T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MEME KANSERİNDE DEMİR HOMEOSTAZIYLA İLGİLİ GENLERİN EKSPRESYONU

TUBA MUTLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MEHMET GÜVEN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MEME KANSERİNDE DEMİR HOMEOSTAZIYLA İLGİLİ GENLERİN EKSPRESYONU

TUBA MUTLU

DANIŞMAN
PROF. DR. MEHMET GÜVEN

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tuba MUTLU

İTHAF

Canım annem, babam ve kardeşime ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen, yol gösteren ve tez çalışmam esnasında da her zaman yardımcı olan değerli tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Mehmet GÜVEN'e,

Eğitimim süresince benden desteğini eksik etmeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e ve Anabilim Dalı'mızın tüm değerli Öğretim Üyelerine,

Tez çalışmamda gerekli örneklerin toplanmasında klinik verilerin sağlanmasında ve değerlendirilmesinde bana her türlü yardımı sağlayan İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Bölümü'nden Sn. Uz. Dr. Fadime Didem Can TRABULUS'a ve Patoloji Bölümü'nden Sn. Doç. Dr. E. Canan Kelten TALU'ya,

Doktora eğitimimin bana kazandırdığı en değerli hazine olan, birlikte çalışmaktan büyük onur ve mutluluk duyduğum, varlıklarını her anımda hissettiğim, sevgili dostlarım, iyikilerim M.Sc. Merve BOSTANCI, M.Sc. Meltem METE ERGÜN, M.Sc. Duygu ERHAN ve Duygu TERZİ' ye,

Desteğini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Cavit Utku TURGUT'a,

Hayatım boyunca aldığım kararları ve beni sonuna kadar destekleyen, maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak başarılarımdaki en büyük paya sahip olan, hakkını asla ödeyemeyeceğim, varlıklarıyla nefesim olan biricik aileme teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22092

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN.....İİİ
İTHAF..... İV
TEŞEKKÜR.....V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....Xİİİ
ÖZET .....XVİİ
ABSTRACT .....XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Meme Anatomisi……4
2.2. Meme Kanseri……...5
2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi……5
2.2.2. Meme Kanserinin Histopatolojisi ……..6
2.2.3. Meme Kanserinin Moleküler Alttipleri……..7
2.2.4. Meme Kanserinin Histolojik Derecelendirilmesi …….……8
2.3. Meme Kanseri İle İlişkili Genler…….……....8
2.3.1. Onkogenler ……..…….……...9
2.3.1.1. HER2/neu……..…….…….....9
2.3.1.2. c-My……....……..…....9
2.3.1.3. Ras…..…….....10
2.3.2. Tümor Baskılayıcı Genler …….....10
2.3.2.1. P53…….…….....…….....10
2.3.2.2. BRCA1 ve BRCA2 …….....10
2.3.3. Tip II Trabsmembran Serin Proteazlar (TTSP)…….....……...11
2.3.3.1. TTSP ve Demir Metabolizması…….....…….....14

2.4. Demir Metabolizmasının Regülasyonu…….……....18
2.4.1. Demirin Sistemik Regülasyonu…….……..……..…...19
2.4.2. Demirin Hücresel Regülasyonu……..……..……....23
2.4.2.1. Demir Metabolizmasının Hücresel Regülasyonunda IRP / IRE Sistemi……..…..24
2.4.2.2. Demir Metabolizmasının Hücresel Regülasyonunda Micro RNA'lar……...……...25
2.5. Kanserde Demir Metabolizması Düzensizligi……..28
2.5.1. Matriptaz-2 (TMPRSS6) Geni ve Proteini…….....……..…….31
2.5.2. Hepsidin (HAMP) Geni ve Proteini……32
2.5.3. Hemojuvelin Geni ve Proteini……..33
2.5.4. FPN1 Geni ve Proteini……..34
2.5.5. IRP1 Geni ve Proteini……..34
2.5.6. MiRNA 122 Geni ve Proteini……...35
2.5.7. Transferrin Reseptör 1 Geni ve Proteini……....36
2.6. Kanserde Anemi…….....37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....39
3.1. Gereçler.....39
3.1.1. Çalışma Grubu.....39
3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....39
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Araç-Gereçler, Çözeltiler ve Tamponlar 40
3.1.3.1. Meme Dokularının Toplanması ve Saklanmasında KullanılanMalzemeler.....40
3.1.3.2. Total RNA Eldesinde Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasal Malzemeler.....40
3.1.3.3. cDNA Sentezinde Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasal Malzemeler.....41
3.1.3.4. qRT-PZR'de Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasal Malzemeler.....41
3.2. Yöntemler 42
3.2.1. Meme Kanserli Hastaların Normal ve Tümörlü Dokularından Total RNA İzolasyonu 42

3.2.1.1. RNA Saflığının ve Miktarlarının Ölçülmesi.....43
3.2.2. cDNA sentezi 43
3.2.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR).....45
3.2.3.1. Normalizasyon 45
3.2.3.2. Deneylerde Kullanılan qRT-PZR TaqMan Primer-Probları.....45
3.2.3.3. qRT-PZR Reaksiyon Karışımının Hazırlanma Aşamaları.....46
3.3. İstatistiksel Değerlendirme 48
4. BULGULAR.....49
4.1. Meme kanserli hastaların klinik verileri…….....49
4.2. Meme Kanserli Hastaların Gen İfadeleri…….....50
4.3. Klinik Verilerin Gen İfadeleri ile ilişkileri.....75
5. TARTIŞMA.....85
KAYNAKLAR.....102
FORMLAR.....134
ETİK KURUL KARARI.....136
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....137
ÖZGEÇMİŞ.....138

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Ekspresyonu microRNA'lar tarafından regüle edilen demir metabolizması genleri.....27

Tablo 3-1: Total RNA İzolasyon Kiti Çözelti ve Tamponunun Hazırlanışı 41

Tablo 3-2: RT reaksiyonun sıcaklık döngüleri.....44

Tablo 3-3: 2X Reverse Transciription (RT) master mix hazırlanışı ve her bir reaksiyonun final hacmi.....44

Tablo 3-4: qRT-PZR TaqMan Primer-Prob Dizileri.....45

Tablo 3-5: qRT-PZR Reaksiyon Karışımı.....47

Tablo 3-6: qRT-PZR Sıcaklık Döngüsü 47

Tablo 4-1: Meme kanserli hastaların demografik klinik verileri.....49

Tablo 4-2: Tümör ve normal doku örneklerinde FPN1, HAMP, TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 ve miRNA122 genlerinin ekspresyon değerleri.....51

Tablo 4-3: Tümör ve normal doku örneklerinde FPN1 genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerleri……..52

Tablo 4-4: FPN1, geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri……...…54

Tablo 4-5: Tümör ve normal doku örneklerinde HAMP genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri……...…55

Tablo 4-6: HAMP geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri……...……57

Tablo 4-7: Tümör ve normal doku örneklerinde TMPRSS6 genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri……...58

Tablo 4-8: TMPRSS6 geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri……...60

Tablo 4-9: Tümör ve normal doku örneklerinde TFRC genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerleri…….61

Tablo 4-10: TFRC geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri…….....63

Tablo 4-11: Tümör ve normal doku örneklerinde IRP1 genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değeri.....64

Tablo 4-12: IRP1 geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri……...66

Tablo 4-13: Tümör ve normal doku örneklerinde HFE2 genine ait CT ve 2-ΔΔCT değerleri…….....……..67

Tablo 4-14: HFE2 geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri……..…69

Tablo 4-15: Tümör ve normal doku örneklerinde miRNA122 genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri……..…70

Tablo 4-16: miRNA122 geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri ……72

Tablo 4-17: Anemisi olan ve anemisi olmayan hastaların meme doku örneklerinde FPN1, HAMP, TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 ve miRNA122 genlerinin ifade değerleri ……..75

Tablo 4-18: Meme kanserli Hastaların FPN1 gen ifadesi ile ER arasındaki ilişki.....76

Tablo 4-19: Meme kanserli Hastaların FPN1 gen ifadesi ile histolojik derece arasındaki ilişki.....76

Tablo 4-20: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile nükleer derece arasındaki ilişki.....77

Tablo 4-21: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile mikrokalsifikasyon arasındaki ilişki.....77

Tablo 4-22: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile P53 arasındaki İlişki.....77

Tablo 4-23: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile ER arasındaki İlişki.....78

Tablo 4-24: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile histolojik derece arasındaki ilişki.....78

Tablo 4-25: Meme kanserli Hastaların HFE2 gen ifadesi ile HER2 arasındaki ilişki.....79

Tablo 4-26: Meme kanserli Hastaların HFE2 gen ifadesi ile histolojik tip arasındaki ilişki.....79

Tablo 4-27: Meme kanserli Hastaların IRP1 gen ifadesi ile nükleer derece arasındaki ilişki.....80

Tablo 4-28: Meme kanserli Hastaların IRP1 gen ifadesi ile mikrokalsifikasyon arasındaki ilişki.....80

Tablo 4-29: Meme kanserli Hastaların IRP1 gen ifadesi ile histolojik tip arasındaki İlişki.....80

Tablo 4-30: Meme kanserli Hastaların IRP1 gen ifadesi ile metastaz arasındaki İlişki.....81

Tablo 4-31: Meme kanserli Hastaların TFRC gen ifadesi ile histolojik tip arasındaki ilişki.....82

Tablo 4-32: Meme kanserli Hastaların TFRC gen ifadesi ile tümör yerleşimi arasındaki ilişki.....82

Tablo 4-33: Meme kanserli Hastaların HAMP gen ifadesi ile histolojik derece arasındaki ilişki.....83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Normal meme anatomisi……...4

Şekil 2.2. Demir homeostazı……....15

Şekil 2.3. Demir metabolizmasında rol oynayan temel hücre tipleri……..…17

Şekil 2.4. Hjv'nin Matriptaz-2 baskılama modelinin BMP sinyalizasyonu ve hepsidin ekspresyonu ile ilişkisi……..20

Şekil 2.5. Sistemik demir metabolizması regülasyonu……....21

Şekil 2.6. Sistemik demir metabolizması regülasyonu……22

Şekil 2.7. Hücresel demir regülasyonu……25

Şekil 2.8. Hücresel demir ve miRNA işlemesi arasındaki ilişki…….26

Şekil 2.9. miRNA'nın demir metabolizmasını etkileme potansiyeli……...28

Şekil 2.10. Demir, oksidatif stres ve estradiol karsinogenezde DNA hasarı oluşturur...29

Şekil 2.11. Meme kanserinin mikroçevresi ve kanserde demir düzensizliğinin potansiyel mekanizmaları……30

Şekil 2.12. TFRC transkripsiyonun regülasyonu……....36

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACD: Kronik hastalıkların anemisi

ACO1: Aconitase 1

ACTB: Aktin Beta

Akt: Alpha serine/threonine-protein kinase

ALAS: Eritroid 5-Amino-levulinat sentaz

ALK3: Aurora-Like Kinase

Apo-Tf: Apo-transferrin

ATP: Adenozin Trifosfat

BMI: Vücut kitle indeksi

BMP: Bone morphogenetic protein

BMP-SMAD: Bone morphogenetic protein-Sons of mothers against decapentaplegic

BRCA 1/2: Meme kanserine yatkınlık

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

Cp: Seruloplazmin

CT: Cycle Threshold

CUB: Cls/Clr, Urchin embryonic growth factor, Bone Morphogenetic Protein-1

DcytB: Duodenal cytochrome B

DCIS: Duktal karsinoma in situ

DMT1: Divalent Metal Transporter 1

DNA: Deoksiribo Nükleik asit

ECAS: European Cancer Anemia Survey

ECM: Ekstraselüler Matriks

EPO: Eritropoietinin

ER + : Östrojen reseptörü pozitif

ERK1/2: Extracellular signal–regulated kinases

FLVCR: Feline Leukemia Virus C Reseptörü

FPN1: Ferroportin 1

FRZ: Frizzled domain

GADD45: The Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45

GTPaz: Guanozin Trifosfataz

GPI: Glikosilfosfatidilininositol

HAMP: Hepsidin antimicrobial peptide

HAT/DESC: Human Airway Trypsin-like protease /Skuamöz hücreli karsinomda farklı olarak ifade edilen)

HCC: Hepatoselüler karsinom

HCP1: Heme taşıyıcı protein 1

HCT: Hematokrit

HCV: Hepatit C virüsünün

HFE: Hemokromatozis

HFE2: Hemokromatozis 2

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

HGB: Hemoglabin

HIF2: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 2

HJV: Hemojuvelin

HO_1: Heme oxygenase 1

Holo-Tf: Holo-transferrin

HR + : Hormon reseptör pozitif

HR - : Hormon reseptör negatif

HRas: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

IARC: International Agency for Research on Cancer

IGF1R: İnsulin-like growth factor 1

IL-6: Interlökin-6

IREB2: İron responsive element binding protein 2

IRIDA: Demire rezistan demir eksikliği anemisi

IRP/IRE: İron regulatory protein/İron-responsive elements

JAK-STAT3: The Janus kinase/signal transducers and activators of transcription

KRas: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LCIS: Lobular karsinoma in situ

LDLA: low-density lipoprotein receptor class A

LNA: Locked Nucleic Acid

MAM: Mmeprin/A5 antigen/Receptor Protein Phosphatase Mu)

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini

MCHC: Ortalama eritrosit hemoglobini konsantrasyonu

MCV: Eritrositlerin ortalama korpüsküler hacmini

Mdm2: Mouse double minute 2 homolog

mFt: Mitokondriyal ferritin

miRNA 122: Mikro ribonükleik asit 122

MSPL: Büyük mozaik serin proteaz

MYC: Myelocytomatosis

NPI: Nottingham Prognostik İndeksi

NRas: Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

p53: Tümör protein P53

PCBP1-2: Poly-cC-binding protein 1-2

PI3K: Phosphoinositide 3-kinases

PLT: Platelet

PR + : Progesteron reseptörü pozitif

PTEN: Fosfotaz ve Tensin homolog

Raf : Rapidly Accelerated Fibrosarcom

RBC: Kırmızı kan hücreleri

RDW: Eritrosit dağılım genişliği

RGM: Repulsive guidance molecule

RISC: RNA-induced silencing complex

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

RR: Ribonükleotid Redüktaz

SEA: sea urchin sperm protein/enteropeptidase/agrin

sFt: Sitoplazmik ferritin

SLC40A1: Solute Carrier Family 40 Member 1

SR: Scavenger Reseptör domain

STEAP (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate)

Steap2: Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2

TBI: Transferine bağlı demir

Tf : Tansferrin

TFRC: Transferrin reseptör

TIBC: Transferrin demir bağlama kapasitesi

TNM: Tümör nodül metastaz

TPA: Tetradekanoilphorbol asetat

TTSP: Tip II Trabsmembran Serin Proteazlar

uPA: Ürokinaz plazminojen Aktivatörü

WBC: Beyaz kan hücresi

ÖZET

Mutlu, T. (2019). Meme kanserinde demir homeostazıyla ilgili genlerin ekspresyonu. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Demir metabolizması ile ilgili bozukluklar çeşitli hastalıklara yol açmakta ve ayrıca kanser sürecinde de etkili olmaktadır. Son zamanlarda meme kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda demir metabolizması ile ilişkili genlerin ekspresyon düzensizliği gösterilmiş olup, bu değişimlerin hastalarda prognostik önem kazandığı görülmektedir. Çalışmamızda meme kanserli hastaların tümör ve normal dokularında demir hemostazıyla ilişkili Matriptaz 2 (TMPRSS6), Hemojuvelin (HFE2), Hepsidin (HAMP), IRP1, Ferroportin 1 (FPN1), Transferrin reseptör 1 (TFRC), miRNA 122 genlerinin ifade düzeylerini kıyasladık ve bu genlerin ifade düzeylerini birbirleriyle ve hastaların klinik verileri ile ilişkilendirdik.

Çalışmamıza, yeni meme kanseri tanısı konmuş, herhangi bir tedavi uygulanmamış 75 kadın hastadan alınan tümörlü ve normal dokuları dahil edildi. Demir homeostazıyla ilgili genlerin ifade düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle tespit edildi.

Çalışmamızda TFRC, TMPRSS6, ve IRP1 genlerinin ifade düzeylerinin tümörlü dokuda normal dokuya göre arttığı saptanmıştır. FPN1, HFE2 ve miRNA122 genlerinin ise ifade düzeylerinin tümörlü dokuda normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. HAMP gen ifade düzeyi açısından tümörlü ve normal dokular arasında fark tespit edilmemiştir (p=0,911). Anemisi olan ve olmayan hastalardaki gen ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 ve miRNA122 genlerin ifade düzeyleri ile hastaların bazı klinik veriler arasındaki ilişki incelendiğinde, istatiksel olarak anlamlı olan sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda ayrıca IRP1 ile FPN1 arasında (r=0,266; p=0,022) ve IRP1 ile miRNA 122 arasında da istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptanmıştır (r=0,231; p=0,048). Diğer yandan sadece IRP1 ifade düzeyleri ile hematolojik verilerden PLT seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptanmıştır (r=0,260; p=0,025).

Demir homeostazında rol oynayan molekülleri kodlayan genlerdeki ifade düzeylerinin meme karsinogenezi ile ilişkisini araştırdığımız çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlarımız, demir homeostaz gen ifadelerinin klinik önemini ortaya koymaktadır. Çalışmamızın sonuçlarının bu alanda yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Demir homeostazı, Meme kanseri, qRT-PCR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22092

ABSTRACT

Mutlu, T. (2019). Expression of genes related to iron homeostasis in breast cancer. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Doctorate Thesis. İstanbul.

Dysregulation of iron metabolism contributes to various human pathologies, including iron overload diseases and cancer. Recently, studies on breast cancer have shown irregular expression of iron-related genes, and these changes seem to gain prognostic significance in patients. In this study, we compared the expression levels of Matriptase 2 (TMPRSS6), Hemojuvelin (HFE2), Hepcidin (HAMP), IRP1, Ferroportin 1 (FPN1), Transferrin receptor 1 (TFRC), miRNA 122 genes in tumor and normal tissues of breast cancer patients. We correlated expression levels of genes with each other and clinical data of patients.

In this study, tumor and normal tissues taken from 75 women with newly diagnosed breast cancer without any treatment were included. Expression levels of genes related to iron homeostasis were determined by qRT-PCR method.

In our study, expression levels of TFRC, TMPRSS6, and IRP1 genes were found to increase in tumor tissue compared to normal tissue. Expression levels of FPN1, HFE2 and miRNA122 genes decreased in tumor tissue compared to normal tissue. No difference was found between tumor and normal tissues in terms of HAMP gene expression level ($p = 0,911$). No statistically significant difference was found between gene expression levels in patients with and without anemia. When the relationship between expression levels of FPN1, HAMP, TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 and miRNA122 genes and some clinical data of the patients were examined, statistically significant results were obtained. In our study, a statistically significant positive correlation was also found between IRP1 and FPN1 ($r = 0,266$; $p = 0,022$) and between IRP1 and miRNA 122 ($r = 0,231$; $p = 0,048$). On the other hand, only a statistically significant positive correlation was found between IRP1 expression levels and PLT levels from hematological data ($r = 0,260$; $p = 0,025$).

The results of our study, which investigated the relationship between levels of expression in genes encoding molecules involved in iron homeostasis and breast carcinogenesis, reveal the clinical importance of iron homeostasis gene expression. We think that the results of our study will contribute to the studies in this field.

Key Words: Iron homeostasis, Breast cancer, qRT-PCR

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 22092

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen ve ölüme neden olan kanser tipidir. WHO ve IARC'ın (International Agency for Research on Cancer) ortak raporuna göre, her yıl dünyada yaklaşık 1.000.000 kadında meme kanseri gelişmekte ve 370.000 kadın ise bu hastalıktan ölmektedir (Jemal A ve ark. 2009). Meme kanserinin gelişimi genetik, çevresel koşullar ve yaşam tarzı faktörlerine bağlıdır (Bogdanova N ve ark. 2013).

Demir birçok canlı için temel bir element olup, yaşamsal öneme sahiptir. Elektron alıp verme özelliği nedeniyle oksijen taşınması, ATP sentezi, DNA, RNA ve protein sentezinde rol oynar. Ayrıca, pek çok enzimin yapı ve fonksiyonu için de gereklidir. Bu sebeple, hücreler yeterli miktarda demire sahip olmak zorundadır (Bogdan A.R. ve ark. 2015). Diğer yandan, demirin fazlası serbest radikaller üzerinden hücresel moleküllerde hasarlara neden olabilir. Demir homeostazı ile ilgili birçok mekanizma olup, bu mekanizmaların birbirleriyle etkileşimleri son derece önemlidir (Silva B ve ark. 2015). Demir metabolizması ile ilgili bozukluklar çeşitli hastalıklara yol açmakta ve ayrıca kanser sürecinde de etkili olmaktadır. Demirin, hücre proliferasyonu ve tümörgenez ile ilişkili olduğu ve kanser hücrelerinin demir metabolizmasındaki düzensizliğine bağlı olarak hücresel demir seviyesinin yüksek olduğu bilinmektedir (Bogdan A.R ve ark. 2015).

Hücre içi demirin kontrolü ile ilgili mekanizmalardan biri IRPs (iron regulatory proteins) sistemidir. Bu sistem demir metabolizması genlerinin post-transkripsiyonel kontrolünü sağlar. Demir, kanda transferrine bağlı olarak taşınır ve transferrin reseptörleri (TFR) vasıtasıyla hücre içine alınır. Sitoplazmada bulunan ve hücresel "demir sensör proteinleri" adlandırılan proteinler (IRP1 ve 2), demir ve enerji metabolizması ile ilgili genlerin translasyonunu düzenler. Demir miktarı düştüğünde, ferritin mRNA'sına bağlanarak onun translasyonunu önlerken, TFR mRNA'sına bağlanarak onu stabilize eder ve TFR'lerinin translasyonunu sağlar. Bu kontrol, ilgili mRNA'ların üzerinde bulunan 30 nükleotidlik IRE (Iron Responsive Element) ile IRP'ler arasındaki ilişkiye bağlıdır (Bogdan A.R ve ark. 2015, Maegdefrau U ve ark. 2011).

Demirin hücre ve organizmadaki rolü oldukça geniştir. Demir, hücrelerde ve vücut sıvılarında Ferrik (Fe^{+3}) veya ferröz (Fe^{+2}) olmak üzere iki oksidasyon

durumunda bulunur. Demirin bu elektron değişimi, bir taraftan gerekli iken diğer taraftan da serbest formda kalması prooksidan olarak serbest radikallerin oluşumuna sebep olur. Bu negatif etkiyi azaltmak için, demir genellikle bir proteinle beraber bulunur. Hücre içinde ferritinde depolanırken, serumda transferrin ile taşınır (Manz, D.H. ve ark. 2016). Demir homeostazı, hepatositlerden salgılanan 25 amino asitlik bir peptid hormon olan hepsidin ile kontrol edilir. Hepsidin, serumda dolaşır ve hücreden demir çıkışını sağlayan ferroportine (FPN) bağlanarak onun yıkımını sağlar. Böylece hücresel demir düzeyi artar (Chen Y ve ark. 2015). TMPRSS6 (transmembran serin proteaz 6) geni tarafından kodlanan Matriptaz 2 ise, hepsidin miktarını kontrol eder. Transmembran serin proteazlar (TTSP)'lar, diğer hücre yüzeyleriyle, çözünür proteinlerle, hücre dışı matriks bileşenleri ile etkileşmek için hücre membranına konumlanmıştırlar (Kitamoto Y ve ark. 1995, Lang, J.C. ve ark. 2001). Proteazlar, kanser hücrelerinin metastazı sırasında matris bariyerlerinin yok edilmesi için önemli olup özellikle de tümör büyümesi, invazyonu ve metastaz ile ilişkilidir (Hooper J.D. ve ark. 2001, Lang, J.C. ve ark. 2001, Netzel-Arnett, S. ve ark. 2006). Matriptaz-2, hemojuvelinin yıkılmasından sorumlu bir proteazdır. Hemojuvelin, hepsidin ekspresyonunu uyaran sistem içinde rol oynayan bir proteindir. Dolayısıyla TMPRSS6 ekspresyonunun artması, hepsidin miktarını düşürür. Böylece hücresel demir düzeyi düşer (Ramsay A.J. 2009).

Hemojuvelin miktarının, miRNA'lar üzerinden de düzenlendiği gösterilmiştir. Özellikle miR122'nin karaciğer dokusunda hemojuvelin mRNA ekspresyonu üzerinde etkili olduğu ve doku demir seviyesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Castoldi, M. ve ark. 2011).

Yapılan çalışmalarda, demir metabolizmasıyla ilişkili birçok genin normal dokularda eksprese olduğu, tümör dokularında ise eksprese olan bu genlerin düzensizliği gösterilmiştir. (Manz, D.H. ve ark. 2016, Hanninen, M.M., Lamy, P.J ve ark. 2014, Maegdefrau U ve ark. 2011, Pan, X ve ark. 2016). Son zamanlarda meme kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda demir ile ilişkili genlerin ekspresyon düzensizliği gösterilmiş olup, bu değişimlerin hastalarda prognostik önem kazandığı görülmektedir (Lamy, P.J ve ark. 2014, Pan, X ve ark. 2016).

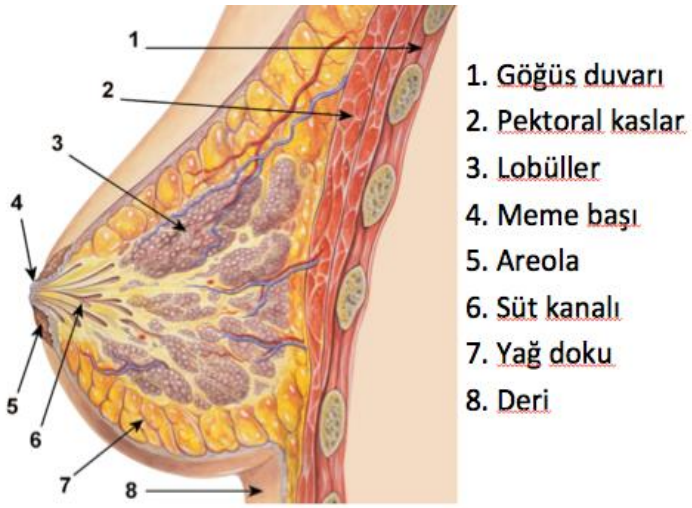
Çalışmamızın amacı, meme kanserli hastaların tümör ve normal dokularında demir hemostazıyla ilişkili Matriptaz 2 (TMPRSS6), Hemojuvelin (HFE2), Hepsidin (HAMP), IRP1, Ferroportin 1 (FPN1), Transferrin reseptör 1 (TFRC), miRNA 122

genlerinin ifade düzeylerini belirlemek ve bu genlerin ifade düzeylerini birbirleriyle ve hastaların klinik verileri ile ilişkilendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Anatomisi

Meme dokusu hem erkeklerde hem kadınlarda olmasına rağmen meme bezleri sadece postpartum dönemde kadınlarda fonksiyonel olmakta ve süt bezlerinden süt salgılanmaktadır. Kadınlarda, meme pektoralis majör kaslarının üzerindedir ve genellikle ikinci kaburga seviyesinden insan kaburga kafesinin önündeki altıncı kaburga seviyesine kadar uzanır. Böylece, göğüs bölgesinin ve göğüs duvarlarının çoğunu kaplar.Meme, ağırlıklı olarak iki tip dokudan oluşur: adipoz doku ve memelerin emzirme fonksiyonlarını etkileyen glandüler doku (Drake RL ve ark. 2005). Morfolojik olarak meme gözyaşı şeklindedir (*Stöppler MC ve ark. 2015).* Yüzeysel doku tabakası (yüzeysel fasya), deriden 0.5–2.5 cm'lik subkütanöz yağ (adipoz doku) ile ayrılır. Yetişkin kadın memesinde, meme ucunda yakınlaşan 14-18 düzensiz laktiferöz lob bulunur. Her meme, herbirinde birçok lobül bulunan 15-20 lobtan oluşmaktadır. 2,0–4,5 mm çapındaki süt kanalları, bezleri destekleyen yoğun bağ dokusu ile çevrilidir. Süt, memeden areola adı verilen bir pigmentli alanla çevrelenen meme ucu vasıtasıyla çıkar. Areola, Montgomery'nin bezleri olarak bilinen değiştirilmiş ter bezleri içerir. Memenin altında göğüs duvarının ve üst abdomenin kasları bulunmaktadır (*Doucet S* ve ark. 2009).



Şekil 2.1. Normal meme anatomisi (Patrick JL ve ark. 2006)

2.2. Meme Kanseri

Kanser, vücuttaki hücrelerin değişimine ve kontrolsüz çoğalmasına sebep olan bir hastalıktır. Çoğu kanser hücresi tümör adı verilen lezyon oluşturur ve bu tümör meydana geldiği vücut bölümü ile adlandırılır. Meme kanseri, meme dokusundan kaynaklanan hücrelerin düzensiz büyümesini ve çoğalmasını ifade eder. Meme kanserlerinin çoğu lobül denen süt üretim yeri olan meme dokusunda ya da lobülleri meme başına bağlayan kanallarda başlar. Memenin geri kalan kısmı yağ doku, bağ ve lenfatik dokulardan oluşur (American Cancer Society 2017;2018, Sharma G ve ark. 2010).

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. Kadınlardaki kanserlerin tümünün %33'ünden ve kanserle ilişkili ölümlerin %20'inden sorumludur. Kansere bağlı ölümlerde ise akciğer kanserinin arkasından 2. sırada gelmektedir. Ancak 40-59 yaş arası kadın ölümlerinin ana nedenidir. (Meme Sağlığı Dergisi 2011, Meme Hastalıkları Kitabı 2012) Meme kanseri erkeklerde de görülmekle beraber, kadınlarda erkeklere göre yaklaşık 100 kat daha yaygındır. Ancak erkeklerde geç tanı nedeniyle daha kötü sonuçlar doğurmaktadır (Sharma G ve ark. 2010).

Meme kanseri ile ilişkili birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bu risk faktörleri demografik (yaş, etnisite/ırk), reprodüktif öykü (menarş yaşı, parite, ilk canlı doğum yaşı, menapoz yaşı), ailesel/genetik faktörler (aile öyküsü, meme kanseri riski ile ilişkili olduğu bilinen veya şüphe edilen BRCA 1/2, p53, PTEN veya diğer gen mutasyonları), çevresel faktörler (30 yaşından önce toraks bölgesine radyoterapi [örneğin Hodgkin hastalığı tedavisi nedeniyle], hormon replasman tedavisi, alkol kullanımı) ve diğer faktörler (meme biyopsi sayısı, atipik hiperplazi veya lobular karsinoma in situ [LCIS], dens meme yapısı, vücut kitle indeksi [BMI]) olarak sınıflandırılabilir. (Meme sağlığı dergisi) Yıllar içerisinde meme kanseri görülme sıklığında artış olmakla birlikte erken tanı ve tedavi modalitelerindeki gelişmeler sayesinde mortalite oranlarında düşüş görülmektedir (Meme Sağlığı Dergisi 2011).

2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser olup, bazı ülkelerde kadınlarda kanserden ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Özellikle Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'daki ülkelerde çok sık görülen meme kanseri, menopozdaki kadınlarda hormon replasman tedavisi kullanılmasının azalmasıyla birlikte azalmaya başlamıştır.

Bu azalma, hormon reseptörü pozitif meme kanserlerinde daha belirgindir. Tarama mamografisinin yaygın olarak uygulanması ile erken tanı ve etkin tedavi, meme kanseri mortalitesinde azalmaya yol açmıştır. Ancak, ülkemizde ve diğer gelişmekte olan ülkelerde, ortalama yaşam süresinin uzaması ve yaşam tarzının batıya benzemesi sonucu meme kanseri sıklığı artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı IARC'in (International Agency for Research on Cancer) International Journal Of Cancer'da yayımlanan 2008 yılı dünya istatistiklerine baktığımızda, tüm dünyada görülen yaklaşk 1.400.000 yeni meme kanser olgusunun yarısı gelişmiş ülkelerde, diğer yarısı da gelişmekte olan ülkelerdedir. Oysa, gelişmekte olan ülkelerin nüfusu, gelişmiş ülkelerin 4 katı kadardır. Aynı verilere mortalite oranları açısından baktığımızda, 2008 yılında meme kanserinden ölümlerin %58.7'si gelişmekte olan ülkelerdedir (Meme Hastalıkları Kitabı 2012). Sağlık Bakanlığı'nın 2015 verileri incelendiğinde, Türkiye'de meme kanseri insidansının kadınlar arasında 43/100.000 oranında olduğu görülmektedir (Meme Sağlığı Dergisi 2011, T.C Sağlık Bakanlığı 2015).

2.2.2. Meme Kanserinin Histopatolojisi

Meme, glandüler ve stromal (destekleyici) olmak üzere iki temel doku türünden oluşur. Glandüler dokular süt üreten bezleri (lobüller) ve kanalları (süt kanalları) oluştururken, stromal dokular memenin yağlı ve lifli bağ dokularını oluşturur. Ayrıca meme, hücresel sıvıları ve atıklar için lenfatik doku-bağışıklık sistemi dokusunu da barındırır (Sharma G ve ark. 2010). Memenin farklı bölgelerinde gelişebilen birçok tümör türü vardır. Çoğu tümör memedeki iyi olan (kanserli olmayan) değişikliklerin sonucudur. Örneğin, kadınlarda gelişen kistler (sıvı birikmiş keseler), fibrozis (yara benzeri bağ dokusu oluşumu), şişlik, kalınlaşmış alanlar, hassasiyet, meme ağrısı gibi bulgular fibrokistik değişikliklere bağlı olarak gelişir ve kansere bağlı olmayan bir durumdur (Sharma G ve ark. 2010). Çoğu meme kanseri, kanalları oluşturan (duktal kanserler) hücrelerde başlar. Bazıları diğer dokularda küçük miktarlarda başlarken, bazıları da lobüllere giden hücrelerde (lobüler kanserler) başlar (Sharma G ve ark. 2010). Meme karsinomlarını, "in situ" ve "invaziv" karsinomlar şeklinde histopatolojik olarak ikiye ayırabiliriz.

In situ (non-invaziv) karsinomlar

In situ meme kanseri hücreleri, kanallarla sınırlıdır ve memenin çevresindeki yağ ve bağ dokularını istila etmez. Duktal karsinoma in situ (DCIS), invaziv olmayan

meme kanserinin en yaygın tipidir (%90). In situ lobüler karsinoma (LCIS) daha az görülür ve artmış meme kanseri riski için bir belirteç olarak kabul edilir (Sharma G ve ark. 2010, Meme Hastalıkları Kitabı 2012).

Invaziv karsinomlar

İnvaziv meme kanseri hücreleri dukt ve lobular duvardan geçen ve memenin çevresindeki yağ ve bağ dokularını istila eder. Kanser lenf düğümlerine veya diğer organlara invazyon gösterebilir. Çoğu meme kanseri invazivdir (%80) (American Cancer Society 2017;2018, Sharma G ve ark. 2010).

2.2.3. Meme Kanserinin Moleküler Alttipleri

Meme kanseri genel olarak tek bir hastalık olarak adlandırılsa da, 21'e farklı histolojik alt tipi ve en az dört farklı moleküler alt tipi vardır. Gen ekspresyonu profilleme teknikleri, pahalı ve karmaşık işlemler olmasına rağmen meme kanserinin moleküler alt tiplerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. (American Cancer Society 2017;2018) Moleküler alt tipler, hormon (östrojen veya progesteron) reseptörlerinin (HR + / HR-) varlığı ve yokluğu ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin aşırı seviyeleri (HER2, büyümeyi teşvik edici bir protein) ve / veya HER2 geninin ilave kopyaları (HER2 + / HER2 -) dahil olmak üzere rutin olarak değerlendirilen biyolojik markerlar kullanılarak belirlenir. Dört ana moleküler alt tip bulunmaktadır (Arpino G ve ark. 2015, American Cancer Society 2017;2018).

Luminal A (HR+/HER2-) (71%)

Diğer alt tiplere göre daha az agresif ve yavaş büyüyen kanserlerdir. Luminal A tümörleri, özellikle kısa vadede en iyi prognozla ilişkilidir. Çünkü bunlar, anti-hormon tedavisine daha duyarlıdırlar (Arpino G ve ark. 2015, American Cancer Society 2017;2018).

Luminal B (HR+/HER2+) (12%)

Luminal A kanserleri gibi, luminal B kanserleri ER + ve / veya PR + 'tir ve Ki67 (aktif olarak bölünen hücrelerin büyük bir kısmının göstergesi) veya HER2 için oldukça pozitif olarak tanımlanır (Arpino G ve ark. 2015, American Cancer Society 2017;2018).

Üçlü negatif (HR-/HER2-) (12%)

Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 negatif oldukları için bu adı alırlar. ABD'de siyah kadınlarda beyaz kadınlara oranla, premenopozal ve BRCA1 gen mutasyonu taşıyan kadınlarda iki kat daha yaygındır. Üçlü negatif meme

kanserlerinin çoğunluğu (yaklaşık %75), gen ekspresyonu profillemesiyle tanımlanan bazal benzeri alt tip sınıfına girmektedir. Üçlü negatif meme kanserleri, diğer tüm alt tiplere kıyasla daha kötü bir prognozuna sahiptir, çünkü bu tümörlerde şu anda hiçbir hedefe yönelik tedavi yoktur (Arpino G ve ark. 2015, American Cancer Society 2017;2018).

HER2-enriched (HR-/HER2+) (5%)

HER2'ce zengin kanserler, diğer alt tiplere göre daha agresif bir şekilde büyümeye ve yayılmaya eğilimlidir. HR+ meme kanserleri ile karşılaştırıldığında daha kötü prognoz ile ilişkilidirler. Bununla birlikte, son yıllarda HER2 + kanserlerinin hedefe yönelik tedavilerinin yaygın kullanımı, bu hastalarda umut vericidir (Arpino G ve ark. 2015, American Cancer Society 2017;2018).

