görülmektedir. Bunun nedeni de, hücrelerin 10 gün boyunca büyütülmüş olmalarıdır. Her iki hücre tipinde de, SUV420H2 baskılanmasının, kontrol siRNA ile muamele edilen hücrelere kıyasla koloni sayısını artırdığı gözlenmektedir. MCF-7 hücrelerinde, SUV420H2 gen baskılanması, referans gruba kıyasla koloni sayısını yaklaşık 3 kat arttırmıştır. Benzer durum MDA-MB-231 hücreleri için de geçerlidir. Bu bulgular, yukarıda anlatılan gerçek-zamanlı hücre çoğalması çalışması ile genel olarak uyumludur.

Tablo 4-4: Meme kanseri hücre soylarının kolonojenik test ile belirlenen % canlılık oranları.

Hücre Soyları	Kontrol	siSCR	SUV20H2-siRNA
MCF-7	100	18	53
MDA-MB-231	100	1	5



Şekil 4-17: MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri.



Şekil 4-18: MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ve kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alan [1, 13], gelişiminde genetik ve epigenetik değişikliklerin birlikte rol aldığı malin hastalıktır. Histon modifikasyon yolağındaki bozulmaların meme kanseri dahil bir çok kanser türünde sıklıkla görülmesi, bu değişimlerin kanser gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir [6]. Bu nedenle kanser araştırmalarında histon modifikasyonlarının incelenmesi önem arz etmektedir.

Histon proteinlerinin modifikasyonu nükleozomlarda gerçekleşir ve epigenetik düzenlemenin önemli bir unsurudur [5]. Histon 4 lizin 20 (H4K20) metilasyonu 1969 yılından beri çalışılmakta olan ve mayalardan insanlara kadar evimsel olarak korunmuş bir epigenetik işaretlemedir [9]. H4K20'nin metillenmesi tekli, ikili ve üçlü metillenme şeklinde HMT'ler tarafından gerçekleşmektedir [9, 58, 59, 68, 69]. H4K20me3, genomda heterokromatik bölgelerde, telomerlerde ve tekrar elementlerinin bulunduğu bölgelerde yoğun olarak bulunarak, bu genomik bölgelerin sessizleştirilmesinde görev alır [6, 9, 68]. H4K20me3'ü katalizleyen histon metil transferaz SUV420H2'dir [68].

H4K20me3'ün kanser gelişimi açısından öneminden yola çıkılarak, H4K20me3'ün meme kanserinde incelenmesinin amaçlandığı tez çalışmamızda, meme kanserli 82 hastanın tümör ve eşlenik sağlıklı dokularında SUV420H2 geninin ifade düzeyi araştırılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda SUV420H2 geninin, tümör dokularında, eşlenik normal dokulara göre, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, daha fazla ifade edildiği saptanmıştır. Diğer taraftan, SUV420H2 ifade düzeylerinin, tümörlerin klinopatolojik özellikleri ile karşılaştırılması 102 meme kanserli hastada gerçekleşmiştir. SUV420H2 gen ifade düzeyi ile yaş, menapozal durum, tümörün evresi, lenf nodu tutulumu, histolojik grad, nükleer grad arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak, SUV420H2 ekspresyonu ile hormon reseptör durumu arasında ilişki dikkat çekmektedir. Tümörleri ER(+) veya PR(+) olan hastalarda, hormon reseptörü negatif olan hastalara göre daha yüksek SUV420H2 ifadesi gözlenmiştir. Bu bağlantının işlevsel temellerinin ve prognozla ilişkisinin araştırılması gerekmektedir.

