

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

S100A4 GEN VARYANLARI İLE METASTATİK MEME
KANSERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

SEDA KILIÇ

DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YAZICI ÖZBEK

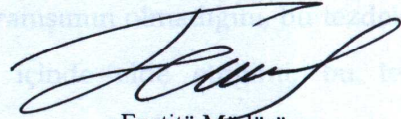
TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI / KANSER
GENETİĞİ PROGRAMI

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

22 / 02 / 2011



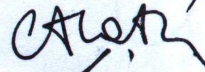
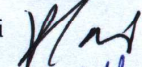
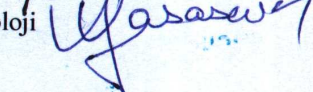
Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Tamer DEMİRALP

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Kanser Genetiği
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
 Anabilim Dalı : Temel Onkoloji
 Tez Sahibi : Seda KILIÇ
 Tez Başlığı : "S100A4 Gen Varyantları İle Metastatik Meme Kanseri Arasındaki İlişkinin Araştırılması"
 Sınav Yeri : İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü
 Sınav Tarihi : 15 / 02 / 2011

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü / Temel Onkoloji / Danışman
2. Prof. Dr. Prof. Dr. Nejat DALAY / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü / Temel Onkoloji
3. Prof. Dr. Canan ALATLI / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü / Klinik Onkoloji
4. Prof. Dr. Pınar Mualla SAİP / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü / Klinik Onkoloji
5. Prof. Dr. Vildan YASASEVER / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü / Temel Onkoloji

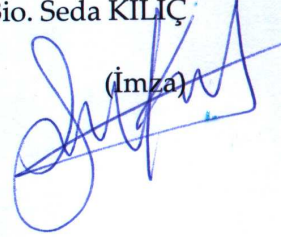




BEYAN

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 olmadığını beyan ederim.

Bio. Seda KILIÇ

(İmza)



İTHAF

Bilim adına çalışan herkese...

TEŞEKKÜR

Onkoloji Enstitüsü Müdürü *Prof. Dr. Erkan Topuz'a*, Anabilim Dalı Başkanımız, *Prof. Dr. Mehmet Nejat Dalay'a* ve tez danışmanım *Prof. Dr. Hülya Yazıcı Özbek'e*, yüksek lisans programı süresince ders aldığım tüm hocalarıma,

DKIS hasta grubunu oluşturmamda yardımlarını esirgemeyen *Prof. Dr. Abdullah İğci*, *Prof. Dr. Mahmut Müslümanoğlu* ve *Doç. Dr. Neslihan Cabioğlu'na* ve Cerrahi C servisindeki hasta dokümantasyon ekibi sekreterleri *Hasibe Üstübeç*, *Atilla Bozdoğan*, *Bedia Silahsızoğlu'na*,

Serum kalsiyum düzeyi ölçümünde deneyimlerini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen *Prof. Dr. Vildan Yasasever* ve *İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü Biyokimya Laboratuvarı ekibi'ne*,

Metastatik meme hasta grubunu oluşturmam konusunda önderlik eden *Prof. Dr. Pınar M. Saip'e* ve hasta toplamamda yardımcı olan *Dr. Özgül Düzgün*, *Dr. Leyla Kılıç* ve *Dr. Serkan Keskin'e*,

Tezim ile ilgili istatistiksel analizleri gerçekleştiren sevgili arkadaşım *Artür Manukyan'a*,

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarından çokça faydalandığım arkadaşlarım, *Orkun Gürbüz*, *Özge Şükriüoğlu*, *Buğra Tuncer*, *Arzu Burnuva*, *Necmiye Koçak*, *Murat Serilmez*, *Ufuk Mert*, *Zübeyde Yalnız Kayım* ve tüm araştırma laboratuvarı ekibine,

Her zaman yanımda olan arkadaşlarım *Sinem & Harun Fırtına*, *Aras Erbilgin*, *Eren Atala* ve *Utku Erciyas'a*,

Sonsuz destekleri için sevgili ailem *Güler & Fahrettin Kılıç*, *Furkan Kılıç* ve teyzem *Güven İzmirli* ve eşi *Ömer İzmirli'ye* teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4273.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	X
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Meme kanseri.....	2
2.1.1. Meme kanserinin sıklığı	2
2.1.2. Meme kanserinin mortalitesi	3
2.1.3. Meme kanserinin histopatolojik sınıflaması.....	3
2.1.4. Meme kanserinin moleküler tipleri	7
2.1.5. Meme kanserine genetik yatkınlık.....	9
2.2. S100 proteinleri ailesi	10
2.2.1. S100A4.....	12
2.2.2. S100A4'ün prognostik önemi	14
2.2.3. S100A4'ün metastazdaki rolü.....	15
2.3. Total kalsiyum	15
2.3.1. Kalsiyum sinyal mekanizması.....	18
2.3.2. Kalsiyum sensörleri	20
2.3.3. S100A4 ile kalsiyum ilişkisi.....	20

3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Gereç.....	21
3.1.1. Hasta ve Kontrol Grupları	21
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve KİT'ler.....	22
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	23
3.1.4. Kullanılan tampon ve çözeltiler	24
3.1.4.1. DNA izolasyonu ve jel elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Tam kandan DNA izolasyonu.....	25
3.2.2. Horizontal agaroz jel elektroforezi	26
3.2.3. Tam kan örneğinden serum ayrıştırılması	26
3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	27
3.2.4.1. Primer dizaynı.....	27
3.2.4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.....	27
3.2.5. PZR ürünlerinin saflaştırılması	29
3.2.6. Dizi Analizi.....	29
3.2.7. Kolorimetrik yöntem ile serumda total kalsiyum tayini	30
3.2.8. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	31
4. BULGULAR	32
4.1. Dizi Analizinden Elde Edilen Veriler	33
4.2. Total kalsiyum düzeyi ölçüm sonuçları.....	35
5. TARTIŞMA.....	36
KAYNAKLAR.....	40
FORMLAR.....	47
ETİK KURUL KARARI.....	49
ÖZGEÇMİŞ	51

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Meme kanserinin histopatolojik sınıflandırılması	4
Tablo 2-2: Meme kanseri moleküler alt tipleri	7
Tablo 2-3: Kalsiyum iyon değerleri ve oranları	18
Tablo 3-1: Kontrol ve deney grupları ile gruplarda örnek dağılımı	22
Tablo 3-2: Fenol-Kloroform Yöntemi ile Tam Kandan DNA İzolasyonu	25
Tablo 3-3: PZR içeriği.....	28
Tablo 3-4: PZR koşulları	28
Tablo 3-5: Dizi analizi reaksiyonu içeriği	30
Tablo 4-1: Dizi analizinden elde edilen veriler	34
Tablo 4-2: Deney gruplarında total kalsiyum değerlerinin ortalamaları.....	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: 2010' da kadınlarda görülmesi beklenen kanser türlerinin sıklığı	3
Şekil 2-2: S100 Proteinlerinin genel şekli.....	11
Şekil 2-3: S100 proteinlerine kalsiyum bağlanması ve hedef proteinler ile etkileşimi	11
Şekil 2-4: Kalsiyuma bağlı sinyal mekanizması ve görevli bazı proteinler	19
Şekil 3-1: Horizontal agaroz jel elektroforez düzeneği.....	26
Şekil 4-1: Hastalarda görülen metastatik bölgelerin dağılımı	33
Şekil 4-2: Dizi analizi raporu	34

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- RNA: Ribonükleik asit
DNA: Deoksiribonükleik asit
DKIS: İn situ duktal karsinom
İSLK: İn situ lobüler karsinom
İDK: İnvaziv duktal karsinom
İLK: İnvaziv lobüler karsinom
PTH: Paratiroid Hormon
ÖR: Östrojen Reseptörü
PR: Progesteron Reseptörü
ER: Endoplazmik retikulum
SR: Sarkoplazmik retikulum
cAMP: Siklik Adenozin monofosfat
RYR: Ryanodin Reseptörleri
1,25-DHCC: 1-25 Dihidrokokalsiferol
InsP₃R: İnositol trifosfat Reseptörleri

ÖZET

Kılıç, S. (2011). S100A4 Gen Varyantları İle Metastatik Meme Kanseri Arasındaki İlişkinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kalsiyum bağlayıcı olduğu bilinen S100A4 proteininin metastatik potansiyeline ilişkin özelliklerin model sistemlerde araştırılmasında, genin C-terminal ucundaki bazı aminoasit rezidülerinin önemli olduğu ve bu aminoasit rezidülerinde oluşan delesyonların/yanlış anlamlı mutasyonların metastatik potansiyeli azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, metastatik potansiyeli teşvik etmede önemli olduğu bildirilmiş S100A4 geninin C-terminal ucundaki genomik varyasyonlar ile S100A4'ün kalsiyum bağlama kapasitesi-serum kalsiyum düzeyi arasında bir ilişkinin olup olmadığını araştırmak amacıyla bölgenin dizi analizi ve total serum kalsiyum ölçümleri yapıldı. S100A4 geni C-terminal bölgesi dizisinin hasta ve kontrol gruplarında farklılık göstermediği ortaya kondu. Total kalsiyum düzeyleri ölçümlerinde, duktal in situ karsinoma ($6,2\pm 1,0$ mg/dL) ve metastatik meme kanseri hastalarına ait değerlerin ($7,2\pm 0,9$ mg/dL) kontrol grubundan ($8,9\pm 0,6$ mg/dL) anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0,001$), aynı zamanda duktal in situ karsinoma ve metastatik meme kanseri hasta gruplarına ait değerler kendi içlerinde birbirleriyle karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklı oldukları gösterildi ($p<0,001$). Metastatik meme kanserli hastalardan kemik metastazı olanların ($7,4\pm 0,5$ mg/dL) total kalsiyum değerlerinin diğer organlara metastazı olan hastalara göre ($6,7\pm 0,7$ mg/dL) anlamlı derecede daha yüksek olduğu ortaya kondu ($p<0,001$).

Anahtar Kelimeler: S100A4, Meme Kanseri, Metastaz, Kalsiyum

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4273

ABSTRACT

Kılıç, S. (2011). Investigation of Relationship Among Genetic Variants of S100A4 and Metastatic Breast Cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. M.Sc. thesis. Istanbul.

The characteristics of S100A4 gene which is known as a calcium binding protein associated with metastasis, it has been presented that the aminoacids which exist on the C-terminal domain of S100A4 gene is crucial for metastatic potential. In the study, we investigated genomic changes on C-terminal domain of S100A4 gene and total serum calcium levels. Variations on the C-terminal domain were determined by DNA sequencing of 141 samples collected from 117 patients with DCIS and metastatic breast cancer and 16 healthy controls. Total serum calcium levels were measured by quantitative colorimetric method. The alterations on C-terminal region of S100A4 gene were not found in our study groups. Total calcium levels of DCIS group ($6,2\pm 1,0$ mg/dL) and metastatic group ($7,2\pm 0,9$ mg/dL) have been found significantly ($p<0,001$) lower than the control group ($8,9\pm 0,6$ mg/dL). The statistical significance ($p<0,001$) have also been found to exist both among the patients with DCIS and patients with metastatic breast cancer. Moreover, serum calcium levels of patients with bone metastasis ($7,4\pm 0,5$ mg/dL) were found significantly ($p<0,001$) higher than the rest of metastasis group ($6,7\pm 0,7$ mg/dL).

Key Words: S100A4, Breast Cancer, Metastasis, Calcium

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 4273

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, kadınlarda görülen kanserlerin %23'ünü oluşturmaktadır ve bu hastalığa yakalananların %40'ının hayatını kaybettiği bilinmektedir. Türkiye'de kadınlarda meme kanserinin görülme oranı %24,1'dir [1]. Ülkemizde her yıl 10.000 yeni meme kanseri vakası geliştiği ve batı bölgelerdeki vaka sayısının doğudakinin 10 katı olduğu bildirilmiştir [2, 3]. Meme kanseri sebebi ile ölümün başlıca nedeni primer tümörden uzak bölgelerde metastatik odakların gelişmesidir.

S100A4 geninin birçok kanser türünde hücrelerin metastaz geliştirmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir. İsmail T.M. ve arkadaşları S100A4 geni C-terminal bölgesini transfekte ederek gerçekleştirdikleri çalışmada, metastatik aktivitenin değiştirilebildiğini göstermişlerdir[4]. Çalışmamızda, S100A4 geninin metastaz geliştirmede önemi olduğu düşünülen C-terminal bölgesindeki genetik bozukluğun incelenmesi ve hasta grupları arasındaki total kalsiyum seviyelerinin metastaz gelişimi ile ilişkisi olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın yapılacağı deney grupları, metastaz yapma özelliği olmayan in situ duktal karsinoma (DKIS) tanılı hastalar ile metastatik meme kanseri tanılı hastalardan seçilmiştir. Ayrıca, incelenecek bölgenin genetik yapısının Türk popülasyonundaki özelliği bilinmediği için, sağlıklı kişilerden oluşan ve deney gruplarının yaşları ile bire bir karşılık gelen kontrol grubu da ilave edilmiştir.

