T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE RASSF1A GENİ PROMOTOR METİLASYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

Sevilay TOKMAKOĞLU

Danışman **Dr. Öğr. Üyesi Asuman ÖZGÖZ**
Jüri Üyesi **Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER**
Jüri Üyesi **Dr. Öğr. Üyesi Fadime MUTLU İÇDUYGU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

KASTAMONU - 2018

TEZ ONAYI

Sevilay TOKMAKOĞLU tarafından hazırlanan **"Üçlü Negatif Meme Kanserinde RASSF1A Geni Promotor Metilasyon Düzeyinin Belirlenmesi"** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Asuman ÖZGÖZ Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Fadime MUTLU İÇDUYGU Giresun Üniversitesi	.....

25/06/2018

Enstitü Müdür V. Doç. Dr. Mehmet Altan KURNAZ .....

TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.



Sevilay TOKMAKOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE RASSF1A GENİ PROMOTÖR METİLASYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

Sevilay TOKMAKOĞLU
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Asuman ÖZGÖZ

Sporadik insan malignansilerinde RASSF1A en sık metilasyona uğrayan tümör supresör genlerden biridir. Pek çok farklı malignanside, yüksek frekansta RASSF1A promotör hipermetilasyonu olduğu ve bu frekansın kanser patogenezi ve daha agresif klinik fenotiple birliktelik gösterdiği bildirilmiştir.

Üçlü negatif meme kanseri, diğer meme kanserlerine göre daha agresif fenotip göstermektedir ve literatür incelendiğinde RASSF1A promotör hipermetilasyonunun meme kanseri tümörogenezinde etkili olduğu yönünde güçlü bulgular görülmektedir. Bunlar bir arada düşünüldüğünde, RASSF1A metilasyon durumu, kanser risk ve prognozu için, klinik değerlendirmede iyi bir potansiyel biomarkır olabilir.

Bu çalışmanın amacı; üçlü negatif meme kanserinde RASSF1A promotör metilasyon durumunun belirlenmesidir.

Çalışmamıza, üçlü negatif meme kanseri olan 37 hasta ve 29 normal meme kontrol doku grubu dahil edildi. DNA metilasyon analizi formalinle fiske edilmiş parafine gömülü üçlü negatif meme kanseri doku örneklerinde gerçekleştirildi. DNA izolasyonu ve bisülfit uygulamasını takiben, DNA metilasyonu, real-time PCR yöntemi ile analiz edildi. Üçlü negatif meme kanseri grubunun RASSF1A geni metilasyonu frekansı %72,2 olarak tespit edilirken, bu oran kontrol grubunda %37,9 olarak bulundu (p=0,020). Sonuçlar benzer çalışmaların sonuçlarıyla paralellik gösterdi. Üçlü negatif meme kanseri grubunda RASSF1A metilasyonu ile histolojik derece, kanser evresi, lenf nodu tutulumu ve tümör çapı arasında bir ilişki bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: RASSF1A, meme kanseri, triple negatif meme kanseri, DNA metilasyonu.

2018, 85 sayfa
Bilim Kodu: 203

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF RASSF1A GENE PROMOTER METHYLATION LEVEL IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

Sevilay TOKMAKOĞLU
Kastamonu University
Institute of Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Asuman ÖZGÖZ

In sporadic human malignancies, RASSF1A is one of the tumor suppressor genes that most frequently undergo methylation. Hypermethylation of the highly frequent RASSF1A promoter association with cancer pathogenesis and a more aggressive clinical phenotype has been reported in many different malignancies.

Triple negative breast cancer shows a more aggressive phenotype than other breast cancers and when the literature is investigated, strong findings are found that RASSF1A promoter hypermethylation is effective in breast cancer tumorigenesis. When considered together, RASSF1A methylation status may be a good potential biomarker for clinical assessment of cancer risk and prognosis.

The purpose of this study is; determination of RASSF1A promoter methylation status in triple negative breast cancer.

This study included 37 patients with triple negative breast cancer and 29 control group individuals. DNA methylation analysis was performed in formalin-fixed paraffin-embedded triple negative breast cancer tissue specimens. Following DNA isolation and bisulfite application, DNA methylation was analyzed by real-time PCR. The frequency of RASSF1A gene methylation was %72,2 in the study group of triple negative breast cancer whereas the frequency was %37,9 in the control group (p=0,020). The results were similar with previous studies in the literature. In cancer group, RASSF1A methylation was not associated with histological grade, cancer stage, lymph node metastasis and tumor diameter.

Key Words: RASSF1A, breast cancer, triple negative breast cancer, DNA methylation

2018, 85 pages
Science Code: 203

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimin ve tez sürem boyunca bana danışmanlık yapan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Asuman ÖZGÖZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimde kullanılan patolojik arşiv materyallerinin sağlanması ve olguların değerlendirilmesi aşamasında katkılarından dolayı Gayrettepe Florence Nightingale Hastanesi Patoloji Bölümü hocaları, Prof. Dr. Fatma AKTEPE'ye, Doç. Dr. İpek ÇOBAN'a; çalışmanın istatistiki analizlerini yapan Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD. öğretim üyesi, Dr. Öğr. Üyesi Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK'e katkıları için teşekkür ederim.

Üniversite ve Yüksek lisans hayatım ve boyunca benden desteklerini esirgemeyen meslektaşlarım ve arkadaşlarım Uzman Biyolog Belma BERBER ve Uzman Biyolog Mehtap ALAY'a teşekkür ederim.

Maddi-manevi her türlü destekte bulunan annem Emine KOYMALI'ya, babam Satılmış KOYMALI'ya ve kardeşim Seçilay KOYMALI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her zorlukta yanımda olan, desteğini benden esirgemeyen eşim Sefa TOKMAKOĞLU'na, tez sürem boyunca desteklerini esirgemeyen kayınvalidem Hayriye TOKMAKOĞLU'na ve TOKMAKOĞLU ailesine teşekkür ederim.

Bu süreçte benimle her zorluğu paylaşan, beni bu hayatta anlamlı kılan, kızım Elif Feride TOKMAKOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Lisans ve Yüksek Lisans hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER'e ve Kastamonu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmayı, KÜ-BAP03/2016-8 proje numarası ile destekleyen, Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetimi Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Sevilay TOKMAKOĞLU
Kastamonu, Haziran, 2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI	ii
TAHHÜTNAME	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Memenin Anatomi ve Fizyolojisi	1
1.2. Meme Kanseri	4
1.2.1. Epidemiyoloji	5
1.2.2. Etyoloji	5
1.2.2.1. Genetik yatkınlık	5
1.2.2.2. Yaş	6
1.2.2.3. Doğurganlık, emzirme ve hormonlar	6
1.2.2.4. Ailesel öykü	6
1.2.2.5. Coğrafi farklılıklar	6
1.2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	7
1.2.3.1. İn situ (Noninvaziv) karsinomlar	7
1.2.3.1.1. İn situ duktal karsinom (DCİS)	7
1.2.3.1.2. İn situ lobüler karsinom (LCİS)	7
1.2.3.2. İnvaziv karsinomlar	8
1.2.3.2.1. İnvaziv (İnfiltratif) lobüler karsinom	8
1.2.3.2.2. İnvaziv (infiltratif) duktal karsinom	8
1.2.4. Meme Kanserinde Evreleme	8
1.2.4.1. Tümör nod metastaz (TNM) evreleme sistemi	8
1.2.4.1.1. Meme kanseri için T kategorileri	9
1.2.4.1.2. Meme kanseri için N kategorileri	10

1.2.4.1.3. Meme kanseri için M kategorileri 12
1.2.4.2. Evreleme (stage) sistemi 13
1.2.5. Moleküler Sınıflandırma 14
1.2.5.1. Luminal A meme kanseri 15
1.2.5.2. Luminal B meme kanseri 15
1.2.5.3. HER2 tip meme kanseri 15
1.2.5.4. Bazal benzeri meme kanseri 16
1.2.5.4.1. Triple negatif meme kanseri (TNMK) 16
1.2.6. Epigenetik Mekanizmalar 18
1.2.6.1. Histon modifikasyonları 20
1.2.6.2. Kodlanmayan RNA'lar 20
1.2.6.2.1. siRNA 21
1.2.6.2.2. miRNA 23
1.2.6.3. DNA metilasyonu 27
1.2.6.4. DNA metilasyonu ve kanser 28
1.2.6.5. DNA Metilasyonunun kanserdeki önemi 30
1.2.6.6. Meme kanseri genetiği 31
1.2.6.6.1. Meme kanserinde görülen polimorfizmler 32
1.2.6.6.2. Meme kanserinde görülen mutasyonlar 32
1.2.6.6.3. Meme kanserinde kodlanmayan RNA'lar 33
1.2.6.6.4. DNA metilasyonu ve meme kanseri 33
1.2.6.7. Triple negatif meme kanserinin genetiği 34
1.2.6.8. RASSF1A geni 37
1.2.6.8.1. Kanserde RASSF1A geni metilasyonu 39
1.2.6.8.2. Meme kanserinde RASSF1A geni metilasyonu 41
2. MATERYAL VE METOD 43
2.1. Çalışma Grupları 43
2.2. Ekipman 43
2.2.1. Kimyasal Maddeler 43
2.2.2. Araçlar ve Cihazlar 44
2.3. Parafine Gömülü Tümör ve Normal Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu 45
2.4. DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 47

2.5. Bisülfit Uygulaması 52
2.6. Kit İçeriğinin Hazırlanması 48
2.6.1. CT Conversion Reagent Hazırlanması 48
2.6.2. M-Wash Buffer hazırlanması 48
2.7. Primer Dizaynı 49
2.8. Real-Time PCR Analizi 50
2.9. Analiz 53
2.10. İstatistiksel Yöntem 53
3. BULGULAR 54
3.1. Metilasyon Profili 55
4. TARTIŞMA 63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 70
KAYNAKLAR 71
ÖZGEÇMİŞ 85

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC	Amerikan kanser Komitesi
BRCA1	Breast Concer Susceptibility Gene 1
BRCA2	Breast Concer Susceptibility Gene 2
DCİS	İn Sitü Duktal Karsinom
DNMT	DNA Metil Transferans
EGFR	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ER	Östrojen Reseptör
HAT	Histon Asetil Transferaz
HDAC	Histon Deasetilaz
HER-2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
LCİS	İn Sitü Lobüler Karsinom
M	Uzak Bölgelere Yayılım
miRNA	Mikro RNA
N	Aksiller Lenf Notları Yayılımı
ncRNA	Kodlanmayan RNA
NST	No Special Type
PGR	Progesteron Reseptör
RISC	RNA İnduced Silencing Complex
RNAi	RNA İnterferans
SAM	S-Adenozilmetiyon
siRNA	Small İnterfering RNA
T	Tümör Boyutu
TDLU	Terminal Duktal-Lobüler Ünite
TNMK	Triple Negative Meme Kanseri
UICC	Uluslar Arası Kanser Örgütü
WHO	Word Health Ogranization
RT-PCR	Real Time PCR
siRNA	Small İnterfering RNA
lncRNA	Uzun Kodlanmayan RNA
dsRNA	Çift İplikli RNA
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
SNP	Tek nükleotid Polimorfizmi
OS	Kötü Sağkalım
BCAC	Meme Kanseri Birliği Konsorsiyumu
TNBCC	Üçlü Negatif Meme Kanseri Konsorsiyumu
CNV	Kopya Numarası Değişiklikleri
TSG	Tümör Baskılayıcı Gen

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Memenin anatomik yapısı. 4
Şekil 1.2. Meme kanserinde T kategorileri, tümör hücreleri kırmızı renkte gösterilmiştir. 10
Şekil 1.3. siRNA'nın gen ekpresyonunu engelleme mekanizması. 23
Şekil 1.4. miRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu. 25
Şekil 1.5. Metilasyon ve kanser ilişkisi. Kırmızı daireler metilasyonu ifade etmektedir. 29
Şekil 1.6. 3p21.3 bölgesinde bulunan RASSF1 geni lokalizasyonu. 37

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. TNM Sınıflandırlması. 9
Tablo 1.2. Evreleme Sistemi. 14
Tablo 1.3. siRNA çeşitleri ve işlevleri (Güzelgül ve Aksoy, 2009).. 22
Tablo 2.1. RASSF1A Unmetile ve Metile Primer Dizileri. 50
Tablo 2.2. RocheLightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kullanımı..... 51
Tablo 2.3. Cihaz protokolü 52
Tablo 3.1. Çalışmadaki katılımcıların gruplara göre dağılımı. 54
Tablo 3.2. Gruplara göre RASSF1A geni için metilasyon dağılımı (Hasta grubunda bir hastada sonuç alınamamıştır)..... 56
Tablo 3.3. Triple negatif meme kanserinde RASSF1A metilasyon durumu ile Histolojik Derece arasındaki ilişki. 58
Tablo 3.4. Triple negatif meme kanserinde RASSF1A metilasyon durumu ile Evre arasındaki ilişki. 59
Tablo 3.5. Triple negatif meme kanserinde RASSF1A metilasyonu ile lenf nodu tutulumu arasındaki ilişki. 60
Tablo 3.6. Triple negatif meme kanserinde tümör çapı ile RASSF1A metilasyon durumu ilişkisi. 61

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 2.1. *RASSF1A* genine ait erime eğrisi. 53
Grafik 3.1. Çalışmadaki katılımcıların gruplara göre dağılım grafiği. 54
Grafik 3.2. MT3 nolu olguya ait RASSF1A geni metile profil gösteren erime eğrisi. 56
Grafik 3.3. MK18 nolu olguya ait RASSF1A geni unmetile profil gösteren erime eğrisi. 56
Grafik 3.4. MT25 olguya ait RASSF1A geni metile+unmetile profil gösteren erime eğrisi. 57
Grafik 3.5. Tümör ve kontrol dokusuna göre RASSF1A geni için metilasyon dağılımları. 57
Grafik 3.6. Triple negatif meme kanserinde Histolojik Dereceye göre RASSF1A metilasyon frekans dağılımları. 58
Grafik 3.7. Triple negatif meme kanserinde Evreye göre RASSF1A metilasyon frekans dağılımları..... 59
Grafik 3.8. Triple negatif meme kanserinde lenf nodu tutulumu durumuna göre RASSF1A metilasyon frekans dağılımları. 60
Grafik 3.9. Triple negatif meme kanserinde tümör çapına göre RASSF1A metilasyon frekans dağılımı. 62

1. GİRİŞ

Meme kanseri; tüm kanser olgularının %23'ünü ve kanser ölümlerinin %14'ünü oluşturarak, kansere bağlı ölümlerin başını çeken ve kadın sağlığını olumsuz yönde etkileyen önemli ve sık görülen bir kanser türüdür (Eliyatkın, 2015).

Dünya sağlık örgütü, 2014 tüm dünyada 1 670 00 yeni teşhis konulan meme kanserli kadın olduğunu, meme kanserinin kadınlarda görülen kanserlerin 4'te 1'ini oluşturduğu bildirmiştir. Gelişmiş ülkelerde kandınlarda meme kanseri görülme oranı 1/7 olup; meme kanseri gelişmekte olan ülkelerde artmakta ve gelişmiş olan ülkelerde azalmaktadır. 2030 yılında tüm meme kanserlerinin %7'sinin, gelişmekte olan ülkelerde görüleceği öngörülmektedir (URL-1).

Ülkemizde 2014 yılında 50 ile 69 yaş arasındaki kadınların %44,5, 25 ile 49 yaş arasındaki kadınların ise %40,4'üne meme kanseri tanısı konulmuştur. Meme kanseri evreleri incelendiğinde T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü veri tabanında yer alan invaziv vakaların %11,1'i ileri evrededir (URL-1).

Kadınlarda ilk adet görme yaşı, doğum yapma ve doğum sayısı, adetten kesilme, emzirme süresi, infertilite, hormon replasman tedavisi alma, beslenme alışkanlıkları gibi durumların meme kanserinin insidans hızını artırdığı bildirilmektedir. Meme kanseri kadınlarda görülen kasnsere bağlı ölümlerin %20'sini kapsamaktadır (Koçak vd., 2011).

1.1. Memenin Anatomi ve Fizyolojisi

Meme, anterior toraks duvarında lokalize, 2 ve 6. kostalar arasında yer alan medialde sternum kenarı, lateralde ise ön-orta aksiller çizgiye kadar uzanan, pektoralis major kası üzerinde yerleşmiş apokrin bir bezdir (Rosen, 2001). Memenin çapı süperior-inferior doğrultuda 10-12 cm büyüklüğündedir. Santral bölgede kalınlığı en fazla 5-7 cm'dir. Emzirme süresinde olmayan bir memenin ağırlığı 150-200 gram, emzirme süresinde ise 400 ile 500 gram arasındadır. Kadınlarda memenin boyutları ve sınırları

gebelik, emzirme, şişmanlama, zayıflama ve yaş gibi nedenlerle değişiklik gösterebilir (Sharkley, Allred ve Volente, 1996).

Meme, süperfisyal fasya adı verilen yapının içindedir. Süperfisyal fasya süperiorda servikal fasya, inferiorda Cooper fasyası ile devam eder. Meme dokusu pektoral fasyanın tarif edilen sınırları dışında da görülebilir. Hipodermisten meme parankimine uzanım gösteren Cooper ligamentleri olarak adlandırılan fibröz katlantılar, memenin anatomik lokalizasyonunu destekler (Sharkley, Allred ve Volente 1996).

Meme başını çevreleyen areola yaklaşık 2-6 cm boyutunda olup, 2. ve 6. kostaların orta kısmına denk gelen 4. kosta hizasında yerleşmiştir. Bu bölge meme derisinden daha fazla pigment içerdiği için koyu renktedir. Areola renginin koyuluk düzeyi östrojen seviyesiyle ilişkili olup östrojen seviyesi arttıkça koyuluk artar. Montgomery bezlerinin duktuslarının açıldığı montgomery tüberkülleri areolada yer alır (Kalaycı, Acarlı ve Demirkol, 2002).

Memenin üst-dış kadranı, diğer kadranlara göre çok daha fazla glandüler elaman içerdiği için, benign ve malign meme tümörleri bu kadranda görülme sıklığı daha yüksektir. Meme dokusunun koltuk altına doğru olan uzantısına "Spence'in aksiller kuyruğu" denilir. Spence'in aksiller kuyruğu, derin fasyayı "Langer Deliği" olarak adlandırılan bir aralıktan geçerek, aksillaya kadar uzanır. Bu nedenle memede oluşan tüm fizyolojik ve patolojik durumlar, aksiler kuyrukta da kendini gösterir (Spart ve Tabin, 1995).

Meme dokusu asinüsler, duktuslar ve stromal elamanlardan oluşmuştur. Memenin salgı yapan birimleri olan asinüslerin içi, küboid epitelle döşenmiştir. Asinüslerin dışı bağ dokusu, kan damarları ve lenf damarları ile çevrilmiştir. Asinüsler lobülleri, lobüllerde bir araya gelerek lobları meydana getirirler. Epitelyal parankim her biri, ayrı bir salgı kanalı ile meme başına açılan 15-20 lobdan oluşur. Her lob 20-40 kadar lobül içerir. Dolayısıyla her duktus bir meme lobunu, yani 20-30 kadar lobülü drene eder. Her bir lobülde sayıları 20 ile 80 arasında değişen asinüsler bulunur. Asinüsler toplayıcı duktus çevresinde toplanmıştır. Meme glandının esas yapısal birimini

lobüller oluştururlar. Lobüllerin sayısı genç kadınlarda daha fazla olmakla birlikte daha büyük görünüme sahiptirler. Lobüllerin sayısı kadınlar adetten kesildikten sonra azalır ve her biri yalnızca birkaç asini içeren küçük üniteler şekline dönüşür (Spart ve Tabin, 1995).

Memede süt kanalları sistemi, asinüslerin birleşerek terminal duktus adı verilen bir kanala açılmasıyla başlar. Terminal duktus intralobuler ve ekstralobuler olmak üzere iki segmentten oluşur. Birkaç lobülün terminal duktuslarının birleşmesi ile laktifer duktuslar oluşur. Bu duktuslar birbirlerine yaklaşarak meme başına doğru ilerler ve subareolar bölgede laktifer sinüs olarak isimlendirilen bir dilatasyon gösterirler. Bu laktifer sinüsler, ampulla adı verilen çok katlı yassı epitel ile örtülü son kısım ile meme başından dışarı açılırlar (Spart ve Tabin, 1995).

Subsegmental ve terminal duktuslar laktifer duktuslar dallanmasıyla oluşurlar. Terminal duktuslar, gevşek bir bağ dokusu stroma ile çevrelenmişlerdir. Memenin fonksiyonel olarak en aktif bölümü olan terminal duktal-lobüler ünite (TDLU), kısa terminal duktus bölümünden ve asinüsten (alveol) meydana gelir. Laktifer duktuslar, orifislerine yakın bölümlerde stratifiye skuamöz epitelyum ile döşelidirler. Duktusu döşeyen epitel, laktifer sinüs içerisinde iki sıralı küboidal hücrelerden oluşan bir yapıya dönüşür. Duktus sisteminin geri kalanı tek sıralı kolumnar ya da kuboidal epitel hücreleri ile döşelidir. Epitel hücreleri, bazal membran üzerinde yerleşim gösterirler. Bazal membranın iç tabakası bazal lamina adını alır (Topuz, Aydıner ve Dinçer, 2003).

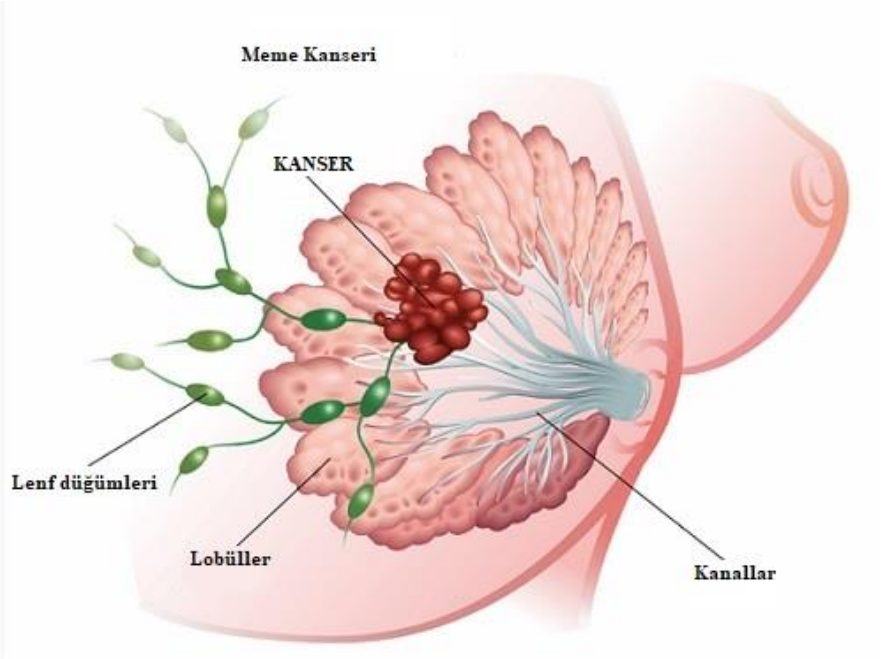
Meme dokusunda, tubulo alveolar glandların sekretuar hücreleri, duktusların epitel ve myoepitel hücreleri, bazal lamina üzerindedirler. Myoepitel hücreleri, epitel hücreleri ile bazal membran arasında bir tabaka oluştururlar. Bu hücreler sekretuar bölgelerde de mevcut olmakla birlikte, geniş duktuslarda daha belirgindirler. Memenin sekretuar kısmı, hamilelik ve emzirme dönemlerinde ve yaşa bağlı olarak değişim gösterir. İnaktif glandda, glandüler komponent azdır. Bu bölüm hemen hemen sadece duktal elemanlardan olusur. Menstrual siklus (adet döngüsü) sırasında, inaktif meme dokusu hafif derecede değişime uğrar. Menstrual siklusun erken dönemlerinde, duktuslar lümen içermezler, kordlar şeklinde uzanırlar. Östrojen

uyarısı altında, ovulasyon (yumutlama) döneminde sekretuar hücreler yüksek kolumnar şekle dönüşürler, asinüs lümenlerinde az miktarda sekresyon görülmeye başlar ve bağ dokusunda sıvı ve lipid birikimi meydana gelir. Daha sonra, hormonal uyarı gerilediğinde gland inaktif haline geri döner (Topuz, Aydıner ve Dinçer, 2003).

1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, memenin duktus veya lobüllerini örten epitelyal hücrelerin malign proliferasyonudur. Kansere bağlı ölümlerin akciğer kanserinden sonra ikinci sık nedeni meme kanseridir. Kandınlarda en sık görülen kanser çeşidi olmakla birlikte kadınlarda görülme oranı %22'dir. Gelişmiş ülkelerde bu oran daha da artmakta olup %26'ya kadar çıkabilmektedir.(Parkin ve ark., 2000).

WHO (World Health Organization)'nun raporuna göre her yıl dünyada 1 000 000 kadında meme kanseri gelişmekte ve bu hastalıktan 370 000 kadın ölmektedir. Dünyada meme kanseri görülme sıklığı yıllık, ortalama %0,5 oranında artmaktadır (Semerci vd., 2013). Memenin genel anatomik yapısı aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Memenin anatomik yapısı (URL-2).

1.2.1. Epidemiyoloji

GLOBOCAN 2012 verilerine göre, Dünya'da 17 milyon kadına kanser tanısı konmuş olup, 521 900 kişide de meme kanserinden dolayı ölüm gerçekleşmiştir. Meme kanseri, gelişmiş ülkelerde en çok ölüme neden olan ikinci kanser türü olarak listeye girmiştir. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri insidansı 74,1, mortalite oranı ise 14,9 iken; gelişmekte olan ülkelerde insidans 31,3, mortalite oranı ise 11,5 olarak bildirilmiştir. (Torre vd., 2015).

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2014 yılında yayınladığı Türkiye Kanser İstatistikleri Raporuna göre meme kanseri, 2014 yılında Türkiye'de kadınlar arasında en sık rastlanan kanser tipidir. 35 yaşından sonra kadınlarda meme kanserine yakalanma oranı artmakla birlikte en yüksek risk grubu 60-64 yaş olarak belirtilmiştir. Erkeklerde bu oran oldukça düşüktür. Erkeklerde meme kanserinin en sık görüldüğü yaş aralığı 70-74 yaş olarak bildirilmiştir (Gültekin vd., 2014).