2.2.4 Meme Kanserinin Histolojik Derecelendirilmesi

Hastalığın evresi, kanser teşhis edildiğindeki derecesi ve yayılımı, invaziv kanserin prognozunu hakkında bilgi vermesi açısından oldukça önemlidir. Tümörlerin TNM sınıflandırması icin kullanılan kriterler, tümör boyutu ve meme içinde ve komşu dokulara ne kadar yayıldığı (T), aksiller lenf nodlarına yayılım (N) ve uzak bölgelere metastazların varlığı veya yokluğudur (M) (American Cancer Society 2017;2018, Ferahman M ve ark. 2006).

T, N ve M belirlendiğinde, 0, I, II, III veya IV evrelerinden biri söz konusuysa sınıflama şöyle yapılır; Örneğin evre 0'da in situ (anormal hücreler, kaynaklandığı kanallara veya salgı bezlerine nüfuz etmemişlerdir), evre I erken evre invaziv kanser ve evre IV ise hastalığın ileri evresini tanımlamaktadır (American Cancer Society 2017;2018).

2.3. Meme Kanseri İle İlişkili Genler

Kanser, protoonkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar sonucu hücrelerin büyüme ve yapısal özelliklerinin değişmesi ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile ortaya çıkar. Meme kanserinde, bu genetik değişikliklerin çoğu kişinin yaşamı boyunca kazanılır ve sadece memedeki belirli hücrelerde mevcuttur. Somatik mutasyonlar olarak adlandırılan bu değişiklikler kalıtılmaz. Daha az görülen germline mutasyonları ise kalıtsal özellik taşır ve meme kanseri gelişme riskini arttırır. Kanser gelişimine katkıda bulunan genler onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak iki kategoriye ayrılır (Ingvarsson S ve ark. 2001).

2.3.1. Onkogenler

Bir protoonkogenin mutasyona uğramış versiyonuna onkogen denir. Çoğunlukla, protoonkogenler hücre bölünmesini uyarmak, hücre farklılaşmasını engellemek ve hücre ölümünü durdurmak için işlev gören proteinleri kodlar. Tüm bu işlemler normal insan gelişimi ve doku ve organların devamlılığı için önemlidir. Bununla birlikte onkogenlerin kodladığı proteinler, normal proteinlerin artmış ve/veya farklılaşmış formlarıdır. Böylece hücre bölünmesinin artmasına, hücre farklılaşmasının azalmasına ve hücre ölümünün inhibisyonuna yol açarlar. (Heidi Chial ve ark. 2008)

2.3.1.1. HER-2/neu

HER2, tirozin kinaz aktivitesine sahip, ancak başlangıçta bir sıçan glioblastoma modelinde tanımlanmış, bilinen bir ligand içermeyen bir transmembran reseptörüdür (Gschwind A ve ark. 2004). PI3K / Akt ve Ras / Raf / MEK / MAPK sinyal yolaklarının aktivasyonunu içeren, birbiriyle bağlantılı sinyal iletimi yoluyla hücre büyümesini, sağ kalımı ve farklılaşmayı düzenleyen dört reseptör ailesini (EGFR / HER1, HER2, HER3, HER4) içerir. mRNA ve/veya protein seviyesinde, HER2 geninin amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu erken evre meme kanseri olan hastaların yaklaşık %20'sinde görülür (Yarden, Y. ve ark. 2001). HER2 ile yönlendirilen tedavilerin ortaya çıkmasından önce, artmış HER2 düzeyi, nod-pozitif ve nod-negatif hastalığı olan hastalarda yüksek nüks oranları ve artan mortalite ile ilişkilendirilmiştir (Ross, J. S. ve ark. 2009, Chia, S. ve ark. 2008). Monoklonal antikor olan trastuzumab, özellikle HER2-pozitif erken evre meme kanseri olan hastalar için onaylanmış tek adjuvan tedavidir (Molina MA ve ark. 2001).

2.3.1.2. c-Myc

MYC proteini, hücre büyümesinin, proliferasyonun, metabolizmasının, farklılaşmasının ve apoptozunun kilit düzenleyicisi olan bir transkripsiyon faktördür. MYC protein düzensizliği, meme kanseri gelişimine ve ilerlemesinde rol oynar ve kötü prognozla ilişkilidir. Meme kanserinde görülen myc düzensizliğinden sorumlu birçok mekanizma vardır. Gen amplifikasyonu, transkripsiyonal regülasyon bozukluğu, tümörsupresör kaybı ile onkogenik yolakların aktivasyonu, mRNA ve protein stabilizasyon bozuklukları bu mekanizmalar arasında yer almaktadır. Bu heterojenite giderek artmaktadır (Xu, J ve ark. 2010).

2.3.1.3. Ras

Ras, tüm hayvan hücre soyları ve organlarında ifade edilen, bir protein ailesinin üyesidir. Tüm Ras protein ailesi üyeleri, küçük GTPaz adı verilen bir protein sınıfına aittir ve hücre içi sinyallerin iletilmesinde rol oynarlar (hücresel sinyal iletimi). Ras, sinyale yanıt olarak aktive olduğunda, hücre büyümesi, farklılaşması ve sağ kalım ile ilgili proteinlerin aktivasyonuna yol açar. Ras genlerindeki mutasyonlar, geri dönüşümsüz Ras aktivasyonuna yol açabilir. Bu durum, sinyal uyarımı olmaksızın hücrenin devamlı uyarımına neden olacağından, kontrolsüz hücre büyümesi ve bölünmesiyle sonuçlanır. İnsanlardaki karsinogenezde üç Ras geni (HRas, KRas ve NRas) sıklıkla rol oynar. Ras'ı sürekli olarak aktif hale getiren mutasyonlar, tüm insan tümörlerinin %20 ila %25'inde ve bazı kanserlerin (örn., pankreas kanseri) ise %90'da görülür. (Goodsell, DS ve ark. 1999)

2.3.2. Tümor Baskılayıcı Genler

Hücresel onkogenlerin aktivasyonu, tümör gelismesi ile ilgili iki temel genetik değişiklikten birincisidir. Diğeri ise tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur. Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılarlar. Birçok kanserde bu genlerdeki mutasyonlar, hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen etkiyi ortadan kaldırdığından tümör hücrelerinin anormal çoğalması gerçekleşir. Meme kanseriyle ilişkisi olan tümör baskılayıcı genler; p53, BRCA1 ve BRCA2' dir. (Cooper, G.F ve ark. 2006)

2.3.2.1. P53

P53 proteini, bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre döngüsünün önemli bir düzenleyicisidir. P53 geni kromozom 17'nin kısa kolu üzerinde bulunur ve 53.000 daltonluk bir çekirdek proteini kodlar. Mutasyonla ya da DNA tümör virüsünün onkogen proteini tarafından inaktive edildiğinde, hücre döngüsü düzeni bozulur ve tümör gelişebilir. P53 genindeki mutasyonlar, tümör hücrelerinde en sık görülen genetik değişikliklerdir (Pazarbaşı A. ve ark. 2003).

2.3.2.2. BRCA1 ve BRCA2

İki büyük meme kanseri yatkınlık genleri olan BRCA1 ve BRCA2 tarafından kodlanan proteinler, genom bütünlüğünün korumasından sorumludur. Bununla birlikte, iki protein DNA hasar yanıtında ve DNA onarımında farklı aşamalarda da rol oynar. BRCA1, hem hücre döngü kontrol noktasının aktivasyonunu hem de DNA onarımında

görev alırken, BRCA2, homolog rekombinasyonda rol oynar (Pazarbaşı A. ve ark. 2003).

2.3.3. Tip II Trabsmembran Serin Proteazlar (TTSP)

Proteolitik enzimler (proteazlar), protein degredasyonunun spesifik olmayan katalizörleri ve fizyolojik olaylarda yer alan efektörlerdir (Lopez-Otin C ve ark. 2008). Mevcut proteaz sınıflandırması, katalitik mekanizmalarına dayanılarak yapılır ve serin, sistein, aspartik, glutamik, metalo ve treonin proteazları içerir (Neurath H ve ark. 1984)

Serin proteazlar, virüsler, bakteriler ve ökaryotlarda bulunan, proteaz sınıfların en büyüğüdür (Rawlings ND ve ark. 2006). Serin proteazların 20'den fazla üyesi (S1-S66) tanımlanmış, Bunlar yapısal ve işlevsel özelliklerine göre gruplara ayrılmıştır Grup PA'ya (Proteases of mixed nucleophile, superfamily A) ait serin proteazlar, bugüne kadar en iyi tanımlanmış enzim gruplarından biridir Grup PA'daki serin proteazların çoğunluğu, S1A ve S1B olmak üzere iki ayrı alt aileyi kapsayan S1 ailesine aittir. S1A ve S1B, ortak yapısal mimariyi paylaşan, filogenetik olarak farklı enzim gruplarıdır. S1A proteazları, hücredışı süreçlere aracılık eden ve bitkiler, prokaryotlar ve arkealarla sınırlı bir dağılım gösterirken, S1B proteazları çok daha geniş bir dağıılım gösterir ve hücreiçi olaylardan sorumludurlar (Page MJ ve ark. 2008). Yirmi yıl öncesine kadar, S1A serin proteazlar ağırlıklı olarak salgı enzimleri olarak görülmüştür (Ramsay, AJ ve ark. 2009)

Serin proteaz özelliği olan transmembran sahasına sahip hepsidinin tanımlanması ve karakterizasyonu ile membrana bağlı serin proteaz olarak adlandırılan ve yapısal olarak farklı bir grup tanımlanmıştır (Folgueras AR ve ark. 2008, Du X ve ark. 2008). Hücre yüzey lokalizasyonu nedeniyle membrana bağlı serin proteazların biyolojik fonksiyonları salgısal serin proteazlardan farklıdır. Bu tip proteazlar hücredışı katabolik süreçlerden ziyade, plazma membranındaki önemli olayları düzenlerler (Madison El ve ark. 2003). Hücre yüzeyi ile ilgili proteolitik süreçler, hücre zarından hücre dışı uyaranların transdüksiyonunu, biyoaktif büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve peptid hormonlarının salınmasını düzenler. Ayrıca komşu hücrelerin bazal membran ve hücre dışı matris proteinleri ile etkileşimlerini kolaylaştırır (Madison El ve ark. 2003).

Bu tip serin proteazların, proteaz sahalarının hücre dışı uyumunu sağlamak için hücre membran çift lipit tabakasından gecebilen amino veya karboksil terminal hidrofobik uzantıları vardır. Proteaz sahaları açısından homolojiler olmasına rağmen,

enzimlerin bağlanma sahalarında varyasyonlar mevcuttur. (Hooper JD ve ark. 2001, Szabo R ve ark. 2008)

Serin proteaz ailesinin en büyüğü olan TTSP'lar, ilk olarak yüzyıl önce, enteropeptidazın pankreatik sindirim proteazlarının aktivasyonu için gerekli bir enzim olarak keşfedilmiştir (Kitamoto Y ve ark. 1994)

TTSP'lar, N-terminal bir transmembran sahası, kimotripsin (S1) katının katalitik histidin, aspartik asit ve serin rezidülleri içeren C-terminal bir eksterasellüler serin proteaz bölgesi ve 1-11 protein sahasını içeren bir kök bölgesi ile karakterize edilir (Bugge TH ve ark. 2009).

Normal TTSP biyokimyasal fonksiyonu için kök bölgeleri oldukça önemlidir. Bu bölgelerin zimojen dönüşümünde, substrat tanımada ve proteolitik aktivitede önemli rolleri vardır. TTSP'ler kök bölgelerinde SEA (sea urchin sperm protein/enteropeptidase/agrin), LDLA (low-density lipoprotein receptor class A) MAM (meprin/A5 antigen/receptor protein phosphatase mu), CUB (Cls/Clr, urchin embryonic growth factor, bone morphogenetic protein-1), FRZ (frizzled domain) ve SR (scavenger reseptör domain) olmak üzere 6 farklı protein sahasına sahiptir (Lee MS ve ark. 2007, Knappe S ve ark. 2004). En yaygın TTSP yapısal sahası olan LDLA sahası, makromoleküllerin hücresel kesişimine ve ligand ile uyarılan cAMP sinyalizasyonuna aracılık eder (Cam JA ve ark, 2006, Parkyn CJ 2008, Hopkins EJ ve ark. 2007) SR sahası, modifiye lipoproteinlerin bağlanmasında, adhezyon ve bakteriyel bağlanmada görev alan membrana bağlı reseptörlerde bulunur. Çeşitli proteaz sınıflarında, CUB sahasının substrat tanıma ve / veya yarılma için çok önemli olduğu kanıtlanmıştır (Geach TJ ve ark. 2008, Zhang P ve ark. 2007). Sadece enteropeptidazda bulunan bir saha olan MAM sahası, meprin proteazları ve tirozin fosfataz mu protein oligomerizasyonundan sorumlu iken, FRZ sahası, embriyonik gelişim ve kök hücrenin kendini yenileme sürecinde Wnt proteinleri için reseptörler olarak işlev görür. (Ishmael FT ve ark. 2005, Aricescu AR ve ark. 2007, Teo R ve ark. 2006)

TTSP genleri tüm omurgalılarda bulunur. Bugüne kadar, insanlarda 20 TTSP ailesinin üyesi tespit edilmiştir. Bu aile üyeleri HAT/DESC, hepsin/TMPRSS, matriptaz ve corin olarak dört alt aile adı altında gruplandırılmıştır. TTSP'lerin serin proteaz alanının filogenetik analizi ile birlikte kök bölgesinin protein sahası, bu alt ailesel sınıflandırmaya olanak sağlamıştır.

Alt ailelerin en büyüğü olan HAT/DESC (Human Airway Trypsin-like protease /Skuamöz hücreli karsinomda farklı olarak ifade edilen) alt familya; HAT, DESC1-4, TMPRSS11A ve HAT-like 1-5'i içerir. Tüm HAT / DESC proteazlarının kök bölgesi, tek bir SEA (deniz kestanesi sperm proteini / enteropeptidaz / agrin) bölgesinden oluşur. Diğer HAT/DESC proteazların fizyolojik roller henüz belirlenmemiş olmasına ragmen, skuamoz hücreli karsinomda DESC1 düzeyinin önemli derecede azalmasından dolayı, DESC1'in tümör baskılayıcı özelliği olduğu tahmin edilmektedir. Diğer yandan DESC1'in aşırı ekspresyonu, böbrek, beyin ve meme dokularından köken alan tümörlerde belirlenmiştir ve bunun protümörojenik bir fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. (Ramsay, A.J., ve ark. 2009)

Alt ailelerin ikinci büyüğü ise hepsin/TMPRSS' dir. Bu alt ailenin Hepsin, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4, TMPRSS5/spinesin, MSPL (büyük mozaik serin proteaz) ve enteropeptidazı da içeren yedi üyesi vardır. Hepsinin kök bölgelerinde bir SR (scavenger receptor) sahası vardır. Bu bölgenin öncesinde TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 ve MSPL'de tek bir LDLA (low-density lipoprotein receptor class A) sahası veya SEA, LDLA, CUB dizisi (Cls / Clr, urchin embryonic growth factor, bone morphogenetic protein-1) ve enteropeptidazda ise MAM (meprin / A5 antijen / reseptör protein fosfataz mu) sahası yer alır. (Ramsay AJ ve ark. 2009, Bugge TH ve ark. 2009)

Corin, iki kıvrımlı sahadan oluşan kompleks bir kök bölgeye sahiptir. Bu kök bölge sekiz LDLA sahası ve SR sahasından oluşan bir yapı gösterir. (Szabo R, ve ark. 2008)

Matriptaz alt ailesinin matriptaz, matriptaz-2, matriptaz-3 ve poliseraz-1 olmak üzere dört üyesi vardır. Matriptazlar kök bölgelerinde bir SEA sahası, iki CUB sahası mevcuttur. Matriptaz-2 ve matriptaz-3, 3 LDLA sahası içerirken, matriptaz 4 LDLA sahasına sahiptir. Poliseraz-1'in kök bölgesi bir LDLA sahası, iki aktif ve bir katalitik olarak pasif serin proteaz sahasından oluşur. (Ramsay AJ, ve ark. 2009, Bugge TH ve ark. 2009)

Metalloproteinazlar da dahil olmak üzere proteazlar, kanser hücrelerinin metastatik yayılımı sırasında matriks bariyerlerinin tahrip edilmesinden sorumludur. Tip II transmembran serin proteazlar (TTSP) olarak adlandırılan serin proteaz sınıfı, tümör metastazı ile ilişkili bir enzim grubu olarak öne çıkmıştır. Bu proteolitik enzimler, hücre yüzey proteinleri ve hücre dışı matriks bileşenleri ile etkileşime girecek şekilde

konumlandırılmıştır. Tümör invazyonunda, büyümesinde ve metastazında rol oynar (Parr C ve ark. 2007).

TTSP'ler ayrıca, insanda embriyonik ve postnatal gelişim, hormon işlenmesi, sindirim, kan basıncı regülasyonu ve demir metabolizması gibi fizyolojik olaylarda da oldukça önemli rol oynar. Birçok dokuda ifade edilmektedirler (Bugge TH ve ark. 2009, Tanabe ML ve ark. 2017). Matriptaz-2 meme kanseri mikroçevresinde önemli rol oynar. Matriptaz-2, meme kanserinde demir homeostazını BMP (Bone morphogenetic protein) sinyalizasyonu ile düzenler (Alarmo EL ve ark. 2010). Matriptaz-2, BMP koreseptörü olan hemojuvelinini parçalayarak BMP-SMAD sinyal yolağını bloke eder. Böylece hepsidin ekspresyonu baskılanır (Silvestri L ve ark. 2008, Maxson JE ve ark. 2010). İnsanlarda ve farelerde matriptaz-2 mutasyonları, yüksek hepsidin seviyelerine ve dolayısyla ferroportin seviyelerinin azalmasına sebep olur. Bunun sonucu olarak oral demir tedavisine cevap vermeyen ciddi demir eksikliği anemisi (IRIDA) ortaya çıkar (Finberg KE ve ark. 2008, Melis MA ve ark. 2008, Guillem F ve ark. 2008)

2.3.3.1. TTSP ve Demir Metabolizması

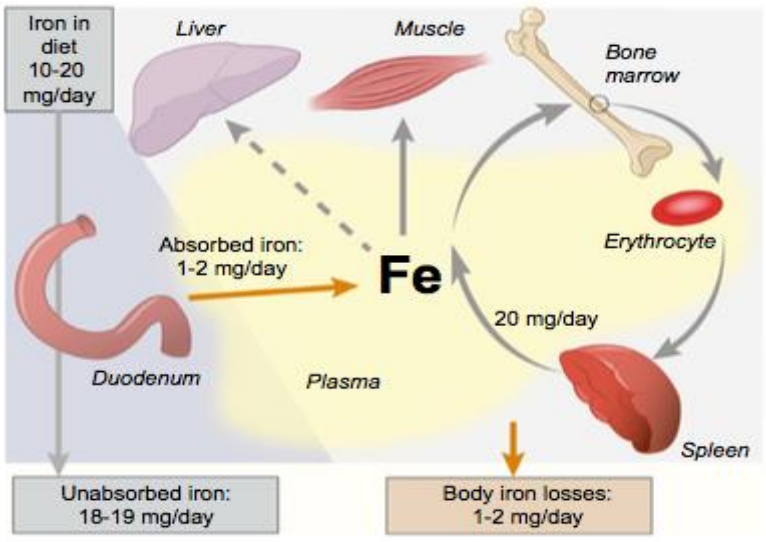
Demir, insan vücudunda bulunan önemli bir eser element ve bir geçiş metalidir. Demir, vücutta ferrik (Fe^{3+}) ve ferröz (Fe^{2+}) formlarda bulunur. Elektron alıp-verme özelliği sayesinde, enerji üretimi ve metabolizmasında görevlidir. Taşıyıcı, depo moleküllerinin ve enzimlerin sensör bileşenidir (Andrews NC ve ark. 1999, Ganz T ve ark. 2011).

Deoksiribonükleotitlerin sentezinden sorumlu enzim olan ribonükleotid redüktaz (RR) hücre bölünme sürecinde önemli rol oynar. RR fonksiyonu için demir zorunludur (Thelander L ve ark. 1979). Demirin kısıtlanması, G1/S bekleme fazında RR aktivitesinin kaybına yol açar (Graslund A ve ark. 1985, Atkin CL ve ark. 1973). Demir varlığının, Mdm2, GADD45 ve p21/WAF1 gibi hücre döngü düzenlenmesinde ve DNA hasar algılanmasında rol oynayan diğer proteinlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Darnell G ve ark. 1999). Ayrıca demir, mitokondride sentezlenen demir-sülfür kümesi içeren proteinlerin ve hem'in fonksiyonel bir bileşenidir (Rouault TA ve ark. 2005). Demir, bu nedenle, hücrenin hayatta kalması, büyümesi ve farklılaşması için esastır (Andrews NC ve ark. 2008). Diğer taraftan, güçlü Lewis asiditesi ve çoklu değerlik nedeniyle demirle ilişkili toksisite ortaya çıkabilir (Buss JL ve ark. 2003). Demir kimyasının bu karakteristik özelliğinden dolayı, Fenton

ve Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla tehlikeli moleküllerin oluşumuna katkıda bulunabilir. Bu reaksiyonlar, hidrojen peroksitin varlığında hidroksil radikalleri ve anyonların üretilmesine neden olan klasik demir katalizli redoks reaksiyonlarıdır. Sonuç olarak, hücrenin kararsız demirindeki fazlalık oksidatif stresin artmasına, DNA, lipidler ve proteinlerde hasara neden olabilir (Marques O ve ark. 2014).

Organizmada bulunan demirin % 60-70'i hemoglobinde ve dolaşan eritrositlerde, %10'u miyoglobin ve sitokromlarda ve demir içeren enzimlerdedir. Kalan %20-30'u gerektiğinde kullanılmak üzere karaciğer ve retiküloendotelyal sistem makrofajlarında depolanır (Uysal Z).

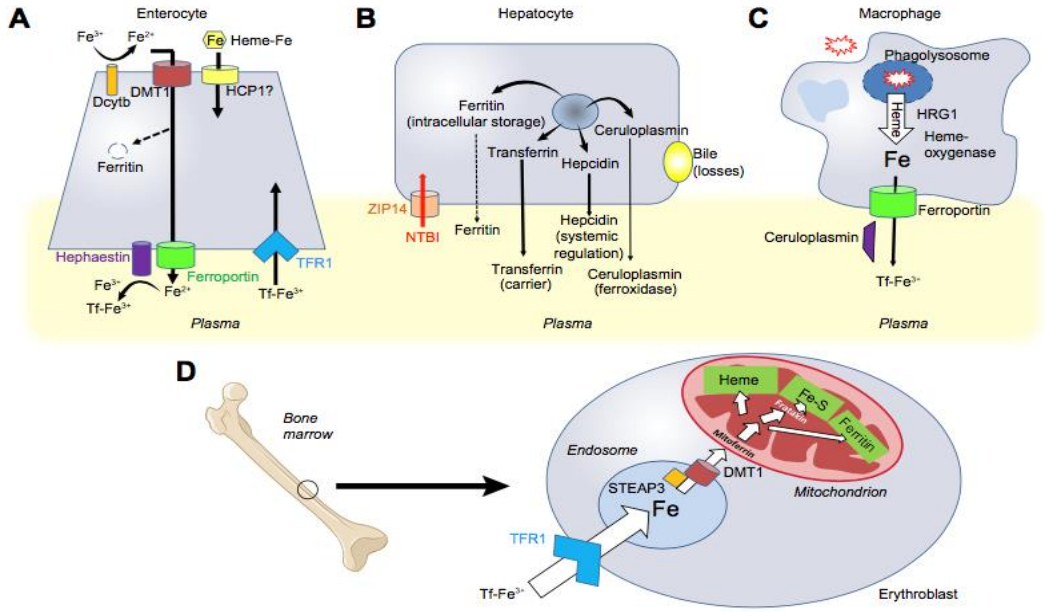
Kanamalar ve gastrointestinal sistemden dökülen epitelial hücreleriyle olan demir kaybı dışında demir kaybı olmamaktadır. Fazlası toksik olan bu elementin sistemik dengesi tamamen emilimin kontrolü ile sağlanmaktadır. Organizmada diyet demirinin %10'u duedenumdan olmak üzere günde 1- 2 mg demir emilir, 1-2 mg demir ise dışkı ile atılır. Demir emilimi ve organizmada demir dengesinin sağlanması özellikle son yıllarda çok fazla araştırılan konulardır (Uysal Z). Demir eliminasyonu için fizyolojik olarak düzenlenmiş bir yol olmadığı göz önüne alındığında demir regülasyonu, duodenumdan diyetle demir emilimi, dolaşımda taşınımı, hücresel alımı ve tüketimi, makrofajlarla geri dönüşümü ve karaciğerde depolanması yoluyla gerçekleştirilir. Genel olarak demir, çoğunlukla sebzelerde inorganik hem dışı demir (±% 10) ve etteki hem demiri (±% 90) olarak diyetle vücuda alınır (Marques O ve ark. 2014, Silva B ve ark. 2015).



Şekil 2.2. Demir homeostazı (Brissot P ve ark. 2016)

Et yemekle alınan hemoglobin ve miyoglobin hemoproteinlerinden kaynaklanan organik hem demiri ve et dışı kaynaklardan alınan inorganik demirin emilim yolları birbirinden tamamen farklıdır. Ette bulunan hemoglobin barsakta intestinal enzimlerle hem ve globuline ayrılmakta, globulin yıkım ürünleri hemi ve organik demiri çözünür halde tutarak absorbsiyonun kolaylaştırmaktadır. Hem demirinin emilimi için duedenal düşük pH ve emilimi kolaylaştıran askorbik asit, sitrik asit gibi faktörlere gereksinim yoktur. Hem demiri ferröz (Fe^{2+}) formda olup, demir eksikliği olduğunda emilimi 2-3 kat artmaktadır. Hem, bağırsak enterositine, hem taşıyıcı protein 1 (HCP1) denilen özel bir taşıyıcı ile girer. Bazı hem demirleri Bcrp / Abcg2 ve / veya Feline Leukemia Virus C Reseptörü (FLVCR) vasıtasıyla enterositleri bertaraf ederek farklı bir yol izleyebilir. Enterositten plazmaya çıkarken inorganik demirle aynı yolu kullanır. Besinlerle alınan hem dışı demirin çoğu ferrik (Fe^{+3}) demir şeklindedir. Çözünürlüğü ve bağırsak enterositine alınması için lümen içi pH'sını düşüren mide asiditesine ihtiyaç vardır. İnorganik demirin emilimi çok kompleks ve moleküler olarak çok sıkı kontrol gerektiren bir sistem içinde düzenlenmektedir (Uysal Z, Silva B ve ark. 2015). İnorganik hem dışı demir, membrana bağlı bir redüktaz olan ve askorbat bağımlı DcytB (Duodenal cytochrome B) ya da Steap2 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2) ile Fe^{+3} (ferrik) formunun Fe^{+2} (ferröz) forma indirgenmesinden sonra DMT1 (divalent metal transporter 1) vasıtasıyla içeriye alınır (McKie AT ve ark. 2001, Ohgami RS ve ark 2006). DMT1, hem dışı demir, kobalt, çinko, kadmiyum ve diğer iyonik formların emiliminden sorumlu bir proteindir. Bağırsak enterositlerinin apikal membranına lokalize olan DMT1'in transkripsiyon seviyesi ve hücreiçi lokalizasyonu, demir varlığı ile düzenlenir (Marques O ve ark. 2014, Uysal Z, Silva B ve ark. 2015). Enterosit içindeki demir daha sonra ya ferritin içinde depolanır ya da seruloplazmin homoloğu bir transmembran proteini olan hepfastinin ferroksidaz aktivitesi ile Fe^{+2} formundan Fe^{+3} formuna okside edilir. Daha sonra bazolateral membranın diğer tarafına bugüne kadar tanımlanan tek demir atıcısı olan ferroportin 1 (FPN1) ile plazmadaki transferrine (Tf) yüklenir (Marques O ve ark. 2014). Hepfastin eksikliğinde duedenal enterositlerde demir fazlalığı ve demir emilim bozukluğuna bağlı hipokrom mikrositer anemi olduğu gösterilmiştir (Uysal Z). Enterositler tarafından emilimini takiben, glukoprotein yapısındaki transferrine bağlanan demir, genel veya özel fonksiyonlar için hücrelere gönderilmektedir. Transferine bağlı demirin (TBI) stabilitesi, demirin oksidasyon hali, protein konformasyonu ve çevresel pH gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

Tf plazmada, demir bağlı olmadığında apo-transferrin (apo-Tf), monoferrik transferrin (tek bir demir atomuna bağlı) ve holo-transferrin olarak da bilinen diferrik transferrin (iki demir atomuna bağlı holo-Tf) olmak üzere üç durumda bulunur. Bu üç Tf durumu, sağlıklı bir bireyde olası demir emiliminin akut artışına karşı organizmada demir fazlalığının toksik etkilerini önler (Young S ve ark.1984).



Şekil 2.3. Demir metabolizmasında rol oynayan temel hücre tipleri (Brissot P ve ark. 2016)

TBI'nın hücre içine alımı, esas olarak hücre zarında bulunan transferrin reseptörü 1 (TfR1) ile sağlanmaktadır (Brown PJ ve ark. 1981). Hücre yüzeyine bağlanan TBI-TfR1 kompleksi, klatrine bağlı endositoza uğrar. Endosom pH'ı, ATP'ye bağımlı bir proton pompasının aracılık ettiği H^+ girişi ile azalır ve Fe^{+3} serbest bırakılır. Endozomda, serbest demir Steap 3 ile indirgenir ve Dmt1 ile sitoplazmaya taşınır (Gunshin H ve ark. 1997, Fleming MD ve ark. 1998. Bu arada, Tf-TfR1 kompleksi plazmaya apo-Tf'nin salındığı hücre yüzeyine gönderilir. Plazmada sıklıkla demire bağlı olmayan transferrin (NTBI) türleri bulunur (Silva B ve ark. 2015).

Organizma, hemoglobin sentezi için çoğunluğu eritroblastlar tarafından kullanılan demire yüksek oranda ihtiyaç duyar (Andrews PA ve ark. 2000). Mitokondri, hücresel demir homeostazını sürdürmekten sorumlu başlıca organelidir. Demir, endozomlardan serbest bırakıldıktan sonra bu organele gönderilir (Shi H ve ark. 2008).

Demir, bir sitosolik demir şaperonu olan poli (rC) ya da bağlanma proteini 1 (PCBP1) ile mitokondriye taşınırken, farklı bir mekanizma ile doğrudan endozomdan da

gönderilebilmektedir (Shi H ve ark. 2008). Demirin ikinci taşınma yolu ise hemoglobin sentezi için gelişmekte olan eritrosilere alınmasıdır. Taşınma mitoferrins 1 ve 2 ile vasıtasıyla olur (Sheftel AD ve ark. 2007, Shaw GC ve ark. 2006). Demir, mitokondride hem biyosentezinde kullanılır. Demir seviyeleri arttığında serbest demir varlığını düşürmek için, demir depolanır. Bu süreç, demir eksikliği sırasında demirin kullanılabilirliğini sağlar. Demir depolamadan sorumlu başlıca protein ferritindir (Ft) (Liu X ve ark. 2005). Ferritin, 24 alt üniteden oluşan globüler bir protein kompleksidir. Ağır (Ft-H) ve hafif (Ft-L) polipeptit zincirlerinden oluşan iki formu bulunmaktadır. Sentezlendiğinde, bu zincirler kendi içinde bir araya gelerek, çekirdeğinde 4500'e kadar demir atomu depolayabilen küresel bir kapsüler yapı oluşturur. Sitozolik Fe^{+2} PCBP şaperonları ile Ft'ye gönderilir, Ft-H altünitesi ile oksidasyon gerçekleştirilirken, Ft-L altünitesi ile çekidek içine alımı sağlanır (Shi H ve ark. 2008). Ft, hücre sitozolü, nükleus ve mitokondrilerde lokalizedir. Aynı zamanda serumda da bulunur (sFt). Mitokondrinin kendine özgü Ft-H-benzeri zincirleri vardır ve mitokondriyal Ft (mFt) sitozolik olandan daha etkin bir şekilde demir depolayabilmektedir (Levi S ve ark. 2001).

Dalak ve hepatik makrofajların ana işlevlerinden biri, yaşlanan eritrositleri temizlemek ve hemoglobinden gelen demiri serbestleştirmektir. Böylece demir diğer bir hemoglobin döngüsü için kullanılabilir hale getirilir (Pollard JW ve ark. 2009). Eritrositler fagolizozomda hidrolitik enzimlere ve hem'in vakuolar sıvıya yayılımını düzenleyen reaktif oksijen türlerine (ROS) maruz kalır. Daha sonra, HO_1, O_2 ile birlikte hem, demir, karbon monoksit ve biliverdine ayırır (Poss KD ve ark. 1997). Makrofajlar ayrıca, eritrosit parçalanması ile seruma salınan hemoglobini de yakalar (Kristiansen M ve ark. 2001).

2.4. Demir Metabolizmasının Regülasyonu

Organizma, demir homeostazını sağlayan mekanizmalara sahiptir. Kontrollü demir emilimi, geri dönüşüm ve depolama bu mekanizmaların bir bölümünü oluşturur. İnsan vücüdunun tek demir kaynağı beslenmedir. Normal bir diyetle günde 10-20 mg demir alınır. Diyetle alınan demirin sadece onda biri (1-2 mg) bağırsaklar tarafından emilir (Silva B ve ark 2015, Brissot P ve ark. 2016) Epitelyal hücrelerinin dökülmesi, terleme ve kanama yoluyla bir miktar demir kaybının dışında demirin vücuttan atılması için aktif bir yol bulunmamaktadır. Ne zaman daha fazla demir gerekse organizma, demirin bağırsak emilimini, makrofajlardan ve depolanan hücrelerden demir salınımını

artırır. Diğer taraftan, aşırı demir yüküne maruz kalındığında, serbest demir fazlalığının toksik etkilerini önlemek için emilim inhibe edilir ve depolama artar. Demir homeostazını sağlamak için gerekli tüm adımlar, hem sistemik hem de hücresel seviyelerde sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Silva B ve ark 2015).

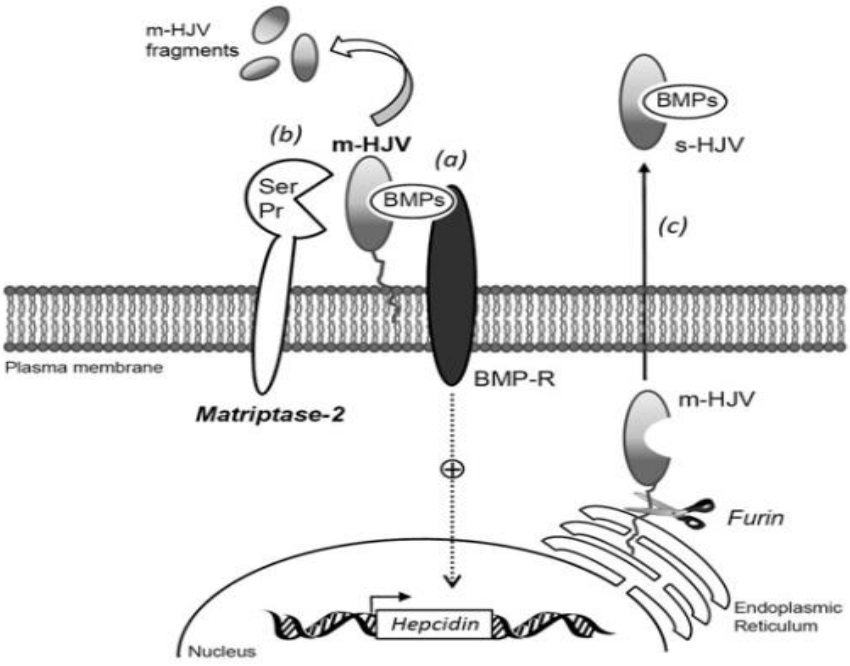
2.4.1. Demirin Sistemik Regülasyonu

Demir homeostazının bilinen majör regülatörü, öncelikli olarak karaciğer tarafından eksprese edilen 25 amino asitlik (aa) bir peptit hormonu olan hepsidindir (Nicolas G ve ark. 2001). Hepsidin hipoksi, anemi, eritropoez, enfeksiyon ve inflamasyon gibi çeşitli fizyolojik durumlarla sistemik demir seviyesini düzenlenmektedir (Lin L ve ark. 2007, Nicolas G ve ark. 2002, Vokurka M ve ark. 2006). Hepsidin, 19 (19q13.1) kromozomunun uzun kolunda yer alan HAMP geni tarafından ifade edilir (Bruno Silva ve ark.). İlk olarak, inaktif 84 aa preproprotein olarak sentezlenir. Bu yapıda bir sinyal peptidi, bir pro-bölge veaktif 25 aa dizi vardır (Hunter HN ve ark. 2002). Olgunlaşma süreci, hücre içinde prohormon konvertaz furinin aracılık ettiği proteolitik bölünme ile gerçekleşir (Valore EV ve ark. 2008). Hepsidin sadece demir emiliminde değil, FPN1'in hücresel ekspresyonunu düzenleme yeteneği ile de, demir homeostazında kritik bir rol oynar (Marques O ve ark. 2014). Hepsidin, FPN1'in hücre içine alımını ve degredasyonunu düzenler. FPN1'e bağlanan hepsidin, FPN1'in hızlıca übikütinasyonunu sağlar. Bu nedenle hepsidin, FPN1 seviyelerini azaltarak sistemik demir metabolizmasını düzenler (Silva B ve ark. 2015).