Çalışmada S100A4 geninin C-terminal bölgesindeki DNA dizisi ve total kalsiyum değerleri, hastaların klinik parametreleri ile karşılaştırılmış ve söz konusu genin C-terminal bölgesinin metastatik meme kanserinin gelişimi açısından önemli olup olmadığı değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme kanseri

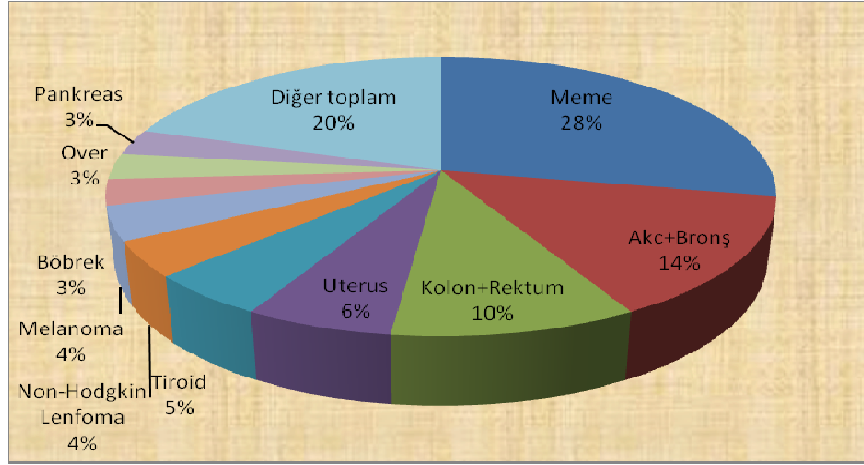
Kanser hastalığına ait tüm verilere bakıldığında meme kanserinin kadınlar arasında en sık rastlanan kanser türü olduğu bildirilmiştir. Genel olarak dünya çapında her yıl 1.000.000'dan fazla kadın meme kanseri tanısı almaktadır. Meme kanseri tanısı almış kadınların 400.000'inden fazlası bu hastalık nedeniyle hayatlarını kaybetmektedirler [5]. Son 50 yıldaki verilere bakıldığında meme kanseri insidansının arttığı ancak mortalitesinin değişmediği gözlemlenmiştir [6].

2.1.1. Meme kanserinin sıklığı

Kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı kıtalara, ülkelere ve hatta aynı ülkede yaşayan farklı etnik kökene sahip gruplara göre değişiklik göstermektedir. Amerika'da beyaz ırkta meme kanseri görülme sıklığı 0,00105 iken siyahi ırkta meme kanseri görülme sıklığı 0,00087 olarak bildirilmiştir [7]. Avrupa kıtasının güneyinde ve doğusunda meme kanseri sıklığının az olması ise bu bölgelerde sanayileşmenin daha az olması ile ilişkilendirilmiştir.

Yaşa göre bir inceleme yapıldığında, 30 yaş öncesi meme kanseri vakalarının nadir olduğu, menopoz döneminde riskin aktif üreme dönemindekine göre biraz azaldığı, postmenopoze dönemde de yavaşça artan bir sıklıkla karşımıza çıktığı bilinmektedir [8].

2010 yılında kadınlarda görülen kanserlerin %28'ini meme kanserinin oluşturacağı beklenmektedir (Şekil 2-1) [9]. Meme kanseri bölgesel kanserler arasında sıklığı en fazla olan kanser türüdür [10].



Şekil 2-1: 2010'da kadınlarda görülmesi beklenen kanser türlerinin sıklığı [9]

2.1.2. Meme kanserinin mortalitesi

Meme kanseri mortalitesi yaşa bağlı olarak artmakla beraber ülkeler arası farklılık göstermektedir. İngiltere'deki mortalite oranının Japonya'dakinden on kat fazla olduğu ve bu değerün dünyanın en yüksek mortalite değeri olduğu bilinmektedir [11].

Meme kanseri nedeni ile gerçekleşen ölümlerin başlıca sebebi, primer tümörden ayrılarak dolaşım yolu ile vücuda dağılan tümör hücrelerinin uzak bölgelerde tümör odakları meydana getirmesidir [12]. Metastatik meme kanseri, sağkalım ortalaması 18-24 ay olan ve tedavi edilemeyen bir hastalıktır [13]. Uzak metastaz yapmış meme kanseri için kür elde etme şansının olmadığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [14]. İleri evredeki meme kanseri hastalarının çoğunda kemik metastazları olduğu gözlenmektedir [15]. Fakat kanser hücrelerini uzak metastaz yapmaya yönlendiren mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır.

2.1.3. Meme kanserinin histopatolojik sınıflaması

Meme kanseri histopatolojik olarak Tablo2-1' de [16] gösterildiği gibi sınıflandırılmaktadır.

Tablo 2-1: Meme kanserinin histopatolojik sınıflandırılması**I. Memenin Epitelyal Tümörleri****A- Benign Tümörler**

- a) İntraduktal papillom
- b) Meme başı adenomu
- c) Adenom

B- Malign Tümörler

- a) İnvaziv olmayan tümörler
 - i. İn situ duktal karsinom
 - ii. İn situ lobüler karsinom
- b) İnvaziv olan Tümörler
 - i. İnvaziv duktal karsinom
 - ii. İntraduktal bileşenleri baskın invaziv duktal karsinom
 - iii. İnvaziv lobüler karsinom
 - iv. Müsinöz karsinom
 - v. Medüller karsinom
 - vi. Papiller karsinom
 - vii. Tübüler karsinom
 - viii. Adenoid kistik karsinom
 - ix. Sekretuar (juvenil) karsinom
 - x. Apokrin karsinom
 - xi. Metaplastik karsinom
- c) Meme başının Paget karsinomu

II. Memenin konnektif doku ve epitelyal doku karışık tümörleri**III. Memenin çeşitli tümörleri****IV. Sınıflandırılmayan tümörler****V. Meme displazisi-fibrokistik hastalık**

VI. Memenin tümöre benzer lezyonları

İnvaziv olmayan karsinom türlerinden olan in situ duktal karsinomlarda (DKIS) malign hücrelerin çoğalması, duktuslar ile membranla çevrili boşluklar içerisinde sınırlıdır. DKIS'nin komedo, papiller, solid, kribriform ve mikropapiller karsinom gibi alt türleri bulunmaktadır [16]. Bu alt tipler ile nüks gelişimi arasında bir ilişkinin olduğu belirtilmiş ve komedo tip karsinomların nüks riskinin diğer alt tiplerden daha fazla olduğu bildirilmiştir [16, 17]. İn situ lobüler karsinomlar (İSLK) ise lobulusları doldurup genişleten tek tipte, yuvarlak, küçük ve kohesiv olmayan hücrelerin çoğalması ile belirlenir [16]. DKIS ve İSLK türlerinin ikisinde de bazal membran tutulumu görülmemektedir.

İnvaziv duktal karsinomlar, invaziv karsinomların en sık görülen alt tipidir. Bu tip tümörler, düzensiz sınırlıdır ve stromaya doğru ince uzantılar oluştururlar. Ayrıca bu tümör dokusunda nekrotik odaklar görülebilir ve iç kısımlardaki kas dokusuna invaze olabilirler [16].

İntraduktal bileşenleri baskın olan invaziv duktal karsinomda invaziv karsinom alanının %25 veya daha fazlası intraduktal karsinoma hücrelerinden oluşmaktadır [16].

İnvaziv lobüler karsinomada ise (İLK) doku sınırları düzensizdir ve gözle görülür bir kitle oluşturmayabilir. Tümör hücreleri normal duktuslar etrafında halkasal şekilde sıralanırlar ve hedef tahtası görünümüne sahip olabilirler. %70-95'i östrojen reseptörü pozitif, %60-70'i progesteron reseptörü pozitifdir. Pleomorfik tip dışında HER-2/neu genellikle negatiftir [16].

Müsinöz karsinomlar, hücre dışına saldıkları müsinöz madde içerisinde çoğalan karsinomlardır. Hormon reseptörleri genellikle pozitif, HER-2/neu negatiftir ve prognozları iyidir [16].

Medüller karsinomlarda nekroz ve kanama sık görülürken hücre sınırları belirgin değildir. İmmünohistokimyasal özellikleri İDK'lere benzemektedir [16].

Papiller karsinomlar seyrek görülürler. Tümör dokusunda papiller yapılara rastlanır ve daha çok postmenopoze kadınlarda görülmektedir [16].

Tübüler karsinomlar İDK ile aynı görüntüye sahip fakat daha küçük hücreli, iyi diferansiye tek tip hücrelerden oluşmaktadırlar. Hemen hemen hepsinde östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, erb-b2 negatiftir [18].

Adenoid kistik karsinomların agresiflik potansiyeli düşüktür. Histolojik olarak tükürük bezi tümörlerine benzer yapıdadırlar [18].

Sekretuar karsinomlar nadir görülen, düşük gradlı, prognozu iyi olan genç hastalarda görülen karsinomlardır. Hasta yaşı ilerledikçe prognozun kötüye gittiği bildirilmiştir [18].

Apokrin karsinomu meydana getiren hücreler, invaziv ve intraduktal karsinoma hücrelerinin apokrin özellik içeren türlerinden oluşurlar ve prognostik açıdan diğer invaziv duktal karsinomlardan farkları yoktur. Apokrin karsinomların çoğu kistik hastalık sıvı proteini (GCDFP-15 / Gross Cystic Disease Fluid Protein) pozitifdir [19].

Metaplastik karsinomlar diğer türlere göre daha kötü prognoza sahip olan, agresif seyreden, yüksek gradlı ve nadir görülen lezyonlardır. Tüm malign meme lezyonlarının %1'den azını oluştururlar [20, 21]. Bu karsinom türünde hormon reseptörlerinin anlatım düzeylerinin düşük

olduğu gözlenmiştir [22]. Bu karsinomlarda, lokal nüks riski invaziv duktal karsinoma göre daha yüksektir [23].

2.1.4. Meme kanserinin moleküler tipleri

Meme kanserinde moleküler alt tipler, sağkalım, sistemik ilaç tedavisine yanıt, nüksün saptanması ve prognozun belirlenmesi nedeniyle önemlidir. Yapılan çalışmalarda farklı meme kanseri türlerinde çeşitli moleküllerin anlatımlarının farklı olduğu gözlenmiş ve Tablo 2-2'de görülen moleküler alt sınıflar belirlenmiştir [17, 24, 25].

Tablo 2-2: Meme kanseri moleküler alt tipleri

1. Luminal Hücre Benzeri
 - Luminal A
 - Luminal B
2. Bazal Hücre Benzeri
3. Erb-B2 pozitif olanlar
4. Normal (sınıflandırılmamış)

Luminal A ve B grupları östrojen reseptörü (ÖR) açısından pozitif gruplardır. Luminal A tipi yaklaşık %45 oranında görülen, düşük gradlı, diferansiye ve kemoterapiye yanıtı iyi olmayan ancak hormon tedavisine iyi yanıt veren, kabul edilebilir düzeyde sağkalım oranına sahip olan kanser türüdür [26]. Luminal A grubunda östrojen reseptörünün anlatımı luminal B grubundan daha fazladır. Luminal B grubuna dahil bazı vakalarda erb-B2 pozitifliği görülmektedir [27, 28]. Luminal A ve Luminal B gruplarında p53 gen mutasyonlarına sık rastlandığı bildirilmiştir [29, 30].

Bazal hücre benzeri alt tipi, hormon reseptörleri açısından negatiftir. "Triple negatif" olarak adlandırılan olgular bu gruba dahildirler [28]. Son

zamanlarda, bazal hücre benzeri grubun da kendi altında heterojen gruplar barındırdığı ve bu nedenle alt gruplara ayrılması gerektiği düşünülmektedir [29, 30].

Bazal hücre benzeri ve erb-B2 pozitif olan tümörlerde uzak metastaz geliştirme riski daha fazladır. Luminal A tip meme kanseri en iyi prognozu, luminal B tipi ise orta düzeyde iyi prognozu göstermektedir [31].

Fan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanseri için prediktör önemi olan “70-gen işareti” [32, 33], “Yara yanıtı” [34, 35], “Rekürrens skoru” [36] ve “İntrinsik biyolojik alt tipler” [25, 27, 31, 37] olmak üzere dört farklı gen anlatım profil sistemi test edilmiştir. Bu çalışma sonunda dört farklı anlatım profili sisteminin standart klinik prediktörlere göre prognostik açıdan çok önemli veriler sağladığı bildirilmiştir. Meme kanserinin, bazal hücre benzeri, HER2(+) ve ER(-) ya da luminal-B olarak sınıflandırılan alt tipleri “70-gen işareti”, “Yara yanıtı” ve “Rekürrens skoru” modellerine göre kötü prognoz grubunda değerlendirilen alt tiplerdir [38].

2002 yılında ilk kez Van't Veer ve arkadaşlarının ileri sürdüğü “70 gen işareti” isimli gen anlatım profilinde, lenf nodu negatif ve tümör büyüklüğü 5cm'den küçük olan meme kanseri vakaları 5 yıl takip edilmiş ve uzak metastaz geliştiren ve geliştirmeyen vakalara ait dondurulmuş tümör doku örneklerinde çok sayıda genin anlatım profilleri incelenmiştir. Bu incelemenin sonucunda 70 genden oluşan bir grubun prognozu tahmin etmede son derece yararlı olduğu gösterilmiştir [32,33]. Buna göre prognozunun iyi olması beklenen hastalara sadece hormon tedavisi uygulayarak, hastaları kemoterapinin toksik etkilerinden korumanın mümkün olacağı ileri sürülmüştür. 2008 yılında FDA tarafından onaylanan ve MammaPrint® ismi verilerek patentlenen “70-gen işareti” prognostik

faktör olarak kullanıma sunulmuştur [39]. MammaPrint® halen EORTC bünyesinde MINDACT (Microarray In Node-negative and 1 to 3 positive lymph node Disease may Avoid ChemoTherapy) isimli ve 6000 hastayı kapsayan bir faz III çalışması olarak yürütülmektedir [39, 40].