1.2.2. Etyoloji

1.2.2.1. *Genetik yatkınlık*

Meme kanserinin büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10'unda genetik yatkınlık söz konusudur. Ailesel yatkınlığa neden olan genler *BRCA-1* (*Breast cancer susceptibility gene 1*) ve *BRCA-2* (*Breast cancer susceptibility gene 2*)'dir. Bu iki gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar, ailesel meme kanserlerinin 2/3'ünde, tüm vakaların ise yaklaşık %5'inde belirlenmiştir (Osborne vd., 2004; Ponder, 1994). *BRCA-1* geni, ovaryum ve meme kanserine yatkınlığı arttıran, kromozom 17q12-21'de lokalize bir gendir. Meme kanseri hastalarının %4'ünde *BRCA-1* mutasyonu görülmektedir. 40 yaş altında ortaya çıkan meme kanserlerinin %25'i *BRCA-1* mutasyonu ile ilgilidir.

BRCA-1 geni mutasyonlarını taşıyanların 50 yaşına ulaşıncaya kadar meme ve/veya ovaryum kanserine yakalanma olasılığı %60, 70 yaşına ulaşıncaya kadar ise %85 olarak bildirilmiştir. 13. kromozomda lokalize olan *BRCA-2* geni, ailevi meme

kanserlerinin %70'inden sorumludur ve aynı zamanda erkeklerde de meme kanseri riskini arttırmaktadır (McKinley vd., 1995) .

1.2.2.2. *Yaş*

Kadınlarda meme kanseri insidansının, yaş ile birlikte artmakta olduğu, menapoza kadar bu riskin her 10 yılda bir, ikiye katlandığı ve meme kanseri gelişme riskinin 25 yaşında 1/19 608, 55 yaşında 1/33, 75 yaşında 1/11, 80 yaşında 1/8 olduğu bildirilmiştir (Phipps vd., 2010).

1.2.2.3. *Doğurganlık, emzirme ve hormonlar*

Östrojen ve progesteron meme kanseri gelişiminde rol oynayan önemli hormonlar olarak görülmektedir. Normal epitelyum hücrelerinde, östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR) bulunmaktadır. Bu hormon düzeylerinin değişmesi, normal epitelyal aktivitenin değişmesine neden olabilmektedir. İleri yaşlarda tek doğum yapan kadınlarda erken yaşlarda doğum yapan kadınlara oranla meme kanserine yakalanma riski 2-5 kat artmaktadır. Bunun yanı sıra menopoza 55 yaşın üstünde girmekte meme kanseri riskini arttırmaktadır. Uzun süreli emzirmelerin riski azaltabileceği, oral gebelikten korunma yöntemlerinin ise meme kanseri gelişim riskini 1,24 kat arttırdığı bildirilmiştir (Cancer, 2002).

1.2.2.4. *Ailesel öykü*

Birinci derece akrabasında meme kanseri olan bireylerin, meme kanserine yakalanma riskinin 2 kat arttığı bildirilmiştir. Birinci dereceden akrabalarından iki kişide meme kanseri olan kişilerde ise risk 4-6 kat artmaktadır (Phipps vd., 2010).

1.2.2.5. *Coğrafi farklılıklar*

Kanserin görülme sıklığı, ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde ve Kuzey Amerika'da meme kanseri görülme riskinin, diğer bölgelere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Amerika'da meme kanserinden ölüm oranı, Japonya'ya göre 5 kat daha fazla bulunmuştur. Bu farklılıkta, çevresel faktörlerin

yanı sıra, diyet ve beslenme alışkanlıklarının da etkili olduğu düşünülmektedir (Torre vd., 2015).

1.2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanseri, histopatolojik sınıflandırmaya göre invaziv (infiltratif) ve noninvaziv (in situ) kanserler olarak ikiye ayrılmaktadır.

1.2.3.1. *İn situ (Noninvaziv) karsinomlar*

İn situ karsinomlar, tüm meme kanserlerinin %20-25 kadarını oluşturlar ve duktal ve lobüler olmak üzere iki tipe ayrılırlar. Eğer süt bezlerinde (lobes) oluşmuşlarsa, lobular karsinoma in situ ya da kısaca LCIS, süt kanallarında oluşmuşlarsa duktal karsinoma in situ ya da kısaca DCIS olarak adlandırılırlar (URL-4).

1.2.3.1.1. *İn situ duktal karsinom (DCİS)*

DCİS'te meme duktusları, anaplastik tümör hücreleri ile dolmuştur. Nadiren hücreler papiller yapılar oluşturur ya da meme başına yayılarak, meme başı Paget hastalığına neden olurlar. Anaplastik hücreler duktus bazal membranını penetre etmez ve noninvaziv in situ olarak kalırlar. Yüksek dereceli olanların %40'ında, zamanla invazyon gerçekleşir (Crum vd., 2002).

1.2.3.1.2. *İn Situ lobüler karsinom (LCİS)*

LCİS, terminal duktus ve duktüllerden gelişir ve bu yapılarda anaplastik tümör hücreleri görülür. Lezyonlar, fibrokistik değişiklikler ile beraber, ya da intraduktal karsinomlarla beraber, invaziv karsinom alanlarının komşuluğunda olabilir, fibroadenom zemininde gelişebilir ve sıklıkla çok sayıda ve bilateraldirler. Üçte birinde aynı taraf ya da karşı tarafta invaziv karsinom gelişir. Genellikle ER ve PR pozitif ve CERB-B2 negatiftirler ve premenapozal dönemde rastlantısal olarak bulunurlar (Crum vd., 2002).

1.2.3.2. *İnvaziv karsinomlar*

1.2.3.2.1. *İnvaziv (İnfiltratif) lobüler karsinom*

Tüm invazif meme karsinomlarının %5-15'ini oluştururlar ve hormon replasman tedavisi alan kadınlarda daha sık görülürler. Diğer invazif meme karsinomlarına göre, daha yüksek oranda bilateral ve multifokal olurlar (İlvan, 2006).

1.2.3.2.2. *İnvaziv (infiltratif) duktal karsinom*

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

1.2.4. Meme Kanserinde Evreleme

1.2.4.1. *Tümör nod metastaz (TNM) evreleme sistemi*

Klinik evreleme için kullanılan çeşitli sistemler bulunmaktadır, fakat dünyada ve ülkemizde en çok kullanılan sistem, Uluslararası Kanser Örgütü (UICC, 1987) ve Amerikan Kanser Komitesi (AJCC, 1988)'nin belirlediği TNM sistemidir. T; tümör boyutunu, N; aksiler lenf nodlarına yayılımı ve M; uzak bölgelere yayılımını gösterir.

Ocak 2018'de yürürlüğe giren en yeni AJCC sistemi, meme kanseri için hem klinik hem de patolojik evreleme sistemlerine sahiptir.

T, N ve M'den sonraki sayılar veya harfler, bu faktörlerin her biri hakkında daha fazla ayrıntı sağlamakta ve daha yüksek rakamlar, kanserin daha ileri olduğu anlamına gelmektedir (Tablo 1.1.).

Tablo 1.1. *TNM Sınıflandırması*.

T: PRİMER TÜMÖR	N: BÖLGESEL LENF NODÜLLERİ	M: UZAK METASTAZ
➢ Tx ➢ T0 ➢ Tis • Tis (DCIS) • Tis (LCİS) • Tis (Paget) ➢ T1 • T1mic • T1a • T1b • T1c ➢ T2 ➢ T3 ➢ T4 • T4a • T4b • T4c • T4d	➢ Nx ➢ N0 ➢ N1 ➢ N2 • N2a • N2b ➢ N3 • N3a • N3b • N3c	➢ Mx ➢ M0 ➢ M1

1.2.4.1.1. *Meme kanseri için T kategorileri*

0-4 arasında sayı alan T, ana (primer) tümörün boyutunu ve cilde ya da memenin altındaki göğüs duvarına yayılıp yayılmadığını belirler. Daha yüksek T sayıları, memenin yakınındaki dokularda daha büyük bir tümör ve/veya daha geniş yayılım anlamına gelir.

TX: Primer tümör değerlendirilemez.

T0: Primer tümör kanıtı yok.

Tis: Karsinom in situ (DCIS veya ilişkili tümör kitlesi olmayan Paget hastalığı)

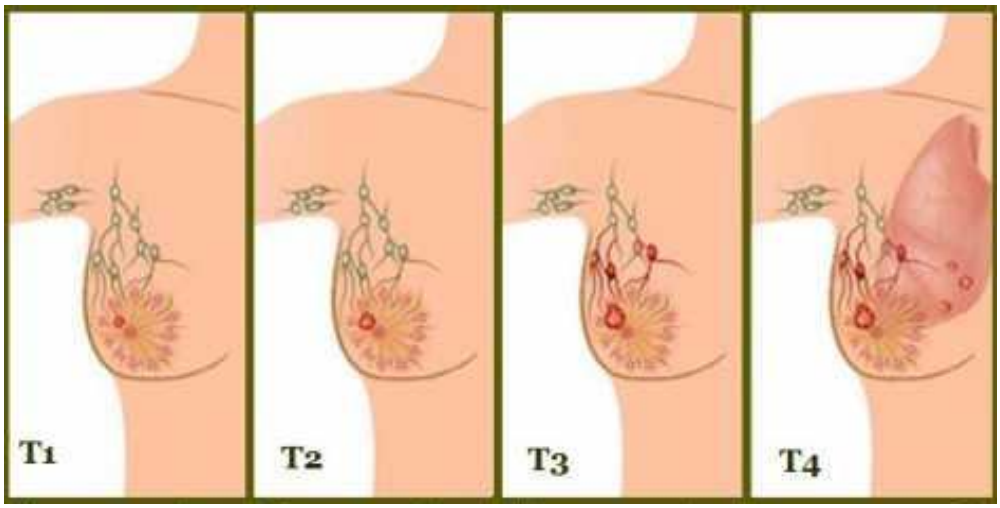
T1 (T1a, T1b ve T1c'yi içerir): Tümör 2 cm veya daha küçüktür.

T2: Tümör 2 cm'den büyük, 5 cm'den küçüktür.

T3: Tümör 5 cm'den büyüktür.

T4 (T4a, T4b, T4c ve T4d'yi içerir): Göğüs duvarına veya meme cildine büyüyen herhangi bir büyüklükteki tümörü temsil eder. Enflamatuar meme kanseri de bu kategoridedir.

T kategorileri şekilde gösterilmiştir (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Meme kanserinde T kategorileri, tümör hücreleri kırmızı renkte gösterilmiştir (URL-3).

1.2.4.1.2. *Meme kanseri için N kategorileri*

N, 0 ila 3 arasında bir sayı ile değerlendirilir, kanserin memenin yakınındaki lenf nodlarına yayılıp yayılmadığını ve yayılmış ise kaç lenf nodunu tuttuğunu gösterir.

NX: Yakındaki lenf nodları değerlendirilemez (örneğin, daha önce çıkarılmış olabilirler).

N0: Kanser, yakın lenf nodlarına yayılmamıştır.

- N0 (i +): Kanser yayılım alanı 200'den az hücre içerir ve 0,2 mm'den küçüktür. "I +" kısaltması, rutin boyamalarda veya immünohistokimya adı verilen özel bir boyama tekniği kullanıldığında az sayıda kanser hücresinin (izole edilmiş tümör hücresi olarak adlandırılır) görüldüğü anlamına gelir.

- N0 (mol +): Kanser hücreleri koltuk altı lenf düğümlerinde görülemez (özel boyamalar kullanılarak bile), ancak RT-PCR yöntemi kullanılarak kanser hücrelerinin izleri tespit edilir.

N1: Kanser, 1 ila 3 aksiller (koltuk altı) lenf noduna yayılır ve/veya sentinel lenf nodu biyopsisinde, internal meme lenf nodlarında (meme kemiğine yakın olanlar) çok az miktarda kanser bulunur.

- N1mi: Kolun altındaki lenf nodlarında mikrometastazlar vardır. Lenf nodlarına yayılan kanser alanları en az 0,2 mm'dir, ancak 2 mm'den büyük değildir.

- N1a: Kanser, kolun altında 1 ila 3 lenf noduna kadar yayılmış ve en az 2 mm genişliğindeki kanser bölgesi oluşturmuştur.

- N1b: Kanser, aynı taraftaki internal meme lenf nodlarına yayılmıştır, ancak bu yayılım sadece sentinel lenf nodu biyopsisinde görülmüştür (lenf nodlarının genişlemesine neden olmaz).

- N1c: Hem N1a hem de N1b geçerlidir.

N2: Kanser, kolun altındaki 4 ila 9 lenf noduna yayılmış veya kanser, internal meme lenf nodlarına genişlemiştir.

- N2a: Kanser, kolun altındaki 4 ila 9 lenf noduna ve en az bir kanser alanı 2 mm'den daha büyük bir alana yayılmıştır.

- N2b: Kanser bir veya daha fazla internal meme lenf noduna yayılarak genişlemesine neden olmuştur.

N3: İki durum söz konusudur:

- N3a: Kanser, en az bir kanser alanı 2 mm'den büyük olan 10 veya daha fazla aksiller lenf bezine yayılmıştır veya kanser, infraklaviküler düğümler

altındaki lenf nodlarına yayılmış ve en az bir kanser alanı 2 mm'den daha büyük bir alana yayılmıştır.

- N3b: Kanser en az bir aksiller lenf nodunda (en az 2 mm'den büyük bir kanser yayılım alanıyla) bulunur ve internal meme lenf nodlarını genişletir. Ya da kanser, 4 veya daha fazla aksiller lenf noduna (2 mm'den daha büyük bir kanser yayılım alanıyla) yayılmış ve sentinel lenf nodu biyopsisinde internal meme lenf bezlerinde çok az miktarda bulunmuştur.

- N3c: Kanser, 2 mm'den büyük bir kanser yayılımı alanına sahiptir ve köprücük kemiği (supraklaviküler düğümler) üzerindeki lenf nodlarına yayılmıştır (URL-4).

1.2.4.1.3. *Meme kanseri için M kategorileri*

M'nin ardından gelen 0 veya 1, kanserin uzak organlara, örneğin akciğerlere, karaciğere veya kemiklere yayılıp yayılmadığını gösterir.

MX: Uzak yayılım (metastaz) değerlendirilemez.

M0: X-ışınlarında (veya diğer görüntüleme testlerinde) veya fiziksel muayenede uzak bir yayılma bulunmuyor.

- cM0 (i +): Kan ya da kemik iliğinde az sayıda kanser hücresi bulunur (yalnızca özel testlerle tespit edilebilir) ya da koltuk altı, köprücük kemiğinden uzakta lenf düğümlerinde küçük bir kanser yayılımı (0,2 mm'den büyük olmayan) bulunur.

M1: Kanser uzak organlara yayılmıştır (çoğu kez kemiklere, akciğerlere, beyine veya karaciğere yayılma göstermiştir) (URL-4).

1.2.4.2. *Evreleme (stage) sistemi*

Meme kanseri evresi, genellikle 0 ile IV arasında bir ölçek olarak ifade edilir; evre 0, kendi orijinal yerleri içinde kalan invazif olmayan kanserleri ve evre IV ise invazif kanserleri tanımlar.

Kanser aşamalandırması aşağıdaki dört özelliğe dayandırılır;

1. Kanserin büyüklüğü
2. Kanserin invazyon durumu
3. Kanserin lenf düğümlerinde bulunma durumu
4. Uzak organlara yayılım durumu (URL-4) (Tablo 1.2.).

Tablo 1.2. *Evreleme Sistemi.*

EVRE	T	N	M
EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE 1	T1	N1	M0
EVRE 2A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
EVRE 2B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE 3A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
EVRE 3B	T4	N0, N1, N2	M0
EVRE 3C	Tx	N3	M0
EVRE 4	Tx	Nx	M1

1.2.5. Moleküler Sınıflandırma

Son yıllarda, meme kanserinin morfolojik sınıflandırmasını, meme kanserinin heterojenliği nedeniyle, tedavi edici stratejileri iyileştirmek ve tümör davranışının daha iyi tahmin edilmesini sağlayan moleküler parametrelerin kullanımı artılırmıştır. Perou ve arkadaşları, meme kanserini, mikroarray teknolojisini kullanarak, gen ekspresyon profillerindeki benzerliklere göre farklı alt gruplara ayırmışlardır. Moleküler sınıflandırma olarak güncellenen bu yeni sınıflandırma, meme kanserinin biyolojisine yeni bakış açıları kazandıracağı ve meme kanserinin terapötik

yaklaşımını etkileyeceği umuduyla, tıp ve bilim camiası tarafından kabul edilmiştir (Makki, 2015).

1.2.5.1. *Luminal A meme kanseri*

Luminal A alt tipi tümörler, ER ve PR-pozitif ve HER2-negatif olup, düşük Ki-67 protein seviyesi gösterirler. Meme kanserlerinin yaklaşık %30-70'i luminal A tümörleridir (Vocud vd., 2010). Luminal A tümörlerinde, hücre proliferasyon aktivitesinin diğer alt tiplerden çok daha düşük olduğu ileri sürülmektedir, ER-pozitif olma eğiliminde oldukları için, tedavi genellikle hormon tedavisini içerir. Luminal A meme kanseri oldukça iyi sağ kalım oranları ve oldukça düşük nüks etme oranları ile en iyi prognoza sahip olan kanserlerdir (Yanagawa vd., 2012; Metzger-Filho vd., 2013).

1.2.5.2. *Luminal B meme kanseri*

Luminal B tümörleri, ER ve PR-pozitif olma eğilimindedir. HER2-negatif veya HER2-pozitif olabilirler, yüksek Ki-67 protein seviyesine sahiptirler (Yanagawa vd., 2012). Luminal B tümörlü kadınlarda, meme kanseri genellikle luminal A tümörleri olanlardan, daha genç yaşta teşhis edilir. Meme kanserlerinin yaklaşık %10-20'si Luminal B meme kanseridir (Vocud vd., 2010). Luminal B meme kanseri, Luminal A ile karşılaştırıldığında, daha kötü prognoza yol açan faktörlere sahip olma eğilimindedirler, sağ kalım oranları daha düşüktür (Kobalt vd., 2012; Metzger-Filho vd, 2013).

1.2.5.3. *HER2 tip meme kanseri*

HER2 moleküler alt tipi, HER2-pozitif ile aynı değildir ve tedaviyi yönlendirmek için kullanılmaz. Çoğu HER2 tipi tümörler HER2-pozitif olmakla birlikte, yaklaşık %30'u HER2 negatiftir (Foukas vd., 2013). HER2 tipi tümörler ER-negatif, PR-negatif, lenf nodu-pozitif, daha düşük tümör evresi olma eğilimindedirler. Meme kanserlerinin yaklaşık yüzde %5-15'i HER2 türüdür (Carey vd., 2014). HER2 tipi tümöre sahip kadınlar, Luminal A ve Luminal B tümöre sahip olanlardan daha genç yaşta teşhis edilebilmektedir (Metzger-Filho vd, 2013) .

1.2.5.4. *Bazal benzeri meme kanseri*

Bazal benzeri meme kanserleri; Triple negatif olmayan bazal-benzeri meme kanseri ve Triple negatif bazal-benzeri meme kanseri olarak iki alt grupta incelenir. Bu alt tipler, BRCA mutasyonunu takiben, ER/PR negatif kanserlerde, HER2 amplifikasyonu/mutasyonu oluşup oluşmadığına bağlı olarak ayrılır. Triple negatif olmayan, bazal benzeri meme kanserinde HER2 amplifikasyonu ve ekspresyonu vardır (Fan vd., 2006). Triple negatif meme kanseri (üçlü negatif meme kanseri) ise, ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatiftir. Agresif davranışı ile bilinmektedir, daha genç yaşlarda ortaya çıkar. Bu tümörler, metastaz, progresyon eğilimi ve spesifik hedef tedavilerin bulunmaması nedeniyle daha agresif bir fenotipe ve daha kötü bir prognoza sahiptir (Howlader, 2014; Yao vd., 2017).

1.2.5.4.1. *Triple negatif meme kanseri (TNMK)*

TNMK ER, PR ve HER2 ekspresyonu göstermeyen meme karsinomlarını içeren gruptur. Bu grup tümörler tedaviye duyarlılıkları, biyolojik özellikleri, prognozları açısından farklılık gösterirler. Negatifliği tanımlamak için kullanılan eşik değerlere, tekniğe ve hasta popülasyonuna bağlı olarak değişen oranlarda tespit edilse de, TNMK, tüm meme karsinomlarının yaklaşık %10-20'sini oluşturmaktadır (Oakman vd., 2001; Badues vd., 2011).

Histopatolojik olarak TNMK, çoğunlukla büyük boyutlu, çevre dokuyla ekspansif bir sınır oluşturan, geniş jeografik nekroz alanlarına sahip, yüksek nükleer dereceli, mitotik aktivitesi yüksek, bez yapısı oluşturmayan tümörlerdir. Tümör çevresinde lenfoplazmositik hücre infiltrasyonu, santralinde fibrotik bir odak gözlenir (Thike vd., 2010) Ancak bu bulguların hiçbiri TNMK için spesifik değildir. Triple negatif olmayan diğer yüksek dereceli tümörlerde de benzer özellikler gözlenmektedir.

TNMK'nin çoğunluğu invaziv karsinom, NST (No special type) morfolojisindedir. İnvaziv lobüler karsinom, metaplastik karsinom, medüller karsinom, myoepitelyal karsinom, apokrin karsinom, adenoid kistik karsinom, nöroendokrin karsinom ve sekretuar karsinom triple negatif özellikteki diğer histolojik alt tiplerdir (Badve vd., 2011; Chiorean vd., 2013).

a. Metaplastik karsinom: Bu grup içindeki tümörler, skuamöz hücrelere ve/veya iğsi, kondroid, osseöz, rabdomyoid gibi mezenkimal komponentlere diferansiye olurlar. Tüm meme karsinomlarının %0,2-5'ini oluştururlar. Düşük dereceli adenoskuamöz karsinom, fibromatozis benzeri metaplastik karsinom, skuamöz hücreli karsinom, iğsi hücreli karsinom, mezenkimal diferansiasyon gösteren metaplastik karsinom, mikst metaplastik karsinom, myoepitelyal karsinom gibi alt tipleri mevcuttur (Lakhani vd., 2012).

Metaplastik karsinomların %90'ından fazlası triple negatif olup, CK5/6, CK14, EGFR eksprese ederler. Moleküler olarak çoğunlukla bazal benzeri grupta olmakla birlikte, iğsi hücreli olanlar klaudin-düşük gruba girerler. Diğer TNMK'ye göre kemoterapiye daha az yanıt vermekte ve daha kötü klinik seyir göstermektedirler (Jung vd., 2010).

b. Medüller karsinom: Düzgün sınırlı, ekspansil invazyon gösteren, sinsityal büyüme paternine sahip, yüksek dereceli pleomorfik tümöral hücrelerden oluşan, çevresinde belirgin lenfoplazmositik infiltrasyon bulunan tümörlerdir (Lakhani vd., 2012) Tüm meme kanserlerinin %1'inden azını oluştururlar. Bu grup tümörler, CK5/6, EGFR, CK14 ekspresyonu gösterebilirler. Moleküler olarak bazal benzeri alt gruba dahildirler (Bertucci vd., 2006).

Medüller karsinomlar; invaziv karsinom, NST ile karşılaştırıldığında, daha iyi prognoza sahiplerdir. Bu durum tümör çevresindeki yoğun lenfoplazmositik infiltrasyon ile ilişkilidir. Ancak medüller karsinom tanısı koymada yaşanılan uyumsuzluk nedeniyle, "medüller benzeri özellikler gösteren" teriminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu tümörler, TNMK tedavisinde kullanılan agresif kemoterapötik ajanlarla tedavi edilmektedirler (Radriguez-Pinilla vd., 2007).

c. Apokrin Karsinom: Apokrin karsinomlar, apokrin hücre benzeri geniş, eozinofilik sitoplazmalı, büyük nükleus ve belirgin nükleolus içeren tümöral hücrelerden oluşurlar. Birçok meme karsinomu alt tipinde apokrin diferansiasyon görülebilir. Apokrin diferansiasyon gösteren karsinomlar, genellikle androjen reseptörü pozitif, ER ve PR negatif olan, sıklıkla HER2 aşırı ekspresyonu gösteren karsinomlardır.

Ayrıca bu tümörlerde, EGFR ve GCDFP-15 pozitifliğine de, sıklıkla rastlanır. Bu profildeki tümörler moleküler apokrin olarak adlandırıp, HER2 grubu ile örtüşmekte iken, apokrin karsinomların bir kısmı ise HER2 negatif olup, triple negatif gruba dahildir (Lakhani vd., 2012; Lehmann-Che, 2013). Çalışmalar bu tümörlerin invaziv karsinom, NST'den daha kötü prognoza sahip olduklarını göstermektedir (Zhang vd., 2017).

d. Adenoid kistik karsinom: Tükrük bezi, akciğer ve derideki aynı isimli tümöre benzer morfolojide, nadir görülen, düşük malignite potansiyelli bir meme karsinomudur. İmmünohistokimyasal olarak triple negatif olup, EGFR aşırı ekspresyonu gösterebilirler. Solid alt tipi, diğer alt tiplere göre daha fazla aksiller metastaz yapma eğilimindedir. Lokal eksizyon yeterli tedavi olup, genel olarak iyi prognozlu kabul edilirler (Lakhani vd., 2012; Hoda vd., 2014).

e. Sekretuar karsinom: Çok nadir görülen iyi prognozlu bir meme karsinomudur. İntrastoplazmik sekret içeren lümen formasyonu gösteren tümöral hücrelerden oluşur ve solid, tübüler ve mikrokistik alanlar içerirler (Hoda vd, 2014). ER ve PR reseptörleri negatif reaktivite gösterir. Genellikle erişkin yaşta görülmekle birlikte, 20 yaş öncesi gençlerde ve çocukluk çağında da görülebilirler. Oldukça iyi prognozludurlar (Tavassoli ve Devilee, 2003).

