T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NEOADJUVAN KEMOTERAPİ ALAN MEME KANSERİ HASTALARINDA TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI DNA METİLASYON SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI

HALİME YILDIRIM

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ENDER M. ÇOŞKUNPINAR

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
EYLÜL/2025

İTHAF

“Varlıklarıyla her zaman güç veren, bu yolculuğun sessiz mimarları YILDIRIM ailesine, derin bir minnetle…”

TEŞEKKÜR

Lisansüstü dönemim boyunca her aşamada desteğini eksik etmeyen, bilgi ve tecrübeleriyle kendime örnek aldığım tez danışmanım Tıbbi Biyoloji ABD başkanı sayın Prof. Dr. Ender M. ÇOŞKUNPINAR'a

Lisansüstü dönemim boyunca her türlü desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ülkan ÇELİK'e

Gönüllülere ait örneklerin ve klinik verilerin toplanması ve değerlendirilmesine katkı sağlayan İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa TÜKENMEZ'e,

Hasta verileri ve numunelerin toplanması aşamalarında yardımlarını hiç eksik etmeyen İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi veri girişi sorumlusu sayın Fatma SEZEN'e

Kan örneklerinin toplanmasının yanı sıra, hayatımın her adımında yanımda olan, zekâsı ve başarılarına imrendiğim İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Aile Hekimliği ABD'dan Dr. Hatice YILDIRIM'a

Çalışmamın deneysel aşamalarına çeşitli katkılar sağlayarak tezimi tamamlamama yardımcı olan İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden doktor adayı sayın Uzm. Biy. Filiz EMİR'e ve tezimin biyoinformatik analizlerinin gerçekleştirilmesinde büyük bir özveriyle katkı sağlayan Wayne State Üniversitesi, Cell, Development and Neurobiology ABD'dan sayın Dr. Deniz SİFOĞLU'na,

Başta Dr. Hava YILDIRIM, Dr. Öğr. Üyesi Fatma Emre TURAN TAŞOLAR, Dr. Kübra GÜNDÜZ, M. Sc. Gizem ALTAY ve B. Sc. Yağmur GÜZEL olmak üzere her zaman yardımıma koşan Tıbbi Biyoloji ABD'dan sevgili çalışma arkadaşlarım ve öğretim üyelerine,

Gösterdikleri incelikli destek ve sarsılmaz inanç için YILDIRIM ailesine saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora sürecimde "YÖK 100/2000 Doktora Bursu" ve "TÜBİTAK BİDEB 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı" kapsamında verdikleri desteklerden dolayı YÖK ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Bu çalışma, TÜBİTAK 1002-B Acil Destek Modülünün **"125S228"** proje numaralı ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin **"2024/098"** proje numaralı araştırma fonlarıyla desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. KANSER VE OLUŞUM MEKANİZMASI 4
2.2. MEME KANSERİ 5
2.2.1. Epidemiyoloji 7
2.2.2. Evreleme Sistemi 7
2.2.2.1. Histolojik sınıflandırma: 8
2.2.2.2. Moleküler sınıflandırma: 8
2.2.2.3. TNM sınıflandırması: 11
2.2.3. Risk Faktörleri 12
2.2.3.1. Cinsiyet: 12
2.2.3.2. Aile öyküsü: 12
2.2.3.3. Yaş: 12
2.2.3.4. Genetik faktörler: 12
2.2.3.5. Reprodüktif ve hormonal risk faktörleri: 13
2.2.3.6. Sigara ve alkol kullanımı: 13
2.2.3.7. Diğer risk faktörleri: 13
2.2.3.8. Meme kanserini önleyici müdahaleler: 14
2.2.4. Meme Kanserinde Tanı ve Tedavi Seçenekleri 14
2.2.4.1. Tanı: 15
2.2.4.2. Tedavi: 15
2.2.5. Meme Kanserinin Moleküler Altyapısı ve Biyobelirteçler 18
2.3. EPİGENETİK MEKANİZMALAR 23
2.3.1. Histon Modifikasyonu 25
2.3.2. Kodlama Yapmayan RNA'lar 26
2.3.4. DNA Metilasyonu 28
2.3.4.1. Metilasyon ve Kanser: 30

2.3.4.2. DNA Metilasyonunun Meme Kanseri ile İlişkisi: 31
2.3.4.3. Metilasyon Tespitinde Kullanılan Yöntemler: 32
3. GEREÇ VE YÖNTEM 35
3.1. GEREÇ 35
3.1.1. Araştırmaya Katılan Gönüllülerin Seçimi 35
3.1.1.1. Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri: 35
3.1.1.2. Sağlıklı Bireylerin Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri: 36
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri 36
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler 37
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 37
3.1.5. Çözeltilerin Hazırlanması 39
3.1.5.1. 50X TAE (TRİS-ASETİK ASİT-EDTA) çözeltisinin hazırlanması: 39
3.1.5.2. %3,5 Hidrojen Peroksit (H_2O_2) hazırlanması: 39
3.1.5.3. %70'lik Etil Alkolün (EtOH) hazırlanması: 39
3.2. YÖNTEM 39
3.2.1. İmmün Histokimyasal Analiz ve Patolojik Değerlendirme 39
3.2.2. Hastalara Uygulanan Terapi Rejimleri 40
3.2.3. Ex-vivo İşlemler 40
3.2.4. Genomik DNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Analiz 41
3.2.4.1. Genomik DNA izolasyonu ile DNA örneklerinin eldesi: 41
3.2.4.2. Spektrofotometrik ölçüm ile DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık analizi: 41
3.2.5. Genomik DNA'nın Bisülfit Dönüşümü 41
3.2.5.1. Bisülfit Dönüşümü: 42
3.2.5.2. Bisülfit Dönüşümünden Sonra DNA Saflaştırması: 42
3.2.6. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Metilasyon-Spesifik PCR 43
3.2.7. Konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplikonların Eldesi 45
3.2.8. Sanger Dizileme Metodu Kullanılarak İlgi Gen Bölgelerinin Analizi 46
3.2.8.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması: 47
3.2.8.2. Sekans PCR Aşaması: 47
3.2.8.3. Clean up Aşaması ve kapiler elektoroforez ile sekans işleminin gerçekleştirilmesi: 48
3.2.9. İstatistik Analizler 49
3.2.10. Biyoinformatik Analizler 49
4. BULGULAR 51
4.1. GÖNÜLLÜLERİN KLİNİK KARAKTERİSTİĞİ VE DEĞERLENDİRMELERİ 51
4.2. METİLASYON SPESİFİK PCR ANALİZ SONUÇLARI 54
4.3. SANGER DİZİLEME ANALİZİ İLE VARYANTLARIN BELİRLENMESİ 66

4.4. BİYOİNFORMATİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI 72
4.4.1. Metilasyon Seviyeleri İncelenen Genlerin Diğer Genlerle Bağlantısı 72
4.4.2. Metilasyon Seviyeleri İncelenen Genlerin İlişkili Olduğu Yolaklar 73
5. TARTIŞMA 76
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 87
KAYNAKLAR 88
EKLER 102

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1: Meme kanseri moleküler alt tipleri.....9

Tablo 2. 2: Moleküler alt tiplerine göre meme kanseri tümörü ile ilişkili biyobelirteçler..18

Tablo 3. 1: Projede kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri listesi.....36

Tablo 3. 2: Projede kullanılan kitler 37

Tablo 3. 3: Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.....38

Tablo 3. 4: Bisülfit dönüşüm reaksiyon protokolü 42

Tablo 3. 5: Bisülfit dönüşüm reaksiyonu termal döngü kondüsyonu 42

Tablo 3. 6: MSP analizinde kullanılan primerlere ait bilgiler 44

Tablo 3. 7: HRM analizinde kullanılan PCR protokolü 44

Tablo 3. 8: Real-time amplifikasyonu aşamaları 45

Tablo 3. 9: Amplikonların eldesinde kullanılan primerlere ait bilgiler 45

Tablo 3. 10: Konvansiyonel PCR bileşenleri ve miktarı 46

Tablo 3. 11: Konvansiyonel PCR reaksiyonu koşulları.....46

Tablo 3. 12: ADS Sequencing Exo-Alp ile PCR ürünlerinin saflaştırılması için kullanılan bileşenler.....47

Tablo 3. 13: ADS Sequencing Exo-Alp ile PCR ürünlerinin saflaştırılmasında uygulanan sıcaklıklar ve süreler 47

Tablo 3. 14: Tek yön primer ile sekans PCR'ı için kullanılan bileşenler ve miktarları 48

Tablo 3. 15: Tek yön primer ile sekans PCR'ı için uygulanan PCR için protokol.....48

Tablo 4. 1: Hasta ve kontrol grubunun demografik verileri. 51

Tablo 4. 2: Biyokimyasal veriler. 52

Tablo 4. 3: Hastaların klinik verileri.....53

Tablo 4. 4: KDM5C gen bölgesinde tespit edilen varyantlar. 71

Tablo 4. 5: Metilasyonu incelenen genlerin ilişkili olduğu yolaklar. 74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1: Kanser hücrelerinin oluşumu ve kanserleşme süreci. 5

Şekil 2. 2: Meme anatomisi ve malignant tümör oluşumu. 6

Şekil 2. 3: Meme kanserinin histopatolojik olarak sınıflandırılması 8

Şekil 2. 4: Meme kanseri genlerinin interaksiyon ve yolak ilişkilisini gösteren diyagram. 21

Şekil 2. 5: DNA metilasyonu ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi. 29

Şekil 3. 1: Sanger dizileme yöntemi ile sekans verilerinin eldesi. 47

Şekil 4. 1: Gene Scaning analizi, Melting Curves görüntüsü. 55

Şekil 4. 2: Gene Scaning analizi, Normalized Melting Curves görüntüsü. 55

Şekil 4. 3: Gene Scaning analizi, Difference Plot Melting Curves görüntüsü. 56

Şekil 4. 4: Gene Scaning analizi, Difference Plot Normalized Melting Curves görüntüsü. 56

Şekil 4. 5: KDM5A, KDM5B, KDM5C ve TFAP2C gen bölgelerinin metilasyon seviyeleri. 57

Şekil 4. 6: ZMYND8, EZH2, SIN3B (Ekzon 1-2) ve SIN3B (Ekzon 19-20) gen bölgelerinin metilasyon seviyeleri. 57

Şekil 4. 7: Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastaların KDM5A, KDM5B, KDM5C ve TFAP2C gen bölgelerinin metilasyon seviyeleri. 58

Şekil 4. 8: Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastaların ZMYND8, EZH2, SIN3B (Ekzon 1-2) ve SIN3B (Ekzon 19-20) gen bölgelerinin metilasyon seviyeleri. 59

Şekil 4. 9: Hasta 5 için tedavi öncesi ve sonrasında SIN3B (Ekzon 19-20) genindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 60

Şekil 4. 10: Hasta 6 için tedavi öncesi ve sonrasında SIN3B (Ekzon 19-20) genindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 60

Şekil 4. 11: Hasta 9 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5C genindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 61

Şekil 4. 12: Hasta 17 için tedavi öncesi ve sonrasında EZH2 genindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 61

Şekil 4. 13: Hasta 19 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5C ve TFAP2C genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 62

Şekil 4. 14: Hasta 2 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5A ve EZH2 genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 63

Şekil 4. 15: Hasta 8 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5C genindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 63

Şekil 4. 16: Hasta 12 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5B ve KDM5C genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 64

Şekil 4. 17: Hasta 13 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5B ve KDM5C genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 64

Şekil 4. 18: Hasta 14 için tedavi öncesi ve sonrasında TFAP2C genindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 65

Şekil 4. 19: Hasta 18 için tedavi öncesi ve sonrasında TFAP2C genindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 65

Şekil 4. 20: Hasta 20 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5C ve SIN3B (Ekzon 19-20) genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri. 66

Şekil 4. 21: KDM5A, KDM5B ve KDM5C gen bölgelerinin PCR görüntüleri. 67

Şekil 4. 22: Jalview programı ile KDM5A gen bölgesinin referans genoma göre hizalama sonuçları. 68

Şekil 4. 23: Jalview programı ile KDM5B gen bölgesinin referans genoma göre hizalama sonuçları. 69

Şekil 4. 24: Jalview programı ile KDM5C gen bölgesinin referans genoma göre hizalama sonuçları. 70

Şekil 4. 25: KDM5C rs41308616 bölgesine ait sanger dizisi görüntüsü. 71

Şekil 4. 26: KDM5C rs971896841 bölgesine ait sanger dizisi görüntüsü. 72

Şekil 4. 27: GeneMANIA programı kullanılarak metilasyonu incelenen genlerin diğer genler ile bağlantısının incelenmesi. 73

SİMGELER VE KISALTMALAR

5caC : 5-karboksilsitozin

5fC : 5-formilsitozin

5hmC : 5-hidroksimetilsitozin

5hmU : 5-hidroksiurasil

5mC : 5-metilsitozin

ABC : ATP bağlayıcı kaset

AC : Doksorubisin (Adriamisin) + Siklofosfamid

ASCO : Amerikan Klinik Onkoloji Derneği

BCRP : Meme kanseri direnç proteini

bç : Baz çifti

BER : Baz eksizyon tamiri

BRCA1 : Breast cancer susceptibility gene 1

BRCA2 : Breast cancer susceptibility gene 2

BS : Bisülfit

BT : Bilgisayarlı tomografi

circRNA : Sirküler RNA

CpG : CG dinükleotidleri

ctDNA : Dolaşımdaki tümör DNA'ları

CYP : Sitokrom P450

DNAm : DNA metilasyonu

DNMT : DNA metiltansferaz

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

EMT : Epiteliyal-mezenkimal transisyon

ER : Östrojen reseptörü

ERBB2 : Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

EtOH : Etil Alkol

FDA : ABD Gıda ve İlaç Dairesi

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

ICI : İmmün kontrol noktası inhibitörü

KDM5 : Lizin Demetilaz 5

LBC : Luminal meme kanseri

lncRNA : Uzun kodlama yapmayan RNA

miRNA : MikroRNA

MRD : Çoklu ilaç direnci

MRI : Manyetik rezonans görüntüleme

MSP : Metilasyon-spesifik PCR

NAK : Neoadjuvan kemoterapi

pCR : Patolojik tam yanıt

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

PR : Progesteron reseptörü

RRBS : Azaltılmış temsil bisülfit dizileme

SAM : S-adenozil-L-metiyonin

TAE : Tris-Asetik asit-EDTA

TBG : Tümör baskılayıcı gen

TET : On-on bir translokasyon

TGD : Timin-DNA glikozilaz

TNBC : Triple-negatif meme kanseri

tsRNA : tRNA türevi küçük RNA

WGBS : Tüm genom bisülfit dizileme

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

NEOADJUVAN KEMOTERAPİ ALAN MEME KANSERİ HASTALARINDA TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASI DNA METİLASYON SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Çeşitli kanser türlerinde neoadjuvan tedavi cerrahi başarıyı arttırma açısından büyük öneme sahiptir. Özellikle lokal ileri evre meme kanseri hastalarında meme korunumunun sağlanmasında etkili olduğu bilinmektedir. Kemoterapötik ajanların etkinliğini değiştiren genler, metilasyon yoluyla ekspresyon düzenlemesine uğrar. Neoadjuvan ajanların etkisini modifiye eden gen promotörlerinde artan metilasyon, gen ifadesini baskılayarak tedaviye yanıtı değiştirebilir. Çalışmamızda tedavi öncesi ve sonrası hastalarda KDM5 gen ailesi ve ilişkili genlerin metilasyon seviyelerini araştırmayı, bununla birlikte KDM5A, KDM5B ve KDM5C gen bölgelerindeki olası varyasyonları incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya meme kanseri tanısı almış 20 hasta ve 30 sağlıklı birey dahil edildi. Hastalardan neoadjuvan kemoterapi (NAK) öncesi ve sonrası olmak üzere iki defa kan örneği alındı. Elde edilen DNA'larla Metilasyon-spesifik PCR (MSP) ile KDM5A, KDM5B, KDM5C, EZH2, TFAP2C, ZMYND8 ve SIN3B (Ekzon 19-20 ve 1-2) gen bölgelerinin metilasyon seviyesi, sanger dizileme ile de KDM5A, KDM5B, KDM5C gen bölgelerinin nükleotid dizileri incelendi. Proje sonucunda bir araya getirilen klinik ve moleküler veriler birleştirilerek istatistik ve biyoinformatik analizler yapıldı.

Bulgular: Kısmi ve tam yanıt veren hastalarda ilgili genlerin metilasyon seviyelerindeki değişimler incelendiğinde, kısmi yanıt veren hastalarda SIN3B (ekzon 19-20), KDM5C, EZH2 ve TFAP2C genleri, tam yanıt verenlerde ise KDM5A, KDM5B, KDM5C, EZH2, TFAP2C ve SIN3B (ekzon 19-20) genleri öne çıkmıştır. Dizileme verilerinin analizi sonucunda KDM5C gen bölgesinde iki hastada sırasıyla rs41308616 ve rs971896841 varyantları heterozigot olarak tespit edildi.

Sonuç: Meme kanseri hastalarında gen bölgelerine ait metilasyon düzeyleri ve genetik varyasyonların incelenmesinin hem tanı koyma sürecinde hem de

tedaviye yönelik stratejilerin belirlenmesinde kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Kemoterapötik Direnç, Metilasyon, Epigenetik, Neoadjuvan Kemoterapi

INVESTIGATION OF DNA METHYLATION LEVELS BEFORE AND AFTER TREATMENT IN BREAST CANCER PATIENTS RECEIVING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

ABSTRACT

Aim: Neoadjuvant therapy is crucial for improving surgical success in various cancer types. It is known to be particularly effective in achieving breast preservation in patients with locally advanced breast cancer. Genes that modulate the effectiveness of chemotherapeutic agents undergo expression regulation through methylation. Increased methylation in gene promoters that modifies the effects of neoadjuvant agents can alter treatment response by suppressing gene expression. In our study, we aimed to investigate the methylation levels of the KDM5 gene family and related genes in patients before and after treatment, as well as to examine potential variations in the KDM5A, KDM5B, and KDM5C gene regions.

Materials and Methods: The study included 20 patients diagnosed with breast cancer and 30 healthy individuals. Blood samples were taken from the patients twice, before and after neoadjuvant chemotherapy (NAC). The obtained DNA samples were analyzed using methylation-specific PCR (MSP) to determine the methylation levels of the KDM5A, KDM5B, KDM5C, EZH2, TFAP2C, ZMYND8, and SIN3B (Exons 19-20 and 1-2) genes. The nucleotide sequences of the KDM5A, KDM5B, and KDM5C genes were analyzed using Sanger sequencing. The clinical and molecular data gathered as a result of the project were combined, and statistical and bioinformatic analyses were performed.

Results: When changes in methylation levels of relevant genes were examined in patients with partial and complete responses, SIN3B (exon 19-20), KDM5C, EZH2, and TFAP2C genes were prominent in patients with partial responses, while KDM5A, KDM5B, KDM5C, EZH2, TFAP2C, and SIN3B (exon 19-20) genes were prominent in patients with complete responses. Analysis of sequencing data revealed heterozygous variants at rs41308616 and rs971896841 in the KDM5C gene region in two patients, respectively.

Conclusion: Examining the methylation levels and genetic variations of these gene regions, which exhibit significant differences in breast cancer patients, may be considered as potential biomarkers for both diagnostic purposes and treatment strategy determination.

Key Words: Breast Cancer, Chemotherapeutic Resistance, Methylation, Epigenetics, Neoadjuvant Chemotherapy

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, kadınlarda en çok görülen karsinoma türü olmakla birlikte, kadınlarda en çok ölümle sonuçlanan ikinci kanser türüdür. Çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler, gen fonksiyonunda değişikliğe sebep olarak meme kanseri patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Hastalığın çoğunluğunu duktal ve lobular alt tipler oluşturmaktadır (1, 2). Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) 2020 verilerine göre 2,3 milyon meme kanseri vakası tespit edilirken, 685,000 kişi ise bu hastalıktan hayatını kaybetmiştir (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer). Meme kanseri yatkınlığı ile ilişkili çok sayıda gen tanımlanmış, bunlardan en çok öne çıkanları ise Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) ve Breast cancer susceptibility gene 2 (BRCA2) olarak bilinmektedir (3).

Neoadjuvan kemoterapi (NAK) operasyon öncesi uygulanan kemoterapötik terapiyi ifade eder. Meme kanserlerinde neoadjuvan tedavinin amacı rezeksiyon ile alınamayacak tümörleri tedavi sonucu boyutlarının küçültülmesi ile opere edilebilir hale getirmek, hali hazırda rezeksiyona uygun boyuttaki tümörleri ise daha da küçülterek operasyon sonrası meme korunumunu sağlamaktır. NAK, operasyon sonrası patolojik tam yanıt (pCR; Tedavi sonrası meme ve lenf nodlarındaki hastalığın ortadan kaldırılması) ile ilişkilendirilmiştir (4-8). Antrasiklin / taksan (paklitaksel, dosetaksel) temelli rejimler invazif meme kanseri olan hastaların neoadjuvan tedavisinde standart tedavi kombinasyonları arasındadır (9). Dosetaksel / doksorubisin / siklofosfamid uygulamaları sık kullanılan protokoller arasındadır (10). Dosetaksel veya paklitaksel gibi neoadjuvan terapide kullanılan mitotik inhibitörler, hücre bölünmesi sırasında kilit rol üstlenen mikrotübüllerin (+) uçlarına yüksek afinite ile geri dönüşlü bağlanarak miktotübül işlevini inhibe ederek mitozu metafazdan anafaza geçiş aşamasında bloke ederler (11, 12). Son zamanlarda mikrotübül polimerizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar, polimerizasyon süreci için gerekli olan bazı proteinlerin dosetaksel veya paklitaksel gibi ilaçların işlevlerini etkileyebileceklerini göstermektedir (13). Siklofosfamid ise bir alkilleyici ajandır (14). Guanine N-7 pozisyonunda bağlanır ve DNA üzerinde hem aynı iplikçikteki hem de karşı eşlenik iplikçikteki bazlar ile çapraz bağ oluşturarak geri dönüşsüz DNA hasarı meydana getirir ve apoptozu tetikler. Siklofosfamid hasarının tamirinde homolog uç rekombinasyonu, nükleotid eksizyon tamiri ve REV3L

polimerazın kritik rol oynadığı bildirilmiştir (15, 16). Bu bulgulardan görüleceği üzere neoadjuvan ajanların etkilerini modifiye eden hücresel bileşenlerin aktivite ve miktarlarının tedaviye yanıtta etkili olması oldukça muhtemeldir. DNA metilasyonu, sitozinlerin bir metil grubu eklenmesi ile 5-metilsitozin (5mC)'e dönüştüğü bir süreçtir. Gen promotörlerinde meydana gelen metilasyon sonucu transkripsiyon engellenerek gen susturulmuş olur. Bu süreç gelişim sırasında normal olarak meydana gelerek gen ifadesinin dokuya özgü düzenlenmesini sağladığı gibi kanser sürecinde aşırı artmış (hipermetilasyon) veya azalmış (hipometilasyon) şekilde meydana gelerek karsinogenezi tetikleyebilir (17-19).

Literatürde neoadjuvan kemoterapi alan hastalarda çeşitli genlerin metilasyon seviyeleri incelenmiş, ancak bu genlerin rutinde tedavi protokollerinin belirlenmesinde kullanılan herhangi bir panel bulunmamaktadır. DNA metilasyonu, hastalığın evresi ve lenf nodu gibi klinik özelliklerin NAK yanıtını öngörmede epigenetik biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür. TMEM132D, MYO15B, TTC34, LTBR ve CLEC14A genleri ise meme kanseri hastalarında NAK duyarlılığını sınıflandırmada en uygun epigenetik biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır (20). Kemoterapiye yanıtı olumlu ve olumsuz olan triple-negatif meme kanseri (TNBC) hastalarının tedavi öncesi alınan biyopsi örnekleri ile yapılan metilom analizi gerçekleştirildiğine, LOC641519, LEF1, HOXA5, EVC2, TLX3 ve CDKL2 genlerinin tedaviye yanıt vermeyen hastalarda, FERD3L, CHL ve TRIP10 genlerinin ise yanıt verenlerde hipermetile olduğu tespit edilmiştir (21). NAK terapi rejimleri uygulanmakta olan meme kanseri hastalarında RASSF1, RARB, GSTPI, DAPK1 ve HIN1 genlerinin promotör bölgelerindeki metilasyon seviyeleri serum ve parafin dokuda incelenmiştir (22). pCR ile luminal meme kanseri (LBC), Stabil hastalığı olan LBC, pCR ile TNBC ve zayıf TNBC yanıtı olan hastalar olarak kategorize edilmiş meme kanseri vakalarının biyopsi dokularından homolog rekombinasyon ile ilişkili genlerin metilasyon seviyeleri araştırıldığında, BRCA1 ve RNF8'in metilasyon seviyelerinin TNBC'de LBC'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (23). TNBC hastalarının preoperatif biyopsi materyalleri ile tüm-metilom analizinde, tedaviye yanıtı ayırt etme yeteneğine sahip 9 gen bölgesi tanımlanmış, bunlardan 4 genin triple-negatif meme kanseri toplam sağ kalımı ile ilişkisi ortaya konmuştur (24). KDM5 gen ailesi, histon H3 (H3K4) üzerindeki lizin 4'ten tri- ve di-metil işaretlerini kaldırabilme yeteneğine sahiptir. KDM5 ailesi genleri, anjiyogenez ve kemorezistans gibi kanser ile bağlantılı mekanizmalar ile ilişkilendirilmiştir (25). Biz de

bu çalışmamızda tedavi öncesi ve sonrasında hastalardan alınan kan örneklerinden KDM5A, KDM5B ve KDM5C ile bu genlerle ilişkili EZH2, TFAP2C, ZMYND8 ve SIN3B (Ekzon 1-2 ve 19-20 bölgeleri) genlerinin metilasyon seviyesini inceleyerek tedaviye bağlı metilasyon seviyelerini araştırmayı, bununla birlikte metilasyon seviyeleri araştırılan KDM5A, KDM5B ve KDM5C gen bölgelerindeki olası varyasyonların durumunu incelemeyi amaçladık.

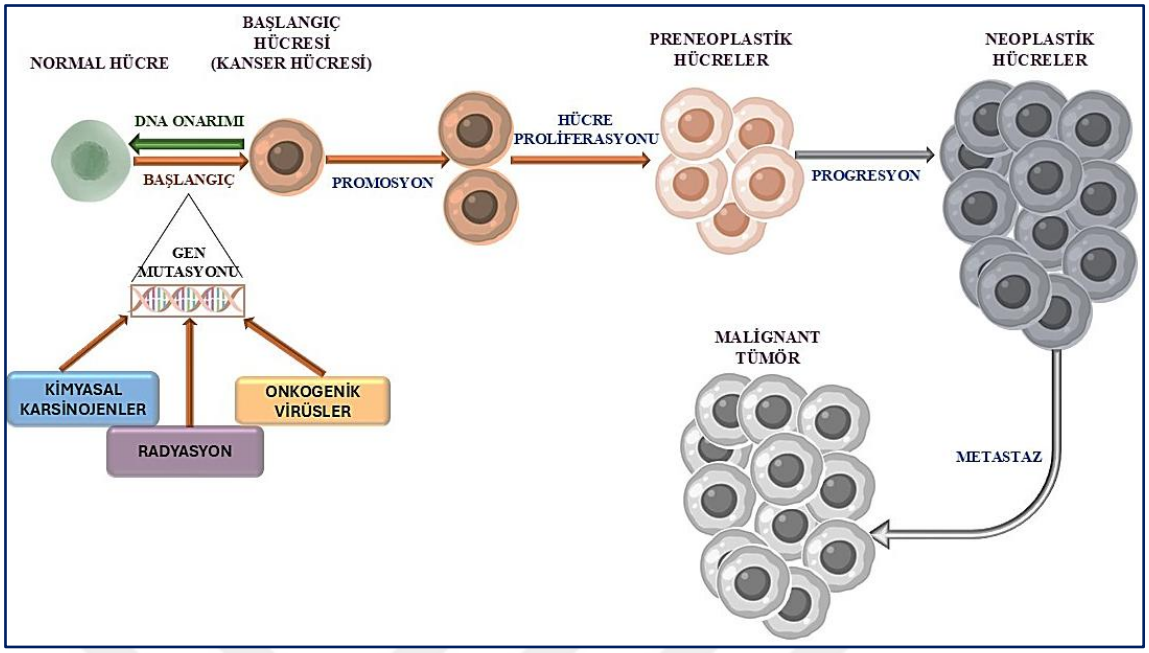
2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER VE OLUŞUM MEKANİZMASI

Kanser, dünya çapında ölümle sonuçlanan ikinci hastalık olarak bilinmekte, genellikle kanser hücrelerinin metastazı bu ölümlere yol açmaktadır. 2022 yılı GLOBOCAN verilerine göre yaklaşık 20 milyon kanser vakası tespit edilirken, 9,7 milyon vaka ise ölümle sonuçlanmıştır. Kadınlarda meme kanseri, erkeklerde ise akciğer kanseri en sık görülen kanser türleridir (26, 27).

Kanserleşmeyi tanımlayan karsinogenez" mekanizması için hücresel, biyokimyasal, zararlı kimyasallara dayalı, somatik ve regülatör teoriler gibi birçok teori öne sürülmüştür. Kanser oluşumu genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin birlikte etki ettiği kompleks bir süreçtir. Genel olarak kanserleşme süreci incelendiğinde, hücre büyümesi ve diferansiyasyonu ile ilişkili genlerdeki mutasyonların birikmesi ve böylece hücresel işleyişi bozması sonucu oluşan kontrolsüz hücre proliferasyonu görülmektedir. Karsinogenez sürecinde gen mutasyonu kanserin ana nedeni olacağı gibi kanserleşmede ara süreç veya sonuç olarak da değerlendirilebilir. Kanserin patofizyolojisinde; kromozom anomalileri, çeşitli genlerde ortaya çıkan somatik ve çoklu mutasyonlar, immün savunma mekanizmalarındaki bozukluklar, onkogen aktivasyonu ile ilişkili iyileşmeyen yaralar, doku organizasyonu, non-mutajenik süreçler ve virüs kaynaklı teoriler yer almaktadır (28, 29).

Karsinogenez mekanizmasında öncelikle transforme olan hücrenin anti-tümör bağışıklık sistemi kontrolünden kaçarak progresyonu ile neoplazma gelişimi görülür. Neoplazma, proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler (TBG'ler) ve DNA tamir genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Bunun sonucunda ise tümör antijenleri bağışıklık sistemini baskılayan faktörler üretmekte ve organizma malignant hücrelerin formasyonuna karşı mücadele edememektedir. Kanser hücrelerinde meydana gelen fonksiyonel bozukluklar sonucunda kontrolsüz çoğalma, apoptozdan kaçış, invazyon ve metastaz meydana gelmektedir (Şekil 2.1) (30, 31).



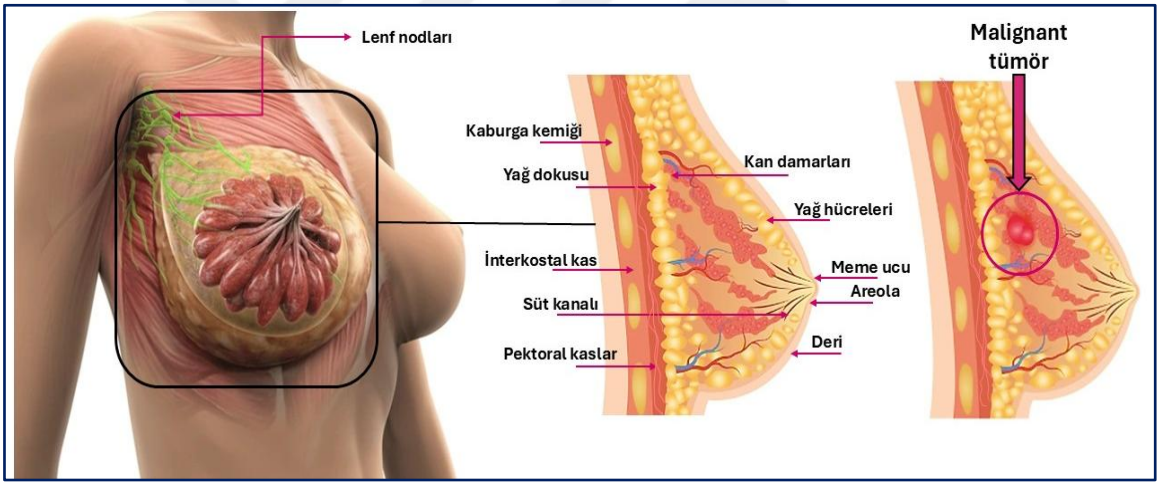
Şekil 2. 1: Kanser hücrelerinin oluşumu ve kanserleşme süreci.

Somatik mutasyonlar ve onkogenez mekanizmasındaki rollerine göre TBG'ler, onkogenler ve füzyon genleri, çeşitli mutasyonlar ve buna bağlı olarak proteinlerin işlevlerinde bozukluğa sebep olarak karsinogenezde rol alırlar. Onkogenler, hücre proliferasyonu ve bölünmesinde rolü bulunan ve hücre için zararlı mutasyonları bulunduran proto-onkogenlerin aşırı eksprese olması ile kanser hücrelerinin oluşumuna katkı sağlamaktadır. Normal hücrelerde bölünme ve apoptozda regülatör görevi gören TBG'ler ise onkogenelere antagonist olarak çalışmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar sonucunda çok sayıda TBG'ler barındıran X kromozomunun kanser başlangıcı, ilerlemesi ve metastazında kritik bir role sahip olduğu ortaya konmuştur. Onkogenlerin fonksiyon kazanımı ve TBG'lerin fonksiyon kaybı kanserli hücrelerde anormal sinyalizasyona öncülük ederek proliferasyonun kontrolsüz bir şekilde ilerlemesine, apoptoz yolağının aksamasına, metastaza ve anjiyogeneze neden olmaktadır (31, 32).

2.2. MEME KANSERİ

Hem erkek hem de kadınlarda bulunan meme dokusu, erkeklerde gelişim göstermemektedir. Bu yapılar, kadınlarda boyut ve şekil açısından yaş ve doğumun yanında, kalıtım, ırk ve beslenme yapısına göre de değişiklik göstermektedir (33).

Meme yapısı, süperomedial, süperolateral, inferomedial ve inferolateral olarak dört ana bölüme ayrılmaktadır (33). Kadınlarda anterior göğüs duvarı kasları üzerinde bulunan meme yapısı, anterior aksiller çizginin mediali ve sternumun lateral kısmında lokalize bir şekilde altı ve yedinci kaburgaların bulunduğu alanda yer almaktadır. Torasik duvarda pektoralis major kası daha baskındır ve hemen altında pektoralis minör kası bulunmaktadır. Lateral torasik duvarı serratus anterior adlı kas kaplamakta ve uzun torasik sinirler tarafından donatılmış durumdadır. Meme glandüler dokusu hamileliğin ikinci yarısında daha az gelişmekle birlikte, emzirme döneminde gelişimini tamamlamaktadır. Glandüler doku, 15-20 arası lobların oluşturduğu özgün kanallarla bağlantılı lobüllerden oluşmaktadır. Lobül yapıları, yağ dokusunun bulunduğu lifli bir doku ile çevrelenmiştir. Meme ucunun altında laktoferöz sinüs adlı bir alan vardır ve pigment içeren aerola'da ise montgomery bezleri görülmektedir (Şekil 2.2) (34).



Şekil 2. 2: Meme anatomisi ve malignant tümör oluşumu.

Meme kanseri, genel olarak duktusların epitelinde ve ardından çevre dokulara sızan kötü huylu tümörlerle karakterizedir. Kadınlarda en çok görülen ve yüksek mortaliteye sahip bu kanser türü, meme dokusunun yoğun olmasından ötürü ekseriyetle superolateral kadranda görülmektedir (33). Metastaz görülmeyen erken evre meme kanseri hastalarının yaklaşık %70-80'i mevcut terapiler ile tedavi edilebilmektedir. Non-invaziv ve invaziv meme kanserleri için multidisipliner tedavi yaklaşımları medikal, cerrahi ve radyasyon terapileri olarak kompleks ve çeşitli uygulamaları içermektedir. Moleküler alt yapısı oldukça kompleks olan bu hastalıkta, HER2'yi kodlayan insan

epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (ERBB2), östrojen ve progesteron reseptörlerinin aktivasyonunun yanında BRCA gen mutasyonları tespit edilmiştir. Günümüzde bireylere uygulanan tedavi stratejileri de moleküler alt tiplerine göre şekillendirilmektedir (35, 36).

2.2.1. Epidemiyoloji

Meme kanseri, kadınlarda global çapta kansere bağlı ölüm sebeplerinin başında gelmektedir. Bireylerde metastaz, tedaviye karşı direnç ve homojenite mortaliteyi önemli derecede etkilemektedir. Halihazırda uygulanan tedavilere yenilerinin eklenmesi ve kişiselleştirilmiş tedaviler sayesinde son yıllarda sağkalım oranının artmasına rağmen, meme kanseri insidansı halen artmaya devam etmektedir. Genetik ve epigenetik faktörlerin birlikte etkisi, çeşitli risk faktörleri ve çevresel uyaranların insidans üzerine etkisi bulunmaktadır (37).

Akciğer ve meme kanseri hem en çok görülen hem de ölümle sonuçlanan yaygın kanser türlerindendir. Dünya çapında kanser vakaları 2022 yılında 20 milyon civarı olarak tespit edilirken, aynı yıl içinde kansere bağlı 9,7 milyon bireyin ölümü gerçekleşmiştir. Hastaların 2,3 milyon kadarı meme kanseri tanısı almış, 670,000 vaka ise ölümle sonuçlanmıştır. Meme kanseri, Türkiye de dahil olmak üzere gelişmiş ülkelerde artış gösteren, yaklaşık 157 ülkede kadınlar arasında en yaygın kanser türüdür. Buna ek olarak, erkeklerde de %0,5-1 oranında ortaya çıkabilmektedir. GLOBOCAN 2022 Türkiye verilerine göre 25,249 yeni vaka, 7,360 hastalığa bağlı ölüm sayısı ve 5 yıllık prevalans ise 100,765 olarak tespit edilmiştir (26, 38, 39).