Sonuç olarak demir beslenme ile alınırken, makrofajlardan, hepatositlerden ve diğer hücre tiplerinden salınır. Hepatositlerin yüzeyinde bulunan çeşitli proteinler "demir sensörleri" olarak kabul edilir. Bunlar hemojuvelin (HJV), HFE, TfR1 ve TfR2'dir (Silva B ve ark. 2015).

Bone morphogenic protein (BMP) yolağıyla sinyal iletimi, hepsidin regülasyonunda merkezi role sahiptir. BMP'ler (BMP2, 4, 6 veya 9 gibi) hücre yüzeyindeki BMP reseptörleri ile etkileşime girer (Truksa J ve ark. 2006). BMP reseptörü aracılığıyla işleyen sinyal yolağı için plazma membranının hücre dış yüzeyine glikosilfosfatidilinositol (GPI) ile bağlanan 50-kDa ağırlığındaki membran proteini olan HJV'ne ihtiyaç vardır. HJV, karaciğerde HAMP ifadesinin ana düzenleyicisi olarak kabul edilir (Babitt JL ve ark. 2006, Silva B ve ark. 2015). Membrana bağlı hemojuvelin (m-HJV), BMP'leri reseptörleri (BMP-R) ile etkileşime girecek şekilde

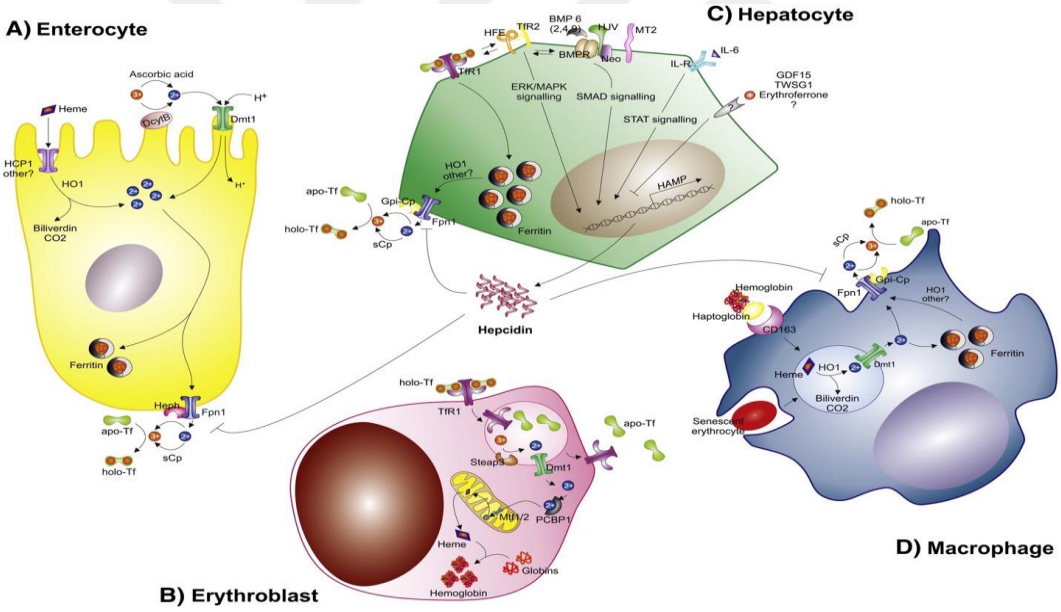
yerleştiren koreseptör olarak işlev görür. M-HJV, BMP ve BMP-R'nin birleşimi, hepsidin transkripsiyonunu arttıran bir hücreiçi sinyalleşme kaskadını tetikler. Serin proteaz (Ser Pr) sahası içeren bir plazma membran proteini olan matriptaz-2, m-HJV'yi küçük parçalara bölerek BMP sinyalizasyonunu ve hepsidin ekspresyonunu baskılayabilir. Serin proteaz sahasından veya proteolitik aktivitesinden yoksun olan matriptaz-2 mutant proteinleri, m-HJV'yi parçalayamaz. Bunun sonucunda hepsidin baskılanması mümkün olmaz. Hepsidin ekspresyonu, m-HJV'nin furin aracılı bölünmesinden kaynaklanan çözünür HJV (s-HJV) ile de bastırılabilir. S-HJV, BMP'ler için m-HJV ile yarışan bir "decoy reseptörü" olarak hareket ederek BMP sinyalini azaltır (Knutson MD ve ark. 2016). GPI'ya bağlı m-HJV'nin yarıklanması, 42-kDa çözünebilir bir HJV (s-HJV) formunu oluşturur. Hepatositlerde yapılan çalışmalar, plazma zarı üzerindeki m-HJV ve s-HJV'nin zıt etkiyle çalıştığını göstermektedir: m-HJV, hepsidin ekspresyonunu arttırırken, s-HJV azaltır. Karşılıklı bu düzenleme, hem m-HJV hem de s-HJV'nin BMP'leri bağlayabilmesinden kaynaklanmaktadır (Knutson MD ve ark. 2016).



Şekil 2.4. Hjv'nin Matriptaz-2 baskılama modelinin BMP sinyalizasyonu ve hepsidin ekspresyonu ile ilişkisi (Knutson MD ve ark. 2016).

HJV hücre yüzeyinde neogenin ile etkileşir. Neogenin, HJV aracılı hepsidin ekspresyonu için olduğu kadar, sHjv üretimi, matriptaz-2 tarafından HJV yarılması ve hepsidin üretimini inhibe etmek için de gereklidir (Silva B ve ark. 2015). Hepsidin

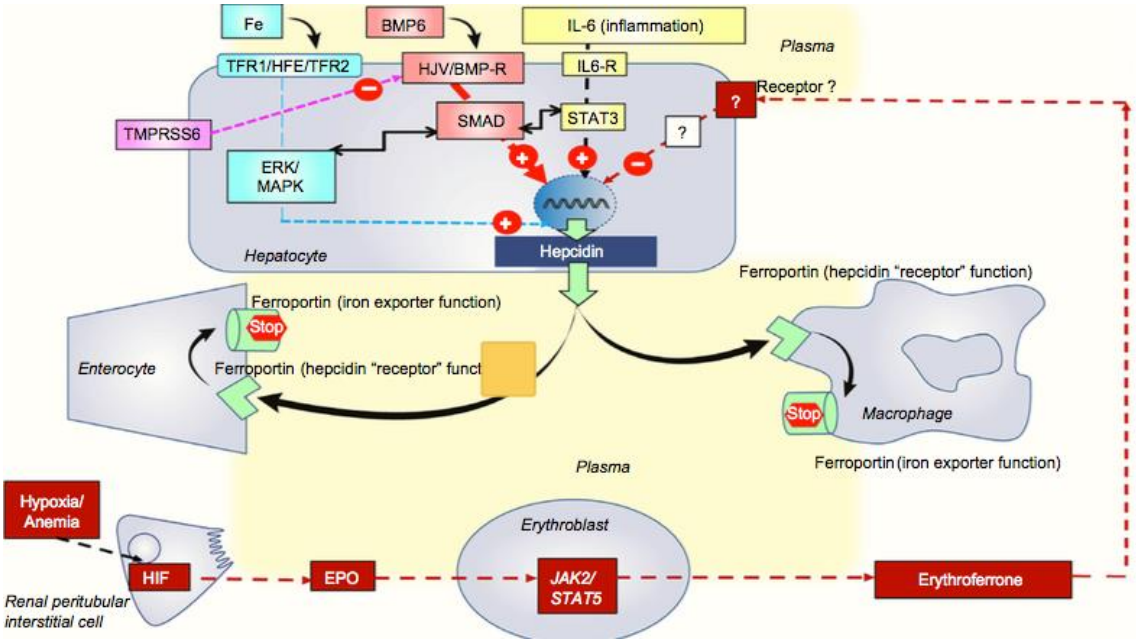
ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumlu başka bir yol, HFE ve TFR2 membran proteinlerini içerir. Demir düzeyinin homeostatik koşullar altında olduğu durumda, HFE hepatosit hücre yüzeyinde kısmen lokalize ve TfR1'e bağlı durumdadır. Plazma demir seviyeleri arttığında, demir yüklü transferrin (Fe^{2+}-Tf) reseptörü için yüksek afinite kazanır. HFE'nin TfR1'e bağlanma alanıyla demir yüklü transferrine (Fe^{2+}-Tf) bağlanma alanı üste geldiğinden HFE, TFR1'den ayrılır ve TfR2 ile bağlanır. Oluşan Fe^{2+}-Tf-TfR2-HFE kompleksi ERK1/2 sinyal yolunu ve sonuçta HAMP ekspresyonunu tetikler HFE ve TfR2, birbirinden bağımsız olarak da diğer sinyal yolaklarını tetikleyebilir. Hücre yüzeyinde HFE'nin hepsidin ekspresyonunu düzenlemesinin yanında BMP'nin reseptörü ALK3 ile etkileşime girerek BMP'nin übikütinasyonunu ve proteasomal degredasyonunu inhibe ederek stabilizasyonunu sağlar (Wu XG ve ark. 2014).



Şekil 2.5. Sistemik demir metabolizması regülasyonu (Silva B ve ark. 2015)

Ferroportin ve hepsidin, sistemik demir homeostazının düzenlenmesi için kritik proteinlerdir. Ferroportin, hücre içi ve hücre dışı demirin giriş çıkışını düzenleyen bilinen tek mekanizmadır. Stabilitesi hepsidin tarafından düzenlenir. Hepsidin, ferroportin üzerindeki spesifik bir loop sahasına bağlanarak fosforilasyonunu sağlar. Ferroportinin fosforillenmesi, hücre içine alınmasına ve proteazom aracılı degredasyonuna yol açar (Pinnix ZK ve ark. 2010).

Ferroportin kanserde yaygın olarak çalışılmamıştır. Bağırsak, karaciğer, kemik iliği ve retiküloendotelyal sistem gibi sistemik demir homeostazında genel olarak önemli olduğu düşünülen dokular dışında sadece sınırlı ferroportin incelemesi yapılmıştır (Zandra K. Pinnix). Ayrıca, ferroportinin hepsidin aracılı yıkımı, meme hücrelerinde ferritin ve demir artışıyla ilişkilendirilmiştir (Pinnix ZK ve ark. 2010).



Şekil 2.6. Sistemik demir metabolizması regülasyonu (Brissot P ve ark. 2016)

Aşırı demir artışı, enfeksiyon ve inflamasyon HAMP ekspresyonunu arttırırken, demir eksikliği, hipoksi, anemi ve eritropoez HAMP ekspresyonunu azaltır (Silva B ve ark. 2015). Diğer organizmalar gibi, patojenler de hayatta kalmak ve çoğalma için demire ihtiyaç duyar. Fakat patojenler hücre dışındayken demirden yoksundur. İnsan vücudu enfekte olduğunda, patojen kendi ihtiyaçları için konakçının demir havuzundan faydalanır. Genel olarak enfeksiyonla ilişkilendirilen hipoferremi, bağışıklık sisteminin çeşitli doğal ve adaptif yanıtlarından biridir. Enflamasyon/ enfeksiyon sırasında hiperferreminin indüklenmesi hepsidin vasıtasıyla olur. Örneğin, farelere hepsidin enjekte edildiğinde serum demir seviyelerinde hızlı bir düşüş gözlemlenir. Dolaşımdaki hepsidin seviyeleri arttıkça, ferroportin degrade edilir. Organizmadan absorbe edilen demir miktarı düşer. Makrofajlardaki ve depo hücrelerindeki vücut demir havuzu durdurulur.

Enfeksiyonlara yol açan patojenler makrofajlar tarafından yabancı elementler olarak kabul edilir ve pro-inflamatuar sitokinler interlökin-6 (IL-6) interlökin-22 (IL-22) ve tip-1 interferonun (INF) ekspresyonu ve salgılanması tetiklenir. Bu sitokinler, hepatositler ve lökositlerde eksprese edilen Toll-like reseptörler tarafından tanınır. Sitokinlerin Toll-like reseptörler tarafından tanınması JAK-STAT3 sinyal yolağını aktive eder. STAT3 faktörünün nukleusa taşınması ve HAMP promotöründeki STAT3 bağlanma bölgelerine bağlanması, HAMP geninin ekspresyonunu tetikler. (Silva B ve ark. 2015). Öte yandan, sHJV ve matriptaz-2 gibi hem çözünür hem de membran proteinlerinin, BMP'leri durdurarak veya mHJV'yi degrade ederek SMAD sinyal yolunu bastırdığı bilinmektedir. Hipoksik koşullarda, HIF-1 protein kompleksi HAMP promotörüne bağlanabilmekte ve hepsidin transkripsiyonunu baskılayabilmektedir. Ayrıca, anemi ve eritropoezde, SMAD ve JAK-STAT sinyalizasyon yollarını inhibe etmek, HAMP ekspresyonunu baskılamak için henüz bilinmeyen membran reseptörleri yoluyla etki eden bazı dolaşım proteinlerinin (GDF15, TWSG1 ve eritroferron) üretildiği düşünülmektedir (Silva B ve ark. 2015, Brissot P ve ark. 2016)

2.4.2. Demirin Hücresel Regülasyonu

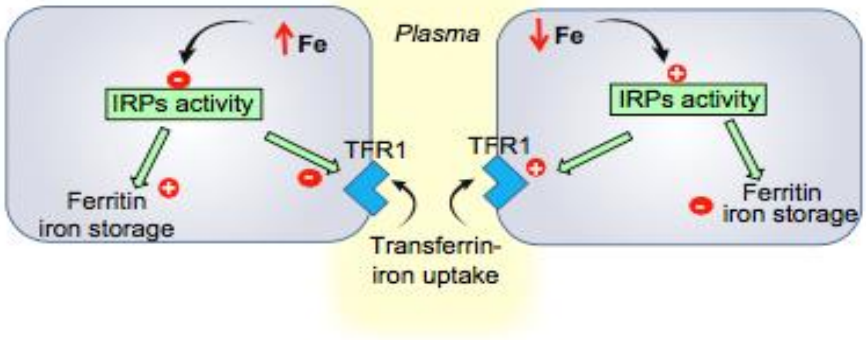
Hepsidin, demir metabolizmasının sistemik regülasyonunda çok önemli bir rol oynasa da, demir metabolizması ile ilişkili genlerin ekspresyonunu hücresel düzeyde düzenleyen spesifik farklı mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalar, alternatif transkript varyantların (transkripsiyonun başlaması, poliadenilasyon ve alternatif splicing gibi) oluşumuna yol açabilen veya mRNA'ların ve proteinlerin stabilitesini kontrol eden daha spesifik sistemlerdir (Silva B ve ark. 2015). Hemen hemen tüm insan genlerinin, RNA stabilitesini, translasyonu ve protein işlemesini etkileyen düzenleyici mekanizmalar yoluyla post-transkripsiyonel düzenlemeye maruz kaldığı tahmin edilmektedir (Bruno Silva ve ark.). Demir metabolizmasının post-transkripsiyonel regülasyonu hem mRNA stabilitesini hem de translasyonunu düzenleyen **IRP/IRE** (İron regulatory protein/İron-responsive elements) ve **mikroRNA'lar** gibi iki spesifik sistemle ilişkilendirilmektedir. Genel olarak, post-transkripsiyonal regülasyon mekanizmaları, hücresel demir metabolizmasının sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Silva B ve ark. 2015)

2.4.2.1. Demir Metabolizmasının Hücresel Regülasyonunda IRP / IRE Sistemi

Hücresel demir düzeyinin korunumu demir alımı, kullanımı ve depolanmasının koordinasyonunu gerektirir. Hücresel demir homeostazı temel olarak transkripsiyon sonrası düzenlemeler ile kontrol edilir. Genel olarak transkripsiyon sonrası düzenleme mekanizmaları, represör veya stabilizatör proteinler yoluyla mRNA sentezini düzenleyerek, protein seviyelerini hızlı ve kolay şekilde kontrol eden düzenleme mekanizmalarıdır (Joshi RS ve ark. 2012).

Demir Düzenleyici Protein (IRP)/Demir-Duyarlı Eleman (IRE) düzenleyici ağı, hücresel demir homeostazını kontrol eden, transkripsiyon sonrası gen ekspresyon düzenleme sistemidir. Bu sistem, Demir Düzenleyici Proteinler (IRP1 ve IRP2) olarak adlandırılan iki RNA bağlayıcı protein ve demir homeostazının önemli proteinlerini kodlayan mRNA'larda bulunan IRE olarak adlandırılan cis düzenleyici RNA öğelerini içerir (Joshi RS ve ark. 2012).

IRP1 ve IRP2 proteinleri, insanlarda hücresel demirin ana regülatörleridir. Demir alımı (Dmt1 ve TfR1), depolama (Ft-H ve Ft-L) ve salınması (FPN1) dan sorumlu proteinleri kodlayan olgun mRNA'ların 5 ′ ve 3′ UTR bölgelerinde bulunan IRE'lere bağlanırlar. IRE'ler yüksek oranda korunmuş ve ikincil yapıya sahip 28-30 nükleotid dizilerdir. Demir eksikliği sırasında, IRP1, IRE'ye yapısındaki bir oyuk yoluyla bağlanırken, aşırı demir varlığında ise aynı oyuk 4Fe – 4S (4 demir 4 sülfür) kümeleri tarafından işgal edildiği için IRP1 IRE'ye bağlanamaz. IRP2'nin aktivitesi, demir tarafından farklı bir şekilde düzenlenir. Hücresel demirin artması, IRP2 übikitinasyonunu ve proteosomal yıkımını artırır. Dolayısıyla IRE'ye bağlanmasını engeller. Hücreler demir azalması durumunda, IRP'ler Ft-H, Ft-L ve SLC40A1'in 5′UTR'lerinde bulunan IRE'lere bağlanarak onların ribozomal birleşmesini ve dolayısıyla translasyonu önler. Aynı zamanda IRP'ler, TFR1 ve SLC11A2'nin 3′UTR'sinde yer alan IRE'lere de onların translasyonlarını artırmak için bağlanırlar. Böylece demir depolama ve ihraç engellenirken demir alımı artar. Demir seviyeleri arttığında, IRP'ler IRE'lere bağlanamazlar (Silva B ve ark. 2015).



Şekil 2.7. Hücresel demir regülasyonu (Brissot P ve ark. 2016)

2.4.2.2. Demir Metabolizmasının Hücresel Regülasyonunda MicroRNA'lar

MicroRNA'lar, diğer RNA'ların antisens düzenleyicileri olarak işlev gören ortalama 22 nükleotid uzunluğunda kodlanmayan RNA'lardır. Fizyolojik süreçlerde (hücre farklılaşması ve gelişimi gibi) olduğu kadar patolojik süreçlerde de rol oynarlar (Silva B ve ark. 2015)

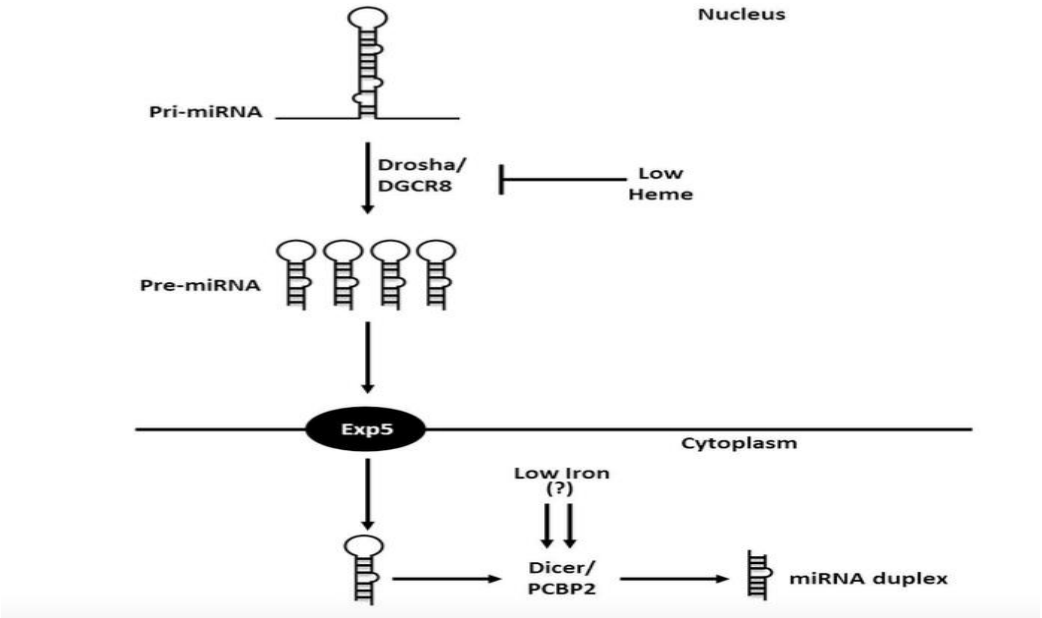
Başlangıçta, çekirdeğin içinde kararlı bir saç tokası yapısına sahip daha uzun RNA'lar (pri-mikroRNA'lar) olarak ifade edilirler. Daha sonra Drosha tarafından, ~ 70 nükleotidlik mikroRNA öncüleri (pre-mRNA'lar) oluşturulup, sitoplazmaya aktarılırlar. Burada da Dicer enzimi tarafından çift zincirli ~ 22 nükleotid mikroRNA'lar olarak işlenirler. İşlenen miRNA ipliklerinden biri, RNA ile indüklenen susturma kompleksi ile (RISC) birleşerek, hedef mRNA'ya bağlanır. Sonuçta translasyon inhibisyonu ve/veya degradasyonu sağlanır (Silva B ve ark. 2015)

Son zamanlarda, mikroRNA'ların demir metabolizması regülasyonunda ve demir ile ilişkili bozuklukların patogenezinde rol oynadığı ifade edilmiştir. İlk çalışmalarda olası mikroRNA'ların çoğu Davis ve Clarke tarafından gözden geçirilmiştir (Davis MK ve ark. 2013). Yakın bir zamanda yapılan çalışmalarda miRNA'lar-130, -199a, -221, -200a ve -223 'ün demir metabolizmasındaki rolleri rapor edilmiştir.

Sistemik demir dengesini düzenleyen BMP-SMAD sinyal yolu, karaciğerde sentez edilen peptid hormon olan hepsidin tarafından kontrol edilir. Demir eksikliği olan fare karaciğerinde miR-130'un artan regülasyonu tespit edilmiştir. Hepatoma kökenli Hep3B hücrelerinde BMP6-SMAD sinyal yolağı miRNA-130'un fonksiyonal

hedefi olarak tanımlanmıştır. BMP tip I reseptörü olan ALK2, miR-130' nın hedefidir. MiRNA-130, ALK2 mRNA stabilitesini azaltmak için, onun 3’ UTR bölgesindeki iki spesifik alana bağlanır. Farelerde, demir eksikliği sırasında karaciğerde artan miRNA-130'un, karaciğerde azalmış Alk2 mRNA seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hep3B hücrelerinde ALK2'nin miRNA-130 tarafından azalan regülasyonu, BMP6 ile indüklenen hepsidin transkripsiyonunu inhibe etmektedir. Sonuç olarak demir eksikliğinde karaciğerde miRNA-130 ifade seviyeleri artmaktadır. Bu durum, ALK2'yi hedef alarak BMP-SMAD sinyalizasyonunu azaltarak, hepsidin sentezini baskılamaktadır. Böylece demir seviyeleri artmaktadır. (Zumbrennen-Bullough KB ve ark. 2014)

MiRNA-199a, HIF-la ve HIF-2a'nın 3’-UTR'lerini hedefler. Hipokside, mikroRNA-199a ekspresyonu azalır, bu da HIF seviyelerini arttırır. Ovaryum kanseri metastazında etkileri ile mikroRNA-199a ve HIF arasında düzenleyici bir ilişki gösterilmiştir. Ayrıca, mikroRNA-221'in Parkinson hastalığının in vitro modelinde TFR2 ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Hem mikroRNA-200a hem de mikroRNA-223 ifadeleri, indüklenmiş alkolik olmayan karaciğer yağlanma hastalığı olan farelerde IRP1 ekspresyonu ile ters orantılı bulunmuştur. Demirin mikroRNA'ların biyogenezi sırasında önemli bir unsur olduğu gösterilmiştir (Silva B ve ark. 2015).



Şekil 2.8. Hücresel demir ve miRNA işlemesi arasındaki ilişki (Davis MK ve ark. 2013)

Örneğin, DGCR8'in (Drosha için bir kofaktör olan hem bağlayıcı protein) aktivitesi, hem demir yokluğundan in vitro etkilenir. Bu durum pri-microRNA'ların pre-

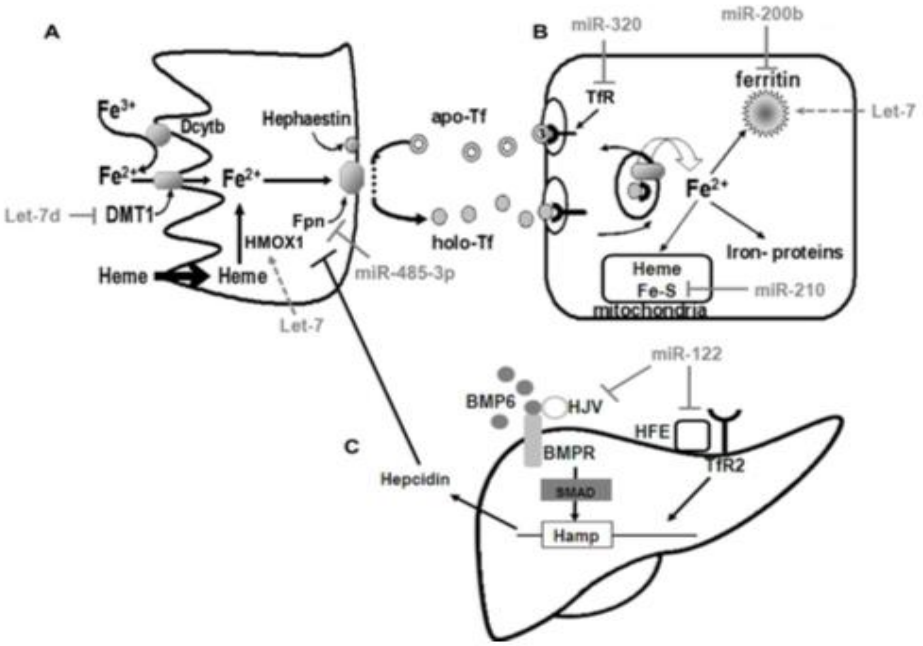
microRNA'lara işlenmesini bozar. Ayrıca, serbest sitozolik demirin, Dicer proteini için kofaktör olan "PCBP2 (poly-cC-binding protein)" ile kenetlenmesi sonucu pre-miRNA'dan olgun miRNA oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Silva B ve ark. 2015).

miRNA	**Target mRNA**	**Reference(s)**
miR-Let-7d	DMT, BACH1	Andolfo et al. (2010), Hou et al. (2012)
miR-122	HFE,HJV	Castoldi et al. (2009)
miR-196	BACH1	Hou et al. (2010)
miR-200b	FTH	Shpyleva et al. (2009)
miR210	ISCU, TFR	Chan et al. (2009), Yoshioka et al. (2012)
miR-214	Lactoferrin	Liao et al. (2010)
miR-320	TFR	Schaar et al. (2009)
miR-485-3p	FPN	Sangokoya et al. (2013)
miR-584	Lactoferrin Receptor	Liao et al. (2010)

Tablo 2.1. Ekspresyonu microRNA'lar tarafından regüle edilen demir metabolizması genleri (Davis MK ve ark. 2013)

Karaciğerde, Tf, TfR2 ve Hfe proteini ile etkileşime girerek BMP ve SMAD sinyalizasyon kaskadını tetikler. Sonrasında HAMP (hepsidin) transkripsiyonunu aktive etmek için BMP-SMAD kaskadı BMP koreseptörü hemojuvelin (HJV) ile etkileşime girer. Karaciğere özgü miRNA122, hepsidin mRNA ekspresyonunu azaltarak sistemik demir homeostazının düzenlenmesine katkıda bulunmak üzere doğrudan HFE ve HJV'yi hedefler. Farelerde yapılan bir çalışmada, modifiye LNA (locked nucleic acid) anti-mir oligotükleotidlerin enjeksiyonu ile miRNA122'nin inhibe edilmesi, hemokromatoz (HFE), hemojuvelin (HJV veya HFE2), BMPR1A ve hepsidin (HAMP) genlerine ait mRNA ekspresyon seviyelerinin artışıyla ilişkilendirilmiştir (Mirco Castoldi ve ark., 2011). Bu mekanizmalarınn tümü, azalan hematopoezin yanı sıra, hem plazma hem de

karaciğer demirinde bir azalmaya sebep olur. Hem HFE hem de HJV doğrudan miR-122'in hedefidir, bu da miR-122'nin demir metabolizması hastalıklarında terapötik müdahale için hedeflenebileceğini düşündürmektedir (Davis MK ve ark. 2013)

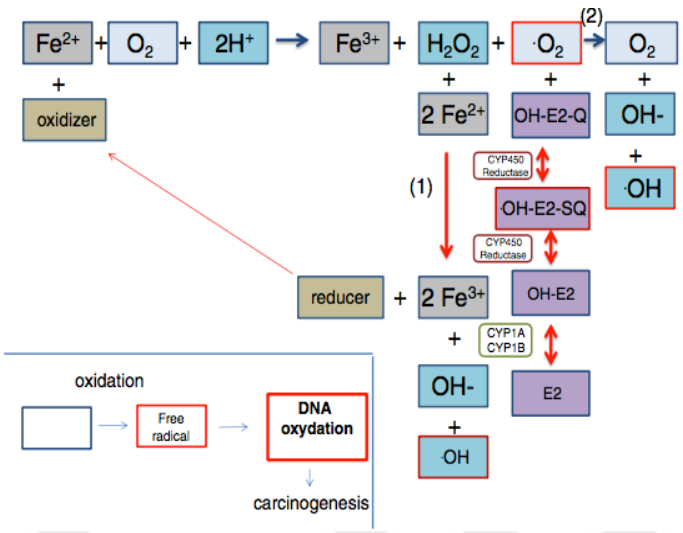


Şekil 2.9. miRNA'nın demir metabolizmasını etkileme potansiyeli. (Davis MK ve ark. 2013)

2.5. Kanserde Demir Metabolizması Düzensizligi

Demir pek çok canlı için esansiyel bir element olup yaşamsal öneme sahiptir. Elektron alıp verme özelliği sayesinde oksijen taşınması, enerji üreim, DNA, RNA ve protein sentezinde rol oynar. Pek çok enzimin yapı ve fonksiyonu için gereklidir. Demir hücre ve organizma için çok önemli işlevlerde rol oynamasına rağmen, serbest formu toksik özelliklere sahiptir. Bu nedenle, esikliği veya aşırı birikmesi birçok patolojik durumların gelişimine yol açar (Silva B ve ark. 2015, Uysal Z).

Demir hücre yaşamı için vazgeçilmezdir; Ancak, aynı zamanda oksidatif stres ve DNA hasarı oluşturabilen toksik bir maddedir. Mitokondri, oksijenden başlayarak süperoksit anyonu (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. ROS daha sonra süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) ile suya dönüştürülür. Süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit varlığında, Fe^{3+}, Fe^{2+} 'ye indirgenir. (Fenton ve Haber–Weiss reaksiyonları) Fe^{2+} karsinogenezde rol oynayan oldukça aktif hidroksil radikallerinin üretimini katalizler (Lamy PJ ve ark. 2014).



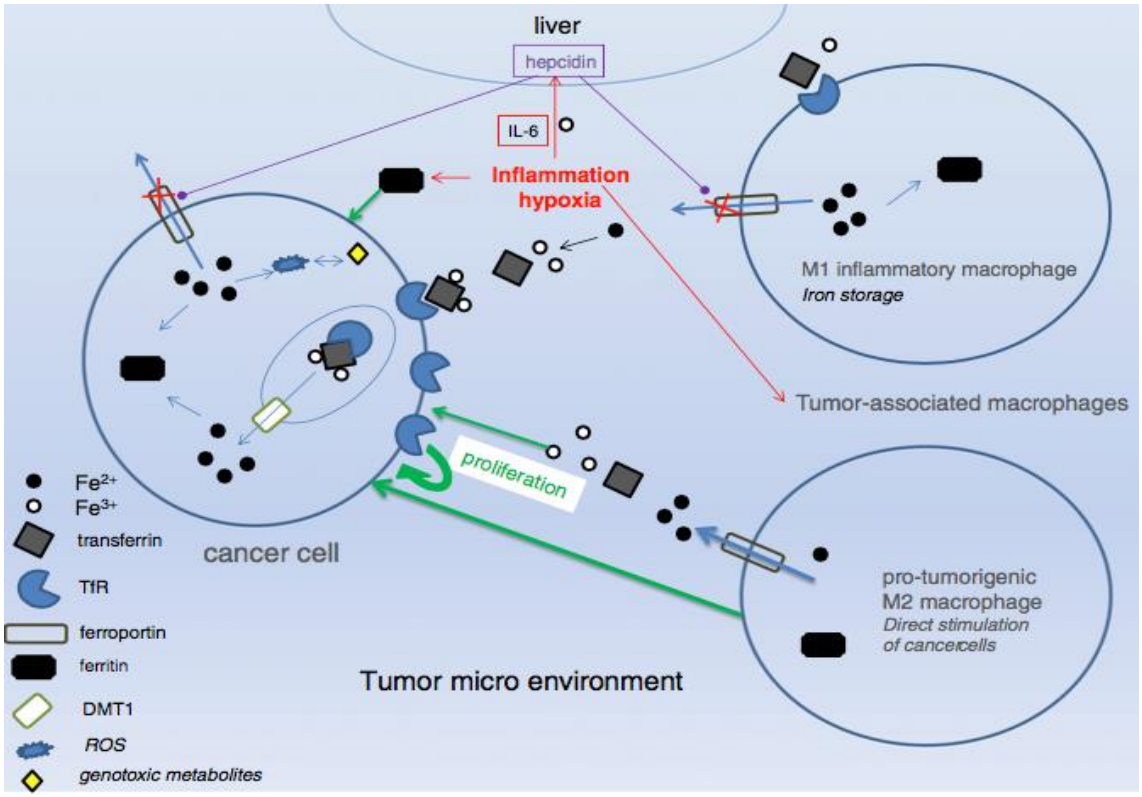
Şekil 2.10. Demir, oksidatif stres ve estradiol karsinogenezde DNA hasarı oluşturur. (Lamy PJ ve ark. 2014).

Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları, serbest radikallerin (OH) oluşumuna yol açmaktadır. Sitokrom P4501A veya 1B (CYP1A / 1B) tarafından estradiol (E2) 'nin hidroksilasyonundan türetilen katekol östrojen metabolitleri (E2-OH), sitokrom P450 redüktazın etkisi ile klon formlarına (E2-OH-Q) ve semikinona (E2-OH • -SQ) dönüştürülür. O_2 üretimi, serbest radikal olarak DNA'ya zarar verebilecek birikime sahip reaktif semikinon oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Lamy PJ ve ark. 2014).

Östrojenler, tümör büyümesini uyararak ve aynı zamanda estradiolün genotoksik metabolitlerinin oluşumuna neden olarak meme karsinogenezini tetiklemektedir. Demir kaynaklı oksidatif stres, bu genotoksik metabolitlerin üretimini arttırabilir. Östrojenlerin hamsterlere uygulanmasının demir depolarının arttığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, kültürdeki hücre östrojen uygulamasının hücre içi demir seviyesinde ve transferrin gen ifadesinde artışa yol açtığı gözlenmiştir. Transferrin ekspresyonunun ve dolayısıyla seviyesinin artması, trasnferrinin otokrin sinyalleme yoluyla hipoksik tümör alanlarındaki kanser hücresi proliferasyonunu arttırmaktadır. Bu nedenle demir ve östrojen arasındaki aktivasyon döngüsü meme kanseri gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Lamy PJ ve ark. 2014).

Oksidatif stres ayrıca MAP kinazları içeren transdüksiyon yollarınıda aktive edebilir. Bu durum AP-1 ve NF-Kappa B'ye bağlı hücre büyümesi ve proliferasyonunda rol oynayan bazı genlerin ekspresyonunun regülasyonunu etkileyebilir. Aşırı demir

birikimi, humoral immünitenin ve fagositozun azalmasına sebep olmaktadır. T lenfositlerin işlevini etkilediği için demir bir immun regülatördür. Dolayısıyla demir düzeyinin artması immün yanıtı inhibe edebilir ve CD4 helper sayısını azaltarak kanser hücrelerinin gelişmesine neden olabilir (Lamy PJ ve ark. 2014).



Şekil 2.11. Meme kanserinin mikroçevresi ve kanserde demir düzensizliğinin potansiyel mekanizmaları (Lamy PJ ve ark. 2014)

Tümör mikroçevresindeki inflamasyon ve hipoksi, inflamatuar sitokinlerin (IL-6) salgılanmasına ve hepsidin seviyesinin artmasına neden olur. Bu durum, ferroportin inhibisyonuna neden olarak, kanser hücrelerinde ve M1 makrofajlarında demir depolarının (kararsız demir havuzu ve ferritin) artmasına yol açar. İnflamasyon ayrıca, hücre dışı ferritini (makrofajlar tarafından salınan), anjiyogenez ile ilgili bir sinyal faktörünü, immünosüpresyonu ve proliferasyonu artırır. M2 makrofajlarında, ferroportin regülasyonu artar ve bu durum hücrelerden demir salınımına neden olur. M2 makrofajlarının kültür süpernatanları, kanser hücrelerinin proliferasyonunu indükler. Epitelyal kanser hücrelerinde, artmış transferrin reseptör (TfR) (proliferasyon için bir sinyal faktörü olarak hareket edebilir) ve indirgenmiş ferroportin ekspresyonu, kararsız demir havuzunun artmasına yol açar. Aşırı demir yükü, hücre büyümesini ve

çoğalmasını uyarır, ayrıca doğal ve adaptif bağışıklık sistemler tarafından oluşturulan anti-kanser regülasyonunu da engeller (Lamy PJ ve ark. 2014).