“Rekürrens skoru” östrojen reseptörü pozitif, lenf nodu negatif olan vakalarda 21 genin anlatımına bakılarak 10 yıl içindeki rekürrens tahmin değerini veren anlatım panelidir [36]. Klinikte risk gruplarını belirlemek amacıyla ≤ 18 , $<18-31$, ≥ 31 şeklinde skorlama yapılmakta ve bu sisteme göre ≤ 18 skora sahip vakaların en düşük rekürrens riski taşıyan ve kemoterapiden en az fayda görecektir grup olduğu, ≥ 31 skora sahip vakaların ise en yüksek rekürrens riskine sahip olup kemoterapiden en çok fayda görecektir grup olduğu kabul edilmiştir [39, 41]. Böylece düşük riske sahip olan vakaların sadece hormon tedavisi alması, yüksek riske sahip vakaların ise kombinasyon tedavisi almasının doğru olacağı bildirilmiş ve bu anlatım paneli Oncotype Dx® olarak adlandırılarak patentlenmiştir [39].

Tümör stroması ile yara iyileşmesi arasındaki benzerliklerden yola çıkılarak birtakım genleri “Yara yanıtı” adı verilen bir grupta toplayarak anlatım profili çalışmaları yapılmıştır [39]. Gruptaki genlerin yüksek anlatım gösterdiği vakalarda prognozun kötü olduğu bildirilmiştir [35]. Finak ve arkadaşlarının, tümör yatağı ve normal stroma hücreleri kullanarak yaptıkları 26 gen içeren “Yara yanıtı” anlatım analizleri sonucunda; prognozu belirlemede, “Yara yanıtı” anlatım profil sisteminin “70 gen işareti” anlatım profili sistemine göre daha belirleyici olduğunu göstermişlerdir [39, 42].

2.1.5. Meme kanserine genetik yatkınlık

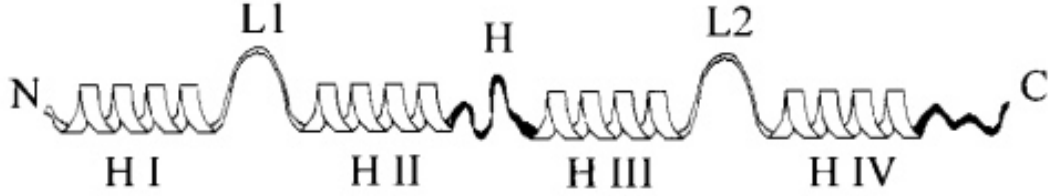
Genetik yatkınlık, meme kanserine yakalanan kadınların %5-30'u arasında görülmektedir [43-45].

Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %25'inin ailesel olduğu bildirilmiştir [45]. Bazı tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğramış formlarının ailesel olarak aktarımı, kanserin daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına neden olabilmektedir [46]. Ailesel meme ve over kanserleri vakalarının %5-10'unda BRCA1, BRCA2, CHEK2, TP53, PTEN genlerinde mutasyonlar olduğu bildirilmiştir. Bunlar arasından BRCA1 ve BRCA2 genleri yüksek penetranslı ve meme kanseri yatkınlığı ile ilişkili genlerdir [45]. BRCA1 ve BRCA2 genlerinin popülasyondaki tahmin edilen sıklığı sırasıyla 1/800 ve 1/1000 olarak hesaplanmıştır. Bu iki genin prevalansının ise etnik köken ve coğrafik bölgelere göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Meme ve over kanseri vakalarının tümü göz önünde bulundurulduğunda bunların arasında BRCA1 mutasyonu taşıma sıklığının %1-7 civarında, BRCA2 mutasyonunun ise %1-3 civarında görüldüğü bildirilmiştir [45].

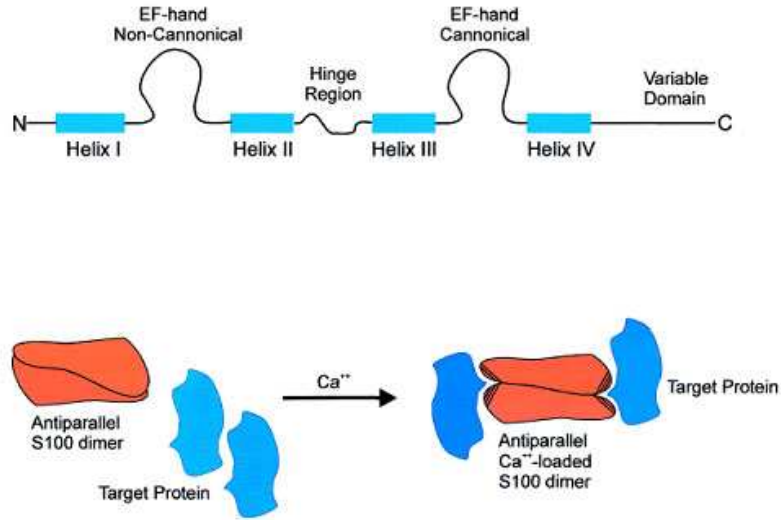
2.2. S100 proteinleri ailesi

S100 gen ailesi, hücre içi ve hücre dışı birçok aktiviteyi düzenleyen mekanizmalarda rol oynayan 20 genin oluşturduğu bir ailedir. S100 ailesi, ismini amonyum sülfat çözeltisinde %100 oranında çözünebilme yeteneğinden ötürü almıştır. Bu gen ailesinin üyeleri, bünyelerinde N-terminal ve C-terminal heliks-döngü-heliks modelinde EF-el yapısı olarak adlandırılan bir yapı taşımaktadırlar (Şekil 2-2). Moleküler ağırlıkları 9-12 kDa arasında değişen bu moleküller [47, 48] genellikle homodimerler veya heterodimerler halinde bulunurlar ve asidik özellik gösterirler [49]. Biyolojik olarak aktif olabilmeleri homodimerler ya da heterodimerler halinde bulunmalarına bağlıdır [50]. Homodimer yapıyı oluşturmak için iki EF-el bölgesi özel bir bağlantı (H) noktası ile birbirlerine tutunurlar. C-terminal uçtaki EF-el bölgesinin hemen ardından gelen C-terminal uzantı

dizisi yer almaktadır. S100 ailesi proteinlerini birbirinden ayıran özellik, H bölgesinin uzunluğu ile C-terminal baz dizisinin farklılığıdır [47].



Şekil 2-2: S100 Proteinlerinin genel şekli; H I, H II, H III, H IV; Heliks döngü heliks yapıları, L1 ve L2; kalsiyum bağlanma bölgeleri, H: bağlantı bölgesi.



Şekil 2-3: S100 proteinlerine kalsiyum bağlanması ve hedef proteinler ile etkileşimi [51]

Bugüne kadar keşfedilen S100 ailesi proteinlerinin her birinin farklı görevlere sahip olduğu gösterilmiştir [52]. S100 ailesindeki proteinlerin genel rolü hücre morfolojisini düzenlemektir. Bunlar arasında mikrotübüller, mikrofilamentler, intermediate filamentler, miyozin,

tropomiyozin gibi hücre iskeleti elementlerinin yapımı ya da yıkılması ile hücre iskeleti bileşenlerine ait dinamiklerin kontrolü, hücre büyümesi, hücre iskeleti, hücre döngüsünün kontrolü gibi görevler sayılabilir [47, 53].

S100 ailesi proteinlerinin kanser oluşumundaki rolü tam olarak bilinmemekle beraber bu aileye mensup proteinlere kalsiyumun bağlanmasıyla protein molekülünün yapısında meydana gelen şekilsel değişikliklerin diğer proteinlerle etkileşimi değiştirdiği ve kansere yol açtığı düşünülmektedir [47]. S100 ailesi proteinlerine kalsiyum bağlandığında homodimer ya da heterodimer yapılarında şekilsel değişiklik meydana gelmekte ve bu değişiklik hedef proteinlerle etkileşimi sağlamaktadır (Şekil 2-3) [51].

2.2.1. S100A4

S100A4 geni, 20 farklı üyeyi içeren S100 ailesinin bir üyesidir. Bu gen, farklı zamanlarda farklı bilim adamları tarafından klonlandığından keşfedildiği ilk andan günümüze kadar MTS1, P9Ka, FSP1, CAPL, calvasculin, PEL98, metastasin, 18A2 ve 42A gibi birçok farklı isimle anılmıştır [54, 55].

S100A4 geni, 1.kromozomun q kolunda lokalize olan ilk iki ekzonu anlatım yapmayan 4 ekzonlu bir gendir [54]. S100 ailesinin diğer üyeleri gibi S100A4 molekülü de hücre içi kalsiyum iyonları tarafından düzenlenir [56]. 101 amino asitten oluşan S100A4 proteini kalsiyum bağlayan iki EF-el taşımaktadır [49]. C-terminal uçta bulunan kalsiyum bağlayıcı bölgenin afinitesi N-terminal uçtaki bölgeden 100 kat daha fazladır [47].

S100A4 proteinine kalsiyum bağlandığında, hedef proteinlerin bağlanmasını kolaylaştıran bir şekil değişikliği meydana gelir. Katlanan molekülde hidrofobik cepler oluşur [49]. Kalsiyum iyonunun bağlanmasıyla şekil değişikliğine uğrayan S100A4 molekülü p53, kas dışı

miyozin II, tropomyozin ve F-aktin gibi hedef proteinlerle etkileşime girmektedir [56-59].

S100A4, kas ve kas dışı hücrelerdeki miyozin ile etkileşim halinde olan bir moleküldür [53, 57-63]. S100A4'ün birçok hücre soyunda kas dışı tropomyozini bağladığı ve mikrofilamentler ile yer değiştirdiği bildirilmiştir [53, 58, 63, 64]. NIH-3T3-fibroblast hücre soyunda S100A4'ün kas dışı tropomyozine bağlandığı ve mikrofilament destelerinde hücre iskeleti proteinleri ile ilişki içinde olduğu gösterilmiştir [53]. Bu etkileşimin gerçekleşmesi ile kas dışı miyozin ağır zincirinin protein kinaz C (PKC) ve kazein kinaz (CK-2) tarafından fosforillenmesi engellenmiş olur [50, 59]. S100A4, PKC'ye bağımlı olarak miyozin ağır zincirinin fosforillenmesine engel olur. Bu durum metastatik hücrelerde hücre iskeleti dinamiklerini değiştirir [53].

Yapılan çalışmalarda, S100A4 geninin metastazda önemli bir mekanizma olan epitelyal hücrelerin mezenkimal hücrelere değişmesi (EMT) sırasında meydana gelen fibrozisin göstergesi olduğu bildirilmiştir [65]. S100A4 "fibroblast özgün protein" ismini (FSP1) bu özelliğinden dolayı almıştır [65].

Metastatik tümör hücre soylarında ve epitelden mezenkimal tipe geçiş yapan hücrelerde S100A4 gen anlatımının yüksek olduğu gösterilmiştir [54]. Ayrıca, insan hücrelerinde S100A4 gen anlatımının değişmesinde β -katenin ve ekstraselüler faktörlerin rol oynadığı gösterilmiştir [54, 66, 67]. S100A4 mRNA düzeyinin metastatik meme kanserli farelerde metastatik olmayanlara göre daha yüksek olduğu ve aynı ilişkinin meme kanser hücre soyu ile benign hücre soyu arasında bulunduğu bildirilmiştir [68-70].

S100A4 proteininin C-terminal bölgesindeki 82'den 101'inci pozisyona kadar olan aminoasitlerin değişime uğramasının metastatik potansiyeli değiştirdiği ileri sürülmüştür. C-terminal uçta bulunan 82-101. aminoasitlerin metastaz potansiyeli, bu bölgede oluşturulan delesyonların incelenmesiyle açığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Bu bölgedeki delesyonlarla oluşturulan mutant genler sıçanlara transfekte edilmiş, bunların metastaz ve invazyon yetenekleri araştırılmıştır. Bu araştırmaların sonucunda mutasyona uğratılmış gen bölgelerine sahip sıçanlarda metastatik progresyonun daha yavaş olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, 100 ve 101. pozisyonlardaki iki lizin aminoasidinin alanin aminoasidine dönüştürüldüğu transfekte mutantlarla farelerde metastatik aktivitenin gerilediği gösterilmiş ve bu iki lizin aminoasidinin metastatik potansiyel açısından önemli olduğu kanıtlamıştır[4].

Metastatik olan ve olmayan meme kanserinde, S100A4 geninin metastatik aktiviteyi değiştirdiği öne sürülen C-terminal bölgesinin yapısal farklılıklarını ortaya koyan bir çalışma henüz literatürde mevcut değildir.