1.2.6. Epigenetik Mekanizmalar

Etimolojik olarak genetiğin üzerinde veya genetik ötesi (epi: üst, üstünde, genesis: köken) anlamlarına gelen epigenetik; 1942'de Conrad Waddington tarafından "fenotipin oluşumunu sağlayan genler ile bu genlerin ürünleri arasındaki ilişkiyi ve gelişim esnasında genotipin, feneotipi nasıl oluşturduğunu inceleyen biyoloji dalı" olarak tanımlanmıştır. Bu tanım önceleri embriyonik dönemdeki gelişim için ifade edilmiş olsa da, birçok biyolojik olayda önemli fonksiyonlara sahip olduğu anlaşılmıştır (Gürel, Nursal ve Yiğit, 2016). Günümüzde epigenetik, DNA metilasyonu ve kromatin yapısındaki kalıtsal, ancak potansiyel olarak geri döndürülebilir değişikliklerin neden olduğu gen ifadesindeki modifikasyonları ifade eder (Gerhauser, 2012). DNA diziliminde değişikliklere (mutasyon) sebep olan

genotoksik mekanizmaların aksine epigenetik mekanizmalar DNA dizilimini değiştirmeden gen ifade seviyesini düzenlemektedir. Birey kendi epigenetik profilini değiştirebilmekte ve oluşturduğu epigenetik profili bir sonraki nesile aktarabilmektedir (Yaykaşlı, Hatipoğlu, Kaya ve Yaykaşlı, 2012).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar, somatik gen terapisinde, klonlamada, transgenik teknolojiler gibi proseslerin yanında; kanser biyolojisinde, biyolojik sonuçların düzenlenmesinde, gelişim, genomik imprinting, X-kromozom inaktivasyonu, kromozomal stabilite ve gen transkripsiyon regülasyonu gibi çoklu fizyolojik süreçler için de gereklidir. Ek olarak, erken çocukluk döneminde beslenme veya anne davranışı gibi çevresel faktörlerin, epigenetik değişikliklere neden olabileceği bildirilmiştir (Das ve Singal, 2004; Martin-Subero, 2011).

Epigenetik mekanizmalar, memelilerde normal gelişim ve doku spesifik ekspresyonunun devamlılığı için gereklidir. Epigenetik regülasyonun bozulması, kanser dahil çeşitli hastalıkların patogenezinde yer almaktadır. Kanser genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin birikimi ile oluşan, çok adımlı kompleks bir hastalıktır. Kanser oluşumu onkogenlerin aktivasyonu ve/veya tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı ile, hücrelerin kontrolsüz büyüme ve metastatik özellikler kazanması ile karekterizedir. Kanserde epigenetik düzenlenmenin bozulması erken evrelerde meydana gelir. Epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA (ncRNA)'lar olmak üzere üç farklı tipte sınıflanmaktadır (Gürel, Nursal ve Yiğit, 2016). Bu mekanizmalar transkripsiyonu aktive eden ve baskılayan proteinlerin aktivitelerini; DNA ve kromatinde meydana gelen modifikasyonları düzenlemektedir (Güngör ve Ünal, 2015).

DNA, ilk etapta histon proteinlerinin etrafına sarılmaktadır. Bu protein–DNA kompleksleri yan yana gelip nükleozomu meydana getirirler ve nükleozomlar kromatin olarak organize edilirler. Kromatin yapısındaki değişikler, gen ifadesini kontrol eder: kromatin yapı sıkılaşıp yoğunlaştığında genler inaktive olur, kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında ise genler aktive olarak ifade edilir (Can ve Aslan, 2016). Kromatin yapısındaki bu dinamik durum, geri dönüştürülebilir olan ve DNA

metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik paternler ile gerçekleştirilir (Güngör ve Ünal, 2015).

1.2.6.1. *Histon modifikasyonları*

Histonlar, ökaryotik kromatinde DNA paketlenmesinin ilk aşamasında görev alırlar. Histon proteinleri, yüksek oranda artı yüklü amino asit (lizin ve arjinin) içerir ve bu aminoasitler eksi yüklü DNA'ya sıkı bir şekilde bağlanır. Histonlar, DNA'dan sadece DNA replikasyonu sırasında geçici olarak ayrılırlar. Transkripsiyon sırasında DNA ile birliktedirler (Can ve Aslan, 2016).

Histon modifikasyonları kromatin yapı ve fonksiyonlarını değiştirtirerek gen ekspresyonunu kontrol eden epigenetik mekanizmalardır (Zhu ve Woni, 2010). Ökaryotik hücrelerde DNA dört farklı tip histon proteini (H3, H4, H2A ve H2B) ile paketlenerek kromatinin çekirdek birimi olan nükleozom yapısını oluşturmaktadır (Kouzarides, 2007). Histonlar modifiye edici rezidülerinin çeşitliliği ve çok sayıda olması ile karakterize edilirler. Histonlar için en az sekiz farklı tip modifikasyon bilinmektedir. Bu modifikasyonlar, metilasyon, asetilasyon, fosforilizasyon, sumolizasyon, ubikutinasyon, ADP-ribozilasyon, deaminasyon ve prolin izomerizasyonu sağlayan sekiz farklı enzim tarafından katalize edilirler. Gen ekspresyonu, histon proteinleri-DNA arasındaki paketlenmenin gevşemesi ve nükleozom yapısının yer değiştirmesi olarak bilinen, yeniden modellenme sonucu mümkün olmaktadır. Modifikasyonlar, histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirmekte ve protein kompleksleri için tanıma bölgesi oluşturmaktadır (Zhu ve Woni, 2010).

1.2.6.2. *Kodlanmayan RNA'lar*

Yeni nesil dizileme tekniklerinin gelişimi ile tüm genom dizilemesi, ortaya şaşırtıcı sonuçlar çıkarmıştır. İnsan genomunun total genomunda, %2'sinden daha azına karşılık gelen, yaklaşık olarak 20 000 protein kodlayan genin bulunması, transkriptomun çoğunun kodlamayan RNA (ncRNA) ile yapılandığını desteklemiştir. Geçtiğimiz yıllarda, sadece bilgi deposu ve DNA-protein arasında basit bir bilgi taşıyıcısı olarak görülen RNA'ların, organizmaların gelişiminde çok önemli bir rol

oynadığı artık bilinmektedir. NcRNA'lar, proteine translasyonu olmayan RNA'lardır ve ökaryotlarda birçok temel düzenleyici fonksiyonları yerine getiren, yeni sınıf RNA moleküllerini ifade etmektedir. RNA dizileme çalışmaları, ncRNA'ların orijininin, protein kodlayan genlerin anti sens transkripleri, iki yönlü promotor transkripleri, intronik transkriptler, transkripsiyondaki enhancer ve tekrarlayan diziler olduğunu göstermiştir. NcRNA'lar biyolojik reaksiyonların katalizlenmesi, hücresel savunma, gelişimsel süreçler, hücresel cevap, transkripsiyon ve post-trankripsiyon gibi birçok biyolojik olayda görev yapmaktadırlar. Bu mekanizma, kanser dahil birçok hastalıkta bozulmaktadır (Akkaya ve Dinçer, 2013; Gürel, Nursal ve Yiğit, 2016).

1998 yılında bir nematod olan *C. Elegans* ile yapılan çalışmada kodlanmayan RNA'ların gen ifadesini susturmada rol aldığı ortaya çıkmıştır. Gen susturulmasını sağlayan mekanizma, RNA interferans (RNAi) mekanizması olarak adlandırılır ve biyolojik süreçlerden; gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apopitoz düzenlenmesinde önemli rol oynar. RNAi mekanizmasının düzenlenmesi mikroRNA (miRNA) ve small interfering RNA'lar (siRNA) tarafından sağlanmaktadır (Güzelgül ve Aksoy, 2009; Görür ve Tamer, 2011).

Kodlanmayan RNA'lar uzunluklarına göre kısa ncRNA'lar ve uzun ncRNA'lar (lncRNA) olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Kısa ncRNA'lar 50 nükleotid uzunluğundan daha kısa, lncRNA'lar ise 200 nükleotitten daha uzun olan ncRNA'ları ifade etmektedir (Gürel, Nursal ve Yiğit, 2016).

1.2.6.2.1. *siRNA*

20-25 baz çifti uzunluğunda, in vitro sentezlenen çift iplikçikli RNA'lar (dsRNA) small interfering RNA ya da short interfering RNA olarak bilinen siRNA'lardır. İlk kez 1999 yılında keşfedilen 70-80 bç'lik dsRNA'lar siRNA'ların öncüsüdür. Endonükleaz enzimlerinden RNAaz III ailesinin üyesi olan "Dicer" enzimi tarafından dsRNA'ların 3' uçlarında 2nt'lik çıkıntı kalacak biçimde kesilmesiyle, 20-25 bç'lik siRNA'lar meydana getirilirler. Virüslerde bulunması sebebiyle siRNA'lar memeli organizması için ekzojen kaynaklı ncRNA'lardır. siRNA'ların çeşitli alt

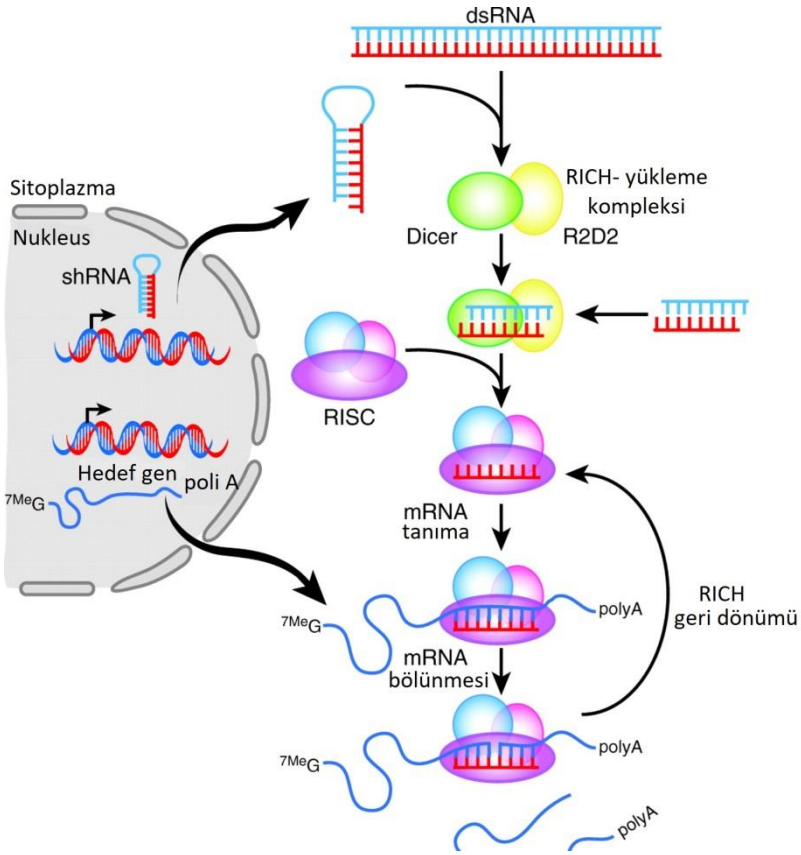
grupları vardır ve bunlar Tablo 1.3.'te verilmiştir (Güzelgül ve Aksoy, 2009; Ecevit, Motor ve İzmirli, 2013).

Tablo 1.3. *siRNA çeşitleri ve işlevleri (Güzelgül ve Aksoy, 2009).*

Sınıf	**Tanım**	**Biogenez ve genomik orjini**	**İşlevi**
Primer siRNA	Small interfering RNA	Çift iplikçikli RNA'nın veya katlanmış RNA'nın Dicer tarafından kesilmesi sırasında oluşur.	Komplementer hedef RNA'ya bağlanma; RdRP-bağımlı sekonder siRNA sentezi için yol göstericidir.
Sekonder siRNA	Small interfering RNA	C. elegans'ta RdRP aktivitesi; A. thaliana'da RdRP bağımlı uzun çift iplikçikli RNA'nın Dicer tarafından kedilmesi sonucu oluşur.	Transkriptlerin transkripsiyon sonrası regülasyonu; heterokromatin oluşumunda işlev görür.
tasiRNA	Trans-acting siRNA	Bazı transkriptlerin miRNA'ya bağımlı yıkımı ve RdRP-bağımlı çift iplikli RNA'ya çevrimi sırasında oluşurve ardından Dicer tarafından kesilir.	Transkriptlerin transkripsiyon sonrası regülasyonunda işlev görür.
natsiRNA	Natural antisense transcript-derived siRNA	Sense ve antisense transkript çiftlerinden oluşan çift iplikçikli RNA'nın Dicer tarafından kesilmesi sonucu oluşurlar.	Ptatojen savunması veya bitkilerde stres savunmasında rol oynayan genlerin transkripsiyon sonrası regülasyonunda işlev görür.

siRNA'lar hücre içine girdiklerinde "Dicer" enzimi tarafından tanınır ve yaklaşık 21-23 nükleotidlik küçük parçalara dönüştürülür. Oluşan parçalar, RNA aracılı baskılama kompleksine (RISC) katılır ve bu kompleks hedef mRNA'ya RISC'in bağlanmasını sağlar. RISC'in endonükleaz aktivitesi ile hedef mRNA parçalanır ve

tüm bu süreçler sonunda transkripsiyon baskılanır (Ecevit, Motor ve İzmirli, 2013). Bir siRNA; mRNA'nın yıkılmasını tetikleyerek ve promotör bölgesinde genin sessizleştirici kromatin değişimlerini tetikleyerek, gen ekspresyonunu iki yolla susturur (Şekil 1.3.) (Güzelgül ve Aksoy, 2009).



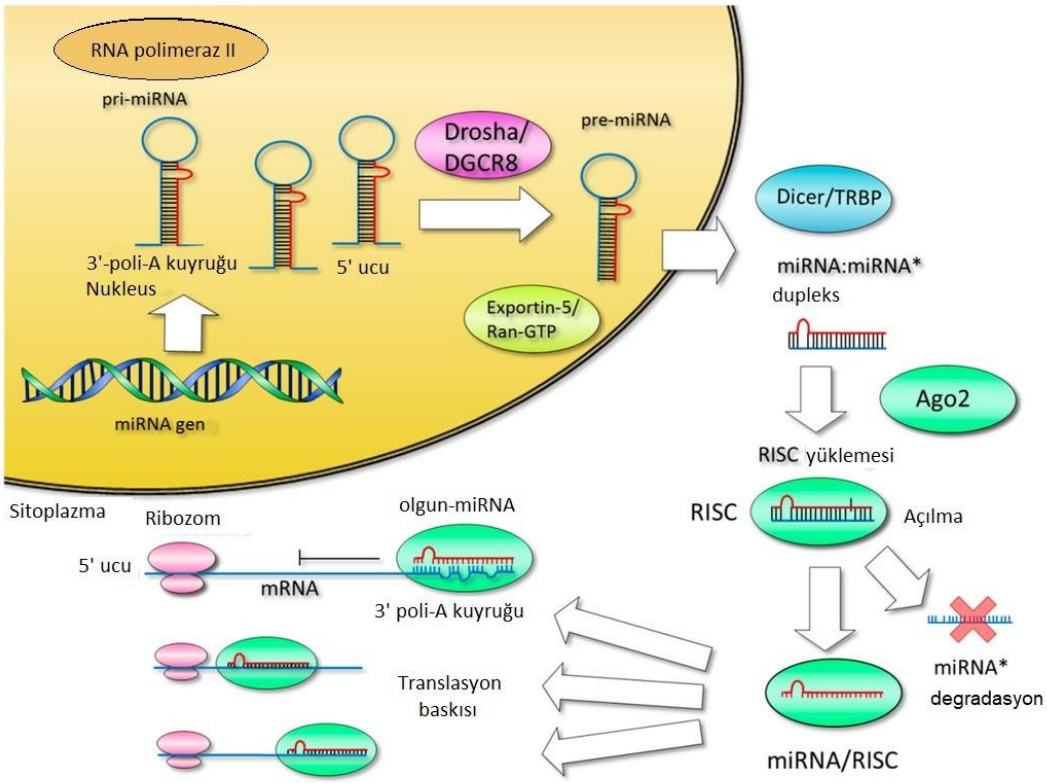
Şekil 1.3. siRNA'nın gen ekpresyonunu engelleme mekanizması (Dominska ve Dykxhoorn, 2010).

1.2.6.2.2. *miRNA*

mikroRNA (miRNA) terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmış olup ilk mikroRNA, Victor Ambros laboratuarında Lee vd., tarafından 1993 yılında keşfedilmiştir. Genom üzerinde intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleri miRNA'lardır. İnsan genomunda 1 000'in üzerinde miRNA tanımlanmış ve miRNA'ları kodlayan yüksek seviyede

korunmuş yüzlerce bölge keşfedilmiştir. miRNA'lar fonksiyonlarını, kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özellikleri sayesinde gerçekleştirirler. miRNA'nın yapıya eklenmesi ile oluşan RISC kompleksi, baz eşleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanmasıyla, ilgili genin translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkılmasına sebep olur (Saydam, Demirci ve Güneş, 2011; Karagün vd., 2014).

RNAi mekanizmasının temelini oluşturan çift iplikçikli miRNA'lar hücre içerisinde, RNA polimeraz enziminin katalizlediği reaksiyonla kodlanır. Hücre içerisindeki gen susturma kompleksi olan, RNA ile indüklenen sustucu kompleksini (RISC; RNA-induced silencing complex) aktive edecek özelliğe ulaşabilmek için miRNA'lar, bir takım aşamalardan geçerler. İlk aşamada, kalıp olarak endojen veya ekzojen kaynaklı bir RNA'yı kullanılarak, RNA bağımlı RNA polimeraz II, tarafından sentezlenen çift zincirli RNA molekülü saç tokası şeklinde kıvrılıp eşleşir. Böylece transkripsiyon sonrası ilk miRNA molekülü oluşmuş olur ve bu miRNA pri-miRNA olarak adlandırılır. Daha sonra pre-miRNA molekülünü oluşturmak için pri-miRNA molekülüne, RNAaz III grubu bir endonükleaz olan Drosha, etki ederek kıvrılmış RNA parçasını, zincirin geri kalan kısmından ayırır. Pre-miRNA sitoplazmaya eksportin 5 (XPO5) aracılığı ile taşınır. Bu aşamadan sonra miRNA, siRNA'yla aynı işlemlerden geçer (Şekil 1.5.) (Hayes ve Chayama, 2016).



Şekil 1.4. miRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu (Hayes ve Chayama, 2016).

miRNA'ların İşlevi

miRNA'nın işlevleri arasında gelişim, hücre ölümü, kolestrol biyosentezi, DNA metilasyonu ve kromatin modifikasyonu gibi prosesler yer almaktadır (Duscasse ve Brown, 2006; Güzelgül ve Aksoy, 2009).

Yapılan çalışmalarda miR-17/20 (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1 ve miR-20a) kümesinin, insan B hücre hatlarında ve meme kanser hücre hatlarında, birçok hücre siklus proteinini (E2F, c-myc, Rb ve siklin D1 gibi) hedefleyerek tümör gelişimini engellediği bildirilmiştir; miR-17/20 kümesi, G1/S'e geçişinin kontrolünde yer almaktadır. miRNA'ların direk olarak siklin D1'in inhibisyonunu sağlayarak etkili olduğunu bildiren ilk çalışmalar, meme kanseri hücre hatlarında, miR17/20'nin siklin D1'in 3' UTR bölgesini hedef alarak, hücre döngüsünün durmasına ve proliferasyonun baskılanmasına neden olduğunu göstermiştir (Yu, Wang vd., 2008, Yu, Baserga vd., 2010) .

miR-221/222; CDK inhibitörlerini (CDKI) hedefleyerek hücre siklusunu kontrol etmektedir. miR-221/222'nin ektopik ekspresyonu, CDK2'yi aktive ederek G1/S geçişini kolaylaştırır ve tümör büyümesini p27kip1 ve p57kip2'nin negatif regülasyonunu sağlayarak arttırır. Bu durum, hem MCF-7 hücre hatlarında, hem de Her2/neu-pozitif primer insan meme kanseri dokularında gösterilmiştir (Miller vd., 2008; Yu, Baserga vd., 2010).

HER2 geninin amplifikasyonu ve/veya overekspresyonu meme tümörlerini de içine alan birçok kanser türünde bildirilmiştir. HER2 amplifikasyonu ve/veya overekspresyonu olan meme kanseri hastalarında, miR-125a ve miR-125b'nin önemli derecede downregüle olduğu gösterilmiştir. Bu iki miRNA da potansiyel tümör süpresörlerdendir ve biyoinformatik araştırmalar, miR-125a ve miR-125b için hedef sekansların, HER2 ve HER3'ün 3' UTR bölgesinde olduğunu göstermiştir. SKBR3 (ErbB2(HER2)-bağımlı insan meme kanseri hücre hattı) hücrelerindeki miR-125a ve miR125b overekspresyonunun, HER2 ile HER3'ün transkript ve protein seviyelerini baskılayarak, hücre motilitesinde ve invazyon kapasitesinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Shenouda ve Alahari,2009; O'Day ve Lal, 2010).

miR-91 olarak da bilinen miR-17-5p, kromozom 13q31 da lokalize olup, bu genomik bölgenin meme kanseri dahil çeşitli kanser tiplerinde heterozigosite kaybına uğradığı bildirilmiştir. miR-17-5p, hem ER-α hem de E2F'nin transkripsiyonel aktivitesini arttıran bir steroid reseptör koaktivatörü olan AIB1 (amplified in breast cancer 1) geninin mRNA'sına komplementerdir. Dolayısıyla AIB1, miR-17-5p'nin doğrudan hedefidir. Kodlanmayan miR-17-5p, AIB1 mRNA translasyonunu baskılayarak, E2F1 ve ERα fonksiyonlarını engeller. MiR-17-5p-aracılı AIB1 down-regulasyonu, ayrıca östrojen reseptör aracılı ve östrojen reseptör bağımsız meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunda da gerilemeye neden olur. Yapılan bir çalışmada, insan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde overekspresyon gösteren siklin D1 geninin (CCND1), meme kanseri hücrelerinde miR17-5p'nin direk hedefi olduğu ve miR-17-5p'nin meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, siklin D1 proteininin sentezini baskılayarak engellediği gösterilmiştir (Heneghan vd., 2009; Shenouda ve Alahari, 2009; O'Day ve Lal, 2010; Yu, Baserga vd., 2010).

1.2.6.3. *DNA metilasyonu*

İlk bulunan ve üzerinde en fazla calışma yapılan epigenetik değişiklik DNA metilasyonudur. Sitozin nükleotidinin metillenmesi, gen eskpresyonu ile direkt bağlantılı olup, birçok ökaryot canlının gelişiminde, normal ve hastalık durumunda büyük rol oynar. DNA metilasyonu, S-adenozilmetiyonindeki (SAM) bir metil (-CH3) grubununun, hücre genomundaki bir sitozin nukleotidine kovalent bağıyla eklenerek metilsitozini oluşturmasıdır. Bu işlem DNA replikasyonu sonrasında enzimatik olarak gerçekleşir. (Yaykaşlı, Hatipoğlu, Kaya ve Yaykaşlı, 2012). Ökaryot DNA'sında bulunan sitozin bazlarının yaklaşık %5'i metil gruplarına sahiptir (Nestler, 2014).

Memeli hücrelerinde DNA metilasyonu genellikle, CpG adacıklarında bulunan CpG dinükleotidindeki sitozinin pirimidin halkasının 5. karbonunda gerçekleşir. CpG adacıkları, çoğunlukla genlerin promotör bölgelerinde bulunan 0,5-3 kb (genellikle 200 baz çiftinden uzun) uzunluğundaki CpG dinükleotince zengin bölgelerdir (CpG frekansı en az 0,6'dır). Başta housekeeping genler olmak üzere, insan DNA'sında bulunan genlerin %60-70'inde, CpG adacıkları vardır. CpG adacıkları promotör bölgelerinin yanı sıra 3'-UTR'lerde ve gen içi bölgelerde (ekzonik CpG) bulunabilir (Antequera ve Bird, 1993; Neguyen, 2001; Goel, 2010; Portela ve Esteller; 2010).

Sitozin metilasyonunun çoğu, 5-metil sitozin (CpG) içeren dizilerde meydana gelmesine rağmen, bazıları da CpA ve CpT dinükleotidlerinde meydana gelmektedir. İnsan genomu sürekli olarak aynı bölgelerden metillenmez. Metillenmiş bölgeler arasında 100 kb'da bir metillenmemiş segmentler bulunabilmektedir. (Das ve Singal, 2004).

Bir metil grubunun, DNA'nın bazlarından birine aktarılması olan DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenmektedir. DNA metilasyonunda, enzimatik bir reaksiyonla S-adenozilmetiyonin, metil vericisi olarak kullanılır ve DNA metil transferaz enzimleri (DNMT) aracılığıyla metiyonin, sitozinin 5' bölgesine, metil bağlanma proteinlerinin yardımıyla (MBD1, MBD2, MBD3 vb.) aktarılır (Aslan 2008; Yaykaşlı, Hatipoğlu, Kaya ve Yaykaşlı, 2012). Günümüze kadar tanımlanan bazı DNMT izoformları; DNMT1p, DNMT1b,

DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3A, DNMT3b, ve DNMT3L olarak bildirilmiştir. Memelilerde en fazla bulunan DNMT, DNMT1'dir ve bu enzim DNA'da mevcut olan metilasyonun devamlılığı için gereklidir. DNMT3A ve DNMT3B ise, de novo DNA metilasyonu için esastır (Yaykaşlı, Hatipoğlu, Kaya ve Yaykaşlı, 2012; Gürel, Nursal ve Yiğit, 2016). DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin aksine; DNMT3L metiltransferaz aktivitesi göstermez. DNMT3L, DNMT3A ve DNMT3B enzimlerinin aktivitesini düzenlemek yoluyla, onların de novo metilasyonlarına katkı sağlar. DNA metilasyonunu duzenleyen DNMT ve MBD genlerindeki mutasyonların, meme, mide ve akut myeloid lösemi gibi kanserlerin oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir. (Holz-Schietinger, 2010; Li ve Tollefsbol, 2010; Jurkowska vd., 2011).

DNMT'lere ilave olarak, metilasyon mekanizmalarında görev alan önemli bir enzim grubu da, demetilazlardır. DNA'daki metilasyonu aktif olarak ortadan kaldıran enzimler olan demetilazlar, 5-metil sitozin glikozilaz ve MBD2b'dir. 5-metil sitozin glikozilaz, DNA'daki metillenmis sitozinleri keser, DNA tamir mekanizması, sitozini normal nükleotid formunda tekrar ekler. MBD2b (metil-CpGbinding domain 2), glikozilaz ya da nükleaz aktivitesi içermez; 5-metil sitozini, sitozin ve metanole hidrolize ederek demetilasyona neden oldugu düşünülmektedir (Jaenisch ve Bird, 2003).