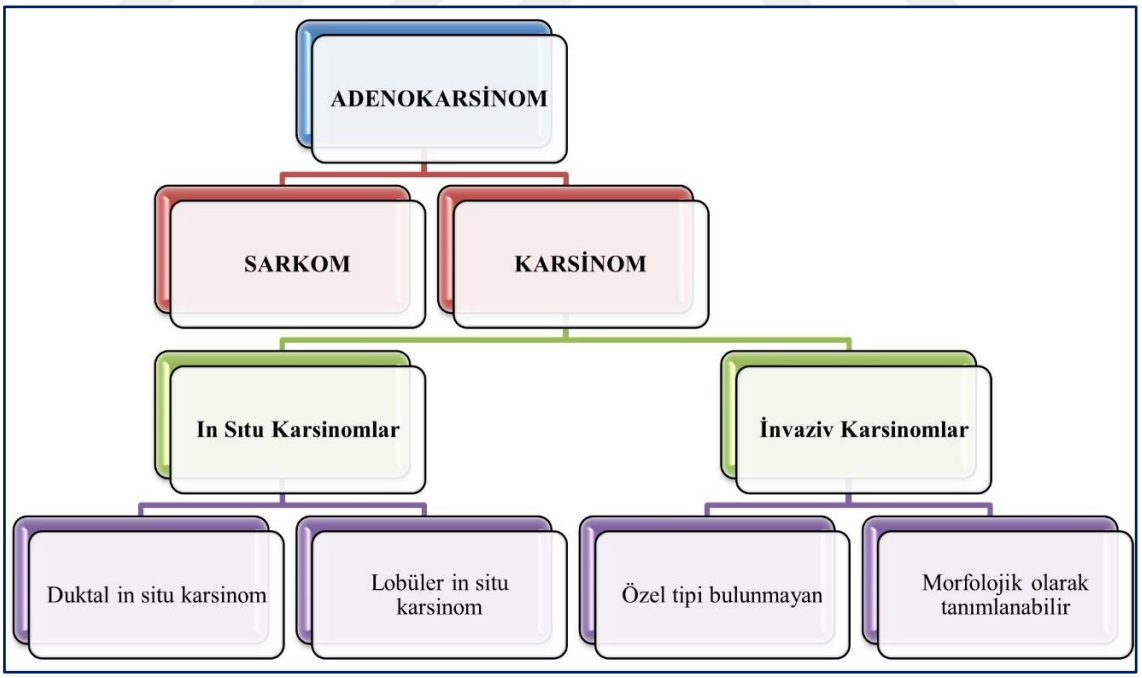
Meme kanseri insidansı yaklaşık %0,13 oranındadır ve 50 yaş altı kadınlarda görülme sıklığı son yıllarda artış göstermiştir. Hastalığın insidansı yaşın yanında etnik ve sosyal nedenlerden ötürü farklılık göstermektedir. Örneğin, siyahi kadınlarda sağkalım oranı tüm alt tipler ve evrelerde düşük seyretmiştir. Yaklaşık olarak son 30 sene boyunca mortalitede düşüş yaşanmıştır. Bunun nedeninin taramalar ile erken teşhisin sağlanması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi olduğu düşünülmektedir. Yine de tanısal uygulamalar ve tedaviye ulaşımın zor olduğu bölgelerde diğer hastalıklar gibi meme kanseri de kritik öneme sahiptir (40).

2.2.2. Evreleme Sistemi

Meme kanseri, histolojik ve moleküler açıdan oldukça heterojendir. Histopatolojik yapı, evre ve belirteçlerin farklılığı ile karakterize tümör özellikleri de

tedavide farklı yaklaşımları beraberinde getirmiştir (41). Mamografi, ultrason ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yöntemleri anatomik evrelemeye rehberlik etmekte ve bununla beraber tedaviye karar vermeye yardımcı olmaktadır.

2.2.2.1. Histolojik sınıflandırma: Temel olarak meme kanseri karsinom ve sarkomdan oluşmaktadır. Karsinom türleri meme kanserinde çok daha sık görülürken, sarkomların oranı %1'in altındadır. Karsinom, lobüller ve süt ile ilişkili terminal kanalları ile bağlantılı meme kök hücrelerine kadar uzanan epitel hücrelerden köken almaktadır. Sarkomların kaynağı ise miyofibroblast gibi bağ dokular veya lobül ve kanallara destek görevi gören kan damarlarıdır. Karsinomların alt türlerinden in situ karsinomlar, lobül ve kanallarda lokalizedir. Duktal in situ karsinomlarında meme kanallarıyla sınırlı anormal hücre tipleri görülmekte, lobüler in situ karsinomda ise anormal hücreler meme bezlerinde yerleşim göstermektedir. İnvaziv karsinomlar, yüksek derecede metastatik bir karsinom alt tipidir. Nadir ve agresif alt tipleri içerenler özel tipi bulunmayanlar arasında kategorize edilirken, morfolojik olarak tanımlanabilir olanlar meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturmaktadır (Şekil 2.3) (41).



Şekil 2. 3: Meme kanserinin histopatolojik olarak sınıflandırılması (41).

2.2.2.2. Moleküler sınıflandırma: Hormon reseptörlerine göre meme kanseri alt grupları Luminal A, Luminal B, HER2 pozitif ve TNBC (bazal benzeri)'den

oluşmaktadır (Tablo 2.1). Bu moleküler sınıflandırma temel olarak östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü (HER2) hormon reseptörlerinin immünhistokimyasal ekspresyon incelenmesine dayanmaktadır. Bunun yanında BRCA1 ve 2, p53 gibi gen mutasyonları, Ki-67 proliferasyon indeksi ve let-7, miR-155, miR-150, miR-153 gibi çeşitli miRNA'lar da sınıflandırmada moleküler belirteç olarak önem arz etmektedir (42, 43).

Tablo 2. 1: Meme kanseri moleküler alt tipleri (42).

Alt Grup	Genetik Profil	Moleküler Bulgular	IHC Fenotipi	Histolojik Alt Tür	İntegratif Küme: DNA Yapısı	Sağkalım
Luminal A	Luminal epitel genlerinin ve ER ile ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu	PI3KCA, MAPK3K1 ve GATA3 mutasyonları; CCDN1 amplifikasyonu; PI3K yolaklarının eş aktivasyonu yok	ER+, PR≥%20, HER2−, Ki-67 düşük	Tübüler karsinom, düşük dereceli IDC-NST, klasik ILC	IntClust 2: 11q13/14 amplifikasyonu; yüksek seviyeli kopya sayısı kazanımlarının firestorm paterni	Düşük
Luminal B	Luminal epitel ve ER-ilişkili genlerin daha düşük ekspresyonu, ancak luminal A'dan daha yüksek düzeyde proliferasyon ve HER2 ile ilişkili genler	Luminal A'ya benzer ancak TP53 ve RB yolaklarının inaktivasyonunun ve Myc-ilişkili ve FOXM1 ile ilişkili transkripsiyonun daha yüksek bir yaygınlığına sahiptir	ER+, PR<%20/ veya HER2+/ veya Ki-67 yüksek	IDC-NST, mikropapiller karsinom, pleomorfik ILC	• IntClust 3: Düşük genomik instabilite • IntClust 4: Kopya sayısı aberasyon yoksunluğu • IntClust 6: Yüksek genomik instabilite; 8p12 amplifikasyonu • IntClust 7: 16p kazanımı, 16q kaybı, 8q amplifikasyonu • IntClust 8: 1q kazanımı, 16q kaybı • IntClust 1: Yüksek genomik instabilite; 17q23 amplifikasyonu; GATA3 mutasyonu	• İyi • İyi • Orta • İyi • İyi • Orta

Tablo 2. 1: devamı.

HER2-pozitif (HER2-enriched)	HER2-ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu; ER-ilişkili genlerin düşük ekspresyonu	HER2 amplikon ve EGFR/HER2 sinyal protein signatürü	ER−, PR−, HER2+	Yüksek dereceli IDC-NST, pleomorfik ILC	• IntClust 2: Yukarıya bakın • IntClust 5: HER2 amplifikasyonu • IntClust 6: Yukarıya bakın • IntClust 9: 8q kazanımı, 20q amplifikasyon	• Düşük Orta
Triple-negatif (bazal-benzeri)	Bazal epitel ve proliferasyon genlerinin yüksek ekspresyonu; HER2-ilişkili ve ER-ilişkili genlerin düşük ekspresyonu	TP53 mutasyonları; RB1 ve BRCA1 kayıpları; MYC amplifikasyonu; yüksek PI3K/AKT yolağı aktivasyonu	ER-, PR-, HER2-	Yüksek dereceli IDC-NST, metaplastik karsinom, medular karsinom, adenoid kistik karsinom	• IntClust 10: 5q kaybı, 8q, 10p ve 12p kazanımı; sawtooth paterniyle yüksek genomik alterasyonlar • IntClust 4: Yukarıya bakın	• Düşük

* ER, östrojen reseptörü; HER2, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; IDC-NST, infiltratif kanal karsinomlar, özel bir tipi bulunmayan; IHC, immün histokimyasal; ILC, invaziv lobüler karsinomlar; PR, progesteron reseptörü.

Luminal tümör kavramı, keratin 8 ve 18 aşırı ekspresyonu görülen meme bölgesindeki luminal epitel hücrelerinden gelmektedir. Luminal A alt tipinde yaşla birlikte görülme sıklığında belirgin artış, yaygın PIK3CA ve nadir TP53 mutasyonu görülmekte, kemoterapiye yanıt oranı %8-10'da patolojik tam yanıt (pCR)'dır. Reseptör ekspresyonu yüksek ER+ ve PR+, HER2- şeklinde ve Ki-67 indeksi düşük olan Luminal A, hastaların %55'ini oluşturmakta ve prognozu iyi seyretmektedir. Daha genç hastaların bulunduğu ve BRCA2 mutasyon taşıyıcıları olan Luminal B'de TP53 mutasyonu daha yaygındır ve PIK3CA mutasyonu Luminal A'ya kıyasla daha az yaygındır. Reseptör ekspresyonu düşük ER+ ve PR+, HER2+/- şeklinde ve Ki-67 indeksi orta derecededir. Luminal B, hastaların %15'ini oluşturmakta ve kemoterapiye yanıt oranı %2'de patolojik tam yanıt (pCR)'dır. Yine genç hastaların bulunduğu HER2-pozitif grubu, TP53 ve PIK3CA mutasyonu barındırmakta, kemoterapiye yanıt %30-60'ta pCR ve HER2-yönlendirmeli tedaviyle daha iyidir. Reseptör ekspresyonu ER-, PR-, HER2+ ve Ki-67 indeksi yüksektir. Hastaların %15-20'sini oluşturan HER2-pozitif bireylerin prognozu kötü seyretmektedir. Genç ve BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında oluşan TNBC alt grubu, hastaların %10'unu oluşturmaktadır. Sık TP53

mutasyonu ve daha az yaygın PIK3CA mutasyonu genetik alterasyonlardandır. Reseptör ekspresyonu ER-, PR-, HER2- şeklinde ve Ki-67 indeksi yüksektir. Prognozu kötü seyreden TNBC'lerin kemoterapiye yanıt oranı %30-40'ta pCR ve immünoterapi kullanımıyla daha iyi seyretmektedir. Bu alt grupların morfolojik sınıfları Luminal A, Seviye 1 ve 2; Luminal B, seviye 2 ve 3; HER2-pozitif, seviye 3 ve TNBC, seviye 3 olarak belirlenmiştir. Moleküler sınıflandırma sistemine dayalı alt tipler klinik, patolojik ve neoadjuvan kemoterapiye yanıt bakımından farklıdır (42, 44).

2.2.2.3. TNM sınıflandırması: Önemli bir prognostik faktör olan tümör derecelendirmesi Scarff-Bloom-Richardson histolojik derecelendirme sistemine göre uygulanmaktadır. Glandüler özellikler, mitotik sayımlar ve polimofizm'e göre 1-3 arası bir puanlama yapılmaktadır. Puanın 3-5 arası olması diferansiyasyonu iyi olan derece 1'i temsil etmektedir. Derece 2, farklılaşma seviyesi orta ve puanı 6-7 olan tümörü, düşük seviyede farklılaşma ve 8-9 arası puanı olan tümör de derece 3 olarak belirlenmektedir (45).

Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC), tümör boyutu (T), bölgesel lenf nodu tutulumu (N) ve uzak metastazlar (M) ile karakterize TNM sınıflandırmasını birçok kanser türünde kullanmaktadır. Meme kanseri değerlendirmesinde bu anatomik değerlendirmelerin yanında ER, PR ve HER2 ekspresyonları ve histopatolojik özellikler de göz önünde bulundurulmaktadır. TNM gruplamalarına patolojik prognostik evrenin eklenmesi daha spesifik ve kesin prognozu sağlamıştır (46).

T, tümör boyutu ve bölgesel invazyon ile karakterizedir. AJCC'ye göre ortamda birden fazla kitle bulunuyorsa en büyük kitle baz alınmakta, küçük satellit nodülleri ise tümör boyutunu etkilememektedir. Tümör hacmi evreyi etkilemese de NAK alan hastalarda tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Aksiller lenf düğümü (nod) durumunu ifade eden N, lenf düğümlerinin yeri ve sayısının yanında, mikrometastaz ve izole kanser hücrelerinin de kapsayan metastazdan etkilenen lenf nodlarını göstermektedir. Uzak metastazı tanımlayan M kategorisinde M0 uzak metastazın olmadığını, M1 ise metastazın mevcut olduğunu tanımlamaktadır. Meme kanseri hastalarında metastatik bölgeler genellikle kemik, akciğer ve karaciğer dokularıdır. Uzak metastazlar, klinik veya görüntüleme kanıtına göre cM0 (kanıt olmaması) ve cM1 (uzak metastaz varlığı) olarak, patolojik kanıta dayanarak ise pM1

(uzak metastaz varlığı) olarak adlandırılır. pM0 ise AJCC kriterlerine göre geçeri bir kategori değildir (46-48).

2.2.3. Risk Faktörleri

Kanser oluşumunda birçok etkenin rol oynaması nedeniyle karsinogenezin kesin bir nedeni bilinmemektedir. Yine de günümüzde kanserleşmeye katkı sağladığı düşünülen bazı faktörler tespit edilmiştir. Hormonal ve reprodüktif sistem, fizyolojik ve sağlık durumları, beslenme alışkanlıkları ve düzensiz yaşam tarzı ile ilgili risk faktörleri meme kanseri oluşumuna katkı sağlamaktadır. Yaş, cinsiyet, genetik alt yapı, hormonal terapiler, obezite, alkol, radyasyon ve virüs maruziyeti, meme kanseri gelişiminde en kayda değer mekanizmalardır (48).

2.2.3.1. Cinsiyet: Meme kanseri yaklaşık %99 oranında kadınlarda görülürken, yaklaşık %1 oranında erkeklerde ortaya çıkmaktadır. Erkeklerde görülme olasılığının nadir olması sebebiyle kadınlar için uygulanan kılavuzlardaki tedavi stratejilerinden yararlanılmakta, östrodiol seviyesinin yüksekliği, BRCA1 ve BRCA2 gibi genlerdeki mutasyonlar, herediter kalıtım, klinifelter sendromu, radyasyon maruziyeti ve ileri yaş bu bireylerde meme kanseri ortaya çıkma olasılığını arttırmaktadır (48, 49).

2.2.3.2. Aile öyküsü: Yakın akrabalarda bir veya daha fazla meme kanseri vakası, herediter olarak risk oluşturabilmektedir. Bazı ailelerde spontane oluşumun yanı sıra, yaşam tarzlarının benzer olması, kalıtımsal mutasyonlar veya bunların kombinasyonu hastalığın gelecek nesillerde ortaya çıkmasını sağlayabilmektedir (50).

2.2.3.3. Yaş: Meme kanserinde yaş faktörü önem arz etmektedir. Ancak son yıllarda yaşa bağlı insidansa bakıldığında tüm yaş gruplarında artış gözlemlenirken, özellikle <50 bireylerde en yüksek seviyelere ulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca, menopoz öncesi kadınlarda son 30 yıl içinde artış tespit edilmiş, 55 yaş sonrası menopoz oluşumunun ise kanser olasılığını arttırdığı gözlemlenmiştir (48, 50).

2.2.3.4. Genetik faktörler: Meme kanserinin %5-10'unun genetik olarak kalıtıldığı, yaklaşık %90'ının ise sporadik mutasyonlarla ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Hastalıkla ilişkili öne çıkan mutasyonlar BRCA1 ve BRCA2 genlerinde görülmüş ve kanser riskini 10 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Bu gen mutasyonları kanserin regülasyonunu kötü yönde etkileyebilmektedir ve mutasyon taşıyıcısı bireylerin meme kanserine yakalanma olasılığı ise %85'tir. BRCA gen mutasyonu

taşıyan kadınların her yaş aralığında yumurtalık kanseri geliştirme olasılığı vardır. Bunun dışında TP53 ve PTEN genlerinin de meme kanserine yatkınlık sağladığı, ATM, BRIP1, CHEK2 ve PALB2 genlerinin de hastalığa yakalanma olasılığını yaklaşık 3 kat arttırdığı literatürde yer almaktadır. DNA tamiri, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok yolakta yer alan ve meme kanseri riskini arttıran FANCM, NS1, BARD1, RAD51C, RAD51D, XRCC2, MSH2 ve MSH6 gibi pek çok gen tanımlanmıştır (48, 50, 51).

2.2.3.5. Reprodüktif ve hormonal risk faktörleri: Yüksek seviyede östrojen hormonu maruziyeti, meme kanseri patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Östrojen hormon terapisi riski %1, kombine hormon replasman terapileri ise %8 oranında arttırmakta, kısa süreli kullanımda bile risk oluşturmaktadır. Östrojen maruziyetinin yanında, ilk menstrüasyon, gebelik ve menopoz yaşı da meme kanseri gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (48, 50).

2.2.3.6. Sigara ve alkol kullanımı: Tütün, mortaliteyi arttıran ve kanserojen madde içeriği zengin bir risk faktörüdür. Uzun zamandır sigara kullanımının meme kanseri ile pozitif korelasyonu bulunmaktadır (52). Nikotinin kemoterapi direnci ve metastaz ile bağlantısının ortaya konmasıyla sigaranın tedavi etkinliğine katkısı da gösterilmiştir (48). Meme kanseri gelişimine katkı sağladığı düşünülen diğer bir risk faktörü de alkol tüketimidir. Kadınlarda menopoz sonrasının yanı sıra öncesinde de alkol alımının karsinogeneze katkısı bulunmaktadır. Alkol, ER sinyalizasyonunu stimüle etmektedir. Bu sebeple, alkol tüketiminin, kanser hücrelerindeki mitojenik aktiviteye etkisinden ötürü ER+ meme kanseri vakaları ile daha güçlü bağlantısı bulunmaktadır (53).

2.2.3.7. Diğer risk faktörleri: Meme kanserine beslenme tarzı, hareketsiz yaşam, meme morfolojisi ve obezite gibi faktörlerin de katkısı bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar neticesinde obeziteli bireylerin yanında aşırı kilolu bireylerin de kanser formasyonuna katkısı olduğunu ortaya koymuştur. Vücut-kitle endeksi >31,1 olan kadınların meme kanserine yakalanma olasılığı <22,6 olanlara göre 2,5 kat daha fazladır. Bunun sebebinin menopoz sonrası az miktarda östrojen üretimini sağlayan yağ hücrelerinin aşırı kilolu bireylerde dokunun fazlalığına bağlı yüksek östrojen üretimine sebep olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Diğer bir faktör olan meme yoğunluğunda ise meme bezleri, bağ doku ve süt kanalları fazlalığı olan büyük memeli bireylerde meme kanseri gelişim riski daha yüksek olmakta, yoğun ve lipid hacmi geniş olan yapısı mamografide tümörün tespitini zorlaştırmaktadır.

Çeşitli hastalıklarda olduğu gibi kanser mekanizmasına da diyetin etkisinden söz edilmektedir. Ancak meme kanseri vakalarında çoğu zaman bağlantı bulunsa da her zaman tutarlı sonuçlar elde edilememiştir. İşlenmiş et, kırımızı et, rafine şekerli ürünler, doymuş yağlar ve tuz içeriği fazla ürünler gibi besinlerin aşırı tüketimi ile meme kanseri gelişim riski arasında anlamlı bir ilişki bulunurken, sağlıklı beslenmenin riski azalttığını ve beslenmenin prognozu da etkilediğine dair anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Meme hücrelerinin östrojen maruziyeti hamilelikte durması ve bireyin menstrüasyon sayısını azaltması sebebiyle hamilelik meme kanseri riskini azaltmaktadır. Hiç doğum yapmayanların ise çok çocuk doğuran ve erken doğum yapan kadınlara göre kansere yakalanma riski daha yüksektir (48, 50).

2.2.3.8. Meme kanserini önleyici müdahaleler: Karsinogenezi tetikleyen risk faktörlerinin bulunmasına karşın, koruyucu müdahalelerle meme kanserine yakalanma olasılığı %30'a kadar azaltılabilir. Kanserin önlenmesinde primer, sekonder ve tersiyer yaklaşımlar bulunmaktadır. Örneğin, yaşam tazının iyileştirilmesiyle birlikte bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve stres seviyesinin azaltılmasına yönelik yaklaşımlar primer önleyiciler kategorisine girmektedir. İleri evrede tedavinin zorlaştığı göz önüne alındığında sekonder önleyiciler, görüntüleme yöntemleri ile kanserin tedavi olasılığı yüksek olan erken evrede tanınmasına yönelik yaklaşımları içermektedir. Tersiyer önleme yaklaşımları ise kanserin tanısı ve tedavisinden sonra yaşam tarzının düzenlenmesine bağlı olarak sağkalımın arttırılması ve relaps riskinin azaltmasını içermektedir. Genel olarak meme kanserinin önlenmesi, risk faktörlerinin ortadan kaldırılması ile sağlanabilmektedir (54).

2.2.4. Meme Kanserinde Tanı ve Tedavi Seçenekleri

Terapi ve diyagnostik kelimelerinden ortaya çıkan teranostik kavramı, hastalığın belirlenmesi (tanı) ve terapötik ajanların hastalıklı bölgeye yönlendirilerek tanı ve tedavinin eş zamanlı olarak yapılmasını içeren yöntemlere denmektedir. Nanoteknoloji

yöntemleri kullanılarak tanı, hedefe özgü terapi ve tedavi yanıtının izleminde ise nanoteranostik (teranostik nanoteknoloji) uygulamaları da teranostik yaklaşımlar gibi meme kanseri yönetiminde yer almaktadır (55).

Kadınlarda göğüs ağrısı ve rahatsızlıkları her yaşta ortaya çıkabilen bir durumdur. Meme kanseri şüphesinin giderilmesinde fiziki muayene, ultrason ve mastektomi uygulanan yöntemler arasındadır. Göğüs ağrısının yanında, meme ucu akıntısı, renk değişikliği, kızarıklık, hassasiyet ve kitle de tespit edilebilmektedir. Amerikan radyoloji kolejinin geliştirdiği Meme Görüntüleme Raporlama ve Veri Sistemi (BI-RADS) ile görüntüleme ile ilgi bulgular düzenlenmekte, son kategorinin C4a ve daha yüksek bulunduğunda hastalara histolojik incelemenin yapılması önerilmektedir (56).

2.2.4.1. Tanı: Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO) verileri ışığında meme kanserinde erken tanıda kullanılabilecek bir algoritma geliştirilmiştir. Erken tanı algoritmasına göre öncelikle mamogram, ultrason ve özel durum için MRI yöntemleri ile görüntüleme yapılmaktadır. Sonraki aşamaları kalın iğne biyopsisi ve onaylanmış tanıyı takiben biyobelirteç analizi (ER, PR, HER2 ve Ki-67), gen ekspresyon tahlilleri, endokrin yanıt değerlendirmeleri ve aile hikayesi gibi bir durum varsa gBRCA1/2 mutasyonu analizi uygulanmaktadır. Son aşama ise evreleme, patolojik değerlendirme, kan sayımı ve bilgisayarlı tomografi (BT) gibi kısımları içermektedir. Meme kanserinin tespitinde mamografi, ultrason ve MRI sistemlerinin yanında farklı görüntüleme prensiplerine dayalı birçok görüntüleme yöntemi bulunmaktadır (55-57).

Mamografi, erken teşhis için klinik olarak kanıtlanmış tek tanı yöntemidir. Ancak bu yöntemin yanlış-pozitif veya yanlış-negatif sonuçlar, gereksiz biyopsi ve radyasyon maruziyeti gibi dezavantajları bulunmaktadır. Doku biyopsisi ve likit biyopsi yöntemleri de kanser teşhisinde kullanılan diğer yöntemlerdir. İnvaziv biyopsinin enfeksiyon riski, hastane yatışı ve iyileşme süreci problemleri bulunurken, likit biyopside bu tür sorunlardan kaçınılması büyük avantajdır. Literatürde meme kanseri erken teşhisinde miRNA gibi moleküllerin mamografiye yardımcı tanısal biyobelirteçler olabileceği öne sürülmüştür. Yapay zekâ araçlarının geliştirilmesiyle derin öğrenme ve hibrit makine öğrenmesi gibi makine öğrenmesi temelli algoritmalar da meme kanseri teşhisi için modern yaklaşımlar olarak yerini almıştır (57-60).

2.2.4.2. Tedavi: Mevcut terapilerin yanında yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesiyle hastaların yaşam kalitesinin arttırılması hedeflenirken terapötik direnç

mekanizmaları, bu çalışmalarda zorluk çıkarmaktadır. Hastaların histolojik ve moleküler özellikleri göz önüne alınarak lokorejyonal (yerel bölgesel) ve sistemik terapiler uygulanmaktadır. Bir meme kanseri hastasına uygulanacak olan en uygun tedavi yaklaşımları evre, tümör alt tipi ve moleküler verilere göre şekillenmektedir (1, 35).

Kanserin metastatik ve non-metastatik olmasına göre tedavi protokolü düzenlenmektedir. Non-metastatik meme kanseri hastalarında tümörün doku ve lenf nodlarından uzaklaştırılması ve metastazın engellenmesinde cerrahi rezeksiyon, ameliyat sonrası radyasyon terapisi, ameliyat öncesi olarak neoadjuvan ve ameliyat sonrası ise adjuvan terapiler olarak adlandırılan sistemik tedaviler bulunmaktadır. Metastatik gruplarda tedavi protokolleri semptomların hafifletilmesi ve hastanın yaşam süresinin uzatılmasına yöneliktir. Bu hastalarda da yine non-metastatik grupta olduğu gibi sistemik tedaviler (hastalığın alt tiplerine göre uygulamalar içerir), cerrahi ve radyoterapi (sadece palyasyon için kullanılır) protokolleri kullanılmaktadır (1).

Lokal terapi olarak cerrahi seçenekleri, meme bölgesinin tamamen alınması olarak bilinen mastektomi, memede tümörlü bölgenin etrafındaki normal dokuyu da kapsayacak şekilde çıkarılması uygulamasını içeren lumpektomi ve aksiller lenf nodu cerrahisini kapsamaktadır. Meme cerrahisi, endikasyon, cerrahi tekniği, rekonstrüksiyon, tekrarlama ve cerrahi kapsamı değerlendirmeleri, evre ve alt tipi dikkate alınarak radikal, modifiye radikal, meme koruyucu ve deri koruyucu mastektomi kategorilerine ayrılmaktadır. Kanserli hücre invazyonu ve terapötik açıdan yararlı olduğu düşünülen aksiller lenf düğümü cerrahisi ise sağkalımın arttırılmasına yönelik aksiller lenf düğümü diseksiyonu ve izosülfan mavisi gibi boyalar, radyoaktif izotoplar veya bunların ikili kombinasyonlarını kullanan sentinel lenf düğümü biyopsisini içermektedir (61-63).

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerinin proliferasyonunu yavaşlatılması veya imha edilmesini sağlamak amacıyla yüksek enerjili iyonize edici X ışınları veya gama ışınları, proton veya stabil olmayan partiküllerin kullanılmasına dayalı bir yaklaşımdır. Kanserin erken evresinde cerrahinin çeşitli aşamalarında uygulanabilirken, cerrahi müdahaleyle çıkarılamayan tümörler veya metastatik vakalarda da kullanılabilir. Progresif evrelerde ise kemoterapi veya immünoterapi ile kombinasyonu tavsiye edilmektedir (64, 65).

Relaps olasılığını yaklaşık %30 oranında düşüren sistemik terapiler kemik modifiye edici ajanlar, neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi, immünoterapi ve endokrin

terapi ajanlarını kapsamaktadır. NAK, çoklu aksiller lenf düğümü tutulumu olan, tümör boyutu büyük olan agresif alt tipli ve genelde TNBC ve HER2-pozitif hastalara uygulanabilmektedir. Böylece hastalık evresinin düşürülmesi, çoklu lezyonların yok edilmesi ve tümörün rezeksiyona uygun hale getirilmesinde tesiri bulunmaktadır. Kemoterapi ilaçları etki ettiği mekanizmalar açısından alkile edici ajanlar, antrasiklinler ve taksanlar adlı farklı gruplara ayrılmaktadır. Alkile edici ajanlar (karboplatin, siklofosfamid), DNA'ya kovalent olarak bağlanarak normal işlevlerini engeller. Antrasiklinler (Doksorubisin, Epirubisin) ise DNA replikasyonunu engellemekte ve kanser hücrelerine daha fazla zarar veren serbest radikallerin üretimini sağlamaktadır. Taksanlar (Dosetaksel, Paklitaksel) mitoz bölünmede mikrotübül degradasyonunu engelleyerek hücre bölünmesini önlemektedir. Kemik rezorpsiyonunun azaltılmasını sağlayan Klodronat, Pamidronat, Zoledronik asit ve Denosumab ilaçları, kemik modifiye edici kategorisindedir. Endokrin terapiler, aromataz inhibitörleri ve selektif östrojen reseptör modülatörlerini ihtiva etmektedir. Aromataz inhibitörleri olarak Anastrozol, Eksemestan ve Letrozol, androstendionun östrona ve testosteronun östradiole dönüşümünü engelleyen aromataz enzimini inhibe ederek reaksiyon göstermektedir. Selektif östrojen reseptör modülatörü ajanları olarak Raloksifen ve Tamoksifen de tümör hücrelerindeki östrojen reseptörlerine rekabetçi bir şekilde bağlanarak etki etmektedir (66, 67).

İmmünoterapi ajanları, immün kontrol noktasında görev alan proteinlerin hedeflerine bağlanmasının önlenmesini sağlamakta, T hücrelerinin aktivasyonu ile kanserli hücrenin hedeflenmesine yardımcı olmaktadır. İmmün kontrol noktası inhibitörleri (ICI'lar) olarak farklı molekülleri hedef alan mekanizmalara sahip ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı çeşitli ilaçlar keşfedilmiştir. Nivolumab, Pembrolizumab, Cemiplimab ve Dostarlimab ilaçları PD-1 inhibitörü, Atezolizumab, Durvalumab ve Avelumab ilaçları PDL-1 inhibitörü ve Ipilimumab ise CTLA-4 inhibitörü olarak görev almaktadır. NAK rejimleri ile ICI kombinasyonunun meme kanseri hastalarında uygulamaları literatürde yerini alırken, yapılan araştırmalarda pCR ve sağkalım açısından iyi sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir. Buna karşın, kombine terapilerin hangi hastalarda fayda sağlayacağı öngörülememektedir (68, 69).

Standart terapilerin dışında moleküler alt tiplerine göre mTOR, PI3K ve PARP gibi çeşitli yolakları hedef alarak kanserli hücrelere etki eden yeni nesil ajanlar da

keşfedilmiştir. Kanserli hücrelerin yok edilmesi ve immün yanıtın sürekliliğinin sağlanması için geliştirilmiş diğer bir terapötik yaklaşım ise kanser aşılarıdır. Meme kanseri aşılarının faydası hakkındaki kanıtlar yetersizdir. Ancak HER2 monoklonal antikorları gibi farklı terapilerle kullanımı daha umut vericidir (70, 71).

Moleküler araştırmaların artmasıyla birlikte ortaya çıkan siRNA, CRISPR-Cas sistemleri, miRNA ve buna benzer moleküler araçları kullanan gen terapileri, kimerik antijen reseptörlerini kullanan hücresel terapiler ve nanolipid taşıyıcıları ve nanopartikül gibi nanoteknoloji ürünlerini kullanan araçlar gelişmeye devam etmektedir. Bu tür moleküler terapötikler, kanserli mekanizmalara müdahalede modern tedaviler olarak ilgi çekici adaylar olmuştur (72-74).

2.2.5. Meme Kanserinin Moleküler Altyapısı ve Biyobelirteçler

Serolojik, histolojik ve genetik biyobelirteçler hastalığın yönetiminde oldukça kullanışlı olabilmektedir. Kanserin tanısı, tedavisi ve prognozunu öngörmede DNA, RNA, protein ve hücresel kategoride birçok biyobelirteç tanımlanmıştır. Moleküler biyobelirteçler, tanı ve prognozun yanı sıra, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine de öncülük etmektedir (Tablo 2.2) (75, 76).

Tablo 2. 2: Moleküler alt tiplerine göre meme kanseri tümörü ile ilişkili biyobelirteçler (75, 76).

Biyobelirteçler	Luminal A	Luminal B	HER2-pozitif	Triple-negatif
Histopatolojik	ER-A, PR, yüksek Ki-67, HER2-	ER-A, PR, düşük Ki-67, HER2+	HER2+, ER-, PR-, tümör infiltre edici lenfositler	HER2-, ER-, PR-, PDL-1, infiltre edici lenfositler
Serolojik	Ki-67, CA15–3, Bax, Bcl-2, CA 27-29, dolaşımdaki tümör hücreleri	PCNA, p62, ALDH1A3, MCM kompleksi, dolaşımdaki tümör hücreleri	Dolaşımdaki tümör hücrelerinde HER2+ tespiti	CEA, CA15–3, dolaşımdaki tümör hücreleri
Genetik	PIK3CA, GATA3, TP53, MAP3K1, MCM4	PIK3CA, TP53	BRF2, DSN1, HER2, 1767M, PI3KC, BRCA1, BRCA2	P53, BRCA1, BRCA2
miRNA	miR-21	miR-21, miR-145	miR-125a, miR-125b, miR-148a, miR-205	miR-145, miR-296, miR-93, miR-934

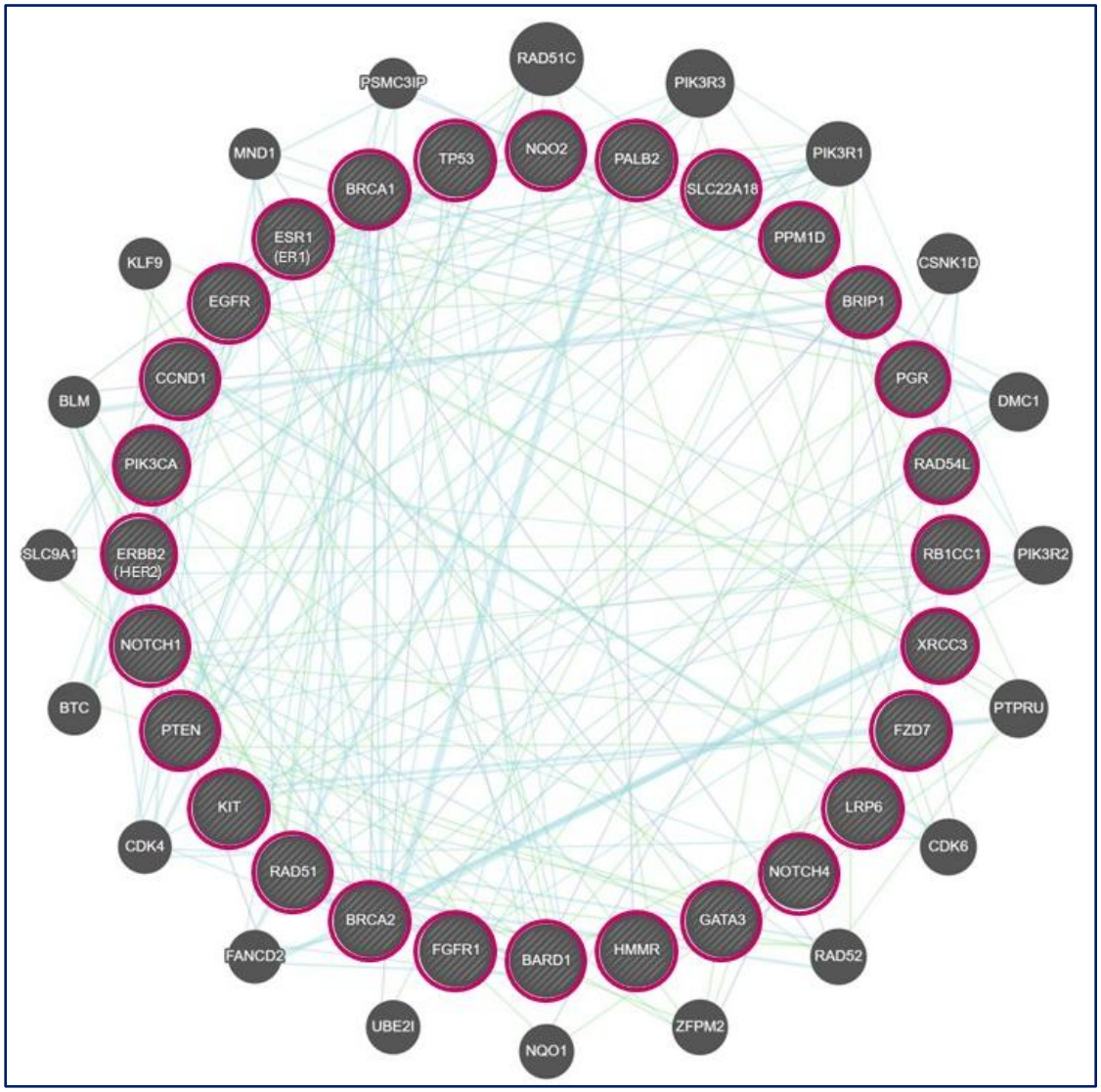
ER, PR, HER2, Mib1/Ki-67, CEA, CEA125 ve CA15–3 moleküler biyobelirteçleri, meme kanserinin farklı alt türleri için oldukça değerli biyobelirteçler olarak klinikte yerini almıştır. Kanserli hücrelerde aşırı-eksprese olan CA15-3 antijeni, tümör hücrelerinde glikozilasyonun alterasyonunda etkili bir MUC-1 ailesi üyesidir. Meme kanseri riskini belirlemede antijen biyobelirteçleri olarak CEA, CEA125, CA15–3 klinik kullanımda kabul almakla birlikte, prognozu öngörmedeki etkisi üzerinde ortak bir görüş bulunmamaktadır. Avrupa Tümör Belirteçleri Grubu CEA ve CA15–3 antijenlerini prognoz ve tedavi aşamalarında yol gösterici olarak değerlendirmiş, bunun aksine meme kanseri tanısı, evrelemesi ve tedavi protokollerinin belirlenmesinde Amerikan Klinik Onkoloji Derneği tarafından kabul görmemiştir (77). Tıpkı CA15-3 gibi CA27-29 antijeni de hücre etkileşimlerinin azalması ve tümör hücrelerinin lizisini engelleyen MUC-1'in protein yapıdaki antijenidir. Metastatik meme kanseri hastalarında CEA, CA15–3 ve CA27-29 antijeninin tedavi yanıtı ve prognoz açısından önemli olduğu görülmüştür (78).

Prediktif ve prognostik biyobelirteç olarak bilinen Ki-67 nükleer antijeni, meme kanserinin çeşitli evre ve alt tiplerinde önemi bulunan bir protein olarak tanımlanmıştır. NAK alan meme kanseri hastaları için Ki-67, prediktif bir belirteç olarak değerlendirilmiştir. Ki-67 eşik değerlerinin NAK yanıtı tahmininde kullanılmasına yönelik veriler patolojik yanıt açısından istatistik anlamlılığı göstermekte, ayrıca erken evrede adjuvan terapi kararının alınması açısından da önemli molekül olduğu öne sürülmektedir (79).

Nükleer steroid reseptör ailesi üyesi olan ER, hücre proliferasyonu, büyümesi ve farklılaşmasında görev almakta ve kontrolü E2 tarafından sağlanmaktadır. Kromozom 6 üzerinde lokalize olan Estrogen Receptor 1 (ESR1) geni ER-α proteinini, ESR2 ise ER-β proteinini kodlamaktadır. Meme kanserinde hem prognostik hem de tedavi açısından öngördürücü olan ER, özellikle endokrin terapi uygulamalarında önemli bir biyobelirteçtir. Etkisini ER aracılığıyla gösteren östrojenin kanser büyümesine katkısının siklin D ve MYC gibi regülatör elementler aracılığıyla olduğu kabul edilmektedir. Diğer bir öngördürücü biyobelirteç olan PR, kromozom 11 üzerinde lokalize PGR geninden eksprese edilmektedir. Hormonal yanıtın öngörülmesinde etkili bu molekül, ligand-aktive nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir. PR-A, B ve C olmak üzere üç izoformu bulunmakta, doku-spesifik PR-C ise PR-B'nin inhibisyonunda rol oynamaktadır. Tip 1

büyüme faktörü ailesinin bir üyesi olan HER2, kromozom 17 üzerinde bulunan Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 (ERBB2) geni tarafından kodlanmaktadır. Primer tümörlerin %30'undan fazlasında ekspresyonu anormal derecede yüksek bulunan HER2, hücre-hücre etkileşimine müdahil olmaktadır. Bu molekülün farklı bölgelerine bağlanan antikorlar aracılığıyla HER2-pozitif meme kanseri hastaları için terapötik yaklaşımlar geliştirilmiştir (76, 80).