2.2.2. S100A4'ün prognostik önemi

S100A4 proteininin birçok kanser türünde prognostik faktör olabileceği gösterilmiştir. S100A4 geni gerek prognostik ve metastatik potansiyeli değiştirme yönünden, gerekse tedavi açısından hedef olabilecek bir moleküldür [71]. İnsan tümör hücrelerinde S100A4'ün varlığı ve bu hücrelerdeki anlatım düzeyi, hastalığın seyrini belirleyici bir faktör olabilir[55]. Rudland ve arkadaşları, 349 hastayı içeren çalışmalarında, tümör örneklerinde S100A4 proteini negatif olarak saptanan hastaların %80'inin 19 yıllık takibin ardından sağ olduklarını, S100A4 pozitif olan hastaların ise sadece %11'inin hayatta kaldığını bildirmişlerdir. Yine aynı

çalışmada S100A4'ün evre-I ve evre-II meme karsinomlu hastalar için sağkalımda çok önemli prediktör bir molekül olduğu vurgulanmıştır [72].

2.2.3. S100A4'ün metastazdaki rolü

Tümör oluşumu ve metastazda kompleks mekanizmalar rol oynamaktadır. Bu karmaşık mekanizmalardan biri de S100A4 molekülüne ilişkin bulgulardır [4, 73-75]. Bunun dışında S100A4 gen anlatımının, hücrelerin birbirlerine ve bazal laminaya tutunmasında önemli bir faktör olan E-kaderin (CDH1) geni ile ters ilişkili olduğu ve sağkalım süresinde azalmaya ve metastaz gelişimine yardımcı olduğu bildirilmiştir [76, 77].

S100A4'ün C-Terminal bölgesinde meydana gelen mutasyonların miyozinIIA molekülüne bağlanma yeteneğini azalttığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak in vitro koşullarda hareket ve invazyon yeteneği daha düşük, in vivo koşullarda ise metastaz yapabilme kabiliyeti daha az olan hücrelerin meydana geldiği bildirilmiştir [4]. C-terminal bölgenin metastatik aktiviteyi arttırma açısından önemli olduğu, bu bölgede oluşturulan transfeksiyonlar ile daha önceki çalışmalarda da ispatlanmıştır [4].

S100A4 geninin farklı birçok kanser türü için prognostik önemi olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir [72, 78-80]. Helfman ve arkadaşları yaptıkları araştırmalar sonucu S100A4'ün tiroit, meme, melanoma, prostat, mide, kolorektal ve mesane kanseri gibi kanser türleri ile ilişkisi olduğunu ve S100A4 gen anlatımı artışının tümör agresifliğini belirleyen lenf nodu metastazı, invazyon derinliği ve peritoneal yayılım gibi birçok faktör ile doğru orantılı olduğunu göstermişlerdir [71].

2.3. Total kalsiyum

Kalsiyum hücre döngüsünün ve transkripsiyonun kontrolü, hücre farklılaşması, hücre motilitesi, apoptoz gibi birçok hayatsal fonksiyonu kontrol edebilen çok yönlü bir iyondur [81, 82].

Periferik kanda total kalsiyum konsantrasyonu 8,5-10,5 mg/dL değerleri arasında olmak üzere dar bir aralıkta tutulmaktadır (Tablo 2-3) [82]. Total kalsiyum düzeyi ölçülürken lipemik ya da hemolizli kan örnekleri yanıltıcı sonuçlara neden olmaktadır. Bu nedenle doğru sonucun alınması için ölçüm yapılacak gereçin dikkatle seçilmesi gerekmektedir [82].

Kanda fizyolojik olarak aktif olan serbest kalsiyum iyonları "iyonize kalsiyum" olarak adlandırılmaktadır. Kalsiyumun, bikarbonat ve sitrat gibi anyonlar ile bileşik oluşturduğu türüne "kompleks kalsiyum" adı verilmektedir. İyonize ve kompleks kalsiyum genel olarak "diffüze olabilen kalsiyum" olarak tanımlanmaktadır. Çünkü bu moleküller biyolojik membranlardan geçme yeteneğine sahiptir. Albümin ve globulinlere bağlı olarak bulunan kalsiyuma ise "proteine bağlı kalsiyum" denir ve proteine bağlı olan kalsiyum kompleksi membranlardan geçemez. Proteine bağlı kalsiyumun %80 kadarı albumine, geri kalanı da globulinlere bağlanır. Proteine bağlı kalsiyumun görevi, iyonize kalsiyumun şiddetli artışı esnasında tampon görevi görüp serbest kalsiyum konsantrasyonunu ve etkilerini %50'lere kadar değiştirmesidir [83].

Kalsiyumun proteinlere bağlanmasında pH önemli bir parametredir; alkali ortamlarda proteine bağlı kalsiyum artar ve iyonize kalsiyum azalır. Bunun nedenlerinden biri bağlanma noktalarında hidrojen ve kalsiyum arasında kompetitif bir durumun ortaya çıkması, diğeri de albümin molekülünün konfigürasyonunun pH ile değişmesidir. Ortam pH'ı yükseldiğinde bikarbonat azalır ve kalsiyum bikarbonat oluşamadığı için iyonize kalsiyum miktarı azalır [83].

Kalsiyumun homeostatik sistemini etkileyen faktörler paratiroid hormon (PTH), D vitamini ve magnezyumdur. İyonize kalsiyumdaki küçük bir azalma PTH sekresyonunun hızlı bir şekilde artmasına neden olur ve

kemikteki kalsiyumun serbest bırakılmasını kolaylaştırır. Kemikteki kalsiyumun serbest kalması, D vitamininin aktif formu olan 1,25-dihidroksikolekalsiferol (1,25-DHCC) molekülünün varlığını gerektirir. PTH'ın bu etkisi ile, kalsiyumun kemikten ekstrasellüler sıvıya taşınması sağlanır. İyonize kalsiyum yeterli düzeye ulaştığında, PTH osteoklastların sayısında artışa neden olarak kemik yapımını hızlandırır. Aynı zamanda PTH'ın, böbrek üzerine etkisi sayesinde serum kalsiyumunun dengesi de sağlanmış olur. PTH, renal kortekste bulunan reseptörlere bağlanıp adenilat siklaz enzimini aktive ederek siklik adenozin monofosfat (cAMP) artışını sağlar, kalsiyum ve magnezyumun tübüler geri emilimini artırır ve fosfat, sodyum, bikarbonat, potasyum ve aminoasitlerin geri emilimini azaltır [83].

D vitamini serum kalsiyum seviyesini arttırmada farklı mekanizmalar kullanmaktadır. 1,25-DHCC, PTH'ın kemik üzerindeki etkisini düzenleyen bir enzimdir. Ayrıca D vitamini, intestinal kalsiyum emilimini, kemik rezorpsiyonunu ve kalsiyumun tübüler geri emiliminin arttırılmasını sağlamaktadır. Kalsiyumun intestinal geri emilimi ve kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkisi aslında aktif metabolit 1,25-DHCC'e bağlıdır. Bunun yanında başka metabolitler de serum kalsiyum düzeyi üzerinde farklı etkiler yaratabilmektedir. Kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyen diğer metabolitler arasında fosfor ve magnezyum da sayılabilir. Serumdaki fosfat seviyesindeki artış, kalsiyum konsantrasyonunu düşürmektedir. Bunun sebebi kalsiyumbifosfatın fazla üretimidir. Serumdaki fosfat konsantrasyonunun azalmasıyla, iyonize kalsiyum ve kemiğin ekstrasellüler sıvısındaki kalsiyumun artışı gerçekleşir [83].

Tablo 2-3: Kalsiyum iyon değerleri ve oranları [83]

Kalsiyum değerleri	Desilitre Başına mg (mg/dL)	Yüzde (%)
İyonize (Serbest)	4.40	44
Diffüze olabilen, Total	5.60	56
Proteine Bağlı	4.60	46
Kompleks	1.00	10
Total	10.00	

2.3.1. Kalsiyum sinyal mekanizması

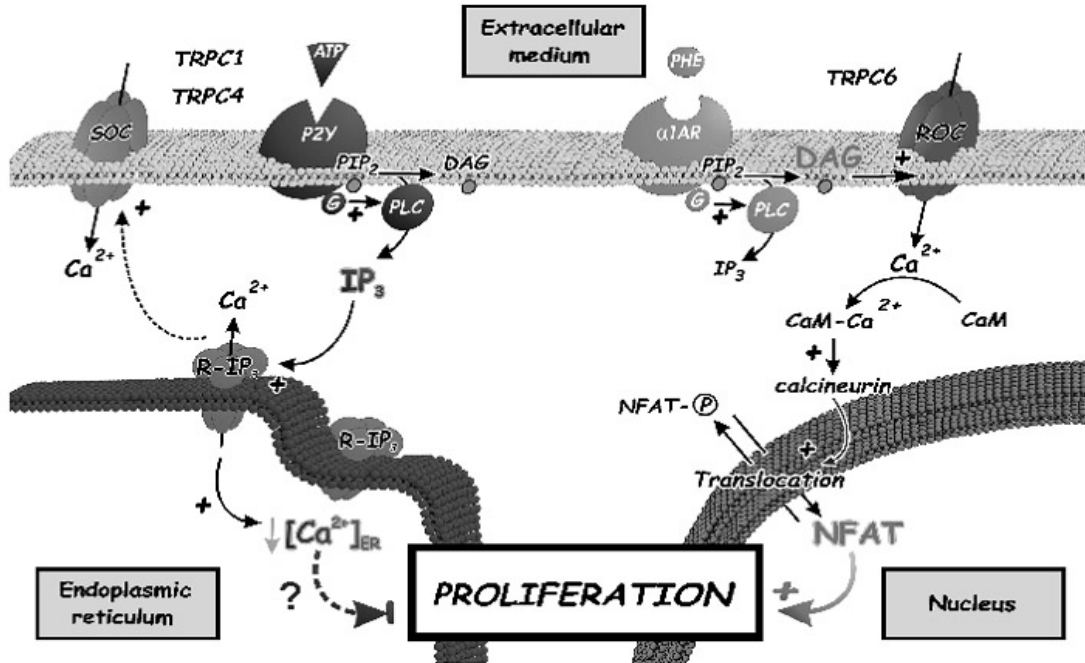
Hücre fonksiyonu için gerekli kalsiyum ya hücre içindeki intraselüler kalsiyum depolarından ya da ekstrasellüler alandan plazma membranını geçerek hücreye diffüze olan kalsiyum iyonlarıyla sağlanır. Hücre içinde kalsiyumu en çok depolayan ve kalsiyum sinyalinde görev alan organel endoplazmik retikulumdur. Kalsiyumun çok miktarda bulunduğu diğer organeller mitokondri ve nükleustur [84].

Kas hücrelerindeki kalsiyum kaynağı sarko-endoplazmik retikulum içinde depolanan kalsiyumdur. Kalsiyum iyonunun sarkoplazmik retikulumdan akışı ise iki farklı kalsiyum kanalı aracılığı ile yapılmaktadır[85]. Bu kanallardan birincisi, inositol 1,4,5-trifosfat reseptörleri (InsP₃R), ikincisi de ryanodin reseptörleri (RYR) olarak bilinmektedir. InsP₃, hücre içi kalsiyum deposu olan endoplazmik retikulum üzerindeki reseptörlere bağlanarak kalsiyumun serbest kalmasında görev alır. InsP₃'ün, kalsiyumun mitokondriyal olmayan depolarından kalsiyum akışını sağlamada görevli olduğu bilinmektedir. InsP₃ reseptörleri üç çeşitir ve üçü birbirinden farklı özellikteki kalsiyum dalgaları ile aktive olur. RYR, intraselüler kalsiyum akışını sağlayan diğer bir reseptördür. RYR'lerin ligandı yine kalsiyumun kendisidir, bu nedenle "Kalsiyum ile indüklenen kalsiyum reseptörleri" olarak isimlendirilir [84].

RYR'lerin sinyal iletme yeteneği, sitoplazmadaki kalsiyum, magnezyum, adenozin trifosfat (ATP) ve fosforilasyon ile düzenlenir. Magnezyum inhibitör etki yaratırken ATP, RYR'yi aktive eder. Sitoplazmada kalsiyum iyon konsantrasyonu 1-10 μ M arasında olduğunda kalsiyum kanalları açılır ve konsantrasyon 1mM'ın altına indiğinde kapanır [86].

Sarko-endoplazmik retikulum aynı zamanda hücre içerisindeki kalsiyum depolarını sarko-endoplazmik retikulum kalsiyum pompaları (SERCA) aktivitesi ile tekrar doldurarak intraselüler kalsiyumun azalmasında rol alır [85].

Plazma membranından kalsiyum geçişini düzenleyen farklı mekanizmalar ve kanallar bulunmaktadır (Şekil 2-4). Bunlar voltaj ile çalışan kanallar, ligand bağımlı kanallar ve kalsiyum depoları ile kontrol edilen kanallardır ve her kanala ait farklı çalışma mekanizmalarının olduğu bildirilmiştir [86].