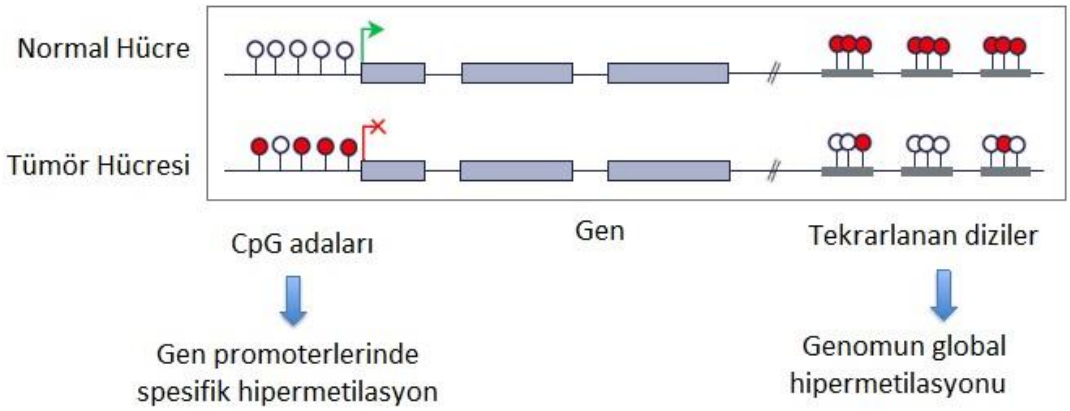
Normal hücrelerde, CpG adaları içeren gen promotörleri, genellikle metillenmemiş durumdadır ve ökromatin yapıdadır. Bu yapı, gen ekspresyonuna izin veren, transkripsiyonel olarak aktif bir konformasyonun oluşmasına olanak sağlar. Fakat kanser gelişimi sırasında, tümör supresör genlerin CpG adalarının büyük çoğunluğu hipermetile durumdadır (Costa, 2010).

1.2.6.4. *DNA metilasyonu ve kanser*

Yapılan pek çok çalışma ile, normal ve tümörlü hücrelerde metilasyonla sessizleşen genlerdeki moleküler mekanizmayı anlamak hedeflenmiştir. Metilasyon ile tümör baskılayıcı genlerin yanı sıra, apopitoz, hücre siklus düzenlenmesi, DNA tamiri,

detoksifikasyon, hormonal cevap oluşrulması gibi, çeşitli hücresel proseslerde görev yapan genler sessizleştirilebilir (Esteller, 2003).

Knudson'nun çift vuruş hipotezine göre tümör baskılayıcı genlerde malign transformasyon gelişebilmesi için, her iki allelde de fonksiyon kaybı gerekmektedir (Knudson, 2001). Bu hipotez ilk kez, retinablastoma gibi kanserlerin, hem herediter hem de sporadik formlarının oluşumunu açıklamak için öne sürülmüştür (Nussbaum vd., 2005). CpG adacık hipermetilasyonu ile oluşan ekspresyon kaybı, Retinablastomanın sporadik formuna sahip hastaların %10'nunda, Rb geni için gösterilmiştir (Lüleyap, 2008). Normal allelde ikinci vuruşun her zaman mutasyon ile meydana gelmediği anlaşıldığında, teori dahada detaylandırılmış ve DNA hipermetilasyonunun tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı yaratabileceği mekanizması ön plana çıkmıştır (Şekil 1.6.) (Nussbaum vd., 2005).



Şekil 1.5. Metilasyon ve kanser ilişkisi. Kırmızı daireler metilasyonu ifade etmektedir (URL-6).

Metilasyonun kanser oluşumuna neden olma mekanizmalarından ilki, 5-metilsitozinin kendisinin, mutasyon oluşturma riskidir. Normalde DNA' da bulunan sitozin, en sık gözlenen mutasyon mekanizmalarından biri olan deaminasyon sonucu urasile dönüşür ve bir RNA bazı olması nedeniyle onarım mekanizmalarınca (urasil glikozilazlar) kolayca tanınarak onarılır. Buna karşılık metil sitozinin spontan deaminasyonu sonucu oluşan timin, normalde de DNA'da bulunan bir baz olduğu için onarım mekanizmalarından kaçar. Tüm genomdaki nokta mutasyonlarının

yaklaşık üçte birinden fazlasının CpG adacıklarında gözlenmesi bu etkinin en açık belirtisidir. Meme kanserine yatkınlık oluşturan BRCA1 ve BRCA2 genlerinde gözlenen binden fazla mutasyonun CpG/CpNpG motiflerinde saptanmış olması da 5-metilsitozinin artmış mutasyon riski oluşturduğunu desteklemektedir (Sayın, 2008) .

Tümör baskılayıcı veya imprintinge uğrayan genlerin CpG adacıklarındaki hipermetilasyon, genin farklı eksprese edilmesine neden olur. DNA metilasyonu, karsinojenlerin DNA'ya bağlanmasını arttırarak ve DNA'nın UV ışınlarını daha fazla absorbe etmesine neden olarak, mutasyon hızını arttırır, böylece kanser oluşumu tetiklenmiş olmaktadır (Sayın, 2008).

Promotor bölge hipermetilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını önleyerek, gende fonksiyon kaybına neden olur. Bu durum, direk ve indirek yolla gerçekleşir. Direk yolda, metilsitozindeki metil grubu DNA'daki büyük oluğa çıkıntı yaparak bu bölgenin tanınmasını engeller. İndirek yolda ise, metilsitozine bağlanan proteinler ile tanıma bölgesi maskelenir (Sayın, 2008).

Ayrıca biyokimyasal bir mekanizma olarak 5-metilsitozinin polaritesinin yüksek olması nedeniyle, RNA polimerazların daha yüksek enerjiyle transkripsiyon başlangıcına ulaştığı ve bunun gen ekspresyonunu engellediği de düşünülmektedir (Sayın, 2008).

1.2.6.5. *DNA Metilasyonunun kanserdeki önemi*

Hücredeki promotor bölge hipermetilasyonu, sonraki kuşaklara aktırılabilmesi ve mutasyon olmadan gen ifadesini değiştirebilmesi sebebiyle, önemli bir olaydır. Kanserli dokuda metilasyon, tümör tipine göre değişmekte olup, tümöre ve gene özgü bir olaydır (Das ve Single, 2004).

Metilasyon değişiklikleri genellikle tümör oluşumunun erken evresinde oluştuğu için, kanserin erken tanısında kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Das ve Singal, 2004). Meme kanserinin erken tanısında da biomarker olarak DNA metilasyonunu

önemli yeri olduğu düşünülmektedir (Dworkin vd., 2009). Çünkü mutasyondan daha sıklıkla oluşan anormal DNA metilasyonu, gen ekspresyonundan bağımsız, kimyasal ve biyolojik olarak stabil tümör spesifik bir markırdır. Tümör dokusunda spesifik bir gende oluşan metilasyon genelikle kaybolmaz, hatta zaman içinde ilerleme gösterebilir (Markl vd., 2001).

Metilasyon değişiklikleri, primer tümörün dışındaki örneklerde de tesbit edilmektedir. Metilasyon analizi, günümüzde birçok non-invaziv yöntemle incelenebilmektedir (Widschawendter ve Jones, 2002). Mesela kolorektal kanser için gaita; akciğer kanseri için balgam; prostat kanseri için idrar örneklerinin analizi yeterli olmaktadır. Meme kanserinde de duktal lavaj, meme başı aspirasyon sıvısı ve ince iğne aspirasyon sıvısı gibi materyallerde, metilasyon analizi yapılabilmektedir (Dworkin vd., 2009). Kanser hastalarının serumunda, tümörden derive DNA bulunması sebebiyle (Wong, 2001), serumda serbest DNA'da metilasyon analizleri pekçok araştırmaya konu olmuştur. Mutasyonlar, genin her bölgesinde meydana gelebilir, araştırılması daha kapsamlı çalışmalarla gerçekleşir. Metilasyon ise, DNA'daki belirli dizilerde olması nedeniyle mutasyonlardan daha kolay saptanabilmektedir. Genetik değişikliklerin aksine, epigenetik değişikliklerin geri dönüşümlü olması, terapötik hedef olmasını da gündeme getirmiştir (Das ve Singal, 2004). Hücre kültürü kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda, demetile ajanların metilasyondan kaynaklanan gen sessizleşmesini geriye çevirdiği saptanmıştır (Strathdee vd., 1999; Plumb vd., 2000).

1.2.6.6. *Meme kanseri genetiği*

Meme kanseri dünyada, kadınlarda en çok tanı konulan kanser türüdür (Ferlay vd., 2010). BRCA1, BRCA2, CHEK2, ATM, PALB2, BRIP1, TP53, PTEN, CDH1 ve STK11 gibi genler, meme kanserinin kalıtsallığında %25-30 rol oynamaktadırlar (Melchor ve Benitez, 2013). Ayrıca Genom-Çapında İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS) ile meme kanseri riski ile ilişkili 70'ten fazla polimorfizm konfirme edilmiştir (Melchor ve Benitez, 2013; Michailidou vd., 2013). Bu çalışmalarla, meme kanserinin kalıtımında karanlıkta kalan oran, yaklaşık olarak %50 civarında

kalmaktadır. Meme kanserinin ortaya çıkışında, somatik mutasyonlar da çok önemli bir rol oynamaktadır (Melchor ve Benitez, 2013; Michailidou vd., 2013).

1.2.6.6.1. *Meme kanserinde görülen polimorfizmler*

GWAS'larda, yapılarak binlerce meme kanseri ve kontrol örnekleri üzerinde çalışma yapılmış ve binlerce SNP (tek nükleotid polimorfizmi) incelenmiştir. Çok sayıda SNP ile meme kanseri arasında ilişki bulunmuş olup, SNP'lerin oluşturduğu risk zayıf düzeydedir, biraraya gelmeleri ile toplam bir etki elde edilir. Meme kanseri riskiyle ilişkili olduğu tespit edilen SNP'ler, TERT, MAP3K1, ESR1, CDKN2A, FGFR2, DNAJ1, SETBP1, TGFBR2, RAD51L1 ve BRCA2 gibi, meme kanseri karsinogenezinde önemli rollere sahip genlerde tespit edilmiştir. Diğer bazı SNPler ise, herhangi bir genle doğrudan ilişkili bulunmamış olup, bu SNP'lerin non-coding RNA'larla veya düzenleyici bölgelerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Michailidou vd., 2013; Sakoda, Jorgenson ve Witte, 2013).

1.2.6.6.2. *Meme kanserinde görülen mutasyonlar*

Meme kanserinde en fazla mutasyona uğrayan genler, PIK3CA (PI3K sinyal yolağı), PTEN (PI3K sinyal yolağı), AKT1 (PI3K sinyal yolağı), TP53 (P53 sinyal yolağı, tümör supresör), GATA3 (transkripsiyon faktörü), CDH1 (adezyon molekülü), RB1 (RB sinyal yolağı, tümör supresör), MLL3, MAP3K1 ve CDKN1B (hücre döngüsü inhibisyonu) olarak ortaya konmuştur. Ayrıca TBX3, RUNX1, CBFB, AFF2, PIK3R1 (PI3K sinyal yolağı), PTPN22 (tirozin fosfataz), PTPRD (tirozin fosfataz), NF1, SF3B1 (splicing faktör), ve CCND3 (hücre döngüsü, proliferasyon) genlerinin de sıklıkla mutasyona uğradığı belirlenmiştir. Meme kanserinde görülen mutasyonlar, moleküler alt tiplere göre de farklılık göstermektedir. Meme kanserinde moleküler tiplendirmeye göre Lüminal A, Lüminal B, Bazal (Triple Negatif) ve HER2 Amplifiye olmak üzere 4 ana tip meme kanserinden, en düşük mutasyon oranı Lüminal A'da ve en yüksek oran Bazal ve HER2 amplifiye tipindedir. Lüminal A'da en fazla mutasyona uğrayan gen PIK3CA (%45) olup, onu takiben MAP3K1, GATA3, TP53, CDH1, ve MAP2K4 genleri gelmektedir. Lüminal A tümörlerinin %12'si, MAP3K1 ve MAP2K4 genlerinden birinde, inaktive edici mutasyonlara

sahiptir (p38/JNK1 sinyal yolağı). Lüminal B tümörleri, en fazla TP53 ve PIK3CA (herbiri %29) genlerinde mutasyona sahiptirler. İlginç bir şekilde, lüminal tümörlerle bazal tümörler, zıt bir mutasyon profili gösterirler; bazal tümörlerde TP53 (%80) ve PIK3CA (%9) hariç, diğer lüminal tümör mutasyonları görülmez. HER2 amplifiye subtipinde, HER2/ERBB2 amplifikasyonu (%80) görülür, ve mutasyon profili olarak hibrit bir profil vardır; yüksek oranda TP53 (%72) ve PIK3CA (%39) mutasyonları görülürken, diğer mutasyonların oranı düşüktür. Bazal tümörlerde TP53 mutasyonları, genelde nonsense ve frame-shift şeklindeyken, lüminal tümörlerde mutasyonlar, nokta mutasyonu (missense) şeklindedir (Cancer Genome Atlas, 2012).

Meme kanserinde gerçekleştirilen amplifikasyon/delesyon analizlerinde, PIK3CA, HER1/EGFR, FOXA1, ve HER2/ERBB2 gibi onkogen potansiyeli olan genleri içeren bölgelerde amplifikasyon ve MLL3, PTEN, RB1 ve MAP2K4 gibi tümör supresör potansiyeli olan genleri içeren bölgelerde, delesyona rastlanmaktadır (Cancer Genome Atlas, 2012).

1.2.6.6.3. *Meme kanserinde kodlanmayan RNA'lar*

Meme kanserinde, miR-10b, miR-125b, ve miR-145 miRNA'larının baskılandığı, miR-21 ve miR-155 miRNA'larının ise indüklendiği gösterilmiştir (Iorio vd., 2005). Yapılan çalışmalarda, miR-21'in meme kanserinin tüm evrelerinde tümörigenezde rolü olduğu görülürken, miR-30, miR-17-5p ve miR-9 gibi miRNAların, farklı evrelere spesifik olduğu görülmektedir. Bu miRNA'ların değişik evrelerde pRB, PTEN, Cyclin D1 ve Bcl-2 gibi tümör supresör veya onkogenleri hedef aldığı tespit edilmiştir (Zhang ve Ma, 2012).

1.2.6.6.4. *DNA metilasyonu ve meme kanseri*

DNA metilasyonu çok önemli bir epigenetik markırdır ve gen ifadesinin kontrolünde kullanılır. Meme kanserinde P16 gibi bazı tümör supresör genlerin metilasyonunun, bir biyomarkır olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (Berman vd., 2005). Yapılan bir çalışmada, hipermetile CpG adalarının, meme kanserinde farklılaşmanın azalmasıyla birlikte, arttığı gösterilmiştir (Yan vd., 2000). Buna karşın, ürokinaz gibi bazı proteazların hipometilasyonunun da, meme kanserinin metastazında önemli

olabileceği bildirilmiştir (Pakneshan, Szyf ve Rabbani, 2005). Bazal tümörlerde ve kanser kök hücre fenotipinde, genel olarak hipometilasyon paterni görülmüştür (Park vd., 2012). Ayrıca onkogen hipometilasyonu paterninin, meme kanseri metastazıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Fang vd., 2011).

1.2.6.7. *Triple negatif meme kanserinin genetiği*

Gen amplifikasyonları veya delesyonları, nokta mutasyonları, heterozigotluk kaybı, kromozomal yeniden düzenlemeler, anöploidi, global ve promoter metilasyonu dahil olmak üzere farklı genetik değişimler, kanser ile ilişkilendirilmiştir. (Yazici vd., 2009).

Triple negatif meme kanserleri, genellikle bazal tümörlerdir. Bazal tümörlerde %80 TP53 mutasyonu görülmektedir (Cancer Genome Atlas, 2012). TNMK'nde TP53, en sık mutasyona uğramış gendir ve mutasyonlar vakaların %65 ila %80'inde meydana gelir. Bugüne kadar yapılan en kapsamlı çalışmalardan birinde, TP53'teki mutasyonlar, bazal benzeri TNMK'nin %62'sinde ve bazal olmayan TNMK'nin %43'ünde bulunmuştur. TNMK bağlamında, bu mutasyonlar, genetik kararsızlığın artmasına ve sitogenetik değişikliklerin yanı sıra daha yüksek heterozigozite kaybı olasılığı ile sonuçlanmaktadır. Son çalışmalar, azalmış p53 fonksiyonuna sahip TNMK hastalarında, daha kötü sağkalım (OS) bildirmiş ve metastatik riski arttırdığını göstermiştir. Bununla birlikte, başka bir çalışma, TP53 mutasyonlarının ve/veya p53 ekspresyonundaki değişimlerin, prognostik faktörler olduğunu doğrulamamıştır. Diğer çalışmalarda da, TP53 mutasyonlarının TNMK'de ilaç direncinin bir göstergesi olduğu bildirilmiştir. Bütün bunlar birlikte ele alındığında, TP53'ün TNMK vakalarının çoğunda mutasyona uğradığı ve bu nedenle antitümör tedavilerinin belirlenmesi için kullanılabileceği düşünülmektedir (Sporikova vd., 2018).

RB1 ve BRCA1 kaybının da bazal tümör özelliklerinden olduğu belirlenmiştir (Cancer Genome Atlas, 2012). TNMK'ye genetik yatkınlık, BRCA1 ve BRCA2 meme kanseri yatkınlık genlerinde nadir, yüksek penetrant, germline mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir. BRCA1'de kalıtsal mutasyonu olan kadınlarda gelişen meme

tümörlerinin, yaklaşık %70'i, ER, PR ve HER2 histolojik belirteçlerinin düşük veya olmayan ekspresyonunu ve rastgele seçilmiş TNMK tümörlerine benzer morfolojik özellikler, nüks paternleri ve ölüm oranlarını göstermiştir. Bu gözlemlerle tutarlı olarak, rastgele seçilmiş Triple Negatif (TN) olgularla yapılan çalışmalar, genel olarak %9-14 ve 50 yaş altında tanı alan vakaların ~%20'sinin BRCA1 mutasyonlarına sahip olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, ailede meme kanseri öyküsü olan TN vakalarının %34'ünün, germline BRCA1 mutasyonları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında görülen meme tümörlerinin %16-23'ünün, TN özellikleri göstermesi nedeniyle, BRCA2'nin TNMK ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. (Kristen vd., 2013).

P53'ü takiben en fazla mutasyona uğrayan gen, PIK3CA (%9) olarak bildirilmektedir. PI3K/AKT sinyal yolağının, en fazla aktiviteyi diğer tiplere kıyasla, bazal tümörlerde gösterdiği bildirilmiştir. PIK3CA mutasyon oranının, bazal tümörlerde düşük olmasına rağmen, PI3K/AKT sinyal yolağı aktivitesinin yüksek olmasının, PTEN ve INPP4B kaybı ve/veya PIK3CA amplifikasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bazal tümörlerde yüksek oranda TP53 mutasyonu, ATM mutasyonları, BRCA1 ve BRCA2 inaktivasyonu, RB1 kaybı, AKT3'ün yüksek seviyede ekspresyonu, cMYC amplifikasyonu ve yüksek ekspresyonu ve Cyclin E1 amplifikasyonu, triple negatif meme kanserinde en öne çıkan genetik değişimleri olarak gözükmektedir (Cancer Genome Atlas, 2012).

Yapılan çalışmalarda, meme kanseri risk lokuslarının ER, PR ve HER2 tarafından belirlenen, meme tümör alt tipleriyle olan ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmaların ilki, Meme Kanseri Birliği Konsorsiyumu (BCAC) tarafından yapılmış, araştırılan 12 varyanttan beşinin TNMK ile ilişkili olduğunu bulmuştur (TOX3 [p = 3,1 x 10-6]; 2q35 [p = 0,001]; MAP3K1 [p = 0,016]; LSP1 [p = 0,011]; TGFB1 [p = 0.038]). Bununla birlikte, yaklaşık 3 000 TN vakası içeren, Üçlü Negatif Meme Kanseri Konsorsiyumu (TNBCC) tarafından yapılan çok daha kapsamlı bir çalışma, sadece TOX3 lokusu için bir ilişki olduğunu doğrulamıştır (p = 3,7 x 10-5). Ek olarak, TNBCC, ESR1 lokusundaki rs2046210 ve rs12662670 SNP'lerinin (rs2046210 [p = 4,4 x 10-7]; rs12662670 [p = 1,1 x 10-4]) ve RAD51L1 lokusundaki rs10483813 (p = 3,0 x 10-4), TNMK ile kuvvetli bir şekilde ilişkilendirilmiştir. CASP8 varyantları ile

TNMK riski arasında bir ilişki olduğu, TNBCC'un çalışmasında (p = 0,005) gözlenmiş, ancak BCAC'un çalışmasında gözlenmemiştir (p = 0,15). Bu nedenle, hem ER-pozitif hem de ER-negatif meme kanseri riskini etkileyen TOX3, ESR1 ve RAD51L1 lokuslarındaki ve muhtemelen 2q35, MAP3K1, LSP1, TGFB1 ve CASP8'deki SNP'ler de, TNMK için genetik risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (Kristen vd., 2013).

ER-negatif meme kanseri çalışmalarında tespit edilen varyantların birçoğunun, TNMK riskini etkilediği gözlenmiştir. ER-negatif TERT varyantı, rs10069690; artmış TNMK riski ile ilişkilendirilmiştir (p = 1,1 × 10-9). Bununla birlikte, bu lokustaki değişkenlik ve meme kanseri riski arasındaki ilişkilerin karmaşıklığı göz önüne alındığında, bu TERT varyantının, TNMK ile ilişkisinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerektiği bildirilmiştir (Kristen vd., 2013).

Kopya sayısı değişiklikleri (CNV) gibi diğer genetik değişiklikler, triple negatif meme kanserinde farklı alt tipler arasında farklı şekilde meydana gelebilmektedir. Triple negatif meme kanseri vakalarının %30'undan fazlasında, iki spesifik CNV, yani gen amplifikasyonu ve kromozomal delesyon bulunmaktadır. (Han vd., 2008; Hu vd., 2009). TNMK'inde spesifik olarak amplifiye olduğu tespit edilen bir genlerden biri, kromozom 9'un kısa kolunda bulunan nükleer faktör 1/B (NFIB)' dir. Bu genin kanser biyolojisindeki işlevi henüz tam olarak tanımlanmamıştır; ancak, merkezi sinir sistemi gelişiminde, bir rol oynadığı bilinmektedir. (Han vd., 2008; Mason vd.,. 2009). TNMK'inde daha sık meydana gelen 5q13-14 kromozomunda 80 Mb'lık bir yapısal delesyon RASA1 genini içerir. Bu gen, RAS'ın aktifleştirilmesinde etkilidir ve RASA1'in inaktifliği, aşırı aktif bir RAS tirozin kinaz ile sonuçlanır. RAS, hücre büyümesinin bir uyarıcısı olduğundan, RAS aşırı ekpresyonu, büyüme aktivitesinin artmasına neden olur. Farklı meme kanseri alt tiplerinin profilleri ile kromozomal instabiliteye neden olan gen ekspresyon durumlarını karşılaştıran bir çalışmada, TN2B'nin, HER2 + alt grupları ile birlikte, en istikrarsız genomu gösterdiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca PTEN be RB1 genindeki mutasyonların bu kromozomal instabilite ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Hu vd., 2009).

1.2.6.8. *RASSF1A geni*

RASSF1 (RAS-association domain family 1) geni, 11 151 bç büyüklüğünde olup, 8 ekzona sahiptir. Farklı promotor kullanımı ve alternatif splicing nedeniyle, RASSF1A lokusundan, 7 farklı RASSF1A transkripti üretildiği için, genin 7 izoformu vardır (RASSF1A-G). İlk 4 ekzonun bulunduğu bölgede, metilasyona uğrayabilen CpG adaları bulunmaktadır ve bu ekzonlar, genin transkripsiyonel kontrolünde önemli bir yere sahiptir. (Agathanggelou, Cooper ve Latif, 2005).



Şekil 1.6. 3p21.3 bölgesinde bulunan RASSF1 geni lokalizasyonu (URL-7)

RASSF1'nin iki ana izoformu RASSF1A ve RASSF1C, iki ayrı promotör bölgesinden oluşturulur. Hem RASSF1A hem de RASSF1C proteinleri bir C-terminal Ras-asosiasyon bölgesi ve ATM fosforilasyon bölgesi içerir. Buna ek olarak, RASSF1A ayrıca bir N-terminal, diaçilgliserol bağlayıcı/protein kinaz C1 (C1) domaini de içerir (Dammann vd., 2000).

RASSF1A (RAS-asosiasyon domain ailesi 1, izoform A), RAS efektör ailesinin üyesi olan bir tümör supresör gendir. RASSF1A, inaktivasyonu birçok insan kanserinin gelişimine neden olduğu bildirilmiş, bir tümör baskılayıcıdır. RASSF1A, delesyon veya nokta mutasyonları ile etkisizleştirilebilse de, RASSF1A fonksiyonunun kaybına veya azalmasına en çok katkıda bulunan, genin promotör metilasyonu ile transkripsiyonel sessizleştirilmesidir (Donninger vd., 2007). RASSF1A geninin mutasyonundan daha çok hipermetilasyonu, akciğer kanseri ve mesane kanseri gibi kanser türlerinde görülmektedir. Böylece bu genin ekspresyonunun, metilasyon yoluyla baskılandığı düşünülmüştür. Kanser hücrelerinde RASSF1A'nın bir alleli genomik olarak kaybedilirken, diğer allel hipermetilasyonla susturulmaktadır (Agathanggelou, Cooper ve Latif, 2005).

RASSF1A kanser hücre hatlarında overekseprese edildiğinde, bu hücreler daha az canlılık göstermekte, daha az invaziv olmakta ve büyümeleri baskılanmaktadır.

RASSF1A özellikle kanserde deregüle olan iki yolağı, apoptozu ve hücre döngüsünü modüle etmektedir. RASSF1A'nın kanser hücre hatlarında Cyclin D1 ve D3 gibi hücre döngüsü efektörlerini baskıladığı ve N-kaderin gibi hücre adezyon moleküllerini artırdığı gösterilmiştir. RASSF1A ile RAS'ın etkilediği genler arasında çok sayıda ortak gen bulunduğu bildirilmiştir (Agathanggelou vd., 2003).

RASSF1A'nın mikrotübüllere bağlandığı ve mikrotübül stabilizasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, RASSF1 null farelerden elde edilen fare embriyonik fibroblast hücrelerinin, tubulin depolimerize edici kimyasal nokadozole karşı, artmış sensitivite gösterdiği görülmüştür. RASSF1 ile transfekte edilen hücrelerde, sentrozomdan çıkan mikrotübüllerin hiperstabilize olduğu ve nokadozole karşı sensitivitelerinin azaldığı görülmüştür. RASSF1A'nın mikrotübüllere bağlandığı immünofloresan yöntemle gösterilmiştir. RASSF1A'ya bağlanan proteinlerin %70'inin, mikrotübüllerle ilişkili proteinlerle homoloji gösterdiği bildirilmiştir (Dammann vd., 2000).