Kanserde epigenetik yolaklar üzerine yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, H4K20me3 düzeylerinde değişimin sık gerçekleştiği ve global H4K20me3 azalmasının

kanserlerin belirleyici özelliklerinden biri olduğu bildirilmiştir [6, 10, 11, 12]. H4K20 üçlü metilasyonunun, meme kanseri hücre soylarında, tümörojenik olmayan meme epitel hücrelerine kıyasla azaldığı bildirilmiştir [11]. Kültür hücreleri ile yapılan çalışmalarda, H4K20me₃'ü katalizleyen histon metil transferaz enzimini kodlayan SUV420H2 geninin ifade düzeyinin meme tümör hücrelerinde azaldığı bildirilmiş [11, 12, 77], buradan yola çıkarak SUV420H2 ifadesinin biyobelirteç olabileceği ileri sürülmüştür [77, 78]. Kanser hücrelerinde H4K20me₃ seviyesinin azalması, SUV420H2 geninin ekspresyonunun azalması ile birlikte seyretmektedir [11, 70]. Yokoyama ve ark., TCGA (Kanser Genom Atlası) ve GEO (Gen Ekspresyon Omnibus) ve MENT (Metilasyon ve Ekspresyon database of Normal ve Tumor Tissue) veri bankasındaki bilgileri kullanarak yaptıkları analizlerde, meme kanseri dokularında SUV420H2 ekspresyonunun normal dokulara göre azalma eğiliminde olduğunu bildirmektedir [12]. Tez çalışmasında SUV420H2 ile ilgili elde edilen bulgular, meme kanserinde literatürde bildirilen sonuçlarla uyumlu gözükmemektedir. Bunun temel nedeni, tez çalışmasında taze dokuların kullanılmış olması; buna karşın literatürde yer alan verinin parafin bloklarda yapılan immünohistokimyasal analizlere veya hücre kültürü çalışmalarına dayanıyor olması olabilir. Çalışmalar arasındaki yöntemsel farklılıkların gen ifadesi konusunda farklı sonuçlara yol açmış olabileceği düşünülmektedir.

Diğer taraftan, TCGA verilerine göre, bir çok malin hastalıkta, tümör dokularında SUV420H2 gen ifadesinin eşlenik normal dokulara göre arttığı saptanmıştır [79]. Benzer durum pankreas kanseri için de geçerlidir. Pankreas kanserinde yapılan güncel bir çalışmada, pankreas kanserli hücrelerde SUV420H2 ifadesinin arttığı ve epitelyal/mezenkimal geçişinde SUV420H2 geninin epigenetik düzenleyici olarak görev yaptığı gözlenmiştir [79]. SUV420H2 seviyesinin artması, invaziv kanserin ilerlemesinde epitelyal karakteristiklerin kaybolması ile ilişkilendirilmiştir [79].

Tez çalışmasında, SUV420H2 gen ifadesinin incelenmesini takiben, H4K20me₃ düzeyi incelendi. Bu amaçla, tümör ve eşlenik sağlıklı dokulardan histon proteinlerinin izolasyonu yapılarak, H4K20me₃ düzeyi ELIZA-benzeri yöntemle ölçüldü. Bu çalışma sonucunda, tümör dokularında anlamlı düzeyde, daha yüksek H4K20me₃ düzeyleri saptandı. Meme tümör dokularında H4K20me₃ düzeyinin artmış düzeyde bulunması, artmış SUV420H2 ifadesi ile uyumlu gerçekleşmiştir.