Meme kanseri tanısı, prognozu, sağ kalım ve tedavi yaklaşımları ile bağlantısı tespit edilen CDK, NOTCH, Wnt, Sonic Hedgehog (SHH), Breast tumor kinase (BRK), HER ve PI3K/Akt/mTOR gibi çeşitli yolaklarda görevli birçok gen bulunmaktadır (81). KEGG DISEASE veri tabanına girişi yapılan meme kanseri ilişkili 28 gen tanımlanmıştır (Şekil 2.4) (82).



Şekil 2. 4: Meme kanseri genlerinin interaksiyon ve yolak ilişkilisini gösteren diyagram.

* **Mavi renkli çizgiler,** yolak bakımından ilişkilendirilen genler; **Yeşil renkli çizgiler,** genetik interaksiyon; **Pembe renkli çember içine alınmış genler,** meme kanseri ile bağlantısı bulunan genlerdir (82, 83).

BRCA1, BRCA2, TP53, XRCC, RAD51, PTEN, PIK3CA, GATA3 ve EGFR gibi farklı yolaklarda yer alan bu genlerin TBG ve onkogenik aktivasyonları, meme kanserinde hücre döngüsü, migrasyon ve hücrenin kaderini değiştirerek hastalığın oluşumu ve progresyonuna zemin hazırlamaktadır. HER2, EGFR (HER1) genini de içine alan diğer HER ailesi üyeleri, mTOR ve Ras genlerini barındıran downstream sinyal transdüksiyon modülatörleri, c-myc, Siklin D1 ve Siklin E gibi siklinler ve hücre döngüsü modülatörleri meme kanseri ile ilişkili onkogenlere örnektir. Myc yolağı aracılığıyla ekspresyonu artan p53, siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri olan p21, p27 ve p57,

DNA tamirinde görev alan BRCA1 ve BRCA2, Akt'nin negatif regülatörü PTEN, meme kanseri hastalarının yaklaşık %30'unda mutasyonu ve kaybı tespit edilen Rb ve DNA hasarı onarımını p53, BRCA-1 ve CHK2 genlerini fosforilleyerek regüle eden ATM geni de meme kanserinde öne çıkan TBG'ler olarak tanımlanmıştır (84).

BRCA1, 17. Kromozomun q21 bölgesinde lokalize olan otozomal resesif kalıtımlı 24 ekzona sahip bir gendir. Meme kanseri hastalarının yaklaşık %5'inde tespit edilen bu TBG, hücrede DNA replikasyon, onarımı, hücre döngüsü ve transkripsiyonel regülasyonda görev almaktadır. TNBC riski ile BRCA1 gen mutasyonu arasında ilişki bulunmuş, ayrıca mutasyon taşıyıcılığının hastalığa yakalanma riskini %80, yumurtalık kanserini ise %40-65'e kadar arttırdığı belirtilmiştir. BRCA1 geninin, hastalığın daha erken yaşta görülmesi, nüks ve agresyon ile bağlantısı sebebiyle bu gen meme kanserinde öne çıkmaktadır (85).

BRCA2, Rb1 genine yakın bir lokasyonda bulunan 13. kromozomun q12.3 bölgesinde konumlanmıştır. BRCA2 gen mutasyonları, meme, yumurtalık, prostat ve pankreas kanseri riskini arttırmanın yanında, hastalığın daha erken yaşlarda görülmesi ile de ilişkilendirilmiştir. ER sinyal yolağı ve BRAC2 arasında E2-aracılı regülatör ilişki bulunmakta, ER-pozitif meme kanseri grubunun ~%80'inde ise bu genin mutasyonları tespit edilmektedir. BRCA2 meme kanseri hastalarında en çok öne çıkan duyarlılık genleri arasındadır ve bu gen mutasyonunu taşıyan bireylerin hastalığa yakalanma olasılığı yaklaşık olarak %55'lere kadar çıkmaktadır (86).

TP53 geni tarafından eksprese olan p53 proteini, DNA hasara uğradığında hücre döngüsünü durdurarak onarım tamamlanana kadar bölünmeye engel olmakta ve böylece hasarlı DNA'ya sahip hücrenin proliferasyonu ile kanser oluşumunu önlemektedir. Hücre döngüsünün regülasyonuna ek olarak apoptoz, metabolik regülasyon ve anti-viral immün yanıtta da rol alan p53 proteini, meme kanseri vakalarının yaklaşık %45'inde aşırı-eksprese olarak bulunmuştur (87).

Hücre döngüsü kontrolü elemanları olan siklin ve CDK'ların aşırı-ekspresyonu, çeşitli onkogenik mekanizmalarla meme kanseri patogenezine katkı sağlamaktadır. Siklin D (CDK4 ve CDK6'ya bağlanır) meme tümörlerinin ~ %82'sinde aşırı-eksprese bulunmuş; Siklin A'nın (CDK1 ve CDK2 ile protein kompleksi oluşturur) aşırı ekspresyonu meme kanserinde erken relaps, yüksek risk ve toplam sağ kalım oranını düşüklüğü ile bağlantısı bulunmuş; Siklin E (CDK2 için regülatör alt ünite) ER-bağımlı

hücre büyümesi, ER- negatif meme kanseri grubunda aşırı-ekspresyonu sonucu mortalitenin artması ve relaps ile bağlantısı bulunmuş; Siklin B'nin (CDK1 ile kompleks oluşturur) meme kanseri dokusunda aşır-ekspresyonunun tümör boyutu ve derecesinin büyüklüğü ve lef nodu tutulumu ile ilişkili olduğu ve Siklin B1'in bağımsız risk faktörü olduğu rapor edilmiştir (88).

MammaPrint, BluePrint ve Oncotype Dx gen ekspresyon platformları, meme kanseri riski ve tekrarının değerlendirilmesinde kullanılan moleküler temelli yöntemlerdir. MammaPrint, 70 genin ekspresyonunu analiz ederek erken evre meme kanseri hastalarını düşük ve yüksek riskli olarak kategorize edebilmektedir. BluePrint, 80 geni analiz ederek hastalığı bazal, luminal ve HER2 alt tiplerine göre değerlendirmekte, ayrıca NAK tedavi duyarlılığı hakkında da öngörüde bulunabilmektedir. Diğer bir prognostik gen signatürlerinin değerlendirildiği platform olan Oncotype Dx, 16 kanser-ilişkili gen ve 5 referans genini qRT-PCR temelli olarak analiz etmekte, adjuvan tedavi kararına destek olan bir prognostik skor sağlamaktadır. Bu genetik testler hastalığa prediktif, prognostik ve tedavi uygulamaları açısından öngörü sağlayabilmektedir (89-91).

Konvansiyonel yaklaşımlara ek olarak son yıllarda geliştirilen moleküler metodlar sayesinde, meme kanserinin patofizyolojisinin aydınlatılması ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine öncülük eden muhtelif yapıda moleküler biyobelirteç keşfedilmiştir.

2.3. EPİGENETİK MEKANİZMALAR

DNA, RNA, kromatin ve histonlarda gerçekleşen çeşitli modifikasyonlar genomda değişikliklere sebep olmadan genin ekspresyonunda değişikliğe sebep olarak hücre homeostazını etkilemektedirler. DNA dizisinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadan gen ekspresyonunu değiştiren olaylar "epigenetik" olarak adlandırılmaktadır. Genin ekspresyon üzerinden regülasyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalar, protein üretimini yönlendirerek hücre tipi ve hastalığa özgü ekspresyon profili ortaya koyarlar. Histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve ncRNA'lar ile gen regülasyonu gibi epigenetik proseslerin öncülük ettiği hücresel olaylar ise "epigenomik" başlığı altında incelenmektedir (92). Post-transkripsiyonel modifikasyonların detaylı araştırılması ile mRNA'nın da N6-metiladenozin (m6A) aracılığıyla metilasyona uğradığı keşfedilmiş, bu tür modifikasyonlar ise literatüre "epitranskriptomik" adında yeni bir

alanı ortaya çıkarmıştır. RNA modifikasyonları arasında en öne çıkan m6A modifikasyonları, adenin nükleotidinin nitrojen-6 pozisyonuna metil grubu eklenmesi ile oluşmaktadır (93).

Genomik imprinting, Xist RNA ile inaktivasyon ve kromozomal stabilite olayları, epigenetik süreçler aracılığıyla gen ekspresyonunun düzenlenmesinde öne çıkan olaylardır. Genomik imprinting; kalıtılan allelin anne veya babadan kökenlenmesine göre epigenetik baskılanma ile aktivitesinin değişmesi durumudur. Genomik imprinting olayının düzenlenmesinde, histon modifikasyonu, DNA metilasyonu ve ncRNA'lar etkilidir. Özellikle embriyonik gelişimde büyük etkisi bulunan imprinting olayı, hücre büyümesi, proliferasyonu, diferansiyasyonu ve moleküler metabolizmayı yönlendirmektedir (94, 95). İmprinting mekanizması epigenetik regülasyon ile hücresel aktivitelerin devamını sağlamaktadır. Bu mekanizmanın bozulması konjenital impriting bozukluklarına neden olmaktadır. Angelman (AS), Prader-Willi (PWS) ve Beckwith-Wiedemann sendromları (BWS) en çok bilinen imprinting bozukluklarıdır. AS, 15q11q13 bölgesinde maternal kalıtımlı delesyon, paternal kalıtımlı uniparental dizomi (UPD), SNURF geni metilasyon kaybı ve UBE3A geni tek nükleotid varyantlarına (SNV) bağlı ortaya çıkarken, PWS ise 15q11q13 bölgesinde paternal kalıtımlı delesyon, maternal kökenli UPD, SNURF geni metilasyon kazanımı ile ortaya çıkmaktadır. Gelişimsel bozukluklara sebep olan ve klinik heterojenite gösteren diğer bir imprinting bozukluk olan BWS, 11p15.5 bölgesinde paternal UPD ve duplikasyon, H19/IGF2 metilasyon kazanımı, KCNQ1OT1 geni metilasyon kaybı ve CDKN1C SVN'leri ile fenotipe yansımaktadır (94, 96).

Epigenetik regülasyonun bir başka örneği olan X kromozomu inaktivasyonu, memelilerde dozaj kompanzasyonunu sağlamak için Xist RNA adlı bir uzun kodlama yapmayan RNA (lncRNA)'nın epigenetik modifikasyonları başlatmasına dayanır. Dişilerde iki, erkek bireylerde ise tek X kromozomu bulunmaktadır. Buna rağmen X kromozomunda bulunan genler tüm bireylerde eşit sentez edilmektedir. X-inaktif spesifik transkript (XIST) geninin ürettiği lncRNA, X kromozomunun susturulmasına sebep olan kromatin yapısında değişikliğe öncülük etmektedir. CpG adacıklarının metilasyonunda artış ile birlikte histon modifikasyonları gözlemlenmekte ve inaktif X kromozomu kompakt bir yapı olan Barr cisimciği adlı yapıya bürünmektedir. Xist RNA'nın regülasyonu, Tsix adında antisens kodlama yapmayan bir transkript ile sağlanmaktadır.

X inaktivasyonu olayına başta H3K27me3, H3K4me3, H3K9, H3K27 ve DNMT3a genleri olmak üzere çeşitli metilasyon-ilişkili genler yardımcı olmaktadır (97, 98). X kromozomu inaktivasyonu prosesinde meydana gelen bozukluklar, genetik hastalık ve sendromlara yol açmaktadır. Turner ve Klinifelter sendromu gibi anöploidiler, otizm spektrum bozuklukları, ATR-X, Kabuki, Lowe oculocerebrorenal ve Allan–Herdon–Dudley sendromları gibi durumlar X kromozomu inaktivasyonu ile ilişkili bozukluklardır. Bunlara ek olarak, inaktivasyon sonrası Xist RNA'nın deregülasyonunun meme karsinogenez ile ilişkisinin öne sürülmesi, bu lncRNA'yı meme kanseri için potansiyel terapötik hedef haline getirmiştir (99, 100).

Genetik instabilite genomdaki değişikliğine göre bir veya birkaç nükleotid değişimini ifade eden "nükleotid instabilitesi", mikrosatellit bölgesindeki delesyon veya insersiyon sebebiyle oluşan "mikrosatellit instabilitesi" ve genomik instabilitenin en çok görülen türü olan "kromozomal instabilite olarak" üçe ayrılır. Genetik bilginin yeniden düzenlenmesi ile çok sayıda genin ekspresyonunda değişime sebep olan Kromozomal instabilite, kromozom yapısında ve sayısında anormallikler ile karakterizedir. Tümör hücrelerindeki genetik bozukluklar ile ilişkili olan kromozomal instabilite, hücre bölünmesi sırasında replikasyon çatalının durması ve çift zincir kırıkları gibi replikasyon sırsında ortaya çıkan hatalar, kromozomların kutuplara çekilmesi sırasında anormal iğ ipliği montaj kontrol noktası aktivitesi, aberant kardeş kromatit ayrımı, sentrozom sayısında anormallik ve mikrotübül ile kinetokorun bağlanmasında hata oluşumundan kaynaklanmaktadır (101). Kromozomal instabilite, kanserde progresyon ve metastaz olayları ile ilişkili olan klonal heterojeniteyi genetik mekanizmalarla desteklemesi açısından önemli bir durumdur. Birçok solid tümörde olduğu gibi meme tümörlerinde de heterojenlik sağlamakta, kanserin prognozu ve tedavi direnci ile ilişkilendirilmektedir (102).

Histon modifikasyonu, ncRNA'lar ve DNA metilasyonu ile gerçekleşen epigenetik modifikasyonlar, hücre homeostazının devamı için hayati öneme sahiptir. Bu mekanizmalarda oluşan aksaklıklar onkogenler ve TBG'leri etkileyerek karsinogenez ile ilişkili yolakları aktive etmektedir.

2.3.1. Histon Modifikasyonu

Kromatin yapısının düzenlenmesinde non-kovalent etkileşimlerin alterasyonunun kullanıldığı histonlarda gerçekleşen epigenetik mekanizma, histon modifikasyonu olarak

isimlendirilir. Ökaryotik organizmaların nükleusunda bulunan genomik DNA, nükleozomların oluşturduğu kromatin yapısında bulunur. Nükleozomların temel yapısını oluşturan histon proteinleri H2A, H2B, H3 ve H4 oktamerleri ve ~ 146 baz çiftlik (bç'lik) DNA zinciri barındırmaktadır. Oktamerlerin oluşturduğu yapı H1 veya H5 (nadir) histonları bağlayıcı DNA dizisi ile birbirine bağlanmaktadır. Gen ekspresyonunun değişimine sebep olan metilasyon, asetilasyon, ubikitinasyon, sumoyulasyon ve fosforilasyon gibi post-transkripsiyonel modifikasyonlar, histonların C ve N terminal kuyruklarının elektriksel yükü ve yapısını düzenleyerek histon modifikasyonlarını sağlarlar (103, 104).

Histon modifikasyonları, genom stabilitesi, DNA tamir mekanizmaları ve kromatin düzenlenmelerini etkileyerek genlerin ekspresyon seviyelerinin değişimini sağlamaktadır. Bu mekanizmalarda gerçekleşen bozukluklar birçok hastalık ile ilişkilendirilmekle birlikte, tümör gelişimi ve metastazı etkileyerek kanser patogenezine de katkı sağlamaktadır. Buna istinaden histon metiltransferaz/demetilaz, asetiltransferaz/deasetilaz ve diğer histon modifikasyon inhibitörleri, farklı solid tümörlerde terapötik yaklaşımlar öne sürülmüştür. Günümüzde histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri ve histon demetilaz inhibitörleri (HMT) gibi epigenetik tedavi ajanlarının meme kanseri hastaları için klinik araştırmaları halen sürmektedir. Meme karsinomlarında H4, H3K4me2, H4K20me3 H4R3me2, HDAC1, HDAC2, HDAC6, H3K9ac, H3K18ac, H4K12ac ve H4K16ac gibi farklı biyobelirteçler değerlendirilerek tümör oluşumu ve hastalığın progresyonu ile bağlantısı belirlenerek terapötik açıdan önemi ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır (105, 106).

2.3.2. Kodlama Yapmayan RNA'lar

mikroRNA (miRNA), uzun kodlama yapmayan RNA (lncRNA), tRNA türevi küçük RNA (tsRNA) ve sirküler RNA (circRNA) gibi RNA yapıda moleküllerin meme kanseri tanısı, prognozu ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından umut vericidir. RNA moleküllerinin ekspresyon seviyelerindeki deregülasyonun tespiti sayesinde, hastalığın moleküler alt yapısı daha iyi anlaşılmakta ve moleküler temelli yeni terapötik ajanların tanımlanmasına öncülük etmektedir (107).

circRNA'ların miRNA ve mRNA'lar ile etkileşimi, kanserleşme mekanizmalarının kontrolünü sağlayarak tümör oluşumuna sebep olabilmektedir. Hsa_circ_0003645, Circ_DCAF6, Hsa_circ_0000515 ve Circ_0005273 gibi çeşitli

circRNA'lar, miRNA'ların regülasyonu yoluyla genleri mRNA seviyesinde kontrol ederek meme kanserinde tümörlü hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu arttırmakta, hücre apoptozunu da engellemektedir (108).

Küçük kodlama yapmayan RNA molekülleri olarak miRNA'lar, genetik ve epigenetik olarak ekspresyon düzeyinde genin regülasyonunu sağlamaktadır. miRNA moleküllerinin deregülasyonu, onkogenlerin aktivasyonu ve TBG'lerin baskılanması ile karsinogeneze öncülük etmektedir. Hücresel, eksozomal ve dolaşımda fonksiyonlarına göre disregülasyonu tespit edilen miRNA'lar, potansiyel uygulamalarına göre tanısal, prediktif, prognostik ve terapötik açıdan potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilirler. Meme kanseri hücrelerinde yapıaln incelemelerle miR-21, miR-328, miR-183, miR-103a-3p, miR-7-5p, miR-23a ve miR-32'nin up-regülasyonu, miR-99a, miR-339-5p, miR-874-3p, miR-600, miR-15a, miR-16 ve miR-139-5p'nin ise down-regülasyonu tespit edilmiş, deregülasyonu belirlenen miRNA'ların tümör regülasyonu, apoptoz, hücre proliferasyonu, metastaz ve ilaç duyarlılığı gibi farklı yolaklarda yer alan genleri hedef alarak meme kanserinin biyolojik karakteristiğini oluştururlar (109, 110).

Kanserde tümör gelişimi ve terapötik direnç bakımından önemli rolleri bulunan lncRNA'lar, miRNA, mRNA ve proteinlerin fonksiyonlarını doğrudan veya dolaylı olarak değiştirerek kemoterapi ajanlarına karşı direnç, apoptoz, hücre sinyalizasyonu ve apoptozu da içeren birçok mekanizmanın alterasyonuna sebep olmaktadırlar. lncRNA'lar biyolojik fonksiyonlarına göre intergenik (örn. MALAT1, ANCR), antisens (örn. lncTALAM1, PDCD4-AS1), sens (örn. lncRNA GAS5), intronik, çift-yönlü (örn. RNA 00441) ve enhancer (örn. lncRNA-LEENE) gruplarına ayrılırlar. Bu gruplarda yer alan lncRNA'lar TGF-β ve NF-κB sinyal yolağının da bulunduğu hücresel fonksiyonlarda hayati rolleri bulunan molekülleri düzenlemektedirler. Çeşitli sinyal yolaklarına etki eden lncRNA'ların meme kanseri patogenezine katkısının anlaşılması, tümör baskılanması ve terapötik yaklaşımların geliştirilmesine ışık tutmuştur (111, 112).

tRNA'ların spesifik kesim bölgelerinden türevlenen tsRNA'lar, RNA susturma, transkripsiyon ve translasyon gibi süreçlerde yer alması nedeniyle disregülasyonu meme kanseri gelişiminde payı bulunabilmektedir. Meme kanseri dokusu ve/veya serumunda deregülasyonu belirlenen tRF-Gly-CCC-046, tRF-Tyr-GTA-010 ve tRF-19-W4PU732S gibi tsRNA'ların, ilaç direnci, tümör özellikleri ve sağ kalım başta olmak üzere klinik

özellikler ile korelasyonu bulunmuş, bu da tsRNA'ları meme kanseri için yeni aday biyobelirteçler haline getirmiştir (113).

2.3.4. DNA Metilasyonu

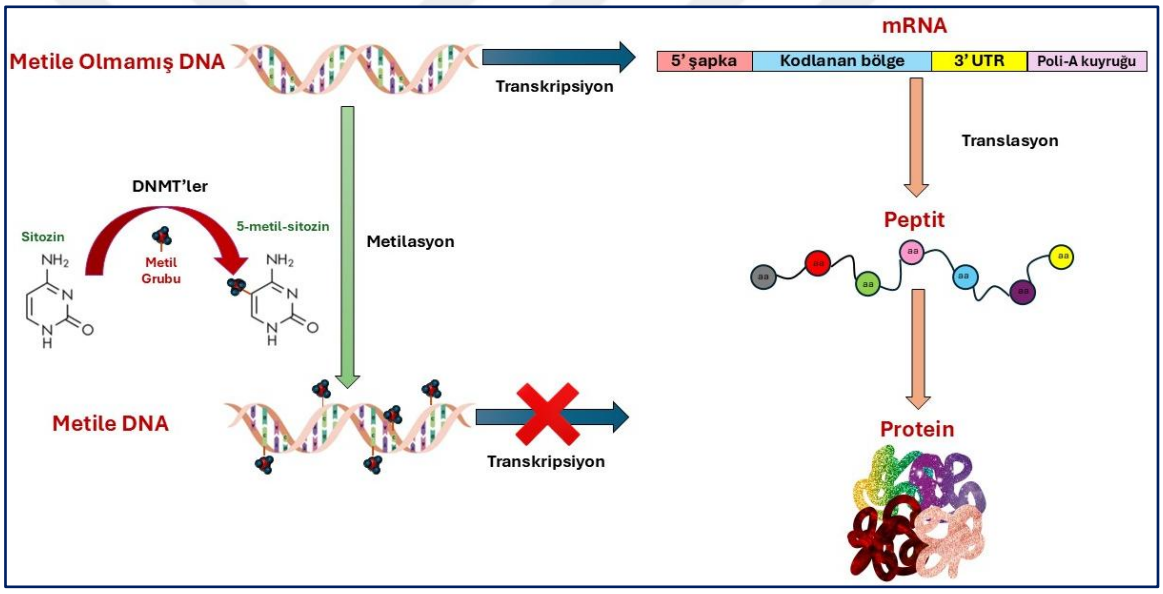
Canlı organizmalarda gen dizisinde değişikliklerin yanında değişik ajanların etkisiyle oksidasyon, alkilasyon, deaminasyon ve metilasyon adlı baz modifikasyonları da oluşabilmektedir. Bu modifikasyonlardan DNA metilasyonu (DNAm), gen dizisini hiçbir değişikliğe uğratmadan gen ekspresyonunu değiştirerek başta gelişimsel süreçler olmak üzere hücrede hayati öneme sahip çok sayıda yolağı etkilemektedir. Metilasyon, ilk olarak 1925 yılında 5-metilsitozin (5mC)'in keşfi ile başlamış, yapılan araştırmalar neticesinde omurgalılar da dahil farklı organizmalarda da 5mC'nin bulunduğu ve gen ekspresyonunu engelleyerek genomik organizasyon, üreme, gelişim ve yaşlanma mekanizmalarını koordine edebildiği görülmüştür (114).

DNAm, memelilerde CG dinükleotid (CpG)' lerindeki sitozinin 5. karbonunun metillenerek 5mC'ye dönüşmesine dayanmaktadır. Bitkilerdeki metillenme ise CHG veya CHH (H nükleotidi A, T veya C olabilir) içeriğindeki sitozinin metilasyonuna dayanır. CpG'ler çift iplikli DNA dizisinde simetrik patern göstermekte ve metillenmiş sitozinler DNA replikasyon sırasında da CpG'deki sitozinler kalarak yavru hücrelere aktarılabilmektedir. Genomda CG yüzdesi %55'in üzerinde (≥ 200 bp) bulunan bölgeler CpG adaları olarak nitelendirilmekte, insan genomunda ~ 28,000 civarında bulunmaktadır. Memeli genomundaki CpG'lerin yaklaşık %60-80'lik bir kısmı metile olmaktadır. Bunun yanı sıra, nöron, yumurta ve embriyo hücreleri gibi spesifik dokulara ait hücre tiplerinde CpA, CpT ve CpC metilasyonu da oluşmaktadır (115-117).

Sitozinlere metil grubunun eklenmesinde DNA'da kimyasal değişimleri sağlayan ve yazıcılar olarak bilinen DNA metiltansferaz (DNMT) enzimleri ile gerçekleşmektedir. Korunmuş DNAm motiflerini C-terminal bölgelerinde bulunduran DNMT'ler, S-adenozil-L-metiyonin (SAM)'den metil grubunu sitozine aktararak 5mC oluşumunu sağlamaktadır. Çeşitli endojen ve eksojen faktörler aracılığı ile oluşan DNAm, transkripsiyon ve translasyon süreçlerini regüle ederek hücresel süreçleri kontrol etmektedir (Şekil 2.5) (118).

DNMT1, memelilerde keşfedilen ilk DNAm genidir. Somatik hücrelerde DNMT1'in tam uzunluktaki formu üretilirken, oositlerde ise N-termianlinde 118

aminoasit eksik ancak daha stabil bir izoform olan DNMT1o üretilmektedir. DNMT1, çeşitli proteinlerle bağlantıyı sağlayarak işlevini özgünleştiren domainler içermektedir. Hemi-metile CpG'leri tanıyan UHRF1, DNMT1 ile kompleks oluşturarak metilasyonun devamlılığını sağlamaktadır. ATM sinyalizasyonunda rol oynayan DMAP1'nin ise DNMT1'in stabilizasyonunu sürdürmede etkisi bulunduğu öne sürülmektedir. DNMT'lerin diğer önemli üyeleri olan DNMT3A ve DNMT3B de novo metilasyonda görev alırken, DNMT3L ise katalitik aktiviteye sahip olmamasına rağmen de novo metilasyonunu regüle etmektedir. DNMT'lerin inhibisyonu 5-aza, 2′-deoksi-sitidin adlı ajan aracılığıyla sağlanmakta ve günümüzde kan kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (116, 117).



Şekil 2. 5: DNA metilasyonu ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi.

* DNMT, DNA metil-transferaz; UTR, Untranslated region.

DNA'daki sitozinlerin 5mC'e dönüşerek metile olması çoklu basamakları içeren demetilasyon yolağı ile geri dönüştürülebilmektedir. Demetilasyon olayı, on-on bir translokasyon/timin-DNA glikozilaz/Baz eksizyon tamiri (TET-TGD-BER) yolağı ile 5mC'nin aktif modifikasyonunu içermektedir. TET ailesi enzimleri (TET1, TET2 ve TET3), öncelikle 5mC'yi 5-hidroksimetilsitozin (5hmC)'e, sonrasında ise 5-formilsitozine (5fC) ve 5-karboksilsitozine (5caC) çevrimine öncülük etmektedir. Oksidizasyona uğramış sitozinlerin deaminasyon yoluyla 5-hidroksiurasil (5hmU)'i oluşturması, TGD enzim tarafından tanınmakta ve 5hmU:G uyumsuzluğunu

gidermektedir. Bu durum BER mekanizmasını tetikleyerek sitozinin aktif demetilasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca, DNMT1'in zayıf substratları olan 5fC, 5caC ve 5hmU de pasif demetilasyonu yönlendirmektedir (117, 119).

Dişi memelilerde X kromozomunun inaktivasyonu, genomda hareket eden DNA dizileri olan transpozonların susturulması ve imprinting olaylarına yön vererek farklı genlerin ekspresyonunu değiştiren DNAm, farklı yolaklardaki çok sayıda gene müdahale etmesinden ötürü bu epigenetik mekanizmada ortaya çıkan aksaklıklar kanser, metabolik hastalıklar ve nörolojik problemler ile ilgili pek çok hastalıkta muhtelif rolleri bulunmaktadır.

2.3.4.1. Metilasyon ve Kanser: Hücrenin olağan süreçlerinin sürdürülerek homeostazın sağlanmasında rolü bulunması dolayısıyla metilasyon mekanizmasında meydana gelen bozukluklar, genlerin deregülasyonuna sebep olarak çeşitli malignitelere sebep olmaktadır. Kanserli hücrelerde metile CpG'lerin oranının normal hücrelere kıyasla daha düşük bulunmasıyla DNAm'nin onkogenik profile önemli katkıları bulunduğu öne sürülmüştür. UV maruziyeti ve karsinojenik ajanlara maruziyet gibi onkogenezi destekleyen faktörler ile onkogenlerin hipometilasyonu, TBG'lerin özellikle promotör bölgelerinde hipermetilasyon ve deaminasyon olayları meydana gelmektedir. TET genlerinin aktivasyonu ve DNMT ailesi üyelerinde olagelen işlevsel kayıplar, kanserli hücrelerin metilasyon profilini değiştirebilmektedir (120).

Kanser genomunda hipermetilasyon genel olarak promotör, enhancer ve regülatör elementlerde yoğunlaşmıştır. Apoptoz, onarım ve hücre döngüsünde rol alan BRCA1, RB ve DAPK1 gibi farklı gen ailesinde yer alan genlerin metilasyon seviyesi normal hücrelere kıyasla deregüle olarak tespit edilmiştir. Örneğin, kolon kanserinde UHRF1'nin up-regülasyonu ile TBG'lerin promotörlerinin hipermetilasyonu belirlenmiştir. Bu da UHRF1'yi kolon kanseri için bir terapötik hedef haline getirmektedir (121). Akciğer kanserinde epigenetik belirteçler incelendiğinde ise, H3K9me2 geninin APC2, WIF1, MMP10, KRAS ve ECM ekspresyon değişimlerine ve böylece kanser progresyonuna sebep olduğu görülmüştür. Hepatoselüler karsinomlarda H3K9me2, JARID1B, KDM4B, KDM5C, SETDB1 ve HDAC3 genlerinin deregülasyonunun da çeşitli genlerin ekspresyonunu değiştirerek hepatokarsinogeneze katkı sağladığı düşünülmektedir (122). Epigenetik mekanizmaların kanserlerdeki rolünün araştırdığı çalışmalardan birkaçı, metiltransferaz özelliğini barındıran WDR5 ve histon demetilaz olarak görev alan

KDM7A'nın sisplatin direnci ile ilişkisini mesane kanseri hücrelerinde ortaya koymuştur (123).

Kanser türlerinin epigenetik modifikasyonlarının araştırılmasıyla "epidrugs" adlı epigenetik temelli ilaçlar ortaya çıkmıştır. DNMT'ler, EZH2, DOT1, LSD1 ve KDM gen ailesi başta olmak üzere epigenetik yazıcılar, okuyucular ve siliciler kategorisine giren çeşitli hedef genlere özgü epigenetik ilaçlar geliştirilmiş ve FDA tarafından onayı alınmıştır. Çoğunlukla bu ilaçlar HDAC, DNMT ve Bromodomain ve ekstraterminal domain (BET) inhibitörleri olarak karşımıza çıkmakta, bu ilaçların kombine terapi olarak kullanımı da umut verici sonuçlar sağlamaktadır. Miyelodisplastik sendrom için intravenöz yolla kullanılan decitabine ve akut miyeloid lösemide oral olarak kullanılan azacitidine, DNMT inhibitörü olarak geliştirilen epigenetik temelli ilaçlara örnektir (124, 125).

2.3.4.2. DNA Metilasyonunun Meme Kanseri ile İlişkisi: Meme kanseri, genetik ve epigenetik faktörlerin birlikte etki ettiği bir hastalıktır. Akciğer, kolon, gastrik, endometriyal ve yumurtalık kanseri gibi solid tümörlerin yanında kan kanserlerinde de transkripsiyonel alterasyonlarla epigenetik kontrolü sağlayan metilasyon, meme kanseri patolojisinde de önemli bir yere sahiptir. Çoğunlukla promotör bölgelerinde görülen hipermetilasyon, meme kanseri epigenetik profilini yönlendirerek genlerin susturulmasını sağlamaktadır (44).

Hücre büyümesi, proliferasyon, onarım ve transkripsiyonel regülasyon başta olmak üzere hücre için hayati öneme sahip çok sayıda genin metilasyonu meme kanserinin çeşitli moleküler alt tipleri için tanımlanmıştır. BRCA genleri, meme kanserine yatkınlık genleri olarak tanımlandığından bu genlerde meydana gelen mutasyon veya metilasyon durumları, hastalığın prognozu ve tedavisinin belirlenmesinde yol göstericidir. TNBC ve fare modelinde BRCA promotör metilasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada, BRCA2 geni promotör bölgesinde ve model hayvanda hipermetilasyon tespit edilmiş, metile geni taşıyan organoidler oluşturularak PARP inhibitörüne karşı hücresel duyarlılık incelendiğinde ise hücre canlılığında azalma olduğu görülmüştür. BRCA1 promotör metilasyonu, TNBC'lerin yaklaşık %25'inde görülmektedir. TNBC kan hücreleri ile gerçekleştirilen metilasyon analizi ile BRCA1 metilasyonunun hastalık geliştirme riski ile ilişkisi belirlenmiştir. Bu çalışmalar, BRCA gen metilasyonlarının

meme kanseri için uygun epigenetik biyobelirteç olabileceğini göstermektedir (44, 126-128)

Meme kanserinde öne çıkan genlerde gerçekleşen epigenetik alterasyonlar, potansiyel biyobelirteç olmanın yanında hastalığın tedavisi için terapötik ajanların keşfine de katkı sağlamaktadır. Endokrine dirençli meme kanseri hastalarında ESR1 promotör metilasyonu ERα down-regülasyonu ile sonuçlanmış, alternatif terapötik stratejiler olarak HDAC inhibitörleri önerilmiştir (129). Epigenetik düzeyde yapılan araştırmalar, 22 aday genden APC, BIN1, BMP6, CST6, ESRb, P21 ve TP53 genlerinin meme kanseri hastalarında hipermetile olduğunu göstermiş, EZH2 ve SUZ12'nin aşırı ekspresyonunun ise HoxA9 metilasyonunda görevi olduğu rapor edilmiştir (44). Meme kanseri hastalarında periferik kandan gen-spesifik metilasyon analizlerine göre VIM ve CXCR4 genlerinin hipometilasyonu tespit edilmiş, bu genlerin klinik kullanımda potansiyel prognostik faktörler olabileceği ileri sürülmüştür (130). Agresif meme tümörlerinde GSTM2 promotör hipermetilasyonu, ER/PR-negatif belirteçlerle bağlantısı bulunduğu, SOD3'ün down-regülasyonun promotör metilasyonuna bağlı kötü prognozla ilişkisi belirlenmiştir (131).

Meme kanseri türlerinde yapılan metilasyon ile ilgili çalışmalar hastalığın tanısı, prognozu ve prediktif açıdan öngörü sağlamakla birlikte, epigenetik temelli ilaçlar ve kombine tedavilerin keşfine öncülük etmektedir.

2.3.4.3. Metilasyon Tespitinde Kullanılan Yöntemler:

Gen ekspresyonunun değişimini sağlayarak hücresel aktivitelerin düzenlenmesine destek olan epigenetik mekanizmalara ilgilinin artmasıyla epigenetik temelli teknolojiler daha da önem kazanmıştır. DNA metilasyon analizinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünlerinin dizilenmesini içeren Sanger dizileme, Metilasyon-spesifik PCR (MSP) ve Pyrosequencing gibi bilinen genler için kullanılan yöntemler bulunurken, geniş çapta global DNA metilasyonunun ELISA temelli analizi de metilasyon durumunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Global metilasyon durumunun incelenmesi için de mikroarray, tüm genom bisülfit dizileme (WGBS) ve azaltılmış temsil bisülfit dizileme (RRBS) metodları bulunmaktadır. ELISA temelli analizler dışındaki diğer metodların analizinde ilk önce bisülfit dönüşümü yer almaktadır (132).

Kimyasal reaksiyonlardan oluşan bisülfit (BS) dönüşümü, DNA metilasyon analizlerinin birçoğunun temel basamağıdır. Pürifiye edilmiş DNA'nın BS dönüşüm reaksiyonunda sodyum bisülfit ile sülfonasyon kimyasal değişimi gerçekleşmektedir. Bu aşamada metillenmiş sitozinler aynı şekilde kalırken metile olmayanlar ise urasile dönüşmektedir. Sodyum bisülfit ile muamele edilmiş DNA'lar metilasyon analizinin ileri proseslerinde kullanılmaktadır. Seri kimyasal reaksiyonları içeren bu basamak, yüksek sıcaklık ve pH'dan etkilenerek DNA'nın degradasyonuna yol açabilmekte, dolayısıyla analiz işlemi için kondisyonlar optimize edilmelidir. Bu sebeple günümüzde BS dönüşümü için geliştirilmiş çeşitli kitler bulunmaktadır (133-135). MSP tekniği, dizisi bilinen DNA moleküllerinin bisülfit dönüşümüne dayalı incelenmesine dayanan yaygın bir uygulamadır. Bu yöntemde metillenmiş ve metillenmemiş bölgelere özgü tasarlanmış primerler kullanılmaktadır. Metodolojik olarak farklı uygulamaları içeren MSP protokolleri bulunmasına rağmen temelde bisülfitlenen DNA'nın kullanımı ve spesifik primerler kullanılarak ilgili bölgenin amplifikasyonu işlemleri ana basamakları oluşturmaktadır. Dizilemem temelli yaklaşımlara göre daha uygun maliyetli ve fazla sayıda örneğin incelenmesine olanak tanıyan bu MSP analizi, ilgili bölgenin amplifikasyonu ile birlikte metilasyon miktarı küçük olan bölgelerin de incelenmesini sağlamaktadır (136, 137).

CpG adalarında metilasyon seviyelerinin araştırılmasında WGBS ve RRBS gibi teknikler kullanılmaktadır. Metile bölgeler BS dönüşümünü engellemekte, DNA metilasyonu WGBS ve RRBS yöntemlerinde bu şekilde ayırt edilebilmektedir. Diğer adı Methyl-seq olan WGBS yöntemi, DNA'nın izole edilmesi ve sonikasyon ile 200-300'lik bç'lere fragmentasyonunu takiben adaptörlerin metile sitozinlere bağlanması, BS dönüşümü gerçekleşen DNA'nın sekans primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu, dizileme reaksiyonu ve biyoinformatik analiz basamaklarından oluşmaktadır. Genom çapında CpG adalarının analizinde etkili olan WGBS metodunda CpG yoğunluğu (CpG/100 bç) ≥ 2 olarak belirlenebilirken, yüksek dizileme derinliğine gerek duyulması, yüksek yoğunluklu CpG bölgelerinde sapma ve azalmış okuma hizalaması gibi zayıflıkları tespit edilmiştir (138, 139). RRBS protokolünde ise CpG adaları hedef alınarak metilasyon profili ortaya konmaktadır. GC bölgelerinin yoğun bulunduğu metile bölgeleri hedef almak için geliştirilen RRBS metodunda GC-zengin bölgeleri 5'-CCGG-3' dizilerini tanıyan MspI restriksiyon enzimi kullanılmaktadır. Fragmentlerine ayrılan DNA'nın uç onarımı, poli-A kuyruğu eklenmesi, adaptörlerin bağlanması ve bisülfitli

DNA’nın PCR ile amplifikasyonu, dizileme ve biyoinformatik analiz yöntem basamaklarını oluşturmaktadır. WGBS metoduna kıyasla CpG bölgelerinin sadece yaklaşık %10 kadarını kapsayan RRBS’de düşük bir oranda genomun değerlendirmeye alınmasının yanında, WGBS’de olduğu gibi yüksek yoğunluklu CpG bölgelerinde sapma ve azalmış okuma hizalaması sorunları yöntemde de karşımıza çıkmaktadır (138, 140).

