

MEME KANSERLİ HASTALAR VE BİRİNCİ DERECE YAKINLARINDA PERİFERAL TRANSKRİPTOM PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Investigation of The Peripheral Transcriptome Profiles in Patients with Breast Carcinoma and Their First Degree Relative

Eda ERDİŞ¹ (0000-0003-3003-8643), Birsen YÜCEL¹ (0000-0002-0083-6866), Öztürk ÖZDEMİR² (0000-0003-1057-3235)

ÖZET

Amaç: Meme kanserinde gen ekspresyon profillerinin kantitatif olarak ölçümü klinik düzeyde önemli bir araç olma potansiyeline sahiptir. Bu çalışmada, meme kanserli hastalar, bu hastaların birinci derece yakınlarının periferik transkriptom profilleri sağlıklı kontrol grubu da dahil edilerek kantitatif olarak karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Materyal-metod: Çalışma popülasyonu, cerrahi ve sonrasında kemoterapi ile tedavi edilmiş olup, radyoterapi için kliniğimize başvuran 30 meme kanserli hasta (aile öyküsü olmayan sporadik vakalar), bu hastaların 30 kişilik birinci derece yakınları (kız kardeş veya kız çocukları) ve 30 kişilik sağlıklı, aile öyküsü negatif olan bireylerden oluşmaktadır. Total genomik RNA, her üç grupta da periferik kandan ayrılmıştır ve gen ekspresyon profilleri niceliksel olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda 36 gen ürünü değerlendirilmiştir. Ancak sadece ER, HER2, p53, GATA-3, GRB-7, EGFR, MYC, BCL-2, VEGF gibi 9 genin ekspresyon profilleri kantitatif olarak ölçülebilmektedir.

Bulgular: Kantitatif olarak ölçülen 9 gen profili, her 3 grup için karşılaştırıldığında, gruplar arasında fark saptanmamıştır ($p < 0.050$). Ancak HER2, GATA3, GRB-7 ve EGFR'nin gen ekspresyon profilinin ortanca kantitatif değerleri hasta grubunda, hasta yakını ve meme kanseri olmayan bireylere göre anlamlı daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.050$).

Sonuç: HER2, GATA3, GRB-7 ve EGFR'nin gen profilinin kantitatif değerleri periferik kandan ölçülmüş olup, hasta grubunda, hasta yakını ve meme kanseri olmayan bireylere göre anlamlı daha yüksek bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Transkriptom profili; Meme kanseri; Epigenetik.

ABSTRACT

Objective: Quantitative measurement of gene expression profiles in breast cancer has the potential to be an important tool. In this study, it was aimed to compare peripheral transcriptome profiles of the breast cancer patients, the first-degree relatives of breast cancer patients with including healthy control group.

Material-Method: The study population consisted of 30 patients with breast cancer who were treated with surgery and chemotherapy and who applied to our clinic for radiotherapy. 30 patients with breast cancer are composed of individuals with negative family history. Total genomic RNA was separated from the peripheral blood in all three groups, and gene expression profiles were quantitatively determined. In our study, 36 gene products were evaluated. However, expression profiles of only 9 genes such as ER, HER2, p53, GATA-3, GRB-7, EGFR, MYC, BCL-2, VEGF were quantitatively measured.

Results: Nine gene profiles measured quantitatively, no difference was found between the groups ($p < 0.050$). However, the median quantitative values of the gene expression profile of HER2, GATA3, GRB-7 and EGFR were found to be significantly higher in the patient group ($p < 0.050$).

Conclusion: The quantitative values of the gene profile of HER2, GATA3, GRB-7 and EGFR were measured from peripheral blood, and were significantly higher in the patient group.

Keywords: Transcriptome profile; Breast cancer; Epigenetics.

¹Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi A.D., Sivas, Türkiye.

²Onsekizmart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genetik A.D., Çanakkale, Türkiye.