H4K20me3 miktarı çeşitli kanser türlerinde araştırılmış ancak net bir sonuç elde edilememiştir. Yapılan bazı çalışmalarda H4K20me3 miktarı azalırken [6, 11, 12, 77, 80] bazılarında ise arttığı bildirilmiştir [81]. H4K20me3 kaybı, literatürde, kanserin bir özelliği ve meme kanserinde prognostik bir faktör olarak tanımlanmıştır [6, 12]. İmmünohistokimyasal olarak tümör dokularında global histon modifikasyonlarının düzeyini inceleyen ve geniş hasta serisine sahip olan çalışmada (N= 880) ise, Elsheikh ve ark. invaziv meme karsinomlu hastaların % 70'inde H4K20me3 miktarının arttığını kalan kısmında ise azaldığını rapor etmişlerdir [81]. Elsheikh ve ark.'nın bulguları ile tez çalışmasında elde edilen bulguların uyumlu olduğu gözükmektedir. Diğer taraftan, çalışmamızda kullandığımız hücre soyları ile (MCF-7 ve MDA-MB-231) yapılmış olan çalışmalarda, H4K20me3 düzeyinin tümörojenik olmayan hücre soylarına göre daha düşük olduğu bildirilmiştir [6, 11, 12, 70]. Çalışmamızda, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ile tümörojenik olmayan hücre soyları arasında bir karşılaştırma yapılmamıştır. SUV420H2 gen ifadesinde olduğu gibi, H4K20me3 düzeyi konusunda, çalışmalar arasındaki uyumsuzluk yöntemsel farklılıklardan dolayı ortaya çıkmış olabilir. Yukarıda adı geçen çalışmaların çoğu, kültür hücreleri ile yapılmış çalışmaları ya da immünohistokimyasal analizleri içermektedir. Tez çalışmasında ise, tümör dokularından izole edilen histon proteinleri üzerinden, doğrudan histon metilasyon ölçümü yapılmıştır.

Bazı çalışmalarda, düşük H4K20me3 seviyeleri agresif meme tümörü özellikleri ile ilişkilendirilmiş ve bunun hastalığın ilerlemesi için biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür [77, 81]. Elsheikh ve ark. çalışmasında, histon modifikasyon miktarı ile klinik sonuç arasında oldukça yüksek bir korelasyon gözlenmiş, ve göreceli olarak yüksek seviyedeki global histon asetilasyon ve metilasyonun iyi prognosisla ilişkili olduğu saptanmıştır [81]. Tez çalışmasında, H4K20me3 düzeyinin, meme tümörlerinin moleküler alt tiplerine göre dağılımına bakıldığında, H4K20me3 düzeyinin bazal benzeri meme tümörlerinde, luminal A ve luminal B meme tümörleri ve HER2-benzeri tümörlere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, Evre III tümörlerde, Evre I ve II tümörlere göre daha yüksek H4K20me3 düzeyi saptanmıştır. Bu ve yukarıda belirtilen bulgular, H4K20me3 miktarının artmasının kanserin ilerlemesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, yapılan bir deneysel çalışmada, H4K20me3 seviyesinin hücre invazyonunun düzenlenmesini etkilediği gösterilmiştir [12].

Tez çalışmasında, SUV420H2 ifadesi ile H4K20me3 düzeylerinin prognostik değeri de araştırıldı. SUV420H2 gen ifadesinin genel sağkalım ile ilişkisi 102 hastada, H4K20me3 düzeyi ise 44 hastada değerlendirildi. Çalışmada elde edilen bulgular SUV420H2 gen ifadesi ile H4K20me düzeyinin prognostik değerinin olmadığına işaret etmektedir. H4K20me3 düzeyi incelenen hasta sayısının düşük olması, analizin istatistiksel gücünü etkilemiş olabileceğinden, daha yüksek hasta serilerinde H4K20me3'ün prognostik değerinin araştırılması gerekmektedir. İmmünohistokimyasal inceleme içeren bir çalışmada, hastaların genel sağ kalımları ve hastaliksız sağkalımları H4K20me3 düzeyine göre incelenmiş ve yüksek miktarda H4K20me3 saptanan hastalarda daha iyi genel sağkalım ve hastaliksız sağ kalım oranları belirlenmiştir [12].