Metilasyon profillemede hedefe yönelik çeşitli yöntemler bulunmaktadır. DNAm’nin araştırılmasında sıklıkla kullanılan bu epigenetik yöntemler, incelenecek bölgenin büyüklüğüne ve amaca yönelik seçilmektedir. Ortaya konması istenen epigenetik profil ile özellikle yeni nesil tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi, hastalık profillerinin belirlenmesi ve biyobelirteçlerin keşfi sağlanabilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Araştırmaya Katılan Gönüllülerin Seçimi

Çalışmaya 18-60 yaş aralığında, İstanbul Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapılan tetkikler sonucu (klinik, radyolojik, biyokimyasal, patolojik) lokal ileri meme kanseri tanısı almış ve araştırmayı kabul ettiğine dair yazılı onay veren (bkz., EK-2) 20 hasta ve 30 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. Sistemik metastazı olan, gönüllü onamı vermeyen, erkek veya gebe olan ve daha önce radyoterapi ve/veya kemoterapi almış hastalar dahil edilmemiştir. Araştırmaya dahil edilen gönüllüler için etik kurul onayı Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih, 03.11.2023; Karar sayısı, 19/27) (bkz., EK-1).

3.1.1.1. Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri:

Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri:

- 18-60 yaş arası olmak
- Klinik, radyolojik, biyokimyasal, patolojik tetkikleri sonucu lokal ileri meme kanseri tanısı almış olmak
- Araştırmayı kabul ettiğine dair yazılı onam vermek

Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilmeme Kriterleri:

- Yaş aralığı 18-60 arası olmamak
- Sistemik metastazı olmak
- Gönüllü onamı vermemek
- Erkek veya gebe olmak
- Süt veriyor olmak
- Daha önce radyoterapi ve/veya kemoterapi almış olmak

3.1.1.2. Sağlıklı Bireylerin Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri:

- Daha önce kanser öyküsü bulunmayan
- Meme ile ilgili kanser dışı hastalık öyküsü (mastit, fibrokistik değişiklikler, fibroadenom vb.) bulunmayan
- Meme estetiği öyküsü olmayan
- Gebelik riski bulunmayan
- Süt vermeyen kadın bireyler

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri

Projede kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri, Tablo 3.1'de belirtilmiştir. Malzemelerin hangi aşamalarda kullanıldığı da tabloya eklenmiştir.

Tablo 3. 1: Projede kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri listesi

No	Kimyasal veya Sarf Adı	Marka	Kullanıldığı Yöntem
1	Nucleic Acid Jel Stain	Softec	Agaroz Jel Elektroforezi
2	2X Taq DNA Polimeraz	Elk biotech.	Konvansiyonel PCR
3	10X PCR buffer (with $MgCl_2$)	Elk biotech.	Konvansiyonel PCR
4	100 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP and dCTP)	GeneDirex	Konvansiyonel PCR
5	DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Scientific	Konvansiyonel PCR
6	1 kb Plus DNA ladder	New England Biolabs (NEB)	Konvansiyonel PCR
7	Agarose	Elk biotech.	Konvansiyonel PCR
8	Trizma Base	Sigma	Konvansiyonel PCR
9	Acetic Acide	Tekkim	Konvansiyonel PCR
10	Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Tekkim	Konvansiyonel PCR
11	Etil Alkol (EtOH)	Honeywell	Genel Kullanım
12	Hydrogen Peroxide (H_2O_2)	Tekkim	Genel Kullanım
13	Sodium Acetate (NaOAc)	Merck	Genel Kullanım
14	Mikrosantrifüj Tüpü (1,5 ml/ 0,5 ml/ 0,2 ml)	Isolab	Genel Kullanım
15	Erlen Mayer (250 ml)	Isolab	Konvansiyonel PCR
16	Mezür (50, 100 ve 1000 ml)	Isolab	Genel Kullanım

Tablo 3. 1: devamı.

17	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche	Real-Time PCR
18	LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche	Real-Time PCR
19	Filter Paper, 40 x 40 cm	Isolab	Genel Kullanım
20	Nitrile Gloves, 100 ad/pk	Isolab	Genel Kullanım
21	Sephadex™ G-50 Fine	cytiva	Sanger Dizilem

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

Proje kapsamında kullanılan kitler ve markaları, yer aldığı yöntem basamağı belirtilerek Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

Tablo 3. 2: Projede kullanılan kitler

No	Kit Adı	Marka	Kullanıldığı Yöntem
1	Exgene DNA Isolation Kit	GeneAll	DNA İzolasyonu
2	QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	DNA İzolasyonu
3	Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit	Zymo	DNA İzolasyonu
4	HRM Analysis Kit (EvaGreen)	Tiangen	Real-Time PCR
5	DNA Bisulfite Conversion Kit	Tiangen	Genomik DNA'nın Bisülfit Dönüşümü
6	Epitect PCR Control DNA Set	Qiagen	Real-Time PCR
7	ADSTM Exo-Alp PCR Cleanup Mix	AdvancedSeq, LLC.	Sanger Dizileme
8	SupreDye™ v3.1 Cycle Sequencing Kit	AdvancedSeq, LLC.	Sanger Dizileme

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Proje kapsamında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 3.3'te belirtilmiştir.

Tablo 3. 3: Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

No	Mevcut/Ekipman türü, Modeli (Araç, Makine-Teçhizat vb.)	Projede Kullanım Amacı
1.	PCR Cihazı (Thermal Cycler) (Blue- Ray/ tcst-9620)	Konvansiyonel PCR çalışmaları
2.	Derin Dondurucu (-80^{0}C) (DAIHAN/Duo Freez U500)	Örneklerin Muhafazası
3.	Derin Dondurucu (-20^{0}C) (BOSCH/GSN36AI31)	Örneklerin muhafazası
4.	+4 buzdolabı (Arçelik)	Genel kullanım
5.	Mikrodalga fırın (BEKO/MD2610)	Solüsyon hazırlanması
6.	Hassas Terazi, 0.1 mg hassasiyeti (SHIMADZU/ATX224, SEG)	Yüksek hassasiyetli miktar tayini
7.	Otomatik pipet seti (Gilson)	Moleküler çalışmalar, tüm deneylerde
8.	Isıtıcı Blok Stuart (SBH130D)	Genel kullanım
9.	Jel Görüntüleme Sistemi (CCD kameralı) (Syngene/G: BoxF3)	Moleküler genetik çalışmaları, agaroz jel sonrası sonuçların incelenmesi ve kayıt altına alınması
10.	UV Transuliminatör (Yatay) (DAIHAN-Wisd/WUV-L20)	Moleküler genetik çalışmaları
11.	Spektrofotometre ve Florometre (DENOVIX/DS-11FX)	DNA/RNA/miRNA/protein miktar tayini
12.	Masaüstü soğutmalı santrifüj	Genel kullanım
13.	Horizontal Elektroforezler (Hoefer)	Agaroz jel yürütme
14.	Güç Kaynağı (Hoefer/PS300B)	Elektroforez işleminde
15.	İnkübator (DAIHAN/ IG-50)	İmmünhistokimyasal ve inkübasyon gerektiren tüm çalışmalarda
16.	Vorteks 4S (DAIHAN- Wisd/ VM-10)	Genel kullanım
17.	Distile su cihazı (Elga)	Genel kullanım
18.	Kar buz makinesi	Genel kullanım
19.	LightCycler 480 PCR cihazı	Real-time PCR çalışmaları
20.	Otoklav cihazı	Materyallerin sterilizasyonu
21.	Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer, A3130XL, USA	Sanger dizileme aşamaları
22.	Bio-rad C1000 Touch Thermal Cycler	PCR çalışmaları

3.1.5. Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan solüsyonların miktarı ve hazırlanışı hakkında bilgi aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1.5.1. 50X TAE (TRİS-ASETİK ASİT-EDTA) çözeltisinin hazırlanması:

Çözelti 242 g Tris base, 57,1 ml Glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA (pH: 8,0) kullanılarak hazırlanmıştır. Tris bazından 242 g 1000 ml'lik behere alınıp 750 ml dH_2O ile çözdürüldükten sonra üzerine dikkatli bir şekilde 57,1 ml Glasiyel asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA eklenmiştir. Son olarak dH_2O ile volüm 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon otoklav ile sterilizasyon sonrasında oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.5.2. %3,5 Hidrojen Peroksit (H_2O_2) hazırlanması: 35 ml H_2O_2 50 ml'lik mezür ile ölçüldü. H_2O_2 1000 ml'lik behere alınıp solüsyon dH_2O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.5.3. %70'lik Etil Alkolün (EtOH) hazırlanması: EtOH'den 70 ml mezür (100 ml) ile ölçüldü. Solüsyon, dH_2O ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. İmmün Histokimyasal Analiz ve Patolojik Değerlendirme

Patoloji sonuçları İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Patoloji ABD'da rutin izlem sırasında değerlendirilmiş ve alınmıştır. Tedavi alan hasta grupları Luminal A, Luminal B, HER2-pozitif ve Triple-negatif olmak üzere dört gruba ayrılmıştır.

Meme kanseri grupları şu şekildedir;

- Luminal A; ER ve PR reseptörleri pozitif olan, HER2 negatif olan hastalar,
- Luminal B; ER ve HER2 reseptörleri pozitif olan ve PR negatif olan, Luminal A'ya göre yüksek histolojik derecede olan hastalar,
- HER2-pozitif; ER negatif ve PR negatif, ancak HER2-pozitif olan tümörleri bulunduran hastalar
- Triple-negatif; ER, PR ve HER2 negatif olan hastalar.

Hastalığın alt gruplarına göre prognoz, metastazın şekli ve tedavi yanıtı gibi hastalığın klinik davranışı öngörülmektedir. Östrojen reseptörleri (ER) ve progesteron (PR) reseptörleri, vücuttaki belirli hücrelerde bulunan özelleşmiş proteinlerdir. Hormon reseptör düzeyi, hastalığın prognozunu gösteren bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Kanda dolaşan östrojen, progesteron ve kadınlık hormonları bu reseptörlere bağlanarak yeni hücre büyümesi ve bölünmesini teşvik ederler. HER2 reseptörü ise hücrenin yeni hücreler oluşturmak için büyümesini ve bölünmesini söyleyen sinyallere yanıt vermesine yardımcı olmaktadır (41).

3.2.2. Hastalara Uygulanan Terapi Rejimleri

Gönüllü hastalara uygulanan kemoterapi rejimi standarttır. Uygulanacak kemoterapi rejiminde hastalara Doksorubisin (Adriamisin) + Siklofosfamid (AC) uygulaması yapılmıştır. Aşağıda uygulanmış olan kemoterapi rejimlerinin dozları ve uygulanan ilaçlar detaylı olarak verilmiştir. Aşağıda belirtilen A veya B rejimine karar verilmesinde hastaların mevcut diğer hastalıkları göz önünde bulundurulmuştur (kronik kardiyovasküler-pulmoner hastalıklar vb.).

A Rejimi; 4 AC + 12 (Paklitaksel)

Doksorubisin (90 mg/m^2), Siklofosfamid (600 mg/m^2) 21 günde 1 kez, ardından Paklitaksel (80 mg/m^2) haftalık olarak 12 kez uygulanmıştır.

B rejimi; 4 AC + 4 (Dosetaksel)

Doksorubisin (90 mg/m^2), Siklofosfamid (600mg/m^2) 21 günde 1 kez, ardından Dosetaksel (100mg/m^2) 3 haftada 1 kez toplam 4 kür uygulanmıştır.

Bu terapi rejimlerinin yanında bazı hastalara Lucrin, Pertizumab, Trastuzumab (Herseptin) ve Karboplatin uygulamaları da yapılmıştır.

1. Örnek, kemoterapi rejimine başlamadan önce kan alınmıştır.

2. Örnek, kemoterapi rejimi bitiminin 15 gün sonrasında alınmış ve ex vivo işlemler basamağında belirtilen işlemler uygulanmıştır.

3.2.3. Ex-vivo İşlemler

Gönüllülerden rutin tetkikler için K2 EDTA'lı hemogram tüplerine alınan kan örneklerinden artan 2 ml.'lik kısım çalışma için kullanılmak üzere ayrılmıştır. Alınan tüm örnekler aynı gün soğuk zincir ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı 'na ulaştırılmış, ileri prosesler gerçekleştirilene kadar +4 ^{0}C buz dolabında saklanmıştır.

3.2.4. Genomik DNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Analiz

3.2.4.1. Genomik DNA izolasyonu ile DNA örneklerinin eldesi:

1. 1.5 ml'lik bir tüpün tabanına 20 µl Proteinaz K çözeltisi (20 mg / ml, sağlandı) pipetlendi.

2. 200 µl'lik periferik kan örneği tüpe transfer edildi.

3. 200 µl lizis tamponu tüpe eklendi. Karıştırmak için vortekslendi ve 56^0 C'de 10 dk. inkübe edildi. Kapak içerisindeki damlaların çıkması için kısaca spin attırıldı (spin down).

4. 200 µl saf etanol karışıma eklendi, karışımın iyice karışması için vortekslendi, kapak içerisindeki damlaların çıkması için kısaca spin attırıldı (spin down).

5. Karışım SV column'a dikkatli bir şekilde transfer edildi. 6000xg'nin (>8000 rpm) üzerinde 1 dk. santrifüj edildi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.

6. Wash-1 tamponundan 600 µl eklendi, 6000xg'nin üzerinde (>8000 rpm) 1 dk. santrifüj edildi ve toplama tüpleri yenisiyle değiştirildi.

7. Wash-2 tamponundan 700 µl eklendi. 6000xg'nin üzerinde (>8000 rpm) 1 dk. santrifüj edildi. Alttaki sıvı uzaklaştırıldı ve SV column toplama tüpüne tekrar takıldı.

8. Kalan yıkama tamponunu uzaklaştırmak için 1 dk. tam hızda santrifüj edildi. SV column'u yeni bir 1.5 ml tüpe yerleştirildi.

9. 40 µl elüsyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk. bekletildi. Tam hızda 1 dk. santrifüj edildi. Elde edilen DNA örnekleri -20 ^{0}C'de muhafaza edildi.

3.2.4.2. Spektrofotometrik ölçüm ile DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık analizi: Mikrosantrifüj tüplerinde muhafaza edilen DNA örneklerinden 1 µl alınarak konsantrasyon ve saflık analizi için spektrofotometre cihazında (DENOVIX/DS-11FX) ölçüldü. Konsantrasyonu 100 ng/ µl üzeri ve $OD_{260/280}$ değerleri 1.8-2.0 olan örnekler bisülfit dönüşümü ve sanger dizileme analizi için seçildi.

3.2.5. Genomik DNA'nın Bisülfit Dönüşümü

3.2.5.1. Bisülfit Dönüşümü:

1. Genomik DNA örneği çözdürüldü.

2. Bisülfit Karışımı belirli deneysel gereksinimlere göre hazırlandı. Her bir Bisülfit karışımı tozu tüpüne 850 µl BM tamponu eklendi. Tüm tozlar eriyene kadar vorteks ile karıştırıldı.

3. Tablo 3.4'e göre, Bisülfit Dönüşüm Reaksiyonunu 200 µl'lik bir santrifüj tüpünde ayarlandı.

Tablo 3. 4: Bisülfit dönüşüm reaksiyon protokolü

Komponent	Miktar
DNA örneği	X µl (optimal DNA miktarı 500-1000 ng)
ddH_2O	20- X µl (DNA ve ddH_2O hacmi 20 µl'den fazla olmamalıdır)
DP tamponu	10 µl
Bisülfit karışımı	90 µl
Toplam	120 µl

4. Tablo 3.5'e göre reaksiyon kurulumundan sonra, PCR cihazında (Blue- Ray/ tcst-9620) bisülfit dönüşüm reaksiyonu başlatıldı.

Tablo 3. 5: Bisülfit dönüşüm reaksiyonu termal döngü kondüsyonu

Sıcaklık	Süre
95 °C	10 dk.
64 °C	30-60 dk.
4 °C	∞

3.2.5.2. Bisülfit Dönüşümünden Sonra DNA Saflaştırması:

1. Kolon dengelenmesi: Bir Spin Column CB1'e 500 µl BL tamponu eklendi (kolon bir toplama tüpüne yerleştirildi), 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Toplama kolonundaki sıvı atıldı, kolon aynı toplama tüpüne geri konuldu.

2. Bisülfit Dönüşüm Reaksiyonundan sonra, reaksiyon karışımı kısa bir süre santrifüj edilerek temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

3. 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne 5 kat hacim (600 µl) PB tamponu eklendi ve karıştırıldı.

4. 7. adımdaki solüsyon Spin Column CB1'e aktarıldı (kolon bir toplama tüpüne yerleştirildi), oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildi, 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Akışkan boşaltıldı ve Spin Column CB1 aynı toplama tüpüne geri konuldu.

5. Spin Column CB1'e 600 µl PW tamponu eklendi ve 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Akışkan atıldı ve Spin Column CB1 aynı toplama tüpüne geri konuldu.

6. Spin Column CB1'e 600 µl DB tamponu eklendi, oda sıcaklığında (15-25 °C) 15 dk. inkübe edildi, 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Akışkan atıldı ve Spin Column CB1 aynı toplama tüpüne geri konuldu.

7. Spin Column CB1'e 600 µl PW tamponu eklendi ve 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Akışkan atıldı.

8. 11. adım tekrarlandı.

9. Spin Column CB1 aynı toplama tüpüne geri konuldu, Spin Column CB1'deki kalan tamponunu tamamen çıkarmak için 2 dk. boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Sonraki deneylerde kalan tamponun yan etkisini önlemek için membranı kurutmak üzere kolon birkaç dakika oda sıcaklığında tutuldu.

10. Spin Column CB1 temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve membranın ortasına 20 µl EB tamponu eklendi ve oda sıcaklığında (15-25 °C) 2 dk. inkübe edildi. 12.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi ve bisülfitlenmiş DNA mikrosantrifüj tüpünde toplandı. Konsantrasyonu ~ 40 ng/µl ve $OD_{260/280}$ değeri 1.8-2.0 olan bisülfitlenmiş DNA örnekleri MSP analizinde kullanılmak üzere -20 °C soğutucuda muhafaza edildi.

3.2.6. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Metilasyon-Spesifik PCR

MSP analizinin gerçekleştirilmesinde bisülfitli DNA örnekleri kullanıldı. Analiz için kullanılan primerlere ait bilgiler Tablo 3.6'da belirtilmiştir. Real-time PCR reaksiyonu ile metilasyon seviyelerinin belirlenmesinde EvaGreen (HRM Analysis Kit, Cat. No. 4992873, Tiangen, China) içerikli kit kullanılmış, reaksiyon basamakları üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Tüm HRM PCR reaksiyonları buz üzerinde uygulandı. PCR reaksiyonu için komponentler ve miktarları Tablo 3.7'de belirtildiği şekilde kullanıldı.

Tablo 3. 6: MSP analizinde kullanılan primerlere ait bilgiler

GEN	PRİMER DİZİSİ	UZUNLUK (bç)	CpG	Tm (^{0}C)
KDM5A	**F:** GAAGAAGGAAAGGTTAGATATATAGG **R:** ACCTAACTAAAACCCACTAAACCC	256	15	62
KDM5B	**F:** GTATTTTGGGTTTTTTTAGTTTT **R:** AAATAAAATAAAACTCTTTTTCCTC	100	13	59
KDM5C	**F:** GGTTTTTATTATATGAAGGTTTTTTAGG **R:** AAAAATCTCAAACTAACTCTACTACTACC	267	21	62
EZH2	**F:** GAGGGGAAGGGGTATGATATT **R:** AACTTAACATAAAACCAAACCAAAC	287	43	59
TFAP2C	**F:** GGGGAGGAGTTATGATAATTTTTTT **R:** CCAATTAAATCCAAAATCCCC	271	31	62
ZMYND8	**F:** AGTTGTAGGTAAAATTTTATTATTTA **R:** ACTTTTTCACTAAACTTCCTATAAC	182	16	59
SIN3B (Ekzon 19-20)	**F:** TAGTTTGGTGTAGGATTGGTTGAT **R:** CAAAAAAACTAAAAAATACCTCTCAC	256	22	59
SIN3B (Ekzon 1-2)	F: TTGGAGATTATGAAGGAGTTTAAAAGT R: CCACAAAATAAATACTACCCATTTC	216	7	59

* bç, baz çifti; CpG; bölgedeki sitozin-guanin miktarı; Tm, primer bağlanma sıcaklığı.

Tablo 3. 7: HRM analizinde kullanılan PCR protokolü

Komponent	20 µl hacim	Final Konsantrasyon
2× HRM Analysis PreMix	10 µl	1X
Forward Primer (10 µM)	0,6 µl	0.3 µM*
Reverse Primer (10 µM)	0,6 µl	0.3 µM*
Kalıp DNA	1 µl	40 ng
RNase-Free ddH_2O	7,8 µl	-

Son aşamada örnekler MSP işlemi için Real-time PCR cihazına (LightCycler 480 II, Cat No. 04 545 885 001, Roche, Germany) alındı. PCR aşamaları, Tablo 3.8'deki gibi ayarlandı.

Tablo 3. 8: Real-time amplifikasyonu aşamaları

Aşama	Döngü	Sıcaklık	Süre	Basamak	Sinyal Koleksiyonu
Başlangıç denatürasyonu	1X	95 ^{0}C	2 dk.	Başlangıç denatürasyonu	N
PCR	40X	95 ^{0}C	10 sn.	Denatürasyon	N
		60 ^{0}C	20 sn.	Primerlerin bağlanması	N
		72 ^{0}C	30 sn.	Uzama	Y
Erime /Ayrılma Eğrisi Basamağı$^{\Delta 2}$					

MSP analizinin gerçekleştirilmesinde Roche LightCycler 480 qPCR Software V.1.5 kullanıldı. Metilasyon seviyelerinin tespitinde Gene scanning analizi yapıldı. Sonuçlar standart kontrol (Epitect PCR control, Cat No. 59695, Qiagen, Germany) ile karşılaştırılarak metilasyon seviyeleri belirlendi.

3.2.7. Konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplikonların Eldesi

Metilasyon bölgeleri incelenen KDM5A, KDM5B ve KDM5C gen bölgelerinde hastalık ile ilişkili olası varyantların tespit edilmesi için PCR reaksiyonu sonrası Sanger dizileme analizi yapılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplikonların eldesi için ilişkili gen bölgelerinin çoğaltılması işleminde kullanılan primerler Tablo 3.9'da bileşenler ve miktarları ise Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3. 9: Amplikonların eldesinde kullanılan primerlere ait bilgiler

GEN	PRİMER	Tm (^{0}C)	UZUNLUK (bç)
KDM5A	F: GGGGAAGAGAAGAAGAAGGA R: GTGGAGAAAAGCTGGCTGAA	54	276
KDM5B	F: GAGCAACAGCAAGTCCGAGT R: CTACCAGACTTAACTTCTTCAG	63,1	303
KDM5C	F: CCCCTTCCAAATAGAAACCC R: ACTCTACTGCTACCGCCTCTT	54	293

* bç, baz çifti; Tm, primer bağlanma sıcaklığı.

Tablo 3. 10: Konvansiyonel PCR bileşenleri ve miktarı

Bileşen	25 µl hacim	Konsantrasyon
Taq DNA polymerase	0,5 µl	5U/µl
10X PCR buffer (Mg^{2+})	5 µl	-
Forward Primer	1 µl	10 µM
Reverse Primer	1 µl	10 µM
Kalıp DNA	2 µl	0.05 µg-0.5 µg
ddH_2O	40,5 µl	-

PCR TurboCycler 2 Thermal Cycler (Blue-Ray Biotech Corp., Cat No. TCST-9612 / TCST-9622, Taiwan) cihazı kullanıldı. PCR koşulları Tablo 3.11'deki şekilde ayarlandı.

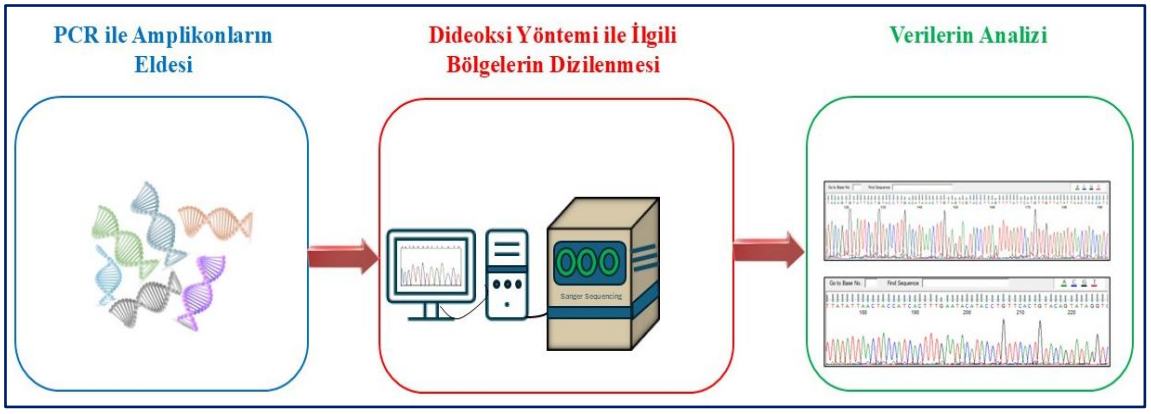
Tablo 3. 11: Konvansiyonel PCR reaksiyonu koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	94 ^{0}C	5 dk.	1
Denatürasyon	94 ^{0}C	30 sn.	35
Primerlerin Bağlanması	54/63,1 ^{0}C	30 sn.	
Uzama	72 ^{0}C	30 sn.	
Son uzama	72 ^{0}C	7 dk.	1
Cooling	4 ^{0}C	∞	1

PCR ürünleri %2'lik jel hazırlanarak 90 V elektrik akımında 500 mA'de 1 saat yürütülerek ilgili bölgelerin amplifikasyonu transuliminatör cihazında (Syngene gel imaging system, G: BoxF3, UK) görselleştirildi. İlgili bölgelerin dizilenmesi için Sanger dizileme yöntemi kullanıldı.

3.2.8. Sanger Dizileme Metodu Kullanılarak İlgi Gen Bölgelerinin Analizi

Elde edilen PCR ürünlerinin amplifikasyonunun ardından sanger dizileme aşamaları PCR yöntemi ile amplikonların eldesi, amplikonların pürifiye edilmesi, dideoksi yöntemi ile sekanslama, sekanslanan ürünlerin pürifikasyonu, kapiler elektroforez ve verilerin analizi şeklinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1: Sanger dizileme yöntemi ile sekans verilerinin eldesi.

3.2.8.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması: PCR işlemi sonrası tüp içeriğinde reaksiyondan arta kalan primer, enzim, buffer gibi maddeler Sanger dizilemeyi inhibe edici etki gösterirler. Bu nedenle PCR ürününün saflaştırılması gerekir. Bu işlem ADS Sequencing Exo-Alp enzimi (ADSTM Exo-Alp PCR Cleanup Mix, Cat No. 320100, Livermore, CA) ile gerçekleştirildi. Saflaştırma aşamasında hazırlanan karışım Tablo 3.12'de ve gerekli sıcaklık döngüleri Tablo 3.13'de belirtilmiştir.

Tablo 3. 12: ADS Sequencing Exo-Alp ile PCR ürünlerinin saflaştırılması için kullanılan bileşenler

Bileşen	Miktar (µl)
Exo-Alp PCR Cleanup Mix	2
PCR Ürünü	5

Tablo 3. 13: ADS Sequencing Exo-Alp ile PCR ürünlerinin saflaştırılmasında uygulanan sıcaklıklar ve süreler

Aşama	Sıcaklık (^{0}C)	Süre (dk.)
1.	37	15
2.	80	15

3.2.8.2. Sekans PCR Aşaması: Enzimatik işlem ile PCR ürününün saflaştırılmasının ardından Sanger dizilemesi yapılacak örneğin tek yön primer ile sekans PCR'ı hazırlandı (SupreDye™ v3.1 Cycle Sequencing Kit, Cat No. 160001,

AdvancedSeq, Livermore, CA). Hazırlanan karışımın içeriği Tablo 3.14'te ve PCR döngüsü Tablo 3.15'te verilmiştir.

Tablo 3. 14: Tek yön primer ile sekans PCR'ı için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
ADS SupreDye v3.1 Cycle Sequencing Kit	0,7
ADS 5x Sequencing Reaction Buffer	3
Primer (10 µM)	0,7
dH_2O	8,6
Template	2
Toplam	**15**

Tablo 3. 15: Tek yön primer ile sekans PCR'ı için uygulanan PCR için protokol

Sıcaklık (^{0}C)	Süre	Döngü
96	1 dk	1
96	10 s	30
50	5 s	
60	4 dk	
4	∞	-

3.2.8.3. Clean up Aşaması ve kapiler elektoroforez ile sekans işleminin gerçekleştirilmesi: Sekans PCR'ı tamamlandıktan sonra örnekler cihaza yüklenmeden önce son bir clean-up aşaması gerçekleştirildi. Bu aşamada sekans PCR reaksiyonundan kalan kontaminantların (florasan boyalar, tuzlar, dNTP, primer ve enzim) temizlenmesi amaçlandı. Çalışma için Cytiva Sephadex G-50 Fine (Sephadex™ G-50 Fine, Cat No. 17004201, USA) ürünü kullanıldı. 1 gr. Sephadex tozu 14 ml su ile karıştırılıp 20 örneği saflaştırmak için hazır hale getirildi. Bu doğrultuda örnek sayısı kadar bir hesaplama yapıldı ve Sephadex tozuna su ilave edilerek falkon tüpü kuvetlice vortekslendi. Kullanımdan önce 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Örnek sayısına göre ANAGEN saflaştırma kolonları ve tüpleri çıkartıldı ve her kolona 700 µl Sephadex solüsyonu eklendi. Tüpler 4500 rpm'de 2 dk. santrifüjlendi. Alt tüpleri çıkartılarak kolonlar yeni tüplerin üzerine konuldu ve daha önce PCR yapılan 15 µl reaksiyon hacmi mikropipet ile rijit oluşturulmuş sephadex kolonuna değmeden eklendi. 4500 rpm'de 2 dk. santrifüjlendi. Kolondan geçerek saflaşan örnek tüpün dibinde toplandı. Bu reaksiyon

hacmi mikropipet ile şeffaf Sanger plate'ine aktarıldı. Bu şekilde dizilenecek örnek cihaza yüklenmeye hazır hale getirildi. İşlem sonrası DNA dizileri Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer cihazı ile elde edildi.

Sanger dizileme cihazında sekanslanan numuneler (Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer, A3130XL, USA) ".ab1" dosyaları olarak dönüştürülmüştür. "AB1" dosyaları, Chromas (http://www.technelysium.com.au/chromas.html) ve ABI Dizi Tarayıcı (http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home.html) dahil olmak üzere farklı yazılım programı kullanılarak analiz edilmiştir (141).

3.2.9. İstatistik Analizler

Grup büyüklüğü sonuçların değişkenliği hakkında yeterli bilgi verebilecek sayıda oluşturulmuştur (Gpower V.3.1.9.7, Effect size: 0,8 / α err prob: 0,05 / Power (1-β err prob): 0,80). Toplanan verilerin analizi SPSS V.25.0 bilgisayar programı ile yapılmıştır. Çalışma grubuna ait ortalama değerin önceden belirlenen değerden farklı olup olmadığı ve var olan değişkenler açısından bağımsız olan iki grup arasında fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi, Wilcoxon testi, ANOVA testleri ile yapılan analiz sonucu belirlenmiştir. P değeri <0,05 olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tedavi yanıtları klinik, ultrason veya magnetik rezonans görüntüleme ile "response evaluation criteria in solid tumors (RECIST)" criteria 1.1'e göre değerlendirilmiştir (142). Metilasyon miktarlarının tedaviye yanıt açısından öngördürücülüğü belirlenirken, RECIST kriterleri ile ilişkilerinin önemi Fisher's exact testi ile, bu ilişkinin yönü ve kuvveti ise lojistik regresyon modellerine dayanan "likelihood ratio" testi ile belirlenmiştir. Tedavi sonrası rezeksiyon materyalindeki histopatolojik skorlamanın neoadjuvan kemoterapi skor yanıtlarının metilasyon seviyeleri ile ilişkisi de analiz edilmiştir.

3.2.10. Biyoinformatik Analizler

Metilasyon seviyelerinin sağ kalımın bağımsız göstergesi olarak etkisi Cox regresyon analizi ile incelenmiştir. Bu programlar gerekli olan hem rakamsal hem de grafiksel tüm gereksinimleri (Heatmapping, Scatter plots, Volcano plot, Box plot, Bar chart vb.) kapsayacak özelliktedir. MSP analizi için CpG adalarının yoğun olduğu bölgeler DataBase of CpG islands and Analytical Tool (DBCAT) (http://dbcat.cgm.ntu.edu.tw/) online aracı ile tespit edilmiştir. Sanger verilerinin analizi

için Galaxy (https://usegalaxy.eu/) platformundan yararlanılmıştır. Filtreleme sonucu gönüllülerde tespit edilen varyantların hizalama düzenlemeleri, analizi ve görselleştirilerek referans genom ile karşılaştırılması Jalview V.2.11.4.0 (https://www.jalview.org/download/) programı ile yapılmıştır. Sekanslamanın ardından dizilerin illüstrasyonu Finch TV V.1.4.0 (https://digitalworldbiology.com/FinchTV) kromatogram görüntüleyici ve Snapgene Viewer 4.3.11 (https://www.snapgene.com/snapgene-viewer) programları ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gen bölgelerinde tespit edilen varyantların incelenmesinde Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html), dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/), SNPedia (https://www.snpedia.com/), ExAC database (https://gnomad.broadinstitute.org/) ve ClinVar database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) programları kullanılmıştır. Metilasyon spesifik PCR ve konvansiyonel PCR işlemleri için kullanılmak üzere primer dizilerinin tasarlanmasında MethPrimer (https://www.urogene.org/methprimer/index.html), BiSearch (http://bisearch.enzim.hu/?m=msp) ve Primer3web V.4.1.0 (https://primer3.ut.ee/) veri tabanları kullanılırken, incelenecek bölgelerin in silico validasyonunda Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?GROUP_TARGET=on) ve UCSC In-Silico PCR (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr) veri tabanları kullanılmıştır. İncelenen genlerin diğer genlerle etkileşimleri, biyolojik prosesler, yolak analizleri ve hastalık ilişkilerinin incelenmesinde ise Gene Ontology (http://geneontology.org/), GeneMANIA (https://genemania.org/), Reactome (https://reactome.org/), KEGG PATHWAY Database (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html), Cytoscape V.3.10.1 (https://cytoscape.org/download.html) ve DisGeNET (https://www.disgenet.org/) programları kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. GÖNÜLLÜLERİN KLİNİK KARAKTERİSTİĞİ VE DEĞERLENDİRMELERİ

Çalışma sonucunda İstanbul Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda meme kanseri tanısı konan ve NAK tedavisi alan 20 hasta ve 30 sağlıklı bireyin klinik verileri elde edilmiştir. Tablo 4.1'de iki grubun demografik verileri paylaşılmış, istatistik analizlere göre yaş (P=0,014), meslek (P=0,002) ve aile öyküsü (P<0,001) bakımından anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması 48,15 (Standart sapma (S.S.): ±8,242) iken, sağlıklı grubun yaş ortalaması 40,80 (Standart sapma (S.S.): ±12,178) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4. 1: Hasta ve kontrol grubunun demografik verileri.

Değişken		Hasta		Sağlıklı			P değeri
		Ort. (%)	**S.S. (±)**	**Ort. (%)**	**S.S. (±)**	**CI (%95) L-U**	
Yaş		48,15	8,242	40,80	12,178	1,544 13,156	**0,014**
VKİ		28,159	5,051	26,323	4,793	-1,591 4,823	0,222
		N	**%**	**N**	**%**	**CI (%95) L-U**	
Meslek							
	Ev hanımı	13	72,2	10	33,3	0,001 0,003	**0,002**
	Öğrenci	0	0,0	4	13,3		
	Çalışan	5	27,7	14	46,7		
	Emekli	0	0,0	2	6,7		
Aile öyküsü							
	Var	11	61,1	3	10,0	-	**< 0,001**
	Yok	7	38,9	27	90,0		
Sigara Kullanımı							
	Hiç İçmemiş	13	72,2	23	76,7	0,844 0,863	0,786
	İçmiş Bırakmış	1	5,6	1	3,3		
	İçiyor	4	22,2	6	20,0		
Alkol Kullanımı							
	Var	0	0	0	0	-	0,155
	Yok	18	100	30	100		

* **Ort.,** ortalama; **S.S.,** standart sapma; **CI,** güven (belirsizlik) aralığı; **L-U,** en düşük-en yüksek; **VKİ,** vücut-kitle indeksi.

Hasta ve sağlıklı bireylerin biyokimyasal parametrelerinin karşılaştırılarak istatistik analizlerin ortaya konmasıyla ALT (P=0,002) ve Mg (P=<0,001) değerlerinde istatistik olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4. 2: Biyokimyasal veriler.

Değişken	Hasta		Sağlıklı			P değeri
	Ort. (%)	S.S. (±)	Ort. (%)	S.S. (±)	CI (%95) L-U	
Glukoz (mg/dL)	104,0565	28,65577	87,6364	9,60925	2,2321 30,6261	0,136
LDH (U/L)	205,5600	35,86840	188,7407	33,50958	-5,53971 39,17823	0,136
ALP (gr/L)	70,5440	12,48179	67,4091	19,87259	-8,62475 14,89456	0,592
Üre (mg/dL)	27,680	6,91375	21,062	5,40097	-,2413 2,4421	0,061
Kreatinin (mg/dL)	0,6782	0,15669	0,6627	0,07704	-0,0656 0,0966	0,721
Albümin (g/dL)	4,5156	0,25817	4,4304	0,29179	0,2010 0,2165	0,269
Ürik Asit (mg/dL)	4,2567	0,88438	4,7696	0,88638	-1,13565 0,10972	0,104
Total Protein (mg/dL)	7,0407	0,41398	5,9852	3,164869	0,064 0,074	0,07
AST (U/L)	21,1112	9,94423	17,6767	4,51722	-,81525 7,68427	0,111
ALT (U/L)	27,1789	12,73974	15,9967	4,98622	4,64050 17,72394	**0,002**
GGT (U/L)	23,2571	10,21645	24,6667	34,23025	-20,53446 17,71541	0,882
CRP (mg/L)	5,1465	7,43566	3,4132	2,22733	-1,9187 5,3860	0,528
K^{+1} (meq/L)	4,3794	0,27541	4,3418	0,28790	-0,13474 0,21005	0,662
Ca^{+2} (mg/dL)	9,6060	0,58639	9,5964	0,52029	-0,34180 0,36095	0,956
Mg^{+2} (mg/dL)	0,7958	0,07971	1,8231	0,35913	-1,24763 -,80686	**<0,001**
Na^{+2}	140,111	2,1390	139,011	2,2434	-,2413 2,4421	0,105
Cl^{-2}	100,729	2,2825	104,190	3,0269	-8,119 8,977	0,190

* **Ort.,** ortalama; **S.S.,** standart sapma; **CI,** güven (belirsizlik) aralığı; **L-U,** en düşük-en yüksek; **LDH,** laktat dehidrogenaz; **ALP,** alkalen fosfataz; **AST,** aspartat aminotransferaz; **ALT,** alanin aminotransferaz; **GGT,** Gama-glutamil transferaz; **CRP,** C-reaktif protein; **K,** potasyum; **Ca,** kalsiyum; **Mg,** magnezyum; **Na,** sodyum; **Cl,** klor.