Aktive edilmiş K-Ras formları, onkoproteinleri dönüştürmekte görevli olmalarının yanında, aynı zamanda apopitozun uyarılması dahil olmak üzere, büyüme önleyici etkilere sahiptir. Dolayısıyla K-Raslar, pro-apoptotik efektör proteinler olduklarından, Ras bağımlı tümörlerin gelişimi sırasında down regüle olmaktadır. RASSF1A'nın RA bölgesi, in vitro olarak direkt Ras'a bağlanabilir ve RASSF1A, hücrelerde aşırı eksprese edildiğinde aktifleştirilmiş K-Ras ile bir kompleks oluşturur. Ayrıca, RASSF1A'nın RAS'a, GTP-bağımlı olarak bağlandığı görülmüştür. RAS, hücre zarındaki reseptör tirozin kinazlardan aldığı sinyallerle, hücre çoğalmasını uyaran yolakları aktif hale getirir. RASSF1A, RAS ile interaksiyona girerek hücreleri apopitoza yönlendirebilmektedir (Doninger vd., 2007).

RASSF1A, anafazı başlatan APC kompleksini aktive eden cdc20'ye bağlanarak, onu inhibe eder. Anafaz başlatıcı kompleks/siklozom (APC/C), hücre döngüsünün ilerlemesine izin vermek için, aktive edici enzimlerle etkileşime giren bir protein kompleksidir. APC/C, cdc20 veya cdh1 (WD40 tekrarları içeren proteinler) ile kompleks oluşturarak, aktive olur. WD40 tekrar proteinleri, APC/C'nin hedef

proteinlerle etkileşime girmesi için gereklidir. S, G2 ve profazlar sırasında, APC/C, Cdc20'nin, Emi1 tarafından tutulmasıyla engellenir; daha sonra prometafaz sırasında, RASSF1A, cdc20 seçiciliği göreviyle, regülatör rolü üstlenir. (Song vd., 2004).

RASSF1A ile stabil olarak transfekte olan A549 hücrelerinde, Cyclin D1 ve D3'ün down-regüle olduğu görülmüştür. Buna ek olarak RASSF1A'nın, S fazının ilerlemesinde rolü olan Cyclin A'yı da regüle edebileceği gösterilmiştir, bunu $p120^{E4F}$ ile bağlanarak yaptığı düşünülmektedir. $p120^{E4F}$'nin P14, RB ve P53 gibi bilinen diğer tümör supresyon proteinlere de bağlandığı bilinmektedir. Bu durum RASSF1A'nın tümör supresyon rolüne güçlü bir vurgu yapmaktadır. RASSF1A'nın bağlandığı proteinler arasında Mst-1, C19ORF5, MAP1B, $p120^{E4F}$, ve CNK1'nın olduğu "maya ikili hibrid (yeast-two-hybrid)" yöntemi ile gösterilmiştir (Agathanggelou, Cooper ve Latif, 2005).

Çok sayıda çalışma, RASSF1A'nın aşırı ekspresyonunun apoptozu desteklediğini, hücre döngüsünü durdurduğunu ve kanser hücre hatlarının tümörijenitesini azalttığını göstermiştir (Rabizadeh vd., 200).

1.2.6.8.1. *Kanserde RASSF1A geni metilasyonu*

Kanserde belirli genlerin DNA metilasyonu ile baskılanması yaygın bir durumdur. Bu durum, özellikle tümör supresör genlerin promotorlarında görülmektedir. RASSF1A metilasyonu mesane kanseri, glioblastoma, özofageal skuamöz hücreli karsinom, gastrik kanser, hepatosellüler karsinom, hodgkin lenfoma, akciğer kanseri ve meme kanseri gibi birçok kanser türünde görülmektedir. Meme kanserinde hasta serumlarında bile, RASSF1A metilasyonu tespit edilebilmektedir (Pfeifer ve Dammann, 2005).

3p allel kayıpları, akciğer, böbrek ve meme kanserleri dahil olmak üzere birçok kanserde en sık tespit edilen genetik değişikliklerden biridir. Heterozigozite kaybı çalışmalarının ve akciğer, meme tümör hücresi hatlarında meydana gelen homozigot delesyonların tanımlanması, 3p21.3'te bir veya daha fazla tümör baskılayıcı gen (TSG) barındırabilecek kritik bir bölgeye işaret etmiştir. Sekiz gen, yani CACNA2D2, PL6/Plasental protein 6, 101F6, TUSC4/NPRL2, ZMYND10/BLU,

RASSF1, TUSC2/FUS1 ve HYAL2, en az 120 kb kapsayan bölgeden klonlanmıştır. Yapılan kapsamlı araştırmalara rağmen, bu genlerin sadece nadir mutasyonları ve polimorfizmleri tanımlanmıştır. Bununla birlikte, ilginç bir şekilde, RASSF1A'nın ekspresyonu, tümör hücre hatlarında görülmemiş veya down regüle edilmiştir. Bu ekspresyon kaybının ana nedeninin, promotör CpG adası hipermetilasyonu olduğu anlaşılmıştır (Dammann vd., 2000; Lerman ve Minna, 2000).

RASSF ailesi genlerinin somatik mutasyonel inaktivasyonu, nadir görülen bir olaydır. RASSF1A metilasyonu primer tümörlerde ve ona karşılık gelen normal dokuda çalışılmış, primer tümörlerde promotör bölgesi hipermetilasyonu tespit edilmiştir. RASSF1A metilasyonu en az 37 tümör tipinde bildirilmiştir. Normal dokularda RASSF1A metilasyonu pek görülmez. Premalign meme kanseri lezyonlarında ve sonradan akciğer kanseri geliştiren hastaların sputumlarında görülen RASSF1A metilasyonu, RASSF1A'nın erken tanıdaki önemini göstermektedir. Over kanserinde RASSF1A metilasyonu, peritoneal sıvıda ve serumda tüm histolojik tip, grade ve evreler için tespit edilmiş olup, bu hastalarda CA-125 serum seviyeleri de düşük olarak bulunmuştur. Bu durum erken tanının prognozda çok önemli olduğu over kanserinde, güvenilir bir tümör markırına sahip olmanın önemini ortaya koymaktadır (Agathanggelou, Cooper ve Latif, 2005).

Yapılan çalışmalarla, RASSF1A'nın insan kanserinde şimdiye kadar tanımlanan en sık hipermetilasyona uğrayan genlerden biri olduğu ortaya çıkmıştır. RASSF1A inaktivasyonu sıklıkla pek çok tümör türünde gözlenir. RASSF1A geninin, akciğer, meme, mesane, mide, kolanjiyokarsinom ve özofageal sarküler hücreli karsinom primer tümörlerinde ekspresyon kaybı, yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Kuroki vd., 2003; Lee vd., 2001). RASSF1 lokusundaki alel kaybının sık sık "ikinci bir vuruş" olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, mutasyon nadir görülen bir olay olarak tanımlanmaktadır (Agathanggelou, Cooper ve Latif, 2005). Bununla birlikte, son zamanlarda, daha hassas bir metodoloji kullanarak primer NPC tümörlerinde yüksek RASSF1A mutasyonları tespiti yapılmıştır (Pan vd., 2005). Medulloblastom gibi bazı tümörlerde, promotör hipermetilasyonu ile RASSF1A'nın biallelik inaktivasyonu gözlenmiştir (Lusher vd., 2002).

1.2.6.8.2. *Meme kanserinde RASSF1A geni metilasyonu*

DNA metilasyonu, DNA metiltransferazların aracılık ettiği, CpG dinükleotidlerindeki sitozini, 5-metilsitozine dönüştürmek için gerçekleştirilen işlemdir (Jones ve Baylin, 2002) . Beslenme, yaş ve çevresel etkenlere maruz kalma ile ilişkili DNA metilasyonunun, meme karsinogenezinin etiyolojisinde erken bir olay olarak göründüğü ve birçok onkogenin aktivasyonuna ve tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına neden olarak; hücrelerin anormal proliferasyonunu ve metastazı teşvik ettiği bildirilmiştir. (Faraga vd., 2007; Herceg, 2007). Genetik mutasyonların aksine, DNA metilasyonu beslenme düzeninin bozulmasına karşı hassastır ve geri dönüşümlüdür; bu nedenle kemoterapi ve kemoprevensiyon için, diyetin düzenlenmesiyle DNA metilasyonunun kontrolü, umut vaat edici bir gelişme olmuştur (Kopelovich vd., 2003; Yoo ve Janes, 2006).

Yapılan çalışmalar, bölgesel hipermetilasyonun, meme kanseri oluşumunun erken evreleri için, ana mekanizmalardan birini temsil ettiğini göstermiştir (Szyf vd., 2004). GWAS'larla, çeşitli meme kanseri hücrelerinde ve tümör dokularında hipermetilasyona uğramış genlerin (CDH1, DAPK1, GSTP1, HIN-1, RASSF1A, TIMP-3, MGMT ve p16INK4a) bir listesi ortaya konulmuştur. (Agrawal vd.,2007, Giacinti vd., 2006; Lehmann vd.,2002). Meme kanseri evresi ile metilasyonun ilişkili olduğu ve meme kanserinin teşhisinde, ilgili genlerin metilasyon durumlarının değerlendirilmesinin, markır olabileceği öne sürülmüştür (Agrawal vd., 2007). Değerlendirilen genler arasında, RASSF1A'nın meme kanserinde en sık metilasyona uğrayan tümör baskılayıcı gen (TSG) olduğu gösterilmiştir (Krop vd., 2001; van der Weyden vd., 2007). İntraduktal papillomlarda, epitelyal hiperplazilerde, in situ duktal karsinomda, RASSF1A metilasyonu tespit edilirken, normal meme dokusunda bulunmamıştır. RASSF1A metilasyonunun, meme tümör oluşumunda erken bir olay olduğu gösterilmiştir. (van der Weyden vd., 2007).

RASSF1A geninin primer meme kanserlerindeki promotor metilasyonunu inceleyen bir çalışmada, 40 meme tümör dokusu kullanılmış olup, RASSF1A metilasyon oranı %9 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada meme kanser hücre hatlarında metilasyon oranı %80 olarak bulunmuştur (Agathanggelou vd., 2001). Bir başka çalışmada,

RASSF1A geni için malign meme kanser dokusunda ortalama DNA metilasyon yüzdesi %45 iken, normal meme kanser dokusunda ortalama metilasyon yüzdesi sadece %2 civarında bulunmuştur (Zhu, Qin, Hewett ve Sauter, 2010). Meme kanseri hastalarının serumunda yapılan bir çalışmada, hastaların %35'inde RASSF1A hipermetilasyonu olduğu bildirilmiştir. (Van der Auwera vd., 2009). Başka bir çalışmada ise, RASSF1A promotor hipermetilasyonu, primer meme kanserlerinin %49'unda ve meme kanser hücre hatlarının %64'ünde tespit edilmiştir (Burbee vd., 2001).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışma Grupları

Çalışmaya Gayrettepe Florence Nightingale Hastanesi, Pataloji bölümü arşivinde bulunan, triple negatif meme kanseri tanısı almış 37 hastaya ait triple negatif meme kanseri tümör dokusu ve 29 kontrol bireyine ait normal meme dokusu dahil edilmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce, Karabük Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan, 28.03.2018 toplantı tarih ve 4/27 kararı ile, araştırma onayı alınmıştır.

2.2. Ekipman

2.2.1. Kimyasal Maddeler

❖ %96-100'lük Etanol

❖ DNA izolasyon kiti içeriği (Thermo Scientific GeneJET FFPE DNA Purification Kit)

- Digestion Buffer
- Proteinase K solüsyonu
- RNase A solüsyonu
- Binding Buffer
- GeneJET DNA Purification Column
- Wash Buffer 1
- Wash Buffer 2
- Elution Buffer

❖ Bisülfit uygulama kiti içeriği (EZ DNA Methylation-Gold Kit)

- CT Conversion Reagent solüsyonu
- Zymo-Spin™ IC Column
- M-Binding Buffer
- M-Wash Buffer
- M-Desulphonation Buffer
- M-Elution Buffer

❖ Enzim Karışımı (LightCycler® 480 SYBR Green I Master)

❖ Forward Primer (F)

❖ Reverse Primer (R)

2.2.2. Araçlar ve Cihazlar

❖ Santrifüj (Wisespin CF_10)

❖ Mikropipetör (10-100 µl ve 100-1000)-(Microlit ve Socorex)

❖ Mikropipet uçları (100 µl ve 1000 µl)-(Biologix)

❖ Eppendorf tüpü (Isolab)

❖ Otoklav (Daihan WiseClave®)

❖ Derin dondurucu (-20) (Bosch)

❖ Su banyoları (Miprolab)

❖ Vorteks (Dragonlab MX-F)

❖ Eldivenler (Dolphin)

❖ Deiyonize su

❖ Kağıt havlu

❖ Enjektör

❖ Parafilm (Parafilm M)

❖ Roche LightCycler 480 II

❖ Thermal Cycler cihazı (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler)

❖ Plate santrifüj cihazı (Beckmann Coulter Allegra X-15R)

❖ PCR tüpü

2.3. Parafine Gömülü Tümör ve Normal Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu

İzolasyon, Thermo Scientific GeneJET FFPE DNA Purification Kit kullanılarak yapılmıştır. İzolasyon için her biri 10 µm kalınlığında olan, 7 kesit FFPE doku örneği kullanıldı.

Saklama Koşulları: Açılmamış Proteinase K ve RNase A solüsyonları oda sıcaklığında saklanmıştır. Solüsyonlar kullanılmaya başladıktan sonra ise -20°C'de muhafaza edildi. Kitin diğer bileşenleri oda sıcaklığında (15-25°C) saklandı.

2 adet su banyosu kullanılmış olup bunların dereceleri 65°C ve 90°C olarak ayarlandı.

Prosedür;

Wash Buffer 1 solüsyonu hazırlamak için total hacim 40 ml'ye tamamlandı ve bu tamamlama 10 ml konsantre wash 1 solüsyonuna, 30 ml etanol (%96) eklenerek yapıldı.

Wash Buffer 2 solüsyonu hazırlamak için, total hacim 40 ml'ye tamamlandı ve bu tamamlama 10 ml konsantre wash 2 solüsyonuna, 30 ml etanol (%96) eklenerek yapıldı.

1. Mikrosantrifüj tüpündeki 7 kesit içeren FFPE doku örneği üzerine, 200 µl Digestion Buffer solüsyonu eklendi. 90°C'de 9 dakika inkübe edilmişdi. İnkübasyon esnasında, doku örneklerinin Buffer solüsyonunun içinde bulunduğundan emin olana kadar, tüp hafifçe birkaç kez sallanarak, örnekler karıştırıldı. İnkübasyondan sonra, parafinin çözünmesi için örnekler vortekslendi. Örnekler oda ısısına gelene kadar soğuması için bekletildi ve tüp kapağının temizlenmesi için kısa süreli spin yapıldı.

2. Spin yapılan örneklere, 20 µl Proteinase K solüsyonu eklendi ve homojen bir karışım elde etmek amacıyla vortekslendi. Daha sonra tüp kapağının temizlenmesi için kısa süreli spin yapıldı.

3. Örnekler, belirli periyotlarla vortekslenerek, 65°C su banyosunda 120 dakika inkübe edildi.

4. Daha sonra örnekler 90°C'olan diğer su banyosuna alınıp, 40 dakika bekletildi.

5. Örnekler 90°C'deki su banyosundan çıkarıldıktan sonra, oda ısısına gelene kadar bekletildi ve sonra, 7 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen lizattan 200 µl alınarak, 1,5 µl'lik yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

6. 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılan örneklere 10 µl RNase A solüsyonu eklenerek iyi bir şekilde vortekslendi ve kısa süreli spin yapıldı. Spinin ardından örnekler, 10 dakika oda ısısında bekletildi.

7. Daha sonra oda ısısında bırakılan örneklere 200 µl Binding Buffer eklendi ve homojenizasyonu sağlamak için, 10 sn. vortekslenip kısa süreli spin yapıldı.

8. Örneklere 400 µl etanol (%96) eklendi ve homojenizasyon için 10 sn. vortekslenip, kısa süreli spin yapıldı.

9. Lizat, Collection Tube içine yerleştirilmiş GeneJET DNA Purification Column'a aktarıldı. 7 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra Collection Tube sıvıyla birlikte atılarak, GeneJET DNA Purification Column, yeni bir collection tüpe yerleştirildi.

10. Collection tüpe 500 µl Wash Buffer 1 solüsyonu eklenip, 8 500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Collection tüpte toplanan sıvı, atığa boşaltılıp column tekrar collection tüpe yerleştirdi.

11. Collection tüpe 500 µl Wash Buffer 2 solüsyonu eklenip 3 dakika, 1 350 rpm'de santrifüj edildi. Collection tüp boşaltılarak, column tekrar yerleştirildi. 1 dakika 1 350 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası collection tüp atılıp, GeneJET DNA Purification Column, steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.

12. Mikrosantrifüj tüpüne alınan GeneJET DNA Purification Column'a 45 µl Elution Buffer, column membranın tam ortasına gelecek şekilde eklendi. Oda sıcaklığında, 2 dakika bekletildikten sonra ve 8 500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

13. Elde edilen DNA -20°C de saklanmıştır.

2.4. DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilmiş olan DNA'ların konsantrasyonları, spektrofotometrik yöntemler ölçüldü. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanslarının ölçülmesiyle saptandı.

2.5. Bisülfit Uygulaması

DNA örneklerinin metilasyon durumunu belirlemek için, Real Time PCR öncesinde bisülfit uygulaması ‘“EZ DNA Methylation-Gold Kit” ile yapıldı.

2.6. Kit İçeriğinin Hazırlanması

2.6.1. CT Conversion Reagent Hazırlanması

Kitle birlikte liyofilize halde sağlanan CT Conversion Reagent, aşağıda belirtildiği şekilde kullanıma hazır hale getirildi.

- ✓ CT Conversion Reagent tüpüne sırasıyla 900 µl dH_2O, 300 µl M-Dilution Buffer ve 50 µl M-Dissolving Buffer konuldu.

- ✓ Oda sıcaklığında 10 dk. boyunca vortekslendi.

2.6.2. M-Wash Buffer hazırlanması

- ✓ Kitle birlikte sağlanan M-Wash Buffer içerisine, 24 ml etanol (%96-100) eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

Prosedür;

1. 130 µl CT Conversion Reagent, PCR tüpü içine koyulan 20 µl DNA örneğine eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldıktan sonra kısa bir santrifüj yapıldı.

2. PCR tüpleri, Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek aşağıdaki basamaklar uygulandı:

   - ✓ 98°C’de 10 dk

   - ✓ 64°C’de 2.5 saat

   - ✓ 4°C bekletme

3. Zymo-Spin™ IC Column, Collection tüp içine yerleştirildikten sonra üzerlerine 600 µl M-Binding Buffer eklendi.

4. 2. Basamakta elde edilen örnek, M-Binding Buffer içeren kolona yüklenmiştir ve kapak kapatılarak alt üst edilip karıştırıldı.

5. 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve collection tüpteki sıvı atıldı.

6. 100 µl M-Wash Buffer, kolona ilave edilerek, 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra, Collection tüpteki sıvı atıldı.

7. Kolona 200 µl M-Desulphonation Buffer eklendi. Oda ısısında (20-30°C) 15-20 dakika inkübe edildikten sonra, 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Collection tüpteki sıvı atıldı.

8. 200 µl of M-Wash Buffer, kolona eklendi ve 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Collection tüpteki sıvı atılıp, tekrar 200 µl M-Wash Buffer, kolona eklendi, 10 000 g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra, collection tüpteki sıvı atıldı.

9. Santrifüj sonrası kolonlar, collection tüplerden alınarak steril, 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Doğrudan kolon matriksi üzerine, 10 µl M-Elution Buffer eklenerek 10 000 g'de 30 sn. santrifüj edildi.

10. Bisülfit uygulaması işlemi tamamlanmış DNA örnekleri, Real-Time PCR aşamasına kadar -20^{o}C'de saklandı.

2.7. Primer Dizaynı

RASSF1 gen bölgesinin, metilasyon durumunu belirlemek için kullanılan primer dizileri, bu genin CpG adalarına spesifik; metile, unmetile olarak, NCBI ve ENSEMBLE genom browser kullanılarak ve MethPrimer Software ile dizayn edildi.

Çalışmada kullanılan RASSF1A Unmetile ve Metile primer dizileri, Tablo 2.1.'de verildi.

Tablo 2.1. *RASSF1A Unmetile ve Metile Primer Dizileri*

Gen ismi	Primer Adı		Primer Dizisi (5'-3')
RASSF1A	Unmetile	Forward	GAGAGTGTGTTTAGTTTTGTTTTT
		Reverse	CCCATACTTCACTAACTTTAAACAC
	Metile	Forward	GAGAGCGCTTTAGTTTCGTTTTC
		Reverse	ACCCGTACGTTCGCTAACTTTAAACG

Primerler İçin Optimizasyon

İlk olarak primerlere, yanında gelen kullanım kılavuzlarında belirtilen 100 µM için gerekli su miktarı eklendi ve 100 µM' a (yani 100 pmol/µl'ye) sulandırıldı. Sulandırılan primerlerden, her parametre için aşağıda belirtilen ara stoklar oluşturulup, Real-Time PCR analizi için hazır hale getirildi.

Primer ara stok hazırlanışı;

Metile ve unmetile primerlerin her biri için, Forward ve Reverse primerlerden 10 µM ara stok oluşturuldu. Bunun için, 100 µM' lık ana stoktan, 10 µl alınarak, üzerine 90 µl su eklendi.

Ara stoklar hazırlanırken M1*V1=M2*V2 klasik formülü kullanıldı.

2.8. Real-Time PCR Analizi

Bisülfit uygulanmış DNA örneklerinin metilasyon profilini belirlemek amacıyla, RASSF1A gen bölgesi için dizayn edilen primerler ile LightCycler® 480 SYBR Green I Master kullanılarak, Roche LightCycler 480 II cihazı ile çalışıldı.

Hem metile hem de unmetile PCR ile profil analizi için, aşağıda belirtilen aynı reaksiyon karışımı kullanıldı (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. *RocheLightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kullanımı*.

Bileşenler (Tek Reaksiyon için)	Hacim
Su, PCR-grade	1,9 µl
Forward Primer(F) (ara stok 10 µM)	0.3 µl
Reverse Primer(R) (ara stok 10 µM)	0.3 µl
Enzim Karışımı (LightCycler® 480 SYBR Green I Master)	5 µl
	+
Bisülfit uygulanmış DNA örneği	2,5 µl
TOPLAM REAKSİYON HACİM	10 µl

Reaksiyon Karışımı:

Reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için bileşenlerin her birinden (DNA hariç) eklendi ve reaksiyon sayısı ile çarpılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.

- Plate'lere her bir reaksiyon için, 8 µl reaksiyon karışımından transfer edildi.
- 2 µl DNA örneği, her bir kuyucuğa son reaksiyon hacmi 10 µl olacak şekilde ilave edildi.
- Negatif Kontrol olarak, kalıp DNA yerine PCR-grade su kullanıldı.
- Pozitif Kontrol olarak, kalıp DNA yerine Zymo Research-Bisulfite-Converted Universal Methylated Human DNA Standard, kullanıldı.
- Hazırlanan platelerin üzeri kapatılarak, plate santrifüj cihazı ile santrifüj edildi ve aşağıda belirtilen cihaz protokolü ile çalışma yapıldı (Tablo 2.5.).

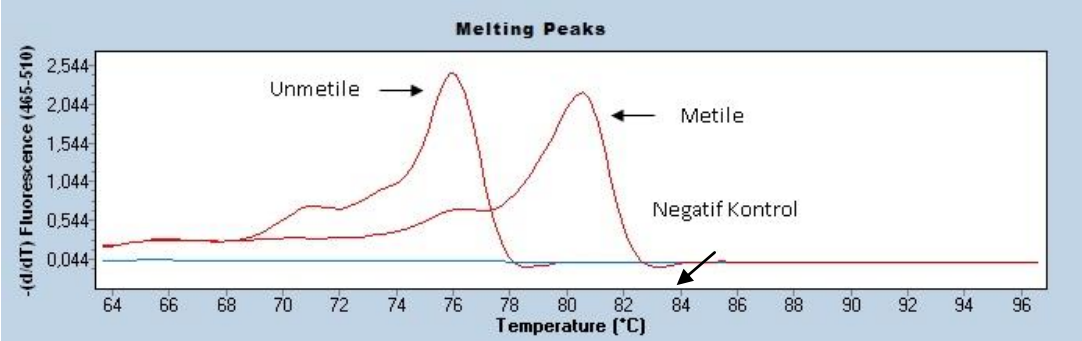
Tablo 2.3.*Cihaz protokolü*.

Program Adı	**PRE-İNKÜBASYON**	**AMPLİFİKASYON**			**MELTING CURVE**			**SOĞUTMA**
Analiz Modu	Yok	Kuantifikasyon Modu			Erime Eğrisi Modu			Yok
Döngü Sayısı	1	50			1			1
Hedef Sıcaklık [°C]	95	95	59	72	95	64	97	40
Süre	00:05:00	00:00:10	00:00:15	00:00:15	00:00:05	00:01:00	00:00:00	00:00:30
Sıcaklık Artış Hızı [°C/s]	4,8	4,8	2,5	4,8	4,8	2,5	0,11	2,5
Okuma Modu	Yok	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Continuous	Yok

2.9. Analiz

Real Time PCR sonunda elde edilen verilerin analizi, LightCycler 480 yazılımında, "Tm Calling" modunda gerçekleştirildi. Her bir örneğin, metile ve unmetile primer setinde bir Tm farkı olup olmadığına bakılıp, metile veya unmetile olduğunun tespiti yapıldı. Her örneğin metilasyon durumu doğrulaması, pozitif metile kontrol DNA'sı; Zymo Research-Bisulfite-Converted Universal Methylated Human DNA Standard ile yapıldı.

RASSF1A genine ait erime eğrileri Grafik 2.1.'de verilmiştir.



Grafik 2.1. *RASSF1A* genine ait erime eğrisi.