Çalışmamızın ikinci aşamasında, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında SUV420H2 geni özgül siRNA oligonükleotidleri aracılığı ile baskılanarak hücrelerin sağkalımları üzerine etkileri araştırılmıştır. Her iki hücre soyunda SUV420H2 geninin baskılanması, gerçek-zamanlı hücre analizinde, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre hücre çoğalmasının artması ile sonuçlanmıştır. Bu etkinin MCF-7 hücrelerinde sınırlı oranda (yaklaşık % 10) gerçekleştiği, buna karşın MDA-MB-231 hücrelerinde daha belirgin (yaklaşık % 80) olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, meme kanseri hücre soylarında SUV420H2 geninin baskılanmasının, hücre sağkalımını artırdığı, hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi deneyi ile de teyit edildi. SUV420H2 geninin baskılanmasının hücre çoğalması ile sonuçlanması yönündeki bulgumuz, literatürde yer alan veri ile tutarlılık göstermektedir [70].

Hücre soyları arasında ortaya çıkan farkın, hücrelerin çoğalma kinetiği nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Çünkü, MCF-7 soyunda hücrelerin etkin şekilde çoğalmadığı ve hücre sayısının, transfeksiyon yapılmayan grupta bile, zamanla azaldığı gözlenmiştir. Buna karşın transfeksiyon yapılmayan MDA-MB-231 hücrelerinin etkin şekilde çoğaldığı görülmektedir. Diğer taraftan, daha agresif fenotipte olan MDA-MB-231 hücrelerinin, SUV420H2 geninin baskılanmasından daha fazla etkilenmiş olması da olasıdır.

Sonuç olarak, tez çalışmasında her ne kadar tümör dokularında SUV420H2 geni ve bu gen ürününün kodladığı histon metiltransferaz tarafından katalizlenen H4K20me3'ün artmış olduğu saptansa da, kültür hücrelerinde SUV420H2 genin baskılanmasının hücre çoğalmasının artması ile sonuçlanması, SUV420H2 geninin

meme kanserinde tümör baskılayıcı bir rol üstlendiğine işaret etmektedir. Hem bu çalışmada vaka sayısının yüksek olmaması hem de literatürde SUV420H2 ve H4K20me3 hakkında verilerin çelişkili olması, daha büyük ve iyi tasarlanmış çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu tez çalışmasının önemli özelliklerinden biri SUV420H2 gen ifadesi ile H4K20me3 düzeyinin taze tümör dokularında çalışılmış olmasıdır. Bu konudaki çalışmaların genel olarak kültür hücreleri veya parafine gömülmüş dokularda yapıldığı düşünüldüğünde, bu durumun tez çalışmasının verilerini güçlü kıldığı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Lukong KE. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA Clin.* 2017; **7**: 64-77. doi: 10.1016/j.bbacli.2017.01.001.
2. <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>.
3. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016; **25** (1): 16-27. doi: 10.1158/1055-9965.
4. Sauter ER. Reliable Biomarkers to Identify New and Recurrent Cancer. *Eur J Breast Health.* 2017; **13** (4): 162-167. doi: 10.5152/ejbh.2017.3635.
5. Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B. Histone onco-modifications. *Oncogene.* 2011; **30** (31): 3391-403. doi: 10.1038/onc.2011.121.
6. Fraga MF. ve ark. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005; **37** (4): 391-400.
7. Gezer U, Holdenrieder S. Post-translational histone modifications in circulating nucleosomes as new biomarkers in colorectal cancer. *In Vivo.* 2014; **28** (3): 287-92.
8. Behbahani TE. ve ark.. Alterations of global histone H4K20 methylation during prostate carcinogenesis. *BMC Urol.* 2012; **12**: 5. doi: 10.1186/1471-2490-12-5.
9. Jørgensen S, Schotta G, Sørensen CS. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* 2013; **41** (5): 2797-806. doi: 10.1093/nar/gkt012.
10. Van Den Broeck A. ve ark. Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; **14** (22): 7237-45. doi: 10.1158/1078-0432.
11. Tryndyak VP, Kovalchuk O, Pogribny IP. Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther.* 2006; **5** (1): 65-70.