Eda ERDİŞ, Dr. Öğr. Üyesi
Birsen YÜCEL, Doç. Dr.
Öztürk ÖZDEMİR, Prof. Dr.

İletişim:

Dr. Öğr. Üyesi Eda ERDİŞ
Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Radyasyon Onkolojisi A.D. Sivas, Türkiye
Tel: 0346-2191010-05063810513
e-mail:
dr.erdiseda@gmail.com

Geliş tarihi/Received: 08.11.2018
Kabul tarihi/Accepted: 11.01.2019
DOI: 10.16919/bozoktip.480365

Bozok Tıp Derg 2019;9(4):27-31
Bozok Med J 2019;9(4):27-31

GİRİŞ

Genetik çalışmalar, meme kanserinin hem klinik hem de moleküler bazda heterojen bir hastalık olduğunu göstermiştir. Prognozu belirleyen birbirinden çok farklı gen ekspresyon paternleri bulunmuştur (1). Bu heterojeniteye rağmen meme tümörünü tanımlayacak, öngörece parametrelere ihtiyaç vardır. Tümör dokusunun genetik profilinin bu gereksinimleri karşılayacağı bilgileri içerdiği düşünülmektedir (2). Tümör dokusunu hem RNA hem de DNA düzeyinde tanımlama çabaları bu düşünceye hizmet etmektedir. Tümör dokusunun genetik profilinin yanında nükleotid dizilerinde değişiklik yaratmadan gen ekspresyonunu değiştiren epigenetik değişikliklerin kanserin başlangıcı ve seyrinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (3-5). Bir çok farklı genin meme kanserinde anormal hipermetilasyonla inaktive edildiği bilinmekle birlikte spesifik meme kanser fenotipine uyan farklı epigenetik değişimlerin neler olduğu hala bilinmemektedir.

Bu çalışmada, meme kanserli hastaların, bu hastaların birinci derece yakınlarının periferik transkriptom profilleri sağlıklı kontrol grubu da dahil edilerek kantitatif olarak karşılaştırılması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma 2008-2009 yılları arasında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dalı'nın işbirliği ile yapılmıştır. Çalışma, ayrıca Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından da onaylanmıştır (Onay No: 2008-10/1). Çalışma popülasyonu, cerrahi ve sonrasında kemoterapi ile tedavi edilmiş olup, radyoterapi için kliniğimize başvuran 30 meme kanserli hasta (aile öyküsü olmayan sporadik vakalar), bu hastaların 30 kişilik birinci derece yakınları (kız kardeş veya kız çocukları) ve 30 kişilik sağlıklı, aile öyküsü negatif olan bireylerden oluşmaktadır. Bilgilendirilmiş "Olur Formu" dolduran ve çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan, bu hastaların yakınları ve kontrol bireylerden 5 cc periferik kan dokusu EDTA'lı ortama alınarak, total mRNA izolasyonlarında kullanılmıştır. İzolasyonda kullanılan filtrelelere uygun miktarda lökosit kullanılmak üzere, her bir hastanın hemogram profilleri elde edilmiş ve bu bilgiler doğrultusunda uygun miktarda kan

örnekleri (50 µl-1.5 ml) izolasyonda kullanılmıştır. Bu gruplara ait kanlar, genomik total mRNA izolasyonu için kullanılmıştır. Kanlar uygun primerlerin bulunduğu vortexlenmiş eppendorf tüplere konularak, PCR yöntemiyle amplifiye edilmiştir. Daha sonra ise, revers transkriptaz ile elde edilen c-DNA sayılarına bakılmıştır. Her bir hasta için toplam 36 olmak üzere, aynı diske 2 hasta bireye ait toplam 72 gen ürünleri analiz edilmek üzere Real-time PCR yapılmıştır.

Sonuç olarak, hedef genlere ait mRNA miktarları öncelikle RT-PCR ile cDNA dönüştürülerek, daha sonra ardıl real - time PCR ile amplifiye edilen cDNA ürünleri (Corbett, RG-6000) sayılmıştır.