Hücre, sürekli demire ihtiyaç duyar. Organizma, serbest demir toksisitesinden korunmak fakat aynı zamanda tüm biyolojik süreçlerde ihtiyaç olduğunda kullanmak üzere yeterli miktarda demiri sağlamak zorundadır. Tüm organizmalar, demir alımını düzenleyerek demir homeostazını sağlayan mekanizmalara sahiptir. Bununla beraber kanser, inflamatuar ve nörodejeneratif hastalıklar demir homeostazını bozar. Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Yaygın tedavi yöntemlerine rağmen, birçok tümörde kemoterapiye direnç gelişir. Bu sebeple hastalık kontrolü için yeni stratejiler gerekmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda demir metabolizma düzensizliği ile meme kanseri progresyonu, agresifliği ve nüksünü arasında ilişkiler tespit edilmiştir (Marques O ve ark. 2014).

Demir emilimi, depolanması, kullanılması ve taşıması ile ilişkili moleküler mekanizmalarının bozulması hastalıklara neden olabilir. Yaşlılarda demirin birikme eğiliminde olduğu bulguları, aşırı serbest demirin ROS oluşumu üzerinden yaşlanma sürecinde ortaya çıkan çeşitli kronik hastalıkların patogenezinde rol oynayabileceği hipotezine yol açmıştır. Demir ile ilişkili karsinogenez süreci için birkaç mekanizma ileri sürülmüştür. Deneysel veriler demirin indüklediği oksidatif stresin, Haber-Weiss ve Fenton tipi reaksiyonlar yoluyla hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit üretimine yol açtığını ve bu yolla DNA, protein ve organel hasarına neden olabileceğini göstermektedir. Dahası redoks dengesindeki kronik bozuklukların, malignite ile ilişkili spesifik sinyal yolaklarını düzenlediği, ayrıca tümör süpressör kaybına ve onkogen ekspresyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Demirin tümörlü hücre proliferasyonunu arttırmasının yanı sıra, malign hücrelerin klonal genişlemesinde de önemli rol oynadığı varsayılmaktadır. Karsinogenezde rol oynadığı düşünülen demir homeostazı ile ilişkili bazı genler aşağıda özetlenmiştir (Marques O ve ark. 2014).

2.5.1. Matriptaz-2 (TMPRSS6) Geni ve Proteini

Matriptaz-2, kromozom 22q13.1'de lokalize olan TMPRSS6 (transmembran serin proteaz 6) geni tarafından kodlanır. Karaciğerde eksprese edilen membrana bağlı bir serin proteazdır (TTSP) (Webb SL ve ark. 2013).

Matriptaz-2, 88,901 kDa ağırlığında 811-amino asit (aa) inaktif bir zimojen olarak sentezlenir ve proteolitik bölünme ile otomatik olarak aktifleştirilir (Pauline Lee

ve ark. 2009). Yapısal olarak, matriptaz-2, kısa bir 54-aa N-terminal sitoplazmik saha, membran ile ilişkili bir bölge, bir SEA sahası, 2 CUB sahası, üç LDLa sahası ve histidin, aspartatın ve serin rezidülerini içeren tripsin benzeri bir serin proteaz sahasından oluşur (Pauline Lee ve ark. 2009).

Matriptaz-2 tip I kollajen, fibronektin ve fibrinojen gibi ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerini hidrolize edebilir ayrıca in vitro olarak uPA (ürokinaz plazminojen aktivatörü) üzerinde de sınırlı aktivasyon etkisi bulunmaktadır (Henna Tuhkanen ve ark.). Hücre yüzey proteini olan hemojuvelinin bölünmesinden sorumludur. Hemojuvelin hepsidin ekspresyonunu BMP/SMAD yolağı ile düzenler. Demir homeostazında önemlidir (Webb SL ve ark. 2013).

Matriptase-2, farklı insan kanserlerinde aşırı eksprese edildiği gösterilmiş matriptase-1 ile yüksek bir homolojiye sahiptir. Bununla birlikte, matriptaz-1'in aşırı ekspresyonu kanserin kötü ilerlemesine yol açarken, matriptaz-2 aşırı ekspresyonu ise meme ve prostat kanseri ilerlemesini önemli ölçüde azalttığı ve düşük seviyede kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Webb SL ve ark. 2013).

2.5.2. Hepsidin (HAMP) Geni ve Proteini

İnsan hepsidin geni (HAMP) 19. kromozomun uzun kolunda (19q13.1) bulunur. 2637 baz çifti uzunluğundadır. 3 ekson ve 2 introndan oluşur. HNF3β, C/EBPβ ve NF - κB gibi düzenleyici faktörler için bağlayıcı alanlara sahiptir. HAMP geni, bir prekürsör olan preprohepsidini kodlar. Preprohepsidin, 84 amino asitlik uzunluğundadır; N terminalinde 24 amino asitlik lider peptid, 35 amino asitlik probölge ve C terminalinde 20/25 amino asitlik olgun peptit içerir. Preprohepsidin daha sonra hepsidini oluşturan 60 aa prohepsidin'e bölünür. Hepsidinin 25 amino asitlik, 22 amino asitlik ve 20 amino asitlik peptit olmak üzere üç formu vardır ve 25 disülfid bağı ile bağlanan sekiz sistein rezidü içerir. İki anti-paralel iplik arasında dört disülfid bağı ile stabilize edilen basit bir saç tokası yapısı bulundurur. Saç tokasının dönüşünde bulunan disülfür köprüsünün önemli fonksiyonları olduğu tahmin edilmektedir (Kwapisz J ve ark. 2009).

Hepsidin, başlangıçta insan kanı ultrafiltratında ve idrar örneklerinde küçük bir bakterisit peptid (defensin ve katelisidin) ve karaciğerde eksprese edilen antimikrobiyal peptit (LEAP – 1) olarak keşfedilmiştir. ‘Hepsidin’ ismi, sentez yeri hepatositler (hep-) ve antimikrobiyal aktivitesinden (-cidin) kaynaklanır. Hepsidin kodlayan gen (HAMP, 19q13) karaciğer, kalp, akciğerler, beyin, omurilik, bağırsak, mide, pankreas,

adipositler, iskelet kasları, testis ve makrofajlarda eksprese edilir. Bu protein demir seviyesinin önemli bir düzenleyicisidir. Bağırsak enterositlerinden demir emilimini, makrofajlardan demir salınmasını ve plasenta boyunca demir taşınmasını azaltır. Hepsidinin hepatositlerde sentezi, aşırı demir yüklenmesi, inflamatuar sinyaller, artmış eritropoez, hipoksi ve anemi ile düzenlenebilir. (Kwapisz J ve ark. 2009).

2.5.3. Hemojuvelin Geni ve Proteini

İnsanda hemojuvelin (HJV), HFE2 geni tarafından kodlanır. HFE2 geni 1. kromozomunun uzun kolunda (1q21.1) lokalizedir. Memelilerde 4 ekzonlu bir gendir (Nili M ve ark. 2013). HJV, hücre yüzey transforming growth factor β super ailesine ait siktokinlerin alt ailesidir (Xia Y ve ark. 2008).

Hemojuvelin (HJV), hepsidin ekspresyonunu düzenleyerek sistemik demir alımını ve salımını kontrol eden, demir metabolizmasının kilit bir molekülüdür. HJV'deki mutasyonlar insanlarda hızla ilerleyen bir demir yükü bozukluğu olan Jüvenil Hemokromatozise neden olur. Aynı zamanda RGMc (repulsive guidance molecule c) olarak da bilinen HJV, üç proteinli RGM ailesinin bir üyesidir. RGM'ler, ~% 50 amino asit özdeşliği olan GPI-bağlı glikoproteinlerdir. RGMa ve RGMb'den farklı olarak HJV/RGMc, hem tek zincirli hem de iki zincirli izoformlardan oluşur. RGMa ve RGMb'nin her biri gelişim sırasında merkezi sinir sisteminde ifade edilir ve aksonal patern ve nöronal sağkalımı kontrol etmede rol oynarlar. HJV/RGMc karaciğerde ve kalp ve iskelet kaslarında sentezlenir (Nili M ve ark. 2013).

RGMc/hemojuvelin proteinin hücre zarı üzerinde iki formu bulunur. Membranla ilişkili RGMc, hem tek zincirli 50-kDa polipeptit hem de 20-kDa NH2-terminal ve 35-kDa COOH-terminal alt-birimlerinden oluşan bir disülfür bağlı heterodimerden oluşur. Çözünür RGMc ise membrane bağlı 50-kDa proteinin, proprotein konvertazlar tarafından bölünmesiyle 50-kDa ve 40-kDa'luk iki form olarak oluşur (Kuns-Hashimoto R ve ark. 2008).

RGM'lerin, hücre büyümesini, adhezyonunu, göçünü ve invazyonunu baskılayarak prostat kanserinde inhibitör rol oynadığı gösterilmiştir. RGM'ler, prostat kanseri ve meme kanseri hücrelerinde, BMP'lerin SMAD bağımlı ve SMAD bağımsız sinyalizasyonunu koordine edebilir. Ayrıca, meme kanserinde RGM'lerin anormal ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Lin L. ve ark. 2005).

2.5.4. FPN1 Geni ve Proteini

IREG 1 veya MTP1 olarak da bilinen Ferroportin-1 (FPN1), insanlarda SLC40A1 geni tarafından kodlanır. 2. kromozomun uzun kolunda (2q32.2) haritalanmıştır. 9 ekzonu bulunmaktadır. Ferroportin (FPN) ailesinin parçası olan bir proteindir (Cianetti L ve ark. 2010, Donovan A. ve ark. 2005, Ward D ve ark. 2012). FPN1 geni, 62 KDa ağırlığında 571 amino asitlik bir protein kodlar. Çok geçişli integral membran proteinidir ve en az dokuz transmembran alfahelikaza sahiptir (Cianetti L ve ark. 2010).

Ferroportin, demirin hücre içinden hücre dışına taşınmasını sağlayan bir transmembran proteindir. Demir, bağırsak hücrelerince emildikten sonra ferroportin, demirin bu hücrelerden kan dolaşımına taşınmasını sağlar. FPN1'in, duodenal enterositlerde (demir alımı ve dolaşımda dışa aktarma), hepatositlerde (depolama), sinsiyotrophoblastlarda (embriyoya transfer) ve retiküloendotelyal makrofajlarda (yaşlanan kırmızı kan hücrelerinden demir geri dönüşümü) başta olmak üzere, memelilerdeki birçok hücrede demir homeostazında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Cianetti L ve ark. 2010).

2.5.5. IRP1 Geni ve Proteini

Demir yanıt proteinler 1 ve 2 (IRP1 ve IRP2), hücresel demir düzeyini optimize etmek için transkripsiyon sonrası demir metabolizma genlerinin ekspresyonunu düzenleyen, sitozolik demir konsantrasyonlarına duyarlı proteinlerdir. IRP1, 9p21.1 lokalizasyonunda bulunan ACO1 geni tarafından kodlanmaktadır. IRP2 ise 15q25 lokalizasyonunda bulunan IREB2 geni tarafından kodlanır. Demir eksikliği olan hücrelerde IRP'ler, ferritin, transferrin reseptörü ve diğer demir metabolizma transkriptlerinin mRNA'larında bulunan demir yanıt veren elementlere (IRE'ler) bağlanırak, demir alımını arttırıp, demir salınımını azaltır (Joshi RS ve ark. 2012).

IRP'ler, β-hidroksi-asit metabolitlerinin izomerizasyonunu katalize eden beş dallı bir Fe-S küme bağımlı hidrolaz ağacı olan akonitaz ailesinin üyeleridir. Ailenin yapısal prototipi, mitokondriyal akonitazdır. Çoğu ökaryotik hücreler aynı zamanda IRP’lere ~% 30 amino asit dizisi özdeşliğine sahip enzimin sitoplazmik bir versiyonuna da sahiptir. Tam bir Fe-S kümesine sahip olan IRP1, sitoplazmik akonitazdır (Volz K ve ark. 2008).

IRP1, demir metabolizmasının kontrolünde IRE'ler bağlanan bir protein olarak anahtar rol oynar. Akonitaz enziminin sitoplazmik izoformu olarakta işlev gördüğünden, çift fonksiyonlu bir proteindir. Akonitazlar, işlevleri için bir 4Fe-4S kümesi (iron-sulphur cluster, ISC) gerektiren bir demir-sülfür enzimi grubudur. ISC, sitrik asit döngüsü sırasında ara akonitaz vasıtasıyla sitratın izositere dönüşmesini katalize eder. Aktif bölgenin sistein kalıntılarına üç demir atomu bağlanır, dördüncü bir demir serbest kalır ve katalitik sürece aracılık eder. Sitozolik akonitaz (s-akotinaz) olarak işlev gören IRP1, sitozolde sitratın izosite dönüşümünü katalize eder. Mitokondriyal akonitaz (m-akotinaz) ile %30 oranında amino asit dizi homolojisine sahiptir. Bu sebeple mitokondriyal matristede aynı reaksiyonu katalize eder. Demir eksikliğinde, ISC, IRP1'den ayrılır ve IRP1 apo-proteine dönüşür. Böylece apo-IRP1, demir metabolizma transkriptlerinin mRNA'larında bulunan IRE'leri bağlama yeteneği kazanır. IRP1'in regülasyonu ISC'ler ile sağlanmaktadır (Joshi RS ve ark. 2012).

IRP1 proteini dört globüler sahadan oluşur. C-akonitaz formunda, 1-3 arası sahalar kompaktır ve bir polipeptit bağlayıcı protein aracılığıyla 4. saha ile birleştirilir. ISC, bu dört sahanın merkezidir. ISC yapısı ve çevresi s- akonitaz ve m-akonitaz arasında oldukça iyi korunmaktadır. Bununla birlikte, holo-IRPl'in (889 amino asit proteini) genel yapısı, daha küçük olan m-akotinaza göre amino asit açısından farklılıklar gösterir (780 amino asit) (Joshi RS ve ark. 2012).

2.5.6. MiRNA 122 Geni ve Proteini

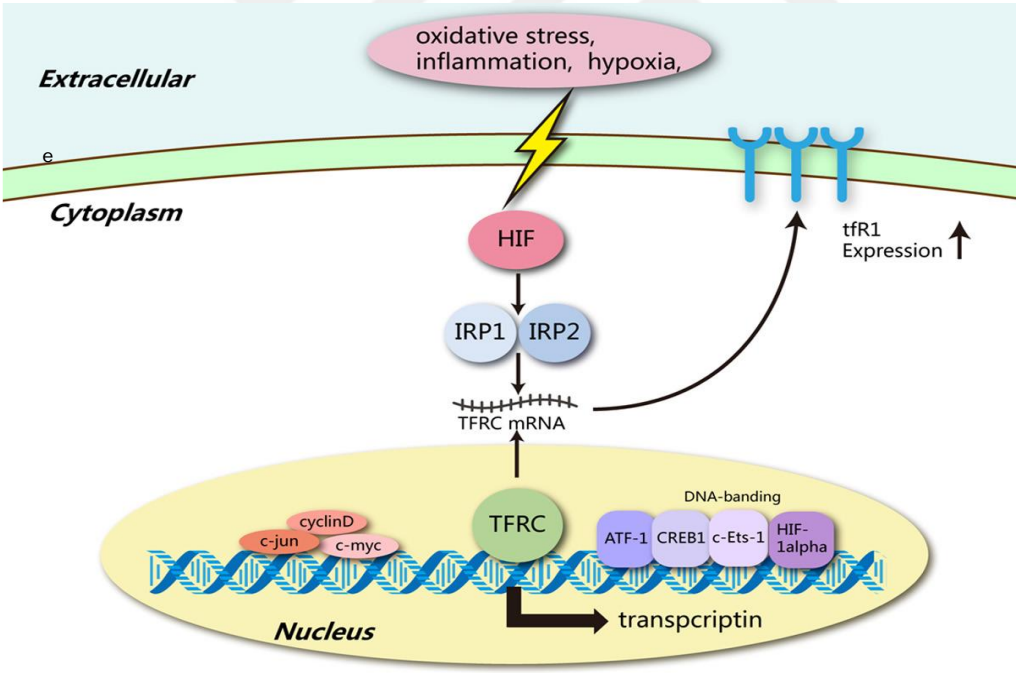
Mir-122 geni, insanda 18. kromozomun uzun kolu üzerinde lokalizedir ve RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. Oluşan pri-miRNA122 nukleusta pre-miR-122'ya, daha sonra sitoplazmada olgun miR-122'ye dönüştürülür. Hepatik hücre hatlarında C /EBPa, HNF1a, HNF3a ve HNF4a [9, 23] ve HNF6 gibi birkaç transkripsiyon faktörünün, miRNA122 gen ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (Thakral S ve ark. 2015).

Omurgalılarda tamamen korunmuş karaciğere özgü bir miRNA olan miRNA122, karaciğer homeostazının korunması için önemlidir. Kolesterol, glukoz ve demir homeostazı, lipit metabolizmasını düzenlemenin yanında, hepatit C virüsünün (HCV) ve parazitik protozoa Leishmania donovanin neden olduğu enfeksiyonlarda da rol oynar (Thakral S ve ark. 2015).

2.5.7. Transferrin Reseptör 1 Geni ve Proteini

TFRC geni tarafından kodlanan transferrin reseptörleri (TFR'ler), transferrine (TF) bağlanan bir membran glikoproteinidir. TFRC geni insanda 3. kromozomun uzun kolunda haritalanmıştır (3q29). Olgun TFR transkripti, 760 amino asit kodlayan 19 eksondan oluşur. (http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_TFRC.html). TFR'nin moleküler ağırlığı 180 kDa'dır. Her bir monomer transferrini bağlayan bir C-terminal saha, kısa bir N-terminal saha ve bir tek transmembran saha içerir.

Transferrin (TF), Fe^{+3} 'ü bağlayan serum proteinidir. Transferin tarafından taşınan demir, hemoglobin sentezi için temel bir demir kaynağıdır. Demir taşıyan TF ile TFR etkileşime girerek demirin hücresel alım süreci başlatılmaktadır. Bir homodimer olarak transferrin reseptörleri, transferrin reseptörü 1 (TFR1) ve transferrin reseptörü 2 (TFR2) olmak üzere iki alt tipe sahiptir. TFR1, hücrelerin yüzeyinde bulunan her hücrede eksprese edilen bir homodimerik tip II transmembran glikoproteinidir. TFR2 ise esas olarak karaciğerde eksprese edilir (Shen Y ve ark. 2018)



Şekil 2.12. TFRC transkripsiyonun regülasyonu (Shen Y ve ark. 2018)

Tümör progresyonuna ile ilişkili TFR1'in, karaciğer, meme, akciğer ve kolon kanseri hücrelerinde fazla eksprese edildiği gösterilmiştir. TFR1'in çeşitli kanserlerde anormal olarak ifade edildiği göz önüne alındığında, kanser hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü, invazyonunu, apoptozunu ve metastazını etkileyebilir. Meme

kanseri hücrelerinin büyümesi için demir alumina ihtiyaç vardır. Bu da TFR1'in overekspresyonu ile gerçekleşir. TFR1'in insan meme kanserinde aşırı eksprese olduğu için kanser hastalarını erken aşamada teşhis etmek ve tedavi etmek için uygun bir biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir (Shen Y ve ark. 2018).

2.6. Kanserde Anemi

Kırmızı kan hücreleri, akciğerlerde oksijene bağlanan ve onu vücuttaki dokulara taşıyan demir açısından zengin bir protein olan hemoglobini taşır. Anemi, yeterli miktarda kırmızı kan hücresi olmadığında veya kırmızı kan hücreleri yeterli fonksiyonu göstermediğinde ortaya çıkar. Hemoglobin değeri erkekte 13,5 g / dl'den az, kadında ise 12,0 gm / dl'den düşük ise anemi teşhisi konabilir. Çocuklar için normal değerler yaşa göre değişmektedir (American Society of Hematology).

Kanser hastalarında anemi sıklıkla bildirilmektedir. Kanser genellikle, başlangıçta plazma demir düzeylerindeki azalmaya bağlı olan azaltılmış transferrin saturasyon katsayısına (TSC) sahip normokromik, normositik, rejeneratif olmayan anemiye yol açabilen kronik inflamasyonla ile ilişkilidir. Sideropenianın (henüz demir eksikliği anemisine dönüşmemiş demir eksikliği) nedeni besinsel demir eksikliği değildir. Çünkü vücut demir depoları azaltılmamıştır. Sideropenianın nedeni kanser hücreleri ve kanser dokusunu infiltre eden makrofajlar tarafından pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-1a, IL-6, interferon gama, TGF beta ve TNF alfa gibi) salgılanmasıyla ilişkili inflamasyondur. Pro-inflamatuar sitokinler serbest radikaller üreterek, eritroid progenitör hücrelerin diferansiyasyonunu ve proliferasyonunu, apoptoza neden olarak ya da reseptörleri için eritropoietinin (EPO) bağlama kapasitesini değiştirerek doğrudan inhibe ederler. Pro-inflamatuar sitokinler ayrıca eritropoietinin (EPO) sentezini inhibe eder ve EPO tedavisine direnç oluştururlar. Demir ayrılmasını indükleyerek doğrudan demir homeostazını da etkilerler. Aneminin hipokrom ve mikrositik bir forma doğru ilerleyişi ortaya çıkar. Inflamasyona karşı bağışıklık yanıtı sırasında salgılanan IL-6 ve LPS, demirin duodenal emilimini inhibe eden, makrofajlar tarafından demir ayrılımını teşvik eden ve bunun geri dönüşümünü sınırlandıran hepsidinin karaciğerde üretimini uyarır. Aynı inflamatuar sinyaller duodenal enterositlerde ferroportin ekspresyonunu azaltarak demirin enterositlerden transferrine taşınması engeller. İnterlökin 10 (IL-10), kanserle ilişkili inflamasyon anemisinde görülen demir homeostazının düzensizliğinde rol oynar. Kanser hastalarında anemi, aynı zamanda, gizli kanama, hemoliz, kemik iliği

metastazı veya kemoterapi ile ilişkili miyelotoksisite gibi demir eksikliğine neden olan diğer nedenlere de bağlı olabilir. (Lamy PJ ve ark. 2014)

Vücudun demir homeostazını dengede tutan yüksek düzeyde organize ve düzenlenmiş bir sistem mevcudiyetine rağmen, genetik, fizyolojik veya çevresel düzeylerdeki çeşitli faktörler, aşırı demir yükü veya yetersizlik koşullarının ortaya çıkmasına yol açabilir. Aşırı demir yüklenmesi sırasında, demir metalinin karaciğerde, kalpte ve diğer dokularda biriktiği görülür (Silva B ve ark. 2015).

Organizmada demir eksikliği, çeşitli anemi türlerinin gelişmesine neden olur. Demir eksikliği de edinilmiş veya genetik olarak sınıflandırılabilir. Demir eksikliği patolojilerinin en sık görülen örnekleri demir eksikliği anemisi (IDA), kronik hastalıkların anemisi (ACD) ve demir tedavisine dirençli demir eksikliği anemisidir (IRIDA) (Clark SF ve ark. 2008, Weiss G ve ark. 2005, Beutler E ve ark. 2007).

IDA dünya çapında en sık görülen beslenme yetersizliğidir. Premenopozal kadın, çocuklar, sık sık diyagnostik kan örneklemesi gerektiren hastalar ve kan kaybeden hastalar gibi belirli gruplarda daha sık görülür. Ayrıca, demir açısından yetersiz bir beslenme sonucu olarak da ortaya çıkabilir. IDA hastalarındaki belirtiler, aşırı yorgunluk, termoregülasyonun bozulması, bağışıklık fonksiyon bozukluğu ve çocuklarda psikomotor ve bilişsel anormalliklere yol açabilen nörobilişsel hasar ile kendini gösteren mikrositik ve hipokromik anemidir. Kronik hastalıkların anemisi (ACD), kronik bir hastalığın sonucu olarak kalıcı bir inflamasyon durumu gösteren bireyden kaynaklanan bir durumdur. İnflamasyon sırasında, makrofajlar, hepsidin ekspresyonunu tetikleyen pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-6 yüksek düzeylerde üretilir. Diyet demir emilimini ve depolanmış demir salımını azalır ve sonuç olarak, anemi gelişir (Silva B ve ark. 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışma Grubu

Çalışmamız, İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi/Meme Cerrahisi Anabilim Dalı'nda yeni meme kanseri tanısı konmuş, herhangi bir tedavi uygulanmamış 75 kadın hastanın cerrahi operasyon sırasında alınan tümörlü ve normal dokularında gerçekleştirildi. Tüm dokuların patolojik incelemesi İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Ana Bilim Dalında gerçekleştirildi. Meme kanserli hastaların her birinden rutin tetkik ve tedavi işlemleri öncesinde kan örneği alındı. Çalışma grubumuzu oluşturan hastaların klinik verileri, İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Ana Bilim Dalından alınan patoloji raporları incelenerek elde edildi. Hastaların detaylı olarak incelenen patoloji raporlarından hastaların yaşı, tümörün yerleşimi, tümörün boyutu, histolojik derecesi, histolojik tipi, nükleer derece, 3'lü negatif, lenf nodu, metastatik durum, klinik aşama, mikrokalsifikasyon, HER-2, ER, PR ve p53 durumları kaydedildi. İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalından hematoloji raporları alınarak hastaların WBC, RBC, HGB, HCT, PLT, MCV, MCH, MCHC ve RDW seviyeleri kaydedildi.

Çalışmamızın tüm deneysel aşamaları Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Cam kültür kapları

Doku homojenizatörü (Bullet-blender, Next Advance)

Penset ve bistüri

Saf su cihazı (Millipore Elix 3)

Çalkalamalı su banyosu (Kotterman)

PZR ve gerçek-zamanlı PZR plaka ve optik kapatıcı

Mikropipet uçları (10 µl, 200 µl, 1000 µl; ExpellPlus)

Mikropipetler (Socorex, Eppendorf)

Manyetik karıştırıcı (Ühromag)

UV-Transilluminatör (Vilber Lourmat)

Soğutmalı santrifüj (Hettich)

Derin dondurucu (-80 C) (New Brunswick Scientific, Sanyo)

Otoklav (Hirayama)

PH Metre (WTW)

Güç kaynağı (PowerEase 500)

Vorteks (Velp)

Santrifüj tüpleri (BluCapp, pre-sterile centrifuge tubes; 1.5mL, 15.0mL ve 50mL)

Gerçek zamanlı PZR cihazı (Applied Biosystems, StepOnePlus Real-Time PCR System)

Buzdolabı ve derin dondurucu (+4 C ve –20 C) (Arçelik)

Nanodrop (Thermo Scientific)

Termal döngü cihazı (9700^{TM} 96-well thermal cycler)

Hassas terazi (CHYO)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Araç-Gereçler, Çözeltiler ve Tamponlar

3.1.3.1. Meme dokularının toplanması ve saklanmasında kullanılan malzemeler

Steril eppendorf tüpler (1.5 mL'lik)

RNA Later solüsyonu

3.1.3.2. Total RNA Eldesinde Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasal Malzemeler

The PureLink® RNA Mini Kit içindeki malzemeler;

Parçalama tamponu

Yıkama tamponu I

Yıkama tamponu II

Spin kartuşu

RNaz içermeyen su

Geri kazanım tüpleri

Toplama tüpleri

The PureLink® RNA Mini Kite ilave olan malzemeler

%70 ve %100'lük etanol çözeltisi

2-merkaptoetanol

Total RNA izolasyon kiti Çözelti ve Tamponunun hazırlanışı

RNA izolasyon kiti (PureLink® RNA Mini Kit, Ambion) çözelti ve tamponunun hazırlanışı Tablo 3.1' de görülmektedir.

Tablo 3-1: Total RNA izolasyon kiti Çözelti ve Tamponunun hazırlanışı

İçerik	Hazırlanışı	Kullanım amacı
Yıkama tamponu-II	60 mL %100'lük etanol eklendi	Kalıntıları uzaklaştırmak
Parçalama tamponu	Her bir doku örneği (30-50 mg) için; %1'lik 1 mL buffer splüsyonuna 10 µL 2- merkaptoetanol eklendi	Hücre membranını parçalar

3.1.3.3. cDNA Sentezinde Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasal Malzemeler

TranScriba revers transkriptaz (20 U/µl), 1 x 100 µl

RNAse Inhibitör (40 U/µl), 1 x 20 µl

5X reaksiyon buffer, 1 x 100 µl

dNTP mix (10 mM), 1 x 50 µl

Oligo $(dT)_{18}$ primer (100 µM), 1 x 30 µl

Random dN-hexamer primer (100 µM), 1 x 30 µl

Nükleaz içermeyen su (DEPC ile muamele edilmiş), 2 x 1.5 ml

Axygen™ 96-well PCR Microplates

Axygen® Ultra-Clear, Pressure-Sensitive Sealing Film

ABI (Applied Biosystems) 9700 96 Well PCR GeneAmp Thermal Cycler

3.1.3.4. qRT-PZR'de Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasal Malzemeler

2X AMPLIFYME SYBR Mix, 2x1 ml

TaqNovaHS polimeraz,

dNTPs,

6 mM $MgCl_2$,

PCR enhancer,

Stabilizatörler,

SYBR® Green I dye.

50X High ROX solüsyon, 80µl

RNAz içermeyen su, 2x1.5 ml

Axygen™ 96-well PCR Microplates

Axygen® Ultra-Clear, Pressure-Sensitive Sealing Film

StepOnePlus™ Real-Time PCR System

3.2. Yöntemler

3.2.1. Meme Kanserli Hastaların Normal ve Tümörlü Dokularından Total RNA İzolasyonu

Cerrahi operasyon esnasında çıkarılan tümörlü ve normal dokular, içinde RNA later bulunan 1,5'luk steril olan ependorflara aktarılarak, +4 ^{o}C'de bir gece bekletildi. Daha sonra RNA later ortamdan uzaklaştırıldı. RNA later solüsyonu uzaklaştırılmış ependorf içindeki dokular total RNA izolasyonu için -80°C dondurucuda saklandı. Doku örneklerinin homojenizasyonu ve total RNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapıldı. Total RNA izolasyonu PureLink® RNA Mini Kit Ambion kullanılarak yapıldı.

1. -80°C'de saklanan dokular öncelikle buz üzerine alınarak çözdürüldü.

2. 30-50 mg normal ve tümörlü meme dokusu folyoya konularak tartıldı. Tartılan dokular buzlu steril petrilerin üzerinde parçalandı.

3. İçerisine 600 µl Lizis/Bağlama tamponu eklenen steril Zirkonyum boncuk içeren vidalı kapaklı tüpler içine alındı.

4. Bullet Blender (Next Advance) homojenizatörde 26.000 g'de 5 dk boyunca lize edildi. Supernatant alınıp RNaz içermeyen tüpe aktarıldı.

5. Tüpün üzerine 200 µl %70'lik etanol ilave edilerek karıştırıldı.

6. Tüm örnek (700 µl) çekilerek filtreli tüpün içerisine aktarıldı.

7. 12,000 x g'de oda sıcaklığında 15 saniye süreyle santrifüj edildi.

8. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve filtre temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.

9. 700 µl yıkama tamponu I'den filtreli tüp üzerine eklendi ve 12,000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Alt tüpte biriken sıvı atıldı ve filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.

10. 500 µl yıkama tamponu II filtreli tüp üzerine eklendi. 12,000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve filtreli tüp yeniden toplama tüpüne aktarıldı.

11. Bir önceki basamak tekrarlandı ve 12,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.

12. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Filtreli tüpün altına 1,5 ml'lik ependorf konuldu. RNA'yı filtreden çözmek için her bir tüpe 100 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

13. 2 dakika 12,000 x g'de santrifüj edildikten sonra çözünerek filtreli tüpün altındaki ependorfa geçen RNA, cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.1.1. RNA Saflığının ve Miktarlarının Ölçülmesi

Hastaların tümörlü ve normal dokularından elde edilen RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop (Thermo Scientific) ile ölçüldü. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu 260 nm'deki optik yoğunluğundan (OD), saflığı da 260 nm/ 280 nm'deki OD değerinden saptandı. Total RNA saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan formüller;

RNA konsantrasyonu (ng/µl)= OD 260 nm x seyreltme faktörü x 40 RNA saflığı= OD 260/ OD 280

3.2.2. cDNA sentezi

Çalışmaya başlamadan önce total RNA konsantrasyonu (ng/µl) en düşük olan örnek baz alınarak, herbir örneğin son RNA konsantrasyonları 100 ng/µl'e eşitlendi ve örnekler arasında normalizasyon sağlandı.

TranScriba Kit kullanılarak cDNA'lar elde edilirken, aşağıda yer alan protokol kullanıldı.

1. Öncelikle -20°C'de muhafaza edilen TranScriba Kit'in bileşenlerini oda sıcaklığında iyice çözdürüldü ve birkaç kez ters çevrilerek karıştırıldı. Daha sonra kısa süre santrifüj edildi ve hemen buzun üzerine alındı.

2. 2X Reverse Transciription (RT) master mix buz üzerinde Tablo 3.3.'e göre hazırlandı. Pipetaj yapılan master mix mikropipet ile MicroAmp Fast Optical 96-well Plate'de her bir kuyucuğa 10 µl olacak şekilde dağıtıldı.

3. Reaksiyon plate şeması önceden tasarlandı. Kuyucuklara dağıtılan reaksiyon karışımına son konsantrasyonları eşitlenen kalıp RNA'lar (Total RNA+ Nükleaz içermeyen H_2O) her bir kuyucuk için 10 µl olacak şekilde ilave edildi. Toplam hacmi 20 µl olan reaksiyon dikkatlice pipetaj yapıldı.

4. Pipetaj işleminden sonra reaksiyon karışımını dağıttığımız kuyucukların üzeri MicroAmp® Optical Adhesive Film ile kapatıldı. Kapatırken hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi.

5. Kısa süre santrifüj edildi ve Tablo 3.2' deki RT reaksiyonuna ait sıcaklık döngüleri kullanılarak ABI (Applied Biosystems) 9700 96 Well PCR GeneAmp Thermal Cycler cihazında cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3-2: RT reaksiyonun sıcaklık döngüleri

Reaksiyonun aşaması	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (dakika)**
1. Basamak	65°C	5 dk.
2. Basamak	42°C	60 dk.
3. Basamak	25°C	5 dk.
4. Basamak	70°C	5 dk.

Tablo 3-3: 2X Reverse Transciription (RT) master mix hazırlanışı ve her bir reaksiyonun final hacmi

Reaksiyon Bileşenleri	**Reaksiyon Hacmi**
5X reaksiyon buffer	4 µl
dNTP mix	2 µl
TranScriba Reverse Transcriptase	4 µl
Toplam 2X (RT) master mix hacmi	10 µl

Her bir reaksiyon için bileşenler	Toplam hacim (µl)
Toplam 2X (RT) master mix hacmi	10 µl
Total RNA+ Nükleaz içermeyen H_2O	10 µl
Toplam	**20 µl**

3.2.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

cDNA sentezinden sonra hedef genlere ait mRNA seviyelerindeki değişimler qRT-PZR yöntemi ile belirlendi. Yöntem, StepOnePlus™ Real-Time PCR System cihazında, AMPLIFYME SYBR Universal Mix kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Hedef genlere ait mRNA miktarlarının doğru belirlenebilmesi için her dokuda ifade edilen referans (housekeeping) gen kullanıldı. Reaksiyon Axygen™ 96-well PCR Microplate'de gerçekleştirildi.

3.2.3.1. Normalizasyon

Her bir hedef genin ekspresyon seviyeleriyle Actin Beta (ACTB) housekeeping geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması ile normalizasyon yapıldı.

3.2.3.2. Deneylerde Kullanılan qRT-PZR TaqMan Primer-Probları

Tablo 3-4: qRT-PZR TaqMan Primer-Prob Dizileri

Genin adı	Primer Çiftleri
ACTB F	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
ACTB R	CGTGGATGCCACAGGACT
TMPRSS6 F	GGTGTGCGGGTGCACTAT
TMPRSS6 R	AGGGACACAGAGTCCATTCAC
HFE2 F	AACTTTACCGTGGCAGCTCA
HFE2 R	GCATCTGAGGGGAAGAGATG
HAMP F	GACCAGTGGCTCTGTTTTCC
HAMP R	TCTGGAACATGGGCATCC

IRP1 F	CCGAGACTGGGCAGCTAA
IRP1 R	TGAATGCGCTCGTAGCTCT
FPN1 F	CCAAAGGGATTGGATTGTTG
FPN1 R	CCTTCGTATTGTGGCATTCA
TFRC F	ACCTGTCCAGACAATCTCCAG
TFRC R	TGTTTTCCAGTCAGAGGGACA
HU-R122 RT	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGAC
	GGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCCAAACACC
HU-R122 F	GCGGTGGAGTGTGACAA
RNU44 R	CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT
RNU44 F	CCTGGATGATGATAAGCAAATG
	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGAC
RNU44 RT	GGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCAGTCAGTT

3.2.3.3. qRT-PZR Reaksiyon Karışımının Hazırlanma Aşamaları

Real Time PCR analiz metodu için reaksiyon karışımının hazırlanması ve izlenen çalışma protokolü (akış şeması) aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

1. Kullanımına başlamadan önce reaktifler tamamen eritildi. Pipetaj yapılarak veya vortekslenerek iyice karıştırıldı ve kısa süre santrifüjlendi. Sonraki adımlar sırasında ışıktan kaçınıldı.
2. Reaksiyon reaktifleri steril nükleaz içermeyen bir Eppendorf tüpte Tablo 3.5.' deki hacimlerde birleştirerek qPCR Master Mix hazırlandı. Her bir örnek için toplam reaksiyon sayısı, en iyi sonuca ulaşabilmek için çift tekrarlı reaksiyon miktarı olarak hesaplandı.
3. Toplam reaksiyon sayısı hesaplandıktan sonra pipetajdan doğabilecek kayıpların önüne geçebilmek için toplam reaksiyon hacminin % 10 oranında fazla karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım iyice pipetaj yapıldıktan sonra kısa süreli santrifüj edildi. cDNA dışındaki tüm reaktifler karışıma dahil edildi.