Şekil 2-4: Kalsiyuma bağlı sinyal mekanizması ve görevli bazı proteinler [87]

2.3.2. Kalsiyum sensörleri

Hücre içinde çok sayıda ve farklı görevler yapan kalsiyum bağlayıcı proteinler bulunur. Bunlardan bazıları tampon görevi yapar, bazıları ise kalsiyum sinyal iletisine aracılık eder ve bunlar genel olarak “kalsiyum sensörleri” olarak adlandırılırlar. Troponin-C ve Calmodulin gibi bazı kalsiyum sensörlerinin görevleri hakkında bilgi sahibi olunmasına rağmen S100 proteinleri ile Anneksin’lerin kalsiyum ile ilişkili sinyal ileti yollarında nasıl bir rol oynadıkları konusunda detaylı bilgi bulunmamaktadır [88]. Weber ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, malign melanomda S100B proteininin p53 gen anlatımını baskıladığı bildirilmiştir [88, 89]. S100B’nin p53 tümör baskılayıcı geni üzerindeki etkisinde kalsiyumun bir rolü olabileceği üzerinde durulmuştur. Kalsiyum sinyal mekanizmaları hakkında araştırmalar yapan Berridge ve arkadaşlarının, yayınladıkları çalışmada Anneksin’ler ve S100 proteinleri gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin hücre çoğalmasında da temel rol oynadığını ve araştırılmaları gerektiğini vurgulamıştır [88].

2.3.3. S100A4 ile kalsiyum ilişkisi

Ortamda kalsiyum yokluğunda S100A4 protein konsantrasyonunun $2\mu\text{M}$ ’ın altında olduğu, kalsiyum varlığında ise $20\mu\text{M}$ düzeylerinde ölçüldüğü ve dimerizasyon ya da oligomerizasyonların meydana geldiği bildirilmiştir [90, 91]. Buradan da anlaşıldığı üzere, S100A4’ün diğer proteinlere bağlanması ve biyolojik olarak aktif hale geçmesi için ortamdaki total kalsiyum konsantrasyonu son derece önemlidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta ve Kontrol Grupları

Hasta grubu, 2009-2010 tarihlerinde İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Cerrahi Anabilim dalına başvurmuş 35 DKIS tanılı hastanın periferik kan ve serum örneği ile İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü, Patoloji bilim dalı arşivinde DKIS'lu 4 hastanın parafin blok doku örneği dahil olmak üzere toplam 39 vaka (n=39) ($\bar{x}\pm sd$, 58,42±11,04) ve İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü'ne başvurmuş metastatik meme kanserli hastalara (n=50) ($\bar{x}\pm sd$, 53,76±12,20) ait periferik kan ve serum örneklerinden oluşturuldu. Ayrıca 1994-1998 tarihleri arasında toplanan 12 metastatik meme kanserli hastanın aynı kişiye ait tümör doku, normal doku ve periferik kan örnekleri de hasta grubuna dahil edildi (n=12) ($\bar{x}\pm sd$, 61,0±8,50). Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet açısından hasta grubu ile uyumlu kişilerden alınan sağlıklı periferik kan ve serum örnekleri (n=16) ($\bar{x}\pm sd$, 54,6±8,52) kullanıldı.

Kontrol grubu, böbrek ve karaciğer ile ilişkili bir hastalığı olmayan ve uzun süreli ilaç kullanmayan sağlıklı kişilerin periferik kan ve serum örnekleri ile oluşturuldu. Kontrol grubu yaş ve cinsiyet olarak hasta grupları ile eşleştirildi. Aynı yaş grubunda olan 6 hastaya karşılık 1 sağlıklı kontrol seçildi. Çalışmaya dahil edilen hasta ve incelenecek hasta materyali seçimi S100A4 geninin hücre içindeki görevi ile bu genin Türk popülasyonundaki durumu hakkında bilgi verecek şekilde yapıldı. Hasta ve kontrol grupları ile deney gruplarında incelenen gerecin dağılımı Tablo 3-1 de verildi (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Kontrol ve deney grupları ile gruplarda örnek dağılımı

Gruplar	Vaka Sayısı	Örnek Dağılımı	
		P.Kan ve Serum	Doku
DKIS	39	35	4
Metastatik Meme Kanseri	62	62	24
Kontrol Grubu	16	16	-
Toplam	117	113	28

Çalışma İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Kansere Genetiği Bilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma öncesi İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Etik Kurul Onay Tarihi 16.09.2009, Sayı:2552). Örnekleri alınan tüm hastalara ve kontrol grubuna çalışmanın kapsamını detayları ile anlatan gönüllü onam formu imzalatıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve KİT'ler

Borik Asit (H_3BO_3)	[MERCK]
Gliserol	[MERCK]
Sodyum Asetat (CH_3COONa)	[MERCK]
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	[MERCK]
Trisma Base (hidroksimetil aminometan)	[MERCK]
Bromfenol Mavisı (BFB)	[SIGMA]
Etidyum Bromid (EtBr)	[SIGMA]
Fenol	[SIGMA]
Proteinaz K	[SIGMA]

Etilen-Diamin-Tetraasetikasit (EDTA)	[SIGMA]
Agaroz	[SIGMA]
Dizi Analizi Kiti – DTCS Kit	[BECKMAN COULTER]
PZR Ürünlerini Saflaştırma Kiti	[ROCHE]
Primerler	[IDT]
Taq Polimeraz	[TALRON BIOTECH]
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	[TALRON BIOTECH]
DNA Marker	[FERMENTAS]
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	[FERMENTAS]
Kolorimetrik Kantitatif kalsiyum tayin kiti	[BIOASSAY SYSTEMS]

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Yüksek Hızlı Soğutmalı Santrifüj	[HERAEUS]
Soğutmalı Ependorf Santrifüj	[HERAEUS]
Santrifüjler, Soğutmasız	[HETTICH, JUAN]
Thermal Cycler	[TECHNE]
Mikropipetler	[GILSON]
pH-Metre	[N.E.L.]
Yatay Gel Elektroforez Tankları ve Jel Dökme Sistemleri	[BRL]
Vorteks	[FINEPCR]
Dizi Analizi Cihazı	[BECKMAN COULTER]
Bidistile Su Üretim Cihazı	[İNCEKARALAR]
İyonize Su Üretim Cihazı	[LABCONCO]
Ultra Derin Dondurucu (-80°C)	[SANYO]
Derin Dondurucu (-30°C)	[SANYO]
NanoDrop Spektrofotometre	[THERMO SCIENTIFIC]
Gel Dökümantasyon Sistemi	[BRL]
SpeedVac Konsantratör	[LABCONCO]
Etüvler (37°C ve 56°C)	[NÜVE]
Mikrodalga Fırın	[ARÇELİK]

Magnetik Karıştırıcı [NÜVE]
 Mikrokuyucuk Okuyucu RT-2100C [RAYTO LIFE AND
 ANALYTICAL SCIENCES CO]

3.1.4. Kullanılan tampon ve çözeltiler

3.1.4.1. DNA izolasyonu ve jel elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler

Hücre Parçalama Tamponu

- 10mM KHCO₃
- 155mM NH₄Cl
- 0.1mM EDTA (pH =8,0)

SE Tampon Çözeltisi

- 75mM NaCl
- 25mM EDTA (pH =8,0)
- 30mM Tris-HCl (pH =8,0)

TE Tampon Çözeltisi

- 20mM Tris-HCl (pH =8,0)
- 1mM EDTA (pH =8,0)

10X BFB Yükleme Tamponu

- %1 SDS
- 5mg Bromfenol Mavisi
- 2mL Gliserol

10XTEB (Tris-EDTA-Borik Asit) Tampon Çözeltisi

- 0.88 M Borik Asit
- 5M Tris
- 0.02 EDTA (pH =8,0)

%0.8'LİK AGARÖZ HAZIRLANMASI

- 0.8 gr Agaroz
- 100mL 0.5X TEB
- 5µL Etidyum Bromür (10mg/mL)

Etidyum Bromür: 10mg/mL

Proteinaz K: 20mg/mL

Fenol/Kloroform: 1:1

3.2. Yöntem

3.2.1. Tam kandan DNA izolasyonu

Çalışmada hasta ve kontrol grubundan alınan 10mL periferik kan örneklerinden Tablo 3-2'deki akış diyagramına göre DNA izole edildi.

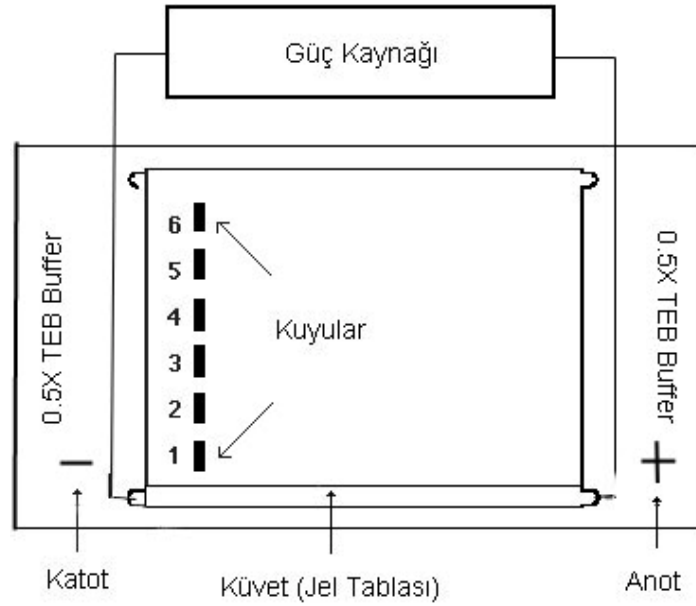
Tablo 3-2: Fenol-Kloroform Yöntemi ile Tam Kandan DNA İzolasyonu

1. 10 mL tam kan + 20 mL hücre parçalama tamponu
→ iyice karıştırıldı
2. +4°C'de 30 dk. bekletildi.
→ parlak kırmızı renk oluşmuş olmalıdır.
3. 3000g'de 10 dk. Santrifüj edildi
→ tüpün dibinde beyaz renkli pellet oluştu, üst faz atıldı.
4. Beyaz renkli pellet + 10 mL hücre parçalama tamponu
→ pellet çözülene kadar vortekslendi
5. 3000g 10 dk. Santrifüj edildi
→ üst faz atıldı
6. Beyaz renkli pellet + 4,5 mL SE Tamponu + 500 µL %10 SDS + 30 µL Proteinaz K (20mg/mL) eklendi
→ vortekslendi.
7. 37°C'de gece boyu inkübe edildi
8. + 5mL SE tamponu + 10mL Fenol/Kloroform (1:1) eklendi
→ vortekslendi
9. 3000g'de 5dk. Santrifüj edildi
→ vortekslendi
10. Üst faz + 10mL Fenol/Kloroform (1:1) eklendi
→ vortekslendi
11. 3000g'de, 5 dk. Santrifüj edildi
→ vortekslendi

12. Üst faz +20 mL izopropanol → DNA bulutu elde edildi.
13. DNA bulutu izopropanolden arındırılarak tüpten çıkarıldı ve 500 µL TE tamponu içinde çözüldü
14. Kullanılana kadar +4°C'de, uzun süreli olarak ise -80°C'de saklandı.

3.2.2. Horizontal agaroz jel elektroforezi

Fenol-kloroform yöntemi ile elde edilen, TE tamponunda çözülmüş DNA örneklerinin 1µL'si 9µL BFB-yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jele yüklendi (Şekil 3-1) ve 150-180V arasında elektroforez edildi. Elektroforez sonucu DNA'nın sağlamlığı UV altında görüntülenerek belirlendi.



Şekil 3-1: Horizontal agaroz jel elektroforez düzeneği

3.2.3. Tam kan örneğinden serum ayrıştırılması

Kan örnekleri, hastalardan özel vakumlu serum tüplerine 5 mL alındı ve 1500 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek serum fazı, lenfosit ve eritrositlerden ayrıştırıldı. Santrifüjleme sonrasında serum fazı üstte kaldı. Eritrositlerden oluşan hücre fazı ise dibeye çöktü. İşlem sonucunda üst fazda

toplanmış olan serum, pipet yardımı ile alınarak ultra derin dondurucuya dayanıklı tüplere ayrıştırıldı. Her bir serum tüpü -80°C ultra derin dondurucuda total kalsiyum düzeyi ölçülene kadar saklandı.

3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

3.2.4.1. Primer dizaynı

Çalışmamızda, C-Terminal bölgesinin metastaz potansiyeli geliştirme açısından önemli olduğu gösterilen S100A4 proteininin 82-101. kodonlar arasını kapsayan Forward (5'-CCTCCCTGAACTCTGGTCTG-3') ve Reverse (5'-TTAGTCACCCTGCATCCCTC-3') olmak üzere iki ayrı primer "Oligo Analyser" bilgisayar programı kullanılarak dizayn edildi (www.idtdna.com). S100A4 geninin C-terminal ucuna ait primerlerin çoğaltacağı bölgenin uzunluğu 545 baz çifti olarak hesaplandı.

3.2.4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

S100A4 geninin C-terminal bölgesinin çoğaltılması için dizayn edilen primer çifti ile hasta ve kontrol grubu örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu 50µL'lik hacimde Tablo 3-3'de bildirilen bileşenler kullanılarak Tablo 3-4'de detayları verilen program ile gerçekleştirildi.