12. Yokoyama Y. ve ark. Loss of histone H4K20 trimethylation predicts poor prognosis in breast cancer and is associated with invasive activity. *Breast Cancer Res.* 2014; **16** (3): R66. doi:10.1186/bcr3681.
13. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019; **69**: 7-34. doi:10.3322/caac.21551.
14. American Cancer Society. Cancer Facts& Figures 2017.
15. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; **151**: 1-32. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.07.002.
16. Rivenbark A., O'Connor S. and Coleman W. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer. Challenges for personalized medicine. *Am J Pathol.* 2013; **183**: 1113-1124; doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.002.
17. Polyak K: Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest.* 2007; **117**: 3155e3163. doi:10.1172/JCI33295.
18. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet.* 2017; **389** (10074): 1134-1150. doi:10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
19. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017; **50** (1): 33. doi: 10.1186/s40659-017-0140-9.
20. Nozad S, Sheehan C, Gay L, Elvin J, Vergilio J, Suh J, et al. Comprehensive genomic profiling of malignant phyllodes tumors of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; **162**: 597–602.
21. Davalos V., Martinez- Cardus A. and Esteller M. The Epigenomic Revolution in Breast Cancer From Single- Gene to Genome- Wide Next- Generation Approaches. *Am J of Pathol.* 2017; **187**: 2163- 2174
22. Perou, C.M., et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; **406**: 747–752.
23. Eroles P., Bosch A., Perez- Fidalgo J. A., and Lluch A. Molecular biology in breast cancer: İntrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat.* 2012; **38**: (6) 698- 707
24. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012; **490** (7418): 61-70. doi: 10.1038/nature11412.
25. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci.*

- 2003; **100** (14): 8418–23.
26. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007; **8** (5): R76.
 27. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010; **12**: R68
 28. Suter R, Marcum JA. The molecular genetics of breast cancer and targeted therapy. *Biologics.* 2007; **1** (3): 241-58.
 29. Longacre M, Snyder NA, Housman G, Leary M, Lapinska K, Heerboth S, Willbanks A, Sarkar S. A Comparative Analysis of Genetic and Epigenetic Events of Breast and Ovarian Cancer Related to Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* 2016; **17** (5). pii: E759. doi: 10.3390/ijms17050759.
 30. Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol.* 2014; **21** (2): 100-7. doi: 10.1097/PAP.0000000000000015.
 31. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.* 2009; **14**: 320–368.
 32. Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2000; **7**: 143–64.
 33. Schulz WA. Molecular biology of human cancers. an advanced student's textbook. Dordrecht: *Springer.* 2006.
 34. Siewertsz van Reesema LL, Lee MP, Zheleva V, Winston JS, O'Connor CF, Perry RR, Hoefler RA, Tang AH. RAS pathway biomarkers for breast cancer prognosis. *Clin Lab Int.* 2016; **40**: 18-23.
 35. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 2004; **18** (22): 2699-711.
 36. Ortiz AB, Garcia D, Vicente Y, Palka M, Bellas C, Martin P. Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma. *PLoS One.* 2017; **12** (11): e0188068. doi:10.1371/journal.pone.0188068.



37. Gómez-Flores-Ramos L, Álvarez-Gómez RM, Villarreal-Garza C, Wegman-Ostrosky T, Mohar A. Breast cancer genetics in young women: What do we know? *Mutat Res.* 2017; **774**: 33-45. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.08.001.
38. S. Masciari, D.A. Dillon, M. Rath, M. Robson, J.N. Weitzel, J. Balmana, et al., Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li fraumeni syndrome consortium effort, *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; **133**: 1125–1130.
39. Rossing M, Sørensen CS, Ejlersen B, Nielsen FC. Whole genome sequencing of breast cancer. *APMIS.* 2019. doi: 10.1111/apm.12920.
40. Murray AJ, Davies DM. The genetic of breast cancer. *Surgery* 2013; **31**: 1-3. doi:10.1016/j.mpsur.2012.10.019.
41. Lee EYHP, Muller WJ. Oncogenes and Tumor Suppressor *Genes.Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; **2**(10): a003236. doi: 10.1101/cshperspect.a003236
42. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Eng J Med* 2008; **358**: 1148- 1159.
43. Llinàs-Arias P, Esteller M. Epigenetic inactivation of tumour suppressor coding and non-coding genes in human cancer: an update. *Open Biol.* 2017; **7** (9). pii:170152. doi: 10.1098/rsob.170152.
44. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer.* 2006; **6** (2): 107-16.
45. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011; **11**: 726–734.
46. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell.* 2012; **22** (1): 9-20. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.008.
47. Esteller M. Epigenetics in biology and medicine. *CRC Press.* 2009; **13**: 978-0-8493-7289-6.
48. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016; **8** (9). pii: a019505. doi: 10.1101/cshperspect.a019505.
49. Ehrlich M, Lacey M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics.* 2013; **5** (5): 553-68. doi: 10.2217/epi.13.43.
50. Mattioli F, D'Arcy S, Luger K. The right place at the right time: chaperoning core histone variants. *EMBO Rep.* 2015; **16** (11): 1454-66. doi:10.15252/embr.201540840.