2.10. İstatistiksel Yöntem

RASSF1A geni metilasyon profili ile; patolojik evre, histolojik derece, tümör çapı, lenf nodu tutulumu olmak üzere, klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla, Statistical Package for Social Sciences (PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.) programı kullanılmış ve tüm analizler için Fisher'ın χ^2 (ki kare) testi uygulanmıştır. P değeri <0,05 olduğunda karşılaştırılan parametreler arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

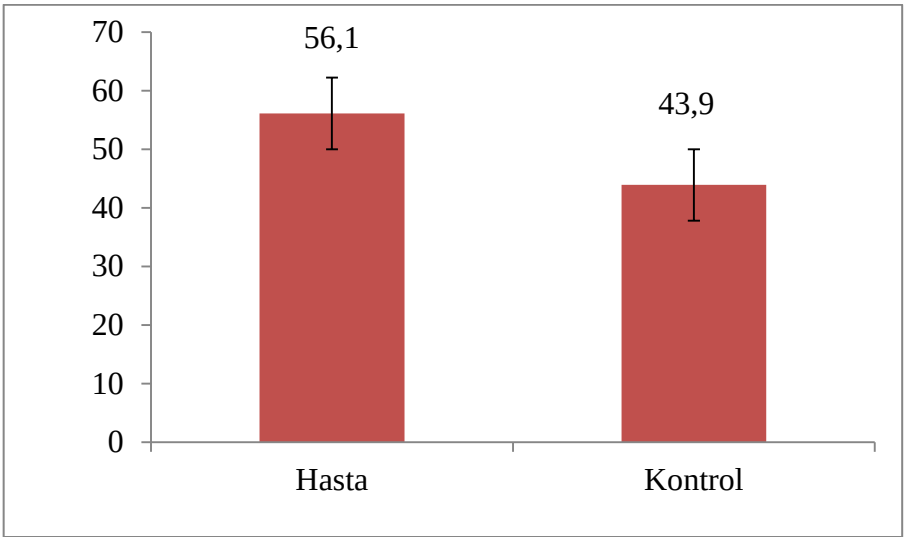
3. BULGULAR

Çalışmada triple negatif meme kanseri tanısı almış 37 hastaya ait, triple negatif meme kanseri tümör dokusu ve 29 kontrol bireyine ait, normal meme dokusu kullanılmıştır. Klinik parametrelerin, triple negatif meme kanserinde, RASSF1A geni metilasyonuyla olan asosiasyonunu değerlendirmek üzere, evre, histolojik derece, tümör çapı ve lenf nodu tutulumu kıyaslanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrollere ait olgu bilgileri Tablo 3.1'de verilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 53,2 iken, kontrollerin yaş ortalaması 42,1 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.1. *Çalışmadaki katılımcıların gruplara göre dağılımı*.

	n	%
Hasta	37	56,1
Kontrol	29	43,9



Grafik 3.1. Çalışmadaki katılımcıların gruplara göre dağılım grafiği.

Histolojik derecesi Grade 2' de 6 (16,7) hasta, Grade 3'de 30 (83,3) hasta mevcuttu. Klinik evreye göre; Evre 1'de 7 (%18,9) hasta, Evre 2A'da 19 (%51,3) hasta, Evre 2B'de 9 (24,3) hasta, Evre 3A'da 1 (%2,7) hasta mevcuttu. Lenf nodu tutulumu değerlendirildiğinde; lenf nodu tutulumu pozitif olan grupta 25 (71,5) hasta, negatif

grupta ise 10 (28,5) hasta bulunmaktadır. Tümör çapları değerlendirildiğinde, ise tümör çapı 20 mm' den küçük olan grupta 6 (16,6) hasta, tümör çapı 20-30 mm arasında 19 (52,7) hasta, tümör çapı 31-45 mm arasında 7 (19,4) hasta, tümör çapı 46-60 mm arasında 2 (5,5) hasta ve tümör çapı 61-90 mm arasında 2 (5,5) hasta mevcuttur.

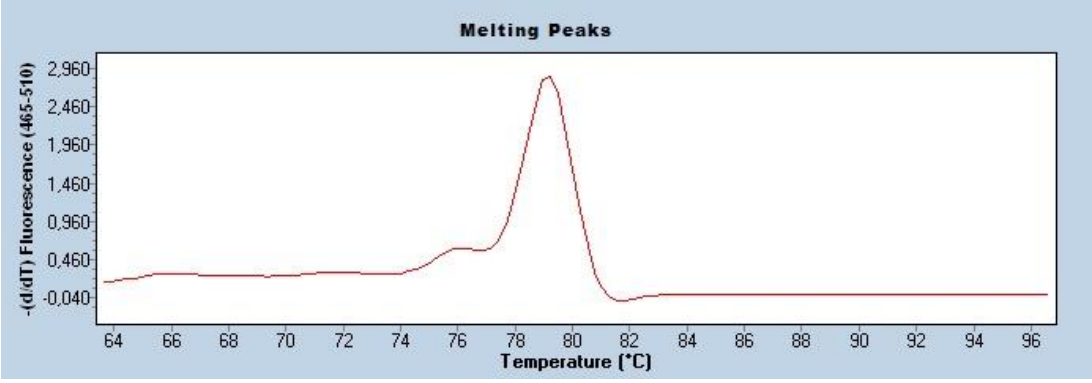
3.1. Metilasyon Profili

Çalışmada, triple negatif meme kanseri tanısı almış 37 hastaya ait triple negatif meme kanseri tümör dokusu ve 29 kontrol bireyine ait normal meme dokusu kullanılmış olup, parafine gömülü doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA, bisülfit uygulamasına tabi tutulmuştur, böylece metile olan bölgelerle, unmetile (metile olmayan) bölgelerin ayırımı sağlanmıştır. Bisülfit uygulamasından sonra, metile ve unmetile bölgelere spesifik primerler kullanılarak, Real Time PCR analizi gerçekleştirilmiş ve çalışılan her dokuda, RASSF1A geninin metilasyon durumu belirlenmiştir. Dokularda ağırlıklı olarak metilasyon varsa metile, metilasyon yoksa unmetile, hem metile hem de unmetile DNA'lar mevcut ise, metile+unmetile olarak etiketlenmişlerdir.

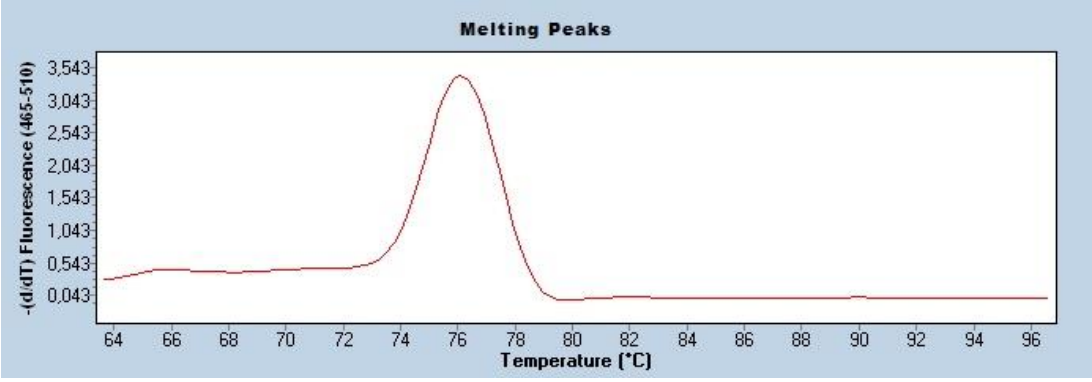
Yapılan analizde, hasta grubunda RASSF1A geninin metilasyonu, kontrol grubuna göre daha yüksek oranda bulunmuştur (p=0,02). RASSF1A geninin metilasyon durumunun hasta ve kontrol gruplarında dağılımı Tablo 3.2'de verilmiştir. Hasta grubunda RASSF1A metilasyon oranı %72,2 (26 tümör dokusu) iken, kontrol grubunda %37,9 (11 meme dokusu)'dur. Buna göre, gruplara göre metilasyon dağılımları arasında fark bulunmaktadır. Hasta grubundaki metile profil yüzdesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek iken, kontrol grubunda unmetile profil gösterenlerin yüzdesi daha yüksek bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubunda metile+unmetile profil dağılımları benzerdir (Grafik 3.2.; 3.3.; 3.4. ve 3.5.) (p=0,020).

Tablo 3.2. *Gruplara göre RASSF1A geni için metilasyon dağılımı (Hasta grubunda bir hastada sonuç alınamamıştır).*

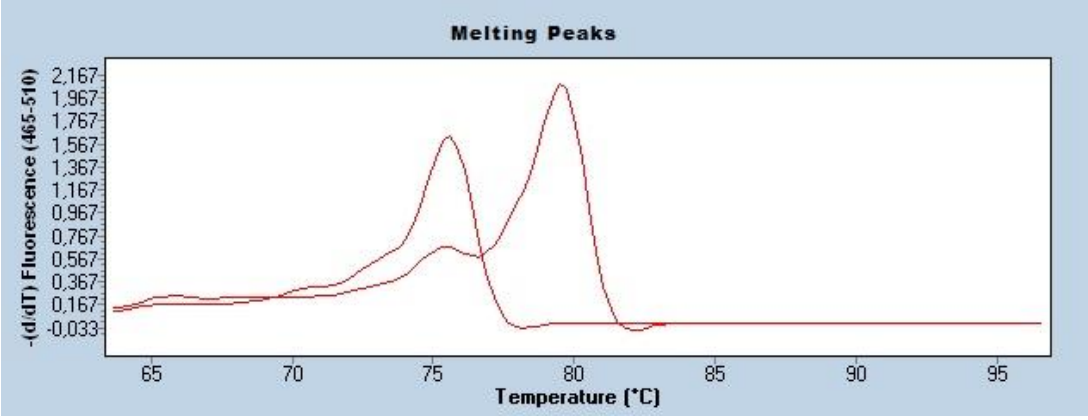
Metilasyon durumu	Üçlü Negatif Meme Kanseri Grubu (n=36)	Kontrol Grubu (n=29)	X^2 p-değeri
RASSF1A			
Metile	26 (%72,2)	11 (%37,9)	0,020
Unmetile	6 (%16,7)	12 (%41,4)	
Metile+Unmetile	4 (%11,1)	6 (%20,7)	



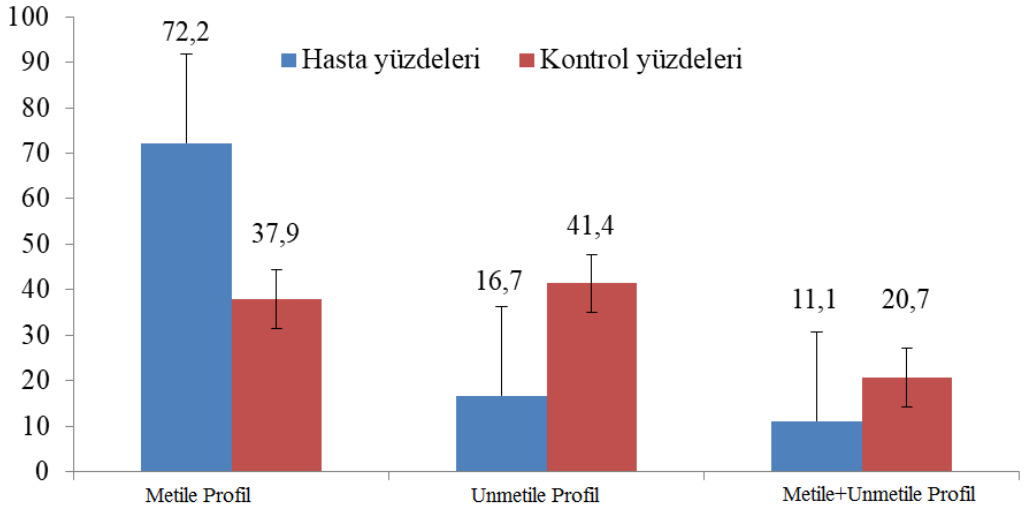
Grafik 3.2. MT3 nolu olguya ait RASSF1A geni metile profil gösteren erime eğrisi.



Grafik 3.3. MK18 nolu olguya ait RASSF1A geni unmetile profil gösteren erime eğrisi.



Grafik 3.4. MT25 olguya ait RASSF1A geni metile+unmetile profil gösteren erime eğrisi.

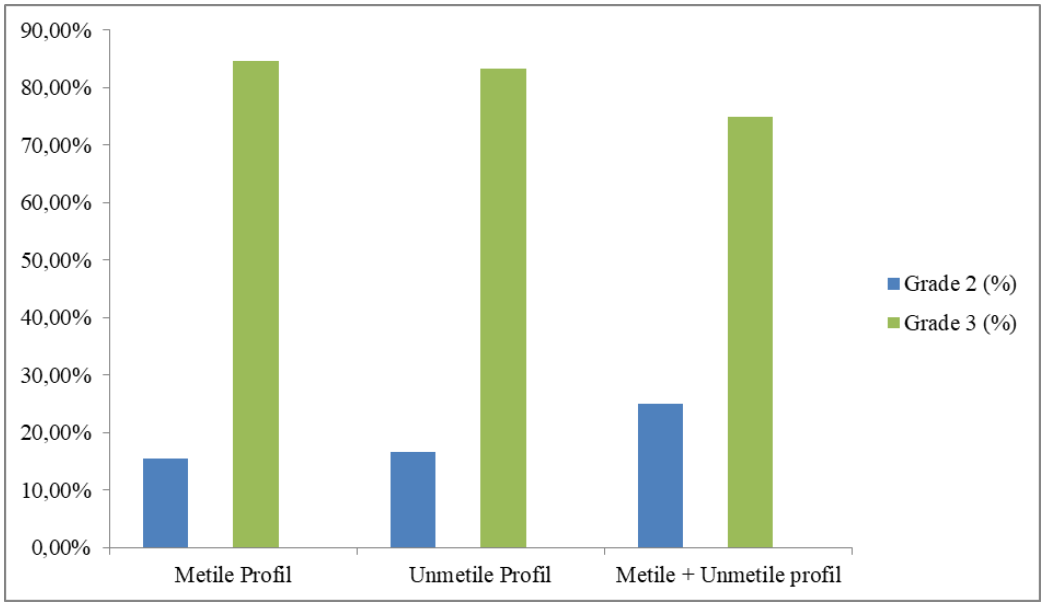


Grafik 3.5. Tümör ve kontrol dokusuna göre RASSF1A geni için metilasyon dağılımları.

Triple negatif meme kanserinde, RASSF1A geninin metilasyon durumuyla histolojik derece arasındaki ilişki karşılaştırılmıştır (Tablo 3.3.). Histolojik derece Grade 2 olan 4 (%15,4) hastanın, histolojik derece Grade 3 olan 22 (%84,6) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile profil belirlenmiştir. Grade 1'de 1 (%16,7) hasta, Grade 2'de 5 (%83,3) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profil belirlenmiştir. Grade 1'de 1 (%25) hastanın, Grade 2'de 3 (%75) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile+unmetile profil belirlenmiştir. Tablo 3.3.'e göre RASSF1A ile histolojik derece arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır (p= 0.891).

Tablo 3.3. *Triple negatif meme kanserinde RASSF1A metilasyon durumu ile Histolojik Derece arasındaki ilişki.*

		RASSF1A			
		Metile	**Unmetile**	**Metile + Unmetile**	**p değeri**
HİSTOLOJİK DERECE	**Grade 2 (n)**	4	1	1	0,891
	%	%15,4	%16,7	%25,0	
	Grade 3 (n)	22	5	3	
	%	%84,6	%83,3	%75,0	



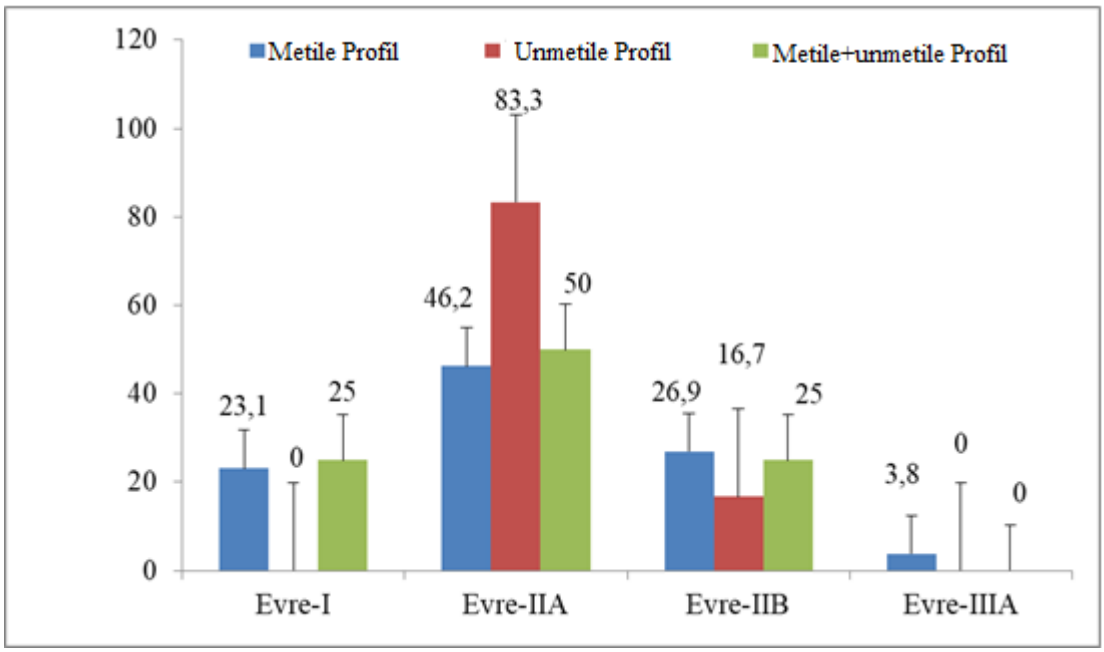
Grafik 3.6. Triple negatif meme kanserinde Histolojik Dereceye göre RASSF1A metilasyon frekans dağılımları.

RASSF1A geninin metilasyon durumuyla meme kanserinin evresi arasındaki ilişki değerlendirildinde; Evre 1'de 6 (%23,1) hastanın, Evre 2A'da 12 (%46,2) hastanın, Evre 2B'de 7 (%26,9) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile profil belirlenmiştir. Evre 3A'da sadece 1 hasta bulunmaktadır. Bu hastada da RASSF1A promotör bölgesinde metile profil belirlenmiştir. Evre 1 ve Evre 3'te unmetile profil belirlenmezken, Evre 2A'da 5 (%83,3) hastanın, Evre 2B'de 1 (%16,7) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profil belirlenmiştir. Evre 1' de 1' (%25,0) hastanın, Evre 2A'da 2 (%50,0) hastanın, Evre 2B'de 1 (%25,0) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile+unmetile profil belirlenirken, Evre 3'te ise

metile+unmetile profile sahip hasta bulunmamaktadır. Tablo 3.4.'te gösterildiği üzere, RASSF1A metilasyonu ile evre arasında bir ilişki bulunmamaktadır (p=0.773).

Tablo 3.4. *Triple negatif meme kanserinde RASSF1A metilasyon durumu ile Evre arasındaki ilişki.*

		RASSF1A			
		Metile	**Unmetile**	**Metile+Unmetile**	**p değeri**
EVRE	**1 (n)**	6	0	1	0,773
	%	%23,1	%0,0	%25,0	
	2A (n)	12	5	2	
	%	%46,2	%83,3	%50,0	
	2B (n)	7	1	1	
	%	%26,9	%16,7	%25,0	
	3A (n)	1	0	0	
	%	%3,8	%0,0	%0,0	



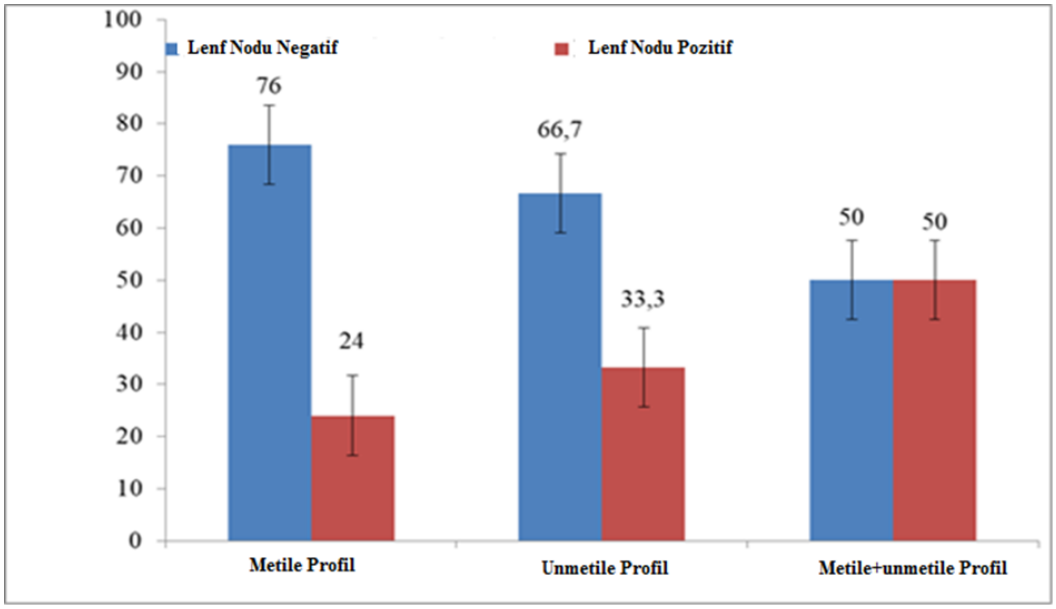
Grafik 3.7. Triple negatif meme kanserinde Evreye göre RASSF1A metilasyon frekans dağılımları.

RASSF1A geninin metilasyon durumuyla lenf nodu tutulumu arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; lenf nodu tutulumu pozitif olan 19 (%76,0) hastanın, lenf nodu tutulumu negatif 6 (%24,0) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile profil

belirlenmiştir. Lenf nodu tutulumu pozitif olan 4 (%66,7) hastanın, lenf nodu tutulumu negatif olan 2 (%33,3) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profil belirlenmiştir. Lenf nodu tutulumu pozitif olan ve lenf nodu tutulumu negatif olan hastaların RASSF1A promotör bölgesinde metile+unmetile profil durumları aynı olarak gözlenmiş olup; ikisinde de 2 (%50) hastada metile+unmetile profil belirlenmiştir. Tablo 3.5'e göre RASSF1A ile lenf nodu tutulumu arasında bir ilişki bulunmamaktadır (p=0,543).

Tablo 3.5. *Triple negatif meme kanserinde RASSF1A metilasyonu ile lenf nodu tutulumu arasındaki ilişki.*

		RASSF1A			
	Metile	**Unmetile**	**Metile+Unmetile**	**p değeri**	**Metile**
LENF NODU	**Pozitif (n)**	19	4	2	0,543
	%	%76,0	%66,7	%50,0	
	Negatif (n)	6	2	2	
	%	%24,0	%33,3	%50,0	



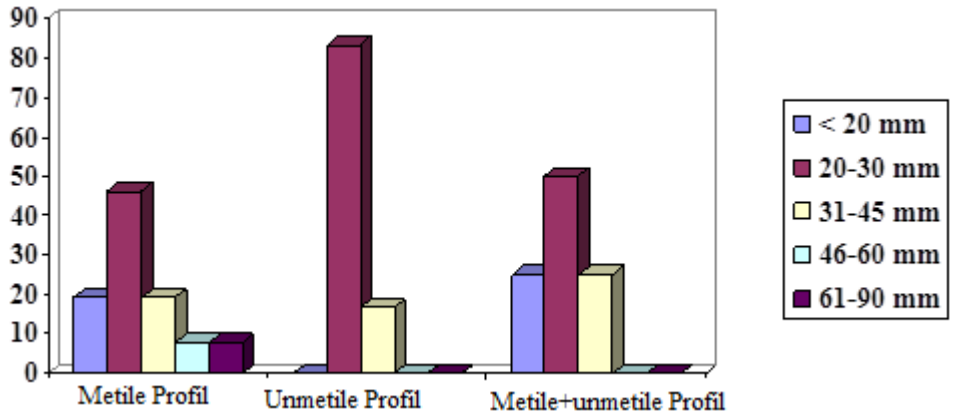
Grafik 3.8. Triple negatif meme kanserinde lenf nodu tutulumu durumuna göre RASSF1A metilasyon frekans dağılımları.

RASSF1A geninin metilasyon durumuyla tümör çapı arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; tümör çapı 20 mm'den küçük 5 (%19,2) hastanın, tümör çapı 20-30 mm arasında olan 12 (%46,2) hastanın, tümör çapı 31-45 mm arasında olan 5

(%19,2) hastanın, tümör çapı 46-60 mm arasında olan 2 (%7,7) hastanın, tümör çapı 61-90 mm arasında olan 2 (%7,7) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile profil belirlenmiştir. Tümör çapı 20-30 mm arasında olan 5 (%83,3) hastanın, tümör çapı 31-45 mm arasında olan 1 (%16,7) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profili belirlenirken, diğer tümör çapı aralıklarında RASSF1A promotör bölgesinde unmetile profil belirlenmemiştir. Tümör çapı 20 mm'den küçük 1 (%25,0) hastanın, tümör çapı 20-30 mm arasında olan 2 (%50,0) hastanın, tümör çapı 31-45 mm arasında olan 1 (%19,2) hastanın, RASSF1A promotör bölgesinde metile+unmetile profil belirlenmiş olup, diğer çap aralıklarında metile+unmetile profil belirlenmemiştir. Tablo 3,6'ya göre tümör çapı ile RASSF1A metilasyon durumu arasında ilişki bulunmamaktadır (p= 0,841).

Tablo 3.6. *Triple negatif meme kanserinde tümör çapı ile RASSF1A metilasyon durumu ilişkisi.*

		RASSF1A			
		Metile	**Unmetile**	**Metile+Unmetile**	**p değeri**
TÜMÖR ÇAPI	**<20 mm (n)**	5	0	1	0,841
	%	%19,2	%0,0	%25,0	
	20-30 mm (n)	12	5	2	
	%	%46,2	%83,3	%50,0	
	31-45 mm (n)	5	1	1	
	%	%19,2	%16,7	%25,0	
	46-60 mm (n)	2	0	0	
	%	%7,7	%0,0	%0,0	
	61-90 mm (n)	2	0	0	
	%	%7,7	%0,0	%0,0	



Grafik 3.9. Triple negatif meme kanserinde tümör çapına göre RASSF1A metilasyon frekans dağılımı.