Tablo 3-3: PZR içeriği

1 Reaksiyon İçin (V=50µL);	
10X PZR Tamponu	5 µL
10mM dNTP Karışımı	1,2 µL
25mM MgCl ₂	2,5 µL
30mM F-Primer	0,4 µL
30mM R-Primer	0,4 µL
5u/µL Taq	0,5 µL
dH ₂ O	39 µL
DNA örneği (250ng)	1 µL

Tablo 3-4: PZR koşulları

PZR Adımları	Sıcaklık (°C)	Süre	
Başlangıç Denatürasyonu	94	4 dk.	
Denatürasyon	94	20 sn.	
2x Döngü	Yapışma	20sn.	
	Uzama	1 dk.30sn	
	Denatürasyon	94	20 sn.
2x Döngü	Yapışma	60	20sn.
	Uzama	72	1 dk.30sn
	Denatürasyon	94	30 sn.
40x Döngü	Yapışma	56	30sn.
	Uzama	72	2 dk.
Reaksiyon Sonu	4	∞	

3.2.5. PZR ürünlerinin saflaştırılması

S100A4 geninin PZR ile çoğaltılan C-terminal ucuna ait bölgenin DNA dizileme işleminden önce PZR'den arta kalan bileşenleri uzaklaştırmak amacıyla ticari kit yardımı ile (High Pure PZR Product Purification Kit - Roche GmbH) PZR ürünleri saflaştırıldı. Saflaştırma işleminde hazır kolonlar kullanıldı. Buna göre PZR ürününün "Kolona bağlama solüsyonu" ile karıştırılmasının ardından karışım kolona yüklendi ve 13.000 rpm'de, 2 dk. santrifüjlendi. Kolonun, yıkama solüsyonları ile iki kere muamelesinden sonra PZR ile çoğaltılan bölge, PZR reaksiyon artıklarından arındırılmış oldu. Kolona bağlı bulunan yıkanmış PZR ürünü 13.000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenerek temiz bir tüpe aktarıldı. Böylece PZR ürünü bir tür dizi analizi reaksiyonu olan Dye Terminator Cycle Sequencing reaksiyonu (DTCS) için uygun hale getirildi.

3.2.6. Dizi Analizi

PZR ürünü saflaştırma işleminden sonra saflaştırılmış PZR ürünlerinin kolonda kalıp kalmadığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra dizi analizi işlemi için örneklerin bir bölümü laboratuvarımızdaki Beckman Coulter (CEQ 8000) dizi analizi cihazında dizilenmek üzere DTCS reaksiyonuna tabi tutuldu (Tablo3-5). Diğer bir bölümü ise NanoDrop'ta PZR ürün konsantrasyonu belirlendikten sonra uluslararası DNA dizileme şirketine (Macrogen Inc. Korea) analiz için gönderildi.

Laboratuvarımızda gerçekleştirilen dizi analizi işlemlerinde DTCS reaksiyonundan hemen sonra, reaksiyon ürünü 1:2:2 oranında glikojen-sodyum edta-sodyum asetat karışımı ile muamele edilerek reaksiyon durduruldu. Reaksiyon ürünü 60µL %95 soğuk etanol eklenerek 14.000 rpm'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Üst faz atıldı, pellete 200µL %70

soğuk etanol eklendi ve 5 dakika 14.000 rpm’de santrifüjlendi. Tüp içindeki alkol pipet yardımıyla toplandı ve tüpün dibinde kalan pellet vakumlu konsantratör yardımı ile alkolün tam olarak uçması için kurutuldu. Kurutulan pellet üzerine 40µL Sample Loading Solution (SLS) tamponu eklenerek çözüldü. Çözülen örnek Beckman Coulter dizi analizine özel mikrokuyucuklara yüklenerek makineye yerleştirildi. Fragment büyüklüğüne uygun program (lfr-b) seçilerek okunmaya bırakıldı. Makinedeki okuma işleminin ardından yine cihaz için özel olan bilgisayar programı (Beckman Coulter CEQ 8000 Analysis Software) kullanılarak analiz edildi. Analiz edilen her bir örnek tek tek gen dizisi ile karşılaştırıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

Tablo 3-5: Dizi analizi reaksiyonu içeriği

DTCS Quick Start Master Mix	4µL
Pürifiye PZR Ürünü (150-200ng)	3µL
Dizileme Primeri (10pmol/µL)	0,7µL
dH ₂ O	12,3µL

3.2.7. Kolorimetrik yöntem ile serumda total kalsiyum tayini

Serumda total kalsiyum tayini için hazır kit kullanıldı (Quantichrome Calcium Assay Kit-BioAssay Inc.). Kantitatif kolorimetrik total kalsiyum ölçümü için -80°C’de saklanan serum örnekleri çözüldü. 5µL serum örneği üzerine 1:1 oranında hazırlanmış ayıraç A / ayıraç B çözeltisinden 200 µL ilave edildi. Hasta örnekleri, kör ve 7 farklı standart (0-20 mg/dL arasında) duplike olacak şekilde mikrokuyucuklara yüklendi.

3 dakika oda ısısında (24°C) inkübasyondan hemen sonra 412-630 nm dalga boyunda mikrokuyucuk okuyucuda (Rayto Life and Analytical Sciences Co.) okundu. Standart eğriye göre okunan duplike örneklerin ortalaması alındı. Duplike yüklenen örnekler arasında %0.1'den az bir varyasyon gözlemlendi.

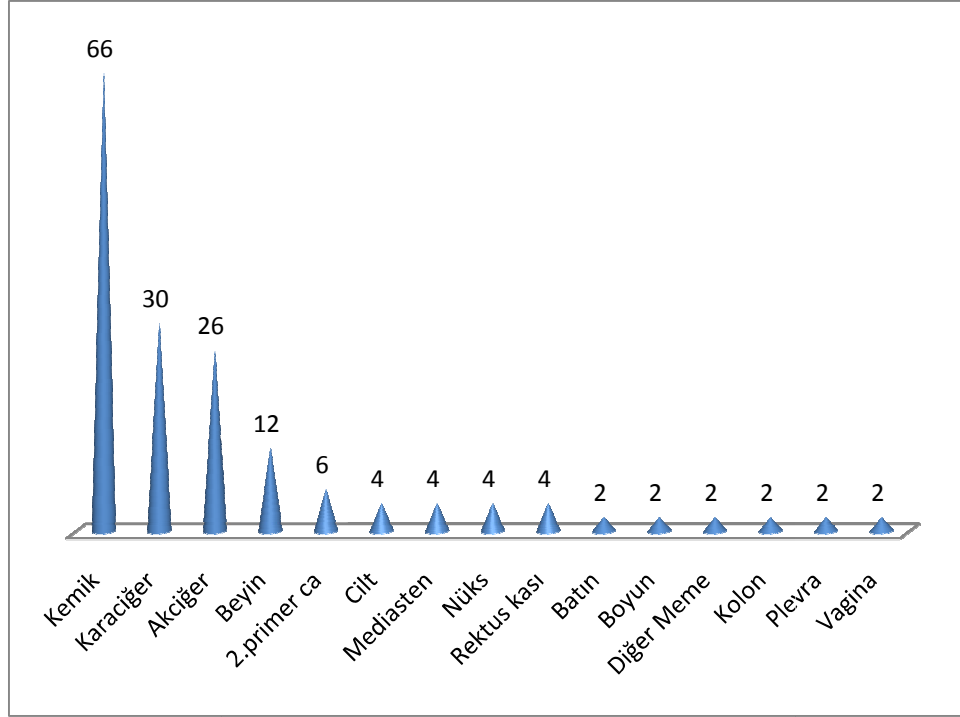
3.2.8. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Hastalar arasında total kalsiyum değerlerinin istatistiksel analiz için dağılımın uygun olup olmadığı Kolmogrov-Smirnov&Shapiro-Wilk, Levene testleri ile değerlendirildi. Verilerin dağılımının normal olduğu belirlendikten sonra iki hasta grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak farklılığı analiz etmek için ANOVA testi yapıldı. Tukey ve Bonferroni testleri ile gruplar ikili olarak karşılaştırıldı.

DeneySEL veriler, SPSS v16.0 programı ile yapıldı. Testler iki yönlü gerçekleştirildi ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Toplam 117 olguya (101 vaka ve 16 kontrol) ait 141 DNA materyali S100A4 geninin C-terminalindeki DNA dizi varyantları için, 113 serum örneği ise total kalsiyum düzeyi ölçümü için kullanıldı (Tablo3-1). Metastatik meme kanserli hastalarda metastaz gerçekleşen bölgelerin hasta grubumuzdaki dağılımı belirlendi. Metastatik meme kanserli hasta grubumuzda görülme sıklığı açısından en sık görüldenden en az görülene doğru sıralı olarak kemik, karaciğer, akciğer, beyin, batin metastazları rastlanırken cilt ve vagina metastazları gibi nadir görülen vakalar olduğu da belirlendi. Metastatik meme kanserli 50 hastanın %66'sında kemik metastazı (hastaların sadece %30'unda tek başına kemik metastazı), %30'unda karaciğer metastazı (hastaların sadece %4'ünde tek başına karaciğer metastazı), %26'sında akciğer metastazı (hastaların sadece %6'sinde tek başına akciğer metastazı), %12'sinde beyin metastazı (hastaların sadece %2'sinde tek başına beyin metastazı), %4'ünde cilt metastazı (hastaların sadece %2'sinde tek başına cilde metastaz), mediastene ve rektus kasına metastaz oranı %4, diğer memeye, batin, boyun, kolon, plevra ve vagina'ya metastaz yapan hasta oranı %2'dir. Bundan başka metastatik meme kanseri olan hastaların %6'sında ikinci bir primer tümör gelişimi saptandı (Şekil 4-1).



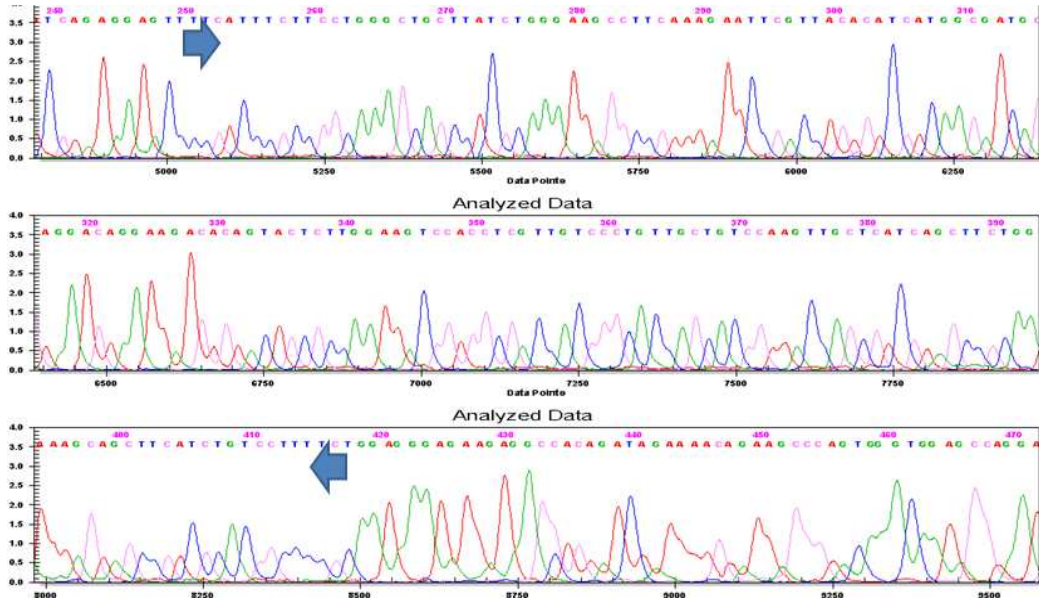
Şekil 4-1: Hastalarda görülen metastatik bölgelerin dağılımı (yüzde %)

4.1. Dizi Analizinden Elde Edilen Veriler

S100A4 geninin C-terminal bölgesindeki metastazı kolaylaştırdığı iddia edilen bölgenin DNA dizi farklılıkları Türk popülasyonundaki varyasyonu anlamak amacıyla öncelikle deney grubu ile yaş ve cinsiyet uyumlu kontrol grubundaki 16 sağlıklı kişinin periferik kan DNA'sında incelendi ve kontrol grubunda bu bölgede herhangi bir varyasyon olmadığı tespit edildi. Bu incelemenin ardından söz konusu bölgenin tümör dokuda farklılık gösterebileceği düşünülerek her hastaya ait tümör ve normal dokusu ile periferik kan DNA örnekleri bulunan 12 metastatik meme kanserli, 52 metastatik meme kanserli ve 35 DKIS'li hastanın periferik kan DNA'sında ve 4 DKIS dokusunda inceleme yapıldı. Bu gruplarda da S100A4 genine ait herhangi bir varyasyon saptanmadı (Tablo4-1 Şekil 4-2). Özetle hasta grupları ve kontrollerde S100A4 geninin C-terminal bölgesinde herhangi bir DNA dizi varyasyonuna rastlanılmadı (Tablo4-1, Şekil 4-2).

Tablo 4-1: Dizi analizinden elde edilen veriler

	Dizilenen Örnek Sayısı	Mutasyon Var	Mutasyon Yok
Hasta Grubu	125	0	125
Kontrol Grubu	16	0	16
Toplam	141	0	141



Şekil 4-2: Dizi analizi raporu; Mavi oklar; varyasyon görülmesi beklenen bölgenin başı ve sonunu işaret etmektedir.

