

**MEME KANSERİ İLE GLUKOKORTİKÖİD  
RESEPTÖR GENİ POLİMORFİZMLERİ  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gürkan AKYILDIZ**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL  
2012**

**T.C.**  
**NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MEME KANSERİ İLE GLUKOKORTİKOİD RESEPTÖR GENİ  
POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gürkan AKYILDIZ**

**BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL**

**TEKİRDAĞ-2012**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### MEME KANSERİ İLE GLUKOKORTİKÖİD RESEPTÖR GENİ POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Gürkan AKYILDIZ

Namık Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL

Glukokortikoid reseptör (GR), anti-apoptotik özelliği ve ekspresyon düzeyleri meme kanserinde çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiş olan nükleer reseptörler ailesine ait bir proteindir. Öte yandan, meme kanserinde GR geni mutasyon ve polimorfizmlerini ele alan tek bir çalışmaya rastlanmaktadır. Bu tezin amacı, meme kanseri hastalarında GR geninin dört yaygın polimorfizminin frekanslarını belirlemek ve yaş, menopoz durumu, aile öyküsü, östrojen ve progesteron reseptörü ekspresyonu gibi klinik özelliklerindeki rolünü incelemektir. Toplam 85 meme kanseri örneği ve sağlıklı gönüllülerden alınan 86 periferik kan örneğinde GR geni *BclI*, *Tth111I*, ER22/23EK ve N363S polimorfizmleri incelenmiştir. İstatistiksel kıyaslamalar hasta ve kontroller arasında klinik-patolojik özellikler de ele alınarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilere göre, sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında GR geni *Tth111I* ve ER22/23EK polimorfizmleri ile meme kanseri arasında anlamlı bir ilişki vardır. Ancak, *BclI* ve N363S polimorfizmleri ile herhangi bir ilişki yoktur.

Bizim bilgilerimize göre bu çalışma, GR gen polimorfizmleri ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır. Tez kapsamında az sayıda vaka ele alınmasına rağmen, elde ettiğimiz sonuçlar GR gen polimorfizmlerinin meme kanserinde önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir. Bu ilişkinin aydınlatılabilmesi için daha fazla sayıda vaka içeren çalışmalar gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Glukokortikoid reseptörü, meme kanseri, polimorfizm

2012 , 60 sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND BREAST CANCER

Gurkan AKYILDIZ

Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Cenk ARAL

Glucocorticoid receptor (GR) belongs to nuclear receptors family and its anti-apoptotic role and expression levels have been shown in breast cancer in various in vitro and in vivo studies. On the other hand, there is only one study available concerning mutations and polymorphisms of GR gene in breast cancer. The aims of this thesis were to determine the frequencies of 4 common polymorphisms of GR gene in breast cancer patients and analyze their role in clinical features such as age, menopausal status, family history, expression of estrogen and progesterone receptors. A total of 85 breast cancer samples and 86 peripheral blood samples from healthy volunteers were analyzed for *BclII*, *Tth111I*, ER22/23EK and N363S polymorphisms of GR gene. Statistical comparisons were made between cases and healthy individuals as well as their clinicopathological features.

According to our data, there are significant associations between *Tth111I* and ER22/23EK polymorphisms and breast cancer when compared to healthy individuals. However, there are no associations with *BclII* and N363S polymorphisms.

In our knowledge, this is the first study investigating the association between GR gene polymorphisms and breast cancer. Since small number of cases analyzed in this thesis, our results indicate that GR gene polymorphisms may play an important role in breast cancer. Studies concerning larger numbers of cases are necessary to clarify this association.

**Keywords:** Glucocorticoid receptor, breast cancer, polymorphism

2012 , 60 pages



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimimde bilgi birikimini ve deneyimlerini benimle paylaşan ve bilimsel desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Cenk ARAL'a;

Tez çalışmamın deney ve hazırlanma aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Rifat BİRCAN ve değerli çalışma arkadaşım Serdar FINDIK, Araş. Gör. Levent CAN ve diğer tüm Biyoloji A.D. mensuplarına;

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmamın yorgunluğunu ve stresini atmamda yardımcı olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Nadim YILMAZER ve değerli arkadaşım Ayhan DEMİR'e;

Yüksek lisans öğrenimim sırasında tez çalışmam dışında farklı çalışmalarda yer almamı sağlayan sayın hocalarım Doç. Dr. Sırrı KAR ve Yrd. Doç. Dr. Deniz ŞİRİN'e;

Tez çalışmamda kullandığım örneklerin sağlanmasında yardımcı olan Marmara Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Anabilim dalı ve Patoloji Anabilim dalı mensuplarına, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı başkanı sayın Prof. Dr. Ayşe ÖZER ve anabilim dalı mensuplarına;

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca maddi manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen ve yüksek lisans öğrenimimi tamamlamamda şüphesiz büyük payı olan sevgili ailem ve beni bu yolda hiç yalnız bırakmayan canım sevgilim Dilan Hevra KIZILOCAK'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından NKUBAP.00.10.YL.10.28 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>11<math>\beta</math>-HSD</b>	11 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenaz
<b>A</b>	Adenin
<b>ACTH</b>	Adrenokortikotropik hormon
<b>AF-2</b>	Nükleer reseptör koaktivatörü
<b>AP-1</b>	Adaptor protein 1
<b>AR</b>	Androjen reseptörü
<b>ATM</b>	Mutant ataksi telanjiektazi
<b>AVP</b>	Arjinin vazopressin
<b>BACH-1</b>	BTB ve CNC homoloğu-1
<b>BAP1</b>	BRCA1 ile ilişkili protein-1
<b>bcl-1</b>	B-hücre lenfoma-1 protein
<b>Bç</b>	Baz çifti
<b>BRCA 1</b>	Meme kanseri tip 1 yatkınlık proteini
<b>BRCA 2</b>	Meme kanseri tip 2 yatkınlık proteini
<b>BSA</b>	Sığır serum albümini
<b>C</b>	Sitozin
<b>c-fos</b>	FBJ fare osteosarkom viral onkogen homoloğu
<b>CHK2</b>	Hücre döngüsü kontrol noktası kinaz 2
<b>c-myc</b>	Miyelositomatozis viral proto-onkogeni
<b>c-jun</b>	Avian sarkoma virüs 17 proto-onkogen homoloğu

<b>COMT</b>	Katekol-O-metiltransferaz
<b>CRH</b>	Kortikotropin serbestleştirici hormon
<b>CYP1A1</b>	Sitokrom P450, aile 1, alt aile A, polipeptit 1
<b>Da</b>	Dalton
<b>dATP</b>	Deoksiadenozin trifosfat
<b>DCC</b>	Deleted in colorectal carcinoma
<b>dCTP</b>	Deoksisitidin trifosfat
<b>dGTP</b>	Deoksiguanozin trifosfat
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile su
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleikasit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleikasit trifosfat
<b>dTTP</b>	Deoksitimidin trifosfat
<b>EDTA</b>	Etilendaimintetraasetik asit
<b>EhK2</b>	EPH homolog kinaz 2
<b>ER</b>	Östrojen reseptörü
<b>ERR</b>	Östrojen ile ilişkili reseptörler
<b>EtBr</b>	Etidyum bromür
<b>FHIT</b>	Kırılgan histidin üçlüsü
<b>FOXP1</b>	Forkhead box P1
<b>G</b>	Guanin
<b>GC</b>	Glukokortikoid

<b>GR</b>	Glukokortikoid reseptörü
<b>GRE</b>	Glukokortikoid cevap elementi
<b>GSTM1</b>	Glutasyon S-transferaz mu 1
<b>HCl</b>	Hidrojen klorür
<b>Her-2</b>	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
<b>HLA</b>	İnsan lökosit antijeni
<b>Hsp</b>	Hsp organize edici protein
<b>HPA</b>	Hipofiz-adrenokortikal eksen
<b>h-ras</b>	Harvey rat sarkoma virüs onkogen 1
<b>Hsp</b>	Isı şok proteini
<b>IARC</b>	Uluslar arası Kanser Araştırma Ajansı
<b>KCl</b>	Potasyum klorür
<b>LKB1</b>	Liver kinaz B1
<b>MAPK</b>	Mitojenle aktive olan protein kinazlar
<b>MCF7</b>	Michigan Cancer Foundation - 7
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum klorür
<b>MLH1</b>	MutL homolog 1
<b>MSH2</b>	MutS homolog 2
<b>MTS1</b>	Malign transformasyon baskılayıcı-1
<b>NaAC</b>	Sodyum asetat
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür

<b>NAT2:</b>	N-asetiltransferaz 2
<b>NF-κB</b>	Nükleer faktör kappa B
<b>nGRE</b>	Negatif glukokortikoid yanıt elementi
<b>nm23</b>	Putative oncoprotein nm23
<b>NR</b>	Nükleer reseptör
<b>NR3C1</b>	Nükleer reseptör alt aile 3, grup C, üye 1
<b>NR3C2</b>	Nükleer reseptör altaile 3, grup C, üye 2
<b>p16</b>	Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A
<b>p23</b>	Prostaglandin E sentetaz 3
<b>p53</b>	Tümör protein 53 geni
<b>PI3-K</b>	Fosfatidilinositol-3-kinaz
<b>PR</b>	Progesteron reseptörü
<b>PTCN</b>	Periferal T-hücre neoplazmi
<b>PTEN</b>	Fosfataz ve tenzin homologu
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RAD51</b>	DNA tamir protein RAD51 homolog 1
<b>RARA</b>	Retinoik asit reseptör alfa
<b>Rb1</b>	Retinoblastoma 1
<b>RE</b>	Restriksiyon enzimi
<b>RFLP</b>	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
<b>Ser</b>	Serin

<b>SNP</b>	Tek nükleotit polimorfizmi
<b>SOD2</b>	Süperoksit dismutaz 2
<b>STK11</b>	Serin/treonin kinaz 11
<b>SULT1A1</b>	Sülfotransferaz ailesi, sitozolik, 1A, fenol tercih eden, üye 1
<b>SUMO</b>	Küçük ubikuitin ile ilişkili düzenleyici protein
<b>T</b>	Timin
<b>TP53</b>	Tümör protein 53
<b>UCH</b>	Ubikutin karboksil terminal hidrolaz
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>v-onc</b>	Viral onkogen
<b>XRCC1</b>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
<b>XRCC3</b>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	3
2.1. Glukokortikoidler ve Glukokortikoid Reseptörü .....	3
2.1.1. Glukokortikoidler .....	3
2.1.2. Glukokortikoid reseptörü ve geni .....	4
2.1.3. Glukokortikoid reseptör gen polimorfizmleri .....	9
2.1.3.1. <i>BclI</i> polimorfizmi (SNP veritabanı kodu: rs41423247) .....	10
2.1.3.2. <i>Tth111I</i> polimorfizmi (SNP veritabanı kodu: rs10052957) .....	10
2.1.3.3. ER22/23EK polimorfizmi (SNP veritabanı kodu: rs6189/6190) .....	11
2.1.3.4. N363S polimorfizmi (SNP veritabanı kodu: rs6195) .....	11
2.2. Meme Kanseri .....	11
2.2.1. Meme kanserinin toplumsal önemi ve risk faktörleri .....	11
2.2.2. Meme kanserinde karsinogenez .....	14
2.2.3. Meme kanserinin genetiği .....	17
2.2.3.1. Onkogenlerin rolü .....	17
2.2.3.2. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin rolü .....	17
2.2.3.3. Siklinlerin rolü .....	17
2.2.3.4. Tümör baskılayıcı genlerin rolü .....	18
2.2.3.5. DNA tamir genlerinin rolü .....	18
2.2.4. Meme kanseri oluşumunda telomeraz aktivitesinin rolü .....	19
2.3. Meme Kanserinin Glukokortikoid Reseptörü ve Diğer Nükleer Reseptörler ile İlişkisi ..	19
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	23
3.1. Materyal .....	23
3.1.1. Kullanılan cihazlar .....	23
3.1.2. Kimyasal maddeler .....	24
3.1.3. Kullanılan çözeltiler .....	25
3.1.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) .....	25
3.1.3.2. Agaroz jel elektroforezi .....	25
3.1.3.3. Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi .....	26
3.1.4. Kullanılan primerler .....	26
3.1.5. Kullanılan restriksiyon enzimleri .....	27
3.1.6. Hasta grubu .....	27
3.2. Yöntem .....	30
3.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) .....	30
3.2.2. Agaroz jel elektroforezi .....	31
3.2.3. Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi .....	31
3.2.3.1. <i>BclI</i> polimorfizmi .....	32
3.2.3.2. <i>Tth111I</i> polimorfizmi .....	32
3.2.3.3. ER22/23EK polimorfizmi .....	32

3.2.3.4. N363S polimorfizmi .....	32
3.2.4. İstatistiksel analizler .....	33
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>34</b>
4.1. Hasta Grubu Bilgileri .....	34
4.2. PZR ve RFLP Bulguları .....	34
4.2.1. <i>BclI</i> polimorfizmi .....	34
4.2.2. <i>Tth111I</i> polimorfizmi .....	36
4.2.3. ER22/23EK polimorfizmi .....	36
4.2.4. N363S polimorfizmi .....	37
4.3. İstatistiksel Analiz Bulguları .....	38
4.3.1. <i>BclI</i> polimorfizmi .....	39
4.3.2. <i>Tth111I</i> polimorfizmi .....	41
4.3.3. ER22/23EK polimorfizmi .....	42
4.3.4. N363S polimorfizmi .....	44
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>45</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>49</b>
ÖZGEÇMİŞ .....	60



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. GR $\alpha$ ve GR $\beta$ 'nin alternatif mRNA kırılması sonucunda oluşması.....	5
Şekil 2.2. İnsan GR geninde alternatif translasyon.....	7
Şekil 2.3. Tez kapsamındaki glukokortikoid reseptör geni polimorfizmleri.....	10
Şekil 2.4. Meme kanseri karsinogenezinin basamakları.....	15
Şekil 4.1. <i>BclI</i> polimorfizmi için PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 2. kuyu kör; 3.-12. kuyular PZR ürünleri.....	35
Şekil 4.2. <i>BclI</i> polimorfizmi için PZR ürünlerinin <i>BclI</i> restriksiyon enzimi ile kesiminin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 2., 4., 5., 7., 11. ve 13. kuyular doğal tip; 3., 6., 8., 9. ve 12. kuyular heterozigot tip örnekler; 10. kuyu polimorfik tip örnek.....	35
Şekil 4.3. <i>Tth111I</i> polimorfizmi için PZR ürünlerinin <i>PstI</i> ( <i>Tth111I</i> ) restriksiyon enzimi ile kesiminin %4'lük agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 2. kuyu PZR ürünü; 6., ve 9. kuyular doğal tip; 3., 5., 7., 8., 11-20. kuyular heterozigot tip; 4. ve 10. kuyular polimorfik tip örnekler.....	36
Şekil 4.4. ER22/23EK polimorfizmi için PZR ürünlerinin <i>MnI</i> restriksiyon enzimi ile kesiminin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1., 3., 6. ve 9. kuyular DNA marker; 2. kuyu PZR ürünü; 4. ve 5. kuyular doğal tip; 7. ve 8. kuyular heterozigot tip örnekler.....	37
Şekil 4.5. N363S polimorfizmi için PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 2.-8. kuyular PZR ürünleri.....	38
Şekil 4.6. N363S polimorfizmi için PZR ürünlerinin <i>TspI</i> ( <i>Tsp509I</i> ) restriksiyon enzimi ile kesiminin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 3-16. kuyular doğal tip örnekler.....	38

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Meme kanseri ile ilişkili genetik sendromlar.....	16
Çizelge 3.1. PZR aşamasında kullanılan primerler ve Tm dereceleri.....	27
Çizelge 3.2. Hasta grubu bilgileri.....	28
Çizelge 3.3. RFLP reaksiyon içeriği.....	32
Çizelge 4.1. <i>BclI</i> polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi <i>p</i> değeri.....	39
Çizelge 4.2. <i>BclI</i> polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi <i>p</i> değeri.....	39
Çizelge 4.3. <i>BclI</i> polimorfizminin Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu.....	40
Çizelge 4.4. <i>BclI</i> ve <i>Tth111I</i> polimorfizmlerinin klinik veriler ile kıyaslanması ve ki-kare testi <i>p</i> değerleri.....	40
Çizelge 4.5. <i>Tth111I</i> polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi <i>p</i> değeri.....	41
Çizelge 4.6. <i>Tth111I</i> polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi <i>p</i> değeri.....	41
Çizelge 4.7. <i>Tth111I</i> polimorfizminin Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu.....	42
Çizelge 4.8. ER22/23EK polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi <i>p</i> değeri.....	42
Çizelge 4.9. ER22/23EK polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi <i>p</i> değeri.....	43
Çizelge 4.10. ER22/23EK polimorfizminin Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu.....	43
Çizelge 4.11. ER22/23EK polimorfizminin klinik verilerle kıyaslanması ve ki-kare <i>p</i> değerleri.....	44

## 1. GİRİŞ

Meme kanseri batı dünyasında akciğer kanserinden sonra görülme sıklığı en fazla olan ve kadınlarda ölüme en fazla sebep olan kanser türüdür. Genellikle postmenopozal kadınlarda görülmekle birlikte ailevi yatkınlıkla premenopozal kadınlarda da görülmektedir. Meme kanseri gelişiminde bilinen risk faktörleri arasında uzun süre östrojen kullanımı, iyonize radyasyon, sigara kullanımı, kadın olmak ve yüksek yağlı diyet sayılabilir (Schulz 2005). Kalıtsal meme kanserlerinde özellikle BRCA 1 ve 2 olmak üzere PTCN, p53, MLH1, MSH2, LKB1 gibi tümör baskılayıcı genler üzerinde meydana gelebilecek mutasyonların rolü olabileceği bilinmektedir. Bu mutasyonlar dışında steroid metabolize eden enzimleri kodlayan genlerde, DNA tamir genlerinde ve tümör baskılayıcı genlerde yer alan polimorfizmlerin de meme kanserine yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir (Steele ve ark. 1998; Westenend ve ark. 2005; Bianchi ve ark. 2011).

Bütün kanser tiplerinde olduğu gibi meme kanserinde de malign transformasyon multifaktöriyel ve kompleks bir süreçtir. Bu süreçte genetik değişimlerle birlikte hücrel proliferasyon, apoptoz, invazyon, metastaz ve anjiyogenezde rol oynayan sinyal transdüksiyon mekanizmalarının değiştiği bilinmektedir (Moutsatsou ve Papavassiliou 2008). Bu mekanizmalar arasında glukokortikoid reseptörler (GR) aracılığıyla etkili olan glukokortikoidlerin (GC), büyüme faktörlerinin regülasyonu, mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK), onkogenler, tümör baskılayıcı genler, proliferasyon ve apoptoz ile ilgili genler, sitokinler ve transkripsiyon faktörleri ile ilişkili etkileri tanımlanmaktadır.

Glukokortikoid reseptör geni 5. kromozomun uzun kolunun 3. bölgesinin 1 ve 2. bandları (5q31-q32) üzerinde lokalize 9 ekzon ve 8 introndan oluşan bir genidir. Bu genin ürünü, mRNA işlenmesine bağlı olarak izoform  $\alpha$  ve izoform  $\beta$  olmak üzere iki farklı izoformda eksprese edilir. GR steroid reseptör süper ailesine dahildir ve sitoplazmada inaktif halde bulunur. Reseptör, glukokortikoid bağlanması ile aktive olarak nükleusa geçer ve glukokortikoid cevap elementine (GRE) veya diğer transkripsiyon faktörlerine bağlanarak hedef genin transkripsiyonunu düzenler (Bamberger ve ark. 1996; DeRijk ve ark. 2002). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda meme kanseri hücrelerinin en az %50'sinde GR ekspresyonu gözlenmiştir. Diğer taraftan bu ekspresyonunun etkilerinin diğer kanser tiplerinden farklı olduğu gösterilmiştir. Lenfomalarda GR aktivasyonunun apoptozu indüklediği gösterildiği

halde, meme kanseri hücrelerinde çeşitli hücreyel stresörlere karşı (örn; kemoterapi uygulaması) anti-apoptotik etki gösterdiği bildirilmiştir (Conzen 2008).

Meme kanserinde GR'nün anti-apoptotik mekanizmasının ve bu mekanizmayı etkileyebilecek genetik ve çevresel etmenlerin tanımlanması, meme kanseri gelişiminin daha iyi anlaşılmasının yanı sıra, gelişiminde rol oynadığı gösterilen endojen kortizol cevabını ve kemoterapi uygulamalarında sentetik glukokortikoidlerin rutin uygulanmasında etkilerinin anlaşılması açısından önemlidir. Buna karşılık meme kanserinde GR ekspresyonuna yönelik çalışmalar bulunduğu halde mutasyon ve/veya polimorfizmlerinin etkilerine yönelik çalışmalar yok denecek kadar azdır. Yaptığımız literatür taramalarında GR geni polimorfizmleri ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi ele alan tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışma kapsamında Curran ve ark. (2001) GR geni içerisinde yer alan dinükleotit tekrarlarının uzunluğu ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve bu polimorfizmin meme kanseri oluşumu riski ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Bu tez çalışmasının amacı meme kanseri hastalarında GR geni polimorfizmlerinin sıklığını polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi (PZR-RFLP) yöntemi ile belirleyerek sağlıklı popülasyon ile istatistiksel olarak kıyaslamak ve GR gen polimorfizmleri ile hastaların klinik-patolojik bulguları arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

## **2. KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1. Glukokortikoidler ve Glukokortikoid Reseptörü**

#### **2.1.1. Glukokortikoidler**

Glukokortikoidler vücuttaki tüm dokuları etkileyebilen doğal ve sentetik steroid hormon sinyal moleküllerinin önemli elemanlarından. Endojen GC'lerin en önemlileri kortizol ve kortikosterondur. Memelilerin hepsinde bu iki molekül sentezlenmekte; fakat salgılanmaları türden türe farklılıklar göstermektedir. Kortizol insanlarda baskın olarak sentezlenmektedir. Yapılan çalışmalar GC salgılanmasındaki uzun vadeli değişikliklerin potansiyel olarak tehlikeli olduğunu ve hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, insülin direnci, obezite, tip 2 diyabet, depresyon ve otoimmün hastalıkları içeren birçok hastalığın patogeneziye katkısı olduğunu göstermiştir (De Kloet ve ark. 1998; Gold ve ark. 2002; Seckl 2004b).

Glukokortikoidlerin günlük ve stres etkisi ile oluşan salgısı -hipotalamus-hipofiz eksenini tarafından kontrol edilir. Bu kontrol mekanizmasında ilk olarak iki hipotalamik nörohormon olan kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH) ve arjinin vazopressin (AVP) salgınır. Parvosellular nöronlardan salgılanan bu hormonlar, paraventriküler nükleus median eminense gönderilirler. CRH ve AVP hipotalamustan hipofizya-portal damarlar yolu ile anterior hipofiz bezine hareket ederler ve orada kortikotropinlerden (spesifik adrenokortikotropik hormon üreten hücreler) adrenokortikotropik hormonun (ACTH) salgınmasını tetiklerler. Bu salgınma işini özel reseptörler olan tip-1 kortikotropin serbestleştirici hormon reseptörü ve tip-1b vazopressin reseptörü aracılığı ile yaparlar. ACTH kortizol-kortikosteronun sentezini başlatmak için tip-2 melanokortin reseptör yolu ile adrenal korteksi etkiler ve GC'ler hızlı bir şekilde sistematik döngüye bırakılır. Gelen uyarıya hipotalamus-hipofiz-adrenokortikal (HPA) ekseninin duyarlılığı negatif geri-besleme sistemi ile düzenlenir. Bu nedenle sırasıyla hipotalamustan salgılanan CRH/AVP ve hipofizden salgılanan ACTH, GC'lerin kendileri tarafından baskılanır (Buckingham ve ark. 1996).

Glukokortikoidler etkilerini genellikle nükleer reseptörlerin steroid ailesine ait olan bir hormon bağlayıcı transkripsiyon faktörü olan glukokortikoid reseptörleri (GR) aracılığıyla gösterirler (Rosmond 2002; Lewis-Tuffin ve ark. 2007). Glukokortikoidler reseptöre

bağlanarak GR'ü aktive eder ve reseptör ile birlikte nükleusa geçerek kompleks düzenleyici mekanizmalar ile birçok genin ekspresyonunu düzenleyebilir. Glukokortikoidler bu yolla kritik metabolik ve enflamatuvar yolların birçoğunu etkileyen genlerin ekspresyonunu baskılayabilir veya arttırabilir (Schoneveld ve ark. 2004). Glukokortikoidler katabolik yolların düzenlenmesinin yanı sıra birçok enflamatuvar cevabı inhibe eder. Bu yüzden GC'ler genellikle anti-enflamatuvar terapötik ajanlar olarak kullanılırlar. Ancak yüksek dozda ve uzun süreli GC tedavisi uygun hastalarda, katabolik genlerin düzenlenmesi arttığından yağın yeniden dağılımı, kilo artışı, hiperglisemi ve osteoporoz gibi ciddi yan etkiler gözlenmektedir (Canalis ve ark. 2007).

Glukokortikoidlerin reseptörlerine ulaşmasını sağlayan en önemli faktör  $11\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenaz ( $11\beta$ -HSD) enzimidir ve bu olay pre-reseptör metabolizması olarak adlandırılır. Erişkinlerde  $11\beta$ -HSD eksikliğinin hipertansiyon, hipokalemi, renin-angiotensin sisteminin baskılanması ve kortizolün kortizona dönüşümünün bozulmasıyla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Stewart ve ark. 1988).  $11\beta$ -HSD'nin tip-1 ve tip-2 olmak üzere iki farklı izoformu tanımlanmıştır (Edwards ve ark. 1996). Glukokortikoid reseptörünün bol olarak bulunduğu dokularda  $11\beta$ -HSD1 enzimi bulunur ve diğer dokularda da bulunmakla birlikte genellikle karaciğer, yağ dokusu ve beyinde eksprese edilir. Bu enzim kortizonun kortizole dönüşümünü katalizler. Yapılan çalışmalarda  $11\beta$ -HSD1 enziminin bloke edilmesi sonucunda insülin salgısının arttığı gözlenmiş ve bundan dolayı  $11\beta$ -HSD1 enziminin insülin direnci, obezite ve diğer metabolik bozuklukların gelişmesinde önemli bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle  $11\beta$ -HSD1'i bloke eden ilaçlar farmasötik endüstri için önemli bir hedeftir (Seckl 2004a).

### **2.1.2. Glukokortikoid reseptörü ve geni**

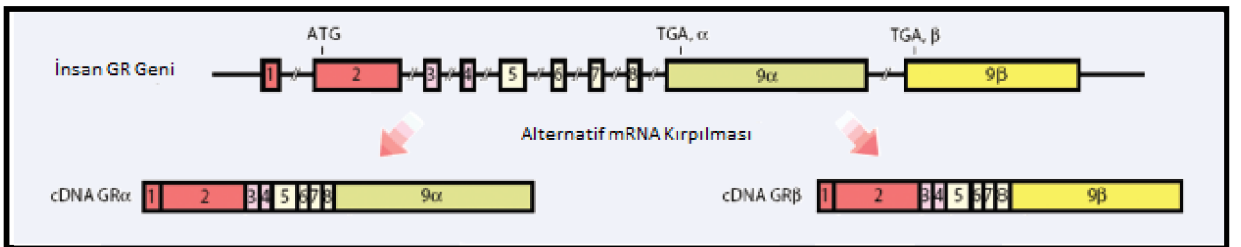
Nükleer reseptörler 3 sınıfa ayrılırlar;

1. Tip 1 reseptörler, östrojen reseptörler, (ER), androjen reseptörleri (AR), glukokortikoid reseptörleri (GR) gibi klasik steroid reseptörlerdir ve ligant aktivasyonu ile nükleusa geçerler.
2. Tip 2 reseptörler, tiroid/retinoid reseptörlerdir. Genellikle nükleusta kalırlar. Bu grubun üyeleri arasında tiroid reseptörleri ve retinoik asit reseptörleri sayılabilir.
3. Tip 3 reseptörler, bilinen reseptörlerle dizi homolojisi göstermekle beraber ligantı tanımlanamamış reseptörlerdir (Junien ve Staels 2008).

Nükleer reseptörler DNA bağlanma ve ligant bağlanma alt birimlerinin dizi homolojilerine göre 7 alt aileye ayrılırlar. Üçüncü alt aile ER benzeri nükleer reseptörleri kapsar ve A; östrojen reseptörü, B; östrojenle ilişkili reseptör, C; 3-keto steroid reseptörler olarak üç gruba ayrılırlar. GR, C grubunun ilk üyesidir. Genin tam adı “nükleer reseptör alt ailesi 3, grup C, üye 1” dir (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1) ve NR3C1 ile sembolize edilmektedir (Laudet 1997; Laudet ve ark. 1999; Zhang ve ark. 2004; NCBI 2012).

İnsan GR tamamlayıcı DNA'sı (cDNA) ilk olarak 1985'de klonlanmış ve klonlanan ilk nükleer reseptör genidir (Hollenberg ve ark. 1985). Genin genomik yapısı 1991 yılında tanımlanmıştır (Encio ve Detera-Wadleigh 1991). Weinberger ve ark., (1985) genin 5q11-q13' de lokalize olduğunu bildirmişler ancak daha sonra yapılan çalışmada genin tam lokalizasyonunun 5q31-q32 olduğu bildirilmiştir (Giuffra ve ark. 1988; Francke ve Foellmer 1989). Bazı çalışmalarda genin 10 ekzondan oluştuğunu ve 1. ekzon ile 9. ekzonun 3' - ucunun translasyonu yapılmayan kısımlar olduğunu belirtilmektedir (Encio ve Detera-Wadleigh 1991; Bray ve Cotton 2003). Buna göre glukokortikoid reseptör proteininin 2. ekzondan 9. ekzonun 5' -ucu arasında kodlandığını vurgulanmıştır. Diğer taraftan Oakley ve ark., (1996) ekzon 9-alpha, intron J ve ekzon 9-beta'nın bir arada yaklaşık 4.1 kb büyüklüğünde bir terminal ekzon oluşturduğunu ve genin toplamda 9 ekzondan oluştuğunu bildirmişlerdir. Glukokortikoid reseptör ekspresyonunun hücreden hücreye değişken olduğu ve ekspresyon düzeyinin, biri glukokortikoidlerce regüle edilen en az 3 farklı promotor tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir (Breslin ve ark. 2001; Nunez ve Vedeckis 2002).

İnsan GR geninden alternatif mRNA kırılması sonucunda GR $\alpha$  (777 amino asit), GR $\beta$  (742 amino asit) olmak üzere iki izoform sentezlenir (Şekil 2.1) (Oakley ve ark. 1999).

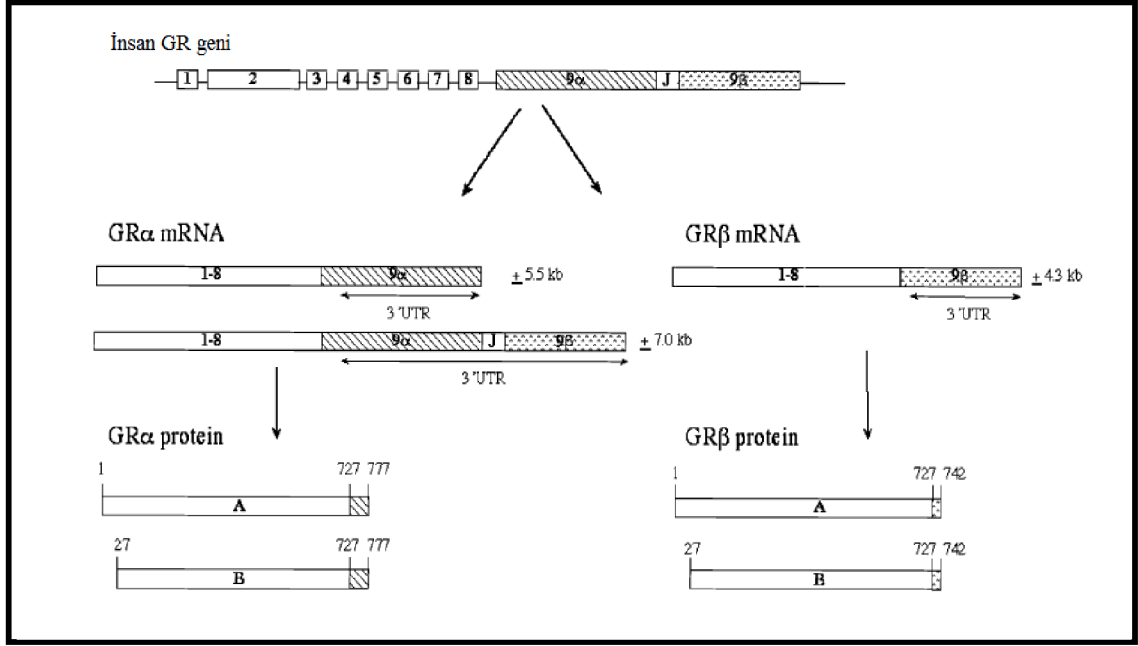


Şekil 2.1: GR $\alpha$  ve GR $\beta$ 'nin alternatif mRNA kırılması sonucunda oluşması (Moutsatsou ve Papavassiliou 2008).

Başlıca izoformu GR $\alpha$ 'dır ve 85659 dalton (Da) ağırlığındadır. Bu izoform ligant bağlama altbirimi yüzünden nükleusa girişi baskılanmıştır. Bu baskılayıcı etki sadece ligant bağlandığı zaman ortadan kalkarak reseptör ligant ile birlikte nükleusa girer. Buna karşın Brink ve ark.'nın (1992) yaptığı araştırmaya göre serbest GR $\alpha$ 'nın baskın olarak nükleusta bulunduğu belirtilmiştir. Glukokortikoid reseptör  $\alpha$ 'nın hormon bağlanan kısmında trans-aktivasyon fonksiyonu içeren AF-2 bölgesi bulunmaktadır (Yudt ve ark. 2003). Glukokortikoidlere duyarlı genlerin ekspresyonu GR $\alpha$  tarafından ayarlanırken, GR $\beta$  izoformu GC'lere bağlanmaz ve transkripsiyonel olarak inaktiftir (Hollenberg ve ark. 1985; Oakley ve ark. 1999). Glukokortikoid reseptör  $\beta$  esasen nükleusta lokalize olmuştur ve fizyolojik rolü henüz belli değildir. Bununla birlikte herhangi bir trans-aktifleştirici etkiye sahip değildir. Ayrıca bazı araştırmacılar GR $\beta$ 'nin önemli bir baskılayıcı etkisinin olmadığını ifade ederken, diğerleri GR $\alpha$  ile dimerizasyonundan dolayı bir dominant negatif baskılayıcı olarak hareket edebileceğini savunmakta ve bundan dolayı GC direnci fenomeninde payı olabileceği ifade edilmektedir (Hecht ve ark. 1997; Oakley ve ark. 1999; Yudt ve ark. 2003; Goulding 2004; Genecards 2012). Bu iki izoformun dışında insanlarda izoform GR $\gamma$  bulunmaktadır. Bu izoform alternatif mRNA kırılması sonucu DNA-bağlanma alt birimine eklenen bir amino asitten dolayı GR $\alpha$ 'dan farklıdır (Rivers ve ark. 1999).

Glukokortikoid reseptör  $\alpha$  ve  $\beta$ 'nin her biri alternatif translasyon ile A ve B izoformları olmak üzere ikiye farklı izoform oluşturur. A izoformu normal translasyon sonucunda oluşur. Alternatif translasyonun başlangıç bölgesi kodon 27'dedir (metionin) ve alternatif translasyon ile 751 amino asitten oluşan B izoformu sentezlenir. Bu mekanizma GR $\alpha$  ve  $\beta$ 'da benzerdir (Şekil 2.2) (Yudt ve Cidlowski 2001; DeRijk ve ark. 2002).





Şekil 2.2: İnsan GR geninde alternatif translasyon.

İnsan GR'ü 3 ana domen içerir. Bunlar;

1. N-terminal domen, immünojenik domen olarak da adlandırılır. Glukokortikoid reseptörün 1. amino asitinden 421. amino asitine kadar olan bölümüdür. Transkripsiyonun aktivasyonunda rol oynayan birinci transaktivasyon domenidir.
2. DNA bağlanma domeni GC ile düzenlenen genlerde DNA'ya bağlanır. Reseptörün 421'den 489. amino asitine kadar olan bölümüdür. Glukokortikoid cevap genlerinin promotorlarında yer alan glukokortikoid cevap elementine bağlanmayı sağlayan iki çinko parmak motifi içerir.
3. C-terminal altbirim, ligand bağlanma domeni olarak da adlandırılır. İkinci transaktivasyon domeni ve ısı şoku proteinleri bağlanma bölgesidir. Glukokortikoid reseptör  $\alpha$ 'da 527. amino asitten 777. amino asite kadar olan bölümdür. Glukokortikoid reseptör  $\beta$  GR $\alpha$  ile 728. amino asite kadar benzerdir. Glukokortikoid reseptör  $\alpha$ 'nın son 50 amino asiti GR geni ekzon 9 $\alpha$  tarafından kodlanır. (Encio ve Detera-Wadleigh 1991; DeRijk ve ark. 2002).

Glukokortikoid reseptör geni her bir hücre tipinde değişen miktarlarda eksprese edilir. En fazla eksprese edildiği hücreler solunum sistemi epitel doku hücreleri ve bronşiyal damar endotel hücreleridir (Adcock ve Ito 2000). Sitoplazmada inaktif halde duran GR, ısı şok proteinlerinden oluşan bir şaperon kompleks ( hsp40, hsp70, hsp90, p23 ve hop (hsp organize edici protein)) ile etkileşime girdiğinde ligandına (kortizol) bağlanmak için hazırlanır

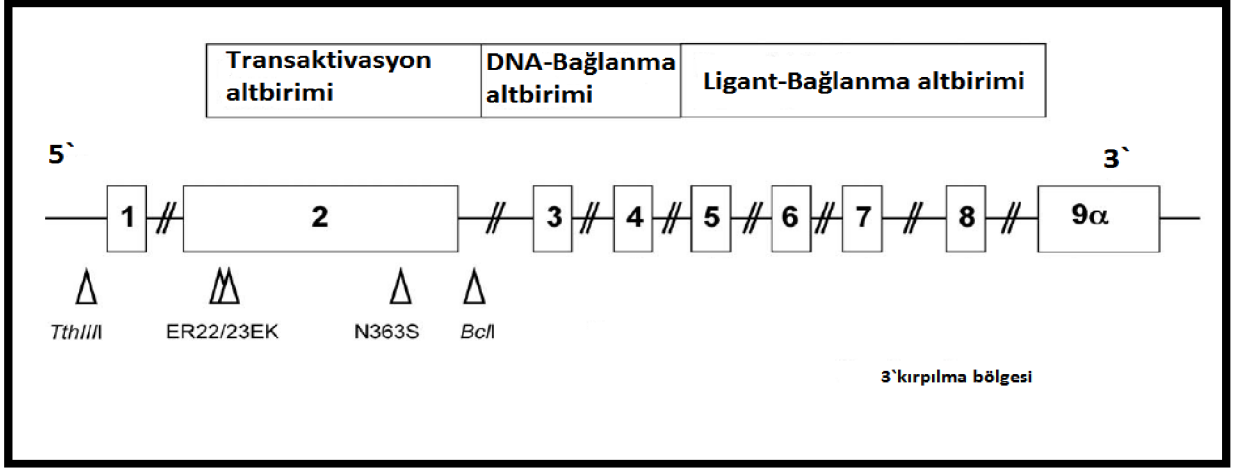
(Morishima ve ark. 2000). Ligant bağlandığında reseptör yapısal bir değişikliğe uğrayarak şaperon kompleksinden ayrılır (Pratt ve Toft 1997; Toft 1998). Ligantın bağlanmasıyla aktifleşmiş olan GR nükleusa geçerek orada hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (Schaaf ve Cidlowski 2003). Bu düzenlemeler ve GR fonksiyonu reseptörün post translasyonel modifikasyonları (fosforilasyon, ubikuitinizasyon, sumolizasyon, asetilasyon ve metilasyon) ile kontrol edilir. Ligant bağlı olmadığı durumda reseptör, fosforillenmiş (ser203) haldedir. Ligant bağlandığı zaman ise hiper-fosforillenmiş (ser203 ve ser211) hale geçer (Wang ve ark. 2002). Fare GR'ünde 8 fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır ve bunlardan 5'i insanda korunmuştur. Reseptörün varsayılan bütün fosforilasyon bölgeleri serinlerdir (ser113, ser141, ser203, ser211 ve ser226) ve hepsi reseptörün N-terminal alt birimindedir. Reseptörün lizin bakiyelerine ubikuitin ligaz enzimi ile poliubikuitin zinciri eklenerek GR işaretlenir ve proteozomlar tarafından yıkılır. Bu sayede GR yıkım oranına bağlı olarak GR'nin fonksiyonu düzenlenmektedir. Ubikuitinizasyona benzer olarak reseptörün lizin bakiyelerine SUMO-1 (small ubiquitin-related modifier-1) proteini kovalent bağla bağlanarak GR fonksiyonu düzenlenebilir. Glukokortikoid reseptöründe 3 SUMO-1 bağlanma bölgesi tanımlanmıştır (K277, K293 ve K703). Bunlardan sırasıyla ilk iki bölge N-terminal alt birimde, son bölge ise ligant bağlanma alt biriminde bulunmaktadır. Fosforillenme, ubikuitinizasyon ve sumolizasyona ek olarak GR aktivitesi asetilasyon ve metilasyon ile de kontrol edilebilir. Fakat bu olay direkt GR proteini üzerinden değil de GR ile ilişkili proteinler üzerinden gerçekleşir (DeRijk ve ark. 2002; Duma ve ark. 2006). Glukokortikoid bağlandıktan sonra aktifleşen GR ya direkt olarak ya da bazı proteinlerin (transkripsiyon faktörleri ve ko-aktivatörleri) *de novo* sentezi ile hedef genlerin transkripsiyonunu aktifleştirir. Aktifleşmiş olan GR nükleus içinde gen ekspresyonunun seviyesini değiştirmek için yanıt genlerinin düzenleyici bölgeleri ile etkileşebilir. Glukokortikoid reseptörünün bağlandığı bu genlerde farklı bağlanma alanları vardır. Reseptör DNA'ya diğer bir GR ile homodimer oluşturarak veya NR3C2 gen ürünü olan mineralkortikosteroid reseptör ya da retinoid X reseptör ile heterodimer oluşturarak bağlanır. Glukokortikoid reseptörü DNA'ya bağlandıktan sonra transkripsiyonu aktifleştirmek için farklı mekanizmalar kullanılabilir. Transkripsiyonun baskılanmasında ise negatif glukokortikoid yanıt elementi (nGRE) ve diğer transkripsiyon faktörleri ile işbirliği içinde çalışır. Fakat enflamatuvar yanıtının baskılanması nGRE'den bağımsız olarak gerçekleşir. İnflamatuvar yanıt için nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve AP-1 gibi pro-enflamatuvar transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerinde onların yanıt elementlerine bağlanmaları gerekmektedir (Miner ve Yamamoto 1992; Barnes ve Karin 1997; Adcock ve Caramori 2001;

Genecards 2012). Bununla ilgili olarak yapılan çalışmalarda pro-enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun nlenmesinde GR ile özellikle NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerinin etkileşiminin önemli olduğu gösterilmiştir (Barnes ve Adcock 2003). Glukokortikoid reseptörleri bu yüzden transkripsiyon faktörleri olarak hareket etmelerinin yanında diğer transkripsiyon faktörlerinin ko-repressr veya ko-aktivatörü olarak da hareket edebilirler.

### **2.1.3. Glukokortikoid reseptör gen polimorfizmleri**

İnsanlarda farklı bireylerde DNA dizileri arasında çok sayıda varyantlara rastlanır ve bu bakımdan insan genomunun polimorfik olduğu söylenebilir. Bu polimorfizm bireyler arasındaki farklılıkların en önemli nedenlerinden biri olmasının yanı sıra bazı hastalıklara yatkınlık açısından da önem taşımaktadır. Bu dizi varyantlarının büyük bir kısmı tek nükleotid substitsyonlarıdır ve kısaca SNP olarak gösterilen tek nükleotid polimorfizmleri olarak adlandırılırlar. Bu polimorfizmler arasında DNA' nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi yoluyla tayin edilebilenler restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmi (RFLP) olarak adlandırılırlar (Motulsky 2010).

Yapılan çalışmalarda glukokortikoid reseptör geninde çok sayıda polimorfizm tanımlanmış ve bunların glukokortikoidlere direnç veya aşırı hassasiyet şeklinde kendini gösteren GC duyarlılığındaki değişimlerle ilişkili olduğu ve çoğunun genin N-terminal transaktivasyon altbirimini oluşturan bölgesinde yerleştiği gösterilmiştir (Bray ve Cotton 2003). Glukokortikoid reseptör geni içinde bulunan ve tezin çalışma kapsamında ele alınan 4 polimorfizmin yeri şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Tez kapsamındaki glukokortikoid reseptör geni polimorfizmleri (van Rossum ve Lamberts 2004).

### 2.1.3.1. *BclI* polimorfizmi (SNP veritabanı kodu: rs41423247)

İlk olarak 1987’de Murray ve ark. (1987) tarafından tanımlanmıştır. Çalışmada 2,3 kb’lık kısa fragment ve 4,5 kb’lık uzun fragmentten oluşan intronik bir RFLP rapor edilmiştir. Daha sonra van Rossum ve ark. (2003) nükleotit değişikliğini tespit ederek 2,2 kb ve 3,9 kb boyutlarında fragmentler veren ekzon 2 den sonraki 646. nükleotit olan sitozinin (C) guanine (G) değişimi olarak tanımlanmıştır. C alleli en sık görülen allel olduğu için doğal tip olarak kabul edilmiştir (van Rossum ve Lamberts 2004).

*BclI* polimorfizminin etkisi sonucu ortaya çıkan moleküler mekanizma henüz anlaşılammıştır. Bu polimorfizmden dolayı GC’lere aşırı duyarlılık hayat boyunca farklı sonuçlara neden olmaktadır. *BclI* polimorfizmi yaşamın erken evrelerinde yağ kütlesi (özellikle abdominal yağ) ile ilişkili iken, daha sonra ki evrelerde yağsız kütle ile ilişkilidir. Yani *BclI* G alleli taşıyan ve yaşamın erken evrelerinde bulunan kişiler daha fazla yağ oranına sahipken, aynı alleli taşıyan ve yaşamın daha geç evrelerinde bulunan kişilerde tam tersi bir durum gözlenmektedir (van Rossum ve Lamberts 2004).

### 2.1.3.2. *TthIII* polimorfizmi (SNP veritabanı kodu: rs10052957)

Glukokortikoid reseptör geninin promotör bölgesinde yer alan *TthIII* polimorfizmi ilk olarak 1991 yılında GR geninin yukarısında yer alan -3807. nükleotit olan sitozinin (C), timine (T) dönüşümü olarak tanımlanmıştır ve artmış günlük kortizol seviyesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ilginç olarak ER22/23EK polimorfizmini taşıyan bütün bireylerin

*Tth1111* T varyantını da taşıdığı belirtilmektedir (Detera-Wadleigh ve ark. 1991; Rosmond ve ark. 2000; van Rossum ve Lamberts 2004). Bu polimorfizmin moleküler etkileri açıklık kazanmamıştır.

### **2.1.3.3. ER22/23EK polimorfizmi (SNP veritabanı kodu: rs6189/6190)**

Koper ve ark. (1997) tarafından GR geninin 2. ekzonunda 22. ve 23. kodonlarında tespit edilmiştir. Bu iki polimorfizmden 22. kodonda oluşan polimorfizm (GAG→GAA) herhangi bir amino asit değişimine neden olmaz ve her iki kodonda glutamik asiti kodlar. İkinci polimorfizm ise (AGG→AAG) arjinin'den lizin'e değişime neden olur. Bu polimorfizmi taşıyanlar nispi GC direnci, daha iyi bir metabolik profil ve daha iyi bir yaşam kalitesi sergilemektedir. Diğer taraftan bu etkilerin erkeklerde görüldüğü halde kadınlarda görülmediği bildirilmektedir. Bu bakımdan bu polimorfizmin etkileri cinsiyete bağlı olarak farklı şekilde ortaya çıkmaktadır. (van Rossum ve ark. 2002; van Rossum ve ark. 2004).

### **2.1.3.4. N363S polimorfizmi (SNP veritabanı kodu: rs6195)**

Glukokortikoid reseptör geninin 2. ekzonunda 363. kodonda tespit edilmiştir. Bu polimorfizm sonucunda Asparajin (AAT)→ Serin (AGT) amino asit değişimi görülür ve artmış GC duyarlılığı, bel-kalça oranının artması ve vücut kütle indeksinin artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Koper ve ark. 1997; Echwald ve ark. 2001; Rosmond 2002). Ayrıca N363S ve *BclII* polimorfizmini birlikte taşıyan bireylerde normalden daha yüksek kolesterol seviyeleri olduğunu ifade eden çalışmalar bulunmaktadır (Di Blasio ve ark. 2003). Lin ve ark. (2003) bu polimorfizmin kilodan bağımsız olarak koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Çin ve Japon toplumlarında bu polimorfizme rastlanmamıştır (Ikeda ve ark. 2001; Lei ve ark. 2003).

## **2.2. Meme Kanseri**

### **2.2.1. Meme kanserinin toplumsal önemi ve risk faktörleri**

Melanoma harici deri tümörleri dışarıda bırakılmak üzere 1990 yılı verilerine göre tüm dünyada 8,1 milyon yeni kanser olgusu belirlenmiştir (Boyle ve ark. 2000). Bu kanser olgularının içinde, meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. 2002 yılında gelişmiş ülkelerde 636000, gelişmekte olan ülkelerde ise 514000 yeni meme

kanseri olgusunun ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (Parkin ve ark. 2005). Meme kanseri aynı zamanda kadınlar arasında kanser sebepli ölümlerin en önemli nedenidir ve 2002 yılında dünyada meme kanserine bağlı 410000 ölüm gerçekleştiği tahmin edilmektedir. İnsidans oranlarının Orta Afrika ülkelerinin çoğu, Çin ve Japonya haricindeki diğer Doğu Asya ülkelerinde düşük; Kuzey Amerika, Arjantin ve Brezilya'yı içeren Güney Amerika'nın bazı bölgeleri, Kuzey ve Batı Avrupa ve Avustralya'da yüksek olduğu kaydedilmiştir. Zamana bağlı insidans trendlerine ve meme kanserinden kaynaklanan mortaliteye bakıldığında, son on yılda insidans pek çok gelişmekte olan ülkede hızla, gelişmiş ülkelerde ise daha yavaş bir şekilde artmıştır. Mortalite oranı ise 1960-1990 yılları arasında birçok Avrupa ülkesinde ve Kuzey Amerika'da oldukça istikrarlı seyretmiş, sonraki yıllarda fark edilir bir şekilde düşüşe geçmiştir (Althuis ve ark. 2005; Parkin ve ark. 2005; Bosetti ve ark. 2008).

Meme kanseri gelişiminde rol oynayan risk faktörleri arasında sigara ve alkol kullanımı, erken menarş, geç menapoz, geç yaşa kadar veya hiç çocuk sahibi olmama, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, bazı benign meme hastalıkları, batı toplumunda yer almak, aile öyküsü, ileri yaş, iyonize radyasyona maruziyet, yüksek sosyoekonomik durum, obezite, psikosomatik faktörler, yüksek yağlı diyet ve kadın olmak sayılabilir. Meme kanseri riskini arttıran bu faktörlere karşılık 20 yaş öncesinde tamamlanmış gebelik, çoklu gebelikler, 45 yaş öncesi overektomi, düzenli spor ve emzirmenin meme kanseri riskini azalttığı bildirilmektedir. Meme kanseri erkeklerde de görülmekle beraber sıklığı % 1 civarındadır (Holland ve Frei 2000b).

Genel olarak kanser gelişiminde rol oynayan etmenlere bakıldığında sigara kullanımı en ön sırada yer almaktadır. Tüm kanser vakalarının yaklaşık %30'unun sigaraya bağlı olduğu düşünülmektedir (Doll ve Peto 1981). Diyet bir diğer önemli etmen olarak karşımızdadır ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %35'inden sorumlu tutulmaktadır; fakat meme kanseri için yağlı besin tüketimi dışında önemli bir etki bildirilmemiştir. Bazı enfeksiyonların da kanser gelişiminde hazırlayıcı rol oynayabileceği bilinmektedir; fakat meme kanseri gelişiminde enfeksiyonların rolü gösterilmemiştir. İnsan kanserlerinin %10'unda bu tür mekanizmaların rol oynayabileceği sanılmaktadır. Alkol kullanımı özellikle sigara ile birlikte olduğunda önem kazanmaktadır ve %3'lük olguda özellikle katkıda bulunduğu öngörülmektedir. Ayrıca alkol kullanımı östrojen seviyesini ve vücuttaki yağ kütlesini arttırdığından meme kanseri gelişiminde etkilidir (IARC 1988, 2008).

Batılı yaşam tarzı ile erken menarj, geç menapoz ve geç yaşta hamilelik ilişkilendirilmektedir ve meme kanseri gelişimi için ideal şartlara sahiptir. Bu veriler göz önüne alındığında batılı gelişmiş ülkelerde yaşayan kadınlarda meme kanserine yakalanma riski %10 olarak belirlenmiştir ve bu meme kanseri vakalarının %30'u ölümlerle sonuçlanmıştır (Schulz 2005).

Hamileliğin ilk 3 aylık döneminde kandaki östrojen seviyesi yüksek olduğundan dolayı kısa bir süreliğine meme kanseri riski artabilir; fakat hamileliğin ilerleyen aylarında prolaktin hormonunun artması ve cinsiyet hormonu bağlayan globulin miktarının azalması nedeniyle hamileliğin meme kanserine karşı yararlı bir etkisi olabileceğini söylemek mümkündür (Calle ve ark. 2002).

Alınan ilaçlar ve uygulanan bazı tedavi yöntemleri de meme kanseri riskini arttırmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda oral kontraseptif kullanımının meme kanseri riskini %10-15 arttırdığı belirtilmiştir (Calle ve ark. 1996). Oral kontraseptif kullanımına 20 yaşından önce başlayan ve uzun süre kullanmaya devam eden kadınlarda risk en yüksek seviyededir (Holland ve Frei 2000a). Menapoza girmekte olan kadınlara uygulanan hormon replasman tedavisi, kandaki östrojen seviyesini arttırdığından ve dolayısıyla meme dokusunun östrojene daha fazla maruz kalmasına sebep olduğundan meme kanseri riskini arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar hormon replasman tedavisi gören kadınların tedavi süresindeki her yıl meme kanserine yakalanma riskini %2,3 arttırdığını göstermektedir (Holland ve Frei 2000a; La Vecchia 2004).

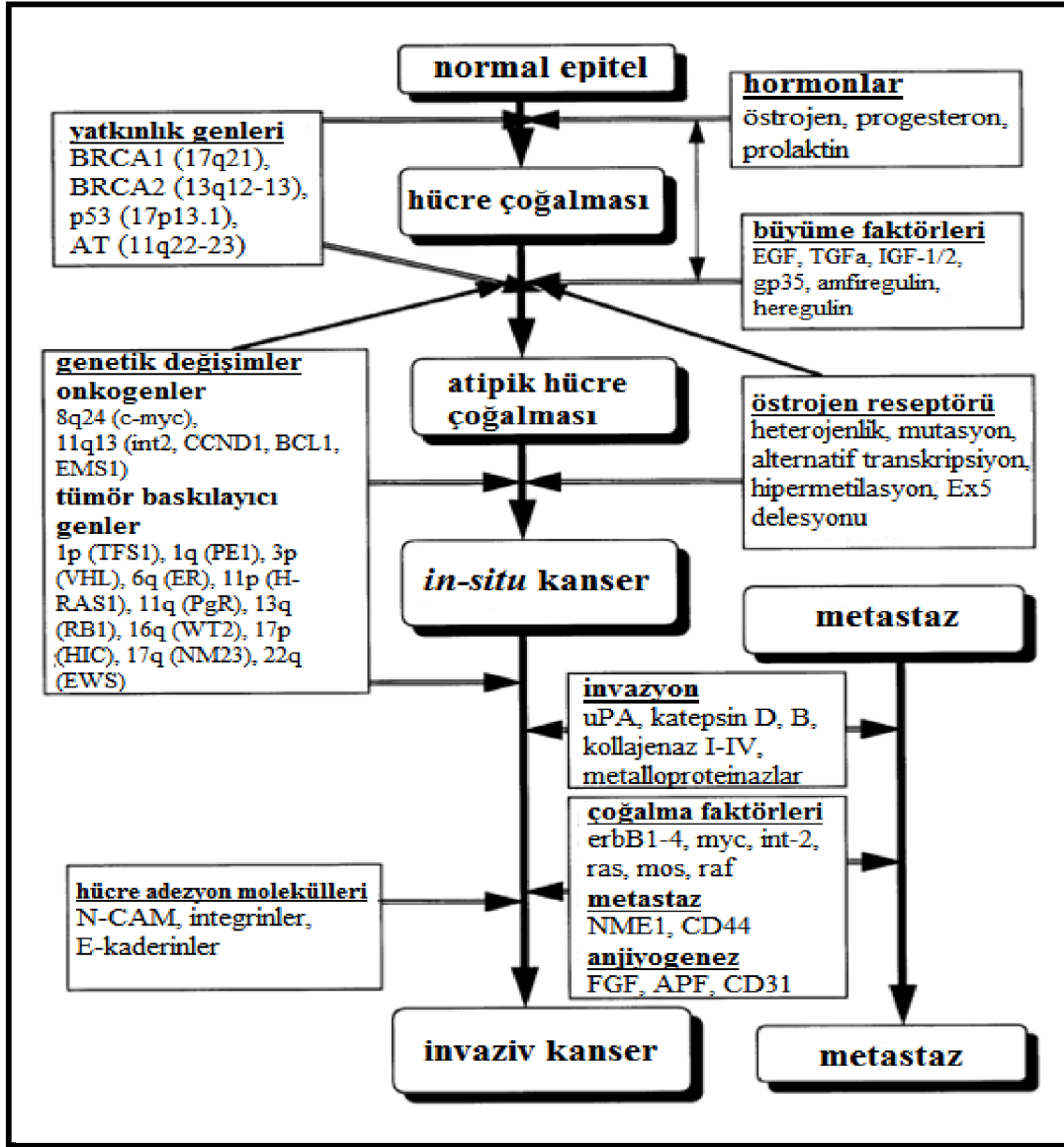
Doksanlı yılların başlarına kadar kanser gelişimini kolaylaştıran etmenlerden diyet ile meme kanseri arasında ancak zayıf bir ilişki ortaya konulabilmekte idi. Ancak yapılan geniş çaplı bazı çalışmalar sonucunda diyet ile alınan A vitamini düzeyi ile meme kanseri gelişimi arasındaki ilişki belirginleşmektedir. Bu konuda bir netlik olduğunu söylemek zor olsa da A vitamininden zengin gıda alımı ile meme kanserine karşı bir ölçüde koruma sağlanabileceği bir olasılık olarak durmaktadır (Hunter ve ark. 1993). Diyet ile ilgili bilgilere ek olarak sebze ve meyve tüketimi ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların incelendiği farklı bir meta-analizde de yüksek oranda sebze ve meyve tüketiminin meme kanserine karşı koruyucu bir etkisi olabileceği belirtilmektedir. Bunların ışığında yüksek oranda sebze ve meyve tüketimi ile kadınlarda görülen bazı kanser türlerinin gelişme riskinin azaltılabileceği; ancak daha fazla veriye gereksinim duydukları belirtilmiştir (Gandini ve ark. 2000). Sonuç olarak diyet meme kanseri gelişimi açısından bazı çalışmalarda etkili bir faktör olarak

anılmakla birlikte daha fazla çalışmaya gereksinim vardır (IARC 2008). Bunların dışında artmış östrojen seviyesi ile ilişkili olan obezite ve yüksek yağ içeren yiyecekler ile beslenme özellikle postmenapozal kadınlarda meme kanseri riskini arttırmaktadır. Yağ alımı ile meme kanseri arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır. Menapoz sonrası kilo alımı ve obezitenin meme kanseri riskini arttırmasının sebebi kandaki östradiol seviyesinin %50 artmasından kaynaklanmaktadır. Menapozdan sonra overlerden östrojen sentezi durur ve döngülenen östrojen yağ dokunun stromal hücrelerinden östradiol olarak sentezlenir. Postmenapozal obez kadınlarda ve menopozdan sonra kilo alan kadınlarda postmenapozal plazma östrojen seviyesinin artması meme kanser riskini arttırır (Rose ve ark. 2004; Weber 2007).

### **2.2.2. Meme kanserinde karsinogenez**

Olguların yaklaşık %90'ını oluşturan kalıtsal olmayan meme kanseri gerek klinik gerek moleküler düzeyde karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Bu heterojeniteye karşın meme kanseri atipik epitelyal hiperplazi, *in-situ* kanser, invaziv kanser ve metastatik hastalık gibi bir dizi klinik ve patolojik evrelerden geçer (Beckmann ve ark. 1997). Bu evreler ve etkili genler Şekil 2.4'de özetlenmiştir.





Şekil 2.4: Meme kanseri karsinogenezinin basamakları (Beckmann ve ark. 1997).

Meme kanseri sporadik veya ailesel formda görülebilir. Ailesel formda kalıtılmış DNA mutasyonları kansere yatkınlığı artırırken, sporadik formda somatik hücrelerde biriken mutasyonlar normal hücrenin kanser hücreğine dönüşmesiyle sonuçlanmaktadır. Ailesel meme kanserlerinin % 5-10' nunda yüksek düzeyde penetran dominant genlerin yatkınlığı arttırdığı belirlenmiştir. Bu genlerdeki mutasyonların 35 yaşın altında görülen izole vakaların yaklaşık %10' da etkili olduğu belirtildiği halde, 80 yaşından sonra görülen vakaların ancak %1' den sorumludur. Ailesel meme kanserleri tipik olarak sporadik formdan daha genç yaşta ortaya çıkma, birden fazla aile bireyinde görülme, yüksek bilateral meme kanseri riski ve over kanseri gelişimi ile sporadik kanserlerden ayrılabilir (Haites ve Gregory 2002). Meme kanseri yatkınlığından sorumlu genetik sendromlar ve ilgili genler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Meme kanseri ile ilişkili genetik sendromlar (Haites ve Gregory 2002).

Sendrom	Gen/kromozom
Ailevi meme kanseri	BRCA1, BRCA2
Li-Fraumeni sendromu	TP53
Ataksi telanjiektazi	ATM
Cowden Hastalığı	PTEN
Klinefelter sendromu	47, XXY
Muir-Torre sendromu	MSH2, MLH1
Peutz-Jeghers sendromu	STK11/LKB1

Kanser gelişiminde rol oynayabilecek etmenler arasında;

- Kansere duyarlılık genlerinde kalıtsal mutasyonlar ya da polimorfizmler,
- Somatik genetik değişikliklerin kazanılmasına neden olan çevresel etkiler,
- Sistemik ve bölgesel etmenler (büyüme faktörlerinin veya bazı hormonların değişen seviyeleri) sayılabilir (Ponder 2001).

Kalıtsal mutasyonların rol aldığı tümörlerde, mutant ve yüksek oranda penetran meme kanseri duyarlılık genleri belirlenmiştir. Bunlardan en önemlileri arasında BRCA1 ve 2 sayılabilir. Bunların dışında daha düşük düzeylerde penetrans gösteren meme kanseri duyarlılık genleri olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca PTEN, LKB1, ATM, p53, MSH2/mlh1, EhK2, ve BACH-1 gibi genlerde meydana gelebilecek mutasyonların da meme kanseri gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Miki ve ark. 1994; Wooster ve Stratton 1995; Marcus ve ark. 1996; Seitz ve ark. 1997; Cantor ve ark. 2001).

Meme ve over kanserlerinin bir bölümünde promotör metilasyonuna bağlı olarak epigenetik BRCA1 inaktivasyonu tanımlanmıştır. BRCA1 metilasyonu olan sporadik karsinomların fenotipinin, BRCA1 geninin kalıtsal inaktivasyonunun gözlemlendiği olgulardaki tümörlere benzerliği dolayısıyla sporadik tümörlerde BRCA1 inaktivasyon mekanizmasının bir epigenetik susturma olabileceği üzerinde durulmaktadır (Baldwin ve ark. 2000; Hedenfalk ve ark. 2001).

Çeşitli metabolik ve detoksifiye edici enzimlerin genlerinde (GSTM1, CYP1A1, NAT2, SULT1A1, COMT, SOD2) meydana gelen polimorfizmlerin, hormon sinyal yollarında görevli proteinlerin (AR ve ER), DNA tamir genlerinin (XRCC1, XRCC3) ve HLA allellerinin meme kanseri gelişimine duyarlılıkta rol oynayabileceği gösterilmiştir (Chaudhuri ve ark. 2000; Zheng ve ark. 2001).

### **2.2.3. Meme kanserinin genetiği**

#### **2.2.3.1. Onkogenlerin rolü**

Onkogenler hücre büyümesi ve bölünmesinden sorumlu olan protoonkogenlerin mutasyona uğramış biçimidir. Bu genlerin hücre genomunda lokalize olanları c-onc, retrovirüs genomunda lokalize olanları v-onc olarak adlandırılmıştır. Meme kanserinin oluşumunda Her-2/neu/c-erbB2/c-myc, c-fos, c-jun, RARA, bcl-1, h-ras gibi onkogenlerin rolü bulunmaktadır (Lapidus ve ark. 1998; Xie ve ark. 2000; Janocko ve ark. 2001).

#### **2.2.3.2. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin rolü**

Meme tümörleri östrojen reseptör (ER) gen ürününün anormal kırılmasından dolayı varyant ER'ler içerdiği için endokrin tedaviye direnç göstermektedir. Meme kanseri olgularının üçte birinde östrojen ve progesteron reseptörleri (PR) sentezlenmemektedir ve bu tip tümörler kötü prognoz göstermektedir. Aynı zamanda gerek ER gerekse PR genlerinde meydana gelen polimorfizmler ve promotör metilasyonu gibi değişiklikler de meme kanserinin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Lapidus ve ark. 1998).

#### **2.2.3.3. Siklinlerin rolü**

Hücre döngüsünün önemli proteinlerinden biri olan siklin D1'in, tirozin kinaz reseptör büyüme faktörleri ve cinsiyet hormonları tarafından indüklendiği düşünülmektedir. C-myc'nin ise siklin D1'i baskımlarken siklin E1'i indüklediği bilinmektedir. Meme kanserinde gerçekleştirilen bazı moleküler genetik çalışmalar siklin D1 ve siklin E genlerinde yaygın bir amplifikasyonun olduğunu ve bunun sonucunda ortaya çıkan siklin D1 aşırı ekspresyonunun meme kanseri oluşumunda hedef genlerden biri olabileceği düşünülmektedir (Xie ve ark. 2000; Janocko ve ark. 2001).

#### **2.2.3.4. Tümör baskılayıcı genlerin rolü**

Meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'i ailesel kökenlidir ve bu kanserlerin oluşumuna soy hattı tümör baskılayıcı gen mutasyonları yol açmaktadır. Tümör baskılayıcı genler protoonkogenlerin ve onkogenlerin aksine hücre büyümesini ve bölünmesini baskılayan genlerdir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserleri oluşumunda da rol oynamaktadır. Meme kanserleri ile gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar, bu kanserlerin gelişiminde başta BRCA1 ve 2 genleri olmak üzere p53, FHIT, PTEN, nm23, p16 (MTS1), Rb1, DCC, CHK2, ATM, FOXP1 gibi tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonların rolü olduğu göstermiştir (Negrini ve ark. 1996; Hayashi ve ark. 1997; Lehman ve ark. 2000; Greenblatt ve ark. 2001; Iau ve ark. 2001).

#### **2.2.3.5. DNA tamir genlerinin rolü**

DNA tamir genlerindeki mutasyonlar ilk defa kolorektal kanserde belirlenmiştir ve kanserleşmeden sorumlu önemli bir gen sınıfını oluşturmaktadır. Bu konuda gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalarda akciğer, baş-boyun, meme kanserleri ve glioblastomalarda da bu genlerin mutasyonları belirlenmiştir. Meme kanserlerinde hMLH1 yanlış eşleşme tamir geninde soy hattı mutasyonları belirlenmiştir (Borg ve ark. 2000). Yanlış eşleşme tamir genleri kanserleşmenin biyolojik mekanizmasında çok önemli yer tutmaktadır. Çünkü bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kendileri ile sınırlı kalmayıp protoonkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyon sıklığını arttırmaktadır. Bunun sonucu olarak genomda mutasyon yapıcı bir fenotip meydana gelmekte ve zincirleme mutasyonlarla kişide kansere karşı genetik bir eğilim oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda meme kanserinin oluşumunda en önemli rolü oynayan BRCA1 ve 2 genlerinin aynı zamanda DNA'nın tamirinde de rol alan genler olduğu gösterilmiştir. Bu iki genden BRCA1'in BAP1 adı verilen tamir geni ile ilişkili olduğu saptanmıştır. BAP1 geni 3p21.3 bölgesinde lokalize olan ve 2000 yılında klonlanmış bir gendir. Genin ürünü olan ubikutin karboksil terminal hidrolaz (UCH) BRCA1 proteininin RING finger bölgesine bağlanmakta ve böylece tamir olayı gerçekleşmektedir. Aynı şekilde BRCA2 geninde RAD51 adı verilen DNA tamirinde görevli bir genle etkileşim gösterdiği ve bu yolla DNA tamirinin gerçekleştiği belirlenmiştir. BRCA geni deneysel olarak baskılanmış fare embriyolarından elde edilen hücrelerin DNA tamiri gerçekleştiremedikleri gibi özellikle BRCA2 geninden yoksun hücrelerin radyasyona ve DNA molekülünde çift sarmal kırıkları

oluşturan kemoterapötik ajanlara karşı aşırı duyarlı oldukları gösterilmiştir (Jensen ve ark. 1998).

#### **2.2.4. Meme kanseri oluşumunda telomeraz aktivitesinin rolü**

Telomeraz enzimi bir ters transkriptaz enzimidir. Yaşam periyodunda kromozom uzunluğu telomer bölgelerinden başlayarak her hücre bölünmesinde biraz daha azalmaktadır. Telomeraz enzimleri ile ilgili çalışmalar hemen hemen tüm kanser hücrelerinde bu enzimlerin aktivitesinin arttığını göstermektedir. Normal hücrelerde çok düşük olan bu aktivite kanserli hücrelerde %90-95'lere kadar çıkmaktadır. Meme kanserinde gerek cerrahi materyallerde gerekse iğne biyopsisi ile elde edilen biyopsi materyallerinde %74-94 arasındaki oranlarda telomeraz aktivitesine rastlarken normal meme dokularında %0-25 dolaylarında görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak telomeraz aktivitesi tayini tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserinin tanısında, hatta metastaz tespitinde bir belirleyici olabileceği düşünülmektedir (Carey ve ark. 1999; Shpitz ve ark. 1999).

#### **2.3. Meme Kanserinin Glukokortikoid Reseptörü ve Diğer Nükleer Reseptörler ile İlişkisi**

İlk olarak 1896 yılında Sir Thomas Beatson'un (1896) yaptığı çalışma ile nükleer reseptörler dolaylı yoldan meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmada ileri derecede meme kanseri kadınlara overektomi uygulanarak hastalığın gerilemesi hedeflenmiştir. Bu sayede kandaki östrojen seviyesinde düşüş olacağından ER'nün etkinliği azalacaktır. Son 30 yılda meme kanseri örneklerinde ER $\alpha$  ve PR için yapılan ligant bağlanma standartizasyonu ve immünokimyasal çalışmalar, büyük ölçekli klinik denemelerde başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda ER ile PR arasında pozitif korelasyon kurulmuş ve hastalar anti östrojen tedavisine yanıt vermiştir (McGuire ve Clark 1989; Harvey ve ark. 1999).

19. yy. başlarında ovaryum kaynaklı östrojen aracılı sinyalizasyon ile meme kanseri arasında bir ilişki olduğu kabul edilmiştir. Günümüz epidemiyolojik çalışmaları da sürekli östrojene maruz kalmanın meme kanser riskini arttırdığını desteklemektedir (Kelsey ve Bernstein 1996). Sentezlenen iki farklı östrojen reseptörlerinden (ER $\alpha$  ve ER $\beta$ ) ER $\alpha$  meme kanser olgularının yaklaşık %70'inde eksprese edilmektedir ve bu durum meme kanseri araştırmalarında önemli bir hedeftir (Greene ve ark. 1986; Althuis ve ark. 2004).

Hedef genlerin transkripsiyonu, NR ligantları ve protein ko-aktivatör ve ko-represörleri (birlikte koregülatör olarak adlandırılır) tarafından kontrol edilmektedir (O'Malley 2007). Bu proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler meme kanser prognozunu etkilemektedir (Zhang ve ark. 2006; Green ve ark. 2008).

Progesteron reseptörü, genin alternatif promotörü kullanılarak iki farklı baskın izoform (PR-A ve PR-B) olarak eksprese edilmektedir (Jeltsch ve ark. 1986). Bu farklı iki izoformdan PR-B daha fazla transkripsiyonel aktiviteye sahiptir (Wei ve ark. 1996). Meme kanseri örneklerinde PR ekspresyonu sıklıkla ER $\alpha$  ekspresyonu ile pozitif korelasyon göstermektedir (Buzdar 2004).

Androjen reseptörü erkek üreme organı gelişiminde önemlidir ve ayrıca ER $\alpha$  negatif ve pozitif meme kanseri hücrelerinde eksprese edilmektedir (Conzen 2008). Yapılan araştırmalara göre ER ve PR'nün eksprese edilmediği (ER/PR-) meme kanserinde AR ekspresyonu ile iyi prognoz ilişkilendirilmiş, buna karşın ER/PR/Her2 – meme kanserlerinde AR ekspresyon kaybı kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Kuenen-Boumeester ve ark. 1996; Rakha ve ark. 2007).

Vitamin D ve kalsiyum alımının meme kanseri ile ters korelasyon gösterebileceği, vitamin D reseptörünün meme kanser biyolojisinde dikkatleri üzerine çekmektedir (Zanardi ve ark. 2006).

Meme karsinomalarının ve meme kanseri hücre hatlarının çoğunda retinoik asit reseptör  $\beta$  (RAR- $\beta$ ) ekspresyonunun kaybolduğu veya azaldığı, buna karşın RAR- $\alpha$  ve RAR- $\gamma$  ayrıca retinoid x reseptörlerin (RXR) normal dokularda ve tümör dokularında değişken bir şekilde eksprese edildiği gözlenmiştir (Pavan ve ark. 2006).

Orphan nükleer reseptör ailesine mensup olan östrojen ile ilişkili reseptörler (ERR) ER $\alpha$  ve ER $\beta$  ile yakından ilişkilidir ve hedef genleri, koregülatörleri, ligantları ve cevap elementlerini paylaşabilirler (Giguere ve ark. 1988). ERR $\alpha$ 'nın meme kanserindeki ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada, ERR'lerin ER $\alpha$  gen ekspresyonunu baskılamada tutarlı bir rolü olduğu ve dolayısıyla ERR $\alpha$ 'nın ekspresyonundaki artışın olumsuz klinik sonuçların ve hormonal duyarsızlığın belirteci olabileceği önerilmiştir (Ariazi ve ark. 2002). Meme kanseri örnekleri ile yapılan diğer bir çalışmada ERR $\alpha$ 'nın olumsuz klinik sonuçların prognostik belirteci olduğunu doğrulamaktadır (Ariazi ve Jordan 2006).

Glukokortikoid reseptör ekspresyonu normal meme dokusundan kanserleşmiş meme dokusuna kadar süregelen her aşamada gözlenmektedir ve normal dokulardan kanserleşme öncesi lezyonlara ve invaziv meme kanserine kadar geçen aşamaları azalarak izler (Teulings ve van Gilse 1977; Perou ve ark. 2000; Sorlie ve ark. 2001; Courtin ve ark. 2012). Ancak GR ekspresyonu ile meme kanser prognozu ya da şiddeti arasında korelasyon yoktur. Ayrıca glukokortikoidler meme epitelinde ve meme kanseri hücre hatlarında anti-proliferatif ve anti-apoptotik etki göstermektedir (Harris ve ark. 1995; Moran ve ark. 2000; Mikosz ve ark. 2001; Mattern ve ark. 2007). Glukokortikoid reseptörü meme fizyolojisi ve gelişiminde önemli bir yer tutmaktadır (Buxant ve ark. 2010). Lobüloalveolar gelişim esnasında hücre çoğalmasında etkilidir; fakat lobüloalveolar farklılaşmada etkisi yoktur (Reichardt ve ark. 1998; Wintermantel ve ark. 2005). Meme dokusunun lobüler ve kanal miyoepitel hücrelerinde GR ekspresyonu güçlü, stromal ve endotel hücrelerinde ise daha zayıf bir şekilde gerçekleşmektedir (Lien ve ark. 2006). Ligant bağlama çalışmaları kullanılarak yapılan araştırmalara göre invaziv meme kanser olgularının %50'sinde ve meme kanseri hücre hatlarında GR eksprese edildiği uzun zamandır bilinmektedir (Horwitz ve ark. 1975). Sıklıkla kullanılan meme kanseri hücre hatlarında (ER $\alpha$ + MCF7 ve ER/PR/Her2- MDA-MB-231) GR'e özgü antikolar kullanılarak yapılan çalışmalar, GR $\alpha$ 'nın bu hücre hatlarında değişen miktarlarda eksprese edildiğini göstermektedir (Mikosz ve ark. 2001). Biyokimyasal kantifikasyon yöntemleri kullanılarak meme tümör dokusu hücrelerinin %51-55'inde GR ekspresyonu belirlenmiştir (Teulings ve van Gilse 1977; Allegra ve ark. 1979a; Allegra ve ark. 1979b). İmmünohisyokimyasal yöntemlerin kullanıldığı daha yeni çalışmalarla invaziv duktal ve lobular karsinoma hücrelerinin %20-40'ında GR eksprese edildiği anlaşılmıştır (Perou ve ark. 2000; Sorlie ve ark. 2001; Lien ve ark. 2006; Richardson ve ark. 2006; Conde ve ark. 2008; Belova ve ark. 2009; Buxant ve ark. 2010). Ayrıca GR aktivasyonu lenfomalarda ve lenfositlerde apoptozu indüklediği halde, meme epitel ve kanser hücre hatlarında büyüme faktörleri gibi hücrel stresörlere ve kemoterapötiklere karşı apoptotik cevabı inhibe etmektedir. Meme epitel hücre sağkalımını desteklemek için GR, hücre stresi cevap proteinlerini kodlayan PI3-K ve MAPK genlerini transaktive etmektedir (Huang ve ark. 2000; Moran ve ark. 2000). Bu genlerin birçoğu GR aktivasyonu ile hücrel stres cevabını indüklemektedir (Wu ve ark. 2005). Glukokortikoid reseptörün meme kanserindeki anti-apoptotik sinyalizasyonunun altında yatan anlam; endojen kortizol cevabı arttıran biyo-davranışsal stresörlerin meme kanser gelişimi ile ilgili olmasıdır (Antoni ve ark. 2006). Bunlara ek olarak tedavide kullanılan sentetik glukokortikoidlerin oldukça yüksek dozları GR

aracılı tümör hücre sağkalımı yolaklarını aktiveleştirme potansiyeline sahip olduğu için kemoterapinin etkinliğini azaltmaktadır (Agadir ve ark. 1997).

Meme kanseri hücrelerinde GR ekspresyonu, birçok meme kanseri olgusu ve sıklıkla kullanılan meme kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmalar sonucu ispatlanmıştır. Buna karşın meme kanseri ile GR geni polimorfizm ve/veya mutasyonlarını araştıran çalışma sayısı çok azdır. Sadece Curran ve ark. (2001) meme kanseri ile GR geni üzerindeki yüksek oranda polimorfik dinükleotit tekrarlarını ilişkilendirmiştir.



### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan cihazlar**

Isısal döngüleme cihazı, Techne TC5000, İngiltere.

Mikrosantrifüj, Sigma, Almanya.

Otomatik pipet, Axygen axypet, Amerika Birleşik Devletleri (ABD).

Yatay elektroforez tankı, Thermo, ABD.

Yatay elektroforez tankı, Cleaver, İngiltere.

Güç kaynağı, Cleaver, İngiltere.

Sallayıcı su banyosu, Nüve ST402, Türkiye.

İnkübatör, Incucell, Almanya.

Soğutucu -20<sup>0</sup>C, Vestel, Türkiye.

Soğutucu +4<sup>0</sup>C, Profilo, Türkiye.

Isıtıcı manyetik karıştırıcı, WiseStir MSH-20A, Kore.

pH metre, Hanna HI221, ABD.

Vorteks, WiseMix VH-10, Kore.

Hassas terazi, Ohaus, ABD.

Transillüminatör, Vilber Lourmat, Fransa.

Fotoğraf makinesi, Canon, Japonya.

### 3.1.2 Kimyasal maddeler

*Taq* DNA polimeraz enzim seti, MBI Fermentas, Litvanya.

*BclII* restriksiyon endonükleaz enzim seti, MBI Fermentas, Litvanya.

*PstI* (*Tth1111*) restriksiyon endonükleaz enzim seti, MBI Fermentas, Litvanya.

*MnII* restriksiyon endonükleaz enzim seti, MBI Fermentas, Litvanya.

*TspI* (*Tsp509I*) restriksiyon endonükleaz enzim seti, MBI Fermentas, Litvanya.

Etil alkol, Sigma, ABD.

Deoksiribonükleik asit trifosfat (dNTP) set (100 mM dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), MBI Fermentas, Litvanya.

Agaroz, Sigma, ABD.

Tris, Sigma, ABD.

EDTA, Sigma, ABD.

Glasiyal asetik asit, Sigma, ABD.

DNA belirteç 50 bç, MBI Fermentas, Litvanya.

Etidyum bromür, Sigma, ABD.

Yükleme tamponu, MBI Fermentas, Litvanya.

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler

#### 3.1.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

**10X Reaksiyon tamponu:** *Taq* DNA polimeraz enzim seti içerisinde hazır olarak alınmıştır.

100 mM Tris-HCl (pH 8,8)

500 mM KCl

0,8% (h/h) Nonidet P40

2 mM MgCl<sub>2</sub>

**25 mM MgCl<sub>2</sub>:** Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan 25 mM MgCl<sub>2</sub> *Taq* DNA polimeraz enzim kiti içerisinde hazır olarak alınmıştır.

**10mM dNTP:** Her biri 100 mM olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP solüsyonlarından 10'ar µl ve steril dH<sub>2</sub>O'dan 60 µl alınarak 500 µl'lik steril ependorf içinde karıştırılarak hazırlandı.

#### 3.1.3.2. Agaroz jel elektroforezi

**50X TAE (1l):**

242 g Tris baz

57,1 ml Glisiyal asetik asit

100 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0)

18,6 g Na<sub>2</sub>EDTA tartılarak bir miktar dH<sub>2</sub>O ile pH 8,0'da çözündürüldü ve son hacmi 100 ml'ye tamamlandı. 242 g Tris 500 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan tris solüsyonu içerisine 57,1 ml glasiyal asetik asit ile daha önce hazırlanan 100 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0) eklendi ve son hacim dH<sub>2</sub>O ile 1l'ye tamamlandı. Çözelti filtre kağıdından geçirilerek süzüldü (Sambrook ve Russell 1989).

### 3.1.3.3. Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi

***Bcl*II ve ER22/23EK polimorfizmleri için reaksiyon tamponu:** *Bcl*II ve *Mn*II restriksiyon endonükleaz enzim seti içinde hazır olarak alınmıştır.

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM NaCl

0,1 mg/ml BSA

***Tth*111I ve N363S polimorfizmleri için reaksiyon tamponu:** *Psp*I (*Tth*111I) ve *Tas*I (*Tsp*509I) restriksiyon endonükleaz enzim seti içinde hazır olarak alınmıştır.

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1 mg/ml BSA

### 3.1.4. Kullanılan primerler

Çalışmanın PZR aşamasında kullanılan primerler Integrated DNA Technologies, Almanya' dan temin edilmiştir. Primerlerin dizileri Çizelge 3.1' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 : PZR aşamasında kullanılan primerler ve Tm dereceleri.

POLİMORFİZM	PRİMER DİZİLERİ (5'→3')	Tm(C°)
<i>BclI</i>	TGC TGC CTT ATT TGT AAA TTC GT	66
	AAG CTT AAC AAT TTT GGC CAT C	
<i>Tth111I</i>	TCC AGG AGT GGG ACA TAA AGC T	62
	CTT AGA AGC AGA GGT GGA AAT GAA G	
ER22/23EK	GAT TCG GAG TTA ACT AAA AG	57
	ATC CCA GGT CAT TTC CCA TC	
N363S	AGT ACC TCT GGA GGA CAG AT	56
	GTC CAT TCT TAA GAA ACA GG	

### 3.1.5. Kullanılan restriksiyon enzimleri

Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmlerinin tayininde kullanılan *BclI*, *PstI* (*Tth111I*), *MnII* ve *TasI* (*Tsp509I*) restriksiyon enzimleri, MBI Fermentas, Litvanya'dan temin edilmiştir.

### 3.1.6. Hasta grubu

Hasta grubu 85 kişiden oluşmaktadır ve 1999-2002 yılları arasında Marmara Üniversitesi Araştırma Hastanesinde meme kanseri erken evresinde küratif cerrahi tedavisi görmüş kadın hastalar arasından seçilmiştir. Hastaların demografik verileri, klinik ve patolojik bulguları Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2: Hasta grubu bilgileri.

Protokol No	Yaşı	Grade	ER	PR	Menopoz	Aksilla Tutulumu	Lenfatik İnvazyon	Evre	Aile öyküsü	T	N	M
31	64	2	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
115	52	2	+	+	Premenapoz	Var	Var	2	Yok	1	1	0
144	39	3	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	2	Yok	2	0	0
181	44	2	+	+	Premenapoz	Var	Var	3	Yok	3	1	0
185	45	2	-	-	Premenapoz	Var	Var	3	Yok	3	2	0
211	60	2	?	?	Postmenapoz	?	?	?	?	?	?	?
243	39	2	?	?	Premenapoz	Var	Var	2	Yok	2	1	0
322	80	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
367	68	3	-	-	Postmenapoz	Var	Var	2	Yok	2	1	0
574	60	2	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
600	60	1	?	?	Postmenapoz	?	?	?	Yok	1	4	0
728	64	1	+	+	Postmenapoz	Var	Var	2	Yok	1	1	0
752	45	3	+	?	Premenapoz	Var	Var	3	Yok	2	2	0
778	66	1	?	?	Postmenapoz	?	?	?	Yok	?	?	?
812	67	2	+	+	Postmenapoz	Var	Var	2	Var	2	1	0
863	60	3	-	-	Postmenapoz	Var	Var	2	Yok	2	1	0
878	42	3	-	-	Premenapoz	Var	Var	2	Yok	2	1	0
897	54	2	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
919	73	1	+	-	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
979	47	2	+	+	Premenapoz	?	?	2	Yok	2	0	0
1013	62	1	?	?	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
1045	39	1	?	?	Premenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
1084	72	2	?	?	Premenapoz	Var	Var	2	Yok	1	1	0
1091	52	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
1140	73	1	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	2	Yok	3	0	0
1211	71	2	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
1339	80	2	+	+	Postmenapoz	?	?	?	Yok	2	4	0
1403	68	3	+	-	Postmenapoz	Var	Var	3	Var	2	2	0
1428	69	3	-	-	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
1504	55	2	+	-	Postmenapoz	Yok	Yok	2	Yok	2	0	0
1592	50	1	?	?	?	?	?	?	?	3	0	0
1624	85	2	?	?	Postmenapoz	?	?	?	Yok	?	?	?
1625	51	3	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	2	Yok	2	0	0
1656	75	3	+	+	Postmenapoz	Var	Var	2	Var	2	1	0
1658	61	2	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
1699	56	3	-	-	Postmenapoz	?	?	?	?	3	4	0
1712	36	2	+	+	Premenapoz	Var	Var	2	Yok	1	1	0
1714	78	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
1763	55	3	?	?	Postmenapoz	?	?	?	Yok	?	?	?

1809	77	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
1840	53	2	+	+	Postmenapoz	Var	Var	3	Yok	2	2	0
1862	55	1	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
1902	47	1	+	-	Postmenapoz	Var	Var	2	Var	2	1	0
1904	46	2	+	+	Premenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
1905	73	1	+	+	Postmenapoz	Var	Var	2	Yok	1	1	0
1983	43	2	?	?	Premenapoz	Var	Var	2	Yok	2	1	0
1985	66	2	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
1992	69	2	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
2031	82	1	?	?	Postmenapoz	?	?	?	Var	1	4	0
2070	51	1	-	-	Premenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
2118	77	3	?	?	Postmenapoz	?	?	?	Yok	4	4	0
2142	82	2	?	?	Postmenapoz	?	?	?	?	2	4	0
2145	69	2	-	+	Postmenapoz	Var	Var	3	Yok	2	2	0
2166	79	2	?	?	Postmenapoz	?	?	?	Yok	1	4	0
2172	57	2	+	?	Postmenapoz	Var	Var	2	Var	2	1	0
2188	71	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
2383	72	?	?	?	Postmenapoz	?	?	?	Yok	?	4	?
2464	70	2	+	+	Postmenapoz	Var	Var	2	Yok	2	1	0
2572	49	2	?	?	Premenapoz	?	?	?	Yok	?	?	?
2581	58	3	+	+	Postmenapoz	Var	Var	2	Yok	1	1	0
2620	61	1	+	+	Postmenapoz	Var	Var	2	Yok	2	1	0
2718	77	2	?	?	Postmenapoz	Yok	Yok	2	Yok	2	0	0
2904	64	1	?	?	Postmenapoz	Var	Var	3	Yok	4	2	0
2910	61	2	+	-	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
2931	46	2	+	+	Premenapoz	Yok	Yok	1	Var	1	0	0
2995	73	2	+	+	Postmenapoz	Var	Var	3	Yok	2	2	0
3102	77	2	+	+	Postmenapoz	?	?	?	?	4	4	0
3139	40	3	+	+	Premenapoz	Var	Var	3	Yok	3	2	0
3204	58	2	+	?	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
3253	66	1	+	+	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
3275	63	2	+	-	Postmenapoz	Var	Var	2	Var	2	1	0
3325	56	2	+	+	Postmenapoz	?	?	?	Var	2	4	0
3510	58	3	-	-	Postmenapoz	Yok	Yok	1	Var	1	0	0
3514	44	3	?	?	Premenapoz	Var	Var	3	Yok	3	2	0
3629	75	2	-	-	Postmenapoz	?	?	?	Yok	2	4	0
3654	60	2	-	-	Postmenapoz	Yok	Yok	2	Yok	2	0	0
3692	45	1	?	+	Premenapoz	Yok	Yok	1	Yok	1	0	0
3703	65	2	?	?	Premenapoz	?	?	?	Yok	?	?	?
3706	48	3	+	+	Postmenapoz	Var	Var	3	Yok	1	2	0
3776	73	3	+	+	Postmenapoz	Var	Var	3	Yok	2	2	0
3823	70	1	?	?	Postmenapoz	Var	Var	2	Yok	2	1	0
3914	51	2	-	-	Postmenapoz	Yok	0	1	Yok	1	0	0

3924	53	3	?	?	Postmenapoz	?	?	?	Yok	?	?	?
3928	68	2	?	?	Postmenapoz	?	?	2	Yok	2	0	0
4032	47	2	-	-	Premenapoz	Yok	Yok	2	Yok	3	0	0

?: arşivlerde patoloji bilgilerine ulaşılamayan hastalar.

Kontrol grubu 86 kişiden oluşmaktadır ve hasta grubundaki her hasta ile yaş bakımından eşleştirilmiş olarak, kanser hikayesi olmayan sağlıklı kadın gönüllüler arasından seçilmiştir.

Meme kanseri hastalarına ait tümör dokusu DNA'ları ve kontrol grubuna ait DNA'lar Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu ilk olarak Kary Mullis ve ark. (1986) tarafından tanımlanmıştır ve hedef DNA parçasının veya RNA'nın oligonükleotit (20-30nt) primerler tarafından yönlendirerek *in vitro* şartlarda kopyalanmasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem basitçe üç aşamadan oluşur:

- Çift iplikli DNA'nın denatürasyonu,
- Primerlerin DNA üzerinde kendilerine özgü bölgelerine bağlanması,
- Yeni DNA zincirlerinin sentezi.

Polimeraz zincir reaksiyonunun ilk aşamasında çifti iplikli DNA yüksek sıcaklıklarda (95-100°C) denatüre edilir. Denatürasyon aşamasından sonra ortam kullanılan primerlere özgü bağlanma sıcaklıklarına düşürülür ve oligonükleotit primerler kendilerine özgü bölgelere bağlanır. Son aşamada *Taq* DNA polimeraz uygun tampon, uygun sıcaklık ve dört çeşit dNTP varlığında primerleri 3' ucundan 5' uca doğru uzatmaya başlar. Her döngü sonucunda ilgili DNA bölgesi iki katına çıkar (Schochetman ve ark. 1988).

Çalışmanın PZR aşamasında GR geninin promotör bölgesindeki *Tth1111* polimorfizmi ve ekzon 2 bölgesindeki *BcII*, ER22/23EK, N363S polimorfizimleri için Çizelge 3.1'de belirtilen primer çiftleri kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, *Tth1111* polimorfizmi için 94°C de 5 dk ön denatürasyon; 94°C de 1 dk, 61,8°C de 1 dk, 72°C'de 1 dk olmak üzere 40 siklus; 72°C de 5 dk son uzama, *BcII* polimorfizmi için 94°C de 5 dk ön



denatürasyon; 94°C de 1 dk, 52°C de 1 dk, 72°C'de 1 dk olmak üzere 40 siklus; 72°C de 5 dk son uzama, N363S polimorfizmi için 94°C de 5 dk ön denatürasyon; 94°C de 1 dk, 52°C de 1 dk, 72°C'de 1 dk olmak üzere 40 siklus; 72°C de 5 dk son uzama ve ER22/23EK polimorfizmi için 94°C de 5 dk ön denatürasyon; 94°C de 1 dk, 52°C de 1 dk, 72°C'de 1 dk olmak üzere 40 siklus; 72°C de 5 dk son uzama olmak üzere ısıl döngüleme cihazında gerçekleştirildi.

### **3.2.2. Agaroz jel elektroforezi**

Agaroz jel elektroforezi ile DNA tayininde çözülmüş, haldeki DNA parçaları elektrik akımı ve jelde oluşan porlar sayesinde büyüklükleri, yükleri ve biçimlerine göre farklı hızlarda hareket etmektedirler. Bu sayede çeşitli boyutlardaki DNA molekülleri tanımlanabilmektedir. Jel oluşturmada kullanılan agarozun konsantrasyonu değiştirilerek jelde oluşacak olan porların çapları ayarlanabilmektedir. Bu nedenle küçük DNA fragmanları için yüksek agaroz konsantrasyonu, büyük DNA fragmanları için düşük agaroz konsantrasyonu ile agaroz jeller hazırlanarak DNA parçalarının ayrılması sağlanmaktadır. Ayrıca agaroz jel hazırlanırken DNA'nın görünür hale gelmesi için etidyum bromür (EtBr) kullanılmaktadır. Agaroz jeldeki EtBr, DNA'ya bağlanarak 300-360 nm dalga boylu UV ışık altında fluoresan etki gösterir ve DNA agaroz jelde görünür hale gelir (Sambrook ve Russell 1989).

Amplifikasyonların sonucunda *TthIII* polimorfizmi için 96 bç'lik, *BcII* polimorfizmi için 335 bç'lik, ER22/23EK polimorfizmi için 442 bç'lik ve N363S polimorfizmi için 251 bç'lik bantlar %2'lik agaroz jel elektroforezinde gözlemlendi.

### **3.2.3. Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi**

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, kısa DNA dizilerini tanıyan ve DNA'yı bu dizilere yakın bölgelerinden veya bu diziler içindeki özel bölgelerden kesen proteinlerdir. Bakterilerden elde edilen bu enzimler ile DNA kesildikten sonra çeşitli uzunlukta fragmanlar oluşmaktadır. Oluşan fragmanların jel elektroforezi ile kontrol edilerek polimorfizmlerin değerlendirilmesine RFLP tekniği adı verilmektedir (Botstein ve ark. 1980).

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri Çizelge 3.3'de verilen reaksiyon karışımları hazırlanarak her bir polimorfizm için bölüm 3.2.3.1-3.2.3.4'de anlatıldığı şekilde kesime tabi tutuldu ve agaroz jel elektroforezinde incelendi.

Çizelge 3.3: RFLP reaksiyon içeriği.

Reaksiyon içeriği	Miktar (µl)
PZR ürünü	10
10x Reaksiyon tamponu	2
Restriksiyon enzimi	1
Saf Su	7

### 3.2.3.1. *Bcl* polimorfizmi

*Bcl* polimorfik bölgesini içeren gen bölgesinin Bölüm 3.2.1' de belirtildiği şekilde amplifikasyonunu takiben PZR ürünleri *Bcl* restriksiyon enzimi ile 55°C'de sıcak su banyosunda 3 saat kesime tabi tutuldu. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

### 3.2.3.2. *Tth1111* polimorfizmi

*Tth1111* polimorfik bölgesini içeren gen bölgesinin Bölüm 3.2.1' de belirtildiği şekilde amplifikasyonunu takiben PZR ürünleri *Pst*I (*Tth1111*) restriksiyon enzimi ile 37°C inkübatörde gece boyu kesime tabi tutuldu. Kesim ürünleri %4'lük agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

### 3.2.3.3. ER22/23EK polimorfizmi

ER22/23EK polimorfik bölgesini içeren gen bölgesinin Bölüm 3.2.1' de belirtildiği şekilde amplifikasyonunu takiben PZR ürünleri *Mn*I restriksiyon enzimi ile 37°C inkübatörde gece boyu saat kesime tabi tutuldu. Kesim ürünleri %4'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

### 3.2.3.4. N363S polimorfizmi

N363S polimorfik bölgesini içeren gen bölgesinin Bölüm 3.2.1' de belirtildiği şekilde amplifikasyonunu takiben PZR ürünleri *Tsp*I (*Tsp509I*) restriksiyon enzimi ile 65°C'de ısısal

döngü cihazında 3 saat kesime tabi tutuldu. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntüledi.

#### **3.2.4. İstatistiksel analizler**

Tez çalışması kapsamında hasta ve kontrol grupları arasındaki ve hasta grubu ile klinik veriler arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı Ki-kare testi ile değerlendirildi ve “*p*” değerinin 0,05'den küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi. Ayrıca her polimorfizm için toplam populasyonun (hasta ve kontrol grubu) Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumluluğu kontrol edildi ve “*p*” değerinin 0,05'den küçük olduğu durumların Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu olmadığı kabul edildi (Rodriguez ve ark. 2009). İstatistik hesapları için SPSS 16.0 bilgisayar programı kullanıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

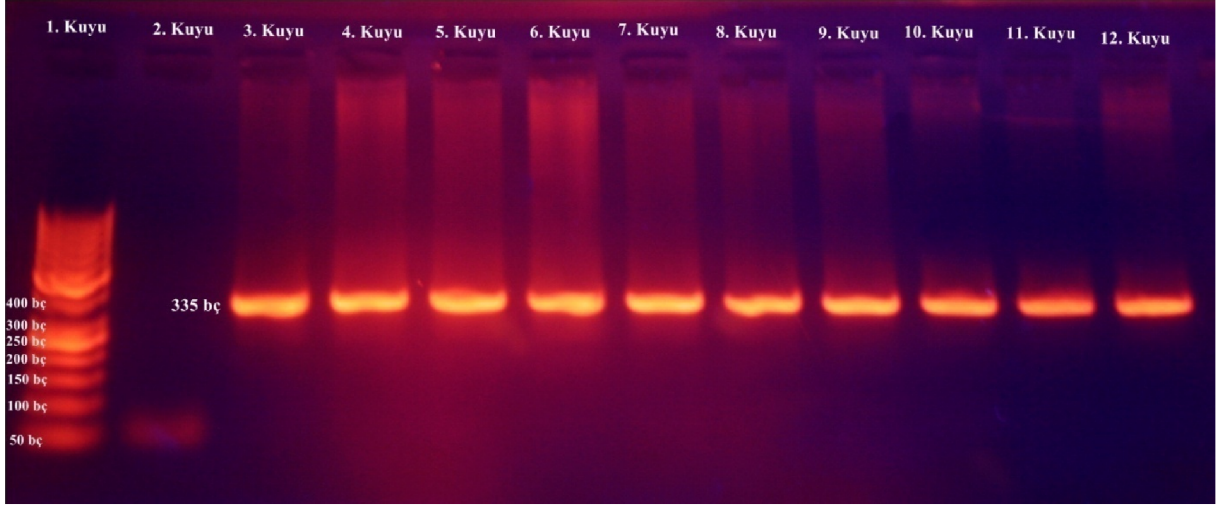
### 4.1. Hasta Grubu Bilgileri

Hasta grubuna ait veriler Marmara Üniversitesi Araştırma Hastanesi veritabanından elde edildi. Veriler göz önünde bulundurulduğunda hasta grubunun yaş ortalaması  $60 \pm 12$  olarak belirlendi. Bu hastaların 20'si 50 yaşında veya 50 yaş altı, 65'i 50 yaş üstü olarak belirlendi. ER ekspresyonu gözlenen 41, gözlenmeyen 13 hasta; PR ekspresyonu gözlenen 34 gözlenmeyen 18 hasta olduğu belirlendi. Hasta grubundan 31 hastada ER, 33 hastada PR ekspresyon bilgisi mevcut değildir. Hasta grubunda menapoza girmemiş 20, menapoza girmiş 58 hasta bulunmaktadır ve 7 hastanın menapoz durumu verilerde mevcut değildir. Aksilla tutulumu ve lenfatik invazyon bulunan 31, bulunmayan 27 hasta vardır ve hasta grubunda 27 hastanın aksilla tutulumu ve lenfatik invazyon durumuna ait veri mevcut değildir. Ailesinde kanser öyküsü bulunan 10, bulunmayan 64 hasta; grade 1'de 20, grade 2'de 42, grade 3'de 19 hasta; 1. evrede 20, 2. evrede 28, 3. evrede 12 hasta olduğu belirlendi. Hasta grubunda 11 hastanın aile öykü bilgisi, 25 hastanın evre bilgisi, 4 hastanın grade bilgisi mevcut değildir. TNM sınıflandırmasında tümör büyüklüklerine göre 30 vaka T<sub>1</sub> (tümör çapı 2 cm'den daha küçük), 30 vaka T<sub>2</sub> (tümör çapı 2-5 cm arasında), 8 vaka T<sub>3</sub> (tümör çapı 5 cm'den daha fazla), 3 vaka T<sub>4</sub> (tümör herhangi bir boyutta; fakat ya göğüs duvarında ya da deride) boyutlarında olduğu görüldü. 30 vakanın yakın lenf nodüllerinde kansere rastlanmadı. Vakaların 20'sinin birer yakın lenf nodülünde, 11'inin ikişer yakın lenf nodülünde, 11'inin dörder yakın lenf nodülünde kansere rastlandı. Uzak doku metastazına hiçbir vakada rastlanmadı. Hasta grubunda 13 hastanın TNM sınıflandırılması, 1 hastanın tümör çapı ve metastaz durumu mevcut değildir (Çizelge 3.2).

### 4.2. PZR ve RFLP Bulguları

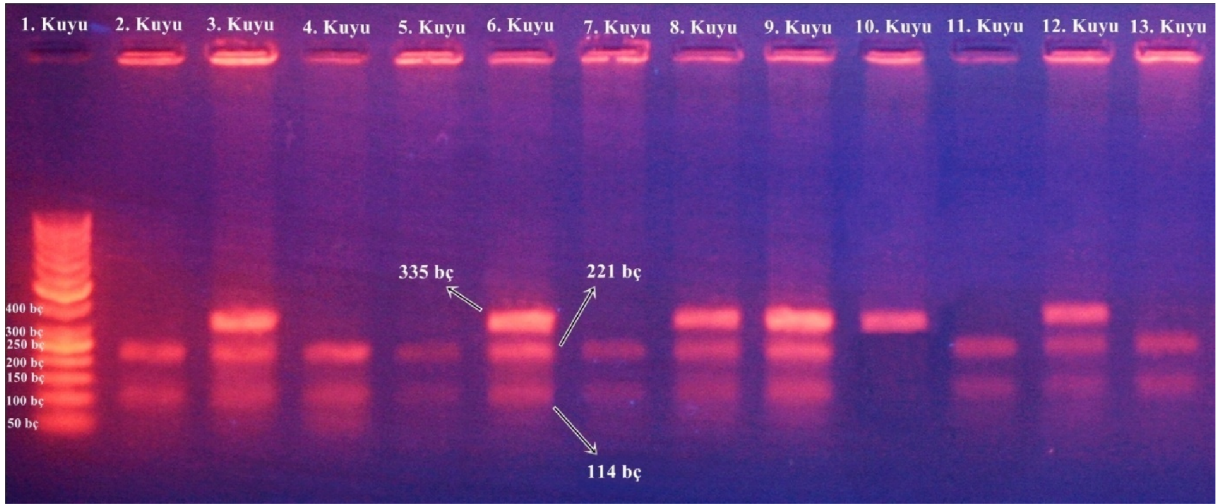
#### 4.2.1. *BcII* polimorfizmi

Araştırma kapsamında hasta grubu için tümör dokularından, kontrol grubu için kan dokusundan izole edilen DNA'ların *BcII* polimorfizmi ile ilgili bölgeleri PZR ile çoğaltıldı ve beklenen 335 bp'lik bantlar %2'lik agaroz jel elektroforezinde gösterildi (Şekil 4.1). Hasta grubundan 12 adet vakanın PZR sonucu alınamadı.



Şekil 4.1: *BclI* polimorfizmi için PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 2. kuyu kör; 3.-12. kuyular PZR ürünleri.

Çoğaltılan ilgili gen bölgeleri *BclI* restriksiyon enzimi ile kesildi ve agaroz jel elektroforezinde incelendi. Kesim sonucunda doğal genotipe sahip örneklerde beklediği gibi 221 bç ve 114 bç'lik bantlar, heterozigot genotipe sahip örneklerde 335 bç, 221 bç ve 114 bç'lik bantlar oluştu. Polimorfik genotipe sahip örneklerde *BclI* restriksiyon enziminin tanıma bölgesi olmadığı için kesilmeden 335 bç'lik bant olarak kaldı (Şekil 4.2).

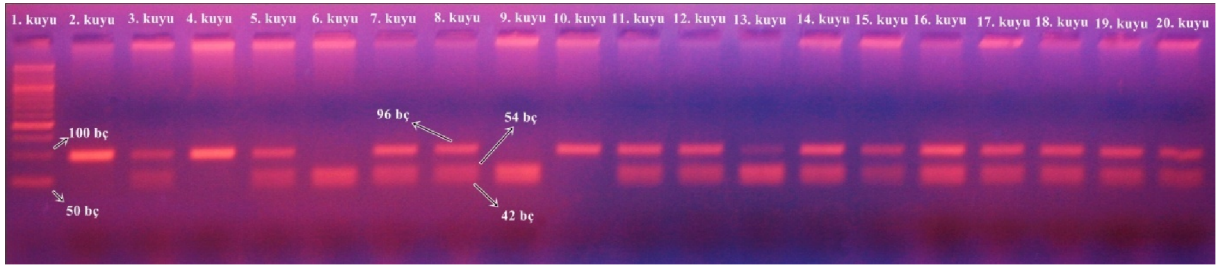


Şekil 4.2: *BclI* polimorfizmi için PZR ürünlerinin *BclI* restriksiyon enzimi ile kesiminin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 2., 4., 5., 7., 11. ve 13. kuyular doğal tip; 3., 6., 8., 9. ve 12. kuyular heterozigot tip örnekler; 10. kuyu polimorfik tip örnek.

#### 4.2.2. *Tth111I* polimorfizmi

Araştırma kapsamında hasta grubu için tümör dokularından, kontrol grubu için kan dokusundan izole edilen DNA'ların *Tth111I* polimorfizmi ile ilgili bölgeleri PZR ile çoğaltıldı ve beklenen 96 bç'lik bantlar %2'lik agaroz jel elektroforezinde gösterildi (Şekil 4.3). Hasta grubundan 2 adet vakanın PZR sonucu alınamadı.

Çoğaltılan ilgili gen bölgeleri *PsyI* (*Tth111I*) restriksiyon enzimi ile kesildi ve agaroz jel elektroforezinde incelendi. Kesim sonucunda doğal genotipe sahip örneklerde beklendiği gibi 54 bç ve 42 bç'lik bantlar, heterozigot genotipe sahip örneklerde 96 bç, 54 bç ve 42 bç'lik bantlar oluştu. Polimorfik genotipe sahip örneklerde *PsyI* (*Tth111I*) restriksiyon enziminin tanıma bölgesi olmadığı için kesilmeden 96 bç'lik bant olarak kaldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: *Tth111I* polimorfizmi için PZR ürünlerinin *PsyI* (*Tth111I*) restriksiyon enzimi ile kesiminin %4'lük agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 2. kuyu PZR ürünü; 6., ve 9. kuyular doğal tip; 3., 5., 7., 8., 11-20. kuyular heterozigot tip; 4. ve 10. kuyular polimorfik tip örnekler.

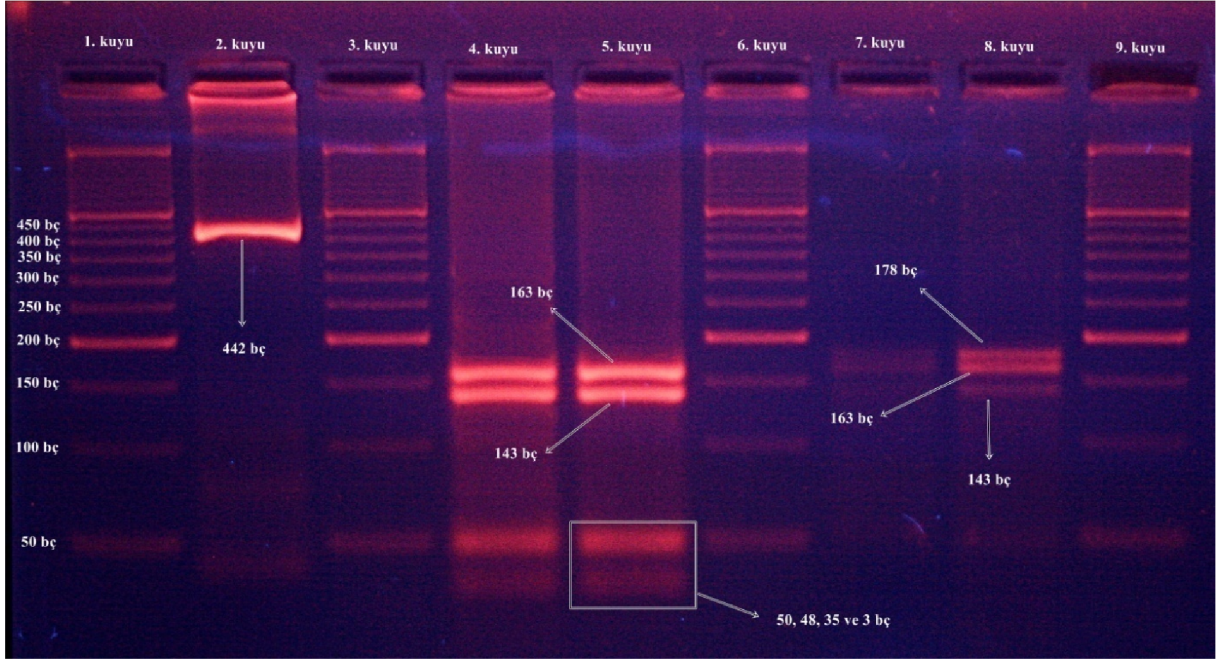
#### 4.2.3. ER22/23EK polimorfizmi

Araştırma kapsamında hasta grubu için tümör dokularından, kontrol grubu için kan dokusundan izole edilen DNA'ların ER22/23EK polimorfizmi ile ilgili bölgeleri PZR ile çoğaltıldı ve beklenen 442 bç'lik bantlar %2'lik agaroz jel elektroforezinde gösterildi (Şekil 4.4). Hasta grubundan 38 adet vakanın PZR sonucu alınamadı.

Çoğaltılan ilgili gen bölgeleri *MnII* restriksiyon enzimi ile kesildi ve agaroz jel elektroforezinde incelendi. Kesim sonucunda doğal genotipe sahip örneklerde beklendiği gibi 163 bç, 143 bç 50 bç, 48 bç, 35bç ve 3 bç'lik bantlar, heterozigot genotipe sahip örneklerde



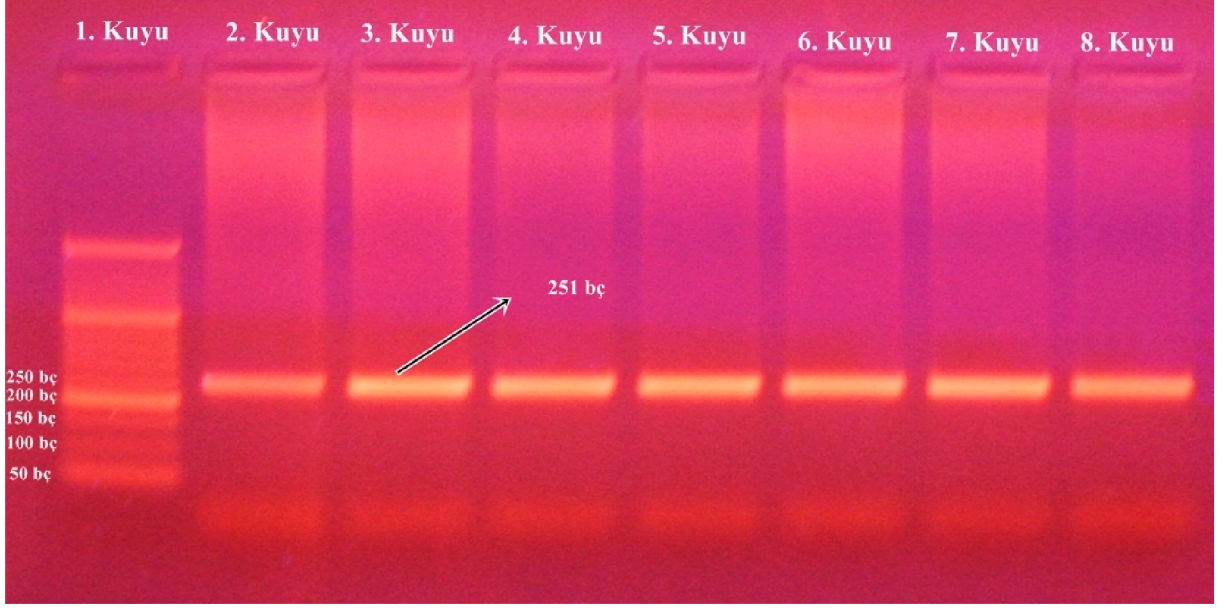
178 bç, 163 bç, 143 bç, 50 bç, 48 bç, 35 bç, ve 3 bç'lik bantlar oluştu. Kesim sonuçlarına göre polimorfik genotipe rastlanmadı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: ER22/23EK polimorfizmi için PZR ürünlerinin *MnI* restriksiyon enzimi ile kesiminin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1., 3., 6. ve 9. kuyular DNA marker; 2. kuyu PZR ürünü; 4. ve 5. kuyular doğal tip; 7. ve 8. kuyular heterozigot tip örnekler.

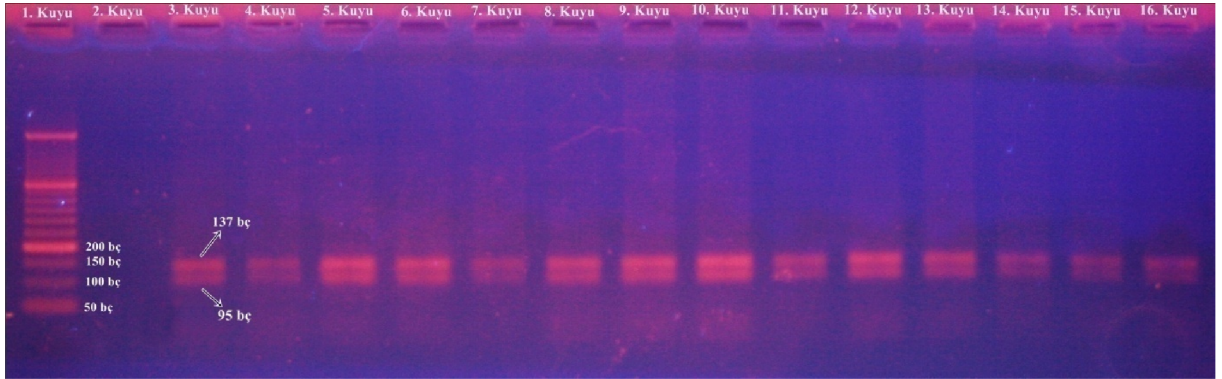
#### 4.2.4. N363S polimorfizmi

Araştırma kapsamında hasta grubu için tümör dokularından, kontrol grubu için kan dokusundan izole edilen DNA'ların N363S polimorfizmi ile ilgili bölgeleri PZR ile çoğaltıldı ve beklenen 251 bç'lik bantlar %2'lik agaroz jel elektroforezinde gösterildi (Şekil 4.5). Hasta grubundan 22 adet vakanın PZR sonucu alınamadı.



Şekil 4.5: N363S polimorfizmi için PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 2.-8. kuyular PZR ürünleri.

Çoğaltılan ilgili gen bölgeleri *TasI* (*Tsp509I*) restriksiyon enzimi ile kesildi ve agaroz jel elektroforezinde incelendi. Kesim sonucunda doğal genotipe sahip örneklerde beklendiği gibi 137 bp, 95 bp ve 19 bp'lik bantlar gözlemlendi (Şekil 4.6); buna karşın heterozigot ve polimorfik genotipe rastlanmadı.



Şekil 4.6: N363S polimorfizmi için PZR ürünlerinin *TasI* (*Tsp509I*) restriksiyon enzimi ile kesiminin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1. kuyu DNA marker; 3-16. kuyular doğal tip örnekler.

### 4.3. İstatistiksel Analiz Bulguları

Çalışılan polimorfizme göre değişen sayılarda meme kanseri hastası ile sağlıklı 86 bireyden oluşan kontrol grubu arasında, tez kapsamındaki GR geni polimorfizmlerinin



genotipleri ve alleleri açısından anlamlılık analizleri ki-kare testi ile yapıldı. Her polimorfizm için toplam popülasyonun Hardy-Weinberg eşitliğine uyumluluğu kontrol edildi. Ayrıca hasta grubu GR geni polimorfizmlerinin genotipleri ile hasta grubunun klinik verileri arasındaki anlamlılık analizleri ki-kare testi ile yapıldı.

#### 4.3.1. *BclI* polimorfizmi

*BclI* polimorfizmi kapsamında 73 bireyden oluşan hasta grubunda 37 (%50,7) CC (doğal genotip), 35 (%47,9) CG (heterozigot genotip), 1 (%1,4) GG (polimorfik genotip); 86 bireyden oluşan kontrol grubunda ise bu oranlar sırasıyla 40 (%46,5), 41 (%47,7) ve 5 (%5,8) olarak belirlendi (Çizelge 4.1). Ki-kare testi sonucuna göre hasta grubu ile kontrol grubu arasında genotip (Çizelge 4.1) ve allel (Çizelge 4.2) açısından istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilemedi. Toplam popülasyonun Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu olmadığı tespit edildi (Çizelge 4.3). Klinik veriler ile *BclI* polimorfizmi genotipleri kıyaslandığında sadece aile öyküsü ile genotipler arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edildi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.1: *BclI* polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi *p* değeri.

		<i>BclI</i> Genotipleri			Toplam	<i>p</i>
		CC	CG	GG		
Hasta	Sayı	37	35	1	73	0,331
	%	50,7	47,9	1,4	100	
Kontrol	Sayı	40	41	5	86	
	%	46,5	47,7	5,8	100	
Toplam	Sayı	77	76	6	159	
	%	48,4	47,8	3,8	100	

Çizelge 4.2: *BclI* polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi *p* değeri.

		<i>BclI</i> Allelleri		Toplam	<i>p</i>
		C	G		
Hasta	Sayı	109	37	146	0,392
	%	74,7	25,3	100	
Kontrol	Sayı	121	51	172	
	%	70,3	29,7	100	
Toplam	Sayı	230	88	318	
	%	72,3	27,7	100	

Çizelge 4.3: *BclI* polimorfizminin Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu.

Genotip	Beklenen	Gözlenen	Ki-kare	<i>p</i>
CC	83,2	77	5,99	0,01
CG	63,6	76		
GG	12,2	6		

Çizelge 4.4: *BclI* ve *Tth111I* polimorfizmlerinin klinik veriler ile kıyaslanması ve ki-kare testi *p* değerleri.

Klinik Veriler		<i>BclI</i> Polimorfizmi					<i>Tth111I</i> Polimorfizmi				
		CC	CG	GG	<i>p</i>	Toplam	CC	CT	TT	<i>p</i>	Toplam
Yaş	≤ 50	12	7	0	0,406	73	5	11	4	0,390	83
	> 50	25	28	1			8	43	12		
Grade	1	7	7	0	0,748	69	5	8	6	0,234	79
	2	20	17	1			5	28	9		
	3	10	7	0			3	14	1		
Östrojen Reseptörü	Pozitif	18	19	0	0,747	50	7	27	6	0,536	52
	Negatif	7	6	0			3	6	3		
Progesteron Reseptörü	Pozitif	14	16	0	0,679	47	7	21	5	0,490	50
	Negatif	9	8	0			3	9	5		
Menapoz Durumu	Menapoz öncesi	11	8	0	0,790	68	5	12	4	0,496	76
	Menapoz sonrası	26	22	1			7	36	12		
T(Tümör Çapı)	T1	15	12	0	0,381	66	3	19	7	0,056	69
	T2	11	16	1			6	19	5		
	T3	6	2	0			4	2	1		
	T4	2	0	0			0	1	2		
N(Nod Sayısı)	n0	14	13	0	0,348	66	5	18	6	0,967	69
	n1	8	10	0			3	13	4		
	n2	5	5	0			3	6	2		
	Nx	7	3	1			2	5	3		
Aksilla Tutulumu	Var	13	15	0	0,392	52	6	19	6	0,713	57
	Yok	14	10	0			3	17	6		
Lenfatik invazyon	Var	13	15	0	0,392	52	6	19	6	0,713	57
	Yok	14	10	0			3	17	6		
Aile öyküsü	Var	2	8	0	0,022*	64	1	6	3	0,725	73
	Yok	32	22	0			11	39	13		
Evre	1	9	9	0	0,937	54	2	13	4	0,558	59
	2	12	13	0			4	18	6		
	3	6	5	0			4	7	1		

\*: İstatistiksel olarak önemli *p* değeri.

#### 4.3.2. *Tth111I* polimorfizmi

*Tth111I* polimorfizmi kapsamında 83 bireyden oluşan hasta grubunda 13 (%15,7) CC (doğal genotip), 54 (%65,1) CT (heterozigot genotip), 16 (%19,2) TT (polimorfik genotip); 86 bireyden oluşan kontrol grubunda ise bu oranlar sırasıyla 31 (%36,0), 45 (%52,3) ve 10 (%11,7) olarak belirlendi (Çizelge 4.5). Ki-kare testi sonucuna göre hasta grubu ile kontrol grubu arasında hem genotip (Çizelge 4.5) hem de allel (Çizelge 4.6) açısından istatistiksel olarak önemli derecede bir anlam tespit edildi. Toplam popülasyonun Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu olmadığı tespit edildi (Çizelge 4.7). Klinik veriler ile *Tth111I* polimorfizmi genotipleri kıyaslandığında hiçbir klinik veri ile genotipler arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilemedi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.5: *Tth111I* polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi *p* değeri.

		<i>Tth111I</i> Genotipleri			Toplam	<i>p</i>
		CC	CT	TT		
Hasta	Sayı	13	54	16	83	0,009*
	%	15,7	65,1	19,2	100	
Kontrol	Sayı	31	45	10	86	
	%	36,0	52,3	11,7	100	
Toplam	Sayı	44	99	26	169	
	%	26,0	58,6	15,4	100	

\*: İstatistiksel olarak önemli *p* değeri.

Çizelge 4.6: *Tth111I* polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi *p* değeri.

		<i>Tth111I</i> Allelleri		Toplam	<i>p</i>
		C	T		
Hasta	Sayı	80	86	166	0,010*
	%	48,2	51,8	100	
Kontrol	Sayı	107	65	172	
	%	62,2	37,8	100	
Toplam	Sayı	187	151	338	
	%	55,3	44,7	100	

\*: İstatistiksel olarak önemli *p* değeri.

Çizelge 4.7: *Tth1111* polimorfizminin Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu.

Genotip	Beklenen	Gözlenen	Ki-kare	<i>p</i>
CC	51,7	44	5,79	0,02
CT	83,5	99		
TT	33,7	26		

#### 4.3.3. ER22/23EK polimorfizmi

ER22/23EK polimorfizmi kapsamında 47 bireyden oluşan hasta grubunda 40 (%85,1) GG (doğal genotip) ve 7 (%14,9) GA (heterozigot genotip); 86 bireyden oluşan kontrol grubunda ise bu oranlar sırasıyla 85 (%98,8) ve 1 (%1,2) olarak belirlendi. Hem hasta hem de kontrol grubunda AA polimorfik genotipine rastlanmadı (Çizelge 4.8). Ki-kare testi sonucuna göre hasta grubu ile kontrol grubu arasında hem genotip (Çizelge 4.8) hem de allel (Çizelge 4.9) açısından istatistiksel olarak önemli derecede bir anlam tespit edildi. Toplam popülasyonun Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu olduğu tespit edildi (Çizelge 4.10). Klinik veriler ile ER22/23EK polimorfizmi genotipleri kıyaslandığında hiçbir klinik veri ile genotipler arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilemedi (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.8: ER22/23EK polimorfizmi genotip oranları ve ki-kare testi *p* değeri.

		ER22/23EK Genotipleri			Toplam	<i>p</i>
		GG	GA	AA		
Hasta	Sayı	40	7	0	47	0,001*
	%	85,1	14,9	0	100	
Kontrol	Sayı	85	1	0	86	
	%	98,8	1,2	0	100	
Toplam	Sayı	125	8	0	133	
	%	94,0	6,0	0	100	

\*: İstatistiksel olarak önemli *p* değeri.

Çizelge 4.9: ER22/23EK polimorfizmi allel oranları ve ki-kare testi  $p$  değeri.

		ER22/23EK Allelleri		Toplam	$p$
		G	A		
Hasta	Sayı	87	7	94	0,002*
	%	92,6	7,4	100	
Kontrol	Sayı	171	1	172	
	%	99,4	0,6	100	
Toplam	Sayı	258	8	266	
	%	97,0	3,0	100	

\*: İstatistiksel olarak önemli  $p$  değeri.

Çizelge 4.10: ER22/23EK polimorfizminin Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu.

Genotip	Beklenen	Gözlenen	Ki-kare	$p$
GG	125,1	125	0,13	0,72
GA	7,8	8		
AA	0,1	0		

Çizelge 4.11: ER22/23EK polimorfizminin klinik verilerle kıyaslanması ve ki-kare  $p$  değerleri.

Klinik Veriler		ER22/23EK Polimorfizmi				
		GG	GA	AA	$p$	Toplam
Yaş	≤ 50	31	4	0	0,254	47
	> 50	9	3	0		
Grade	1	7	1	0	0,725	45
	2	22	3	0		
	3	9	3	0		
Östrojen Reseptörü	Pozitif	20	2	0	0,322	31
	Negatif	7	2	0		
Progesteron Reseptörü	Pozitif	16	2	0	0,592	29
	Negatif	9	2	0		
Menapoz Durumu	Menapoz öncesi	11	3	0	0,465	45
	Menapoz sonrası	27	4	0		
T(Tümör Çapı)	T1	17	2	0	0,673	43
	T2	14	4	0		
	T3	3	1	0		
	T4	2	0	0		
N(Nod Sayısı)	n0	15	3	0	0,872	43
	n1	10	1	0		
	n2	4	1	0		
	Nx	7	2	0		
Aksilla Tutulumu	Var	14	2	0	0,626	32
	Yok	13	3	0		
Lenfatik invazyon	Var	14	2	0	0,626	32
	Yok	13	3	0		
Aile öyküsü	Var	3	2	0	0,126	43
	Yok	33	5	0		
Evre	1	12	2	0	0,649	35
	2	12	3	0		
	3	5	1	0		

#### 4.3.4. N363S polimorfizmi

N363S polimorfizmi kapsamında 63 bireyden oluşan hasta ve 86 bireyden oluşan kontrol grubunda sadece AA (doğal genotip) genotipine rastlandı. Gerek hasta gerekse kontrol grubunda polimorfik (G) allele rastlanmadı ve herhangi bir istatistiksel kıyaslama yapılmadı.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Uluslar Arası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) verilerine göre 2008 yılında 1,38 milyon yeni meme kanseri olgusu tanımlanmıştır. Bu değer kadınlar arasında görülen tüm kanserlerin %23'ünü, cinsiyet ayrımı olmaksızın görülen tüm kanserlerin ise %10,9'unu teşkil etmektedir (IARC 2008). Meme kanseri gelişiminden sorumlu çeşitli çevresel ve genetik etmenler tanımlanmıştır. Tezin Kuramsal Temeller kısmında detaylı olarak belirtildiği gibi, bazı genetik sendromların varlığı, uzun süreli östrojen maruziyeti, batılı yaşam tarzı, sigara ve alkol kullanımı gibi faktörlerin kadınlarda meme kanseri gelişiminde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Ponder 2001; Haites ve Gregory 2002; IARC 2008). Meme kanserinin oluşumundan tedavisine kadar her süreçte etkili genetik ve çevresel etmenlerin araştırılması büyük ölçekte devam etmektedir. Bu süreçlerde rol oynayan penetrans yüksek genlerin yanı sıra düşük penetranslı gen polimorfizmleri de önemli bir araştırma konusudur (Dunning ve ark. 1999). Yapılan çalışmalar tümör baskılayıcı genler, DNA tamir genleri, onkogenler, steroid ve karsinojen metabolizma genlerinde görülen polimorfizmlerin farklı popülasyonlardaki sıklığının belirlenmesi ve kanser ile ilişkisinin araştırılmasının önemini ortaya koymaktadır.

Glukokortikoid reseptörler hücre içerisinde ligantı olan glukokortikoidlere bağlanarak aktive olarak nükleusda hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyen steroid reseptörlerdir. Glukokortikoid reseptörü, insan genomunda 5q31-5q32 üzerinde yer alan ve 9 ekzondan oluşan bir gen tarafından kodlanır. Bu genin ekspresyonu dokudan dokuya farklı düzeylerde olmakla beraber tüm dokularda görülmektedir. Glukokortikoid reseptörü, N-terminal transaktivasyon, DNA bağlanma ve C-Terminal ligant bağlanma domeni olmak üzere üç ana kısımdan oluşur. Reseptör ekspresyonunun normal meme dokusundan kanserin her aşamasına kadar değişen düzeylerde görüldüğü bildirilmektedir (Courtin ve ark. 2012). Yapılan çalışmalar GR aktivasyonunun meme kanserinde anti-apoptotik etkili olduğunu göstermektedir (Huang ve ark. 2000; Moran ve ark. 2000). Meme kanserinde GR ekspresyonu ve bu ekspresyonun strese bağlı olarak serbestleşen GC'ce düzenlendiği bilgisinden hareketle strese bağlı kanser gelişiminde GR'nin etkili olabileceği ifade edilmektedir (Baschant ve Tuckermann 2010). Diğer taraftan GR ile bir tümör baskılayıcı olan p53 arasında kompleks bir inhibisyon mekanizması tanımlanmış ve aktif GR'ün p53 fonksiyonu üzerine etki ederek kanser gelişimi üzerine rol oynadığı bildirilmiştir. Ancak bu etki GR/p53 dengesine bağlıdır

(Vilasco ve ark. 2011). Glukokortikoidlerin önemli bir etki mekanizması da hücre bölünmesi üzerinedir. Sentetik bir glukokortikoid olan deksametazonun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Ancak yapılan çalışmalar normal hücrelerde proliferasyon baskılandığı halde yüksek düzeyde GR ekspresyonunun olduğu hücrelerde proliferasyonu stimüle edici etkinin olduğunu göstermiştir. Bu sebeple meme kanserinin kemoterapi veya adjuvan tedavisinde glukokortikoid kullanımının ön görülemeyen etkiler ortaya çıkarabildiği belirtilmektedir (Courtin ve ark. 2012). Sonuç olarak yapılan çalışmalar GR ile meme kanseri arasındaki ilişkinin karmaşık ve pek çok bakımdan tam olarak aydınlatılmamış olduğunu göstermektedir. Bu bakımdan çok sayıda hastada GR ekspresyon düzeyleri, gen düzeyinde polimorfizm ve mutasyon çalışmaları ile moleküler mekanizmanın anlaşılmasına yönelik çalışmalara gereksinim vardır.

Glukokortikoid reseptör geninin polimorfizmleri çoğunlukla transaktivasyon domeni üzerinde tanımlanmıştır ve GC duyarlılığı üzerine etkili oldukları belirtilmektedir (Bray ve Cotton 2003). Tez kapsamında ele alınan *BcII*, *Tth111I*, ER22/23EK ve N363S polimorfizmlerinin çeşitli metabolik hastalıklardaki etkileri araştırılmış ve farklı klinik tablolar için çeşitli düzeylerde etkili oldukları belirtilmiştir. Diğer taraftan bu etkilerin moleküler mekanizmaları açık değildir (Detera-Wadleigh ve ark. 1991; Lin ve ark. 2003; van Rossum ve Lamberts 2004). Yaptığımız literatür taramaları sonucu GR geni mutasyon ve polimorfizmlerine yönelik tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Curran ve ark., (2001) meme kanseri ile GR geninin promotor bölgesinde yer alan dinükleotid tekrarlarının meme kanseri ile ilişkili olduğunu bildirmiştir.

Çalışma kapsamında ele alınan dört polimorfizmin hasta ve sağlıklı bireylerdeki sıklığı PZR-RFLP tekniği ile incelenmiş ve elde edilen veriler, genotip ve allel frekansları bakımından hasta ve sağlıklı grup arasında istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Ayrıca her polimorfizm için çalışılan tüm vakalardaki genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesine uyumluluğu açısından test edilerek elde edilen hasta genotiplerinin klinik verilerle ilişkisi de istatistiksel olarak araştırılmıştır.

Tez kapsamında 85 kadın meme kanseri olgusuna ait tümör dokusundan izole edilen DNA örnekleri ile yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 86 sağlıklı gönüllüden alınan periferik kan örneklerinden izole edilen DNA örnekleri kullanıldı. Çalışılan dört polimorfizm için DNA örneklerinin yeterli olmaması, eski olması veya zaman içerisinde meydana gelmesi



muhtemel kırılmalara bağılı olarak hastalara ait DNA örneklerinin ancak bir kısmından sonuç alınabildi. Kontrol grubu içinse tüm örneklerden sonuç alındı.

Çalışılan polimorfizmlerden N363S polimorfizminde polimorfik allele hiçbir örnekte rastlanmadı ve gerek hastalık ve klinik bulguları açısından gerekse Hardy-Weinberg dengesi açısından bir kıyaslama yapılmadı. SNP veritabanı verilerine göre de polimorfik allel frekansının Avrupa popülasyonunu kapsayan iki panelde 0,021 ile 0,083 olduğu Afrika-Amerikan ve Asya popülasyonlarında ise hiç görülmediği belirlenmiştir (Sherry ve ark. 2001). Bu bakımdan elde ettiğimiz bu sonuç mevcut SNP veritabanı verileriyle örtüşmektedir.

*BcII* polimorfizmi kapsamında 73 hastada PZR sonuçları alınabilmiştir. Genotip frekansları homozigot doğal tip, heterozigot ve homozigot polimorfik tip için sırasıyla 0,484; 0,478; 0,038 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin beklenen Hardy-Weinberg dengesi açısından uyumsuz olduğu belirlenmiştir. SNP veritabanı verilerine göre çalışılan popülasyonlarda heterozigot genotipin ağırlıklı olduğu, sitozin allel frekansının ise düşük olduğu görülmektedir. Bu bakımdan elde ettiğimiz sonuçların veritabanı bilgileriyle farklı olduğu görülmektedir. Genotip ve allel dağılımları hasta ve sağlıklı grup arasında kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiş, klinik veriler açısından ise sadece aile öyküsü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tez çalışması kapsamında ele alınan *Tth1111* polimorfizmi için 83 hasta ve 86 kontrol vakası incelenmiştir. Genotip frekansları homozigot doğal tip, heterozigot ve homozigot polimorfik tip için sırasıyla 0,260; 0,586; 0,154 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçların beklenen Hardy-Weinberg dengesi açısından uyumsuz olduğu görülmektedir. SNP veritabanı popülasyon verileri açısından incelendiğinde farklı popülasyonlarda farklı genotipik dağılımlar olduğu görülmektedir. Genotip ve allel frekansları açısından sağlıklı ve hasta grup kıyaslandığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Klinik veriler açısından ise *Tth1111* polimorfizmi ile anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

Çalışılan dördüncü polimorfizm olan ER22/23EK için 47 hasta bireyde sonuç alınabilmiştir. Çalışılan örneklerde homozigot polimorfik genotipe rastlanmamış, heterozigot genotip frekansı ise 0,006 olarak bulunmuştur ve popülasyonun Hardy-Weinberg beklenen değerleri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Elde edilen veriler SNP veritabanı verileriyle uyumlu olarak G allelinin ağırlıklı olarak bulunduğunu göstermektedir. Hasta grubu ile kontrol grubu genotip ve allel frekansları açısından kıyaslandığında *Tth1111* polimorfizminde

olduğu gibi anlamlı bir fark olduğu ancak klinik verilerle bir ilişki olmadığı görülmektedir. Yapılan alışmalar ER22/23EK taşıyıcılarının genel olarak daha iyi bir metabolik profile sahip olduklarını, daha dūřuk açlık insülin düzeyleri, artmış insülin hassasiyeti gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Diđer taraftan *Tth1111* polimorfizminin etkilerine ilişkin veriler az sayıda olmakla beraber bu polimorfizmin metabolik etkilerinin ER22/23EK polimorfizmiyle ilişkili olduğunu ve etkinin her iki polimorfizmde taşıyıcılarında ortaya çıktığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Rosmond ve ark. 2000; van Rossum ve Lamberts 2004). Bu verilerle uyumlu olarak tez çalışması kapsamında ER22/23EK taşıyıcılığı gözlenen 7 hasta ve 1 sağlıklı bireyin aynı zamanda *Tth1111* taşıyıcısı oldukları belirlenmiştir. Diđer taraftan özellikle ER22/23EK polimorfizmi sonuçlarının az sayıda hastada alınabilmiş olması nedeniyle bu tür bir korelasyonu mevcut verilerle yapma olanağımız yoktur.

Tez alışması kapsamında elde edilen verilerin moleküler düzeyde çalışılmamış olması sonuçların sağlıklı bir şekilde tartışılması konusunda sınırlayıcıdır. Ayrıca vaka-kontrol sayısının az olması, tüm polimorfizmler için her hastada sonuç alınamamış olması, verilerin hastaların metabolik profillerini yansıtmaması, hastalara ait patoloji arşiv bilgilerinde eksiklerin olması tez çalışmamızın zayıf yönlerini teşkil etmektedir. Tez çalışmasının güçlü yönleri ele alınacak olduğunda yapılan alışmalar GR'ün memenin gerek fizyolojisi gerekse patolojisinde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Buna rağmen GR geninin mutasyon ve/veya polimorfizmlerini ele alan bir çalışma dışında çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan tez çalışmamız GR geninin meme kanserinde ele alındığı en kapsamlı çalışma olarak bir ilk niteliği taşımaktadır. Çalışma sonucunda iki polimorfizmin (*Tth1111* ve ER22/23EK) hastalıkla ilişkili olduğunun gösterilmesi bu alanda daha büyük hasta-kontrol gruplarıyla çalışmaların yapılmasının önemli olabileceğine işaret etmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Adcock IM, Caramori G (2001). Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol*, 79:376-384.
- Adcock IM, Ito K (2000). Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis*, 55:256-266.
- Agadir A, Shealy YF, Hill DL, Zhang X (1997). Retinyl methyl ether down-regulates activator protein 1 transcriptional activation in breast cancer cells. *Cancer Res*, 57:3444-3450.
- Allegra JC, Lippman ME, Simon R, Thompson EB, Barlock A, Green L, Huff KK, Do HM, Aitken SC, Warren R (1979a). Association between steroid hormone receptor status and disease-free interval in breast cancer. *Cancer treatment reports*, 63:1271-1277.
- Allegra JC, Lippman ME, Thompson EB, Simon R, Barlock A, Green L, Huff KK, Do HM, Aitken SC (1979b). Distribution, frequency, and quantitative analysis of estrogen, progesterone, androgen, and glucocorticoid receptors in human breast cancer. *Cancer Res*, 39:1447-1454.
- Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA (2005). Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int J Epidemiol*, 34:405-412.
- Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME (2004). Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13:1558-1568.
- Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, Dhabhar FS, Sephton SE, McDonald PG, Stefanek M, Sood AK (2006). The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nature reviews Cancer*, 6:240-248.
- Ariazi EA, Clark GM, Mertz JE (2002). Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res*, 62:6510-6518.
- Ariazi EA, Jordan VC (2006). Estrogen-related receptors as emerging targets in cancer and metabolic disorders. *Curr Top Med Chem*, 6:203-215.
- Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, Karlan BY (2000). BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res*, 60:5329-5333.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev*, 17:245-261.
- Barnes PJ, Adcock IM (2003). How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med*, 139:359-370.
- Barnes PJ, Karin M (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, 336:1066-1071.

- Baschant U, Tuckermann J (2010). The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 120:69-75.
- Beatson G (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet*, 2:104-107.
- Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med (Berl)*, 75:429-439.
- Belova L, Delgado B, Kocherginsky M, Melhem A, Olopade OI, Conzen SD (2009). Glucocorticoid receptor expression in breast cancer associates with older patient age. *Breast Cancer Res Treat*, 116:441-447.
- Bianchi F, Raponi M, Piva F, Viel A, Bearzi I, Galizia E, Bracci R, Belvederesi L, Loretelli C, Brugiati C, Corradini F, Baralle D, Cellerino R (2011). An intronic mutation in MLH1 associated with familial colon and breast cancer. *Fam Cancer*, 10:27-35.
- Borg A, Isola J, Chen J, Rubio C, Johansson U, Werelius B, Lindblom A (2000). Germline BRCA1 and HMLH1 mutations in a family with male and female breast carcinoma. *Int J Cancer*, 85:796-800.
- Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C (2008). Cancer mortality in the European Union, 1970-2003, with a joinpoint analysis. *Ann Oncol*, 19:631-640.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32:314-331.
- Boyle P, Maisonneuve P, Autier P (2000). Update on cancer control in women. *Int J Gynaecol Obstet*, 70:263-303.
- Bray PJ, Cotton RG (2003). Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum Mutat*, 21:557-568.
- Breslin MB, Geng CD, Vedeckis WV (2001). Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. *Mol Endocrinol*, 15:1381-1395.
- Brink M, Humbel BM, De Kloet ER, Van Driel R (1992). The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinology*, 130:3575-3581.
- Buckingham JC, Loxley HD, Christian HC, Philip JG (1996). Activation of the HPA axis by immune insults: roles and interactions of cytokines, eicosanoids, glucocorticoids. *Pharmacol Biochem Behav*, 54:285-298.
- Buxant F, Engohan-Aloghe C, Noel JC (2010). Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast in situ carcinoma, and invasive breast cancer. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 18:254-257.

- Buzdar AU (2004). The ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial: an update. *Clin Breast Cancer*, 5 Suppl 1:S6-S12.
- Calle EE, Heath CW, MiracleMcMahill HL (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*, 347:1713-1727.
- Calle EE, Heath CW, MiracleMcMahill HL (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, 360:187-195.
- Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP (2007). Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int*, 18:1319-1328.
- Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM (2001). BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell*, 105:149-160.
- Carey LA, Kim NW, Goodman S, Marks J, Henderson G, Umbricht CB, Dome JS, Dooley W, Amshey SR, Sukumar S (1999). Telomerase activity and prognosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol*, 17:3075-3081.
- Chaudhuri S, Cariappa A, Tang M, Bell D, Haber DA, Isselbacher KJ, Finkelstein D, Forcione D, Pillai S (2000). Genetic susceptibility to breast cancer: HLA DQB\*03032 and HLA DRB1\*11 may represent protective alleles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:11451-11454.
- Conde I, Paniagua R, Fraile B, Lucio J, Arenas MI (2008). Glucocorticoid receptor changes its cellular location with breast cancer development. *Histology and histopathology*, 23:77-85.
- Conzen SD (2008). Minireview: nuclear receptors and breast cancer. *Mol Endocrinol*, 22:2215-2228.
- Courtin A, Communal L, Vilasco M, Cimino D, Mourra N, de Bortoli M, Taverna D, Faussat AM, Chaouat M, Forgez P, Gompel A (2012). Glucocorticoid receptor activity discriminates between progesterone and medroxyprogesterone acetate effects in breast cells. *Breast Cancer Res Treat*, 131:49-63.
- Curran JE, Lea RA, Rutherford S, Weinstein SR, Griffiths LR (2001). Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene polymorphisms with sporadic breast cancer. *Int J Cancer*, 95:271-275.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, 19:269-301.
- DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER (2002). Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81:103-122.

- Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Rollins DY, Coffman D, Wiesch D (1991). A TthIII1 polymorphism on the 5' flanking region of the glucocorticoid receptor gene (GRL). *Nucleic Acids Res*, 19:1960.
- Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podesta F, Koper JW, Liuzzi A, Lamberts SW (2003). The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 59:68-74.
- Doll R, Peto R (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 66:1191-1308.
- Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA (2006). Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102:11-21.
- Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF (1999). A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8:843-854.
- Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Pedersen O (2001). The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25:1563-1565.
- Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR (1996). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects. *Steroids*, 61:263-269.
- Encio IJ, Detera-Wadleigh SD (1991). The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 266:7182-7188.
- Francke U, Foellmer BE (1989). The glucocorticoid receptor gene is in 5q31-q32 [corrected]. *Genomics*, 4:610-612.
- Gandini S, Merzenich H, Robertson C, Boyle P (2000). Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *Eur J Cancer*, 36:636-646.
- Genecards (2012). Proteins for NR3C1 gene. Weizmann Institute of Science, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NR3C1> (08.05.2012).
- Giguere V, Yang N, Segui P, Evans RM (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*, 331:91-94.
- Giuffra LA, Kennedy JL, Castiglione CM, Evans RM, Wasmuth JJ, Kidd KK (1988). Glucocorticoid receptor maps to the distal long arm of chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet*, 49:313-314.
- Gold PW, Drevets WC, Charney DS (2002). New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression. *Biol Psychiatry*, 52:381-385.
- Goulding NJ (2004). The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation - a four-ring circus. *Curr Opin Pharmacol*, 4:629-636.

- Green AR, Burney C, Granger CJ, Paish EC, El-Sheikh S, Rakha EA, Powe DG, Macmillan RD, Ellis IO, Stylianou E (2008). The prognostic significance of steroid receptor co-regulators in breast cancer: co-repressor NCOR2/SMRT is an independent indicator of poor outcome. *Breast Cancer Res Treat*, 110:427-437.
- Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N, Foulkes WD (2001). TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Res*, 61:4092-4097.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231:1150-1154.
- Haites N, Gregory H (2002). *Familial Breast and Ovarian Cancer : Genetics, Screening and Management*. Cambridge University Press, 419, West Nyack, NY, USA.
- Harris RA, Hiles ID, Page MJ, O'Hare MJ (1995). The induction of apoptosis in human mammary luminal epithelial cells by expression of activated c-neu and its abrogation by glucocorticoids. *Br J Cancer*, 72:386-392.
- Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999). Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 17:1474-1481.
- Hayashi S, Tanimoto K, Hajiro-Nakanishi K, Tsuchiya E, Kurosumi M, Higashi Y, Imai K, Suga K, Nakachi K (1997). Abnormal FHIT transcripts in human breast carcinomas: a clinicopathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases. *Cancer Res*, 57:1981-1985.
- Hecht K, Carlstedt-Duke J, Stierna P, Gustafsson J, Bronnegard M, Wikstrom AC (1997). Evidence that the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor. *J Biol Chem*, 272:26659-26664.
- Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, Wilfond B, Borg A, Trent J, Raffeld M, Yakhini Z, Bendor A, Dougherty E, Kononen J, Bubendorf L, Fehrle W, Pittaluga S, Gruvberger S, Loman N, Johannsson O, Olsson H, Sauter G (2001). Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med*, 344:539-548.
- Holland JF, Frei E (2000a). *Cancer Etiology*. *Holland-Frei Cancer Medicine*, In: Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E (eds). BC Decker, Hamilton (ON), 197.
- Holland JF, Frei E (2000b). *Neoplasms of the Breast*. *Holland-Frei Cancer Medicine*, In: Rast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E (eds). BC Decker, Hamilton (ON), 1739-1743.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 318:635-641.
- Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL (1975). MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*, 26:785-795.

- Huang Y, Johnson KR, Norris JS, Fan W (2000). Nuclear factor-kappaB/IkappaB signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. *Cancer Res*, 60:4426-4432.
- Hunter DJ, Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE, Willett WC (1993). A prospective study of the intake of vitamins C, E, and A and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, 329:234-240.
- IARC (1988). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. International Agency for Research on Cancer.
- IARC (2008). World Cancer Report. International Agency for Research on Cancer.
- Iau PT, Macmillan RD, Blamey RW (2001). Germ line mutations associated with breast cancer susceptibility. *Eur J Cancer*, 37:300-321.
- Ikeda Y, Suehiro T, Tsuzura S, Shiinoki T, Kaneda T, Kumon Y, Hashimoto K (2001). A polymorphism in the promoter region of the glucocorticoid receptor gene is associated with its transcriptional activity. *Endocr J*, 48:723-726.
- Janocko LE, Brown KA, Smith CA, Gu LP, Pollice AA, Singh SG, Julian T, Wolmark N, Sweeney L, Silverman JF, Shackney SE (2001). Distinctive patterns of Her-2/neu, c-myc, and cyclin D1 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in primary human breast cancers. *Cytometry*, 46:136-149.
- Jeltsch JM, Krozowski Z, Quirin-Stricker C, Gronemeyer H, Simpson RJ, Garnier JM, Krust A, Jacob F, Chambon P (1986). Cloning of the chicken progesterone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83:5424-5428.
- Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, Gardner HP, Ha SI, Chodosh LA, Ishov AM, Tommerup N, Vissing H, Sekido Y, Minna J, Borodovsky A, Schultz DC, Wilkinson KD, Maul GG, Barlev N, Berger SL, Prendergast GC, Rauscher FJ, 3rd (1998). BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*, 16:1097-1112.
- Junien JL, Staels B (2008). Nuclear Receptors as Molecular Targets for Cardiometabolic and Central Nervous System. IOS Press, 117, Amsterdam/Netherlands.
- Kelsey JL, Bernstein L (1996). Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu Rev Public Health*, 17:47-67.
- Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, Grobbee DE, Karl M, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW (1997). Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet*, 99:663-668.
- Kuennen-Boumeester V, Van der Kwast TH, Claassen CC, Look MP, Liem GS, Klijn JG, Henzen-Logmans SC (1996). The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer*, 32A:1560-1565.
- La Vecchia C (2004). Estrogen and combined estrogen-progestogen therapy in the menopause and breast cancer. *Breast*, 13:515-518.



- Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE (1998). The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 3:85-94.
- Laudet V (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*, 19:207-226.
- Laudet V, Auwerx J, Gustafson JA, Wahli W (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97:161-163.
- Lehman TA, Haffty BG, Carbone CJ, Bishop LR, Gumbs AA, Krishnan S, Shields PG, Modali R, Turner BC (2000). Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res*, 60:1062-1069.
- Lei SF, Deng FY, Liu XH, Huang QR, Qin Y, Zhou Q, Jiang DK, Li YM, Mo XY, Liu MY, Chen XD, Wu XS, Shen H, Dvornyk V, Zhao L, Recker RR, Deng HW (2003). Polymorphisms of four bone mineral density candidate genes in Chinese populations and comparison with other populations of different ethnicity. *J Bone Miner Metab*, 21:34-42.
- Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA (2007). Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol Cell Biol*, 27:2266-2282.
- Lien HC, Lu YS, Cheng AL, Chang WC, Jeng YM, Kuo YH, Huang CS, Chang KJ, Yao YT (2006). Differential expression of glucocorticoid receptor in human breast tissues and related neoplasms. *The Journal of pathology*, 209:317-327.
- Lin RC, Wang XL, Morris BJ (2003). Association of coronary artery disease with glucocorticoid receptor N363S variant. *Hypertension*, 41:404-407.
- Marcus JN, Watson P, Page DL, Narod SA, Lenoir GM, Tonin P, Linder-Stephenson L, Salerno G, Conway TA, Lynch HT (1996). Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer*, 77:697-709.
- Mattern J, Buchler MW, Herr I (2007). Cell cycle arrest by glucocorticoids may protect normal tissue and solid tumors from cancer therapy. *Cancer Biol Ther*, 6:1345-1354.
- McGuire WL, Clark GM (1989). Prognostic factors for recurrence and survival in axillary node-negative breast cancer. *J Steroid Biochem*, 34:145-148.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266:66-71.
- Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, Conzen SD (2001). Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J Biol Chem*, 276:16649-16654.
- Miner JN, Yamamoto KR (1992). The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element. *Genes Dev*, 6:2491-2501.
- Moran TJ, Gray S, Mikosz CA, Conzen SD (2000). The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 60:867-872.

- Morishima Y, Murphy PJ, Li DP, Sanchez ER, Pratt WB (2000). Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP-dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket. *J Biol Chem*, 275:18054-18060.
- Motulsky AG (2010). *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches*. Springer Press, 961, Heidelberg, Almany.
- Moutsatsou P, Papavassiliou AG (2008). The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer. *J Cell Mol Med*, 12:145-163.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1:263-273.
- Murray JC, Smith RF, Ardinger HA, Weinberger C (1987). RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nucleic Acids Res*, 15:6765.
- NCBI (2012). NR3C1 nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) [ *Homo sapiens* ]. National Center for Biotechnology Information, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2908>> (08.05.2012).
- Negrini M, Monaco C, Vorechovsky I, Ohta M, Druck T, Baffa R, Huebner K, Croce CM (1996). The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Res*, 56:3173-3179.
- Nunez BS, Vedeckis WV (2002). Characterization of promoter 1B in the human glucocorticoid receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*, 189:191-199.
- O'Malley BW (2007). Coregulators: from whence came these "master genes". *Mol Endocrinol*, 21:1009-1013.
- Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA (1999). The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem*, 274:27857-27866.
- Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA (1996). The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem*, 271:9550-9559.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55:74-108.
- Pavan B, Biondi C, Dalpiaz A (2006). Nuclear retinoic acid receptor beta as a tool in chemoprevention trials. *Curr Med Chem*, 13:3553-3563.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406:747-752.
- Ponder BA (2001). Cancer genetics. *Nature*, 411:336-341.

- Pratt WB, Toft DO (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, 18:306-360.
- Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO (2007). Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*, 109:25-32.
- Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schutz G (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*, 93:531-541.
- Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, Lu X, Brown M, Miron A, Liao X, Iglehart JD, Livingston DM, Ganesan S (2006). X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer cell*, 9:121-132.
- Rivers C, Levy A, Hancock J, Lightman S, Norman M (1999). Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J Clin Endocrinol Metab*, 84:4283-4286.
- Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN (2009). Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*, 169:505-514.
- Rose DP, Komninou D, Stephenson GD (2004). Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 5:153-165.
- Rosmond R (2002). The glucocorticoid receptor gene and its association to metabolic syndrome. *Obes Res*, 10:1078-1086.
- Rosmond R, Chagnon YC, Chagnon M, Perusse L, Bouchard C, Bjorntorp P (2000). A polymorphism of the 5'-flanking region of the glucocorticoid receptor gene locus is associated with basal cortisol secretion in men. *Metabolism: clinical and experimental*, 49:1197-1199.
- Sambrook J, Russell DW (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory, New York.
- Schaaf MJ, Cidlowski JA (2003). Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol Cell Biol*, 23:1922-1934.
- Schochetman G, Ou CY, Jones WK (1988). Polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 158:1154-1157.
- Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH (2004). Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta*, 1680:114-128.
- Schulz WA (2005). *Molecular Biology of Human Cancers, An Advanced Student's Textbook*. Springer, 508, Dordrecht, Germany.
- Seckl JR (2004a). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr Opin Pharmacol*, 4:597-602.
- Seckl JR (2004b). Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol*, 151 Suppl 3:U49-62.

- Seitz S, Rohde K, Bender E, Nothnagel A, Kolble K, Schlag PM, Scherneck S (1997). Strong indication for a breast cancer susceptibility gene on chromosome 8p12-p22: linkage analysis in German breast cancer families. *Oncogene*, 14:741-743.
- Sherry ST, Ward MH, M. K, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29:308-311.
- Shpitz B, Zimlichman S, Zemer R, Bomstein Y, Zehavi T, Liverant S, Bernehim J, Kaufman Z, Klein E, Shapira Y, Klein A (1999). Telomerase activity in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat*, 58:65-69.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:10869-10874.
- Steele RJ, Thompson AM, Hall PA, Lane DP (1998). The p53 tumour suppressor gene. *Br J Surg*, 85:1460-1467.
- Stewart PM, Corrie JE, Shackleton CH, Edwards CR (1988). Syndrome of apparent mineralocorticoid excess. A defect in the cortisol-cortisone shuttle. *J Clin Invest*, 82:340-349.
- Teulings FA, van Gilse HA (1977). Demonstration of glucocorticoid receptors in human mammary carcinomas. *Horm Res*, 8:107-116.
- Toft DO (1998). Recent Advances in the Study of hsp90 Structure and Mechanism of Action. *Trends Endocrinol Metab*, 9:238-243.
- van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA, Lamberts SW (2002). A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes*, 51:3128-3134.
- van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW (2003). Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 59:585-592.
- van Rossum EF, Lamberts SW (2004). Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res*, 59:333-357.
- van Rossum EF, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van de Waal HA, Kemper HC, Lamberts SW (2004). The ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition and muscle strength in young adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:4004-4009.
- Vilasco M, Communal L, Mourra N, Courtin A, Forgez P, Gompel A (2011). Glucocorticoid receptor and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 130:1-10.

- Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem*, 277:26573-26580.
- Weber GF (2007). *Molecular Mechanisms of Cancer*. Springer, 593, Cincinnati, Ohio.
- Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL, Quinn PG (1996). An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol*, 10:1379-1387.
- Weinberger C, Hollenberg SM, Ong ES, Harmon JM, Brower ST, Cidlowski J, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM (1985). Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science*, 228:740-742.
- Westenend PJ, Schutte R, Hoogmans MM, Wagner A, Dinjens WN (2005). Breast cancer in an MSH2 gene mutation carrier. *Hum Pathol*, 36:1322-1326.
- Wintermantel TM, Bock D, Fleig V, Greiner EF, Schutz G (2005). The epithelial glucocorticoid receptor is required for the normal timing of cell proliferation during mammary lobuloalveolar development but is dispensable for milk production. *Mol Endocrinol*, 19:340-349.
- Wooster R, Stratton MR (1995). Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels. *Trends Genet*, 11:3-5.
- Wu W, Pew T, Zou M, Pang D, Conzen SD (2005). Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *J Biol Chem*, 280:4117-4124.
- Xie D, Shu XO, Deng Z, Wen WQ, Creek KE, Dai Q, Gao YT, Jin F, Zheng W (2000). Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, 92:412-417.
- Yudt MR, Cidlowski JA (2001). Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, 15:1093-1103.
- Yudt MR, Jewell CM, Bienstock RJ, Cidlowski JA (2003). Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Biol*, 23:4319-4330.
- Zanardi S, Serrano D, Argusti A, Barile M, Puntoni M, Decensi A (2006). Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer*, 13:51-68.
- Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, Gibbs RA, Weinstock G, Wheeler DA (2004). Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res*, 14:580-590.
- Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hara Y, Kobayashi S, Iwase H (2006). NCOR1 mRNA is an independent prognostic factor for breast cancer. *Cancer Lett*, 237:123-129.
- Zheng W, Xie D, Cerhan JR, Sellers TA, Wen W, Folsom AR (2001). Sulfotransferase 1A1 polymorphism, endogenous estrogen exposure, well-done meat intake, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10:89-94.

## ÖZGEÇMİŞ

Gürkan AKYILDIZ 23.11.1986 tarihinde Çorlu/TEKİRDAĞ'da doğdu. İlköğrenimini Çakıllı İlköğretim Okulunda, lise eğitimini Vize Lisesinde Vize/KIRKLARELİ'de tamamladı. Lisans eğitimini Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde 2009 yılında tamamladı. 2011 yılında Antalya'da düzenlenen 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresinde "Türk meme kanseri hastalarında glukokortikoid reseptör gen polimorfizmlerinin araştırılması" başlıklı poster sunumunu gerçekleştirdi. 2009 yılından günümüze Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.