Hastaların evrelemeleri sonucunda bir hastada Tumor in situ (TİS) olduğu görülmüştür. Tedavinin tamamlanmasının ardından ise bir hasta akciğer ve karaciğer metastazı olduğu belirlenmiştir. Patolojik tümör boyutunun milimetre (mm) seviyesinde incelenmesi ile en büyük tümör boyutu 146 mm olarak belirlenmiştir.

Hastaların alt tipleri ve NAK terapisi ile ilgili bilgiler incelendiğinde, içsel alt tip değerlendirmelerine göre hastaların 3'ü Luminal A, 6'sı Luminal B, 7'si HER2-pozitif ve 4'ü Triple-negatif olarak belirlenmiştir. Hastaların alt tiplerinin anatomik ve tur-cut histolojik tipinin ortaya konmasıyla bir hastanın in situ duktal karsinom'u olduğu görülmüştür. Hastalara uygulanan 4 AC+12 Paklitaksel / 4 AC+4 Dosetaksel terapilerinin dışında bazı hastalara Lucrin, Pertizumab, Trastuzumab ve Karboplatin ilaçları da uygulanmıştır. NAK sonrası cerrahi operasyonun ardından bazı hastalara Trastuzumab gibi adjuvan kemoterapiler uygulanmaya devam edilmiştir. NAK yanıtı ortalaması %78,42 iken, patolojik tümör boyutu 135 mm olan bir hastada minimal oranda regresyon (%5) görülmüştür.

Hastaların menopoz durumu, Ki-67, hormon reseptörleri, antijen verileri Tablo 4.3'te paylaşılmıştır. Ki-67 ortalaması %43,45, CEA seviyeleri ortalaması 1.528 ve CA 15-3 değeri ise 26.57 şeklindeydi. Hastaların %35'i post-menopoz dönemdeydi. Tümör yanıtının Ki-67 (P=0,320), CEA (P=0,391) ve CA 15-3 (P=0,395) ile analizinin sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Bu değerlerin spearman korelasyon analizi sonuçları değerlendirildiğinde, Ki-67 ve CEA (Spearman's rho, 0,392; P=0,148) arasında pozitif yönlü orta düzeyde ilişki, Ki-67 ve CA 15-3 (Spearman's rho, 0,180; P=0,521) arasında zayıf pozitif ilişki, CEA ve CA 15-3 (Spearman's rho, 0,436; P=0,521) arasında ise orta düzeyde pozitif ilişki tespit edilmiş, ancak hiçbir değer için istatistik anlamlılık belirlenmemiştir.

Tablo 4. 3: Hastaların klinik verileri.

Hasta Kodu	Menopoz Durumu	Ki-67 (%)	ER	PR	HER2	CEA	CA 15-3
Hasta 1	Post-Menopoz	75	%10	Neg	Neg	5.35	43.46
Hasta 2	Pre-Menopoz	70	Neg	Neg	Neg	1.86	13.09
Hasta 3	Pre-Menopoz	5	%70	%70	Neg	1.22	17.66
Hasta 4	Post-Menopoz	60	Neg	Neg	Neg	_	_
Hasta 5	Pre-Menopoz	3	Neg	Neg	Pozitif	0.75	12.16

Tablo 4. 3: devamı.

Hasta 6	**Pre-Menopoz**	**30**	**%60**	**%60**	**Neg**	**1.71**	**18.9**
Hasta 7	Post-Menopoz	50	Neg	Neg	Neg	2.64	60.86
Hasta 8	Pre-Menopoz	50	%90	Neg	Neg	0.74	26.4
Hasta 9	Pre-Menopoz	25	Neg	Neg	Pozitif	0.3	5.56
Hasta 10	Post-Menopoz	30	Neg	Neg	Neg	_	_
Hasta 11	Pre-Menopoz	80	%20	Neg	Neg	0.69	18
Hasta 12	Pre-Menopoz	90	%10	Neg	Neg	_	_
Hasta 13	Pre-Menopoz	40	Neg	Neg	Pozitif	_	_
Hasta 14	Pre-Menopoz	20	%95	%50	Pozitif	1.15	45.2
Hasta 15	Pre-Menopoz	30	Neg	Neg	Pozitif	2.3	39.4
Hasta 16	Pre-Menopoz	16	%80	%2	Pozitif	0.88	29.7
Hasta 17	Post-Menopoz	10	%50	Neg	Pozitif	0.52	23.9
Hasta 18	Post-Menopoz	30	Neg	Neg	Pozitif	0.94	24.51
Hasta 19	Pre-Menopoz	5	%85	%20	Neg	_	_
Hasta 20	Post-Menopoz	50	Neg	Neg	Pozitif	1.77	15.38

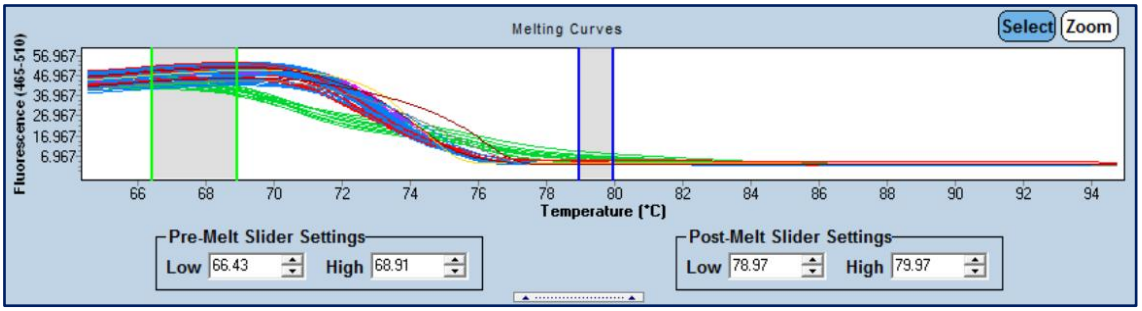
* **Ki-67,** antijen Kiel 67(Kiel 67 çoğalma belirteci); **ER,** östrojen reseptörü; **PR,** progesteron reseptörü; **HER2,** insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; **CEA,** karsinoembriyonik antijen; **CA 15-3,** karsinom Antijeni 15-3.

4.2. METİLASYON SPESİFİK PCR ANALİZ SONUÇLARI

High-Resolution Melting" (HRM) temelli metilasyon analizinin sonucu gen bölgelerindeki metilasyon yüzdeleri literatürde belirtildiği şekilde aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Tmo, %0 metile standart; Tm100, %100 metile standart) (143).

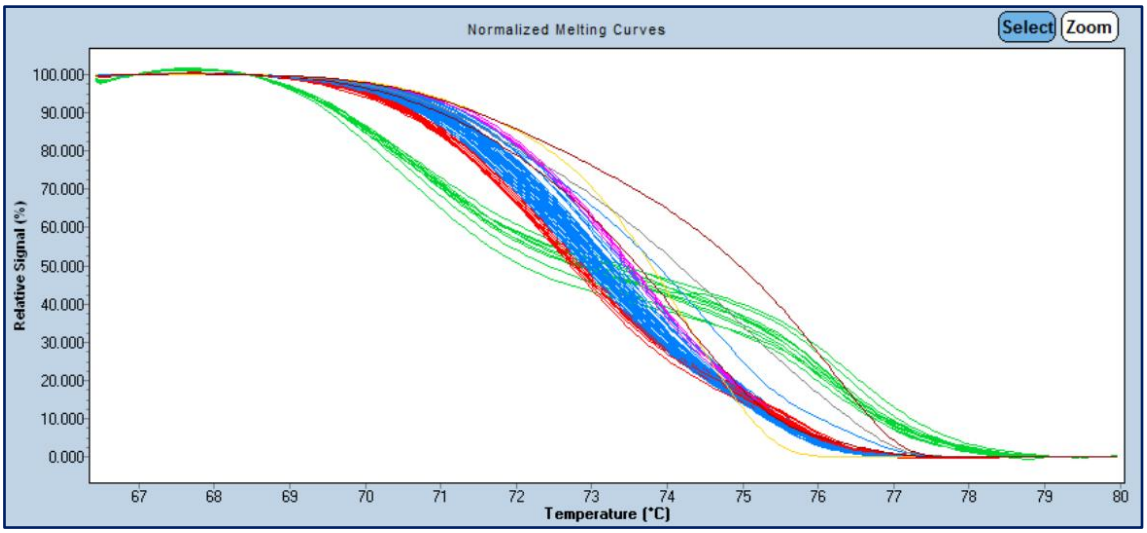
$$\%Metilasyon = \frac{Tmörnek - Tmo}{Tm100 - Tmo} x100$$

Şekil 4.1 ve 4.2'de gene scaning analizi sonuçlarına ait melting curves ve normalized melting curves eğrileri gösterilmiştir. Standart olarak %0, %50, %75 ve %100 metilasyon seviyeleri olan DNA'ların, tedavi öncesi ve sonrası hastaların ve sağlıklı grubunun Tm değerleri analiz edilerek metilasyon seviyeleri incelenmiştir. Grafiklerde çift iplikli DNA'nın melting (ayrılma) süreci gösterilmiştir. DNA'nın metile bölgeleri daha stabil olmakla birlikte, Tm'in yüksek olması metilasyonun fazlalığı, düşüklüğü ise metilasyonun azlığı ile ilişkilidir.



Şekil 4. 1: Gene Scaning analizi, Melting Curves görüntüsü.

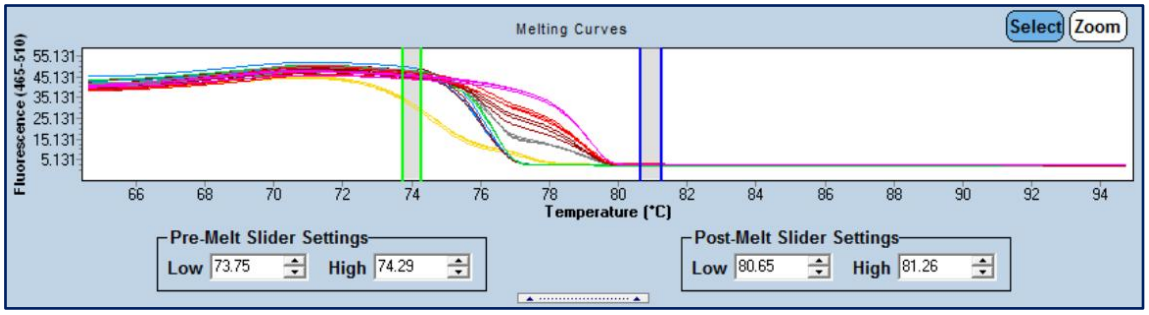
* Standartlar %0, %50, %75 ve %100 olarak seçilmiştir.



Şekil 4. 2: Gene Scaning analizi, Normalized Melting Curves görüntüsü.

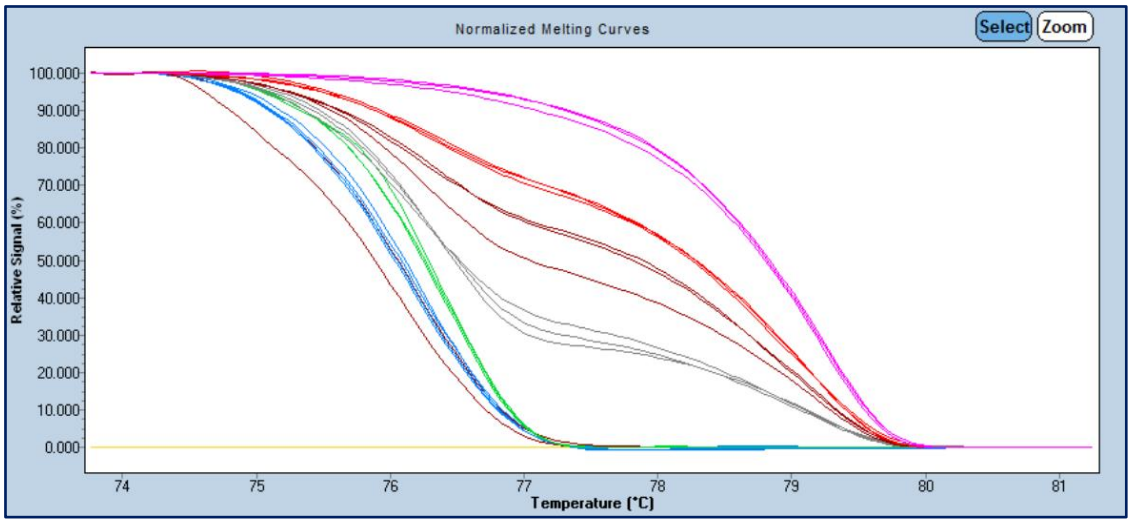
* Standartlar %0, %50, %75 ve %100 olarak seçilmiştir.

Şekil 4.3 ve 4.4'te ise gene scaning analizi sonuçlarına ait difference plot melting curves ve difference plot normalized melting curves eğrileri gösterilmiştir. Difference plot grafikleri melting curve sonuçlarının normalizasyonu yapılıp standart ile karşılaştırılması ile oluşmaktadır. Heterodupleks oluşumu ve varyasyonların saptanması için kullanılan bu grafik floresan farklı (Y ekseni) ve sıcaklık (X ekseni) verilerini göstermektedir.



Şekil 4. 3: Gene Scaning analizi, Difference Plot Melting Curves görüntüsü.

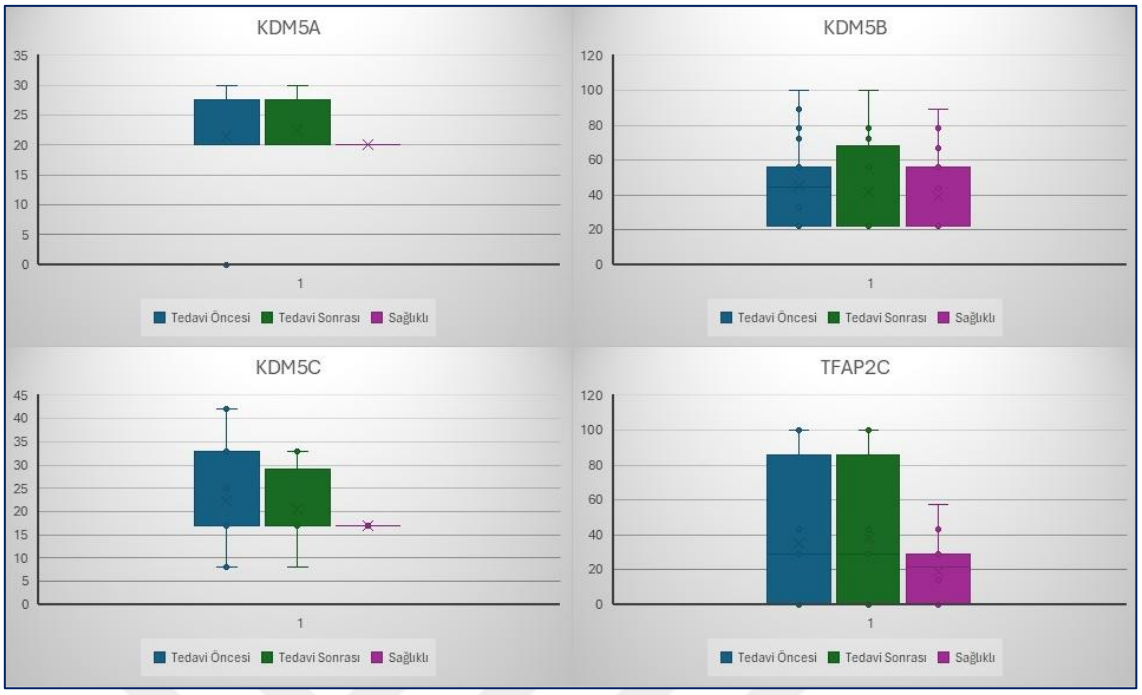
* Standartlar %0, %50, %75 ve %100 olarak seçilmiştir.



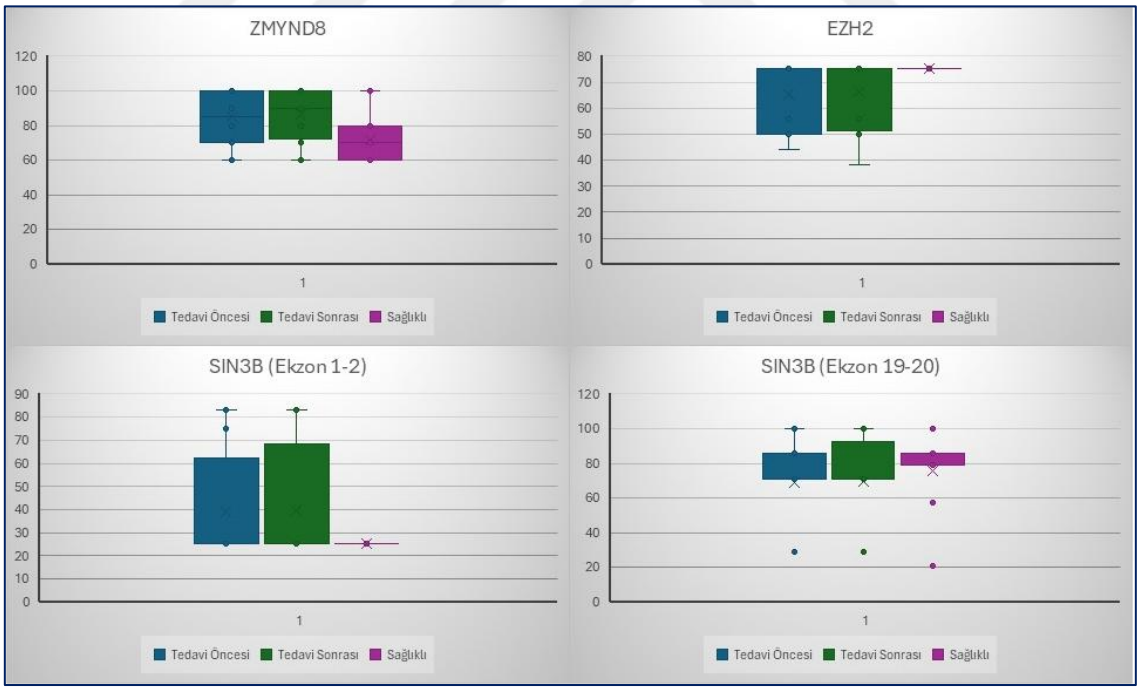
Şekil 4. 4: Gene Scaning analizi, Difference Plot Normalized Melting Curves görüntüsü.

* Standartlar %0, %50, %75 ve %100 olarak seçilmiştir.

NAK tedavisi öncesi, sonrası ve sağlıklı grup arasında KDM5A, KDM5B, KDM5C, EZH2, TFAP2C, ZMYND8, SIN3B (Ekzon 19-20) ve SIN3B (Ekzon 1-2) gen bölgesi metilasyon seviyelerinin karşılaştırmaları neticesinde, KDM5A (P=0,037), EZH2 (P=0,001), ZMYND8 (P=0,001) ve SIN3B (Ekzon 1-2) (P=0,013) gen bölgelerinde anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gruplar arası metilasyon seviyelerindeki farklılık ve gruplardaki heterojen dağılım durumu gösterilmiştir.



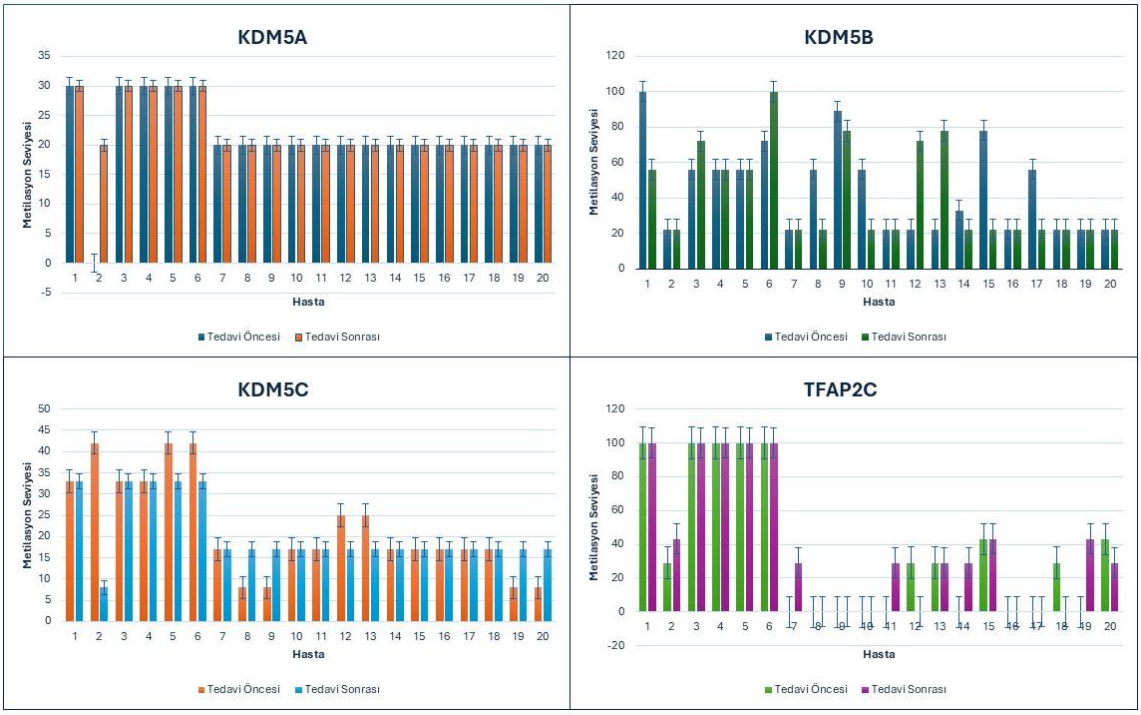
Şekil 4. 5: KDM5A, KDM5B, KDM5C ve TFAP2C gen bölgelerinin metilasyon seviyeleri.



Şekil 4. 6: ZMYND8, EZH2, SIN3B (Ekzon 1-2) ve SIN3B (Ekzon 19-20) gen bölgelerinin metilasyon seviyeleri.

KDM5A (P= 0,794), KDM5B (P= 0,566), KDM5C (P=0,800), EZH2 (P=0,754), TFAP2C (P=0,650), ZMYND8 (P=0,778), SIN3B (Ekzon 19-20) (P=0,904) ve SIN3B

(Ekzon 1-2) (P=0,928) metilasyon değerlerinin tedavi öncesi ve sonrası analizinde ise gruplar arasında istatistik anlamlılık tespit edilmemiştir. Şekil 4.7 ve 4.8'de gen bölgelerinin metilasyon seviyeleri tedavi öncesi ve sonrasına göre karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



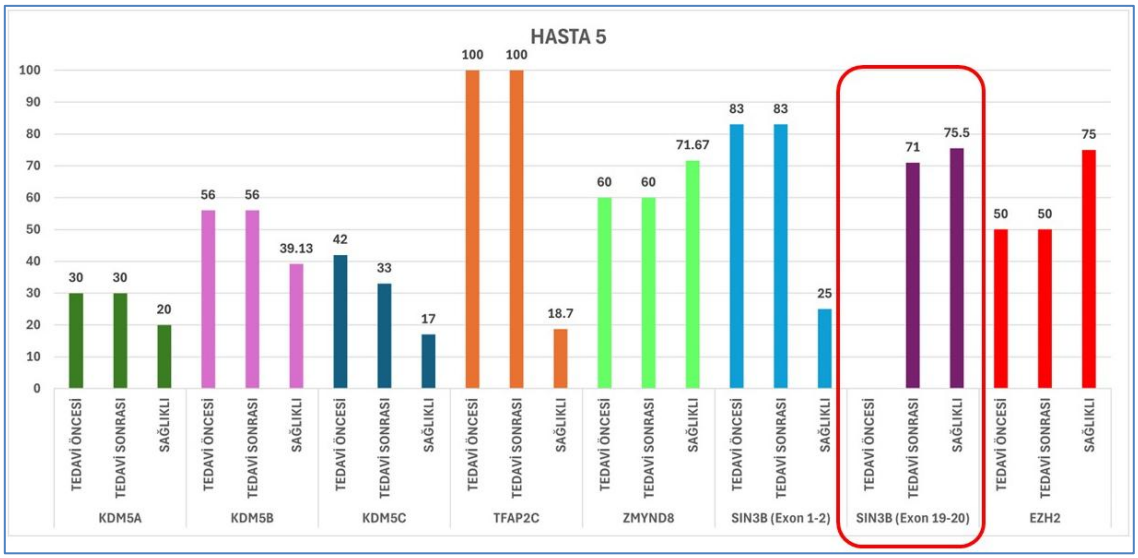
Şekil 4. 7: Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastaların KDM5A, KDM5B, KDM5C ve TFAP2C gen bölgelerinin metilasyon seviyeleri.



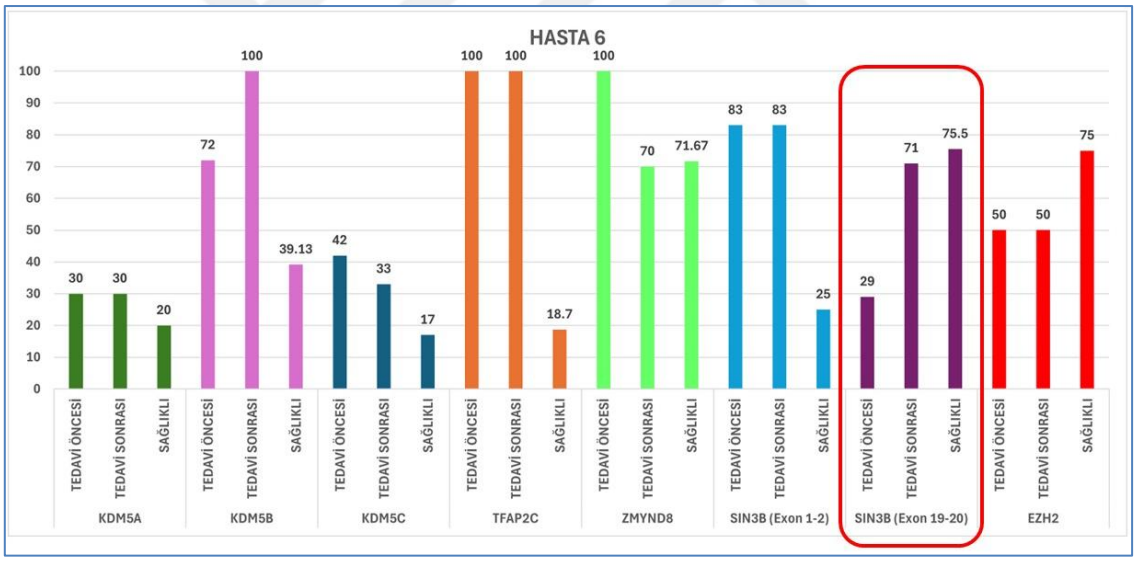
Şekil 4. 8: Tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastaların ZMYND8, EZH2, SIN3B (Ekzon 1-2) ve SIN3B (Ekzon 19-20) gen bölgelerinin metilasyon seviyeleri.

Tam ve kısmi yanıt veren hastalarda tedavi öncesi ve sonrası metilasyon değerlerine göre kısmi yanıt veren 5 hastada KDM5C (Hasta 9 ve 19), EZH2 (Hasta 17), TFAP2C (Hasta 19) ve SIN3B (Ekzon 19-20) (Hasta 5 ve 6) gen bölgelerinde tedavi öncesi ve sonrası metilasyon seviyelerinde değişim gözlenirken, tam yanıt veren 7 hastada ise KDM5A (Hasta 2), KDM5B (Hasta 12 ve 13), KDM5C (Hasta 8, 12, 13 ve 20), EZH2 (Hasta 2), TFAP2C (Hasta 14 ve 18) ve SIN3B (Ekzon 19–20) (Hasta 20) gen bölgelerinde metilasyon seviyelerinde değişim olduğu görülmüştür.

Tedaviye patolojik olarak kısmi yanıt veren hastaların tedavi öncesi ve sonrası metilasyon seviyelerine göre, Hasta 5'te (Şekil 4.9) tedavi öncesinde hipometile olarak gözlemlenen SIN3B (Ekzon 19-20) geninin tedavi sonrasında %71'e yükseldiği, aynı gen için Hasta 6'da (Şekil 4.10) ise %29'dan %71'e kadar yükselme tespit edilmiştir.

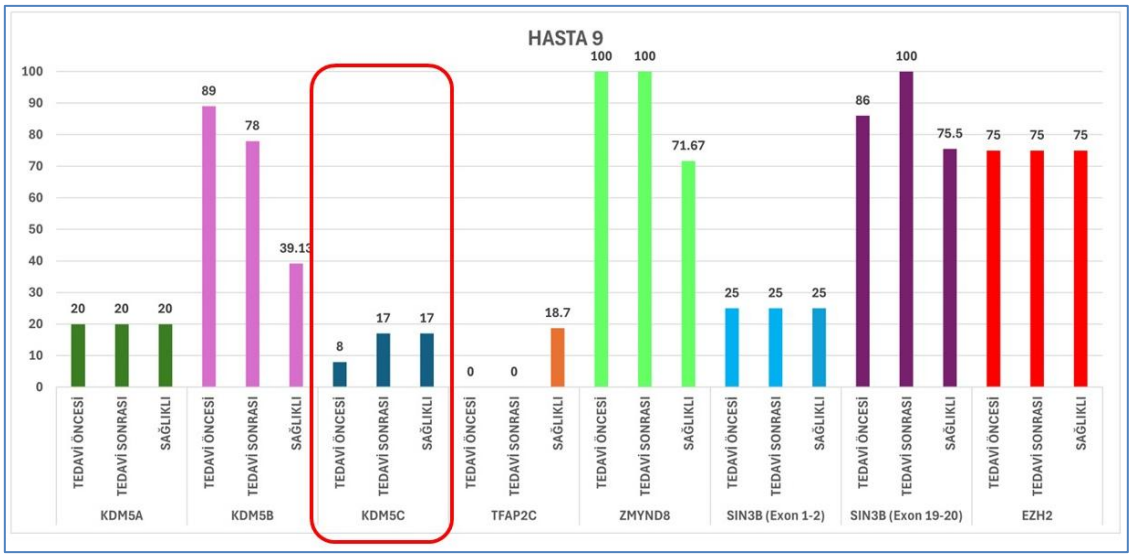


Şekil 4. 9: Hasta 5 için tedavi öncesi ve sonrasında SIN3B (Ekzon 19-20) genindeki metilasyon seviyesi değişimleri.



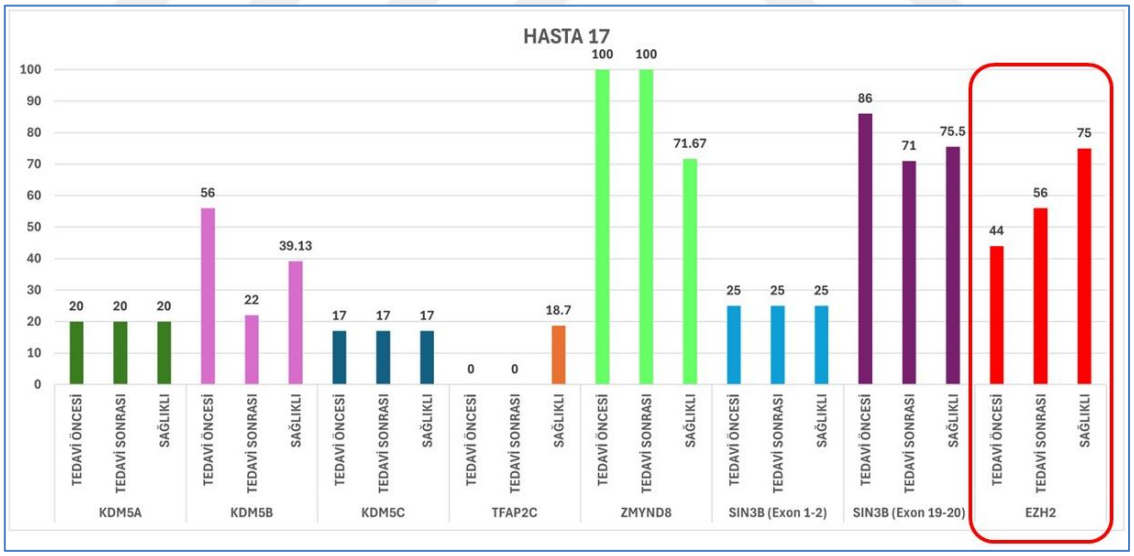
Şekil 4. 10: Hasta 6 için tedavi öncesi ve sonrasında SIN3B (Ekzon 19-20) genindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

Tedaviye kısmi yanıt veren Hasta 9'un metilasyon seviyelerine göre, KDM5C geninin tedavi öncesinde %8 olarak gözlemlenen metilasyon seviyesi %17'ye yükselmiştir (Şekil 4.11).



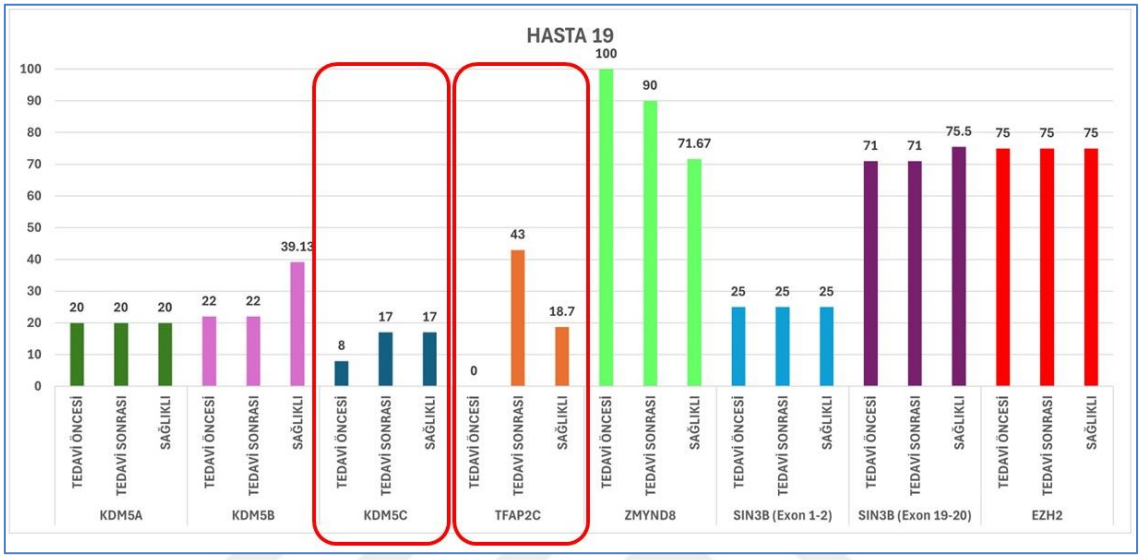
Şekil 4. 11: Hasta 9 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5C genindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

Kısmi yanıt görülen Hasta 17'de EZH2 geni için tedavi öncesi %44 olarak seyreden metilasyon seviyesi, tedavi sonrasında %56'ya yükselmiştir (Şekil 4.12).



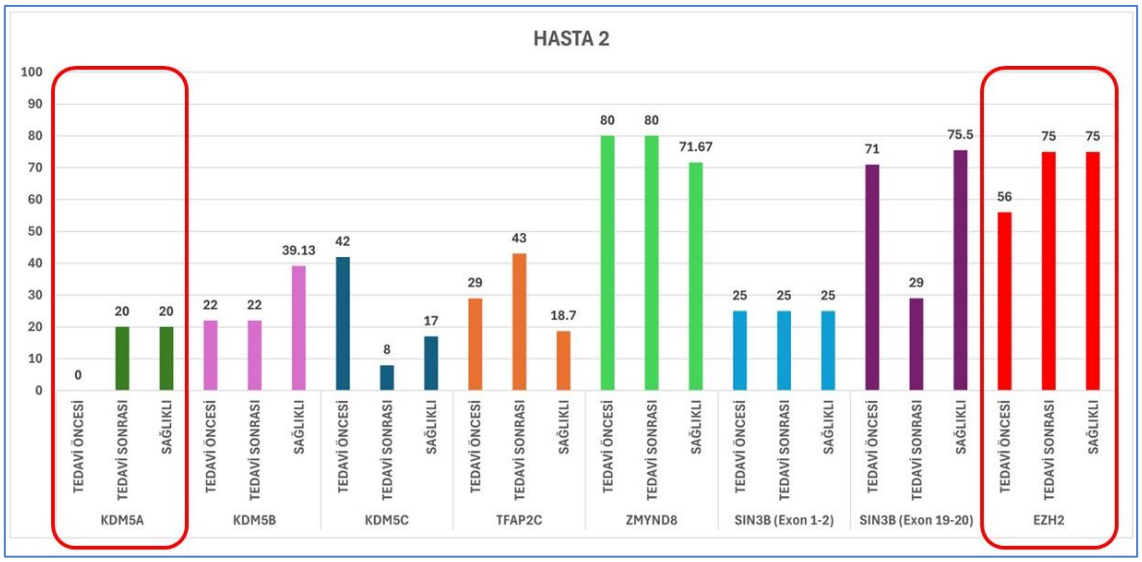
Şekil 4. 12: Hasta 17 için tedavi öncesi ve sonrasında EZH2 genindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

Kısmi yanıt gözlemlenen Hasta 19'un metilasyon seviyeleri incelendiğinde, KDM5C ve TFAP2C genlerinde tedavi sonrasında metilasyon seviyelerinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.13).



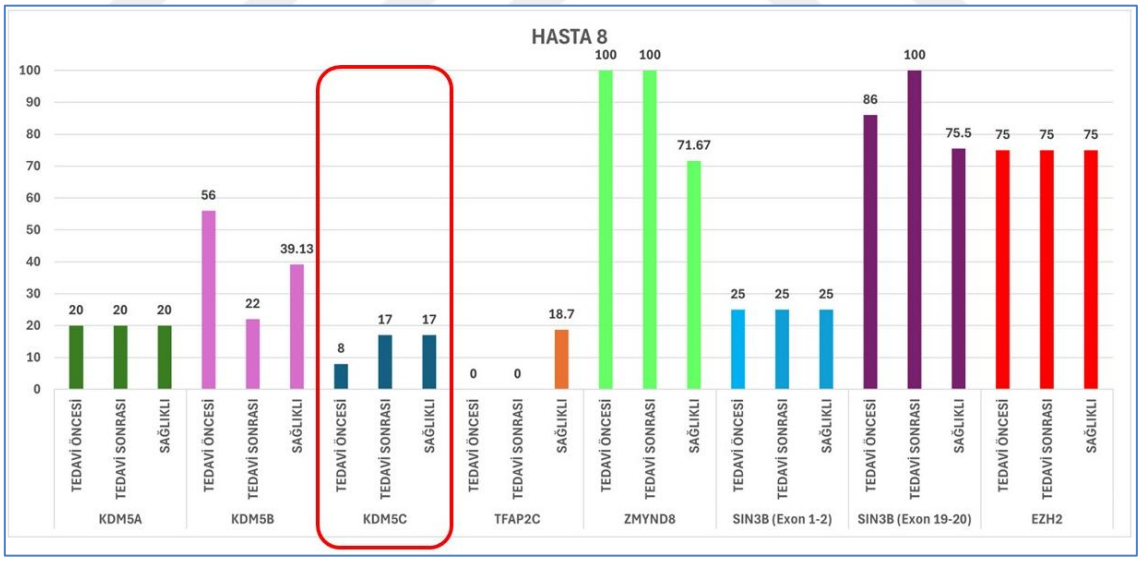
Şekil 4. 13: Hasta 19 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5C ve TFAP2C genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

Tedaviye tam yanıt veren Hasta 2'de KDM5A geninin metilasyon seviyesi tedavi öncesinde %0 iken, tedavi sonrasında %20'ye yükselmiş, EZH2 metilasyon seviyesi ise %56'dan %75'e yükselmiştir (Şekil 4.14).