Değerlendirme – İstatistikî analiz

Çalışmamızın verileri SPSS versiyon 14.0 programına yüklendi. Normal dağılım parametrelerine bakıldıktan sonra, grupların yaş ve gen profillerin ortanca değerlerini karşılaştırmak üzere Kruskal-Wallis Testi, kullanıldı. İstatistiksel olarak P<0.050 sonucu anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada yer alan hasta grubundaki kadınların yaş ortalamaları 52.83±10.57'dir. Hasta yakını grubundaki kadınların yaş ortalamaları 32.93±10.88, kontrol grubundaki kadınların yaş ortalamaları ise 34.70±11.02'dir. Yaş yönünden her üç grup arasında istatistiki olarak farklılık mevcuttur (p<0.05). Hormon reseptör durumları hasta grubundaki kadınların 19'unda (%63,3) pozitif iken, 11 kadında (%36,7) reseptör negatiftir. HER2 durumunun hasta grubundaki kadınların 13'ünde (%43,3) pozitif iken, 17'sinde (%56,7) negatif olduğu görülmektedir.

Çalışmaya dahil edilen hasta grubunda 36 gen profili çalışılmış olup bunların sadece dokuz gen profilinde kantitatif ölçüm yapılmıştır. Ölçülen kantitatif değerler Tablo 1'de gösterilmiştir. Her üç grup karşılaştırıldığında hiçbir gen profili için anlamlı fark saptanmamıştır (p>0.050). Ancak, HER2, GATA3, GRB-7 ve EGFR'nin gen profilinin kantitatif değerinin ortancaları karşılaştırıldığında hasta grubunun sonuçları, diğer iki gruba göre anlamlı daha yüksek bulunmuştur (p<0.050).

Tablo 1. Kantitatif ölçüm yapılan genlerin gruplara göre dağılımı

Genler	Hasta Ortanca (min-max)	Hasta yakını Ortanca (min-max)	Kontrol Ortanca (min-max)	p değeri
ESR	1154.6 (0-5680)	1010.5 (0-4667)	835.0 (0-4976)	>0.05
HER2	149.5 (0-382)	6.9 (0-1)	7.8 (0-4)	>0.05
VEGF	319.1 (0-1567)	135.0 (0-1293)	519.2 (0-2793)	>0.05
GATA-3	165.3 (0-2619)	16.1 (0-146)	12.2 (0-177)	>0.05
GRB-7	689.0 (0-2619)	6.0 (0-6)	48.2 (0-106)	>0.05
EGFR	673.8 (0-2619)	7.0 (0-7)	31.0 (0-59)	>0.05
P53	39.0 (0-137)	49.0 (0-256)	55.2 (0-277)	>0.05
MYC	129.5 (0-726)	96.3 (0-315)	229.1 (0-2026)	>0.05
BCL-2	1460.0 (0-3386)	1157.38 (0-4976)	1520.7 (0-4976)	>0.05

TARTIŞMA

Meme kanseri, epigenetik ve genetik değişikliklerin progresif birikimi ile oluşan, kalıtsal ve çevresel risk faktörlerinin etkili olduğu heterojen bir hastalıktır (6). Meme kanserine bağlı denetimsiz hücre çoğalması genellikle genomik instabilite belirtileri ve belirli epitelyal özelliklerin ortadan kalkması gibi değişiklikler sergiler. Bu yüzden kanser gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların bilinmesi ve buna en uygun tedavi yöntemlerinin belirlenmesi önem taşır. Meme kanseri araştırmalarının genel amacı, prognostik ve prediktif değişiklikleri belirlemektir (7).