4. Mikropipet yardımıyla Axygen™ 96-well PCR Microplates'deki kuyucukların her birine 2 tekrarlı olacak şekilde 2 µl cDNA dağıtıldı
5. Hazırlanan karışım mikropipet yardımıyla Axygen™ 96-well PCR Microplates 'deki kuyucukların her birine 18 µl olacak şekilde dağıtıldı.
6. Hazırlanan, Axygen™ 96-well PCR Microplates, Axygen® Ultra-Clear, Pressure-Sensitive Sealing Film ile hiç hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilerek kapatıldı.
7. Hava kabarcıklarını gidermek ve tüpün dibine reaksiyonu toplamak için qPCR plate'i 1-2 dakika boyunca santrifüj edildi.
8. QPCR plate'i StepOnePlus™ Real-Time PCR System cihazına yüklendi.

Tablo 3-5: qRT-PZR Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	**Reaksiyon Hacmi**	**Final Konsantrasyonu**
2X AMPLIFYME SYBR Mix	10 µl	1X
Forward primer (10 µM)	0,6 µl (0,3 µM)	0,1-0,8 µM
Reverse primer (10 µM)	0,6 µl (0,3 µM)	0,1-0,8 µM
50X ROX solüsyon	0,4 µl	1X
cDNA	2µl	1 pg-0,5 µg
Nükleaz içermeyen su	6,4 µl	**(total hacim 20 µl)**

Tablo 3-6: qRT-PZR Sıcaklık Döngüsü

Basamak	**Sıcaklık**	**Süre (saniye)**	**Döngü sayısı**
Aktivasyon ve denatürasyon	95°C	180 sn.	
Denatürasyon	95°C	5 sn.	40 döngü
Yapışma/ Uzama	60°C	15-30 sn.	

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Sürekli değerlerin yaş ile ilgili verileri ortalama± standart sapma (S.D.), hastalara ait deneysel ve klinopatolojik bulgular gibi kantitatif verileri ise ortalama ± standart hata (S.E.) olarak ifade edildi.

Anlamlılık düzeyleri $P<0.05$ olarak kabul edildi. Analizlerin tümü istatistiksel yazılım paketi (SPSS, v18.0, SPSS Inc., Chicago, IL) programı ile yapıldı.

Hastaların nomal ve tümör dokularındaki gen ekspresyon değerleri, anemisi olan ve anemisi olmayan hastaların gen ekspresyon değerleri gibi iki bağımsız grup arasındaki farklılıklar Student t testi ve Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi.

Gen ifadeleri ve hastaların klinopatolojik verileri gibi kategorik değişkenlerin analizi için χ^2 testi veya Fisher exact testi kullanıldı. Genlerin ekpresyon düzeylerinin korelasyonu değerlendirmek için Pearson korelasyon testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamıza, meme kanseri tanısı alarak cerrahi operasyon geçirmiş fakat herhangi bir tedavi almamış 75 kadın hasta dahil edildi. Yetmişbeş kadın hastanın tümör ve tümöre komşu olan normal doku örneklerinde Matriptaz 2 (TMPRSS6), Hemojuvelin (HFE2), Hepsidin (HAMP), IRP1, Ferroportin 1 (FPN1), Transferrin reseptörü 1 (TFRC), miRNA 122 (miR-122) genlerinin ifadeleri tespit edildi. Çalışmaya alınan meme kanserli hastaların klinik verilerine ait dosyaları retrospektif olarak incelenmiştir.

4.1. Meme kanserli hastaların klinik verileri

Çalışmaya dahil edilen 75 hastanın (yaş ortalamaları 54±13 yıl) demografik ve klinik verileri Tablo 4-1'de görülmektedir.

Tablo 4-1: Meme kanserli hastaların demografik klinik verileri

Yaş:			
≥ 50	**47**		
< 50	**28**		
ER		**Tümör Yerleşimi**	
Pozitif	61	Sağ	34
Negatif	14	Sol	41
PR		**Nükleer Derece**	
Pozitif	55	I,II	41
Negatif	20	III,IV	34
HER-2		**Histolojik derece**	
Pozitif	14	I,II	47
Negatif	61	III,IV	28
Üçlü Negatif		**Tümör Büyüklüğü**	

Pozitif	6	<2	33
Negatif	69	>2	42
Lenf nodu		**Klinik aşama**	
Var	43	I,II	36
Yok	32	III,IV	17
Metastatik durum		**Mikrokalsifikasyon**	
Var	3	Var	57
Yok	72	Yok	18
P53		**Histolojik Tip**	
Pozitif	16	Duktal	61
Negatif	37	Lobular	7
		Diğer	7

4.2. Meme Kanserli Hastaların Gen İfadeleri

Çalışmaya dahil ettiğimiz 75 meme kanser vakasının her biri için Matriptaz 2 (TMPRSS6), Hemojuvelin (HFE2), Hepsidin (HAMP), IRP1, Ferroportin 1(FPN1), Transferrin reseptörü 1 (TFRC) ve miRNA122 (miR-122) genlerinin ve referans gen olarak kullanılan ACTB geninin CT (Cycle Threshold) verileri elde edildi. Tümör ve normal doku örneği için ayrı ayrı olmak üzere hedef gen CT değeri ile referans gen CT arasındaki fark alınarak, her vaka için $2^{-\Delta CT}$ değeri hesaplanmıştır. Her bir hastaya ait tümör ve normal doku örneği, çift tekrar çalışılarak, iki CT değerinin ortalamaları alındı. Bu değerler, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin hesaplamasında kullanıldı. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri Schmittgen ve Livak'ın 2008'de önerdiği denkleme göre her hasta için ayrı olarak hesaplanarak, her hasta için tek bir $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri tespit edildi.

Her hastanın tümör ve normal doku örneklerine ait TMPRSS6, HFE2, HAMP, IRP1, FPN1, TFRC ve miRNA-122 genleri ile ilgili $2^{-\Delta CT}$ değerleri aşağıda yer alan tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 4-2: Tümör ve normal doku örneklerinde FPN1, HAMP, TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 ve miRNA122 genlerinin ifade değerleri ($2^{-\Delta CT}$)

	Tümör dokusu	Medyan(GA)	Normal doku	Medyan(GA)	*P
FPN1	0,032±0,0051	1,643 (0,023-0,042)	0,033±0,0028	1 (0,028-0,039)	0,836
HAMP	0,0055±0,0011	0,0020 0,036-0,078	0,0057±0,0013	1,500 0,035-0,086	0,911
TMPRSS6	0,0190±0,0121	0,0023 0,036-0,078	0,0133± 0,0029	1,500 0,035-0,086	0,651
TFRC	0,0115± 0,0012	0,0060 (0,009-0,014)	0,0062±0,0005	1,500 (0,005-0,007)	0,000
IRP1	0,0034± 0,003	0,0035 (0,003-0,004)	0,0055±0,0004	1,500 0,0049-0,0063	0,000
HFE2	0,0228± 0,0080	0,0061 0,112-0,425	0,0312± 0,0050	1,500 0,215-0,410	0,368
miRNA-122	0,0003±0,0002	0,0002 0,001-0,007	0,0008±0,0001	1,500 0,0006-0,0010	0,025

Veriler ortalama ±SE olarak verilmiştir. *Mann-Whitnety U testi. GA: Güven aralığı

$2^{-\Delta CT}$ hesaplamasına göre FPN1, HAMP, TMPRSS6 ve HFE2 genlerinin tümörlü dokudaki ifade düzeyleri ile normal dokudaki ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4-2). Diğer yandan, normal ve tümörlü dokulardaki TFRC, IRP1, ve miRNA-122 genlerinin ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (Tablo 4-2)

Her hastaya ait TMPRSS6, HFE2, HAMP, IRP1, FPN1, TFRC ve miRNA122 genleri ile ilgili CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri aşağıda yer alan tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 4-3: Tümör ve normal doku örneklerinde FPN1 genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri

Hasta No	Tümör doku		Normal doku		
	FPN1 (CT)	**ACTB (CT)**	**FPN1 (CT)**	**ACTB (CT)**	**$2^{-\Delta\Delta CT}$**
1.	28,464	24,518	28,464	26,816	4,984
2.	24,952	22,226	26,244	23,570	1,037
3.	30,333	24,777	29,329	25,334	2,951
4.	28,830	22,485	26,723	22,948	5,940
5.	28,272	24,793	29,646	25,514	0,636
6.	28,079	20,691	28,113	23,467	6,696
7.	26,571	22,168	27,528	22,985	0,907
8.	26,997	21,528	30,254	24,295	0,712
9.	29,707	23,850	27,315	23,049	3,013
10.	24,783	22,400	26,110	21,828	0,268
11.	26,428	22,177	29,514	25,242	0,986
12.	25,327	21,606	26,621	22,671	0,854
13.	27,082	24,674	28,828	23,670	0,149
14.	32,527	23,958	28,052	23,858	20,738
15.	26,540	21,661	26,992	21,903	0,865
16.	29,306	22,450	29,609	24,476	3,302
17.	28,995	24,614	26,803	22,114	0,808
18.	28,457	22,372	22,162	18,960	7,376
19.	27,802	22,293	27,581	24,088	4,043
20.	26,567	21,360	25,659	21,496	2,062
21.	27,161	22,165	27,153	22,511	1,278
22.	28,507	22,036	31,723	26,913	3,165
23.	26,940	21,051	27,050	23,125	3,902
24.	30,331	21,594	29,731	24,141	8,860
25.	27,075	21,007	27,265	20,476	0,607
26.	25,980	21,397	26,203	21,713	1,067

27.	31,868	21,244	26,549	21,951	65,147
28.	29,454	21,677	27,697	23,255	10,082
29.	26,623	20,886	28,967	21,722	0,352
30.	29,789	21,422	28,970	23,143	5,817
31.	26,821	21,216	28,688	22,517	0,676
32.	25,737	21,531	27,441	21,775	0,364
33.	30,399	22,253	27,267	21,031	3,760
34.	29,621	23,356	27,378	22,080	1,954
35.	25,639	20,512	28,156	21,708	0,400
36.	28,966	22,010	27,727	21,442	1,592
37.	27,547	22,800	27,999	23,222	0,980
38.	28,405	21,866	28,262	22,006	1,217
39.	26,287	20,865	29,156	22,285	0,366
40.	30,442	22,272	28,979	22,712	3,740
41.	30,075	21,090	27,367	22,135	13,482
42.	25,710	21,302	28,621	22,795	0,374
43.	29,804	22,061	29,477	23,218	2,797
44.	28,826	21,479	28,240	21,809	1,887
45.	27,729	22,717	28,721	22,825	0,542
46.	28,711	22,938	27,612	20,737	0,466
47.	28,119	22,442	30,929	23,947	0,405
48.	29,897	22,025	28,703	22,503	3,188
49.	27,958	21,987	27,691	22,103	1,305
50.	30,049	22,184	28,699	22,636	3,483
51.	26,715	21,979	28,866	23,678	0,731
52.	29,887	21,846	26,222	22,499	19,940
53.	25,695	22,519	28,744	22,958	0,164
54.	28,337	21,269	28,215	23,069	3,788
55.	27,390	21,931	27,293	21,959	1,091
56.	31,130	22,560	29,117	23,467	7,569

57.	24,899	22,594	28,344	24,045	0,251
58.	26,802	22,646	28,693	22,808	0,302
59.	33,078	25,071	29,434	23,948	5,742
60.	27,956	21,972	28,957	23,529	1,470
61.	29,937	22,933	28,232	21,578	1,275
62.	28,555	21,432	28,157	23,296	4,799
63.	28,130	20,764	27,748	22,796	5,325
64.	28,509	22,143	28,686	23,414	2,135
65.	25,954	22,450	27,437	23,395	0,689
66.	27,743	21,673	28,894	23,227	1,322
67.	28,212	23,123	29,174	23,516	0,674
68.	26,584	21,499	29,507	23,792	0,647
69.	28,420	21,330	28,492	22,118	1,643
70.	30,611	23,626	29,462	23,048	1,485
71.	27,603	22,412	27,003	22,438	1,543
72.	27,910	23,125	28,833	24,011	0,975
73.	29,935	22,549	28,162	22,770	3,985
74.	28,715	24,211	30,189	24,192	0,356
75.	30,754	23,895	28,741	23,886	4,011

Tablo 4-4: FPN1, geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri

	FPN1 (Ort)	**ACTB(Ort)**	**ΔC_T (Ort)**	**$\Delta\Delta C_T$(Ort)**	**$2^{-\Delta\Delta CT}$**
Tümör	28,213	22,287	-5,92	0,673	0,627
Normal	28,168	22,962	-5,252	0	1

Tablo 4-4’ de görüldüğü üzere, FPN1 ifade düzeyinin tümörlü dokuda 0,627 oranında değiştiği görülmektedir

Tablo 4-5: Tümör ve normal doku örneklerinde HAMP genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri

Hasta No	Tümör doku		Normal doku		
	HAMP (CT)	**ACTB(CT)**	**HAMP(CT)**	**ACTB(CT)**	**$2^{-\Delta\Delta CT}$**
1.	33,942	24,518	33,942	26,816	4,919
2.	28,548	22,226	31,437	23,570	0,343
3.	30,484	24,777	32,206	25,334	0,446
4.	28,985	22,485	29,385	22,948	1,045
5.	30,167	24,793	30,556	25,514	1,258
6.	24,488	20,691	27,498	23,467	0,851
7.	26,594	22,168	29,409	22,985	0,250
8.	28,262	21,528	30,722	24,295	1,237
9.	31,988	23,850	28,309	23,049	7,354
10.	29,497	22,400	28,969	21,828	0,970
11.	29,143	22,177	32,552	25,242	0,788
12.	29,597	21,606	31,070	22,671	0,754
13.	30,547	24,674	33,252	23,670	0,076
14.	32,804	23,958	28,883	23,858	14,125
15.	30,912	21,661	29,663	21,903	2,810
16.	30,048	22,450	36,421	24,476	0,049
17.	31,917	24,614	28,719	22,114	1,622
18.	28,238	22,372	25,675	18,960	0,555
19.	27,568	22,293	29,922	24,088	0,679
20.	28,038	21,360	26,898	21,496	2,422
21.	29,047	22,165	28,910	22,511	1,398
22.	29,618	22,036	34,578	26,913	0,944
23.	27,837	21,051	30,242	23,125	0,795
24.	28,421	21,594	30,052	24,141	1,887
25.	31,609	21,007	30,931	20,476	1,107
26.	32,065	21,397	30,660	21,713	3,298

27.	30,106	21,244	32,319	21,951	0,352
28.	31,974	21,677	34,662	23,255	0,463
29.	31,649	20,886	32,467	21,722	1,013
30.	31,060	21,422	32,565	23,143	1,162
31.	29,964	21,216	31,145	22,517	1,087
32.	30,139	21,531	32,089	21,775	0,307
33.	29,930	22,253	30,389	21,031	0,312
34.	33,549	23,356	35,558	22,080	0,103
35.	30,502	20,512	30,475	21,708	2,336
36.	31,437	22,010	31,186	21,442	0,803
37.	34,522	22,800	35,118	23,222	0,887
38.	30,466	21,866	31,100	22,006	0,710
39.	31,820	20,865	32,903	22,285	1,263
40.	32,518	22,272	34,549	22,712	0,332
41.	33,359	21,090	32,154	22,135	4,757
42.	32,625	21,302	32,689	22,795	2,693
43.	32,311	22,061	30,562	23,218	7,493
44.	33,192	21,479	31,230	21,809	4,898
45.	33,253	22,717	33,410	22,825	0,967
46.	33,071	22,938	30,943	20,737	0,951
47.	32,878	22,442	35,529	23,947	0,452
48.	32,842	22,025	31,538	22,503	3,438
49.	30,400	21,987	31,864	22,103	0,393
50.	30,059	22,184	30,790	22,636	0,824
51.	31,934	21,979	32,368	23,678	2,403
52.	32,307	21,846	31,317	22,499	3,123
53.	32,692	22,519	30,871	22,958	4,787
54.	29,785	21,269	33,476	23,069	0,270
55.	32,222	21,931	33,884	21,959	0,322
56.	35,566	22,560	34,575	23,467	3,727

57.	30,377	22,594	33,114	24,045	0,410
58.	32,682	22,646	34,119	22,808	0,413
59.	34,280	25,071	31,358	23,948	3,481
60.	32,954	21,972	32,692	23,529	3,526
61.	34,511	22,933	31,638	21,578	2,866
62.	29,145	21,432	31,015	23,296	0,996
63.	31,321	20,764	35,335	22,796	0,253
64.	31,694	22,143	33,387	23,414	0,746
65.	32,684	22,450	32,121	23,395	2,843
66.	30,456	21,673	31,057	23,227	1,936
67.	32,731	23,123	32,027	23,516	2,139
68.	31,860	21,499	32,103	23,792	4,143
69.	29,296	21,330	31,689	22,118	0,329
70.	33,067	23,626	33,825	23,048	0,396
71.	31,938	22,412	32,261	22,438	0,813
72.	30,223	23,125	32,413	24,011	0,405
73.	32,162	22,549	32,272	22,770	1,080
74.	30,933	24,211	34,239	24,192	0,100
75.	31,964	23,895	35,805	23,886	0,069

Tablo 4-6: HAMP geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri

	HAMP (Ort)	**ACTB(Ort)**	**ΔC_T (Ort)**	**$\Delta\Delta C_T$(Ort)**	**$2^{-\Delta\Delta CT}$**
Tümör	31,104	22,287	-8,81	-0,049	1,034
Normal	31,827	22,962	-8,865	0	1

Tablo 4-6 ‘da görüldüğü üzere (yukarıdaki Tablo) HAMP ifade düzeyinin tümörlü dokuda 1,034 oranında değiştiği görülmektedir.

Tablo 4-7: Tümör ve normal doku örneklerinde TMPRSS6 genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri

Hasta No	Tümör doku		Normal doku		
	TMPRSS6(CT)	ACTB(CT)	TMPRSS6(CT)	ACTB(CT)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1.	31,292	24,518	26,972	26,816	98,20713
2.	31,324	22,226	28,599	23,570	16,79531
3.	38,446	24,777	34,323	25,334	25,63851
4.	29,906	22,485	35,839	22,948	0,02257
5.	31,678	24,793	33,589	25,514	0,43806
6.	26,798	20,691	25,496	23,467	16,89325
7.	32,626	22,168	30,519	22,985	7,58443
8.	28,680	21,528	36,265	24,295	0,03546
9.	34,992	23,850	36,751	23,049	0,16969
10.	31,212	22,400	34,722	21,828	0,05903
11.	32,190	22,177	35,021	25,242	1,17612
12.	29,802	21,606	31,426	22,671	0,67955
13.	34,526	24,674	30,726	23,670	6,94697
14.	28,070	23,958	29,632	23,858	0,31572
15.	26,263	21,661	27,565	21,903	0,47953
16.	31,222	22,450	33,257	24,476	0,99423
17.	35,356	24,614	27,263	22,114	48,21957
18.	28,847	22,372	25,050	18,960	1,30513
19.	27,749	22,293	34,818	24,088	0,02583
20.	26,631	21,360	29,794	21,496	0,12268
21.	28,058	22,165	34,402	22,511	0,01565
22.	27,678	22,036	35,871	26,913	0,10048
23.	29,245	21,051	31,027	23,125	1,22497
24.	38,637	21,594	34,976	24,141	73,92257
25.	30,704	21,007	31,957	20,476	0,29041
26.	32,104	21,397	29,869	21,713	5,86494

27.	33,993	21,244	30,709	21,951	15,89553
28.	29,282	21,677	30,731	23,255	1,09316
29.	29,969	20,886	33,596	21,722	0,14455
30.	30,987	21,422	33,172	23,143	0,72494
31.	32,736	21,216	33,504	22,517	1,44817
32.	30,034	21,531	34,914	21,775	0,04022
33.	29,291	22,253	30,695	21,031	0,16202
34.	35,102	23,356	31,907	22,080	3,78131
35.	28,367	20,512	31,968	21,708	0,18893
36.	31,672	22,010	36,843	21,442	0,01872
37.	30,281	22,800	36,407	23,222	0,0192
38.	35,566	21,866	34,346	22,006	2,56727
39.	27,741	20,865	33,129	22,285	0,06388
40.	31,749	22,272	35,227	22,712	0,12174
41.	35,193	21,090	30,089	22,135	70,9746
42.	30,113	21,302	35,653	22,795	0,06049
43.	34,709	22,061	35,066	23,218	1,74026
44.	29,494	21,479	33,286	21,809	0,09073
45.	34,297	22,717	33,380	22,825	2,03596
46.	32,950	22,938	31,189	20,737	0,73727
47.	34,935	22,442	34,454	23,947	3,96292
48.	29,573	22,025	31,038	22,503	0,50457
49.	34,761	21,987	33,384	22,103	2,81514
50.	26,360	22,184	31,982	22,636	0,02777
51.	30,821	21,979	31,016	23,678	2,83724
52.	24,678	21,846	28,598	22,499	0,10389
53.	27,912	22,519	30,689	22,958	0,19778
54.	31,560	21,269	32,279	23,069	2,11606
55.	29,699	21,931	30,619	21,959	0,53912
56.	26,925	22,560	30,293	23,467	0,18156

57.	26,718	22,594	30,949	24,045	0,14551
58.	29,296	22,646	30,538	22,808	0,47301
59.	33,996	25,071	35,681	23,948	0,14286
60.	27,942	21,972	30,543	23,529	0,48478
61.	26,750	22,933	31,153	21,578	0,01848
62.	31,217	21,432	33,280	23,296	0,87135
63.	28,553	20,764	33,981	22,796	0,09504
64.	27,533	22,143	35,938	23,414	0,00712
65.	28,500	22,450	30,814	23,395	0,38710
66.	32,935	21,673	38,656	23,227	0,05564
67.	28,695	23,123	32,288	23,516	0,10883
68.	30,040	21,499	31,430	23,792	1,86983
69.	30,960	21,330	30,266	22,118	2,79289
70.	29,663	23,626	29,776	23,048	0,61936
71.	31,066	22,412	31,088	22,438	1,00236
72.	27,518	23,125	30,525	24,011	0,23008
73.	34,984	22,549	31,950	22,770	9,55169
74.	27,322	24,211	32,029	24,192	0,03781
75.	33,558	23,895	36,025	23,886	0,17973

Tablo 4-8: TMPRSS6 geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri

	TMPRSS6(Ort)	**ACTB(Ort)**	**ΔC_T (Ort)**	**$\Delta\Delta C_T$(Ort)**	**$2^{-\Delta\Delta CT}$**
Tümör	30,694	22,287	-8,406	-0,935	1,912
Normal	32,304	22,962	-9,342	0	1

Tablo 4-8’ de görüldüğü üzere, TMPRSS6 ifade düzeyinin tümörlü dokuda 1,912 oranında değiştiği tespit edildi.

Tablo 4-9: Tümör ve normal doku örneklerinde TFRC genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri

Hasta No	Tümör doku		Normal doku		
	TFRC(CT)	ACTB(CT)	TFRC(CT)	ACTB(CT)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1.	30,075	24,518	34,281	26,816	0,266
2.	28,324	22,226	29,095	23,570	1,488
3.	31,971	24,777	31,588	25,334	1,919
4.	28,971	22,485	29,953	22,948	0,698
5.	30,927	24,793	32,260	25,514	0,654
6.	26,391	20,691	29,998	23,467	0,562
7.	26,427	22,168	29,720	22,985	0,180
8.	28,197	21,528	32,078	24,295	0,462
9.	28,882	23,850	30,357	23,049	0,207
10.	28,380	22,400	29,408	21,828	0,330
11.	29,088	22,177	33,144	25,242	0,503
12.	28,500	21,606	29,303	22,671	1,200
13.	31,294	24,674	31,010	23,670	0,607
14.	30,358	23,958	30,466	23,858	0,865
15.	29,937	21,661	29,033	21,903	2,211
16.	29,765	22,450	31,988	24,476	0,873
17.	32,086	24,614	29,167	22,114	1,336
18.	30,024	22,372	24,784	18,960	3,550
19.	33,240	22,293	31,219	24,088	14,075
20.	29,091	21,360	29,948	21,496	0,607
21.	27,606	22,165	29,828	22,511	0,272
22.	27,969	22,036	34,231	26,913	0,383
23.	29,277	21,051	30,304	23,125	2,066
24.	27,934	21,594	32,302	24,141	0,283
25.	29,168	21,007	28,714	20,476	0,947

26.	26,955	21,397	28,907	21,713	0,322
27.	28,548	21,244	29,154	21,951	1,072
28.	30,255	21,677	30,350	23,255	2,796
29.	28,173	20,886	30,089	21,722	0,473
30.	28,878	21,422	30,829	23,143	0,853
31.	27,790	21,216	31,679	22,517	0,166
32.	28,951	21,531	30,023	21,775	0,564
33.	31,214	22,253	29,660	21,031	1,258
34.	32,909	23,356	30,994	22,080	1,557
35.	28,373	20,512	30,266	21,708	0,617
36.	30,746	22,010	30,420	21,442	0,845
37.	30,635	22,800	33,303	23,222	0,211
38.	29,864	21,866	30,895	22,006	0,539
39.	29,421	20,865	31,643	22,285	0,574
40.	30,737	22,272	31,968	22,712	0,578
41.	27,552	21,090	30,983	22,135	0,191
42.	28,937	21,302	31,760	22,795	0,398
43.	30,463	22,061	32,115	23,218	0,709
44.	30,810	21,479	30,763	21,809	1,299
45.	29,320	22,717	32,183	22,825	0,148
46.	31,771	22,938	29,437	20,737	1,097
47.	31,462	22,442	32,371	23,947	1,512
48.	27,872	22,025	31,307	22,503	0,129
49.	28,865	21,987	29,991	22,103	0,497
50.	28,490	22,184	31,012	22,636	0,238
51.	29,322	21,979	31,150	23,678	0,914
52.	28,459	21,846	28,567	22,499	1,459
53.	28,418	22,519	30,111	22,958	0,419
54.	28,407	21,269	30,053	23,069	1,113
55.	26,882	21,931	29,330	21,959	0,187

56.	30,217	22,560	31,113	23,467	1,007
57.	27,963	22,594	30,800	24,045	0,383
58.	29,369	22,646	30,634	22,808	0,466
59.	30,371	25,071	31,608	23,948	0,195
60.	28,692	21,972	30,056	23,529	1,142
61.	29,030	22,933	29,175	21,578	0,354
62.	26,269	21,432	30,741	23,296	0,164
63.	28,202	20,764	30,341	22,796	0,928
64.	28,949	22,143	31,307	23,414	0,470
65.	28,271	22,450	29,841	23,395	0,649
66.	29,040	21,673	31,333	23,227	0,599
67.	30,073	23,123	30,584	23,516	0,922
68.	27,671	21,499	30,579	23,792	0,653
69.	28,893	21,330	29,716	22,118	0,976
70.	30,443	23,626	30,159	23,048	0,816
71.	29,414	22,412	29,698	22,438	0,836
72.	30,329	23,125	30,566	24,011	1,569
73.	28,727	22,549	29,848	22,770	0,536
74.	28,623	24,211	30,236	24,192	0,323
75.	28,317	23,895	29,954	23,886	0,319

Tablo 4-10: TFRC geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri

	TFRC (Ort)	ACTB(Ort)	ΔC_T (Ort)	$\Delta\Delta C_T$(Ort)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Tümör	29,243	22,287	-6,956	-0,666	1,586
Normal	30,584	22,962	-7,622	0	1

Tablo 4-10’ da görüldüğü üzere, TFRC ifade düzeyinin tümörlü dokuda 1,586 oranında değiştiği görülmektedir.

Tablo 4-11: Tümör ve normal doku örneklerinde IRP1 genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri

Hasta No	Tümör doku		Normal doku		
	IRP1(CT)	**ACTB(CT)**	**IRP1(CT)**	**ACTB(CT)**	**$2^{-\Delta\Delta CT}$**
1.	31,205	24,518	33,411	26,816	1,066
2.	29,149	22,226	30,485	23,570	1,006
3.	32,969	24,777	32,516	25,334	2,014
4.	30,733	22,485	29,055	22,948	4,412
5.	32,191	24,793	32,810	25,514	1,073
6.	29,529	20,691	30,289	23,467	4,046
7.	30,685	22,168	30,319	22,985	2,270
8.	29,520	21,528	31,892	24,295	1,315
9.	32,802	23,850	30,324	23,049	3,200
10.	29,894	22,400	28,513	21,828	1,751
11.	30,241	22,177	31,964	25,242	2,535
12.	28,441	21,606	29,261	22,671	1,185
13.	31,187	24,674	30,414	23,670	0,852
14.	30,623	23,958	29,919	23,858	1,519
15.	28,721	21,661	28,735	21,903	1,171
16.	30,275	22,450	31,670	24,476	1,549
17.	32,309	24,614	28,815	22,114	1,991
18.	30,403	22,372	27,528	18,960	0,689
19.	29,288	22,293	31,104	24,088	0,986
20.	28,512	21,360	28,617	21,496	1,022
21.	30,987	22,165	30,175	22,511	2,231
22.	30,188	22,036	33,540	26,913	2,879
23.	28,806	21,051	29,843	23,125	2,052
24.	29,164	21,594	31,202	24,141	1,423
25.	30,260	21,007	28,941	20,476	1,726
26.	30,119	21,397	29,665	21,713	1,706

27.	31,216	21,244	29,609	21,951	4,972
28.	29,902	21,677	30,616	23,255	1,820
29.	30,177	20,886	31,008	21,722	1,004
30.	30,948	21,422	31,354	23,143	2,489
31.	30,802	21,216	31,057	22,517	2,066
32.	30,771	21,531	30,162	21,775	1,808
33.	30,945	22,253	29,821	21,031	0,934
34.	32,309	23,356	29,207	22,080	3,545
35.	30,361	20,512	31,097	21,708	1,375
36.	30,496	22,010	29,682	21,442	1,186
37.	31,535	22,800	30,535	23,222	2,679
38.	31,439	21,866	29,970	22,006	3,051
39.	29,701	20,865	30,538	22,285	1,498
40.	32,781	22,272	32,028	22,712	2,286
41.	30,208	21,090	31,464	22,135	0,864
42.	30,574	21,302	31,823	22,795	1,185
43.	32,106	22,061	31,595	23,218	3,176
44.	30,524	21,479	30,168	21,809	1,609
45.	32,371	22,717	31,990	22,825	1,404
46.	30,894	22,938	31,946	20,737	0,105
47.	30,690	22,442	31,678	23,947	1,430
48.	30,277	22,025	31,247	22,503	0,711
49.	30,121	21,987	29,921	22,103	1,246
50.	29,944	22,184	30,866	22,636	0,721
51.	30,408	21,979	31,201	23,678	1,874
52.	29,364	21,846	29,979	22,499	1,027
53.	30,978	22,519	30,699	22,958	1,644
54.	32,177	21,269	30,946	23,069	8,181
55.	30,382	21,931	29,712	21,959	1,623
56.	32,335	22,560	31,162	23,467	4,229

57.	31,014	22,594	30,781	24,045	3,212
58.	31,013	22,646	29,635	22,808	2,910
59.	33,943	25,071	32,000	23,948	1,766
60.	30,375	21,972	30,926	23,529	2,007
61.	30,732	22,933	29,889	21,578	0,702
62.	30,723	21,432	30,647	23,296	3,839
63.	29,149	20,764	29,878	22,796	2,468
64.	30,972	22,143	31,489	23,414	1,687
65.	31,042	22,450	30,303	23,395	3,212
66.	30,939	21,673	31,973	23,227	1,434
67.	31,359	23,123	31,742	23,516	1,007
68.	30,781	21,499	31,766	23,792	2,477
69.	31,541	21,330	30,776	22,118	2,934
70.	31,814	23,626	30,556	23,048	1,602
71.	30,975	22,412	30,666	22,438	1,261
72.	31,598	23,125	31,773	24,011	1,638
73.	31,956	22,549	30,710	22,770	2,765
74.	31,625	24,211	32,731	24,192	0,459
75.	31,506	23,895	29,982	23,886	2,857

Tablo 4-12: IRP1 geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri

	IRP1 (Ort)	ACTB(Ort)	ΔC_T (Ort)	$\Delta\Delta C_T$(Ort)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Tümör	30,773	22,287	-8,486	0,751	0,594
Normal	30,697	22,962	-7,735	0	1

Tablo 4-12’ de görüldüğü üzere, IRP1 ifade düzeyinin tümörlü dokuda 0,594 oranında değiştiği görülmektedir.

Tablo 4-13: Tümör ve normal doku örneklerinde HFE2 genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri

Hasta No	Tümör doku		Normal doku		
	HFE2(CT)	**ACTB(CT)**	**HJV(CT)**	**ACTB(CT)**	**$2^{-\Delta\Delta CT}$**
1.	31,611	24,518	30,481	26,816	10,768
2.	29,105	22,226	30,177	23,570	1,207
3.	31,848	24,777	32,257	25,334	1,108
4.	28,631	22,485	30,396	22,948	0,405
5.	27,912	24,793	29,025	25,514	0,762
6.	30,684	20,691	27,695	23,467	54,391
7.	28,879	22,168	27,880	22,985	3,522
8.	28,148	21,528	28,993	24,295	3,788
9.	31,281	23,850	30,468	23,049	1,009
10.	31,589	22,400	29,263	21,828	3,371
11.	28,700	22,177	28,590	25,242	9,031
12.	28,417	21,606	29,495	22,671	0,992
13.	29,738	24,674	27,726	23,670	2,011
14.	31,740	23,958	29,206	23,858	5,403
15.	29,732	21,661	33,112	21,903	0,114
16.	29,869	22,450	36,064	24,476	0,056
17.	34,089	24,614	30,227	22,114	2,567
18.	31,565	22,372	26,631	18,960	2,871
19.	27,610	22,293	30,931	24,088	0,347
20.	30,387	21,360	32,353	21,496	0,281
21.	28,945	22,165	28,037	22,511	2,386
22.	30,271	22,036	33,801	26,913	2,545
23.	28,969	21,051	28,903	23,125	4,406
24.	31,484	21,594	31,698	24,141	5,038
25.	24,959	21,007	25,002	20,476	0,672
26.	27,353	21,397	27,120	21,713	1,464

27.	26,153	21,244	26,883	21,951	0,984
28.	26,045	21,677	27,055	23,255	1,482
29.	27,081	20,886	24,523	21,722	10,520
30.	28,390	21,422	25,131	23,143	31,553
31.	25,632	21,216	25,436	22,517	2,824
32.	25,841	21,531	26,770	21,775	0,623
33.	27,800	22,253	26,450	21,031	1,093
34.	24,211	23,356	25,711	22,080	0,146
35.	25,907	20,512	24,761	21,708	5,072
36.	26,497	22,010	26,008	21,442	0,947
37.	26,462	22,800	26,556	23,222	1,256
38.	27,836	21,866	26,347	22,006	3,093
39.	26,702	20,865	25,300	22,285	7,070
40.	25,203	22,272	27,419	22,712	0,292
41.	27,302	21,090	25,719	22,135	6,186
42.	26,504	21,302	26,563	22,795	2,701
43.	28,510	22,061	28,725	23,218	1,921
44.	25,513	21,479	25,357	21,809	1,400
45.	32,787	22,717	27,075	22,825	56,476
46.	31,532	22,938	29,242	20,737	1,064
47.	30,163	22,442	31,147	23,947	1,434
48.	25,676	22,025	28,654	22,503	0,177
49.	31,936	21,987	32,318	22,103	0,832
50.	31,451	22,184	31,615	22,636	1,221
51.	33,372	21,979	33,723	23,678	2,547
52.	30,533	21,846	31,002	22,499	1,136
53.	30,987	22,519	31,515	22,958	0,940
54.	31,724	21,269	30,965	23,069	5,894
55.	31,489	21,931	30,484	21,959	2,047
56.	31,683	22,560	30,790	23,467	3,482

57.	33,687	22,594	32,368	24,045	6,817
58.	32,955	22,646	31,691	22,808	2,689
59.	34,844	25,071	34,610	23,948	0,540
60.	32,237	21,972	33,793	23,529	1,000
61.	31,148	22,933	31,193	21,578	0,379
62.	32,059	21,432	32,686	23,296	2,358
63.	31,949	20,764	31,310	22,796	6,366
64.	34,043	22,143	33,559	23,414	3,375
65.	31,395	22,450	31,340	23,395	2,001
66.	32,228	21,673	30,673	23,227	8,626
67.	32,290	23,123	30,462	23,516	4,663
68.	31,950	21,499	31,422	23,792	7,068
69.	30,941	21,330	31,055	22,118	1,595
70.	31,396	23,626	31,306	23,048	0,713
71.	31,560	22,412	31,159	22,438	1,344
72.	30,808	23,125	31,897	24,011	0,869
73.	30,986	22,549	30,399	22,770	1,751
74.	31,818	24,211	30,500	24,192	2,462
75.	31,369	23,895	30,060	23,886	2,462

Tablo 4-14: HFE2 geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri

	HFE2 (Ort)	ACTB(Ort)	ΔC_T (Ort)	$\Delta\Delta C_T$(Ort)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Tümör	29,788	22,287	-7,500	0,913	0,531
Normal	29,550	22,962	-6,588	0	1

Tablo 4-14’ de görüldüğü üzere, HFE2 ifade düzeyinin tümörlü dokuda 0,531 oranında değiştiği görülmektedir.