4. TARTIŞMA

RASSF1A promotör bölgesindeki CpG adalarının hipermetilasyonunun, karsinojenezde önemli ve erken bir olay olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. RASSF1A geni, RAS yolağında, proliferasyonu düzenleyen, apoptozu indükleyen ve mikrotübülleri stabilize edebilen bir tümör baskılayıcı gendir. Hem in vitro, hem de in vivo çalışmalar, kanser hücrelerinde RASSF1A'nın aşırı ekspresyonunun, hücre döngüsünün durdurulmasına neden olduğu gösterilmiştir. RASSF1A metilasyonu, meme tümörlerinde %10–95 arasında değişen sıklıkta tespit edilmektedir. Serum DNA'sında RASSF1A metilasyonunun saptanmasının, erken kanser gelişimi için bir belirteç olduğu öne sürülmüştür. (Yazici vd., 2009)

Meme kanseri moleküler olarak 4 alt tipe ayrılmaktadır; bu alt tipler, lüminal A, Lüminal B, HER2 amplifiye ve Bazal tümörlerdir. Bazal tümörler genel olarak agresif seyreden tümörler olarak bilinirler, daha kötü prognoza sahiptirler ve bu tümörler için terapi opsiyonları, diğer meme kanseri tiplerine oranla daha kısıtlı görünmektedir. Bazal tümörlerin büyük çoğunluğunu, triple negatif meme kanserleri oluşturmaktadır (Howlader, 2014; Yao vd., 2017). Bu çalışmaya sadece triple negatif meme kanseri hastaları dahil edilmiştir. Çalışmamızda RASSF1A geni promotör metilasyon oranı hasta grubunda (triple negatif meme kanseri) %72,2 iken, kontrol grubunda %37,9 olarak bulunmuştur (p=0,02).

Yazıcı ve ark. tarafından 2009 yılında A.B.D. ve Kanada'da meme kanserli hastalar veya onların kardeşlerinde yapılan bir çalışmada, periferik kandan izole edilen DNA'da, RASSF1A metilasyonu kontrollere oranla daha yüksek oranda tespit edilmiş, ve bu çalışmada incelenen 12 tümör dokusunun hepsinde (%100), RASSF1A metilasyonu bulunmuştur. 100 kişinin dahil edildiği bu çalışmada, olgulardan 28'i meme kanseri diyagnozundan önce kan alınan meme kanseri hastaları ve 10'u kanser tanısı almamış kardeşleri iken; çalışmada tanı öncesi kan alınmayan 33 meme kanseri hastası ile, yaş ve ırk olarak eşleştirilmiş 29 kontrol bireyi yer almıştır. Çalışmada yer alan 61 meme kanseri hastasının 11'inin (%18), meme kanseri hastalarının risk taşıyan sağlıklı olan 10 kardeşinin 2'sinin (%20);

periferik kandan izole edilen DNA'sında metilasyon görülmüştür. Sağlıklı 29 kontrolün hiçbirinde (0%) RASSF1A metilasyonu görülmemiştir. Bu çalışma, meme kanseri tanısı öncesinde, belirli olgularda RASSF1A metilasyonunun periferik kan DNA'sında görülebileceğini, ve erken tanı için kullanılabileceğini bildirmesi açısından önemli olmuştur. Yazıcı ve ark. inceledikleri 12 tümör dokusunda, %100 oranında RASSF1A metilasyonu tespit etmişlerdir (Yazıcı vd., 2009). Bizim çalışmamızda kanser dokusunda metilasyon oranı %72,2'dir, ancak bizim çalışmamızın Yazıcı ve ark.'larının çalışmasından farkı, sadece triple-negatif meme kanserlerinin çalışmaya dahil edilmesidir. Lee ve ark. tarafından 2010 yılında Kore popülasyonunda meme kanseri alt tiplerinden; Lüminal, HER2 ve bazal meme kanserlerinde RASSF1A metilasyonunu karşılaştıran bir çalışmada, bazal tümörlerdeki metilasyonun, lüminal ve HER2 amplifiye tümörlere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaya 114 inazif duktal karsinomlu meme kanseri hastası dahil edilmiştir (57 lüminal, 24 HER-2 ve 33 bazal tip meme kanseri). Bazal meme kanserlerinde tespit edilen RASSF1A metilasyon seviyesi %1,59 iken, lüminal meme kanserlerinde %40,1 ve HER-2 amplifiye meme kanserlerinde ise %13,87 olmuştur ($p<0,0001$) (Lee vd., 2010). Bizim çalışmamızda diğer meme kanseri alt tiplerine göre nisbeten daha az RASSF1A metilasyonu görülen, triple negatif (genellikle bazal tümörlerdir) meme kanserleri çalışılmış, bu kanserlerde normal dokuya göre daha yüksek RASSF1A metilasyonu tespit edilmiştir.

Klajic ve ark. tarafından 2013 yılında Norveç ve İsveç popülasyonunda yapılan bir çalışmada, RASSF1A metilasyonu ileri evre meme kanserlerinde, erken evreye göre göre daha yüksek bulunmuş ve ER pozitif kanserlerde negatif kanserlere göre, daha yüksek RASSF1A metilasyonu görülmüştür. Çalışmaya farklı evrelerden 238 DCIS hastası dahil edilmiştir (Evre I %28,9, Evre II %8,9, Evre III %40,9, Evre IV %9,8). Normal dokularda RASSF1A hipermetilasyonu görülmezken, tümör hipermetilasyon oranı Evre I'de %81,1, Evre II'de %90, Evre III'te %95.2 ve Evre IV'te %94.4 olarak gözlenmiştir. Artan evreyle beraber hipermetilasyon artarken, en belirgin fark Evre I ile Evre IV meme kanseri arasında gözlenmiştir ($p=0,0000033$) (Klajic vd., 2013). Park ve ark. tarafından 2012 yılında Kore popülasyonunda yapılan bir çalışmaya, 179 meme kanseri hastası (36 lüminal A, 33 lüminal B, 30 lüminal–HER2, 40 HER2 amplifiye, ve 40 bazal meme kanseri hasta) dahil edilmiş ve

RASSF1A geni promotör bölge metilasyonu çalışılmıştır. RASSF1A'nın metilasyon frekansı lüminal A'da %86, lüminal B'de %91, lüminal–HER2' de %100, HER2 amplifiye tipinde %70 ve bazal meme kanserlerinde %23 olarak görülmüştür (Park vd., 2012). Bizim çalışmamız bazal tümör grubunda olan triple negatif meme kanserlerine odaklanmış ve bu alttipte metilasyonun (%72,2), kanser olmayan kontrol grubuna (%37,9) göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda RASSF1A metilasyonu ile histolojik derece, evre, lenf nodu tutulumu ve tümör çapları arasında bir ilişki bulunamamıştır (sırasıyla p=0.891, p=0.773, p=0.543, p=0,841) .

Wang ve ark. tarafından 2012 yılında A.B.D.'de Afrika (33 hasta) ve Avrupa (32 hasta) kökenli 65 meme kanseri hastasında yapılan bir çalışmada, Afrikalı-Amerikalı ve Avrupalı-Amerikalı kadınlar arasında RASSF1A metilasyon seviyesi için bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmada aynı hastada, tümörlü doku ve normal doku arasında RASSF1A metilasyon seviyesi farkı değerlendirilmiştir. Tümör dokularında, RASSF1A metilasyon seviyesi daha yüksek bulunmuştur (p<0,001). Ayrıca neo-adjuvan terapinin tümörlerde RASSF1A metilasyon seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir (p<0.005) (Wang vd., 2012). Ancak, Mehrotra ve ark. tarafından 2004 yılında 111 meme kanseri hastasında A.B.D.'de yapılan bir çalışmada, ER−/PR−, yaş < 50 meme kanser grubunda Afrikalı-Amerikalı (67 hasta) ve beyaz ırk mensubu (44 hasta) kadınlar arasında, RASSF1A metilasyon seviyesi için fark bulunmuştur (sırasıyla, %76 ve %29, p<0,0001) (Mehrotra et al., 2004). Lee ve ark. tarafından 2007 yılında Koreli ve A.B.D.'li duktal meme kanserli hasta grubunda yapılan çalışmada, Koreli kadınlarla (n=67) Amerikalı beyaz ırk kadınlar (n=50) karşılaştırılmış ve RASSF1A geninin metilasyon seviyesi iki ırk arasında benzer görülmüş; fakat 50 yaş altı ER-/PR- hasta grubundaki Koreli kadınların RASSF1A metilasyon seviyesi, A.B.D.'li kadınlara göre daha yüksek bulunmuştur (Lee et al., 2007). Li ve ark. tarafından 2008 yılında Çinli kadınlarda yapılan 36 hastanın dahil edildiği çalışmada, meme kanserinde RASSF1A metilasyon oranı %61,1 olarak bulunmuştur, aynı hastalardan alınan normal dokuda, metilasyon tespit edilmemiştir (Li, Wei, Cao ve Cao, 2008). Rasti ve ark. tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada, RASSF1A geninin metilasyon seviyesi İranlı meme kanseri hastalarında (n=81)

değerlendirilmiş ve %51 oranında metilasyon görülmüştür (Rasti, Tavasoli, Monabati ve Entezam, 2009).

Literatürde, bizim çalışmamız dışında Türk popülasyonunda yapılmış çalışmalara da rastlanılmıştır. Buyru ve ark. tarafından 2009 yılında Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada, meme kanseri tanısı konulmuş hastalardan 77 tümör dokusu ve 77 normal kontrol dokusu çalışılmıştır. Bu çalışmada, tümör örneklerinde RASSF1A metilasyon oranı %48 olarak bulunmuştur. Buyru ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada hastaların %93'üne invaziv duktal karsinom tanısı konulmuş ve RASSF1 metilasyon oranı da %62-70 arasında bulunmuştur. Çalışmada yer alan olguların ER; PR; HER2, durumlarına ilişkin bilgi bulunmamakla birlikte kontrol grubunda metilasyona rastlanılmamıştır (Buyru vd., 2009), Cho ve ark. tarafından 2010 yılında Türk popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada, invaziv duktal karsinom tanısı konmuş 40 hasta dokusu kullanılmıştır. Bu çalışmada RASSF1A metilasyon oranı tümör dokularında %82,5 iken, bitişik dokularda %82,2 bulunmuştur. Çalışmada yer alan olguların ER; PR; HER2, durumlarına ilişkin bilgi bulunmamaktadır ve ayrıca bu çalışmada sadece tümör ve tümör yakınındaki dokuların metilasyon durumu değerlendirilmiş olup, kontrol dokusu kullanılmamıştır (Cho vd., 2010). Bizim çalışmamız üçlü negatif meme kanseri hastalarına odaklanmıştır ve bildiğimiz kadarıyla, Türk popülasyonunda, üçlü negatif meme kanserinde RASSF1A promotör bölge metilasyonunun çalışıldığı ilk çalışmadır.

De Groot ve ark. tarafından 2016 yılında Hollandalı kadınlarda yapılan çalışmaya 49 sağlıklı ve 52 meme kanserli kadın dahil edilmiştir. Bu çalışmada RASSF1A'nın da bulunduğu 4 gendeki hipermetilasyon verisinin normal ve kanserli meme dokusunun ayrımında kullanılabileceği ve RASSF1A'nın hipermetilasyonunun (%18), meme kanseri erken tanısında biyomarkır olarak değeri olabileceği gösterilmiştir (de Groot vd., 2016). Kloten ve ark. tarafından 2013 yılında Alman hastalarda yapılan çalışmaya 604 serum örneği dahil edilmiştir. Bu serum örnekleri farklı evrelerdeki meme kanseri hastalarından (n=250), kanser hastası olmayan sağlıklı kontrollerden (n=237), iyi huylu meme hastalığına sahip bireylerden (n=59) ve kolon kanseri hastalarından (n=58) elde edilmiştir. Bu çalışmada, ITIH5, DKK3, ve RASSF1A genlerinin metilasyon seviyesi belirlenmiş ve bu genlerin tümör spesifik

hipermetilasyonunun %67 sensitivite ve %69 spesifisite ile, serumdan meme kanserinin erken tanısı için biyomarkır olarak kullanabileceği gösterilmiştir ($p<0,0001$) (Kloten vd., 2013). Shan ve ark. tarafından 2016 yılında Çin popülasyonunda yapılan bir çalışmada 749 serum örneği (268 meme kanseri hastası, 236 benin meme hastalığı, 245 sağlıklı kontrol) kullanılarak, meme kanserinin erken tanısı için kullanılabilecek bir gen metilasyon paneli geliştirilmeye çalışılmış ve genlerin metilasyon seviyeleri ölçülmüştür. Bu çalışmada SFN, P16, hMLH1, HOXD13, PCDHGB7 ve RASSF1A genlerini içeren bir panel ile bu genlerin tümör spesifik hipermetilasyonunun, %80 sensitivite ve %72 spesifisite ile meme kanserinin erken tanısı için biyomarkır olarak kullanabileceği gösterilmiştir (Shan vd., 2016).

Müller ve ark. tarafından 2003 yılında Avusrturyalı meme kanseri hastalarında (n=86) yapılan çalışmada, serumda belirli genlerin metilasyon seviyesiyle prognoz arasındaki ilişki araştırılmıştır. Serumda metile RASSF1A bulunmasının, meme kanseri için kötü bir prognoz faktörü olduğu ve riski 5,7 kat artırdığı bulunmuştur ($p<0,001$) (Muller vd., 2003). Lewis ve ark. 2005 yılında A.B.D.'de yaptıkları çalışmaya, 27 meme kanserli kadın ve 55 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Belirli gen bölgelerindeki metilasyon seviyesi incelenmiştir. Meme kanseri dokularında RASSF1A metilasyonu görülme oranı %59 olarak görülmüştür. Sağlıklı kontrollerde yapılan klinik analizler sonucu (Gail, Claus, BRCAPRO, ve Bodian), sağlıklı kontroller meme kanseri için yüksek risk ve normal/düşük risk olarak iki gruba ayrılmıştır; RASSF1A metilasyonu yüksek riskli grupta %70 oranında görülürken (7/10), düşük riskli grupta %29 oranında (12/41) görülmüştür ($p=0,03$). Normal meme dokusunda artmış RASSF1A metilasyonunun artmış meme kanser riskiyle ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Lewis vd., 2005).

Antill ve ark. tarafından 2010 yılında Avustralya'da yapılan bir çalışmaya BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınlar (n=34) dahil edilmiştir. Memeden alınan duktal lavaj örneklerinde (n=168), belirli gen bölgelerindeki metilasyon seviyesi belirlenmiştir. BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarında, incelenen genlerdeki metilasyon oranı daha yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonuna sahip kadınlarda yapılan bu çalışmada, RASSF1A metilasyonuyla bir olguda meme kanseri

gelişimi arasında bir ilişki bulunmuştur (Antill vd., 2010). Euhus ve ark. tarafından 2008 yılında A.B.D.'de yapılan bir çalışmaya 65 meme kanseri hastası ve 95 sağlıklı kadın dahil edilmiştir. Sağlıklı kadınlar klinik analizlere (Gail, Claus, BRCAPRO) dayalı olarak meme kanseri için yüksek risk (n=25) ve düşük risk (n=70) olmak üzere iki gruba ayrılmış ve metilasyon seviyeleri belirlenmiştir. RASSF1A metilasyon oranı malign örneklerde %67 iken, benign örneklerde %19 olarak görülmüştür (Euhus vd., 2008).

Jiang ve ark. tarafından 2012 yılında yapılan 1795 hastayı kapsayan bir meta-analizde, RASSF1A promotor metilasyonu ile meme kanserinde hastalıksız sağkalım (DFS) ve sağkalım (OS) arasındaki ilişki incelenmiştir. RASSF1A promotor hipermetilasyonuyla, meme kanserinin daha yüksek tekrar riski ve daha kötü sağkalım arasında ilişkili bulunmuştur. Meme kanserinde RASSF1A metilasyon oranı %60,4 olarak görülmüştür (Jiang, Cui, Chen, Shen ve Ding, 2012). Geng ve Wu tarafından 2016 yılında yapılan 5727 hastayı içeren, 63 çalışmayı kapsayan bir meta-analizde, RASSF1A metilasyon durumu, RASSF1A metilasyonu ve meme kanseri riski arasındaki ilişki incelenmiştir. Meta-analizde, RASSF1A metilasyonun ER pozitif hastalarda (%75,96), ER negatif hastalardan (%60,48); PR pozitif hastalarda (%70,61) PR negatif hastalardan (%63,83) daha yüksek olduğu gösterilirken, RASSF1A promotör metilasyonunun HER2 durumu ile hiçbir ilişkisi bulunamamıştır. Bu çalışmada, RASSF1A'nın meme kanserinin en agresif ve dirençli formlarından biri olan üçlü negatif meme kanserinde yüksek oranda metillendiği bildirilmiştir. Metilasyon oranını belirlemek için kullanılan toplam 28 çalışmanın 25'inde, RASSFA1 promotörünün tümör içermeyen normal dokularda veya bitişik normal dokulardaki metilasyonunun, %0 ila %20 arasında değişip, ortalamanın %13,26 olduğu (%95 CI =%3,88 ila %22,64); buna karşılık, primer tümör doku örneklerindeki ortalama metilasyon oranının %69,56 olduğu tespit edilmiştir (%95 CI=%62,7 ila %76,42) (Geng ve Wu, 2016).

Literatürde, TNMK'de RASSF1A metilasyonunu değerlendiren çalışmalar incelendiğinde, genel olarak, TNMK'nin, diğer meme CA tiplerine göre, daha düşük metilasyon frekansı gösterdiği dikkati çekmektedir. Bizim çalışmamızda, sadece

TNMK'leri çalışılmış olmakla birlikte, %72,2'lik oranda oldukça yüksek metilasyon tespit edilmiştir.

Kozomara vd, tarafından yapılan; 61 TNMK ve 70 ER+PR+Her2- olgunun yer aldığı Sırp popülasyonunda yapılan bir çalışmada, sırasıyla RASSF1A metilasyonu, 50.8% ve 48.6% olarak bildirilmiştir (Kozomara, 2018). Bizim çalışmamızda sadece, TNMK ve kanser olmayan, meme kontrol dokusu yer aldığı için, meme kanseri tiplerindeki metilasyon farklılıklarını kıyaslama şansımız olmamakla birlikte; TNMK'de %72,2'lik yüksek frekansta metilasyon tespit etmemiz (p=0,020) açısından çalışmamız, Kozomara vd.'nin çalışmasıyla uyumludur.

Gil vd, Kore popülasyonunda, 15 TNMK, 30 diğer gruptaki meme kanseri olgularını içeren çalışmalarında, RASSF1A promotör metilasyonunu TNMK grubuda ortalama %14.4±11.9; diğer meme CA gruplarında ise 24.8±17.0 olarak belirlemişlerdir (p=0.042) (Gil vd., 2012). Volodko vd.'nin, Kanada'da 69 meme CA hastası ve 12 kanser olmayan kadına ait meme dokusunda yaptıkları RASSF1A metilasyon çalışmasında, ortalama RASSF1A metilasyon frekansları, Luminal A (Her2-)'da %33 ± %16; Luminal B (Her2+)'de %44 ± %,22; Her2/Neu overekprese tümörlerde %38 ± %17 bulunurken, TNMK'de %10 ± %9.5 olarak düşük oranda tespit edilmiştir (Volodko, 2016). Wang vd.'nin, 32 Afrikalı-Amerikan, 33 Avrupalı-Amerikan olmak üzere 65 olguda farklı tümör tipleri ve komşu kanseröz olmayan kontrol dokularını kullandıkları çalışmada, TNMK'de RASSF1A metilasyonunun, diğer tümör tiplerine göre azaldığını (p=0.02) bildirmişlerdir (Wang, 2012).

Gil vd., Volodko vd., Wang vd'nin, genel literatürle uyumlu olarak TNMK'de RASSF1A promotör metilasyonunu düşük buldukları çalışmalar; TNMK'de RASSF1A promotör metilasyonunu yüksek bulduğumuz çalışmamızla (p=0,020) uyum göstermemektedir (Gil vd., 2012; Volodko, 2016; Wang, 2012).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

RASSF1A geni promotör metilasyonunun, triple negatif meme kanserinde diğer meme kanseri tiplerine göre genellikle düşüş gösterdiği, farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda, TNMK'de, RASSF1A geninin metilasyon durumunun, Türk popülasyonunda belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda TNMK tümör dokularında RASSF1A metilasyon frekansı %72,2 olarak tespit edilmiş ve metilasyon frekansı kontrol dokularından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p=0,020); fakat histolojik derece, evre, lenf nodu tutulumu ve tümör çapı ile RASSF1A metilasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla Türk toplumunda triple negatif meme kanserinde RASSF1A metilasyonunun değerlendirildiği ilk çalışmadır. Türk popülasyonunda diğer populasyonlardan farklı olarak, bizim çalışmamızla ilk defa ortaya konulduğu üzere, TNMK'de RASSF1A geni promotör bölge metilasyonu, normal meme kontrol dokularından anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur. Farklı popülasyonlardaki metilasyon paternlerindeki değişimler, diyetle alınan faktörler (folat, B6 vitamini, B12 vitamini) de dahil olmak üzere çevresel faktörlere ve fonksiyonel SNP allel frekanslarına bağlı olarak değişebilmektedir, bu nedenle bir popülasyon için biomarker olabilecek bir metilasyon paterni, başka bir popülasyon için geçerli olmayabilmektedir. Meme kanserinin en agresif formu olan TNMK'inde, RASSF1A geni promotör bölge hipermetilasyonu, Türk Toplumu için bir biomarker olabilir. Bunun yanında, çalışmamıza, diğer meme kanseri alt tipleri dahil edilmemiş olmasına rağmen, Türk toplumunda TNMK'de yapılmış ilk ve tek çalışma olması açısından, değerli ve önemli bulgular ortaya konmuştur. Türk toplumunda, daha fazla olgu sayılı ve farklı meme kanseri alt tiplerinin RASSF1A promotör metilasyonunun değerlendirildiği çalışmaların yapılmasının, çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların doğrulanması ve TNMK'de RASSF1A promotör hipermetilasyonunun biomarker olabilirliğinin ortaya konması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Agathanggelou, A., Bieche, I., Ahmed-Choudhury, J., Nicke, B., Dammann, R., Baksh, S., vd. (2003). Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Cancer Res, 63*(17), 5344-5351.

Agathanggelou, A., Cooper, W. N., & Latif, F. (2005). Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res, 65*(9), 3497-3508. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4088

Agathanggelou, A., Honorio, S., Macartney, D. P., Martinez, A., Dallol, A., Rader, J., vd. (2001). Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene, 20* (12), 1509-1518. doi: 10.1038/sj.onc.1204175

Agrawal A, Murphy RF, Agrawal DK. (2007) DNA methylation in breast and colorectal cancers. Mod Pathol.; 20:711–721.

Akkaya, Y. Z., & Dinçer, P. (2013). Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal; 26*: 5-10. DOI:10.5472/MMJ.2012.02596

Antequera, F., & Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and Mouse, *Proc Natl Acad Sci USA; 90* (24):11995-9.

Antill, Y. C., Mitchell, G., Johnson, S. A., Devereux, L., Milner, A., Di Iulio, J., vd. (2010). Gene methylation in breast ductal fluid from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 19* (1), 265-274. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0359

Aslan, A. (2008). DNA Metilasyonu. *Doktora Semineri*, Fırat Üniversitesi, 25 s.

Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., vd. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers:a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol;24* (2):157-167.

Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Developmental cell, 19* (5), 698-711.

Berman, H., Zhang, J., Crawford, Y. G., Gauthier, M. L., Fordyce, C. A., McDermott, K. M., vd. (2005). Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells identify a subpopulation of cells involved in early carcinogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 70*, 317-327. doi: 10.1101/sqb.2005.70.051

Bertucci F., Finetti P., Cervera N., Charafe-Jauffret E., vd. (2006). Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res;66* (9):4634-44

Bora, G., & Yurter, E. H. (2007). Epigenetik ve tedavi yaklaşımları, *Hacettepe Tıp Dergisi, 3*8, 48-54.

Burbee, D. G., Forgacs, E., Zochbauer-Muller, S., Shivakumar, L., Fong, K., Gao, B., vd. (2001). Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst, 93*(9), 691-699.

Buyru, N., Altinisik, J., Ozdemir, F., Demokan, S., & Dalay, N. (2009). Methylation Profiles in Breast Cancer, *Cancer Investigation, 27*:3, 307-312, DOI: 10.1080/07357900802350814

Campan, M., Weisenberger, D., & Laird, P. (2006). *DNA methylation profiles of female steroid hormone-driven human malignancies DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer*; Springer, 310 p, 141-178.

Can, M. İ., & Aslan A. (2016). Epigenetik Mekanizmalar ve Bazı Güncel Çalışmalar. *Karaelmas Fen ve Müh. Derg. 6* (2):445-452. DOI: 10.7212/zkufbd.v6i2.376

Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature, 490* (7418), 61-70. doi: 10.1038/nature11412

Cancer, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002). Breast Cancer and Breastfeeding: Collaborative Reanalysis of İndividual Data from 47 Epidemiological Studies in 30 Countries, İncluding 50 302 Women with Breast Cancer and 96 973 Women without the Disease. *The Lancet, 360* (9328), 187-195.

Carey L. A., Cheang M. C. U., & Perou, C. M. (2014). *Chapter 29: Genomics, Prognosis, and Therapeutic Interventions,* in Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the Breast, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins,

Chiorean, R., Braicu, C., & Berindan-Neagoe, I. (2013). Another review on triple negative breast cancer. Are we on the right way towards the exit from the labyrinth? *Breast*;22 (6):1026-33.

Cho, Y. H., Yazıcı, H., Wu, H., Terry, M. B., Gonzalez, K., Qu, M., Dalay, N., & Santella, R. M. (2010). Aberrant Promoter Hypermethylation and Genomic Hypomethylation in Tumor, Adjacent Normal Tissues and Blood from Breast Cancer Patients. *Antıcancer Research 30*: 2489-2496.

Costa, F. F. (2010). Epigenomics in cancer management. *Cancer Manag Res, 2*, 255-265.

Crum, C. P., Lester, S. C., & Cotran, R. S. (2002). "The Female Genital System and Breast", (Editors)Cotran, R.S., Robbins, S.L., Kumar V.C., Pathologic basis of disease, Saunders, *Philadelphia pennsylvania 7*: 679-719.

Dammann R., Li C., Yoon J.H., Chin P.L., Bates S. and Pfeifer G.P. (2000) Epigenetic inactivation of 25, a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3, *Nature Genet* 315–319

Dammann, R., Yang, G., & Pfeifer, G. P. (2001). Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21. 3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Research, 61* (7), 3105-3109.