Yeni kanser belirteçlerinin saptanmasında, gen ekspresyon profilleri giderek artan oranlarda kullanılmaktadır. Bu teknoloji klinik ve patolojik parametrelerin belirlenmesi ve yeni modalitelerin oluşturulması için umut vaat etmektedir. ER, PR, HER2 ve EGFR gibi etyolojik genler, prognozu belirlemede ve hedefe yönelik tedavilerin seçiminde kullanılmaktadır. Meme kanserinde östrojen reseptör ekspresyonu her aşaması östrojen tarafından kontrol edilen çok aşamalı kompleks bir işlemdir. Östrojen etkisiyle ER ekspresyonu ve dolayısıyla östrojen bağlanma bölgelerinin sayısı azalır (8). Östrojen bu etkisini transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamaların hepsinde gösterir. Endokrin tedaviye cevap açısından önemli rol oynayan progesteron reseptörünün ekspresyonu östrojen-ER etkileşimi ile regüle edilir. Böylece transkripsiyon hızı düşer RNA düzeyi ve progesteron reseptör sayısı azalır. Östrojene bağlı değişikliklerin aksine mRNA yarı ömründe

değişiklik olmaz ve etkisini sadece transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamalarında gösterir (9). Stanley ve Szewczuk yaptıkları hücre kültürü çalışmalarında multiplex tandem PCR ile ER relatif gen ekspresyon değerini yaklaşık 600 olarak bulmuşlardır (10). Bizim çalışmamızda ise hasta grubunda ortanca ER değeri 1154.6 olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırmada fark gözlenmemiştir.

HER2 insan solid tümörlerinde gözlenen ve bilinen anormalliklerin prototipidir. Bu gendeki değişikliklerin bilinen kötü prognostik özellikler ile ilişkisi ve bu moleküler değişikliğe karşı hedefe yönelik tedavi geliştirme olanağı vurgulanmaktadır. HER2, EGFR ile büyük benzerlik taşıyan ve tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran proteini kodlamaktadır. Meme kanserinin oldukça önemli bir bölümünde HER2 geninde ekspresyon artışı görülür. HER2 molekülünün ekstraselüler bölgesi, molekülden ayrılarak dolaşıma girmesi bu molekülün hasta serumunda saptanmasına olanak vermektedir. Bu yüzden tanı sırasında yapılacak serum HER2 testi primer tümörün durumu ve tümör hücrelerinin yayılımı hakkında bilgi verebilir. HER sporadik olguların %15–30'unda fazla miktarda eksprese edilmektedir (11). Bizim çalışmamızda kanserli olgularda ortanca 149,5 (0-382) HER2 ekspresyonu mevcutken hasta yakını ve kontrol grubunda 1'er olguda ekspresyon izlenmiştir. Stanley ve Szewczuk'un çalışmalarında hücre kültüründe multipleks tandem PCR ile HER2 rölatif gen ekspresyon değerini çalışmamızla benzer olarak, yaklaşık 150–200

arasında saptamışlardır (10). Çalışmamızda gruplar arasında ortanca HER2 değerlerinde, 3 grup için fark saptanmamış ancak hasta grubunun diğer iki grup ile karşılaştırılmasında, hasta grubunun değerleri diğerlerine göre anlamlı daha yüksek bulunmuştur.

EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir glikoprotein reseptörüdür. EGFR aşırı ekspresyonu fibroblastlarda EGFR'den bağımsız transformasyon oluşturabilmesi, reseptörün trans formasyonunda önemli rol oynadığına işaret eder. Klinikte yüksek EGFR düzeylerinin östrojen reseptör durumundan bağımsız olarak, kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. EGFR ile c-erbB2 aşırı ekspresyonunun birlikte görülmesini ve iki molekülün birbirlerini fosforile etmeleri, bu iki gen arasında işlevsel bir bağlantı olduğuna işaret etmektedir. İki genin birlikte aşırı eksprese olduğu hastalarda, prognozla kötü olduğu görülmektedir (12). Moleküllerin kompleks kurması büyük olasılıkla tirozin kinaz aktivitesini artırmaktadır. Sporadik olgularda %11–21'inde EGFR overekspresyonu görülmektedir (6). Bizim çalışmamızda, her üç grup karşılaştırıldığında p değerinin anlamlı olmamasına rağmen gruplar ikili karşılaştırıldığında, hasta grubunun EGFR gen ekspresyon değerleri diğer gruptakilerin EGFR gen ekspresyon değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulunmuştur.

VEGF, anjiogeneziye rol alan, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir reseptördür. VEGF ekspresyonu pek çok yayında bağımsız prognostik faktör olarak tanımlanmıştır ve meme kanserinde düşük sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (13). Çalışmamızda, her üç gruptaki VEGF ölçümleri karşılaştırıldığında, gruplar arası farklılıklar önemsiz olarak bulunmuştur.

GATA–3 meme gland morfogenez ve differansiasyonunda rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. GATA–3 meme kanseri differansiasyonu ve proliferasyonunda rol oynayan gen dizilerini kontrolünde görev alması sebebiyle, aynı zamanda tümör supresör gen olarak da adlandırılabilir.

Meme kanserinde GATA–3 ekspresyonu ve ER ekspresyonu arasında güçlü bir ilişki vardır. Bu nedenle komplementer DNA mikro-array analizleri östrojen pozitif karsinomlarda düşük GATA–3 ekspresyonu

yüksek metastaz ve rekürrens ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek GATA–3 gen anlatımı ise relapsız sağ kalımla ilişkilendirilmiştir (11). Bizim sonuçlarımızda, bu gen ekspresyonu içinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ancak grupların kendi aralarında ikili karşılaştırıldığında hasta grubunun değerleri diğerlerine göre anlamlı daha yüksek bulunmuştur.

GRB–7 pek çok hücre yüzey reseptöründe sinyal iletimini sağlayan adaptör moleküldür. Meme kanserlerinin %20–30'unda overeksprese olarak izlenmiştir. GRB–7 overekspresyonu hücre migrasyonu ve metastazla ilişkilendirilebilir. Ancak bu yolak tam olarak bilinmemektedir (10). Stanley ve Szewczuk'un hücre kültüründe multipleks tandem PCR ile yaptığı çalışmada GRB–7 rölatif gen ekspresyon değerini, 1000'in altında saptamışlardır (10). Bizim çalışmamızda, Hasta grubunda bu gen ekspresyonu yüksek olmasına karşın kontrol grubu ve hasta yakını grubu ile karşılaştırıldığında, istatistikî olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ancak ikili karşılaştırmada, hasta grubunun değerleri diğer gruplara göre anlamlı daha yüksek bulunmuştur.

p53 17. kromozomda yerleşmiş olan bir tümör suppressör gendir. Kodladığı protein hücre bölümünde düzenleyici olarak rol oynar. Aynı zamanda diğer genlerin transkripsiyonunu da düzenler. p53'ün asıl görevi hasara uğramış DNA'ya sahip hücrenin bölünmesine engel olmaktır. p53'ün prognostik faktör olarak, meme kanserindeki yeri yaklaşık 40 araştırma ile ortaya konmuştur. p53 sporadik meme kanserlerinin %14–35' inde inaktivedir (14). Çalışmamızda gruplar ayrı ayrı ve birlikte karşılaştırıldığında p53 değerleri için anlamlı fark saptanmamıştır.

c-Myc protoonkogeni, transkripsiyon faktörü olarak görev yapan bir çekirdek proteini kodlamaktadır. Bu fosfoprotein, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve apoptozisin bazı aşamalarını kontrol eder. Meme kanserinde en çok görülen değişikliklerden biri c-Myc geninde amplifikasyonudur. Çok sayıda çalışmada c-Myc amplifikasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu gözlenmiştir (12). Sporadik meme kanserlerinin %5–30 unda c-Myc geninin overeksprese olduğu saptanmıştır (7). Çalışmamızda gruplar ayrı ayrı ve

birlikte karşılaştırıldığında p53 değerleri için anlamlı fark saptanmamıştır.

Bcl-2 apoptozisi inhibe ederek hücre sağ-kalımını artıran bir onkogendir. Tümörlerde Bcl-2 varlığı iyi prognoz ile ilişkilidir. İleri evre tümörlerde azalmış Bcl-2 salınımı söz konusudur. İnvaziv meme kanserinde Bcl-2 ekspresyonu ile ER durumu arasında güçlü bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (15). Çalışmamızda gruplar ayrı ayrı ve birlikte karşılaştırıldığında p53 değerleri için anlamlı fark saptanmamıştır.

SONUÇ

Her geçen gün moleküler onkoloji alanındaki laboratuvar çalışmaları tıbbi uygulamalara dönüşmektedir. Bireysel farklılıkları belirleyen genetik çeşitliliğin ortaya konması gen ekspresyon değerleri ile moleküler sınıfları tanımlayabilir. Bu bakış açısıyla, bu araştırmanın dayanak noktası periferik kan dokusundan birçok gen ekspresyonunu ölçmektir. Çalışmanın en büyük kısıtlılığı tümör dokusunun gen ekspresyonu açısından değerlendirilememiş ve farklı çalışmalarda doğrulanmamış olmasıdır. Meme kanserli hastalarda ve birinci derece yakınlarında genomik değerlerin elde edilmesinin amaçlandığı bu çalışmanın sonucunda, HER2, GATA3, GRB-7 ve EGFR'nin gen profilinin ortalama kantitatif değerleri hasta grubunda, hasta yakını ve meme kanseri olmayan bireylere göre anlamlı daha yüksek bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000; 406:747-52.
2. Caldas C, Aparicio SA: The molecular outlook. *Nature* 2002; 415:484-485.
3. Heppner, G. H. and Miller, F. R. 1998 *International Rev. Cytology*, 1988: 177, 1-56.
4. Baylin, S. B.; Herman, J. G.; Graff, J. R.; Vertino, P. M. and Issa, J. P. Adv. In *Cancer Res.*, 1998: 72, 141-196.
5. Jones, P. A. and Laird, P. W. *Nat. Genet.*, 1999: 21, 163-167.
6. Conzen SD, Grushko TA, Olopade OI. *The Molecular Biology of Breast Cancer* 43: 1; 1595-1605.
7. Onat H. Meme kanseri risk faktörleri ve korunma. In: *Meme Kanseri Ed E Topuz, A Aydın, M Dinçer*, 2003, 90-107.
8. Nasser SM. Gene expression profiling in breast cancer. *J Med Liban*. 2009;57(2): 83-88.
9. Kao J, Salari K, Bocanegra M. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery *Plos ONE* 2009; 4(7):1-16.

10. Stanley KK, Szcwczuk E. Multiplexed Tandem PCR: gene profiling from small amounts of RNA using SYBR Green detection. *Nucleic Acids Research* 2005; 33(20): 1-9.
11. Oğuz H, Yasasever V. Moleküler Tıpta Tümör Belirleyiciler. *Türk Onkoloji Dergisi* 2004; 19(1): 28-35.
12. Dalay N. Meme kanserinin biyolojik özellikleri Meme Kanseri. Nobel Tıp Kitapevi, 2003 34-71.
13. Gisterek I, Matkowski R, Lacko A et al. Serum Vascular Endothelial Growth Factors A, C and D in Human Breast Tumors. *Pathol Oncol Res*. 2009 Oct 11. [Epub ahead of print] 126. Fang SH, Chen Y, Weigel RJ. GATA-3 as a Marker of Hormone Response in Breast Cancer *The Journal of surgical research* 2008;1-6.
14. Siamakpour-Reihani S, Argios HJ, Wilmeth LJ et al. The cell migration protein Grb7 associates with transcriptional regulator FHL2 in a Grb7 phosphorylation-dependent manner. *J Mol Recognit*. 2009; 22(1): 9-17.
15. Yasasever V, Karaoglu D, Yazici H. Serum neu oncoprotein levels as tumor marker in breast cancer. *J Tumor Marker Oncol*. 1992;7:33-42.