Tablo 4-15: Tümör ve normal doku örneklerinde miRNA122 genine ait CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri

Hasta No	Tümör doku		Normal doku		
	miRNA122(CT)	RNU44(CT)	miRNA122(CT)	RNU44(CT)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1.	32,874	19,257	34,758	23,292	4,443
2.	33,494	20,022	33,778	20,918	1,529
3.	34,445	17,714	32,884	21,665	45,617
4.	33,201	19,585	32,315	20,23	2,890
5.	31,672	18,879	32,518	20,556	1,779
6.	33,094	20,741	31,273	23,507	24,017
7.	29,934	18,816	32,372	22,062	1,752
8.	32,171	19,160	31,271	20,436	4,517
9.	31,392	18,156	32,563	21,639	4,967
10.	31,304	17,609	32,261	18,967	1,320
11.	33,073	18,514	32,209	22,877	37,427
12.	33,157	19,742	31,778	21,14	6,857
13.	32,621	21,31	33,563	17,967	0,051
14.	32,469	20,098	31,756	22,771	10,458
15.	32,61	19,22	33,002	19,673	1,042
16.	33,913	18,558	33,574	21,457	9,438
17.	34,258	18,875	32,88	19,817	4,995
18.	32,773	17,294	31,241	16,525	1,698
19.	32,588	19,496	31,894	17,767	0,488
20.	32,254	18,252	32,814	19,216	1,323
21.	32,386	18,741	32,885	22,828	12,021
22.	32,282	18,989	35,601	26,854	23,369
23.	33,153	19,887	32,771	21,562	4,163
24.	33,795	20,349	32,128	21,522	7,160
25.	32,876	20,474	33,215	23,327	5,712

26.	33,837	20,195	33,126	22,21	6,618
27.	34,448	20,076	33,554	21,717	5,796
28.	33,393	18,472	33,344	22,010	12,017
29.	33,154	18,903	33,201	24,075	34,920
30.	33,336	21,137	32,155	21,458	2,831
31.	28,254	21,958	33,093	24,575	0,214
32.	33,546	20,015	32,381	22,804	15,498
33.	31,935	19,979	33,645	23,358	3,177
34.	33,157	22,502	32,797	21,581	0,678
35.	33,482	19,844	33,351	21,242	2,886
36.	33,330	21,082	33,283	24,375	10,130
37.	32,521	19,147	33,698	23,954	12,376
38.	18,986	33,123	33,100	22,285	9,997
39.	18,857	32,215	19,899	32,517	1,669
40.	20,483	33,503	21,456	32,891	3,000
41.	18,308	32,883	22,124	32,996	13,028
42.	33,462	20,737	33,035	23,049	6,678
43.	33,069	20,458	33,806	22,151	1,941
44.	32,882	20,988	32,533	22,009	2,585
45.	32,137	19,902	33,035	23,46	6,323
46.	33,203	19,130	31,766	18,606	1,882
47.	33,123	24,305	34,535	20,130	0,021
48.	32,369	19,576	31,636	21,035	4,569
49.	-11,090	0,443	12,027	-10,280	10,556
50.	32,988	17,309	35,163	22,884	8,098
51.	34,755	21,448	34,272	23,983	3,668
52.	34,718	20,102	33,998	21,257	9,344
53.	35,619	20,788	33,290	21,683	6,375
54.	34,861	18,467	34,028	20,307	16,365
55.	33,891	19,237	33,152	22,530	31,147

56.	33,939	18,441	33,618	23,080	54,531
57.	34,561	19,827	34,279	25,315	0,699
58.	38,583	28,936	34,013	23,848	16,033
59.	33,677	19,078	33,694	23,098	1,355
60.	33,532	19,521	34,802	21,229	7,298
61.	32,196	18,618	33,538	23,005	8,265
62.	33,375	19,781	32,438	20,135	2,448
63.	33,063	20,397	32,281	23,491	14,667
64.	34,487	19,889	33,061	23,858	42,078
65.	32,112	17,331	33,268	23,139	25,133
66.	32,796	19,35	31,934	20,819	5,032
67.	33,116	20,457	32,47	23,084	9,667
68.	32,138	19,123	32,585	20,744	2,257
69.	32,264	19,804	31,795	21,940	6,082
70.	32,686	18,732	33,802	19,521	0,797
71.	32,069	21,207	31,769	21,837	1,907
72.	33,448	24,025	32,187	23,170	1,325
73.	33,107	19,588	34,454	23,235	4,926
74.	33,064	19,045	34,439	23,943	11,503
75.	32,85	17,797	33,609	25,393	114,325

Tablo 4-16: miRNA122 geninin tümör ve normal doku örneklerindeki ortalama ifade değeri

	miRNA122(Ort)	ACTB(Ort)	ΔC_T (Ort)	$\Delta\Delta C_T$(Ort)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Tümör	31,758	20,248	-11,450	1,623	0,32
Normal	32,291	21,991	-9,827	0	1

Tablo 4-16' da görüldüğü üzere, miRNA122 ifade düzeyinin tümörlü dokuda 0,32 oranında değiştiği görülmektedir.

FPN1, HAMP, TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 ve miRNA 122 genlerine ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçlarımız ayrıca 0,9-1,1 aralığına göre de değerlendirildi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 0,9 değerinden küçük ise normal dokuya göre söz konusu genin ifadesinin azaldığı, 0,9-1,1 aralığında ise normal dokuya göre ilgili genin ifadesinin değişmediği, 1,1 değerinden büyük ise normal dokuya göre hedef genin ifadesinin arttığı kabul edildi.

FPN1 gen ifade verilerine göre 27 (%36) hastaya ait tümör dokusunda FPN1 gen ifadesinin normal dokuya göre arttığı, 42 (%56) hastanın tümör dokusunda normal dokuya göre azaldığı ve 6 (%8) hastanın tümör dokusunda FPN1 gen ifadesinin normal dokuya göre değişmediği tespit edilmiştir. Tablo 4-2'de de FPN1 gen ifadesi açısından tümör ve normal dokular arasında fark tespit edilmemiş (p=0,836) olmasına rağmen FPN1 ifadesinin hastalarda %56 oranında azalmış olması, $2^{-\Delta\Delta CT}$=0,627 değerinin ifade ettiği gen ifadesinin azalmış olması skalasına uymaktadır.

HAMP gen ifade verilerine göre 35 (%47) hastaya ait tümör dokusunda HAMP gen ifadesinin normal dokuya göre arttığı, 30 (%40) hastanın tümör dokusunda normal dokuya göre azaldığı ve 10 (%13) hastanın tümör dokusunda HAMP gen ifadesinin normal dokuya göre değişmediği tespit edilmiştir. Tablo 4-2'de de HAMP gen ifadesi açısından tümör ve normal dokular arasında fark tespit edilmemiştir (p=0,911). Aynı zamanda hastaların %47 sında gen ifadesinin artmış, %40'nda azalmış olması yani arada bariz anlamlı bir fark olmaması, $2^{-\Delta\Delta CT}$=1,034 değerinin ifade ettiği gen ifadesinin değişmemiş olması skalasına uymaktadır.

TMPRSS6 gen ifade verilerine göre 46 (%61) hastaya ait tümör dokusunda TMPRSS6 gen ifadesinin normal dokuya göre arttığı, 26 (%35) hastanın tümör dokusunda normal dokuya göre azaldığı ve 3 (%4) hastanın tümör dokusunda TMPRSS6 gen ifadesinin normal dokuya göre değişmediği tespit edilmiştir. Tablo 4-2'de de TMPRSS6 gen ifadesi açısından tümör ve normal dokular arasında fark tespit edilmemiş (p=0,651) olmasına rağmen TMPRSS6 gen ifadesinin hastalarda %61 oranında artmış olması, $2^{-\Delta\Delta CT}$=1,912 değerindeki gen ifadesinin artmış olması skalasına uymaktadır.

TFRC gen ifade verilerine göre 50 (%67) hastaya ait tümör dokusunda TFRC gen ifadesinin normal dokuya göre arttığı, 17 (%23) hastanın tümör dokusunda normal dokuya göre azaldığı ve 8 (%10) hastanın tümör dokusunda TFRC gen ifadesinin

normal dokuya göre değişmediği tespit edilmiştir. Tablo 4-2'de de TFRC gen ifadesi açısından tümör ve normal dokular arasında fark tespit edilmiştir (p=0,0001). Aynı zamanda hastaların %67' sında TFRC gen ifadesinin artmış, %23'ünde azalmış olması yani arada bariz anlamlı bir fark olması, $2^{-\Delta\Delta CT}$=1,586 değerinin ifade ettiği gen ifadesinin artmış olması skalasına uymaktadır.

IRP1 gen ifade verilerine göre 8 (%11) hastaya ait tümör dokusunda IRP1 gen ifadesinin normal dokuya göre arttığı, 58 (%77) hastanın tümör dokusunda normal dokuya göre azaldığı ve 9 (%12) hastanın tümör dokusunda IRP1 gen ifadesinin normal dokuya göre değişmediği tespit edilmiştir. Tablo 4-2'de de IRP1 gen ifadesi açısından tümör ve normal dokular arasında fark tespit edilmiştir (p=0,0001). Aynı zamanda hastaların %11' inde IRP1 gen ifadesinin artmış, %77'inde azalmış olması yani arada bariz anlamlı bir fark olması, $2^{-\Delta\Delta CT}$=0,594 değerinin ifade ettiği gen ifadesinin azalmış olması skalasına uymaktadır.

HFE2 gen ifade verilerine göre 16 (%21) hastaya ait tümör dokusunda HFE2 gen ifadesinin normal dokuya göre arttığı, 50 (%67) hastanın tümör dokusunda normal dokuya göre azaldığı ve 9 (%12) hastanın tümör dokusunda HFE2 gen ifadesinin normal dokuya göre değişmediği tespit edilmiştir. Tablo 4-2'de de HFE2 gen ifadesi açısından tümör ve normal dokular arasında fark tespit edilmemiş (p=0,368) olmasına rağmen HFE2 gen ifadesinin hastalarda %67 oranında azalmış olması, $2^{-\Delta\Delta CT}$=0,531 değerinin ifade ettiği gen ifadesinin azalmış olması skalasına uymaktadır.

MiRNA122 gen ifade verilerine göre 12 (%16) hastaya ait tümör dokusunda miRNA122 gen ifadesinin normal dokuya göre arttığı, 62 (%83) hastanın tümör dokusunda normal dokuya göre azaldığı ve 1 (%1) hastanın tümör dokusunda miRNA122 gen ifadesinin normal dokuya göre değişmediği tespit edilmiştir. Tablo 4-2'de de IRP1 gen ifadesi açısından tümör ve normal dokular arasında fark tespit edilmiştir (p=0,025). Aynı zamanda hastaların %16' sında miRNA gen ifadesinin artmış, %83'ünde azalmış olması yani arada bariz anlamlı bir fark olması, $2^{-\Delta\Delta CT}$=0,320 değerinin ifade ettiği gen ifadesinin azalmış olması skalasına uymaktadır.

FPN1, HAMP, TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 ve miRNA122 genlerinin ifade değerleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$), hastaların laboratuvar bulgularına göre anemik olmaları veya olmamalarına göre değerlendirildi (Tablo 4-17).

Tablo 4-17: Anemisi olan ve anemisi olmayan hastaların meme doku örneklerinde FPN1, HAMP, TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 ve miRNA122 genlerinin ifade değerleri

	Anemi var (+)	Anemi yok (-)	*P değeri
FPN1	6,30± 4,12	3,13±0,71	0,295
HAMP	1,10± 0,30	1,77±0,32	0,192
TMPRSS6	4,26± 1,96	6,36± 3,48	0,679
TFRC	0,86± 0,11	1,01± 0,14	0,420
IRP1	2,39± 0,24	2,10± 0,27	0,498
HFE2	7,93± 3,44	2,68± 0,47	0,171
miRNA122	12,42± 3,19	10,21± 2,47	0,593

Veriler ortalama ±SE olarak verilmiştir. *Student-t testi

$2^{-\Delta\Delta CT}$ hesaplamasına göre FPN1, HAMP, TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 ve miRNA122 genlerinin ifade düzeyleri açısından, anemisi olan ve anemisi olmayan hastalardaki ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

4.3. Klinik Verilerin Gen İfadeleri ile ilişkileri

FPN1, HAMP, TMPRSS6, TFRC, IRP1, HFE2 ve miRNA122 genlerine ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 0,9-1,1 aralığına göre değerlendirildikten sonra, bu değerler ile hastaların klinik veriler arasındaki ilişki incelendi. Bu incelemede istatiksel olarak anlamlılık düzeyinde olan sonuçlar özetlenmiştir.

Tablo 4-18: Meme kanserli Hastaların FPN1 gen ifadesi ile ER arasındaki ilişki

ER					
		Pozitif	**Negatif**	**Toplam**	***P**
FPN1	İfadesi artan	31(%51)	12 (%86)	43	
	İfadesi azalan	23 (%38)	2 (%14)	25	0,0524
	İfadesi değişmemiş	7 (%11)	0 (%0)	7	
	Toplam	61	14	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-19: Meme kanserli Hastaların FPN1 gen ifadesi ile histolojik derece arasındaki ilişki

Histolojik derece					
		I,II	III	Toplam	*P
FPN1	İfadesi artan	22 (%47)	21 (%75)	43	
	İfadesi azalan	20 (%43)	5 (%18)	25	0,053
	İfadesi değişmemiş	5 (%10)	2 (%7)	7	
	Toplam	47	28	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Gruplanmış FPN1 gen ifade düzeyi ile nükleer derece, mikrokalsifikasyon, p53, PR, HER2, üçlü negatif, histolojik tip, lenf nodülü, metastaz durumu, tümör büyüklüğü, klinik aşama, tümör yerleşimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde, anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,374**;** p=0,227; p=0,713; p=0,064; p=0,840; p=0,382; p=0,912; p=0,080; p=0,844; p=0,380; p= 0,368, p= 0,227, sırasıyla). Diğer yandan, FPN1 gen ifade düzeyi ile ER ve histolojik derece arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. ER negatif (%86) olan hastalarda FPN1 gen ifadesi ER pozitif (%51) olan hastalara göre artarken (^{a}p=0,045), histolojik derecesi III (%75) olan hastalardaki FPN1 gen ifadesi histolojik derecesi I,II (%47) olan hastalara kıyasla artmıştır (^{a}p=0,016).

Tablo 4-20: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile nükleer derece arasındaki ilişki

Nükleer derece					
		I,II	**III,IV**	**Toplam**	***P**
TMPRSS6	İfadesi artan	10 (%24)	15 (%45)	25	
	İfadesi azalan	30 (%73)	16 (%48)	46	0,091
	İfadesi değişmemiş	1 (%3)	2 (%7)	3	
	Toplam	41	33	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-21: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile mikrokalsifikasyon arasındaki ilişki

Mikrokalsifikasyon					
		Var	**Yok**	**Toplam**	***P**
TMPRSS6	İfadesi artan	17 (%59)	9 (%20)	26	
	İfadesi azalan	9 (%31)	37 (%80)	46	0,00005
	İfadesi değişmemiş	3 (%10)	0 (%0)	3	
	Toplam	29	46	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-22: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile P53 arasındaki ilişki

P53					
		Pozitif	**Negatif**	**Toplam**	***P**
TMPRSS6	İfadesi artan	8 (%50)	7 (%19)	15	
	İfadesi azalan	7 (%44)	28 (%76)	35	0,062
	İfadesi değişmemiş	1 (%6)	2 (%5)	3	
	Toplam	16	37	53	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-23: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile ER arasındaki ilişki

ER					
		Pozitif	**Negatif**	**Toplam**	**P**
TMPRSS6	İfadesi artan	17 (%28)	9 (%64)	26	0,002
	İfadesi azalan	42 (%69)	4 (%29)	46	
	İfadesi değişmemiş	2 (%3)	1 (%7)	3	
	Toplam	61	14	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-24: Meme kanserli Hastaların TMPRSS6 gen ifadesi ile histolojik derece arasındaki ilişki

Histolojik derece					
		I,II	III	Toplam	P
TMPRSS6	İfadesi artan	12 (%26)	14 (%50)	26	0,03
	İfadesi azalan	34 (%72)	12 (%43)	46	
	İfadesi değişmemiş	1 (%2)	2 (%7)	3	
	Toplam	47	28	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Gruplanmış TMPRSS6 gen ifade düzeyi ile PR, HER2, üçlü negatif, histolojik tip, lenf nodülü, metastaz, tümör büyüklüğü, klinik aşama, tümör yerleşimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,477**;** p=0,330; p=0,220; p= 0,310; p=0,633; p=0,931; p=0,400; p=0,414; p=0,559; sırasıyla). Diğer yandan, TMPRSS6 gen ifade düzeyi ile nükleer derece, mikrokalsifikasyon, p53, ER, ve histolojik derece arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Nükleer derecesi I,II (%73) olan hastalarda nükleer derecesi III,IV (%48) olan hastalara göre (p=0,036); mikrokalsifikasyon olmayan hastalar (%80) mikrokalsifikasyon olan (%31) hastalara göre (p=0,0004); p53 negatif (%76) olan hastalar p53 pozitif (%44) olan hastalara göre (p=0,023); ER pozitif (%69) olan hastalar

ER negatif (%29) olan hastalara göre (p=0,008); histolojik derecesi I,II (%72) olan hastalar histolojik derecesi III (%43) olan hastalara göre (p=0,018) TMPRSS6 gen ifadesi azalmıştır.

Tablo 4-25: Meme kanserli Hastaların HFE2 gen ifadesi ile HER2 arasındaki ilişki

HER2					
		Pozitif	**Negatif**	**Toplam**	**P**
HFE2	İfadesi artan	13 (%93)	38 (%62)	51	0,660
	İfadesi azalan	0 (%0)	16 (%26)	16	
	İfadesi değişmemiş	1 (%7)	7 (%12)	8	
	Toplam	14	61	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-26: Meme kanserli Hastaların HFE2 gen ifadesi ile histolojik tip arasındaki ilişki

	Histolojik tip				
		Duktal	**Lobular**	**Diğer**	**Toplam**	**P**
HFE2	İfadesi artan	44 (%72)	3 (%43)	4 (%57)	51	0,045
	İfadesi azalan	9 (%15)	4 (%57)	3 (%43)	16	
	İfadesi değişmemiş	8 (%13)	0 (%0)	0 (%0)	8	
	Toplam	61	7	7	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Gruplanmış HFE2 gen ifade düzeyi ile nükleer derece, mikrokalsifikasyon, p53, ER, PR, üçlü negatif, histolojik derece, lenf nodülü, metastaz, tümör büyüklüğü, klinik aşama, tümör yerleşimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,205; p=0,722; p=0,697; p=0,172; p=0,215; p=0,172; p=0,578; p=0,123; p=0,479; p=0,153; p=0,185; p=0,768, sırasıyla). Diğer yandan, HFE2 gen ifade düzeyi ile HER2 ve histoljik tip arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak

anlamlı bir fark saptandı. HER2 pozitif (%93) olan hastalar HER2 negatif (%62) olan hastalara göre (p=0,018); histolojik tipi duktal (%72) olan hastalar histolojik tipi lobular (%43) ve diğer (%57) olan hastalara göre (p=0,024) HFE2 gen ifadesi artmıştır.

Tablo 4-27: Meme kanserli Hastaların IRP1 gen ifadesi ile nükleer derece arasındaki ilişki

Nükleer Derece					
		I,II	**III,IV**	**Toplam**	**P**
IRP1	İfadesi artan	31 (%76)	26 (%79)	57	0,029
	İfadesi azalan	2 ((%5)	6 (%18)	8	
	İfadesi değişmemiş	8 (%19)	1(%3)	9	
	Toplam	41	33	74	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-28: Meme kanserli Hastaların IRP1 gen ifadesi ile mikrokalsifikasyon arasındaki ilişki

Mikrokalsifikasyon					
		Var	**Yok**	**Toplam**	**P**
IRP1	İfadesi artan	42 (%82)	16 (%67)	58	0,001
	İfadesi azalan	1 (%2)	7 (%29)	8	
	İfadesi değişmemiş	8 (%16)	1 (%4)	9	
	Toplam	51	24	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-29: Meme kanserli Hastaların IRP1 gen ifadesi ile histolojik tip arasındaki ilişki

	Histolojik tip				
IRP1	**Duktal**	**Lobular**	**Diğer**	**Toplam**	**P**
İfadesi artan	49 (%80)	5 (%71)	4 (%57)	58	

	İfadesi azalan	8 (%13)	0 (%0)	0 (%0)	8	0,027
	İfadesi değişmemiş	4 (%7)	2 (%29)	3 (%43)	9	
	Toplam	61	7	7	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-30: Meme kanserli Hastaların IRP1 gen ifadesi ile metastaz arasındaki ilişki

Metastaz durumu					
		Pozitif	**Negatif**	**Toplam**	**P**
IRP1	İfadesi artan	3 (%100)	55 (%76)	58	0,00000002
	İfadesi azalan	0 (%0)	8 (%11)	8	
	İfadesi değişmemiş	0 (%0)	9 (%13)	9	
	Toplam	3	72	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Gruplanmış IRP1 gen ifade düzeyi ile p53, ER, PR, HER2, üçlü negatif, histolojik derece, lenf nodülü, tümör büyüklüğü, klinik aşama, tümör yerleşimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,450; p=0,257; p=0,938; p=0,319; p=0,384; p=0,189; p=0,204; p=0,925; p=0,934; p=0,186 sırasıyla). Diğer yandan, IRP1 gen ifade düzeyi ile nükleer derece, mikrokalsifikasyon, histolojik tip ve metastaz durumu arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Mikrokalsifikasyonu olan (%82) hastalar mikrokalsifikasyonu olmayan (%67) hastalara göre (p=0,001); histolojik tipi duktal (%80) olan hastalar histolijk tipi lobular (%71) ve diğer (%57) olan hastalara göre (p=0,030); metastaz durumu pozitif olan (%100) hastalar metastaz durumu negatif (%76) olan hastalara kıyasla (p=0,00000002) IRP1 gen ifadesi artmıştır. Ayrıca nükleer derecesi I,II olan hastalarda (p=0,013), mikrokalsifikasyonu olmayan hastalarda (p=0,003), histolijk tipi diğer olan hastalarda (p=0,029) gen ifadesi azalan grupla gen ifadesi değişmemiş grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

Tablo 4-31: Meme kanserli Hastaların TFRC gen ifadesi ile histolojik tip arasındaki ilişki

	Histolojik tip				
	Duktal	**Lobular**	**Diğer**	**Toplam**	**P**
	Duktal	**Lobular**	**Diğer**	**Toplam**	
TFRC İfadesi artan	11 (%18)	1 (%14)	5 (%71)	17	0,030
İfadesi azalan	43 (%70)	5 (%72)	2 (%29)	50	
İfadesi değişmemiş	7 (%12)	1 (%14)	0 (%0)	8	
Toplam	61	7	7	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Tablo 4-32: Meme kanserli Hastaların TFRC gen ifadesi ile tümör yerleşimi arasındaki ilişki

Tümör yerleşimi					
		Sağ	**Sol**	**Toplam**	**P**
TFRC	İfadesi artan	11 (%34)	6 (%14)	17	0,112
	İfadesi azalan	18 (%56)	32 (%74)	50	
	İfadesi değişmemiş	3 (%10)	5 (%12)	8	
	Toplam	32	43	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Gruplanmış TFRC gen ifade düzeyi ile nükleer derece, mikrokalsifikasyon, p53, ER, PR, HER2, Üçlü negatif, histolojik derece, lenf nodülü, metastaz, tümör büyüklüğü, klinik aşama, arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,152; p=0,398; p=0,484; p=0,786; p=0,656; p=0,330; p=0,850; p=0,239; p=0,796; p=0,335; p=0,680; p=0,766; sırasıyla). Diğer yandan, TFRC gen ifade düzeyi ile histolojik tip ve tümör yerleşimi arasındaki ilişki incelendiğinde

istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Histolojik tipi lobular (%72) olan hastalar histolojik tipi duktal (%70) ve diğer (%29) olan hastalara göre (p=0,013); tümör yerleşimi solda (%74) olan hastalar tümör yerleşimi sağda (%56) olan hastalara kıyasla (p=0,037) TFRC gen ifadesi azalmıştır.

Tablo 4-33: Meme kanserli Hastaların HAMP gen ifadesi ile histolojik derece arasındaki ilişki

Histolojik derece					
		I,II	**III,IV**	**Toplam**	**P**
HAMP	İfadesi artan	23 (%49)	8 (%29)	31	0,018
	İfadesi azalan	22 (%47)	13 (%46)	35	
	İfadesi değişmemiş	2 (%4)	7 (%25)	9	
	Toplam	47	28	75	

*Pearson'nın 2x3 ki-kare testine göre elde edilen p değeri

Gruplanmış HAMP gen ifade düzeyi ile nükleer derece, mikrokalsifikasyon, p53, ER, PR, HER2, Üçlü negatif, histolojik tip, , lenf nodülü, metastaz, tümör büyüklüğü, klinik aşama, tümör yerleşimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,196; p=0,783; p=0,745; p=0,560; p=0,683; p=0,703; p=0,486; p=0,554; p=0,908; p=0,109; p=0,428; p=0,147; p=0,691 sırasıyla). Diğer yandan, HAMP gen ifade düzeyi ile histolojik derece arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Histolojik derecesi I,II (%47) olan hastalar HAMP gen ifadesi histolojik derecesi III, IV (%29) olan hastalara kıyasla (p=0,007) artmıştır. Ayrıca histolijk derecesi I,II olan hastalar (p=0,034) gen ifadesi azalan grupla gen ifadesi değişmemiş grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

Gruplanmış MiRNA 122 gen ifade düzeyi ile nükleer derece, mikrokalsifikasyon, p53, ER, PR, HER2, üçlü negatif, histolojik tip, , lenf nodülü, metastaz, tümör büyüklüğü, klinik aşama, tümör yerleşimi ve histolojik derece arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark saptanmadı.

Çalışmamızda ayrıca TMPRSS6, HFE2, HAMP, IRP1, FPN1, TFRC ve miRNA-122 ifade düzeylerinin birbirleriyle olan ilişkilerini, parametrik olmayan

Pearson korelasyon testi kullanarak inceledik. IRP1 ve FPN1 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptandı (r=0,266; p=0,022). Ayrıca IRP1 ve miRNA 122 arasında da istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptandı (r=0,231; p=0,048).

Diğer yandan TMPRSS6, HFE2, HAMP, IRP1, FPN1, TFRC ve miRNA122 ifade düzeyleri ile hematolojik veriler (WBC, RBC, HGB, HCT, PLT, MCV, MCH, MCHC ve RDW) arasındaki ilişki de, Pearson korelasyon testi ile karşılaştırıldı. Sadece IRP1 ifade düzeyleri ile PLT seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptandı (r=0,260; p=0,025).

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kanser nedenli ölümlerde ilk sırada yer almaktadır. Kadınlar arasında ise en yaygın görülen kanser tipidir. Hem genetik hem de çevresel faktörleri içeren heterojen bir hastalıktır. Tedavi stratejilerindeki ilerlemelere rağmen, kesin tedavisi bulunmamaktadır. Uygulanan tedavi metodları, bazen tam iyileşme sağlayabilmekte, bazen de hastalık semptomlarının hafifletilmesine ve sağkalımın artmasına katkıda bulunmaktadır. Meme kanserinin tanısı, tedavisi ve prognozu için yeni stratejilere ihtiyaç vardır (Wang B ve ark. 2012). Dolayısıyla meme kanser gelişim ve ilerleme süreçlerinde rol oynayan hücresel ve moleküler süreçlerin daha iyi anlaşılması gerekir (Marques O ve ark. 2014).

İnsan miRNA'larını kodlayan genlerin yaklaşık yarısının, kanserde genellikle çoğalan, delesyona uğrayan ya da yeniden düzenlenmiş kanserle ilişkili genomik bölgelerde bulunduğunu, bazı miRNA'ların tümör baskılayıcı genler ya da onkogenler olarak hareket ettiğini gösterilmiştir. Günümüze kadar, miR-9, miR-125b, miR-301, miR-155, miR-135a ve miR-122 gibi bazı insan miRNA'larının meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkisi gösterilmiştir. Bu bulgular, miRNA'ların meme kanseri tümörogenezinde rol oynadığını göstermektedir (Wang B ve ark. 2012). Araştırmalar, miRNA'ları kullanarak tümörü hedefleyen tedavilerin yeni bir teşhis ve tedavi aracı haline geldiğini göstermiştir. miR-122'nin aşırı ekspresyonunun hücre büyümesini, in vitro koloni oluşumunu ve in vivo tümörogenezi inhibe ettiğini göstermektedir (Wang B ve ark. 2012).

Wang ve ark., miRNA 122'nin meme kanserindeki rolünü araştırmışlardır. miRNA 122'nin insan meme kanseri hücrelerindegi gen ifadeleri incelenmiş, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü dağılımı ve koloni oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Wang B ve ark. 2012). Wang ve ark. miRNA 122'nin meme kanseri örneklerinde ve meme kanseri hücre hatlarında genellikle aşağı yönde regülasyonunu bildirmişlerdir. miRNA 122' nin aşırı ekspresyonu, in vitro G1-faz hücre döngüsünün durdurulması vasıtasıyla, sadece koloni oluşumunu ve hücre proliferasyonunu baskılamakla kalmaz, aynı zamanda in vivo olarak tümörogenezi de azaltır. miRNA 122'nin aşırı ekspresyonunun, hedeflerinden biri olan insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörünün (IGF1R) ekspresyonunu da azalttığını gözlemlemişlerdir. IGF1R mRNA seviyeleri miRNA 122 ekspresyonu ile ters korelasyon göstermektedir. Birlikte ele

alındığında, miRNA 122'nin bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü ve IGF1R'yi hedef alarak ve PI3K/Akt/mTOR/p70S6K yolunu düzenleyerek tümörogenezin inhibe edilmesinde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. Bu bulgular göz önüne alındığında, miRNA122 meme kanseri tedavisi için yeni bir terapötik veya tanısal/prognostik hedef olabilir (Wang B ve ark. 2012). Sonuç olarak, miRNA 122'nin IGF1R sinyalizasyonunu yüksek seviyede koordineli olarak düzenlediği gösterilmiştir. Meme kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak, miRNA 122'nin aşırı ekspresyonu, hem in vitro hem de in vivo olarak hücre büyümesini inhibe etmektedir (Wang B ve ark. 2012). Bu bulgular, miRNA 122' nin insan kanserlerinde tümör baskılayıcı olarak davranabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, meme kanserinde miRNA 122'nin biyolojik fonksiyonu ve mekanizmalarını inceleyen çalışmalar devam etmektedir (Wang B ve ark. 2012).

Çalışmamızda tümör dokusundaki miRNA 122 ifade düzeyini normal doku ile kıyaslandığında, miRNA 122 ifade düzeyinin tümörlü dokuda azalmış olduğu tespit ettik. Tümör baskılayıcı fonksiyonu olan miRNA 122'nin tümör dokusundaki ifade düzeyinin düşük olması beklenen bir sonuç olup, sonuçlarımız miRNA'nın tümör baskılayıcı fonksiyonunu desteklemektedir. Literatürde miRNA-122 inhibisyonunun HFE2 ekspresyonunu baskılayarak, hepsidin transkripsiyonunun aktivasyonuna neden olduğu gösterilmektedir. Sonuçlarımız, miRNA 122'in hedefleri arasında bulunan HFE2 gen ifadesinde azalma olduğunu göstermektedir. Moleküller arası etkileşimler ile hepsidin düzeyinin artması ve dolayısıyla kanser hücrelerindeki demir homeostazının bozulması sonucu demir miktarı artmaktadır. Bu durum kanser hücre davranışına uygundur. Ayrıca sonuçlarımız IRP1 ve miRNA 122 arasında istatistiksel olarak pozitif yönde bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Böyle bir ilişki IRP1'in miRNA 122'nin hedeflerinden biri olmadığını düşündürmektedir.

Radojicic ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, üçlü negatif meme karsinomunda, dokuz miRNA'nın ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve miRNA-10b, miRNA-145, miRNA-205 ve miRNA-122 ekspresyon seviyelerinin meme kanseri dokusunda normal dokuya göre daha azalmış olduğu, miRNA-21, miRNA-210 ve miRNA-221 seviyelerinin ise artmış olduğu görülmüştür. Bu bulgular bizim azalmış miRNA 122 bulgumuzu desteklemektedir. MiRNA-222 ve miRNA-296_5p'nin ekspresyon seviyelerinin ise değişmediği tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmda, miRNA-10b, miRNA-145, miRNA-205 ve miRNA-122, üçlü negatif meme kanseri vakalarında

normal dokuya göre daha azalmış ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Bu miRNA'nın ekspresyon seviyeleri, ERα-negatif kanser dokusuna kıyasla ERα-pozitif normal dokuda daha yüksek bulunmuştur (Radojicic J ve ark. 2011). MiRNA ekspresyon seviyeleri az farklılaşmış tümör hücrelerinde daha düşüktür. Hücre farklılaşması ve tümörün gelişim durumu ile ilişkilidirler. Farklı miRNA'ların ekspresyon seviyeleri, yani ER ve PR ekspresyonu, lenf nodu durumu, vasküler invazyon, proliferasyon indeksi ve tümör evresi gibi meme kanserinin spesifik patolojik özellikleri ile ilişkilendirilmektedir (Radojicic J ve ark. 2011). Bizim çalışmamızda ise, miRNA122 ifade değerleri ile nükleer derece, mikrokalsifikasyon, p53, PR, HER2, üçlü negatif, histolojik tip, lenf nodülü, metastaz durumu, tümör büyüklüğü, klinik aşama, tümör yerleşimi gibi prognozda etkili klinik parametreler arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir. MiRNA122 gen ifade seviyesinin meme kanseri hastalarında prognostik açıdan incelenebilmesi için daha fazla klinik parametreye ihtiyaç olabilir.

Kanserin en önemli özelliklerinden biri metastaz yapma yeteneğidir. Metastatik kaskad, henüz tam olarak anlaşılmayan bir dizi sıralı, birbiriyle ilişkili adımdan oluşur. TTSP'ler, kanser metastazındaki rolleri son zamanlarda araştırma konusu olmuştur. Ancak TTSP'lerin çoğunluğunun, fizyolojik rolleri ve etki mekanizmaları hala belirsizdir. Matriptaz-2 yakın zamanda TTSP ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır. Bugüne kadar TMPRSS6 hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Parr C ve ark. 2007).

Son zamanlarda hücre içi demir içeriğini en aza indiren gen kombinasyonlarının meme kanserinde iyi prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak tümörlerde TMPRSS6 ekspresyonuyla ilgili az sayıda çalışma tanımlamıştır. TMPRSS6 proteini, fare Leydig tümör hücrelerinde gözlenirken, Leydig hücrelerinin primer kültürlerinde gözlenmemiştir. TMPRSS6 normal meme dokusunda eksprese edilir. Ancak meme kanserlerindeki invaziv duktal hücrelerde yüksek düzeylerde tespit edilmiştir. Başka bir çalışma, TMPRSS6 ekspresyon artışının meme kanserinde düşük sağkalım oranı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, meme ve prostat kanseri çalışmaları, TMPRSS6' nın tümör gelişimi ve büyümesinde baskılayıcı rol oynadığını bildirmiştir (Tuhkanen H ve ark. 2013). Bizim çalışmamızda TMPRSS6 ifade düzeylerinin normal doku ile kıyaslandığında, tümörlü dokuda artmış olduğu tespit edildi. Bu bulgular literatür bilgilerini desteklemektedir.

Tuhkanen ve ark. 83 meme tümör dokusunun gen ekspresyon farklılıklarına bakmışlardır. TMPRSS6'nın düşük ekspresyonu, ER negatif, PR negatif ve HER2

pozitif tümörlerle ilişkilendirilmiştir. Üçlü negatif meme tümörlerinin, üçlü negatif olmayan tümörlere göre anlamlı şekilde daha düşük gen ekspresyonuna sahip olduğu tespit etmişlerdir. TMPRSS6 ekspresyonu, tümör progresyonu sırasında azalmış görünmektedir. Çünkü düşük gen ekspresyonu, daha az farklılaşmış, büyük, duktal veya lobüler tümörlerle ilişkilidir (Tuhkanen H ve ark. 2013). TMPRSS6 düzeyleri meme tümörü derecesine (grade 1, grade2, grade3) göre değerlendirilmiştir. Grade 2 ve grade 3 tümörleri, grade 1 ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmış TMPRSS6 seviyeleri gözlenmiştir. TMPRSS6 transkript seviyeleri ile histolojik tipler arasındaki ilişki de analiz edilmiştir. Bizim çalışmamızda TMPRSS6 mRNA ekspresyon seviyeleri, nükleer derecesi I,II, mikrokalsifikasyonu olmayan, p53 negatif, histolojik derecesi I,II ve ER pozitif olan meme kanseri hastalarında düşük bulunmuştur. Bulgularımız Tuhkanen ve ark. larının çalışmasını desteklememektedir. Bizim çalışmamızın sonuçları TMPRSS6 mRNA ekspresyonunun, tümör progresyonunun ileriki safhalarından ziyade ilk safhalarında daha düşük olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi gen ifadesi düzeyi ile protein ifade düzeylerinin her zaman paralel olmamasından kaynaklanabilir.

Daha önce meme kanserinde hücre içi demir içeriğini en aza indiren genler (anti-import veya pro-export) iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Hepsidinin negatif düzenleyicisi olarak TMPRSS6, bir pro-export genidir. Bu nedenle, düşük TMPRSS6 ifadesi düşük sağ kalım ile ilişkilidir. Parr ve ark. yapmış olduğu çalışmada, 20 meme kanser hastasının tümör dokusunda TMPRSS6 mRNA ekspresyonu belirgin şekilde yüksek olarak, protein ekspresyonu düşük olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın diğer bir bulgusu, düşük seviyelerdeki TMPRSS6 protein ekspresyonu kötü prognozu belirten yüksek Nottingham Prognostik İndeks ile ilişkili olarak bulunmasıdır. Bu çalışmada kullanılan Nottingham Prognostic Index prognostik sınıflandırma bizim çalışmamızda kullanılmamıştır (Tuhkanen H ve ark. 2013). Nottingham Prognostik İndeksine göre meme kanseri hastaları sağ kalım durumuna göre 3 gruba ayrılmaktadır. NPI1 grubu iyi prognozlu hastaları, NPI2 grubu orta prognozlu hastaları temsil ederken NPI3 kötü prognoza sahip hastalar grubudur. Orta ve kötü prognozlu hastalar (sırasıyla NPI2 ve NPI3) iyi prognoz grubundaki hastalarla (NPI1) karşılaştırıldığında, orta ve kötü prognozlu hastaların TMPRSS6 düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Diğer yandan, TMPRSS6 düzeyleri meme tümörü derecesine (grade 1, grade2, grade3) göre değerlendirilmiştir. Grade 2 ve grade 3 tümörleri, grade 1 ile karşılaştırıldığında

önemli ölçüde azalmış TMPRSS6 seviyeleri gözlenmiştir. TMPRSS6 transkript seviyeleri ile histolojik tipler arasındaki ilişki de analiz edilmiştir.

TMPRSS6 protein ekspresyonu daha önce tümörün ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir. Hipoksi ve özellikle hipoksi ile indüklenebilir faktörün (HIF) TMPRSS6'yı arttırabildiği ve HIF'nin kanserde negatif prognostik bir gösterge olduğu iyi bilinmektedir. Dahası TMPRSS6 ECM bileşenlerini in vitro olarak bozabilir ve bir dereceye kadar uPA'yı aktive etme yeteneğine sahiptir. Miller ve ark. invaziv duktal karsinomda, yükselmiş TMPRSS6 düzeyleri tespit etmiştir. Meme kanserinde TMPRSS6 ekspresyonunun metastazsız sağkalım ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. TMPRSS6, meme kanseri mikroçevresinde çok sayıda fonksiyona sahiptir. TMPRSS6 demir homeostazını meme tümörlerinde oldukça karmaşık bir yol olan BMP sinyalizasyonu ile düzenler. Bazı TTSP'lerin hücresel lokalizasyonu, tümörogenez sırasında değişmektedir. Her ne kadar TTSP'ler membrana bağlı proteinler olarak tanımlansa da, epitelyal meme kanseri hücrelerinin sitoplazmasında TMPRSS6 proteinine rastlanmaktadır (Tuhkanen H ve ark. 2013).

Siobhan L. Webb ve ark. normal doku kesitlerine kıyasla kanserli meme dokusu kesitlerinde TMPRSS6 boyanmalarının sadece epitelyal bölümlerle sınırlı olduğunu göstermiştir. Immunohistokimya tekniklerin aksine kantitatif PCR sonuçları, TMPRSS6 seviyelerinin normal dokularla karşılaştırıldığında tümörde yüksek olduğunu göstermiş ayrıca, düşük NPI ve TNM evrelerinde TMPRSS6 seviyelerinin belirgin olarak daha yüksek ve iyi prognozla korele olduğunu göstermiştir. TMPRSS6 'nın aşırı ekspresyonunun, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin in vitro ve in vivo da agresif özelliklerini azalttığını belirlemişlerdir (Webb SL ve ark. 2013). Bu konuda yapılan çalışmaların geneline bakılacak olursa, çalışmaların çoğunluğunda bizim de çalışmamızda gösterdiğimiz gibi tümör dokusunda TMPRSS6 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber yüksek bulunurken, TMPRSS6 düzeyi ile klinik bulgular arasındaki ilişkide farklı sonuçlar bidirilmiştir.

Ferroportin (FPN1) bilinen tek omurgalı demir akış pompasıdır ve transkripsiyon sonrası IRE-IRP sistemi ve hepsidin tarafından düzenlenir. Ferroportin, malign meme epitelinde azalan yönde düzenlenir, bu da tümör demir depolarında genel bir artışa ve önemli ölçüde daha hızlı hücre çoğalmasına neden olur (Bogdan AR ve ark 2015). Meme kanseri hücreleri, malign olmayan hücrelere kıyasla aşırı yüksek miktarda hepsidin eksprese eder. Aşırı hepsidin ekspresyonu meme tümörlerinde ferroportini

azaltan yönde regüle etmek için otokrin veya parakrin tarzda etki edebilir. Normalde, ferroportin, demirin kullanılabilirliğini sınırlandırarak kanser gelişimini baskılar. Böylece artan hepsidin regülasyonunun ferroportin regülasyonunu azaltması veya FPN1 transkripsiyonunun inhibisyonu tümör ilerlemesini teşvik eder (Bogdan AR ve ark. 2015).

Her ne kadar hepsidin kaynaklı FPN1 hücre içine alımı ve degredasyonu iyi tanımlanmış olsa da, özellikle kanser hücrelerinde mRNA düzeyinde FPN1 düzenlenme çalışmaları çok sınırlıdır. Düzensiz hepsidin-ferroportin ekseni nedeniyle bozulan demir homeostazı, kanserler de dahil olmak üzere birçok hastalıkta rol oynamaktadır. FPN1 seviye azalmasının meme kanserlerinde kötü prognozu gösterdiği ve FPN1 ekspresyonu yüksek hastaların sağkalım oranlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir (Chen Y ve ark. 2015).

Chen ve ark. yapmış olduğu çalışmada meme kanserinde hepsidin-ferroportin sinyalizasyonundan sorumlu mekanizmalar ele alınmıştır. Çalışmalarının sonuçlarında azalan FPN1'in MDA-MB-231 hücre büyümesini in vitro ve in vivo olarak hızlandırdığını ortaya koymuşlardır. Çalışmalar, FPN1'in hücre içi demir konsantrasyonunu kontrol ederek meme kanseri ilerlemesinde belirleyici olduğunu göstermektedir (Chen Y ve ark. 2015).

Pinnix ZK ve ark. ferroportin düzeyindeki değişiklikler ile agresif meme kanseri fenotipi arasındaki korelasyonunu araştırmıştır. Düşük konsantrasyonlarda ferroportin eksprese eden MDA-MB-231-luc hücreleri ile birlikte ferroportin ekspresyon vektörü farelere transfekte edildikten sonra ferroportin düzeyi malign olmayan HME hücrelerindeki seviyelere gelmiştir. Daha sonra dişi nude farelere kontrol yağıyla ya da transfekte edilmiş hücrelerle meme yağ pedine ortotopik olarak enjekte edilmiştir. Kontrol tümörleri insandaki boyut sınırına ulaştığında, tümör büyümesi 4 hafta boyunca izlenmiştir. Ferroportinin artmış ekspresyonu, tümör ağırlıklarını ve tümör büyümesinin hızını azaltmıştır. Bu nedenle, aşırı ferroportin ekspresyonu, in vivo olarak ksenograflanmış meme kanseri hücrelerinin büyümesini azaltmaktadır. Ferroportin konsantrasyonlarının meme kanseri hastalarının dokularında da değişip değişmediğini test etmek için immünohistokimyasal analiz yapılmıştır. Normal epitel, duktal karsinom ve invaziv meme kanseri alanlarını içeren tek bir hastadan elde edilen dokuda boyama yoğunluğunun artması malign potansiyelin azaldığını göstermiştir. Ferroportin normal duktal yapılarda en yüksek ifadeye sahipken invaziv dokuda en

düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu gözlemler, insan meme kanseri dokusunda ve meme kanseri hücre hatlarında ferroportin protein ekspresyonun azaldığını göstermektedir (Pinnix ZK ve ark. 2010). Bizim de çalışmamızda, FPN1 ifade düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, tümör dokusunda literatürle uyumlu olarak düşük bulunmuştur.

Meme kanser alt tiplerinin ferroportin gen ekspresyonunda farklılık gösterip göstermediği de incelenmiştir. İyi prognozlu alt tiplerde (normal ve lüminal A) ferroportin ekspresyonu, kötü prognozlu alt tipler (ERBB2 +, lüminal B ve bazal) deki ferroportin ekspresyonuna göre yüksek olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, düşük ferroportin seviyesi yüksek histolojik derece, östrojen reseptörü (ER) yokluğu ve hastalığın lenf nodlarına yayılımı dahil kötü prognostik sonuçlar ile ilişkili olduğu da tespit edilmiştir. Bu nedenle, düşük ferroportin gen ekspresyonu kötü prognozlu moleküler ve klinik alt tiplerle ilişkilidir (Pinnix ZK ve ark. 2010).

Bizim bulgularımız da literatürdeki bulguları desteklemektedir; histolojik derecesi I,II olan nispeten klinik durumu daha iyi durumdaki hastalardaki FPN1 gen ifadesi histolojik derecesi III olan hastalara kıyasla azalmıştır. Diğer taraftan bizim bulgularımıza göre düşük FPN1 düzeyi ER pozitif hastalar ile ilişkili bulunmuştur.

Bir başka çalışmada da, 276 ER pozitif meme kanser hastasının yüksek FPN1 ve düşük hepsidin düzeylerine sahip olduğu durumda 10 yıllık metastazsız sağkalım oranının % 89 olduğu, diğer yandan düşük FPN ve yüksek hepsidin düzeyine sahip olduğu durumda 10 yıllık metastazsız sağkalım oranının benzer tedavi rejimlerine rağmen % 65 olduğu tespit edilmiştir (Bogdan AR ve ark 2015, Pinnix ZK ve ark 2010) Sonuç olarak, ferroportin ve hepsidin meme kanseri için etkili prognostik gösterge ve terapötik stratejiler için yararlı bir rehber olabilir. Örneğin, düşük ferroportin/ yüksek hepsidin tümörlü hastalar (yani, yüksek hücre içi demir içeren tümörler) demir bağlama tedavisi için iyi adaylar olabilir. (Bogdan AR ve ark 2015). Meme kanserinde, azalmış FPN1 metastazsız sağkalım oranında azalma ile ilişkilidir. Düşük FPN 1 seviyeleri, östrojen reseptörlerinin yokluğu, yüksek histolojik dereceli ve lenf nodu metastazı gibi kötü prognostik belirteçlerle anlamlı şekilde ilişkilidir. Yapılan araştırmalar, meme kanseri hücrelerinde FPN 1 ifadesinin, farelerde kanser ksenograftlarının büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir (Manz DH ve ark. 2016). Ayrıca, meme kanseri hücrelerinde FPN1 aşırı ekspresyonunun, Snail1, Twist1, ZEB2, ve vimentin gibi epitelyal mezenşimal geçiş belirteçlerinin seviyelerini önemli ölçüde azaltarak farelerde akciğer

ve karaciğere metastazı bozduğunu tespit etmişlerdir (Manz DH ve ark. 2016, Guo W ve ark. 2015)

Kanser hücreleri tarafından üretilen hepsidin, membran FPN1'i yıkmak için lokal bir otokrin sinyali başlatır. Tümör dokularındaki yüksek hepsidin ekspresyonu, metastatik progresyon ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Manz DH ve ark. 2016). Elde edilen bulgular, hepsidinin onkogenik özelliğinin, FPN1'in hücre içine alınması ve bozulmasını başlatarak tümör hücrelerinde hücre içi demir içeriğini arttırabilmesinden kaynaklanabileceğini göstermektedir (Manz DH ve ark. 2016). Orlandi ve ark. sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, meme kanseri ve benign meme lezyonları olan hastaların, hepsidin düzeylerinin anlamlı derecede arttığını bulmuşlardır. Bununla birlikte, sadece birkaç çalışmada hepsidinin meme kanseri kemik metastazı ile korelasyonu belirlenmiştir (Shao X ve ark. 2017).

Pinnix ve ark. FPN ve hepsidinin, meme kanseri hücrelerinde demir homeostazı düzensizliğinde önemli rol oynadığını göstermiştir. İlk önce kültüre edilmiş meme kanseri hücrelerinde, hepsidinin transkripsiyon sonrası mekanizmalar yoluyla FPN ekspresyonunu negatif olarak düzenlediğini göstermiştir. Ek olarak, hepsidin konsantrasyonu tümör hücrelerinde normal hücrelere göre daha yüksek bulunmuştur. Son çalışmalar meme kanseri hastalarının sağlıklı kontrol gruplarından daha yüksek plazma hepsidin konsantrasyonuna sahip olduğunu ve hepsidinin, kanser hastalarında FPN ekspresyonunu negatif olarak düzenleyebildiğini bildirmektedir. Ciniselli ve ark. benign meme tümörü olan hastalarla karşılaştırıldığında, malign meme tümörü olan hastalarda hepsidinin anlamlı derecede arttığını, ancak meme tümörünün hastaların % 87'sinde 2 cm'den az olduğu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar, hepsidinin meme kanserindeki potansiyel rolünü doğrulamaktadır (Shao X ve ark. 2017).

Kanser hastalarında anemi, sıklıkla kanser tedavisinin yan etkisi olarak görülmektedir. Bazı çalışmalar kanser hastalarında herhangi bir anti kanser tedavisinden önce aneminin ortaya çıkabileceğini göstermiştir (Shao X ve ark. 2017). 2001 yılında European Cancer Anemia Survey (ECAS) yapmış olduğu bir çalışmada meme kanseri olan 3,278 olguda anemiyi araştırmıştır. Takip dönemindeki hastaların yaklaşık % 62' sinde aneminin en az bir kez meydana geldiği ortaya koyulmuştur. Kanser metastazı olan olgularda ise anemi insidansı % 30 olarak belirlenmiştir (Shao X ve ark. 2017).

Hepsidin, intestinal mukozal hücrelerde FPN'i azaltabilir ve intestinal mukozada biriken demir atılımını önleyebilmekte ve böylece kandaki demir konsantrasyonunun düşmesine neden olabilmektedir. Ek olarak, hepsidin, makrofaj hücre zarlarında FPN'i azaltabilir ve demir salınımını önleyebilir, zayıf demir anemisini arttırabilir ve daha sonra anemiye yol açabilmektedir. Artan hepsidin seviyeleri, meme kanseri olan hastaların % 41-82' sinin neden ameliyat öncesi anemi olduğunu kısmen açıklayabilmektedir. Shao X ve ark. yapmış olduğu çalışmada, hepsidin, meme hiperplazili hastalarda Hb ile negatif korelasyon göstermiştir. Bu negatif korelasyon kemik metastazı olan meme kanseri hastalarında daha belirgindir. Son çalışmalar, özellikle ileri prognozlu kanser hastalarında hepsidinin Hb ile negatif korelasyonu olduğunu bildirmektedir. Bu çalışma ayrıca ileri meme kanserli hastalarda artmış hepsidin düzeyinin anemi insidansı ile ilişkisini doğrulamaktadır. Ancak kemik metastazı olmayan meme kanseri hastalarında hepsidin ve Hb arasında anlamlı bir negatif ilişki belirlenememiştir (Shao X ve ark. 2017). Durigova ve ark., ayrıca meme kanserli hastalarda erken kemoterapi aşamasında, sadece başlangıç Hb ve hepsidin düzeylerinin aneminin bağımsız belirleyicileri olduğuna inanmaktadır (Shao X ve ark. 2017).

Çin ve diğer ülkelerden gelen raporlara göre serum hepsidin ve FPN' nin anemi gelişimi ile yakından ilgili olduğu gösterilmiştir. Nemeth ve ark. hepsidinin doğrudan ferroportin üzerinde etkili olabileceğini, aşağı yönde regülasyonunu ve degredasyonuna sebep olabileceğini bildirmiştir. Kanserli hastalarda aneminin ana nedeninin yüksek hepsidin ekspresyonu olduğu sonucuna varmışlardır (X. Pan ve ark. 2016).

Pan X ve ark. 62 meme kanseri hastasının doku ve serum örneklerinde, hepsidin ve ferroportin protein ifadesini elisa ve immünohistokimya yöntemleri kullanarak analiz etmişlerdir. Aynı zamanda, hepsidin, ferroportin ve anemi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Meme kanser dokusunda, hepsidin ekspresyon seviyesi, komşu normal meme dokusuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, meme kanseri dokusunda FPN ekspresyon oranı, komşu normal meme dokusuna göre anlamsız olarak daha düşük bulunmuştur. Anemi ile meme kanseri dokularındaki hepsidin veya ferroportin ekspresyonu arasında açık bir ilişkiye rastlamamışlardır. Ayrıca meme kanseri dokusunda hepsidin ve ferroportin ekspresyonu ile bu faktörlerin serumdaki seviyeleri arasındaki ilişki incelenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar meme

dokusunda, hepsidin ile ferroportin gen ekspresyonları arasındaki negatif korelasyonu gösterirken, Hb ile serum hepsidin arasında negatif korelasyon ve Hb ile serum ferroportin arasında ise pozitif korelasyonu göstermiştir. Serum ferritinin anemi grubunda, anemi olmayan gruba göre daha yüksek olduğunu, serum ferritin ve hepsidinin pozitif korelasyon gösterdiğini ve bu durumun literatürle uyumlu olmadığını belirlemişlerdir. Hepsidin ve serum ferritinin, demir eksikliği anemisi olan hastalarda anlamlı olarak düşük olduğu ve pozitif olarak korele olduğu bilinmektedir. Ancak Grotto ve Chen ve ark. her ikisi de, hepsidinin, serum ferritin ile pozitif korelasyonunu tespit etmişlerdir. Malyszko ve ark. hepsidin alan bir deney grubunda hepsidin ve serum ferritininin kontrol grubundan daha yüksek olduğunu ve Hb'nin azaldığını bildirmişlerdir.

Lenfositler ve makrofajlarda demir ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunun farklı tümör mikroçevrelerinde değiştiği göz önüne alındığında, Marques ve ark. tarafından primer tümörleri daha önce analiz edilen hastalardan elde edilen metastaz görülen ve metastaz görülmeyen lenf nodları incelenmiştir. Lenf nodlarında hepsidin immüno-ekspresyonu çoğunlukla makrofajlar ile sınırlıdır ve çok az da lenfositlerde gözlenmektedir. Metastaz görülen lenf nodlarında metastaz görülmeyen lenf nodlarına göre, yüksek bir hepsidin immüno-ekspresyonu gözlemlemişlerdir (Marques O ve ark. 2016).

Theurl ve ark. çözünür HJV'nin BMP 6'yı bloke ettiğini ve hepsidin ekspresyonunu inhibe ettiğini bulmuştur. Bu nedenle çözülebilir HJV, inflamatuar sitokin interlökin 6 (HJV tarafından bloke edilmeyen), kanser hastalarında hepsidine bağlı aşırı demir yükünün geri bildirimi gibi birçok düzenleyici mekanizma kanser anemisinde hepsidin değişimlerine katılabilir. Lee, Kemna ve ark., inflamatuar faktör aracılı yolakların, HJV ve transferrin reseptör 2 genlerinin katılımını gerektirmediğini göstermiştir. Zhang ve ark., interlökin 6'nın hepsidin ekspresyonunu indükleyebildiğini, ancak demir artışının HJV regülasyonunu azalttığını bulmuştur. Demirin artması durumunda, hepsidin daha yüksek bir seviyede ifade edilebilmektedir. (X. Pan ve ark. 2016)

Bizim çalışmamızda ise literatür bulgularından farklı olarak tümör dokusundaki HAMP ifade düzeyi normal doku ile kıyaslandığında, istatiksel olarak anlamlı olmamakla beraber herhangi bir fark tespit etmedik. Klinik bulgulardan sadece

histolojik derecesi I,II olan hastalarda HAMP gen ifadesi ise histolojik derecesi III, IV olan hastalara kıyasla artmıştır.

Bir transmembran glikoprotein homodimeri olan TFRC, diferrik transferini bağlar. Bağlanma, demir alımı ve hücre büyümesinin düzenlenmesi için gereklidir. Birçok çalışma, kanser hücrelerinin, normal hücrelere kıyasla TFRC ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Meme, böbrek hücresi ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi kanserlerde görülen yüksek seviyelerdeki TFRC ekspresyonu, kötü hasta prognozu ile ilişkili olarak bildirilmiştir. TFRC ekspresyonu, intraselüler demir seviyelerine cevap olarak post-transkripsiyonel seviyede IRP'ler tarafından düzenlenir. TFRC ayrıca bir onkoprotein olan c-Myc'nin doğrudan transkripsiyonel hedefidir (Manz DH ve ark. 2016).

Normal hücrelerin tümörogenik hücrelere dönüşümü ve tümör progresyonu halen büyük ölçüde bilinmeyen karmaşık süreçler içerir. Değişimler temel olarak bazı kilit genlerin birikmiş mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Transferin reseptörlerinin (TFR'lerin) bu süreçleri kontrol etmedeki kilit rolleri son on yılda gösterilmiştir. Tümör progresyonuna katılan TFR proteinini kodlayan TFRC geni, karaciğer, meme, akciğer ve kolon kanseri hücrelerinde bol miktarda eksprese edilmektedir. TFRC 'in çeşitli kanserlerde anormal şekilde eksprese edildiği göz önüne alındığında, kanser hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü, istilasını, apoptozunu ve metastazını etkilemektedir (Shen Y ve ark. 2018). TFRC aşırı ekspresyonu ile artan demir alınımı meme kanseri hücrelerinin gelişimine yol açmaktadır. TFRC 'in insan meme kanserinde aşırı eksprese edildiği, kanser hastalarını erken aşamada teşhis ve tedavi etmek için uygun bir biyobelirteç olduğu bildirilmiştir. Miller ve ark. 674 meme kanseri vakasından oluşan mikroarray verilerine dayanarak, meme kanseri prognozuna bağlı olarak TFRC geninin ekspresyonunu tespit etmişler ve yüksek TFRC ekspresyonunu kötü prognozla ilişkilendirmişlerdir. Singh ve ark. benign ve normal lezyonlarda TFRC gen ekspresyonunun invaziv karsinom ve premalign lezyonlardakinden anlamlı derecede düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bu arada, yüksek dereceli meme kanserinde diğer sınıflardan daha fazla TFRC eksprese edildiği belirlenmiştir. Jiang ve ark. meme kanseri hücrelerinde TFRC ekspresyonunun değişip değişmediğini araştırmışlardır. MCF-7 hücrelerinde, insan meme epitel MCF-12A hücrelerinde olduğundan daha fazla TFRC'nin eksprese edildiğini göstermiştir. Wang ve ark. meme kanserinde IRP2'nin demir birikiminde hakim olduğunu tespit etmişlerdir (Wang W ve ark. 2014). IRP2 aşırı

ekspresyonu, TFRC' nin ifadesinin artması ve ferritin ağır zincirinin azalması ile ilişkilendirilmiştir. Östrojen reseptörü (ER) + / progesteron reseptörü (PR) + invaziv duktal meme kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki invaziv vakaların yaklaşık %45' ini oluşturmaktadır. Buas ve ark. 121 vaka ve 121 kontrol ile yaptıkları çalışmada, TFRC ekspresyonlarının önemli ölçüde farklı olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, TFRC'i prediagnostik biyoörneklerle ER + / PR + duktal meme kanseri için plazma protein biyobelirteci olarak doğrulamışlardır (Buas MF ve ark. 2015).

Marques ve ark. tümör mikroçevresinde, TFRC ifade değişikliklerini araştırmıştır. Makrofajlar ve lenfositler, primer tümörlere sızmış ve metastatik lenf nodlarında TFRC ekspresyonu arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca gen ifadesi ile klinik ve patolojik belirteçler arasında ilişkili tespit edilmiştir (Marques O ve ark. 2016). Rychtarcikova ve ark. meme kanserinin teşhisi veya tedavisinde kullanılabilecek demir metabolizması ile ilgili kritik genleri ve proteinleri araştırmıştır. TFRC'nin, özellikle demir eksikliği olan tümör hücrelerinde yüksek düzeyde ifade olduğunu tespit etmiştir (Rychtarcikova Z ve ark. 2017). Jian ve ark. gambogic asit (GA) TFRC 'nin meme kanseri hücrelerinde sinyalizasyondaki rolünü incelemiş ve Src tarafından TFRC Tyr (20) fosforilasyonun hücrelerde apoptoza direnç yarattığını ve böylece meme kanseri hücrelerinin yaşam oranını arttırdığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, TFRC' nin hem önemli bir bağımsız prognostik belirteç hem de meme karsinomu için umut verici bir terapötik hedef olabileceği ortaya çıkarılmıştır (Jiang XP ve ark. 2010).

Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda da meme kanserli hastaların tümör dokusundaki TFRC ifade düzeyi normal doku ile kıyaslandığında artmış olarak tespit edilmiştir. Histolojik tipi lobular olan hastaların, TFRC gen ifadesini histolojik tipi duktal olan hastalara kıyasla azalmış olarak tespit ettik. Duktal karsinoma in situ (DCIS), invaziv olmayan meme kanserinin en yaygın tipidir (%90). In situ lobüler karsinoma (LCIS) daha az görülür ve artmış meme kanseri riski için bir belirteç olarak kabul edilir. Duktal karsinomada TFRC gen ifadesinin artmış olması prognostik açıdan hastalığın farklı yorumlara açık olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, tümör yeleşimi solda olan hastalarda TFRC gen ifadesinin azaldığını belirledik.

RGM-C (Repulsive guidance molecules-C) olarakta adlandırılan hemojuvelin hücre membranına bağlı bir glikosilfosfatidilininositol (GPI) proteinidir. Bu proteini kodlayan HFE2 gen mutasyonları, aşırı demir yük bozukluğu olan juvenil hemokromatoze neden olur. Hemojuvelin, matriptaz-2 için temel bir substrat olarak

tanımlanmıştır. Matriptaz-2 kodlayan TMPRSS6 genindeki mutasyonlarla demir eksikliği anemisine (IRIDA) neden olur. Hücre yüzey hemojuvelini, hepatositlerdeki hepsidin ekspresyonu ile koreledir. HFE2 bazı BMP'ler için, özellikle BMP6 için bir koreseptördür ve SMAD1/SMAD4 yolunun aktivasyonu yoluyla hepsidin geninin (HAMP) transkripsiyonunu arttırır. İnsanlarda juvenil hemokromatozis hastalığı ile ilişkili olan hemojuvelin eksikliği, aşırı demir yüküne yol açarak hepsidinin anormal derecede düşük ekspresyonuna neden olur. Matriptaz-2 eksikliğinde, hemojuvelin ekspresyonu hepsidin ekspresyonunu arttıracak şekilde yükseldiği in vivo olarak gösterilmiştir. Matriptaz-2-eksik farelerin BMP2, BMP4 veya BMP9 uyarılmasına karşı aşırı daha duyarlı olmadığı tespit edilmiştir. Proteaz alanı eksik veya kusurlu olan matriptaz-2, hemojuvelini parçalayamaz. Membranla ilişkili matriptaz-2, çözünür hemojuvelini parçalamaz/bölemez ve çözünür matriptaz da zarla ilişkili hemojuvelini bölemez. Veriler, bölünme için matriptaz-2 ve membrana bağlı hemojuvelinin birlikte eksprese edilmesinin gerekli olduğunu göstermiştir. Hem fonksiyonel matriptaz-2 hem hemojuvelinden yoksun olan farelerin fenotipini belirlemek için, çift mutant bir fare suşu (Hfe2 $^{tm1Nca/tm1Nca}$ Tmprss6 $^{Msk\ /\ Msk}$) üretilmiştir. Hem matriptaz-2 hem hemojuvelin içermeyen fareler, yüksek plazma demiri, yüksek transferrin saturasyonu ve normal hemoglobin ve MCV, yüksek karaciğer demir içeriği ve hemojuvelin null farelere benzer şekilde düşük Hamp1 mRNA seviyeleri sergilemiştir. Bu veriler hemojuvelin ve matriptaz-2'nin hem pozitif hem de negatif uyaranlarının yokluğunda, Hamp1 ifadesinin yapısal olarak kapalı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, hem matriptaz-2 hem hemjuvelinin bulunmadığı farelerde, Hamp1 mRNA ekspresyonu BMP2, BMP4 ve BMP9'a ve enflamatuar sitokin IL-6'ya cevap vermiş, ancak yüksek diyet demire cevap vermemiştir. Bu nedenle, hem matriptaz-2 hem de hemojuvelin bulunmayan, hemojuvelin null farelere oldukça benzeyen fareler, hemojuvelinin matriptaz-2 için bir substrat olduğu modelini desteklemektedir. Eğer matriptaz-2 bir alt tabaka hemojuvelin akışı üzerinde etkili olması durumunda, aşırı demir yüklü fenotip yerine demir eksikliği ya da normal bir fenotip ortaya çıkabilmektedir (Lee P ve ark. 2009).

Metastaz, kanserden kaynaklanan morbidite ve mortalitenin önemli nedenidir. Kemik metastazı hem prostatta hem de meme kanserinde en sık görülen komplikasyondur. Kemik morfogenetik proteinlerin (BMP'ler), meme, prostat, akciğer ve kolorektal kanser, melanom ve osteosarkom gibi çeşitli malignitelerin gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadıkları gösterilmiştir. Kemik matriksinde bol miktarda bulunan

bir osteojenik faktör grubu olarak BMP'ler, kanserin kemik metastazında önemli rol oynamaktadır. Kemik metastazı gelişimi sırasında BMP'ler, kemik oluşumunu, kemik bozulmasını, anjiyogenez ve tümör gelişimini hem SMAD'ye bağımlı hem de bağımsız yollarla koordine eder. RGM'ler BMP koreseptörleri olarak çalışır ve BMP sinyal yolağına katılarak kanser gelişimi ve ilerlemesinde de rol oynayabilmektedir. Jin Li ve ark. meme kanseri dokularında ve hücre hatlarında RGM'lerin ekspresyon profilini, RGM transkript seviyeleri ile meme kanseri hastalarının klinik ve histopatolojik verileri arasındaki ilişkiler incelenmiştir. RGM transkript seviyeleri ile NPI, TNM evrelemesi ve tümör derecesi arasında anlamlı bir fark olmamasına rağmen, RGMB ekspresyonunun yüksek NPI skorları ve daha kötü tümör dereceleri, yani daha agresif meme tümörleri ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. RGMA ve RGMB ekspresyon seviyelerinin aksine, RGMC, ekspresyonunun normal dokularla karşılaştırıldığında meme kanseri tümörlerinde daha düşük olduğu görülmüştür. Bu, RGM'lerin meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesi sırasında farklı roller oynadığını göstermektedir. Sonuç olarak, bu çalışma meme kanserinde RGM'lerin anormal ekspresyonunu göstermiştir. Meme kanserinde RGMA'nın düşük ekspresyonu, kötü prognoz, özellikle hastalığa spesifik metastaz ve ölüm ile ilişkilidir. RGMB'nin düşük ekspresyonu, lokal nüksler ve hafif metastaz ile ilişkilidir. En düşük ekspresyon seviyeleri diğer iki üyeye kıyasla RGMC'de görülmüştür (Li J ve ark. 2011).

Çalışmamızda tümör dokusundaki HFE2 ifade düzeyinin normal dokuya oranla istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber azalmış olduğunu tespit ettik. Bu bulgumuz literatürle uyumludur. Histolojik tipi duktal olan hastalarda HFE2 gen ifadesi histolojik tipi lobular ve diğer olan hastalara göre artmıştır. In situ lobüler karsinoma (LCIS) duktal karsinomaya (DCIS) nispeten daha az görülür ve artmış meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçlarımız literatürle uyumludur. Ayrıca HER2 pozitif olan hastalarda da HFE2 gen ifadesi arttığını tespit ettik. HER2'ce zengin kanserler, diğer alt tiplere göre daha agresif bir şekilde büyümeye ve yayılmaya eğilimlidir. Ancak son yıllarda HER2 pozitif kanserlerde hedefe yönelik tedavilerin yaygın kullanımı ve tedaviye verilen yanıtların olumlu olması bu hastalarda umut vericidir. Çalışmamızın sonucu olarak HER2 pozitif hastalarda HFE2 gen ifadesinin artmış olması tedaviye cevap açısından pozitif bir faktör olarak düşünülebilir.

Hücresel demir ve enerji metabolizmasının başlıca transkripsiyonel regülatörü olan demir düzenleyici protein 1 (IRP1)'in aktivitesi, bir demir-kükürt küme sahası

tarafından kontrol edilir. IRP1 proteini yapısındaki sistein-437, kümelenmeyi koordine eden sahadır. Bu saha ile ilgili mutasyonlar demir düzensizliklerine cevap veremez. Bu mutant formu taşıyan hücrelerle yapılan bir çalışma, insan akciğer (H1299) ve meme (MCF7) kanseri hücresi klonları ile gerçekleştirilmiştir. Beklendiği gibi $IRP1^{C437S}$ mutantları transferrin reseptör mRNA'sını stabilize etmiş ve her iki hücre tipinde ferritin mRNA'sının IRE'lerine bağlanarak translasyonunu inhibe etmiştir. Bu mekanizma, ferritin mRNA seviyelerinde değişiklik yapmamıştır. Bu veriler, ferritin mRNA translayonunun IRE-IRP sisteminin kontrolünden kaçtığını göstermektedir (Chen G ve ark. 2007).

Guohua Chen ve ark. demir homeostazının bozulmasının kanser hücrelerinin büyüme özelliklerini değiştirebileceğini düşünmüşler ve bununla ilgili bir çalışma yapmışlardır. Tetrasiklin ile indüklenebilir IRP1'in aşırı ekspresyonu için tasarlanan H1299 akciğer kanseri hücrelerini kullanarak yaptıkları bu çalışmada, IRP1'in indüksiyonu (wild tip veya $IRP1^{C437S}$ mutantı) kültürdeki hücrelerin proliferasyonunu etkilememiş, sadece yumuşak agarda koloniler oluşturmak için hücrelerin verimlerini azaltmıştır. Bununla birlikte, IRP1, çıplak farelerde katı tümör ksenograftları oluşturan hücrelerinin kapasitesini büyük ölçüde bozmuştur. IRP1 transfektanlarından türetilen tümörler, ana hücrelerden elde edilenlere kıyasla %20 oranında daha küçük boyutta görülmüştür. IRP1, mRNA'ların demir duyarlı elementlerine (IRE'ler) bağlanarak transferrin reseptörü 1 (TfR1) ve ferritinin ekspresyonunu koordine eder. Biyokimyasal analizleri, IRP1 ekspresyonunun IRE-bağlama aktivitesinde artışla ilişkili olduğunu göstermiştir. Çalışmada mutant formlarda, TfR1 seviyelerini artırarak demir metabolizmasını yanlış düzenlenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde IRP1, ferritin ekspresyonunu baskılayamamıştır ve demir taşıyıcı ferroportinin seviyelerini etkilememiştir. IRP1'in aşırı ekspresyonu, belirgin bir tümör baskılayıcı fenotip ile ilişkilendirilmiş ve IRE/IRP sistemi ile kanser arasında doğrudan bir düzenleyici bağlantı sağlanmıştır (Guohua Chen ve ark. 2010).

Wei Wang ve ark. IRP2'nin meme kanserinde demir birikiminde kilit bir rol oynadığı gösterilmiştir (Wang W ve ark. 2013). Her ne kadar IRP1 ve IRP2 meme kanserinde aşırı eksprese edilse de, IRP1'in olmasa da IRP2'nin aşırı ekspresyonu, ferritin H'nin azalması ve TfR1 artması ile ilişkili bulunmuştur. Üçlü negatif MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde, IRP2'nin yıkılması ferritin H ekspresyonunu arttırmakta, TfR1 ekspresyonunu azaltmakta ve bu durumdaa kararsız demir havuzunda

bir düşüşe yol açmaktadır. Ayrıca, IRP2 yıkımı, fare meme yağ pedinde MDA-MB-231 hücrelerinin büyümesini azaltmaktadır. Meme kanseri hastalarının gen ekspresyon mikroarray profilleri, artan IRP2 ekspresyonunun yüksek dereceli kanser ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Artan IRP2 ekspresyonu, luminal A, lümen B ve bazal meme kanseri alt tiplerinde gözlenmiş, ancak ERBB2 moleküler alt tipinin meme tümörlerinde görülmemiştir. IRP1 seviyeleri, hücre büyümesini veya in vitro olarak meme kanseri hücrelerinde demir metabolizma proteinlerini etkilemiyor gibi gözüktüğü için, IRP1'in rolü ileri sürülmemiştir. Bununla birlikte, IRP1'in in vitro etkilerinin etkilerini her zaman in vivo olarak yansıtmadığına ve IRPl'in in vivo olarak demir metabolizmasına ve /veya meme tümörü büyümesine katkıda bulunabileceğinin mümkün olduğuna dikkat çekmişlerdir (Wang W ve ark. 2013).

Bizim çalışmamızda IRP1 ifade düzeyi normal doku ile kıyaslandığında, tümörlü dokuda azalmış olarak tespit edildi. Ayrıca mikrokalsifikasyonu olmayan ve histolojik tipi lobular olan ve metastazı olmayan hastaların tümör dokularında IRP1 gen ifadesi azalmıştır. IRP1 ve miRNA122 arasında, IRP1 ve PLT seviyeleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir korelasyon saptadık. Yapmış olduğumuz literatür taramalarında IRP1'in meme kanserindeki rolünü açıklayabilecek bizim çalışmamıza benzer herhangi çalışmaya rastlanılmamıştır. IRP1 ifade seviyesinin meme kanseri hastalarında prognostik değer taşıyabilmesi için konu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç

Demir canlılar için yaşamsal bir elementtir. Elektron alıp verme özelliği sayesinde oksijen taşınması, enerji üretimi, DNA, RNA ve protein sentezinde rol oynar. Pek çok enzimin yapı ve fonksiyonu için gereklidir. Demir hücre ve organizma için çok önemli işlevlerde rol oynamasına rağmen, serbest formu toksik özelliklere sahiptir. Vücutta demir miktarı, metabolik aktivite için sağlanmalı ve artan demir seviyelerinin toksisiteye sebebiyet vermemesi için sıkı bir şekilde denetlenmelidir. Bu nedenle, eksikliği veya aşırı birikmesi birçok patolojik durumun gelişimine yol açar. Demir homeostazında görevli moleküler mekanizmaların kanser hücrelerinde bozulması sonucu demir miktarı artmaktadır (Bogdan A.R. ve ark. 2015). Çalışmamızda sınırlayıcı faktörlerden bir tanesi demir değerlerinin yer almamasıdır. İfade seviyelerini belirlediğimiz demir homeostazı genleri ile demir seviyeleri arasında ilişki kuramamış olmamız meme kanserinde demirin rolünü tam anlamıyla ortaya koymamızı kısıtlar

niteliktedir. Ayrıca demir homeostazıyla ilişkili mekanizmaları imkanlarımız doğrultusunda sadece gen ifadesi açısından inceleyebildik. Yüksek organizmalı canlılarda genetik materyal DNA'dır. DNA'daki bilgi RNA'ya transkripe edildikten sonra RNA, bu şifreyi proteine çevirmektir. RNA'nın %98'den fazlası proteine çevrilemez. İlişkili genlerin yalnız gen ekspresyon seviyelerinde bakılıp protein ekspresyon seviyelerinin çalışılamamış olması da çalışmamızın sınırlayıcı faktörleri arasındadır. Protein ifade düzeylerine de bakılarak kanserde hücre proliferasyonu, metastaz, apoptoz gibi kanserin doğasında yer alan mekanizmalarla demir homeostazı genleri arasında ilişki kurularak, klinik açıdan hastalığın prognozuna yardımcı olacak sonuçlar elde edilebilirdi. Ayrıca çalışmamızda bütçe ve zaman konusundaki yetersizlikler sınırlayıcı faktörlerin başında gelmektedir.

Demir hemeostazında rol oynayan molekülleri kodlayan genlerdeki ifade düzeylerinin meme karsinogenezi ile ilişkisini araştırdığımız çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler, demir homeostaz gen ifadelerinin klinik önemini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

Alarmo, E.L. ve Kallioniemi, A. (2010) Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumourigenesis? *Endocr Relat Cancer*;17: R123–R139.

American Cancer Society (2017-2018). *Breast Cancer Facts & Figures*. Atlanta, USA American Cancer Society, Inc.

American Society of Hematology https://www.hematology.org/Patients/Anemia/

Andrews N.C. (1999). Disorders of iron metabolism, *N. Engl. J. Med.* 341 1986–1995.
Andrews, P.A. (2000). Disorders of iron metabolism, *N. Engl. J. Med*. 342 1293 (author reply 1294).

Andrews, N.C. (2008). Forging a field: the golden age of iron biology, *Blood* 112 219-230.
Aricescu, A.R., Siebold, C., Choudhuri, K., Chang, V.T., Lu, W., Davis, S.J. ve ark. (2007). Structure of a tyrosine phosphatase adhesive interaction reveals a spacer- clamp mechanism. *Science*; 317:1217-20.
Arpino, G., Milano, M., De Placido, S. (2015). Features of aggressive breast cancer. *The Breast* 24 594-600.

Arteaga, C.L., Sliwkowski, M.X., Osborne, C.K., Perez, E.A., Puglisi, F., Gianni, L. (2011). Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol*.

Atkin, C.L., Thelander, L., Reichard, P., Lang, G. (1973) Iron and free radical in ribonucleotide reductase. Exchange of iron and Mossbauer spectroscopy of the protein B2 subunit of the Escherichia coli enzyme, *J. Biol. Chem*. 248 7464–7472

Babitt, J.L., Huang, F.W., Wrighting, D.M. ve ark. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*.;38:531–539

Beutler, E. (2007). Iron storage disease: facts, fiction and progress. *Blood Cells Mol. Dis.* 39 140–147.

Bogdan, A.R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., Tsuji, Y. (2015). Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease, *Trends in Biochemical Sciences*. Vol. xx, No. yy

Bogdanova, N., Helbig, S., Dörk, T. (2013). Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle. *Hered Cancer Clin Pract* 2013; 11: 12 [PMID: 24025454 DOI: 10.1186/1897-4287-11-12]

Brissot, P. ve Loréal, O. (2016). Iron metabolism and related genetic diseases: A cleared land, keeping mysteries, *Journal of Hepatology*, Vol. 64 j 505–515.

Brown, P.J., Johnson, P.M. (1981). Isolation of a transferrin receptor structure from sodium deoxycholate-solubilized human placental syncytiotrophoblast plasma membrane, *Placenta* 2 1–10.

Buas, M.F., Rho, J.H., Chai, X., Zhang, Y., Lampe, P.D., Li, CI. (2015). Candidate early detection protein biomarkers for ER+/PR+ invasive ductal breast carcinoma identified using pre-clinical plasma from the WHI observational study. *Breast Cancer Res Treat*; 153: 445-454.

Buss, J.L., Torti, F.M., Torti, S.V. (2003). The role of iron chelation in cancer therapy, *Curr.Med. Chem.* 10 1021–1034

Bugge, T.H., Antalis, T.M., Wu, Q. (2009). Type II Transmembrane Serine Proteases. *The Journal of Biological Chemistry Vol. 284*, No.35, pp. 23177-23181.

Cam, J.A. ve Bu, G. (2006). Modulation of betaamyloidprecursor protein traffickingand processing by the low density lipoproteinreceptor family. *Mol Neurodegener*; 1:8.

Castoldi, M., Muckenthaler, M.U. (2012). Regulation of iron homeostasis by microRNAs Cell. *Mol. Life Sci*. 69:3945–3952

Castoldi, M., Spasic, M.V., Altamura, S., Elmén, J., Lindow, M. (2011). The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *The journal of clinical investigation,* vol. 121, number 4.

Chen, G., Fillebeen, C., Wang, J., Pantopoulos, K. (2007). Overexpression of iron regulatory protein 1 suppresses growth of tumor xenografts. *Carcinogenesis* 28(4): 785–791.

Chen, Y., Zhang, S., Wang, X., Guo, W., Wang, L., Zhang, D. (2015). Disordered signaling governing ferroportin transcription favors breast cancer growth. *Cellular Signalling* 27:168–176

Chia, S. ve ark. (2008). Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. J. *Clin. Oncol. 26,* 5697–5704.

Chial, H. (2008). Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. *Genes and Disease Nature Education* 1(1):33.

Cianetti, L., Gabbianelli, M., Sposi, N.M. (2010). Ferroportin and Erythroid Cells: An Update. *Advances in Hematology*, Article ID 404173, 12 pages

Clark, S.F. (2008). Iron deficiency anemia. *Nutr. Clin. Pract*. 23 128–141.

Cooper, G.F., Hausman, R.E. (2006). *Hücre Moleküler Yaklaşım*. 3. Baskı. İzmir

Darnell, G. ve Richardson, D.R. (1999). The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents III: the effect of the ligands on molecular targets involved in proliferation, *Blood* 94 781–792.

Davis, M.K. ve Clarke, S. 2013. Influence of microRNA on the Maintenance of Human Iron Metabolism. *Nutrients*, 5, 2611-2628

Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., Andrews, N.C. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism*, Vol. 1

*Doucet, S., Soussignan, R., Sagot, P., Schaal, B. (2009). "The Secretion of Areolar (Montgomery's) Glands from Lactating Women Elicits Selective, Unconditional Responses in Neonates". PLoS ONE. **4** (10): e7579.*

Drake, R.L., Vogl, W., Tibbitts, A.W.M. *Gray's anatomy for students*. Illustrations by Richard Richardson, Paul. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005.

Du, X., She, E., Gelbart, T., Truksa, J., Lee, P., Xia, Y., ve ark. (2008). The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*; 320:1088-92.

Ferahman, M. Meme kanserinde güncel TNM evrelemesi. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizi No:54, 87-91.

Finberg, K.E., Heeney, M.M., Campagna, D.R., ve ark. (2008). Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet*; 40:569–71.

Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., Andrews, N.C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 1148–1153

Folgueras, A.R., de Lara, F.M., Pendas, A.M., Garabaya, C., Rodriguez, F., Astudillo, A. ve ark. (2008). Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*; 112:2539-45.

Ganz, T. ve ark. Nemeth, E. (2011). Hepcidin and disorders of iron metabolism, *Annu. Rev. Med.* 62 347–360.

Geach, T.J. ve Dale, L. (2008). Molecular determinants of Xolloid action in vivo. *J Biol Chem*; 283:27057-63. 37.

Goodsell, D.S. (1999). The Molecular Perspective: The ras Oncogene. *The Oncologist; 4*:263-264.

Graslund, A., Sahlin, M., Sjoberg, B.M., The tyrosyl free radical in ribonucleotide reductase, *Environ. Health Perspect*. 64 (1985) 139–149.

Gschwind, A., Fischer, O.M., Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases:targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 361–370.

Guillem, F., Lawson, S., Kannengiesser, C. ve ark. (2008). Two nonsense mutations in the TMPRSS6 gene in a patient with microcytic anemia and iron deficiency. *Blood*; 112:2089–91.

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F. ve ark. (1997). Cloning and characterization of amammalian proton-coupled metal-ion transporter, *Nature* 388 482–488.

Guo, W., Zhang, S., Chen, Y., Zhang, D., Yuan, L., Cong, H. ve ark. (2015). An important role of the hepcidin–ferroportin signaling in affecting tumor growth and metastasis. *Acta Biochim Biophys* Sin, 47(9), 703–715.

Hooper, J.D., Clements, J.A., Quigley, J.P., Antalis, T.M. (2001). Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J Biol Chem*; 276:857-60.14.

Hopkins, E.J., Layfield, S., Ferraro, T., Bathgate, R.A., Gooley, P.R. (2007). The NMR solution structure of the relaxin (RXFP1) receptor lipoprotein receptor class A module and identification of key residues in the N-terminal region of the module that mediate receptor activation. *J Biol Chem*; 282:4172-84.

http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_TFRC.html

Hunter, H.N., Fulton, D.B., Ganz, T., Vogel, H.J. (2002). The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J. Biol. Chem.* 277 37597–37603.

Ingvarsson, S. (2001). Breast cancer: introduction. *Seminars in Cancer Biology*, Vol. 11, pp. 323–326.

Ishmael, F.T., Shier, V.K., Ishmael, S.S., Bond, J.S. (2005) Intersubunit and domain interactions of the meprin B metalloproteinase. Disulfide bonds and protein-protein interactions in the MAM and TRAF domains. *J Biol Chem*; 280:13895-901.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J.. (2009). Cancer statistics. *CACancer J Clin*;59(4):225–49.

Jiang, X.P., Elliott, R.L., Head, J.F. (2010). Manipulation of iron transporter genes results in the suppression of human and mouse mammary adenocarcinomas. *Anticancer Res*; 30: 759-765.

Joshi, R.S., Moran, E. ve Sanchez, M. (2012). Cellular Iron Metabolism –The IRP/IRE Regulatory Network. *InTec*h, www.intechopen.com

Kitamoto, Y., Yuan, X., Wu, Q., McCourt, D.W., Sadler, J.E. (1994). Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:7588-92.

Kitamoto, Y., Veile, R.A., Donis-Keller, H., Sadler, J.E.. (1995). cDNA sequence and chromosomal localization of human enterokinase, the proteolytic activator of trypsinogen. *Biochemistry*; 34:4562^ 8.

Knappe, S., Wu, F., Madlansacay, M.R., Wu, Q. (2004). Identification of domain structures in the propeptide of corin essential for the processing of proatrial natriuretic peptide. *J Biol Chem*; 279:34464-71.

Knutson, M.D. (2016). Into the matrix: regulation of the iron regulatory hormone hepcidin by matriptase-2. *Nutrition Reviews Vol.* 67(5):284–288.

Koçak, S., Çelik, L., Özbaş, S., Dizbay Sak, S., Tükün, A., Yalçın, B. (2011). *Meme Sağlığı Dergisi* Cilt: 7 Sayı: 2

Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409 198–201.

Kuns-Hashimoto, R., Kuninger, D., Nili, M., Rotwein, P. (2008). Selective binding of RGMc/hemojuvelin, a key protein in systemic iron metabolism, to BMP-2 and neogenin. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C994–C1003

Kwapisz, J., Slomka, A., Zekanowska, E. (2009). Hepcidin and its role in iron homeostasis. *EJIFCC* 20(2): 124–128.

Kwok, J.C. ve Richardson, D.R. (2002). The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation? *1. Crit Rev Oncol Hematol* 42:65–78.

Lamy, P.J., Durigova, A., Jacot, W. (2014). Iron homeostasis and anemia markers in early breast cancer. *Clinica Chimica Acta* 434, 34–40.

Lang, J.C. ve Schuller, D.E. (2001). Differential expression of a novel serine protease homologue in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*; 84:237^43.

Lee, M.S., Tseng I.C., Wang, Y., Kiyomiya, K., Johnson, M.D., Dickson, R.B. ve ark. (2007). Autoactivation of matriptase in vitro: requirement for biomembrane and LDL receptor domain. *Am J Physiol Cell Physiol*;293:C95-105.

Lee, P. (2009). Role of Matriptase-2 (TMPRSS6) in Iron Metabolism. *Acta Haematol*, 122:87–96

Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D. ve ark. (2001). A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J. Biol. Chem*. 276 24437–24440.

Li, J., Ye, L., Mansel, R.E., Jiang, W.G. (2011). Potential Prognostic Value of Repulsive Guidance Molecules in Breast Cancer. *Anticancer Research*, 31: 1703-1712

Lin, L., Goldberg, Y.P., Ganz, T. (2005). Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 106: 2884–2889.

Lin, L., Valore, E.V., Nemeth, E., Goodnough, J.B., Gabayan, V., Ganz, T. (2007). Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 110 2182–2189.

Lopez-Otin, C., Bond, J.S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*; 283:30433-7.

Madison, E.L., Quigley, J.P., Bugge, T.H. (2003). Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev*;22: 237-58.

Maegdefrau, U., Arndt, S., Kivorski, G., Hellerbrand, C., Bosserhoff, A.K. (2011). Downregulation of hemojuvelin prevents inhibitory effects of bone morphogenetic proteins on iron metabolism in hepatocellular carcinoma. *Laboratory Investigation*, 91, 1615–1623.

Manz, D.H., Blanchette, N.L., Paul, B.T., Torti, F.M., Torti, S.V. (2016) Iron and cancer: recent insights. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. xxxx 1–12

Marques, O., Silva, B.M., Porto, G., Lopes, C. (2014). Iron homeostasis in breast cancer. *Cancer Letters* 347;1–14.

Maxson, J.E., Chen, J., Enns, C.A. ve ark. (2010). Matriptase-2- and proprotein convertase-cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the downregulation of hepcidin expression. *J Biol Chem*; 285:39021–8.

McKie, A.T. Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., ve ark. (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron, *Science* 291 1755–1759.

Melis, M.A., Cau, M., Congiu, R. ve ark. (2008). A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica*; 93:1473–9.

Hanninen, M.M., Haapasalo, J. (2009). Expression of iron related in human brain and brain tumors. *BMC Neuroscience*.

Molina, M.A. ve ark. (2001). Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res. 61*, 4744–4749.

Muckenthaler, M.U., Galy, B., Hentze, M.W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr* 28:197–213.

Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306:2090–2093.

Netzel-Arnett, S., Currie, BM., Szabo, R., Lin, C.Y., Chen, L.M. ve ark. (2006). Evidence for a matriptase prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *J Biol Chem* 281: 32941–32945.

Neurath, H. (1984). Evolution of proteolytic enzymes. *Science*; 224:350-7.

Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 8780–8785.

Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J.L., Bigard, X., Devaux, I. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation, *J. Clin. Invest*. 110 1037–1044.

Nili, M., David, L., Elferich, J., Shinde, U., ve Rotwein, P. (2013). Proteomic Analysis and Molecular Modeling Characterize the Iron-Regulatory Protein, Hemojuvelin/Repulsive Guidance Molecule c. *Biochem J*., 452(1): 87–95

Ohgami, R.S., Campagna, D.R., McDonald, A., Fleming, M.D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* 108 1388–1394.

Özmen, V., Cantürk, Z., Çelik, V., Güler, N., Kapkaç, M., Koyuncu, A., Müslümanoğlu, M., Utkan, Z., *Meme Hastalıkları Kitabı*, Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2012

Page, M.J., Di Cera, E. (2008). Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life* Sci; 65:1120-36.

Pan, X., Lu, Y., Cheng, X., Wang, J. (2016). Hepcidin and ferroportin expression in breast cancer tissue and serum and their relationship with anemia. *Current oncology*. vol. 23

Parr, C., Sanders, A.J., Davies, G., Martin, T., Jane L.J., Mason, M.D. ve ark. (2007). Matriptase-2 Inhibits Breast Tumor Growth and Invasion and Correlates with Favorable Prognosis for Breast Cancer Patients, *American Association for Cancer*

Parkyn, C.J., Vermeulen, E.G., Mootoosamy, R.C., Sunyach, C., Jacobsen, C., Oxvig, C. ve ark. (2008). LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J Cell Sci*; 121:773-83.

Patrick J. Lynch. *Medical illustrator.* 2006

Pazarbaşı, A., Kasap, M. (2003). Kanser Genetiği. 12: 328

Pinnix, Z.K., Lance, D., Wang M.W., D'Agostino Jr. R, Kute, T., Willingham, M.C. ve ark. (2010). Ferroportin and Iron Regulation in Breast Cancer Progression and Prognosis. *Sci Transl Med.*

Pollard, J.W. (2009). Trophicmacrophages in development and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 9 259–270.

Poss, K.D., Tonegawa, S. (1997). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 10919–10924.

Radojicic, J., Zaravinos, A., Vrekoussis, T., Kafousi, M., Spandidos, D.A., Stathopoulos, E.N. (2011). MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. *Cell Cycle* 10:3, 507-517

Ramsay, A.J., Hooper, J.D., Folgueras, A.R., Velasco, G., and López-Otín, C. (2009). Matriptase-2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis. *Haematologica*; 94(6)

Rawlings, N.D., Morton, F.R., Barrett, A.J., MEROPS. (2006). The peptidase database. *Nucleic Acids Res*;34 (Database issue): D270-2.

Rouault, T.A., Tong, W.H. (2005). Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 6 345–351.

Ross, J.S. ve ark. (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist 14*, 320–368.

Rychtarcikova, Z., Lettlova, S., Tomkova, V., Korenkova, V., Langerova, L., Simonova, E. ve ark. (2017). Tumorinitiating cells of breast and prostate origin show alterations in the expression of genes related to iron metabolism. *Oncotarget*; 8: 6376-6398.

Shao, X., Cao, F., Tao, M. (2017). The Clinical Value of Hepcidin in Breast Cancer and Its Bone Metastasis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 47, no. 2

Sharma, G.N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., Sharma, KK. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *J. Adv. Pharm. Tech. Res*. Vol. 1 (2).

Shaw, G.C., Cope, J.J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G.E. (2006). Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation, *Nature* 440 96–100.

Sheftel, A.D., Zhang, A.S., Brown, C., Shirihai, O.S., Ponka, P. (2007). Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion, *Blood* 110 125–132.

Shen, Y., Li, X., Dong, D., Zhang, B., Xue, Y., Shang, P. (2018). Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *Am J Cancer Res*; 8(6):916-931.

Shi, H., Bencze, K.Z., Stemmler, T.L., Philpott, C.C. (2008). A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin, *Science* 320 1207–1210.

Silva, B.M., Porto, G., Lopes, C. (2014). Iron homeostasis in breast cancer, *Cancer Letters* 347 1–14

Silva, B. ve Faustino, P. (2015). An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies, *Biochimica et Biophysica Acta* 1852, 1347–1359

Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A. ve ark. (2008) The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*;8: 502–11.

Stöppler, M.C. Breast Anatomy. 2015.

Szabo, R., Bugge, T.H. (2008). Type II transmembrane serine proteases in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol*; 40:1297-316.

Tanabe, L.M. ve List, K. (2017). The Role of Type II Transmembrane Serine Protease Mediated Signaling in Cancer, *FEBS J.*, 284(10): 1421–1436.

Teo, R., Mohrlen, F., Plickert, G., Muller, W.A., Frank, U. (2006). An evolutionary conserved role of Wnt signaling in stem cell fate decision. *Dev Biol*; 289:91-9.

Thakral, S. ve Ghoshal, K. (2015). MiR-122 is a Unique Molecule with Great Potential in Diagnosis, Prognosis of Liver Disease, and Therapy Both as miRNA Mimic and Antimir. *Curr Gene Ther*, 15(2): 142–150.

Thelander, L. ve ark. Reichard, P., 1979, Reduction of ribonucleotides, *Annu. Rev. Biochem.* 48 133–158.

T.C Sağlık Bakanlığı 2015 yılı kanser istatistikleri. Erişim 14.10.2016, http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/ANA_rapor_2013v01_2.pdf

Truksa, J., Peng, H., Lee, P., Beutler, E. (2006). Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci USA*.;103:10289–10293.

Tuhkanen, H., Hartikainen, J.M., Soini, Y., Velasco, G., Sironen, R., Nykopp, T.K. ve ark. (2013). Matriptase-2 gene (TMPRSS6) variants associate with breast cancer survival, and reduced expression is related to triplenegative breast cancer *Int. J. Cancer*: 133, 2334–2340.

Uysal, Z. Hepsidin ve Demir Metabolizması, 6. İlk basamak kursu.

Valore, E.V., Ganz, T. (2008). Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol. Dis*. 40 132–138.

Vokurka, M., Krijt, J., Sulc, K., Necas, E. (2006). Hepcidin mRNA levels inmouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol. Res*. 55 667–674.

Volz, K. (2008). The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr Opin Struct Biol*., 18(1): 106–111.

Wang, B., Wang, H., Yang, Z. (2012). MiR-122 Inhibits Cell Proliferation and Tumorigenesis of Breast Cancer by Targeting IGF1R. *PLoS ONE* 7(10): e47053.

Wang, W., Deng, Z., Hatcher, H., Miller, L.D., Di, X., Tesfay, L. (2013). IRP2 Regulates Breast Tumor Growth. *American Association for Cancer Research*; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1224.

Wang, W., Deng, Z., Hatcher, H., Miller, L.D., Di, X., Tesfay, L. (2014). IRP2 regulates breast tumor growth. *Cancer Res*; 74: 497-507.

Ward, D. ve Kaplan, J. (2012). Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim Biophys Acta*,1823(9): 1426–1433.

Ward, D.M., Kaplan, J. (2012). Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim Biophys Acta* 25:119–131.

Webb, S.L., Sanders, A.J., Mason, M.D., Jiang, W.G. (2011). Type II Transmembrane Serine Protease (TTSP) deregulation in cancer. *Frontiers in Bioscience* 16, 539-552.

Webb, S.L., Sanders, A.J., Mason, M.D., Jiang, W.G. (2013). Matriptase-2 inhibits HECV motility and tubule formation in vitro and tumour angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biochem* 375:207–217.
Webb, S.L., Sanders, A.J., Mason, M.D., Jiang, W.G. (2013). Matriptase-2 inhibits HECV motility and tubule formation in vitro and tumour angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biochem* 375:207–217.

Weiss, G. ve Goodnough, L.T. (2005). Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* 352 1011–1023.

Wu, X.G., Wang, Y., Wu, Q., Cheng, W.H., Liu, W., Zhao, Y. (2014). HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood* 124 1335–1343.

Xia, Y., Babitt, J.L., Sidis, Y., Chung, R.T., Lin, H.Y. (2008). Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood* 111 5195–5204.

Xu, J., Chen Y., Olopade, O.I. (2010). MYC and Breast Cancer. *Genes & Cancer* / vol 1 no

Yarden, Y. ve Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2*, 127–137.

Young, S. ve Bomford, A. (1984). Transferrin and cellular iron exchange, *Clin. Sci. (Lond.)* 67 273–278.

Zhang, P., Pan, W., Rux, A.H., Sachais, B.S., Zheng, X.L. (2007). The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial or recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood*;110: 1887-94.

Zhang, S., Chen, Y., Guoa, W., Yuand, L., Zhang, D., Xu, Y. (2013). Disordered hepcidin–ferroportin signaling promotes breast cancer growth. *Cellular Signalling*.

Zumbrennen-Bullough, K.B., Wu, Q., Core, A.B., Canali, S., Chen, W., Theurl, I. (2014). MicroRNA-130a Is Up-regulated in Mouse Liver by Iron Deficiency and Targets the Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor ALK2 to Attenuate BMP Signaling and Hepcidin Transcription. *The Journal of Biological Chemistry Vol*. 289, No. 34, pp. 23796–23808.

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Kanser, belirli genlerde bir takım etkilerle oluşan mutasyonlar sonucu veya gen ifadesinin miktarında ve zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan, hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda demir metabolizması ile ilgili bozuklukların çeşitli hastalıklara yol açmakta olduğu ve meme kanseri sürecinde de etkili olabileceği düşünülmektedir.

Demir pek çok canlı için temel bir element olup, yaşamsal öneme sahiptir. Demir homeostazı ile ilgili birçok mekanizma olup, bu mekanizmaların birbirleriyle etkileşimleri son derece önemlidir. Demirin, hücre proliferasyonu ve tümörgenez ile ilişkili olduğu ve kanser hücrelerinin demir metabolizmasının düzensizliğine bağlı olarak hücresel demiri depoladığı bilinmektedir. Meme kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda demir ile ilişkili genlerin ekspresyon düzensizliği gösterilmiş olup, bu değişimlerin hastalarda prognostik önem kazandığı görülmektedir. Bu sebeple çalışmamızda, meme kanserli hastaların tümör ve normal dokularında demir hemostazıyla ilişkili genlerinin expresyon düzeyleri belirlenecek ve bu genlerin ekspresyon düzeyleri hastaların klinik verileri ile ilişkilendirilecektir.

Bu çalışma için sizden ameliyatınız sırasında cerrahınız tarafından alınacak olan dokudan 1 cm^3 parça kullanılacaktır. Alınacak olan bu doku laboratuarımızda çalışılacaktır.

Kabul etmeniz halinde katılacağınız bu çalışma bir araştırmadır. Araştırmanın amacı hastalığınızın gelişimi üzerine etkisi olduğu düşünülen proteinin ne kadar ifade olduğu ve ifadesindeki değişiklikleri tespit etmektir. Araştırmaya katılacak tahmini gönüllü sayısı 100'dür. Gönüllü olarak sizin araştırma üzerinde herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Araştırma boyunca sizden bir maddi katkı talebi olmayacaktır. Sizin için herhangi bir rahatsızlık veya risk oluşturmayacak bu çalışma, kısa dönemde size bir fayda da sağlamayacaktır. Ancak uzun dönemde hastalığın gelişiminin daha iyi anlaşılabilmesini ve alternatif tedavi geliştirebilmek için çalışma önemlidir.

Araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlı olup araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz. Reddetmeniz halinde yararınıza engel ya da cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar size ait tıbbi bilgilere ulaşılabilecek ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

Siz veya yasal temsilciniz bilgilendirilmiş olur formunu imzalamakla bunu kabul etmiş olacaksınız. Ayrıca kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlar da gizli tutulacaktır.



Araştırma esnasında sizi ilgilendirecek bir bilgi söz konusu olduğunda siz veya yasal temsilcinize derhal haber verilecektir.

Araştırma hakkında ek bilgiye 0212 414 30 00-22659'dan ulaşabilirsiniz.

Hasta Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum, dinledim, anladım, istediğim soruları sordum ve cevapları aldım. Bu klinik araştırmaya gönüllü olarak hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

''Meme kanserinde demir homeostazıyla ilgili genlerin ekspresyonu'' araştırması kapsamında alınan doku örneklerimin;

Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Hasta/ hasta yakını adı, soyadı İmzası Tarih

Açıklama yapan araştırmacı adı, soyadı İmzası Tarih

Olur alma işlemine tanık olan kişinin adı, soyadı İmzası Tarih

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 13/06/2016-214246

T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Tuba Mutlu'nun etik kurul kararı

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :20.05.2016 tarih, 66018902-050.99.182518 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Prof.Dr.Mehmet GÜVEN'in** danışmanlığında Doktora Öğrencisi **Tuba MUTLU'nun yürütücülüğünde Doç.Dr.Canan KELTEN ve Op.Dr.Fadime Didem TRABULUS'un** yardımcılıklarında yürütülecek olan **"Meme Kanserinde Demir Homeostazıyla İlgili Genlerin Ekspresyonu"** başlıklı Doktora Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **07 Haziran 2016** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica olunur.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:http://194.27.120.66/envision.Sorgula/Validate_Doc.aspx?V=BE0LKBEUR

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Fax : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

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

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MEME KANSERİNDE DEMİR HOMEOSTAZIYLA İLGİLİ GENLERİN EKSPRESYONU

ORIJINALLIK RAPORU

%10	%5	%3	%7
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	<%1
3	Submitted to Yeditepe University Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Bahcesehir University Öğrenci Ödevi	<%1
6	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	www.thd.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.thejournalofbreasthealth.com İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuba	**Soyadı**	Mutlu
Doğ.Yeri	İstanbul	**Doğ.Tar.**	29.05.1983
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	26332287070
Email	tobemutlu@gmail.com	**Tel**	05354581317

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2011
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2007
Lise	Bandırma Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	-	72,5

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı	70.753	69.907	63.376

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office Programları	İyi

Ulusal Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler

1. Beyhan Durak Aras, Olga Meltem Akay, **Tuba Mutlu**,Vahap Aslan, Eren Gündüz, Sevilhan Artan, Zafer Gülbaş; Ph+KML Olgularında ASS Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmelerinin FISH Analizi İle Değerlendirilmesi, 36.Ulusal Hematoloji Kongresi, 2010, Antalya. (Poster)

2. Tuba Mutlu, Beyhan Durak Aras, Olga Meltem Akay, Vahap Aslan, Eren Gündüz, Sevilhan Artan, Zafer Gülbaş; Ph+Kronik Miyelositer Lösemili Olgularda ASS Gen Bölgesi Yeniden Düzenlenmelerinin Araştırılması ve Tedaviye Yanıtın Değerlendirilmesi, 13.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013, Kuşadası, TÜBİTAK destekli. (Poster)

3. Meltem Mete, **Tuba Mutlu,** Merve Bostancı, Yusuf Bükey, Serkan Teksöz, Çağlayan Akkaya, Yıldız Dinçer, Mehmet Güven; Tiroid Kanserinde Eğiliminde 8-oxo-deoksiguanin DNA Glikozilaz1 (hOGG1) Polimorfizminin Önemi, 14.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2015, Fethiye-Ölüdeniz/MUĞLA. (Poster)

4. Merve Bostancı, Duygu Terzi, **Tuba Mutlu**, Duygu Erhan, Meltem Mete, Mehmet Güven, DNA Tamir Proteinlerinin Etkileşimine Polimorfizm Etkisinin CO-IP Yöntemi ile Incelenmesi, 15.TıbbiBiyolojiveGenetikKongresi,2017,Fethiye-Ölüdeniz/MUĞLA.(Poster)

5. Duygu Erhan, Emre Ozoran, Didem Can Trabulus , **Tuba Mutlu**, Bahadır Batar, Mehmet Güven Investigation Of DNA Repair And Apoptotic Gen Polymorphism In Breast Cancer, 15.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2017, Fethiye-Ölüdeniz/MUĞLA. (Poster)

Uluslararası Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler

1. Tuba Mutlu, Serap Yavuzer, Isil Bavunoglu, Mahir Cengiz, Hakan Yavuzer, Yusuf Ziya Erzin, Aydin Tunckale, Meltem Mete, Mehmet Guven; The Effect of TMPRSS6 (RS2235324, RS855791, RS2111833) Polymorphisms on Red Blood Cells Levels in

IronDeficiencyAnaemia;24thBiennialInternationalCongressonThrombosis,2016,İSTANBUL.(Poster)

2. Tuba Mutlu, Matem Tunçdemir, Mustafa Akın, Merve Bostancı, Meltem Mete, Bahadir Batar, Mehmet Güven ; Apoptosis related genes and protein expression, depending on the radiation therapy role of the developing acute side effect in breast cancer patients, 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2017, Antalya (poster)

3. Zeynep Caliskan, **Tuba Mutlu**, Matem Tuncdemir, Mehmet Guven, Mutlu Niyazioğlu, Yalcin Hacioglu, Yildiz Dincer. Evaluation of Histonedeacetylase SIRT6 Expression and Oxidative DNA Damage in Patients with Prediabetes and Type 2 Diabetes, VI. International Congress of Molecular Medicine, İstanbul, Turkey, 22-25 May 2017. Turkish Journal of Molecular Biology& Biotechnology 2017; 02 (Suppl 1): 1-171 (poster)

4. Tuba Mutlu, Didem Can Trabulus, Emre Ozoran, Meltem Mete, Bahadir Batar, Duygu Erhan, Mehmet Guven, An İnvestigation of The Relationship Between Matriptase-2 (TMPRSS6) Genetic Variant And Hematologic Parameters In Breast Cancer, 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 8-10 September 2017, Istanbul (poster)

5. Duygu Erhan, Emre Ozoran, Didem Can Trabulus, **Tuba Mutlu**, Bahadir Batar, Mehmet Guven, Investigation Of DNA Repair And Apoptotic Gen Polymorphism In Breast Cancer, 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 8-10 September 2017, Istanbul (poster)

Ulusal Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler

1. Demir Eksikligi Anemisinde TMPRSS6 Polimorfizmlerinin Önemi, 14.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 2015, Fethiye-Ölüdeniz/MUĞLA.(Sözlü bildiri)

2. Koroner Anjiyografi ile DNA Hasar Düzeyi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi, 15. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 2017, Fethiye-Ölüdeniz/MUĞLA.(Sözlü bildiri)

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler (SCI & SSCI)

1. GüvenM., BatarB., **MutluT**., BostancıM., MeteM., ArasC., ÜnalM., Toll-Like Receptors 2 and 4 Polymorphismsin Age Related Macular Degeneration, Current Eye Research, 2016 Jun; 41(6):856-61.

2. Z. Caliskan, **T. Mutlu,** M. Guven, M. Tuncdemir, M. Niyazioğlu, Y. Hacioglu ,Y. Dincer., SIRT6 expression and oxidative DNA damage in individuals with prediabetes and type 2 diabetes mellitus, Gene, 2017.

3. Batar B., Bavunoglu . I. ., Hacioglu Y. ., Cengiz M. ., **Mutlu . T**. ., Yavuzer S. ., Yavuzer H., Cuhadar Ercelebi D. ., Erhan D., Unal S. ., Tunckale A. ., Guven M., The role of TMPRSS6 gene variants in iron-related hematological parameters in Turkish patients with iron deficiency anemia, Gene, vol. 673, pp. 201-205, 2018.

4. BATAR B., **MUTLU T**. ., BOTANCI M., AKIN M., TUNCDEMIR M., BESE N. ., GUVEN M., DNA repair and apoptosis: Roles in radiotherapy-related acute reactions in breast cancer patients, Cellular and Molecular Biology, vol. 64, pp. 64-70, 2018.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Batar B. ., **Mutlu T**. ., Özdemir N. ., Celkan T. ., Guven M. ., TLR4 ve NOD2 Polimorfizmlerinin Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi ile İlişkisi, Bezmialem Science, DOI: 10.14235/bs.2017.1678

Katılmış olduğu Kongre/Konferans/Seminer/Sempozyum/Kurs ve Eğitimler

1. GMP Eğitimi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2007

2. ISO9001-2000 Eğitimi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2007

3. IV. Kök Hücre Sempozyumu, Bilkent Oteli, Ankara, 2009

4. Klinisyenler İçin Moleküler Hematoloji Kursu, Topkapı Eresin Otel, İstanbul, 2010

5. Türkiye Üniversiteleri Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürleri XXII.Toplantısı, ESOGÜ Kongre Merkezi, Eskişehir (Toplantı sunumlarında görev aldım.), 2010

6. Sitogenetik FISH Çalıştayı, ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi GenetikA.D., Eskişehir. (Uygulama eğitmeni olarak katkıda bulundum), 2010

7. Yabancı Dil Kursu (İngilizce), ICLS, ABD, 2011

8. Prof.Dr.Asım Cenani Günü Sempozyumu Genetik, İstanbul Üniversitesi C.T.F. Prof. Dr. Cem`I Demiroğlu Oditoryumu, Istanbul (Toplantı sunumunda görev aldım), 2012

9. European Human Genetics Conference 2013, Paris Palaisdes Congress, Paris/FRANCE.

10. 13.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Pine Bay Otel, Kuşadası/AYDIN, 2013.

11. 8. Ulusal Tromboz Hemostaz ve Anjioloji Kongresi, Florence Nightingale Hastanesi Konferans Salonu, İSTANBUL, 2014.

12. 14.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Liberty Lykia Hotel, Fethiye-Ölüdeniz/MUĞLA, 2015.

13. Kök Hücre ve Uygulamaları Sempozyumu (İÜKÖK), İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Prof. Dr. Cem'I Demiroğlu Oditoryumu, İSTANBUL, 2016.

14. 24th Biennial International Congress on Thrombosis, Halic Congress Center, İSTANBUL, 2016

15. "Diyabet ve Tedavide Moleküler Yaklaşımlar", CTF Tıbbi Biyoloji A.D., Fatih-İSTANBUL, 2016.

16. 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Bogazici University, Istanbul, 2017.

17. 15.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Liberty Lykia Hotel, Fethiye-Ölüdeniz/MUĞLA, 2017.

18. X. Aziz Sancar DETAE Günleri, " İmmün Sistem Yetersizlikleri ve Aşılar", İstanbul Üniversitesi DETAE, İstanbul, 2018

19. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi, Radisson Blu Hotel Şişli, İstanbul, 2018.