4.2. Total kalsiyum düzeyi ölçüm sonuçları

DKIS, metastatik meme kanserli hasta ve kontrol grubuna ait toplam 113 serum örneğinde kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak total kalsiyum düzeyi ölçüldü. Bu üç gruba ait olan kalsiyum değerlerinin ortalamaları DKIS 'li hastalarda $6,2 \pm 1,0$ mg/dL, metastatik meme kanserli hastalarda $7,2 \pm 0,9$ mg/dL ve kontrol grubunda $8,9 \pm 0,6$ mg/dL olarak saptandı (Tablo4-2).

Tablo 4-2: Deney gruplarında total kalsiyum değerlerinin ortalamaları

Gruplar	Kalsiyum değeri (mg/dL) ($\bar{x} \pm sd$)
DKIS	$6,2 \pm 1,0$
Metastatik Meme	$7,2 \pm 0,9$
Kontrol	$8,9 \pm 0,6$

DKIS'lu ve metastatik meme kanserli hastaların total kalsiyum düzeylerinin kontrollerden anlamlı derecede farklı olduğu belirlendi ($p < 0,001$). Bunun yanında metastatik meme kanseri ve DKIS'lu hastaların total kalsiyum düzeyleri arasında da istatistiksel anlamlılık bulundu ($p < 0,001$).

Kemik metastazı olan ve olmayan hasta grupları total kalsiyum değerleri açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında, kemik metastazı olanlarda ($7,4 \pm 0,5$ mg/dL) olmayanlara ($6,7 \pm 0,7$ mg/dL) göre total kalsiyum düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ($p < 0,001$).

5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür [1]. Meme kanseri sebebi ile gerçekleşen ölümlerin nedeni, bu kanser türünün belirli bir zaman diliminde agresif uzak organ metastazları geliştirmesi ve metastatik yayılım görülen vakalarda kür sağlama şansının olmamasıdır[12, 14]. Hastalığın ilerleyen zamanlarında meydana gelen metastazların sıklıkla iskelet sistemine yerleştiği yapılan gözlemler ve istatistiklerle gösterilmiştir [15].

Birçok histopatolojik alt tipi olan meme kanserinde, metastatik potansiyele sahip olmayan alt gruplar da bulunmaktadır [16]. Bu gruplardan DKIS, hücre çoğalması duktuslar içinde sınırlı olan ve invazyon özelliği olmayan karsinom hücrelerinden meydana gelir ve dolayısıyla bu hücreler metastaz geliştirmezler [16].

Kalsiyum bağlayıcı protein ailesi olan S100 gen ailesi, hücre içi ve hücre dışında çeşitli görevler gerçekleştiren 20 farklı üyeden meydana gelir ve bu üyelerden biri de metastatik potansiyeli arttırmada etkili olduğu bildirilen S100A4 genidir [4, 47, 65]. S100A4 geninde bulunan kalsiyum bağlama bölgelerine kalsiyum bağlanmasıyla meydana gelen şekil değişikliği ile S100A4 molekülü diğer proteinlerle etkileşime girer ve biyolojik aktivite başlamış olur [50, 56]. Yüksek S100A4 gen ifadesinin ise hücrenin hareket etme ve invazyon yapabilme yeteneğini arttırdığı, malign melanom, meme, mesane, özafagus, mide, kolorektal kanser, küçük hücreli akciğer kanseri gibi kanser türlerinde yaşam süresinin düşmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [4,50]. Buna rağmen, S100A4 geninin metastatik gelişim ile ilgili mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda S100A4 geninin metastatik potansiyelini araştırmak için, metastatik meme kanserli hasta grubu ile onunla zıt özelliklere sahip olan DKIS hasta grubu karşılaştırılmıştır. Bu çalışma ile S100A4 geni C-terminal bölgesinin DNA dizi değişiklikleri ilk kez bir kanser türünde araştırılmıştır. Söz konusu gen bölgesinin metastatik aktiviteyi teşvik ettiği bildirilen ilk deneysel çalışma ise farelerde gösterilmiştir [4]. Çalışmamızda duktal in situ karsinoma tanılı vakalarda S100A4 geni C-terminal bölgesinde görülmesi beklenen, metastatik aktiviteyi durdurucu herhangi bir gen bölgesi değişikliği saptanmamıştır. Aynı şekilde metastatik meme karsinomlu hastaların primer tümör doku ve periferik kan DNA'larında da S100A4 geni C-terminal bölgesine ait DNA dizisinde bir farklılık görülmemiştir.

Hücrelerin metastaz geliştirme yeteneği kazanmasında önemli olduğu söylenen S100A4 geninin C-terminal bölgesinin 100. ve 101. aminoasidindeki iki lizin amino asidini bloke edebilecek yetenekte yeni ilaç molekülleri dizayn edilerek, bu genin aktivitesinin azaltılması ya da ortadan kaldırılmasıyla metastatik odak oluşumuna engel olunabileceği düşünülmektedir. Nitekim 2010 yılında Garrett S. ve arkadaşları S100 ailesindeki genler için inhibitör ajanlara ait patent almışlardır [92]. Çalışmamızda DKIS'lu ve metastatik meme kanserli hastalarda S100A4 geninin C-terminal bölgesinde herhangi bir değişikliğin saptanmamış olması, meme kanserinin S100 ailesine yönelik inhibitörler için aday hastalık grubu olacağını düşündürmektedir.

Bunun dışında çalışmamızda metastatik olan ve olmayan olgular arasında total kalsiyum düzeyleri araştırılmış ve bulgular çalışma grupları arasında karşılaştırılmıştır. Total kalsiyum düzeyinin DKIS'lu ve metastatik meme kanserli vakalarda kontrollerden anlamlı derecede farklı olduğu

($p<0.001$), aynı anlamlılığın DKIS ile metastatik meme kanserli grup arasında da olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Ayrıca meme kanseri tanılı kemik metastazı gelişmiş vakalar ile kemik metastazı dışında başka organlarına metastaz gelişmiş vakalar arasındaki kalsiyum düzeylerinin de anlamlı şekilde farklı olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Daha önce kanser vakalarında yapılan çalışmalarda, hipoksi, yüksek kalsiyum miktarı ve TGF- β gibi büyüme faktörlerindeki artışın kemik metastazını tetiklediği bildirilmiştir [93]. Bulgularımız bu çalışmayı destekler niteliktedir.

Meme kanseri tanılı ve kemik metastazı gelişmiş vakalar ile başka bir organa metastaz gelişmiş vakalar arasındaki kalsiyum düzeylerinin farklı olması, bu yüksek kalsiyum değerinin kemik metastazını tetikleyebileceğini, yüksek S100A4 anlatımının kalsiyum ile etkileşmesinin metastaz bölgesi ile ilişkili olabileceği ve bu farklılığın hastalığın izlenmesinde kullanılabileceğini akla getirmektedir.

Daha önceki çalışmalarda S100A4 gen anlatımının meme kanserli vakalarda yüksek olduğu gösterilmiştir [4,50]. Bu bağlamda hasta grubumuzda S100A4 gen anlatımının artmış olabileceği ve bu artan gen anlatımının yüksek kalsiyum düzeyi ile birleşerek metastatik potansiyeli arttırmada etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu hipotezi desteklemek için gelecekteki çalışmalarda aynı hasta grubularında S100A4 ve diğer kalsiyum bağlayıcı genlerin anlatım düzeylerinin araştırılması planlanmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda S100A4 geninin metastaz geliştirme özelliğinden sorumlu olan 82-101. aminoasitleri kapsayan bölgesinde bir bozukluk olmadığı gösterilmiştir. İncelenen iki hasta grubunun DNA örneklerinde de değişiklik gözlenmemiş olması, ya bu genin incelenmeyen bölgelerinde bozukluk olabileceğini ya da S100A4 geninin post-

translasyonel aşamada bir farklılığa maruz kalabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bu genin DKIS'lu ve metastatik meme kanserli vakalarda aynı özelliği taşımasına rağmen genin en önemli hedef moleküllerinden biri olan kalsiyumun serumdaki düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Metastatik meme kanseri vakalarında DKIS grubundan daha yüksek değerlerde kalsiyum konsantrasyonunun olması, kanserdeki bozulmuş diğer bazı yolları tetikleyerek metastaz oluşmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

S100A4 geni C-terminal bölgesinde bir değişiklik saptanmaması, S100A4 geninin metastatik aktiviteyi artırma fonksiyonunu tek başına gerçekleştirmediğini düşündürmektedir. Bu nedenle S100A4 proteinine kalsiyum bağlandıktan sonra hangi proteinlerle etkileştiği ve etkileşen moleküllerin meydana getirdiği yolağın araştırılması gereklidir. S100A4 geninin kalsiyum bağlayan bölgelerinde meydana gelebilecek değişiklikler (mutasyon, delesyon) kalsiyum bağlama kapasitesini değiştireceğinden hastalarda bu bölgenin DNA ve mRNA düzeyinde taranması kalsiyum konsantrasyonundaki değişimleri açıklayabilir.

KAYNAKLAR

1. T.C.Sağlık Bakanlığı. *Kanser İstatistikleri 1999*; Available from: <http://www.saglik.gov.tr/extras/istatistikler/apk2001/092.htm>.
2. Ozmen, V., *Breast cancer in the World and Turkey*. J Breast Health, 2008. 4: p. 6-12.
3. Özmen, V., C. Fidaner, and E. Aksaz, *Türkiye’de Meme Kanseri Erken Tanı ve Tarama Programlarının Hazırlanması “Sağlık Bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu”*. Meme Sağlığı Dergisi, 2009. 5(3): p. 125-134.
4. Ismail, T.M., et al., *The basic C-terminal amino acids of calcium-binding protein S100A4 promote metastasis*. Carcinogenesis, 2008. 29(12): p. 2259-66.
5. Buchanan, M., et al., *Breast cancer advocacy across Europe through the work and development of EUROPA DONNA, the European Breast Cancer Coalition*. Eur J Cancer, 2004. 40(8): p. 1111-6.
6. Cunningham, M.P., *Giving life to numbers*. CA Cancer J Clin, 1997. 47(1): p. 3-4.
7. Topuz, E., *Meme Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi*, in *Meme Kanseri ; Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi*, E. Darendeliler, Editor. 1997, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları: İstanbul. p. 16-32.
8. Seidman, H., et al., *Probabilities of eventually developing or dying of cancer--United States, 1985*. CA Cancer J Clin, 1985. 35(1): p. 36-56.
9. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. 60(5): p. 277-300.
10. Parkin, D.M. and L.M. Fernandez, *Use of statistics to assess the global burden of breast cancer*. Breast J, 2006. 12 Suppl 1: p. S70-80.
11. Boring, C.C., T.S. Squires, and T. Tong, *Cancer statistics, 1993*. CA Cancer J Clin, 1993. 43(1): p. 7-26.
12. Kamby, C., *The pattern of metastases in human breast cancer: methodological aspects and influence of prognostic factors*. Cancer Treat Rev, 1990. 17(1): p. 37-61.
13. Pasqualini, J.R., ed. *Breast Cancer Prognosis, Treatment, and Prevention*. Cytotoxic Therapy and Other Nonhormonal Approaches for the Treatment of Metastatic Breast Cancer, ed. J.A. Sparano. 2002, Eastern Hemisphere Distribution: New York. 417-472.
14. Soran, A., et al., *Randomized trial comparing locoregional resection of primary tumor with no surgery in stage IV breast cancer at the presentation*

- (Protocol MF07-01): a study of Turkish Federation of the National Societies for Breast Diseases. *Breast J*, 2009. **15**(4): p. 399-403.
15. Galasko, C.S., *Skeletal metastases*. *Clin Orthop Relat Res*, 1986(210): p. 18-30.
 16. Topuz, E., *Memenin Malign Tümörlerinin Patolojik Özellikleri*, in *Meme Kanseri ; Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi*, S. Tuzlalı, Editor. 1997, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları: İstanbul. p. 199-217.
 17. Parker, J.S., et al., *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(8): p. 1160-7.
 18. Tavassoli, F.A., *Pathology of the breast*. 2nd ed. 1999, Stamford, Conn.: Appleton & Lange. xi, 874 p.
 19. Özen, Ö., *Memenin Apokrin Karsinomunun Ayırıcı Tanısında Morfolojik, Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bulgular*. *Meme Sağlığı Dergisi*, 2007. **3**(2): p. 69-74.
 20. Akyol, C., *Metaplastik Meme Kanseri: Nadir Görülen Bir Tümör*. *Meme Sağlığı Dergisi*, 2008. **4**: p. 127-129.
 21. Rosen, P.P., ed. *Carcinoma with Metaplasia*. *Breast Pathology*, ed. P.P. Rosen. 1997, Lippincott-Raven: Philadelphia. 375-395.
 22. Tse, G.M., et al., *p63 is useful in the diagnosis of mammary metaplastic carcinomas*. *Pathology*, 2006. **38**(1): p. 16-20.
 23. Pezzi, C.M., et al., *Characteristics and treatment of metaplastic breast cancer: analysis of 892 cases from the National Cancer Data Base*. *Ann Surg Oncol*, 2007. **14**(1): p. 166-73.
 24. Geyer, F.C., T. Decker, and J.S. Reis-Filho, *[Genome-wide expression profiling as a clinical tool: are we there yet?]*. *Pathologie*, 2009. **30**(2): p. 141-6.
 25. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
 26. Bertucci, F., et al., *How different are luminal A and basal breast cancers?* *Int J Cancer*, 2009. **124**(6): p. 1338-48.
 27. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
 28. Çavuşoğlu, A.Ç., *Meme Tümör Sınıflamasında Yenilik Çabaları*. *Meme Sağlığı Dergisi*, 2009. **5**(4): p. 187-190.
 29. Nielsen, T.O., et al., *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(16): p. 5367-74.
 30. Kreike, B., et al., *Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas*. *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(5): p. R65.

31. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
32. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
33. van de Vijver, M.J., et al., *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer*. N Engl J Med, 2002. **347**(25): p. 1999-2009.
34. Chang, H.Y., et al., *Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3738-43.
35. Chang, H.Y., et al., *Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds*. PLoS Biol, 2004. **2**(2): p. E7.
36. Paik, S., et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2817-26.
37. Hu, Z., et al., *The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 96.
38. Fan, C., et al., *Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(6): p. 560-9.
39. Weigelt, B., F.L. Baehner, and J.S. Reis-Filho, *The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade*. J Pathol, 2010. **220**(2): p. 263-80.
40. Cardoso, F., et al., *Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial*. J Clin Oncol, 2008. **26**(5): p. 729-35.
41. Paik, S., *Development and clinical utility of a 21-gene recurrence score prognostic assay in patients with early breast cancer treated with tamoxifen*. Oncologist, 2007. **12**(6): p. 631-5.
42. Finak, G., et al., *Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer*. Nat Med, 2008. **14**(5): p. 518-27.
43. Pasqualini, J.R., ed. *Breast Cancer: Prognosis, Treatment and Prevention*. 1 ed. BRCA1, BRCA2 and Hereditary Breast Cancer, ed. B.A. Bove, R.L. Dunbrack, and A.K. Godwin. 2002, Marcel Dekker, Inc.: New York. 555-624.
44. Bowcock, A., *Breast Cancer Genes*. Breast, 1997. **3**: p. 1-6.
45. Balmana, J., et al., *BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines*. Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 5**: p. v20-2.
46. Mendelson, J., et al., eds. *Molecular Basis of Cancer*. Molecular Basis of Breast Cancer, ed. R.B. Dickson and M.E. Lippman. Vol. 2. 2001, W.B.Saunders Company: New York. 313-342.

47. Donato, R., *Intracellular and extracellular roles of S100 proteins*. Microsc Res Tech, 2003. **60**(6): p. 540-51.
48. Fritz, G., et al., *Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: structural basis of functional diversity*. FEBS J, 2010. **277**(22): p. 4578-90.
49. Malashkevich, V.N., et al., *Structure of Ca²⁺-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA*. Biochemistry, 2008. **47**(18): p. 5111-26.
50. Oslejskova, L., et al., *Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease activity of rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48**(12): p. 1590-4.
51. Lapi, E., *Identification of novel and direct target genes of p73*, in *Biologia Cellulare e Molecolare*. 2007, Universita' Degli Studi Di Roma Roma. p. 30-36.
52. Pathuri, P., L. Vogeley, and H. Luecke, *Crystal structure of metastasis-associated protein S100A4 in the active calcium-bound form*. J Mol Biol, 2008. **383**(1): p. 62-77.
53. Donato, R., *Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1450**(3): p. 191-231.
54. Garrett, S.C., et al., *S100A4, a mediator of metastasis*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 677-80.
55. Boye, K. and G.M. Maeldandsmo, *S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles*. Am J Pathol, 2010. **176**(2): p. 528-35.
56. Vallely, K.M., et al., *Solution structure of human Mts1 (S100A4) as determined by NMR spectroscopy*. Biochemistry, 2002. **41**(42): p. 12670-80.
57. Watanabe, Y., et al., *Calvasculin, as a factor affecting the microfilament assemblies in rat fibroblasts transfected by src gene*. FEBS Lett, 1993. **324**(1): p. 51-5.
58. Takenaga, K., et al., *Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin*. J Cell Biol, 1994. **124**(5): p. 757-68.
59. Kriajevska, M.V., et al., *Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene*. J Biol Chem, 1994. **269**(31): p. 19679-82.
60. Vicente-Manzanares, M., et al., *Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 778-90.
61. Gibbs, F.E., et al., *Interactions in vitro of p9Ka, the rat S-100-related, metastasis-inducing, calcium-binding protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(29): p. 18992-9.
62. Ford, H.L. and S.B. Zain, *Interaction of metastasis associated Mts1 protein with nonmuscle myosin*. Oncogene, 1995. **10**(8): p. 1597-605.

63. Barraclough, R. and P.S. Rudland, *The S-100-related calcium-binding protein, p9Ka, and metastasis in rodent and human mammary cells*. Eur J Cancer, 1994. **30A**(10): p. 1570-6.
64. Mandinova, A., et al., *Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 14)**: p. 2043-54.
65. Schneider, M., J.L. Hansen, and S.P. Sheikh, *S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases?* J Mol Med, 2008. **86**(5): p. 507-22.
66. Mazzucchelli, L., *Protein S100A4: too long overlooked by pathologists?* Am J Pathol, 2002. **160**(1): p. 7-13.
67. Stein, U., et al., *The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer*. Gastroenterology, 2006. **131**(5): p. 1486-500.
68. Dunnington, D., et al., *Long-term toxicity study of ethyl methylphenylglycidate (strawberry aldehyde) in the rat*. Food Cosmet Toxicol, 1981. **19**(6): p. 691-9.
69. Barraclough, R., et al., *Use of DNA transfer in the induction of metastasis in experimental mammary systems*. Biochem Soc Symp, 1998. **63**: p. 273-94.
70. Ebralidze, A., et al., *Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family*. Genes Dev, 1989. **3**(7): p. 1086-93.
71. Helfman, D.M., et al., *The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis*. Br J Cancer, 2005. **92**(11): p. 1955-8.
72. Rudland, P.S., et al., *Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1595-603.
73. Lee, W.Y., et al., *Expression of S100A4 and Met: potential predictors for metastasis and survival in early-stage breast cancer*. Oncology, 2004. **66**(6): p. 429-38.
74. Huang, L.Y., et al., *S100A4 over-expression underlies lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(1): p. 69-78.
75. Zou, M., et al., *S100A4 (Mts1) gene overexpression is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma*. Br J Cancer, 2005. **93**(11): p. 1277-84.
76. Keirsebilck, A., et al., *E-cadherin and metastasin (mts-1/S100A4) expression levels are inversely regulated in two tumor cell families*. Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4587-91.

77. Oida, Y., et al., *Increased S100A4 expression combined with decreased E-cadherin expression predicts a poor outcome of patients with pancreatic cancer*. *Oncol Rep*, 2006. **16**(3): p. 457-63.
78. Kimura, K., et al., *Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer*. *Int J Oncol*, 2000. **16**(6): p. 1125-31.
79. Ninomiya, I., et al., *Increased expression of S100A4 and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma*. *Int J Oncol*, 2001. **18**(4): p. 715-20.
80. Yonemura, Y., et al., *Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(11): p. 4234-42.
81. Parkash, J. and K. Asotra, *Calcium wave signaling in cancer cells*. *Life Sci*, 2010. **87**(19-22): p. 587-95.
82. Tietz, N.W., ed. *Textbook of Clinical Chemistry. Calcium and Phosphate Metabolism*, ed. D. Fraser, et al. 1986, W. B. Saunders Company Harcourt Brace Jovanovich, Inc.
83. Walker, H., W. Hall, and J. Hurst, eds. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3 ed. Serum Calcium, ed. D. Goldstein. 1990, Butterworth Publishers: Boston.
84. Siegel, J., et al., eds. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. . 6 ed. 1999, Lippincott-Raven: Philadelphia.
85. Gomez-Viquez, L., et al., *SERCA pump optimizes Ca²⁺ release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells*. *Biophys J*, 2003. **85**(1): p. 370-80.
86. Kinjo, T. and P. Schnetkamp, *Ca²⁺ Chemistry, Storage and Transport in Biologic Systems: An Overview*, G. Zamponi, Editor. 2005, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
87. Thebault, S., et al., *Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(4): p. 2038-47.
88. Berridge, M.J., *Calcium signal transduction and cellular control mechanisms*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1742**(1-3): p. 3-7.
89. Lin, J., et al., *The calcium-binding protein S100B down-regulates p53 and apoptosis in malignant melanoma*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(35): p. 27487-98.
90. Badyal, S.K., et al., *Mechanism of the Ca(2+)-Dependent Interaction between S100A4 and Tail Fragments of Nonmuscle Myosin Heavy Chain IIA*. *J Mol Biol*, 2011. **405**(4): p. 1004-26.
91. Tarabykina, S., et al., *The dimerization interface of the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1): in vivo and in vitro studies*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 24212-22.

92. Bresnick, A.R. and S.C. Garrett, *Assays for S100 Inhibitors*. 2010: USA.
93. Kingsley, L.A., et al., *Molecular biology of bone metastasis*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(10): p. 2609-17.

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ HASTA ONAY FORMU

Tarih:

ÇALIŞMANIN KAPSAMI

1. “S100A4 Gen Varyantları İle Metastatik Meme Kanseri Arasındaki İlişkinin Araştırılması” adlı çalışma Meme Kanseri ile ilgili bir çalışmadır. Bu çalışma, Meme kanseri hastalığının metastaz ile ilgili olan genetik boyutunu aydınlatmak ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olmayı hedeflemektedir.

2. Yapılması planlanan genetik incelemeler için sizden 10ml periferik kan örneği ve eğer biyopsi ya da tümörün çıkartılmasına yönelik bir operasyon geçirdiyeniz bu esnada çıkartılmış doku örneğinden patolojik gözetiminde çok küçük bir parça alınacaktır.

3. Alınan kan ve/veya doku örneğinden DNA gereciniz izole edilerek saklanacaktır. Biyolojik gereciniz üzerinde sizin kimliğinize ilişkin bir ibare bulunmayacaktır.

4. Saklanan örnekler meme kanserinde metastaz ile ilişkisi olan S100A4 genini araştırmada kullanılacak ve bu genin varyantları incelenecektir. Elde edilen sonuçlar klinik parametreler ile ilişkilendirilip ilgili genlerin hedef tedavi için aday olup olmayacağı değerlendirilecektir.

5. Araştırma kapsamında yapılacak olan çalışmanın süresi 1 yıldır.

6. Çalışmaya 150 gönüllü hasta katılacaktır.

7. Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir.

8. Elde edilen genetik bilgiler şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara kesinlikle aktarılmayacaktır.

9. Araştırma süresince sizden sadece 1 defa kan ve/veya biyopsi esnasında çıkarılmış dokudan küçük bir parça alınacaktır ve özellikle bu çalışma ile ilişkili olarak invaziv bir işlem gerçekleştirilmeyecektir.

10. Kan alma sırasında oluşabilecek herhangi bir sorun karşısında ücretsiz olarak tıbbi destek sağlanacaktır.

11. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.

12. Bu çalışmada sizden maddi bir beklentimiz olmadığı gibi size maddi bir katkısı da olmayacaktır. Bunun yanında gereciniz arttığı takdirde bu gereci biz başka çalışmalar içinde kullanabiliriz.

13. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu talebiniz, gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz etkisi olmayacaktır.

14. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabiliyorsunuz.

Kararınızdan önce size verilen bu bilgileri lütfen okuyunuz.

Yukarıdaki yazılı bilgileri okudum. Meme kanseri hastalığının metastaz oluşturmasında genetik boyutuna yönelik araştırmalar için çalışmaya kan vermeyi kimsenin etkisi altında kalmadan kendi rızamla kabul ediyorum.

Hastanın Adı, Soyadı:

İmzası

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, Soyadı:

İmzası

Rıza alma işleme başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı,
Soyadı: Görevi: İmzası

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu




Sayı : 2552

Tarih : 16/09/2009

Konu : Doç.Dr. Hülya YAZICI hk,

Sayın Doç.Dr. Hülya YAZICI
Onkoloji Enstitüsü
Öğretim Üyesi
İlgi : 22.06.2009 tarihli 124/1592 sayılı yazınız

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Seda KILIÇ'ın yürütüldüğü : 2009/1483 dosya numaralı "S100A4 Gen Varyantları İle Metastatik Meme Kanseri arasındaki ilişkinin araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 13.05.2009 tarihli 05 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.


Prof.Dr. Güher ŞARUHAN DİRESKENELİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Dekan Yardımcısı ve
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

T.C.
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI



Toplantı Tarihi : 13/05/2009

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 5

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Onkoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Hülya YAZICI'nın üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Seda KILIÇ'ın yürüteceği 2009/1483 protokol numaralı "S100A4 Gen Varyantları İle Metastatik Meme Kanseri arasındaki ilişkinin araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi.

Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ
Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN
Farmakoloji ve Kli.F. A.D.

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ
Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKÖĞLU (T.Katılmadı)
Biokimya A.D

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK
İç Hast. A.D. End. Ve Meta. Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
Hukukçu

Prof.Dr. Y. Sümer YAMANER (T.Katılmadı)
Genel Cerrahi A.D.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Seda	Soyadı	Kılıç
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	18.02.1986
Uyruğu	TC	TC Kim No	
Email	sedaklc@gmail.com	Tel	0555-304-61-69

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü	2009-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Almanca	Çok İyi	İyi	İyi		
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi	78,75	

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	79,35	80,33	80,21

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi