

T.C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERLERİNDE EPİGENETİK DEĞİŞİM GÖSTEREN  
GENLERDE METİLASYON PATERNLERİNİN BISÜLFİD  
SEKANSLAMA YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

**SHOHREH ALİZADEH SHARGH**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK  
**DOKTORA TEZİ**

**İZMİR-2012**

DEU.HSI.PhD-2006970120

T.C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERLERİNDE EPİGENETİK DEĞİŞİM GÖSTEREN  
GENLERDE METİLASYON PATERNLERİNİN BISÜLFİD  
SEKANSLAMA YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK  
DOKTORA TEZİ**

**SHOHREH ALİZADEH SHARGH**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Meral SAKIZLI

DEU.HSI.PhD-2006970120

Bu tez, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında  
DEÜ.2009.KB.SAG.071 no ile desteklenmiştir.

"Meme Kanserlerinde Epigenetik Değişim Gösteren Genlerde Metilasyon Paternlerinin Bisülfid Sekanslama Yöntemiyle Belirlenmesi" isimli bu tez 15.08.2017 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı/başarısız bulunmuştur.

**Jüri Başkanı**

Prof.Dr.Meral SARIZI  
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Prof.Dr.Tülay CANDA  
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Patoloji Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Doç. Dr. Sultan ÇİNGÖZ  
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi (yedek)**

Prof.Dr. Neşe ATABEY  
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU  
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Doç. Dr. Zuhâl EROĞLU  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi (yedek)**

Yrd. Doç.Dr. Burak KOSOVA  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

## İÇİNDEKİLER

1-Giriş .....	5
2.GENEL BİLGİLER .....	8
2.1. Genlerin metillenmesi.....	8
2.2. CpG adacıklarında metilasyon oluşumu.....	8
2.3. DNA metillenmesi ve gen ekspresyonu .....	8
2.4. Normal ve kanser hücrelerinde epigenetik belirteçler .....	11
2.5. DNA'nın metillenmesi ve insanda kanser oluşumu .....	13
2.6. Meme kanserine giriş.....	16
2.7. E-cadherin:tümör baskılayıcı gen .....	18
2.8. GSTP1 ;genetik stabilite'de katkısı olan gen .....	21
2.9. DNA metillenmesinin tanımı: .....	23
2.9.1. Bisülfite özel PCR (BSP): .....	26
2.9.2. Bisülfite sekanslama.....	27
2.9.2.1. Kapiler elektroforez.....	27
2.9.2.2. Sekanslamanın esası .....	27
2.9.2.3. Otomatik sekanslamanın iş akımının şeması .....	28
2.9.2.4. Sekanslama için primerler.....	29
2.10. Gen ekspresyonunun saptaması: Western blotlama (W.B):.....	32
2.10.1. Western blotlamanın gerekçesi.....	32
2.10.2. İmün blotlama .....	33
2.10.3. Blotlama malzemeleri.....	34
2.10.4. İmmün blotlamada membranlar ve tamponlar .....	34
2.10.5. İmün tanımlama (immun detection) .....	35
2.10.6. Total proteinin tanımlaması .....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Araştırmanın Tipi:.....	37

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı .....	37
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/ Çalışma grupları.....	37
3.3.1. Vakalar .....	37
3.3.2. Kontrol örnekler.....	39
3.4. Çalışma Materyali.....	39
3.5. Araştırmanın Değişkenleri: .....	40
3.6. Veri Toplama Araçları.....	40
3.6.1. Kullanılan aletler.....	40
3.6.2. Kullanılan kimyasal maddeler .....	41
3.6.4. Örnekler.....	43
3.6.5. Yöntemler.....	44
3.6.5.1. Bisülfid sekanslama.....	44
3.6.5.2. Meme dokusundan DNA izolasyonu .....	44
3.6.5.2.1. Yöntem.....	44
3.6.5.2.2. Çözeltiler.....	45
3.6.5.2.3. Protokol.....	46
3.6.5.3. Asetat sodyum ile DNA saflaştırması .....	47
3.6.5.3.1. Yöntem.....	47
3.6.5.3.2. Çözeltiler.....	47
3.6.5.3.3. Protokol.....	47
3.6.5.4. DNA'nın bisülfid muamelesi.....	48
3.6.5.4.1. Prensip.....	48
3.6.5.4.2. Çözeltiler.....	48
3.6.5.4.3. Protokol.....	49
3.6.5.5. Bisülfid'e özel PCR (BSP).....	50
3.6.5.5.1. E-cadherin geninin promotör bölegesini ve BSP dizisi ve amplicon büyüklüğü .50	
3.6.5.5.2. E-cadherin primerlerinin prensibi.....	52

3.6.5.5.3. Çözeltiler.....	53
3.6.5.5.4. E-cadherin için amplifikasyon protokolü.....	53
3.6.5.5.5. E-cadherin için termal döngü.....	54
3.6.5.5.6. GSTP1 geninin promotör bölegesi ve BSP dizisi ve amplicon büyüklüğü .....	54
3.6.5.5.7. GSTP1 geninin promotör bölegesinde CpG noktaların dizi sayısı .....	54
3.6.5.5.8. GSTP1 primerlerinin prensibi.....	55
3.6.5.5.9. Çözeltiler.....	55
3.6.5.5.10. GSTP1 için amplifikasyon protokolü.....	56
3.6.5.5.11. GSTP1 için termal döngüsü.....	56
3.6.5.6. Poliakrilamid jelin hazırlaması .....	57
3.6.5.6.1. Prensip.....	57
3.6.5.6.2. Çözeltiler.....	57
3.6.5.6.3. Yöntem.....	59
3.6.5.7. Western Blotlama .....	59
3.6.5.7.1. Prensip.....	59
3.6.5.7.2. Çözeltiler.....	60
3.6.5.7.2.1 %12 Poliakrilamid (loading jel) .....	60
3.6.5.7.2.2. % 8 Poliakrilamid (loading jel) .....	60
3.6.5.7.2.3. %5 Poliakrilamid (Stacking jel) .....	60
3.6.5.7.2.4. Protein yükleme ( loading) boyası .....	60
3.6.5.7.2.5. 1.5 X Tris (Resolving tampon).....	61
3.6.5.7.2.6. 0.5 X Tris (Stacking tamponu) .....	61
3.6.5.7.2.7. %10 SDS.....	61
3.6.5.7.2.8. %10 Amoniyum persülfat (APS) .....	61
3.6.5.7.2.9. Örnek (sample) tamponu 2× (Reducing buffer) .....	61
3.6.5.7.2.10. Tank tamponu (running or migration) (10X) .....	62
3.6.5.7.2.11. TAE tamponu 50X (Komasi mavısının yıkaması için).....	62

3.6.5.7.2.12. Aktarma (transfer) tamponu .....	62
3.6.5.7.2.13. Bloklama tamponu .....	62
3.6.5.7.2.14. Liziz tamponu.....	62
3.6.5.7.2.14.1. Liziz tampon(stok).....	62
3.6.5.7.2.15. TBS 10× ( konsantre).....	63
3.6.5.7.2.16. TTBS (Tween Tris Buffered saline) .....	63
3.6.5.7.2.17. SDS Akrilamid stok solüsyonu (% 30T-%2.6C) .....	63
3.6.5.7.2.18. Ponso S boyası.....	63
3.6.5.7.2.19. Proteinaz inhibitör kokteli .....	64
3.6.5.7.3. Proteinin İzolasyonu.....	64
3.6.5.7.3.1. Dokulardan total protein izolasyonu: .....	64
3.6.5.7.3.2. Hücre Kültüründen protein izolasyonu .....	64
3.6.5.7.4. Protein miktarının belirlenmesi: .....	65
3.6.5.7.5. Proteinin SDS-PAGE poliakrilamid jelinde yürütülmesi .....	66
3.6.5.7.5.1. Yürütme için örneklerin hazırlamasının prensibi.....	66
3.6.5.7.5.2. PAGE jelin hazırlamasının prensibi.....	67
3.6.5.7.5.3. Yöntem.....	68
3.6.5.7.5.4. Pozitif kontroller.....	69
3.6.5.7.5.5. Yürütme notları .....	69
3.6.5.7.5.6. Yürütme kontrolleri.....	70
3.6.5.7.5.7. Proteinlerin jelde boyaması .....	70
3.6.5.7.5.7.1. Proteinlerin jelde görüntülenmesi .....	70
3.6.5.7.5.7.2. Komasi mavısı .....	71
3.6.5.7.5.8. Poliakrilamid jelinde yürütülen proteinlerin PVDF membranlara transferi ve membranın bloklanması.....	71
3.6.5.7.5.8.1. Proteinlerin membrana yürütmesinin (transferi) prensibi.....	71
3.6.5.7.5.8.2. Küçük ve büyük proteinlerin aktarımının prensibi .....	72
3.6.5.7.5.8.3. Yöntem.....	72

3.6.5.7.5.8.4. Ponso-S boyaması .....	73
3.6.5.7.5.8.5. Bloklama.....	75
3.6.5.7.5.8.5.1. Membranın bloklama nedeninin prensibi .....	75
3.6.5.7.5.8.5.2. Yöntem .....	75
3.6.5.7.5.8.5.3. Primer ve sekonder antikorlerin hazırlama prensibi:.....	76
3.6.5.7.5.8.5.3.1. Antikorlerin hazırlama yöntemi .....	76
3.6.5.7.5.8.5.4. Proteinlerin membran üzerinde saptanması.....	77
3.6.5.7.5.8.5.5. Develop yöntemleri.....	77
3.6.5.7.5.8.5.6. Sonuçların niteliğini belirlemek.....	77
3.7 . Araştırma Planı ve Takvimi .....	79
3.8. Verilerin Değerlendirmesi:.....	80
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları: .....	81
3.10. Etik Kurul Onayı:.....	81
4. BULGULAR .....	82
4.1. Meme Tümöründe E-cadherin Geninin Metillenme Durumu.....	82
4.1.1. E-cadherin geninde meme tümör ve normal örneklerin metillenme durumu ve paterni .....	82
4.1.2 Meme tümör ve normal örneklerin E-cadherin genine özel BSP ürünlerinin jelde görünülmesi .....	85
4.1.3 Meme tümör ve normal örneklerin, E-cadherin geninin promotör bölgesine özel BSP ürünlerin sekanslanması .....	87
4.1.2. E-cadherin geninde meme tümör ve civarındaki normal dokuların metillenme durumu .....	91
4.1.2. E-cadherin geninde meme tümör ve civarındaki normal dokuların metillenme paterninin durumu .....	92
4.1.3. E-cadherin geninde meme tümör dokuların metillenme durumu ile tümör evresinin (stage) arasında ilişkisi.....	94
4.1.4. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör evresi arasındaki ilişki .....	95



4.1.5. E-cadherin geninde meme tümör dokuların metillenme durumu ile tümör derecesi (grade) arasında ilişkisi.....	96
4.1.6. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör derecesinin arasında ilişki.....	97
4.1.7. E-cadherin geninin promotör bölgesinde tam metillenme durumu ile tümörün evresi ve derecesi arasında ilişki .....	98
4.1.8. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün geridönüşümü, metastaz durumu ve kemoterapi arasında ilişki .....	98
4.1.9. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün geridönüşümü, metastaz durumu ve kemoterapi arasında ilişki .....	99
4.1.10. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümör türünün ilişkisi.....	100
4.1.11. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümör türünün ve tümör evresinin arasında ilişkisi.....	101
4.1.12. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün türü ve tümörün derecesinin arasında ilişkisi.....	101
4.2. Meme Tümöründe GSTP1 Geninin Metillenme Durum.....	102
4.2.1. GSTP1 geninde meme tümör ve normal örneklerin metillenme durumu ve paterni .....	102
4.2.2 Meme tümör ve normal örneklerin GSTP1 genine özel BSP ürünlerinin jelde görünülmesi .....	109
4.2.3 Meme tümör ve normal örneklerin GSTP1 genine bisulfate özel sekanslama sonuçlarının farklı düzeylerde görüntülerinin örnekleri .....	109
4.2.4. GSTP1 geninde meme tümör ve civarındaki normal dokuların metillenme durumu .....	112
4.2.4. GSTP1 geninde meme tümör ve civarındaki normal dokuların metillenme paterninin durumu .....	113
4.2.5. GSTP1 geninde meme tümör dokuların metillenme durumu ile tümör evresinin (stage) arasında ilişkisi.....	114
4.2.6. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün evresinin arasında ilişki.....	116
4.2.7. GSTP1 geninde meme tümör dokuların metillenme durumu ile tümör derecesi (grade) arasında ilişkisi.....	117

4.2.6. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün derecesinin arasında ilişki.....	118
4.2.7. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün evresi ve derecesi arasında ilişki.....	120
4.2.8. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün evresi ve derecesi arasında ilişki.....	121
4.2.9. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün geridönüşümü, metastaz durumu ve kemoterapi arasında ilişki .....	123
4.2.10. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün geridönüşümü, metastaz durumu ve kemoterapi arasında ilişki .....	124
4.2.11. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün türünün arasında ilişki.....	125
4.2.12. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör türünün ilişkisi .....	126
4.2.13. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ve metillenme paterni ile tümör türü ve tümör evresinin arasındaki ilişki .....	126
4.2.14. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ve paterni ile tümör türünün ve tümörün derecesi arasında ilişki .....	128
4.2.17 GSTP1 genin promotör bölgesinde özel ccg, ctg ve cg cg noktaların metillenme paterni .....	130
4.2.18. GSTP1 genin promotör bölgesinde özel ccg, ctg ve cg cg noktalarının metillenme durumu ile tümörün evresi arasındaki ilişki .....	131
4.2.19. GSTP1 genin promotör bölgesinde özel ccg, ctg ve cg cg noktalarının metillenme durumu ile tümörün derecesi arasındaki ilişki (Şekil 56).....	131
4.3. Meme tümöründe E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve promotör bölgesinde metillenme ile kıyaslanması .....	132
4.3.1. E-cadherin proteininin ekspresyon düzeyini western blotlama yöntemiyle elde edilen sonuçlarının görüntüsü .....	132
4.3.2. Meme tümöründe, tümör ve normal örneklerde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyinin kıyaslanması.....	134
4.3.3. Meme tümör doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasındaki ilişki.....	134
4.3.4. Meme normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasında ilişki .....	135

4.3.5. Meme tümör ve normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme paterninin sıklığı.....	136
4.3.6. Meme tümör örneklerinde, E-cadherin proteinin ekspresyon durumu ile tümörün evresinin arasında ilişki .....	140
4.3.7. Meme tümörünün örneklerinde, E-cadherin proteinin ekspresyon durumu ile tümörün derecesi (grade) arasındaki ilişki .....	141
4.3.8. Meme tümör örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve tümör kemoterapi, geridönüşümü ve metastazının durumu arasındaki ilişki.....	142
4.4. Meme Tümöründe GSTP1 Proteinin Ekspresyon Düzeyi ve Promotör Bölgesinde Metillenme Ile Kıyaslanması .....	142
4.4.1. GSTP1 proteininin ekspresyon düzeyini western blotlama yöntemiyle elde edilen sonuçlarının görüntüsü .....	142
4.4.2. Meme tümöründe, tümör ve normal dokularda GSTP1 protein ekspresyon düzeyinin kıyaslanması.....	146
4.4.3. Meme tümör doku örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme durumu arasındaki ilişki .....	147
4.4.4. Meme normal doku örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasındaki ilişki.....	147
4.4.5. Meme tümör ve normal doku örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme paterninin sıklığı.....	149
4.4.6. Meme tümör örneklerinde, GSTP1 proteinin ekspresyon durumu ile tümör evresinin arasındaki ilişki .....	152
4.4.7. Meme tümör örneklerinde, GSTP1 proteinin ekspresyon durumu ile tümörün derecesi (grade) arasındaki ilişki.....	153
4.4.8. Meme tümör örneklerinde GSTP1 protinin ekspresyon düzeyi ve tümörün kemoterapi, geridönüşüm ve metastaz durumu arasındaki ilişki .....	153
5.TARTIŞMA.....	154
5.1. Verilerin gözden geçirmesi .....	154
5.1.1. E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme durumu .....	154
5.1.2. GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme durumu .....	155
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	163
7. Kaynaklar .....	165

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1.Tümör önleyici genlerin işlevleri üzerinden sınıflandırılması (Yang et al, 2001:115)....	18
Tablo 2.İnsanın meme kanserinde metillenen genler ( Huang, Esteller, 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004515) .....	20
Tablo 3. Meme tümör örneklerin patolojik özellikleri.....	37
Tablo 4 .Tavsiye olmuş liziz tamponunun miktarı.....	65
Tablo 5.Jelin yüzdesi ve protein büyüklüğü .....	67
Tablo 6.Poliakrilmid jel içeriği.....	68
Tablo 7.Poliakrilmid jel içeriği.....	69
Tablo 8.Yürütme kontrollerinin özellikleri.....	70
Tablo 9.Meme tümör örneklerinde, E-cadherin geninin promotör bölgesinde yapılab bisülfid sekanslama sonuçlarının sınıflandırılması .....	82
Tablo 10.Meme normal örneklerinde, E-cadherin geninin promotör bölgesinde yapılab bisülfid sekanslama sonuçlarının sınıflandırılması .....	84
Tablo 11.Meme tümör ve normal örneklerinde E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumunun kıyaslaması.....	92
Tablo 12.Meme tümör ve normal dokularında, E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterninin kıyaslaması.....	93
Tablo 13.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümörün evresinin ilişkisi .....	95
Tablo 14.E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör evresi arasında ilişkisi .....	95
Tablo 15.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümörün derecesinin.....	97
Tablo 16.E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör derecesi arasında ilişkisi .....	97
Tablo 17. Meme tümöründe E-cadherin geninin promotör bölgesinde tam metillenme durumu ile tümörün evre ve derecesi arasında ilişkisi .....	98
Tablo 18.E-cadherin geninin promotör bölgesinde meillenme durumu ile meme tümörün metstaz, kemoterapi etkisi ve tümörün geridönüşümü arasında ilişkisi.....	98
Tablo 19.E-cadherin geninin promotör bölgesinde meillenme paterni ile meme tümörün metstaz, kemoterapi etkisi ve tümörün geridönüşümü arasında ilişkisi .....	99

Tablo 20.E-cadherin geninin promotör bölgesinde 940. noktanın metillenme durumu ile .....	99
Tablo 21.E-cadherin geninin promotör bölgesinde tümörün türü (duktal) ve metillenme durumu arasında ilişkisi .....	100
Tablo 22. Meme tümör örneklerinde, GSTP1 geninin promotör bölgesinde yapılab bisülfid sekanslama sonuçlarının sınıflandırılması .....	103
Tablo 23. Meme normal örneklerinde, GSTP1 geninin promotör bölgesinde yapılab bisülfid sekanslama sonuçlarının sınıflandırılması .....	107
Tablo 24.GSTP1 geninde tümör ve normal dokularda metillenme durumunun sıklığının kısılaması.....	113
Tablo 25.GSTP1 geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümör evresinin ilişkisi .....	115
Tablo 26.GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör evresi arasında ilişkisi .....	116
Tablo 27.GSTP1 geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümörün derecesinin ilişkisi .....	118
Tablo 28. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün derecesinin arasında ilişki.....	118
Tablo 29. Meme tümöründe GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün evre ve derecesi arasında ilişkisi (yüzdesi).....	120
Tablo 30.Meme tümöründe GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün evre ve derecesi arasında ilişkisi .....	122
Tablo 31. GSTP1 geninin promotörünün bölgesinde metillenme durumu ile meme tümörünün metastaz, kemoterapi etkisi ve tümörün geridönüşümünün arasında ilişkisi .....	123
Tablo 32.GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile meme tümörünün metastazı, kemoterapi etkisi ve tümörün geridönüşümü arasında ilişkisi .....	124
Tablo 33. GSTP1 genin promotör bölgesinde duktal tipinden meme tümörün farklı metillenme durumlarının sıklığı .....	125
Tablo 34.GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile duktal tümör türü ve tümör evrelerinin arasında ilişki.....	127
Tablo 35.GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme paterni ile duktal tipinden olan meme tümörünün evresi arasında ilişkisi.....	128

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. DNA metillenmesi ve histon modifikasyonunun gen ekspresyonunda etkisi (Egger et al, 2004;457).....	9
Şekil 2. Normal ve tümör hücrelerinde epigenetik değişimlerin şematik görüntüsü .....	10
Şekil 3. İnsan genomunda CpG dinükleotidlerin dağılımı ile, normal ve tümör hücrelerinde metillenme paterninin farklılığı (açık yuvarlaklar metillenmemiş ve koyular metillenmiş sitozini göstermektedir) (Herman, Baylin, 2003:2042).....	11
Şekil 4. Tümörgenezisde DNA metillenme paterninin değişimi ( Esteller, 2007: doi:10.1038/nrg) .....	12
Şekil 5. ‘Çift-vuruş’ hipotezine göre, tümör baskılayıcı genlerin genetik ve epigenetik susturulma mekanizması (Herman, Baylin, 2003:2042).....	15
Şekil 6. Hücre-hücre sinyal sistemi ve E-cadherin yolu ile Rac yolağının tetiklenmesi (Yap et al,2002).....	21
Şekil 7. Bisülfite ile muamele edilmiş PCR ürününün metillenme araştırma yöntemleri ( <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Bisulfite_sequencing">http://en.wikipedia.org/wiki/Bisulfite_sequencing</a> ).....	26
Şekil 8. Florsans sekanslama ve radyoaktif sekanslamanın sonuçlarının kıyaslanması .....	27
Şekil 9. PCR primerler ile sekanslama.....	29
Şekil 10. Muamele olmamış DNA dizisi. Oklar metillenmemiş sitozinlerin konumunu guaninden önce göstermektedir. Bisülfite muamelesinden sonra, metillenmemiş sitozinler, timine dönüşüyor. ....	30
Şekil 11. Bisülfite ile muamele olmuş DNA sekansı. Oklar metillenmemiş sitozinlerin konumunu göstermektedir. Bu sitozinler bisülfite muamele sonrası timine dönüşmüştür. ....	30
Şekil 12. Normal ve direkt sekanslama iş akımının kıyaslanması .....	31
Şekil 13. Antijen ve antikor etkileşimi ( <a href="http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure,2011">http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure,2011</a> ).....	32
Şekil 14. Western blotlama şeması ( <a href="http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure,2011">http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure,2011</a> ).....	33
Şekil 15. Western blotlama transferi .....	35
Şekil 16. E-cadherin için bisülfite özel PCR ürününün bandları.....	58
Şekil 17. GSTP1 için bisülfite özel PCR ürününün bandları.....	58
Şekil 18. Gen ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi’’Western blot’’ .....	59

Şekil 19. Komasi mavisini ile jel boyaması.....	71
Şekil 20.a. Membranın ponsu ile boyaması ve b. Membrandan boyanma sonrası yıkanılmış ve markrın işaretlenmesinin ve protein bandlarının görüntüsü .....	74
Şekil 21.Membran üzerinde markrleın işaretlendirmesi .....	75
Şekil 22.Western blot'da görüntülenme temeli .....	78
Şekil 23.Meme tümör ve normal örneklerinde, E-cadherine geninin promotör bölgesine özel PCR ürünlerin poliarilamit jeldinde görüntüsü .....	87
Şekil 24.Meme tümör ve normal örneklerin, E-cadherin geninin promotör bölgesine özel BSP ürünlerin sekanslama sonuçlarının görüntüsü.....	90
Şekil 25.Meme tümör ve normal örneklerinde E-cadherin geninin promotör bölgesinde .....	91
Şekil 26.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme paterni kıyaslaması.....	93
Şekil 27.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümör evresi ile ilişkisi (*m= metillenmemiş) .....	94
Şekil 28.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme sıklığı ile tümör derecesi ile ilişkisi (*=metillenmemiş) .....	96
Şekil 29. E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme paterni ile duktal tipinden olan meme tümör türünün arasında ilişkisi.....	100
Şekil 30.E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile duktal tipinden tümör ve tümör evresinin arasında ilişkisi.....	101
Şekil 31.E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme paterni ile duktal tipinden olan meme tümörünün derecesi arasında ilişkisi.....	102
Şekil 32.Meme tümör ve normal örneklerinde, GSTP1 geninin promotör bölgesine özel PCR ürünlerin poliarilamit jeldinde görüntüsü .....	109
Şekil 33.GSTP1 geninde promotör bölgesinin BSP ürününün normal ve tümör örneklerinde, bisülfid sekanslama görüntüsü.....	112
Şekil 34. GSTP1 geninde tümör ve normal dokuların metillenme sıklığı.....	113
Şekil 35. GSTP1 geninde tümör ve normal dokuların metillenme paterni.....	114
Şekil 36. GSTP1 geninde tümör dokuların metillenme sıklığı ile tümör evresinin arasında ilişki .....	115
Şekil 37. GSTP1 geninde tümör dokuların metillenme sıklığı ile tümörün derecesi ile ilişki ..	118
Şekil 38. Meme tümöründe GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün evre ve derecesinin arasında ilişkisi.....	121

Şekil 39. GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme paterni ile duktal tipinden olan meme tümör türünün arasında ilişkisi .....	126
Şekil 40. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile duktal tümör türü ve tümörün evrelerinin arasında ilişki.....	127
Şekil 41. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenmiş CpG noktaların sayısı ve duktal tipinden 3 sınıfta tümörün evresinin arasında ilişki .....	128
Şekil 42. GSTP1 geninin promotör bölgesindeki metillenme durumu ile, duktal tümörün türü .	129
Şekil 43. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenmiş CpG noktalarının sayısı ve duktal tipinden olan, 3 sınıfta tümör derecesinin (grade) arasında ilişki .....	129
Şekil 44. Meme tümöründe GSTP1 genin promotöründe bulunan cgcg, ctg ve ccg noktaların metillenme yüzdesi.....	130
Şekil 45. Meme tümöründe GSTP1 genin promotöründe bulunan cgcg, ctg ve ccg noktaların metillenme paterninin sıklığı .....	130
Şekil 46. Meme tümörünün örneklerinde GSTP1 geninin promotör bölgesinde CCG, CTG ve CGCG noktaların metillenme durumu .....	131
Şekil 47. Meme tümör örneklerinde GSTP1 geninin promotör bölgesinde CCG, CTG ve CGCG noktalarının metillenme paterni.....	131
Şekil 48. E-cadherin proteini için beta aktin proteini ve E-cadherin proteinin bantlarının görüntüsü.....	132
Şekil 49. E-cadherin proteini için western blotlamada, E-cadherin ve beta aktin proteinlerinin bantlarının görüntüsünden örnekler.....	133
Şekil 50. Meme tümör ve normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyonunun kıyaslanması.....	134
Şekil 51. Meme tümör örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasında ilişki (*= metillenmemiş).....	135
Şekil 52. Meme normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyonunun düzeyi ve metillenme durumu arasında ilişki .....	135
Şekil 53. Meme tümör ve normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyonunun düzeyi ve metillenme durumunun kıyaslaması .....	136
Şekil 54. Meme tümör örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme paterninin arasında ilişki .....	137
Şekil 55. Meme normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme paterni arasındaki ilişki .....	138



Şekil 56. Memetümöründe normal ve tümör örneklerinde, E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyinin kıyaslaması .....	139
Şekil 57. Meme normal dokuları ve tümör dokuların E-cadherin proteinin dansitelerinin kıyaslanması.....	139
Şekil 58. Meme normal dokuları ve tümör dokuların E-cadherin proteinin üç sınıfta konsantrasyonlarının sıklığının kıyaslanması.....	140
Şekil 59. Meme tümörünün örneklerinde, E-cadherin proteinin ekspresyon durumu ile tümörün evresinin arasında ilişki.....	141
Şekil 60. Meme tümörünün örneklerinde, E-cadherin protein ekspresyonun düzeyi ve tümörün derecesi (grade) arasında ilişki .....	142
Şekil 61. GSTP1 proteini için western blotlamada, GSTP1 ve beta aktin proteinlerinin bantlarının görüntüsünden örnekler.....	146
Şekil 62. Meme tümöründe, normal ve meme örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyinin kıyaslanması .....	146
Şekil 63. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme durumu arasındaki ilişki.....	147
Şekil 64. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme durumu arasında ilişki.....	148
Şekil 65. Meme tümör ve normal örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme durumunun kıyaslaması.....	148
Şekil 66. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme paterninin sıklığı.....	149
Şekil 67. Meme normal örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme paterninin sıklığı.....	150
Şekil 68. Memetümöründe normal ve tümör örneklerinde, GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyinin kıyaslaması .....	150
Şekil 69. Meme normal dokuları ve tümör dokuların E-cadherin proteinin dansitelerinin kıyaslanması.....	151
Şekil 70. Meme normal dokuları ve tümör dokuların GSTP1 proteinin üç sınıfta konsantrasyonlarının sıklığının kıyaslanması.....	151
Şekil 71. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile tümörün evresinin arasındaki ilişki.....	152
Şekil 72. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyonunun düzeyi ile tümörün derecesi (grade) arasındaki ilişki .....	153

## KISALTMALAR

**AJCC:** American Joint Committee on Cancer

**APC:** Adenomaous Ployposis koli (Adenomaous Ployposis Coli)

**BAC:**Bakteriel yapay kromozom (Bacterial artificial chromosome)

**BCIP:** 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Fosfat (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate)

**BRCA1:** Meme ve overe yatkınlık proteini(Breast and Ovarian cancer Susceptibility Protein 1)

**BSA:** Sığır seromunun albomini ( Bovine Serum Albumine)

**BSP:** Bisülfite Özel PCR(Bisulfite Specific PCR)

**CDH1:** Kadherin 1(Cadherin 1)

**CpG:** Citozin guaninden önce(Cytosine precede Guanine)

**DNMT:** DNA-metil transferaz(DNA-Metyltransferase)

**ECM:** Hücre Dışı Matris(Extra Cellular Matrix)

**EDTA:** Ethylenediaminetetraasetik Asit (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

**ELISA:** Enzime bağlı imünsorbent ölçücü(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

**ER:** Östrojen reseptörü (Estrogen Receptor)

**ErbB2:** Avian Erythroblastosis Onkogen B 2(Avian Erythroblastosis oncogene B 2)

**GSTP1:** Glutation-S-transferaz(Glutathion-S-Transferase)

**HDAC:** Histon deasetilaz(Histone Deacetylase)

**HPCE:** Yüksek performans Kapiler Kromatogarfi(High Performance Capillary Chromatography)

**HPLC:** Yüksek Basıncılı Sıvı Faz Kromatografisi(High Pressure Liquid Chromatography)

**JNK1:** MAPK ailesinden bir protein kinaz (C- Jun N-terminal kinases)

**LOH:** Heterozigotluk Kaybı(Loss Of Heterozigosity)

**MCF-7:** İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı (human Breast adenocarcinoma Cell Line)

**MeCP2:** Metil CpG'e Bağlanan Protein 2(Methyl CpG Binding Protein 2)

**MLH1:** MutL Homolog 1

**MSP:** Metillenmeye Özel PCR(Methylation Specific PCR)

**NBT:** Nitroblu tetrazolyum(Nitroblue Tetrazolium)

**NFMP:** Yağsız süt tozu (Non Fat Milk Powder)

**OD:** Optik Dansite (Optical density)

**PACS:** Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Polyacrylamide Gel elektroforesis)

**PCNA:** Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (Proliferating Cell Nuclear Antigen)  
**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)  
**P21:** CDKN1A (Sikline Bağlı Kinaz İnhibitörü 1A)(Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1A)  
**P53:** Isı Şok Proteini geni 53 (Heat Shock Protein 53 Gene)  
**PVDF:** Polivinilidenflorid (Polyvinilidene fluoride)  
**QAMA:** Metillenmiş allel kantitatif analizi (Quantitative analysis of Methylated Allels)  
**SDS:** Sodyum Dodesil Sülfat(Sodium Dodecyl sulfate)  
**TEMED:** Tetramethylethylenediamine  
**TIMP3:** Doku İnhibitörü Metaloproteinaz 3(Tissue Inhibitor of Metaloproteinase-3)  
**TNM:** Tumor (Tümörün boyutu), Node(uzakda Lemfatik metastaz), M(metastaz)  
(T: extent of tumor, N:extent of spread to the lymph node, M:metastasis)  
**VHL:** Von Hippel Linadau hastalığı  
**Yac:** Yapay Maya Kromozomu (Yeast Artificial Chromosome)  
**W.B:** Western Blotlama (Western Blotting)  
**5-aza:** 5-aza-deoksisitidin (5-aza-deoxy cytidine)

## TEŞEKKÜR

“Yaşam birbirine bağlanmış yüreklerin sıcağıdır  
Dust olmasa tüm kapılar kapalıdır....” 2001-Fereydun Moşiri

Benim doktora tezimi başlangıcından sonuna kadar, ders dışı, aldığım hayat dersleri, tecrübeler ve düz insanlık, aldığım saf samimi yardımlar, anlayışlar ve bütün zorluklarda her zaman inanılmaz tarafsız destek için Prof. Dr.Meral Sakızlı'ya bütün kalbimle minnettarlığımı bildiriyorum. Prof. Dr.Neşe Atabey'e harika bilgi besleme yolunu gösterdiği için, sabırlı ve bilim bakışı ile her şeye bakmayı öğrettiği için, Prof. Dr.Mojtaba Mohaddes'e anlayışlı destek ve yardımları için, Dr.Vahid Montazeri, Duygu Aybay, Nevin Çelik Bayrakçı, Prof. Dr.Safar Farajnia, Prof. Dr.Vahid Khalaj, Öğrenci işleri personeli ve Bahriye Demirel'e de maddi ve manevi destekleri için teşekkürü bir borç biliyorum.

## ÖZET

### Doktora Tezi

#### **Meme Kanserlerinde Epigenetik Değişim Gösteren Genlerde Metilasyon Paternlerinin Bisülfid Sekanslama Yöntemiyle Belirlenmesi**

(Shohreh Alizadehshargh)

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü

Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doktora Programı

Meme kanseri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, en sık görülen kanser tipidir.

Bu çalışmanın amacı; meme karsinogenezinde önemli rollerinin olduğu gösterilmiş olan, GSTP1 ve E-cadherin genlerin ekspresyon düzenleyici bölgelerinde bulunan CpG adalarının metillenme profillerinin, tümörlerin özellikleri ile ilişkilendirilmesidir.

Hipotezimiz; GSTP1 ve E-cadherin genlerinin ifadenmesinde DNA metillenmesinin değişebileceği ve bu farklılıkların meme kanserinin özelliklerini etkileyebileceğidir.

Çalışmaya, Meme kanseri tanısı almış 50 tümör örneği ile, aynı hastalara ait 50 adet çevre normal doku örneği, rastgele örnekleme yöntemiyle alınmıştır (patoloji Anabilim Dalı, Türkiye'nin 9 Eylül Üniversitesi Hastanesinin arşivinde tarama ile). DNA izolasyonundan sonra, sodyum bisülfid sekanslama yöntemiyle GSTP1 ve E-cadherin promotöründe CpG adacıkları belirlenerek, tümörün derecesi ve diğer kanser parametreleriyle ilişkileri 'x<sup>2</sup> korelasyon' analizleri ile yorumlanmıştır.

Bu çalışmada meme kanserinde E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme sıklığı %94 ve GSTP1 geninin promotöründe % 41.3 bulundu.

E-cadherin geni için tümör örneklerinin, % 44.0'ü (50 örnekten, 22'si), tam metillenmiş, % 50'si kısmen (50 örnekten, 25'i) ve % 6.0'ı (50 örnekten, 3'tanesi) metillenmemiştir.

Metillenme olayı tümör ve normal örneklerin arasında, anlamlı şekilde farklı gözlenmiştir. Tam

olarak meme kanser dokuların % 94'ünde metillenme gözlenmiştir. Ayrıca normal meme dokuların % 76'sı (50 örnekten, 38'i) metillenmemiştir.

GSTP1 geni için tümör örneklerinde % 28.3'ü (13 örnek 46 örnekten) tam metillenmiş, % 13'ü (6 örnek 46 örnekten) kısmen ve % 58.7'i (27 örnek 46 örnekten) metillenmemiştir. Ayrıca normal meme dokularında genellikle örneklerin % 87.2'i metillenmemiştir ve % 12.8'inde kısmen metillenme gözlenmiştir. Metillenme olayı tümör ve normal meme dokuların arasında anlamlı derecede farklıdır ( $p= 0.000$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Epigenetik değişim, meme kanseri, GSTP1, E-cadherin.

## **ABSTRACT**

### **Doctoral Thesis**

#### **Investigation of Methylation Patterns in Epigenetically Effected Genes in Breast Cancers**

by

#### **Bisulfate Sequencing Method**

**(Shohreh Alizadeh Shargh)**

Dokuz Eylül University

Institute of Health Sciences

Department of Medical Biology & Genetics

Doctoral Program

The purpose of this study was determining the role of GSTP1 and E-cadherin genes in breast tumorigenesis that their importance in breast cancer is established. Also it was shown that E-cadherin and GSTP1 genes are methylated then the methylation relationship with tumor's features is evaluated. The hypothesis of the study is that GSTP1 and E-cadherin genes methylation is related to tumor's features . 50 established breast cancer samples and 50 of their adjacent normal samples were obtained with random sampling method from pathology department archive of 9 eylul university of Turkey . After isolation of DNA, sodium bisulfite sequencing was performed in promoter regions and the comparison between tumor and normal samples was made, the relationship with tumor's grade, stage ,... is analyzed by  $x^2$  correlation and regression programs.

In E-cadherin gene, for tumor samples of 44% ( 22 in 50) were full metyhlated, 50% partial ( 25 in 50) and 6.0% (3 in 50) were non- methylated. The methylation status shows meaningful differentiation between tumor and normal samples. Generally , 94% of tumor samples were full methylated and of normal samples 76% ( 38 in 50) were non-methylated.

In GSTP1 gene, for tumor samples of 28.8% (13 in 50) were full methylated, 13% (6 in 46) partial and 58.7% ( 27 in 50 ) were non-methylated. In general, from normal samples there were 87.2% non-methylated and partial methylation has seen in 12.8% of samples. There is meaningful difference in methylation status between tumor and normal samples ( $p=0.000$ ).

**Key words:** Epigenetic changes, Methylation, breast cancer, GSTP1, E-cadherin.



## **1-GİRİŞ**

Bu araştırmanın amacı; GSTP ve E-cadherin genlerinin promotör bölgelerinde CpG adacıklarının metilasyon paterninin incelemesi, tümör ve normal dokularda önemli farklılığın belirlenmesi ve ayrıca metilasyon değişiminin protein ürünü olarak gen ekspresyonunda etkisi olup olmadığının araştırılmasıdır. Ayrıca bu çalışmada epigenetik değişimler ve tümörün derece ve evresiyle ilişkisi incelenmiştir. Metilasyon profili bisülfid sekanslama yöntemiyle araştırılmıştır. Metillenmemiş sitozinlerin timine dönüşümü sonucu oluşan sekans farklılıkları tümör dokusu ile yakın normal doku arasında karşılaştırılmıştır. Bu değişimlerin hastalığın derece ve evresi ile ilişkisi olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Tümör baskılayıcı genler olarak tanımlanan, DNA tamiri, hücre döngüsü ve büyümeyi düzenleyici görevleri olan genler hücrenin normal halinde eksprese olurlar. Kanserli hücrede ise, ya herhangi bir mutasyon sonucu genetik olarak, ya da, promotör bölgelerinde metilasyon sonucu epigenetik olarak ekspresyonları tamamen durur veya tümörün derecesine bağlı olarak düzeyi değişir.

DNA metilasyonu birçok hücresel işlevlerde rol oynar. Örneğin gen damgalaması<sup>2</sup> (Ripoche, Kress, Poirier, 2009: 1596), X kromozomun inaktivasyonu (Luikenhuis, Wutz, Jaenisch, 2001:8512-8520,Wutz,Gribnau,2007:387), normal embriyonal gelişim (Fulka, Mrazek,tepla, Fulka, 2004: 703), hücre farklılaşması (Isagawa et al, 2011: e26052) ve yabancı DNA dizilerinin sessizleştirilmesi (Liang, Chan,Tomgahara,Tsai, 2002:480) gibi.

Gen düzenleyeci bölgedeki CpG adacıklarının metillenmesi hedef gende transkripsiyonu engeller, daha sonra 5-metil sitozinin (5meC) deaminasyon sonucu timine dönüşmesine ve replikasyon sonrasında da transisyon mutasyonlarına yol açar (Robertson, Jones, 2000: 461). Kontrol dışı hipometilasyon ise gereksiz gen ekspresyonu nedeni olabilir (Sato et al, 2003: 4158). Uygun olmayan hipermetilasyon ve düzensiz gen ekspresyonu arasında bir ilişki bulunması olasıdır (Ho, Beaver, Williams, Dashwood, 2011: 497).

Deneyisel kanıtların çoğunluğunda CpG adacıklarının metillenmesi ile genin transkripsiyonel sessizleştirilmesi arasında bir ilişki saptanmıştır fakat sadece son senelerde bu transkripsiyonel sessizleştirmede sorumlu mekanizmalar belirlenmiştir (Bird, 2002:6).

Gelişimin ilker dönmelerinde hücre ve dokuya özgü metilasyon paterni belirlenir. Bu süreçte, farede Dnmt3a ve 3b'nin metilasyonda önemi vurgulanmıştır (Webster, Bryan, Fletcher, 2004:4068).

Embrioblastın farklılaşması<sup>1</sup> sırasında dokuya özgü biçimlenmede, dokuya ait genler demetile olur, buna karşın 'housekeepig' genler dölllenme zamanından tüm organogenez zamanına kadar demetile halinde kalmaya devam eder (Ponger, Duret, Mouchiroud, 2011: 1854). Genelde olgun normal bireylerin dokularında, dokuya özgü aktif genlerin CpG adacıkları metillenmemiş halde bulunur. Bunun istisnası transkripsiyonel olarak sessizlenmiş parazitik sekanslar ve damgalanmış genlerdir (örn; H19) (Lewis, Mitsuya, Contancia, Reik, 2004:5650). Neoplastik dokuların bir çoğunda genomun bütünlüğünde hipometilasyon ve özellikle çok önemli ve kritik tümör baskılayıcı ve büyümeyi düzenleyen genlerin promotörlerinde bölgesel hipermetilasyon görülmektedir (Wajed, Laire, Meester, 2001: 10). DNA metilasyonu çok farklı yollardan kanserin özelliklerinden biri olan genetik instabiliteye de yol açabilir.

Metil sitozinin (5meC) timine dönüşü tümör baskılayıcı P53 geninde daha önce tanımlanmıştır (Schmutte et al, 1997: 3010). Kritik genlerin promotör metillenmesi aracılığıyla sessizleştirilmesinin genetik instabiliteye yol açmasına neden olabilir (Gerco et al, 2010: 181). DNA tamirinde görevli olan BRCA1 buna iyi bir örnektir ve promotöründe oluşan metilasyon meme kanserine yol açabilir (Matros et al, 2005: 179). CpG adacıklarının metillenmesi sonucunda glutathion-s-transferaz sınıf  $\pi$  geninin (GST) inaktif olması detoksifikasyon işleminin durmasına ve oksijen radikallerinin birikmesi ile DNA hasarına neden olur (Jeronimo et al, 2002: 445). Promotör bölgelerdeki hipermetilasyon dışında genom boyu hipometilasyonun da genetik instabiliteden sorumlu olabileceği belirlenmiştir (Geiman, Sankpal, Robertson, 2004: 2716).

Normal hücreler DNA'nın metilasyonu ile geçici olarak kendi genlerinin ekspresyonunu değiştirirler. Tümör hücrelerinde ise, genellikle, bu normal metilasyon paterninin korunmadığı gözlenmektedir. Örneğin, metastatik fenotipte dinamik instabilite metilasyon paterninin dönüşümünü ortaya çıkartır. Bu da metastatik ilerlemeyi tetikler. E-cadherin buna iyi bir örnek sayılabilir. E-cadherin hücrenin adezyon homotipik mülkülü olduğundan, ekspresyonunun azalması sonucunda metastatik ve invaziv olasılık artmaktadır, ancak aynı zamanda uzak ve metastaz yapılan dokularda tümör hücrelerin kalıcılığı ve büyümeleri için hücre bağlantısı

---

1. Differentiation

yeniden kurulmalıdır.<sup>1</sup> Bu durumda metillenme olayı dinamik ve dönüşümlüdür (Graff et al, 2000: 2727).

Gen ekspresyonunda epigenetik değişimler çevre değişimlerine karşı yanıt vermek için kanser hücrelerine özel güç sağlar. CpG bölgelerindeki metillenmenin tümör oluşumunda mutasyon yatkınlığının artışına yol açtığı da söylenebilir.

Metillenmiş 5´CpG adacıkları, meme kanserlerinin bir kısmında transkripsiyonel sessizleştirilen genlerin tanımlanması için yeni bir epigenetik belirteç olabilir (Lombaerts et al,2006:661, Maruya et al, 2004:637). Epigenetik belirteçler hastalığın erken tanısı, tanımlanması ve prognozunda kullanılabilir. Amaca ulaşmak için çeşitli yöntemler bulunmaktadır ve bu araştırmada bu yöntemlerden biri olan bisüfit sekanslama kullanılmıştır. Bu yöntemler, çok küçük bir doku ile yapılabilir ve çeşitli örnek türleri kullanılabilir örn; meme ucu aspirasyonu, ince iğne biopsisi, mikrodiseksiyonla alınmış premalignan lezyonlar, *in situ* duktal karsinom gibi ve patolojik olarak sentinel lenfatik nodüllerden örnek alınabilir (Wang ve Srivastava, 2010: 16).

DNA metilasyonu ve onunla birlikte görülebilen kondanse kromozom konformasyonu, kanser tedavisinde yeni hedef sayılabilir (Gonzalez et al, 2005:38). Şimdiye kadar meme kanseri ile ilgili olan genlerin metilasyon durumunu belirlemek için bir çok çalışma yapılmıştır.

Çalışmamızda, meme kanserinde farklı işlevi olan iki gen seçilmiştir ve bunların genel ve dokuya özel metilasyon durumları araştırılmıştır. Daha önce yayınlanmış araştırmalarda meme kanserinde metilasyon paterni bu kapsamda araştırılmamıştır ve özellikle kanser evresi ve derecesiyle değerlendirilmemiştir. Aslında DNA metilasyon ve histon deasetilasyon inhibitörleri yeni kemoterapi ajanları olarak göz önüne alınmış ve kanser tedavisindeki olası yararlarının belirlenmesi için bir çok çalışma yapılmıştır (Candelaria et al, 2007:1529). Sonuç olarak epigenetiğin mekanizmasına yönelik temel çalışmaların yapılması, gelecekte kansere özgü sessizleştirilmiş tümör baskılayıcı genleri yeniden aktive edebilecek, gene özgü ajanların keşfedilmesine yol açacaktır .

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Genlerin metillenmesi**

Omurgalıların DNA'sında metillenme CpG dinükleotid tekrar bölgelerindeki sitozin (C) lerde meydana gelir (Fang, 2006:22049). Bu gibi epigenetik modifikasyonlar genetik değişimlerin aksine potansiyel olarak geri dönüşümlüdür (Baylin et al, 2002:299). Metil sitozin tüm bazların % 0,4-0,8 'ini kapsamaktadır ve CG içereğinin yüzdesi % 35-50'dir. CpG dinükleotidlerin oranı % 0,5-1,5'dir ve bunların çoğunluğu DNA'nın kodlamayan bölgesinde metillenmiş şekilde bulunmaktadır (Fryxell and Moon,2004: 650).

Yeni sentezlenen DNA'da sitozinler DNA-sitozin-metiltransferaz (DNMT) enzimi tarafından metillenir . Bu enzim, metil grubunu metil vericisi olan S-adenozil-metioninden alıp ve DNA'ya transfer eder. Bu işlem bir kalıp DNA yardımıyla yapılır ve amacı, yavru hücrelere benzer şekilde aktarılmasıdır (Lee, Shim, Zhu, 2005: 1018). CpG dinükleotidler genom boyunca rastgele dağılmış kümeler<sup>1</sup> halinde, CpG adacıkları şeklinde bulunurlar. CpG adacıklarının %1-2'si metillenmiştir ve genlerin yukarısında ve promotörlerindedir (Hisano, Ohta, Nishimune, Nozaki, 2003: 4797).

### **2.2. CpG adacıklarında metilasyon oluşumu**

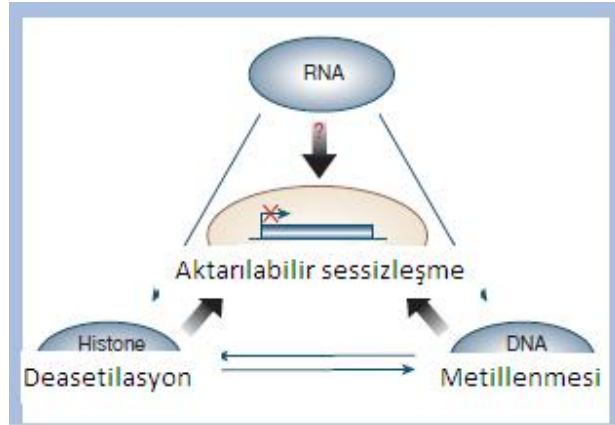
Epigenetik, nükleer kalıtılabilen bir özelliktir, ancak bu kalıtım DNA dizisinde farklılık değil, DNA'nın yapısında oluşan sekonder değişikliklerden kaynaklanır. Mekanizma, histon modifikasyonları ve DNA'nın metillenmesini içerir (Gutierrez, Callejas, Borniquel, 2000:139 and Kondo, 2009: 455). CpG dinükleotidlerin yapısındaki sitozinlerin enzimatik metillenmesi, genin sessizleşmesine neden olabilir. Memelilerin genomunda CpG dizisileri kısmen düzensiz biçimde dağılmıştır ve bunların çoğunluğu metillenmiştir. Aksine, genlerin promotör bölgesinde CpG adacıkları olarak adlandırılan bölgeler metillenmemiş şekilde bulunur (Goodman et al, 2004: 2504).

### **2.3. DNA metillenmesi ve gen ekspresyonu**

Metillenme mekanizması memelilerde genleri, yer değiştiren elemanlara karşı koruyan bir sistem olarak gelişmiştir (Sharif, Endo, Toyoda, Koseki, 2010:545). Sitozinlerin 5. karbondan metillenmesi mutasyonu artırıcı bir faktördür ve C:G baz çiftinin T:A'ya tranzisyonuna neden

olur ve böylece DNA'da metil-akseptör bölgenin kaybolmasına yol açar. İnsan DNA'sında bulunan CG tekrarlarının % 50'si 500bp'lik CpG adacıklarından oluşur (Evrim sürecinde bu bölgeler korunmuştur ve evrimin başlangıcında metillenmemiş halde buldukları belirlenmiştir). DNA'da bu tekrarların % 40'ı memeli genlerinin promotör bölgelerinde yerleşmiştir (Egger, Liang, Apqricio, 2004:457).

Antisens RNA transkripti, kodlamayan RNA (örn; Xist gibi) veya interferans RNA'lar (RNAi) DNA metilasyonunu tetikleyerek, DNA'da metilasyon pateminin korunmasını ve bir 'epigenetik imzası' oluşumu, kalıtılabilir biçime dönüşerek kalıcı gen sessizleşmesini sağlar (Shi ve Wu, 2009: 59) (Şekil 1).



Şekil 1. DNA metillenmesi ve histon modifikasyonunun gen ekspresyonunda etkisi (Egger et al, 2004;457)

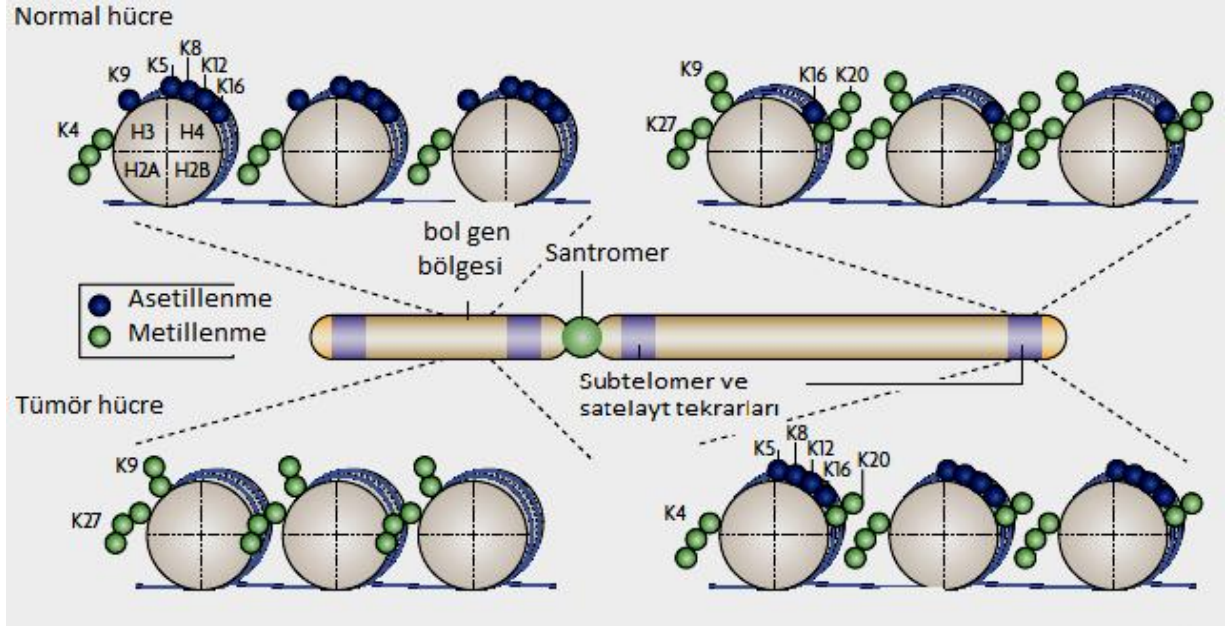
Normal olgun hücrelerde aktif genlerin önünde bulunan CpG adacıklarındaki sitozinler genelde metillenmemiştir buna karşın, transkripsiyonel olarak aktif olmayan X kromozomu üzerindeki bazı genler ve diğer kapalı genler metillenerek kapatılmıştır (genomik imprintlenen genler gibi) (Paulsen ve Ferguson-Smith, 2001:97).

CpG adacıklarının metillenme paterni kromatin yapısı ve genin transkripsiyonunun düzenlenmesinde önemli ölçüttür (Cervoni, Szyf, 2001:40778). Metilasyonun dansitesinin belirlenmesi için, *in vitro* koşullarda epizomal plazmidlerin farklı bölgelerinden metillenerek çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar, CpG adacıklarının gen spesifik metillenmesinin genin aktivitesi ile ters ilişkili olduğunu göstermiştir, bu durum metile DNA dizisinin

transkripsiyon başlangıç noktasına olan uzaklığından bağımsızdır. (Chen, Mann, Hsieh, 2005:902).

Bir DNA metiltransferaz inhibitörü olan 5-aza-2'-deoksisitidin DNA'nın metilasyonunu durdurur ve genin 5' dizisinin demetilasyonuna neden olarak, gen ekspresyonunu aktive edebilir (Michalowsky ve Jones, 1989: 189) . Bu madde bir nükleotid analogudur ve DNA yapısına katılır ancak sitozinin tersine DNA metiltransferaz (DNMT) ile kovalent bağlantı yaparak enzimi inaktive edip, DNA'nın demetilasyonuna neden olur (Patel et al, 2010: 4313).

Metilasyona bağımlı gen sessizleşmesi kromatinin, promotöre ulaşımı kısıtlayan lokal konformasyonel değişimi ile meydana gelir (Gheldof, Tabuchi, Dekker, 2006: 12463). Metillenmiş DNA en azından bir, metile sitozine bağlanan protein (MeCP2) ile birlikte bulunur. Bu protein transkripsiyon baskılayıcı multi-protein kompleksinin oluşumunu tetikler. Me CP2'de bir represör etki bölgesi içerir ve aynı zamanda mSin3A korepresörüne bağlanarak, histon-deasetilaz (HDAC1, 2) gibi birçok proteinin komplekse yapışmasını sağlar (Kimura ve Shiota, 2003: 4806) (Şekil 2).



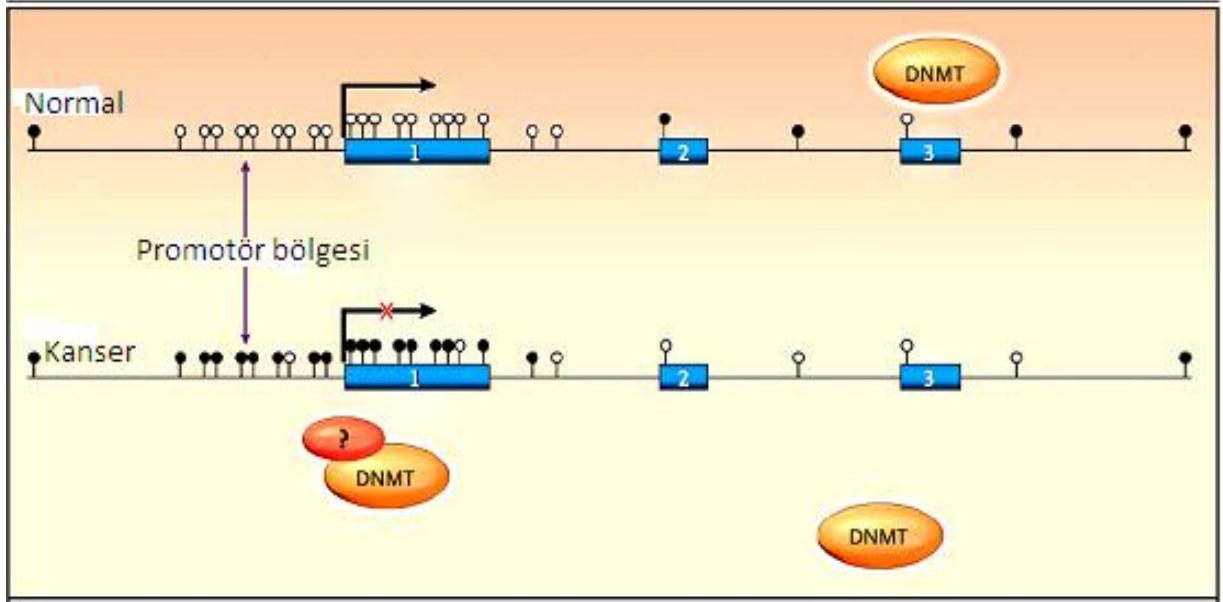
Şekil 2. Normal ve tümör hücrelerinde epigenetik değişimlerin şematik görüntüsü (Esteller, 2007; doi:10.1038/nrg)

Şekil 1’de nükleozomların üzerinde histon asetillenme ve metillenmesi görülmektedir. Normal hücrelerde, tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgesinde, histon asetillenmesi yaygındır ve transkripsiyonel aktivite sağlar ( H3,H4, K5, K8, K9, K12, K16 asetillenmiş). Tümör hücrelerde ise, subtellomer bölgelerde histonlar metillenerek DNA’yı kapatmıştır ( K27, K20 metillenmiştir) (Esteller, 2007; doi:10.1038/nrg).

#### 2.4. Normal ve kanser hücrelerinde epigenetik belirteçler

DNA metillenmesi ve histon modifikasyonu, gen aktivitesinde ve çekirdeğin yapısında çok önemli rol oynamaktadır. İnsanda en çok araştırılmış olan epigenetik modifikasyon DNA’daki CpG dinükleotidlerinde yerleşik sitozinin metillenmesidir.

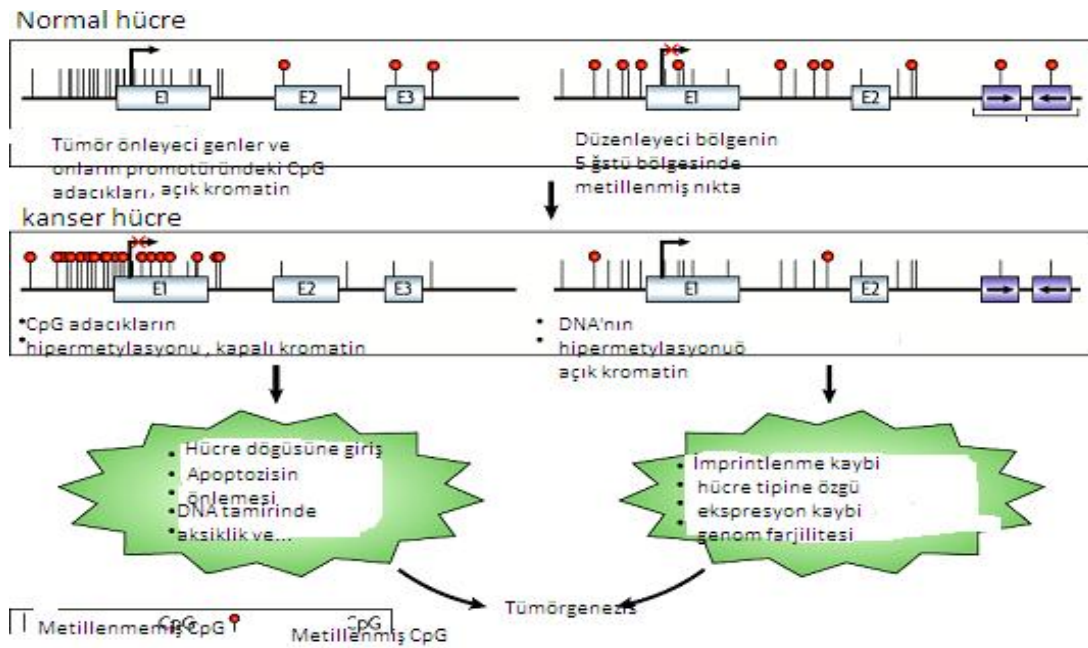
Kanser oluşumunda hem DNA’nın metillenmesi ve hem histon deasetillenmesi birlikte önem taşımaktadır ancak metillenmenin rolü daha güçlüdür (Herman, Baylin, 2003:2042 ). Metilasyon potansiyelini taşıyan ‘methylable’ CpG dinükleotitleri rastgele olarak genomda dağılmamıştır ve tam tersine, genlerin 5’ucunun transle olmayan kısmında ve 1.ekson civarında en sık bulunur ve aktif gen bölgelerinde genelde metile değildir. Metillenmemiş CpG adacıklamı taşıyan genlerin ekspresyona açık genler oldukları ve transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasıyla aktifleştikleri bilinmektedir (Asselah et al, 2008: doi.10.1136.gut.2008.166348).



Şekil 3. İnsan genomunda CpG dinükleotidlerin dağılımı ile, normal ve tümör hücrelerinde metillenme paterninin farklılığı (açık yuvarlaklar metillenmemiş ve koyular metillenmiş sitozini göstermektedir) (Herman, Baylin, 2003:2042).

Kanserli hücrelerde tümör baskılayıcı genlerin promotör CpG adacıklarındaki hipermetilasyonu ile meydana gelen transkripsiyonel sessizleşmesi tümörögenizde çok önemli anahtar bir işlemdir ve bu genlerin kanserli hücrelerde inaktivasyonunda tipik ‘hall mark’ olarak tanımlanmıştır (Esteller, 2007: R50).

Diğer yandan, tekrarlanan genomik diziler çok yoğun biçimde metillenmiştir. Metillenmiş bölgeler sessizleşmiş ve metillenmemiş bölgeler aktif halinde bulunur bu metillenme olayı özel koşullarda, hücrede genin aktif olup olmamasını belirlemektedir (Rodenhiser, Mann, 2006: 341). Bu metillenmenin ‘endoparazitik’ dizilere karşı kromozomun bütünlüğünün korunması, kromozom instabilitesi, translokasyonu ve parçalanmasının önlenmesi için önemli olduğu düşünülmektedir (Mohtat ve Susztak, 2010: 468) (Şekil 3).



Şekil 4. Tümörögenizde DNA metillenme paterninin değışimi ( Esteller, 2007: doi:10.1038/nrg)

DNA metillenmesi aynı zamanda germ haddi ve doku-spesifik genler için epigenetik kontrol sağlar (Sinkovics, Horvath, 2006:765). Genomik imprintlemede, genin bir veya her iki allelinde hipermetilasyonu mono allelic-ekspresyona neden olur (Hanahan, Weinberg, 2000:57 ). Benzer şekilde, gen-doajının ayarlanmasında, dişi bireylerde X kromozomunun inaktive edilmesinde bu mekanizma çalışmaktadır (Yasukochi et al, 2010: 3704). İyi tanımlanmış ‘imprintleme kaybı’



(LOH) bu mekanizmalarından biridir (Brown, 1996: 480). DNA metilasyonu, diğer epigenetik mekanizmalar gibi, metile CpG'ye bağlanan proteinleri ve DNA metiltransferazları, histon deasetilaz ve histon metiltransferazları çeker (Fuks et al, 2003: 4035).

## **2.5. DNA'nın metillenmesi ve insanda kanser oluşumu**

Hücrede epigenetik değişimler gen ekspresyonunun değişmesine neden olur ve anormal epigenetik değişim kanser gibi, çeşitli hastalıklara neden olabilir. Karsinogenez süreci, karmaşık ve çok basamaklı bir süreçtir (Nishimura, Saito, Yamasaki, 2003: 1615)(Şekil 4).

Normal hücrelerin tümöre transformasyonunda ve invaziv ve metastatik sürece ilerlemesinde çeşitli, klasik genetik değişimler rol almaktadır. Örneğin; tümör baskılayıcı genlerin delesyon ve diğer mutasyonlar ile kaybı veya dominant etkili onkogenlerin kesintisiz aktivasyonu veya amplifikasyonu meydana gelir (Polsky, 2003: 3087). Yakın zamanlarda yapılmış araştırmalardan anlaşıldığı gibi, epigenetik değişimler, özellikle tümör baskılayıcı genlerin DNA metillenme aracılığıyla sessizleşmesi, kanserin başlangıç ve ilerlemesinde çok kritik önem taşımaktadır (Zhao, Soejima, Higashimoto, 2005:137).

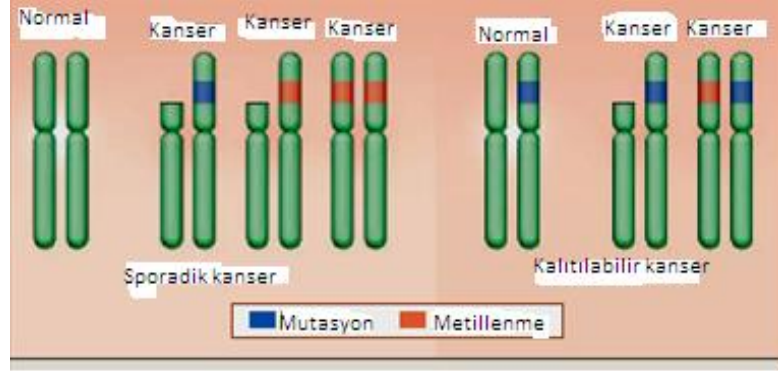
Kanserli hücrelerde, Rb, VHL, APC ve MLH1 gibi bir çok tümör baskılayıcı genin *de novo* metillendiği gösterilmiştir (Pfeifer, 2009: 181).

Metillenmenin kanserin başlangıcında mı, sonunda tamamlayıcı olarak mı rol oynadığı tam anlaşılmamıştır.

Kanserde hipermetilasyon mekanizması da tam çözümlenmemiştir. Normal hücrede birçok 'cis' ve 'trans' faktör DNA'nın özel bölgelerinde metillenme paterninin oluşumunu kontrol eder. (Riddle ve Richards, 2002: 355). Sonuç olarak, kanser hücrelerinde bu faktörlerin değişimi anormal metillenmenin oluşumuna neden olabilir. Yaygın bir hipoteze göre, DNA metiltransferaz (DNMT1)'lerin aşırı ekspresyonu, tümörögenез sürecindeki *de novo* metillenmede önem taşımaktadır (Robertson et al, 1999: 2291) . Kanserli hücrelerin büyük bir çoğunluğunda DNMT'lerin yüksek miktarda eksprese edildikleri ve bunun kolon ve akciğer kanserlerinin ilerlemesinde önemli olduğu saptanmıştır (Mizuno et al, 2001: 1172). Ayrıca, DNMT'in fibroblastlarda *in vitro* aşırı ekspresyonu, DNA'nın hipermetilasyonuna ve hücrelerin transformasyonuna neden olduğu görülmüştür (Biniszkiwicz et al, 2002: 2124). Adenomatöz polipozisde, nakavt fare modelinde DNMT1'in ekspresyonunun azalması ya da, DNMT1 inhibitörü kullanması sonucu bağırsaktaki adenomaların azaldığı gösterilmiştir (Kopelovich et

al, 2003: 1747). Benzer şekilde, *in vitro* adrenokortikal fare tümör hücre hattında DNMT1'in antisens ekspresyon vektörü ile transfekte edilmesi DNA'nın genel hipometilasyonu ve tümörün büyümesinin önlenmesini sağlamıştır (Ye et al, 2011: 1519). Sonraki araştırmalara göre antisens oligonükleotitler fare model sisteminde stabil tümörlerin büyümesini önlemiştir (Campbell ve Szyf, 2003:17).

Kanserin metillenme paterninin değişmesinde dengesiz ve yükselmiş DNMT1 aktivitesinden sorumlu mekanizmalar sayılabilir ve bir araştırmaya göre, kolon kanserinde DNMT1'in ekspresyonu bazı kanser hücrelerde yüksek, diğer kısmında azalmı olarak saptanmıştır (Marzo et al, 1999; 3855). Bu gibi bulgular DNMT1'in ekspresyon ve aktivitesinin hücre döngüsüne bağlı olması nedeniyle çok da şaşırtıcı değildir. Mitojen indüklemesi ile *in-vivo* DNMT1 aktivite artışı, zamana bağlı olarak izlenmiş ve S-fazına giriş ile arttığı belirlenmiştir (Szyf, 2001: d599). Normal fibroblastlarda DNMT1 enzimin aktivitesinin ve mRNA miktarının hücre döngüsünün S-fazında artması, yeni sentezlenen DNA'nın metillenmesi ile koreledir ve muhtemelen DNMT1'in PCNA (çoğalan hücre çekirdek antijeni)'ya bağlanması ile ilişkilidir (Zardo et al, 2002: doi/10.1096). Hücre döngüsü inhibitörü P21, DNMT1'in PCNA'ya bağlanmasını yarışmalı olarak bozar ve iki proteinin de aktivitesini engeller (Araujo, Knox, Szyf,1998:3475). P21 ekspresyonunun kanserli hücrelerde çoğunlukla azaldığı ve DNMT1 ve P21 proteinlerinin miktarının fibroblastların transformasyonunda zıt orantılı etki gösterdikleri belirlenmiştir (Chuang, Tan, Oh, Li, 2002:1592). Normal DNMT1/P21 orantısının bozulması, aktivitenin değişmesine ve metillenme mekanizmasına odaklanmaya sebep olup ve kanser hücresinde yoğun metillenme paternini ortaya çıkarır (Robertson , 2001: 3139). Bu hipotezi güçlendirecek yeni veriler eklenmelidir, örn; DNMT3 $\alpha$  ve  $\beta$  DNA metiltransferaz enzimlerinin farklı kanser tiplerinde dokularda artmış oldukları gözlenmiştir (Sharma et al, 2011: e1001286). İlginç şekilde bu yeni enzimlerin metillenmemiş DNA'ya afiniteleri, DNMT1'den daha güçlüdür. DNMT1 genelde hemimetile DNA'ya odaklanır (Yokochi, Robertson, 2002: 11735). Metilasyonla gen sessizleşmesi karsinogenezde Kundson'un 'çift vuruş' hipotezine bir kanıt olarak tanımlanır. 'Çift vuruş' genelde genetik nedenlerle araştırılmış, homozigot delesyon veya intragenik mutasyonlar ile heterozigosite kaybı (LOH) şeklinde izlenmiştir. Gelişmiş araştırmalarda, bazı kanser tiplerinde tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgesinin CpG adacıklarında hipermetillenme ile LOH ve tümörögenез oluşumu ispatlanmıştır (Napieralski et al, 2007: 5095) (Şekil 5).



Şekil 5. 'Çift-vuruş' hipotezine göre, tümör baskılıyıcı genlerin genetik ve epigenetik susturulma mekanizması (Herman, Baylin, 2003:2042)

Mutasyonun aksine DNA metillenme değişiminde geri dönüşme potansiyeli bulunur (Belinsky et al, 2003:7089). Yoğun DNA metillenmesi, hücrelere geçici olarak gen ekspresyonunun değişim imkanını sağlar. Sonuç olarak, metillenme paterninde özellikle kanser hücrelerinde tam olarak net bir kalıcılık bulunmamaktadır ve çevre koşullarına göre değişilebilir (Gallou ve Kabani,2005:1899). Örneğin, metastatik fenotipin dinamik instabilitesi DNA metillenmesi gibi geçici olaylardan kaynaklanıyor ve belki de bu, metastazın ilerlemesinin nedenidir. E-cadherin geni bu iddiaya iyi bir örnek. Meme kanserlerinde bu hücre homotipik adezyon molekülünün ekspresyonunda azalma görülmektedir ki, böyle bir fenotip invaziv ve metastaz potansiyelinin kazanmasına, uzak bölgelerde de tümörün yerleşerek büyümesine yardımcı olur. İkinci organın içinde hücre adezyonuna yeniden ihtiyaç duyulur. Aslında son yapılmış araştırmalara göre E-cadherin'in hem ekspresyonu ve hemde metillenme paterni dönüşümlüdür ve seçici baskı altında değişebilir (Fihlo, Franks, 2002: 187). Belki de, gen ekspresyonunda meydana gelen bu epigenetik modifikasyonlar, kanser hücrelerin çevrelerinde oluşan değişimlere yanıt vermeleri için büyük güç sağlamaktadır (Barrons ve Offenbacher, 2009: 400).

Bir başka olası, potansiyel mekanizma; metillenme değişimi sonucu sitozininin timine çevirim oranının artması ile transisyon mutasyonlarının meydana gelmesidir ( Muhan, Rao, Gagliardi, Tini, 2007: 229). Bu tür mutasyonlar 5-metilsitozinin deaminasyonu ile gerçekleşir (Lirad, 2005:65). Bu olay genin kodlayan bölgesinin 5' ucunda meydana gelir ancak genin promotöründe yerleşirse transkripsiyon dengesinde değişiklik yapabilir. Diğer nükleotidlerle kıyaslandığında 5-metilsitozinde öngörülen mutasyon hızı 10-40 kat fazladır (Jones ve Gonalgo, 1997: 2103). C'nin T'ye transisyon mutasyonu hem somatik hem de germ-hattı hücrelerinde

görülür (Xie et al, 2009: 434). Çeşitli insan kanserlerinde görülen P53, retinoblastoma ve diğer tümör baskılayıcı genler anlamlı miktarda nokta mutasyonları içermektedir (Ye et al, 2009: 1509). Aynı zamanda, kanser dokusunda mutasyonu saptanan tüm CpG'lerin normal dokuda metillenmiş halde buldukları gösterilmiştir (Esteller, Corn, 2001: 3225). Bulgulara göre, ailesel meme kanserinde BRCA1 geninin hipermetillenmesi ile birlikte heterozogotluk kaybı da gösterilmiştir (Flanagan et al, 2010: 420). Aslında genomun bisüfit sekanslamasında bu CpG'lerin normal meme dokusunun DNA'sında da metillendiği saptanmıştır ve bu şekilde metillenme, dokuya özgü şekilde meydana gelir (Fang, Fan, Zhang, Zhang, 2006:2204). Bu bulgulara göre bir çok insan kanserinde tümör baskılayıcı genlerin mutagenesisinde CpG bölgelerinde DNA'nın metillenmesi özellikle meme kanserinde BRCA1 geninde gösterilmiştir (Tan, Bianco, Dobrovic, 2002: 231).

## **2.6. Meme kanserine giriş**

Bazı doku tiplerinde onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin genetik veya epigenetik nedenlerle transformasyonu, özel kanserler için, örn: prostat ve mesane kanserinde bir marker olarak kullanılabilir (Wu et al, 2007: 4123). Ancak meme kanserinde epigenetik etki yeterince netleşmemiştir ve epigenetik değişimlerin saptaması fazla önemsenmemiştir. Bu değişimler genelde meme kanserinde yüksek oranda bulunur ve bu mekanizmalar, kanserin fenotipik ve genetik heterojenitesinin dışında kabul edilir. Meme kanserinde genetik ve epigenetik değişimlerden kanserin başlangıç ve ilerlemesini öngörmek üzere marker olarak yararlanmak mümkündür. Ayrıca, kanserin oluşum mekanizmasının belirlenmesinde de çok faydalı olabilir. Aynı zamanda, bu bilgilerden, hastalığın önlenmesi ve tedavi stratejisinin seçiminde de faydalanmak mümkündür (Lee ve Muller, 2010: a003236). Meme kanserinde, aksiller node-negatif veya ER-pozitif hastalarda, hastalığın ilerlemesi ve sistemik adjuvant tedavisine ihtiyaç olup olmadığını belirleme imkanı sağlanabilir (Tonini, Fratto, Schiavon, 2008: 773).

Tümöre özgü belirteçlerle tanı, tedavi, prognoz bilgileri edinebilmek için, metastaza özel ve çok hassas serum belirteçlerinin belirlenmesi gerekir. Tümör genetik ve epigenetik belirleyiciler bulunuyorsa, klinikte en iyi tedavi programının önerilmesine yardım edebilecektir (Osborn, Wilson, Tripathy, 2004: 361). Meme kanserinde tümör baskılayıcı genlerin 5' ucunda yerleşen CpG adacıklarının metillenmesi ve transkripsiyonel sessizleşmesinin tanımlanması mümkün olursa, yeni bir epigenetik belirteç olarak, erken tanı, teşhis ve öngöründe

kullanılabilir (Xiang et al, 2011:1). Hastaların doku örneklerinde epigenetik değişimleri, çok sayıda PCR yöntemi ile tanımlanabilir. Örneğin; metillenmeye özel PCR (methylation specific PCR), bisülfite özel PCR (BSP), birleşik bisülfite restriksiyon analizi (combined bisulfate restriction analysis) (COBRA) (Barekati, Radpouer, Kohler, Zhong, 2010: doi: 10.1155/2010/870865), ve dizinsel gen ekspresyon analizi (sequential analysis of gene expression)(SAGE), transkripsiyonel değişimlerin belirlenmesi için kullanılmıştır ve bu değişimler meme kanserinin ilerleme sürecinde oluştuğu için, tanıda çok önemli yöntemlerden sayılırlar. (Polyak, Riggers, 2001: 2948).

Meme kanserinde çeşitli genlerin DNA'sında metillenme aracılığı ile sessizleşme, olası bir mekanizma sayılabilir. Meme tümöründe ilgili genlerde, genelde DNA'larının hipometillenmeleri (özellikle onkogenlerde) ve bölgesel olarak CpG adacıklarında hipermetillenme olayı saptanmıştır (Chio, James, Link, 2009:1889). Yapılmış araştırmalara göre, bazı genlerin, 3' ucunda hipermetillenme ile genin ekspresyonu arasında bağlantı bulunmuştur ve bazen ekspresyonun artmasına yol açabileceği gösterilmiştir (Mc Cabe, Brandes, Vertino, 2009: 3927). Meme kanserinde, 'diferansiyel metilasyon hibridizasyon' gibi, DNA dizin yöntemleri kullanıldığında CpG adacıklarının hipermetillenme durumu genom boyunda belirlenmiştir (Yan, et al, 2000: 1438). Elde edilen sonuçlarda, tümör hücrelerine ait yaklaşık 30 tanımlanmamış CpG adacığı belirlenmiş ve normal hücrelerden ayırt etmek için uygun hedef sayılabileceği belirtilmiştir (Huang, Perry, Laux, 1999: 459).

Ayrıca normal epitel hücreleri, meme, kolon ve karaciğer dokularında da CpG adacıklarında metillenme saptanmış, nedeni X kromozomunun inaktivasyonu sırasında bazı genlerin metillenmesi veya genlerin damgalanması olabilir ve bu tip metillenmelerin genlerin dokuya özgü sessizleşmesine bağlı olabileceği vurgulanmıştır (Shen et al, 2007: e181). Bunun tersine meme kanserli hücre hatlarında, CpG adacıkların metillenme oranısı daha büyüktür Örn: APC, CDH1 ve CTNNB1 genlerin promotöründe, normal hücrelere göre daha yoğun metillenme gözlenmiştir (Hoque et al, 2009: 2694). Metillenme paterninin meme kanserinin alt guruplarında da değişimi saptanmıştır (Auwera et al, 2010: e12616).

PCR'a dayalı teknolojilerden biri, 'methylation sensitive restriction fingerprinting' adlandırılır ve meme tümöründe bu yöntem ile DNA'nın metillenme değişimi incelenmektedir (Huang, et al, 2009: 2694).

Meme kanserinde genlerin metillenmesini incelemek için başka bir yol olarak tümör baskılayıcı genlerin 5' ucundaki düzenleyici bölgelerinin CpG adacıklarını veya ilk ekson'larında hipermetillenme durumuna bakmadır. Bu zamana kadar tümör genezis ile ilişkide olan bir sürü tümör baskılayıcı genlerin hipermetillenmesi bulunmuştur. Bu genlerin işlevleri dört temel sınıfta yerleşmektedir: hücre siklusunu düzenleyen, sinyal iletişimi, DNA tamirine katılan, transformasyonda etkili, adezyon ve metastazda ilişkisi olan genler yerleşmiştir (Brooks, Cairns, Zeleniuch-jacquotte, 2009: 1539). (Tablo1).

Tablo 1. Tümör önleyici genlerin işlevleri üzerinden sınıflandırılması (Yang et al, 2001:115)

Gen	Fonksyon	Yüzde (%)	Kaynak
<i>p16<sup>INK4a</sup></i>	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü	15	Herman <i>et al.</i> (1995)
<i>14-3-3σ</i>	G2 kontrol noktası	91	Ferguson <i>et al.</i> (2000)
<i>ERα</i>	Esteroid reseptörü	50	Ottaviano <i>et al.</i> (1994)
<i>PR</i>	Esteroid reseptörü	40	Lapidus <i>et al.</i> (1996)
<i>RARβ2</i>	Esteroid reseptörü	25	Sirchia <i>et al.</i> (2000)
<i>BRCA1</i>	DNA hasarının tamiri	15	Dobrovic & Simpfendorfer (1997)
<i>GSTP1</i>	Karsinogenlerin detoksifiye etmesi	30	Esteller <i>et al.</i> (1998)
<i>E-cadherin</i>	Epitel hücre-hücre adezyonu	50	Graff <i>et al.</i> (1995)
<i>TIMP-3</i>	MMP'lerin inhibitörü	25	Bachman <i>et al.</i> (1999)

## 2.7. E-cadherin:tümör baskılayıcı gen

E-cadherin geni (CDH1) kromozom 16q22.1'de yerleşmiştir ve protein olarak, bir transmembran glikoprotein üretir. Bu protein hücreleri fiziksel olarak hücre dışına ve hücrelere bağlar. Ayrıca E-cadherin proteini, β-catenin ile birarada hücre zarından çekirdeğe sinyal aktarır. E-cadherin proteini normal epitel dokularda yukarı miktarda ekspresyon olur (Mareel, Leroy, 2003: 337) ve ekspresyonunun düzeyi çeşitli karsinomalarda örn: pankreas, miğde, meme, prostat, hepatosellüler karsinoma, ve mesanede azalır veya kaybolur (Berx, Roy, 2009: a003129). Bir

sürü gen meme kanseriyle ilişkide bulunmaktadır (Jong et al, 2002: 225) ve bunların bir kısmı, metillenme yoluyla sessizleşmiştir ( Tablo 2).

Tümör genezis, metastasın bir sonraki basamağıdır. Bu olayda hücrelerin arasında adezyonu kaybolur, kanserli hücreler kan damarlarına doğru çekilip ve kan dolaşımına girer ve yeni metastatik bölgede büyümek için tespit olunurlar. Metastazı önleyeci olarak üç gen katkıda bulunur: E-cadherin, doku baskılayıcı metaloproteinaz 3 geni (tissue inhibitor of metaloproteinase-3) (TIMP3) ve maspin . Bu genlerin meme kanserinde metillenmesi saptanmıştır (Debis, Welch, 2002: 441).

Buna göre E-cadherinin ekspresyonunun kaybı, meme epitel hücrelerin metastazı için önemli basamaktır. Özelleşmemiş tümör tiplerinde bu genin ekspresyonu azalır veya tamamen kaybolur ve bu olay tümörün agresivitesi ile artmaktadır (Colpaert, Vermeulen, 2003:718). E-cadherinin allelik kaybı, löbuler meme kanserinde, yaklaşık % 100'de bulunur ve ERBB2'nin over-ekspresyonunda, E-cadherinin ekspresyonu azalmaktadır (Berx, Roy, 2009: 289). Meme kanser tümörlerinin yaklaşık % 50'den fazlasında, E-cadherinin promotörü, metillenmiştir (Tryndyak, Beland, Pogribny, 2010: 2575).

E-cadherin geninin ekspresyonunun kaybı ile tümörün dağılması ve hastanın yaşamda kalma (survival) arasında ilişki bulunmaktadır (Ehdaie, Theodorescu, 2008:61). Ekspresyonun azalmasının mekanizmalarından, heterozigosite kaybı (Cheng et al, 2001: 3814), mutasyon (Fearon, 2000: 515), trans-acting yolaklar (Hajra, Ji, Fearon, 1999: 7274), kromatinin yeniden düzenlenmesi (chromatin-rearrangement) (Rodrigues, Pinto, Pereira, 2004:1535) ve promotörde CpG'nin hipermetillenmesidir ve E-cadherinin inaktif etmesinde katkıda bulunurlar (Masciari, Larsson, Senz, 2007:726). Bu araştırmanın hipotezinde, E-cadherin geninin promotörünün CpG'lerinde yoğun metillenme ve meme kanserinde E-cadherin protein ekspresyon kaybına neden olduğu farz edilmiştir.

Aslında E-cadherin aracılığı ile hücre adezyon sistemi bir invazyon baskılayıcı sistem olarak, kanser hücrelerinde çalışmaktadır, dolayısıyla, E-cadherinin ekspresyonunun kaybı, hücrelerde invaziv fenotipini kazandırır (Büyüktunçer, Arisan, Özdilli, 2003:57) ve E-cadherin ekspresyonunun kaybı invaziv özelleşmemek (dedifransiyasyon), limfo-vasküler invazyon ve limfatik nodülün metastazı, uzakta (distant) metastaz ve kısalmış süreye (disease-free) ile bağlantıdadır (Lin et al, 2010: 670). Yapılan araştırmalara göre, E-cadherinin ekspresyonu yüksek tümör derecesinde (grade), östrojen reseptörünün negatif olmasında ve metastatik meme

kanserinde çok anlamlı miktarda azalmıştır (Putti et al, 2005: 26). Ayrıca meme kanserinin ilerlemiş evresinde (stage), E-cadherinin ekspresyonunun kaybı, tümöre, invazive gücü kazandırmaktadır (Oka et al, 1993: 1696). Meme kanserinin invaziv duktal karsinoma tipinin bir kısmında, E-cadherinin ekspresyon kaybı ve karmaşık bir panelde, diğer kısmında ekspresyonunun artışı rapor olmuştur halbuki lobüler karsinomasında, E-cadherinin kaybı tümörlerin yaklaşık %100'de bulunmaktadır (Acs et al, 2001: 85). Meme tümörün tipinin devamında, inflamatory meme tümöründe , E-cadherinin yoğun ekspresyonu görünür ve bu olayın muhtemel nedeni, inflamatory meme tümörünün metastatik mahiyetinden kaynaklanabilir (Cristofanilli, Buzdar ve Hortobagyi, 2003: 141).

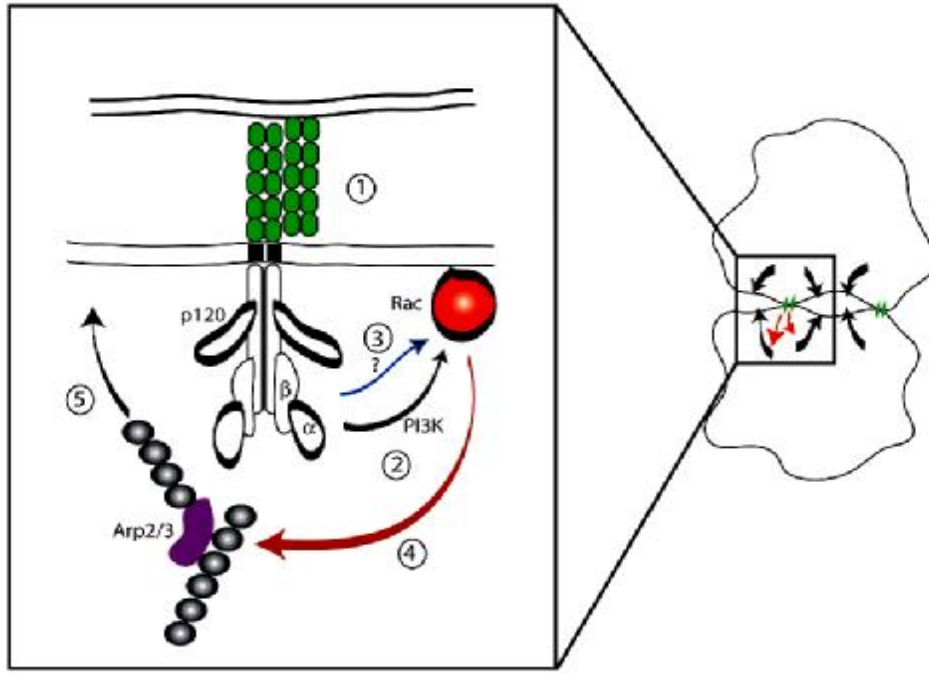
Tablo 2.İnsanın meme kanserinde metillenen genler ( Huang, Esteller, 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004515)

Fonksyon	Genler
Anjogenez	CXCR4, HIF1A, IL2, IL10, NOS3, VEGF
Apoptozis	APAF1, BAK1, BAX, BIM, BME, BCL2, BCL2L1, BCL2L2, CASP8, DR4, DR5, FADD, MCL1, SFRP1, PYCARD, TRAIL, XIAP
bağlanan proteinler	CEBPD, FABP3 (MDGI), GATA3, GNAL, HRAS, IGFBP3, IGFBP7, LDIRAP1, LRP2, PRKDCBP, SOCS1
Hücre dönüşümü kontrol edenler	CCNA1, CCNA2, CCND1, CCND2, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CTPS, DBC1, DNAC15, GADD45, EPB41L3, GREM1, IGF2, RAD9A, SFN, RNRI, SCGB3A1, TYMS
Proteaz,transkriptaz ve enzimler	KLK6, KLK10, hTERT, ABL1, AK5, AKT1, DAPK, FLT3, RAF1, TEK, PTGS2, CYP1B1, HS3ST2, HSD17B4, GSTP1, NAT1, SAT2, SULT1A1, SYK, TDH, WRN
DNA tamir/ karsinogenlerin detoksifiye edenleri	MGMT, MLH1, PRKDC, RPA2, TYMS, XRCC5, XRCC6
Enhanserler ve transkripsiyon faktörleri	HOXA2, HOXA5, HOXD11, IRF7, ID4, MYO1D1, PAX5, PAX6, POU3F1, RUNX3, SIM1, SIM2, TWIST1, WTI
Ormon reseptörleri ve kinaz	AR, CALCA, EPHA3, EPO, EGFR, ERBB2, ESR1, ESR2, GALR2, ITGB4, PGR, RARB, STK11, TGFB1, TGFB2, TNFRSF12, UPA
İmün yanıtlar	CsADMI (TSLC1), CD40, CD44, CD80, CD86, and ICAM1
İnvazyon/matataz önleyenler	COL9A1, MMP2, MMP9, MT1A, PLS3, RECK, ROBO1, S100A4, SLIT2, THBS1, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TJP2, TPM1, VCAN
transporterler, glikoproteinler ve zara bağlı proteinler	ABCBI, AMN, CDCP1, CDH1, CDH3, CDH13, CFTR, DSC3, EDNRB, GJB2, GPC3, LAMA3, LAMB3, LAMC2, MUC2, NEFL, PCDH10, RARRES1, RBP1, TMEFF2, TSPAN2, SLC5A5, and SLC6A20
Tümör baskılayıcı genler	APC, BRCA1, CAV1, CST6, DAB2, DCC, DLC1, FHIT, GSN, H19, HIC1, LATS1/LATS2, PLAGL1, PTEN, RASSF1A, RBL1, RBL1, PRDM2, SNCG, SERPINB5, TP53, TSC1, TSC2, TUSC3, VHL, WIF1
Tümör antijenleri	ABO, MAGEA1, MME

Tümörün ilerlemesinde, E-cadherinin transkripsiyonel inaktivasyonu, süreklilik göstermektedir (Onder et al, 2008: 3645). E-cadherin,  $\alpha$ - $\beta$  ve  $\gamma$  catenin ile birlikte 'adherent junction' ların temel bileşimini oluşturur (Şekil 6) bu tür ilişkilerde, hücre-hücre bağlantısının tespit etmesine yardımcı olur (Schlosshauer, Ellenson, Soslow, 2002: 1032). Ayrıca cadherin sistemi direkt olarak onkogenlerin ürünleri ile örn: c-erbB-2 proteini (Souza B,Taylor-Paradimitriou, 1994:



7202) ve epidermal hücrelerin büyüme faktörünün reseptörü ile ve adenomatoz polipoz coli (APC) adlı tümör baskılayıcı genin proteini ile iletişimde bulunur (Yates,Wells,Turner, 2005:366) ve bu işlevleri  $\beta$ -catenin aracılığı ile gerçekleştirir (Tanaka et al, 2003:557). Bu katkının sonucu uyarı iletim yollarında önemli olabilir ve buda insan kanserlerinin biolojik özelliklerini belirlemektedir (Potter, Bergwitz, Barbant, 1999: 207).



Şekil 6. Hücre-hücre sinyal sistemi ve E-cadherin yolu ile Rac yolağının tetiklenmesi (Yap et al,2002)

## 2.8. GSTP1; genetik stabilitede katkısı olan gen

GSTP1 bir otozomal gen olarak, kromozom 11q13'in üzerinde yerleşmiştir. Glutathione (GSH) ve ona bağlı sitozolik GST'ler (faz II metabolik enzimler), xenobiotik ve kemoterapotik elemanların detoksifiye etme yollarına katkıda bulunurlar (Vlaykova, Miteva, Gulubova, Stanilova,2007: 1209). GST enzimleri, hücrenin içinde, detoksifiye reaksiyonlarını kataliz edip ve bu reaksiyonlarda kimyasal olarak reaktif elektrophil'leri GSH'e konjuge ederler (Townsend, Tew, 2003: 7369). Ayrıca DNA hasarının önlenmesi bu proteinlerin glutathion-S-transferaz olarak (GST) adlandırılan sınıfının aracılığı ile gerçekleşir ve DNA onarım enzimleri ile düzenlenir

(Wang et al, 2010: 365). GST $\pi$  proteini, çevresel mutajenlerin aracılığıyla, DNA'da oluşan kovalent modifikasyonlar karşı koruyabilir (Donkena, Young, Tindall, 2010:1).

GST'ler, farklı  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  ve  $\theta$  gen aileleri tarafından kodlanırlar (Bjork et al, 2006: 10.1096/fj.06-5896).  $\pi$ - sınıfında olan GST'ler, GSTP1 genin tarafından kodlanırlar (Franki, Dolzan, Arneric, Dodic-Fikfak, 2008:7) ve meme kanserinde çok özel öneme sahiptirler (Gudmundsdottir, Tryggvadottir, Eyfjord, 2001: 1169).

Glutation-S-transferaz 1(GSTP1) geninin, promotör bölgesinde CpG noktalarının hipermetillenmesinin rolü, hormona bağımlı kanserlerde bir biyomarker olarak belirlenmiştir. Farmakolojik ajanları az miktarda konjuge etmesi nedeniyle, GSTP1'in hipermetillenmesi, tedavinin ilerlemesine neden olabildiği belirlenmiştir (Dejeux et al, 2010:68).

GSTP1 genin metillenmesi , meme, karaciğer, prostat, böbrek ve akciğerde gözlenmiştir (Ronneberg et al, 2008:5562)

Özel genlerin yoğun metillenmesi seçici olarak, tümörün tipine veya grubuna bağımlı olduğu gözlenmiştir. örn: ailesel meme ve over kanserinde, BRCA1'nin metillenmesi görünüyor (Esteller et al, 2000, 564). GSTP1-negatif hücre MCF-7 hattında, mRNA ekspresyonu 5-aza muamelesi ile indüklenebilir ve *de novo* şeklinde,  $\pi$ -sınıfında olan proteini üretebilir (Lin et al, 2001, 1815). MSP yöntemine dayaklı bulgulara göre, primer meme kanserinde, GSTP1'in promotör bölgesinde, tümörün derecesine bağılı olarak, % 25-33 arasında metillenme görülmektedir (Hoque et al, 2006:4262).

Meme kanserinde, ER (östrojen reseptörü) ve ER negatif olan meme kanserlerinde GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumunda, farklılıklar gözlenmektedir. Dolayısıyla metillenme profili bu iki tür tümörde farklı olma anlamına gelmektedir. GSTP1 geninin promotöründe, hipermetillenme durumu, ER-pozitif tümörlerde, ER-negatiflere göre daha sık görülmektedir. Bu olay hem erken ve hemde ilerlemiş meme tümörlerinde gözlenmiştir ve ER (veya hormon reseptörü)'nün ekspresyonu, epigenetik değişimlerin meydana gelmesinde etkisi olabilir (Muggerud et al, 2010:R3).

Epigenetik değişimler, gen ekspresyonunu kontrol eder ve oksidatif DNA hasarının birikmesine neden olabilir. Bu mekanizmalar metillenme olayı veya CpG dinükleotitlerin oksitlenmesi yoluyla meydana gelmektedir (Basha, Reddy, 2010:636).

Sitozinin 5. karbonunda yerleşen metil grubu, sekansa-özel DNA'ya bağlanan proteinler için önemli bölgedir. 5 metil sitozin, hidrokümetil sitozine çevrilip ve MBP'ler (metile bağlanan

proteinler)'e bağlanma afinitesini değiştirir ve kromatinin sonraki kondanse olma basamağına etki sağlar ve bu şekilde, epigenetik değişimlerinin etkisini düzenler (Valinluk et al, 2004: 4100).

## **2.9. DNA metillenmesinin tanımı:**

Bazı durumlarda epigenetik değişimler genetik değişimler kadar, genin fonksiyonun kaybına neden olabilir (Baylin et al, 2002:299). Promotör bölgesinin hipermetillenmesi, karsinogenezisin her basamağında meydana gelmektedir. Bazen epigenetik değişimler, premalign olayı olarak, mutasyonların oluşumuna yol açmaktadır (Siedlecki, Zielenkiewicz, 2006:245). Çeşitli tümör tiplerinde tümör baskılayıcı aday genlerde promotörün hipermetillenmesi tanımlanmıştır (Bibikova et al, 2006:383). Genin ekspresyonunun azalmasında, promotör bölgesindeki metillenme ve genomdaki CpG bölgelerindeki mutasyonların birarada etkisi olabilir (Schuebel et al, 2007: e157). Metillenmenin incelemesinde üç yaklaşım tanımlanmıştır: 1) Genel metillenme profilinin belirlenmesi 2) CpG bölgelerinde metillenme paterninin belirlenmesi 3) Metillenme düzeyinin her CpG'de belirlenmesi (Cheng et al, 2006:282). Bazı kaynaklarda bu yöntemler detaylı olarak bulunmaktadır (Huang, Esteller, 2010:2:a004515), ancak metillenmenin incelendiği yöntemler sürekli ilerlemektedir. Günümüzde yayınlanmış yöntemler, kısaca üç grupta sınıflandırılır:

Birinci sınıfta, endonükleaz sindirimi, aracılığıyla parçalanma yöntemine dayalıdır. Gerekli olan, metillenmiş sitozinlerin, restriksiyon endonükleaz enzimlerinin tanıdığı bölgelerin içine, yerleşmesidir ve enzimlerin (örn: HpaII ve HhaI) metillenme ile, aktivitelerinin etkilenmeleri şart olmalıdır. Genomik hedef bölgesinin metillenme durumunun incelenmesi, Southern blotlama hibridizasyon yöntemi ile bu sınıf araştırmalardan sayılır. Söylenen teknikte, hedef bölgeyi tanımak için restriksiyon enzimlerine özel tanıttım bölgelerin olması şarttır ayrıca bu yöntemde çok miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulur (Strobel ve Thompson, 1984: 8074).

İkinci grupta araştırma yöntemlerinde, sitozin ve 5-metil sitozinin kimyasal modifikasyonlarına karşı, farklı duyarlılıklarından yararlanılır (Rein, Pamphilis, Zorbas, 1998: 2255).

Memeli genlerinin araştırmasında, genomik DNA'nın sekanslaması, ligasyon aracılı PCR (Ligation-mediated-PCR) yöntemiyle yapılmaktadır. Bu yöntemde 5 metil sitozinlerin tek nükleotit düzeyi ve kısmen niteliklerinin belirlenmesi mümkündür. Bu tip tekniklerin yüksek

özellik göstermeleri ve dolayısıyla yüksek duyarlılıklarına rağmen (sadece 0,5-1 mikrogram DNA yeterlidir), teknik olarak çok kompleksler (Pfeifer, 1992: 107).

Son yöntemde, bisülfite muamelesi olarak tanımlanmıştır. Genomik bisülfite sekanslamanın temeli, metillenmemiş sitozinlerin, deaminasyonu ve urasile çevrilmesine dayalıdır. Bu yöntemde, metillenmiş sitozinler bisülfite ile reaksiyona girmez ve olduğu şekilde durur. Kimyasal reaksiyonun sonunda, istenen bölgede, PCR amplifikasyonunun yapılması gerekmektedir (Huang et al, 2010: e8888). Bisülfite sekanslamanın çoğunluğunda, ilk basamak olarak klonlama yapılır. Tutuşturma (alignment) analizlere göre amplifiye bölgede, orijinal (muamele olmamış) ve klonlanmış (muamele olmuş) nükleotid dizilerin kıyaslamasıyla, metillenme durumu belirlenebilir (Rauch ve Pfeifer, 2005: 1172).

Bisülfite ile muamele olmuş DNA'nın PCR ürünü, başka yöntemlerle incelenebilir. Örn: birleşmiş bisülfite restriksiyon analizi (Combined bisulfite restriction analysis, COBRA). Bu teknikte, bisülfite ile muamele olmuş bölgede, enzim sindirimine bağlı olarak metillenmiş ve metillenmemiş DNA'nın arasında farklılık belirlenmektedir (Xiong ve Laird, 1997: 2532).

Bisülfite muamelesine dayanan yöntemlerden biri, metillenmeye özel PCR (Methylation specific PCR, MSP)'dir (Goessl et al, 2000:5941). Sodyum bisülfite ile muamele olmuş genomik DNA, bir kalıp olarak sonraki PCR reaksiyonunda kullanılır. MSP'ye özel çift primerler, hazırlanıp, primer dizaynında, bisülfite ile muamele olmuş ve muamele olmamış kalıp DNA'nın arasında farklılık gösterilmektedir. Ayrıca, CpG adacıklarında, metillenmemiş (deamine olmuş) ve metillenmiş (deamine olmamış) sitozinlerin arasında farklılık bulunmaktadır (Mund et al, 2005: e73). Ancak MSP' ile kıyaslandığında sensitivitesi azdır ve bu nedene göre bu yöntem sadece kantitatif veya 5-metil sitozinin dağılımının analizinde kullanılır. Metillenmemiş sitozinler yeterince urasile dönüşürse, yanlış pozitif sonuçlar alınabilir. Ayrıca yanlış-çiftleşme (mis-pairing) olayının potansiyeli özellikle yüksek PCR'ın siklusunda bulunmaktadır (Shaw et al, 2006:e78).

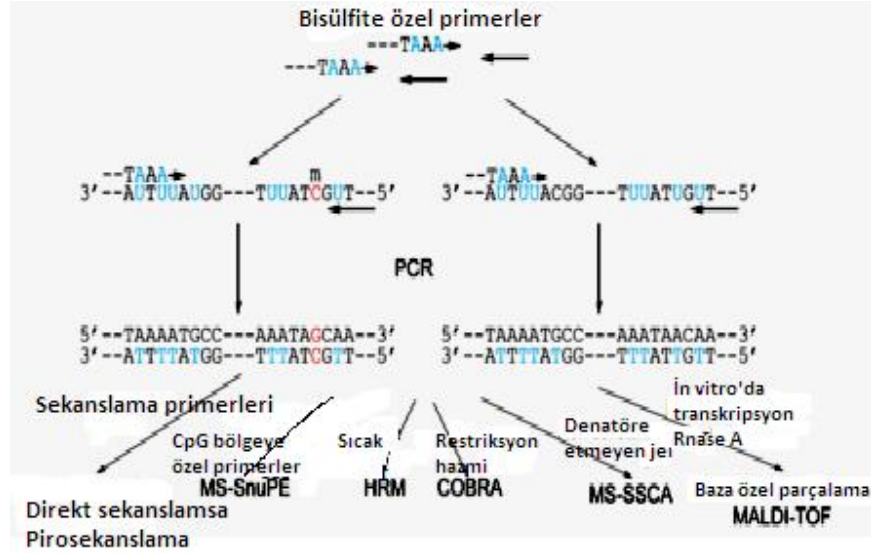
Metillenme durumunun araştırması için, başka bir yöntem olarak, metillenmiş DNA dizisine bağlanan MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) proteinin, MBD (methyl-CpG-binding-domain) domainine seçici olarak bağlanmasıdır (Fraga et al, 2003: 1765).

Nicelik analizi için bir sürü yöntem bulunmaktadır örn: klonlama sonrası bisülfite sekanslaması, ve pirosekanslama'sı, klonlama sonrası sekanslamanın dezavantajı, yöntemin çok basamaklı olması, vektör hazırlanması, pozitif klonların tanınması ve zaman alıcılığı olmasıdır. Pirosekanslama, kısa dizileri tanıyabilmektedir (Jiang et al, 2010: 282). Başka yöntemlerden,

mass spektrometre ile metillenmeden bağımsız PCR (Schatz, Dietrich, Schuster, 2004: e167), floresans ile PCR karışımında DNA'da metillenmiş sekansın bulması-methylight-adlı yöntem sayılabilir, bu yöntemde mono ve bi-allel metillenmeyi ayırt edilebilmektedir ( Eads et al, 2000:e32), bu yöntemlerin her ikisinde çok kompleks basamak kullanımı dezavantaj olarak sayılır. Ağır metillenmiş alleller için nicelik analiz yöntemlerinden biri, ( quantitative analysis of methylated alleles)( QAMA)( Zeschnigk et al, 2004:e125) tanımlanmaktadır. Bu yöntemlerin her biri için bir sürü avantaj ve dezavantajlar bulunmaktadır ve genelde analizler için önemli olan şartlar, DNA'nın konsantrasyonu ve yöntemin duyarlılığıdır.

Özel bir genin promotöründe metillenme durumunun incelemesi için bu yöntemlerin çoğunluğu, uygundur. Metillenmeyi genom boyunda incelemek için başka tekniklerde mevcuttur örn: yüksek verimli kapiler kromatografi ( HPCE) (high-performance- capillary –chromatography) (Stach et al, 2003: e2), yüksek verimli sıvı fazında kromatografi ( HPLC) (high-performance-liquid-chromatography) veya restriksiyon yoluyla genomun taraması ( restriction landmark genome scanning RLGS,) RLGS ile DNA'nın metillenmesini incelemek için genomun bazı bölgelerinde örn CpG adacıkları araştırılır (Smiralgia & Plass, 2002:5414). Buna ilaveten genom boyunda yeni mikrodizin yöntemleri çok verimli yöntem olarak, CpG ve promotör bölgelerinin metillenmesinin incelemesi için tanımlanmıştır. Çok miktarda DNA gereksinimi olan bu yöntemler, biyomarker olarak kullanılamaz ancak toplumdaki değişimlerin belirlenmesi için çok başarılıdır ve yeni tümör baskılayıcı genlerin bulması içinde faydalı olabilir (Gitan et al, 2001: 158). Genelde, bu tür araştırmalarda tek bir üstün yöntem bulunmamaktadır ve yöntem seçimi tamamen araştırmanın amacına bağlıdır.

### 2.9.1. Bisülfite özel PCR (BSP):



Şekil 7. Bisülfite ile muamele olunmuş PCR ürününün metillenme araştırma yöntemleri ([http://en.wikipedia.org/wiki/Bisulfite\\_sequencing](http://en.wikipedia.org/wiki/Bisulfite_sequencing))

Bisülfite sekanslamasının temeli, DNA dizisinde sitozinin urasile (dolayısıyla timine) dönüşümü ve 5-metilsitozinin değişimemesidir bunun için bir sürü yöntem bulunmaktadır (Şekil 7). DNA'nın amplifikasyonu için, Bisülfite özel PCR'in (Bisulfate Specific PCR, BSP) uygulaması gerekmektedir. Bunun için, araştırılan genin hedef bölgesini seçtikten sonra elde veya bisülfite özel primerler ile primerler dizayn edilir. Bu primerler, CpG bölgelerini içermemelidir dolayısıyla, bisülfite ile muamele olmamış DNA ile komplementer olmamalı ve metile bölgenin yakınlığına tutunarak (flanking) ancak aranan bölgeye dahil olmaması şarttır. Bu nedenlere göre, MSP'nin tersine, BSP'de hem metile hemde metillenmemiş diziler çoğaltılacaktır. Bu yöntem, küçük uzunlukta olan nanogramlık DNA'ya uygundur. Standart protokol'da, 500 ng örnek kullanılır. CpG'de yerleşmeyen sitozinler, iç kontrol olarak kullanılmaktadır (Shaw et al, 2006:561).

## 2.9.2. Bisülfid sekanslama

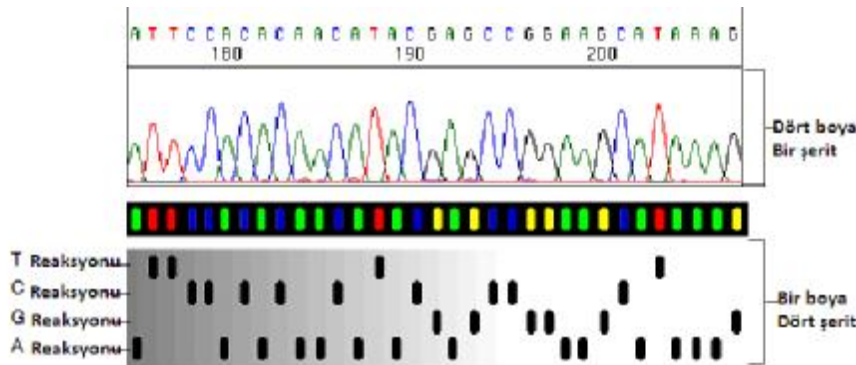
### 2.9.2.1. Kapiler elektroforez

Esas olarak, DNA'nın sekanslama ürünleri, poliakrilamid jel ile ayrılır ve manuel şekilde iki cam kapak arasında yerleştirilir. Kapiler elektroforez bir denatüre edici polimerler kullanılır. Bu yöntem jel ayırma tekniğine alternatif, verimli ve rahat bir yöntemdir.

DNA parçaları floresans ile işaretlenmiş ve moleküler ağırlığına göre ayrılırlar. Jel akımına ihtiyaç olmadığına göre, kapiler elektroforezde DNA sekanslaması tamamen otomize olmuştur (Yang et al, 2006: e 61).

### 2.9.2.2. Sekanslamanın esası

Kapiler elektroforez süresinde, sekanslama siklusunun uzatılmış ürünleri bir kapiler tüpe girerek, elektroforez reaksiyonu tamamlanır. Tamponlu sekanslama reaksiyon karışımına, yüksek voltaj uygulanır ve negatif şarjlı parçalar, kapiler tüpüne girer. Uzatılmış ürünler, total şarjlarında dayanarak, büyüklüklerine göre ayrılırlar. Örneklerin elektroforezdeki hareketlilikleri, tampon tipi, konsantrasyon, PH değeri, uygulama ortamının sıcaklığı, voltaj miktarı ve kullanılan polimerin tipine göre değişir. Kısaca, pozitif elektroda ulaşmadan önce, floresans ile işaretlenmiş DNA parçaları, kendi büyüklüğüne göre ayrılır. Bu lazer dalgısı, parçadaki floresans boyanı aktif ediyor. Optik tanıma cihazı bu floresansı tanıtıyor. Verileri toplayan software, floresans sinyalını, dijital verilere dönüştürür ve verileri dosya olarak kayıtlar. Her boya, tetiklendiği lazere, kendi ışınımını farklı dalgada saçar ve buna göre, tam 4 boya ve dolayısıyla her 4 baz için, farklı ekrana çizilir ve kapiler injeksiyonunda tanımlanabilir (Şekil 8) (França, Carrilho, Kist, 2002: 169).



Şekil 8. Floresans sekanslama ve radyoaktif sekanslamanın sonuçlarının kıyaslaması

([www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041003.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf), 2010)

### 2.9.2.3. Otomatik sekanslamanın iş akımının şeması

#### DNA Kalıbının Hazırlaması



1. DNA parçası, plasmid, BAC, YAC'dan DNA kalıbının hazırlaması
2. Primerlerin dezinayı
3. Kalıbın temizlemesi
4. DNA'nın kalitesinin ölçülmesi
5. DNA miktarının hesaplamak

DNA kalıbının hazırlaması basamağında bir örnek:

- PCR ürünleri
- Plasmidin DNA'sı
- Genomik DNA
- BAC'ın DNA'sı
- YAC'ın DNA'sı

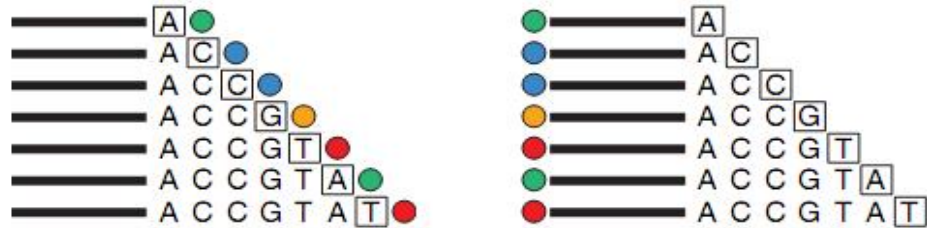
#### Dizi sekanslama



1. Sekanslamanın kimyasal seçimi
2. Siklus sekanslama reaksiyonunun hazırlanması
3. Termal döngüsünde sekanslama reaksiyonunun yürütülmesi

Siklus sekanslamanın çıktısı:

Boya (Dye) terminatür ürünleri veya Boya (Dye) primer ürünleri





Uzatılan ürünlerin  
saflaştırılması



Bir metot ile, uzatılma ürünlerin saflaştırması

- Big Dye X terminatör saflaştırılması
- Etanol presipitasyonu
- Spin-kolon saflaştırması
- Alternatif saflaştırma prosedürleri

Safladırdıktan sonra, örneklerin elektroforez için hazırlanması

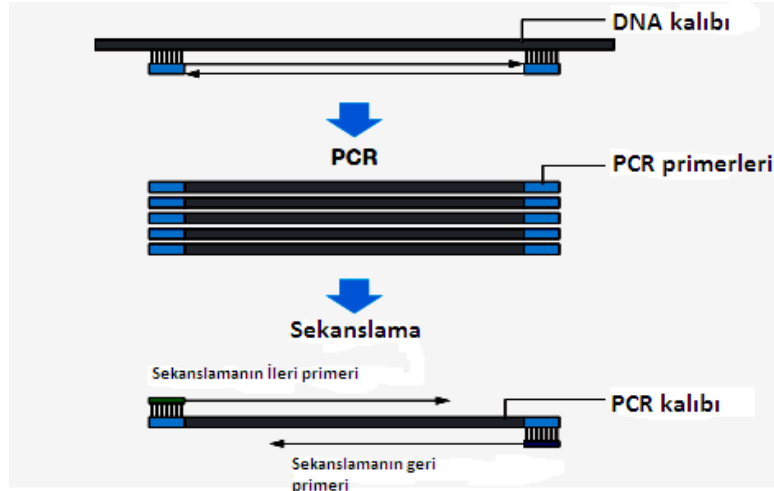
Uzatılma ürünlerinin saflaştırma çıktısı:

Saflaştırılmış Dye terminatörün ürünlerini veya saflaştırılmış dye primer ürünleri

#### 2.9.2.4. Sekanslama için primerler

Sekanslama sırasında, PCR ürünleri iki şerhli sekanslanma yöntemin doğruluğu (accuracy) % 99'e kadar yükselir. Bu yöntemde farklı primerler kullanılabilir. Ancak PCR primerleri, sekanslama primeri olarak kullanılsa, özel primer dezinayna gerek kalmadan sekanslama kurması, PCR primerleri ile yapılabilir. Bu yöntemin dezavanatajı her sekanslamada bir master mix hazırlamasıdır (Şekil 9).

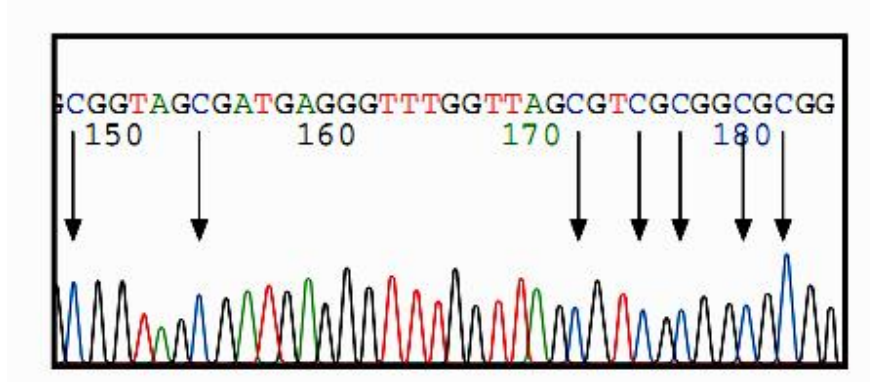
([www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041003.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf),2010).



Şekil 9. PCR primerler ile sekanslama

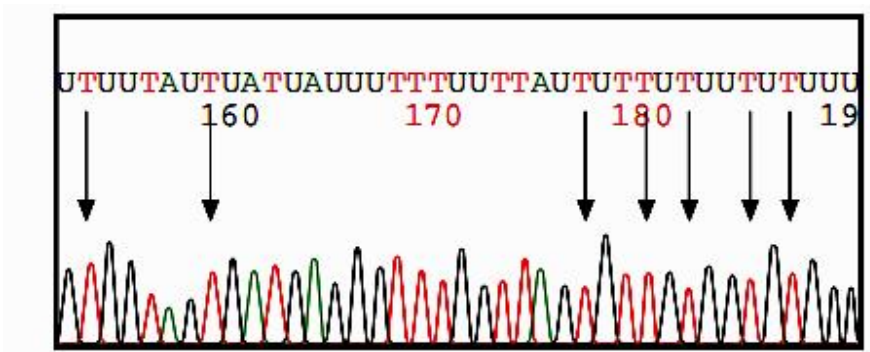
([www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041003.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf), 2010)

Esasen, metillenme için iki yöntem kullanılır, bu seçim elde olan verilere ve araştırmanın amacına bağlıdır: metillenmeye özel PCR ve bisülfite özel PCR. Her iki yöntemin ilk basamağında, bisülfite dönüşümü ortaktır. Epigenetik olayın, tanımlanabilen hale getirilmesi ve kalıcı şekilde (stable) değişime çevrilmesi için, bisülfite dönüşümü uygulanır. PCR sırasında orijinal metillenme ortadan kaybolur. Sodyum bisülfite ile muamele edilmiş DNA'nın sekansı muamele olunmamış genomik DNA ile kıyaslanır, çok dikkatli şekilde DNA zincirinde tüm metillenmiş sitozinleri tanımlamak olabilir (Şekil 10 ve 11).



Şekil 10. Muamele olmamış DNA dizisi. Oklar metillenmemiş sitozinlerin konumunu guaninden önce göstermektedir. Bisülfite muamelesinden sonra, metillenmemiş sitozinler, timine dönüşüyor.

([www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041003.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf))

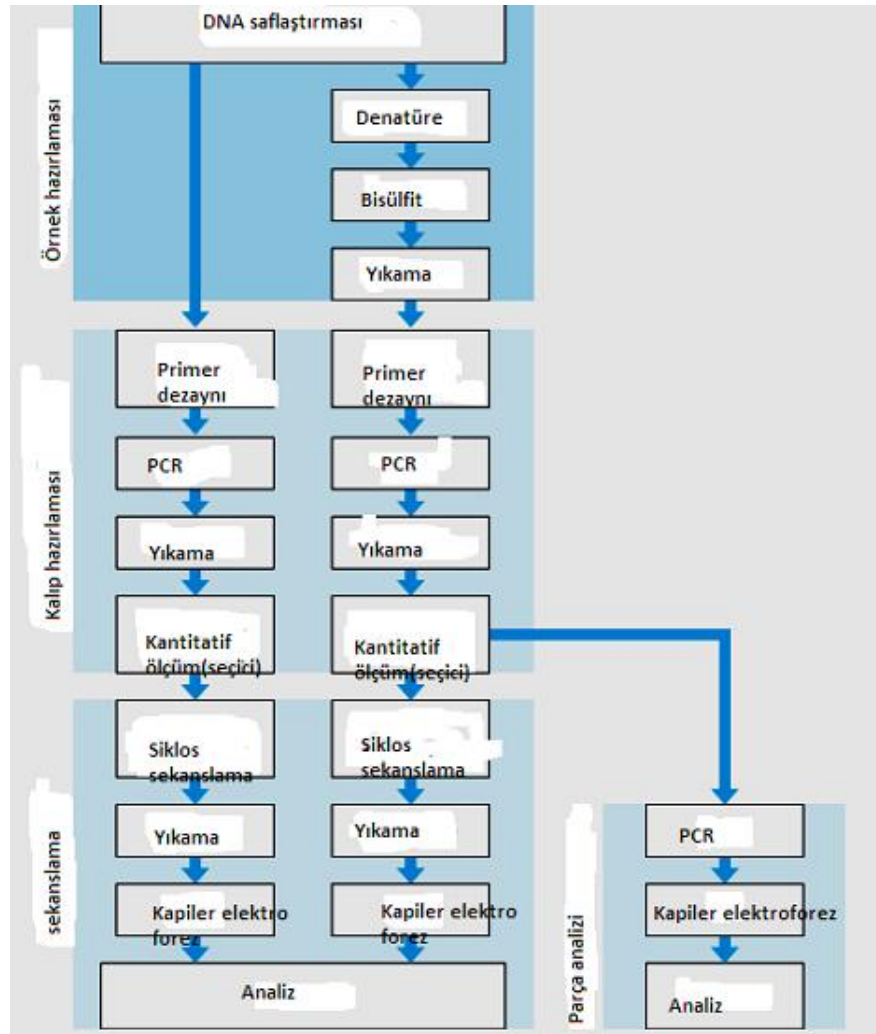


Şekil 11. Bisülfite ile muamele olmuş DNA sekansı. Oklar metillenmemiş sitozinlerin konumunu göstermektedir. Bu sitozinler bisülfite muamele sonrası timine dönüşmüştür.

([www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041003.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf))

Bisülfid ile muamele olmuş ve olmamış sekanslarda, bisülfid sekanslamasının zirve ( peak)'lerini kıyaslama şeklindedir ve kantitatif değil. Metillenmenin niteliğini ölçmek için, parçaların analizi gerekmektedir. Metillenme sekansının verilerini toplamak için iki yöntem bulunmaktadır. Her iki seçimde de bisülfid dönüşümü ve PCR amplifikasyonu gerekmektedir ancak, bir yöntemde PCR ürünü direkt olarak sekanslanır ve diğer yöntemde PCR ürünleri klonlanır ve daha sonra klonlar sekanslanır ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms\\_039258.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_039258.pdf)).

bisülfid klonlamadan sekanslama ve normal sekanslama kıyaslanmıştır (Şekil 12).

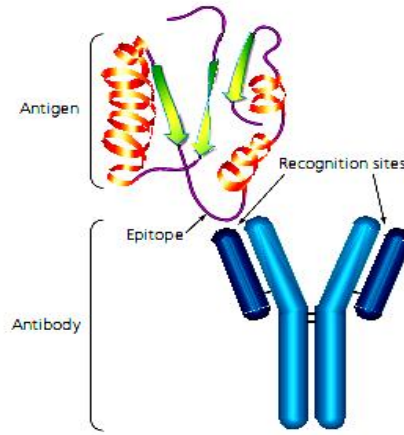


Şekil 12. Normal ve direkt sekanslama iş akımının kıyaslanması

([www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041003.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf))

## 2.10. Gen ekspresyonunun saptaması: Western blotlama (W.B):

Katı faz immünoassay yönteminde proteinler özel yapay membranlara yeterince güçlü olarak bağlanır ve katı fazında immünoassay çalışması sağlanır. Bağlanan proteinler kendi antijenisite konumlarıyla, özel problemler maruz kaldığı takdirde bu yerlere bağlanırlar. Yapay membranlara bağlanan proteinlerin problemleri için farklı teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklere genellikle 'blot' denilir. Genel olarak, proteinler elektroforez jelinden bir membrana aktarılır ve daha sonra antikorlar ile problemlenir. Bu yöntem 'immün blotlama' veya 'Western blotlama' olarak adlandırılır. Bu yöntemde PAGE'in (1-D veya 2-D) rezolüsyonu ile immünoassay özelliği biraraya gelir ve bir komplekste bulunan proteinler, birbir tanımlanır ve saptanır. Western blotlamada elektroforetik ayırma tamamlanır ve proteinler elektroforez ile jelden membrana aktarılır (<http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure>, 2011) (Şekil 13).



Şekil 13. Antijen ve antikor etkileşimi

(<http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure>,2011)

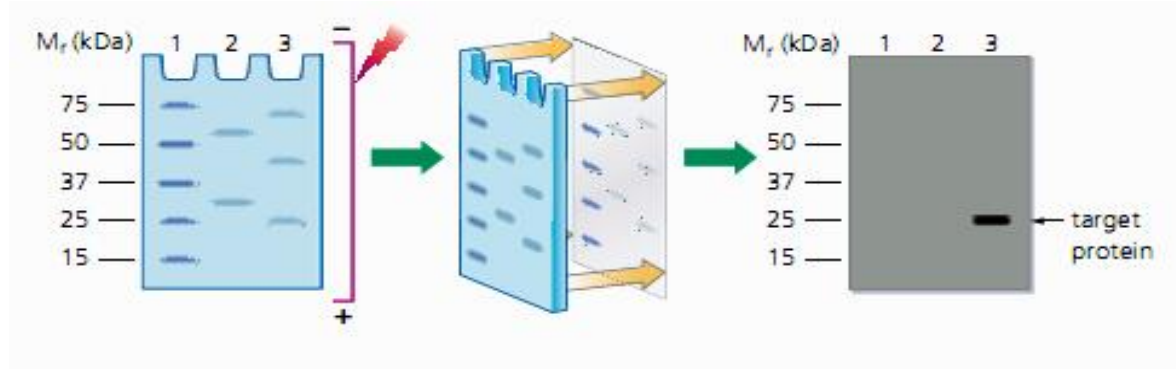
### 2.10.1. Western blotlamanın gerekçesi

Western blotlamada hedef proteinlerin kimliği doğrulanır. Bu yöntemde proteinler hem spesifik antikora bağlanır hem de büyüklüğü belirlenir. Ayrıca bu yöntemde beklenmedik sonuçların nedeni ve hangi proteinin izleneceği ortaya çıkar. Elde edilen band beklenilenden küçükse, protein parçalanmıştır. Eğer büyükse, glikozilasyon veya multimer formu oluşmuştur, alternatif kesilip çıkarılma (splicing), proteinin boyutunu etkileyebilir. Yüklü amino asitler de epitopa ulaşımı etkileyebilir (Gomez et al, 2008: 3889). Western blotlamada proteinlerin dokuya özel ekspresyonları belirlenip, ilaç üretimi veya hastalıkların tanımında yardımcı olabilir (Okamura

et al, 2008: 3194). Ayrıca proteinlerin fraksiyonları bu yöntem ile belirlenir. Blotlama yöntemi imünhistokimya veya ELİSA gibi metodlara kombine olabilir. Sonuçların hızlı ve açık olmasına göre, bir 'ek tarayıcı test'(supplementary screen test) olarak seçilmiştir.

### 2.10.2. İmün blotlama

İmün blotlama prosedürü birkaç basamaktan ibarettir: 1. Proteinlerin elektroforez ile jelden membran üzerine aktarılması ve tespit (imobile) edilmesi , bu aktarımda membran ile jel bire bir aynıdır. 2. Membranın üzerinde protein dolmamış bölgelerin, antikorun non-spesifik bağlanmaması için, doyurulması (saturate). Bu basamağa 'Bloklaama' veya 'Quenching' denilir. 3. Elde edilmiş band (blot), ikinci kez blotlanır. İkinci prob bir antikordur ve primer antikor için şpesifiktir ve bir tanımlayıcı enzim ile konjuge olunmuştur. Aranan protein bölgesi, enzim ile işaretlenir ve bu işaret primer ve sekonder antikorun özelliğine (spesifitesine) bağlıdır. 4. Enzim substratı suda çözülmez hale gelmiş şekilde eklenir ve blot ile birlikte inkübe olunur. Enzim çalışmasının sonunda boyalı bir ürün oluşur ve bağlanan bölgede bir nokta (blot) veya bir band bulunur ve bu aranan proteini temsil eder (Towbin ve Staehelin, 1989: 495) (Şekil 14).



Şekil 14. Western blotlama şeması  
(<http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure.2011>)

Elektroforez ile protein ayırması; blotlama membranına aktarım ve hedef proteinin tanımlaması, bu protein sadece son basamakta band formunda görünür (3. şerit).

Şerit 1: Önceden boyanmış moleküler ağırlığı standartlar.

Şerit 2,3: Protein karışımı

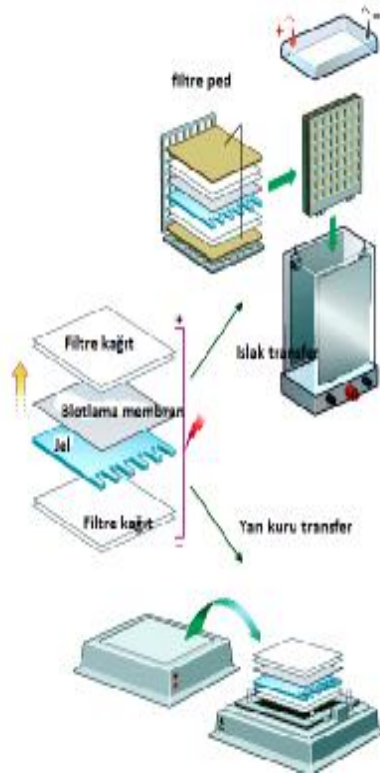
### **2.10.3. Blotlama malzemeleri**

Proteinleri jelden membrana elektro-transfer edilmesi, elektrik akımı ile uygulanır. Jelin kalınlığından geçen akım, proteinleri jelden koparıp membrana aktarır. İki tür elektro-transfer yöntemi bulunmaktadır: 1. ‘Yarı kuru’(Semidry) transfer cihazı 2. ‘Tamponla dolmuş meydan’ (Buffer-filled tankları) (Şekil 15). Transfer tankları plastikten yapılı ve iki elektrod, tank zarfının iki ucunda yerleşmiştir. Akıma yalıtkan kasetlere dikey olarak tank içerisine yerleştirilir ve elektrotlara paralel şekilde konulur ve elektroforez tamponunda emilir. Tamponun büyük miktarından dolayı, transfer sırasında oluşan sıcaklık önlenmektedir. Yarı kuru blotlamada jel ve membran sandviç şeklinde ve yatay düzeyde yerleştirilir ve tamponda ıslatılmış iki filter kağıt arasında elektrotlara bağlanır. Yarı kuru sistemde yerleşen elemanların çok yakın temasları güçlü akımı sağlamaktadır. ‘Yarı kuru’ terimi filtere kağıtlarının ıslatımı için kısıtlı miktarda tampon kullanımı anlamına gelmektedir. Yarı kuru sisteminde küçük moleküler ağırlıklı proteinler membranlardan geçerek, tamponun azlığından kaynaklanan zamanın kısa olması nedeni ile bazı yüksek moleküler ağırlığı olan proteinler zayıf miktarda aktarılır (Diller et al, 2011: <http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.292>).

### **2.10.4. İmmün blotlamada membranlar ve tamponlar**

Membran için en çok kullanılan madde, nitroselüloz ve polyvinylidene flouride (PVDF)’dir. Her iki membran, 100 µg/cm<sup>2</sup> de proteinlere bağlanma özelliğine sahiptir. Nitroselüloz bir deneyin ilk basamaklarında çok iyi kullanımlıdır. PVDF membranı, özel kimyasal maddeleri proteinlerden uzak tutması için ve sekanslama yapılan proteinler için iyi seçenektir. SDS-PAGE için kullanılan tank tamponları elektroforez tamponlarının modifiyesidir. Yarı kuru transfer tamponunun içeriği 48 mM tris, 39 mM glisin, 20% (v/v) metanol ve PH=9 dir. Tampondaki metanol, SDS’i, protein-deterjan kompleksinden koparır ve proteinler ile membran arasında olan afiniteyi artırır ([http://danish.pall.com/variants/pdf/pdf/laboratory\\_48923.pdf](http://danish.pall.com/variants/pdf/pdf/laboratory_48923.pdf)).

Denatüre olmayan jellerde, metanol kullanılmaz. Membranların problemlerinde, yağsız süt tozu ve Tween 20 deterjanı membranın boş yerlerini bloklaması için ve antikorların taşıyıcısı olarak kullanılır.



Şekil 15. Western blotlama transferi

(<http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure,2011>)

### 2.10.5. İmün tanımlama (immun detection)

Uygun primer antikorlar, farklı hayvanlardan örn: tavşan ve fare den alınabilir. Bu antikorler çeşitli sekonder antikor ile (örn: goat anti-rabbit immunoglobulin) reaksiyona girebilir. Sekonder antikorler özel kimyasal maddeler (örn: radioaktif , floresans ve enzimler) ile konjuge olur ve ticari olarak elde edilir. Western blotlamada en çok kullanılan enzimlerden alkalın fosfat ve horse-radiş peroksidazdır. Alkalın fosfat için tercih edilen substrat, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) ve nitroblue tetrazolium (NBT) karışımıdır. BCIP substratı enzim ile defosforile olur ve daha sonra NBT'nin indirgenme reaksiyonunda oksit hale gelir. Bu reaksiyonun sonucu koyu pamuk görüntülü bir boyadır. Bu renk protein bantında veya noktasında depozit olarak görünmektedir. Horse-radiş peroksidaz da, 4-chloro-1-naphtol veya diaminobenzidine substratı (hidrojen peroksidaz eklenmiş) kullanılır. 'Horse-radish' peroksidaz için kemilüminesans sübstratı, oksitlenmiş lüminoldur. Blotlanmış lüminol substratından, çok

güçlü ve hassas sinyal oluşur ancak fotoğraf ışığına maruz kalmaya veya özel cihaza ihtiyaç duyulur (special configured imaging device)(Garfin, 2003:197).

#### ***2.10.6. Total proteinin tanımlaması***

Bir blotlama'da, proteinin doğru tanımlaması için tanımlanmış proteinlerin, jeldeki total proteinin paterni ile kıyaslanması gerekir. Kolloid altın boyaması total proteinin boyaması için çok hassas bir ajandır. Bu boya kolloid altının stabilize olmuş sol halinde partiküllerini içerir. Tanımlama sınırı kaç yüz pikogramdır ve gümüş ile muamele edilmesi tanımlama sınırını genişlendirebilir. CBB G-250 total protein boyaması için başka bir ajandır. Bu yöntem mass spektrometri için uygundur. Boyanmış blotlar 2D-PAGE'in arşivlenmesi için uygun araçtır. SYPRO Ruby adlı ajan total proteinin boyaması için çok hassastır (Wang, Hanash, 2005:413).



### **3. GEREK VE YÖNTEM**

#### **3.1. Araştırmanın Tipi:**

Bu araştırma geçmişe yönelik (retrospektif) gözlemsel (observational) ve deneysel (qualitative and quantitative ) analytical nitelik ve nicelik sonuçlu araştırmadır.

#### **3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı**

Bu araştırmanın bir kısmı Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı'nın laboratuvarında ve diğer kısmı, İran Tebriz Üniversitesi'nde, Tıbbi Genetik ve Biyokimya Anabilim dalının biyoteknoloji laboratuvarında 2008-2011 yılları arasında yapılmıştır.

#### **3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/ Çalışma grupları**

##### **3.3.1. Vakalar**

Dokular meme kanseri tanısı alan 50 kadın hastadan (ortalama yaş 48.±10) 2008-2009 yılına kadar, alındı. Bu vakaların temel seçim kriterleri, aile geçmişine bakmadan, meme kanserinin tanısı olmasıdır. Bütün vakalarda, histolojik olarak meme kanseri Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji Anabilim dalı laboratuvarlarında tanımlanmış olan ve Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı biobankında saklanan örneklerden alındı ( bu örnekler önceden, Dr. Aydan Çelebiler tarafından uluslararası Biyobanka kurallarına göre saklanmıştır ( Tablo 3). Hastalardan, ameliyat öncesi, araştırmanın amacını açıklayan onam Form'ları alınmıştır. Ameliyat sırasında alınan dokuların yarısı -80 derece derin dondurucuya alınırken, diğer yarısı patolojik inceleme amacıyla laboratuvara gönderilmiş ve hasta isimleri güvence altına alınarak, örnekler kodlanıp uygun koşullarda saklanmıştır).

Tablo 3. Meme tümör örneklerin patolojik özellikleri

Sayı	Cinsiyet	Yaş	Evre (Stage)	Derece (Grade)	Tumor sayısı	Tümörün tipi	İnvaziv	Kemoterapi	Geridönüüm	Metastz
1	1	39	2	2	1	duktal	+	-	-	+
2	1	53	2	2	1	duktal	+	-	-	+
3	1	40	3a	2	1	duktal	+	-	-	+
4	1	70	3a	2	1	duktal	+	-	-	-
5	1	37	3a	2	2	duktal	+	-	+	+

6	1	29	2	2	1	duktal	+	-	-	+
7	1	63	2	2	1	duktal	+	-	-	+
8	1	53	1	2	1	duktal	+	-	-	+
9	1	68	2	2	6	duktal	+	-	-	+
10	1	74	2	3	1	lobüler	+	-	-	-
11	1	44	2	2	1	duktal	+	-	-	+
12	1	58	3a	1	2	duktal	+	-	-	+
13	1	50	2	3	1	duktal	+	-	+	+
14	1	57	3a	2	1	duktal	+	-	-	+
15	1	49	2	1	1	duktal	+	-	-	-
16	1	35	3a	2	1	duktal	+	-	-	-
17	1	59	2	2	1	duktal	+	-	-	-
18	1	40	1	1	1	duktal	+	-	-	-
19	1	55	3b	2	1	duktal	+	-	+	+
20	1	51	2	2	1	duktal	+	-	-	-
21	1	30	2	3	1	duktal	+	-	-	-
22	1	36	2	3	1	duktal	+	-	+	-
23	1	23	2	1	1	insitue	insitue	+	-	-
24	1	41	2	2	1	insitue	+	-	-	-
25	1	50	2	2	1	duktal	+	-	+	+
26	1	43	3a	3	1	duktal	+	-	-	-
27	1	47	2	2	1	duktal	+	-	-	-
28	1	45	2	1	1	duktal	+	-	-	-
29	1	46	2	1	1	duktal	+	-	+	-
30	1	52	2	1	1	duktal	+	-	-	-
31	1	37	2	1	1	duktal	+	+	+	-
32	1	50	2	2	1	duktal	+	-	-	-
33	1	63	3a	2	1	duktal	+	-	-	+
34	1	50	3a	2	1	duktal	+	-	+	-
35	1	45	2	non	1	duktal	+	-	-	-

36	1	48	2	2	1	duktal	+	-	+	-
37	1	53	3a	non	1	duktal	+	-	-	-
38	1	48	2	1	1	duktal	+	-	+	-
39	1	55	1	2	1	duktal	+	+	-	+
40	1	36	3a	2	2	duktal	+	-	-	+
41	1	47	2	non	1	insitue	-	-	-	-
42	1	40	2	non	1	insitue	-	-	-	-
43	1	43	2	non	1	insitue	insitue	-	-	+
44	1	51	2	2	1	duktal	+	+	-	-
45	1	55	2	2	1	duktal	+	-	-	-
46	1	58	2	2	1	duktal	+	-	-	-
47	1	49	2	2	1	duktal	+	+	-	-
48	1	50	2	1	1	duktal	+	-	-	-
49	1	34	3a	2	1	duktal	+	+	-	-
50	1	60	3	2	1	duktal	+	-	-	-

### 3.3.2. Kontrol örnekler

Kontrol gurubu olarak, 50 tane meme normal dokusu, aynı hastalardan ve aynı taraftan ( sağ veya sol taraf), tümör bölgesinden yaklaşık 3 cm uzak bölgeden alındı. Meme küçültme ameliyatı sırasında alınan bir normal meme dokusu örneği negatif kontrol olarak araştırmaya eklendi.

Kontrol örneklerinin alınma nedeni, E-cadherin ve GSTP1 genlerinin tümör ve normal dokularda metillenme durumu ve proteinlerinin ekspresyon düzeyinin kıyaslaması için yapıldı. Aynı hasta ve aynı memeden alındığından, yan faktörler olabildiğince dışlandı ve tek farklılıkları kanserli olup olmamasıdır.

### 3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada kullanılan materyal, insan meme kanser ve normal dokusu (hastalardan alınan örnekler) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı biobankından (Haziran-2009) ve meme hücre hattı (MCF-7) ve prostat kanseri hücre hattı (PC-3) İran Pasteur Enstitüsü'nün hücre üretim labratuvarından alındı (Haziran-2011 tarihinde).

### 3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Bağımlı değişkenler: a) E-cadherin ve GSTP1 genlerinin metillenmesinin ( sitozinin 5. karbonunda metil gurubunun yerleşimi), kantitatif değeri. Sonuçların rapor şekli: 1- metillenme durumu: 3 sınıfta ( tam metillenme ( bütün CpG noktaların metillenmesi), kısmen metillenme ( bazı CpG noktaların metillenmesi) ve metillenmemiş ( hiçbir noktada metillenme olmaması) şeklinde incelendi. 2- metillenme paterni : E-cadherin için 10 tane seçilmiş CpG noktalarında ve GSTP1 geninde 40 tane seçilmiş CpG noktalarında (metin içerisinde, sayı şeklinde belirlenmiş noktalar) sekanslama sonuçlarının üzerinden (graf şeklinde) tümör ve eşdeğer olarak normal meme dokusunda birebir kıyaslanması ve pozitif veya negatif olarak raporlanmasıdır.

Bağımlı değişkenler: meme tümörünün evresi ve derecesi

Meme tümörün saptanması patolojik ve cerrah tarafından klinik bulgular ve patoloji slaytların incelenmesi ile saptandı. Tümörün evresi (stage) uluslararası AJCC-02-TNM sisteminde yapıldı ve sayı olarak, 1=1, 2=2a, 3=2b,4=3a, 5=3b, 6=3c,7=4 sınıflandırıldı ve tümörün derecesi (grade) cerrah tarafından uluslararası sisteminde 3 sınıfta ( I,II ve III) belirlendi.

### 3.6. Veri Toplama Araçları

Hastaların bilgileri, patoloji raporları hastanenin cerrahi arşivinden alındı.

#### 3.6.1. Kullanılan Aletler

UV Spektrofotometre	Eppendorf biophotometer (AG 2233) RS232C
Shaker (vortex)	Retsch mixer
Buzdolabı	Emersan ER13K
Derin dondurucu -20 derece	Pars F12MC
Derin dondurucu -80 derece	Dairei,468(UPUL-580)
Otoklav	Reyhan-Teb(RT)
Hassas terazi	Sartorius PT120
Benmari	ATT-W-350
Santrifüj(mikrofüj)	Hettich universal D-7200
Buzdolablı santrifüj	Boeco M-240R
PH metre	Metrohm 744
Otomatik pipet	Eppendorf(0.1-2.5µl,2-20 µl)

Elektroforez cihazı	EPS 600 Pharmacia biotech
Elektroforez güç kaynağı	PS 250 Hybaid
Elektroforez tankı	Electro-4 Hybaid
Western elektroforez tankı	EPS-600Z Akhtarian
Kamera (UV capture)	UVP products
Termal siklus cihazı	Cyclogene Techne FPHC3CD
Eppendorf tüpleri	Axygen(0.2,0.5,1.5 ml)
Falkon tüpleri	Nuova Aptaca(50 ml)
Western blotlama tankı	Biomeriux
Elektroblot transfer cihazı	Cleaver
Kapaklı camlar	50,500 ml
Koyu renkli camlar	50ml
Immobilin PVDF membranı	Millipore
Nitrosellülöz membranı	Schleicher & Schuell BA85
Ajitatör	Heidolph-polymax 2040
Elektrolüminesan açıklayıcı aleti	Codack

### ***3.6.2. Kullanılan kimyasal maddeler***

Glasial asetik asit	Sigma A6283
Sodyom hidroksit (NaOH)	Sigma B0316462
İzopropanol	Merck D-6100
Absolü Etil Alkol	Merck UN-11
70 derece Etil Alkol	Merck K389/3383
Sodyom asetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Merck TA544865
Amonyom asetat (CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> )	Merck A191515015
Amonyom per sulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Fisher Scientific BP179-25
N'N'-bis-methylene-akrilamid (C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Amersham 17-1304-02
Formaldeit	Merck K34782502
Magnezyum Klorür	Merck UN-2074
Tris Hcl(C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> C <sub>1</sub> H)	ICN 816124
Tris base	MP Biomedicals 819623

Proteinase K	Sigma-P 2308
AgNO <sub>3</sub>	Merck K31952312
EDTA	Merck 8421X039
Borik asit	Merck K34518460
TEMED	Bio-Rad 161-0800
Akrilamit pudrası	Merck S4882730
Taq DNA polimeraz	Fermentaz TA 7506C
Primerler	Sinajen PR7708
dNTP	Sinajen
Hidrokinon (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma HT1014
Bisülfite sodyum,sodyum metabisülfid( NaHSO <sub>3</sub> ,Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Merck 223070010
İmmobilon PVDF membranı	RPN 303F
Nitroselölöz membranı	Scheicher & Schuell BA85
Whatman 3mm kağıdı	
Primer anti-fare beta aktin	Clone AC-74,ürün sayısı A2228, Sigma-Aldrich
Primer anti-fare E-cadherin	Santa Cruz Biotechnology Inc, (G-10):Sc-8426
Primer anti-fare GSTP1	Santa Cruz Biotechnology Inc, (3F2C2):Sc-66000
Sekonder anti-fare IgG,HRP antikor	Santa Cruz Biotechnology Inc F0710
Bromfenol mavisi (%0.5)	Fermentas ≠R0571
BSA(sığır serum albomini)	Sigma A5408
Parafilm	American national can
SDS	Bio-Rad 161-0800
Gliserol	Merck 4091
Glisin	Merck K13045701
Proteinaz inhibitör kokteli	Roch 11697498001
Skim milk	Acumedia 7352
Tween-20	Sigma P1379-100ML
Metanol	Merck 1.06007

NaCL	Merck K 30005704
Protein Marker(14.4KD-116.0KD)	Fermentas ≠SM0431
Protein Marker (51KD-212KD)	Pastor enstitosu,el yapımı
Ponceau S	Usb 32819
2 Merkaptotetanol	Merck 15433
Komasi birilyant(Coomasie Brilliant)	Bio-Rad 161-0436
Triton X-100	Bio-Rad 161-0407

### **3.6.3. Ticari kitleler**

DNA izolasyon kiti	Fermentaz DN 8115C
DNA pürifikasyon kiti	Fermentaz K0701
Bradford protein izolasyon kiti	Fermentaz R1271

### **3.6.4. Örnekler**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesinin Meme Konseyi tarafından meme tümörü tanısı alıp gönüllü onam formunu imzalayan ve mastektomi olan, toplam en az 100 olgudan elde edilecek taze dokular alınır 50 örnek, DEÜ. Patoloji Anabilim dalı arşivinde tarama yapılarak, meme kanser tanısı alan ( H & E boyama metodu) ve aynı kişiye ait normal meme bölgesinden, DNA izolasyonu amacıyla doku kesitleri alındı ( bu projenin IRAN üniversitesiyle ortak yapılması nedeniyle alınan dokuların 50'si Tabriz üniversitesi hastanesinde cerrahi bölümde ameliyat yapılan örnekler onkoloji bölümünden, meme kanseri tespit olmuş örneklerde projeye alındı). Normal doku seçiminde hastaların meme dokusunda, uzman patolog tarafından belirlenecek tümör dışı bölgeden elde edilecek dokular normal kontrol olarak değerlendirildi.

Tümörlerin derece ve evrelerinin belirlenmesi sırayla, cerrah ve patolog tarafından yapıldı ve AJCC-02 TNM protoklü üzerinden yapılarak tümör derecesi

1-1, 2-2a, 3-2b, 4-3a, 5-3b, 6-3c, 7-4 olarak belirlendi ve tümör tipleri duktal karsinoma , lobüler karsinoma (in situe) ve invaziv duktal, lobüler, müsinus, tubuler ve medüller tipleri olarak sınıflandırıldı. 100 örnek 50 vakadan alındı bunların 25 vakası,Türkiye ve 25 vakası, İran'dan alındı. Her vakanın iki örneği vardı, biri tümör ve diğeri aynı memeden ancak normal dokudan seçildi . Örneklere sahip olan kişiler çeşitli yaşlara sahipler. Örnek sayısı meme kanserin prevalansına göre yapılmış çalışmalara bakarak seçildi.

### **3.6.5. Yöntemler**

100 örnek 50 vakadan ikişerli paralel sıralanmada, dizilerek moleküler analiz olmak üzere iki aşamada değerlendirildi. Bu değerlendirmede 2 genin ( E-cadherin ve GSTP1), metilasyon durumu promotör bölgesinde, bisüfit sekanslama ve western blotlama yöntemleri ile araştırıldı.

#### **3.6.5.1. Bisüfit sekanslama**

E-cadherin ve GSTP1 genlerin promotör sekansında metilasyonunu belirlemesi, üç aşamada yapıldı.

#### **3.6.5.2. Meme dokusundan DNA izolasyonu**

##### **3.6.5.2.1. Yöntem**

DNP™ kiti, insan dokusundan çift iplikli DNA'nın izole etmesine özeldir. Bu prosedür, fenol çıkarımı yapılmadan , 30-35 dakika süresinde, bir aşamada tamamlandı. Bu yöntem hücrelerin parçalanmasıyla ve sonraki DNA prisipitasyonu ile tamamlandı, sonundada çözülmeyen DNA yıkanıp ve yıkama tamponuyla tuzu atıldı. Hücrelerin zarı proteinaz-k ve proteinaz tamponu ile 56°'de parçalandı ve proteinleri hidroliz edildi ve liziz tamponu ile (koloroform base) protein atıkları temizlendi. Son aşamada sulu fazda bulunan DNA, su veya Tris-EDTA(TE) 'da çözüldü ve UV spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'de, optik dansite (OD)'leri ölçülüp ve konsantrasyonu ve saflığı daha sonraki basamakta hesaplandı.

##### **DNA saflığının hesaplaması**

260/280'de, OD değeri, 1.7-2.0 arasında iyi ve saf DNA'yı gösterir. Bu değerden aşağıdaki değerler, protein ve fenol kontaminasyonunu, daha yüksek değerler ise, RNA kontaminasyonunu göstermektedir.

DNA konsantrasyonunun hesaplanması 260'de, OD miktarı her 1 OD, 50 µg DNA'ile eşdeğerlendirilir ve her örnek için DNA konsantrasyonu hesaplanır.

Konsantrasyon (µg DNA/ml):  $OD_{260} \times 50 \times 50$  (dilüsyon faktörü). Bu değer, spektrofotometre'de otomatik olarak hesaplandı ve DNA değeri µg/ml olarak elde edildi. Elde edilen miktar, örneğin tam hacminde hesaplanarak, DNA'nın tam konsantrasyonu belirlendi.

Bir örnek alalım:

N con(µg/ml)	T con(µg/ml)	N DNA con(µg)	T DNA con(µg)	N vol PCR	NvolPCR
762.1	2686.3	38.1	134.3	2.6	0.7





4. Proteaz tamponu	5ml
6. Yıkama tamponu	2×50 ml
7. Çözelti tamponu	2×1250µl

Şartlar: proteaz tamponu ve uzun süreli saklamak için, kitin tüm komponentleri, -20 derecede saklanmalıdır.

Kitin içereklere kullanmadan önce, oda sıcaklığına getirildi.

Liziz tamponunu 37° de 20 dakika bekletildi ve yavaşça miks edildi.

### **3.6.5.2.3. Protokol**

1. 1.5 µl'lik mikrosantrifüj tüplerde, 100 µl proteaz tamponu 25-50 mg örnek dokunun (donmuş ya taze) üzerine eklendi ve üzerine 5µl proteaz ilave edilip, 55° su banyosunda gece boyu bekletildi.
2. 100µl örneğin üzerine 400µl liziz tampon eklenip ve 15-20 saniye vortekslendi. Örneklerin süspansiyonu tamamen homojenize edildi, agregate varsa ufak pipetleme ile çözüldü veya kaldırıldı.
3. 300µl presipitasyon solüsyonu eklendi ve 3-5 saniye vortekslendi, 12000 g'de 10 dakika santrifüjlendi.
4. Tüpler yavaşça boşaltıldı ve supernatant atıldı, tüpler su alıcı kağıtta ters döndürüldü 2-3 saniye bekletildi. Bu basamakta kros-kontaminasyon oluşmamasına dikkat edildi.
5. 1ml yıkama tamponu tüpün dibine yapışmış pelete eklendi, 3-5 saniye vortekslendi ve 12000 g'de santrifüjlendi, supernatant atıldı .
6. 5'inci basamak tekrarlandı.
7. Yıkama tamponu su alıcı kağıt üstünden tamamen alındı ve 65° de 5 dakika bekletirildi ve kurutuldu.
8. Peletin üzerine 50 µl solvent tamponu eklendi ve 65° de 5 dakika bekletildi. Tüpün duvarları tamponla yıkandı ve kalan pelet de yavaşça pipetleme ile yıkandı.
9. RNA' ları kaldırmak için 2 µl Ribonükeaz A( tamamlanmış konsantrasyon 0.2 mg/ml cat. No EN0531) karışıma eklendi yavaşça mikslendi ve 10 dakika 37° de inkübe edildi.
10. Karışım 12000 g'de 30 saniye süreyle santrifüjlendi.
11. Çözülmemiş agregatlar sulu fazdan ayrıldı ve supernatantta saf DNA

kaldi ve yeni tüplere aktarıldı. DNA konsantrasyonu fotometre ile ölçüldü. DNA distile su yada TE tamponunda çözüldü ve buz dolabında saklandı.

### **3.6.5.3. Asetat sodyum ile DNA saflaştırması**

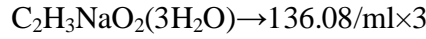
İzole olmuş DNA'ların verimi düşük olduğu takdirde, asetat sodyum saflaştırması ile muamele olundu .

#### **3.6.5.3.1. Yöntem**

1.7-2.0 değerinden az miktardaki DNA'lar, protein kontaminasyonunun olduğunu gösterir. Yüksek tuz konsantrasyonu ve etanol aracılığı ile proteinler presipite edilir.

#### **3.6.5.3.2. Çözeltiler**

1. Asetat sodyum 3 molar



40. 824 gr asetat pudrası 100 ml su da çözüldü ve asit HCL ile PH=5.2 'a ayarlandı. Kapaklı kapta saklandı.

2. Absolü etanol

Buz dolabında soğutuldu.

#### **3.6.5.3.3. Protokol**

1. 60 µl sulu DNA ya 60 µl 3 molar asetat sodyum eklendi.

2. 150 µl soğuk etanol eklendi ve pipetleme ile karıştırıldı.

3. -20°'de 1 saat beklendi ve 15 dakika 15000g'de santrifüjlendi.

4. Supernatant atıldı.

5. 500µl oda sıcaklığında %75 etanol eklendi.

6. 5 dakika 12000g'de santrifüjlendi.

7. Etanol basamağı tekrarlandı (%75 etanol).

8. Supernatant atıldı.

9. Pelet hava da kurutuldu.

10. Su ile dilüe edildi ve çözüldü (100-500µl) bu çözülmeyi kolaylaştırmak için en az 5 saat 50°'de beklendi ve arada yavaşça karıştırıldı.

### **3.6.5.4. DNA'nın bisülfıt muamelesi**

#### **3.6.5.4.1. Prensip**

Bu protokol'de tek iplikli DNA'da, sitozin rezidüleri sodyum bisülfıt aracılığı ile urasil rezidülerine dönüşür. Bu koşullarda elde edilen DNA sonraki işlemlerde spesifik primerler ile çoğaltılır, (baz çiftleşmesine göre urasil timini temsil ediyor). Bu protokol küçük uzunlukta olan nanogramlık DNA için uygundur. Standart protokol'de, 500 ng örnek kullanılır. Edle edilen elüte DNA çeşitli yöntemlerde kullanılabılır öm; PCR, RT-PCR, MSP-PCR, bisülfıt sekanslaması, BSP, mikrodizin ve pirosekanslama.

#### **3.6.5.4.2. Çözeltiler**

1.Sodyum asetat ( $C_2H_3NaO_2,3H_2O$ ) 3 Molar

408.24 gr →1000 ml su (pH:5.2)

2.Amonyum asetat ( $CH_3COONH_4$ ) 6 molar

462.48 gr→1000 ml su(PH:7.0)

3. NaOH 10 molar ve 3 molar

8 gr+ 20ml su→10 M

5.04+ 20ml su→3 M

(9 ml NaOH 10M+ 30ml su→3M NaOH)

4. Bisülfıt dönüştürücü solusyonu

54 gr sodyum bisülfıt + 100 ml su

6.66 ml hidrokinon (stok)

4000 µl NaOH 10M

Bisülfıtın hazır solusyonu (working )

5. Hidrokinonun stok solusyonu

0.044 gr hidrokinon + 10 ml su→ vortekslenir

kullanıma kadar alüminyum foliyo ile örtülür ve karanlıkta saklanır.

13.2 gr bisülfıt +24.4 ml su

1.63 stok hidrokinon solusyonu

977.8 ml NaOH 10 M

6. İzopropanol
7. Diyonize su
8. 70 derece etanol
9. Absolü etanol

#### **3.6.5.4.3. Protokol**

- 1.2µg DNA örneğin üzerine 50 µl diyonize su eklendi .
  2. 10 dk 100 derece su banyosunda kaynatıldı (DNA' nin çift ipliklerini tek iplikliye dönüştürmek için, bu işlem ile bisülfid muamelesi daha da verimli hale getirmektedir).
  3. Tüpler, su banyosundan hemen çıkartarak, buz içine koyuldu ( çift ipliğin tekrar oluşmaması için).
  4. 61 µl hazırlanmış NaOH 3M, 50 µl örneklere eklendi.
  5. Tüpler tekrar 0°C'de 1dk saklandı (dupleks oluşumun önlemesi için).
  6. 220 µl bisülfid-hidrokinon-NaOH solüsyonu, 300 µl örnek karışımına eklendi ve tüplerin kapağı sıkıca kapandı ve parafilm ile kapakların üzeri kapandı ve alüminyum foyl ile tüplerin üstü tekrar kapandı ve 8 saat 55 derece su banyosunda inkübe edildi.
  7. Tüpler su bayosundan çıkartılıp GeneJET pürifikasyon kit ile,( DNA örneklerin tuzu alınıp) pürifiye edildi.
- Kit komponentin hazırlaması:
- 9 ml yıkama tamponu + 45 ml absolü etanol'e eklendi.
  - 220 µl bağlanma (binding) tamponu, DNA karışımın üzerine eklendi. Karışımın son rengi sarı olmalıdır . Turunç veya mor rengin oluşumu gözlenirse, 10 M asetat sodyum'dan 10µl eklendi ve sarı renk oluşturdu (PH dengesi sağlanır).
  8. DNA' nın verimini artmak için, 2:1 ornaı ile izopropanol eklendi (220µl) yavaşça karıştırıldı.
  9. 800 µl örnek karışımından (960µl) tüplere aktarıldı (her örneğe tüp hazırlandı ve üzerine numarası yazıldı) 30-60 saniye 10,000 rpm hızında santrifüjlendi ve alttaki kısım (flow through) atıldı.
  10. DNA'nın geri kalan kısmını tüpe ekleyip ve tekrar santrifüjlendi ve çıkan atık (flow throgh) atıldı.
  11. 700µl etanol ile sulanan hazırlanmış yıkama tamponundan, tüplere eklendi ve 30-60 saniye 10000 rpm hızında santrifüj edildi ve çıkan atık (flow throgh) atıldı.

12. Boş tüpler, 1 dakika daha santrifüjlendi ve kalan etanol karışımı çıkartıldı.
  13. Tüplerin içindeki kolonler yeni temiz kapaksız tüplere aktarıldı ve örneklerin numaraları üzerine yazıldı.
  14. 50 µl elüsyon tamponundan kolonlerin tam dibine ve ortaya (duvarlara dokunmadan) eklendi ve 1 dk santrifüjlendi, (10 kb'dan fazla DNA'ya bu tampon 65°C'de ısıtlanır) kolonler atıldı.
  15. 2µl NaOH 3M, elde edilmiş DNA'nın üzerine eklendi (55µl), pipetleme ile karıştırıldı ve 37 derecede 15 dakika inkübe edildi bu işlemin adı desülfünasyondur.
  16. 5.4µl, asetat amonyum ve 6 M ve 61µl absölu etanol, DNA'ya eklenip ve 1 saat -20 derece derin dondurucuda saklandı.
  17. DNA peletini elde etmek için, tüpler -4°C'de 15 dakika maksimum hızda santrifüjlendi.
  18. Çok dikkat ile supernatant alındı ve 180µl 70 derece etanol pellete eklendi ve 15 dakika -4°C'de santrifüj edildi.
  19. Etanol tamamen atıldı ve DNA peleti oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve kurutuldu.
  20. Pelet, 50µl diyonize su ile sulandırıldı.
- Sonraki işlemlerin başlamasına kadar eldeki DNA buz dolabında saklandı.

#### **3.6.5.5. Bisülfite özel PCR (BSP)**

Bu yöntemde araştırılan 2 genin promotör sekansına uygun primerler dizayn edildi. Bu primerlerde metilasyondan kaynaklanan yanlış amplifikasyonu önlemek için, CpG içeren bölgeler, çift nükleotid olmamalı ve modifiye olmamış DNA'nın amplifiye olmaması için primer dizisinde, non-CpG sitozin içermelidir. Negatif kontrol olarak, bisülfite ile muamele olunmamış genomik DNA kullanıldı ve pozitif kontrol olarak, hazır tüm metillenmiş DNA örneği kullanıldı.

##### **3.6.5.5.1. E-cadherin geninin promotör bölgeleri ve BSP dizisi ve amplicon büyüklüğü**

E-cadherin geninin sekansı

Accession no:L34545

S1 nt;836-861

S2 nt;965-940

CAAT signal:958-962

Exon 1022...1193

1 tctagaaaa tttttaaaa aattaggccg ctcgagcgag agtgcagtgg ctcacgcctg  
61 taatccaaca cttcaggagg ctgaagaggg tggatcacct gaggtcagga gttccagacc  
121 agcctggcca acatggtgaa accccgtctt gtactaaaa tacaaaatta gccggtgtgg  
181 tggcacacgc ctgtagtccc agctactcaa taggctgaga caggagagtc tcttgaacce  
241 ggcaggcgga ggttgcagtg agccgagatc gtgccactgc actccagcct gggcaagaca  
301 gagcgagact ccgtctcaaa aaatacaaac aaaacaaca acaaaaaat taggctgcta  
361 gctcagtggc tcatggctca cacctgaaat cctagcactt tgggaggcca aggcaggagg  
421 atcgcttcag cccaggagtt cgagaccagg ctgggcaata caggagagaca cagcgcctcc  
481 actgcccctg tccgccccga cttgtctctc tacaaaaagg caaaagaaaa aaaaaattag  
541 cctggcgtgg tgggtgtcac ctgtactccc agctactaga gaggctgggg ccagaggacc  
601 gcttgagccc aggagtcca ggctgcagtg agctgtgatc gcaccactgc actccagctt  
661 gggtaaaaga gtgagcccca tctcaaaac gaacaacaa aaaatccca aaaacaaag  
721 aactcagcca agtgtaaaag cctttctga tcccaggtct tagtgagcca ccggcggggc  
781 tgggattcga acccagtgga atcagaaccg tgcaggtccc ataaccacc tag**accctag**

841 **caactccagg ctagagggtc** ac **cg cg** tcta tg**cg**aggc **cg** ggtggg **cg**gg **cg**tcagctc

863,865 873 879 887 892

901 **cg**ccctgggg aggggtc **cg c g**ctgctgatt ggctgtggc **c g****gcaggtgaa ccctcagcca**

901

918,920

940

**961 atcagcggtta** cggggggcgg tgctccgggg ctacactggc tgcagccacg caccctct

1021 cagtggcgtc ggaactgcaa agcacctgtg agcttgcgga agtcagtca gactccagcc

1081 cgtccagcc cggcccgacc cgaccgacc cggcgctgc cctcgtcgg cgtccccggc

1141 cagccatggg cccttggagc cgcagcctct cggcgctgct gctgctgctg cag

//

Seq orig : cctag caactccagg ctagagggtc a

convert ttag taatttagg ttagagggtta

F : ttag taatttagg ttagagggtt (836-861)

Seq orig : cggcaggtgaa ccctcagcca atcag

convert tgtaggtgaa ttttagtta attag

R : ctaattaact aaaaattcac ctacc (940-965)

Amplikon: 5' ttagagggtt a atcgcgttta tgcgaggtcg ggtgggagg tcttagttt

901 cgttttgggg aggggttcgcggtttgtgatt ggtgtggtcgggtgatgg ttt 3' (81 nt)(ful metillenme,dönüşmemiş )

CpG noktaları: 863,865,873,879,887,892,901,918,920,940.

### 3.6.5.5.2. E-cadherin primerlerinin prensibi

E-cadherin geninin promotör bölgesine ait sekansa göre primerler dizayn oldu, düz (forward) primer nt 836-861 ve ters( reverse) primer nt 965-940 pozisyonunda yerleşmiştir.

5'-TTT AGT AAT AGG TTA GAG GGT T -3'(forward) , MT 61.7°C

OD(1000µl) 6.8 , 26251.45 pmol, konsantrasyon (µM/500µl): 52.50

Stok solüsyonun hazırlama konsantrasyonu: 9.5µl/50µl (10µM hazırlamak için).



5'-CTA ATT AAC TAA AAA TTC ACC TAC C -3'(reverse), MT 60.3°C

OD(1000µl)8.5, 33833.09 pmol, konsantrasyon (µM/500µl):67.67

Stok solüsyonun hazırlama konsantrasyonu: 7.4µl/50µl (10µM hazırlaması için)

### 3.6.5.5.3. Çözeltiler

#### 1. 1. dNTP karışımı

100mM dNTP 'den, 20µl alıp ve 200 µl dedistile suya ekler ve son konsantrasyonunu 10mM hazırlandı, çalışma sırasında, bu karışımdan 2µl alındı, 100µl'lik PCR karışımında, son konsantrasyonu 200µM( 0.2mM) oluşturuldu.

#### 2. Primerlerin hazırlanması

E1 (3') primer 262 µl dedistile su primer tübüne eklendi (×100µM)

E2 (5') primer 238.3 µl dedistile su primer tübüne eklendi (×100µM)

### 3.6.5.5.4. E-cadherin için amplifikasyon protokolü

Protokol kurulduktan sonra, E-cadherin geninin promotör bölgesinin çoğaltılması için seçildi;

PCR karışımı :

DNA	—————→	2µl (2µg)
Primer E1	—————→	0.8µl (0.4 µM) (woking:10µM)
Primer E2	—————→	0.8µl (0.4 µM) (working 10µM)
10X tampon	—————→	2µl (1X)
dNTP	—————→	0.4 µl (0.2mM)
Mgcl2	—————→	0.6 µl (1.5mM)
Taq polimeraz	—————→	0.2 µl (1.2 unit)
ddH2O	—————→	12.2 µl
DMSO	—————→	1 µl
Son hacim	—————→	20 µl

### 3.6.5.5.5. *E-cadherin için termal döngü*

Amplifikasyon karışımını içeren 0.2 µL'lik eppendorf tüpleri termal döngüsünün aletine (Cyclogene Techne FPHC3CD) yerleştirildikten sonra, aşağıdaki sıcaklık ve süreler uygulandı. Son döngü, polimerizasyon için uzun tutuldu.

- 95°C 5dk
- 94°C 30 sn 30 döngü
- 54°C 30 sn
- 72°C 30 sn
- 72°C 5dk son döngü
- 10 °C 60 dk

### 3.6.5.5.6. *GSTP1 geninin promotör bölgesi ve BSP dizisi ve amplicon büyüklüğü*

>|cl|36449

Length=327

4979-5306

5' **tcctaggccccctggggacctgg**gaaagagggaaaggctccccggccagctgcgcggc

Convert (F.P) 5' ttttagttttgttggggatttgg

gactccggggactccaggggcggccctctgcggccgacggccggggtgcagcggccgccggggctggggccggcgggagtcgcggg  
gacctccagaagagcggccggcggcgtgactcagcactggggcggagcggggcgggaccaccttataaggctcggaggccgcga  
ggccttcgctggagtttcggcggcagctcttcgccaccagtgagtacgcggcccgctccccggggat**gggg**  
**ctcagagctcccagcatgggg** 3'

Convert :ggggtttagagtttttagtatgggg

R.P:3' ccccaaatctcaaaaatcatacccc 5'

### 3.6.5.5.7. *GSTP1 geninin promotör bölgesinde CpG noktaların dizi sayısı*

- gi|237820690|ref|NG\_012075.1| Homo sapiens glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1) on chromosome 11 nt 4979-5306(327)CpG sites:-197,-190,-187,-185,-182,-176,-162,-155,-152,-148,-145,-141,-131,-129,-127,-124,-112,-109,-101,-99,-81,-77,-74,-71,-53,-48,-43,-22,-15,-13,-4,+8,+11,+14,+23,+38,+40,+42,+47,+54.(n=36)

197 190,187,185,182

Amplicon:4979tcctaggccccgctggggacctgggaaagaggaaaggcttccc**cg**gccag**ctgcgcg****gcg**

176 162 155,152 148,145, 141 131 127,124

actc**cg**gggactccaggg**cg**cccct**ctgcg****ccga****cg**cc**cg**gggtgcag**cg****ccg****ccg**gg

112 109 101,99 81 77 74,71

gctgggg**ccg****cg**gggagt**ccg****cg**ggaccctccagaagag**cg****ccg****cg****ccg**tgactcagc

53 48 43 22 15,13 4

actgggg**cg**gag**cg**ggg**cg**ggaccacccttataaggct**cg**gagg**ccg****cg**aggcctt**cg**ct

8,11,14 23 38,40,42 47 54

ggagtt**ccg****ccg****ccg**cagctt**cg**ccaccagtga**gcg****cg**gc**ccg**ctcc**cg**gggatggggctcagagctcccagcat

gggg 5306 (n=327)

### 3.6.5.5.8. GSTP1 primerlerinin prensibi

- GSTP1 geninin promotör bölgesine ayit sekansa göre primerler dezayn oldu, düz (forward) primer nt 4954-4979 ve ters (reverse) primer nt 5281-5306 pozisyonunda yerleşmiştir.
- G1(F)5' TTTGGGAAAGAGGGAAAGGTTTT3' MT: 66.4°C OD (1000µl):5.9 MV: 7222 konsantrasyon (pmol): 24508.45 konsantrasyon (µM) 500 µl' de: 49.02, 50 µl hazır solüsyon için gereken stok primer solüsyonundan gereken hacmi (10µM): 10.2, 100 µ M'lük stok solüsyon hazırlaması için gereken dd su hacmi: 245.08 µM
- G2(R)5' CCCATACTAAAACTCTAAACCCC3' MT:64.3°C OD (1000µl):7.5 MV:7468 konsantrasyon (pmol):30128.55 konsantrasyon(µM) 500 µl' de:60.26 50 µl hazır solüsyon için gereken stok primer solüsyonundan gereken hacmi (10µM):8.3 100 µM'lük stok solüsyon hazırlaması için gereken dd su hacmi: 301.29 µM .

### 3.6.5.5.9. Çözeltiler

#### 1. Primer hazırlaması

G1 (3') primer 100 µM'lük stok solüsyon hazırlaması için gereken dd su hacmi: 245.08 µM

G2 (5') primer 100  $\mu\text{M}$ 'lük stok solüsyon hazırlaması için gereken dd su hacmi: 301.29  $\mu\text{M}$

### 3.6.5.5.10. *GSTP1* için amplifikasyon protokolü

Protokol setup olduğundan sonra bu protokol *GSTP1* geninin promotör bölgesinin çoğaltılması için seçildi;

PCR karışımı :

DNA	.....>	2 $\mu\text{l}$ (2 $\mu\text{g}$ )
Primer G1	.....>	1.25 $\mu\text{l}$ (0.5 $\mu\text{M}$ )
Primer G2	.....>	1.25 $\mu\text{l}$ (0.5 $\mu\text{M}$ )
10X tampon	.....>	2.5 $\mu\text{l}$ (1X)
dNTP	.....>	0.25 $\mu\text{l}$ (0.1mM)(stok: 10mM)
MgCl <sub>2</sub>	.....>	0.56 $\mu\text{l}$ (1.125mM)(stok:50mM)
Taq polimeraz	.....>	0.2 $\mu\text{l}$ (1.2 unit)
ddH <sub>2</sub> O	.....>	17.74 $\mu\text{l}$
DMSO	.....>	1.25 $\mu\text{l}$
Son hacim	.....>	25 $\mu\text{l}$

### 3.6.5.5.11. *GSTP1* için termal döngüsü

Amplifikasyon karışımını içeren 0.2  $\mu\text{L}$ 'lik eppendorf tüpleri termal döngüsü aletine (Cyclogene Techne FPHC3CD) yerleştirildikten sonra aşağıdaki sıcaklıklar ve süreler uygulanmıştır. Son döngü, polimerizasyon için uzun tutuldu.

- 95°C 1dk
- 94°C 30 sn 30 döngü
- 58°C 40 sn
- 72°C 45 sn
- 72°C 5dk son döngü
- 10 °C 60 dk

### **3.6.5.6. Poliakrilamid jelin hazırlaması**

#### **3.6.5.6.1. Prensiip**

Poliakrilamid jel elektroforezi DNA molekülünün (PCR ürünü) tanımlanması, ayrıştırılması ve saflaştırılması amacıyla kullanılır. Elektriksel bir ortamda akrilamid jel içinde bulunan DNA molekülleri, içerdikleri nükleotit sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler (Sambrook et al,1989).

#### **3.6.5.6.2. Çözeltiler**

1. 5X TBE tamponu: (445mM Tris base, 445 mMBoric acid,10 mM EDTA)

Tris base 540 gr

Borik asit 275 gr

Na<sub>2</sub> EDTA,2H<sub>2</sub>O 37.2gr

1 litre'ye kadar distile su ile yetişir.

2. Amonyum per sülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (10%)

1gr +10 ml su

2. AgNO<sub>3</sub>(1%)

1gr +100 ml su

4. NaOH (%37.5)

5. %30 poliakrilamid

29 gr pudra+ 1 gr Bis ve hacmi 100 ml distile suda tamamlanır.

6. Poliakrilamid jelin hazırlaması

26.3 ml ddH<sub>2</sub>O

13.3 ml %30 Akrilamid

10 ml 5 X TBE

700 µl Amonyum per sülfat

30 µl TEMED

(% 8 polikrilamide hazırlandı)

(ilk 2 ml karışıma 3 µl TEMED ekleyip ve camın dibine ekleyip ve jelin geri kalanına 27 µl TEMED eklendi), Jelin sertleşmesine kadar beklendi ( 30 dakika).

6. Boyama hazırlıkları

Yürütme boya (loading dye)'nin hazırlaması

EDTA 0.5 M 200 µl  
Xylen Cyanol 15 mg Formamid'ile hacmi 10 ml'ye yetiştirildi.  
Bromophenol mavisi 3 mg

#### 3.3.1.4.3 Protokol

50 ml Etanol  
2 ml Asetik asit

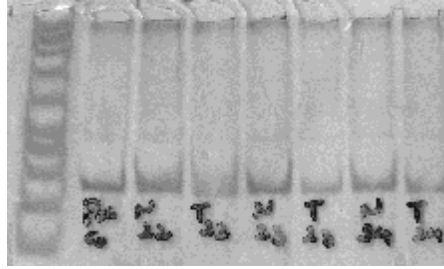
500 ml suyu ile hacme yetştirilir

Elde edilmiş hacim iki basamak'ta jele eklendi ve her seferinde, 3 dakika karıştırıldı.

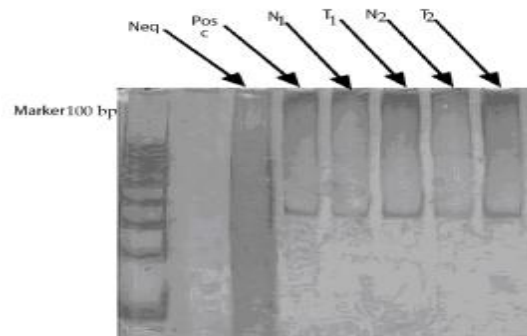
İkinci basamakta: 25 ml AgNO<sub>3</sub>( %1)→Su ile 250 ml'e ayarlandı ve  
20 dakika karıştırıldı.

Son basamak'ta: 10 ml NaOH(%37.5)  
2 ml Formaldeit

Karıştırıldı ve karışıma eklendi ve 5-10 dakika karıştırıldı ve renkleme tamamlandı.



Şekil 16.E-cadherin için bisülfite özel PCR ürününün bandları



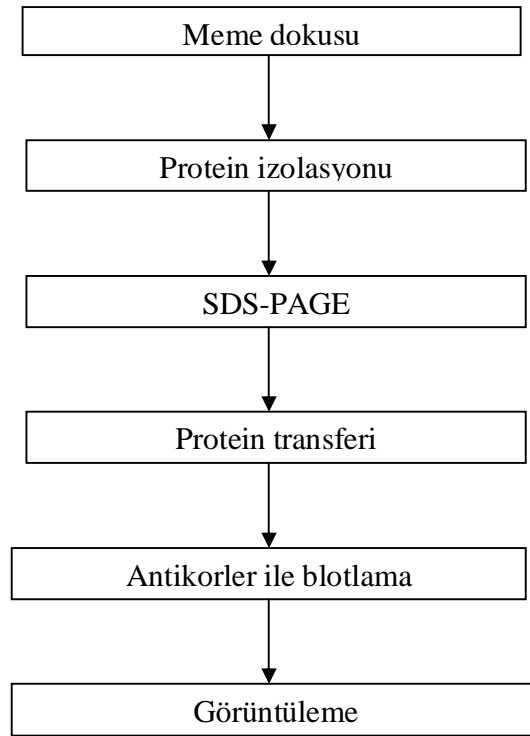
Şekil 17.GSTP1 için bisülfite özel PCR ürününün bandları

### 3.6.5.6.3.Yöntem

Poliakrilamid karışımını, 500 ml'lik erlen mayer'de erittikten sonra, aplikasyon tarağını içeren jel kabına ilk 2 ml'lik karışım döküldü ve donması beklendi ve daha sonra (yaklaşık 5 dk) geri kalanı eklendi. Poliakrilamid jell, 1xTBE tamponuyla dolmuşla elektroforez tankının içine yerleştirildikten sonra tarak çıkartıldı. Jelde oluşan kuyucuklara, 3µL amplifiye DNA ve 2µL yükleme tamponu aplike edildi. 150 voltaj'da 30 dakika, elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforez sonrası, jel boyandı ve DNA bandlarının boyanması sağlandı. Daha sonra jel , distile sudan dolu kap içinde yarım saat bekletilerek, boya atıklarının temizlenmesi sağlandı. Son aşamada ise, jel UV lamba altına alınarak DNA bandları görünür hale getirildi ve polaroid kamera ile fotoğrafı çekilerek değerlendirildi (Şekil 16 ve 17).

### 3.6.5.7. Western Blotlama

#### 3.6.5.7.1. Prensip



Şekil 18.Gen ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi''Western blot''

### **3.6.5.7.2. Çözltiler**

#### **3.6.5.7.2.1 %12 Poliakrilamid (loading jel)**

Distile su	3.4 ml
%30 akrilamid miks	4ml
Tris 1.5 mol (PH=8.8)	2.5ml
%10 SDS	100µl
%10 APS	50µl
TEMED	5µ son hacim: 10 ml

Note: Karışım miksi TEMED ve APS'den hariç, 15 dakika önce hazırlanabilir.

#### **3.6.5.7.2.2. % 8 Poliakrilamid (loading jel)**

Distile su	4.7 ml
% 30 akrilamid miks	2.7 ml
Tris 1.5 mol ( PH=8.8)	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	50 µl
TEMED	5 µl son hacim: 10 ml

Not: Karışım miksi TEMED ve APS'den hariç, 15 dakika önce hazırlanabilir.

#### **3.6.5.7.2.3. %5 Poliakrilamid (Stacking jel)**

Distile su	540µl
% 30 akrilamid miks	200 µl
Tris 1.0 mol ( PH=6.8)	250 µl
% 10 SDS	10 µl
% 10 APS	5 µl
TEMED	1 µl son hacimi: 1 ml

#### **3.6.5.7.2.4. Protein yükleme ( loading) boyası**

2-merkaptöetanol	100 µl (buz dolabında)
Loading tampon	1000 µl (1ml)(oda sıcaklığında)



**3.6.5.7.2.5. 1.5 X Tris (Resolving tampon)**

Tris-base	27.23 gr
Ultra saf su	150 ml
Hcl	2µl; PH (8.8) son hacmi: 100 ml

Not: 80 ml Tris base'e su eklendi ve PH=8.8 de 6N HCL ile ayarlandı daha sonra total hacmi su ile, 150'ye yetiştirildi, filtre olup ve 4°C'de saklandı.

**3.6.5.7.2.6. 0.5 X Tris (Stacking tamponu)**

Tris-base	6gr
Ultra saf su	100 ml

Not: 60ml Tris base'e suyu ekleyip ve PH=6.8 de 6N HCL' ile ayarlanır daha sonra total hacmi, 100 ml su ile yetiştirildi, filtre olup ve 4°C'de saklandı.

**3.6.5.7.2.7. %10 SDS**

SDS (fw 288.38)	10gr	Son konsantrasyon 1.5M
Ultra püre su	100ml	

Not: yavaşça karıştırıldı.

**3.6.5.7.2.8. %10 Amoniyum persülfat (APS)**

Amoniyum persülfat (fw 228.20)	0.010 gr	Son konsantrasyon % 10
Ultra pure su	0.100 ml	

**3.6.5.7.2.9. Örnek (sample) tamponu 2× (Reducing buffer)**

0.5M Tris-HCl, pH 6.8	25ml	Son konsantrasyon 0.125M
Gliserol	25ml	Son konsantrasyon % 25
SDS % 10	40ml	Son konsantrasyon % 4
Bromofenol blue	4ml	Son konsantrasyon % 0.02
Duble distile su	4ml	

Not: Oda sıcaklığında saklanır. Kullanıma hemen başlamadan, 20µl β-Merkaptoetanol dan her 980µl 2× örnek tamponuna eklendi. Örnek ile 1:1 karıştırıldı.

**3.6.5.7.2.10. Tank tamponu (running or migration) (10X)**

Tris-base (fw 121.1) 30.3gr Son konsantrasyon % 0.025 M

Glaysin (fw 75.07) 144.0 gr Son konsantrasyon % 0.192 M

SDS 10.0 gr Son konsantrasyon % 0.1

Duble dionize su ile 1000 ml'ye kadar ayarlandı (4°C'de saklanır, çökmüşse, kullanmadan önce oda sıcaklığına konulur)

Çalışma(working) tamponu:

450 ml distile su + 50 ml stok

**3.6.5.7.2.11. TAE tamponu 50X (Komasi mavısının yıkaması için)**

Tris base 60.5 gr

Asetik asit 14.3 ml

EDTA (0.5 N) 25 ml dionize su ile hacmini 300 ml'ye ayarlandı.

**3.6.5.7.2.12. Aktarma (transfer) tamponu**

Tris base 3.03 gr (25mM)

Glaysin 14.4 gr (192 mM)

Metanol 200 ml (20 %) PH: 8.3

Double distile su 1000 ml' kadar eklendi.

**3.6.5.7.2.13. Bloklama tamponu**

Skim milk 1 gr Son konsantrasyon % 5

Gliserol 1 ml Son konsantrasyon % 5

TTBS ile 40ml kadar ayarlandı.

**3.6.5.7.2.14. Liziz tamponu**

**3.6.5.7.2.14.1. Liziz tampon(stok)**

1) Tris HCL 200 mM (PH=7.5) 6.3 gr

2) NaCL 1.5 mM 0.0175 gr

3) EDTA(Na<sub>2</sub>) 10 mM 0.74 gr

- 4) Triton X100 % 10 20 ml  
5) SDS % 0.1 2.7 ml  
6) Ultra saf su su ile, 10ml'ye ayarlandı

**3.6.5.7.2.14.2. Liziz tampon ( working):**

- 1) Proteinaz inhibitörü 7.7 mg  
2) liziz tamponunun stok solüsyonunu 1ml

**3.6.5.7.2.15. TBS 10× ( konsantre)**

- Tris HCl (fw 157.60) 7.88gr Son konsantrasyon 100 mM  
NaCl (fw 58.44) 4.5 gr Son konsantrasyon % 0.9  
Ultra püre su ile 500 ml'ye kadar karıştırıldı

Not: PH miktarı, 1N NaOH ile 7.5'a ayarlandı ve 2 aya kadar 4°C'de saklanılabilir.

1 lit'e kadar su eklendi

**3.6.5.7.2.16. TTBS (Tween Tris Buffered saline)**

- TBS 10× 100 ml  
Tween 20 50µl Son konsantrasyonu % 0.05

**3.6.5.7.2.17. SDS Akriyamit stok solüsyonu (% 30T-%2.6C)**

- Akriyamit (fw 71.08) 30 gr Son konsantrasyon % 30  
N'N'-bis-methylene-akriyamit (fw 154.17) 0.8 gr Son konsantrasyon % 0.8  
Ultra pure su 100 ml' kadar eklendi

Not: 0.45 filtre kağıdı ile filter olup ve 4°C'de maksimum 30 güne kadar saklana bilir.

**3.6.5.7.2.18. Ponso S boyası**

Ponso S boyası 1:10 stok solüsyonundan hazırlanır .% 2 ponso S, % 30 trikloroasetik asit ve % 30 sulfosalisilik asit, 5 dakika ajitatörde beklendi.

### **3.6.5.7.2.19. Proteinaz inhibitör kokteli**

Market'de hazır tabletler (Complete protease inhibitor cocktail tablets in glass vials, cat no: 11697498001, Roch) kullanıldı. Bir tablet 2 ml dd suda çözüldü (25 X) ve her seferinde 1ml inhibitör, 9 ml liziz tamponu eklendi.

### **3.6.5.7.3. Proteinin İzolasyonu**

#### **3.6.5.7.3.1. Dokulardan total protein izolasyonu:**

-80 derecede, 25 mg'lik donmuş örnekleri buz üstünde tutarak porselen zarfda yerleştirerek üzerine 10-20 ml sıvı azot eklendi ve ezildi. Sıvı azot biter bitmez, üzerine 200 µl liziz tamponu eklendi ve homojenize edildi. Örnekler homojenize edildikten hemen sonra, tüpler içinde proteinazı inhibe etmek ve protein ekstraksiyonu için, buz üzerine konuldu ve 3-4 dakikada vorteksenerek, 20-30 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpler hücre debrilerinin uzaklaştırılması için 15,000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatant yeni bir tüpe alındı ve protein miktarının belirlenmesi aşamasına geçildi.

#### **3.6.5.7.3.2. Hücre Kültüründen protein izolasyonu**

Pozitif kontrol için meme (MCF-7) ve prostat (PC-3) hücre kültüründen protein izole edildi. 100 mm'lik hücre kültür kabına triptan mavisi ile sayılarak ekilen hücreler % 70 yoğunluğa ulaştığında, % 2 FBS içeren standart ortam içerisinde 16 saat serum açlığına maruz bırakıldı.

Hücre sayısı/ ml'de:

$$\frac{\text{Total sayılmış hücreler}}{\text{Karelerin sayısı}} \times (\text{dilüsyon faktörü}) \times (10,000)$$

Karelerin sayısı

Örnek; dilüsyon faktörü 2 and karelerin #'i 10'dur

$$(\text{örnek: } 62/10 \times 2 \times 10^4 = 1.24 \times 10^5)$$

Canlı hücrelerin yüzdesi:

$$\frac{\text{\# of canlı (viable) hücreler}}{\text{total sayılmış hücre sayısı}} \times 100$$

total sayılmış hücre sayısı

$$\text{örnek } 54/62 \times 100 = 87.09\%$$

Tablo 4 .Tavsiye olmuş liziz tamponunun miktarı

(<http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure>, 2011)

Hücre tipi	Elde edilen miktar	Liziz tamponunun hacmi
Doku kültürü	10 <sup>7</sup> hücre veya 100 mm petri diş'den	1ml
Tüm doku	100miligram	2 ml' eklenip ve sonike olup veya homojenize olunur
Bakteri	Örnekler karıştırılıp ve hacmi hesaplanır	10 ml' eklenip ve vorteks olunur
Maya	Örnekler karıştırılıp ve hacmi hesaplanır	10 ml' eklenip ve sonike olup veya cam yuvarlaklar ile vortekslenir

hücreler buz üzerine alındı ve ortamları uzaklaştırıldı ve soğuk PBS'ile 2-3 kez yıkandı. 1 ml PBS eklendi ve pompaj ederek hücreler kaldırıldı ve 1.5 ml'lik tüpler içerisine alındı. Bir kez daha flaks kazıca ve PBS tamponu ile kazıldı ve tüplere aktarıldı. Hücreleri çöktürmek için 1,500g'de, 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant'daki PBS atıldıktan sonra, hücre pelletinin hacminin üç katına kadar liziz tamponu eklenerek (Tablo 4), tüpler buz üstünde protein ekstraksiyonu için 30 dakika ajitator üzerinde bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpler hücre debrilerinin uzaklaştırması için 15,000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Proteinleri içeren supernatant yeni tüpe alındı ve protein miktarının belirlenmesinin aşamasına geçildi. Hücre lizatını hemen kullanmak istenmediği takdirde, birkaç hafta için -20 °C'de ve uzun süreli saklamak için, -80°C'de çalışma zamanına kadar tutulabilir.

#### 3.6.5.7.4. Protein miktarının belirlenmesi:

Protein miktarlarının belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanıldı. Bradford solüsyonuyla örnekler karıştırıldı ( 1 ml Bradford solüsyonu + 20 µl liziz tamponu + 20µl örnek) optikal dansitesi 595 nm'de ölçüldü. Bovin serum albumini (BSA) standart protein olarak kullanılır. Hesaplamaların açıklaması:

Örnek OD'si (µg/µl)

1µl (protein verimine göre değişilir)

35(optimum konsantrasyon) X

X=A örnek sayısı: A $\mu$ l +A $\mu$ l (2x loading tamponu) + (son hacim örn: 25 $\mu$ l -2A)

Örnek 1: N35 5.33  $\mu$ g/ $\mu$ l 1 $\mu$ l

35  $\mu$ g/ $\mu$ l 6.57

6.57+6.57(2x) +11.87(1x) yürütmeye hazırlanan solüsyon

Örnek 2: T12 19.82  $\mu$ g/ $\mu$ l 1 $\mu$ l

35  $\mu$ g/ $\mu$ l 1.76

1.76+ 1.76 (2x) + 21.48 (1x) yürütmeye hazırlanan solüsyon

Kullanacak örnek hacimi belirlendikten sonra örnekler jelin kuyusunda yerleştirildi.

Proteinin veriminin iyi olduğundan emin olduktan sonra, örnekler jelde yürütmek için sonraki basamağa geçildi. GSTP1 için kullanılan marker firma tarafından (Fermentaz):118, 90, 50, 36, 27 ve 20 boyutlarda ve E-cadherin için elde hazırlanmış marker: 213,170,116,76 ve 53 boyutlarda kullanıldı.

### **3.6.5.7.5. Proteinin SDS-PAGE poliakrilamid jelinde yürütülmesi**

#### **3.6.5.6.5.1. Yürütme için örneklerin hazırlanmasının prensibi**

Tipik olarak antikorlar, istenen proteinin sadece küçük kısmına (epitop) yapışıp ve çoğunluğunda bu bölge 3D konformasyonda yerleşmiştir ve antikorun buna ulaşması için proteinin katlarının açılması ve denatüre edilmesi şarttır. Buna göre yürütme tamponunda anyonik denatüre edenler (sodyum dodesil sülfat, SDS) kullanımı gerekmektedir ve 95-100 derecede'de kaynatma veya 70 derece'de (5-10 dk)'da faydalıdır.

Standart yürütme tampon 2 $\times$  'Laemmli' adlandırılan bir tamponudur (PH=6.8). SDS'in kullanımında, proteinlerin yükü tamamen SDS'in anionlarına yapışıp ve negatif olur. SDS'in proteinlere yapışması ve denatüre etmesinin oranı (1.4:1)' dır. Bu yüzden proteinlerin göç etmesi elektrik yükünün aracılığı ile değil, moleküler boyutun ağırlığıyla meydana gelir. SDS'in kalite ve tazeliği proteinlerin net ve iyi ayrılması ve arka plan (background)'nin azaltmasını sağlar. DTT veya 2ME disülfid köprülerin azalması için kullanılır. Gliserolün rolü, örneğin dansitesini artırması ve koyucuğun dibinde tutmasıdır. Proteinlerin göçünü izlemek için yürütme tamponuna az miktarda anyonik boya (bromofenol mavisi) eklenir. Örneklerin muamele sırasında ve kaynatmanın önce ve sonrasında vortekslenmesi iyi verime neden olacaktır.

### 3.6.5.7.5.2. PAGE jelin hazırlamasının prensibi

Poliakramit jeli, SDS' ile birlikte SDS-PAGE olarak adlandırılır. Bu yöntem ile proteinler kendi moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar (Tablo 5). Poliakrilamid iki maddeden oluşmuştur (akrilamid ve N,N-methylenebis-akrilamid, Bis). Bis bir 'cross-link' edici ajandır. Amonyum persülfat ve TEMED ile polimerize olayı başlatılır. Jel, hidrofil ve uzun karbohidratların üç boyutlu bir ağıdır. Jelin içindeki deliklerin boyu, ayrılan moleküllerin büyüklüklerini etkiler. Bu deliklerin boyutu iki faktör ile etkilenir: 1. akrilamidin miktarı (%T) 2. Kros-linkerin miktarı (% C). Akrilamidin miktarı arttıkça, deliklerin boyu azalır. Kros-linkerin % 5'i en küçük delik boyunu oluşturur. Bu yüzden, % C'in azalması veya artması deliklerin değişimine sebep olur. Akrilamidin son hacmi (w/v) ve bis'ile birlikte hazırlanır. % 7,5 T'in anlamı, 100 ml jelde, 7,5 akrilamid ve bis'in içermesidir. % 7,5 T:% 5'in anlamı;7.5 (w/v) akrilamid + bis ve bisin total hacmi % 5 olmasıdır. Genel kural olarak proteinin boyutu ne kadar küçükse, mono/bis yüzdesi artmaktadır.

GSTP1, için % 10'lik, E-cadherin için ise % 8'lik (proteinin boyutunun büyük olması nedeniyle) poliakrilamid jeli kullanıldı.

Tablo 5. Jelin yüzdesi ve protein büyüklüğü

(<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>)

Proteinin büyüklüğü (KD)	Jelin yüzdesi (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

Tablo 6. Poliakrilamid jel içeriği

10 ml'lik Jel monomer solüsyonunun hazırlama klavuzu:

30 % Degassed

(<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296.PDF>)

Jel Yüzdesi	DD H <sub>2</sub> O (ml)	Akrilamid/ Bis	Jel Tamponu (ml)	10% w/v SDS (ml)
4%	6.1	1.3	2.2	0.1
5%	5.7	1.7	2.5	0.1
6%	5.4	2.0	2.5	0.1
7%	5.1	2.3	2.5	0.1
8%	4.7	2.7	2.5	0.1
9%	4.4	3.0	2.5	0.1
10%	4.1	3.3	2.5	0.1
11%	3.7	3.7	2.5	0.1
12%	3.4	4.0	2.5	0.1
13%	3.1	4.3	2.5	0.1
14%	2.7	4.7	2.5	0.1
15%	2.4	5.0	2.5	0.1
16%	2.1	5.3	2.5	0.1
17%	1.7	5.7	2.5	0.1

\* Resolving Jel Tamponu -1.5 Tris – HCl, pH 8.8

\* Stacking Jel Tamponu -0.5 M Tris –HCl, pH 6.8

### 3.6.5.7.5.3. Yöntem

A. Jel yükleme camları kapatılıp ve agaroz jel ile dolduruldu. Yukarıdaki poliakrilamid jeli (separating jeli, E-cadherin için %10 ve GSTP1 için % 8 ) (Tablo 7) eklendi ve 1.5 santimetre camın yukarısına kalmış, %5 ploiakrilamid jeli ( stacking jel) eklendi( formülün üzerinden hazırlanır: %10 jelin hacmi 10 ml ve % 5 jelden 5 ml). %10 jeli cama eklendikten sonra, beklendi ve üzerine izopropanol eklendi. Bunun amacı jelin düzeyini belirlemektir. Jeli dondurduktan sonra, alkol boşaltırıldı ve % 5 jelin üstüne eklendi ve donuncaya kadar beklendi (Tablo 8).



B. Örnekler liziz tamponu ile homojenize edilip 30 saniye vortekslenildi ve 5 dakika mikrodalga fırında tutuldu.

C. Tank tamponunu tanka eklendi ve jel yerleştirildi. Örnekler ve marker koyucuklara yüklendi. Örnek ve yürütme ( loading) boyasının oranı; 50 µl sample ve liziz tamponu karışımı ve 50µl loading boyasıdır.

D. Yürütme (loading) boyası, jelin sonuna yaklaştığında, elektroforez durduruldu. E-caherin için Voltaj:100, 1.5 saat, GSTP1 Voltaj:100 1.5 saat uygulandı.

Tablo 7.Poliakrilimid jel içereği

	% 8'Lik jel (10mL)	% 10'luk jel (10mL)	% 5'lik jel (5mL)
dH2o	4,6	4,0	3,4
%30'luk akrilamid	2,7	3,3	0,83
1.5 M Tris-Cl, pH 8.8	2,5	2,5	0,63*
% 10 SDS	0,1	0,1	0,05
% 10 amonyum persulfat	0,1	0,1	0,05
TEMED	0,006	0,004	0,005

\*% 5'lik jel için 1 M Tris-Cl, pH 6.8 kullanılmıştır.

#### **3.6.5.7.5.4. Pozitif kontroller**

Bir pozitif kontrol lizatı (beta aktin), protokolün yeterli ve doğru çalıştığını gösterir ve antikorün örneklerde olmayan hedef proteinin tanımlanmasını göstermek için kullanıldı.

#### **3.6.5.7.5.5. Yürütme notları**

1. Mikro hamilton veya ince iğnelerden, örnekler kuyucuklara yerleştirildi.
2. İğneler kuyucukları yırtmamalı bandlar dağılılabılır.
3. Kuyucuklar dolmamalı, örnekler diğer kuyucuklara dağılırsa bandlar zayıflar.
4. Her kuyucukta 20-40 µg protein eklenmeli.

5. Yürütme zamanı protökole göre değişir.

6. Molekül boyası jelin sonuna ilerleyince, gerilim kapanmalı. Proteinler yavaşça jelden kopar, bunu önlemek için, hemen hızlı aktarım basamağı başlanmalıdır.

### 3.6.5.7.5.6. Yürütme kontrolleri

Tablo 8. Yürütme kontrollerinin özellikleri

(<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>)

Yürütme Kontrolü	Örnek tipi	Moleküler ağırlık (kDa)	Uyarı
Beta aktin	Bütün hücre/sitoplasmik	43	iskelet kars hücrelerine uygun değil, hücre büyümesinde ve hücre dışı matriksin değişimlerinde, etkilenebilir (Farmer <i>et al</i> , 1983).
GAPDH	Bütün hücre/sitoplasmik	30-40	Bazı fizyolojik faktörler, hipoksi ve şeker hastalığında, özel hücrelerde artmaktadır
Tübülin	Bütün hücre/sitoplasmik	55	Antimikrobial ve anti-maya ilaçlarında, değişir (Sangrajang S. <i>et al</i> , 1998, Prasad V <i>et al</i> , 2000)
VDCA1/Porin	Mitokondriyel	31	
COXIV	Mitokondriyel	16	Çoklu proteinler 16 kDa'luk COXIV gibi yürür
Lamin B1	Nükleer	66	Hücrelerin nükleer zarı parçalanırsa, uygun değil
TATA bağlanan protein (TBP)	Nükleer	38	DNA kaldırmasında, uygun değildir

1. Yürütme kontrolleri , örneklerin jeldeki görünen bantları olarak, yürütülmesini göstermektedir özellikle örneklerde farklı ekspresyon düzeyinin kıyaslanması isteniliyorsa, bu kontrol yardımcı olabilir (Tablo 8).

2. Aktarım (transfer) basamağı başarılı olmasa da, yürütme kontrollerinin bantlarının üzerinden, protein miktarını her bantda ölçmek mümkündür.

### 3.6.5.7.5.7. Proteinlerin jelde boyaması

#### 3.6.5.7.5.7.1. Proteinlerin jelde görüntülenmesi

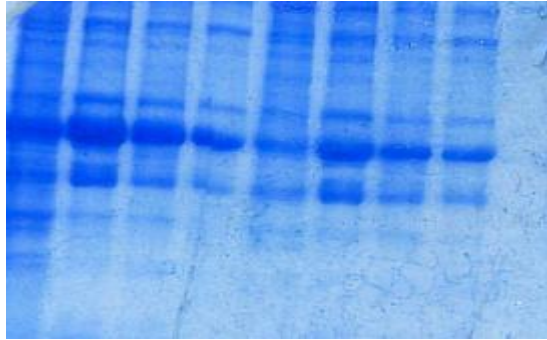
Bu görüntülenme proteinlerin tekdüze ( uniform) ve tamamen göç etmesini kontrol etmek içindir.

Proteinleri membrana aktarmak amacı varsa, gümüş boyası kullanılır. Komasi (Coomassie)

mavisi geridönüşmez. Komasi mavisi sadece aktarımın sonrasında , aktarımın kalitesini izlemek için kullanılır veya aktarma (transfer) yapmak gerekmiyorsa ve sadece SDS-PAGE'de sonuçları izlemek amacı varsa, kullanılır.

#### **3.6.5.7.5.7.2. Komasi mavisi**

Gerilim hemen kapandıktan sonra, protein bantları dağılmağa başlar (su fazında çözülebilir). Bu olayı önlemek için, % 40 distille su, %10 asetik asit ve % 50 metanol solüsyonu hazırlandı ve jel bu solüsyonda tutundu. Bu yöntemde proteinler presipite olur (çözünmez hale gelir). Tespit olmuş proteinlerin görünmesi için jel aynı su/asetik asit/methanol karışımında ve % 0,25 komasi brilliant mavisi R-250 tutundu. 4 saat veya gece boyu oda sıcaklığında, rotator üzerinde bekletildi. Inkübeden çıkartılıp yeni karışım ile yıkandı ve fazla boya uzaklaştırıldı. Boya, akrilamid'e bağlanmaz ve atılır (saf jel bırakır) ancak proteinlere güçlü şekilde bağlı kalır ve koyu mavi boya oluşur. Proteinlerin görüntülmesi için 3 örnek için komasi boyaması uygulandı (Şekil 19), ancak bu boyamanı yaptıktan sonra aktarma mümkün olmadığı için, bu boyama genel olarak kullanılmadı.



Şekil 19. Komasi mavisi ile jel boyaması

#### **3.6.5.7.5.8. Poliakrilamid jeldinde yürütülen proteinlerin PVDF membranlara transferi ve membranın bloklanması**

##### **3.6.5.7.5.8.1. Proteinlerin membrana yürütmesinin (transferi) prensibi**

Sisteme bağlı aktarma protokolü değişebilir ancak yöntemin temeli aynıdır. Burada da önceki gibi, bir gerilim eseriinde proteinler jelden membrana aktarılır ve 'blot'lanır. Yarı-kuru aktarımı çok hızlıdır ancak ıslak aktarım membran kurutulması nedeni ile daha başarılıdır ve 100'KD'dan

büyük proteinler için kullanılır. Her iki sistemde, membranlar jel üzerine konur ve emici maddeler arasında sandüviç olurlar ve bir solid dayanaklarla tutulur böylece jel ve membran sert ve yakın şekilde birbirine tutulur. Islak sistemde sırasıyla (sünger/kağıt/jel/membran/kağıt/sünger) yerleştirilir ve hava kabarcıkları alınır. Daha sonra bu sandüviç aktarma tamponunda tutulur ve akım verilir. Negatif yüklü olan proteinler, pozitif elektroda doğru göç eder ve membran proteinleri blotlayıp ve onlara bağlanır ve göçlerini önler.

#### **3.6.5.7.5.8.2. Küçük ve büyük proteinlerin aktarımının prensibi**

100KD'dan büyük proteinler:

1. Büyük proteinler için aktarma çok yavaş olabilir aynen jelde yavaş yürümleri gibi, bu nedenle jelin konsantrasyonu % 8 ve daha az olmalıdır, jelin dağılmamasına dikkat edilmelidir.
2. Büyük proteinler jelde presipite olabilir. Aktarma tamponunun son konsantrasyonuna, % 0.1 SDS'in eklemesi bu sorunu çözebilir.
3. Metanol SDS'i proteinlerden koparabilir bu yüzden tamponda metanolün yüzdesi azaltılır. Jeli kabartır (swelling) ve büyük proteinlerin kolay aktarımına yardım eder.
4. Metanol nitroselulozde kullanılır, PVDF kullanılıyorsa, tamponda metanolün kullanılmasına gerek yoktur sadece PVDF'i aktif etmek için ilk basamakta ıslatmakta kullanılır.
5. Gece boyu yaş aktarma, yarı-kuru yerine tercih edilir.

Küçük proteinler için (<100KD):

1. SDS aracılığı ile, tüm proteinler membrandan ayrılır ancak küçük proteinlerde etkisi çoktur, bu yüzden SDS, tamponda olmamalıdır.
2. Metanol konsantrasyonu % 20 olmalı.

Protein bandlarının boyutunu tahminen hesaplamak için, 'size marker' kullanılır. Jelde farklı boyutlarda ayrılan proteinlerden ibarettir.

#### **3.6.5.7.5.8.3. Yöntem**

Elektroforez işlemi bittikten sonra, jel çıkarıldı ve işaretlendi (üstü ve arkasının belli olması için) ve taze hazırlanan Tris-Glisin transfer tamponu (protokol üzerinden hazırlanmış) içerisine alındı.

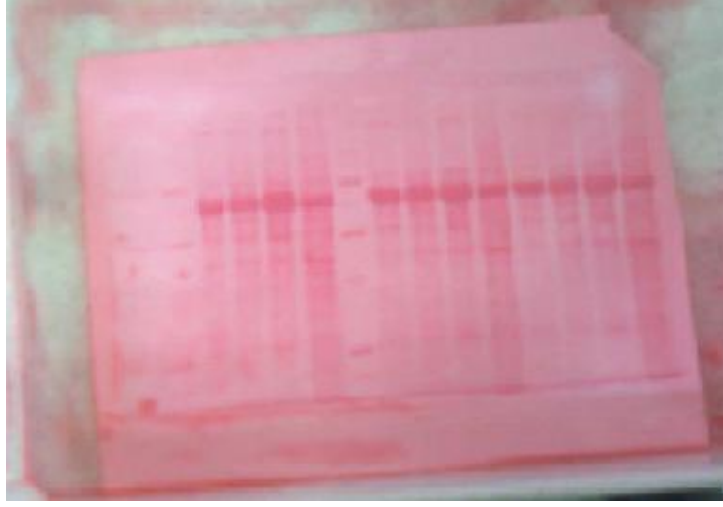
Watman ve kurutucu kağıtları jel boyutunda kesip ve 1 tanesi jelin üstüne ve 1 tane jelin altına hazırlandı. Transfer tamponu ile kağıtlar ıslatıldı.

PVDF membranı hidrofob olmasına göre, ilk methanol ile ıslatılır 30 saniye ile 1 dakika bekletildikten sonra, distile su ile yıkandı bu koşullarda kağıtın rengi açık griye dönüştü.

Transfer tamponundan biraz üzerine eklendi daha sonra 1 tane ıslak watmen kağıtı blotlama camında yerleştirildi ve üzerine pipetin dolandırması ile hava kabarcıkları çıkartıldı bir az daha transfer tamponu eklendi, PVDF membranı konuldu ve tekrar transfer tampon eklendi ve daha sonraki basamakta jel camdan ayrıldı ve fazla kısmı kesildi (stacking kısmını) ve jel ters çevirilerek biraz transfer tamponu eklendi, çok fazla yerini değiştirmeden watman kağıtlarının fazlası makas ile kesildi ve 1 tane ıslak kurutucu kağıdı, jelin üzerine konup tekrar transfer tamponu eklendi ve daha sonra hava kabarcıkları çıkartılıp ve kağıtların etrafında fazla su alındı. Bu sistem, yarı-kuru (semi-dry) olduğuna göre fazla malzeme konmasına gerek yoktur. Akımın yönü olarak, negatif yukarıda ve pozitif aşağı yönde ayarlandı. Blotlama camının kapağı yerleştirildi ve elektrik akımı başlatıldı. Akımda, 18 voltaj kullanıldı ve blotlama süreci bir saat ayarlandı (2 membran birarada kullanıyorsa, 20 volt bir saat). Transferin başarılı olmasını kontrol etmek için, transfer sonrasında jeller "Comassie mavisi" ile boyandı.

#### ***3.6.5.7.5.8.4. Ponso-S boyaması***

Proteinlerin membranda görüntülenmesi için, membrana TBST tamponunda yıkandı. Stok kırmızı ponso boyası, 1:10'a dilüe olundu ( % 2 ponso, % 30 trikoloroasetik asit ve % 30 sülfosalisilik asit'de) membran ajitatörün üzerinde 5dk inkübe edildi. Su ile yıkandı ve protein bandları iyi görüntüleninceye kadar yıkandı. Membran su da fazla yıkanırsa bandlar tamamen silinebilir buna göre marker çizgileri silinebilir kalem ile PVDF kağıtında (E-cadherin ve GSTP1'e özgü ve farklı ) işaretlendi ve sonraki basamağa girdi (Şekil 20 a,b ve 21).

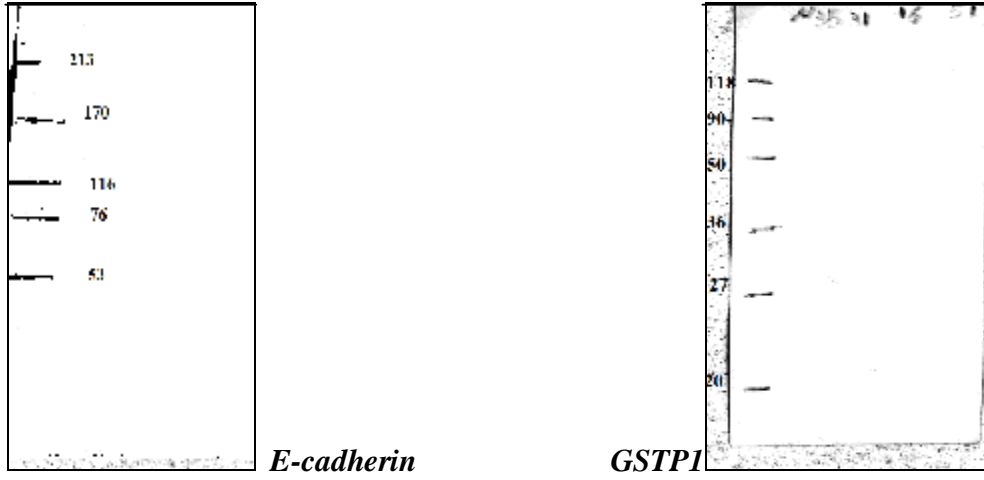


20 a.



20 b.

Şekil 20.a. Membranın ponsu ile boyaması ve b. Membrandan boyanma sonrası yıkanılmış ve markrın işaretlenmesinin ve protein bandlarının görüntüsü



Şekil 21. Membran üzerinde markerlerin işaretlenmesi

### **3.6.5.7.5.8.5. Bloklama**

#### **3.6.5.7.5.8.5.1. Membranın bloklama nedeninin prensibi**

Membranın bloklaması, primer veya sekonder antikorların membrana spesifik olmayan bağlantısını önler. İki bloklayan çözelti kullanılır: yağsız süt veya sığır serumunun albumini (bovine serum albumine, BSA) (cohn fraksiyon V). Süt daha ucuzdur ancak fosforlü proteinler için tavsiye edilmez (kazein proteininde fosfat bulunmaktadır ve arka planda, koyu boya oluşabilir). Belli olmayan nedenlere göre, antikorlar BSA' ile daha güçlü band oluşturur. %5 süt veya BSA çözeltisi hazırlanır (5gr süt+100 ml TBST tamponu eklendi), karıştırılır ve filtre edilir. Filtre edilmesse, noktalama ('spotting') oluşabilir. 1 saat 4 derecede ajitatörde inkübe olunur. 5 saniye TBST'de yıkanır.

#### **3.6.5.7.5.8.5.2. Yöntem**

Bloklama tamponu (skim milk 1 gr son konsantrasyon % 5, Gliserol 1 ml son konsantrasyon % 5, TTBS ile 40 ml kadar ayarlandı), PVDF membranı ile bir naylon torbada yerleştirildi ve torbanın başı ısıtma ile kapandı ve buz dolabında gece boyu bekletildi (membranın yönü ve ters tarafı işaretlenir).

PVDF membranı bloklama tamponundan çıkartıp, PBS-tween 20 (150 µl PBS+ 75 µl Tween) tamponu ile 3 kez ve her seferinde 5 dakika rotatörde yıkanıldı. Geri kalan bloklama tamponu falkon tüpelerde bir sonraki işlem için saklandı.

### **3.6.5.7.5.8.5.3. Primer ve sekonder antikorlerin hazırlama prensibi:**

Seçilmiş antikorler antijene özel olmalı ve onun özel bölgesine bağlanmalıdır. Buna rağmen western blotlama'da kullanılan antikorler her zaman tipik şekilde çalışmaz (konformasyonel epitoplara, parçalanmış proteinler). Tampon, jel ve blotlama koşullarının esnekliği nedeni ile, antikorlerin optimize çalışması mümkün olabilir.

Primer antikor firma tarafından belirlenen dilüsyonda hazırlanır ve firma tarafından özel tampon belirlenmeyen taktirde, bloklayan tampon veya TBST'ile (1:100-1:3000)'de dilüe ve optimize edilir. Fazla antikor kullanımı, spesifik olmayan bantlar oluşturabilir. Antikore bağlı, bloklayıcı ajanın tamponda kullanılması değişebilir. Süt veya BSA'nın az konsantrasyonda (% 0.5- 0.25) kullanımı, bantların güçlü olmasını sağlar.

İnkübe süresi: bu süre bir saattan, gece boyuna kadar (18 saattan fazla) değişebilir ve proteinin yoğunluğu ve antikorün afinitesine bağlıdır. Spesifik bağlanma için daha dilüe antikor ve daha uzun inkübasyon tavsiye edilir.

İnkübe sıcaklığı: soğuk derecelerin kullanılması, tercih edilir. Gece boyu inkübe düşünülüyorsa, 4°C gerekiyor yoksa kontamine olasılığı ve proteinin bozulması beklenir. İnkübe sırasında ajitatör kullanımı tavsiye edilir böylece membranın üstü, homojen şekilde kapatılır ve spesifik olmayan bağlantıların oluşumu önlenir.

Bloklama solüsyonundan alınan membranlar primer antikor ile , optimize edilen dilüsyonlarda muamele edildi.

#### **3.6.5.7.5.8.5.3.1. Antikorlerin hazırlama yöntemi**

Anti E-cadherinin primer antikorü, 1/200, GSTP1 için 1/100 ve beta aktinin için, 1/100 oranında, Tris tamponlu-tuz solüsyonu-Tween20 (TBS-T=Tris-Buffered Saline Tween-20) içinde hazırlandı, % 5-10 yağsız süt tozu (Non Fat Milk powder, NFMP) veya %3 sığır albumin (BSA) içeren % 0,5 TBS-T tamponuna eklenildi ve inkübasyonlar 25 ° C (oda sıcaklığı)'nda 2 saat uygulandı. Sekonder antikor olarak Santa Cruz Biotechnology anti-fare (IgG-HRP F0710-Santa Cruz) antikorları, 1/500 konsantrasyonda kullanıldı. Antikorlar %3 NFMP, % 0,5 TBS-T ile (1:1000-1:5000 oranında) sulandırılarak 1 saat 25 C'de inkübe edildi.



#### **3.6.5.7.5.8.5.4. Proteinlerin membran üzerinde saptanması**

Membran TBST' ile birkaç kez yıkanıldı, her seferinde 5dk ve daha uzun sürede primer antikor yıkanıp atıldı.

Not: Inkübenme tamponunu ve dilüe orantısı genelde firma tarafından belirlenir, yoksa (1:1000-1:20000)'de optimize edilir. Fazla antikorun kullanılması, spesifik olmayan band oluşturabilir. Dilüe etmek için, bloklama tamponu kullanılır ancak bloklayıcı ajan, antikorün hedef proteine bağlanmasını önleyebilir ve zayıf band oluşabilir.

Hem primer ve hem sekonder antikorler için inkübenmenin süreci ve sıcaklığı: 1-2 saat, oda sıcaklığında ve ajitatörde yapıldı ve her antikorle (primer ve sekonder) inkübenme basamağının arasında, 3 kez yıkanma 5 dakika aralıkla yapıldı.

Konjuge ediciler: HRP ile konjuge olmuş antikorler tercih edilir. ALP ile konjuge olmuş sekonder antikorler fazla hassas değil.

Sekonder antikor hazırlandı, inkübasyondan sonra, yıkama işleminde, membranlar PBS tamponu ile 3 kez 5 dakika rotatorda yıkanıldı.

#### **3.6.5.7.5.8.5.5. Develop yöntemleri**

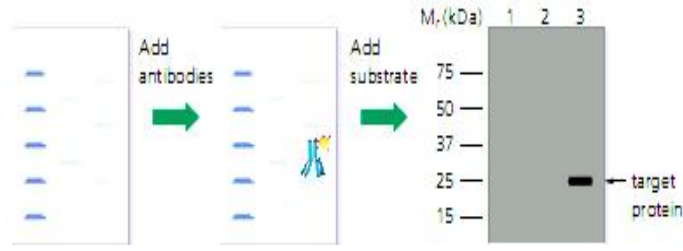
HRP ile konjuge olan antikorler için ECL ve ECL-plus tanımlayıcı kullanılır ve ECL-plus tavsiye edilir. X-ray filmlerinin kullanımında, inkübe sürecinin kontrol etme şansı sağlar bu yöntemin yapılması için, otomize aletler bulunmaktadır. Over ekspres olmuş filmleri koyu band oluşturur ve protein miktarı belirlenmez (spesifik olmayan bandlar ve band kontrastı yoktur). Dijital fotoğraf larda, kameralar bir mahfaza içinde yerleştirildi ve membrandan kemilüminesans ışıntının sinyalını dijital resme dönüştürüldü ve hızlı analiz için softwear kullanıldı.

#### **3.6.5.7.5.8.5.6. Sonuçların niteliğini belirlemek**

Western blotlamadan alınan verilerin semi-kantatif olmasını hatırlamak çok önemlidir. Buna göre protein düzeyinde absölü miktarı değil, relatif kıyaslama yapılabilir. Bunun nedeni iki şekilde açıklanabilir: örneklerin yürütme ve aktarma orantısı her örnek için farklıdır ve kıyaslama öncesi optimize olmalıdır ve örneklerin konsantrasyonundan oluşan sinyal, çok geniş çerçevededir (range) ve ilişkisi çizgisel (linear) değildir buda substratın ulaşımı ve çizgisel (linear) yanıtlamaya bağlıdır. Bu yüzden hiçbir zaman protein konsantrasyonu ile ışım arasında linear

bağlantı kurmak mümkün değildir. Tanımlama metotlardan, CCD kamera ile ECL sinyali daha dikkatli yöntemdir (Şekil 22).

Görüntülenmesi için sekonder antikora bağlı olan peroksidaz enzimlerinin substratını parçalaması esasına dayanan ve sonuçta modifiye substrattan oluşan kimyasal ışımının film üzerinde saptanması zaman- çizgelesine (timeline) dayanan kemilüminesans,

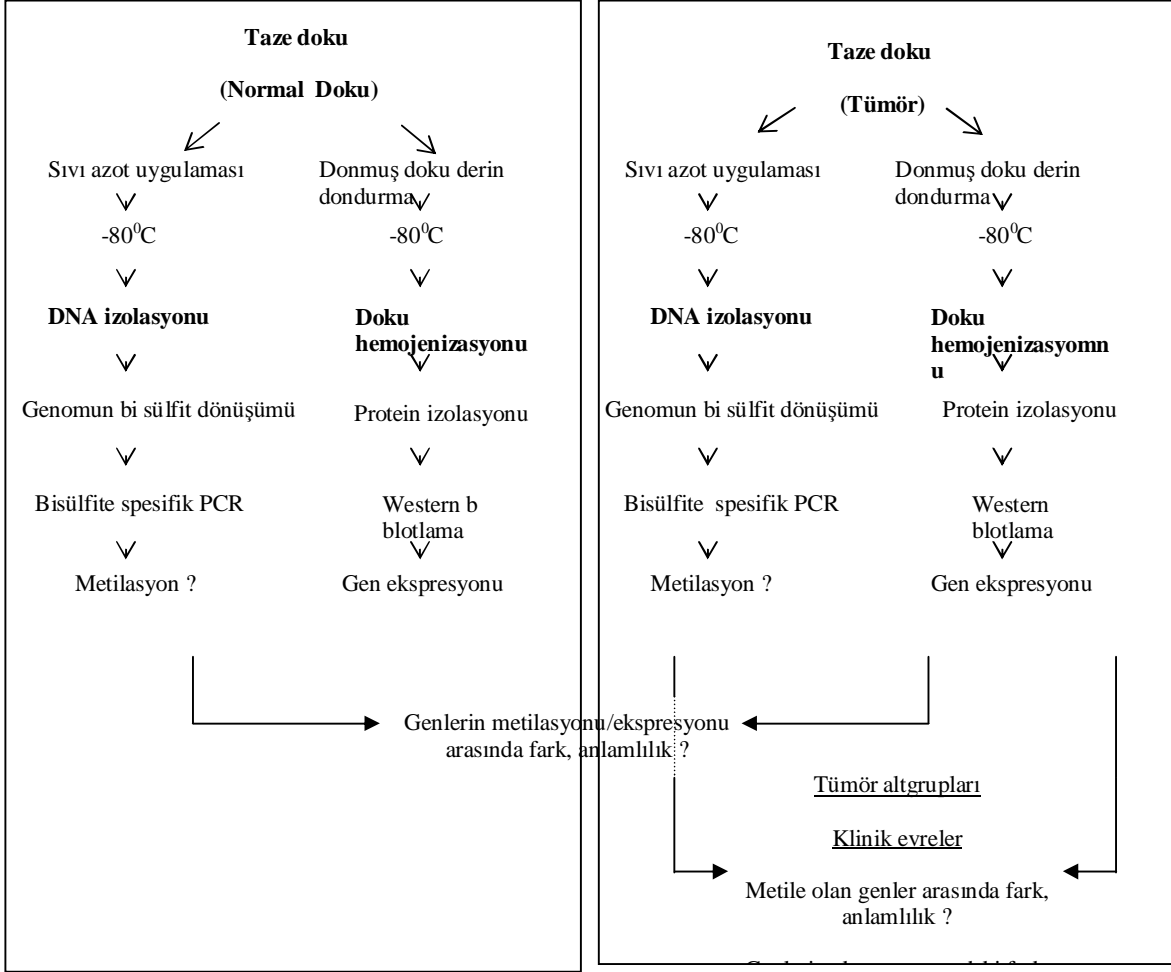


Şekil 22. Western blot'da görüntülenme temeli

(<http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure>, 2011)

görüntülenme yöntemi kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği şekilde ( ECL'in develop floresans işaretlenme ajanı A ve B tamponu ile hazırlandı (1 $\mu$ l A + 40 $\mu$ l B tamponu) hazırlanan karışım, membranın üstünü kaplayacak miktarda sürülerek, 2-3 dakika bekletildi. Membranlar ışık geçirmeyen bir kaset içine alındıktan sonra, kemilüminesansa duyarlı alet'e (Codak) konuldu uygun sürede bekletildi (2-3 dakika), direkt protein bandları monitorda izlenildi ve kaydedildi.

### 3.7 . Araştırma Planı ve Takvimi



İşlev ↓	Aylar →	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22	23-24
Klinik örneklerin eldesi ve saklanması													
Hastalar klinik verilerinin eldesi kaydı													
DNA izolasyonları													
Genomun bisülfıt dönüşümü ve BSP ve jelde yürütme													
Bisülfıt sekanslama													
Western blot analizi													
İstatistiksel değerlendirme ve analizi													
proje raporunun yazılması													

### 3.8. Verilerin Değerlendirmesi:

**İstatistik:** Elde edilecek verilerle;

- 1- Metilasyon ile gen ekspresyonu arasındaki korelasyon,
- 2- Genel tanımlamada, meme tümöründe metile olan genlerin yüzdesi,
- 3- Meme tümörünün subgruplarında metillenen genlerin yüzdesi,
- 4- Meme tümöründe evreleme, derece, kemoterapi, tümörün tipi ve geridönüşüm ile metilasyon arasındaki ilişki değerlendirildi.
5. Meme tümöründe evreleme, derece, kemoterapi, tümörün tipi ve geridönüşüm ile protein ekspresyonunun arasındaki ilişki değerlendirildi.

Verilerin özelliğine göre (normal dağılım ve homojen oldukları), sayım verilerde yapılan analizler ki-kare ve fisher, ölçüm verilerde t-ki kare ,fisher ve spearman testinin gerektiği belirlendi. Ayrıca bir kısım verilerin parametrik olduğuna göre, pearson, t varyant analizi yapıldı. Biri bağımlı ve biri bağımsız verilerde nedensellik olmayan kıyaslamalarda regresyon testi ve korelasyon testi iki yönlü şeklinde (2-sided) yapılır ve böylece farklılığın olup olmadığı belirlendi. Bu nedenlere göre, Kullanılan tanımlayıcı,  $x^2$  , korelasyon ve regresyon analizleri SPSS 16.0 programı ile yapıldı. Örneklerin homojen olması için *insitu* ve lobüler örneklerin

sayısına göre, bu örnekler analizden çıkarıldı ancak daha geniş açıdan araştırma yapabilmek için her 3 tip tümör dokunun kullanılması (duktal, lobüler ve insitu), uzun zamanlı araştırmalarda daha iyi olacaktır.

### **3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:**

Daha uzun sürede örnek toplama mümkün olmadığından, meme tümörünün her üç tipinden yeterli örnek alınmadı. Her bir gen için çok çalışma gerektiği için ve verilerin toplaması uzun süre ve çok yüksek bütçe gerektiği için, sadece iki gen üzerinde çalışmak mümkün oldu.

### **3.10. Etik Kurul Onayı:**

Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmış olan 06.04.2006 tarih ve 88 sayılı rapor bu çalışmayı da kapsamaktadır. (Rapor eklidir)

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Meme Tümöründe E-cadherin Geninin Metillenme Durumu**

#### ***4.1.1. E-cadherin geninde meme tümör ve normal örneklerin metillenme durumu ve paterni***

E-cadherin için, 10 CpG noktası promotör bölgesinde seçildi ve bisülfid sekanslama sonuçları bu noktalara göre sınıflandırıldı. Tüm 10 noktada metillenme, ful olarak tanımlandı ve 10 noktadan düşük sayıda metillenen noktalar kısmen metillenmiş ve noktaların hiç bir noktada metillenme görünmemişse, metillenmemiş (non) adlandırıldı ayrıca her CpG noktanın numarasını belirlendikten sonra, metillenme paternide belirlendi (Tablo 9 ve 10).

Tablo 9.Meme tümör örneklerinde, E-cadherin geninin promotör bölgesinde bisülfid sekanslama sonuçlarının sınıflandırılması

Tümör örnekleri (E-cadherin)	CPC-bölgeleri	Ful metillenme durumu	Kısmen metillenme durumu	Metillenmeme durumu
1	863,873,887,892,901,918,940	-	+	-
2	863,873,887,892,901,918,940	-	+	-
3	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
4	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
5	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
6	873,887,892,901,918,940	-	+	-
7	887,892,901,918,940	-	+	-
8	892,901,918,940	-	+	-
9	892,918,940	-	+	-
10	887,892,901,918,940	-	+	-
11	-	-	-	+
12	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
13	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
14	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
15	892,918,940	-	+	-
16	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
17	892,940	-	+	-
18	892,918,940	-	+	-
19	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
20	887,892,901,918,940	-	+	-
21	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
22	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
23	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
24	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
25	863,873,887,892,901,918,940	-	+	-

26	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
27	892,940	-	+	-
28	892,901,918,940	-	+	-
29	892, 940	-	+	-
30	892,901,918,940	-	+	-
31	863,865,873,887,892,901,918,940	-	+	-
32	-	-	-	+
33	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
34	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
35	892, ,918,940	-	+	-
36	-	-	-	+
37	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
38	873,887,892,901,918,920,940	-	+	-
39	863,865,873,887,892,901,918,940	-	+	-
40	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
41	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
42	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
43	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
44	863, 873,887,892,901,918,920,940	-	+	-
45	873, 887,892,901,918,920,940	-	+	-
46	887,892,901,918,940	-	+	-
47	865,873,879,887,892,901,918,920,940	-	+	-
48	892,901,918, 940	-	+	-
49	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
50	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-

Tablo 10.Meme normal örneklerinde, E-cadherin geninin promotör bölgesinde bisülfid sekanslama sonuçlarının sınıflandırılması

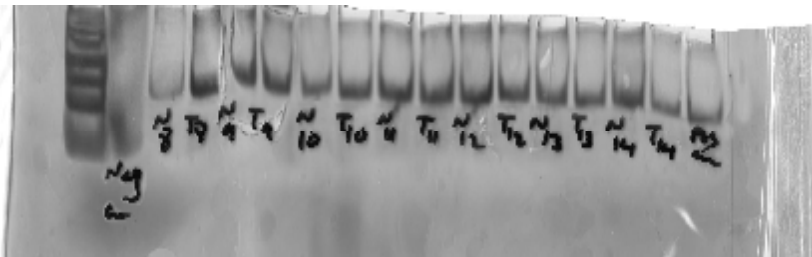
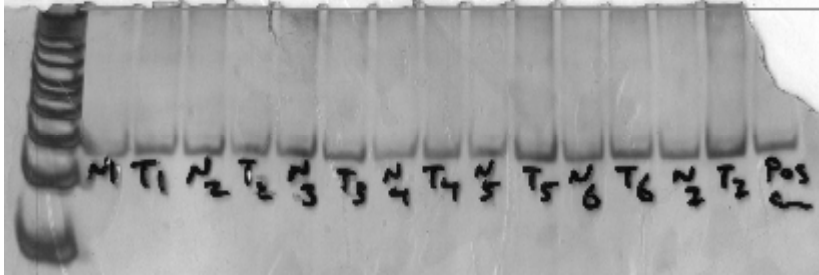
Normal örnekler (E-cadherin)	CPC-bölgeleri	Ful metillenme durumu	Kısmen metillenme durumu	Metillenmeme durumu
1	-	-	-	+
2	863 ,873,879,887,892,901,918 ,940	-	+	-
3	863 , 879,887 ,901	-	+	-
4	863,865,873,879,887,892,901,918,920,940	+	-	-
5	863 ,873,879,887,892,901,918 ,940	-	+	-
6	-	-	-	+
7	-	-	-	+
8	-	-	-	+
9	-	-	-	+
10	-	-	-	+
11	-	-	-	+
12	-	-	-	+
13	-	-	-	+
14	865,879,887,901	-	+	-
15	-	-	-	+
16	-	-	-	+
17	-	-	-	+
18	-	-	-	+
19	863, 879,887, 901	-	+	-
20	-	-	-	+
21	-	-	-	+
22	-	-	-	+
23	-	-	-	+
24	-	-	-	+
25	-	-	-	+
26	863, 879,887, 901	-	+	-
27	-	-	-	+
28	-	-	-	+
29	-	-	-	+
30	-	-	-	+
31	-	-	-	+
32	-	-	-	+
33	863,873,879,887,892,901,918,940	-	+	-
34	863, 879,887, 901	-	+	-
35	-	-	-	+
36	-	-	-	+
37	-	-	-	+
38	-	-	-	+

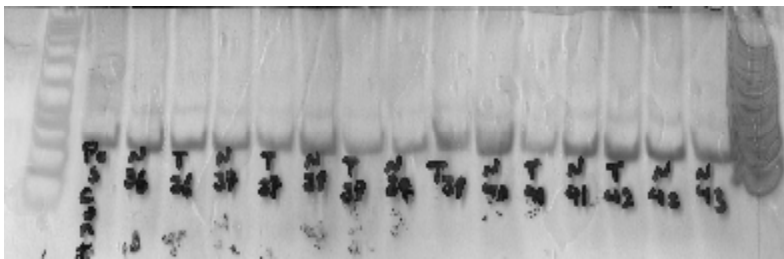
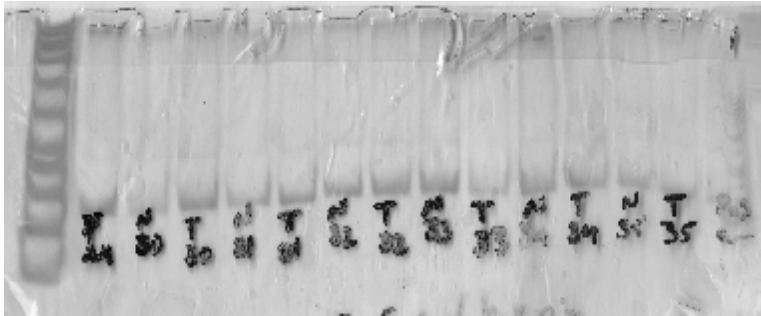
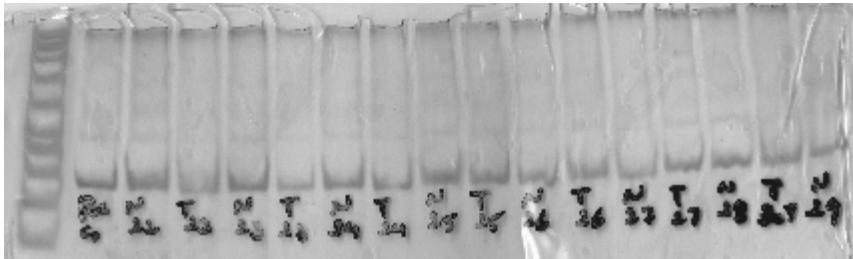
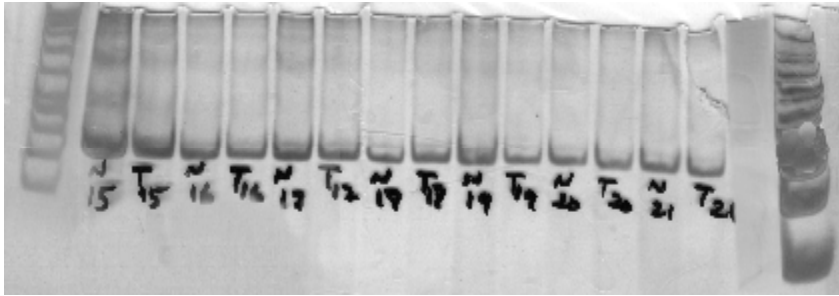


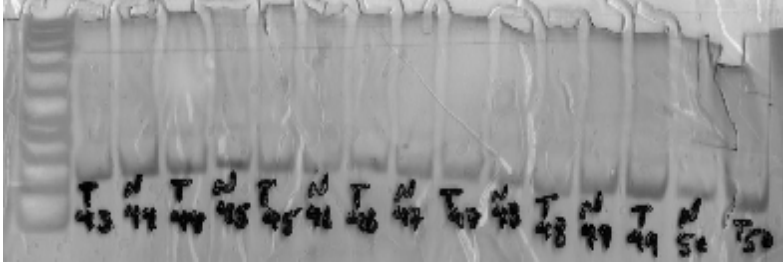
39	-	-	-	+
40	863,865,873,879,887,892,901,918,940	-	+	-
41	-	-	-	+
42	-	-	-	+
43	-	-	-	+
44	-	-	-	+
45	-	-	-	+
46	-	-	-	+
47	-	-	-	+
48	-	-	-	+
49	879,887	-	+	-
50	879	-	+	-

#### 4.1.2 Meme tümör ve normal örneklerin E-cadherin genine özel BSP ürünlerinin jelde görünülmesi

Meme tümör ve normal örneklerin üzerinde yapılan BSP ürünleri, % 8 poliakrilamid jelinde yürütüldü ve BSP için ayarlanan primerlerin mahiyetine göre, metillenen ve metillenmeyen örneklerde ürün bulunmaktadır. Negatif kontrol olarak, bisülfite ile muamele olmamış genomik örnek ve pozitif kontrol olarak universal hazır tam metillenmiş DNA örneği kullandı ( Şekil 23).







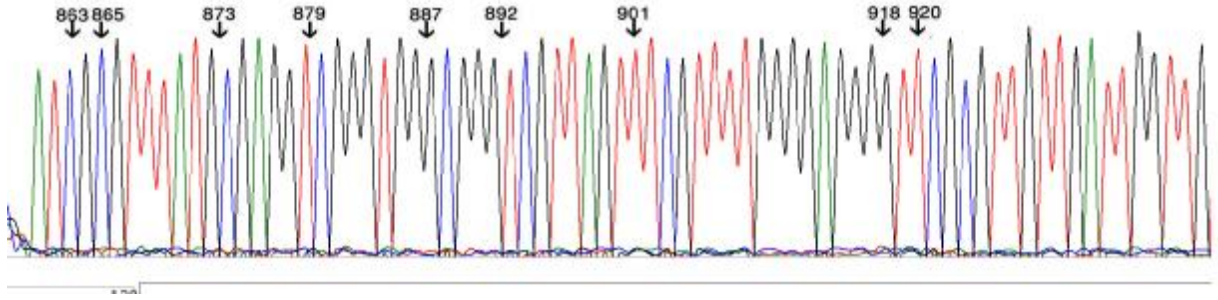
Şekil 23. Meme tümör ve normal örneklerinde, E-cadherin geninin promotör bölgesine özel PCR ürünlerin poliakrilamid jelinde görüntüleri.

#### ***4.1.3 Meme tümör ve normal örneklerin, E-cadherin geninin promotör bölgesine özel BSP ürünlerin sekanslanması***

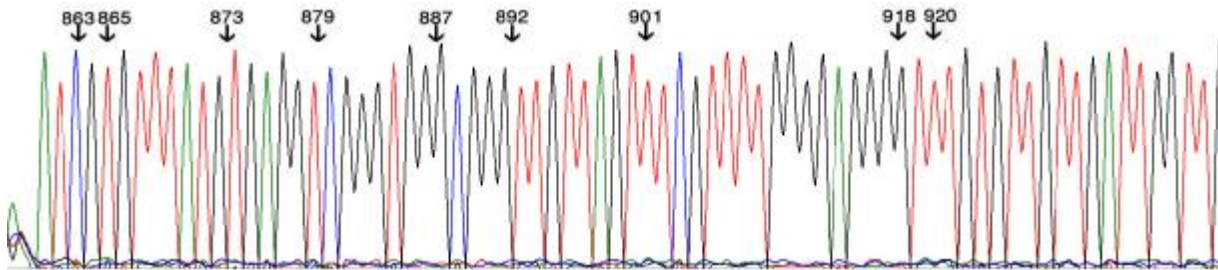
Elde edilen BSP ürünlerinin bisülfid sekanslamasının sonuçları, üç sınıfta bulundu: bütün CpG noktalarında metillenen örnekler tam metillenen örnekler adlandırıldı ( T14,...) ve diğerleri sadece kaç CpG noktasında metillenmiştir ve bunlar kısmen metillenen örneklerde sınıflandırıldı ( T25,...) ve hiç bir noktada metillenmeyen örnekler bulundu (N14,...). E-cadherin için promotör bölgesinde bulunan 10 CpG noktalar, numara olarak promotörde konumlarına göre adlandırıldı: 863, 865, 873, 879, 887, 892, 901, 918, 920 ve 940 (Şekil 24).

T14: Tam metillenmiş

N14: Metillenmemiş



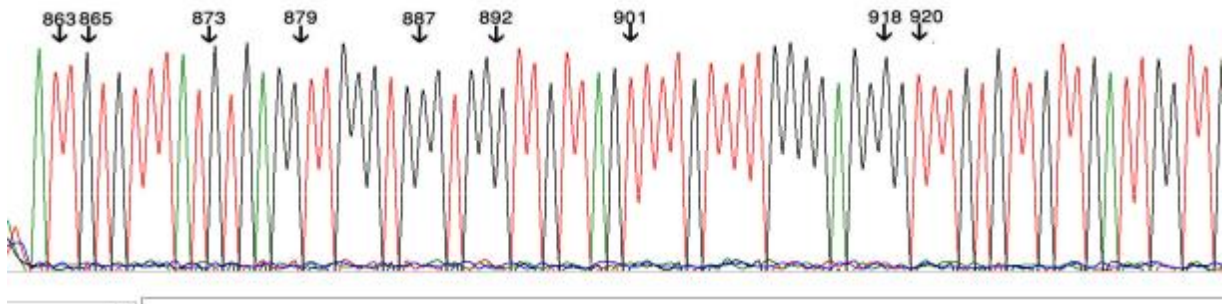
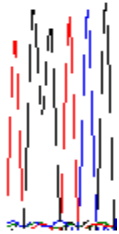
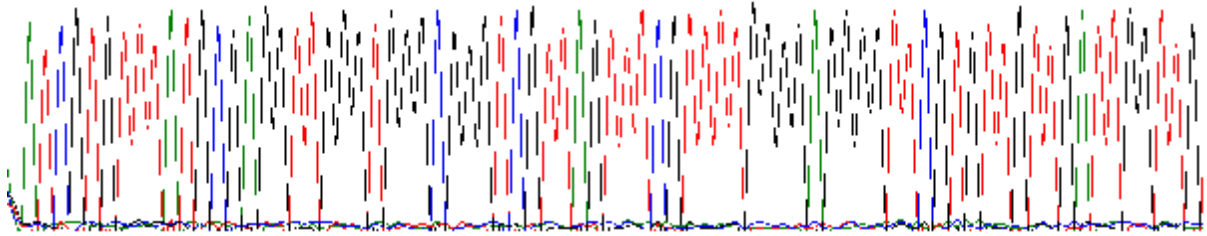
TGGTGGNI



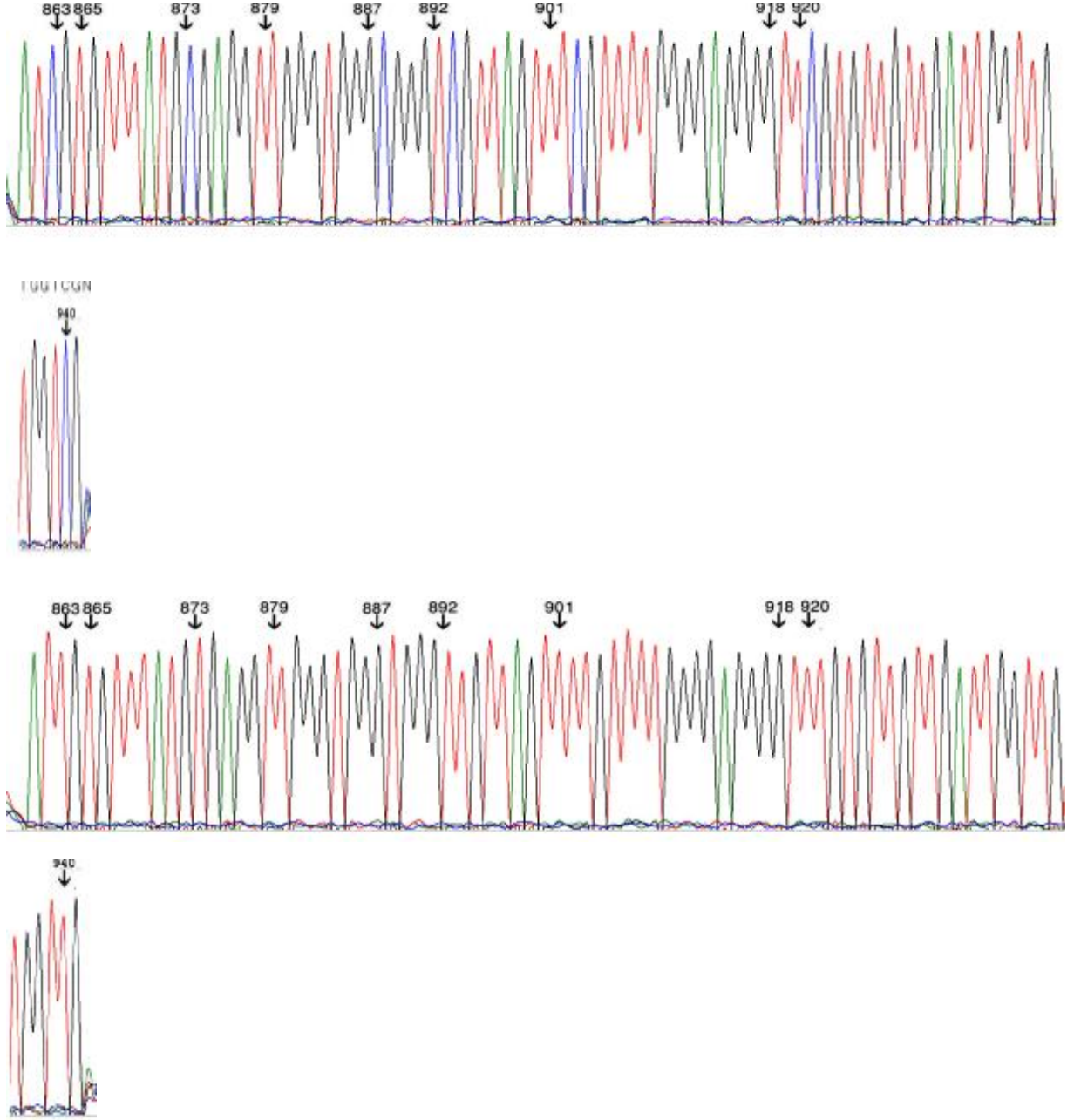
TGGTGGNI



T25: Kısmen metillenmiş N25: Metillenmemiş



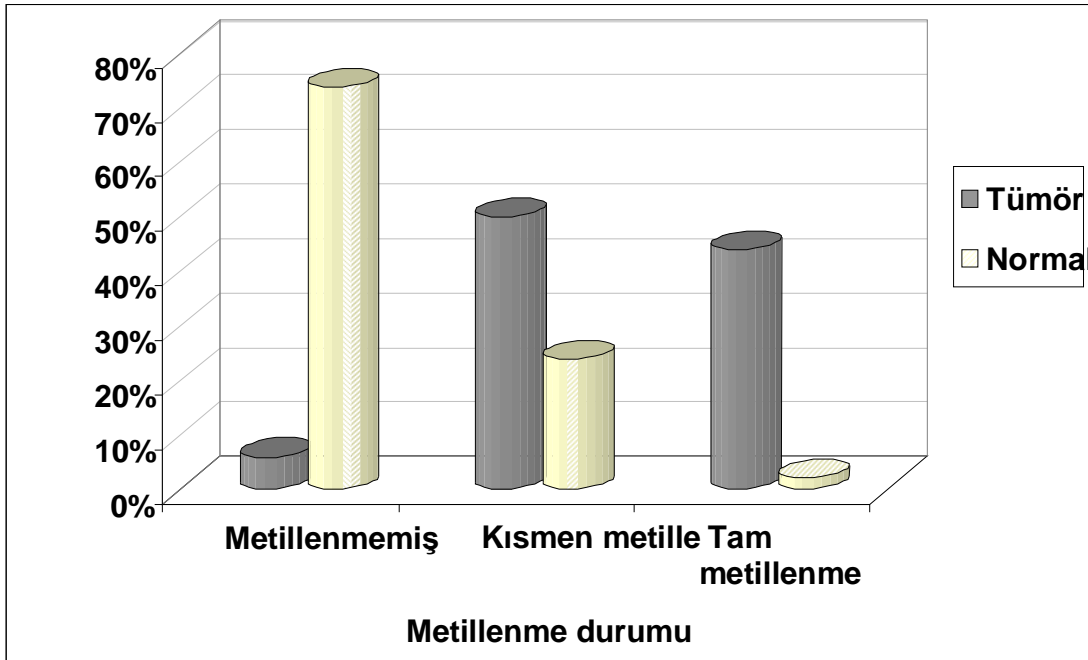
T31: Kısmen metillenmiş N31: Metillenmemiş



Şekil 24. Meme tümör ve normal örneklerin, E-cadherin geninin promotör bölgesine özel BSP ürünlerin sekanslama sonuçlarının görüntüsü

#### 4.1.2. E-cadherin geninde meme tümör ve civarındaki normal dokuların metillenme durumu

Meme kanser hastaların ortalama yaşı 48 (23-74) olarak gözlenmiştir. Tümör örneklerin % 92'si invaziv, % 4.0'ü non-invaziv ve % 4.0'ü insitu tipinden bulunmuştur. Ayrıca tümör sayısı hastaların % 92,0'de bir tane, % 6,0'sında 2 tane ve % 2,0'de 10 tane tümör bulunmuştur. Tümör örneklerinin, % 44,0'ü ( 50 örnekten, 22'si), tam metillenmiş, % 50'si kısmen ( 50 örnekten, 25'i) ve % 6,0'I ( 50 örnekten, 3'tanesi) metillenmemiştir. Metillenme olayı tümör ve normal örneklerin arasında, anlamlı şekilde farklı gözlenmiştir. Tam olarak meme kanser dokuların % 94'ünde metillenme gözlenmiştir. Ayrıca normal meme dokuların % 76'su ( 50 örnekten, 38'i) metillenmemiştir. (Şekil 25).



Şekil 25. Meme tümör ve normal örneklerinde E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme sıklığının kıyaslanması

Ki-kare spirmen analizinin sonuçlarına göre. Metillenme durumu normal ve tümör örneklerin arasında anlamlı şekilde farklılık göstermektedir (  $p= 0.001$ ) (Tablo 11).

Tablo 11.Meme tümör ve normal örneklerinde E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumunun kıyaslanması

E-cadherin			Grup		Tam
			Tümör	Normal	
Metillenme durumu	Metillenmemiş	Sayı	3	34	37
		%	6.0%	73.9%	38.5%
	Kısmen	Sayı	25	11	36
		%	50,0%	23,9%	37,5%
	Tam metillenmiş	Sayı	22	1	23
		%	44,0%	2,2%	24,0%
Tam		Sayı	50	46	96
		%	100,0%	100,0%	100,0%

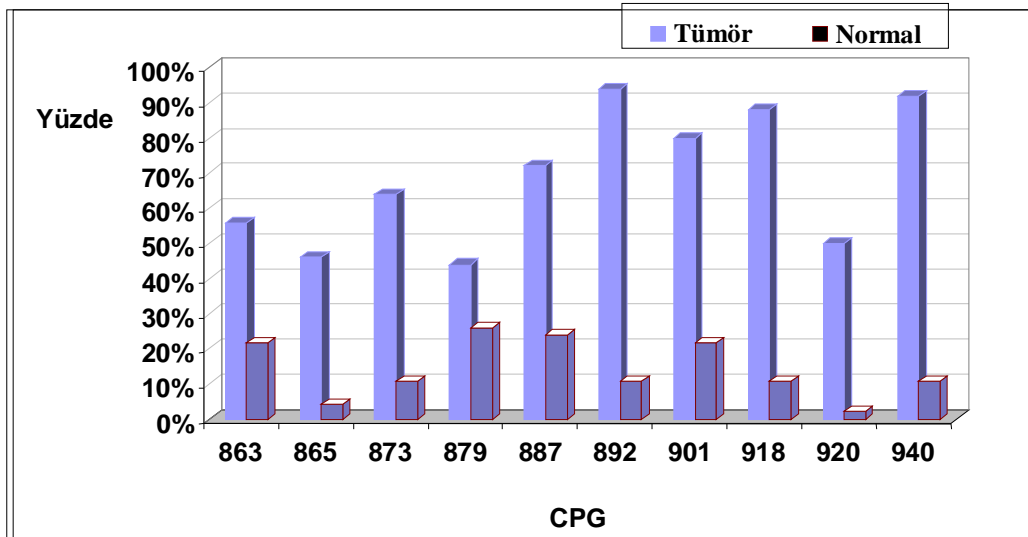
#### 4.1.2. E-cadherin geninde meme tümör ve civarındaki normal dokuların metillenme paterninin durumu

Tümör ve normal dokularda, 10'lu metillenen noktaların sıklığında anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0.006$ ) ve tümör örneklerde bu metillenme daha sık gözlemiştir. Ayrıca 10'lu CpG noktalarda, metillenme paterninde (metillenen noktalarda ) normal ve tümör dokuların arasında anlamlı farklılık gözlemiştir ( $p=0.000$ ). Tümör dokularında en sık görünen metillenmiş CpG nokta, 892 (% 94) ve normal dokularda en sık metillenmiş nokta 879. (% 26,10) elde edildi (Şekil 26 ve Tablo 12)



Tablo 12.Meme tümör ve normal dokularında, E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterninin kıyaslanması

CpG noktaları		Grup		Pearson Ki-Kare	
		Tümör	Normal	Değer	Sig. (2-sided)
863	Sayı	28	10.00	11.759	.001
	% grup	56	21.74		
865	Sayı	23	2	21.581	0.00
	% grup	46	4.34		
873	Sayı	32	5.00	28.552	0.00
	% grup	64	10.87		
879	Sayı	22	12.00	3.361	.067
	% grup	44	26.09		
887	Sayı	36	11.00	22.170	0.00
	% grup	72	23.91		
892	Sayı	47	5.00	66.690	0.00
	% grup	94	10.87		
901	Sayı	40	10.00	32.586	0.00
	% grup	80	21.74		
918	Sayı	44	5.00	57.037	0.00
	% grup	88	10.87		
920	Sayı	25	1.00	27.750	0.00
	% grup	50	2.17		
940	Sayı	46	5.00	63.326	0.00
	% grup	92	10.87		

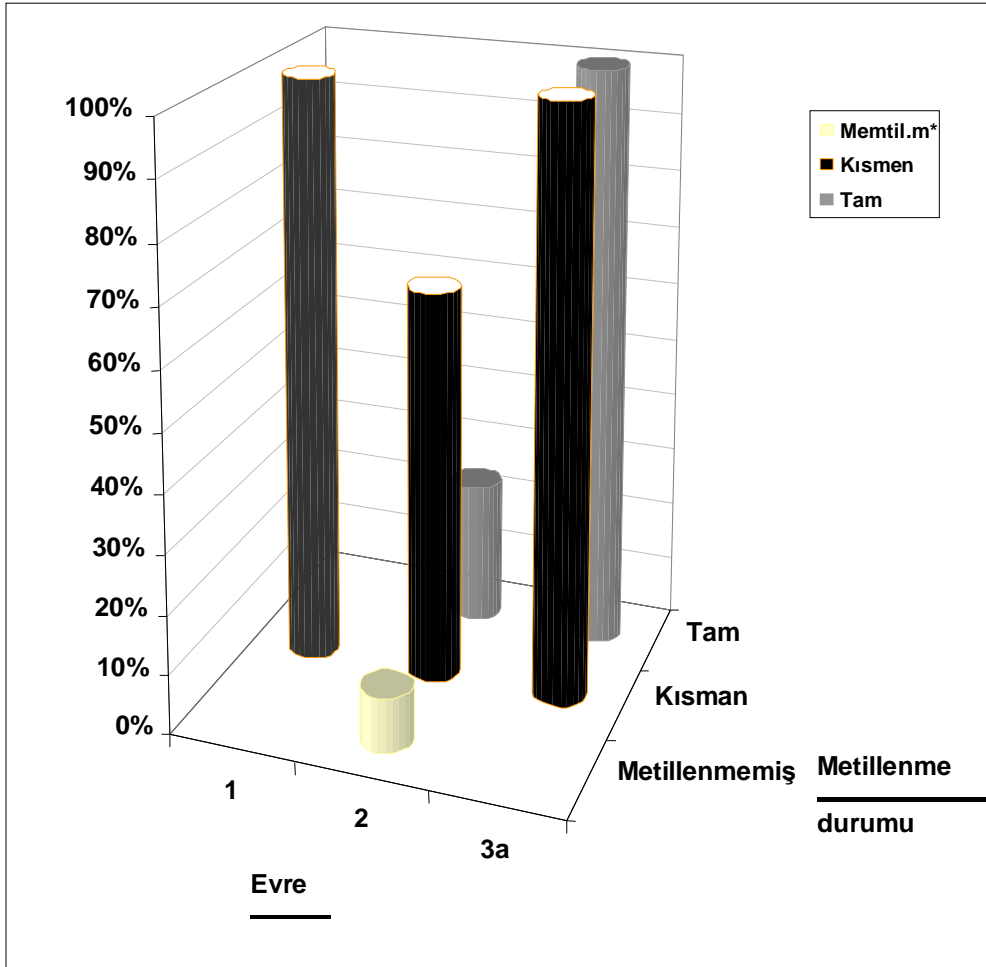


Şekil 26.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme paterninin kıyaslaması

#### 4.1.3. E-cadherin geninde meme tümör dokuların metillenme durumu ile tümör evresinin (stage) arasında ilişkisi

Genel olarak E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme ile tümörün evresi arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p= 0.000$ ) ve tümörün evresi, metillenme olayını etkilemiştir ve tümörün evresi arttıkça, metillenme şiddetide artmaktadır. Evre 1’de örneklerin % 100’ü kısmen metillenmiş, evre 2’de örneklerin % 66,7’i kısmen ve % 24,2’i tam metillenmiştir. Evre 3a’de, örneklerin % 100 ‘ü metillenmiştir (Şekil 27 ve Tablo 13).

Bu araştırmada, duktal tipinden başka tiplerin az sayıda bulunduğu için, statik analizde anlamlı çıkmadıkları için, sonuçlardan çıkarıldı ve sadece duktal tipinin üzerinden analizler yapıldı.



Şekil 27.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümör evresi ile ilişkisi (\*m= metillenmemiş)

Tablo 13.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümörün evresinin ilişkisi

\*\* korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed).

		Metillenme durumu	Tam metillenmiş	Kısmen metillenmiş	metillenmemiş
Evre	Korelasyon değeri	.666(**)	.699(**)	-.639(**)	-.116
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.423
	N	50	50	50	50

#### 4.1.4. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör evresi arasındaki ilişki

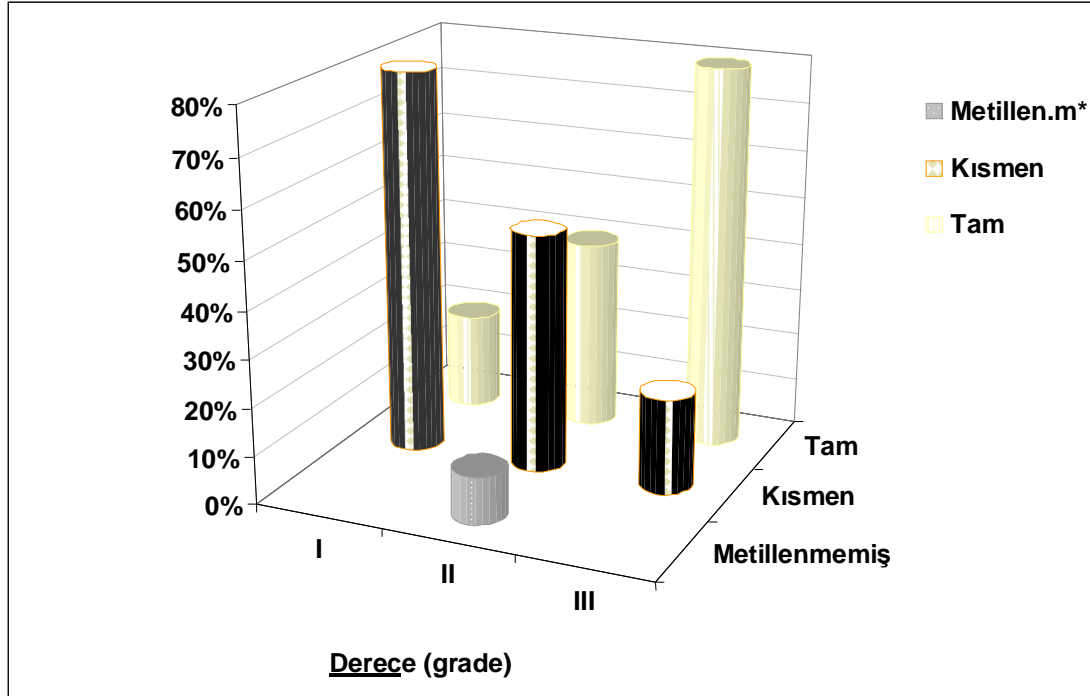
E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme 863, 865, 873, 879, 887 ve 920, CpG adacıklarında ve tümörün evreleri arasında çok anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $0.000 \leq p < 0.002$ ) (Tablo 14 ) ve tümörün evresi arttıkça, metillenmenin sıklığı bu noktalarda artmaktadır.

Tablo 14. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör evresi arasında ilişkisi

	Metillenme noktaları	Korelasyon katsayısı(coefficient)	Sig. (2-tailed)
Evre	CPG_863	.588(**)	0
	CPG_865	.617(**)	0
	CPG_873	.469(**)	0.001
	CPG_879	.699(**)	0
	CPG_887	.420(**)	0.002
	CPG_892	0.116	0.423
	CPG_901	.304(*)	0.032
	CPG_918	0.169	0.24
	CPG_920	.579(**)	0
	CPG_940	0.135	0.349

#### 4.1.5. E-cadherin geninde meme tümör dokuların metillenme durumu ile tümör derecesi (grade) arasında ilişkisi

Genel olarak E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme ile tümörün derecesi arasında çok anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p= 0.080) ve bulgulara göre, tümörün derecesi metillenme olayının etkilenmemiştir. Ancak tümörün derecesi arttıkça, tam metillenme sıklığı artmaktadır (p= 0.035) ve ters orantılı, kısmi metillenme azalmaktadır (p= 0.022) . Grade I'de tümör örneklerin % 80'de kısmen metillenmiş ve % 20'de tam metillenmiştir. Grade II'de, örneklerin % 10'u metillenmemiş, % 50'de kısmen ve % 40'da tam metillenmiştir. Grade III'de, örneklerin % 20'de kısmen metillenme ve % 80'de tam metillenme gözlenmiştir (Şekil 28 ve Tablo 15).



Şekil 28.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme sıklığı ile tümör derecesi ile ilişkisi (\*=metillenmemiş)

Tablo 15.E-cadherin geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümörün derecesinin

İlişkisi

		Metillenme durumu	Tam metillenme	Kısmen metillenme	Metillenmemiş
Derece (grade)	Korelasyon değeri	.264	.315(*)	-.340(*)	.062
	Sig. (2-tailed)	.080	.035	.022	.686
	N	45	45	45	45

**4.1.6. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör derecesinin arasında ilişki**

E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme tümörün derecesi ile etkilenmiştir ve 887. (p=0.007), 865, 879 ve 920. (0.022<p<0.035) CpG adacıklarında ve tümörün derecesinin arasında çok anlamlı farklılık gözlenmiştir (Tablo 16).

Tablo 16. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör derecesi arasında ilişkisi

	CpG noktaları	Korelasyon değeri	Sig. (2-tailed)
Derece (Grade)	863	0.29	0.054
	865	<b>0.32(*)</b>	<b>0.031</b>
	873	0.25	0.091
	879	<b>0.31(*)</b>	<b>0.035</b>
	887	<b>0.40(**)</b>	<b>0.007</b>
	892	-0.06	0.686
	901	0.19	0.204
	918	0.03	0.844
	920	<b>0.34(*)</b>	<b>0.022</b>
	940	-0.07	0.637

\*\* Korelasyon değeri 0.01 düzeyde anlamlıdır (2-tailed).

\* Korelasyon değeri 0.05 düzeyde anlamlıdır (2-tailed).

#### 4.1.7. E-cadherin geninin promotör bölgesinde tam metillenme durumu ile tümörün evresi ve derecesi arasında ilişki

Bulgulara göre, E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan tam metillenme durumu ile meme tümörün evresi ve derecesi arasında anlamlı ilişki gözlenmiştir (p= 0.000) (Tablo 17).

Tablo 17. Meme tümöründe E-cadherin geninin promotör bölgesinde tam metillenme durumu ile tümörün evre ve derecesi arasında ilişkisi

		Tam metillenme	
		Derece	Evre
<b>1</b>	Sayı	2	0
	%	10,5%	,0%
<b>2</b>	Sayı	13	8
	%	<b>68,4%</b>	34,8%
<b>3</b>	Sayı	4	15
	%	21,1%	<b>65,2%</b>
4	Sayı	71	23
	%	100.0%	100.0%

#### 4.1.8. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün geridönüşümü, metastaz durumu ve kemoterapi arasında ilişki

Bulgulara göre, bu parameterlerü tümörün metillenme durumunu etkilememiştir ve Spearman korelasyon analizinin sonuçlarına göre, anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Tablo 18)

Tablo 18. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile meme tümörün metastaz, kemoterapi etkisi ve tümörün geridönüşümü arasında ilişkisi

	Metillenme noktaları	Geri dönüşüm (recurance)	Kemoterapi	metastaz
Metillenme durumu	Korelasyon katsayısı (coefficient)	.035	-.048	-.160
	Sig. (2-tailed)	.812	.741	.268
	N	50	50	50

**4.1.9. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün geridönüşümü, metastaz durumu ve kemoterapi arasında ilişki**

E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme CpG noktalarının metillenme durumu, tümörün metastaz durumu ile etkilenmiştir ve 940. Noktanın metillenmesinde, anlamlı farklılık göstermekte ayrıca tümörün kemoterpi durumu ile 873. noktanın metillenmesi arasında anlamlı ilişki görünmektedir (Tablo 19,20).

Tablo 19.E-cadherin geninin promotör bölgesinde meillenme paterni ile meme tümörün metastaz, kemoterapi etkisi ve tümörün geridönüşümü arasında ilişkisi

	Metillenme noktaları	Metillenen CpG noktaların dizi sayısı									
		863	865	873	879	887	892	901	918	920	940
geridönüş	Korelasyon katsayısı (coefficient)	.101	.090	.134	.004	.060	.118	- .026	.013	.052	.138
	Sig. (2-tailed)	.487	.535	.352	.977	.677	.413	.858	.930	.720	.339
kemoterapi	Korelasyon katsayısı (coefficient)	.203	.030	.277	- .079	.230	.093	.185	.136	.123	.109
	Sig. (2-tailed)	.157	.838	<b>.050</b>	.584	.108	.519	.199	.345	.394	.452
metastaz	Korelasyon katsayısı (coefficient)	- .044	- .069	.011	- .126	- .023	- .174	- .063	.005	- .042	- .255
	Sig. (2-tailed)	.760	.632	.942	.384	.876	.226	.662	.971	.771	<b>.044</b>

Tablo 20.E-cadherin geninin promotör bölgesinde 940. noktanın meillenme durumu ile cerrahi öncesi kemoterapi ve tümörün evresi arasında ilişkisi

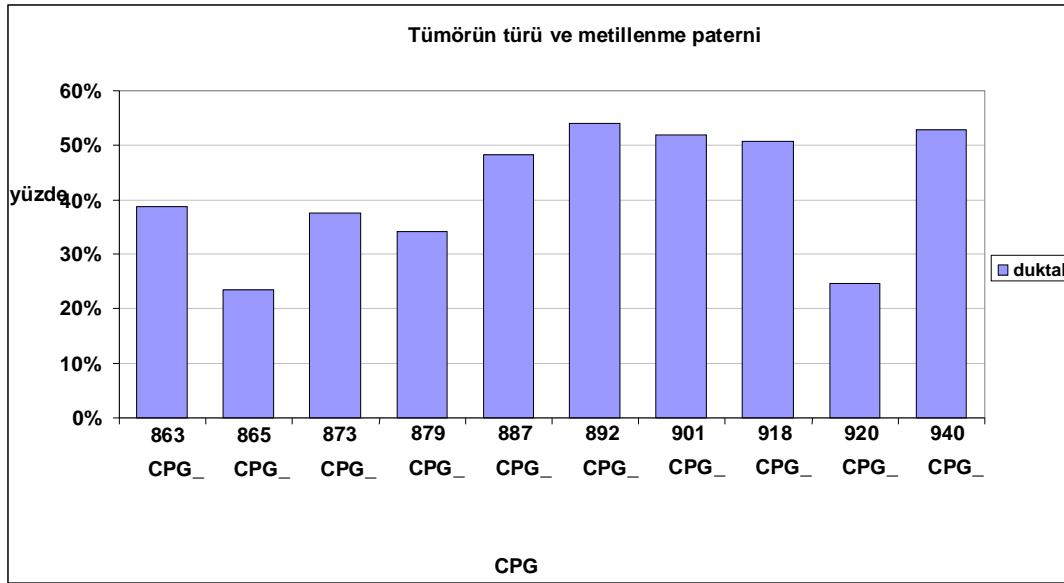
	Metillenme noktaları	Kemotarap i
Evre	Pearson korelasyonu	-.368(*)
	Sig. (2-tailed)	.025
	N	37

#### 4.1.10. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümör türünün ilişkisi

Tümörlerin çoğunluğu duktal tipinde olduğuna göre, diğer tümör türlerin az sayıda olması nedeni ile korelasyon ilişkisinin bağlanması mümkün olmadı. Tümörlerin duktal tipi, metillenme olayını etkilemiştir ve metillenme durumlarının arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0.050$ ) (Tablo 21 ve Şekil 29).

Tablo 21.E-cadherin geninin promotör bölgesinde tümörün türü (duktal) ve metillenme durumu arasında ilişkisi

		Tam metillenme	Kısmen metillenme	Metillenme	Metillenme durumu
Duktal tipinden tümör		.280(*)	-.234	-.093	.279(*)
	Sig. (2-tailed)	.049	.103	.520	.050
	N	50	50	50	50



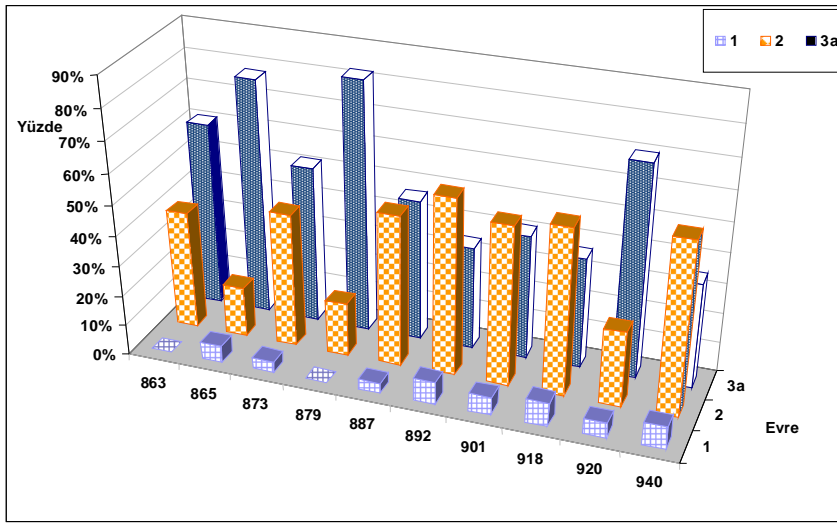
Şekil 29. E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme paterni ile duktal tipinden olan meme tümör türünün arasında ilişkisi

Bulgulara göre, tümörün duktal tipinden olması, metillenen CpG noktaların metillenmesini etkilemiştir ve en sık görülen noktalar 940, 887, 918, 901 ve 892 bulunmuştur ( $p=0.000$ ).



#### 4.1.11. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümör türünün ve tümör evresinin arasında ilişkisi

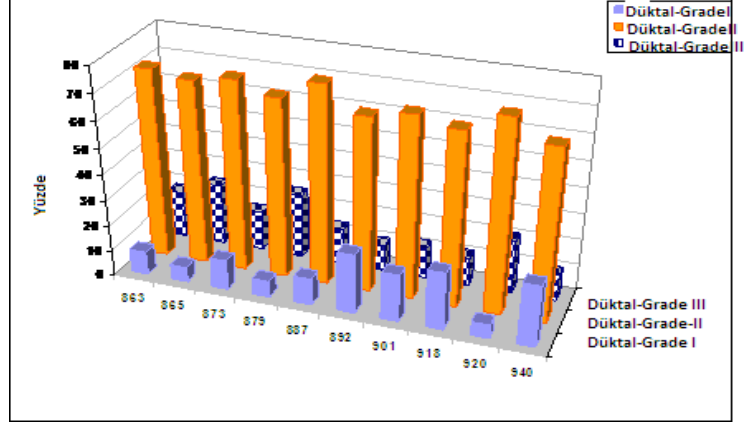
Elde edilen verilere göre, tümörün duktal tipinde, tümörün evreleri ve metillenme durumu arasında anlamlı farklılık gözlenmiş ve duktal tipinde tümör evresi arttıkça metillenme yüzdeside artmaktadır ( $p=0.024$ ). Duktal tipinden tümörlerin metillenme paterni ile tümörün evresi arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir.(Şekil 30)



Şekil 30.E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile duktal tipinden tümör ve tümör evresinin arasında ilişkisi

#### 4.1.12. E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün türü ve tümörün derecesinin arasında ilişkisi

Elde edilen verilere göre, tümörün duktal tipi ile tümör derecelerinde (grade) metillenme durumu arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ve duktal tipinden tümörün derecesi arttıkça metillenme yüzdeside artmaktadır ( $p=0.043$ ). Ayrıca, duktal tümörün farklı derecelerde olması, CpG noktalarının metillenme paternini etkilememektedir (CpG noktalarının çeşitleri), ( $p=0.764$ ) (Şekil 31).



Şekil 31.E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme paterni ile duktal tipinden olan meme tümörünün derecesi arasında ilişkisi

## 4.2. Meme Tümöründe GSTP1 Geninin Metillenme Durum

### 4.2.1. GSTP1 geninde meme tümör ve normal örneklerin metillenme durumu ve paterni

GSTP1 için, 40 CpG noktası promotör bölgesinde seçildi ve bisüfit sekanslama sonuçları bu noktalara göre sınıflandırıldı. Tüm 40 noktada metillenme, ful olarak tanımlandı ve 40 noktadan düşük sayıda metillenen noktalar kısmen metillenmiş ve noktaların hiç bir noktada metillenme görünmemişse, metillenmemiş (non) adlandırıldı ayrıca her CpG noktanın numarasını belirlendikten sonra, metillenme paternide belirlendi (Tablo 22 ve 23).

Tablo 22. Meme tümör örneklerinde, GSTP1 geninin promotör bölgesinde yapılab bisülfid sekanslama sonuçlarının sınıflandırılması

Tümör örnekler (GSTP1)	Metilleneme durumu	Kısmen metillenme durumu	Full metillenme durumu	CpG bölgeleri ( Metillenme paterni)	ccg	ctg	cgcg
1	+	-	-				
2	+	-	-				
3	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,-162,-152,-148,-145,-141,-132,-129,-127,-123,-112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	187,185,-127,124,-101,99-74,71,-15,13-8,11,14-38,40,42,
4	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,-162,-152,-148,-145,-141,-132,-129,-127,-123,-112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	187,185,-127,124,-101,99-74,71,-15,13-8,11,14-38,40,42,
5	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,-162,-152,-148,-145,-141,-183,-185,-132,-129,-127,-123,-112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	187,185,-127,124,-101,99-74,71,-15,13-8,11,14-38,40,42,
6	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,-162,-152,-148,-145,-141,-132,-129,-127,-123,-112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	187,185,-127,124,-101,99-74,71,-15,13-8,11,14-38,40,42,
7	-	+	-	-197,-190,-187,-185,-176,-155,-148,-141,-127,-124,-112,-101,77,71,15,13,4,11,14,38,40,42,47,54	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	187,185,-127,124,-101,99-74,71,-15,13-8,11,14-

							38,40,42,
8	+	-	-				
9	-	+	-	-197,-190,-176,-162,-155,-148,-141,-127,-124,15,13,4,8,11,14,38,40,42,47,54	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	187,185,-127,124,-101,99-74,71,-15,13-8,11,14-38,40,42,
10	+	-	-				
11	missed	-	-				
12	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,-162,-152,-132,-148,-145,-14,-183,-185,-132,-124,-127,-123,-112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	187,185,-127,124,-101,99-74,71,-15,13-8,11,14-38,40,42,
13	-	+	-	197,190,185,176,155,152,148,141,127,124,112,101,99,77,71,15,13,8,11,14,38,40,42,47,54	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	127,124,-101,99-15,13-8,11,14-38,40,42
14	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,-162,-152,-132,-148,-145,-141,-183,-185,-132,-124,-127,-123,-112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	187,185,-127,124,-101,99-74,71,-15,13-8,11,14-38,40,42
15	+	-	-				
16	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,-162,-152,-132,-148,-145,-141,-183,-185,-132,-124,-127,-123,-112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148	190,15	187,185,-127,124,-101,99-74,71,-15,13-8,11,14-38,40,42
17	-	+	-	-197,-190,-185,-176,-162,-155,-148,-141,-127,-124,-112,-101,-99,-77,-74,-71,-15,13,4,8,11,14,38,40,42,47	197,176,141,124,112,101,77,71,15,11,47,54,148		127,124-101,99-74,71-15,13-8,11,14-38,40,42
18	+	-	-				
19	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,-162,-152,-132,-148,-145,-	197,176,141,124,112,	190,	187,185,-127,124,-

				141,-183, -185, -132,-124,-127,-123,- 112,-110,-101,-91,-81,....	101,77,71,1 5,11,47,54, 148	15 5	101,99- 74,71,- 15,13- 8,11,14- 38,40,42,
20	+	-	-				
21	+	-	-				
22	+	-	-				
23	-	+	-	-197, -190, -187,-185,-182,- 162,-155,-152,-127,-124,- 112, --101,-77,-99,-74,-71,- 43,15,13,8,11,14,38,40,42,4 7	148,197,12 7,124,112,1 01,77,71,15 ,11,14,47	19 0, 15 5	187,185,- 127,124,- 101,99- 74,71,- 15,13- 8,11,14- 40,42.
24	+	-	-				
25	-	+	-	-197,190,185,-176,-162,- 155,-148,-141,-127,-124,- 112,-101,-99,-77,-74,-71,- 15,13,4,8,11,14,38,40,42,47	197,176,14 1,124,112, 101,77,71,1 5,11,47,54, 148	19 0, 15 5	127,124,- 101,99- 74,71-15,13- 8,11,14- 38,40,42,
26	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,- 162,-152,-132,-148, -145, - 14,-183, -185, -132,-124,-127,-123,- 112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,14 1,124,112, 101,77,71,1 5,11,47,54, 148	19 0, 15 5	187,185,- 127,124,- 101,99- 74,71,- 15,13- 8,11,14- 38,40,42,
27	+	-	-				
28	+	-	-				
29	+	-	-				
30	+	-	-				
31	+	-	-				
32	missed	-	-				
33	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,- 162,-152,-132,-148, -145, - 14,-183, -185, -132,-124,-127,-123,- 112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,14 1,124,112, 101,77,71,1 5,11,47,54, 148	19 0, 15 5	187,185,- 127,124,- 101,99- 74,71,- 15,13- 8,11,14- 38,40,42,
34	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,- 162,-152,-132,-148, -145, - 14,-183, -185, -132,-124,-127,-123,- 112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,141 ,124,112, 101,77,71,1 5,11,47,54,1 48	19 0, 15 5	187,185,- 127,124,- 101,99- 74,71,-15,13- 8,11,14-

							38,40,42,
35	+	-	-				
36	missed	-	-				
37	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,- 162,-152,-132,-148, -145, - 14,-183, -185, -132,-124,-127,-123,- 112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,14 1,124,112, 101,77,71,1 5,11,47,54, 148	19 0, 15 5	187,185,- 127,124,- 101,99- 74,71,- 15,13- 8,11,14- 38,40,42,
38	+	-	-				
39	+	-	-				
40	+	-	-				
41	+	-	-				
42	+	-	-				
43	+	-	-				
44	+	-	-				
45	+	-	-				
46	missed	-	-				
47	+	-	-				
48	+	-	-				
49	+	-	-				
50	-	-	+	-197,-183,-185,-182,-176,- 162,-152,-132,-148, -145, - 14,-183, -185, -132,-124,-127,-123,- 112,-110,-101,-91,-81,....	197,176,14 1,124,112,1 01,77,71,15 ,11,47,54,1 48	19 0, 15 5	187,185,- 127,124,- 101,99- 74,71,- 15,13- 8,11,14- 38,40,42,

Tablo 23. Meme normal örneklerinde, GSTP1 geninin promotör bölgesinde yapılab bisülfid sekanslama sonuçlarının sınıflandırılması

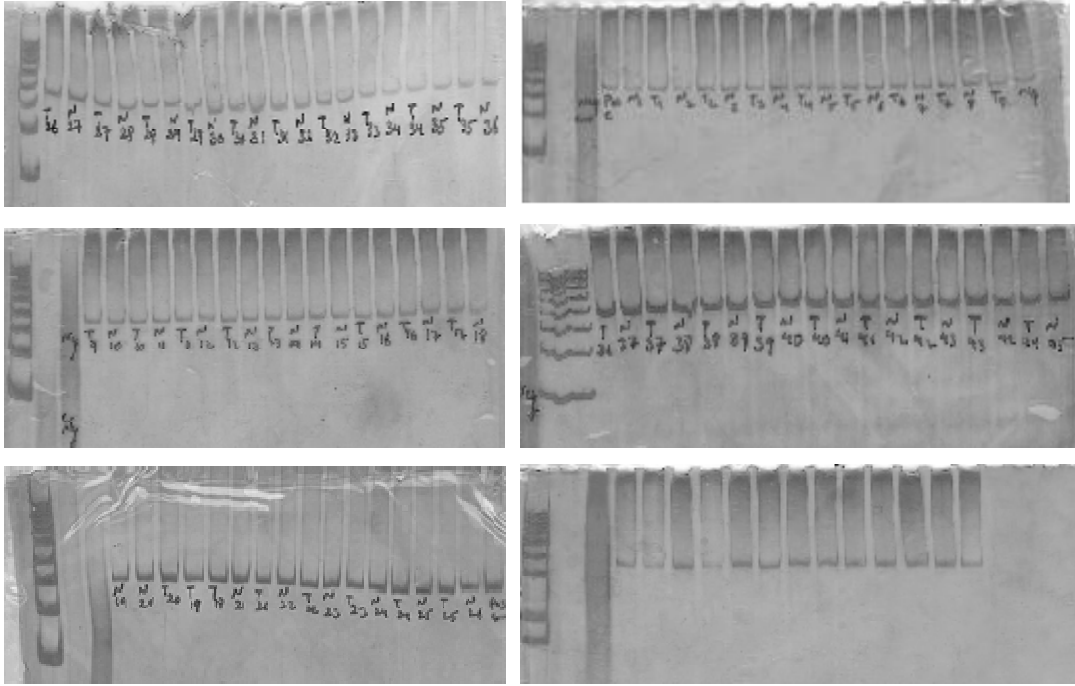
Normal dokular (GSTP1)	Metilleneme durumu	Kısmen metillenme durumu	Ful metillenme durumu	CpG bölgeleri (metillenme paterni)	ccg	ctg	cgcg
1	+	-	-				
2	+	-	-				
3	-	+	-	162	-	-	-
4	+	-	-				
5	-	+	-				
6	+	-	-				
7	+	-	-				
8	+	-	-				
9	-	+	-	54	54	-	-
10	missed	-	-				
11	+	-	-				
12	missed	-	-				
13	+	-	-				
14	-	+	-	4	-	-	-
15	+	-	-				
16	+	-	-				
17	+	-	-				
18	+	-	-				
19	+	-	-				
20	+	-	-				
21	+	-	-				
22	+	-	-				
23	+	-	-				
24	missed	-	-				
25	+	-	-				
26	+	-	-				
27	+	-	-				
28	+	-	-				
29	+	-	-				
30	+	-	-				
31	+	-	-				
32	-	+	-	176,127,148,109,4,23,54	176,148,127,54	-	-
33	+	-	-				
34	+	-	-				
35	+	-	-				

36	+	-	-				
37	+	-	-				
38	+	-	-				
39	-	+	-	43,22,8,11,14,47,54	11,14,47,54	-	8,11,14
40	+	-	-				
41	+	-	-				
42	+	-	-				
43	+	-	-				
44	+	-	-				
45	+	-	-				
46	+	-	-				
47	+	-	-				
48	+	-	-				
49	+	-	-				
50	+	-	-				



#### 4.2.2 Meme tümör ve normal örneklerin GSTP1 genine özel BSP ürünlerinin jelde görünülmesi

Meme tümör ve normal örneklerin üzerinde yapılan BSP ürünleri, % 8 poliakrilamid jelinde yürütüldü ve BSP için ayarlanan primerlerin mahiyetine göre, metillenen ve metillenmeyen örneklerde ürün bulunmaktadır. Negatif kontrol olarak, bisülfite ile muamele olmamış genomic örnek ve pozitif kontrol olarak universal hazır tam metillenmiş DNA örneği kullandı ( Şekil 32).

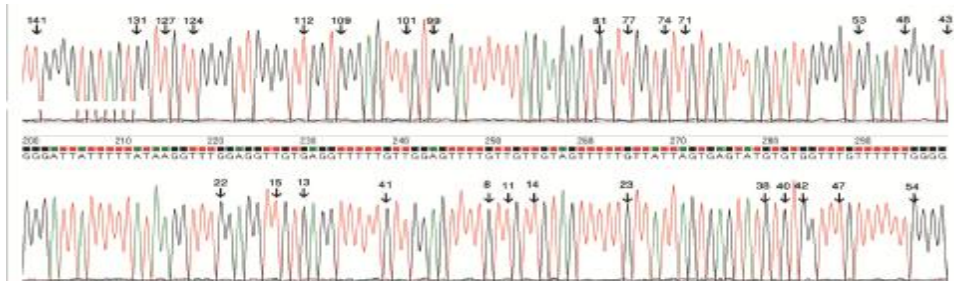
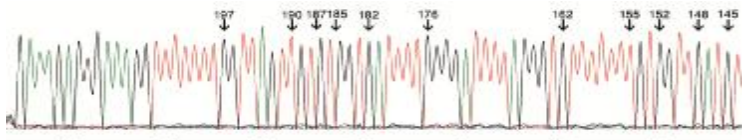
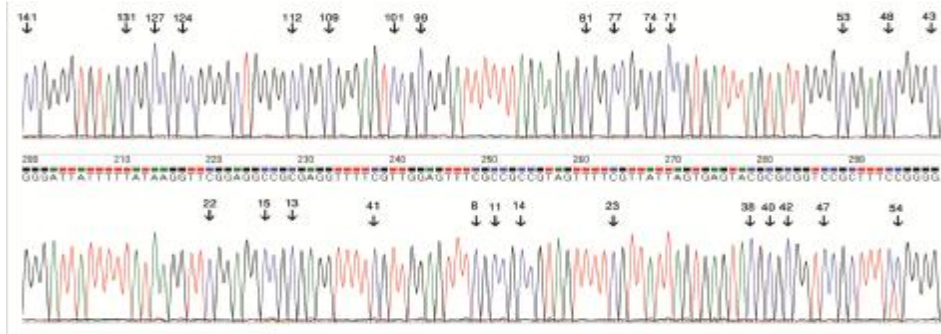
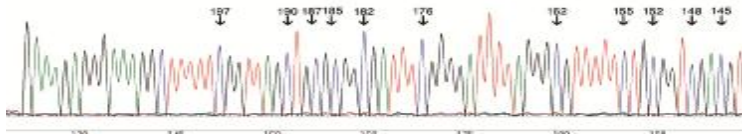


Şekil 32. Meme tümör ve normal örneklerinde, GSTP1 geninin promöter bölgesine özel PCR ürünlerin poliakrilamid jeldinde görüntüsü

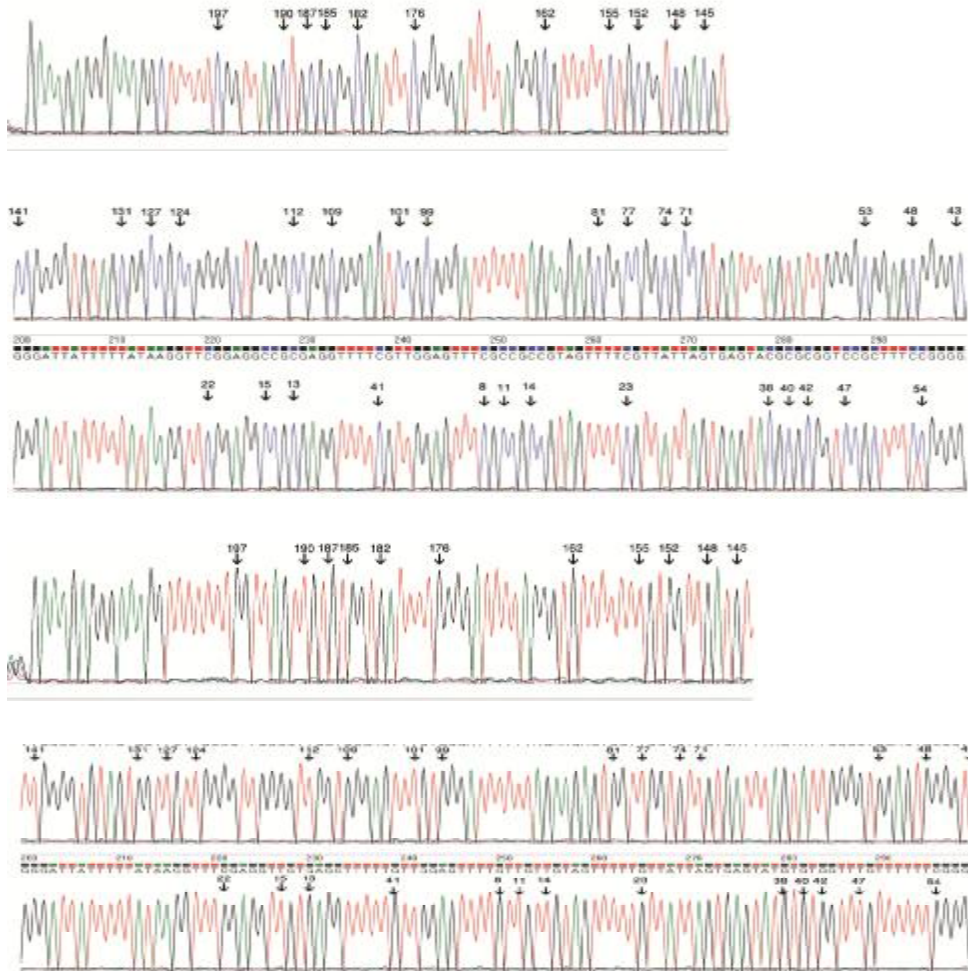
#### 4.2.3 Meme tümör ve normal örneklerin GSTP1 genine bisülfite özel sekanslama sonuçlarının farklı düzeylerde görüntülerinin örnekleri

Elde edilen BSP ürünlerinin bisülfite sekanslamasının sonuçları, üç sınıfta bulundu: bütün CpG noktalarında metillenen örnekler tam metillenen örnekler adlandırıldı ( T6,...) ve diğerleri sadece kaç CpG noktasında metillenmiştir ve bunlar kısmen metillenen örneklerde sınıflandırıldı (T23,...) ve hiç bir noktada metillenmeyen örnekler bulundu (T31,...). E-cadherin için promotör bölgesinde bulunan 40 CpG noktalar, numara olarak promotörde konumlarına göre adlandırıldı: 4, 8, 11, 13, 14, 15, 22, 23, 38, 40, 42, 43, 47, 48, 53, 54, 71, 74, 77, 81, 99, 101, 109, 112, 124, 127, 132, 141, 145, 148, 152, 155, 162, 176, 182, 183, 185, 187, 190, 197 (Şekil 33).

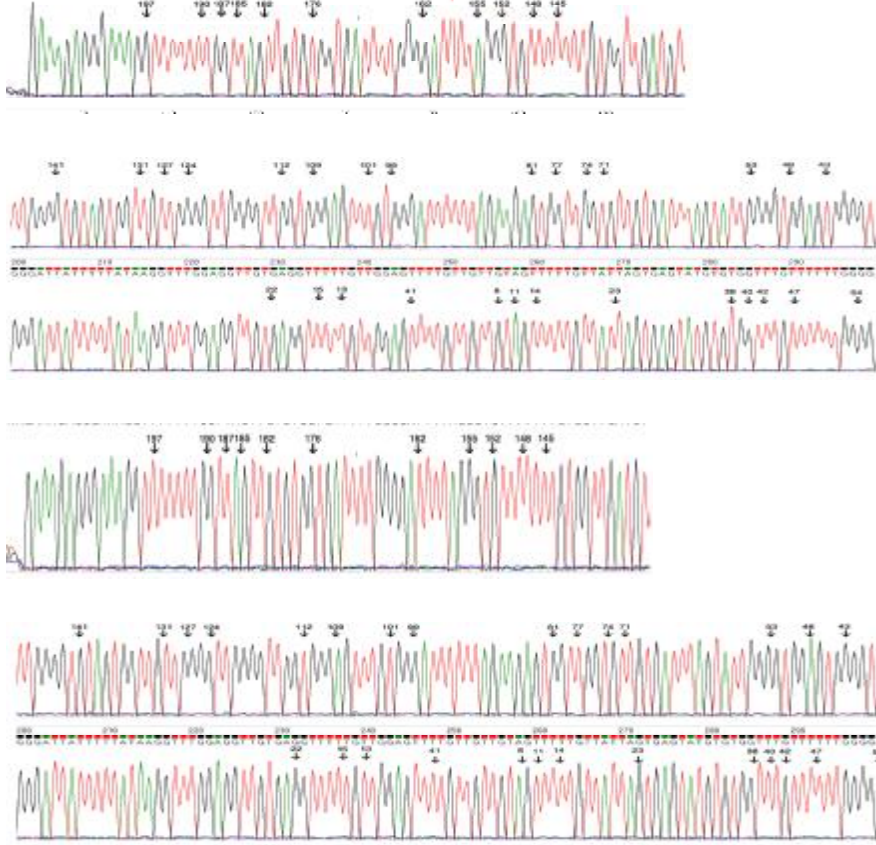
**T6: Tam metillenme N6: Metillenmemiş**



**T23: kısmen metillenmiş N23: Metillenmemiş**



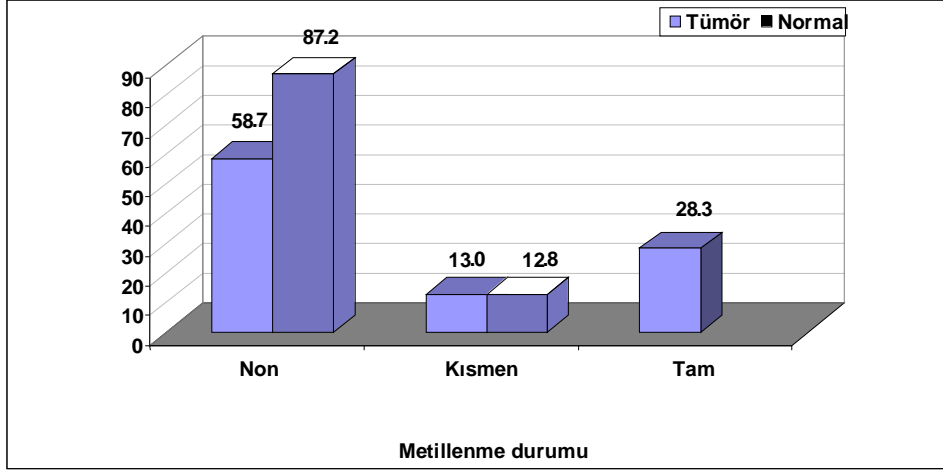
### T31: Metillenmemiş N31: Metillenmemiş



Şekil 33.GSTP1 geninde promotör bölgesinin BSP ürününün normal ve tümör örneklerinde, bisülfıt sekanslama görüntüsü

#### **4.2.4. GSTP1 geninde meme tümör ve civarındaki normal dokuların metillenme durumu**

Meme kanser hastaların ortalama yaşı 48 (23-74) olarak gözlenmiştir. Tümör örneklerin % 92'si invaziv, % 4,0'ü non-invaziv ve % 4,0'ü insitu tipinde bulunmuştur. Ayrıca tümörün sayısı hastalarda % 92,0'de bir tane, % 6,0 'da 2 tane ve % 2,0'de 10 tane bulunmuştur. Tümör örneklerinde % 28,3'ü (13 örnek 46 örnekten) tam metillenmiş, % 13'ü (6 örnek 46 örnekten) kısmen ve % 58,7'i (27 örnek 46 örnekten) metillenmemiştir. Ayrıca normal meme dokularında genellikle örneklerin % 87,2'i metillenmemiştir ve % 12,8'inde kısmen metillenme gözlenmiştir. Pearson-ki kare testi ile yapılan sonuçlara göre, metillenme olayı tümör ve normal meme dokuların arasında anlamlı derecede farklıdır (p= 0.000) (Şekil 34 ve Tablo 24).



Şekil 34. GSTP1 geninde tümör ve normal dokuların metillenme sıklığı

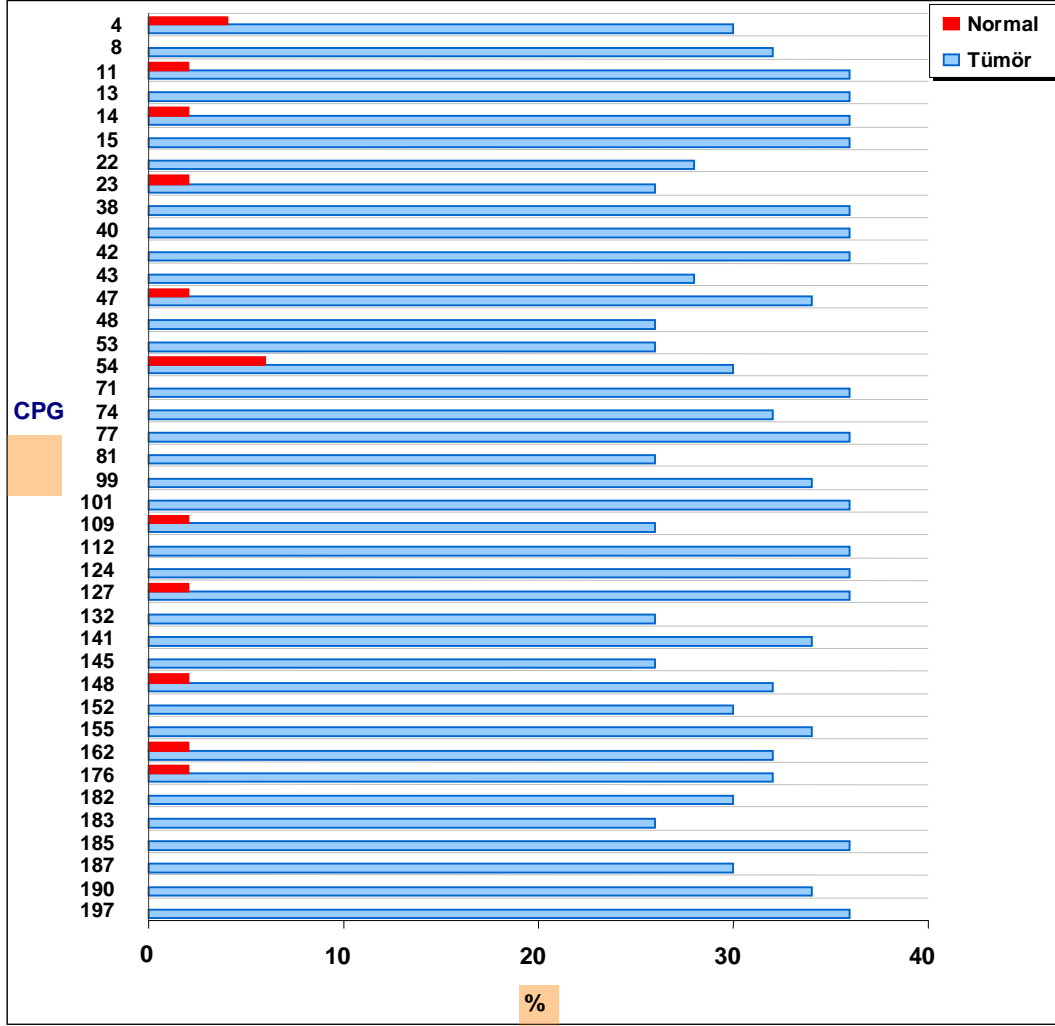
Tablo 24. GSTP1 geninde tümör ve normal dokularda metillenme durumunun sıklığının kısılaması

Metillenme durumu		Grup		Tam
		Tümör	Normal	
Metillenmemiş	Sayı	27	41	68
	%	58,7%	87,2%	73,1%
Kısmen metillenmiş	Sayı	6	6	12
	%	13,0%	12,8%	12,9%
Tam metillenmiş	Sayı	13		13
	%	28,3%		14,0%
Tam	Count	46	47	93
	%	100,0%	100,0%	100,0%

#### 4.2.4. GSTP1 geninde meme tümör ve civarındaki normal dokuların metillenme paterninin durumu

Tümör ve normal dokulardaki metillenen noktaların sıklığı anlamlı şekilde farklılık göstermiştir ( $p=0.000$ ). Ayrıca CpG noktalarının metillenme paterninde (CpG noktalarının hangisinin metillenmesi), normal ve tümör dokuların arasında metillenme sıklığı anlamlı farklılık

gözlemiştir (p=0.000). Tümör dokularında metillenmiş CpG noktaları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ve normal dokularda en sık metillenmiş noktalar (176,162,148,127,109, 47, 23,14,11 ve 4) elde edildi. (Şekil 35)



Şekil 35. GSTP1 geninde tümör ve normal dokuların metillenme paterni

#### 4.2.5. GSTP1 geninde meme tümör dokuların metillenme durumu ile tümör evresinin (stage) arasında ilişkisi

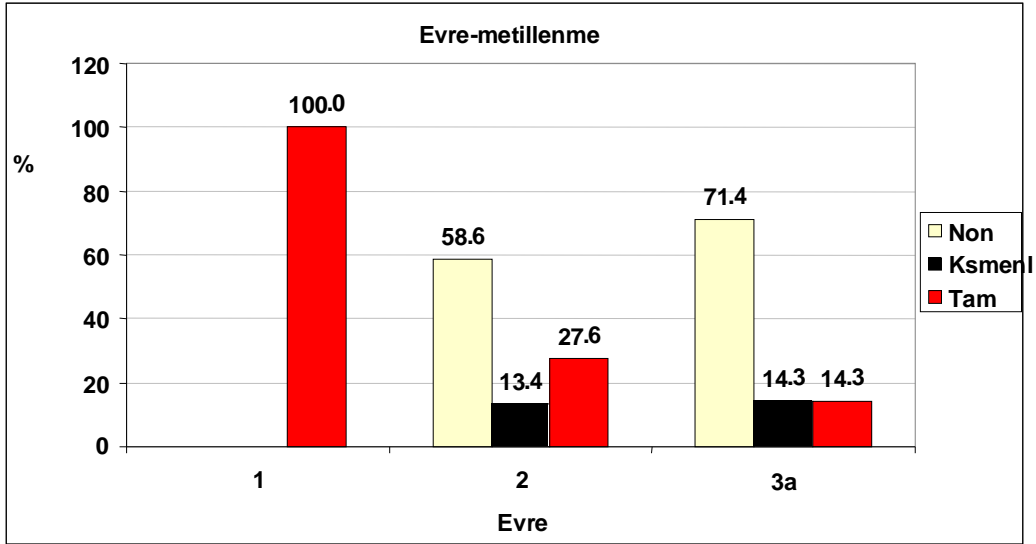
Genel olarak meme tümörün evresi, GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenmeyi etkilemiştir ve bu iki parameter arasında anlamlı ilişki gözlenmiştir (p= 0.022). Evre 1’de tümör örneklerin % 100’ünde, metillenmiş durumu gözlenmiştir. Evre 2’de, örneklerin % 58.6’inde

metillenmemiş ve % 13,8’unda kısmen metillenme ve % 27,6 tam metillenmiştir ve Evre 3a’da, tümör örneklerin % 71,43’ü metillenmemiş, % 14,29’unda kısmen metillenmiş ve % 14,29’unda tam metillenmiş durumu gözlenmiştir (Şekil 36 ve Tablo 25).

Sekanslama sırasında, 4 tane tümör ve 3 tane normal dokuların sonuçları kayb oldu ve sonuçlanmadı bu yüzden evre sonuçlarının 50 tane olmasına rağmen, kayb olan örneklerin evreleride istatistik analizlerden atıldı, bu mantık bütün diğer hesaplamalarda da uygulanmıştır.

Tablo 25. GSTP1 geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümör evresinin ilişkisi

		Metillenme durumu	Tam metillenme	Kısmen metillenme	Metillenmemiş
Evre	Korelasyon değeri	.284(*)	.298(*)	.108	.272
	Sig. (2-tailed)	.022	.035	.454	.056
	N	46	46	46	46



Şekil 36. GSTP1 geninde tümör dokuların metillenme sıklığı ile tümör evresinin arasında ilişki

#### 4.2.6. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün evresinin arasında ilişki

Meme tümörünün evresi, GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenmeyi etkilemiştir ve 183, 176, 162, 152, 148, 145, 132, 109, 99, 81,74, 53, 48, 47, 43, 23 ve 8. CpG adacıklarında metillenme olayı ve tümör evresi arasında çok anlamlı farklılık gözlenmiştir . (Tablo 26).

Tablo 26. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör evresi arasında ilişkisi

		Korelasyonun katsayısı (coefficient)	Sig. (2-tailed)
Evre	CPG_197	0.23	0.111
	CPG_190	0.21	0.135
	CPG_187	0.19	0.196
	CPG_185	0.23	0.111
	CPG_183	0.33(*)	0.021
	CPG_182	0.27	0.061
	CPG_176	0.28(*)	0.049
	CPG_162	0.28(*)	0.049
	CPG_155	0.21	0.135
	CPG_152	0.35(*)	0.013
	CPG_148	0.28(*)	0.049
	CPG_145	0.33(*)	0.021
	CPG_141	0.21	0.135
	CPG_132	0.33(*)	0.021
	CPG_127	0.23	0.111
	CPG_124	0.23	0.111
	CPG_112	0.23	0.111
	CPG_109	0.33(*)	0.021
	CPG_101	0.23	0.111
	CPG_99	0.29(*)	0.039
CPG_81	0.33(*)	0.021	
CPG_77	0.23	0.111	
CPG_74	0.28(*)	0.049	
CPG_71	0.23	0.111	



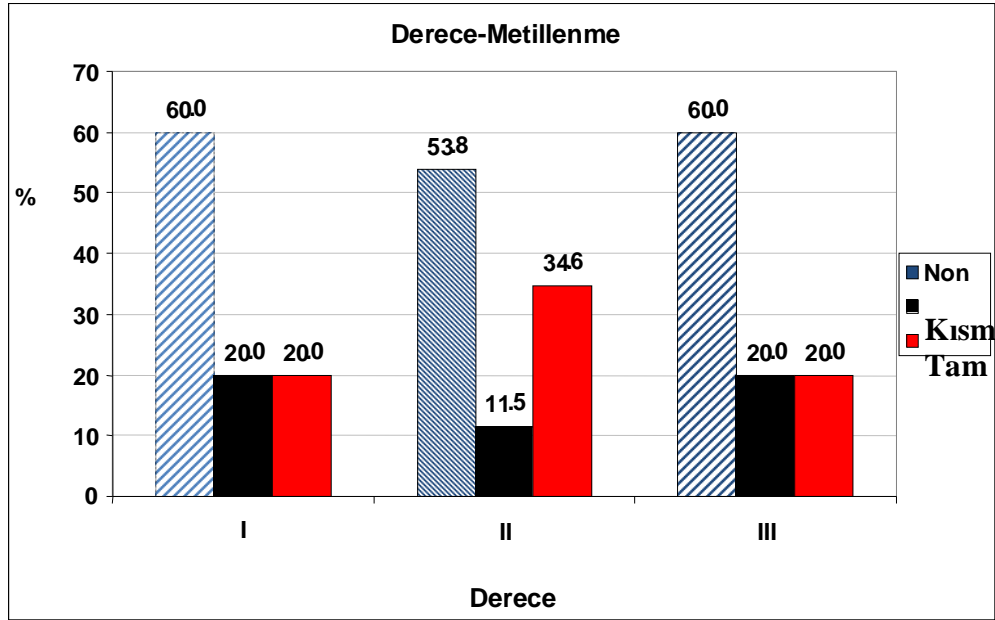
	CPG_54	0.27	0.061
	CPG_53	0.33(*)	0.021
	CPG_48	0.33(*)	0.021
	CPG_47	0.29(*)	0.039
	CPG_43	0.34(*)	0.017
	CPG_42	0.23	0.111
	CPG_40	0.23	0.111
	CPG_38	0.23	0.111
	CPG_23	0.33(*)	0.021
	CPG_22	0.25	0.075
	CPG_15	0.23	0.111
	CPG_14	0.23	0.111
	CPG_13	0.23	0.111
	CPG_11	0.23	0.111
	CPG_8	0.36(*)	0.010
	CPG_4	0.27	0.061

**4.2.7. GSTP1 geninde meme tümör dokuların metillenme durumu ile tümör derecesi (grade) arasında ilişkisi**

Genel olarak GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme ile tümörün derecesi arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p= 0.849). Tümör örneklerinde, derece I'de, örneklerin % 60'i metillenmemiş, % 20'si kısmen (partial) ve % 20'sinde tam metillenme gözlemiştir. Derece II'de, örneklerin % 53,8'i metillenmemiş, % 11,5'ı kısmen (partial) ve % 34,6'si tam metillenmiştir. Derece III'de, örneklerin % 60'ı metillenmemiş, % 20'si kısmen (partial) ve % 20'i tam metillenme gözlenmiştir (Tablo 27, Şekil 37).

Tablo 27. GSTP1 geninde tümör dokuların metillenme durumu ile tümörün derecesinin ilişkisi

		Metillenme durumu	Tam metillenme	Kısmen metillenme	Metillenmemiş
Derece	Korelasyon	.031	.059	.038	.052
	Sig. (2tailed)	.849	.702	.802	.732
	N	45	45	45	45



Şekil 37. GSTP1 geninde tümör dokuların metillenme sıklığı ile tümörün derecesi ile ilişkisi

#### 4.2.6. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün derecesinin arasında ilişki

Spearman korelasyon analizinin sonuçlarına göre, tümörün derecesi, GSTP1 geninin promotör bölgesinde olan CpG adacıkların metillenmesinde ( farklı CpG noktaları) etkisiz bulunmuştur ( $p > 0.05$ ) ( Tablo 28).

Tablo 28. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün derecesinin arasında ilişki

CpG noktaları	Derece(grade)	
	Korelasyon katsayısı (coefficient)	Sig. (2 şerli)
CPG_197	0.17	0.262
CPG_190	0.18	0.231
CPG_187	0.04	0.806
CPG_185	0.17	0.262
CPG_183	0.03	0.847
CPG_182	0.04	0.806
CPG_176	0.11	0.468
CPG_162	0.11	0.468
CPG_155	0.18	0.231
CPG_152	0.12	0.423
CPG_148	0.11	0.468
CPG_145	0.03	0.847
CPG_141	0.10	0.513
CPG_132	0.03	0.847
CPG_127	0.17	0.262
CPG_124	0.17	0.262
CPG_112	0.17	0.262
CPG_109	0.03	0.847
CPG_101	0.17	0.262
CPG_99	0.18	0.231
CPG_81	0.03	0.847
CPG_77	0.17	0.262
CPG_74	0.11	0.468
CPG_71	0.17	0.262
CPG_54	0.04	0.806
CPG_53	0.03	0.847
CPG_48	0.03	0.847
CPG_47	0.18	0.231
CPG_43	0.05	0.754
CPG_42	0.17	0.262
CPG_40	0.17	0.262

CPG_38	0.17	0.262
CPG_23	0.03	0.847
CPG_22	0.04	0.802
CPG_15	0.17	0.262
CPG_14	0.17	0.262
CPG_13	0.17	0.262
CPG_11	0.17	0.262
CPG_8	0.19	0.201
CPG_4	0.04	0.806

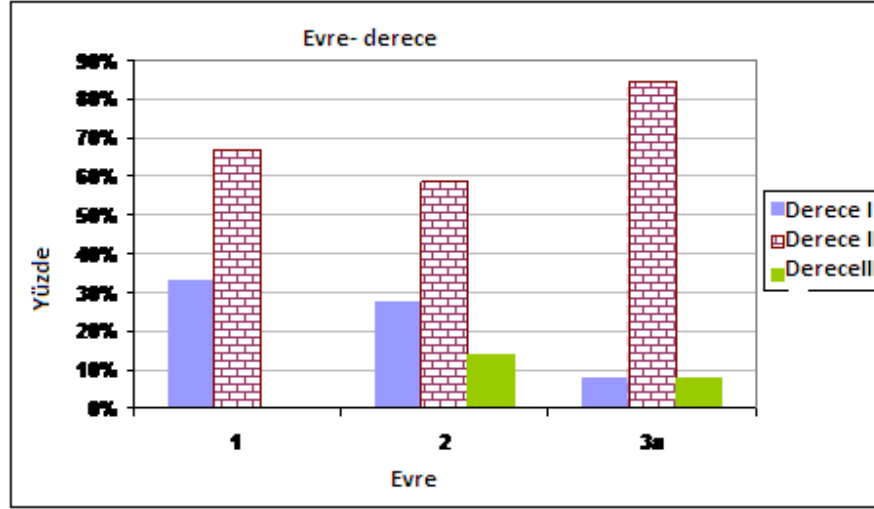
GSTP1 geninin promotör bölgesinin CpG adacıklarında oluşan metillenme ve tümörün derecesi arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p=0.467$ ) (Tablo 28).

#### **4.2.7. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün evresi ve derecesi arasında ilişki**

Bulgulara göre, GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme sıklığı ile meme tümörünün evresi ve derecesi arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir (Tablo 29, Şekil 38)

Tablo 29. Meme tümöründe GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün evre ve derecesi arasında ilişkisi (yüzdesi)

			Evre			Tam
			1	2	3a	
Derece (grade)	I	Sayı	1	8	1	10
		%	33.3	27.6	7.7	22.2
	II	Sayı	2	17	11	30
		%	66.7	58.6	84.6	66.7
	III	Sayı	0	4	1	5
		%	.0	13.8	7.7	11.1
Tam		Sayı	3	29	13	45
		%	100.0	100.0	100.0	100.0



Şekil 38. Meme tümöründe GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün evre ve derecesinin arasında ilişkisi

Bulgulara göre metilleme sıklığı ve meme tümörünün dokularının evresi arasında anlamlı ilişki bulunmaktadır ( $p= 0.031$ ) ve metillenme durumu ile meme tümörünün dokularının derecesi (grade) arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p= 0.849$ ).

#### ***4.2.8. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün evresi ve derecesi arasında ilişki***

Bulgulara göre meme tümöründe GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme ile tümörün evresi ve derecesi arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (tümör evresi,  $p=0.048$ ) (tümör derecesi,  $p= 0.467$ ) (Tablo 30).

Tablo 30. Meme tümöründe GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün evre ve derecesi arasında ilişkisi

	Evre			Derece (grade)		
	1	2	3a	I	II	III
CPG_197	3	11	4	5	11	1
CPG_190	3	10	4	5	10	1
CPG_187	3	8	4	3	10	1
CPG_185	3	11	4	5	11	1
CPG_183	3	8	2	2	9	1
CPG_182	3	9	3	3	10	1
CPG_176	3	11	3	4	11	1
CPG_162	3	10	4	4	11	1
CPG_155	3	10	4	5	10	1
CPG_152	3	10	2	4	9	1
CPG_148	3	11	3	4	11	1
CPG_145	3	8	2	2	9	1
CPG_141	3	10	4	4	11	1
CPG_132	3	8	2	2	9	1
CPG_127	3	12	4	5	12	1
CPG_124	3	11	4	5	11	1
CPG_112	3	11	4	5	11	1
CPG_109	3	9	2	2	10	1
CPG_101	3	11	4	5	11	1
CPG_99	3	11	3	5	10	1
CPG_81	3	8	2	2	9	1
CPG_77	3	11	4	5	11	1
CPG_74	3	10	3	4	10	1
CPG_71	3	11	4	5	11	1
CPG_54	4	11	3	3	13	1
CPG_53	3	8	2	2	9	1

CPG_48	3	8	2	2	9	1
CPG_47	4	11	3	5	11	1
CPG_43	3	9	2	3	9	1
CPG_42	3	11	4	5	11	1
CPG_40	3	11	4	5	11	1
CPG_38	3	11	4	5	11	1
CPG_23	3	9	2	2	10	1
CPG_22	3	8	3	2	10	1
CPG_15	3	11	4	5	11	1
CPG_14	4	11	4	5	12	1
CPG_13	3	11	4	5	11	1
CPG_11	4	11	4	5	12	1
CPG_8	3	11	2	5	9	1
CPG_4	3	10	4	3	12	1

**4.2.9. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün geridönüşümü, metastaz durumu ve kemoterapi arasında ilişki**

Bulgulara göre, bu parametreler tümör dokularında, GSTP1 geninin promotör bölgesinde bulunan CpG adacıklarının metillenmesini etkilemiştir ve tümörün metastazı ve metillenme durumu arasında ( $p=0.000$ ), tümörün kemoterapisi ve metillenme durumu arasında ( $p=0.059$ ) ve tümörün geridönüşümü ve metillenme durumu arasında ( $p=0.047$ ) ilişki gözlenmiştir (Tablo 31).

Tablo 31. GSTP1 geninin promotörünün bölgesinde metillenme durumu ile meme tümörünün metastaz, kemoterapi etkisi ve tümörün geridönüşümünün arasında ilişkisi

		Geridönüşüm	Kemoterapi	Metastaz
Metillenme durumu	Korelasyon Katsayısı(Coefficient)	.295(*)	.280	.503(**)
	Sig. (2 şerli)	.047	.059	.000
	N	46	46	46

**4.2.10. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümörün geridönüşümü, metastaz durumu ve kemoterapi arasında ilişki**

Elde edilen bulgulara göre, metillenme paterni tümörün farklı şerhleme durumlarında, çeşitli sonuçlar göstermektedir ve tümörün geridönüşümünde, 197, 190, 185, 183, 176, 162, 155 ve 148. Noktalar, tümörün kemoterapisinde, 152 ve 52. Nokta ve tümörün metastazında hep noktalarında, metillenme ile anlamlı ilişki göstermektedir (Tablo 32).

Tablo 32. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile meme tümörünün metastazı, kemoterapi etkisi ve tümörün geridönüşümü arasında ilişkisi

	Geridönüşüm		Kemoterapi		Metastaz	
	Pearson Korelasyonu	Sig.	Pearson korelasyonu	Sig.	Pearson Korelasyonu	Sig.
CPG_197	0.30*	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_190	0.32*	0.022	0.25	0.074	0.29	0.043
CPG_187	0.26	0.067	0.16	0.264	0.36	0.010
CPG_185	0.30*	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_183	0.32*	0.026	0.20	0.159	0.54	0.000
CPG_182	0.26	0.067	0.16	0.264	0.45	0.001
CPG_176	0.35*	0.013	0.27	0.054	0.41	0.003
CPG_162	0.35*	0.013	0.14	0.324	0.41	0.003
CPG_155	0.32*	0.022	0.25	0.074	0.29	0.043
CPG_152	0.26	0.067	0.30	0.037*	0.45	0.001
CPG_148	0.35*	0.013	0.27	0.054	0.41	0.003
CPG_145	0.32	0.026	0.20	0.159	0.54	0.000
CPG_141	0.32	0.022	0.25	0.074	0.38	0.007
CPG_132	0.32	0.026	0.20	0.159	0.54	0.000
CPG_127	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_124	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_112	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_109	0.32	0.026	0.20	0.159	0.54	0.000
CPG_101	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_99	0.32	0.022	0.25	0.074	0.38	0.007
CPG_81	0.32	0.026	0.20	0.159	0.54	0.000
CPG_77	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_74	0.35	0.013	0.14	0.324	0.41	0.003
CPG_71	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_54	0.26	0.067	0.30	0.037*	0.45	0.001
CPG_53	0.32	0.026	0.20	0.159	0.54	0.000
CPG_48	0.32	0.026	0.20	0.159	0.54	0.000
CPG_47	0.32	0.022	0.25	0.074	0.38	0.007
CPG_43	0.29	0.043	0.18	0.209	0.49	0.000



CPG_42	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_40	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_38	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_23	0.32	0.026	0.20	0.159	0.54	0.000
CPG_22	0.29	0.043	0.18	0.209	0.49	0.000
CPG_15	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_14	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_13	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_11	0.30	0.035	0.24	0.099	0.34	0.015
CPG_8	0.35	0.013	0.27	0.054	0.41	0.003
CPG_4	0.37	0.007	0.16	0.264	0.45	0.001

#### 4.2.11. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile tümörün türünün arasında ilişki

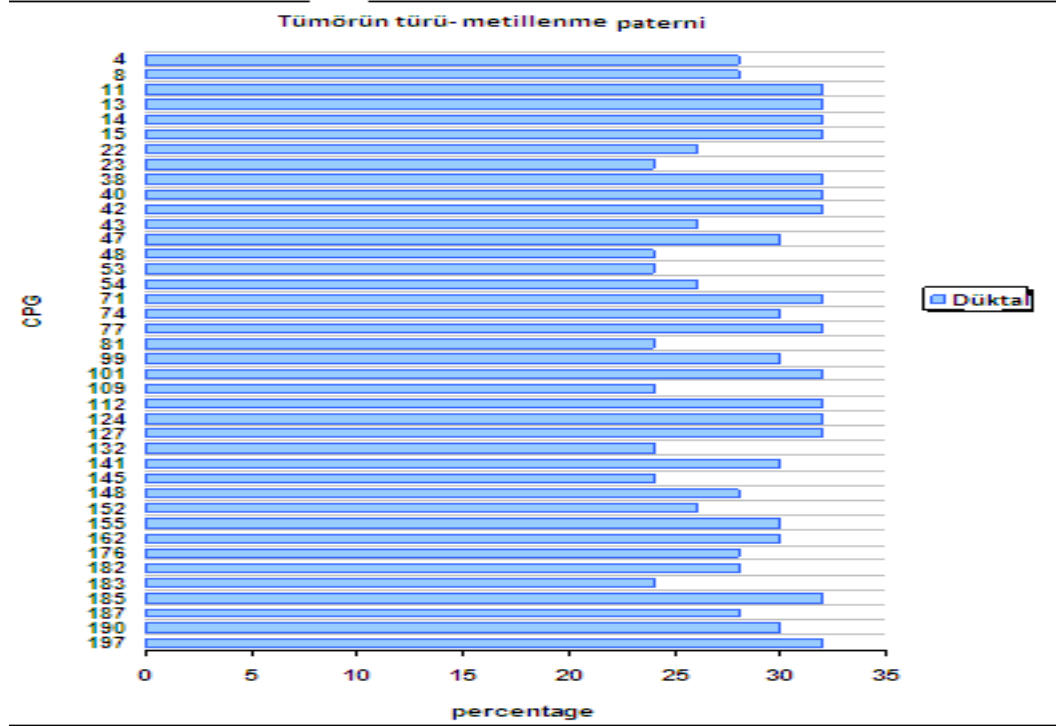
Tümörlerin çoğunluğu duktal tipinden olduğuna göre, diğer tümör türlerin çok az sayıda olması nedeni ile korelasyon ilişkisinin bağlanması mümkün olmadı ve anlamlı farklılık bulunmadı ( $p=0.24$ ), ayrıca duktal tipinden olan tümörlerin metillenme durumları etkilenmemiştir ve korelasyon analizinin sonuçlarına göre duktal tipi metillenme olayında etkisiz bulundu ( $p=0.24$ ). Farklı CpG noktalarının metillenme sıklığında tümörün duktal tipinden bağımsız bulundu ( $p=0.959$ ) (Tablo 33).

Tablo 33. GSTP1 genin promotör bölgesinde duktal tipinden meme tümörün farklı metillenme durumlarının sıklığı

		Duktal tipi tümör	
Metillenme durumu	Metillenmemiş	Sayı	24
		%	60.0
	Kısmen	Sayı	4
		%	10.0
	Tam metillenmiş	Sayı	12
		%	30.0
Tam		Sayı	40
		%	100.0

#### 4.2.12. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme paterni ile tümör türünün ilişkisi

Elde edilen bulgulara göre, duktal tipinden olan tümörlerde, farklı CpG adacıklarının metillenmesi etkilenmemiştir ve Pearson-ki kare korelasyon analizinin sonuçlarına göre bu iki ölçüt arasında anlamlı ilişki bulunmamaktadır (P= 0.34) (Şekil 39).



Şekil 39. GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme paterni ile duktal tipinden olan meme tümör türünün arasında ilişkisi

#### 4.2.13. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ve metillenme paterni ile tümör türü ve tümör evresinin arasındaki ilişki

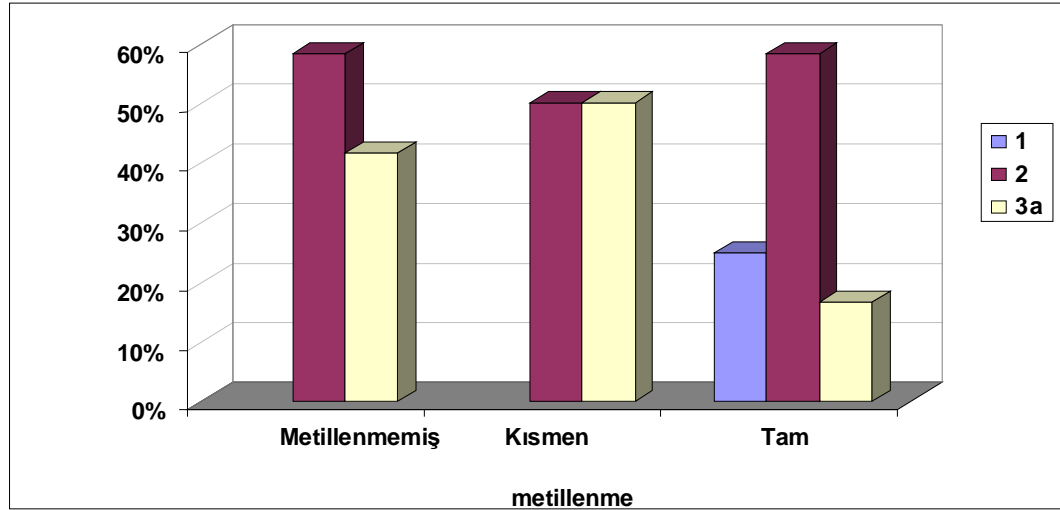
Elde edilen verilere göre tümörün duktal tipinden olan tümörlerin evrelerinde, metillenme durumu etkilenmiştir ve anlamlı farklılık gözlenmiştir dolayısıyla, duktal tipinde tümörün evresi arttıkça metillenme yüzdeside artmaktadır (p= 0.057) (Tablo 34, Şekil 40 ve 41).

Ayrıca ki-kare analiz testinin sonuçlarına göre, duktal tipinden meme tümör örneklerinin GSTP1 genine göre, CpG adacıklarının metillenme sıklığı etkilenmiştir (p= 0.048) (Şekil 41) ve CpG noktalarının sayısı yüksek olduğuna göre, bu noktalar altı sınıfta yerleştirildi ve öylesi korelasyon analizine katıldı:

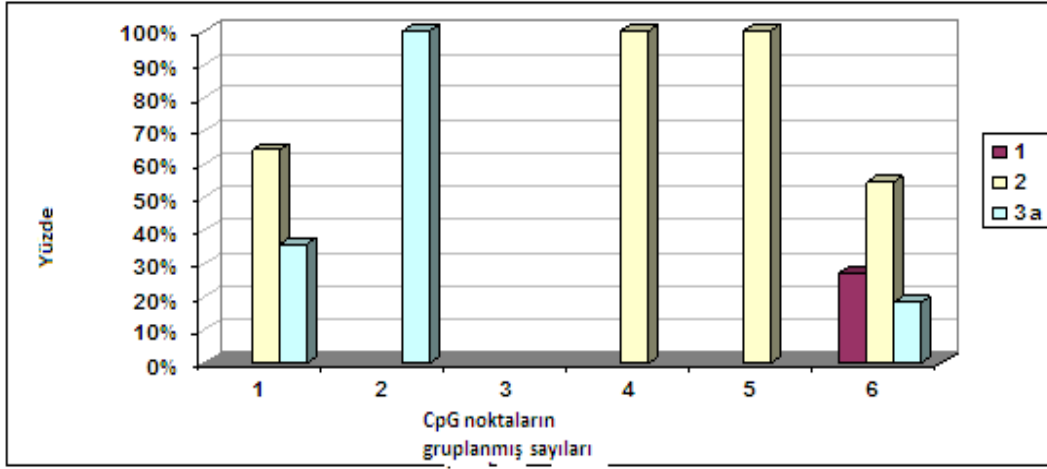
CpG noktası metillenmemiş (0) = Sınıf 1  
 24 CpG adacığı metillenmiş (24) = Sınıf 2  
 25 CpG adacığı metillenmiş (25) = Sınıf 3  
 26 CpG adacığı metillenmiş (26) = Sınıf 4  
 37 CpG adacığı metillenmiş (37) = Sınıf 5  
 40 CpG adacığı metillenmiş (40) = Sınıf 6

Tablo 34.GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile duktal tümör türü ve tümör evrelerinin arasında ilişki

Tümörün tipi				Metillenme			Tüm sayı
				Metillenmemiş	Kısmen	Tam	
Duktal	Evre	1	Count			3	3
			%			25.0	7.5
		2	Count	14	2	7	23
			%	58.3	50.0	58.3	57.5
		3a	Count	10	2	2	14
			%	41.7	50.0	16.7	35.0
Piyerson ki-kare			Değer (Value)	3.158			
			p-değeri	.057			



Şekil 40.GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ile duktal tümör türü ve tümörün evrelerinin arasında ilişki



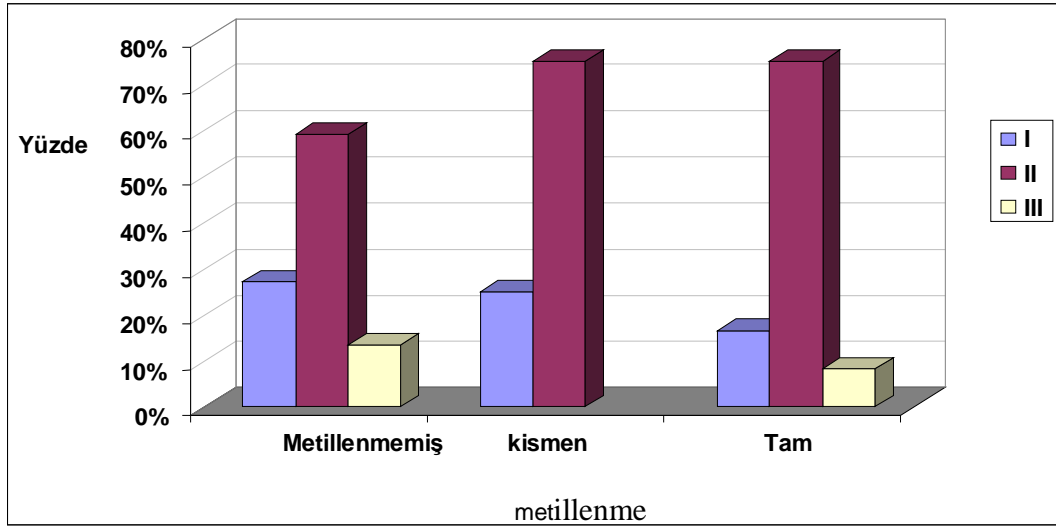
Şekil 41. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenmiş CpG noktalarının sayısı ve duktal tipinden 3 sınıfta tümörün evresinin arasında ilişki

#### 4.2.14. GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenme durumu ve paterni ile tümör türünün ve tümörün derecesi arasında ilişkisi

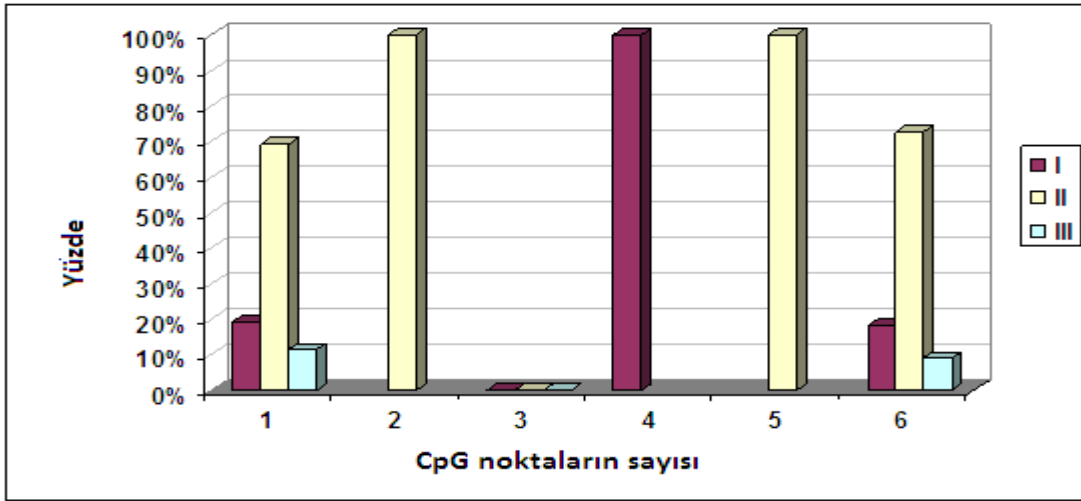
Elde edilen verilere göre, tümörün duktal tipi ile tümör derecelerinin metillenme durumu arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ve duktal tipinde olan tümör derecesi arttıkça metillenme yüzdesi de artmaktadır. Metillenmiş CpG noktalarının sayısına göre, bu noktaların sayısının sıklığı ve duktal tipinin tümör derecesi arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p= 0.048$ ) (Tablo 35, Şekil 42). Ayrıca duktal tipinde meme tümör örneklerin derecesi, farklı CpG adacıklarının metillenmesini etkilememiştir ve bu iki belirteç arasında anlamlı korelasyon bulunmadı ( $p = 0.349$ ) (Şekil 43).

Tablo 35. GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme paterni ile duktal tipinden olan meme tümörünün evresi arasında ilişkisi

Tümörün tipi	Derece			Metillenme durumu			Tüm sayı
				Metillenmemiş	Kısmen	Tam	
Duktal	I	Sayı	6	1	2	9	
		%	27.3	25.0	16.7	23.7	
	II	Sayı	13	3	9	25	
		%	59.1	75.0	75.0	65.8	
	III	Sayı	3		1	4	
		%	13.6		8.3	10.5	
Piyerson ki-kare		Değer(Value)	12.78				
		p-değeri	.048				



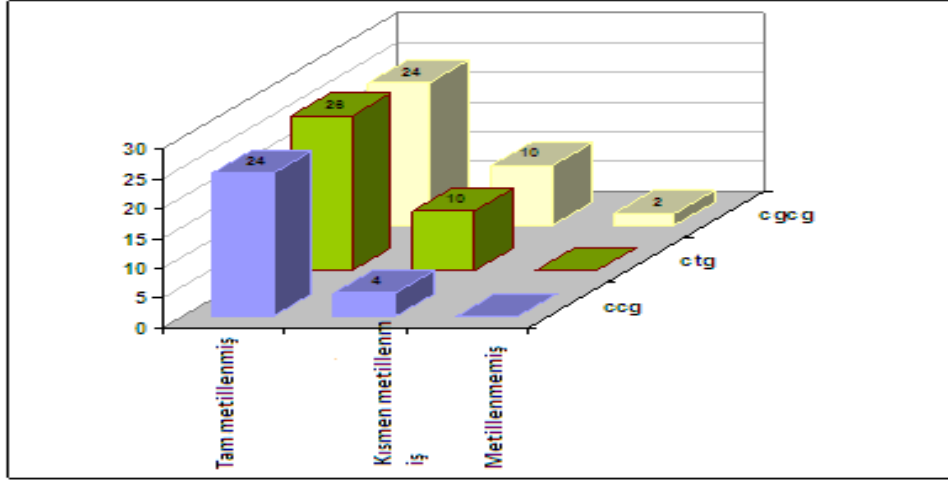
Şekil 42.GSTP1 geninin promotör bölgesindeki metillenme durumu ile, duktal tümörün türü ve derecesi (grade) arasındaki ilişki



Şekil 43.GSTP1 geninin promotör bölgesinde metillenmiş CpG noktalarının sayısı ve duktal tipinden olan, 3 sınıfta tümör derecesinin (grade) arasında ilişki

#### 4.2.16. GSTP1 genin promotör bölgesinde özel ccg,ctg ve cg cg noktaların metillenme durumu

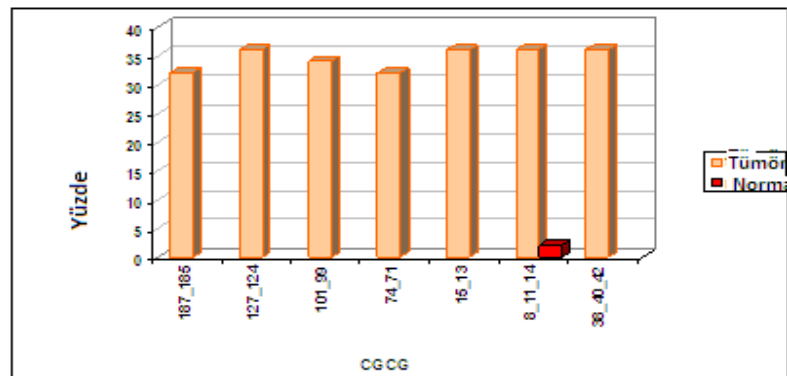
Bu noktaların sıklığı üç metillenme sınıfında (tam, kısmen ve metillenmemiş) araştırılmıştır (Şekil 44).



Şekil 44. Meme tümöründe GSTP1 genin promotöründe bulunan cgcg, ctg ve ccg noktaların metillenme yüzdesi

#### 4.2.17 GSTP1 genin promotör bölgesinde özel ccg, ctg ve cg cg noktaların metillenme paterni

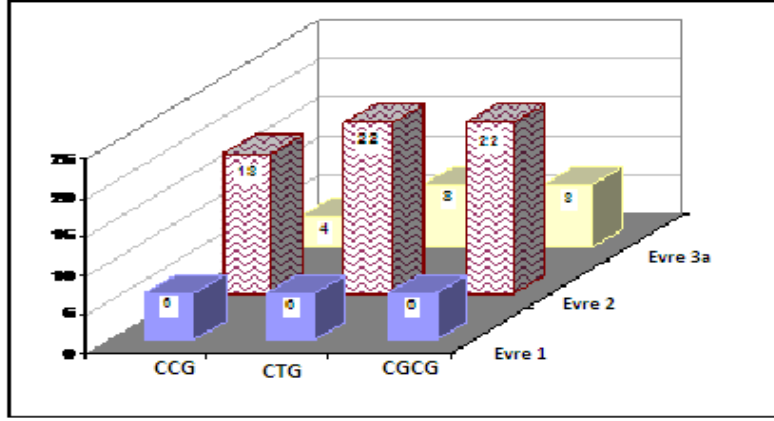
Bulgulara göre, sadece 8-11-14 CpG noktası normal ve tümör örneklerinde ortaktır (Şekil 45).



Şekil 45. Meme tümöründe GSTP1 genin promotöründe bulunan cgcg, ctg ve ccg noktaların metillenme paterninin sıklığı

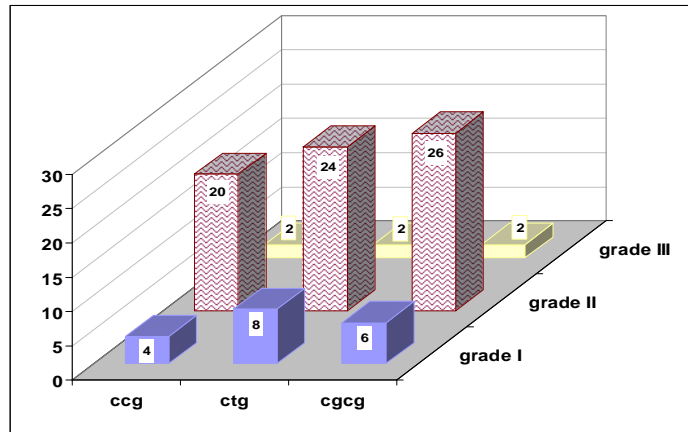
**4.2.18. GSTP1 genin promotör bölgesinde özel ccg, ctg ve cgcg noktalarının metillenme durumu ile tümörün evresi arasındaki ilişki**

Bulgulara göre, tümörlerin evre 2 ve evre 3a'da, en sık görülen CpG noktalarının türü; CTG ve CGCG'dir ve (Şekil 46).



Şekil 46. Meme tümörünün örneklerinde GSTP1 geninin promotör bölgesinde CCG, CTG ve CGCG noktalarının metillenme durumu

**4.2.19. GSTP1 genin promotör bölgesinde özel ccg, ctg ve cg cg noktalarının metillenme durumu ile tümörün derecesi arasındaki ilişki (Şekil 47)**

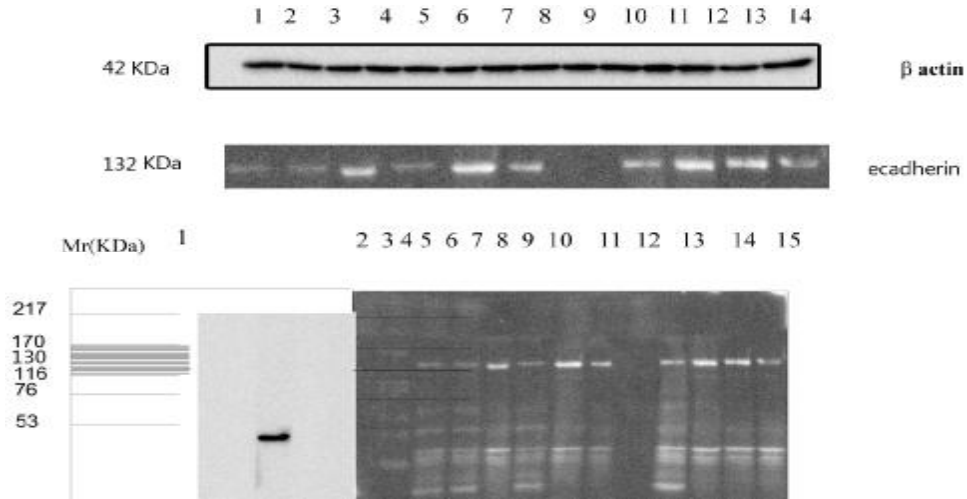


Şekil 47. Meme tümör örneklerinde GSTP1 geninin promotör bölgesinde CCG,CTG ve CGCG noktalarının metillenme paterni

### 4.3. Meme tümöründe E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve promotör bölgesinde metillenme ile kıyaslanması

#### 4.3.1. E-cadherin proteininin ekspresyon düzeyini western blotlama yöntemiyle elde edilen sonuçlarının görüntüsü

Meme tümör ve normal örneklerin üzerinde western blotlama yöntemi uygulandı ve yöntemin çalışmasına dayır pozitif kontrol olarak beta aktin proteinin (43 kD) kullanıldı ve meme kanseri için pozitif kontrol olarak MCF-7 total hücre lizatı kullanıldı. E-cadherin proteini üç bant oluşturur: 55,90 ve 132 KD ve örneklerin çoğunluğunda 132 kD'luk bant görünmektedir. Kullanan markerin boyutları 53,76, 116, 170 ve 217 kD'dur (Şekil 48 ve 49).

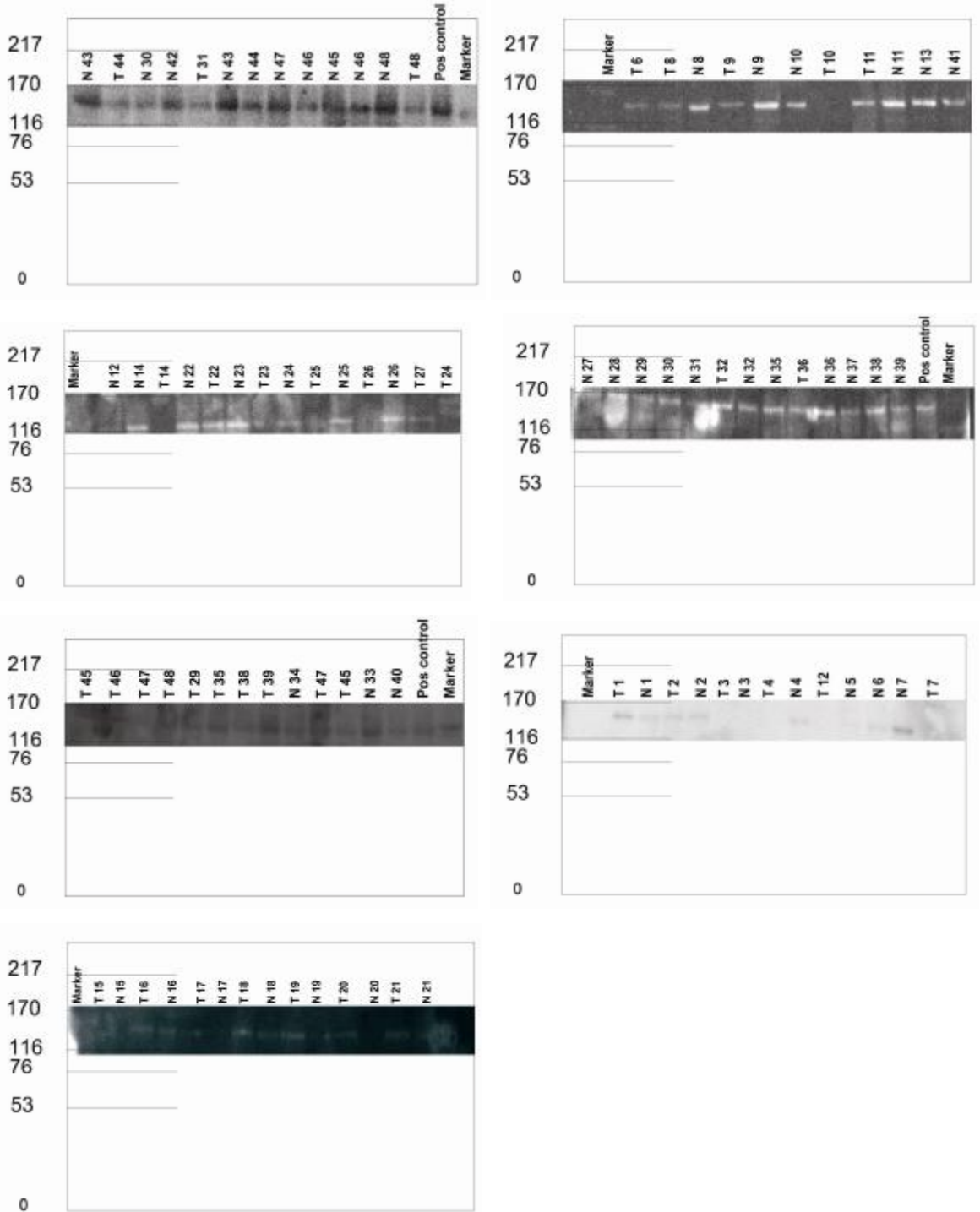


Şekil 48. E-cadherin proteini için beta aktin proteini ve E-cadherin proteinin bantlarının görüntüsü





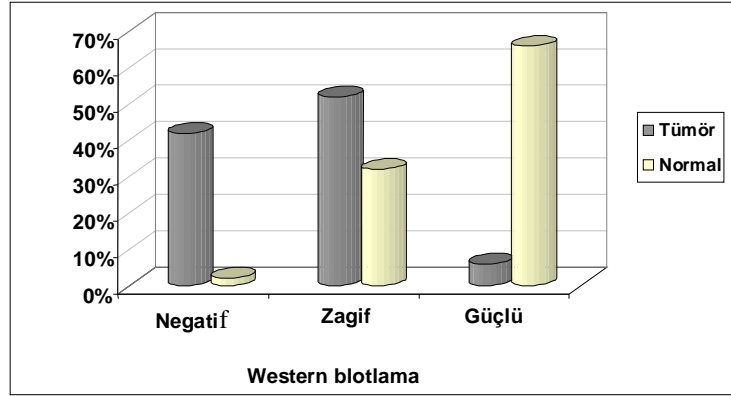
## Beta-aktin



Şekil 49. E-cadherin proteini için western blotlamada, E-cadherin ve beta aktin proteinlerinin bantlarının görüntüsünden örnekler

#### 4.3.2. Meme tümöründe, tümör ve normal örneklerde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyinin kıyaslanması

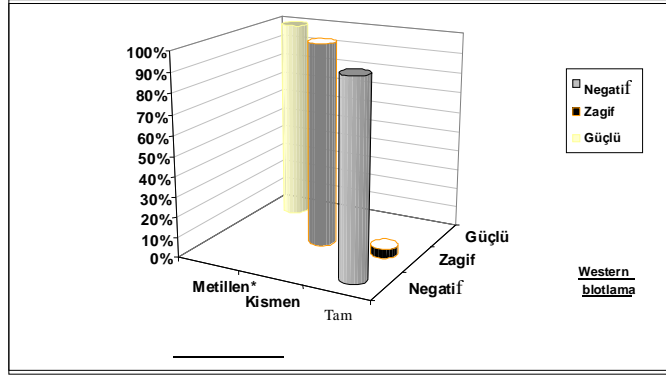
Bulgulara göre, E-cadherin proteinin üç düzeyde ( güçlü, zayıf ve negatif) ekspresyon düzeyi , normal ve tümör örnekler arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p<0.001$ , ki-kare testi)(Şekil 50).



Şekil 50. Meme tümör ve normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyonunun kıyaslanması

#### 4.3.3. Meme tümör doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasındaki ilişki

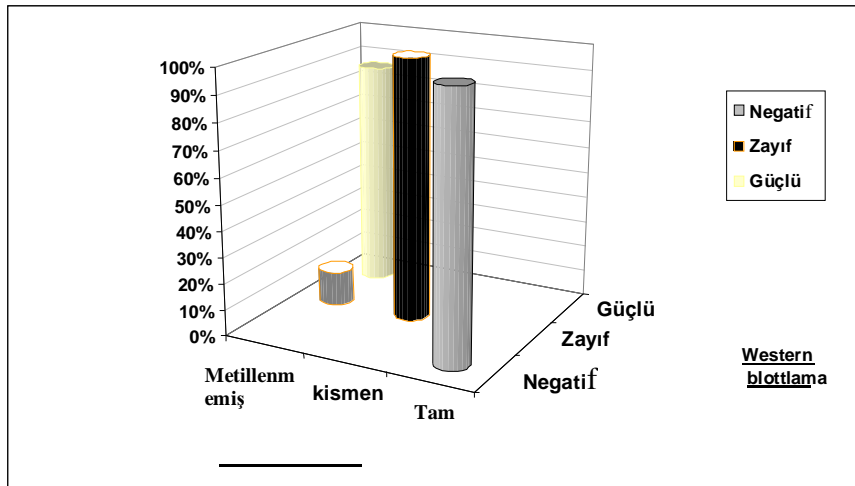
Meme tümör örneklerinde protein ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasında anlamlı ve ters ilişki gözlenmiştir dolayısıyla, promotör bölgesinde metillenme olayı, tümör örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyonunu etkilemiştir. Metillenmemiş örneklerin % 100'ünde, E-cadherin proteini eksprese olmuştur ve kısmen metillenen tümör örneklerinin, % 100'ünde zayıf protein ekspresyonu gözlenmiştir ve tam metillenen tümör örneklerinde, % 95,5'de protein ekspresyonu negatif ve % 4,5'de protein zayıf düzeyde eksprese olmuştur ( $p=0.000$ )(Şekil 51).



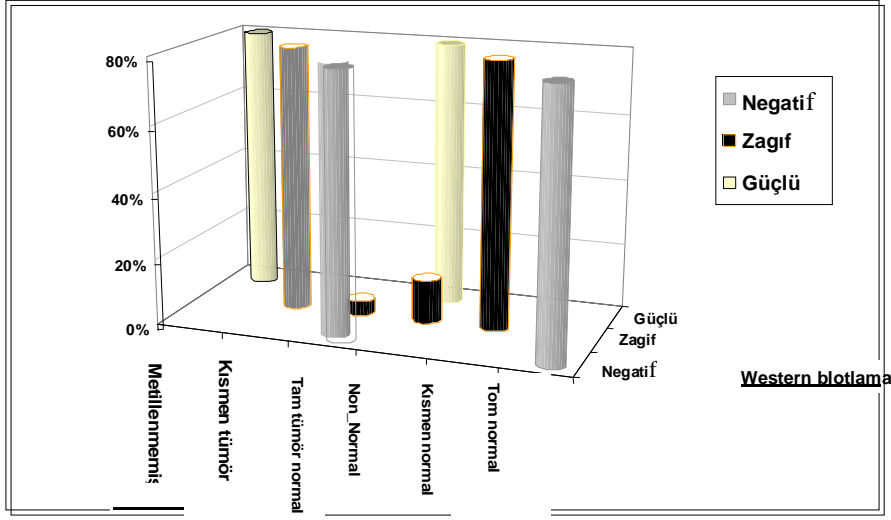
Şekil 51. Meme tümör örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasında ilişki (\*= metillenmemiş)

#### 4.3.4. Meme normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasında ilişki

Meme dokusunun normal örneklerinde protein ekspresyon düzeyi, metillenme durumu ile ters ilişkide etkilenmiştir ve metillenme durumu arttıkça, protein ekspresyon düzeyi azalmaktadır. Normal örneklerde metillenmemiş örneklerin % 13,2'sinde, E-cadherin proteini zayıf ve % 86,8'inde güçlü şekilde ekspresyon olmuştur ve kısmen metillenen normal örneklerin, % 100'ünde proteinin ekspresyonu zayıf olarak gözlenmiştir ve tam metillenen normal örneklerin, % 100'ünde proteinin ekspresyonu negatif olmuştur (  $p=0.000$ ) (Şekil 52 ve 53).



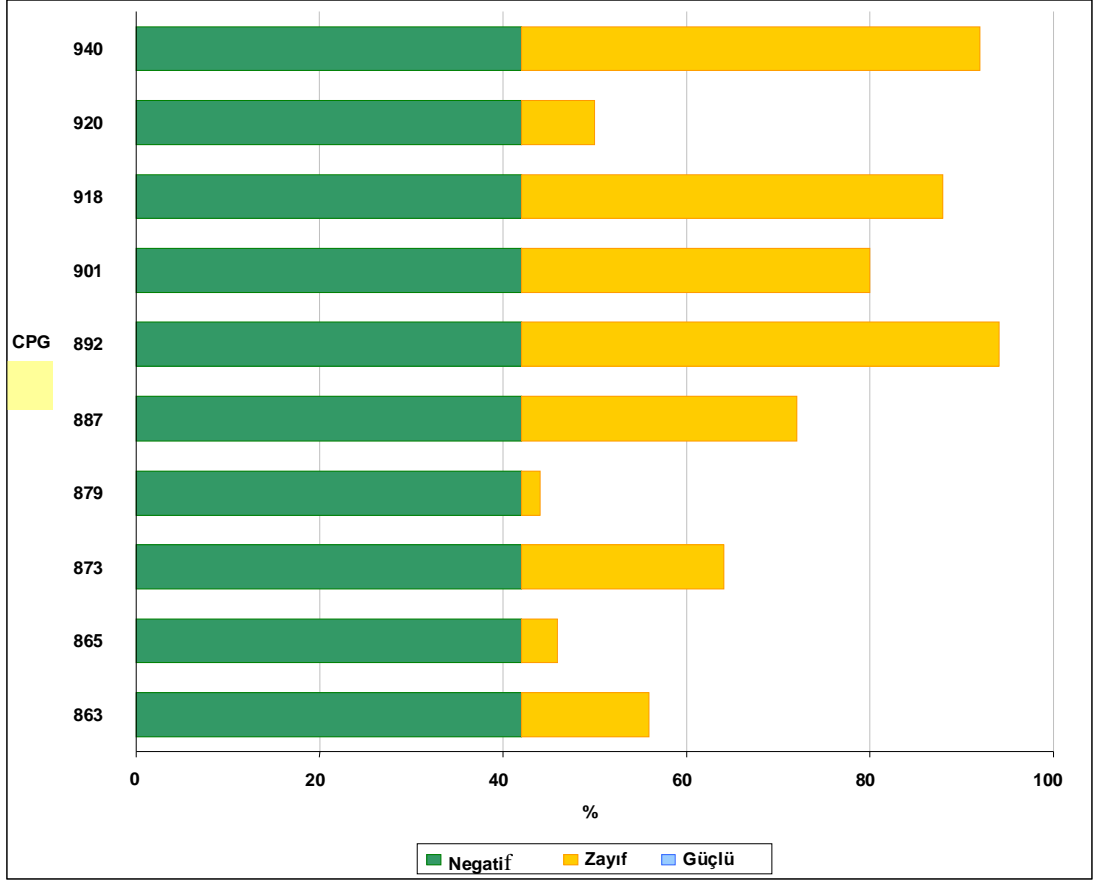
Şekil 52. Meme normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyonunun düzeyi ve metillenme durumu arasında ilişki



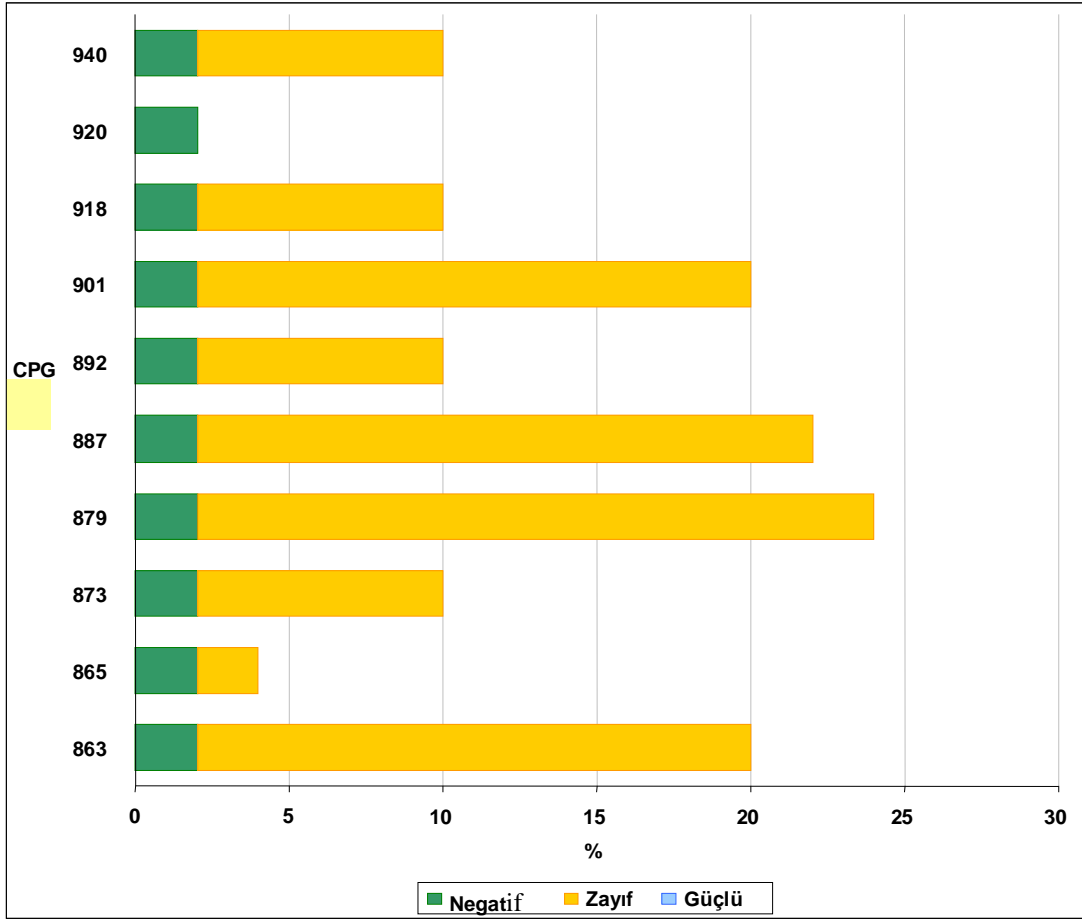
Şekil 53. Meme tümör ve normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyonunun düzeyi ve metillenme durumunun kıyaslaması

#### 4.3.5. Meme tümör ve normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme paterninin sıklığı

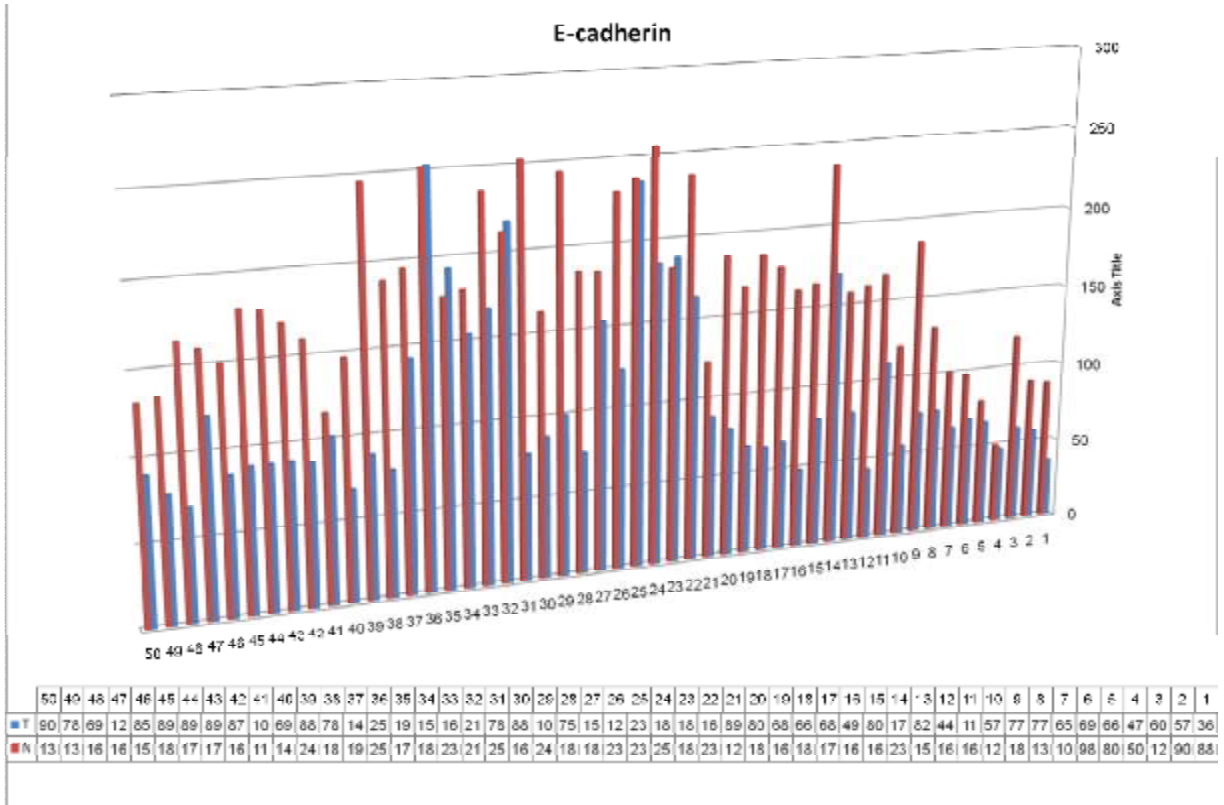
Spearman korelasyon testin sonuçlarına göre, meme tümör ve normal örneklerin E-cadherin proteinin ekspresyonu ve CpG noktalarının metillenmesinin (paterni ) arasında, anlamlı ilişki bulunmaktadır ( $p= 0.000$ ). Tümör örneklerinde, CpG noktaların metillenme sıklığının artması, E-cadherin proteinin ekspresyonu ile ters şekilde ilişki bulunmaktadır ve normal dokulardada proteinin ekspresyonu, metillenme azaldıkça artmaktadır ( $p = 0.000$ ) normal örneklerde güçlü protein ekspresyonu görünmemektedir (Şekil 54,55). Tümör ve normal dokuların protein dansiteleri kıyaslandığında, iki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p= 0.000$ ) normal ve tümör örneklerin protein ekspresyon dansiteleri birbiri ile kıyaslandı ( Şekil 56). Normal ve tümör dokuların proteinlerinin dansiteleri beta aktine karşı kıyaslandı ve tümör dokularda zayıf ve negatif protein ekspresyon sonuçları normal dokuların kıyasında ve görüldüğü gibi E-cadherin proteinin ekspresyonu normal dokularda genelde tümör dokulara göre daha yüksek düzeyde gözlenmiştir (Şekil 57) ve normal ve tümör örneklerin protein konsantrasyonlarının üç sınıfta frekansları görünmektedir zayıf ve negatif sonuçların dansitelerinde iki normal ve tümör grupların arasında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $p= 0.01$ ). Ayrıca normal ve tümör dokuların arasında, protein konsantrasyonları kıyaslandı ve tümör örneklerinde güçlü protein ekspresyonu normal örneklerin kıyasında daha düşüktür (Şekil 58).



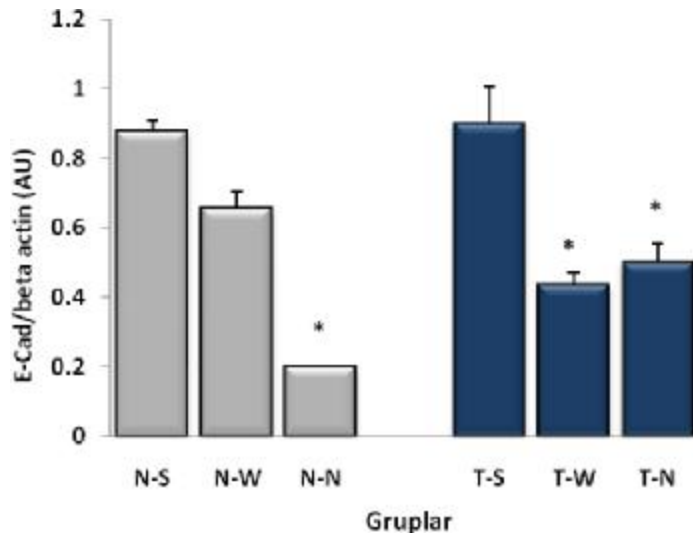
Şekil 54. Meme tümör örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme paterninin arasında ilişki



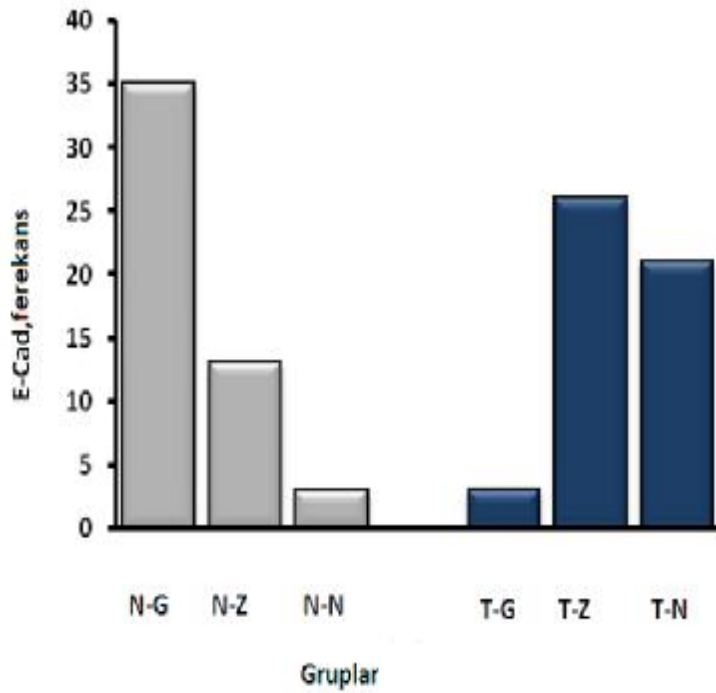
Şekil 55.Meme normal doku örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme paterni arasındaki ilişki



Şekil 56. Meme tümöründe normal ve tümör örneklerinde, E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyinin kıyaslaması



Şekil 57. Meme normal dokuları ve tümör dokularının E-cadherin proteinin dansitelerinin kıyaslanması



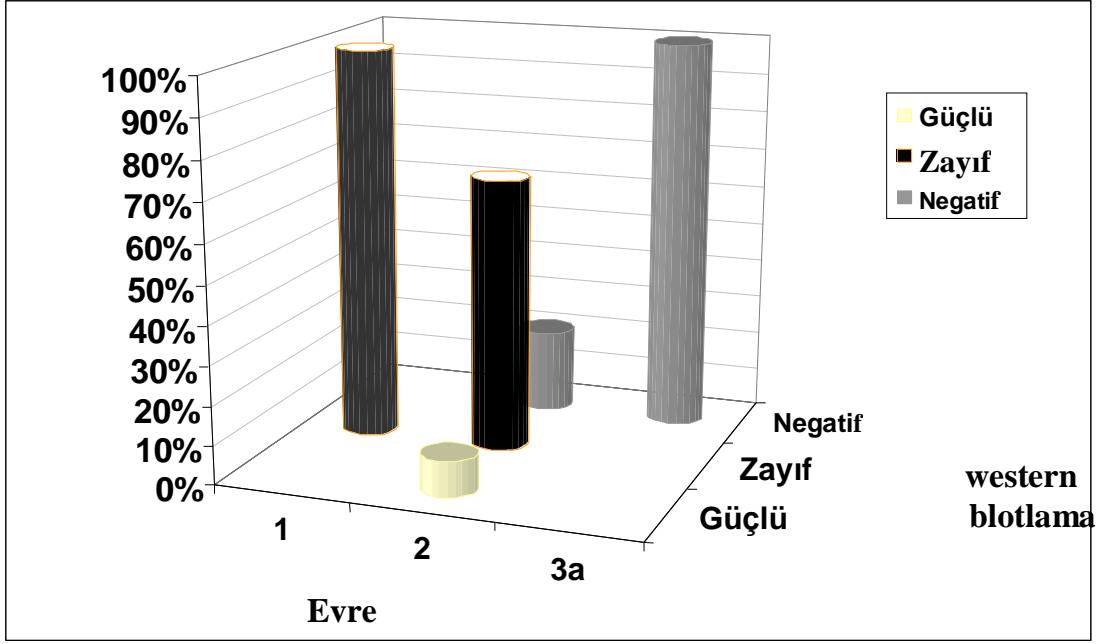
Şekil 58. Meme normal dokuları ve tümör dokuların E-cadherin proteinin üç sınıfta konsantrasyonlarının sıklığının kıyaslanması

#### 4.3.6. Meme tümör örneklerinde, E-cadherin proteinin ekspresyon durumu ile tümörün evresinin arasında ilişki

Bulgulara göre, meme tümörünün örneklerinde, tümör evresi ve proteinin ekspresyonunun düzeyi arasında, anlamlı ters ilişki bulunmaktadır ve tümörün evresi arttıkça, proteinin ekspresyonunun düzeyi azalmaktadır ( $p=0.000$ ).

Evre 1'de, tümör örneklerin %100'ünde, protein ekspresyonu negatif, evre 2'de örneklerin % 21,2'de, protein ekspresyonu negatif ve % 69,7'de zayıf ve % 9,1'de protein ekspresyonu güçlüdür. Evre 3'a'da, proteinin ekspresyonu örneklerin % 100'ünde negatiftir (Şekil 59).

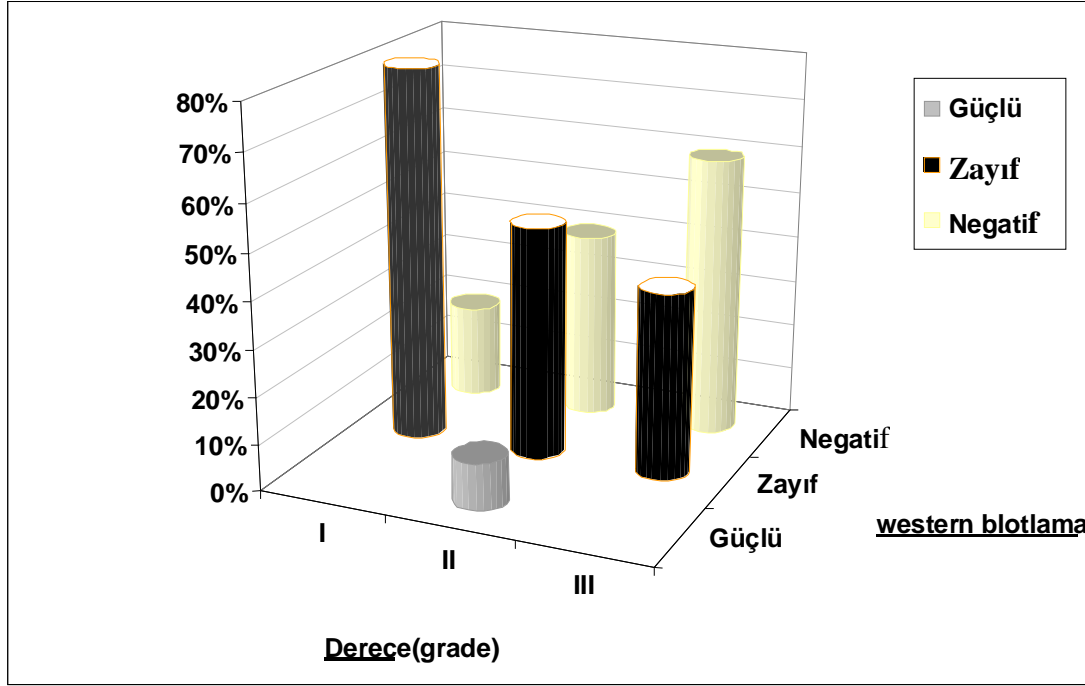




Şekil 59. Meme tümörünün örneklerinde, E-cadherin proteinin ekspresyon durumu ile tümörün evresinin arasında ilişki

#### 4.3.7. Meme tümörünün örneklerinde, E-cadherin proteinin ekspresyon durumu ile tümörün derecesi (grade) arasındaki ilişki

Pearson ki-kare korelasyon analizinin sonuçlarına göre, E-cadherin proteinin ekspresyonu tümörün derecesi (grade) ile etkilenmemiştir ve bu iki belirteç arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p = 0.345$ ). Derece I'de, tümör örneklerin % 20'de, protein ekspresyonu negatif ve % 80'de zayıftır. Derece II'de tümör örneklerinin % 40'da, proteinin ekspresyonu negatif, % 50'de zayıf ve % 10'da güçlüdür. Derece III'de, tümör örneklerinin % 60'da protein ekspresyonu negatif ve % 40'da zayıftır (Şekil 60).



Şekil 60. Meme tümörünün örneklerinde, E-cadherin protein ekspresyonun düzeyi ve tümörün derecesi (grade) arasında ilişki

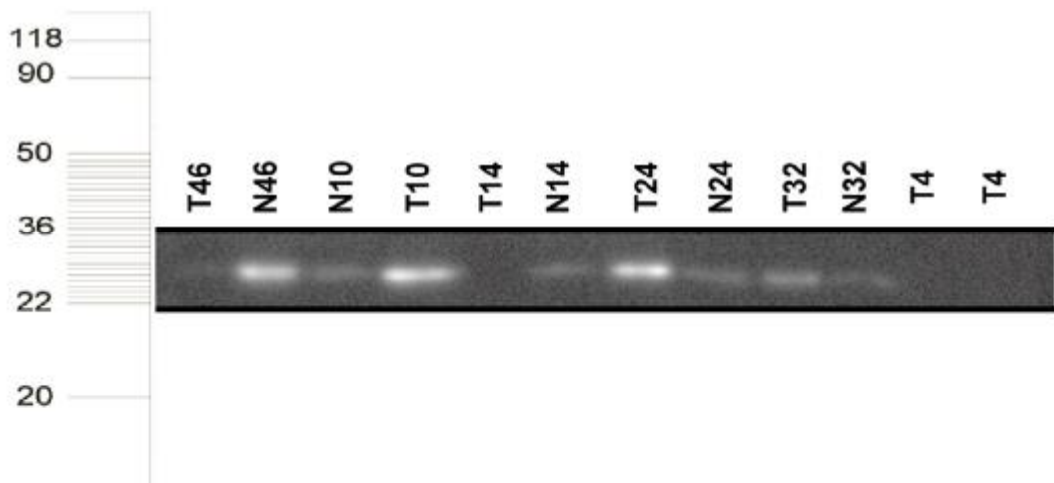
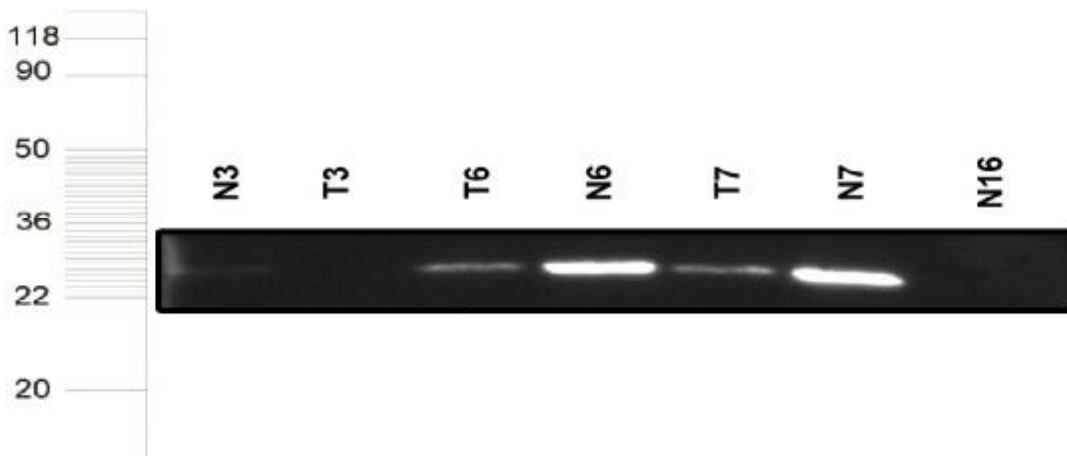
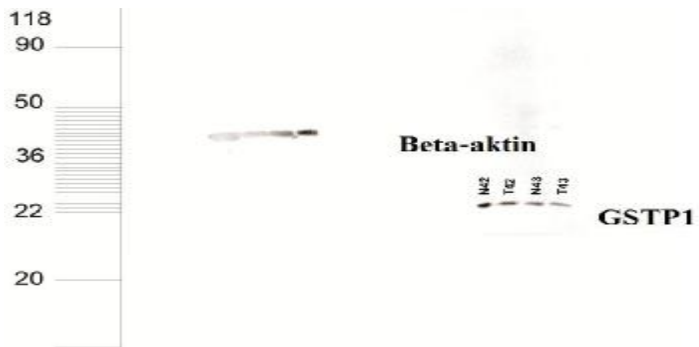
#### 4.3.8. Meme tümör örneklerinde E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ve tümör kemoterapi, geridönüşümü ve metastazının durumu arasındaki ilişki

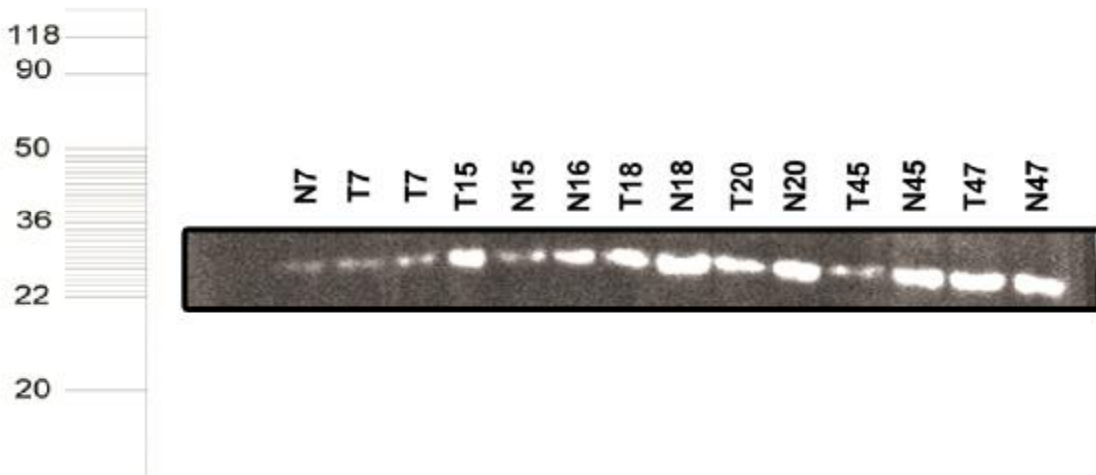
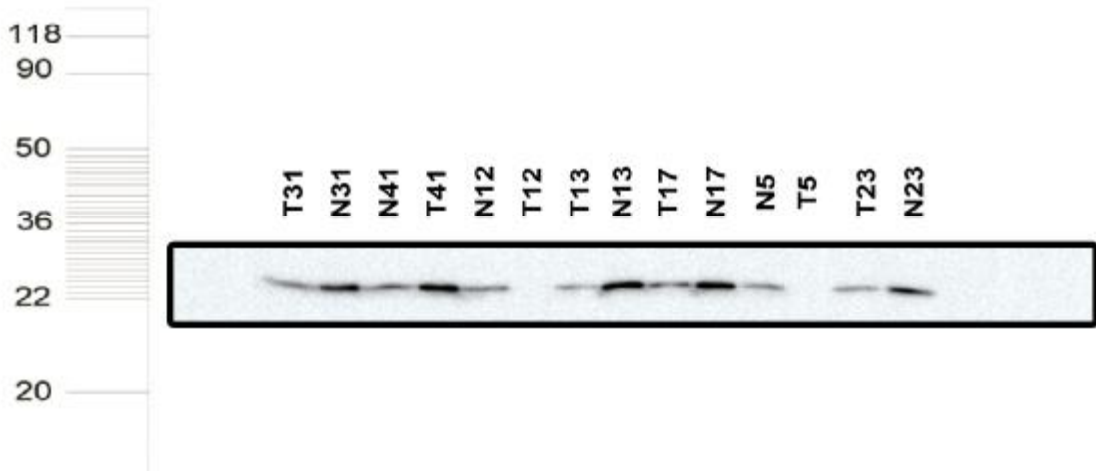
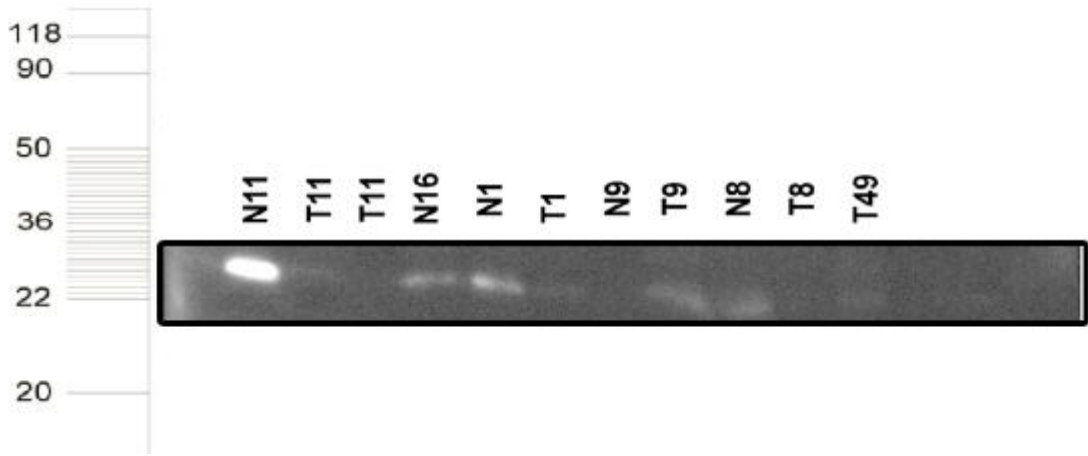
Bulgulara göre, E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi, alınan meme tümörün örneklerinde hastalardaki geridönüşüm durumuyla ( $p= 0.295$ ), hastanın kemoterapi olması ile ( $p= 0.909$ ) ve tümörün metastazi ile ( $p= 0.884$ ) anlamlı ilişkide bulunmamaktadır.

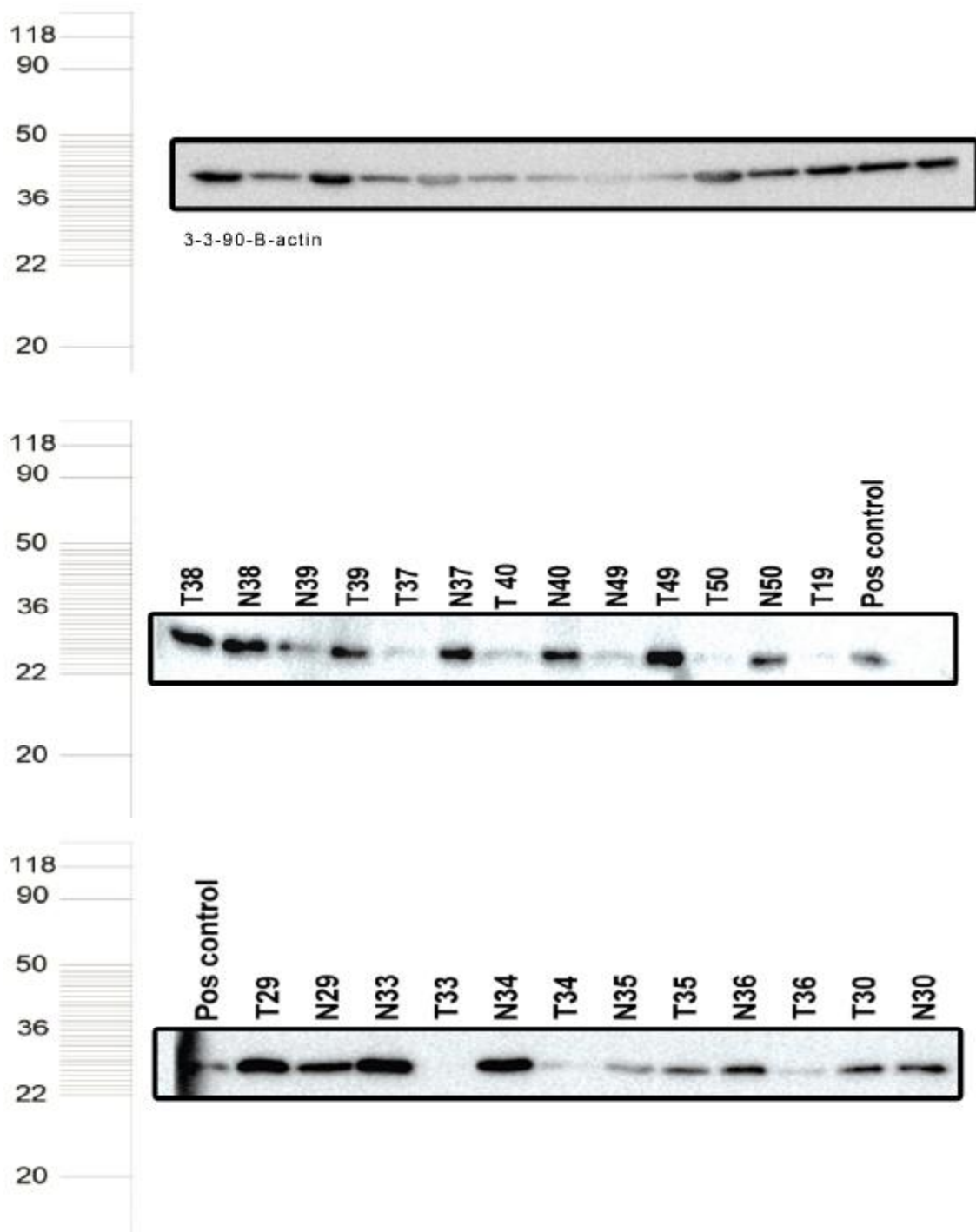
#### 4.4. Meme Tümöründe GSTP1 Proteinin Ekspresyon Düzeyi ve Promotör Bölgesinde Metillenme Ile Kıyaslanması

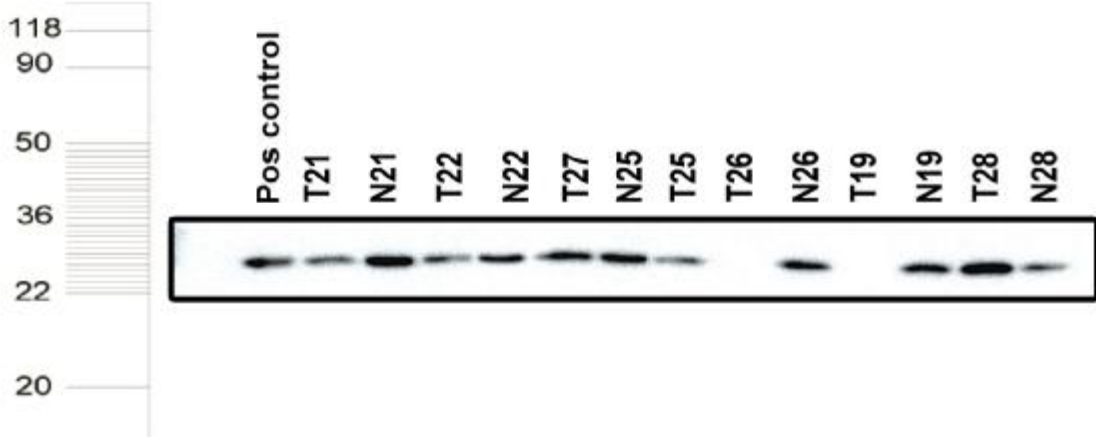
##### 4.4.1. GSTP1 proteininin ekspresyon düzeyini western blotlama yöntemiyle elde edilen sonuçlarının görüntüsü

Meme tümör ve normal örneklerin üzerinde western blotlama yöntemi uygulandı ve yöntemin çalışmasına dayır pozitif kontrol olarak beta aktin proteinin (43 kD) kullanıldı ve meme kanseri için pozitif kontrol olarak PC-3 to hücre lizatu kullanıldı. GSTP1 proteini 23kD'luk bant oluşturdu. Kullanan markerin boyutları 20, 22,36,50,90 ve 118 kD'dur (Şekil 61).





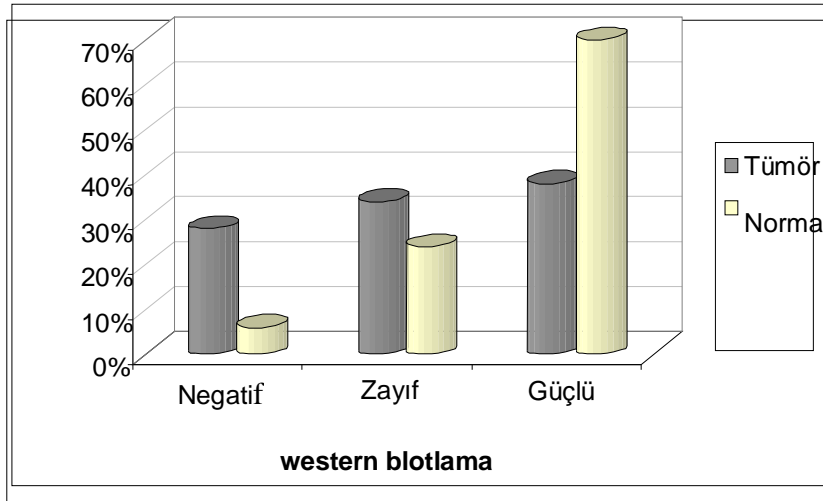




Şekil 61.GSTP1 proteini için western blotlamada, GSTP1 ve beta aktin proteinlerinin bantlarının görüntüsünden örnekler

#### 4.4.2. Meme tümöründe, tümör ve normal dokularda GSTP1 protein ekspresyon düzeyinin kıyaslanması

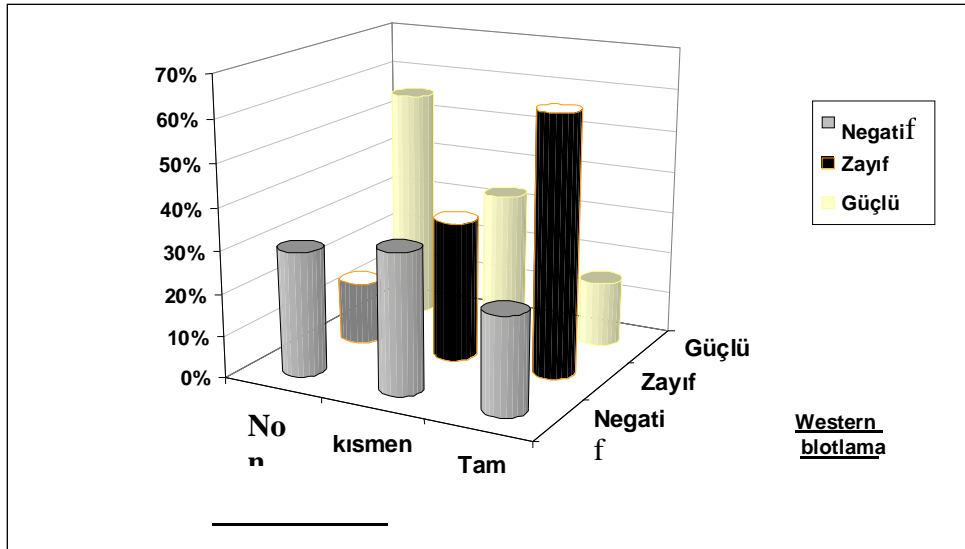
Bulgulara göre, meme tümör ve normal örnekleri arasında GSTP1 proteinin ekspresyonunda anlamlı farklılık gözlenmiştir (  $p=0.002$ )(Şekil 62). Normal ve tümör dokularının protein dansitelerinin kıyaslamasında iki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir (  $p=0.000$ ). Bu gruplar 3 sınıfta araştırılmıştır (negatif, zayıf ve güçlü).



Şekil 62.Meme tümöründe, normal ve meme örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyinin kıyaslanması

#### 4.4.3. Meme tümör doku örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme durumu arasındaki ilişki

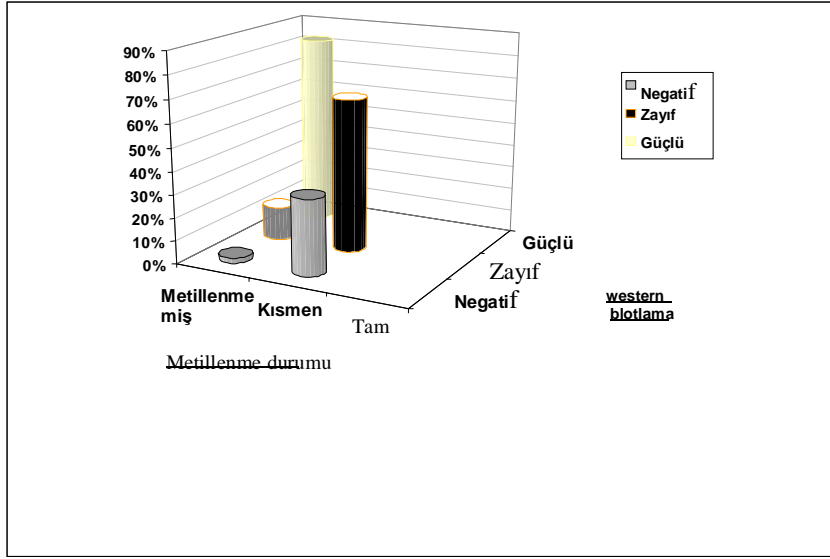
Pearson ki-kare analizinin sonuçlarına göre, metillenme durumu, GSTP1 proteinin ekspresyonunu etkilemiştir ve metillenme durumu ile GSTP1 proteinin ekspresyonu düzeyi arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir (  $p= 0.040$ ). Tümör örneklerinde, metillenmemiş örneklerin % 29.6'da protein ekspresyonu negatif, % 14.8'de zayıf ve % 55,6'da güçlüdür. Kısmen metillenen tümör örneklerinin % 33,3'de, protein ekspresyonu negatif, % 33,3'de, zayıf ve % 33,3'de güçlüdür. Tam metillenen tümör örneklerinin % 23,1'de protein ekspresyonu negatif, % 61,5'de zayıf ve % 15,4'de güçlüdür ( Şekli 63).



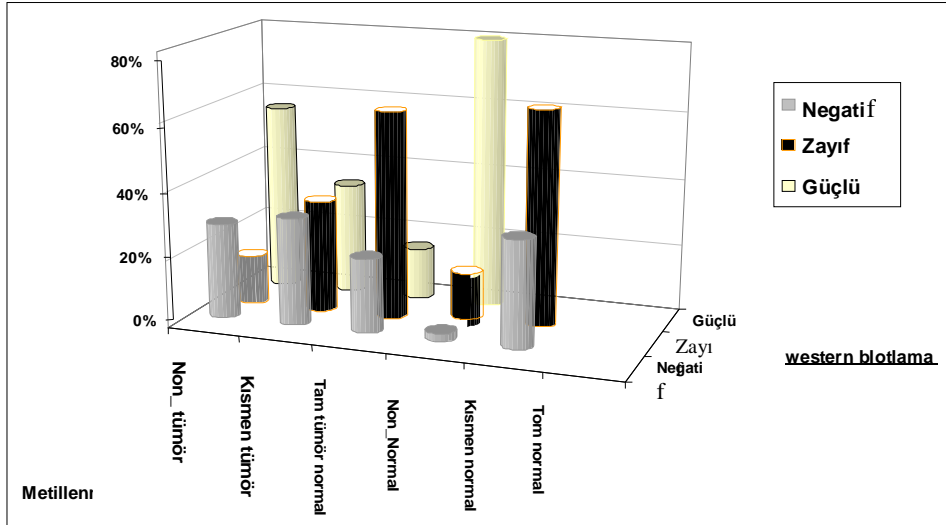
Şekil 63. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme durumu arasındaki ilişki

#### 4.4.4. Meme normal doku örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasındaki ilişki

Pearson ki- kare analizinin sonuçlarına göre, metillenme durumu ile GSTP1 proteinin ekspresyonunun düzeyi arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir (  $p=0.000$ ). Normal metillenmemiş örneklerin % 2,4'de protein ekspresyonu negatif, % 14,6'de zayıf ve % 82,9'da güçlüdür. Kısmen metillenen normal örneklerin, % 33,3'de protein ekspresyonu negatif ve % 66,7'de zayıftır. Tam metillenen normal örnek gözlenmemiştir (Şekli 64 ve 65).



Şekil 64. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme durumu arasında ilişki

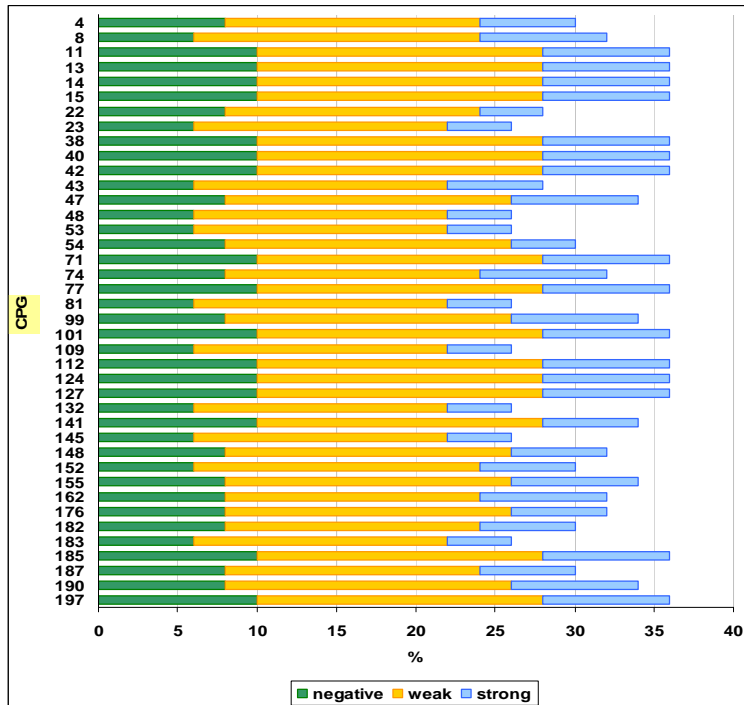


Şekil 65. Meme tümör ve normal örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme durumunun kıyaslaması

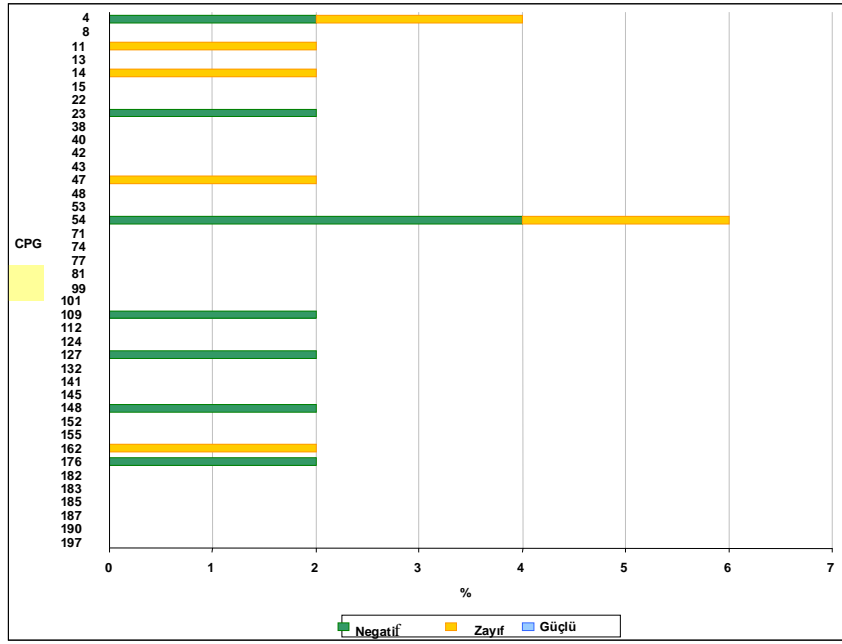


#### 4.4.5. Meme tümör ve normal doku örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme paterninin sıklığı

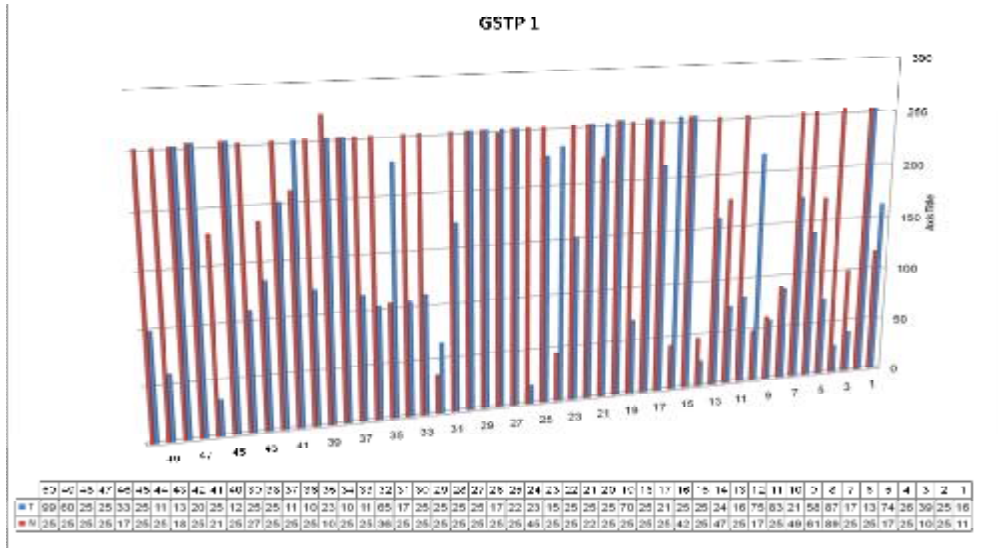
Spearman korelasyon testin sonuçlarına göre, meme tümör ve normal örneklerin GSTP1 proteinin ekspresyonu ve CpG noktalarının metillenmesinin (paterni ) arasında, anlamlı ilişki bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ) (Şekil 66,67). Tümör ve normal dokuların protein dansiteleri kıyaslandığında, iki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0.000$ ) normal ve tümör örneklerin protein ekspresyon dansiteleri birbiri ile kıyaslandı (Şekil 68). Normal ve tümör dokuların proteinlerinin dansiteleri beta aktine karşı kıyaslandı ve tümör dokularda zayıf ve negatif protein ekspresyon sonuçları normal dokuların kıyasında ve görüldüğü gibi GSTP1 proteinin ekspresyonu normal dokularda genelde tümör dokulara göre daha yüksek düzeyde gözlenmiştir (Şekil 69) ve normal ve tümör örneklerin protein konsantrasyonlarının üç sınıfta frekansları görünmektedir zayıf ve negatif sonuçların dansitelerinde iki normal ve tümör grupların arasında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $p= 0.01$ ). Ayrıca normal ve tümör dokuların arasında, protein konsantrasyonları kıyaslandı ve tümör örneklerinde güçlü protein ekspresyonu normal örneklerin kıyasında daha düşüktür (Şekil 70).



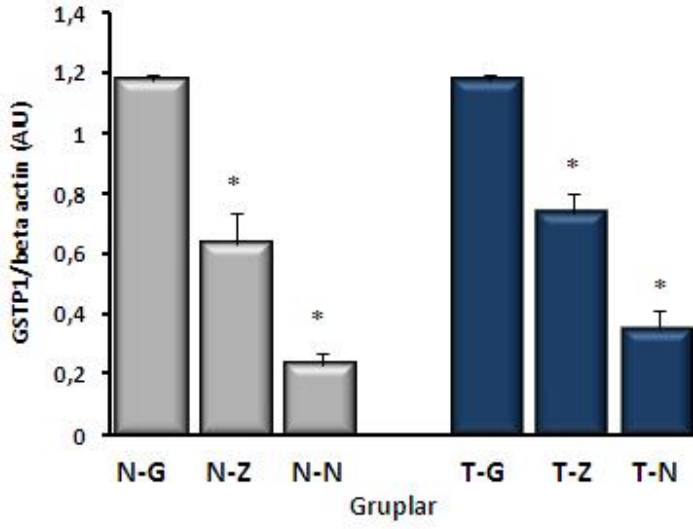
Şekil 66. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme paterninin sıklığı



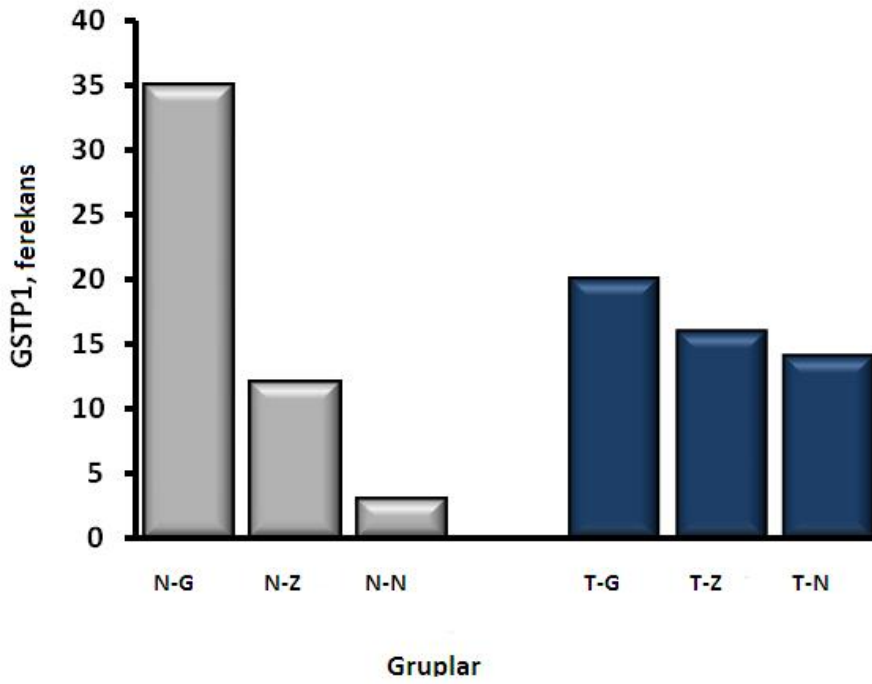
Şekil 67. Meme normal örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile metillenme paterninin sıklığı



Şekil 68. Memetümöründe normal ve tümör örneklerinde, GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyinin kıyaslaması



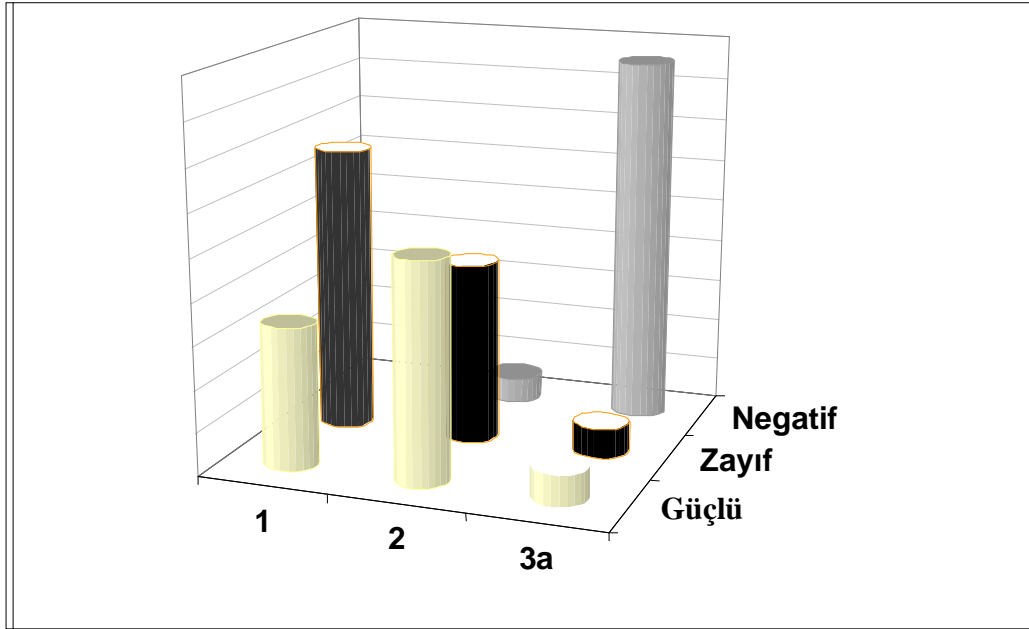
Şekil 69. Meme normal dokuları ve tümör dokuların E-cadherin proteininin dansitelerinin kıyaslanması



Şekil 70. Meme normal dokuları ve tümör dokuların GSTP1 proteininin üç sınıfta konsantrasyonlarının sıklığının kıyaslanması

#### 4.4.6. Meme tümör örneklerinde, GSTP1 proteinin ekspresyon durumu ile tümör evresinin arasındaki ilişki

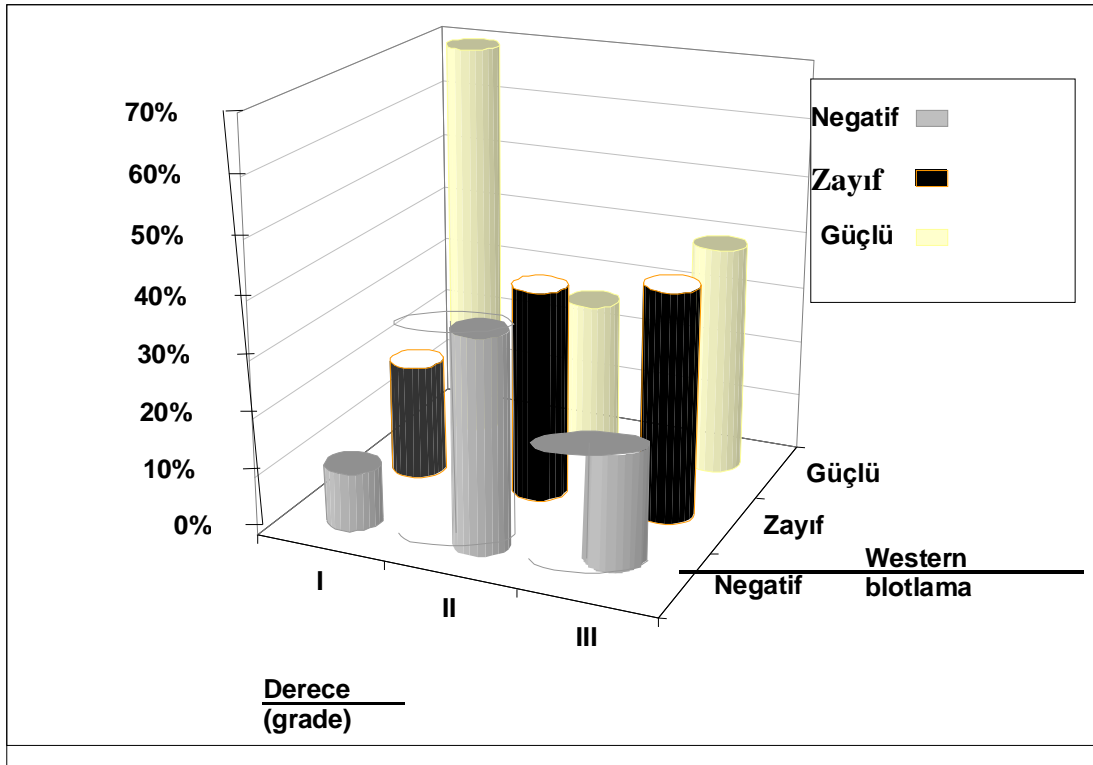
Bulgulara göre, meme tümör örneklerinde, tümör evresi ve proteinin ekspresyon düzeyi arasında, anlamlı ters ilişki bulunmaktadır ve tümörün evresi arttıkça, proteinin ekspresyon düzeyi azalmaktadır ( $p=0.000$ ). Evre 1’de, tümör örneklerinin % 66.7’sinde, protein ekspresyonu zayıf ve % 33.3’de güçlüdür, evre 2’de % 6.1’de protein ekspresyonu negatif ve % 66.7’de zayıf ve % 33.3’de güçlüdür. Evre 3’de % 6.1’de negatif, % 66.7’de zayıf ve % 33.3’de proteinin ekspresyonu güçlüdür (Şekil 71)



Şekil 71. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile tümörün evresinin arasındaki ilişki

#### 4.4.7. Meme tümör örneklerinde, GSTP1 proteinin ekspresyon durumu ile tümörün derecesi (grade) arasındaki ilişki

Bulgulara göre, meme tümör örneklerinde, tümörün derecesi GSTP1 proteinin ekspresyonunda etkisiz bulunmaktadır ve tümörün derecesi ve proteinin ekspresyonunun arasında anlamlı ilişki bulunmamaktadır ( $p=0.169$ ). Derece I'de, tümör örneklerinin % 10'da, protein ekspresyonu negatif, % 20'de zayıf ve % 70'de güçlüdür, derece II 2'de örneklerin % 36.7'de protein ekspresyonu negatif ve % 36.7'de zayıf ve % 26.7'de güçlüdür. Derece III 'de örneklerin % 20'de negatif, % 40'de zayıf ve % 40'de protein ekspresyonu güçlüdür (Şekil 72).



Şekil 72. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyonunun düzeyi ile tümörün derecesi (grade) arasındaki ilişki

#### 4.4.8. Meme tümör örneklerinde GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ve tümörün kemoterapi, geridönüşüm ve metastaz durumu arasındaki ilişki

Bulgulara göre, GSTP1 protein ekspresyon düzeyi ve hasta tümörünün geridönüşümünün arasında ( $p=0.689$ ), hastanın kemoterapi olması ( $p=0.752$ ) ve tümörün metastazıyla anlamsız ( $p=0.178$ ) ilişki gözlenmiştir.

## **5.TARTIŞMA**

### **5.1. Verilerin gözden geçirmesi**

Bu araştırmada, meme tümör dokusu ve onun civarındaki normal meme dokusu patolojik ve cerrah tarafından belirlenip ve tümörün evre ve derecesi uluslararası standartlar üzerinden (AJCC-TNM sistemi) belirlenmiştir. Hastaların çoğunluğunda, (% 92.0) bir tane tümör bulunmuştur. Meme kanserinde etkili olan iki genin (E-cadherin ve GSTP1) promotör bölgesinde yerleşen CpG adacıklarında oluşan metillenme durumu araştırıldı. Her iki gende meme tümör ve normal dokuların metillenme durumu ve paterni arasında anlamlı farklılık gözlemlendi.

#### ***5.1.1. E-cadherin geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme durumu***

E-cadherin (CDH1) geninin promotör bölgesinde CpG adacıklarının metillenme durumu tümör dokularında, normal dokulara göre anlamlı şekilde farklılık göstermiştir. Meme tümör dokularında tam metillenme ve kısmen metillenme şeklinde gözlemlenmiştir. Metillenmiş normal dokuları genelde, kısmi şekilde metillenmiştir. Meme tümör örneklerinde en fazla gözlenen metillenmiş CpG noktaları 892. ve 940. ve normal örneklerinde 879. ve 887’de elde edildi. E-cadherin geninin promotör bölgesinde CpG adacıklarının paterninin bakışından, CpG noktalarının türü ve metillenme derecesinde, tümör ve normal dokuların arasında anlamlı farklılık gözlemlenmiştir. Meme tümör örneklerinde, tümörün evresi 3 sınıfta sıralanmıştır (1, 2 ve 3a), buna göre tümör doku örneklerinde, tümörün evresi ve metillenme durumu ile, metillenme paterni arasında anlamlı farklılık gözlemlenmiştir. Tümör evresinde, metillenmiş CpG noktalarının bazıları diğer noktalara göre anlamlı sıklık ve farklılık göstermiştir (863, 865, 873, 879, 887 ve 920). Normal meme dokularında, tümörün evresini incelemek zaten anlamsızdır.

Ayrıca tümör derecesi olarak, tümör örneklerinde 3 sınıf gözlemlenmiştir (Grade I, II ve III) ve burada tümörün derecesi ile metillenme durumu arasında anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir. Tümör örneklerinin çoğunluğunda, Grade I ve Grade II’de en fazla metillenme gözlemlenmiş ve bu metillenme kısmen oluşmuştur. Grade III’de metillenme genelde tam şekilde oluşmuştur. Metillenme paterni olarak, CpG noktalarının metillenmesi, tümörün derecesine özellik göstermiştir (887, 865, 879 ve 920). Ancak genelde tümörün evresi ve derecesi birada metillenme durumuyla anlamlı farklılık göstermemiştir.

Meme tümör örneklerin metastazı, kemoterapi edilmesi ve geridönüşümüyle metillenme durumu ve paterni arasında anlamlı farklılık gözlenmemiş ancak metazaz ile 940. nokta ve tümörün geridönüşüm durumuyla 873. noktada da anlamlı farklılık gözlenmiştir.

Meme tümör örneklerinin türü 3 sınıfta tanımlanmıştır (duktal, insitu ve lobüler), ancak insitu ve lobüler türlerin sayısı az olduğu için, statistik analizden çıkarılmıştır. Tümörün duktal tipi ile metillenme durumu arasında anlamlı farklılık gözlenmiş ve en sık metillenen CpG noktası 892' olarak belirlenmiştir.

Tümörün duktal tipinin evresi arttıkça, metillenme derecesi ve paterninin metillenme sıklığı arasında anlamlı farklılık gözlenmiş ancak duktal tipinden örneklerin derecesi ve metillenme arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Tümör ve normal örneklerinde, E-cadherin protein ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir. Metillenmiş tümör örneklerinde, protein ekspresyon olmamıştır. Kısmen metillenen örneklerde protein ekspresyon düzeyi zayıftır. Normal dokuların çoğunluğu anlamlı şekilde metillenmemiş durumda bulunmuştur ve protein ekspresyon olmuştur. Metillenme paterniyle proteinin ekspresyonu arasında anlamlı ilişki gözlenmiştir. Tümörün evresi, protein ekspresyonu ile ters ve anlamlı ilişki göstermiştir ve tümörün evresi arttıkça, proteinin ekspresyonu azalmıştır. Tümörün derecesi ile protein ekspresyonu ilişkisiz bulunmuştur. Tümörün metastaz durumu, hastanın kemoterapi edilmesi ve tümörün geridönüşümüyle proteinin ekspresyonunda ilişkisiz bulunmuştur.

### ***5.1.2. GSTP1 geninin promotör bölgesinde oluşan metillenme durumu***

Tümör dokularda, GSTP1 geninin promotör bölgesinde CpG adacıklarının metillenme durumu normal dokulara göre anlamlı şekilde farklılık göstermiştir ve yaklaşık örneklerin yarısında tam veya kısmi metillenme gözlemlendi. Normal meme dokularının çoğunluğu, metillenmiş durumda gözlenmiştir. Metillenme paterninde tümör ve normal örneklerin arasında anlamlı farklılık gözlenmiş ve tümör örneklerinde CpG noktalarının metillenmesinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Meme normal örneklerinde en fazla gözlenen metillenmiş 176,162,148,127, 209, 47, 11 ve 4. CpG noktalarında, elde edildi. Meme tümör örneklerinde, tümörün evresi 3 sınıfta sıralanmıştır (1, 2 ve 3a), buna göre, tümör doku örneklerinde, tümörün evresi ve metillenme durumu ile, metillenme paterni arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ve tümörün evresi arttıkça, metillenme derecesinde artmıştır. Bu örneklerin evre 3'de, metillenme % 100 sıklıkla gözlenmiştir. Tümör evresinde, metillenmiş CpG noktalarının bazısı, diğer noktalara göre anlamlı sıklık ve

farklılık göstermiştir (183, 176,152, 148, 145, 132,109, 99, 81,74, 53, 48, 47, 43, 23 ve 8). Normal meme dokularında, tümörün evresini incelemek zaten anlamsızdır.

Ayrıca tümörün derecesi olarak, tümör örneklerinde 3 sınıf gözlenmiştir (Grade I,II ve III) ve tümör örneklerinde metillenme durumuyla tümörün derecesi arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir. Metillenme paterni olarak, tümörün derecesiyle anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Tümörün evresi ve derecesi birarada, metillenme durumuyla anlamlı ilişki gözlenmemiştir.

Promotör bölgesinde, meme tümörünün örneklerin metastazı, kemoterapi durumu ve geridönüşümüyle metillenme durumu ve paterni arasında anlamlı farklılık gözlenmiş ve kemoterapide 152. ve 54. noktalar ve tümörün geridönüşümünün durumuyla, 197, 190, 183, 176, 162, 155 ve 148. noktalarında anlamlı farklılık gözlenmiştir.

Meme tümör örneklerin türü, 3 sınıfta bulunmaktadır (duktal,insitu ve lobüler), ancak insitu ve lobüler türlerinin sayısı az olduğuna göre, istatistiksel analizden çıkarılmıştır. Tümörün duktal tipi ile metillenme durumu arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir.

Tümörün duktal tipinin evresi arttıkça, metillenme artmıştır ve bu iki parametre arasında anlamlı farklılık gözlemlendi ancak duktal tipinden örneklerin derecesi ve metillenmesi arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Meme tümörünün örneklerinde duktal tipinden olan örneklerin metillenmesi ve tümörün derecesi arasında anlamlı farklılık gözlemlendi.

GSTP1 genin promotör bölgesinde özel CpG grupları gözlemlendi (ccg, ctg ve cgcg) bu noktalar ile metillenme durumu, tümör ve normal örneklerinde sadece (8-11-4) noktalarında ortaklık gözlenmiştir.

GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ve metillenme durumu arasında tümör ve normal örneklerin arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir. Tam metillenmiş tümör örneklerin çoğunluğunda, metillenmiş durumunda, protein ekspresyonu olmuştur. Tümör örneklerinde, metillenme paterni ile proteinin ekspresyonu arasında anlamlı farklılık gözlemlendi. Normal dokularda bu ilişki anlamlı bulunmamıştır. GSTP1 proteinin ekspresyonuyla tümörün evresinin arasında anlamlı ilişki gözlemlendi ve tümörün evresi arttıkça, proteinin ekspresyonu azalmıştır. Tümörün derecesi ile proteinin ekspresyonu arasında anlamlı farklılık bulundu. Tümörün metastazı, kemoterapi durumu ve geri dönüşümüyle proteinin ekspresyonu ilişkisiz bulundu.

Karsinogenez olayında, birkaç basamaklı prosedürde, genetik ve epigenetik değişimler biriktirmektedir. Meme kanserinde E-cadherin geni için hem heterozigot kaybı ve hem de



kromozom yapısında mutasyonlar saptanmıştır. Bazı genlerin promotör bölgesinde epigenetik hipermetillenme, insanın kanserinin oluşumunda çok önemli olay sayılır. Promotörde metillenmenin boyutuna göre, genin işlevinde oldukça etki sağlar ve bu arada tümör baskılayıcı genlerin inaktif olmasına neden olur ve genin eksprese ettiği proteinin düzeyinde azalma meydana gelebilir (Narayan et al, 2003:24).

Meme kanserinin gelişiminde tümör baskılayıcı genlerin metillenmesi, tanımlanmıştır ancak çeşitli meme kanser lezyonlarında (duktal) özel ve önemli genlerin metillenme profili detaylı olarak araştırılmamıştır. Bu çalışmada, bisülfite özel PCR yöntemi ile (BSP), E-cadherin ve GSTP1 genlerin metillenme profili meme kanserinde farklı bakımlardan araştırılmıştır ve bu profiling klinikte yararlı olma olasılığı ve kullanımı incelenmiştir. Önceki araştırmalara göre, meme kanserinde E-cadherin (CDH1) ve GSTP1 genlerinin metillenmesi saptanmıştır (Pu et al, 2003:1095).

Bu çalışmada meme kanserinde E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme sıklığı % 94 ve GSTP1 geninin promotöründe % 41.3 bulunmuştur.

E-cadherin geni, kanserli hücrelerin göç etmesinde ve GSTP1 geni DNA tamirinde görevlidiler. Her iki genin birarada incelenmesi meme kanserinde metillenme olayının takibi için çok geniş alanı sağlayıp ve ayrıca hücrenin farklı işlemlerinin bozulmasını ve dolayısı ile diğer yolların etkilenmesini açıklayabilir.

E-cadherin geninin sessizleşmesi kanserin patolojik özelliklerinde etki sağlar, dolayısıyla, tümörün az gelişmesi, infiltrate büyümesi, lemf bezi metastazı ve hastanın sağ kalım süresini azaltır (Liu et al, 2001: 949). Elde ettiğimiz verilerde, E-cadherinin promotör bölgesinde metillenme ile tümörün derecesi, tümörün türüyle ilişkisi incelenmiştir ve bulgulara göre, anlamlı ilişki bulunmuştur.

Önceki çalışmalarda, meme kanserinde E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme ve dolayısıyla protein ekspresyonunun azalması saptanmıştır. Ayrıca E-cadherin proteinin ekspresyonu önceki çalışmalarda , örneklerin % 85’de gözlenmiştir (Calderia et al, 2005:48). Bu çalışmada da E-cadherin geninin promotör bölgesinde metillenme sıklığı ve protein ekspresyonu arasında anlamlı ve ters ilişki bulunmuştur.

Meme tümör örneklerinde ekspresyon kaybı, örneklerin % 95.5’de elde edilmiştir. E-cadherinin promotöründe metillenme ve proteinin ekspresyonu arasında ilişkinin incelemesi, çok sayı araştırmalarda gözlenmiştir ancak homojen örnekte (örn: duktal tipinde kanserde),

metillenme ve ekspresyon düzeyi arasında ilişki kurmak az sayıdaki çalışmalarda bulunmaktadır (Graff et al, 2000:2727).

Metillenme paterninin incelemesinde de E-cadherin geninin durumu, mesane kanserinde 10 CpG noktasında araştırılmış ve sonucunda, sık metillenme bulunmuştur (Filho et al, 2002:187) ancak bu çalışmada meme kanserinde ilk kez hangi noktaların metillenmesi saptanmıştır.

GSTP1 geninin, JNK1 sinyal yolağında role göre, GSTP1'in, tümör baskılayıcı bir gen olduğu düşünülmektedir (Dasgupta et al, 2033: 2345). GSTP1 proteinin ekspresyon kaybı duktal insitu karsinomda yaklaşık % 49.0 ve invaziv duktal karsinomda da % 41.7 oranında gözlenmiştir (Lee, 2007: 637). Elde edilen bulgulara göre, bu çalışmada da meme tümör örneklerinin % 23.1'de GSTP1 proteini metillenen örneklerde kayb olmuştur. Meme kanserinde GSTP1 geninin sık metillenmesi saptanmış ve GSTP1 geninin promotör bölgesindeki metillenmenin , bu genin muhtemelen sessizleştirilme mekanizmalarından sayılmıştır (Esteller et al,1998:4515). Bu nedenle , uygun bir biomarker olarak tanımlanmıştır (Krassenstein et al, 2004:28). Bu çalışmada da GSTP1 geninin promotör bölgesinde meydana gelen metillenme sıklığı % 41.3 bulunmuştur.

GSTP1 geninin metillenmesi , kanserlerde lenf bezi metastazı ile bağlantılı bulunmuştur (Yuan et al, 2008: 856). Çalışmalara göre, GSTP1'in hipermetillenmesi, tümörün grade I ( $p= 0.000$ ) ile anlamlı bulunmuştur ve ayrıca tümörün geridönüşümüyle de anlamlı ilişkide olduğu ( $p \leq 0.01$ ) bulunmuştur ( Lasabova et al, 2010:35) ve GSTP1'in hipermetillenmesi duktal meme kanserinde erken değişim olarak tanımlanmıştır (Wong et al, 2010:645). Bu çalışmada da tümörün evresi ve derecesi ve metastazın durumu ve kemoterapisiyle metillenme durumunun arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Bu çalışmada BSP metodu kullanılmıştır. BSP yöntemi, MSP yöntemine göre daha fazla CpG noktalarını inceleme imkanı verdiği gözlenmiştir. Primerler CpG noktalarından bağımsızdır ve metillenmemiş bölgede de ampikon üretilir. Diğer araştırmalarda, MSP yöntemi kullanılmıştır. Ancak tümör örnekleri homojen değildir ve duktal, lobüler, metaplastik, apokrin ve papiller örnekler incelenmiştir (Calderia et al, 2006: 48). Bu çalışmada duktal tipi daha fazla olduğuna göre, örnekler daha homojendir. Ayrıca Calderia ve arkadaşlarının çalışmasında, E-cadherin geninin promotörünün metillenmesi ve proteinin ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ancak bu çalışmada bu ilişki anlamlı bulunmuştur.

Parrella ve arkadaşlarının ( Parrella et al, 2004:5349) çalışmasına göre, meme kanseri dokularında, E-cadherin geninin metillenme sıklığı % 39 ve GSTP1'in metillenme sıklığı % 13 bulunmuştur. Ayrıca çalışmalarında metillenme ve tümörün evresi ve derecesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bunun nedeni, MSP yöntemi ile çalışma ve seçilmiş promotör bölgesi ve az sayıda CpG noktalarının incelemesi olabilir. Diğer MSP' ile çalışılan meme kanser örneklerinde de tümör ve normal örnekleri arasında anlamlı farklılık ortaya çıkarılmamıştır (Jeronimo et al, 2003:3413) ayrıca seçilen promotör bölgesi açıklanamamıştır. Bu çalışmada E-cadherin geninin metillenme sıklığı % 94 ve GSTP1 geninin metillenme sıklığı % 41.3 bulunmuştur.

Sarrío ve arkadaşları (Sarrío et al, 2003:208), E-cadherin geninin promotörünün metillenmesini lobüler tipinde olan meme kanser örneklerinde % 41 olarak saptamışlardır. Bunun nedeni tümörün tipi ve promotör polimorfizmi olabilir ayrıca kullandığı yöntem ve sporadik veya hücre hattınının kullanımı olabilir. Sarrío'nun çalışmasında insitu örneklerin metillenmesi saptamıştır ve bir başlayıcı (initiation) mekanizma sayılmıştır, ancak elde edilen verilere göre bu çalışmada, yüksek tümör evre ve derecesinde metillenme saptandı ve insitu örneklerin az sayıda olduğuna göre, metillenmenin tümörün başlayıcı etkisinin incelenmesi mümkün olmadı. Yapılmış çalışmalarda özel CpG paterni ve noktaların metillenme sıklığı ve onların tümör parametreleriyle ilişkisi incelenmemiştir.

Bu çalışmada E-cadherin ve GSTP1 genlerin promotör bölgelerinin metillenme durumu ve paterni, meme kanserin parametreleriyle kıyaslandı. Meme tümör ve normal dokular bu iki gen için incelenmiştir. Bu iki genin metillemesi önceki çalışmalarda incelenmiştir (Sunami et al, 2008; R46) ve bu iki genin sık metillendiği bulunmuştur.

Bu çalışmaların birkaç yönden faydası bulunmaktadır: kansere bağımlı genlerin promotöründe, anormal hipermetillenmenin araştırılması, özel tümör markır olarak saptaması ve bu marker ile hastalığın ilerlemesini incelemek ve hastalık sırasında metillenmenin değişiminin incelemesini sağlaması sayılabilmektedir. Ayrıca CpG adacıkların hipermetillenmesi pozitif ve spesifik bir sinyal oluşturarak, özel yöntemlerde yorumlanırken, normal metillenmemiş hücre karışımında yeterli kadar güçlü ve seçilebilirdir. Buna göre kanser tanısında, genetik markırlar, çok önemli sağlık standardını sağlayabilir.

Bu çalışma özel genlerin promotörlerinde, anormal hipermetillenmeyi, karsinogenezisi takip (follow-up) etmek için, meme biopsisi ile yapılabilmesini göstermiştir.

Normal ve tümör dokularında, E-cadherin ve GSTP1 genlerinin promotörünün hipermetillenmesi saptanmıştır. Genelde promotörün metillenme sıklığı diğer çalışmalar gibi pozitif ancak daha yüksek miktarda bulundu (Radpour et al, 2011: e16080) bunun muhtemel nedeni önceki çalışmalarda kullandığı iğne biopsisi olabilir, bu yöntemde küçük alandan örnek alındığına göre, klonal seçimi ve hücrelerin birikmesidir ancak doku örneğinde daha heterojen bölge olduğuna göre, farklı karışımda farklı metillenme bölgeleri bulunabilir. Bir başka nedeni, MSP yönteminin kullanımındadır. Bu yöntemde spesifikite çok azdır ve optimize etmesi, sonuçları BSP yöntemine göre, daha fazla etkilemektedir. Yapılmış araştırmalarda normal ve kanserli örneklerin arasında anlamlı farklılık bulunur ancak normal dokularında metillenme gözlenmemiştir (Sproul et al, 2011: 10.1073). Bu çalışmada, tümör örneği ve civarındaki normal doku kontrol olarak incelenmiştir bu iki grupta arasında çok anlamlı farklılık bulunmuştur ve bazen normal dokularında da, metillenme bulundu ve muhtemel nedeni, normal dokuda predispoze metillenme değişimlerinin oluşumu, özellikle bu dokuların, tümör bölgesinin yakınlığında olmasına göre daha muhtemel mekanizma olabilir. Bu çalışmada, gene spesifik metillenme aynı dokuda gözlenmiştir ve E-cadherin geninin metillenme sıklığı, GSTP1 geninin metillenme sıklığı ile farklı bulunmuştur. Ayrıca benign hiperplastik örneklerin metillenme durumu normal dokular gibi metillenmemiş olarak bulunmuştur. Ancak bazen normal dokularında da metillenme gözlenmiştir.

Lazer mikrodiseksiyonuyla tümör ve normal dokunun marjininin tam olarak belirleme imkanı olmamasına göre, bu hücrelerde kanserli hücre karışımı olabilir veya patoloğ tarafından normal tanımlanan dokuda, kanserli olayı predispoz şeklinde başlamış olabilir. Metillenme durumuyla tümörün derecesi (grade)'i arasındada anlamlı ilişki bulunmamıştır bunun nedeni ise, tümörün derecesi cerrah tarafından özel ve şahsi yorumlama olduğu için beklenmelidir ancak tümörün evresi patoloğ tarafından standart uluslararası yöntem ile belirlenmesi için, metillenme durumuyla tümörün evresi arasında, her iki gende anlamlı ilişki bulundu.

Genin ekspresyonu ve metillenme durumu arasındada çok anlamlı ve ters ilişki bulundu ve dolayısıyla metillenen örneklerde, protein ekspresyonu olmamıştır.

E-cadherin geninin CpG noktalarının metillenme paterninde, anlamlı farklılık gözlemlendi, tümör örneklerinde 892. nokta ve normal örneklerde, 879. nokta en sık oranda görülmüştür. Tümörün farklı evrelerinde 863,865,873,879,887 ve 920 noktalarında metillenme en sık miktarda bulundu ayrıca hem evre 1'de ve hem evre 3'de tam metillenme gözlemlenmiştir ve her iki evrede %100 metillenmeye bağlı olarak %100 protein ekspresyon kaybı gözlemlenmiştir. Tümörün farklı dereceleriyle metillenme paterninde 887, 865, 879 ve 920 noktalar, en sık bulunan metillenen noktalardı ve hem derece I'de ve hem derece III'de, % 80 metillenme gözlemlenmiştir ve % 20 negatif ve % 80 kısmen metillenme her iki derecede gözlemlenmiştir. Tümörün metastaz durumunun incelemesinde, 940. nokta , kemoterapi sapıkasında, 873. nokta en sık metillenen noktalar bulundu. Tümörün türünde, duktal tipinde 892, 901, 918, 887 ve 940 noktalar en sık metillenen noktalar bulundu ve duktal tipinden olan evre 1'de 892, 918 ve 940 noktalar, evre 2'de 887, 901, 918, 892 ve 940 noktalar ve evre 3'de 863, 879, 865 ve 920 noktalar en sık metillenmiştir. Bu bulguların anlamı, tanı yapmak için hangi noktaların, tümöre ayıt olarak seçimidir ayrıca evre bakımından veya metastaz ve tümörün diğer parametrelerine göre, özel bir metillenme paterni seçmektir. Genelde tümörün derecesi anlamsızdır ve bunun nedeni cerrah tarafından belirlenmesidir. Bulgularda gözlemlendiği gibi, hem tümörün ilk evresi ve derecesinde ve hem yüksek evre ve derecelerinde tam metillenme gözlemlenmiştir ve bunun anlamı metillenme olayının hem başlangıç ve hem ileri basamaklarda rol aldığını göstermektir. Ancak metillenme paterninin değişimine göre tümörün her bir basamağında, farklı metillenme paterninin seçe bilmesini göstermektedir.

GSTP1 geninin promotör bölgesinin metillenme durumunda, tümör dokularında en sık metillenen noktalar 176, 162, 148, 127, 109, 47, 23, 14, 11 ve 4 CpG noktaları bulundu ve normal örneklerde 176, 162, 148, 127, 109, 54, 47, 23, 13, 11 ve 4 bulunmuştur. Ortak noktaların haricinde, bu iki grubun metillenme paterninde çok farklılık gözlemlenir ve buna göre, tümör ve normal gruplar ayırt edilebilir. Tümörün evresi ve metillenme paterninin incelemesinde, 183, 176, 162, 148, 145, 132, 109, 99, 81, 74, 53, 48, 47, 43, 23 ve 8 noktaları en sık metillenen noktalar bulunmuştur. Tümörün derecesinde metillenen CpG noktalarında anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir.

Tümörün gerdönüşümünde 197, 190, 187, 183, 176, 162, 155, 152, 148 , 145 noktaları, en sık metillenen noktalardır. Tümörün metastazında 197, 190, 187, 185, 183, 182, 176, 162, 155, 152, 148 ve 145 noktalar ve tümörün cerrahi öncesi kemoterapisinde bu noktalar 47, 43, 42, 40, 38, 23, 22, 145, 132, 109, 81, 74, 53, 48, 183'dan hariç, bütün noktalarda sık metillenme gözlenmiştir. Tümörün duktal tipinde tümörün evresinin incelemesinde, evre 1, evre 2 ve evre 3a 'da tam metillenme durumu gözlenmiştir ve noktaların metillenme paterninde anlamlı farklılık gözlenmediğine rağmen, evre 1, 2 ve 3a'da, 6 nokta birarda metillenme durumunda bulunmuştur. Bu bulgu, tümörün derecesinde de aynı şekilde gözlenmiştir. Ayrıca GSTP1 geninin promotör bölgesinde özel tipde CpG noktaları bulundu (ccg, ctg ve cgcg) bu noktalarında en sık metillenme durumu tam şeklinde ortaya çıktı ve nokta 8-11-4'den hariç, diğer noktaların metillenmesi sadece tümör örneklerinde gözlenildi. GSTP1 proteinin ekspresyonunun düzeyi ile metillenme paterninde ortak olarak 11, 13, 14, 15, 38, 40, 42, 71, 77, 101, 112, 124, 127, 185 ve 197 noktaları en sık metillenen ve protein ekspresyonunu kayb eden noktalar bulunmuştur. Normal dokularda ise, sadece 54 ve 4 noktalarda bu ortaklık gözlenmiştir.

## **6. SONUC VE ÖNERİLER**

Bu çalışmanın bulgularına göre, meme kanserinde, E-cadherin ve GSTP1 genleri sıklıkla metillenmiş durumdadır. Ayrıca tümör örneklerinde, bu iki genin ekspresyonunda azalma saptanmaktadır. Özellikle bu kayıp bu iki genin tümör baskılayıcı rolünü açıkladığından oldukça anlamıdır. E-cadherinde, tümör örneklerinin % 95,5 i ile, GSTP1’de, tümör örneklerin % 23,1’in de, proteinin ekspresyonu, tüm evrelerde ve derecelerde (evre 3a ve derece III dahil) kaybolmuş durumda bulunmuştur. Tümörün ilk gelişim basamaklarında (evre 1 ve derece I), bu genlerin ekspresyon kaybı da gözlenmiştir. Bu olayın mekanizması tam olarak belirlenmemiş ancak bu çalışmada da iki genin ekspresyon kaybında tümörün evre ve derecesinde artış gözlenmiştir. Ayrıca tümörün türüne bağlı (duktal) olarak, evre ve derecenin artması ile, ekspresyon kaybı artmaktadır. Bazı normal örneklerde ekspresyon kaybı ve metillenme olayı gözlenmiştir ve bunun nedeni mikro-epigenetik değişimler olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca diğer araştırmalara göre bu değişimler kanser hücrelerinde geri çevrilebilir (Nojima et al, 2001:19), bu yüzden metillenme olayı, bir gizli ve geridönüşebilen değişim olarak, tümör hücrelerde beklenmelidir. Buna göre, epigenetik değişimler, mutasyon veya allelik kayıp gibi, kanserin gelişiminden sorumlu sayılabilirler. Hipermetillenme bir ‘non-mutasyonel’ olay olarak, tümör baskılayıcı genlerin sessizleştirilmesine neden olabilir. Bu çalışmada promotör bölgede, CpG adacıklarının metillenmesi, proteinlerin ekspresyonunun kaybıyla birlikte gözlenmiştir. Çalışmamızda, bisülfid ile muamele olunmuş DNA’nın direkt sekanslama yöntemiyle, E-cadherin ve GSTP1 genlerin metillenmesi saptanmış ve tümör örneklerinde, protein ekspresyonunun kaybı incelenmiştir. Direkt bisülfid sekanslama yöntemiyle, CpG noktalarının her birinin metillenme durumu incelenebilmektedir. Bu çalışmada, hiperplastik benign meme dokusu, normal meme dokusu ve meme tümör dokusu incelenmiştir. Direkt sekanslamanın faydası, toplam metillenme durumunu her bir sitozin rezidusunda inceleme imkanı vermesidir, halbuki metillenmeye-özel-PCR’da, metillenmeye hassas enzimler genomik DNA’da, sadece bir veya iki CpG noktasının incelenmesine olanak sağlar. Çalışılan araştırmamızda, E-cadherin için 10 ve GSTP1 için 40 CpG noktası incelenmiş ve bu bölgelerde metillenmenin tüm noktalarda olduğu gözlenmiştir.

Bu noktaların bazıları tümör dokularında bulunmaları açısından daha fazla özellik göstermektedir. Seçilen örnekler tamamen sporadik meme kanserine aittir ve metillenme sıklığı, transkripsiyonun başlangıç noktasından bağımsız olarak CpG noktalarında incelenmiştir. Bu

yöntemin kullanım nedeni, transkripsiyonel faktörlerin bu bölgede etkisinin olmamasıdır. E-cadherin ve GSTP1 genlerinde seçilen promotör bölgelerin, amplikonun boyutu sırayla 83 ve 327 bp'lik olduğu için , PCR ürünlerinin çoğaltılmasında sorun yaşanmamıştır.

Tümörün parametreleri ile metillenme durumu ve paterni, bu genlerin proteinlerinin ekspresyonunun kaybı ile ilişkili bulunmuştur ve en yüksek tümör evresi ve derecesinde, proteinin ekspresyonu tamamen kaybolmuştur. Bu çalışmada, meme tümöründe, ilk kez E-cadherin ve GSTP1'de birlikte metillenme durumu ve paterni bakımından incelenmiş ve CpG noktaları, tümörün evre, derece ve tipiyle kıyaslanmış ve özel paternleri belirlenmiştir. Metillenmiş genler, tümörün ilerlemesi ile direkt bağlantılı gözlenmiştir.

Bu çalışma, meme kanserinde tümörün patogeneğinde E-cadherin ve GSTP1 genlerinin metillenmesinin ekspresyon kaybında rol aldığına dair hipoteze dayanak olabilir.

Çalışmanın daha fazla örnek sayısı olması, lazer mikrodiseksiyon ile tümör ve normal dokuların ayrılması, homojen tümör tiplerinden tüm grupların araştırılması ve metillenme paterninin incelenmesi, daha yeni metillenme tekniklerinin kullanılması önerilir. Ayrıca genlerin tam olarak sessizleşme mekanizmasını belirlemek için, genetik mutasyonların da paralel olarak incelenmesi, bu araştırmada çok faydalı olabilir düşüncesindeyiz.



## 7. KAYNAKLAR

Acs G, Lawton T J, Rebbeck T R, LiVolsi V A, et al. Differential expression of E-cadherin in lobular and duktal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. *Am J Clin Pathol.* 2001; 115: 85-98.

Araujo F D, Knox D, Szyf M, Price G, et al. Concurrent Replication and Methylation at Mammalian Origins of Replication. *Mol Cell Biol.* 1998;18: 3475–3482.

Asselah T, Bieche I, Sabbagh A, Bedossa P, et al. Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut.* 2008. (doi.10.1136/gut.2008.166348).

Auwera I V D, Yu W, Suo L, Neste L V, et al. Array-based DNA methylation profiling for breast cancer subtype discrimination. *PLoS ONE.* 2010; 5: e12616 (doi: 10.1371/journal.pone.0012616).

Barekati Z, Radpour R, Kohler C, Zhong X Y. Specificity of methylation assays in cancer research: a guideline for designing primers and probes. *Obstet Gynecol Int.* 2010; doi: 10.1155/2010/870865.

Barrons S P, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res.* 2009; 88: 400-408.

Basha R, Reddy G.R. Developmental exposure to lead and late life abnormalities of nervous system. *Indian J Experiment Biol.* 2010; 48: 636-641.

Baylin S, Bestor T H. Altered methylation patterns in cancer cell genomes: Cause or consequence?. *Cancer Res.* 2002; 1:299-305.

Belinsky S.A, Klinge D.M, Stidley C A, Issa J.P, et al. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res.* 2003;63:7089-7093.

Berx G, Roy F V. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1: a003129.

Berx G, Roy F V. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res.* 2001; 3: 289-293.

Bibicova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 2006; 16: 383-393.

Biniszkiewicz D, Gribnau J, Ramsahoye B, Gaudet F, et al. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting and embryonic lethality. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 2124-2135.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16: 6-21. Bisulfite sequencing. En [Wikipedia.org/wiki/bisulfite-sequencing](http://Wikipedia.org/wiki/bisulfite-sequencing). 2011.

Bjork K, Saarikoski S T, Arlinde C, Kovanen L, et al. Glutathione-S-transferase expression in the brain: possible role in ethanol preference and longevity. *FASEB J.* 2006; doi: 10.1096/fj.06-5896 com.

Boks M P, Derks E M, Weisenberger D J, Strengman E, et al. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLOS.* 2009; 4: e6767 (doi: 10.1371/journal.pone.0006767).

Brocke J V, Kraus A, Whibley C, Hollstein M C, et al. The carcinogenic air pollutant 3-Nitrobenzanthrone induces GC to TA transversion mutations in human p53 sequences. *Mutagenesis.* 2008; 1-7 (doi: 10.1093/mutage/gen049).

Brooks J, Cairns P, Zeleniuch-Jacquotte A. Promoter methylation and the detection of breast cancer. *Cancer Causes Control.* 2009; 20: 1539-1550.

Brown C J. Role of the X chromosome in cancer. *J Nat Cancer Inst.* 1996; 88: 480-482.

Büyüktunçer D, Arisan S, Özdilli K. E-cadherin molecular mechanism in prostate cancer. *J Cell Mol Biol.* 2003; 2: 57-64.

Calderia J R F, Prando E C, Quevedo F C, Neto F A M, et al. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating cancer. 2005. *BMC Cancer.* 6; 48-57.

- Campbell P M, Szyf M. Human DNA methyltransferase gene DNMT1 is regulated by the APC pathway. *Carcinogenesis*. 2003; 24: 17-24.
- Candelaria M, Rincon D G, Arce C, Cetina L, et al. A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Annals oncol*. 2007; 18: 1529-1538.
- Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem*. 2001; 276: 40778–40787.
- Cheng Y W, Shawber C, Notterman D, Paty P, et al. Multiplexed profiling of candidate genes for CpG island methylation status using a flexible PCR/LDR/Universal array assay. *Genome Res*. 2006; 16: 282-289.
- Chen Z X, Mann J R, Hsieh C L, Riggs A D, et al. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem*. 2005; 95: 902–917.
- Cheng C W, Wu P E, Yu J C, Huang C S, et al. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene*. 2001; 20: 3814-3823.
- Choi J Y, James S R, Link P A, McCann S E, et al. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of Breast Cancer. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 1889–1897.
- Chuang L S, Tan E H H, Oh H K, Li B F L. Selective depletion of human DNA-methyltransferase DNMT1 proteins by sulfonate-derived methylating agents. *Cancer Res*. 2002; 62: 1592-1597.
- Clarke R B, Bundred N J. Do early premalignant changes in normal breast epithelial cells predict cancer development?. *Breast Cancer Res*. 2000; 7: 18-20.
- Colpaert C G, Vermeulen P B, Benoy I, Soubry A, et al. Inflammatory breast cancer shows angiogenesis with high endothelial proliferation rate and strong E-cadherin expression. *Br J Cancer*. 2003; 88: 718 – 725.

Cristofanilli M, Buzdar A U, Hortobagyi G N. Update on the management of inflammatory breast cancer. *Oncologist*. 2003; 8: 141-148.

Dasgupta R. K, Adamson P J, Davies F E, Rollinson S, et al. Polymorphic variation in GSTP1 modulates outcome following therapy for multiple myeloma. *Blood*. 2003; 102: 2345-2350.

Debis M T, Welch D R. Genetics basis of human breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2006; 6: 441-451.

Dejeux E, Ronneberg J A, Solvang H, Bukholm I et al. DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response. *Mol Cancer*. 2010; 9:68-81.

Delgado S, Gomez M, Bird A, Antequera F. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *EMBO J*. 1998; 7:2426-2435.

Diller T, Miller J, Updyke T, Feldman G, et al. A new dry blotting system for rapid protein transfer from polyacrylamide gels to membrane. *Invitrogen*. [iBlot\\_Dry\\_Blot\\_system\\_AppNote.pdf \(application/pdf object\)](#). 2011.

DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Applied Biosystems chemistry guide*. Second edition. [www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041003.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041003.pdf), 2010.

Dolinoy D C, Jirtle R.L. Environmental epigenomics in human health and disease. *Environ Mol Mutagen*. 2008; 49:4-8.

Donkena K V, Young C Y F, Tindall D J. Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. *Obs Gynec Int*. 2010; 1. Doi:10.1155/2010/302051.

Eads C A, Danenberg K D, Kawakami K, Saltz L B, et al. Methylation: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28: e32.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004; 429:457-463.

Ehdaie B, Theodorescu D. Molecular markers in transitional cell carcinoma of the Bladder: new insights into mechanisms and prognosis. *Indian J Urol.* 2008; 24:61-67.

Eric R, Fearon E R. BRCA1 and E-Cadherin promoter hypermethylation and gene inactivation in cancer—association or mechanism?. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:515-517.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2005; doi:10.1038/nrg:1-8.

Esteller M, Corn P G, Baylin S B, Herman J G. A gene hypermethylation profile of human Cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 3225–3229.

Esteller M, Corn P G, Urena J M, Gabrielson E, et al. Inactivation of glutathione S-transferase P by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.* 1998; 58:4515-4518.

Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: R50-R59.

Esteller M, Silva J M, Dominguez G, Bonilla F, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Nat Cancer Inst.* 2000; 92: 564-569.

Fang F, Fan S, Zhang X, Zhang M. Predicting methylation status of CpG islands in the human brain. *Bioinformatics.* 2006; 22: 2204-2209.

Filho L A R, Franks J, Sasaki M, Shiina H, et al. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. *Mol Carcinog.* 2002; 34:187–198.

Fischer U, Kuhlmann M, Pecinka A, Schmidt R, et al. Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. *Plant J.* 2008; 53:1-10.

Flanagan J M, Cocciardi S, Waddell N, Johnstone C N, et al. DNA methylome of familial breast cancer identifies distinct profiles defined by mutation status. *Am J Hum Genetics.* 2010; 86:420-433.

Fraga M F, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, et al. The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 1765-1774.

Franca L T C, Carrilho E, Kist T B L. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys.* 2002; 35: 169-200.

Franko A, Dolzan V, Arneric N, Dodic-Fikfak M. The influence of genetic polymorphism of GSTP1 on the development of asbestosis. *JOEM.* 2008; 50: 7-12.

Fryxell K J, Moon W J. CpG mutation rates in the human genome are highly dependent on local GC content. *Mol Biol Evol.* 2005; 22:650-658.

Fuks F, Hurd P J, Wolf D, Nan X, et al. The methyl-CpG-binding MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *Biol Chem.* 2003; 278: 4035-4040.

Fulka H, Mrazek M, Telpa O, Fulka J. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction.* 2004; 128: 703-708.

Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome. *Diabetes.* 2005; 54: 1899-1906.

Garfin D E, Gel electrophoresis of proteins. In: Davey J, Lord M, editors. *Essential cell biology.* Oxford UK: Oxford University Press; 2003.p.197-268.

Geiman T M, Sankpal U T, Robertson A K, Chen Y, et al. Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome Condensation machinery. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 2716-2729.

Gheldof N, Tabuchi T M, Dekker J. The active FMR1 promoter is associated with a large domain of altered chromatin conformation with embedded local histone modification. *PNAS.* 2006; 103: 12463-12468.

Gitan R S, Shi H, Chen C M, Yan P S, et al. Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res.* 2001; 12: 158-164.

- Goessl C, Krause H, Mueller M, Heicappell R, et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res.* 2000; 60: 5941-5945.
- Gomez D S, Filardi E S, Nunez R T M, Caparros E, et al. Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *J Biol Chem.* 2008; 283: 3889-3903.
- Gonzalez A D, Lizan M, Candelaria M, Cetina L, et al. Epigenetic of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer.* 2005; 4:38-62.
- Goodman P A, Burkhardt N, Juran B, Tibbles H E, et al. Hypermethylation of the spleen tyrosine kinase promoter in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene.* 2003; 22: 2504-2514.
- Graff J R, Gabrielson E, Fujii H, Baylin S B, et al. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem.* 2000; 275: 2727-2732.
- Greco M, Alo F D, Scardocci A, Criscuolo M, et al. Promoter methylation of DAPK1, E-cadherin and thrombospondin-1 in de novo and therapy-related myeloid neoplasms. *Blood Cells Mol Dis.* 2001; 45: 181-185.
- Gudmundsdottir K, Tryggvadottir L, Eyfjord J E. GSM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the P53 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10: 1169-1173.
- Gutiérrez J C, Callejas S, Borniquel S, González A M. DNA methylation in Ciliates: implications in differentiation processes. *Int Microbiol.* 2000; 3:139-146.
- Hajra K M, Ji X, Fearon E R. Extinction of E-cadherin expression in breast cancer via a dominant repression pathway acting on proximal promoter elements. *Oncogene.* 1999; 18: 7274-7279.
- Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.

Herman J G, Baylin S B. Gene silencing in cancer in association with promoter Hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003; 349: 2042–2054.

Herman J G, Graff J R, Myohanen S, Nelkin B D, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR-assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:9821-9826.

Hisano M, Ohta H, Nishimune Y, Nozaki M. Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene, *Tact1/Act17b*, represses its expression in somatic cells. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 4797-4804.

Ho E, Beaver L M, Williams D E, Dashwood R H. Dietary factors and epigenetic regulation for prostate cancer prevention. *Adv Nutr.* 2011; 2: 497-510.

Hoque M O, Fang Q, Toure P, Dem A, et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24:4262-4269.

Hoque M O, Prencipe M, Poeta M L, Barbano R, et al. Changes in CpG islands promoter methylation pattern during ductal breast carcinoma progression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18: 2694-2700.

Huang T H M, Esteller M. Chromatin remodeling in mammary gland differentiation and breast tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2:a004515(doi:10.1101/cshperspect.a004515).

Huang T H M, Laux D E, Hamlin B C, Tran P, et al. Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique. *Cancer Res.* 1997; 57: 1030-1034.

Huang T H M, Perry M R, Laux D E. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Human Mol Genet.* 1999; 8: 459-470.

Huang Y, Pastor W A, Shen Y, Tahiliani M, et al. The behavior of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfate sequencing. *PLoS One.* 2010; 5: e8888(doi:10.1371/journal.pone.0008888).

Introduction to western blotting. <http://issuu.com/abdserotec/docs/westernblottingbrochure>. 2011.



Isagawa T, Nagae G, Shiraki N, Fujita T, et al. DNA methylsation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers. *PLOS*. 2011; 6:e26052 (doi: 10.1371/journal.pone.0026052).

Jeronimo C, Costa I, Martins M C, Monterio P, et al. Detection of gene promotör hypermethylation in fine needle washing from breast lesions. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 3413-3417.

Jeronimo C, Vazim G, Henrique R, Oliveira J, et al. I105V polymorphism and promotör methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent*. 2002; 11: 445-450.

Jiang M, Zhang Y, Fei J, Chang X, et al. Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfate-PCR sequencing traces. *Lab Invest*. 2010; 90: 282-290.

Jones P A, Gonzalgo M L. Altered DNA methylation and genome instability: a new pathway to cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94: 2103-2105.

Jong M M, Nolte I M, Meerman G J, Graaf W T A, et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet*. 2002; 39: 225-249.

Kang G H, Shim Y H, Jung H Y, Kim W H, et al. CpG Island Methylation in Premalignant Stages of Gastric Carcinoma. *Cancer Res*. 2001;61:2847–2851.

Kimura H, Shiota K. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *Biol Chem*. 2003; 278: 4806-4812.

Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modification in human cancers. *Yonser Med J*. 2009; 50: 455-563.

Kopelovich L, Crowell J A, Fay J R. The epigenome as a target for cancer chemoprevention. *J Nat Cancer Inst*. 2002; 95: 1747-1757.

Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, Battaglic C, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation. *Clin Canc Res*. 2004;10:28-32.

Laird W P. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet.* 2005;14: 65–76.

Lasabova Z, Tilandyova P, Kajo K, Zubor P, et al. Hypermethylation of the GSTP1 promotör region in breast cancer is associated with prognostic clinicopathological parameters. *Neoplasma.* 2010; 57:35-41.

Lee E Y H P, Muller W J. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Sprig Harb Perspect Biol.* 2010; 2: a003236.

Lee J S. GSTP1 promotör hypermethylation in an early event in breast carcinogenesis. *Virchows Arch.* 2007; 450: 637-642.

Lee W J, Shim J Y, Zhu B T. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol.* 2005. 68: 1018-1030.

Lewis A, Mitsuya K, Constancia M, Reik W. Tandem repeat hypothesis in imprinting: deletion of a Conserved direct repeat element upstream of *H19* has no effect on imprinting in the *Igf2-H19* Region. *Mol Cell Biol.* 2004;24:5650-5656.

Liang G, Chan M F, Tomigahara Y, Tsai Y C, et al. Cooperativity between DNA Methyltransferases in the Maintenance Methylation of Repetitive Elements. *Mol Cell Biol.* 2002; 22:480-491.

Lin Q, Li M, Shen Z Y, Xiong L W, et al. Prognostic impact of vascular endothelial growth factor-A and E-cadherin expression in completely resected pathologic stage I non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2010; 40: 670-676.

Lin X, Tascilar M, Lee W H, Vles W J, et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol.* 2001; 159: 1815-1826.

Liu D, Huang C L, Kameyama K, Hayashi E, et al. E-cadherin expression associated with differentiation and prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71: 949-955.

- Lombaerts M, Wazel T V, Philippo K, Dierssen JWD, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2006; 94:661-671.
- Luikenhuis S, Wutz A, Jaenisch R. Antisense Transcription through the *Xist* Locus Mediates *Tsix* Function in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol*. 2001; 2:8512-8520.
- Maranchie J K, Vasselli J R, Riss J, Bonifacino J S, et al. The contribution of VHL substrate binding and HIF1- $\alpha$  to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2002; 1:247-255.
- Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev*. 2003; 83: 337-376.
- Matros E, Wang Z C, Lodeiro G, Miron A, et al. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 91: 179-186.
- Maruya S, Kurotaki H, Wade R, Saku T, et al. Promoter methylation and protein expression of the E-cadherin gene in the clinicopathologic assessment of adenoid cystic carcinoma. *Modern Pathol*. 2004; 17:637-645.
- Marzo A M, Marchi V L, Yang E S, Veeraswamy R, et al. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*. 1999; 59: 3855-3860.
- Masciari S, Larsson N, Senz J, Boyd N, et al. Germline E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. *J Med Genet*. 2007; 44:726-731.
- McCabe M T, Brandes J C, Vertino P M. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 3927-3937.
- Michalowsky L A, Jones P A. DNA methylation and differentiation. *Environ Health Perspect*. 1989. 80: 189-197.

- Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1,3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2001; 97: 1172-1179.
- Mohtat D, Susztak K. Fine tuning gene expression: the epigenome. *Semin Nephrol*. 2010; 30: 468-476.
- Muggerud A A, Ronneberg J A, Warnberg F, Botling J, et al. Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOX1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12:R3(doi:10.1186/bcr2466).
- Muhan R D, Rao A, Gagliardi J, Tini M. SUMO-1-dependent allosteric regulation of thymine DNA glycosylase alters subnuclear localization and CBP/P300 recruitment. *Mol Cell Biol*. 2007; 27: 229-243.
- Mund C, Beier V, Bewerunge P, Dahms M, et al. Array-based analysis of genomic DNA methylation patterns of the tumor suppressor gene p<sup>16</sup> Ink<sup>4A</sup> promoter in colon carcinoma cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33: e73(doi:10.1093/nar/gni072).
- Napieralski R, Otto K, Kremer M, Becker K, et al. Methylation of tumor-related genes in nonadjuvant-treated gastric cancer: relation to therapy response and clinicopathologic and molecular features. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 5095-5102.
- Narayan G, Pulido H A, Koul S, Vargas H, et al. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB and C1H1 genes in carcinoma of cervix uteri: it's relationship to clinical outcome. *Mol Cancer*. 2; 24-36.
- Nishimura M, Saito T, Yamasaki H, Kudo R. Suppression of gap junctional intercellular communication via 50 CpG island methylation in promoter region of E-cadherin gene in endometrial cancer cells. *Carcinogenesis*. 2003; 24:1615-1623.
- Nojima D, Nakajima K, Li L C, Franks J, et al. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma. 2001; 32:19-27.

Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, et al. Expression of E-cadherin cell adhesion molecule in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res.* 1993; 53: 1696-1701.

Okamura N, Masuda T, Gotoh A, Shirakawa T, et al. Quantitative proteomic analysis to discover potential diagnostic markers and therapeutic targets in human renal cell carcinoma. *Proteomics.* 2008; 8: 3194-3203.

Onder T T, Gupta P B, Mani S A, Yang J, et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008; 68: 3645-3654.

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

Parella P, Poeta M L, Gallo A P, et al. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5349-5354.

Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, et al. Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acid Res.* 2010; 38: 4313-4324.

Paulsen M, Ferguson-Smith A C. DNA methylation in genomic imprinting, development and disease. *J Pathol.* 2001; 195: 97-110.

Pfeifer G P. Analysis of chromatin structure by ligation-mediated-PCR. *Genome Res.* 1992; 2: 107-111.

Pfeifer G P, Rauch T A. DNA methylation pattern in lung carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2009; 19: 181-187.

Polsky D, Cordon-Cardo C. Oncogenesis in melanoma. *Oncogene.* 2003; 22: 3087-3091.

Polyak K, Riggins G J. Gene discovery using the serial analysis of gene expression Technique: implications for cancer research. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 2948-2958.

Ponger L, Duret L, Mouchiroud D. Determination of CpG island: expression in early embryo and isochore structure. *Genome Res.* 2011; 11: 1854-1860.

Potter E, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev.* 1999; 20: 207-239.

Pu R T, Laitala L E, Alli P M, Fackler M J, et al. Methylation profiling of benign and malignant breast lesions and its application to cytopathology. *Mod Pathol.* 2003; 16:1095-1101.

Putti T C, El-Rehim D M A, Rakha E A, Paish C E, et al. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol.* 2005; 18: 26-35.

Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One.* 2011; 6: e16080 (doi: 10.1371/journal.pone.00116080).

Rauch T, Pfeifer G. Methylated –CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. *Lab Invest.* 2005; 85: 1172-1180.

Rein T, Pamphilis M L, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 2255-2264.

Riddle N C, Richards E J. The control of natural variation in cytosine methylation in *Arabidopsis*. *Genetics.* 2002; 162: 355-363.

Ripoche M A, Kress C, Poirier F, Dandolo L. Deletion of the H19 transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. *Genes Dev.* 2009; 11:1596-1604.

Robertson K D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene.* 2001; 20: 3139-3155.

Robertson K D, Jones P A . DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis.* 2000; 12: 461-467.

Robertson K D, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, et al. The human DNA methyltransferase (DNMTs)1,3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 2291-2298.

Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ.* 2006; 174:341-348.

Rodrigues C F, Pinto I M, Pereira D, Lopes C S. Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas. *Annals Oncol.* 2004;15:1535-1542.

Ronneberg J A, Tost J, Solvang H K, Alnaes G I G, et al. GSTP1 promoter haplotypes affect DNA methylation levels and promoter activity in breast carcinomas. *Cancer Res.* 2008; 68:5562-5571.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Separation of DNA in polyacrylamide gels. In: *Molecular cloning. a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press; 1989. p.125-130.

Sarrio D, Bueno G M, Hardisson D, Estevez C S, et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer, relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer.* 2003;106: 208-215.

Sato N, Maitra A, Fukushima N, Heek T, et al. Frequent hypermethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63: 4158-4166.

Schatz P, Dietrich D, Schuster M. Rapid analysis of CpG methylation patterns using RNase T1 cleavage and MALDI-TOF. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: e167 (doi:10.1093/nar/gnh165).

Schlosshauer P W, Ellenson L H, Soslow R A.  $\beta$ - Catenin and E-Cadherin expression Patterns in high-grade endometrial carcinoma are associated with histological subtype. *Mod Pathol.* 2002; 15: 1032–1037.

Schmutte C, Baffa R, Veronese L M, Murakumo Y, et al. Human thymine-DNA glycosylase maps at chromosome 12q22-q24.1 : a region of high loss of heterozygosity in gastric cancer. *Cancer Res.* 1997; 57: 3010-3015.

Schuebel K E, Chen W, Cope L, Glockner S C, et al. Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet.* 2007; 3: e157 (doi:10.1371/journal.pgen.0030157).

Sharif J, Endo T A, Yokoda T, Koseki H. Divergence of CpG islands promoters: A consequence or cause of evolution? *Develop Differ.* 2010; 52:545-554.

Sharma S, Carvalho D D, Jeong S, Jones P A, et al. Nucleosome containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenomic inheritance. *PLOS.* 2011; 7: e1001286.

Shaw R J, Liloglou T, Rogers S N, Brown J S, et al. Promoter methylation of P16, RAR $\beta$ , E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer.* 2006; 94:561 – 568.

Shaw R J, Teth E K A, Risk J M, Field J K, et al. Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34:e78 (doi:10.1093/nar/gk1424).

Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet.* 2007; 3: e181(doi:10.1371/journal.pgen.0030181).

Shi L, Wu J. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reprod Biol.* 2009; 7: 59-70.

Siedlecki P, Zielenkiewicz P. Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochem Polonica.* 2006; 33: 245-256.

Smiraglia D J, Plass C. The study of aberrant methylation in cancer via restriction landmark genomic scanning. *Oncogene.* 2002; 21:5414-5426.



Souza B, Taylor-Paradimitriou J. Overexpression of ERBB2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene. *Proc Nat Acad Sci.* 1994; 91: 7202-7206.

Stach D, Schmitz O J, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Capillary electrophoresis analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: e2 (doi:10.1093/nar/gng002).

Sunami E, Shinozaki M, Sim M S, Nguyen S L, et al. Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008; 10: R46 (doi:10.1186/bcr2098).

Sun Y, Lin R, Dai J, Jin D, et al. Suppression of tumor growth using antisense oligonucleotide against survivin in an orthotopic transplant model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. *Oligonucleotides.* 2006; 16: 365-374.

Szyf M. The role of DNA methyltransferase 1 in growth control. *Front Biosci.* 2001; 6: d599-d609.

Tan L W, Bianco T, Dobrovic A. Variable promoter region CpG island methylation of Putative tumor suppressor gene connexin 26 in breast cancer. *Carcinogenesis.* 2002; 23:231-236.

Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin,  $\alpha$ -catenin, and  $\beta$ -Catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2003; 89:557 – 563.

Tonini G, Fratto M E, Schiavon G. Molecular prognostic factors: clinical implications in patients with breast cancer. *Cancer Ther.* 2008; 6: 773-782.

Towbin H, Staehelin T. Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989; 27: 495-501.

Townsend D M, Tew K D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 2003; 22: 7369-7375.

Tryndyak v P, Beland F A, Pogribny I P. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and micro RNA-200 family alternations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2010; 126: 2575-2583.

Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest*. 2000; 105:401-407.

Valinluk V, Tsai H.H, Rogstad D.K, Burdzy A, et al. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2(MeCP2).*Nucleic Acids Res*. 2004;32:4100-4108.

Vlaykova T, Miteva L, Gulubova M, Stanilova S. Ile<sup>105</sup> val GSTP1 polymorphism and susceptibility to colorectal carcinoma in Bulgarian population. *Int J Colorectal Dis*. 2007; 22: 1209-1215.

Wajed S A, Laird P W, Meester T R. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg*. 2001; 234: 10-20.

Wang H, Hanash S. Intact-proteinbased sample preparation strategies for proteome analysis in combined with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2005; 24:413-426.

Wang J, Zou L J, Huang S D, Lu F L, et al. Genetic polymorphisms of glutathione –S- transferase gene GSTM1, GSTP1 and risk of coronary heart disease. *Mutagenesis*. 2010; 25: 365-369.

Wang W, Srivastava S. Stategic approach to validating methylated genes as biomarkers for breast cancer. *Cancer Prev Res*. 2010; 3: 16-24.

Webster K E, Bryan M K, Fletcher S, Crewther P E, et al. Meiotic and Epigenetic defects in Dnmt3l-knockout mouse spermatogenesis.*PNAS*. 2004; 102:4068-4073.

Western blotting PVDF membrane. [Danish.pall.com/variants/pdf/pdf/laboratory\\_48923.pdf](http://Danish.pall.com/variants/pdf/pdf/laboratory_48923.pdf).2011.

Wong C M, Anderton D L, Schnelder S S, Wing M A, et al. Quantitative analysis of promoter methylation in exfoliated epithelial cells isolated from breast milk of healthy women. *Epigenetics*. 2010; 5:645- 655.

Wu G, Guo Z, Chang X, Kim M S, et al. LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit Ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 4123-4129.

Wutz A, Gribnau J. X inactivation Xplained. *Sciencedirect.* 2007; 17:387–393.

Xiang T X, Yuan Y, Li L L, Wang Z H, et al. Aberrant promoter CpG methylation and its translational application in breast cancer. *Chin J Cancer.* 2011; 30: 1-9.

Xie H, Wang M, Bischof J, Bonaldo M F, et al. SNP-based prediction of the human germ cell methylation landscape. *Genomics.* 2009; 93: 434-440.

Xiong Z, Laird P W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 2532-2534.

Yang I, Park I Y, Jang S M, Shi L H, et al. Rapid quantification of DNA methylation through dNMP analysis following bisulfate-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: e61(doi:10.1093/nar/gk1257).

Yang X, Yan L, Davidson N.E. DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2001; 8:115-127.

Yan P S, Perry M R, Laux D E, Asare A L, et al. CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 1432-1438.

Yasaukochi Y, Maruyama O, Mahajan M C, Padden C, et al. X chromosome-wide analyses of genomic DNA methylation states and gene expression in male and female neutrophils. *PNAS.* 2010; 107: 3704-3709.

Yates C, Wells A, Turner T. Luteinising hormone-releasing hormone analogue reverses the Cell adhesion profile of EGFR overexpressing DU-145 human prostate carcinoma subline. *Br J Cancer.* 2005; 92:366 – 375.

Ye W, Xu P, Jen R, Feng E, et al. Zeranol down-regulates P53 expression in primary cultured human breast cancer epithelial cells through epigenetic modification. *Int J Mol Sci* .2011; 12:1519-1532.

Ye Y, Wang D, Su C, Rong T, et al. Combined detection of P53,P16,Rb and EGFR mutations in lung cancer by suspension microarray. *Genet Mol Res*. 2009; 8: 1509-1518.

Yokochi T, Robertson K D. Preferential methylation of unmethylated DNA by mammalian *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a. *Biol Chem*. 2002; 277: 11735-11745.

Yuan Y, Qian Z R, Sano T, Asa S L, et al. Reduction of GSTP1 expression by DNA methylation correlates with clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod Pathol*. 2008; 21: 856-865.

Zhao W, Soejima H, Higashimoto K, Nakagawachi T, et al. The essential role of histone H3 Lys9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island. *J Biochem*. 2005; 137:431–440.

Zardo G, Reale A, Passananti C, Pradhan S, et al. Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation induces DNA hypermethylation: a possible molecular Mechanism. *FASEB J*. 2002; doi: 10.1096/fj.01-0827fje.

Zeschnigk M, Bohringer S, Price A, Onadim Z, et al. A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA):analysis of the retinoblastoma locus.*Nucleic Acids Res*. 2004;32:e125(doi:10.1093/nar/qnh122).

## ÖZGEÇMİŞ

## ÖZGEÇMİŞ

### ŞOHREH ALİZADEH SHARGH

<b>TC Kimlik No/Pasaport No:</b>	99985014836
<b>Doğum Yılı</b>	1968
<b>Yazışma Adresi</b>	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi/İnciraltı 35340-İZMİR 35340 İzmir/Türkiye
<b>Telefon</b>	232-4645609
<b>e-posta</b>	<a href="mailto:ShohrehShargh@gmail.com">ShohrehShargh@gmail.com</a>

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Iran	Iran Tıp Üniversitesi	Sağlık Bilimler Enstitüsü	Bioloji	Yüksek Lisans	2000
Iran	Iran azad İslami Üniversitesi	Sağlık Bilimler Enstitüsü	Bioloji	Lisans	1991

### AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

<b>Kurum/Kuruluş</b>	<b>Ülke</b>	<b>Şehir</b>	<b>Bölüm/Birim</b>	<b>Görev Türü</b>	<b>Görev Dönemi</b>
Azad İslami üniversitesi	Iran	Çalus	Tıbbi Labratuvar bilimleri	Araştırma üyesi	

### UZMANLIK ALANLARI

Tıbbi bioloji ve genetik öğretmenliği ve Moleküler araştırma labratuvar üyesi
Diğer

### ÖDÜLLER

<b>Ödülün Adı</b>	<b>Alındığı Kuruluş</b>	<b>Yılı</b>

**Düzenleme Tarihi:**10/9/2011

**Ek1:**

**E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ile normal ve tümör örneklerinde promotör bölgesinde CpG noktalarının arasında ilişki**

E_CADHERIN	Tümör						Normal					
	Negatif		Zayıf		Pozitif		Negatif		Zayıf		Pozitif	
Metillenme durumu	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
CPG_863			6	12	23	46			10	20	2	4
CPG_865			1	2	22	44			1	2	1	2
CPG_873			10	20	23	46			5	10	2	4
CPG_879					22	44			11	22	1	2
CPG_887			14	28	23	46			11	22	2	4
CPG_892			25	50	23	46			5	10	2	4
CPG_901			18	36	23	46			10	20	2	4
CPG_918			22	44	23	46			5	10	2	4
CPG_920			3	6	22	44					1	2
CPG_940			24	48	23	46			5	10	2	4

**E-cadherin proteinin ekspresyon düzeyi ile tümör örneklerinde promotör bölgesinde CpG noktalarının arasında ilişki**

E_CADHERIN		Corelasyon Coefficient	Sig. (2-tailed)
Metillenme durumu	CPG_863	0.77	0.00
	CPG_865	0.89	0.00
	CPG_873	0.69	0.00
	CPG_879	0.92	0.00
	CPG_887	0.62	0.00
	CPG_892	0.58	0.00
	CPG_901	0.57	0.00
	CPG_918	0.54	0.00
	CPG_920	0.84	0.00
	CPG_940	0.56	0.00



**Ek 2.****GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile normal ve tümör örneklerinde promotör bölgesinde CpG noktalarının arasında ilişki**

GSTP1 western blotting	Tümör						Normal					
	Negatif		Zayıf		Güçlü		Negatif		Zayıf		Güçlü	
	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
CPG_197	5	10	9	18	4	8						
CPG_190	4	8	9	18	4	8						
CPG_187	4	8	8	16	3	6						
CPG_185	5	10	9	18	4	8						
CPG_183	3	6	8	16	2	4						
CPG_182	4	8	8	16	3	6						
CPG_176	4	8	9	18	3	6	1	2				
CPG_162	4	8	8	16	4	8			1	2		
CPG_155	4	8	9	18	4	8						
CPG_152	3	6	9	18	3	6						
CPG_148	4	8	9	18	3	6	1	2				
CPG_145	3	6	8	16	2	4						
CPG_141	5	10	9	18	3	6						
CPG_132	3	6	8	16	2	4						
CPG_127	5	10	9	18	4	8	1	2				
CPG_124	5	10	9	18	4	8						
CPG_112	5	10	9	18	4	8						
CPG_109	3	6	8	16	2	4	1	2				
CPG_101	5	10	9	18	4	8						
CPG_99	4	8	9	18	4	8						
CPG_81	3	6	8	16	2	4						
CPG_77	5	10	9	18	4	8						
CPG_74	4	8	8	16	4	8						
CPG_71	5	10	9	18	4	8						
CPG_54	4	8	9	18	2	4	2	4	1	2		
CPG_53	3	6	8	16	2	4						

CPG_48	3	6	8	16	2	4						
CPG_47	4	8	9	18	4	8			1	2		
CPG_43	3	6	8	16	3	6						
CPG_42	5	10	9	18	4	8						
CPG_40	5	10	9	18	4	8						
CPG_38	5	10	9	18	4	8						
CPG_23	3	6	8	16	2	4	1	2				
CPG_22	4	8	8	16	2	4						
CPG_15	5	10	9	18	4	8						
CPG_14	5	10	9	18	4	8			1	2		
CPG_13	5	10	9	18	4	8						
CPG_11	5	10	9	18	4	8			1	2		
CPG_8	3	6	9	18	4	8						
CPG_4	4	8	8	16	3	6	1	2	1	2		

**GSTP1 proteinin ekspresyon düzeyi ile tümör örneklerinde promotör bölgesinde CpG noktalarının arasında ilişki**

<b>GSTP1</b>		<b>Corelasyon Coefficient</b>	<b>Sig. (2-tailed)</b>
<b>Metillenme durumu</b>	CPG_197	-0.06	0.71
	CPG_190	-0.07	0.68
	CPG_187	-0.02	0.89
	CPG_185	-0.06	0.71
	CPG_183	-0.10	0.53
	CPG_182	-0.08	0.61
	CPG_176	-0.07	0.64
	CPG_162	-0.13	0.40
	CPG_155	-0.07	0.68
	CPG_152	-0.14	0.37
	CPG_148	-0.07	0.64
	CPG_145	-0.10	0.53
	CPG_141	-0.01	0.96
	CPG_132	-0.10	0.53
	CPG_127	-0.06	0.71
	CPG_124	-0.06	0.71
	CPG_112	-0.06	0.71
	CPG_109	-0.10	0.53
	CPG_101	-0.06	0.71
	CPG_99	-0.12	0.43
	CPG_81	-0.10	0.53
	CPG_77	-0.06	0.71
	CPG_74	-0.13	0.40
	CPG_71	-0.06	0.71
	CPG_54	-0.02	0.89
	CPG_53	-0.10	0.53

	CPG_48	-0.10	0.53
	CPG_47	-0.12	0.43
	CPG_43	-0.15	0.34
	CPG_42	-0.06	0.71
	CPG_40	-0.06	0.71
	CPG_38	-0.06	0.71
	CPG_23	-0.10	0.53
	CPG_22	-0.03	0.85
	CPG_15	-0.06	0.71
	CPG_14	-0.06	0.71
	CPG_13	-0.06	0.71
	CPG_11	-0.06	0.71
	CPG_8	-0.19	0.23
	CPG_4	-0.08	0.61

**Descriptives**

E\_cad

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N_S	35	,8771	,20159	,03407	,8079	,9464	,50	1,20
N_W	13	,6538	,18536	,05141	,5418	,7659	,40	1,00
N_N	3	,2000	,00000	,00000	,2000	,2000	,20	,20
T_S	3	,9000	,36056	,20817	,0043	1,7957	,50	1,20
T_W	26	,4346	,19379	,03800	,3563	,5129	,20	1,00
T_N	21	,5000	,24083	,05255	,3904	,6096	,20	,90
Total	101	,6366	,29008	,02886	,5794	,6939	,20	1,20

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: E\_cad

Tukey HSD

(I) Groups	(J) Groups	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N_S	N_W	,22330(*)	,06791	,017	,0258	,4208
	N_N	,67714(*)	,12578	,000	,3113	1,0430
	T_S	-,02286	,12578	1,000	-,3887	,3430
	T_W	,44253(*)	,05413	,000	,2851	,6000
	T_N	,37714(*)	,05771	,000	,2093	,5450
N_W	N_S	-,22330(*)	,06791	,017	-,4208	-,0258
	N_N	,45385(*)	,13392	,013	,0643	,8434
	T_S	-,24615	,13392	,447	-,6357	,1434
	T_W	,21923(*)	,07102	,031	,0127	,4258
	T_N	,15385	,07379	,304	-,0608	,3685
N_N	N_S	-,67714(*)	,12578	,000	-1,0430	-,3113
	N_W	-,45385(*)	,13392	,013	-,8434	-,0643
	T_S	-,70000(*)	,17071	,001	-1,1966	-,2034
	T_W	-,23462	,12749	,445	-,6054	,1362
	T_N	-,30000	,12905	,195	-,6754	,0754
T_S	N_S	,02286	,12578	1,000	-,3430	,3887

	N_W	,24615	,13392	,447	-,1434	,6357
	N_N	,70000(*)	,17071	,001	,2034	1,1966
	T_W	,46538(*)	,12749	,006	,0946	,8362
	T_N	,40000(*)	,12905	,030	,0246	,7754
T_W	N_S	-,44253(*)	,05413	,000	-,6000	-,2851
	N_W	-,21923(*)	,07102	,031	-,4258	-,0127
	N_N	,23462	,12749	,445	-,1362	,6054
	T_S	-,46538(*)	,12749	,006	-,8362	-,0946
	T_N	-,06538	,06134	,894	-,2438	,1130
T_N	N_S	-,37714(*)	,05771	,000	-,5450	-,2093
	N_W	-,15385	,07379	,304	-,3685	,0608
	N_N	,30000	,12905	,195	-,0754	,6754
	T_S	-,40000(*)	,12905	,030	-,7754	-,0246
	T_W	,06538	,06134	,894	-,1130	,2438

\* The mean difference is significant at the .05 level.

## GSTP1

### Descriptives

#### GSTP1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
N_S	35	1,1771	,08075	,01365	1,1494	1,2049	,80	1,20
N_W	12	,6333	,37497	,10825	,3951	,8716	,20	1,30
N_N	3	,2333	,05774	,03333	,0899	,3768	,20	,30
T_S	20	1,1750	,07864	,01758	1,1382	1,2118	,90	1,20
T_W	16	,7375	,27049	,06762	,5934	,8816	,30	1,20
T_N	14	,3486	,24579	,06569	,2067	,4905	,08	1,00
Total	100	,8968	,38719	,03872	,8200	,9736	,08	1,30

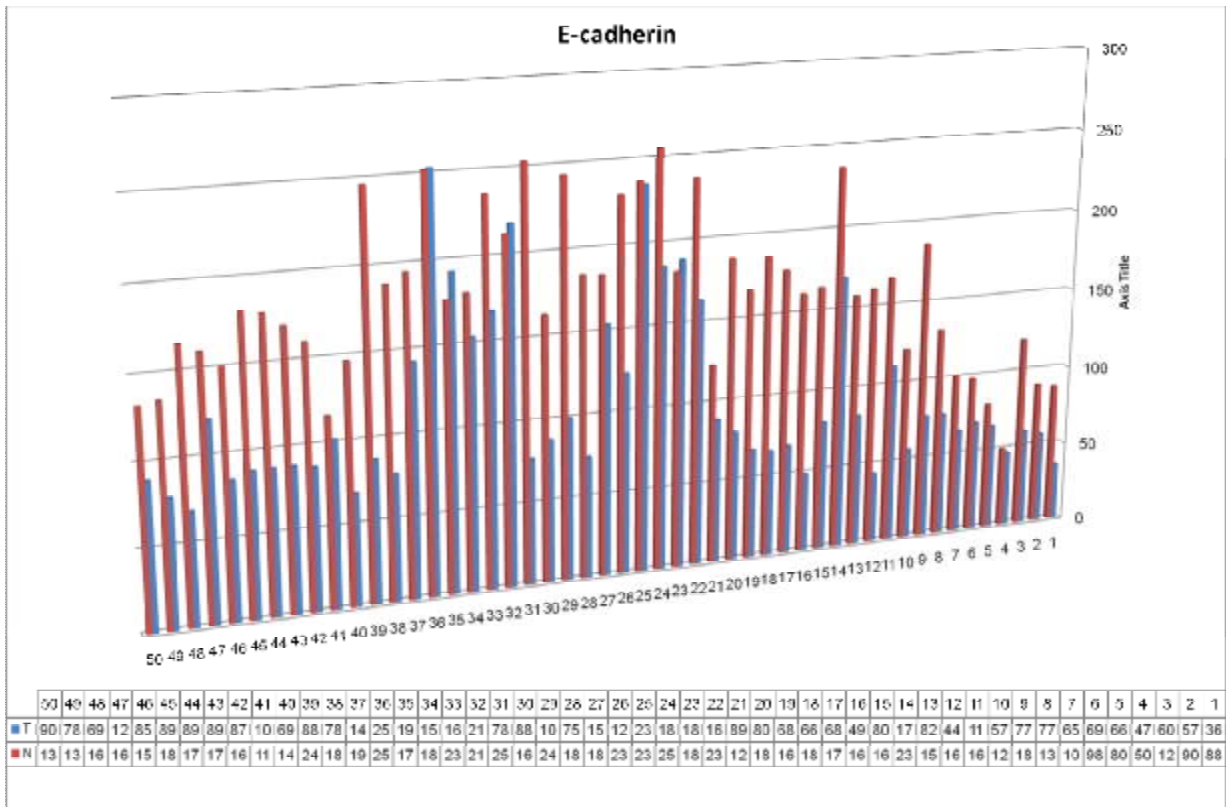
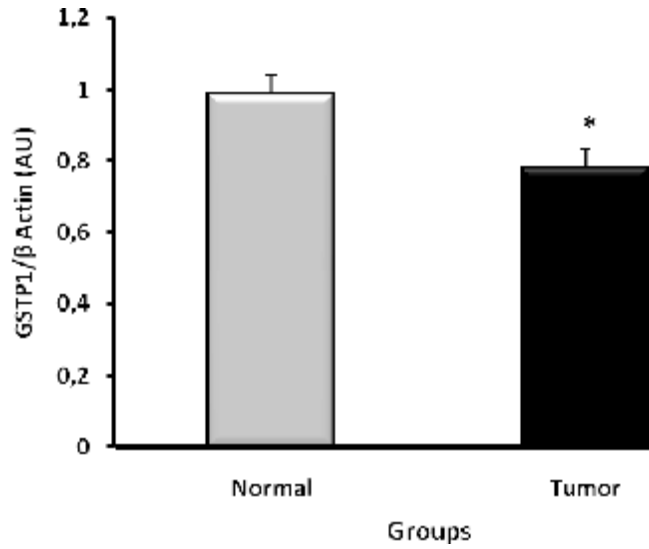
**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: GSTP1

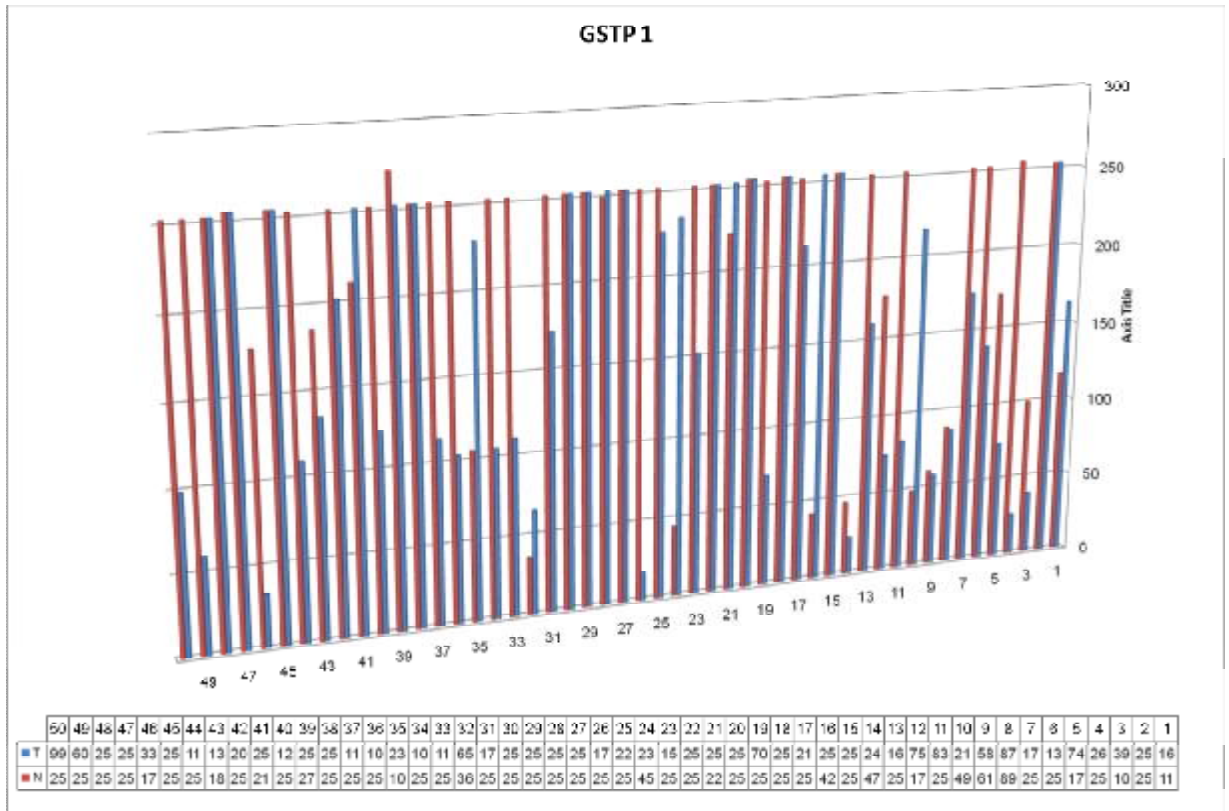
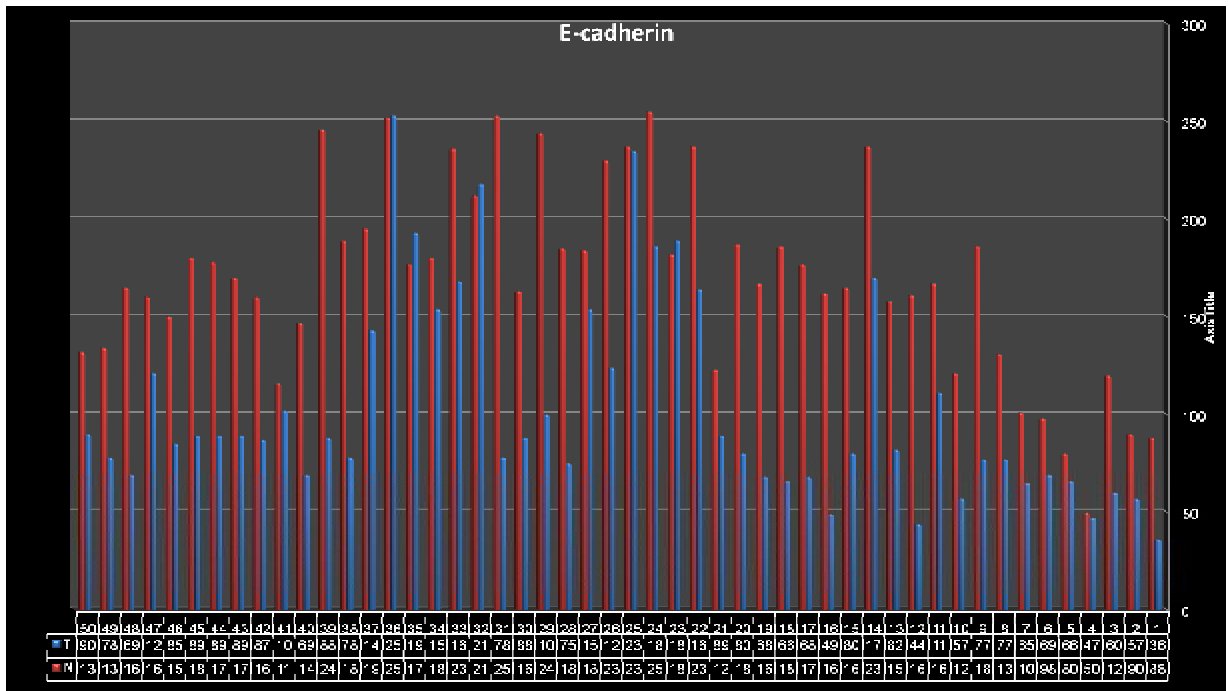
Tukey HSD

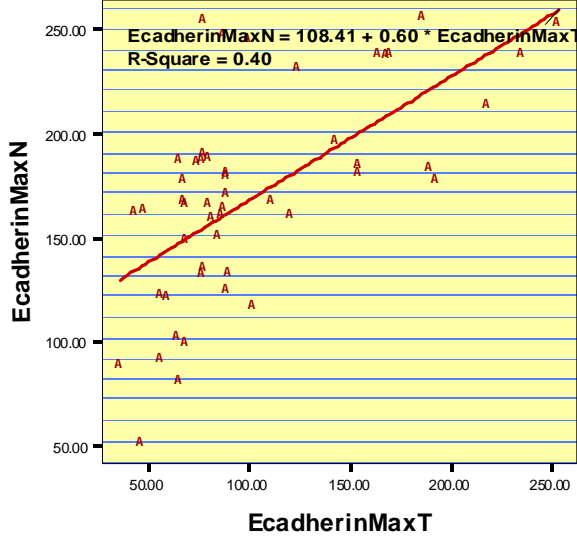
(I) Groups	(J) Groups	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N_S	N_W	,54381(*)	,06704	,000	,3488	,7389
	N_N	,94381(*)	,12056	,000	,5930	1,2946
	T_S	,00214	,05618	1,000	-,1613	,1656
	T_W	,43964(*)	,06048	,000	,2637	,6156
	T_N	,82857(*)	,06338	,000	,6442	1,0130
N_W	N_S	-,54381(*)	,06704	,000	-,7389	-,3488
	N_N	,40000(*)	,12936	,030	,0236	,7764
	T_S	-,54167(*)	,07318	,000	-,7546	-,3288
	T_W	-,10417	,07653	,750	-,3268	,1185
	T_N	,28476(*)	,07884	,006	,0554	,5141
N_N	N_S	-,94381(*)	,12056	,000	-1,2946	-,5930
	N_W	-,40000(*)	,12936	,030	-,7764	-,0236
	T_S	-,94167(*)	,12408	,000	-1,3027	-,5807
	T_W	-,50417(*)	,12609	,002	-,8710	-,1373
	T_N	-,11524	,12750	,945	-,4862	,2557
T_S	N_S	-,00214	,05618	1,000	-,1656	,1613
	N_W	,54167(*)	,07318	,000	,3288	,7546
	N_N	,94167(*)	,12408	,000	,5807	1,3027
	T_W	,43750(*)	,06722	,000	,2419	,6331
	T_N	,82643(*)	,06984	,000	,6233	1,0296
T_W	N_S	-,43964(*)	,06048	,000	-,6156	-,2637
	N_W	,10417	,07653	,750	-,1185	,3268
	N_N	,50417(*)	,12609	,002	,1373	,8710
	T_S	-,43750(*)	,06722	,000	-,6331	-,2419
	T_N	,38893(*)	,07334	,000	,1756	,6023
T_N	N_S	-,82857(*)	,06338	,000	-1,0130	-,6442
	N_W	-,28476(*)	,07884	,006	-,5141	-,0554
	N_N	,11524	,12750	,945	-,2557	,4862
	T_S	-,82643(*)	,06984	,000	-1,0296	-,6233
	T_W	-,38893(*)	,07334	,000	-,6023	-,1756

The mean difference is significant at the .05 level.

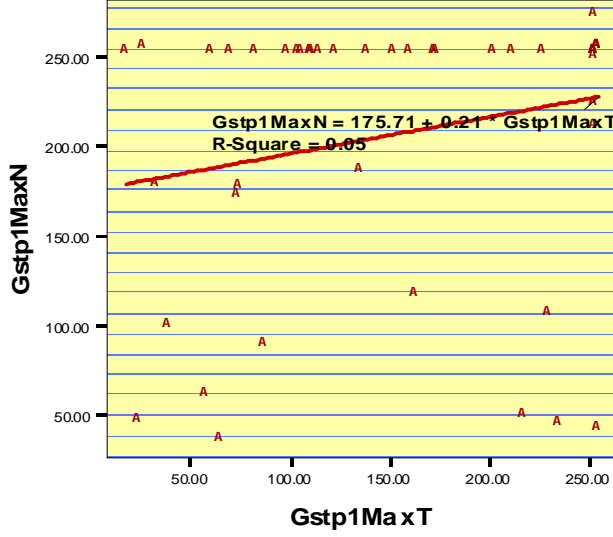








Linear Regression



Linear Regression

Western blotlama sonuçlarının konsantrasyon analizleri:

Hipotezlerin analizi

1. Örneklerin normal dağılım analizi

1.1 E-cadherinin (tümör örnekleri) normallik analizi

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Ecadherin Max	Ecadherin Min	Ecadherin Mean		
T	T	T		
50	50	50	N	
103.4800	45.5400	70.4202	Mean	Normal Parameters(a,b)
52.15645	20.94522	35.39227	Std. Deviation	
.262	.133	.225	Absolute	Most Extreme Differences
.262	.133	.225	Positive	
-.107	-.087	-.137	Negative	
1.152	.938	1.594	Kolmogorov-Smirnov Z	
.092	.343	.012	Asymp. Sig. (2-tailed)	

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Sig miktarının Min ve Max'da sig miktarlarının 0.05'den yüksek olmalarına göre, normal dağıtım kabulleniyor.

1.2 E-cadherinin (normal örnekleri) normallik analizi

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Ecadherin <b>Max</b> N	Ecadherin <b>Min</b> N	Ecadherin <b>Mean</b> N		
50	50	50	N	
170.0800	47.9600	89.4108	Mean	Normal Parameters(a,b)
49.35951	19.86173	43.31915	Std. Deviation	
.111	.099	.166	Absolute	Most Extreme Differences
.111	.099	.166	Positive	
-.103	-.080	-.092	Negative	
.783	.700	1.172	Kolmogorov-Smirnov Z	
.572	.712	.128	Asymp. Sig. (2-tailed)	

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Burdada her üç bölümde verilerin 0.05'den yüksek olmasına göre, dağılım normaldir.

1.3 GSTP1 için normal (tümör ve normal örnekleri için) dağıtım analizi

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Gstp1MinN	Gstp1MinT	Gstp1MeanN	Gstp1MeanT	Gstp1MaxN	Gstp1MaxT		
50	50	50	50	50	50		N
38.1400	34.8400	127.1046	98.8400	209.4000	164.2200	Mean	Normal Parameters(a,b)
17.70508	19.69602	56.40876	58.90609	55.14612	73.51715	Std. Deviation	
.148	.157	.096	.171	.385	.196	Absolute	Most Extreme Differences
.148	.157	.091	.171	.252	.139	Positive	
-.070	-.079	-.096	-.104	-.385	-.196	Negative	
1.047	1.112	.677	1.206	2.726	1.387		Kolmogorov-Smirnov Z
.223	.168	.750	.109	.095	.043		Asymp. Sig. (2-tailed)

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Burdada verilerin her 5 bölümde, 0.05'den yüksek olmasına göre, verilerin dağılımı normaldir.

2. 1 E-cadherin geninde, normal ve tümör örneklerinde, western blotlama sonuçlarının (konsantrasyon) anlamlı farklılık olmasının analiz.

Bu analizde, varyans analizi (Levene's testi) yapıldı.

groups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
EcadherinMaxTandN 1.00	50	103.4800	52.15645	7.37604
2.00	50	170.0800	49.35951	6.98049

### Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
EcadherinMaxTandN	Equal variances assumed	.313	.577	-6.558	98	.000	-66.60000	10.15545	-86.75316	-46.44684
	Equal variances not assumed			-6.558	97.704	.000	-66.60000	10.15545	-86.75392	-46.44608

Elde edilen verilere göre, Levin analizinde orta miktarın 0.05’den küçük olmasına göre (0.000) tümör ve normal örneklerin arasında anlamlı farklılık gözlemlendi.

1. 2.2 GSTP1 geninde, normal ve tümör örneklerinde, western blotlama sonuçlarının (konsantrasyon) anlamlı farklılık olmasının analizi
2. Bu analizde, varyans analizi (Levene’s testi) yapıldı.

	Groups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MaxTandN	1.00	50	164.2200	83.51715	11.81111
	2.00	50	209.4000	75.14612	10.62727

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
MaxTandN	Equal variances assumed	3.217	.076	-2.844	98	.005	-45.18000	15.88839	-76.71000	-13.65000
	Equal variances not assumed			-2.844	96.927	.005	-45.18000	15.88839	-76.71436	-13.64564

Varyansların eşit olma varsayımıyla, ortaların analizinde 0.005’in, 0.05’den küçük olma nedeniyle, GSTP1 geninde western blotlama konsantrasyonunun verileri tümör ve normal örneklerde anlamlı şekilde farklı gözlenmiştir.

Vilkakson analizi (Wilcoxon Test)

1. E-cadherin geninde, tümör ve normal örneklerinde, western blotlama konsantrasyonunda, zayıf sonuçlarında anlamlılık analizi (H1: anlamlı farklılık vardır)

### Descriptive Statistics

Maximum	Minimum	Std. Deviation	Mean	N	
235.00	36.00	43.54833	90.9600	25	EcadherinTW
237.00	80.00	56.19479	159.3636	11	EcadherinNW

### Ranks

Sum of Ranks	Mean Rank	N	
.00	.00	0(a)	Negative Ranks
66.00	6.00	11(b)	Positive Ranks
		0(c)	Ties
		11	Total

a EcadherinNW < EcadherinTW

b EcadherinNW > EcadherinTW

c EcadherinNW = EcadherinTW

### Test Statistics(b)

EcadherinNW - EcadherinTW	
-2.934(a)	Z
.003	Asymp. Sig. (2-tailed)

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Sig'in, 0.05d'den küçük olması nedeniyle. H1 kabullenir ve anlamlı farklılık vardır.

2.E-cadherin geninde, tümör ve normal örneklerinde, western blotlama konsantrasyonunda, zayıf sonuçlarında anlamlılık analizi (H1: anlamlı farklılık vardır)

Güçlü örneklerin sayısının az olmasına görel analiz yapılamadı.

### Descriptive Statistics

Maximum	Minimum	Std. Deviation	Mean	N	
189.00	44.00	47.93601	105.3636	22	EcadherinTS
50.00	50.00	.	50.0000	1	EcadherinNS

### Ranks

Sum of Ranks	Mean Rank	N	
1.00	1.00	1(a)	Negative Ranks EcadherinNS – EcadherinTS
.00	.00	0(b) 0(c)	Positive Ranks Ties
		1	Total

a EcadherinNS < EcadherinTS

b EcadherinNS > EcadherinTS

c EcadherinNS = EcadherinTS

3.E-cadherin geninde, tümör ve normal örneklerinde, western blotlama konsantrasyonunda, negatif sonuçlarında anlamlılık analizi (H1: anlamlı farklılık vardır)

### Descriptive Statistics

Maximum	Minimum	Std. Deviation	Mean	N	
253.00	111.00	61.89440	187.2500	4	EcadherinTN
255.00	88.00	44.48512	177.3636	33	EcadherinNN

### Ranks

Sum of Ranks	Mean Rank	N	
10.00	2.50	4(a)	Negative Ranks EcadherinNN – EcadherinTN
.00	.00	0(b) 0(c)	Positive Ranks Ties
		4	Total

a EcadherinNN < EcadherinTN

b EcadherinNN > EcadherinTN

c EcadherinNN = EcadherinTN



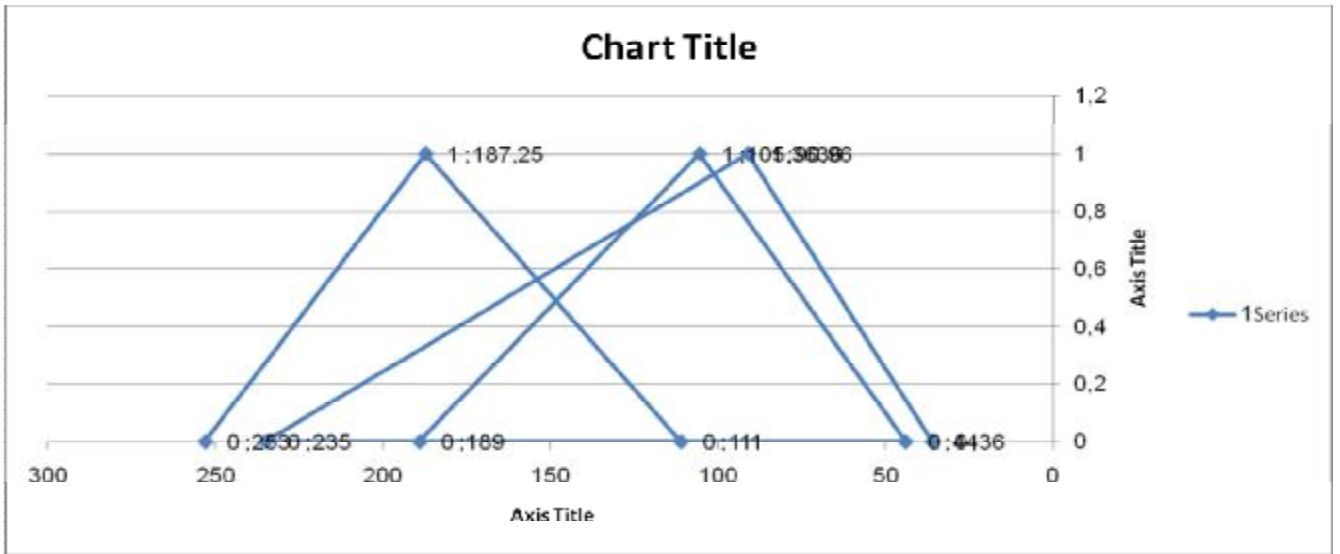
### Test Statistics(b)

EcadherinNN - EcadherinTN	
-1.826(a) .068	Z Asymp. Sig. (2-tailed)

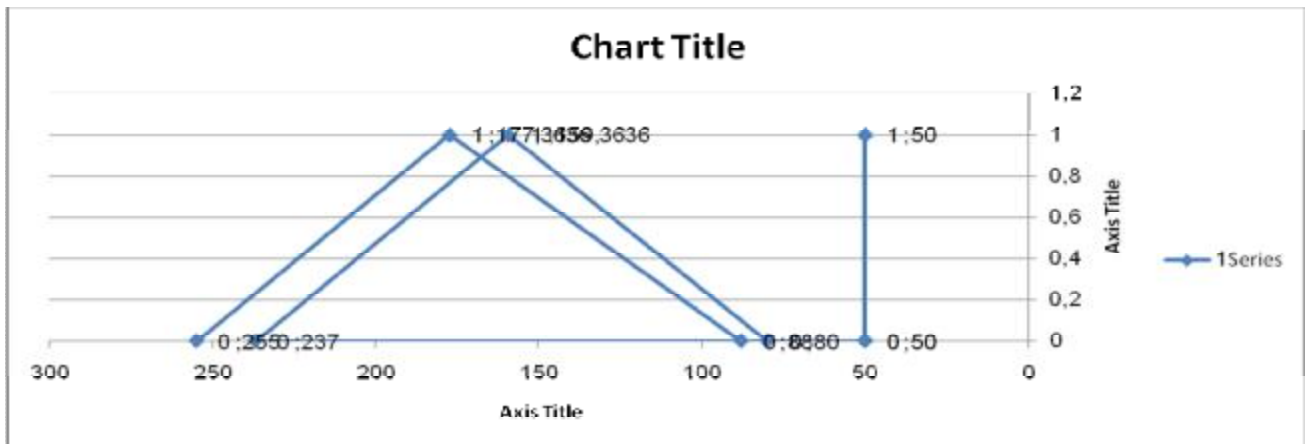
a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Sig miktarının 0.05'den yüksek olmasına göre (0.068), normal ve tümör örneklerin negative sonuçlarında anlamlı farklılık gözlenmedi.



Tümör örnekleri (E-cadherin)



Normal örnekleri (E-cadherin)

4. GSTP1 geninde, tümör ve normal örneklerinde, western blotlama konsantrasyonunda, negatif sonuçlarında anlamlılık analizi (H1: anlamlı farklılık vardır)

#### Descriptive Statistics

Maximum	Minimum	Std. Deviation	Mean	N	
253.00	65.00	55.43007	152.6471	17	Gstp1TW
273.00	45.00	77.77059	134.5833	12	Gstp1NW

#### Ranks

Sum of Ranks	Mean Rank	N	
51.50	7.36	7(a)	Negative Ranks
26.50	5.30	5(b)	Positive Ranks
		0(c)	Ties
		12	Total

a Gstp1NW < Gstp1TW

b Gstp1NW > Gstp1TW

c Gstp1NW = Gstp1TW

#### Test Statistics(b)

Gstp1NW - Gstp1TW	
-.982(a)	Z
.326	Asymp. Sig. (2-tailed)

a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Sig'in, 0.05'den fazla olmak nedeniyle (0.326) normal ve tümör örneklerin western sonuçlarının zayıf konsantrasyonlarının arasında, anlamlı farklılık bulunmadı.

5. E-cadherin geninde, tümör ve normal örneklerinde, western blotlama konsantrasyonunda, güçlü sonuçlarında anlamlılık analizi (H1: anlamlı farklılık vardır)

### Descriptive Statistics

Maximum	Minimum	Std. Deviation	Mean	N	
255.00	202.00	15.13738	247.8421	19	Gstp1TS
255.00	177.00	15.47700	248.9118	34	Gstp1NS

### Ranks

Sum of Ranks	Mean Rank	N	
47.00	6.71	7(a)	Negative Ranks
44.00	7.33	6(b)	Positive Ranks
		6(c)	Ties
		19	Total

- a Gstp1NS < Gstp1TS  
b Gstp1NS > Gstp1TS  
c Gstp1NS = Gstp1TS

### Test Statistics(b)

Gstp1NS - Gstp1TS	
-.107(a)	Z
.915	Asymp. Sig. (2-tailed)

- a Based on positive ranks.  
b Wilcoxon Signed Ranks Test

Sig'in 0.05'den büyük olmasına göre (0.915), anlamlı ilişki güçlü sonuçlarda bulunmadı.

6. E-cadherin geninde, tümör ve normal örneklerinde, western blotlama konsantrasyonunda, negatif sonuçlarında anlamlılık analizi (H1: anlamlı farklılık vardır)

### Descriptive Statistics

Maximum	Minimum	Std. Deviation	Mean	N	
115.00	17.00	33.89844	64.7857	14	Gstp1TN
61.00	36.00	13.05118	46.3333	3	Gstp1NN

### Ranks

Sum of Ranks	Mean Rank	N	
3.00	3.00	1(a)	Negative Ranks
3.00	1.50	2(b)	Positive Ranks
		0(c)	Ties
		3	Total

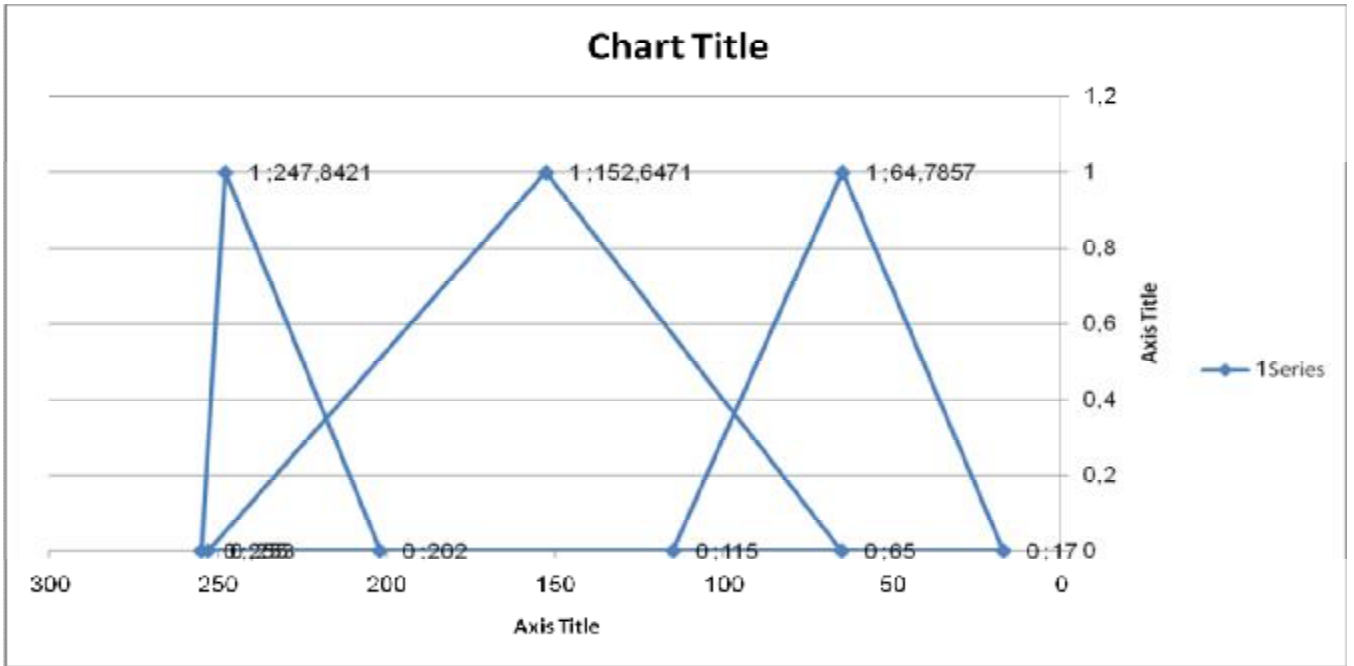
- a Gstp1NN < Gstp1TN  
b Gstp1NN > Gstp1TN  
c Gstp1NN = Gstp1TN

### Test Statistics(b)

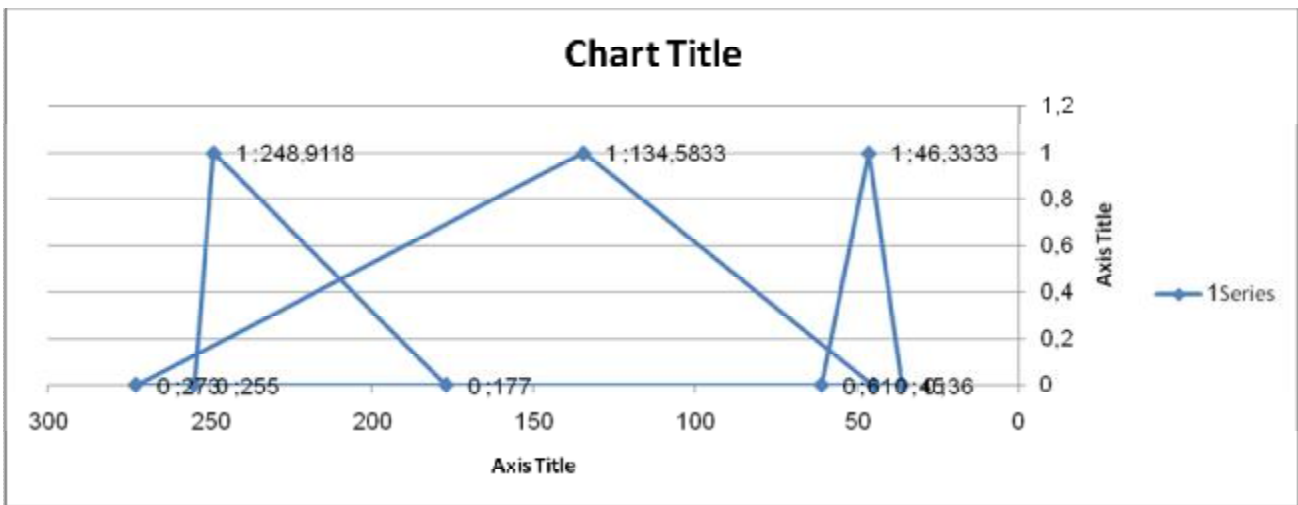
Gstp1NN - Gstp1TN	
.000(a)	Z
1.000	Asymp. Sig. (2-tailed)

- a The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.  
b Wilcoxon Signed Ranks Test

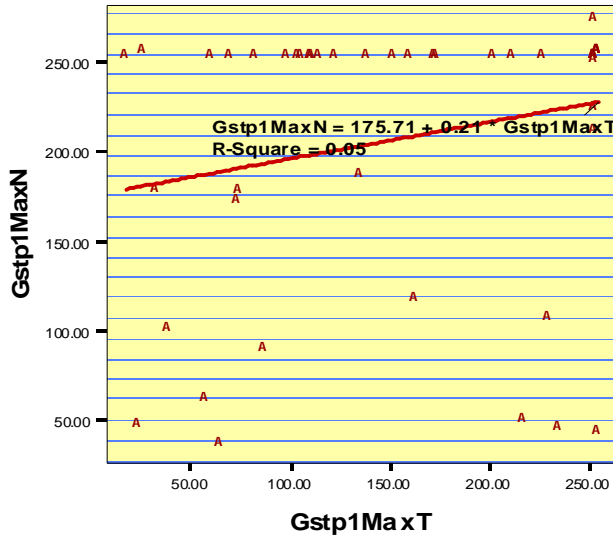
Sig'in 0.05'den yüksek olmasına göre (1.000), negatif sonuçlardada anlamlı farklılık bulunmadı.



GSTP1 tümör örnekler



GSTP1 normal örnekler



Linear Regression

```
>lcl|36449
Length=327
```

```
Score = 599 bits (324), Expect = 1e-174
Identities = 327/328 (99%), Gaps = 1/328 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 4979 TCCCTAGGCCCGCTGGGGACCTGGGAAAGAGGGAAAGGCTTCCCCGGCCAGCTGCGCGG
5038
|||||
Sbjct 1 TCCCTAGGCCCGCTGGGGACCTGGGAAAGAGGGAAAGGCTTCCCCGGCCAGCTGCGCGG 60

Query 5039 CGACTCCGGGGACTCCAGGGCGCCCTCTGCGGCCGACGCCCGGGGTGCAGCGGCCGCCG
5098
|||||
Sbjct 61 CGACTCCGGGGACTCCAGGGCGCCCTCTGCGGCCGACGCCCGGGGTGCAGCGGCCGCCG 120

Query 5099 GGGCTGGGGCCGGCGGGAGTCCGCGGGACCCTCCAGAAGAGCGGCCGGCGCCGTGACTCA
5158
|||||
```

```

Sbjct  121  GGGCTGGGGCCGGCGGGAGTCCGCGGGACCCTCCAGAAGAGCGGCCGGCGCCGTGACTCA  180

Query  5159  GCACTGGGGCGGAGCGGGGCGGGACCACCCTTATAAGGCTCGGAGGCCGCGAGGCCTTCG
5218
      |||
Sbjct  181  GCACTGGGGCGGAGCGGGGCGGGACCACCCTTATAAGGCTCGGAGGCCGCGAGGCCTTCG  240

Query  5219  CTGGAGTTTCGCCCGCCGAGTCTTCGCCACCAGTGAGTACGCGGGCCCGCGTCCCCGGG
5278
      |||
Sbjct  241  CTGGAGTTTCGCCCGCCGAGTCTTCGCCACCAGTGAGTACGCGGGCCCGC-TCCCCGGG  299

Query  5279  GATGGGGCTCAGAGCTCCCAGCATGGGG  5306
      |||
Sbjct  300  GATGGGGCTCAGAGCTCCCAGCATGGGG  327

```



T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU  
Tarih ve Sayı: 06.04.2006/88

**Etik Kurul Üyeleri**

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI  
Prof. Dr. Cem Şeref BEDİZ  
Prof. Dr. Uğur MÜNGAN  
Prof. Dr. Hüseyin İŞLEKEL  
Doç. Dr. Arzu SAYINER  
Prof. Dr. Özgül SAGOL  
Prof. Dr. Görsev YENER  
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL  
Yard. Doç. Dr. Cenk ERDAL  
Yunus KARSLI

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,**

Etik Kurulumuzun 06 Nisan 2006 tarih ve 06/06/06 no.lu toplantısında 38/2006 Protokol Numaralı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Meral SAKIZLI'nın sorumlu olduğu, "Meme tümörlerinde GSTP1, p16 BRCA1, e-Cadherin VE TIMP-3 genlerinin epigenetik değişimi ve evrelendirme ilişkisi." isimli çalışmanın uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI  
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları  
Etik Kurulu Başkanı

Etik Kurul Sekreteri  
Yonca YILDIRIM

Tel: 0232 412 22 54



Full Length Research Paper

## Evaluation of methylation modification in E-cadherin gene and its application in the improvement of breast cancer

Shohreh Alizadeh Shargh<sup>1,3\*</sup>, Seyyed Mojtaba Mohaddes<sup>2</sup>, Meral Sakizli<sup>1</sup>, Jalal Gharesouran<sup>2</sup>,  
Vahid Montazeri<sup>3</sup>, Amir Vahedi<sup>4</sup> and Fateme Karami<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Genetic and Biology, Health Institute of 9 Eylul University, Izmir, Turkey.

<sup>2</sup>Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Tabriz, I. R. Iran.

<sup>3</sup>Department of Thorax Surgery, Imam Reza Hospital, Medical University of Tabriz, I. R. Iran.

<sup>4</sup>Department of Pathology, Imam Reza Hospital, Medical University of Tabriz, I. R. Iran.

Accepted 24 May, 2011

CDH1 (E-cadherin), which mediates cell-cell interaction and polarity, is known as glycoprotein in cytoskeleton. The objective of this study was to evaluate CDH1 expression loss as the metastatic marker by defining the methylation pattern in the promoter region and determining whether or not the methylation pattern changes in correlation with a kind of tumor, grade and metastatic status. Fifty patients with breast carcinoma were enrolled in this study and fifty normal breast tissues were obtained from an adjacent tumor area as control from the same patients' breast. All of these patients had different grades, metastasis status and tumor kind. Fresh tissue sections of breast cancers were obtained and their DNA was isolated, bisulfite treated, PCR amplified and analyzed for sequencing. The loss of CDH1 was assessed as percentage of methylation (full, partial and non-methylated) in the promoter region, and the number of CpG sites involved in methylation was assessed as the methylation pattern. The percentage of CDH1 gene promoter methylation in the tumor samples was 44% for full methylation, 50% for partial methylation and 6% for non-methylated. There was significant difference between normal and tumor tissues in methylated CpG sites and also between different grades and kinds of tumor. More so, there was no significant variation in the recurrence state of tumor. Even though loss of CDH1 expression in breast cancer has been established before, its critical role in cell-cell contact can reflect the metastatic effect of the lost expression during the metastatic phase of cancer. However, methylation pattern significantly differs in high grade tumor samples ( $p < 0.00$ ).

**Key words:** E-cadherin, promoter, methylation, breast cancer, prognosis.

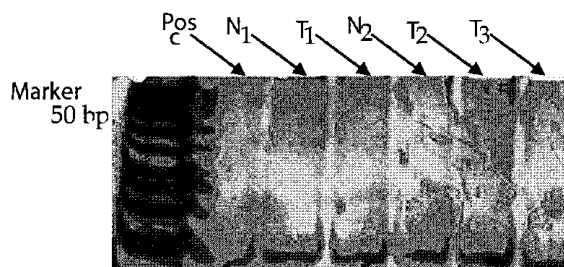
### INTRODUCTION

CDH1 (E-cadherin) acts as a transmembrane glycoprotein that is important in epithelial cell-cell interactions (Kim and Sahin, 2005), and also interacts with  $\alpha$  and  $\beta$  catenin together with actin in cytoskeleton (Lombaerts et al., 2006). CDH1 plays a critical role for establishment and maintenance of polarity and differentiation of epithelium during the development period (Wilson et al., 2004). Also, it plays an important role in signal transduction, differentiation, gene expression, cell

motility and inflammations (Slaus, 2003). However, somatic loss of CDH1 expression is associated with lobular breast cancer (Goldstein et al., 2001). Besides the mutational changes (Mastracci et al., 2005) observed in gene expression, there are evidences for epigenetic silencing of CDH1 gene including promoter region methylation in CpG sites (Trischoof and Tannapfel, 2008). Loss of CDH1 expression in cancer cells leads to a diffused growth pattern and metastasis potential in tumors; thus, CDH1 generally acts as a tumor suppressor gene (Maruyama et al., 2001).

CDH1 gene expression down-regulation is mediated by several mechanisms that can be evaluated by different

\*Corresponding author. E-mail: [sham@gmail.com](mailto:sham@gmail.com).



**Figure 1.** CDH1 gene methylation status by BSP in the human breast cancer. Normal (N) and Tumor (T) samples from same patient were analyzed with one set of BSP primers (M=50 bp marker).

approaches (Masciari et al., 2007). One way is to search for methylation pattern in the promoter region (Dhillon et al., 2004). For this purpose, we performed a methylation pattern study on 50 breast cancer samples and 50 normal adjacent normal breast tissues with a known breast cancer and evaluated them for different kinds of tumor, grade (according to TNM grading system) and metastasis status.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection and DNA extraction

Fresh surgery samples from known breast carcinoma (n=50) were obtained from the general surgery department of Imam Reza Hospital dependent of Tabriz university and private Nour-nejat hospital during one year. The tumors were classified according to the three-tier WHO histological grading system (Hepap, 2002; Sobin and Willenkind, 2002). The patients' age ranged from 23 to 74 (average 48), and none of them underwent chemotherapy. Clinical and pathological data were documented and entered into a specific tumor registry grading and other markers. This study was designed as an historical prospective study (all samples are obtained from discarding pathological samples). DNA was extracted from fresh frozen tissues after overnight digestion with proteinase K in TBE buffer and purification with sodium acetate.

### Bisulfite specific polymerase chain (PCR) and sequencing

Bisulfite specific PCR (BSP) reaction was performed with DNA and treated with sodium bisulfite as described previously (Clark et al., 1994). Briefly, 1  $\mu$ l of genomic DNA was denatured by incubation with 0.2 M NaOH for 10 min at 37°C. Aliquots of 10 mM hydroquinone (30  $\mu$ l:Sigma) and 3 M sodium bisulfate (PH 5.0, 520  $\mu$ l: Sigma) were added, and the solution was incubated at 56°C for 8 h. Treated DNA was purified by use of DNA purification kit (fermentaz.corp), desulfonated with 0.3 M NaOH, precipitated with ethanol, and resuspended in water. Modified DNA was stored at -70°C. One set of primers was used to amplify the region of interest regardless of the methylation status. Negative control samples with genomic DNA were included for each set of PCRs, while the universal methylated DNA prepared commercially was used as

positive control. PCR products were analyzed on 6% poly acrylamide gels. The primer set for bisulfite specific PCR is designed in such a way that all methylated and non methylated samples had PCR product (Figure 1).

### Data analysis

A comparison of the proportion was done using  $\chi^2$  test or Fisher's exact method. To compare the extent of methylation for the normal and tumor group with grade metastasis and kind of tumor, the data were calculated using spearman-rank regression method. The existence of the metastasis-free interval was observed before the second operation which confirmed the first evidence of metastasis or the last evidence of follow-up of patients who remained alive and were metastasis-free. Cox proportional model was applied for the multivariate analysis, where  $p < 0.05$  was defined as being statistically significant (Figure 1). CDH1 gene methylation status was shown by BSP in the human breast cancer. Normal (N) and Tumor (T) samples from the same patient were analyzed with one set of BSP primers (M=50 bp marker). When the primer set was used, both methylated and non methylated samples resulted in amplification, but were not bisulfate.

## RESULTS

### Frequency of methylation in breast cancer

Among 50 breast cancers, the methylation frequency was as follows: a total of 94% was methylated (50% partial methylation and 44% full methylation), while only 6% was non-methylated. In normal samples, there were 76% non-methylated samples and 24% methylated samples (22% was partially methylated and 2% was fully methylated). However, there was meaningful differentiation between tumor and normal samples in methylation rate ( $p=0.000$ ) (Figure 2). Also, there was significant difference in methylation pattern between tumor and normal tissues ( $p=0.006$ ). A sample of one chromatogram for comparison of tumor and normal sample methylation pattern differences is shown in (Figure 2).

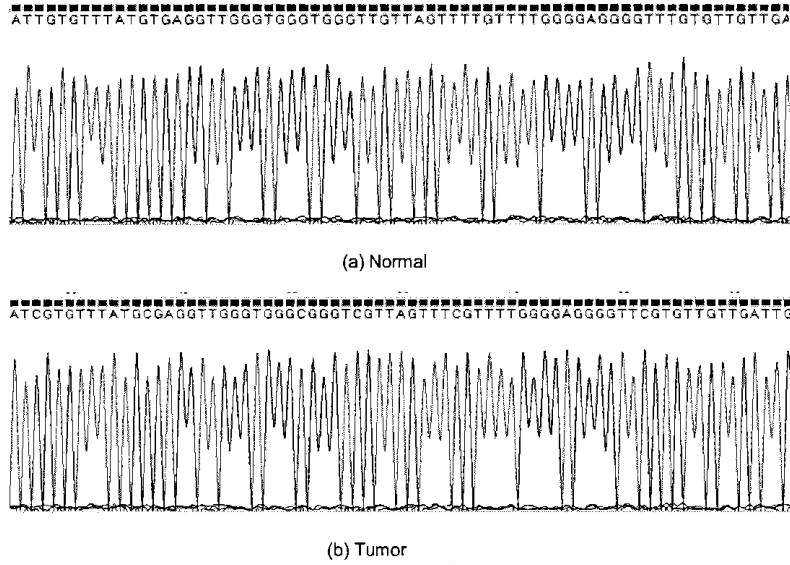


Figure 2. Examples of direct sequencing chromatograms. Bisulfate-modified DNA was amplified and then sequenced. a) Complete methylation in high grade breast cancer sample. b) No methylation in normal breast tissues.

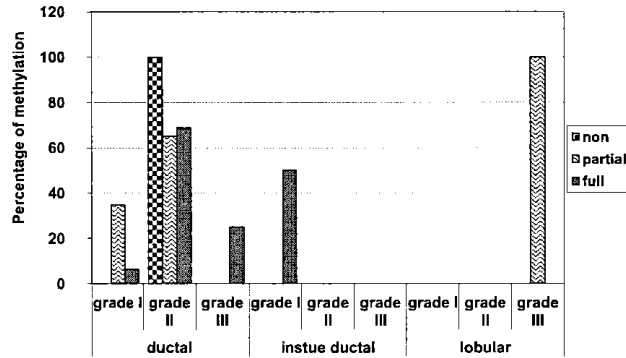


Figure 3. Correlation of methylation status in different tumor grades and kind of tumor. Tumors were divided into 3 grade groups (I, II, III) that get higher as number increases. Tumor's kind are divided to ductal, lobular and insitue-ductal.

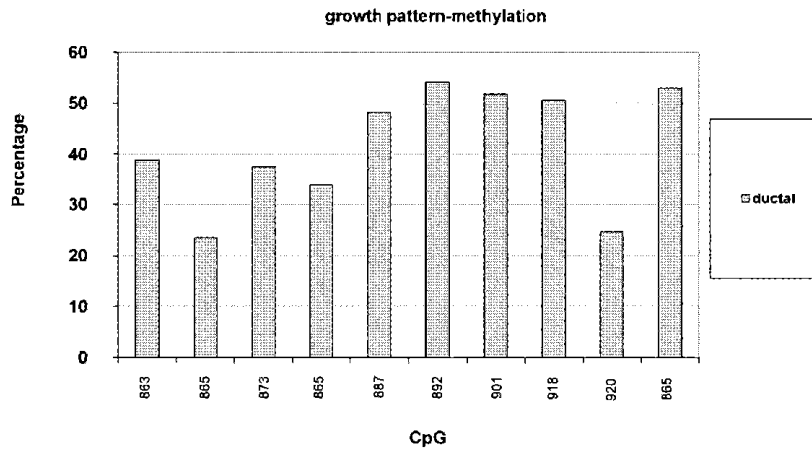
**Correlation of methylation and risk factors**

Figure 3 illustrates the correlation of methylation

frequencies with factors of increased risk including tumor grade and growth pattern (kind of tumor). It could be found that the highest methylation occurred in ductal kind

**Table 1.** Comparison of different methylation statuses according to tumor's grade in E-cadherin promoter region in breast cancer of tumor samples.

Methylation_state		Grade			Total
		I	II	III	
Non	Count	0	3	0	3
	%	0.00	10.00	0.00	6.70
Partial	Count	8	15	1	24
	%	80.00	50.00	20.00	53.30
Full	Count	2	12	4	18
	%	20.00	40.00	80.00	40.00
Total	Count	10	30	5	45
	%	100.00	100.00	100.00	100.00



**Figure 4.** Comparison of methylation pattern in different sites of CDH1 gene promoter region in different grade in ductal form.

of tumor in grade II of breast cancer samples in full methylated form (as the *in situ* and lobular forms number was insufficient for meaningful data analysis, they were excluded from the conclusion).

According to the results in grade I, the highest percent in methylation status is about partial methylation (80%); in grade II, the highest percent is about partial methylation (50%), but in grade III, the highest percentage is about the full methylation state (80%). Absolutely, in the full methylation state, there is direct and meaningful correlation between the grade of tumor and intensity of methylation ( $p=0.035$ ) (Table 1). Any meaningful

correlation were found in tumor's adjacent normal tissues with methylation status at all (Data not shown).

**Correlation between tumor kind and grade with methylation pattern**

In correlating the kind of tumor (ductal form) with methylation pattern, there was significant variation between full methylation and growth pattern ( $p=0.049$ ), with the highest correlation found at 892.nt methylation (Figure 4). As we evaluated a methylation status in two

**Table 2.** Correlation between methylation pattern in breast cancer tumor samples and tumor's grade.

	Selected methylation pattern(sites) in E-cadherin gene promoter region	Correlation coefficient	Sig. (2-tailed)
	863	0.29	0.054
	865	0.32(*)	0.031
	873	0.25	0.091
	879	0.31(*)	0.035
<b>Grade</b>	887	0.40(**)	0.007
	892	-0.06	0.686
	901	0.19	0.204
	918	0.03	0.844
	920	0.34(*)	0.022
	940	-0.07	0.637

aspects, one in percent of methylated CpG sites (non, partial and full methylation) and the other in the kind of methylated CpG sites (as pattern of methylation), in some CpG sites were marked with nucleotide number (for example 863.nt, 865.nt,...), there is meaningful correlation between the kind of CpG site and its position in the promoter region and grade of tumor, that is, some CpG sites have greater prevalence in methylation than others. The highest methylation prevalence is seen between 887.nt (as CpG site number in the promoter region) and the high grade tumor (Table 2). There is also a meaningful variation between growth pattern and the number of methylated state (ductal carcinoma type,  $p=0.046$ ) (Table 2). In evaluating the metastasis with methylation state, there was considerable variation between different statuses of metastatic and non-metastatic samples ( $p=0.028$ ), but not with the other two risk factors: chemotherapy and recurrence status ( $p=0.741$ ,  $0.812$ , respectively). Also, 940.nt had the significant variation as the most methylated site in metastatic tumors.

## DISCUSSION

In the last decade, there is a large body of evidences that imply the importance of DNA methylation in the promoter region, in different human cancers (Chiles et al., 2003). This region has significant effects on gene expression level (Chen et al., 2005) characterized by methylation profiles of individual tumor types (Esteller, 2005). There are relatively few studies about methylation pattern of CDH1 gene in breast cancer (Brex and Roy, 2001). E-cadherin's role in tumor development is now well established (Maruya et al., 2004) in different kinds of human carcinomas such as: prostate, colon, thyroid, gastric and breast, which show reduced E-cadherin

expression relative to adjacent normal tissues (Corn et al., 2001). Besides the mutational loss of function, there are evidences for epigenetic basis (like methylation pattern changes in promoter region) which can also reduce or lost CDH1 expression (Droufakou et al., 2001). Whatever is the cause, loss of CDH1 in tumor cells means the capability of tumor cells to spread far away from the original site of malignancy/metastasis. In most carcinomas, this lost is usually a late event that is associated with invasion and metastasis (Bornman et al., 2001), but this may happen in the early steps. CDH1 acts as a tumor suppressor gene, with the loss of expression of wild type CDH1 allele usually occurring through promoter hypermethylation as a second hit (Yang et al., 2001; Shaw, 2006). In this study, most of the tumor kinds are in ductal form (99%). In evaluation of methylation changes, there is a direct relation between methylation intensities (from non-methylated in any CpG sites to fully-methylated in all CpG sites), that is, as the tumor grade increases, the methylation status trend becomes fully methylated (Figure 3). In the ductal type of tumor, the highest full methylation rate is seen as follows: 25, 68.8 and 6.3% for grades III, II and I, respectively. Generally, there is a meaningful variation in the growth pattern (ductal) and grade of tumors in comparison with the methylation state ( $p=0.043$ ), but it must be noted that methylated CpG sites are completely different in the grades and kinds of tumor or metastatic status of tumors. This implies that they could not be correlated as common markers in all tumor invasiveness risk factors. Although, it is interesting to note that the highest degree of methylation is observed in high tumor grade, methylation is seen even in an *in situ* form which reflects the methylation changes in malignant tissues beginning from the initial steps that may have a contributing effect on the cancer characteristics in cells. There was also a significant variation between CpG sites methylation pattern in

kind of tumor (ductal form), but no significant variation was observed between the kind of CpG sites and the growth pattern. However, the expression of CDH1 gene can be affected by these changes in methylation pattern of the promoter region in different tumor kinds, grades and metastatic statuses; although more clear evidences are yet to be studied. In metastasis evaluation of tumor with methylation state, there is significant variation between the existence of metastasis and methylation rate directly, which may explain the E-cadherin's role in maintenance of cell-cell interaction in cytoskeleton. It seems that there is no correlation with chemotherapy history or recurrence of breast carcinoma with methylation changes. Nevertheless, a small number of samples for analysis need to be clarified in the next studies.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by Eylul University and Tabriz Medical University. The authors wish to thank Imam-Reza and Nore-Nejat hospital nursing and surgery staff.

#### REFERENCES

- Bornman DM, Mathew S, Alsrufe J, Herman G, Gabrielson (2001). Methylation of E-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am. J. Pathol.*, 159(3): 831-835.
- Brex G, Roy FV (2001). The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res.*, 3: 289-293.
- Chen X, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chedin F (2005). Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J. Cell. Biochem.*, 95: 902-917.
- Chiles MC, Ai L, Zuo C, Fan CY, Smoller BR (2003). E-cadherin promoter hypermethylation in preneoplastic and neoplastic skin lesions. *Mod. Pathol.*, 16(10): 1014-1018.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.*, 22: 2990-2997.
- Corn PG, Heath EI, Heitmiller R, Fogt F, Forastiere AA, Herman GJ, Wu TT (2001). Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 7: 2765-2769.
- Dhillon VS, Young AR, Husain SA, Aslam M (2004). Promoter hypermethylation of MGMT, CDH1, RAR- $\beta$  and SYK tumor suppressor genes in granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin. *Bri. J. Cancer*, 90: 874-881.
- Droufakou S, Deshmane V, Roylanace R, Hanby A (2001). Multiple ways of silencing E-cadherin expression in lobular carcinoma of the breast. *Int. J. Cancer*, 92: 404-408.
- Esteller M (2005). Dormant hypermethylated tumor suppressor genes: questions and answers. *J Pathol.*, 205: 172-180.
- Goldstein NS, Bassi D, Watts JC, Layfield LJ, Yaziji H, Gown AM (2001). E-cadherin reactivity of 95 noninvasive ductal and lobular lesions of the breast. Implications for the interpretation of problematic lesions. *Am. J. Clin. Pathol.*, 115: 534-542.
- Helpap B (2002). New WHO classification of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, 86: 57-66.
- Kim EK, Sahin A (2005). E-cadherin expression loss in T1 invasive ductal carcinoma of breast as a predictive marker for lymph node metastasis. *Korean J. Pathol.*, 39: 187-91.
- Lombaerts M, Wezel TV, Philippo K, Dierssen JWF, Zimmerman RME, Oosting J, Eijek RV, Eilers PH, Water BVD, Cornelisse CJ, Cleton JAM (2006). E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell line. *Bri. J. Cancer*, 94: 661-671.
- Maruya SI, Kurotaki H, Wada R, Saku T, Shinkawa H, Yagihashi S (2004). Promoter methylation and protein expression of the E-cadherin gene in the clinicopathologic assessment of adenoid cystic carcinoma. *Modern Pathol.*, 17: 637-645.
- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka OK, Harda K, Virmani AK, Z (2001). Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res.*, 61: 8659-8663.
- Masciañ S, Larsson N, Senz J, Boyd N, Kaurah P, Kandel MJ, Harris LN, Pinheiro HC, Troussard A, Miron P, Tung N, Oliveira C, Collins L, Schnitt S, Graber JE, Huntsman D (2007). Germline E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. *I. Med. Genet.*, 44: 726-731.
- Mastracci TL, Tjan S, Bane AL, OMalley PF, Andrulis IL (2005). E-cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma insitu of the breast. *Modern Pathol.*, 18: 741-751.
- Shaw RJ (2006). The epigenetics of oral cancer. *Int. J. Oral Maxillofac Surg.*, 35: 101-108.
- Slaus NP (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int.*, 3: 1-7.
- Sobin LH, Wittenkind C (2002). TNM classification of malignant tumors. 6th ed. Wiley, John & sons, New York.
- Tischoff I, Tannapfel A (2008). DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*, 14(11): 1741-1748.
- Wilson BAR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YSN, Jeyes J, Schinas J, Bacani J, Kelsey M, Ferreira P, Mac Gillivray B, MacLeod P, Micek M, Ford J, Foulkes W, Australie K, Greenberg C, LaPointe M, Gilpin C, Nikkel S, Gilchrist D, Hughes R, Jackson CE, Monaghan KG, Oliveira MJ, Seruca R, Gallinger S, Caldas C, Huntsman D (2004). Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J. Med. Genet.*, 41: 508-517.
- Yang X, Yan L, Davidson NE (2001). DNA methylation in breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, 8: 115-127.

*Full Length Research Paper*

## Evaluation of methylation pattern in promoter region of E-cadherin gene and its relation to tumor grade and stage in breast cancer

Shohreh A. Shargh<sup>1,2</sup>, Meral Sakizli<sup>2</sup>, Safar Farajnia<sup>3,4\*</sup> and Soheila Montazer-Saheb<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Science, Health Institute, Chalous Azad University, Chalous, Iran.

<sup>2</sup>Department of Medical Genetics and Biology, Health Institute, 9 Eylul University of Izmir, Izmir, Turkey.

<sup>3</sup>Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

<sup>4</sup>Infectious and Tropical Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Accepted 24 January, 2011

The epithelial cadherin gene (CDH1) has been identified as a tumor suppressor gene located within the 16q22.1 region. The CDH1 gene encodes a transmembrane glycoprotein involved in cell to cell adhesion and loss of CDH1 expression contributes to increased proliferation, invasion and metastasis in breast carcinoma. No mutation in CDH1 have been identified in invasive ductal carcinoma (IDC), suggesting that, other inactivation mechanisms are responsible for IDC oncogenesis. In order to analyze the role of promoter methylation in CDH1 gene inactivation in breast cancer, the CpG methylation status of E-cadherin promoter region by bisulfite sequencing PCR (BSP) was investigated. 10 CpG sites [nucleotide (nt) 863, 865, 873, 879, 887, 892, 901, 918, 920 and 940] in the promoter region were screened for methylation. The CDH1 methylation was detected in 94% (47 to 50) of breast tumors which was associated with higher tumor grade ( $p = 0.035$ ), tumor stage ( $p = 0.000$ ) and tumor metastasis ( $p = 0.000$ ). There was also a significant correlation between tumor stage, grade and metastatic status with sites of methylation ( $p = 0.000$ ). The data indicate that CDH1 promoter methylation might be a potential mechanism for epigenetic silencing of CDH1 in primary breast cancer suggesting a valuable molecular marker for detection of breast cancer progression.

**Key words:** Breast cancer, E-cadherin, methylation pattern, tumor stage, tumor grade.

### INTRODUCTION

Breast carcinoma is the most common malignancy among women worldwide. The disease arising from the ductal and lobular epithelium of the mammary glands (Oyama et al., 2009) and metastasis represents an important step in the progression of the fatal disease (Sahin et al., 2009). Complex genetic and epigenetic alterations affect the severity of each step in tumor progression. Genetic changes that occur in metastatic cells have been studied at the level of several genes, tissue specific profiles and

whole genome approaches (Hunter and Alsarraj, 2009). Different mechanisms in both genetic and epigenetic changes are involved, including mutation, loss of heterozygosity (Ehdaie and Theodorescu, 2008), transacting pathways (Vesuna et al., 2008), chromatin rearrangement (Rodenhiser and Mann, 2006) and hypermethylation in promoter CpG sites (Choi et al., 2009). Unlike genetic changes, epigenetic alterations in metastasis are less characterized in primary cancers. DNA methylation is the covalent addition of a methyl group to a cytosine base, generally in the context of a CpG dinucleotide. The mammalian genome is predominantly methylated with the exception of CpG-rich regions, which are generally found in gene promoters and

\*Corresponding author. E-mail: farajnia@gmail.com. Tel: 00989143018589. Fax: 00984113363231.

are known as "CpG islands" (Esteller, 2005). These changes alter gene expression levels primarily through regulation of methylation state-dependent interactions with transcriptional activators or repressors (Conerly and Grady, 2010). The aberrant methylation of gene promoters observed in many cancers is believed to play a key role in the development of different cancers. It is also well understood that hyper-methylation of some regulatory sequences is more frequent than mutational change (Chan et al., 2008). This methylation can silence genes such as CDH1, which can promote enhanced invasiveness (Nakata et al., 2006). CDH1 is a gene localized in the chromosome 16q22.1, that is expressed from epithelial cells and involved in cell to cell interactions. This molecule contains two extra and intra membrane domains. The extra membrane domain interacts with other cells whereas, intra membrane domain participates in structural proteins like  $\alpha$ -catenin and  $\beta$ -catenin (Bex and Roy, 2009). CDH1 displays a tumor/invasion suppressor functions and its expression level influences the cell shape, adhesion and biological interactions (Masciari et al., 2007). CDH1 dysfunction due to mutations has been reported in gastric and lobular breast carcinomas (Lascombe et al., 2006). Also, its down regulation due to allelic deletion has been seen in various types of tumors like hepato-cellular carcinomas (Xia et al., 2008) lobular and ductal breast carcinomas (Masciari et al., 2007). For most of the primary breast cancers and cell lines of the ductal histotype, no CDH1 mutations could be identified despite the fact that these tumors often show strikingly reduced CDH1 gene and protein expression (Bex and Roy, 2001). Possible mechanisms to explain this reduced expression include chromatin rearrangement, hypermethylation and alterations in trans-factor binding (Li et al., 2006). Hypermethylation of the CDH1 promoter and overlapping 5' CpG Island has been demonstrated to be correlated with the loss of CDH1 expression at the transcriptional level for various breast cancer cell lines and primary ductal breast cancers (Chao et al., 2010). However, the relation of CDH1 hypermethylation and grade and stage of tumors has not been well understood. In this study, the methylation pattern of CDH1 promoter in breast cancer was investigated. The methylation status was classified in a qualitative manner as full, hemi and non-methylated in tumor and normal tissues. Quantitative analysis of methylation pattern of CpG sites and their relation with tumor's grade and stage were also investigated.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and tissue specimens

Samples of breast cancer were obtained from 50 women (mean age of  $48.2 \pm 10.55$  years) who had undergone surgery at the Imam

Reza hospital in Tabriz university of Medical Sciences. The samples obtained during surgery were according to the institutional guidelines. Normal breast tissues ( $n = 50$ ) were also taken from the same patients and breasts that underwent partial or total mastectomy, 3 cm away from the site at which the tumor was sampled.

Staging was performed according to AJCC-02 TNM staging system and grading was carried out according to WHO international protocol by surgeon as GI, GII and GIII.

### DNA isolation

DNA was extracted from 25 mg frozen breast tissues at  $-80^{\circ}\text{C}$  of 50 tumoral and 50 normal samples using a SDS-proteinase K and phenol-chloroform method as previously described (Pourabbas et al., 2009). 10 CpG sites from the promoter region located at -836 to -962 upstream to transcription start site were analyzed for methylation pattern as described earlier (Ribeiro-Filho et al., 2002).

### Bisulfite conversion and BSP analysis

To amplify the interested region of the promoter, DNA was treated with sodium bisulfite as described earlier (Frommer et al., 1992) with some modifications. Briefly, 1  $\mu\text{g}$  of DNA was denatured using NaOH and treated with sodium bisulfite for 8 h in  $55^{\circ}\text{C}$ . Bisulfite treated DNA was amplified with specific primer pairs (forward: 5'-TTTAGTAATTTAGGTTAGA GGGTT-3', nt -836 to -861) and (reverse: 5'-CTAATTAACATAAAATTCACCTACC-3', nt -940 to -965). 2  $\mu\text{l}$  of treated DNA were entered into a 25  $\mu\text{l}$  polymerase chain reaction (PCR) mixture containing 0.4  $\mu\text{M}$  forward and reverse primers each; 1  $\times$  Taq buffer, 0.2 mM four deoxynucleotide triphosphate and 1.2 U Taq polymerase (Fermentas, Letonia). PCR was carried out with the program as followed: a 5 min cycle in  $95^{\circ}\text{C}$  followed by 30 cycles of 30 s in  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s in  $54^{\circ}\text{C}$ , 30 s in  $72^{\circ}\text{C}$  and a final extension cycle of 5 min in  $72^{\circ}\text{C}$ . The untreated breast tissue genomic DNA was used as negative control and universal methylated DNA (in vitro) sample as ready to use commercial control that underwent bisulfite treatment, was used as positive control. PCR products then, were purified using PCR product purification kit and checked by electrophoreses on 5% polyacrylamide gel. The resulting products were sequenced on an ABI automated sequencer with big dye terminator (Perkin-Elmer, CA).

### Classification and quantification of methylation levels

Determination of methylated CpG sites was performed by comparing the C versus T nucleotide peaks in bisulfite treated tumor samples in each 10 specified CpG sites that remained as C and was converted to T in bisulfite treated normal samples. Methylation was considered 100% if all 10 CpG sites were methylated. Methylation levels less than 10 CpG sites were classified as partial methylation and absence of methylation was considered unmethylated.

### Statistical analysis

The percentage of methylation was calculated by chi-square test and significance difference between cancer and normal samples, also, cancer grade and stage with methylated CpG sites was analysed by using spearman regression test.



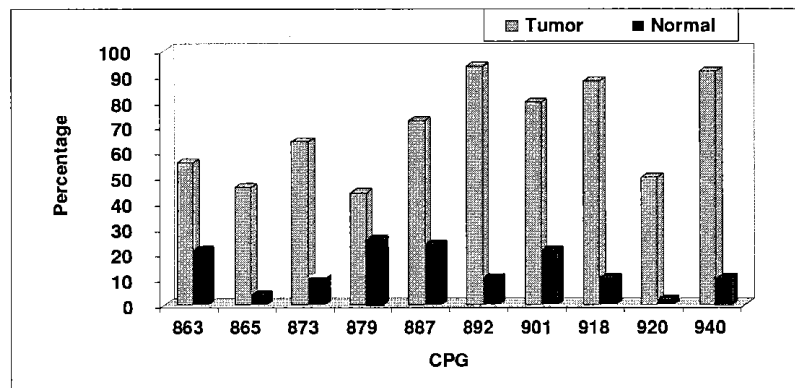


Figure 1. Comparison of methylation pattern of CDH1 promoter region in breast cancer and its adjacent normal tissues.

## RESULTS

### Methylation status in tumor and normal samples

Among breast cancer samples, 44% (22 of 50) were completely methylated, 50% (25 of 50) were partially methylated and 6% (3 of 50) were unmethylated. The overall hypermethylation rate in breast cancer tissues was 94% (47 of 50). On the other hand, the majority of the normal samples that is 76% (38 of 50) were unmethylated. There were significant differences between tumor and normal samples in the methylated CpG sites (methylation pattern) ( $p = 0.000$ ) (Figure 1).

### Methylation of the CDH1 promoter and its relation to grade of tumor

Of 45 tumor samples 10 were classified as grade 1 (well differentiated), 30 grade 2 (moderately differentiated) and 5 grade 3 (poorly differentiated). 5 samples had unknown grade and were excluded from the calculations. Analysis for methylation showed that among 10 grade 1 tumors, 2 (20.0%) were fully methylated and 8 (80.0%) were partially methylated. Among 30 grade 2 tumors, 12 (40.0%) were fully methylated, 15 (50%) partially methylated and 3 (10.0%) were non-methylated. Finally, of 5 grade 3 tumors, 4 (80.0%) were full methylated and 1 (20.0%) partially methylated. Statistical analysis showed a significant direct relationship between full-methylation and grade of tumor samples ( $p < 0.022$  for partial and  $p <$

0.035 for full methylation) (Figure 2).

### Methylation pattern of the CDH1 promoter CpG sites and its relation to grade of tumor

The spearman regression test analysis showed the highest significant relationship between grade of tumor and methylation at 887 nt ( $p = 0.007$ ). There were also an association (statistically non-significant) between methylation at 920, 879 and 865 nts with grade of tumors ( $p = 0.022$ , 0.035 and 0.031, respectively) (PV was set in 0.05 level, 2 tailed) (Table 1 and Figure 3).

### Methylation of the CDH1 gene and its relation to tumors' stage

Among the 7 different stages that have been reported in different studies, in this study, only 3 stages were found in tumor samples including stages 1, 2 and 3a. There were 3 samples in stage 1, 29 in stage 2 and 13 in stage 3a. Of the 3 stage 1 tumor sample, all (100%) were partially methylated, of 33 stage 2 tumors, 8 (24.2%) were full methylated, 22 (66.7%) partial and 3 (9.1%) were not methylated. Finally, of the 14 stage 3a tumors, 14 (100%) were full methylated. There was a significant correlation between tumors' stage and methylation status ( $p = 0.000$ , in full and partial methylation), which indicated the presence of a meaningful direct relation between stage of tumor and full methylation (Figure 4).

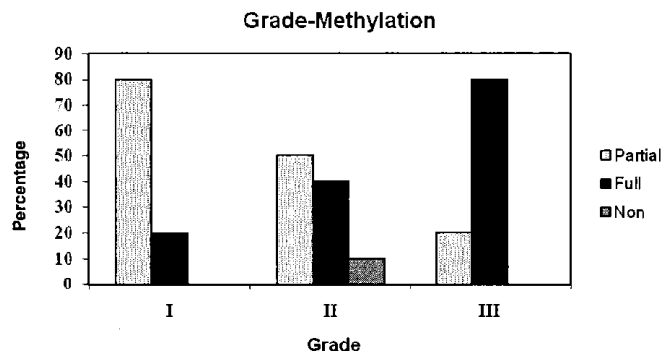


Figure 2. Comparison of tumor grade and methylation status in tumor and normal samples.

Table 1. Methylation pattern and tumor grade in breast tumor samples.

Grade	CpG site	Correlation coefficient	Significance (2-tailed)
Grade	863	0.29	0.054
	865	0.32*	0.031
	873	0.25	0.091
	879	0.31*	0.035
	887	0.40**	0.007
	892	-0.06	0.686
	901	0.19	0.204
	918	0.03	0.844
	920	0.34*	0.022
	940	-0.07	0.637

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed), \*correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

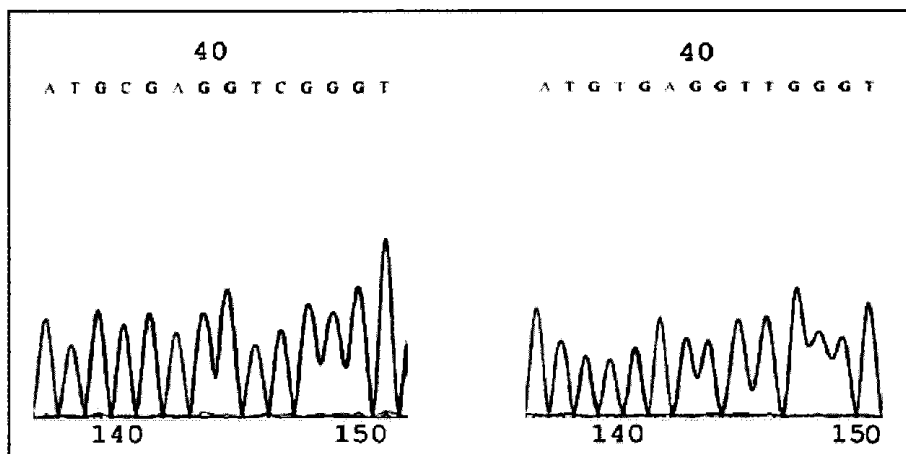
#### Methylation pattern of the CDH1 promoter and its relation to stage of tumor

There were a significant direct relationship between stage of tumor and methylation at nucleotides 863, 865, 873, 879, 887 and 920 ( $p = 0.000, 0.000, 0.001, 0.000, 0.002$  and  $0.000$ , respectively) and in some degree with nucleotide 901 ( $p = 0.032$ ) (PV was set at 0.005 level, 2 tailed) (Table 2).

In the evaluation of methylation patterns in ductal tumor and different tumor stage, the higher methylation rate was observed in stage 3a and among the different tumor grades, the highest rate of CpG methylation was observed in grade 2 of ductal type breast cancer samples (Data not shown).

#### DISCUSSION

CDH1 hypermethylation is a candidate mechanism responsible for silencing CDH1 association with several types of malignancies (Lo and Sukumar, 2008) but underlying mechanism for silencing of CDH1 is not clearly understood. In this study, CDH1 promoter methylation status was analyzed in breast cancer tissues of 50 individuals. From each patient, a breast cancer sample and normal breast tissue (from neighboring site of tumor) were evaluated. With this design, pair of cancer and normal samples was available for each case. The comparison of normal and malignant tissues showed a statistically significant ( $p = 0.006$ ) difference in the methylation pattern. This finding is consistent with several



**Figure 3.** Examples of direct sequencing chromatograms. Bisulfite treated DNA was amplified and sequenced on ABI automated sequencer. The sequences represents CpG sites one of which marked by arrows. 3a) complete non-conversion of cytosine to thymine (complete methylated). 3b) complete conversion of cytosine to thymine (non-methylated).

studies indicating the role of CDH1 methylation in various tumors. Kordi-Tamandari et al. (2010) found that, 61.8% of oral cavity tumors had methylated CDH1 gene. Hiraki et al. (2010) found that CDH1 gene methylation in the peritoneal fluid is a potential marker predicting peritoneal invasion of gastric cancer which varies significantly depending on the extent of the cancer invasion. Methylation of CDH1 in primary human colon cancer and its association with cancer progression and metastasis has also been reported (Kim et al., 2006). Feng et al. (2010) found CDH1 methylation in 23.7% of lymph nodes in metastatic breast cancer when compared with 18.4% in primary cancers and reported that, CDH1 methylation is correlated with lymph node metastasis rate. It has also been demonstrated that, down regulation of CDH1 expression is often accompanied with methylation of the 5'CpG island of CDH1 in prostate, lung, liver, bladder, gastric, thyroid and breast carcinoma cell lines (Borrmann et al., 2001; Ehdai and Theodorescu, 2008; Brooks-Wilson et al., 2004).

Because of the small number of *in situ* and lobular form of tumors in this study, evaluation of a possible increasing trend of CDH1 methylation in malignant progression was not possible. The CDH1 methylation status did not seem to correlate with tumor number or with chemotherapy. There was no significant correlation between tumor grade and stage in this study, indicating lack of common methylated site related to both aspects of the tumor.

BSP product sequencing of tumor samples showed considerably higher CDH1 methylation levels when compared with normal samples at all CpG sites of the promoter region (nt 863, 865, 879, 892, 901, 918, 920 and 940). However, nucleotide 892 (94%) and 940 (92%) demonstrated higher methylation prevalence. This might be related to the higher predisposition of some CpG sites to methylation which has a key role in cancer progression. It has been shown that, CpG sites contain SP1 elements that are located upstream of the transcription initiation site (Varshochi et al., 2005) and their cis-acting property prevent CpG islands methylation (Goldstein, 2002). Disruption of these elements may be responsible for the CpG methylation and gene silencing.

Notable finding of this study was that, the sites of methylated CpGs corresponding to the stage and grade of tumor were different. Even low grade and early stage tumors showed some degree of CDH1 methylation (Figure 2 and 4), confirming previous reports and show that, epigenetic alteration is an early event in malignancy that may take place before tumor invasion (Duffy et al., 2009).

In summary, this study showed the CDH1 gene hypermethylation in breast cancer. There was a specific CpG methylation pattern that might be critical in the silencing of the CDH1 gene in breast cancer. These results are important in evaluating the mechanisms involved in CDH1 silencing through hypermethylation of specific CpG

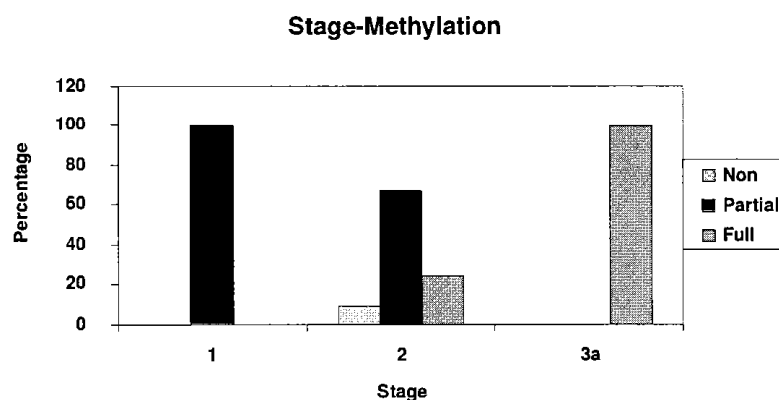


Figure 4. Comparison of tumor stage and methylation status in tumor and normal samples.

Table 2. Relation between promoter methylation pattern in different tumor stage in breast cancer samples in CDH1 gene promoter region.

Stage	CpG site	Correlation coefficient	Significance (2-tailed)
Stage	CPG-863	0.588**	0.0
	CPG-865	0.617**	0.0
	CPG-873	0.469**	0.001
	CPG-879	0.699**	0.0
	CPG-887	0.420**	0.002
	CPG-892	0.116	0.423
	CPG-901	0.304*	0.032
	CPG-918	0.169	0.24
	CPG-920	0.579**	0.0
	CPG-940	0.135	0.349

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed);  
\*correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

sites, which may provide a marker for diagnosis and prognosis of breast cancer. The gene expression study in the protein level by western blotting method is recommended for confirmation of these results.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Health institute of 9 Eylul University, Izmir, Turkey and in part by biotechnology research center of Tabriz university of Medical Sciences, Iran.

#### REFERENCES

- Berx G, Roy VF (2001). The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res.* 3(5): 289-293.
- Berx G, Roy VF (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 1(6): a003129.
- Bornman DM, Mathew S, Alsrube J, Herman JG, Gabrielson E (2001). Methylation of the *E-cadherin* gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly Individuals. *Am. J. Pathol.* 159(3): 831-835.
- Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YS, Jeyes J, Schinas J, Bacani J, Kelsey M, Ferreira P, MacGillivray B, MacLeod P, Micek M, Ford J, Foulkes W, Australie K, Greenberg C, LaPointe M, Gilpin C, Nikkel S, Gilchrist D, Hughes R, Jackson CE, Monaghan KG, Oliveira MJ, Seruca R, Gallinger S, Caldas C, Huntsman D (2004). Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J. Med. Genet.* 41(7): 508-517.
- Chan TA, Glockner S, Yi JM, Chen W, Van Neste L, Cope L, Herman GJ, Velculescu V, Schuebel KE, Ahuja N, Baylin SB (2008). Convergence of mutation and epigenetic alterations identifies common genes in cancer that predict for poor prognosis. *PLoS. Med.* 5(5): e114.
- Chao YL, Shepard CR, Wells A (2010). Breast carcinoma cell re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol. Cancer.* 9: 179-196.
- Choi JY, James SR, Link PA, McCann SE, Hong CC, Davis W, Nesline MK, Ambrosone CB, Karpf AR (2009). Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of Breast Cancer. *Carcinogenesis.* 30(11): 1889-1897.
- Conerly M, Grady WM (2010). Insights into the role of DNA methylation in disease through the use of mouse models. *Dis. Model. Mech.* 3(5-6): 290-297.
- Duffy MJ, Napieralski R, Martens JW, Span PN, Spyralos F, Sweep FC, Brunner N, Foekens JA, Schmitt M (2009). Methylated genes as new cancer biomarkers. *Eur. J. Cancer.* 45(3): 335-346.
- Endaie B, Theodorescu D (2008). Molecular markers in transitional cell carcinoma of the Bladder: new insights into mechanisms and

- prognosis. *Indian J. Urol.* 24(1): 61-67.
- Esteller M (2005). Dormant hypermethylated tumor suppressor genes: questions and answers. *J. Pathol.* 205(2): 172-180.
- Feng W, Orlandi R, Zhao N, Carcangiu ML, Tagliabue E, Xu J, Bast RC Jr, Yu Y (2010). Tumor suppressor genes are frequently methylated in lymph node metastases of breast cancer. *BMC Cancer*, 10: 378-388.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *PNAS*, 89(5): 1827-1831.
- Goldstein NS (2002). Does the level of E-cadherin expression correlate with the primary breast carcinoma infiltration pattern and type of systemic metastases? *Am. J. Clin. Pathol.* 118(3): 425-434.
- Hiraki M, Kitajima Y, Sato S, Nakamura J, Hashiguchi K, Noshiro H, Miyazaki K (2010). Aberrant gene methylation in the peritoneal fluid is a risk factor predicting peritoneal recurrence in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 16(3): 330-338.
- Hunter KW, Alsarraj J (2009). Gene expression profiles and breast cancer metastasis: a genetic perspective. *Clin. Exp. Metastasis*, 26(6): 497-503.
- Kim YH, Petko Z, Dzieciatkowski S, Lin L, Ghiassi M, Stain S, Chapman WC, Washington MK, Willis J, Markowitz SD, Grady WM (2006). CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer. *Genes. Chromosomes Cancer*, 45(8): 781-789.
- Kordi-Tamandari DM, Moazeni-Roodi AK, Rigi-Ladiz MA, Hashemi M, Birjandian E, Torkmanzahi A (2010). Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. *Arch. Oral. Biol.* 55(10): 809-814.
- Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Kantelip B, Bittard H (2006). N-Cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin. Cancer Res.* 12(9): 2780-2787.
- Li SY, Rong M, Iacopetta B (2006). DNA hypermethylation in breast cancer and its with clinicopathological features. *Cancer Lett.* 237(2): 272-280.
- Lo PK, Sukumar S (2008). Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics*, 9(12): 1872-1902.
- Masciari S, Larsson N, Senz J, Boyd N, Kaurah P, Kandel MJ, Harris LN, Pinheiro HC, Troussard A, Miron P, Tung N, Oliveira C, Collins L, Schnitt S, Garber JE, Huntsman D (2007). Germ line E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. *J. Med. Genet.* 44(11): 726-731.
- Nakata S, Sugio K, Uramoto H, Oyama T, Hanagiri T, Morita M, Yasumoto K (2006). The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. *Cancer*, 106(10): 2190-2199.
- Oyama T, Yasui Y, Tanaka T (2009). Breast cancer chemoprevention: Current Perspectives. *Curr. Enzyme Inhib.* 5: 198-208.
- Pourabbas R, Farajnia S, Kimyai S, Mohammadnejad L, Johnson A, Nejatian T (2009). In vitro assessment of cytotoxicity of giomer on human gingival fibroblasts. *Afr. J. Biotechnol.* 8(20): 5522-5526.
- Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, Shiina H, Li LC, Nojima D, Arap S, Carroll P, Enokida H, Nakagawa M, Yonezawa S, Dahiya R (2002). CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. *Mol. Carcinog.* 34(4): 187-198.
- Rodenhiser D, Mann M (2006). Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*, 174(3): 341-348.
- Sahin AA, Guray M, Hunt KK (2009). Identification and biologic significance of micrometastases in axillary lymph nodes in patients with invasive breast cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 133(6): 869-878.
- Varshochi R, Halim F, Sunter A, Alao JP, Madureira PA, Harts SM, Ali S, Vigushin DM, Coombes RC, Lam EW (2005). IC182, 780 induces p21Waf1 gene transcription through releasing histone deacetylase 1 and estrogen receptor alpha from Sp1 sites to induce cell cycle arrest in MCF-7 breast cancer cell line. *J. Biol. Chem.* 280(5): 3185-3196.
- Vesuna F, van Diest P, Chen JH, Raman V (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367(2): 235-241.
- Xia HH, Tischoff I, Tannapfel A (2008). DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 14(11): 1741-1748.

*Full Length Research Paper*

## **Evaluation of methylation status in glutation S-transferase P1(GSTP1) gene promoter in human breast cancer and its relation to tumor grade and stage**

**Shohreh Alizadeh Shargh<sup>1,3\*</sup>, Zahra Mostakhdemin Hosseini<sup>2</sup> and Meral Sakizli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medical Sciences, Health institute, Chalous Islamic Azad University, Chalous, Iran.

<sup>2</sup>Iran National Tumor Bank, Pathology Department, Cancer Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Department of Medical Genetics and Biology, Health Institute of 9 Eylul University, Izmir, Turkey.

Accepted 31 August, 2011

**Glutation S-transferase P1 (GSTP1) gene methylation in promoter CpG islands has been described as a specific biomarker for many types of cancer including breast cancer as a tumor suppressor gene. At the present study we found that the GSTP1 gene promoter to be methylated in breast cancer tissues. For studying the difference of sequence in hypermethylated GSTP1 promoter in cancer tissues and non methylated status in normal tissues, we analyzed the cytosine methylation status as epigenetic changes in 50 tumors from patients with breast cancer and 50 normal breast tissues that were obtained from the adjacent regions of the breast tumors of the same patients. In order to study the promoter methylation status for GSTP1 gene in breast cancer, 40 CpG sites [nucleotide(nt) 197, 190, 187, 185, 183, 182, 176, 162, 155, 152, 148, 145, 141, 132, 127, 124, 112, 109, 101, 99, 81, 77, 74, 71, 54, 53, 48, 47, 43, 42, 40, 38, 23, 22, 15, 14, 13, 11, 8, 4] were screened. The GSTP1 methylation was detected in 41.3% of the breast tumors which was associated with higher tumor grade (p=0.467) and tumor stage (p = 0.048).**

**Key words:** GSTP1, promoter, methylation, pattern, breast cancer.

### **INTRODUCTION**

Breast cancer is the second leading cause of death among women after lung cancer. Detection of premenopausal breast cancer without X-ray exposure is of particular importance in early detection. Thus alternative approaches to breast cancer detection are clearly needed. Detection of changes in DNA methylation which is the most common molecular alteration in human neoplasia (Wu et al., 2010), including breast cancer (Bedgia et al., 2006), may offer an alternative method to screening (Hoque et al., 2006). Cytosine methylation has critical role in control of gene activity that mostly occurs in cytosines that precede guanines, called 'CpG islands' (Esteller, 2008). These regions span the 5' end of the

regulatory region of many genes, which usually not methylated in normal cells (Weber et al., 2007). Hypermethylation of CpG islands in gene promoter blocks the ability of transcription factors to interact with the promoter and inhibits gene expression (Li et al., 2008). DNA methylation is one of the known mechanisms for control of certain tissue-specific genes that have important role as tumor suppressor genes such as GSTP1, E-cadherin, BRCA1 in many types of cancer including breast cancer.

It is reported that CpG islands are hypermethylated in >80% of hepatocellular carcinomas, ~ 30% of breast cancers and >90% of prostate cancers (Maxwell et al., 2009).

GSTP1 is the only gene of the human glutathione S-transferase (GST) P subfamily (Suzuki et al., 2005). GSTs provide protection to mammalian cells against electrophilic metabolites of carcinogens and reactive

\*Corresponding author. E-mail: [shohrehshargh@gmail.com](mailto:shohrehshargh@gmail.com).  
Tel: +0098-191-2248787

oxygen species (Chow et al., 2007). GSTp1 plays a role in regulating the Map kinase pathway via protein-protein interactions as it is an inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase 1, a kinase involved in stress response, apoptosis and cellular proliferation (Holly et al., 2007).

Recently, GSTP1 CpG island hypermethylation was found to be significantly associated with tumor size, lymph node metastasis and relapse free-survival in breast cancers (Gao et al., 2009). The involvement of GSTP1 in drug metabolism, potential effect on cancer therapy and other tumor features, indicates the importance of evaluation of mechanisms for its regulation in normal and cancer tissues (Ronneberg et al., 2008).

In this research, we studied tumors from breast cancer patients and also normal breast tissues from the adjacent regions of the breast tumors of the same patients as control tissues. The promoter region of the gene, is selected at 40 CpG sites with specific structures like as: ccg, ctg and cgcg (the order of sequence for cytosine and guanine nucleotides which are in DNA) in the promoter analyzed by semi-quantitative measures, and the relationship between methylation degree with tumor's grade and stage was evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and tissue specimens

Samples of breast cancers were obtained from 50 women (mean age of 48.2±10.55 year) who had undergone surgery at the Tabriz University Hospital (Imam Reza) of Medical Sciences (Retrospective observational study with Cluster random sampling in time intervals for 1 year). The samples were obtained according to institutional guidelines, during the surgery as a fresh and immediately taken to -80° deep freeze. Normal breast tissues were also obtained from the surgery region of the same patients, about 3 cm away from the tumor site (n = 50). As all specimens were the part of routine pathology and surgery mastectomy procedures, therefore, all the samples were coded by number and patients' information were kept in secure.

Determining of stage was performed according to AJCC-02 TNM stage system and determining of grade was performed according to WHO international protocol by surgeon as GI, GII and GIII.

Gene sequence alterations typically were identified by direct sequencing of PCR-amplified bisulfite treated genomic templates, BSP (Bisulfite treated specific PCR), that included the promoter region.

### DNA isolation

Genomic DNA was isolated from tumor and normal tissues using SDS-protease K and phenol-choloroform method as previously described (Pourabbas et al., 2009). Samples were first digested with protease K; DNA was extracted from 200 µl protease K digested samples, following the manufacturer's protocol (Fermentase DNA isolation kit, Letonia). DNA concentration was measured using a spectrophotometer.

### Bisulfite conversion

Extracted DNA was treated with sodium bisulfite as described

before with some modifications. Briefly 5 µg of DNA was denatured using NaOH and treated with sodium bisulfite for 8 h in 55°C. Bisulfite treated DNA was amplified with BSP specific primer set (forward: 5'-TTT GGGAAAGAGGGAAAGGTTT -3', nt -4954 to -4979) and (reverse: 5'-CCCCATACTAAAACCTAAACCCC-3', nt -5281 to -5306). 2 µg of treated DNA were entered into a 25 µl polymerase chain reaction (PCR) mixture containing 0.5 µM forward and reverse primers each; 1X Taq buffer, 0.1 mM four deoxynucleotide triphosphate, 1.125 µM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µl DMSO and 1.2 U Taq ploymerase (Fermentase, Letonia), 15.75 µl ddH<sub>2</sub>O. PCR was carried out with the program as followed: a 1 min cycle in 95°C followed by 30 cycles of 30 s in 94°C, 40 s in 58°C, 45 s in 72°C and a final extension cycle of 5 min in 72°C.

The untreated breast tissue genomic DNA was used as negative control and universal methylated DNA (Invitogen) sample as ready to use as positive control. PCR products then, were purified using PCR product purification kit (Fermentase, Letonia) and checked by electrophoresis of 5% polyacrylamide gel. The resulting products were sequenced on an ABI automated sequencer with big dye terminator (Perkin-Elmer, CA).

### Classification and quantification of methylation levels

Determination of methylated CpG sites was performed by comparing the C versus T nucleotide peaks in bisulfite treated tumor samples in each 40 specified CpG sites that remained as C and was converted to T in bisulfite treated normal samples. Methylation was considered 100% if all 40 CpG sites were methylated. Methylation levels less than 40 CpG sites were classified as partial methylation and absence of methylation was named as unmethylated.

### Statistical analysis

The percentage of methylation was calculated by chi-square test and significant difference between cancer and normal samples. Cancer grade and stage with methylated CpG sites, was analyzed by using spearman regression test.

## RESULTS

### Methylation status in tumor and samples

Out of 46 breast cancer samples, 28.3% (13 samples) were completely methylated, 13% (6 samples) were partially methylated and 58.7% (27 samples) were unmethylated. The overall hypermethylation rate in breast cancer tissues was 41.3% (19 out of 46). On the other hand, the majority of the normal samples (87.2%) or 41 out of 47 were unmethylated. There were significant differences between tumor and normal samples in the methylated CpG sites (methylation pattern) (Figure 1).

### Methylation of the GSTP1 promoter and its relation to grade of tumor

Out of 50 tumor samples, 5 samples had unknown grade and were excluded from analysis. Out of 45 samples, 10 were classified as Grade I (well differentiated), 30 Grade

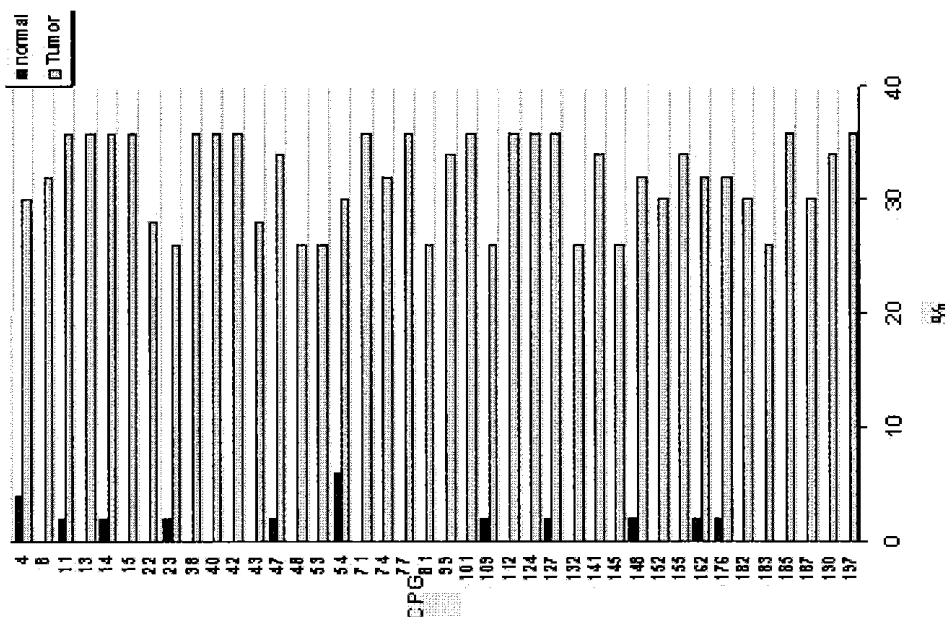


Figure 1. Comparison of methylation pattern on GSTP1 promoter region in breast cancer and its adjacent normal tissues (p = 0.000).

II (moderately differentiated) and 5 Grade III (poorly differentiated). Also 4 samples of Grade II, had missed in methylation sequence analysis and were excluded from the calculations (total samples were 41). Analysis for methylation showed that among 10 Grade I tumor samples, 2 (20%) were fully methylated and 9 samples (34.6%) were partially methylated and 6 samples (60%) were nonmethylated. Among 26 grade 2 tumors, 9 samples (34.6%) were fully methylated, 3 samples (11.5%) partially methylated and 14 samples (53.8%) were nonmethylated. Finally, out of 5 grade 3 tumor samples, 1 sample (20%) was full methylated and 1 sample (20%) partially methylated, 3 samples (60%) were nonmethylated. Statistical analysis did not show any significant direct relationship between methylation and grade of tumor samples (Figure 2).

**Methylation pattern of the GSTP1 promoter CpG sites and its relation to grade of tumor**

The spearman regression test analysis showed no significant relationship between methylated sites and tumor grade (p = 0.467).

**Methylation of GSTP1 gene and its relation to tumor's stage**

Among the 7 different stages that have been reported in different studies, in this study, only 3 stages were found in tumor samples including stage 1, 2 and 3a. There were 3 samples in Stage 1, 29 in Stage 2 and 14 in Stage 3a. (Total 46 known stage samples). Out of the 3 stage 1 tumor samples, 3(100%) were full methylated, out of 29 stage 2 tumors, 8(27.6%) were full methylated, and 4 (13.8%) were partial methylated and 17(58.6%) were nonmethylated.

Among 14 Stage 3a, 2(14.29%) were full methylated and the same number for partial methylation and 10 (71.43%) were nonmethylated in tumor breast samples (Figure 3).

**Methylation pattern of the GSTP1 promoter CpG sites and its relation to stage of tumor**

The spearman regression test analysis showed the highest significant relationship between stage of tumor and methylation at 183, 176, 162, 152, 148, 145, 132,



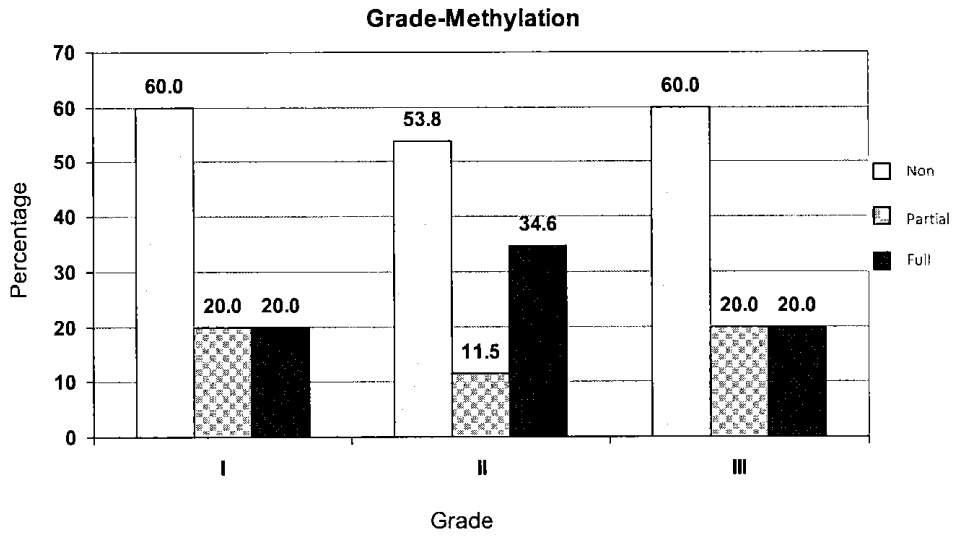


Figure 2. Comparison of tumor grade and methylation status in tumor samples. (correlation is significant at the 0.05 level, 2 tailed) (p = 0.8).

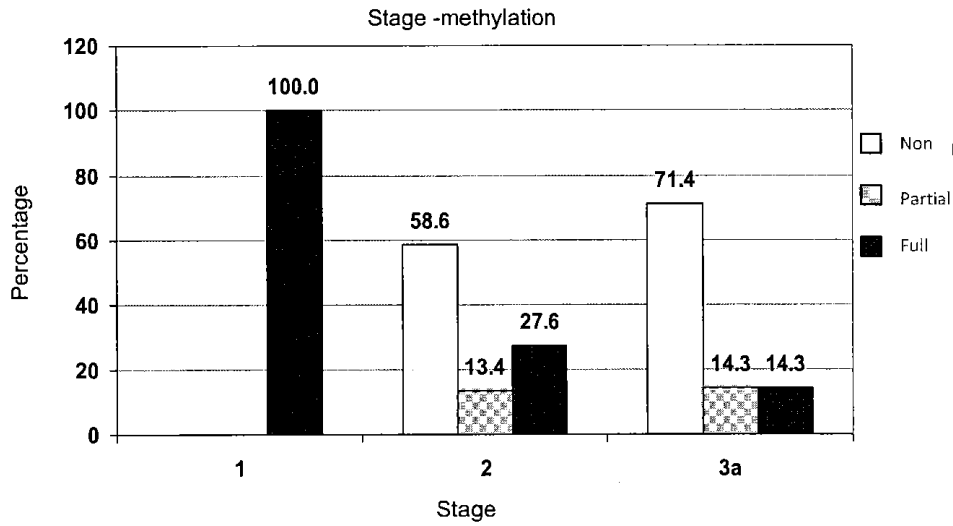


Figure 3. Comparison of tumor stage and methylation status in tumor samples. (correlation is significant at the 0.05 level, 2 tailed) (p = 0.046).

**Table 1.** Methylation pattern and tumor stage in breast tumor samples.

	Correlation Coefficient	Sig. (2-Tailed)
CPG_197	0.23	0.111
CPG_190	0.21	0.135
CPG_187	0.19	0.196
CPG_185	0.23	0.111
CPG_183	0.33(*)	0.021
CPG_182	0.27	0.061
CPG_176	0.28(*)	0.049
CPG_162	0.28(*)	0.049
CPG_155	0.21	0.135
CPG_152	0.35(*)	0.013
CPG_148	0.28(*)	0.049
CPG_145	0.33(*)	0.021
CPG_141	0.21	0.135
CPG_132	0.33(*)	0.021
CPG_127	0.23	0.111
CPG_124	0.23	0.111
CPG_112	0.23	0.111
CPG_109	0.33(*)	0.021
CPG_101	0.23	0.111
STAGE		
CPG_99	0.29(*)	0.039
CPG_81	0.33(*)	0.021
CPG_77	0.23	0.111
CPG_74	0.28(*)	0.049
CPG_71	0.23	0.111
CPG_54	0.27	0.061
CPG_53	0.33(*)	0.021
CPG_48	0.33(*)	0.021
CPG_47	0.29(*)	0.039
CPG_43	0.34(*)	0.017
CPG_42	0.23	0.111
CPG_40	0.23	0.111
CPG_38	0.23	0.111
CPG_23	0.33(*)	0.021
CPG_22	0.25	0.075
CPG_15	0.23	0.111
CPG_14	0.23	0.111
CPG_13	0.23	0.111
CPG_11	0.23	0.111
CPG_8	0.36(*)	0.010
CPG_4	0.27	0.061

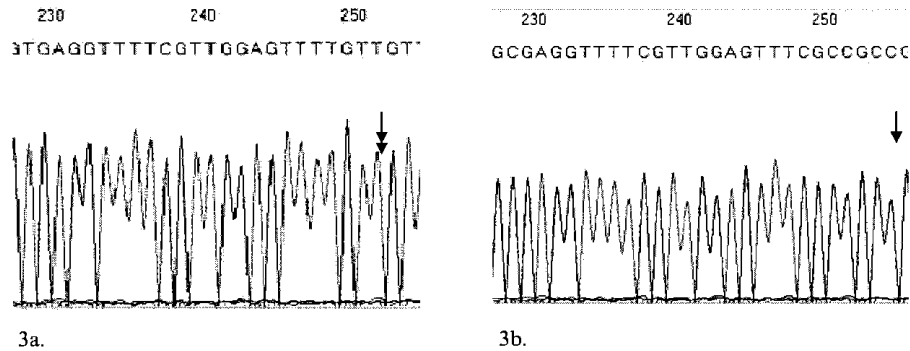
109, 99, 81, 74, 53, 48, 47, 43, 23 and 8 nts (p = 0.048) (Table 1).

## DISCUSSION

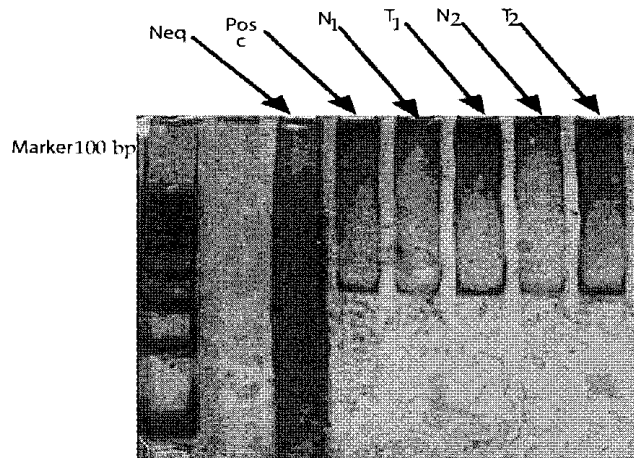
Cancer is a disease associated with both genetic and epigenetic changes. Epigenetic gene regulation has been recognized to play a role in the etiology of cancer.

Abnormal DNA methylation is a hallmark of cancer and often mediates silencing of gene (Xiang et al., 2008).

In this study, we provided a status of methylation extant in the promoter of the detoxification enzyme GSTP1. Previously, the hypermethylation of GSTP1 promoter has mainly been studied by methylation specific PCR (MSP) and was found to be methylated in 24 to 30% of breast tumors (Muggerud et al., 2010; Esteller et al., 2001). Bae et al. (2005) reported that GSTP1 is one of the



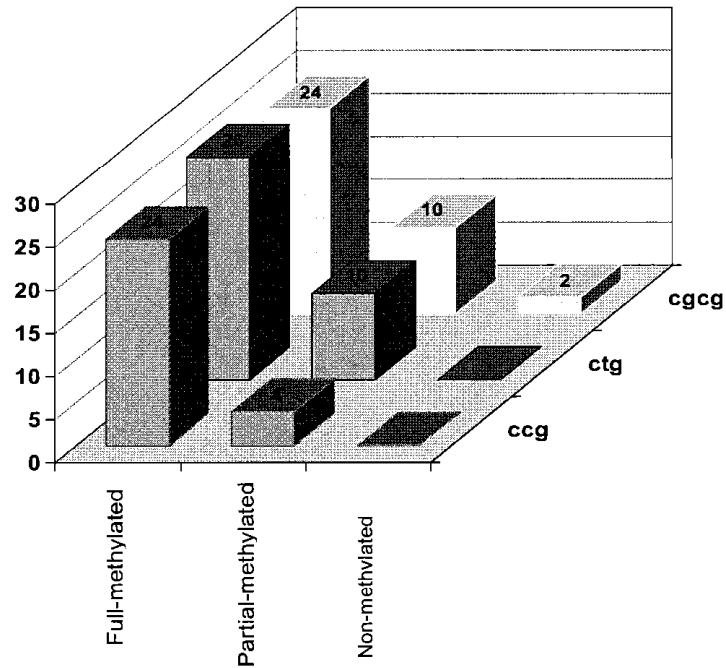
**Figure 4.** Examples of direct sequencing chromatograms. Bisulfite treated DNA was amplified and sequenced on ABI automated sequencer. The sequences represents CpG sites one of which marked by arrows. 3a) Complete conversion of cytosine to thymine (non-methylated) normal breast tissue. 3b) Complete non-conversion of cytosine to thymine (complete methylated) breast tumor tissue.



**Figure 5.** Electrophoresis of BSP products in acrylamide gel, produces visible bands both in methylated and nonmethylated samples with BSP specific designed primers that amplifies both methylated and non methylated DNA samples (positive control is ready to use positive universal methylated DNA sample and negative control is non bisulfite treated genomic DNA).

hypermethylated genes during breast cancer. Quantitative DNA methylation profiling is a powerful tool to identify molecular changes associated with tumors for GSTP1, it might be predictive factor for the response to and efficacy of doxorubicin treatment (Dejeux et al., 2010).

We found that the GSTP1 promoter was methylated in 41.3% of the breast tumors analyzed by bisulfate specific PCR (BSP) method and comparison was made between tumor tissues and normal neighbor breast tissues by direct bisulfate sequencing (Figure 4 and Figure 5). Most of them were seen in Stage 2 that also had the highest



**Figure 6.** Comparison of cpg,ctg and cgcg sites methylation status in GSTP1 promoter region in full,partial and non methylated levels(chi-square test; p=0.000).

number in all tumor samples. The comparison of normal neighbor tissues with tumor tissues, showed the significant difference between methylation status among them ( $p = 0.000$ ). There was also statistically significant difference in methylation pattern between normal and tumor samples ( $p = 0.000$ ).

According to several studies, GSTP1 gene is methylated in various types of tumors. Fang et al. (2007) had found effectiveness of DNA methyltransferase inhibitors in demethylation of the CpG islands in the promoters and reactivation of methylation silenced genes such as P16<sup>ink4</sup>, retinoic acid receptor  $\beta$ , human mutL homolog 1 and glutathione-S-transferase  $\pi$ . They showed that these activities in human esophageal, colon, prostate and mammary cancer cell line and the activity can be enhanced by longer term treatment with polyphenolic compounds, the present study was performed on breast tumor and normal tissues from the same area.

It has been reported that the pattern of aberrant

methylation of individual or multiple genes can be associated with clinically useful information, such as cancer risk assessment, cancer progress, early detection and responses to therapy, therefore, these features make DNA hypermethylation as an excellent biomarker candidate (Vaziri Gohar, 2010). As the special structure of CpG sites, There were also some CG contained sites as cpg, ctg and cgcg that had methylated in significant values in breast tumor samples (Figure 6).

Poplawski et al. (2008) reported hypermethylation of GSTP1 in gastric cancer which was also associated with age, gender, smoking and family history. Promoter methylation of GSTP1 was best analyzed in prostate cancer. It has also been demonstrated that, GSTP1 methylation is an early event in prostatic carcinogenesis, because in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia loss of GSTP1 expression is caused by DNA methylation. Many other types including breast cancer and cholangiocarcinoma showed a GSTP1 hypermethylated promoter. In hepatocellular carcinoma, methylation of

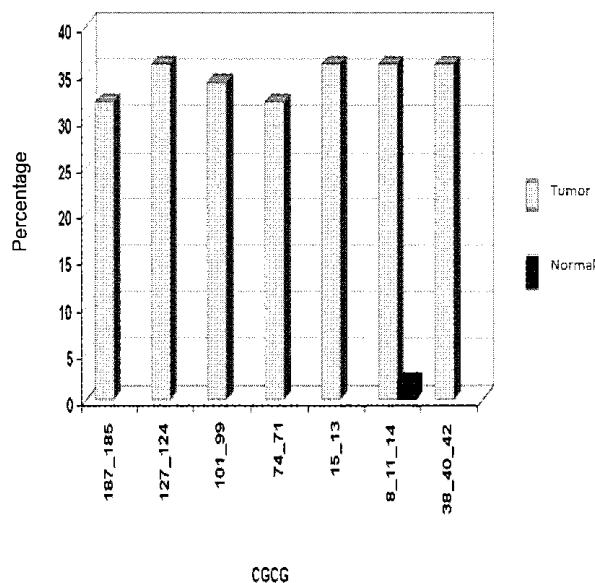


Figure 7. Prevalence of methylated cgcg sites in the promoter region of GSTP1 gene in breast cancer samples (chi-square test;  $p=0.000$ ).

GSTP1 gene occurred in 41 to 85% (Tischoff and Tannapfel, 2008). The consequence of silencing or loss of GSTP1 gene as a biotransformer of electrophilic substances, is higher incidence of mutations that has been established in prostate cancer and also was found in breast cancer tissue, hypermethylation could be detected in the early stage of breast cancer, but not observed in normal or benign breast tissue (Paluszczak and Baer-Dubowska, 2006).

Due to small number of *in situ* and lobular form of tumors in this work, evaluation of a possible increasing trend of GSTP1 methylation in malignant progression was not possible. The GSTP1 methylation status did not correlate with tumor number or chemotherapy history. There was no significant correlation between tumor grade and stage indicating lack of common methylated site related to both aspects of the tumor. Evaluating of CpG sites methylation pattern in promoter region of GSTP1 was performed in new design and methodology.

BSP product sequencing of tumor samples showed considerably higher promoter CpG sites methylation when compared with normal samples, with higher prevalence in 197, 185, 127, 124, 112, 101, 77, 71, 42, 40, 38, 15, 14, 13, 11 nt (36%) that also has correlation

with those that are most prevalence in methylation according to tumors stage and grade (data not shown). This might be related to higher predisposition of some CpG sites to methylation which has a key role in cancer progression. Notably all of these sites belong to cgcg,ctg and ccg series of CpG sites that are the special composition of CpG sites, so this may have a specific mean and importance through promoter region and already have specificity to tumor samples (Figure 7).

According to King-Baton et al. (2008), treatment with genistein or lycopene at non-toxic concentrations partially demethylated the GSTP1 promoter and reactivated GSTP1 expression in human breast cancer cells. Both of these substances are known to have chemopreventive activity against prostate cancer (Klein, 2006), probable mechanism is due to inhibiting the expression of DNMT and resultant re expression of their mRNA (Xiang et al., 2008), indicating effectiveness of methylation mechanism in gene silencing (Dietrich et al., 2009).

Hypermethylation of the GSTP1 promoter with reduced expression levels is detected in precursor high-grade intraepithelial neoplasia and absence of GSTP1 expression with promoter hypermethylation is evident in prostate cancer. Inactivation of GSTP1 may leave cells

vulnerable to oxidative damage and/or tolerant to accumulation of oxidized DNA base adducts (Donkena et al., 2010). In the present study methylation is present even in early stages and grades of tumors showing the methylation progress from starting the carcinogenesis event although this changes are present also in some degrees in higher tumor stages and grades (Figures 2 and 3). GSTP1 methylation is correlated with Gleason grade and prostate volume, suggesting that quantitative GSTP1 methylation maybe of prognostic significance (Zho et al., 2004). In our study GSTP1 methylation seem to be occurring in early steps of malignancy but if treatment applying is followed, it may have significance value to prognosis of therapy effectiveness. On the other hand the relationship between methylation classes and several covariants like patient age, alcohol consumption, dietary folate, estrogen receptor status and tumor size are not included according to AJCC staging system (Christensen et al., 2010). This finding maybe explain the discrepancy of staging of tumor with methylation status.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the 9 Eylul University and Biotechnology Research Center of Tabriz Medical University. The authors wish to express their thanks to Imam-Reza and Nore-Nejat hospital nursing and surgery staff.

#### REFERENCES

- Bae YK, Shim YR, Choi JH, Kim MJ, Gabrielson E, Lee SJ, Hwang TY, Shin SO (2005). Gene promoter hypermethylation in tumors and plasma of breast cancer patients. *Cancer. Res. Treat.*, 4: 233-240.
- Bedgia NG, Sagredo AA, Guerra I, Viguri A, Albania C, Diaz I R, Rezola R, Alberdi MJ, Dopazo J, Montaner D, Renobales M, Fernandez AF, Field JK, Fraga MF, Liloglu T, Pancorbo MM (2010). DNA methylation epigenotypes in breast cancer molecular subtypes. *Breast. Cancer. Res.*, 12: R77-89.
- Chow HHS, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Tome ME, Moore JR, Cordova CA, Mikael DM, Briehl MM, Alberts DS (2007). Modulation of human glutathione S-transferases by polyphenon E intervention. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prevent.*, 16: 1662-1666.
- Christensen BC, Kelsey KT, Zheng S, Houseman EA, Marsit CJ, Wrensch MR, Wiemels JL, Nelson HH, Karagas MR, Kushi LH, Kwan ML, Wiencke JK (2010). Breast cancer DNA methylation profiles are associated with tumor size and alcohol and folate intake. *PLoS. Gen.*, 6: e1001043.
- Dejeux E, Ronneberg JA, Solvang H, Bukholm I, Geisler S, Aas T, Gut IG, Dale ALB, Lonning PE, Kristensen VN, Tost J (2010). DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumors identifies novel genes associated with survival and treatment response. *Mol. Cancer.*, 9: 68-81.
- Dietrich D, Lesche R, Tetzner R, Krispin M, Dietrich J, Haedicke W, Schuster M, Kristensen G (2009). Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J. Histol. Cytochem.*, 57: 477-489.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JGA (2001). Gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.*, 61: 3225-3229.
- Esteller M (2008). Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 358: 1148-1159.
- Fang M, Chen D, Yang C (2007). Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J. Nutr.*, S223-228.
- Gao P, Yang X, Xue YW, Zhang XF, Wang Y, Liu WJ, Wu XJ (2009). Promoter methylation of glutathione S-transferase  $\pi 1$  and multidrug resistance gene1 in bronchoalveolar carcinoma and its correlation with DNA methyltransferase 1 expression. *Cancer*, 115: 3222-3232.
- Holly SL, Fryer AA, Haycock JW, Grubb SEW, Strange RC, Hoban PR (2007). Differential effects of glutathione S-transferase P1(GSTP1) haplotype on cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis*, 28: 2268-2273.
- Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, Wood T, Jeronimo C, Rosenbaum E, Stern J, Yu M, Trink B, Kiviat NB, Sidransky D (2006). Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 24: 4262-4269.
- King-Baton A, Leszczynska JM, Klein CB (2008). Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49: 36-45.
- Klein EA (2006). Chemoprevention of prostate cancer. *Annu. Rev. Med.*, 57: 49-63.
- Li M, Paik HH, Balch C, Kim Y, Li L, Huang THM, Nephew KP, Kim S (2008). Enriched transcription factor binding sites in hypermethylated gene promoters in drug resistant cancer cells. *Bioinformatics*, 24: 1745-1748.
- Maxwell A, McCudden CR, Wians F, Willis MS (2009). Recent evidences in the detection of prostate cancer using epigenetic marker in commonly collected laboratory samples. *Labmedicine*, 40: 171-178.
- Muggerud AA, Ronneberg JA, Wamberg F, Botling J, Busato F, Jovanovic J, Solvang H, Bukholm I, Dale ALB, Kristensen VN, Sorlie T, Tost J (2010). Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXO1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer. *Breast. Cancer Res.*, 12: R31-10.
- Paluszczak J, Baer-Dubowska W (2006). Epigenetic diagnostics of cancer—the application of DNA methylation markers. *J. Appl. Genet.*, 47: 365-375.
- Poplawski T, Tomaszewska K, Galicki M, Morawiec Z, Blasiak J, Morawiec Z, Blasiak J (2008). Promoter methylation of cancer-related genes in gastric carcinoma. *Exp. Oncol.*, 30: 112-116.
- Ronneberg JA, Tost J, Solvang HK, Alnaes GIG, Johansen FE, Brendeford EM, Yakhini Z, Gut IG, Lonning PE, Dale ALB, Gabrielsen OS, Kristensen VN (2008). GSTP1 promoter haplotypes affect DNA methylation levels and promoter activity in breast carcinomas. *Cancer Res.*, 68: 5562-5571.
- Suzuki T, Takagi Y, Osanai H, Li L, Takeuchi M, Katoh Y, Kobayashi M, Yamamoto MM (2005). Pi class glutathione S-transferase genes are regulated by Nr2 through an evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish. *Biochem. J.*, 388: 65-73.
- Tischoff I, Tannapfel A (2008). DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World. J. Gastroenterol.*, 14: 174-1748.
- Vaziri Gohar A (2010). Clinical application of epigenetic markers in diagnosis and treatment of cancer. *J. Biol. Sci.*, 10: 373-385.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.*, 39: 457-466.
- Wu Y, Alvarez M, Slamon D, Koeffler P, Vadgama JV (2010). Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. *BMC. Cancer*, 10: 32-44.
- Xiang N, Zhao R, Song G, Zhong W (2008). Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 29: 2175-2181.