Das, P. M., & Singal, R., (2004). DNA methylation and cancer, *Journal of Clinical Oncology, 22*: 4632-4642.

de Groot, J. S., Moelans, C. B., Elias, S. G., Jo Fackler, M., van Domselaar, R., Suijkerbuijk, K. P., vd. (2016). DNA promoter hypermethylation in nipple fluid: a potential tool for early breast cancer detection. *Oncotarget, 7* (17), 24778-24791. doi: 10.18632/oncotarget.8352

Dominska, M., & Dykxhoorn, D. M. (2010). Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci, 123* (Pt 8), 1183-1189. doi: 10.1242/jcs.066399

Ducasse, M., & Brown, M., (2006). Epigenetic aberrations and cancer. *Molecular Cancer, 5;* 60

Dworkin, A .M., Huang, T. H., & Toland, A. E. (2009). Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment, *Semin Cancer Biol.,19*, 3, 165-71.

Ecevit, H., Motor, S., & İzmirli, M. (2013). Genden Tedaviye Yeni Yaklaşımlar: Kodlamayan Nükleik Asitler. Mustafa Kemal Üniv.*Tıp Derg.; 4*, (13) 27-36.

Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., & Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science, 300* (5618), 455-455.

Eliyatkın N., Yalçın E., Zengel B., Aktaş S., Vardar E., (2015). Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk. *J Breast Health; 11: 59-66. DOI: 10.5152/tjbh.2015.1669*

Esteller, M. (2003). *Cancer epigenetics: DNAmethylation and chromatın alterations ın human cancer,* New Trends In Cancer For The 21th Century, Edited by Llombart-Bosch and Felipo, Kluwer Academic/Plenum publishers p.39-49.

Euhus, D. M., Bu, D., Milchgrub, S., Xie, X. J., Bian, A., Leitch, A. M., & Lewis, C. M. (2008). DNA methylation in benign breast epithelium in relation to age and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 17*(5), 1051-1059. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2582

Fan, C., Oh, D. S., vd. (2006) Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med. 355*(6):560-9

Fang, F., Turcan, S., Rimner, A., Kaufman, A., Giri, D., Morris, L. G., vd. (2011). Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. *Sci Transl Med, 3*(75), 75ra25. doi: 10.1126/scitranslmed.3001875

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer, 127*(12), 2893-2917. doi: 10.1002/ijc.25516

Foukakis, T., Bergh, J., Hayes, D. F., & Vora, S. R. (2013). *Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer.* Dizon Ed UpToDate.

Fraga MF, Agrelo R, Esteller M. (2007) Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. Ann N Y Acad Sci.; 1100:60–74

Geng, H., & Wu, L. (2016). The application of RASSF1A promoter methylation as a biomarker in breast cancer: acomprehensive literature review. *Int J Clin Exp Med. 9*(5):7729-7742. ISSN:1940-5901/IJCEM0018586

Gerhauser, C. (2012). *Cancer Chemoprevention and Nutri-Epigenetics: State of the Art and Future Challenges,* Top Curr Chem 2012 [Epub ahead of print]

Giacinti L, Claudio PP, Lopez M, Giordano A. (2006) Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer. Oncologist.; 11:1–8.

Gil EY, Jo UH, Jeong H, Whang YM, Woo OH, Cho KR, Seo JH, Kim A, Lee ES, Koh I, Kim YH, Park KH. Promoter methylation of RASSF1A modulates the effect of the microtubule-targeting agent docetaxel in breast cancer. Int J Oncol. 2012 Aug;41(2):611-20.

Goel, A. (2010). DNA methylation-based fecal biomarkers for the noninvasive screening of GI cancers, *Future Oncol;6* (3):333-6.

Görür, A., & Tamer, L . (2011). MikroRNA'ların Terapötik Kullanımı. *Mersin Üniv. Sağlık Bilim Derg.; 4* (2) s. 1-7.

Gültekin, M., & Boztaş, G. (2014). *Türkiye Kanser İstatistikleri*. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 43.

Güngör, Ö. F., & Ünal (2015). Epigenetik ve genomik baskılanma. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.; 55* (2) 73-81.

Gürel, Ç., Nursal, F. A., & Yiğit, S. (2016). Epigenetik ve Kanser. *Turkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topic, 2*(1), 45-51

Güzelgül, F., & Aksoy, K. (2009). Kodlanmayan RNA'ların İşlevi ve Tıpda Kullanım Alanları. Arşiv. s. 141-155. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı*, Adana.

Han W, Jung EM, Cho J, Lee JW, Hwang KT, Yang SJ, Kang JJ, Bae JY, Jeon YK, Park IA, Nicolau M, Jeffrey SS, Noh DY (2008) DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 47:490–499

Hayes, C. N., & Chayama, K. (2016). MicroRNAs as Biomarkers for Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*, *17*(3), 280. doi: 10.3390/ijms17030280

Heneghan, H. M., Miller, N., Lowery, A. J., Sweeney, K. J., & Kerin, M. J. (2009). MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *J Oncol.2009*:950201

Herceg Z. (2007) Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. Mutagenesis.; 22:91–103.

Hoda, S. A., Brogi, E., Koerner, F., & Rosen, P. P. (2014). *Rosen's Breast Pathology*. 4th ed. China: Lippincott Williams & Wilkins.

Holz-Schietinger, C., & Reich N. O. (2010). The inherent processivity of the human de novo methyltransferase 3A (DNMT3A) is enhanced by DNMT3L, *J Biol Chem; 285* (38):29091-100.

Hossain, A., Kuo, M. T., & Saunders, G. F. (2006). Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol 26*: 8191–8201.

Howard Donninger, Michele D. Vos, Geoffrey J. Clark (2007) Journal of Cell Science; 120: 3163-3172; doi: 10.1242/jcs.010389

Howlader, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., vd. (2014). US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst. 106* (5)

Hu X, Stern HM, Ge L, O'Brien C, Haydu L, Honchell CD, Haverty PM, Peters BA, Wu TD, Amler LC, Chant J, Stokoe D, Lackner MR, Cavet G (2009) Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. Mol Cancer Res 7:511–522

İlvan, Ş. (2006). Meme Karsinomu Patolojisi. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. *Meme Kanseri Sempozyum Dizisi* No: 54; s. 65 -71.

Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., vd. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res, 65* (16), 7065-7070. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1783

Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature Genetics Supplement, 33:* 245-254.

Jiang, Y., Cui, L., Chen, W. D., Shen, S. H., & Ding, L. D. (2012). The prognostic role of RASSF1A promoter methylation in breast cancer: a meta-analysis of published data. *PLoS One, 7* (5), e36780. doi: 10.1371/journal.pone.0036780

Jones PA, Baylin SB. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet.; 3:415–428.

Jung, S. Y., Kim, H. Y., Nam, B. H., Min, S. Y., vd. (2010). Worse prognosis of metaplastic breast cancer patients than other patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat;120*(3):627-637.

Jurkowska, R. Z., Rajavelu, A., Anspach, N., Urbanke, C., Jankevicius, G., Ragozin, S., Nellen, W., Jeltsch, A. (2011). Oligomerization and binding of the Dnmt3a DNA methyltransferase to parallel DNA molecules: heterochromatic localization and role of Dnmt3L, *J Biol Chem; 286* (27):24200-7.

Kalaycı, G., Acarlı, K., & Demirkol, K. (2002). *Meme Anatomisi Ve Gelişmesi*. Genel cerrahi cilt 1. Türkiye, İstanbul. Nobel; 537-542.

Karagün, Ş. B., Antmen, B., Şaşmaz, İ., & Kılınç, Y. (2014). Mikro RNA ve Kanser.*Türk Klinik Biyokimya Derg; 12* (1): 45-56.

Klajic, J., Fleischer, T., Dejeux, E., Edvardsen, H., Warnberg, F., Bukholm, I., vd. (2013). Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. *BMC Cancer, 13,* 456. doi: 10.1186/1471-2407-13-456

Kloten, V., Becker, B., Winner, K., Schrauder, M. G., Fasching, P. A., Anzeneder, T., vd. (2013). Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Res, 15*(1), R4. doi: 10.1186/bcr3375

Knudson, A. G., (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer, *Nat Rev Cancer, 1,* (2) 157–62 p.

Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., ve ark., 2012 for the Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature, 490* (7418):61-70

Koçak S., Çelik, L., Özbaş S., Dizbay Sak, S., Tükün, A., & Yalçın, B. (2011). Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi Ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu. *The Journal of Breast Health; Vol: 7 • No: 2.*

Kopelovich L, Crowell JA, Fay JR. (2003) The epigenome as a target for cancer chemoprevention. J Natl Cancer Inst.; 95:1747–1757.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*; 128:693-705.

Kozomara Z, Supic G, Krivokuca A, Magic Z, Dzodic R, Milovanovic Z, Brankovic-Magic M. Promoter hypermethylation of p16, BRCA1 and RASSF1A genes in triple-negative breast cancer patients from Serbia. J BUON. 2018 May-Jun;23(3):684-691.

Krop IE, Sgroi D, Porter DA, Lunetta KL, LeVangie R, et al. (2001) HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA.; 98:9796–9801.

Kuroki T., Trapasso F., Yendamuri S., Matsuyama A., Alder H., Mori M. and Croce C.M. (2003) Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Res* 63, 3724–3728

Lakhani, S. R., Ellis, I. O., Schnitt, S. J., Tan, P. H., vd. (2012). *WHO Classification of Tumors of the Breast* 4 ed. Lyon: WHO Press.

Lee M.G., Kim H.Y., Byun D.S.,. Lee S.J., Lee C.H., Kim J.I., Chang S.G. and Chi S.G. (2001) Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma, *Cancer Res* 61, 6688–6692.

Lee, J. S., Fackler, M. J., Lee, J. H., Choi, C., Park, M. H., Yoon, J. H., vd. (2010). Basal-like breast cancer displays distinct patterns of promoter methylation. *Cancer Biol Ther, 9* (12), 1017-1024.

Lee, J. S., Lo, P. K., Fackler, M. J., Argani, P., Zhang, Z., Garrett-Meyer, E., & Sukumar, S. (2007). A comparative study of Korean with Caucasian breast cancer reveals frequency of methylation in multiple genes correlates with breast cancer in young, ER, PR-negative breast cancer in Korean women. *Cancer Biol Ther, 6* (7), 1114-1120.

Lehmann U, Langer F, Feist H, Glockner S, Hasemeier B, et al. (2002) Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. Am J Pathol.; 160:605–612.

Lehmann-Che, J., Hamy, A. S., Porcher, R., Barritault, M., vd. (2013). Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res;15* (3):R37.

Lerman M.I and Minna J.D. (2000) for The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumour Suppressor Gene Consortium, The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: Identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes, *Cancer Res* 60, 6116–6133.

Levenson, A. S., & Jordan, V. C., (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line, *Cancer research, 57* (15), 3071-3078.

Lewis, C. M., Cler, L. R., Bu, D.-W., Zöchbauer-Müller, S., Milchgrub, S., Naftalis, E. Z., & Euhus, D. M. (2005). Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. *Clinical cancer research, 11* (1), 166-172.

Li, Y., & Tollefsbol, T. O. (2010). Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components, *Curr Med Chem 17* (20):2141-51.

Li, Y., Wei, Q., Cao, F., & Cao, X. (2008). Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancers in Chinese women. *Oncol Rep, 19* (5), 1149-1153.

Lüleyap, H. Ü. (2008). *Moleküler Genetiğin Esasları*, Nobel Kitabevi, 306-307 s .

Lusher M.E., Lindsey J.C., Latif F., Pearson A.D.J., Ellison D.W. and Clifford S.C. (2002) Biallelic epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in medulloblastoma development, *Cancer Res* 62, 5906–5911.

Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. Clinical Medicine Insights: *Pathology: 8* 23–31 doi: 10.4137/CPath.S31563

Markl, I. D., Cheng J., Liang, G., Shibata, D., Laird, P. W., Jones, P. A. (2001). Global and gene-specific epigenetic patterns in human bladder cancer genomes are relatively stable in vivo and in vitro over time , *Cancer Res, 61*, 15, 5875-5884

Martín-Subero, J. I. (2011). How epigenomics brings phenotype into being, *Pediatr Endocrinol Rev 9* Suppl 1:506-10.

Mason S, Piper M, Gronostajski RM, Richards LJ (2009) Nuclear factor one transcription factors in CNS development. Mol Neurobiol 39:10–23

McKinley, A., Russell, S., Spence, R., Odling-Smee, W., & Nevin, N. (1995). Hereditary breast cancer and linkage analysis to BRCA1. *British journal of surgery, 82* (8), 1086-1088.

Mehrotra, J., Ganpat, M. M., Kanaan, Y., Fackler, M. J., McVeigh, M., Lahti-Domenici, J., vd. (2004). Estrogen receptor/progesterone receptor-negative breast cancers of young African-American women have a higher frequency of methylation of multiple genes than those of Caucasian women. *Clin Cancer Res, 10* (6), 2052-2057.

Melchor, L., & Benitez, J. (2013). The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet, 132*(8), 845-863. doi:10.1007/s00439-013-1299-y

Metzger-Filho, O., Sun, Z., Viale, G., vd. (2013). *Patterns of recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: results from internationa*

Michailidou, K., Hall, P., Gonzalez-Neira, A., Ghoussaini, M., Dennis, J., Milne, R. L., vd. (2013). Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet, 45* (4), 353-361, 361e351-352. doi: 10.1038/ng.2563

Miller, T. E., Ghoshal, K., Ramaswamy, B., Roy, S., Datta, J., Shapiro, C. L., Jacob, S., & Majumder, S. (2008). MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem; 283*:29897–29903.

Mirza, S., Sharma, G., Prasad, C. P., Parshad, R., Srivastava, A., Gupta, S. D., & Ralhan, R. (2007). Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERα and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life sciences, 81*(4), 280-287

Morin, V., Diaz, F., Montecino, M., Fothergill-Gilmore, L., Puchi, M. & Imschenetzky, M. (1999). Poly(ADP-ribosylation) protects maternally derived histones from proteolysis after fertilization. *Bochem. J., 343*; 95- 98

Müller, H. M., Widschwendter, A., Fiegl, H., Ivarsson, L., Goebel, G., Perkmann, E., & Widschwendter, M. (2003). DNA methylation in serum of breast cancer patients an independent prognostic marker. *Cancer Res, 63* (22), 7641-7645.

Natalia Volodko, Mohamed Salla, Alaa Zare, El-Arbi Abulghasem, Krista Vincent, Matthew G.K. Benesch, Todd P.W. McMullen, Oliver F. Bathe, Lynne Postovit, and Shairaz Baksh. RASSF1A Site-Specific Methylation Hotspots in Cancer and Correlation with RASSF1C and MOAP-1. Cancers (Basel). 2016 Jun; 8(6): 55.

Nestler, E. J. (2014). Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology, 76*: 259- 268.

Nguyen, C., Liang, G., Nguyen, T. T., Tsao-Wei, D., Groshen, S., Lubbert, M., Zhou, J. H., Benedict, W. F., & Jones, P. A. (2001). Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells, J Natl Cancer Inst; 93(19):1465-72.

Nussbaum, R. L., McInnes, R. R.,Willard, H. F, & Boerkoel, III. F. C. (2005). *Tıbbi Genetik,* 6 th ed. Güneş Kitabevi, 314-323 s .

Oakman, C., Moretti, E., Pacini, G., Santarpia, L., vd. (2011). Triple negative breast cancer: a heterogeneous subgroup defined by what it is not. *European J Cancer; 3*:S370-2.

O'Day, E., & Lal, A. (2010). MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res.;12* (2):201.

Osborne, C., Wilson, P., & Tripathy, D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist, 9* (4), 361-377.

Pakneshan, P., Szyf, M., & Rabbani, S. A. (2005). Hypomethylation of urokinase (uPA) promoter in breast and prostate cancer: prognostic and therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets, 5*(7), 471-488.

Pan Z.G., Kashuba V.I., Liu X.Q., Shao J.Y., Zhang R.H., Jiang J.H., Guo C., Zabarovsky E., Ernberg I and Zeng Y.X. (2005) High Frequency Somatic Mutations in RASSF1A in Nasopharyngeal Carcinoma, *Cancer Biol Ther* 4, 1116–1122.

Park, S. Y., Kwon, H. J., Choi, Y., Lee, H. E., Kim, S. W., Kim, J. H., vd. (2012). Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes. *Mod Pathol, 25*(2), 185-196. doi: 10.1038/modpathol.2011.160

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer. 94*: 153-156.

Pfeifer, G., Dammann, R. (2005). Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Moscow), 70* (5), 576-583.

Phipps, A. I., & Li, C. I. (2010). *Breast cancer biology and clinical characteristics Breast Cancer Epidemiology* (pp. 21-46): Springer.

Plumb, J. A., Strathdee, G., Sludden, J., Kaye, S. B, & Brown, R. (2000). Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2′-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter, *Cancer Res, 60*, 21, 6039-6044.

Ponder, B. (1994). Searches begin and end. Nature: International weekly. *Journal of science, 371* (6495), 279.

Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease, *Nat Biotechnol; 28*(10):1057-68.

Rabizadeh S, Xavier RJ, Ishiguro K, et al.(2004) The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. J Biol Chem; 279: 29247–54.

Rasti, M., Tavasoli, P., Monabati, A., & Entezam, M. (2009). Association between HIC1 and RASSF1A promoter hypermethylation with MTHFD1 G1958A polymorphism and clinicopathological features of breast cancer in Iranian patients. *Iran Biomed J, 13* (4), 199-206.

Rodriguez-Pinilla, S. M., Rodriguez-Gil, Y., Moreno-Bueno, G., Sarrió, D., vd. (2007). Sporadic invasive breast carcinomas with medullary features display a basal-like phenotype: an immunohistochemical and gene amplification study. *Am J Surg Pathol;31* (4):501-508.

Rosen, P. P. (2001). *Rosen's Breast Pathology*, Chapter 1, 12, 14, 34, Lippincott Williams and Wilkins;1-22, 253-256, 325-364, 627-652.

Sakoda, L. C., Jorgenson, E., & Witte, J. S. (2013). Turning of COGS moves forward findings for hormonally mediated cancers. *Nat Genet, 45* (4), 345-348. doi: 10.1038/ng.2587

Santos-Rosa, H., & Caldas, C., (2005). "Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer", *European Journal of Cancer*, *41*: 2381- 2402 (2005).

Saydam, F., Demirci, İ., & Güneş, V. H. (2011). MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Derg Dicle Med J 38,* (1): 113-120.

Sayın, D. B., (2008), Metilasyon ve Kanser. Turkiye Klinikleri *J Med Sci, 28,* 513-524

Semerci Sevimli, T., Sevimli, M., & Özçelik, N. (2013). Meme Kanserinde Protein Ekspresyon Değişimleri Ve Önemi. *Dicle Tıp Dergisi; 40* (1): 161-168 doi: 10.5798/diclemedj.0921.2013.01.0249

Shan, M., Yin, H., Li, J., Li, X., Wang, D., Su, Y., vd. (2016). Detection of aberrant methylation of a six-gene panel in serum DNA for diagnosis of breast cancer. *Oncotarget, 7* (14), 18485-18494. doi: 10.18632/oncotarget.7608

Shenouda, S. K., & Alahari, S. K. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev. 28*: 369-378.

Song, M. S., Song, S.J, Ayad, N.G, vd., (2004). The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* ; 6: 129–37

Songping Wang, Tiffany H. Dorsey, Atsushi Terunuma, Rick A. Kittles, Stefan Ambs, and Bernard Kwabi-Addo (2012). Relationship between Tumor DNA Methylation Status and Patient Characteristics in African-American and European-American Women with Breast Cancer. *PLoS One.* 2012; 7(5): e37928.

Sporikova Z., Koudelakova V., Trojanec R., & Hajduch M. (2018) Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. Clinical Breast Cancer, Vol. 18, No. 5, e841-50 ª 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Spratt, J. S., & Tabin, G. R. (1995). Gross anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS, eds. (1995). *Cancer of the breast*. 4th edition. WB. Saunders; 22-42.

Stegh, A. H. (2012). Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils. *Expert Opin Ther Targets, 16* (1), 67-83. doi: 10.1517/14728222.2011.643299

Stevens K.N., Vachon C.M., & Couch F.J. (2013) Genetic Susceptibility to Triple Negative Breast Cancer. Cancer Res. April 1; 73(7): 2025–2030. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1699.

Szyf, M., Pakneshan, P., & Rabbani, S. A. (2004) DNA methylation and breast cancer. Biochem Pharmacol. ; 68:1187–1197

Tavassoli, F. A., & Devilee, P., (Ed). (2003). *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press.

Thike, A. A., Cheok, P. Y., Jara-Lazaro, A. R., Tan, B., vd. (2010). Triple-negative breast cancer:clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod Pathol; 23* (1):123-133.

Topuz E., Aydıner A., & Dinçer M. (2003). *Meme Kanseri*. Nobel tıp kitapevi, İstanbul.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians, 65* (2), 87-108.

Ünal, H., (2006). "Meme Kanserinin Tanı ve Tedavisinin Tarihsel Gelişimi", İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Meme Kanseri Sempozyumu Dizisi*, (54):9-13

URL-1 https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik 25.05.2018 tarihinde elde edilmiştir.

URL-2 http://www.cancernews.com.au/breast-cancer/ 30.03.2017 tarihinde elde edilmiştir.

URL-3 https://www.kansanmedtrip.com/breast-cancer.php 15.02.2018 tarihinde elde edilmiştir.

URL-4 http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging 30.05.2017 tarihinde elde edilmiştir.

URL-5 https://mcmanuslab.ucsf.edu/node/268 23.11.2017 tarihinde elde edilmiştir.

URL-6 http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/DNAMethylationID20127.html 03.05.2018 tarihinde elde edilmiştir.

URL-7 http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG0 0000068028;r=3:50329788-50340912;t=ENST00000359365 24.04.2018 tarihinde elde edilmiştir.

Van der Auwera, I., Elst, H. J., Van Laere, S. J., Maes, H., Huget, P., & van Dam, P., vd. (2009). The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients. *Br J Cancer, 100* (8), 1277-1286. doi: 10.1038/sj.bjc.6605013

Van der Weyden, L., & Adams, D. J. (2007) The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochim Biophys Acta*.; 1776:58–85.

Voduc, K. D., Cheang, M. C., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T. O., & Kennecke, H. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse, *J Clin Oncol. 28* (10):1684-91.

Wang, S., Dorsey, T. H., Terunuma, A., Kittles, R. A., Ambs, S., & Kwabi-Addo, B. (2012). Relationship between tumor DNA methylation status and patient characteristics in African-American and European-American women with breast cancer. *PLoS One, 7* (5), e37928. doi: 10.1371/journal.pone.0037928

Widschwendter, M., & Jones, P. A., (2002). DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene, 21*, 35, 5462-82 p.

Wong, I. H., (2001). Methylation profiling of human cancers in blood: molecular monitoring and prognostication (review), *Int J Oncol, 19*, 6, 1319-24.

Yan, P. S., Perry, M. R., Laux, D. E., Asare, A. L., Caldwell, C. W., & Huang, T. H. (2000). CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer. *Clin Cancer Res, 6* (4), 1432-1438.

Yanagawa, M., Ikemot, K., Kawauchi, S., Furuya, T., Yamamoto, S., Oka, M., Sasaki, K., (2012) Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Research Notes, 5* (1), 376.

Yao, H., He, G., Yan, S., Chen, C., Song, L., Rosol, T. J., & Deng, X. (2017). Triplenegative breast cancer: is there a treatment on the horizon? *Oncotarget, 8* (1), 1913.

Yaykaşlı, O. K., Hatipoğlu, F. Ö., Kaya, E., & Yaykaşlı, E. (2012). Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser. *Düzce tıp dergisi, 14* (3), 58-68

Yazici, H., Terry, M. B., Cho, Y. H., Senie, R. T., Liao, Y., Andrulis, I., & Santella, R. M. (2009). Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 18* (10), 2723-2725. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-1237

Yoo, C. B., & Jones, P. A. (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.; 5*:37–50.

Yu, Z., Baserga, R., Chen, L., Wang, C., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2010). microRNA, cell cycle, and human breast cancer. *Am J Pathol.;176* (3):1058-64.

Yu, Z., Wang, C., Wang, M., Li, Z., Casimiro, M. C., Liu, M., Wu, K., Whittle, J., Ju, X., Hyslop, T., McCue, P., & Pestell R. G. A. (2008) cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol;182* :509–517.

Zhang, N., Zhang, H., Chen, T., & Yang, Q. (2017). Dose invasive apocrine adenocarcinoma has worse prognosis than invasive ductal carcinoma of breast: evidence from SEER database. *Oncotarget;8* (15):24579–592.

Zhang, Z. J., & Ma, S. L. (2012). miRNAs in breast cancer tumorigenesis (Review). *Oncol Rep, 27* (4), 903-910. doi: 10.3892/or.2011.1611

Zhu, Q., & Wani, A. A. (2010). Histone modifications: crucial elements for damage response and chromatin restoration. *J Cell Physiol*; *223*: 283–8.

Zhu, W., Qin, W., Hewett, J. E., & Sauter, E. R. (2010). Quantitative evaluation of DNA hypermethylation in malignant and benign breast tissue and fluids. *Int J Cancer, 126* (2), 474-482. doi: 10.1002/ijc.24728

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Sevilay TOKMAKOĞLU
Doğum Yeri ve Yılı : Yenice /1993
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : sevilaykoymali@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Vakıfbank Zübeyde Hanım Anadolu Lisesi
Lisans : Kastamonu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı (Halen Devam Etmekte)

Mesleki Deneyim

İş Yeri : Kastamonu Halk Sağlığı Laboratuvarı/Staj Eğitimi
İş Yeri : Daday Çok Programlı Anadolu Lisesi/ Öğretmen

Yayınları

Gürelli, G., Alay, M., & Koymali, S. (2014). Kastamonu civarında dağılış gösteren *Helix lucorum* Linnaeus, 1758 (Mollusca: Pulmonata)'da Dicrocoeliid (Trematoda: Digenea) larval safhalarının yaygınlığı. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*; Istanbul Vol. 38, Iss. 1,: 37-40. DOI:10.5152/tpd.2014.3346

Yeni Kılavuzlar Eşliğinde Temel ve İleri Kardiyak Yaşam Desteği Sempozyumu, 17 Mart 2016, Kastamonu.

3. Aerobiyoloji, Palinoloji ve Alerjik Hastalıklarda Son Yenilikler Sempozyumu, 5-7 Kasım 2016, Kastamonu.