51. Du J, Patel DJ. Structural biology-based insights into combinatorial readout and crosstalk among epigenetic marks. *Biochim Biophys Acta*. 2014; **8**: 719 – 727.
52. Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep*. 2015; **16** (11): 1467-81. doi:10.15252/embr.201540945.
53. Vu LP, Luciani L, Nimer SD. Histone-modifying enzymes: their role in the pathogenesis of acute leukemia and their therapeutic potential. *Int J Hematol*. 2013; **97** (2): 198-209. doi: 10.1007/s12185-012-1247-y.
54. Munshi, A. et al. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics*. 2009; **36** (2): 75-88.
55. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011; **21** (3): 381-95. doi: 10.1038/cr.2011.22.
56. Fan J, Krautkramer KA, Feldman JL, Denu JM. Metabolic regulation of histone post-translational modifications. *ACS Chem Biol*. 2015; **10** (1): 95-108. doi:10.1021/cb500846u.
57. Messier TL. Ve ark. Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes. *Oncotarget* 2016; **7**: 5094e5109.
58. Nimura K, Ura K, Kaneda Y. Histone methyltransferases: regulation of transcription and contribution to human disease. *J Mol Med (Berl)*. 2010; **88** (12): 1213-20. doi: 10.1007/s00109-010-0668-4.
59. Li J, Zhu S, Ke XX, Cui H. Role of several histone lysine methyltransferases in tumor development. *Biomed Rep*. 2016; **4** (3): 293-299.
60. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. 2012; **13** (5): 343-57. doi: 10.1038/nrg3173.
61. Rao VK, Pal A, Taneja R. A drive in SUVs: From development to disease. *Epigenetics*. 2017; **12** (3): 177-186. doi: 10.1080/15592294.2017.1281502.
62. Tschiersch B ve ark. The protein encoded by the Drosophila position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* 1994; **13**: 3822-31; PMID:7915232.
63. Dambacher S, Hahn M, Schotta G. Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. *Heredity (Edinb)*. 2010; **105** (1): 24-37. doi:10.1038/hdy.2010.49.

64. Dimitrova E, Turberfield AH, Klose RJ. Histone demethylases in chromatin biology and beyond. *EMBO Rep.* 2015; **16** (12): 1620-39. doi:10.15252/embr.201541113.
65. Højfeldt JW, Agger K, Helin K. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; **12** (12): 917-30. doi:10.1038/nrd4154.
66. Zhao QY. Ve ark. Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a four-stage breast cancer model. *Clin Epigenetics* 2016; **8**: 34.
67. Weirich S, Kudithipudi S, Jeltsch A. Specificity of the SUV4-20H1 and SUV4-20H2 protein lysine methyltransferases and methylation of novel substrates. *J Mol Biol.* 2016; **428** (11): 2344-2358. doi: 10.1016/j.jmb.2016.04.015.
68. Schotta G, ve ark. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 2004; **18** (11): 1251-62.
69. Wu,S., Wang,W., Kong,X., Congdon,L.M., Yokomori,K., Kirschner,M.W. and Rice,J.C. Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes Dev.* 2010; **24**: 2531–2542.
70. Shinchi Y. ve ark. SUV420H2 suppresses breast cancer cell invasion through down regulation of the SH2 domain-containing focal adhesion protein tensin-3. *Exp Cell Res.* 2015; **334** (1): 90-9. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.03.010.
71. Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res.* 2003; **5** (2): 89-95.
72. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst.* 2015; **31**: 107 (7).
73. Cell line profile MDA-MB-231 (ECACC catalogue no. 92020424). <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>
74. Chang K, Marran K, Valentine A, Hannon GJ. RNAi in cultured mammalian cells using synthetic siRNAs. *Cold Spring Harb Protoc.* 2012; **2012** (9): 957-61. doi:10.1101/pdb.prot071076.

75. Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv.* 2002; **2** (3): 158-67.
76. Crowley LC, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016; **2016** (8). doi: 10.1101/pdb.prot087171.
77. Simpson NE, Tryndyak VP, Beland FA, Pogribny IP. An in vitro investigation of metabolically sensitive biomarkers in breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; **133** (3): 959-68. doi: 10.1007/s10549-011-1871-x.
78. Zhang Y, Yan L, Yao W, Chen K, Xu H, Ye Z. Integrated Analysis of Genetic Abnormalities of the Histone Lysine Methyltransferases in Prostate Cancer. *Med Sci Monit.* 2019; **25**: 193-239. doi: 10.12659/MSM.912294.
79. Viotti M., et all. SUV420H2 is an epigenetic regulator of epithelial/mesenchymal states in pancreatic cancer. *J Cell Biol.* 2018; **217** (2): 763-777. doi: 10.1083/jcb.201705031.
80. Wu Y, Shi W, Tang T, Wang Y, Yin X, Chen Y, Zhang Y, Xing Y, Shen Y, Xia T, Guo C, Pan Y, Jin L. miR-29a contributes to breast cancer cells epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion via down-regulating histone H4K20 trimethylation through directly targeting SUV420H2. *Cell Death Dis.* 2019; **10** (3): 176. doi: 10.1038/s41419-019-1437-0.
81. Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA, Grainge MJ, Ball GR, Abdelghany MK, Martinez-Pomares L, Heery DM, Ellis IO. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 2009; **69** (9): 3802-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3907.

ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

Sayı : 915
Konu: Prof. Dr. Uğur GEZER hk.

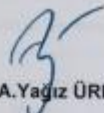
Tarih : 23.08.2017

Sayın Prof. Dr. Uğur GEZER
Onkoloji Enstitüsü

İlgi : Onkoloji Enstitüsünün 04/08/2017 gün ve 295664 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Uzm. Bio. Hüsnüye İŞİN' in yürüteceği 2017/887 dosya numaralı "Meme Kanseri Histon 4 Lizin 20 Üçlü Metillenmesinin (H4K20me3) Öneminin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 11/08/2017 gün ve 13 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
TELEFON	0 (212) 414 21 53
FAKS	0 (212) 414 21 53
E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Meme Kanseri Histon 4 Lizin 20 Üçlü Metillenmesinin (H4K20me3) Öneminin Araştırılması"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Uğur GEZER			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Temel Onkoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Diğer ise belirtiniz :				
	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLAR ARASI <input type="checkbox"/>	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞKANIN AÇIK ADI **"Meme Kanserinde Histon 4 Lizin 20 Üçlü Metillenmesinin (H4K20me3) Öneminin Araştırılması"**

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	07.08.2017		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>		Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BİYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>				
	ILAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:13	Tarih: 11/08/2017				
	İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Uğur GEZER ' in sorumluluğunda ve Uzm. Bio. Hüsnüye İŞİN' in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir..					