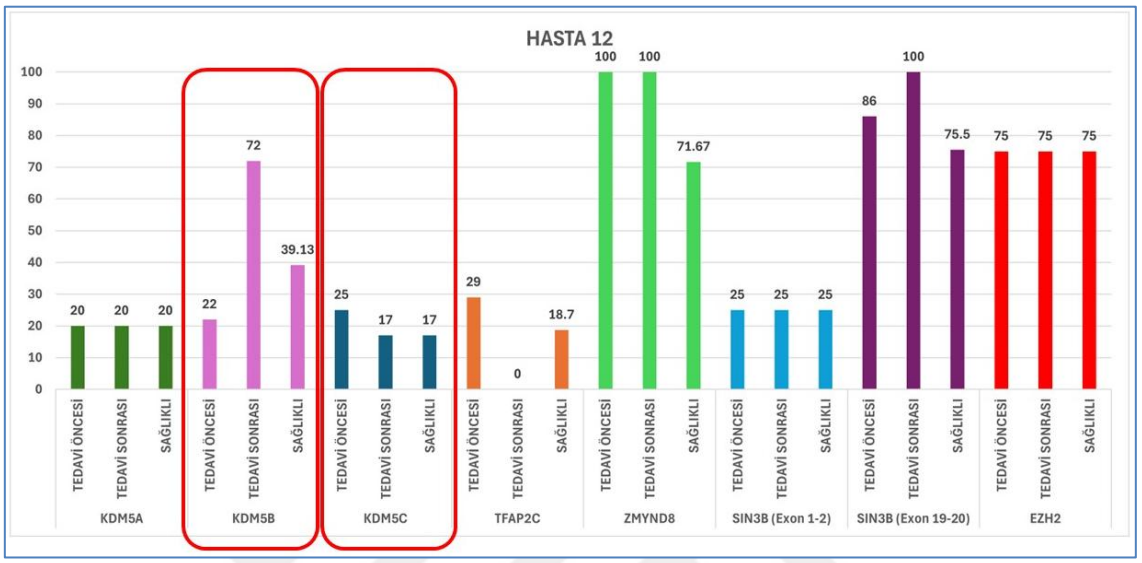
Şekil 4. 14: Hasta 2 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5A ve EZH2 genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

Patolojik tam yanıt gözlemlenen Hasta 8'de KDM5C geni için tedavi öncesinde %8 olan metilasyon değeri, tedavi sonrasında %17 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15).

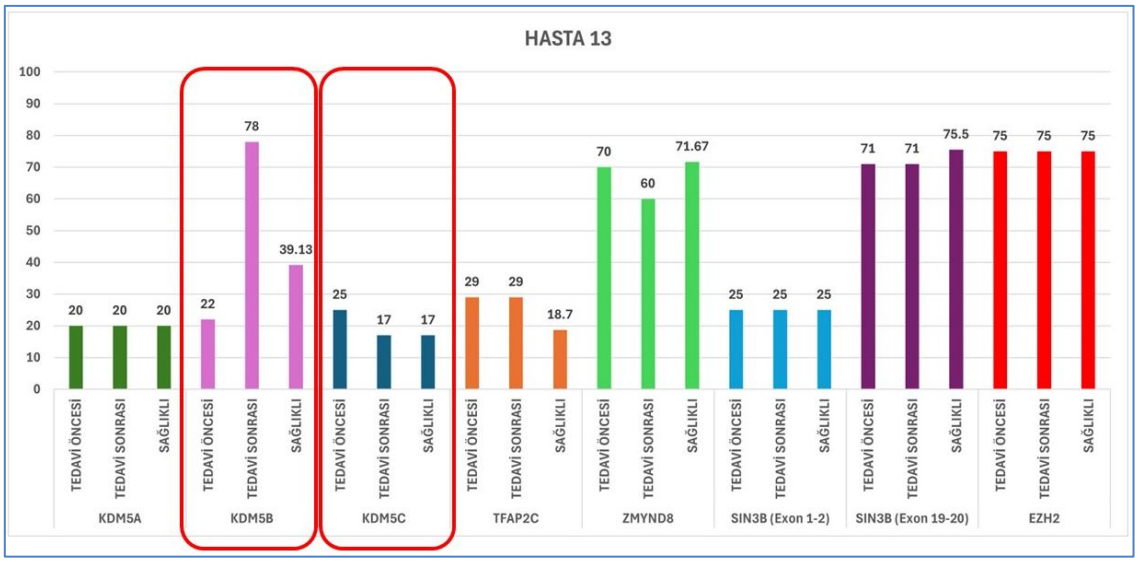


Şekil 4. 15: Hasta 8 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5C genindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

NAK tedavisine tam yanıt veren Hasta 12 ve 13'ün metilasyon seviyeleri analiz edildiğinde, KDM5B'nin tedavi sonrasında hipermetilasyonu belirlenirken, KDM5C geninde ise düşüş görülmüştür (Şekil 4.16 ve 4.17).

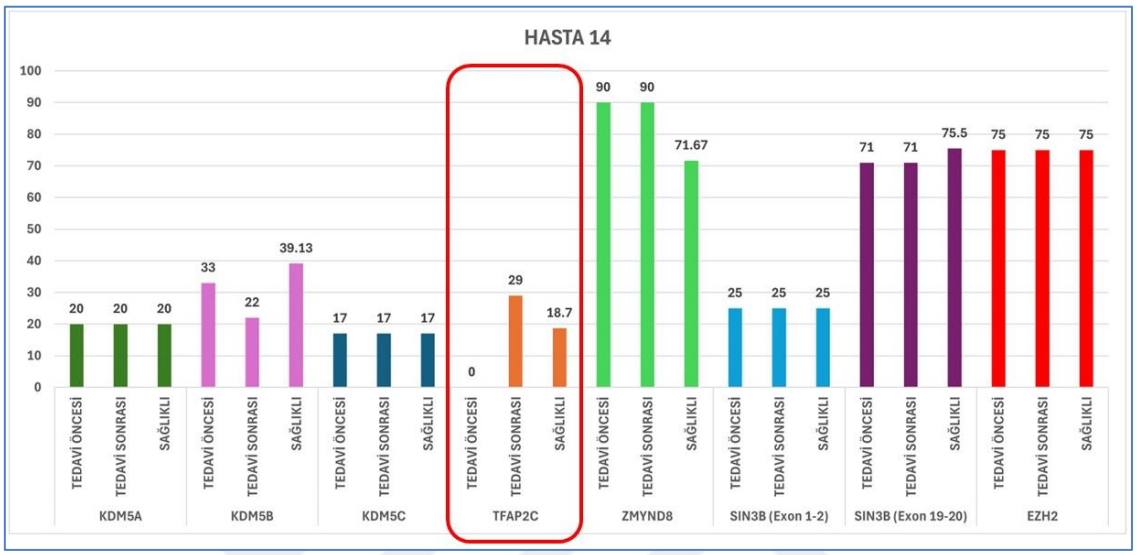


Şekil 4. 16: Hasta 12 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5B ve KDM5C genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

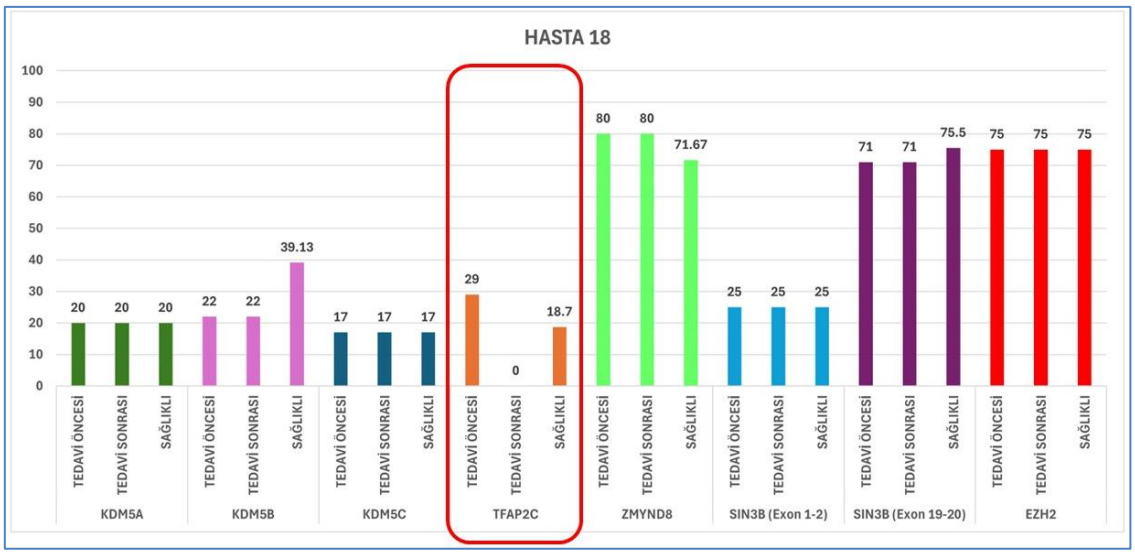


Şekil 4. 17: Hasta 13 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5B ve KDM5C genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

Tam yanıt veren Hasta 14'te tedavi öncesi hipometilasyonu görülen TFAP2C geninin metilasyon seviyesi tedavi sonrasında %29'a yükselirken, Hasta 18'de ise aynı genin metilasyonu tam tersi olarak değişmiştir (Şekil 4.18 ve 4.19).

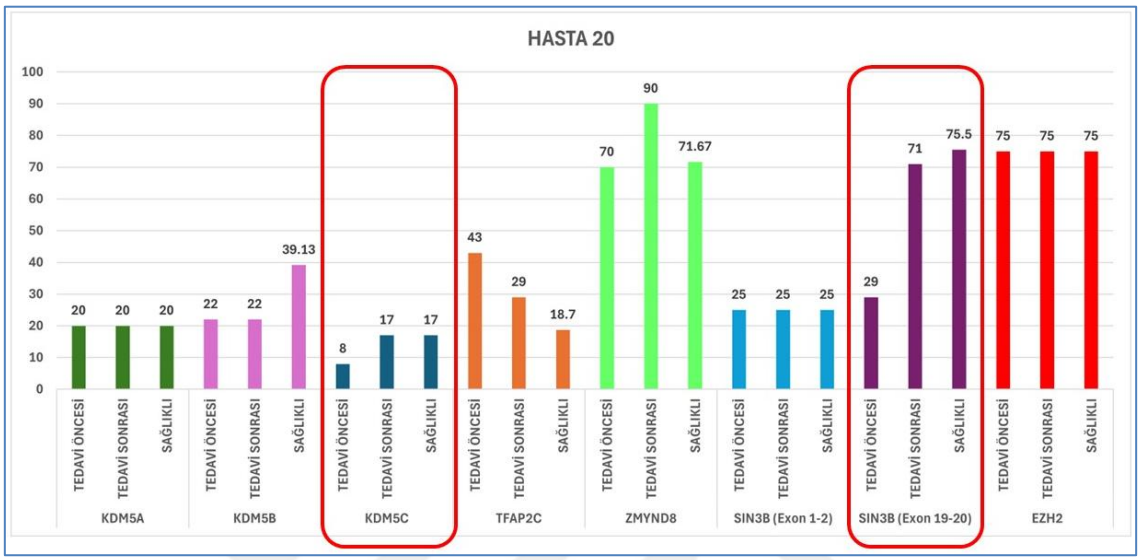


Şekil 4. 18: Hasta 14 için tedavi öncesi ve sonrasında TFAP2C genindeki metilasyon seviyesi değişimleri.



Şekil 4. 19: Hasta 18 için tedavi öncesi ve sonrasında TFAP2C genindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

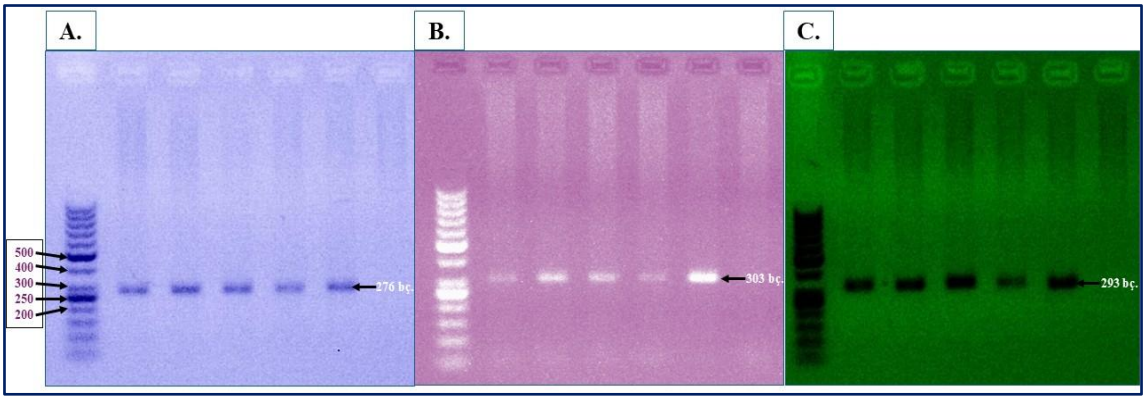
NAK tedavisine patolojik tam yanıt veren Hasta 20'nin tedaviye bağlı metilasyon seviyesi değişen genler analiz edildiğinde, KDM5C ve SIN3B (Ekzon 19-20) genlerinde tedavi sonrasında metilasyon seviyelerinin yükseldiği bulunmuştur (Şekil 4.20).



Şekil 4. 20: Hasta 20 için tedavi öncesi ve sonrasında KDM5C ve SIN3B (Ekzon 19-20) genlerindeki metilasyon seviyesi değişimleri.

4.3. SANGER DİZİLEME ANALİZİ İLE VARYANTLARIN BELİRLENMESİ

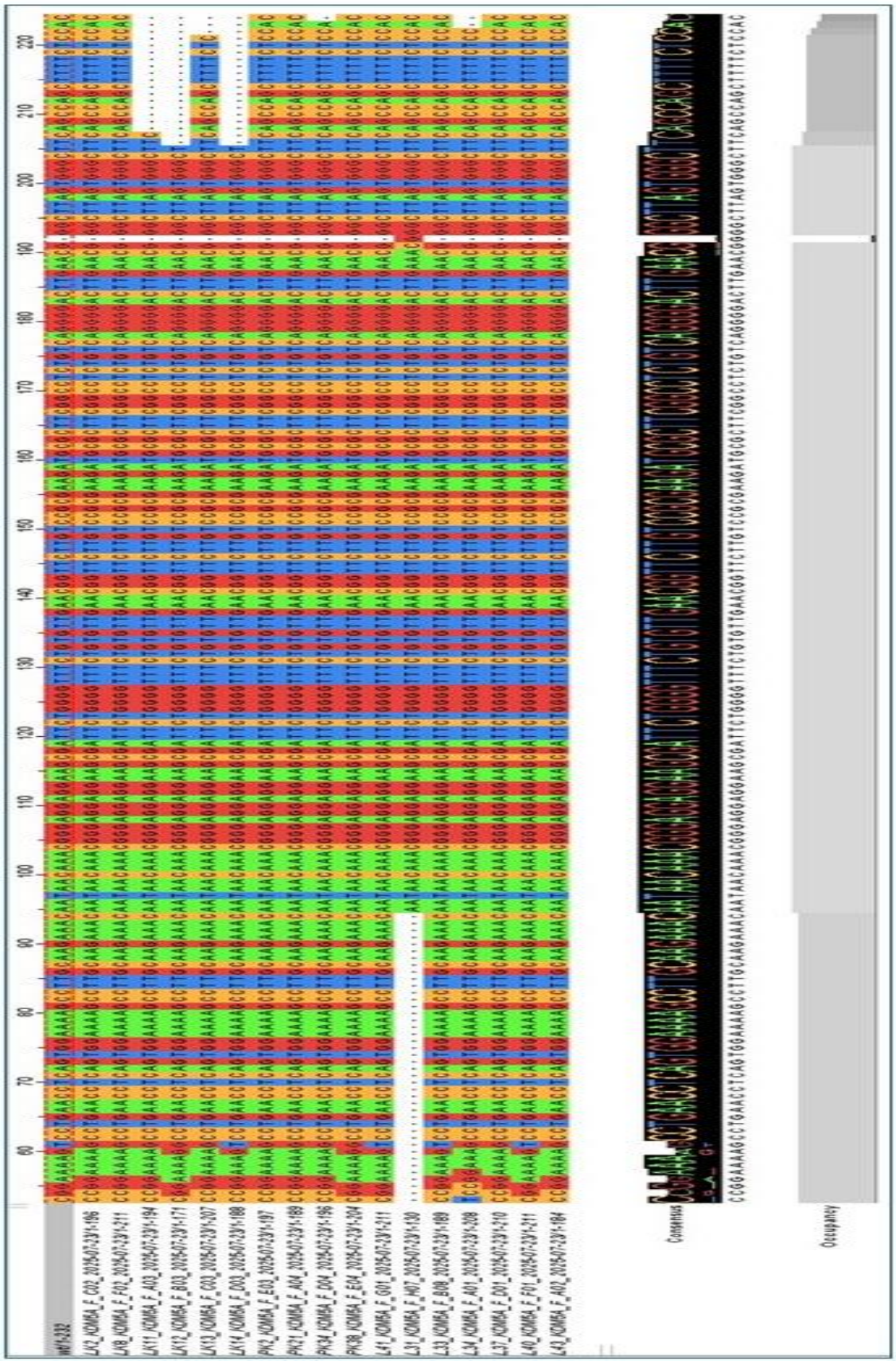
Sanger dizileme analizi yapılmadan önce elde edilen amplikonların doğru yere bağlanıp bağlanmadığını non-spesifik bağlanmaları tespit etmek amacıyla yapılan agaroz jel elektroforezi sonrası elde edilen görüntüler Şekil 4.21'de verilmiştir. Görüntüleme sonucunda amaçlandığı üzere KDM5A'nın 276 bç, KDM5B 303 bç ve KDM5C'nin de 293 bç'lik amplikonların oluştuğu görülmüştür.



Şekil 4. 21: KDM5A, KDM5B ve KDM5C gen bölgelerinin PCR görüntüleri.

* **A**, KDM5A (276 bç); **B**, KDM5B (303 bç), **C**, KDM5C (293 bç.). PCR görüntüsü; %2'lik agaroz jelde 60 dk. yürütüldü. Marker (O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder) boyutları 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 bç şeklindedir.

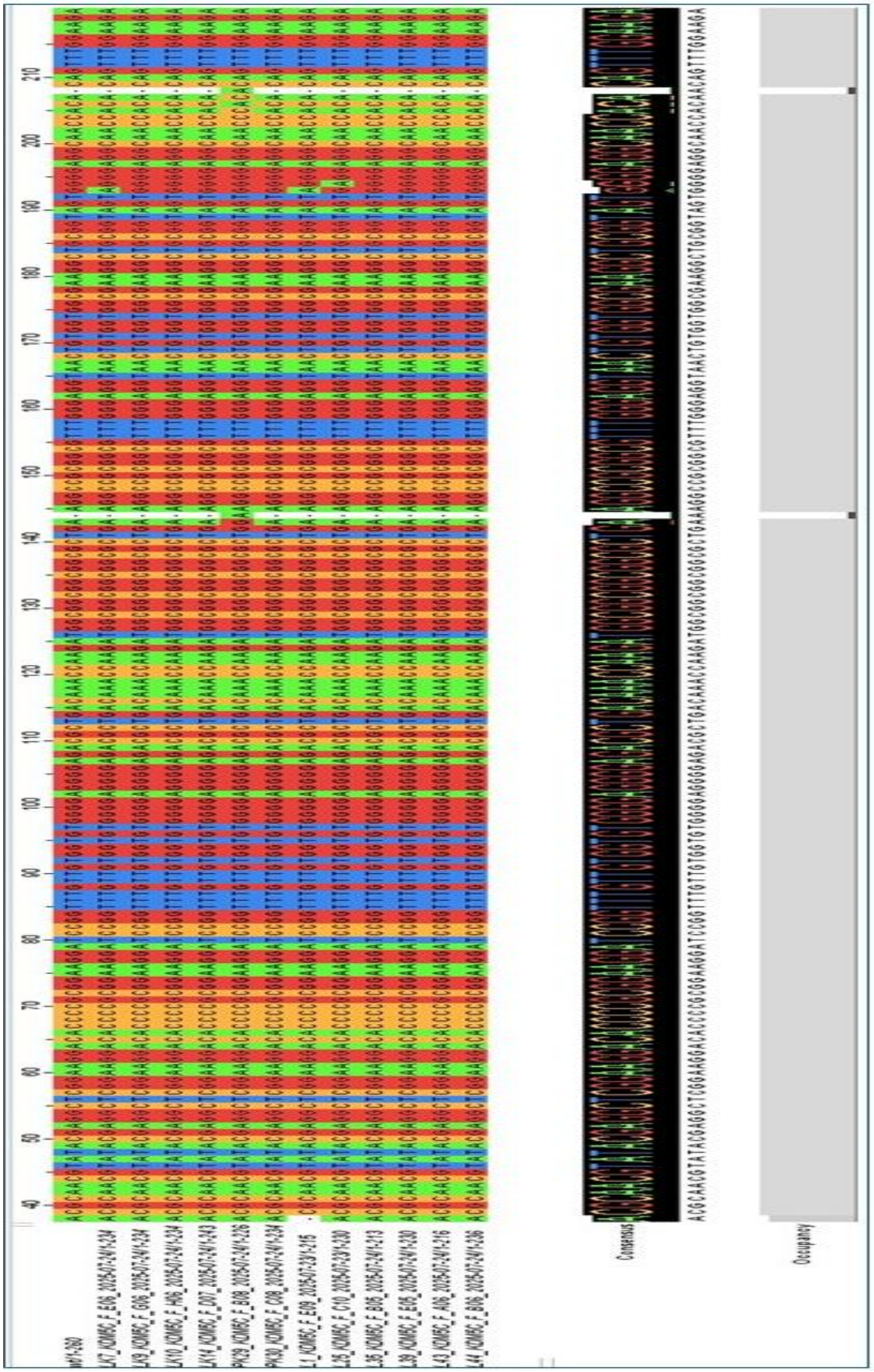
Sanger dizileme sonucu elde edilen ".ab1" sekans dosyaları Galaxy programına yüklendi. ab1-QualityCheck aracı ile sinyal kalitelerinin kontrolünün ardından kalitesi düşük tespit edilen bölgelerden "Trimmomatic" aracı ile kesme işlemi gerçekleştirildi. Dosyaların analiz edilebilir bir formata dönüştürülmesi için "ab1_to_fasta" aracından yararlanıldı. Sekans verilerinin Jalview V.2.11.4.0 programı kullanılarak referans genoma göre hizalamaları ve görselleştirilmesi sonucu KDM5A, KDM5B ve KDM5C gen bölgelerinde varyant açısından farklılık olduğu düşünülen gönüllülere ait dizilerin referansa göre hizalamaları Şekil 4.22, 4.23 ve 4.24'te e gösterilmiştir.



Şekil 4. 22: Jalview programı ile KDM5A gen bölgesinin referans genoma göre hizalama sonuçları.



Şekil 4. 23: Jalview programı ile KDM5B gen bölgesinin referans genoma göre hizalama sonuçları.



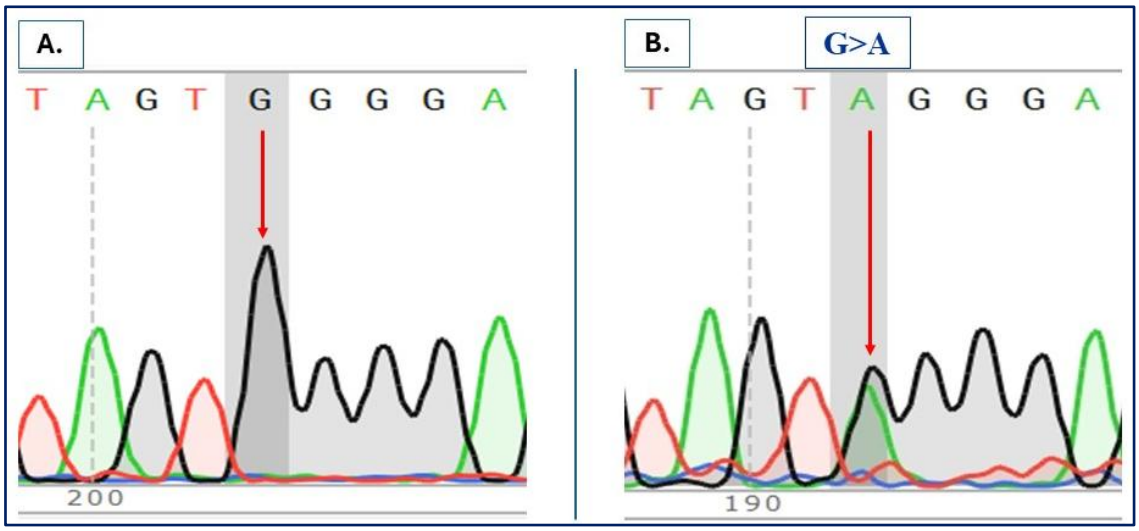
Şekil 4. 24: Jalview programı ile KDM5C gen bölgesinin referans genoma göre hizalama sonuçları.

Varyant analizi sonucunda KDM5A ve KDM5B genlerinde hastalık ile ilişkisi olabilecek herhangi bir varyant tespit edilmemiştir. KDM5C gen bölgesi incelendiğinde ise iki hastada sırasıyla rs41308616 ve rs971896841 varyantları heterozigot olarak tespit edilmiştir. İncelenen rs numaralarının patojenite durumu ClinVar'dan araştırıldığında rs41308616 bölgesine ait varyant "muhtemel iyi huylu" olarak rapor edilirken, rs971896841 bölgesine ait bilgi ClinVar'da raporlanmamıştır. İlgili varyantlara ait detaylı bilgi Tablo 4.4'te paylaşılmıştır.

Tablo 4. 4: KDM5C gen bölgesinde tespit edilen varyantlar.

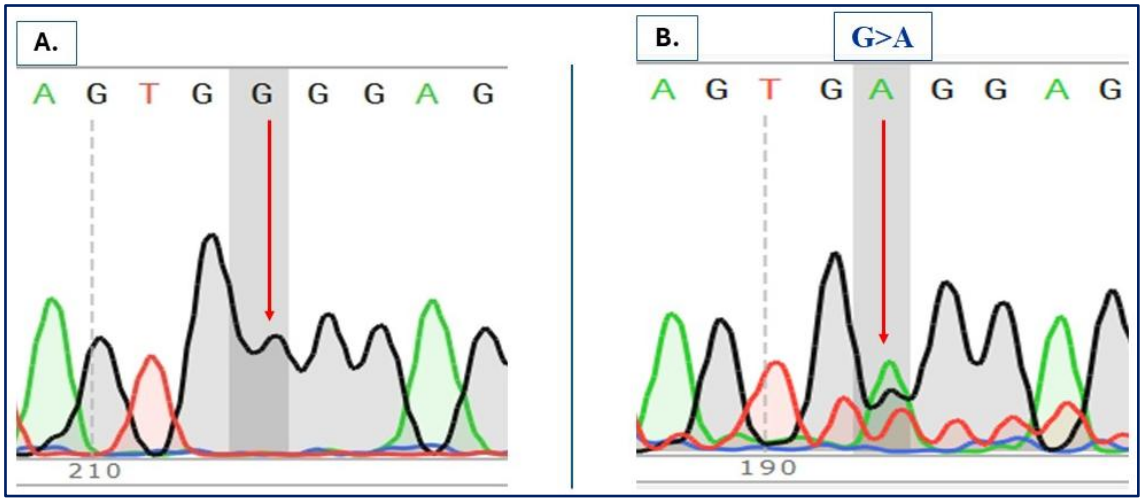
Gen	rs Numarası	Allel	Lokasyon	Dizi	Genotip	Varyant	Patojenite (Clinvar)
KDM5C	rs41308616	c.-240G>A	X:53225129	CGGTAGT**A**GGGAGGC	Heterozigot	Kodlama yapmayan transkript varyantı	Olası iyi huylu
KDM5C	rs971896841	c.-239G>A	X:53225128	GGTAGTG**A**GGAGGCA	Heterozigot	Kodlama yapmayan transkript varyantı	ClinVar'da raporlanmamış

Hastalara ait incelenen varyant bölgeleri SnapGene Viewer 4.1.9 programı kullanılarak Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da görselleştirilmiştir.



Şekil 4. 25: KDM5C rs41308616 bölgesine ait sanger dizisi görüntüsü.

* **A**, referans dizi; **B**, hastanın dizisi.



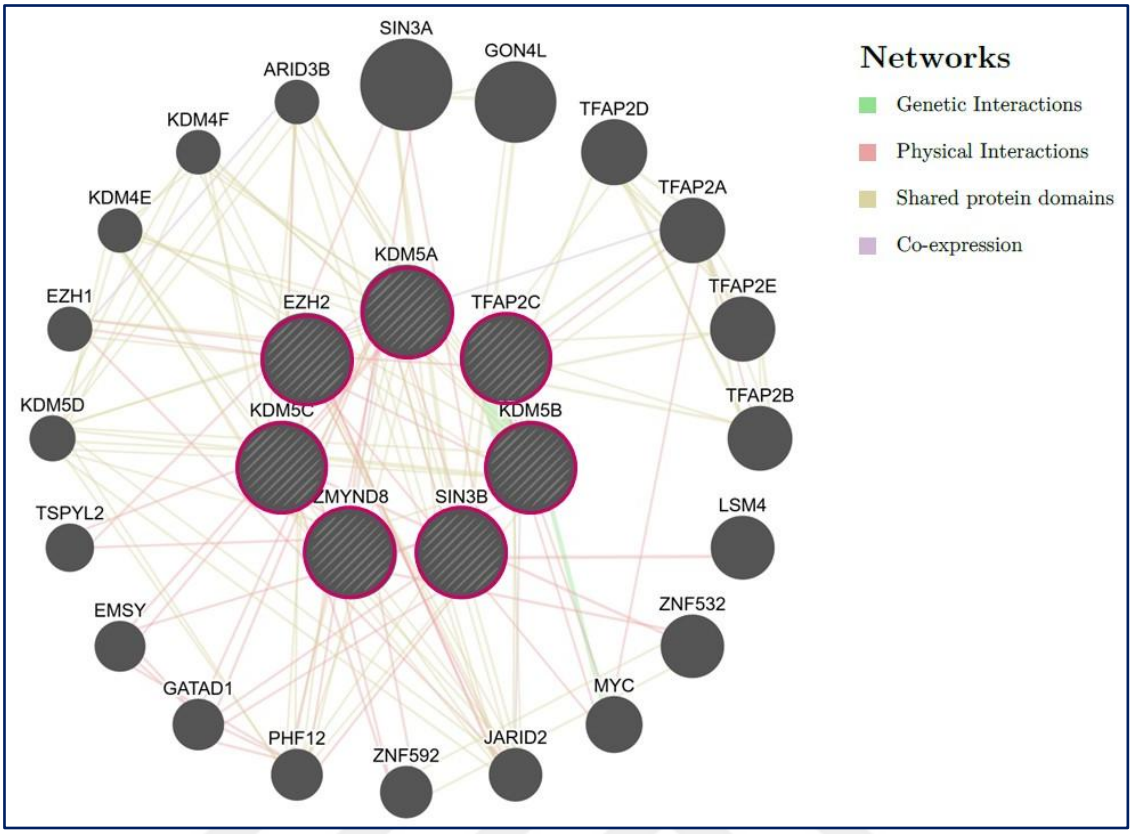
Şekil 4. 26: KDM5C rs971896841 bölgesine ait sanger dizisi görüntüsü.

* **A**, referans dizi; **B**, hastanın dizisi.

4.4. BİYOİNFORMATİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

4.4.1. Metilasyon Seviyeleri İncelenen Genlerin Diğer Genlerle Bağlantısı

Çalışmada metilasyon seviyeleri incelenen genlerin literatürdeki çalışmaların sonuçlarından hareketle en çok ilişkili genlerle çeşitli yönlerden bağlantısını analiz etmek için GeneMANIA programı kullanıldı. KDM5A, KDM5B, KDM5C, TFAP2C, ZMYND8, EZH2 ve SIN3B genlerin ilişkili genler ile genetik ve fiziksel interaksiyonun ortaya konmasının yanında, paylaşılan protein domainleri ve ilişkili genlerin ko-ekspresyonu Şekil 4.27'de gösterildiği şekilde bulunmuştur. İlişkili genlerin illüstrasyonu programa entegre edilmiş olan Cytoscape ağ görselleştirme ve analiz platformu ile gerçekleştirilmektedir.



Şekil 4. 27: GeneMANIA programı kullanılarak metilasyonu incelenen genlerin diğer genler ile bağlantısının incelenmesi.

* Yeşil ile renklendirilmiş çizgiler, genetik interaksiyon; pembe ile renklendirilmiş çizgiler, fiziksel interaksiyon; açık sarı ile renklendirilmiş çizgiler, paylaşılan protein domainleri; mor ile renklendirilmiş çizgiler, ko-ekspresyonu göstermektedir.

Network analizine göre incelenen genetik interaksiyonlar %66,49, fiziksel interaksiyonlar %17,05, paylaşılan protein domainleri %10,38 ve ko-ekspresyon oranı ise %6,08 olarak belirlenmiştir. İlişkili genlerin interaksiyonu sonucunda ortaya konan genlerden bağlantısı en yüksek bulunan gen SIN3A (SIN3 transcription regulator family member A, Source:HGNC, Symbol;Acc:HGNC:19353) en düşük gen ise ARID3B (AT-rich interaction domain 3B, Source:HGNC, Symbol;Acc:HGNC:14350) olarak tespit edilmiştir.

4.4.2. Metilasyon Seviyeleri İncelenen Genlerin İlişkili Olduğu Yolaklar

KDM5A, KDM5B, KDM5C, EZH2, TFAP2C, ZMYND8 ve SIN3B genlerinin Reactome veri tabanında taranarak ilgili yolaklar ortaya konmuştur (Tablo 4.5). KDM5A, KDM5B ve KDM5C genleri ile ilgili yolaklar incelendiğinde kromatin düzenlemeleri ve

histon demetilasyonu gibi hücresel olaylar ön plana çıkmaktadır. EZH2 ve ZMYND8 de çeşitli mekanizmalar ile kromatin organizasyonunda rol oynamaktadır.

Tablo 4. 5: Metilasyonu incelenen genlerin ilişkili olduğu yolaklar.

Gen	Referans Gen Ürünü	Uniprot	Yolaklar
KDM5A	R-HSA-3215029	P29375	• MZT sırasında kromatin değişiklikleri • Kromatin modifiye edici enzimler ile organizasyon • Gelişim Biyolojisi • HDM'ler ile histonların demetilasyonu • Kromatin Düzenlemesi / Asetilasyon
KDM5B	R-HSA-3215031	Q9UGL1	• MZT sırasında kromatin modifikasyonları • Kromatin modifiye edici enzimler ile organizasyon • Kromatin organizasyonu • Gelişim Biyolojisi • Transkripsiyon
KDM5C	R-HSA-4754186	P41229	• Kromatin modifiye edici enzimler ile organizasyon • HDM'ler ile histonların demetilasyonu
EZH2	R-HSA-212298	Q15910	• PTEN regülasyonu • Oksidatif Stres Kaynaklı Yaşlanma • PRC2'nin histonları ve DNA'yı metile etmesi • Erken embriyogenez sırasında arka beyin gelişiminde anterior HOX genlerinin aktivasyonu • HCMV enfeksiyonu • E2F6 aracılı transkripsiyonel regülasyon • CDH1 ekspresyonu ve fonksiyonunun regülasyonu • Kromatin modifiye edici enzimler ile organizasyon • Defektif piroptozis
TFAP2C	R-HSA-3234058	Q92754	• TFAP2 ailesi tarafından transkripsiyonel düzenleme • Nöral plak sınırının belirlenmesi • Meme kök hücrelerinin gelişimsel kökeni • Primordial germ hücrelerinin spesifikasyonu

Tablo 4. 5: devamı.

ZMYND8	R-HSA-9856649.3	Q9ULU4	• BMAL1 (ARNTL) ve CLOCK'un fosforilasyonu ve nükleer translokasyonu • MITF-M ekspresyonu ve aktivitesinin transkripsiyonel ve post-translasyonel regülasyonu • WNT'ye yanıt olarak TCF'ye bağlı sinyallenme • ESR-aracılı sinyallenme • MITF-M'ye bağlı gen ekspresyonu • Entegre meme kanseri yolağı • RUNX1 tarafından transkripsiyonel regülasyon • Beta-kateninin yıkım kompleksi tarafından degradasyonu • SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimerinin transkripsiyonel aktivitesi • Mitotik G1 fazı ve G1/S geçişi • ALK füzyonları ve aktive edilmiş nokta mutantları ile sinyalleme • NoRC ile rRNA ekspresyonunu negatif regülasyonu • Kromatin organizasyon proteinlerinin SUMOyulasyonu • EGR2 ve SOX10 aracılı Schwann hücre miyelinasyonunun başlatılması • TP53 ile hücre ölüm genlerinin transkripsiyonunun regülasyonu • FOXO aracılı hücre ölüm genlerinin transkripsiyonu
SIN3B	R-HSA-3006450	O75182	• Megakaryosit farklılaşması ve trombosit fonksiyonunda rol oynayan genlerin RUNX1 ile regülasyonu • NoRC ile rRNA ekspresyonunu negatif regülasyonu

* MZT, Maternal-zigot geçişi; HDM; Histon demetilaz; TCF, T-cell factor; ESR, östrojen reseptörü.

Meme kanseri ile bağlantılı yolaklar incelendiğinde, TFAP2C'nin meme kök hücresi gelişimi, ZMYND8'nin ise östrojen reseptörü ve entegre meme kanseri yolağı ile ilişkili bir sinyalizasyonda görev aldığı belirlenmiştir. Çalışmada metilasyon seviyeleri araştırılan bu genlerin farklı yolaklar aracılığıyla birçok genin regülasyonu olayına merkezi veya dolaylı olarak katıldığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA

NAK, kanser hastalarında cerrahi veya radyoterapi öncesi uygulanan sistemik kemoterapi ilaçlarıdır. Böylelikle ameliyat ile alınamayacak durumda olan tümörlerin rezeksiyona uygun hale getirilmesi, tümörün bulunduğu dokunun korunumu ve prognozun iyileştirilmesi amaçlanmaktadır. Meme kanseri hastalarında kullanılan NAK, endokrin terapi ve hedefe yönelik tedaviler hakkında, klinisyenlerin bilgi sahibi olması amacıyla Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (ASCO) 2021 yılında bir rehber çıkarmıştır. ASCO'nun güncel rehberi, hastalığın alt tiplerine göre uygun NAK protokolleri ve tavsiyeleri içermektedir. Hormon reseptörü (HR) ve HER2 pozitifliği, lenf nodu, menopoz durumu ve TNM derecelendirmesine göre hastaya özgü tedavi protokolleri önerilmektedir (144, 145).

Günümüzde DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu veya serbest radikaller oluşturarak hücre hasarına sebep olarak etki gösteren Doksorubisin ve Epirubisin gibi antrasiklinler, mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek tümör hücrelerini öldürmeyi hedefleyerek anti-tümör aktivite gösteren dosetaksel ve paklitaksel gibi taksanlarla kombine terapiler şeklinde hastalara uygulanmakta, bu antrasiklin ve taksan kombine terapisi AC-T terapisi olarak adlandırılmaktadır. Bizim çalışmamızda da hastaların klinik, radyolojik ve patolojik değerlendirmeleri neticesinde doksorubisin, siklofosfamid ve paklitaksel terapilerinin yanında, hastaya özgü olarak pertizumab, trastuzumab, dosetaksel ve karboplatin gibi ilaçlar tedavi protokolüne dahil edilmiştir. NAK, hastanın prognozunu iyileştirmede umut vaat etmekle birlikte, hastalığın alt tipi ve bireyin klinik özelliklerine göre şekillenmektedir (146, 147).

Meme kanseri hastalarında NAK etkinliği klinik görüntüleme ve mikro-patolojik değerlendirmeler ile ortaya konmaktadır. Ultrason çeşitleri, mamografi, MRI ve PET-BT görüntüleme teknikleri olarak, histopatolojik değerlendirmeler, tümör biyobelirteç (ER, PR, HER2, Ki-67, p53, BRCA1 ve BRCA2) analizleri, anormal glikan glikoproteini ekspresyonu seviyesinin analizi, Tümör infiltre eden lenfositler (TIL'ler), tümör mikroçevresi değerlendirmeleri, dolaşımdaki immün hücreler ve tümör hücrelerinin ölçümleri ise mikroskopik patoloji yöntemleri olarak NAK yanıtının değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir. Görüntüleme verilerini

klinik bilgiler ile birleştirerek istatistik hesaplamalara dayanan imageomik de NAK yanıtını değerlendirmede kullanılmaktadır (148).

NAK sonrası tedavi yanıtı yüksek risk sınıfındaki meme kanseri hastaları incelendiğinde, hastaların ~%13-50'si pCR göstermiştir. Özellikle agresif tümörlü hastalarda AC-T terapisi pCR ve uzak metastaz olmadan sağkalımı arttırmaktadır. Klinik uygulamalar için rutinde kullanılan NAK terapilerinin meme kanseri tedavisinde umut vaat etmesine rağmen, hastalarda ilaç direnci gelişebilmektedir (146, 149). Bizim çalışmamızda da literatüre uyumlu olarak AC-T terapisi alan hastaların %40'ında pCR sağlanmış, ancak bir hastada %5 oranında minimal regresyon görülmüştür. Tümör boyutu 135 mm olan bu hastada, ayrıca akciğer ve karaciğerde uzak metastaz bulunmuştur.

Meme kanseri hastalarında ilaç direnci, tedavi başarısızlığının en önemli sebeplerindendir. Sitokrom P450 (CYP) gen ailesi üyeleri gibi birtakım ilaçları metabolize eden enzimler, NAK ilaçlarının ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı süper ailesi gibi moleküller ile hücre dışına taşınarak direnç oluşturması, uzun süreli NAK terapisine bağlı olarak çoklu ilaç direnci (MRD) genleri ve/veya meme kanseri direnç proteinlerinin (BRCP) aşırı ekspresyonu, glutatyon enzimlerinin hücresel artışı ve platin ilaçları ile kompleks oluşturması, tek hedefli ilaçların diğer genlerin ekspresyonunu tetikleyerek direnç geliştirmesi, DNA hasar yolağında yer alan moleküller aracılığıyla hasarı tersine çevirmesi, hücre apoptozu ve otofajinin tetiklenmesine bağlı mekanizmalar ve kanser invazyonu ve migrasyonuna bağlı epiteliyal-mezenkimal transisyon (EMT) durumları meme kanserinde NAK'lara karşı gelişen direnç mekanizmalarıdır (150, 151). İlaç direnci geliştirilen TNBC hücre hatları ve NAK uygulanan meme kanserli bireylerde ekstraselüler veziküllerdeki ekspresyon değişimleri incelendiğinde MRD ve BCRP ekspresyonunun (MDR1, MRP1 ve BCRP ekspresyonu) hücre hattı ve rezidüel tümörlü hastalarda pCR sağlamış hastalara kıyasla yüksek oranda ekspresyonu tespit edilmiştir (152). İlaç direnci ile ilişkili olan tümör kaynaklı ekzozomlarda miRNA ve hedef genlerin ekspresyon analizlerine göre miR-125b-5p, miR-146a-5p, miR-484, miR-1246-5p ve miR-1260b öne çıkmıştır. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların plazmalarıyla genlerin ekspresyonu valide edilmiş, sonuç olarak bu miRNA'ların ve BAK1, NOVA1, PTGER4, RTKN2, AGO1, CAP1 ve ETS1 adlı hedef genlerinin ilaç direnci gelişiminde aday biyobelirteçler olarak öne sürülmüştür (153).

Meme kanseri türlerinde tanı, prognoz, sağkalım, tedavi protokolü, çoklu terapi yaklaşımları ve tedaviye yanıt ile bağlantısı öne sürülen çok sayıda biyobelirteç öne sürülmüştür. Özellikle NAK'a karşı direnç ve yatkınlık üzerine etkisi bulunduğu düşünülmüş çeşitli yolaklarda yer alan genler bulunmaktadır. Genetik profilleme hastalığın farklı yönleriyle araştırılmasını sağlarken, aynı zamanda ilaç yanıtı ve direnç mekanizmalarına etki ederek kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına öncülük etmektedir. Literatürde meme kanseri hastalarında AKT, ABC transporter, CYP, GST (Glutatyon S-transferaz) ve FGFR (fibroblast büyüme faktörü reseptörü) gen ailesi üyeleri, folat ilişkili genler ve TP53 gen varyantlarının terapötik rejimlere karşı gösterilen ilaç direncine katkı sağlandığını rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (154). Tedaviye bağlı gen alterasyonları ve ekspresyon değişimlerinin NAK duyarlılığına etkisi WES ve RNA-seq metodları ile hasta kohortu ve hücre hattında araştırılmıştır. ClinVar'da patojenik ve olası patojenik olarak tanımlanmış 28 kanser yatkınlık geni tedavi öncesi ve sonrası tümörler ile analiz edildiğinde en çok alterasyonu görülen genlerin TP53, TTN ve MUC16 olduğu, tedaviye yanıt veren tümörlerde FOXP1'nin de bulunduğu bölgede delesyon, yanıt verenlerde ise ADGRA2 ve ADRB3 genlerini içine alan bölgede amplifikasyon olduğu belirlenmiştir. CDKAL1P409L gen mutasyonunun ise dosetaksel direncinin apoptoz inhibisyonu yoluyla gerçekleştiği öne sürülmüştür (155). NAK alan meme kanseri hastalarında TAC1 gen polimorfizmlerinin ilaç direnci ve pCR'ye etkisi araştırıldığında, rs17010664, rs6715729 ve rs3771869 varyantlarının pCR ile ilişkili bulunmuş, ayrıca rs17010664 bölgesinde C aleli taşımanın NK-R1 izoformunun eksikliği ile bağlantılı olarak pCR'yi engellediği gösterilmiştir (156). Platin bazlı kemoterapi alan erken evre 45 TNBC hastasında, bu terapinin hem antrasiklin ve taksan ilaçlarına direnç gösteren bireyler için uygun tedavi seçeneği olduğunu göstermek hem de BRCA1, BRCA2 ve XRCC1 gen polimorfizmlerinin incelenerek prognostik ve prediktif rollerinin araştırıldığı bir çalışmada, BRCA1 (rs1799949) ve BRCA2 (rs206115) gen varyantlarının pCR ve toplam sağkalım ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Buna ek olarak histolojik derece ve Ki-67 (>%65) değerleri de tedavi yanıtının düşük olmasına sebep olduğu da belirtilmiştir (157). Çalışmamızda hastaların Ki-67 değeri ile tedavi yanıtı arasında bağlantıyı incelendiğimizde, bu parametrenin tedavi yanıtı ile ilişkisini destekleyecek istatistiksel anlamlılık elde edilememiştir. Bu durum, Ki-67'nin prognostik değerinin hasta grubumuza özgü olarak sınırlı olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde meme kanseri hastalarında farklı yolaklardaki gen polimorfizmlerinin NAK yanıtı üzerine etkisini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu gen polimorfizmleri, biyolojik proseslerin yönünü değiştirerek kemoterapi etkinliğini azaltabilmekte ve böylece direnç oluşturarak pCR'yi engellemektedir. Bizim araştırmamızda da KDM5A, KDM5B ve KDM5C gen bölgeleri metilasyon seviyeleri incelenmiştir. Sanger dizileme sonucunda KDM5C geninde heterozigot olarak bir hastada rs41308616, başka bir hastada ise rs971896841 varyantı belirlenmiştir. rs41308616 varyantını taşıyan Luminal B alt tipli invaziv duktal karsinomlu hastanın NAK yanıtının %5 ve patolojik tümör boyutunun 135 mm olduğu, akciğer ve karaciğer metastazı bulunduğu görülmüştür. Aynı bölgede metilasyon seviyesinin tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında ise herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu varyantı taşıyan hastanın tedavi yanıtının en düşük olması, metilasyondan bağımsız olarak rs41308616'nin ilaç direnci ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir. rs971896841 varyantını taşıyan invaziv karsinomlu agresif bir biyolojiye sahip olan TNBC alt tipli hastada ise herhangi bir metastatik durum görülmemektedir.

Renal hücreli karsinom hastalarında PBRM1, BAP1 ve KDM5C genlerinde tümör-spesifik mutasyonların belirlenmesi amacıyla hedefe yönelik dizileme yapıldığında toplam 12 yaygın ve 94 nadir mutasyon tespit edilmiş, bir hastada rs41308616 bölgesinde substitusyon tanımlanmıştır. Bu nadir varyantın etkisi ise modifier (minimal veya bilinmeyen etki) şeklindedir. Bunun dışında hastalarda KDM5C geninde 7 yaygın varyant da tespit edilmiştir (158). KDM5C geninin kodlama yapmayan transkript varyantı olarak dbSNP veri tabanında yer alan rs971896841 bölgesi ile ilgili bir araştırma bulunmamaktadır. Buna ek olarak, tek nükleotid polimorfizm bölgesini içeren bu varyantın klinik anlamlılığı da henüz belirlenememiştir.

NAK tedavisi alan meme kanseri hastalarında genetik faktörlerin yanında tedavi etkinliği ve ilaç direnci başta olmak üzere birçok farklı mekanizmalar ile hastalığın patogenezine etki eden epigenetik temelli çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle tedavi yanıtına dayalı gen ekspresyonu ve DNA metilasyonu çalışmaları literatürde oldukça önemli ve geniş bir yer edinmiştir. NAK terapisi alan 16 TNBC hastasından 5'inin pCR ve 11'inin ise tam yanıt alamadığı bir araştırmada, pCR

gösteren hastalardan arasında 250 kodlama yapan (151 up-regüle, 99 down-regüle) ve 155 kodlama yapmayan (90 up-regüle, 65 down-regüle) genin ekspresyonunda farklılık gözlemlenmiştir. Bu genlerden KDM5A (P=0,002, logFC=0.89087181) geninin ekspresyon seviyesi pCR gösteren grupta up-regüle olarak bulunmuştur (159). Transkripsiyon profillemesi ile tedavi yanıtının incelendiği araştırmalarda bağışıklık ile ilişkili LAG-3, CTLA4 ve IDO1 gibi immünolojik yolaklarda yer alan, CXCL13, CXCL16 ve GZMK gibi kemokin ve sitokinler, IL7R ve IL33 gibi interlökin genlerinin ekspresyonunun pCR başarısıyla bağlantısı ortaya konmuştur. Ekspresyon seviyesi up-regüle olarak tespit edilen DEFB1, DEFB103A, DEFB4A ve FCAR genlerinin ise pCR oranını düşürdüğü öne sürülmektedir. Farklı yolaklarda görev alan EGFR, IGFR1, ADAM10, ABCG2, TMBS15A, SIRT5, SPARC, TMBS15A, SIRT5, SPARC, TMBS15A, SIRT5, SPARC, CR2, CD19, MS4A1, MELK, STAT1, GZMB, ACSL4 ve GPX4 gen ekspresyonları da tedavi yanıtı oranını etkilediği düşünülen moleküllerdir (160-162).

Epigenetik modifikasyonlar, tümör dinamiğini etkileyerek kanser progresyonuna yön vermesi açısından önem arz etmektedir. DNA metilasyonları, meme kanserinde detaylı bir şekilde araştırılmış, tanı ve prognozun yanında NAK yanıtında da görev almaktadır. Önceki çalışmalarda farklı alt tiplere sahip meme kanseri hastalarında tespit edilen demetile genlerin, ekspresyon seviyelerini değiştirerek tümör davranışını yönlendirmesi sebebiyle epigenetik biyobelirteç olarak kullanışlı moleküller olarak önerilmektedir. NAK terapisi alan hastalarda da tedavi yanıtı ile ilişkili olduğu düşünülen farklı gen metilasyonları tanımlanmıştır. NAK terapisi alan ve almayan TNBC hastalarında ELISA yöntemiyle global metilasyon analizinin yapıldığı bir çalışmada, progresif hastalarda tedavi öncesi 5hmC düzeyleri anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur (P=0,028). Yüksek tümör derecesi ile bağlantısı istatistik olarak ortaya konan 5mC ve 5hmC (P=0,039 ve P=0,017)'nin NAK yanıtını olumsuz etkilediği, meme kanseri için prognostik ve prediktif biyobelirteç olma potansiyeli olduğu rapor edilmiştir (163). HER2 pozitif grupta DNA metilasyonundaki alterasyonların tedavi direnci üzerine etkisi araştırılmış, 20 hastanın 12'si pCR 8'i ise non-pCR (tedavi öncesi 8 örnek, tedavi sonrası 8 örnek) olmak üzere iki grup için doku örneklerinden WGBS analizi yapılmıştır. Tedavi öncesi non-pCR grupta hipometilasyon gözlenirken, tedavi sonrasında ise hipermetilasyon seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Araştırma neticesinde tedavi sonrası metilasyon farklılıkları

tespit edilen KIT, LAD1, FAM110C ve DAPP1 genleri bulunmuş, bu genleri ilaç direnci için aday biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır. Proto-onkogen olarak bilinen MOS ve RET genleri de non-pCR grupta hipometile olarak bulunmuştur (164). Metilasyon profili, dolaşımdaki tümör DNA'larında (ctDNA) da incelenebilmektedir. NAK öncesi, sonrası ve ameliyattan 1 yıl sonra olmak üzere evre 2 ve 3 primer meme kanseri olan 87 hastadan alınan serum örneklerinden elde edilen metile ctDNA ile RASSF1A promotör metilasyonu değerlendirilerek NAK yanıtı araştırılmıştır. NAK öncesi alınan kandan incelenen ctDNA'lar ile metilasyon seviyelerinin incelenmesinin CEA ve CA15-3 gibi belirteçlere oranla daha duyarlı olduğu raporlanmıştır (165). Metilasyon temelli biyobelirteçlerin dolaşımdaki serbest DNA (cfDNA)'larda değerlendirilmesi yaklaşımını içeren çalışmalar sonucunda hipermetile bulunan APC, GSTP1, RASSF1A, RARB, HIT1H3C ve TM6SF1 genleri prognostik biyobelirteçler olarak önerilmiştir (166). NAK terapisi alan meme kanseri hastalarında potansiyel biyobelirteçler olarak demetile genlerin araştırılması, tedavi yanıtını öngörmede olumlu sonuçlar vermiştir.

KDM5 ailesi (H3K4 demetilaz ailesi) üyeleri olan genler, Histon H3'ün (H3K4me1/2/3) metile lizin 4'ünü hedefleyerek gen ekspresyonunu regüle eden histon demetilazları olarak işlev görürler. Çeşitli hastalıklardaki potansiyel rolü öne sürülen KDM5 genleri meme kanseri başta olmak üzere mide, akciğer, lösemi ve prostat gibi çok sayıda kanser türünde deregülasyonunun belirlenmesi, bu genlerin kanser patogenezi ile bağlantısı olduğunu gözler önüne sermiştir. KDM5 genleri TBG'lerin ekspresyonunu arttırırken onkogenleri de aktive edebilir. KDM5 üyelerinin kanser biyolojisindeki rolünü araştıran çalışmalar, kanserli hücrelerde TBG'lerin ekspresyonun KDM5-aracılı demetilasyon ile ilaç direncine sebep olduğu yönünde kanıtlar ortaya koymaktadır (25, 167, 168). Özellikle KDM5A ve KDM5B genlerinin meme kanseri hücrelerinde up-regülasyonu, farklı genleri etkileyerek ilaç direncine öncülük etmektedir. Bu sebeple biz de KDM5 gen ailesi üyeleri ve bu genler ile ilişkisi olduğu öne sürülen genleri çalışmamıza dahil ettik. Araştırmamıza sadece meme kanserli kadın bireyleri dahil etmemiz ve KDM5D'nin Y kromozomu üzerinde bulunması sebebiyle bu gen KDM5 ailesi üyesi olmasına rağmen dışlanmıştır.

KDM5A, meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedir. Bu sebeple mevcut çalışmalar kanserli hücrelerde KDM5A inhibisyonu yoluyla kanserli hücrelerin

proliferasyonu şeklindedir. KDM5A'nın aşırı ekspresyonu ile ilaç direnci gelişimini görülmüş, KMD5A'nın shRNA ile baskılanması, apoptoz yolağını aktive eden ve CDK inhibitörü genlerinin up-regülasyonunu sağlamıştır (169). Siklopenta[c]kromen türevi 1 ile KDM5A geninin meme kanseri hücre hatlarında baskılanması, H3K4me3 seviyelerini yükselterek p16 ve p27 artmasına bağlı olarak hücre arestine ve senesense sebep olmuştur. Bu da tümörlü hücrelerin proliferasyonunun azalmasına yol açmıştır (170). Bir tür ginseng metaboliti olan Rg3'ün MCF-7 meme kanseri hücrelerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, Rg3 ile muamele edilen hücrelerde genom çapında metilasyon analizi ile KDM5A geninin hipometilasyonu sağlanmıştır. Bu bağlamda, KDM5A'nın up-regülasyonu, sağkalımı iyi yönde etkilemiştir (171). Bizim çalışmamızda da KDM5A geninin metilasyon seviyesi bir hastada tedavi sonrasında yükselerek sağlıklı grup ile aynı seviyeye gelmiştir. Bu da uygulanan NAK uygulamasının etkinliğine işaret etmektedir.

Çeşitli yolaklardaki genler ile doğrudan veya dolaylı olarak bağlantılı olan KDM5A'nın biyolojik proseslere SIN3B ve ZMYND8 gibi genlerle ilişkili olarak da katkı sağladığı bilinmektedir. SIN3B, transkripsiyonun baskılanmasında görev alan kromatin modifiye eden kompleksler ile hücrelerin döngüden ayrılarak proliferasyonun engellenmesinde görevlidir. Bu şekilde proliferasyonun engellenmesi, tümörün gelişimini de durdurmaktadır. SIN3, KDM5A'yı da içine alan histon modifikasyonunda görev alan enzimler ve transkripsiyon faktörü olarak işlev gören p53, E2F4, Rb ve p130 genleri ile birlikte çalışmaktadır. Ayrıca hücre döngüsü ile ilişkili histon modifikasyon ve kromatin modifikasyonu gibi olaylarda SIN3A, SIN3B, E2F4 ve KDM5A'nın belirli genlerinin promotör bölgelerinde birlikte bulunduğu gösterilmiştir. KDM5A'nın SIN3B ile interaksiyonun sağlanması için ise MRG15 molekül aracılığı ile olmaktadır (172). BRCA2 ile interaksiyonu bulunan bir transkripsiyon baskılayıcısı olarak rol alan meme kanseri ilişkili EMSY geninin KDM5A ve SIN3B ile birlikte fonksiyon gördüğü çalışmalar bulunmaktadır. Bu üç gen kompleksi meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese olmakta, bu genlerin ekspresyonunun azaltılması tümör proliferasyonu ve ilaç direncini engellemektedir (173). SIN3B'nin inaktive edilmesi, sisplatin ve doksorubisin gibi DNA hasarı oluşturan ilaçlara karşı duyarlılığı attırmakta ve non-homolog uç birleştirme mekanizmasını tetiklemektedir. Bu sayede kanser hücrelerinde kemoterapi ilaçlarına hassasiyet artmaktadır (174). SIN3B, meme kanserinde tümör progresyonu ve metastazı arttırmaktadır. Meme kanserinde yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, SIN3A/B'kompleksinin anormal gen susturulmasına

sebep olduğunu, SIN3 genlerinin susturulmasının TNBC gibi agresif meme kanseri hastalarında yeni tedavi yaklaşımı olabileceğini göstermiştir (175, 176). Çalışmamızın sonucunda tam yanıt alan bir hastada ve kısmi yanıt alan iki hastada tedavi öncesi SIN3B geninin ekzon 19-20 bölgesinde gözlemlenen hipometilasyon, tedavi sonrasında hipermetile olarak bulunmuştur. Tedaviye bağlı olarak gerçekleşen metilasyon farklılığının, uygulanan kemoterapi rejiminin olumlu etkilerini gösterdiği düşünülmektedir. SIN3B geninin ekzon 19-20 bölgesinde bazı hastalarda metilasyon değişimleri gözlemlenirken aynı genin ekzon 1-2 bölgesinde farklılık bulunmamıştır. Bu bölgesel metilasyon farklılıkları, SIN3B'nin fonksiyonel regülasyonunun kompleks ve bölgeye özgü olduğunu göstermekte olup, kemoterapi yanıtı ve tümör biyolojisi açısından potansiyel klinik önem taşımaktadır.

H3 histon proteini ile etkileşen bir protein olan ZMYND8, hücre büyümesinde görev alan genlerin transkripsiyonel düzenleyicisidir. Bu genin mutasyona uğraması veya deregülasyonu, tümör oluşumu ve progresyonuna sebep olabilmektedir. Meme kanserinde ZMYND8'in hem proto-onkogenik yönüyle kanseri tetikleyici hem de büyüme, proliferasyon, invazyon ve metastazı engellemesiyle tümör baskılayıcı özelliklerini gösteren çelişkili çalışmalar bulunmakta, kanser için terapötik etkisinin detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir (177). ZMYND8, HER2 pozitif meme kanseri hastalarında ilaç direncine sebep olabilmektedir. ZMYND8'in up-regülasyonu c-Myc seviyesini arttırarak cPLA2α'nın ekspresyon seviyesini yükseltmekte, bu da IL-27'yi indükeyerek ilaç direnci oluşturmaktadır (178). Akciğer kanserli hastaların dokularında ZMYND8 geninin promotör metilasyonları MSP ile analiz edildiğinde promotör bölgede hipometilasyon olduğu tespit edildi (179). Çift zincir kırıklarının oluşumunda KDM5A histon demetilasyonunu sağlamakta, ZMYND8–NuRD kompleksi de bu sayede ilgili bölgeye bağlanarak hasar oluşumunda transkripsiyonu baskılamaktadır. Aberasyonu kanser ve ilaç toleransına sebep olan KDM5A, ZMYND8 üzerinde regülatör etki göstermektedir (180). Doksorubisin ile muamele edilmiş meme kanseri hücrelerinde ZMYND8'in aşırı ekspresyonunun tümör ilişkili genlerin ekspresyonunu baskılayarak prognozun iyiye gitmesini sağladığı, bu işlevini ise KDM5C ve EZH2'nin yardımıyla başardığı rapor edilmiştir (181). ZMYND8 seviyesini çalışmamız kapsamında incelediğimizde, tüm gruplarımızda metilasyon seviyesi yüksek seviyede gözlemlenmiştir. ZMYND8 geninde gözlenen yüksek metilasyon düzeyi, mevcut literatürle çelişmekle birlikte, genin epigenetik baskılanmasına işaret edebilir.

ZMYND8'in epigenetik baskılanma yolu ile regülasyonu, Carney ve ark.'nın (2023) çalışmasında glioma hücrelerinde DNA hasarı ve genomik bütünlüğe etkisi bakımından gösterilmiş (182), bizim varsayımımız da bu sonuçları desteklemektedir. NAK terapisine bağlı metilasyon değişimlerini incelediğimiz mevcut çalışmamızda, hastalarımızın hiçbirinde bu gen için tedaviye bağlı bir metilasyon farklılığı gözlemlenmemiş, bu sebeple ZMYND8 geninin tedavi etkinliği ile ilişkisi bulunmamıştır.

Histon H3 lizin 4 demetilazı olarak görev yapan KDM5C mutasyonları, DNA metilasyonlarını değiştirerek hastalığın patogenezine katkı sağlamaktadır (183). KDM5C, meme kanseri hücrelerinde genlerin transkripsiyonel aktivasyonu ve represyonunu tetikleyerek iki yönlü çalışabilmektedir. ERα-pozitif meme kanserinde KDM5C, ZMYND8 ile etkileşim sağlayarak ERα ve IFN hedef genlerinin ekspresyonlarını değiştirmekte ve böylece tümör oluşumunu desteklemektedir (184). KDM5C gen bölgesinin patolojik olarak tam ve kısmi yanıt gösteren hastalarda metilasyon seviyelerini değerlendirdiğimizde, tam yanıt veren dört hastanın da metilasyon seviyesi tedavi sonrasında sağlıklı grubunki ile aynı seviyeye eşitlenirken, aynı durum kısmi yanıt gösteren iki hastada daha gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız, tedavi yanıtı farklı olan iki grupta da NAK terapisinin KDM5C geni üzerine etkisi olduğunu göstermiştir.

EZH2 geni, Histon 3'ün lizin 27 pozisyonunu trimetilasyona uğratarak gen ekspresyonlarını regüle etmektedir. EZH2 mutasyonu veya deregülasyonu kanser patogenezi ile ilişkilendirilmiş, genellikler kanser hücrelerinde up-regüle bulunması sağkalımı kötü yönde etkilemiştir (185). Meme kanserinde EZH2'nin ekspresyonu yüksek seviyelerde seyretmesi kliniğin kötüye gitmesine yol açmaktadır. EZH2, ilaç direncindeki rolünü PTEN, PI3K, AKT, mTOR, RAS, RAF, MEK ve ERK yolaklarındaki genleri etkileyerek göstermektedir (186). NAK terapisi alan TNBC hastalarında GFRA1, KCNQ1OT1, DLEU2, ID4, EEF1DP3, TIMP2, TTC38 ve EZH2 genleri ile metilasyon paneli oluşturulmuş, bu panelin tedavi yanıtını öngörmede potansiyel barındırdığı belirtilmiştir (187). EZH2, PRMT1 aracılığıyla metile edildiğinde hipermetilasyonu meme kanseri hastalarında klinik seyri kötüye yönlendirerek metastaza sebebiyet vermektedir (188). Mevcut araştırmamızda, patolojik tam yanıt gösteren bir hastamızda tedavi sonrası EZH2 geni metilasyon seviyesi yükselerek sağlıklı grubunki ile aynı seviyede tespit edilirken, kısmi yanıt gösteren bir hastamızda ise metilasyon

seviyesi tedavi sonrasında öncekine göre biraz daha yükselerek sağlıklı gruba yaklaşmıştır. Bu da hastalarımızda tedavi yanıtı ile EZH2 metilasyon seviyesi ilişkisinin pozitif yöndeki korelasyonunu göstermektedir.

H3 lizin 4'ün demetilasyonunu sağlayan KDM5B, hormon-pozitif meme kanseri tümörlerinde up-regüle olarak bulunmuş, KDM5B'nin aşırı ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (189). Meme kanseri hastalarında KDM5B ekspresyonu artışı metastaz olasılığını arttırmakta, genin susturulması ise proliferasyon ve migrasyonu engellemektedir. KDM5B'nin ekspresyonunun azalması ayrıca EMT yolağını da tersine çevirmektedir (190). KDM5B gen ekspresyonu, p53 geni mutasyon durumu, hastalığın evresi, tümör alt tiplerine göre farklılık gösterebilmektedir. Genin up-regülasyonu belirlenen tümör dokularında ekspresyonu azaltmaya ve ilaç duyarlılığını arttırmaya yönelik uygulamalar, kişiye özgü tedavi protokollerinin oluşturulmasında umut verici sonuçlar ortaya koymuştur (191). KDM5B gen metilasyonunu analiz ettiğimiz araştırmamız neticesinde, tam yanıt veren iki hastamızda da tedavi öncesi hipometile olarak tespit edilen genimiz, tedavi sonrasında hipermetile olarak bulunmuştur. Hastalarımızda tedavi sonrası görülen bu metilasyon değişiminin, genin ekspresyonundaki azalmanı bir sonucu olarak tedavinin başarısına işaret etmektedir.

KDM5B'nin çeşitli genlerle doğrudan veya dolaylı etkileşimleri ile kanser patogenezine katkı sağladığı bilinmekte, bu genler arasında bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan TFAP2C de bulunmaktadır. TFAP2C, hücre döngüsünde inhibitörü görevi üstlenerek CDKN1A ekspresyonunu azaltmaktadır. TFAP2C ve Myc, KDM5B ile kompleks oluşturarak CDKN1A'nin proksimal promotör bölgesine etki etmektedir. Bu üçlü kompleks, CDKN1A'ya etki ederek hücre döngüsü yoluyla tümör oluşumuna katkı sağlamakta ve tedavi etkinliğini azaltmaktadır (192). İleri meme kanseri hastalarında ER antagonisti tedavisinin yanıtı moleküler düzeyde araştırıldığında, TFAP2C'nin up-regülasyonu ile tedavi yanıtının negatif korelasyonu gözlemlenmiştir (193). Siklin bağımlı kinaz 4/6 inhibitörü olan palbosiklib'in meme kanserinde direnç mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada, TFAP2C'nin kanserde deregüle olarak tespit edilmiş bir transkripsiyon faktörü olan ve palbosiklib direncine neden olan DDR1'nin ekspresyonunu regüle ettiği ve TFAP2C inhibisyonunun dirençli hücrelerde ilaç duyarlılığını arttırdığı belirlenmiştir (194). TFAP2C, ERα ve HER2 regülasyonunda kritik bir konuma sahiptir. GPX1 promotöründeki CpG adacığında metilasyon, bu

transkripsiyon faktörünün bağlanmasına engel olmakta ve TFAP2C aracılı GPX1'in ekspresyonu baskılanmaktadır. GPX1 ile ilişkili olarak TFAP2C'nin aktivasyonu, onkogenik mekanizma ve tümör progresyonunda önemli bir mekanizma olarak rapor edilmiştir (195). Bizim araştırmamız sonucunda TFAP2C gen metilasyonu incelemelerine göre patolojik tam yanıt veren hastalarımızdan birinde hipometile tespit edilen genin tedavi sonrasında artışı gözlemlenirken, diğer hastamızda ise tam tersi bir durum görülmüştür. Buna ek olarak kısmi yanıt veren grupta yer alan bir hastamızda da tedavi sonrası bir artış görülmüştür. Hastalarımızda tespit edilen bu epigenetik regülasyondaki farklılıkların, NAK terapisi dışındaki TFAP2C'ye etki eden genetik ve epigenetik regülasyonlar sebebiyle olduğu güşünülmektedir.

Araştırmamızda KDM5 gen ailesi üyeleri ile ilişkili genlerin metilasyon düzeyleri tedavi öncesi-sonrası hastalar ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, birçok hastada metilasyon profillerinin belirgin bir özgünlük taşıdığını göstermektedir. Bu durum, metilasyon temelli biyobelirteçlerin, hastaların klinik özelliklerindeki çeşitlilik ve tümöre verdikleri yanıt doğrultusunda değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda, hastaların klinik özelliklerinin moleküler analiz sonuçlarıyla birlikte ele alınarak kişiye özel tedavi protokollerinin geliştirilmesi gerekliliği vurgulanmaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bireylerde gen varyantlarının araştırılması, hastaların patolojik özelliklerine yardımcı olmakta kullanışlı olabilmektedir. Araştırmamız neticesinde iki hastada rs41308616 ve rs971896841 varyantları belirlenmiş, KDM5C varyantlarının tedavi yanıtında öngördürücü belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Çalışma sonucunda veri tabanlarında yer almayan bir varyant (rs971896841) tespit edilmiştir.

Patolojik olarak tam ve kısmi yanıt gösteren hastalarda metilasyon seviyeleri değerlendirildiğinde, kısmi yanıt veren hastalarda SIN3B (ekzon 19-20), KDM5C, EZH2 ve TFAP2C genleri, tam yanıt verenlerde ise KDM5A, KDM5B, KDM5C, EZH2, TFAP2C ve SIN3B (ekzon 19-20) genleri öne çıkmıştır.

Tüm hastalarda KDM5C, EZH2, SIN3B ve TFAP2C genlerinde kısmi ve tam yanıta bağlı olarak; bazı hastalarda ise metilasyon seviyelerine baktığımız diğer genlerde aşağı ya da yukarı yönde metilasyon farklılıklarının görülmesi çalışmamızın iki amacından biri olan tedavi etkinliğinin kişiye göre farklılık gösterdiğinin önemli bir kanıtıdır.

Kişiselleştirilmiş tedavi tam da bu sebeple bundan sonraki araştırmalarımızda üzerinde çalışacağımız öncelikli konudur.

KAYNAKLAR

1. Waks, A. G., Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 321(3), 288-300.
2. Bombonati, A., Sgroi, D. C. (2011). The molecular pathology of breast cancer progression. *The Journal of pathology*, 223(2), 308-318.
3. Antoniou, A. C., Easton, D. F. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*, 25(43), 5898-5905.
4. Montemurro, F., Nuzzolese, I., Ponzone, R. (2020). Neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in early breast cancer?. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(9), 1071-1082.
5. Hudis, C. A., Gianni, L. (2011). Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *The Oncologist*, 16, 1–11.
6. Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., et al. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*, 295(21), 2492-2502.
7. Tirkkonen, M., Johannsson, O., Agnarsson, B. A., Olsson, H., Ingvarsson, S., Karhu, R., et al. (1997). Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer research*, 57(7), 1222-1227.
8. Rastogi, P., Anderson, S. J., Bear, H. D., Geyer, C. E., Kahlenberg, M. S., Robidoux, A., et al. (2008). "Preoperative chemotherapy: updates of national surgical adjuvant breast and bowel project protocols B-18 and B-27. *Journal of Clinical Oncology*, 26(5), 778-785.
9. Oakman, C., Viale, G., Di Leo, A. (2010). Management of triple negative breast cancer. *The Breast*, 19(5), 312-321.
10. Mackey, J. R., Martin, M., Pienkowski, T., Rolski, J., Guastalla, J. P., Sami, A., et al. (2013). Adjuvant docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide in node-positive breast cancer: 10-year follow-up of the phase 3 randomised BCIRG 001 trial. *The Lancet Oncology*, 14(1), 72-80.
11. Yvon, A. M. C., Wadsworth, P., Jordan, M. A. (1999). Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Molecular biology of the cell*, 10(4), 947-959.
12. van Eijk, M., Vermunt, M. A., van Werkhoven, E., Wilthagen, E. A., Huitema, A. D., Beijnen, J. H. (2022). The influence of docetaxel schedule on treatment tolerability and efficacy in patients with metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC cancer*, 22(1), 1-10.
13. Das, T., Anand, U., Pandey, S. K., Ashby Jr, C. R., Assaraf, Y. G., Chen, Z. S., Dey, A. (2021). Therapeutic strategies to overcome taxane resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*, 55, 100754.
14. Ijaz, M., Shahzad, Z., Ahmad, T. (2022). Cytochrome CYP2B6 Gene Polymorphism and Urinary Adverse Effects in Pakistani Breast Cancer Patients taking Cyclophosphamide. *Precision Medicine Communications*, 2(01).

15. Nojima, K., Hochegger, H., Saberi, A., Fukushima, T., Kikuchi, K., Yoshimura, M., et al. (2005). Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells. *Cancer research*, 65(24), 11704-11711.
16. Dronkert, M. L., Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research/DNA Repair*, 486(4), 217-247.
17. Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., Cedar, H. (2016). DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Research*, 76(12), 3446-50.
18. Köhler, F., Rodríguez-Paredes, M. (2020). DNA methylation in epidermal differentiation, aging, and cancer. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(1), 38-47.
19. Mazloumi, Z., Farahzadi, R., Rafat, A., Asl, K. D., Karimipour, M., Montazer, M., et al. (2022). Effect of aberrant DNA methylation on cancer stem cell properties. *Experimental and Molecular Pathology*, 104757.
20. Sigin, V. O., Kalinkin, A. I., Nikolaeva, A. F., Ignatova, E. O., Kuznetsova, E. B., Chesnokova, G. G., et al. (2023). DNA Methylation and Prospects for Predicting the Therapeutic Effect of Neoadjuvant Chemotherapy for Triple-Negative and Luminal B Breast Cancer. *Cancers*, 15(5), 1630.
21. Pineda, B., Diaz-Lagares, A., Pérez-Fidalgo, J. A., Burgués, O., González-Barrallo, I., Crujeiras, A. B., et al. (2019). A two-gene epigenetic signature for the prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer patients. *Clinical epigenetics*, 11, 1-11.
22. Avraham, A., Uhlmann, R., Shperber, A., Birnbaum, M., Sandbank, J., Sella, A., et al. (2012). Serum DNA methylation for monitoring response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *International journal of cancer*, 131(7), E1166-E1172.
23. Watanabe, Y., Maeda, I., Oikawa, R., Wu, W., Tsuchiya, K., Miyoshi, Y., et al. (2013). Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Genes to cells*, 18(12), 1120-1130.
24. Meyer, B., Clifton, S., Locke, W., Luu, P. L., Du, Q., Lam, D., et al. (2021). Identification of DNA methylation biomarkers with potential to predict response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 1-7.
25. Plch, J., Hrabeta, J., Eckschlager, T. (2019). KDM5 demethylases and their role in cancer cell chemoresistance. *International Journal of Cancer*, 144(2), 221-231.
26. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263.
27. Kiri, S., Ryba, T. (2024). Cancer, metastasis, and the epigenome. *Molecular Cancer*, 23(1), 154.
28. Weber, G. F. (2007). Molecular mechanisms of cancer (Vol. 39, pp. 45-99). Dordrecht: Springer.
29. Meng, X., Zhong, J., Liu, S., Murray, M., Gonzalez-Angulo, A. M. (2012). A new hypothesis for the cancer mechanism. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31, 247-268.

30. Ikramova, S. (2023). Cancer Genesis: Possible Mechanisms of Its Development and Inhibition. *Science and innovation*, 2, 32-36.
31. Dakal, T. C., Dhabhai, B., Pant, A., Moar, K., Chaudhary, K., Yadav, V., et al A. (2024). Oncogenes and tumor suppressor genes: functions and roles in cancers. *MedComm*, 5(6), e582.
32. Sondka, Z., Bamford, S., Cole, C. G., Ward, S. A., Dunham, I., Forbes, S. A. (2018). The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nature Reviews Cancer*, *18*(11), 696-705.
33. Gupta, M., Goyal, N. (2022). Applied anatomy of breast cancer. In S. M. Bose (Ed.), *Breast Cancer: Comprehensive Management.* Singapore: Springer Nature Singapore; pp. 23-35.
34. Troupis, T., Markopoulos, C. (2023). Development, Physiology and Surgical Anatomy of the Breast. In C., Markopoulos, A. Karakatsanis (Eds.), *Breast Cancer Management for Surgeons: An Examination Guide.* Cham: Springer International Publishing; pp. 3-18.
35. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., et al. (2019). Breast cancer. *Nature reviews Disease primers*, 5(1), 66.
36. Gradishar, W. J., Moran, M. S., Abraham, J., Abramson, V., Aft, R., Agnese, D., et al. (2024). Breast cancer, version 3.2024, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 22(5), 331-357.
37. Nolan, E., Lindeman, G. J., Visvader, J. E. (2023). Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell*, 186(8), 1708-1728.
38. WHO. *Breast cancer,* WHO Reports (İnternette) 13 March 2024. Erişim 30.12.2024, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer.
39. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., et al. (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Erişim 08 January 2025. https://gco.iarc.who.int/today/en
40. Giaquinto, A. N., Sung, H., Newman, L. A., Freedman, R. A., Smith, R. A., Star, J., et al. (2024). Breast cancer statistics 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(6), 477-495.
41. Zubair, M., Wang, S., Ali, N. (2021). Advanced approaches to breast cancer classification and diagnosis, *Frontiers in Pharmacology*, 11, 632079.
42. Tsang, J. Y., Gary, M. T. (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in anatomic pathology*, 27(1), 27-35.
43. Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of breast cancer. *Breast Cancer* [Internet].
44. Roy, M., Fowler, A. M., Ulaner, G. A., Mahajan, A. (2023). Molecular classification of breast cancer. *PET clinics*, 18(4), 441-458.
45. Kalli S, Semine A, Cohen S, Naber SP, Makim SS, Bahl M. (2018). American Joint Committee on Cancer's staging system for breast cancer, eighth edition: what the radiologist needs to know. *RadioGraphics*, 38, 1921–1933.
46. Hortobagyi, G. N., Edge, S. B., Giuliano, A. (2018). New and important changes in the TNM staging system for breast cancer. *American society of clinical oncology educational book*, 38, 457-467.