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *	Katılım **	İmza		
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığında izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

Sayfa 2

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MEME KANSERİNDE HİSTON 4 LİZİN 20 ÜÇLÜ METİLENMESİNİN (H4K20ME3) ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%7	%2	%1	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%3
2	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
3	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.biyolojikongreleri.org İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
6	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
7	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	cms.galenos.com.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	HÜSNİYE	Soyadı	IŞIN
Doğ.Yeri	KIRCAALİ	Doğ.Tar.	14.11.1981
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	12836467490
Email	husniyeyilmaz@gmail.com	Tel	05339350080

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ/ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ/TEMEL ONKOLOJİ ABD./ DENEYSEL VE MOLEKÜLER ONKOLOJİ PROGRAMI	2015
Lisans	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ/ FEN FAKÜLTESİ/ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ	2006
Lise	İSTANBUL KURTULUŞ YDA LİSESİ	2000

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	YÖK 100/2000 BURSİYERİ	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ	2017- devam ediyor.
2.	TIBBİ TANITIM SORUMLUSU	ECZACIBAŞI İLAÇ PAZARLAMA	2007- 2010
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) YÖKDİL Puanı
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ	63,75	78,75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	71,56	73,22	66,22
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS OFFİCE	İYİ

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI,SSCI,Arts and Humanities)

1. Fayda M, Isin M, Tambas M, Guveli M, Meral R, Altun M, Sahin D, Ozkan G, Sanli Y, Isin H, Ozgur E, Gezer U. Do circulating long non-coding RNAs (lncRNAs) (LincRNA-p21, GAS 5, HOTAIR) predict the treatment response in patients with head and neck cancer treated with chemoradiotherapy? Tumour Biol. 2016 Mar;37(3):3969-78. doi: 10.1007/s13277-015-4189-1.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Nejat Dalay, Husniye Isin, Canan Kelten, Didem Karaçetin, Şefika Aksoy, Didem Can Trabulus. Methylation of The WRN, DOK1 And DSP Genes in Breast Cancer. Epigenetics and Cancer, Keystone Colorado, 25- 30 Ocak 2015. (Ref: 1024) **(Poster Bildiri)**
2. Isin M, Isin H, Talu CK, Trabulus D, Karaçetin D, Dalay N. Involment of miRNA29b in breast cancer. MicroRNAs and Noncoding RNAs in Cancer, Keystone Colorado, 7-12 Haziran 2015. (Ref: 1040) **(Poster Bildiri)**

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Hüsniye Işın, Esra Canan Kelten Talu, Didem Karaçetin, Fadime Didem Can Trabulus, Uğur Gezer. Meme kanserinde Histon4 Lizin 20 Üçlü Metillenmesinin (H4K20me3) Öneminin Araştırılması. 15. İÜ. Onkoloji Enstitüsü Günleri Sempozyumu ve 8. İÜ. Onkoloji Enstitüsü Çalıştayı, İstanbul 01-02 Aralık 2017 (Tez Projesi). **(Sözel Bildiri)**
2. Işın H, Işın M, Talu CK, Trabulus DC, Karaçetin D, Aksoy Ş, Dalay N. Meme Kanserli Hastalarda WRN ve DSP Genlerinin Araştırılması. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ölüdeniz-Fethiye 26- 29 Ekim 2017 (Ref: SS-052). **(Sözel Bildiri)**
3. Işın H, Işın M, Talu CK, Trabulus DC, Karaçetin D, Aksoy Ş, Dalay N. Meme Kanserli Hastalarda WRN ve DSP Genlerinde Gen İfadesi ve Metillenme Değişikliklerinin Araştırılması. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ölüdeniz-Muğla 27-30 Ekim 2015. (Ref: SS-01 12) **(Sözel Bildiri)**
4. Işın M, Işın H, Talu CK, Trabulus D, Karaçetin D, Dalay N. Meme Kanserinde GATA3 ve miRNA29b İfadelerinin Araştırılması. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ölüdeniz-Muğla 27-30 Ekim 2015. (Ref: PS-01 14) **(Poster Bildiri)**