47. Teichgraeber, D. C., Guirguis, M. S., Whitman, G. J. (2021). Breast cancer staging: Updates in the AJCC cancer staging manual, and current challenges for radiologists, from the AJR special series on cancer staging. *American Journal of Roentgenology,* 217(2), 278-290.
48. Smolarz, B., Nowak, A. Z., Romanowicz, H. (2022). Breast cancer—epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature). *Cancers*, 14(10), 2569.
49. Khan, N. A. J., Tirona, M. (2021). An updated review of epidemiology, risk factors, and management of male breast cancer. *Medical Oncology*, 38(4), 39.
50. Obeagu, E. I., Obeagu, G. U. (2024). Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine,* 103(3), e36905.
51. Breast Cancer Association Consortium. (2021). Breast cancer risk genes—association analysis in more than 113,000 women. *New England Journal of Medicine*, 384(5), 428-439.
52. Guo, Q., Lu, Y., Liu, W., Lan, G., Lan, T. (2024). The global, regional, and national disease burden of breast cancer attributable to tobacco from 1990 to 2019: a global burden of disease study. *BMC Public Health*, 24(1), 107.
53. Sohi, I., Rehm, J., Saab, M., Virmani, L., Franklin, A., Sánchez, G., et al. (2024). Alcoholic beverage consumption and female breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Alcohol: Clinical and Experimental Research*, 48, 2222–2241.
54. Kechagioglou, P., Fuller-Shavel, N. (2024). Prevention Is Better Than Treatment. In P., Kechagioglou, N., Fuller-Shavel (Eds.), *Integrative Oncology in Breast Cancer Care.* Cham: Springer Nature Switzerland; pp. 3-8.
55. Bhushan, A., Gonsalves, A., Menon, J. U. (2021). Current state of breast cancer diagnosis, treatment, and theranostics. *Pharmaceutics*, 13(5), 723.
56. You, J. Y., Park, S., Lee, E. G., Lee, E. S. (2023). Detection and Diagnosis of Breast Cancer. In E. S. Lee (ed.), *A Practical Guide to Breast Cancer Treatment*. Singapore: Springer Nature Singapore; pp. 1-17.
57. Loibl, S., André, F., Bachelot, T., Barrios, C. H., Bergh, J., Burstein, H. J., et al. (2024). Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology*, 35(2), 159-182.
58. Jang, J. Y., Kim, Y. S., Kang, K. N., Kim, K. H., Park, Y. J., Kim, C. W. (2021). Multiple microRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis. *Molecular and clinical oncology*, 14(2), 1-1.
59. Yadav, R. K., Singh, P., Kashtriya, P. (2023). Diagnosis of breast cancer using machine learning techniques-a survey. *Procedia Computer Science*, 218, 1434-1443.
60. Ahmad, J., Akram, S., Jaffar, A., Ali, Z., Bhatti, S. M., Ahmad, A., Rehman, S. U. (2024). Deep learning empowered breast cancer diagnosis: Advancements in detection and classification. *Plos one*, 19(7), e0304757.
61. Waks, A. G., Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.

62. You, J. Y., Park, S., Lee, E. S. (2023). Brief Overview of Breast Cancer Treatment. In E. S. Lee (ed.), *A Practical Guide to Breast Cancer Treatment*, (pp. 147-171). Singapore: Springer Nature Singapore.
63. Burguin, A., Diorio, C., Durocher, F. (2021). Breast cancer treatments: updates and new challenges. *Journal of personalized medicine*, 11(8), 808.
64. Hasan, M. M., Mohanan, P., Bibi, S., Babu, C., Roy, Y. J., Mathews, A., et al. (2023). Radiotherapy in breast cancer. In N. Rezaei (Ed.), *Cancer Treatment: An Interdisciplinary Approach*. Switzerland: Springer Nature; pp. 69-96.
65. Sigurdson, S., Thibodeau, S., Korzeniowski, M., Moraes, F. Y. (2024). A Precise Approach for Radiotherapy of Breast Cancer. In O., Al Jarroudi, K., El Bairi, G. Curigliano (Eds.), *Breast Cancer Research and Treatment: Innovative Concepts.* Cham: Springer International Publishing; pp. 175-198.
66. Wang, J., Wu, S. G. (2023). Breast cancer: an overview of current therapeutic strategies, challenge, and perspectives. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 721-730.
67. Trayes, K. P., Cokenakes, S. E. (2021). Breast cancer treatment. *American family physician*, 104(2), 171-178.
68. Dvir, K., Giordano, S., Leone, J. P. (2024). Immunotherapy in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14), 7517.
69. Corti, C., Kurt, B. B., Koca, B., Rahman, T., Conforti, F., Pala, L., et al. (2025). Estrogen Signaling in Early-Stage Breast Cancer: Impact on Neoadjuvant Chemotherapy and Immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 132, 102852.
70. Lau, K. H., Tan, A. M., Shi, Y. (2022). New and emerging targeted therapies for advanced breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2288.
71. Zhu, S. Y., Yu, K. D. (2022). Breast cancer vaccines: disappointing or promising?. *Frontiers in Immunology*, 13, 828386.
72. Yang, Y. H., Liu, J. W., Lu, C., Wei, J. F. (2022). CAR-T cell therapy for breast cancer: from basic research to clinical application. *International journal of biological sciences*, 18(6), 2609.
73. Zafar, A., Khan, M. J., Abu, J., Naeem, A. (2024). Revolutionizing cancer care strategies: immunotherapy, gene therapy, and molecular targeted therapy. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 219.
74. Marwah, H., Dewangan, H. K. (2024). Advancements in solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for breast cancer therapy. *Current pharmaceutical design*, *30*(37), 2922-2936.
75. Lopez-Gonzalez, L., Sanchez Cendra, A., Sanchez Cendra, C., Roberts Cervantes, E. D., Espinosa, J. C., Pekarek, T., et al. (2024). Exploring Biomarkers in Breast Cancer: Hallmarks of Diagnosis, Treatment, and Follow-Up in Clinical Practice. *Medicina*, 60(1), 168.
76. Tarighati, E., Keivan, H., Mahani, H. (2023). A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer. Clinical and experimental medicine, 23(1), 1-16.

77. Li, J., Liu, L., Feng, Z., Wang, X., Huang, Y., Dai, H., et al. (2020). Tumor markers CA15-3, CA125, CEA and breast cancer survival by molecular subtype: a cohort study. *Breast Cancer*, 27, 621-630.

78. Seale, K. N., Tkaczuk, K. H. (2022). Circulating biomarkers in breast cancer. Clinical breast cancer, 22(3), e319-e331.

79. Wang, E., Henderson, M., Yalamanchili, P., Cueto, J., Islam, Z., Dharmani, C., Salas, M. (2024). Potential biomarkers in breast cancer drug development: application of the biomarker qualification evidentiary framework. *Biomarkers in Medicine*, 18(6), 265-277.

80. Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., et al. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International immunopharmacology*, 84, 106535.

81. Kamdje, A. H. N., Etet, P. F. S., Vecchio, L., Muller, J. M., Krampera, M., Lukong, K. E. (2014). Signaling pathways in breast cancer: therapeutic targeting of the microenvironment. *Cellular signalling*, *26*(12), 2843-2856.

82. Kegg Disease. *DISEASE: Breast cancer* 16 January 2025. Erişim 19 January 2025, https://www.kegg.jp/entry/H00031

83. GENEMANIA. Erişim 19 January 2025, https://genemania.org/

84. 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.

85. Fu, X., Tan, W., Song, Q., Pei, H., Li, J. (2022). BRCA1 and breast cancer: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 813457.

86. Li, P. C., Zhu, Y. F., Cao, W. M., Li, B. (2024). ER-positive and BRCA2-mutated breast cancer: a literature review. *European Journal of Medical Research*, 29(1), 30.

87. Behl, T., Kumar, A., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Yadav, S., et al. (2023). Understanding the mechanistic pathways and clinical aspects associated with protein and gene based biomarkers in breast cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126595.

88. Kashyap, D., Garg, V. K., Sandberg, E. N., Goel, N., Bishayee, A. (2021). Oncogenic and tumor suppressive components of the cell cycle in breast cancer progression and prognosis. Pharmaceutics, 13(4), 569.

89. Obeagu, E. I., Ahmed, Y. A., Obeagu, G. U., Bunu, U. O., Ugwu, O. P. C., Alum, E. U. (2023). Biomarkers of breast cancer: Overview. Int. J. Curr. Res. Biol. Med, 1, 8-16.

90. Haan, J. C., Bhaskaran, R., Ellappalayam, A., Bijl, Y., Griffioen, C. J., Lujinovic, E., et al. (2022). MammaPrint and BluePrint comprehensively capture the cancer hallmarks in early-stage breast cancer patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *61*(3), 148-160.

91. Giachetti, P. P. M. B., Schianca, A. C., Trapani, D., Marra, A., Toss, A., Marchiò, C., et al. (2025). Current controversies in the use of Oncotype DX in early breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 102887.

92. Higashimoto, K., Hara, S., Soejima, H. (2022). DNA methylation analysis using bisulfite pyrosequencing. In I., Hatada, T. Horii (Eds.), *Epigenomics: Methods and Protocols*. NY: Springer US; pp. 3-20.

93. Kan, R. L., Chen, J., Sallam, T. (2022). Crosstalk between epitranscriptomic and epigenetic mechanisms in gene regulation. *Trends in Genetics*, 38(2), 182-193.
94. Sazhenova, E. A., Lebedev, I. N. (2021). Evolutionary aspects of genomic imprinting. *Molecular Biology*, 55(1), 1-15.
95. Eggermann, T. (2024). Human reproduction and disturbed genomic imprinting. *Genes*, 15(2), 163.
96. Eggermann, T., Monk, D., de Nanclares, G. P., Kagami, M., Giabicani, E., Riccio, A., et al. (2023). Imprinting disorders. *Nature Reviews Disease Primers*, 9(1), 33.
97. McCulley, M. (2024). *Epigenetics and Health: A Practical Guide*. USA: John Wiley & Sons.
98. Chhabra, R. (2023). The epigenetics of noncoding RNA. In T. O. Tollefsbol (Ed.), *Handbook of epigenetics*. US: Academic Press; pp. 55-71.
99. Pereira, G., Dória, S. (2021). X-chromosome inactivation: implications in human disease. *Journal of Genetics*, 100(2), 63.
100. Ma, Y., Zhu, Y., Shang, L., Qiu, Y., Shen, N., Wang, J., et al. (2023). LncRNA XIST regulates breast cancer stem cells by activating proinflammatory IL-6/STAT3 signaling. *Oncogene*, 42(18), 1419-1437.
101. Hosea, R., Hillary, S., Naqvi, S., Wu, S., Kasim, V. (2024). The two sides of chromosomal instability: drivers and brakes in cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 75.
102. Castellanos, G., Valbuena, D. S., Pérez, E., Villegas, V. E., Rondón-Lagos, M. (2023). Chromosomal instability as enabling feature and central hallmark of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 189-211.
103. Zhang, Y., Sun, Z., Jia, J., Du, T., Zhang, N., Tang, Y., et al. (2021). Overview of histone modification. *Histone Mutations and Cancer*, 1-16.
104. Neganova, M. E., Klochkov, S. G., Aleksandrova, Y. R., Aliev, G. (2022). Histone modifications in epigenetic regulation of cancer: Perspectives and achieved progress. In Seminars in cancer biology, 83, 452-471.
105. Feng, J., Meng, X. (2022). Histone modification and histone modification-targeted anti-cancer drugs in breast cancer: Fundamentals and beyond. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 946811.
106. Li, W., Wu, H., Sui, S., Wang, Q., Xu, S., Pang, D. (2021). Targeting histone modifications in breast cancer: A precise weapon on the way. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 736935.
107. Afzal, S., Hassan, M., Ullah, S., Abbas, H., Tawakkal, F., Khan, M. A. (2022). Breast cancer; discovery of novel diagnostic biomarkers, drug resistance, and therapeutic implications. *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 783450.
108. Zhang, M., Bai, X., Zeng, X., Liu, J., Liu, F., Zhang, Z. (2021). circRNA-miRNA-mRNA in breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, *523*, 120-130.
109. Zablon, F. M., Desai, P., Dellinger, K., Aravamudhan, S. (2024). Cellular and Exosomal MicroRNAs: Emerging Clinical Relevance as Targets for Breast Cancer Diagnosis and Prognosis. *Advanced Biology*, 8(4), 2300532.
110. Abolhasanzadeh, N., Sarabandi, S., Dehghan, B., Karamad, V., Avci, C. B., Shademan, B., Nourazarian, A. (2024). Exploring the intricate relationship between miRNA dysregulation and

breast cancer development: insights into the impact of environmental chemicals. *Frontiers in Immunology*, 15, 1333563.

111. Singh, D., Assaraf, Y. G., Gacche, R. N. (2022). Long non-coding RNA mediated drug resistance in breast cancer. *Drug Resistance Updates*, 63, 100851.
112. Thapa, R., Afzal, O., Gupta, G., Bhat, A. A., Almalki, W. H., Alzarea, S. I., et al. (2023). Unveiling the connection: long-chain non-coding RNAs and critical signaling pathways in breast cancer. *Pathology-Research and Practice*, 249, 154736.
113. Huang, T., Zhao, Y., Jiang, G., Yang, Z. (2024). tsRNA: A Promising Biomarker in Breast Cancer. *Journal of Cancer*, 15(9), 2613.
114. Mattei, A. L., Bailly, N., Meissner, A. (2022). DNA methylation: a historical perspective. *Trends in Genetics*, 38(7), 676-707.
115. Sall, S. O., Berens, P. J. T., Molinier, J. (2022). DNA damage and DNA methylation. In M. G. Jasiulionis (Ed.), *Epigenetics and DNA Damage*. London, UK: Academic Press; pp. 3-16.
116. Carlberg, C., Molnár, F. (2019). *Human epigenetics: How science works*. NY, USA: Springer.
117. Ying, Z., Chen, T. (2023). Mechanisms of DNA Methylation and Demethylation During Mammalian Development. In T. O. Tollefsbol (Ed.), *Handbook of Epigenetics*. London, UK: Academic Press; pp. 11-26.
118. Gillespie, C. A., Chowdhury, A., Quinn, K. A., Jenkins, M. W., Rollins, A. M., Watanabe, M., Ford, S. M. (2024). Fundamentals of DNA methylation in development. *Pediatric Research*, 1-12.
119. Zhang, X., Zhang, Y., Wang, C., Wang, X. (2023). TET (Ten-eleven translocation) family proteins: structure, biological functions and applications. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 297.
120. Daştan, S. D., Yurtcu, N. (2022). *Epigenetics: beyond the genetics and medicine*. NY, USA: Nova Science Publishers.
121. Asmar, F., Gillberg, L., Grønbæk, K. (2023). Methylation and hydroxymethylation in cancer. In S. G. Gray (ed) *Epigenetic Cancer Therapy*. London, UK: Academic Press; pp. 11-37.
122. Yang, Y., Zhang, M., Wang, Y. (2022). The roles of histone modifications in tumorigenesis and associated inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Center*, 2(4), 277-290.
123. Li, F., Zheng, Z., Chen, W., Li, D., Zhang, H., Zhu, Y., et al. (2023). Regulation of cisplatin resistance in bladder cancer by epigenetic mechanisms. *Drug Resistance Updates*, 68, 100938.
124. Yu, X., Zhao, H., Wang, R., Chen, Y., Ouyang, X., Li, W., et al. (2024). Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine. *Cell Death Discovery*, 10(1), 28.
125. Davalos, V., Esteller, M. (2023). Cancer epigenetics in clinical practice. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(4), 376-424.
126. Roy, M., Biswas, J., Datta, A. (2023). *Genetics and Epigenetics of Breast Cancer*. Singapore; Springer Nature Singapore.
127. Däster, K., Hench, J., Diepenbruck, M., Volkmann, K., Rouchon, A., Palafox, M., et al. (2025). BRCA promoter methylation in triple-negative breast cancer is preserved in xenograft models and

represents a potential therapeutic marker for PARP inhibitors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 209(2), 389-396.

128. Lønning, P. E., Nikolaienko, O., Pan, K., Kurian, A. W., Eikesdal, H. P., Pettinger, M., et al. (2022). Constitutional BRCA1 methylation and risk of incident triple-negative breast cancer and high-grade serous ovarian cancer. *JAMA oncology*, 8(11), 1579-1587.
129. Garcia-Martinez, L., Zhang, Y., Nakata, Y., Chan, H. L., Morey, L. (2021). Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. *Nature communications*, 12(1), 1786.
130. Vietri, M. T., D'elia, G., Benincasa, G., Ferraro, G., Caliendo, G., Nicoletti, G. F., Napoli, C. (2021). DNA methylation and breast cancer: A way forward. *International journal of oncology*, 59(5), 1-12.
131. Ma, L., Li, C., Yin, H., Huang, J., Yu, S., Zhao, J., et al. (2023). The mechanism of DNA methylation and miRNA in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9360.
132. Li, Y. (2021). Modern epigenetics methods in biological research. *Methods*, 187, 104-113.
133. Jeddi, F., Faghfuri, E., Mehranfar, S., Soozangar, N. (2024). The common bisulfite-conversion-based techniques to analyze DNA methylation in human cancers. *Cancer Cell International*, 24(1), 240.
134. Hong, S. R., & Shin, K. J. (2021). Bisulfite-converted DNA quantity evaluation: a multiplex quantitative real-time PCR system for evaluation of bisulfite conversion. *Frontiers in genetics*, 12, 618955.
135. Kresse, S. H., Brandt-Winge, S., Pharo, H., Flatin, B. T., Jeanmougin, M., Vedeld, H. M., Lind, G. E. (2023). Evaluation of commercial kits for isolation and bisulfite conversion of circulating cell-free tumor DNA from blood. *Clinical Epigenetics*, 15(1), 151.
136. Humardani, F. M., Mulyanata, L. T., Tanaya, L. T. A., Ikawaty, R., Wijono, H., Sulistomo, H. W., et al. (2023). Methylation Specific PCR (MSP): Nested PCR vs Unnested PCR. In *Conference on Natural Resources And Life Sciences 2022 (NRLS-BIO 2022)*. France: Atlantis Press; pp. 90-95.
137. Martisova, A., Holcakova, J., Izadi, N., Sebuyoya, R., Hrstka, R., Bartosik, M. (2021). DNA methylation in solid tumors: functions and methods of detection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4247.
138. Beck, D., Ben Maamar, M., Skinner, M. K. (2022). Genome-wide CpG density and DNA methylation analysis method (MeDIP, RRBS, and WGBS) comparisons. *Epigenetics*, 17(5), 518-530.
139. Rauch, T. A., Pfeifer, G. P. (2023). Methods for Analyzing DNA Cytosine Modifications Genome-wide. In T. O. Tollefsbol (Ed.), *Handbook of epigenetics: the new molecular and medical genetics*. UK: Academic Press; pp. 123-135.
140. Nakabayashi, K., Yamamura, M., Haseagawa, K., Hata, K. (2022). Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). In J. M. Walker (ed.), *Epigenomics: Methods and Protocols.* NY: Springer US; pp. 39-51.

141. Parrish, R. R., Day, J. J., Lubin, F. D. (2012). Direct bisulfite sequencing for examination of DNA methylation with gene and nucleotide resolution from brain tissues. *Current Protocols in Neuroscience*, 60(1), 7-24.

142. Chen, S., Huang, L., Liu, Y., Chen, C. M., Wu, J., Shao, Z. M. (2013). The predictive and prognostic significance ofpre-and post-treatment topoisomerase IIα in anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy for local advanced breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 39(6), 619-626.

143. Provençal, N., Suderman, M. J., Guillemin, C., Massart, R., Ruggiero, A., Wang, D., ... & Szyf, M. (2012). The signature of maternal rearing in the methylome in rhesus macaque prefrontal cortex and T cells. *Journal of Neuroscience*, 32(44), 15626-15642.

144. Korde, L. A., Somerfield, M. R., Carey, L. A., Crews, J. R., Denduluri, N., Hwang, E. S., ... & Hershman, D. L. (2021). Neoadjuvant chemotherapy, endocrine therapy, and targeted therapy for breast cancer: ASCO guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 39(13), 1485-1505.

145. Tamirisa, N., & Hunt, K. K. (2022). Neoadjuvant chemotherapy, endocrine therapy, and targeted therapy for breast cancer: ASCO guideline. *Annals of surgical oncology*, 29(3), 1489-1492.

146. An, J., Peng, C., Tang, H., Liu, X., & Peng, F. (2021). New advances in the research of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9644.

147. Chiappa, C., Greta, M., Miriam, L., Ietto, G., Inversini, D., Ballabio, A., ... & Rovera, F. A. (2024). Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: evaluation of the impact on surgical outcomes and prognosis. *Cancers*, 16(13), 2332.

148. Chen, Y., Qi, Y., & Wang, K. (2023). Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: an evaluation of its efficacy and research progress. *Frontiers in Oncology*, 13, 1169010.

149. DeMichele, A., Yee, D., & Esserman, L. (2017). Mechanisms of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(23), 2287-2289.

150. An, J., Peng, C., Tang, H., Liu, X., & Peng, F. (2021). New advances in the research of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9644.

151. Desgres, M., Poyraz, M., Sari, B., Duhoux, F. P., van Marcke, C., & Corbet, C. (2025). Resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancers: a metabolic perspective. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 44(1), 234.

152. Kim, M. W., Lee, H., Lee, S., Moon, S., Kim, Y., Kim, J. Y., ... & Kim, J. Y. (2024). Drug-resistant profiles of extracellular vesicles predict therapeutic response in TNBC patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *BMC cancer*, 24(1), 185.

153. Kim, M. W., Moon, S., Lee, S., Lee, H., Kim, Y., Kim, J. Y., ... & Kim, S. I. (2024). Exploring miRNA-target gene profiles associated with drug resistance in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *Oncology Letters*, 27(4), 1-14.

154. Bouhniz, O. E., & Kenani, A. (2025). Potential role of genetic polymorphisms in neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer. *Journal of Chemotherapy*, 37(2), 97-111.

155. Yin, G., Liu, L., Yu, T., Yu, L., Feng, M., Zhou, C., ... & Yu, Z. (2024). Genomic and transcriptomic analysis of breast cancer identifies novel signatures associated with response to neoadjuvant chemotherapy. *Genome Medicine*, 16(1), 11.

156. Ghorbani, M., Namazi, S., Dehghani, M., Razi, F., Khalvati, B., & Dehshahri, A. (2025). Identifying the potential mediators of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy among TACR1 gene polymorphisms: a study on breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 211(3), 617-626.

157. Zhao, Z., Li, L., He, M., Li, Y., Ma, X., & Zhao, B. (2024). Prognostic and Predictive Markers for Early Stage Triple-Negative Breast Cancer Treated With Platinum-Based Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancer Medicine*, 13(20), e70336.

158. Kluzek, K., Srebniak, M. I., Majer, W., Ida, A., Milecki, T., Huminska, K., ... & Wesoly, J. (2017). Genetic characterization of Polish ccRCC patients: somatic mutation analysis of PBRM1, BAP1 and KDMC5, genomic SNP array analysis in tumor biopsy and preliminary results of chromosome aberrations analysis in plasma cell free DNA. *Oncotarget*, 8(17), 28558.

159. Zheng, T., Pang, Z., & Zhao, Z. (2019). A gene signature predicts response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer patients. *Bioscience reports*, 39(5), BSR20190414.

160. van den Ende, N. S., Nguyen, A. H., Jager, A., Kok, M., Debets, R., & van Deurzen, C. H. (2023). Triple-negative breast cancer and predictive markers of response to neoadjuvant chemotherapy: a systematic review. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2969.

161. Ferrari, P., Scatena, C., Ghilli, M., Bargagna, I., Lorenzini, G., & Nicolini, A. (2022). Molecular mechanisms, biomarkers and emerging therapies for chemotherapy resistant TNBC. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1665.

162. Sha, R., Xu, Y., Yuan, C., Sheng, X., Wu, Z., Peng, J., ... & Lu, J. (2021). Predictive and prognostic impact of ferroptosis-related genes ACSL4 and GPX4 on breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *EBioMedicine*, 71.

163. Tarhonska, K., Wichtowski, M., Wow, T., Kołacińska-Wow, A., Płoszka, K., Fendler, W., ... & Jabłońska, E. (2025). DNA Methylation and Demethylation in Triple-Negative Breast Cancer: Associations with Clinicopathological Characteristics and the Chemotherapy Response. *Biomedicines*, 13(3), 585.

164. Guo, Z., Wei, J., Gui, A., Liang, X., Yu, P., Bai, J., ... & Ma, S. (2025). Analysis of methylation features associated with neoadjuvant efficacy in HER2-positive breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 15, 1610093.

165. Takahashi, H., Kagara, N., Tanei, T., Naoi, Y., Shimoda, M., Shimomura, A., ... & Noguchi, S. (2017). Correlation of methylated circulating tumor DNA with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Clinical breast cancer*, 17(1), 61-69.

166. Rykov, S. V., Filippova, E. A., Loginov, V. I., & Braga, E. A. (2021). Gene Methylation in Circulating Cell-Free DNA from the Blood Plasma as Prognostic and Predictive Factor in Breast Cancer. *Russian Journal of Genetics*, 57(11), 1239-1252.

167. Pavlenko, E., Ruengeler, T., Engel, P., & Poepsel, S. (2022). Functions and interactions of mammalian KDM5 demethylases. Frontiers in genetics, 13, 906662.

168. Ohguchi, Y., & Ohguchi, H. (2022). Diverse functions of KDM5 in cancer: Transcriptional repressor or activator?. *Cancers*, 14(13), 3270.

169. Hou, J., Wu, J., Dombkowski, A., Zhang, K., Holowatyj, A., Boerner, J. L., & Yang, Z. Q. (2012). Genomic amplification and a role in drug-resistance for the KDM5A histone demethylase in breast cancer. *American journal of translational research*, 4(3), 247.

170. Yang, G. J., Ko, C. N., Zhong, H. J., Leung, C. H., & Ma, D. L. (2019). Structure-based discovery of a selective KDM5A inhibitor that exhibits anti-cancer activity via inducing cell cycle arrest and senescence in breast cancer cell lines. *Cancers*, 11(1), 92.

171. Ham, J., Lee, S., Lee, H., Jeong, D., Park, S., & Kim, S. J. (2018). Genome-wide methylation analysis identifies NOX4 and KDM5A as key regulators in inhibiting breast cancer cell proliferation by ginsenoside Rg3. *The American journal of Chinese medicine*, 46(06), 1333-1355.

172. Cantor, D. J., & David, G. (2017). The potential of targeting Sin3B and its associated complexes for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 21(11), 1051-1061.

173. Varier, R. A., de Santa Pau, E. C., Van Der Groep, P., Lindeboom, R. G., Matarese, F., Mensinga, A., ... & Vermeulen, M. (2016). Recruitment of the mammalian histone-modifying EMSY complex to target genes is regulated by ZNF131. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7313-7324.

174. Morales-Valencia, J., Petit, C., Calderon, A., Saini, S., & David, G. (2023). Chromatin-associated SIN3B protects cancer cells from genotoxic stress-induced apoptosis and dictates DNA damage repair pathway choice. *Molecular Cancer Research*, 21(9), 947-957.

175. Bao, L., Kumar, A., Zhu, M., Peng, Y., Xing, C., Wang, J. E., ... & Luo, W. (2023). SAP30 promotes breast tumor progression by bridging the transcriptional corepressor SIN3 complex and MLL1. *The Journal of clinical investigation*, 133(17).

176. Farias, E. F., Petrie, K., Leibovitch, B., Murtagh, J., Chornet, M. B., Schenk, T., ... & Waxman, S. (2010). Interference with Sin3 function induces epigenetic reprogramming and differentiation in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11811-11816.

177. Chen, Y., Tsai, Y. H., & Tseng, S. H. (2021). Regulation of ZMYND8 to treat cancer. *Molecules*, 26(4), 1083.

178. Wang, Y., Wang, Y., Bao, L., Vale, G., McDonald, J. G., Fang, Y., ... & Luo, W. (2025). ZMYND8 drives HER2 antibody resistance in breast cancer via lipid control of IL-27. *Nature communications*, 16(1), 3908.

179. Pourasghariazar, M., Zarredar, H., Asadi, M., Caner, A., Akhgari, A., Valizadeh, H., ... & Raeisi, M. (2023). Comparative evaluation of ZMYND-8 and RARβ2 genes promoters' methylation changes in tumor and tumor margin tissues of patients with lung cancer. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 24(1), 20.

180. Gong, F., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Legube, G., & Miller, K. M. (2017). Histone demethylase KDM5A regulates the ZMYND8–NuRD chromatin remodeler to promote DNA repair. *Journal of Cell Biology*, 216(7), 1959-1974.

181. Mukherjee, S., Adhikary, S., Gadad, S. S., Mondal, P., Sen, S., Choudhari, R., ... & Das, C. (2020). Suppression of poised oncogenes by ZMYND8 promotes chemo-sensitization. *Cell death & disease*, 11(12), 1073.

182. Carney, S. V., Banerjee, K., Mujeeb, A., Zhu, B., Haase, S., Varela, M. L., ... & Castro, M. G. (2023). Zinc finger MYND-type containing 8 (ZMYND8) is epigenetically regulated in mutant isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) glioma to promote radioresistance. *Clinical Cancer Research*, *29*(9), 1763-1782.

183. Grafodatskaya, D., Chung, B. H., Butcher, D. T., Turinsky, A. L., Goodman, S. J., Choufani, S., ... & Weksberg, R. (2013). Multilocus loss of DNA methylation in individuals with mutations in the histone H3 lysine 4 demethylase KDM5C. *BMC Medical Genomics*, 6(1), 1.

184. Shen, H. F., Zhang, W. J., Huang, Y., He, Y. H., Hu, G. S., Wang, L., ... & Liu, W. (2021). The dual function of KDM5C in both gene transcriptional activation and repression promotes breast cancer cell growth and tumorigenesis. *Advanced Science*, 8(9), 2004635.

185. Luo, L., Wang, Z., Hu, T., Feng, Z., Zeng, Q., Shu, X., ... & Li, Z. (2023). Multiomics characteristics and immunotherapeutic potential of EZH2 in pan-cancer. *Bioscience Reports*, 43(1), BSR20222230.

186. Chen, Y., Zhu, H., Luo, Y., Tong, S., & Liu, Y. (2024). EZH2: The roles in targeted therapy and mechanisms of resistance in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 175, 116624.

187. Sigin, V. O., Kalinkin, A. I., Ignatova, E., Chesnokova, G., Vinogradov, I. Y., Vinogradov, I. I., ... & Tanas, A. S. (2020). 27P Development of DNA methylation markers panels for neoadjuvant chemotherapy response prediction in triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*, 31, S1225.

188. Li, Z., Wang, D., Lu, J., Huang, B., Wang, Y., Dong, M., ... & Bai, J. (2020). Methylation of EZH2 by PRMT1 regulates its stability and promotes breast cancer metastasis. *Cell Death & Differentiation*, 27(12), 3226-3242.

189. Yamamoto, S., Wu, Z., Russnes, H. G., Takagi, S., Peluffo, G., Vaske, C., ... & Polyak, K. (2014). JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer. *Cancer cell*, 25(6), 762-777.

190. Zhang, Z. G., Zhang, H. S., Sun, H. L., Liu, H. Y., Liu, M. Y., & Zhou, Z. (2019). KDM5B promotes breast cancer cell proliferation and migration via AMPK-mediated lipid metabolism reprogramming. *Experimental cell research*, 379(2), 182-190.

191. Jose, A., Munisamy, M., Kulkarni, P., Shenoy, G. G., Rodrigues, G. S., Damerla, R. R., ... & Rao, M. (2024). 36P Abacavir potentiates the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells via KDM5B Inhibition. *ESMO Open*, 9.

192. Wong, P. P., Miranda, F., Chan, K. V., Berlato, C., Hurst, H. C., & Scibetta, A. G. (2012). Histone demethylase KDM5B collaborates with TFAP2C and Myc to repress the cell cycle inhibitor p21cip (CDKN1A). *Molecular and cellular biology*, 1633–1644.

193. Jeselsohn, R., Barry, W. T., Migliaccio, I., Biagioni, C., Zhao, J., De Tribolet-Hardy, J., ... & Malorni, L. (2016). TransCONFIRM: identification of a genetic signature of response to fulvestrant in advanced hormone receptor–positive breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(23), 5755-5764.

194. Mughal, M. J., Zhang, Y., Li, Z., Zhou, S., Peng, C., Zhang, Y. Q., ... & Zhu, W. (2025). TFAP2C-DDR1 axis regulates resistance to CDK4/6 inhibitor in breast cancer. *Cancer letters*, 610, 217356.

195. Kulak, M. V., Cyr, A. R., Woodfield, G. W., Bogachek, M., Spanheimer, P. M., Li, T., ... & Weigel, R. J. (2013). Transcriptional regulation of the GPX1 gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer. *Oncogene*, 32(34), 4043-4051.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 13.11.2023-22863

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 03.11.2023
Toplantı Sayısı : 2023/19
Karar Sayısı : 19/27

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulanDoç. Dr. Ender Mehmet Çoşkunpınar'ın sorumlu, Uzm. Tıbbi Biy. Halime Yıldırım ve Prof. Dr. Mustafa Tükenmez'in yardımcı araştırmacı olduğu 23/618 kayıt numaralı ***"Neoadjuvan Kemoterapi Alan Lokal İleri Meme Kanseri Hastalarında Tedavi Öncesi ve Sonrası DNA Metilasyon Seviyelerinin Araştırılması"*** başlıklı proje önerisi kurulumuzun 03.11.2023 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL
Başkan

Doç. Dr. Muzaffer AKDOĞAN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Abubekir ELTAS
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Papatya KELEŞ
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Selda RIZALAR
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Eray Metin GÜLER
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Erhan ALABAY
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Gamze TEMİZ
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe ÖZYAZICI
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Şükran ÖZDATLI KURTULUŞ
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Banu BAYRAM
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Esra ÇİKLER
Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Hasan DEMİRCİ
Öğretim Üyesi

07.11.2023 Memur Feyzanur SEZGİN

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evrak Tarih ve Sayısı: 12.08.2024-385225

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-46418926-050.04--385225 12.08.2024
Konu : 23-618/Dilekçe

Sayın Prof. Dr. Ender M. ÇOŞKUNPINAR

03.11.2023 tarihli ve 19/27 karar sayılı "Neoadjuvan Kemoterapi Alan Lokal İleri Meme Kanseri Hastalarında Tedavi Öncesi ve Sonrası DNA Metilasyon Seviyelerinin Araştırılması" başlıklı uygun bulunan çalışmanın başlığının "Neoadjuvan Kemoterapi Alan Meme Kanseri Hastalarında Tedavi Öncesi ve Sonrası DNA Metilasyon Seviyelerinin Araştırılması" olarak değiştirilmesi Etik Kurulumuzca uygun görülmüş olup arşiv kayıtlarına eklenmiştir.

Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL
Başkan

Ek:Dilekçe

EK-2. Bilgilendirilmiş Onam Formu

Araştırma Projesinin Adı: Neoadjuvan Kemoterapi Alan Meme Kanseri Hastalarında Tedavi Öncesi ve Sonrası DNA Metilasyon Seviyelerinin Araştırılması
Sorumlu Araştırıcının Adı: *Prof. Dr. Ender M. ÇOŞKUNPINAR*
Diğer Araştırıcıların Adı: *Uzm. Tıbbi Biy. Halime YILDIRIM, Prof. Dr. Mustafa TÜKENMEZ*

"Neoadjuvan Kemoterapi Alan Lokal İleri Meme Kanseri Hastalarında Tedavi Öncesi ve Sonrası DNA Metilasyon Seviyelerinin Araştırılması" isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sizde "Meme Kanseri" hastalığının görülmüş olmasıdır. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma, *Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. Ender M. ÇOŞKUNPINAR* sorumluluğu altındadır.

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

- *Araştırmanın amacı,*

— *Neoadjuvan terapiye yanıt, kullanılan kemoterapi protokollerine göre değişmektedir. Bu protokollerde yer alan etken maddelerle, hedeflediğimiz genlerin metilasyon seviyeleri arasında bir ilişki olup olmadığının anlaşılması birinci amacımızdır.*

— *DNA metilasyon seviyeleri tespit edilecek olan bu genlerin tedaviye yanıta katkı anlamında yolak analizlerinin de yapılarak elde edilecek verilerin klinik bulgularla eşleştirilmesi sonucu kişiye özgü tedavi protokollerinin oluşturulması çalışmamızın ikinci amacıdır.*

— *Metilasyon seviyelerinin tedaviye yanıtı etkilediği belirlenen genlerin ilgili bölgelerinin dizilenerek bu bölgelerde yer alan varyantların ortaya konması çalışmamızın üçüncü amacıdır.*

- *Çalışmaya kaç kişinin alınmasının planlandığı,*

Çalışmaya 18-60 yaş aralığında, İstanbul Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapılan tetkikler sonucu (klinik, radyolojik,

biyokimyasal, patolojik) lokal ileri meme kanseri tanısı almış ve araştırmayı kabul ettiğine dair yazılı onay veren 30 gönüllü dahil edilecektir. Çalışma tek merkezli olarak yürütülecektir.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalasanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten doktor çalışmaya devam etmenizin sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

Bu çalışmaya katılırsam beni ne bekliyor?

- Çalışmanın hangi yöntemlerle gerçekleştirileceği,
  Gönüllülerden rutin tetkikler için alınan kan örneğinden artan 2 ml.'lik kısım çalışma için kullanılmak üzere ayırılacaktır. Alınan tüm örnekler aynı gün soğuk zincir ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ulaştırılacaktır. Elde edilen periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılacak, ardından Metilasyon-spesifik PCR ve Sanger dizileme yöntemleri kullanılarak ilgili genlerin metilasyon seviyeleri ve varyasyonlar araştırılacaktır. Toplanan verilerin analizi SPSS version 25.0 bilgisayar programı ile yapılacaktır.

  - Araştırmanın süresi
    Çalışmanın 24 ay sürmesi planlanmaktadır.

  - Hastaya ait biyolojik bir materyal ya da görüntü materyali üzerinde çalışılacaksa tam olarak ne bakılacağı,
    Hastalığınız nedeni ile yapılan rutin tetkik ve tedavi işlemleriniz sırasında sizden alınan kanda (2 ml) ilişkili genlerin metilasyon seviyelerinin nasıl değiştiği ve olası varyantlar araştırılacaktır.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?

Araştırmanın hastalar için herhangi bir riski ve çalışma kaynaklı rahatsızlık oluşturucu bir durumu söz konusu değildir.

Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : *Prof. Dr. Mustafa TÜKENMEZ*
GÖREVİ : *Genel Cerrah*
TELEFON :

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında, Prof. Dr. Ender M. ÇOŞKUNPINAR tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim).* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. Araştırmadan elde edilen benimle ilgili

kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum. Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, *Prof. Dr. Mustafa TÜKENMEZ, …'nolu telefon ve İstanbul Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Genel Cerrahi ABD., Topkapı, Turgut Özal Millet Cd, 34093 Fatih/İstanbul* adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı	**Görüşme tanığı**
Adı, soyadı:	Adı, soyadı:
Adres:	Adres:
Tel:	Tel:
İmza:	İmza:
Tarih:	Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı: *Mustafa TÜKENMEZ, Prof. Dr.*

Adres: *İstanbul Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Genel Cerrahi ABD., Topkapı, Turgut Özal Millet Cd, 34093 Fatih/İstanbul*

Tel:

İmza:

Tarih: