

Mmp-3 Ve E-kaderin Polimorfizmlerinin Meme Tümörlerindeki Rolü

The Role Of Mmp-3 And E-cadherin Polymorphisms In Breast Tumours

Nazlı Turan¹, Arzu Ergen^{1*}, Soykan Arıkan², İlhan Yaylım¹, Turgay Isbir³

¹ İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler
Tıp Anabilim Dalı İstanbul, Türkiye

² İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Cerrahi Kliniği, İstanbul, Türkiye

³ Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı İstanbul, Türkiye

ÖZET

Meme kanseri ve diğer maligniteler, hücre büyümesi ve gelişimine katılan hücresel yolları etkileyen genetik değişimler sonucu ortaya çıkar. Proto-onkogenler normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli bazı proteinlere ait kodlar içerirler. Eğer bir mutasyon sonucu proto-onkogenin yapısı değişirse oluşan hasar, genin ve gen ürünün yapısını değiştirerek, çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolünü ortadan kaldırır ve malignite ortaya çıkar. Kanser oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör-baskılayıcı genlerdir.

Kaderinler, birbiri ile genelde homofilik karakterde ilişkiye girerler ve bağlanarak hücre-hücre adezyonunu sağlarlar. Tümör hücrelerinin düzensiz davranışı nedeniyle hücre-hücre ilişkisi tümörlerde bozulmuştur. E-Kaderin (CDH-1) hücrenin hareketlilik özelliğinin yok olmasına neden olur. Meme kanserlerinde, E-Kaderin ekspresyon kaybı veya sitoplazmik parçasının fosforilasyonundaki bozukluk nedeniyle epitelyum hücreleri hareketlilik kazanır ve lokal yayılmada artış gözlenir. E-Kaderin eksikliği invazif fenotipin ortaya çıkmasından sorumludur ve duktal karsinomlarda kötü prognoza yol açmaktadır. Matriks metalloproteinaz (MMP) gen ailesi extraselüler matriks makromoleküllerine karşı aktivite gösteren dokuz ya da daha fazla endopeptidaz kodlarlar. Yapılan çalışmalarda meme kanserinde artmış MMP-3 ekspresyonunun tümör prognozunu teşvik edici olduğu bildirilmiştir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda meme kanserinde E-Kaderin -160 C/A ve MMP-3 5A/6A gen polimorfizmlerinin etkisini incelemeyi amaçladık. Bu amaçla çalışmamızda ilgili gen polimorfizmlerini tayin etmek için polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi (PZR-RFLP) metodunu kullandık. İstatistiksel değerlendirme sonucunda MMP-3 6A alleli ve E-Kaderin CC genotiplerini taşımanın, hastalık gelişiminde ve metastaz oluşumunda rol oynayabileceği izlenimini elde ettik.

Anahtar Kelimeler: MMP-3, E-Kaderin, Matriks Metalloproteinaz, Polimorfizm, Meme Kanseri

ABSTRACT

Breast cancer and other malignities are caused by genetic alterations affecting cellular pathways participating in cell growth and development. Proto-oncogenes contain certain proteins which are important for normal cell growth and differentiation. If a mutation causes a damage by changing in the structure of the proto-oncogene, it eliminates the control of cell division in various ways by changing the structure of genes and gene products and malignity consists. Except the oncogenes, a second gene group called tumor suppressor genes are also important in formation of cancer.

Cadherins are connected each other by homophilic binding and they play important roles in cell adhesion, ensuring that cells within tissues are bound together. Because of the irregular behavior of tumor cells to cell-cell relationship is corrupted. E-Cadherin (CDH-1) leads to the destruction of property of the cell mobility. In breast cancer issues, due to lost of E-Cadherin expression or disorder in phosphorylation of cytoplasmic part of E-Cadherin, epithelial cells gain mobility. And increase in their local spread is observed. The lack of E-cadherin is responsible for emergence of invasive phenotype and ductal carcinomas, leading to a poor prognosis.

Matrix metalloproteinases (MMP) gene family, codes 9 or more endopeptidase against extracellular matrix macromolecules. It has been reported that increased MMP-3 expression in breast cancer is encouraging tumor prognosis. In this study, we aimed to investigate the effect of the E-Cadherin -160 C/A and MMP-3 5A/6A gene polymorphisms in breast cancer. For this purpose, to determine relevant gene polymorphisms we used polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. As a result of statistical consideration, we find out that carrying 6A allele of MMP-3 gene and CC genotype of E-Cadherin can play a role in disease progression and metastasis.

Key Words: MMP-3, E-Cadherin, Matrix Metalloproteinases, Polymorphism, Breast cancer

Giriş

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ise akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. Meme kanseri ve diğer maligniteler, hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir işlem sonucu ortaya çıkar. Proto-onkogenler normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı proteinlere ait kodlar içerirler. Eğer bir mutasyon sonucu proto-onkogenin yapısı değişirse oluşan hasar, genin dolayısı ile gen ürünün yapısının değişmesine neden olur ve çeşidi yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar ve malignite ortaya çıkar. Kanser oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör-baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu kanserogeneze birbiriyle zıt etkilidir. Onkogenler malign transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde işlev gören genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerler. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar.

Kaderinler, ve kaderin tipinde bölgelere sahip proteinler, tek hücrelilerden omurgalıların tüm sınıflarına kadar uzanan canlıların çok büyük bir bölümünde bulunurlar (1). Moleküler ağırlıkları 120,000-140,000 arasında değişen, yapı ve fonksiyonları açısından kalsiyuma bağımlı transmembran proteinleridir. Embriyojenik dokuların oluşumu ve stabiliteyi için gerekli, hücreler arası adezyon olaylarının başlaması ve devamı, doku morfogenez ve tümör baskılanması için kritik öneme sahiptirler (2,3). Sitoplazmik bölge, katenin adı verilen, kaderinlerin aktin temelli hücre iskeletine bağlanmasını sağlayan hücre içi moleküllerle etkileşim halindedir. Kaderinlerin hücre iskeletine bağlanması, hücre hücre adezyonu için oldukça önemlidir ve E-Kaderin ya da kateninlerde oluşacak mutasyonlar bu bağlantıyı bozarak, hücre adezyonunun ortadan kalkmasına neden olabilirler (3). β -Kaderin kalsiyuma bağımlı, normal epitel dokularında ekspres edilen bir adezyon molekülüdür ve 16. kromozomda q22.1 da yer almaktadır (4). Transmembran bir glikoprotein olan β -Kaderin, normal epitelial hücrelerinin hücrelerarası adezyonunda, hücre polarizasyonunda, hücre sinyal iletiminde, hücre farklılaşma bakımında ve doku morfolojisinde görevlidir (5).

Azaltılmış E-Kaderin ekspresyonu malign dönüşüm, tümör invazyonu ve metastazı teşvik etmektedir. Çeşitli hücre hatlarında, E-Kaderin ekspresyonu ve invazivlik düzeyleri arasında karşılıklı bir ilişki gösterilmiştir (6).

E-Kaderin protein ekspresyonunun yok olduğu mekanizmalar, E-Kaderin mutasyonların ve heterozigozite kaybı (LOH) adı verilen yaban tip allel kaybını içerir. Bu bilgiler E-Kaderinin klasik bir tümör baskılayıcı gen olduğunu göstermektedir (7,8).

E-Kaderin hücrenin hareketlilik özelliğinin baskılanmasma neden olur. E-Kaderin ekspresyonu azalan epitel hücrelerinde diferansiyasyonun azaldığı ve göç kabiliyetlerinin arttığı belirlenmiştir. Meme kanserlerinde, E-Kaderin ekspresyon kaybı veya sitoplazmik parçasının fosforilasyonundaki bozukluk nedeniyle epitelyum hücreleri hareketlilik kazanır ve lokal yayılda artış gözlenir. Kaderin eksikliği invazif fenotipin ortaya çıkmasından sorumludur ve duktal karsinomlarda kötü prognoza yol açmaktadır.

Yapılan çalışmalarda mobilite kazanan tümör hücrelerinde, hücrel adezyonu sağlayan kaderin ailesinin bir üyesi olan E-Kaderin ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (9,10). E-Kaderin geninin promotör bölgesinde tanımlanmış olan ve transkripsiyon başlangıç bölgesi ile ilişkili olduğu bildirilen -160 C/A polimorfizmi (rs16260) ile ilgili birçok kanser tipinde çalışmalar bulunmaktadır.

Li ve ark. Yaptığı çalışmada bu polimorfizmde görülen C/A baz değişiminin sonucu olarak A allelinin, C allele göre %68 daha az transkripsiyonel aktivite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (11).

MMP gen ailesi extraselüler matriks makromoleküllerine karşı aktivite gösteren dokuz ya da daha fazla endopeptidaz kodlarlar. MMP-3, matriks metalloproteinaz ailesinde, stromelysin-1 olarak da adlandırılan bir proteazdır. Hücre yüzey moleküllerinden tümör nekroz faktör prekürsörü (TNF- α) ve E-Kaderini (12); ayrıca fibronektin, laminin, tip IV kollajen ve proteoglikanları degrade ederek ekstraselüler matriksin yıkılması ve yeniden düzenlenmesinde görev alır. Bunlardan dolayı romatoid artrit, osteoartrit, gastrointestinal lezyonlar, baş ve boyun karsinom, bazal hücreli karsinom, bronş ve akciğer skuamöz hücreli karsinom, özofagus skuamöz hücreli karsinom, kolorektal kanser ve meme kanserinde tümör hücresi invazyonu ve metastazında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (13). Klasik bir tümör baskılayıcı olan

E-Kaderin ekspresyonunun epitelyal tümörler arasında sıklıkla azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu durum, E-Kaderin/ β -katenin kompleksinin Wnt sinyal yolağının görev aldığı, hücre-hücre adezyonu, hücrel polarite, doku düzenlenmesi gibi olaylarda bozukluklar, tümör gelişimi ve tümör metastazıyla sonuçlanmaktadır (6, 14-16). Wnt sinyal yolları, erişkin dönemde kendini yenileyen hücrelerin adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, embriyonik dönemdeki hücrelerde ise hücre polaritesinin, proliferasyonunun sağlanmasında, farklılaşmada ve hücre göçünde önemli ölçüde rol oynamaktadır. Wnt/ β -katenin sinyal yolunun kanserle olan ilişkisi bu sinyal yolunda görev yapan moleküllerde meydana gelebilecek herhangi bir mutasyonla açıklanabilmektedir. Bu durum birçok kanser türünün de ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (17). Özellikle son yıllarda, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun çeşitli kanser türleri ve birçok ciddi hastalıklar ile olan ilişkisi literatürde geniş yer bulmaktadır. E-Kaderinin membran bağımlı β -katenini serbest bırakarak Wnt sinyal yolağının güçlendirmesinin, tümörögenezi teşvik ettiği bildirilmiştir (6,14,18).

E-Kaderin mutasyonu sonucunda, hücre hücre adezyonunun yok olması ve Wnt yolağının etkisi dışında, tümör invazyon ve metastazında önemli olan diğer aşamalar, MMP'lerin önemli rol oynadığı ekstraselüler matriks (ECM) 'in ve bazal membranın degradasyonu, anjiyogenez ve epitelyal mezenkimal dönüşümdür (EMT) (19).

Bu gen ile ilgili en yaygın şekilde yapılan çalışmalardan biri, bir insersiyon/delesyon polimorfizmi olan ve MMP-3 geni promotör bölgesinde tanımlanan 5A/6A polimorfizmidir (rs3025058). Bu polimorfizm transkripsiyon başlangıcından 1612 bp uzaklıkta 5 ya da 6 adenozinin lokalizasyonu ile karakterizedir. Bu polimorfizmin sonucunda gende meydana gelen değişikliklere ilişkin literatürde çelişik bilgiler bulunmaktadır. Yapılan in vitro çalışmalarda 5A allelinin 6A allele göre daha fazla promotör aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (20). Başka bir çalışmada ise 6A allelinin bir ya da iki kopyasının bulunmasına göre serum MMP-3 düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir (21).

Yapılan çalışmalarda meme kanserinde artmış MMP-3 ekspresyonunun tümör prognozunu teşvik edici olduğu ve bununla beraber invaziv meme kanseri hücrelerinde MMP-3 ekspresyonunun invaziv olmayan hücrelere göre arttığını gözlemlemişlerdir. Meme kanserinde tümör oluşumu, kanseri hücresi invazyonu ve metastazında, adezyon molekülleri ve

matriks metalloproteinaz ailesinin önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Matriks metalloproteinazların, ECM degradasyonunda önemli rol oynaması, tümör invazyonunda ve metastazında etkilidir (22-25).

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda MMP-3 -1171 5A/6A ve E-Kaderin gen polimorfizmleri ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi tarafından takip edilen meme kanseri tanısı konulmuş 65 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

İkinci grupta kontrol olarak kullanılmak üzere kendisinde ve 1. derece akrabalarında kanser görülmeyen 54 sağlıklı birey seçilerek kullanılmıştır.

Her iki çalışma grubu için de örnek toplanması işlemi çalışmamızın İstanbul Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından onaylanmasından sonra başlatılmıştır (Sayı 284).

KULLANILAN YÖNTEMLER

Periferik Kandan DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplerle alınan 10ml.lik kan örnekleri çalışma için falkon tüplerine aktarılır. Üzerlerine 1:3 oranında lizis eklenerek +4°C'de 15dk. bekletilir. Daha sonra 1500rpm'de 10dk. santrifüj edilir ve süpernatant kısımları atılarak pelletler tamamen süspansiyon durumuna getirilir ve üzerlerine tekrar 15-20ml. lizis eklenir. Örnekler +4°C'de 15dk. bekledikten sonra 10dk. 1500rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant kısımları atılır ve süspansiyon olan pellet üzerine 500 µl %10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS), 75µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml lökosit parçalama çözültisi eklenerek 56°C'de su banyosunda bir gece inkübe edilir. İnkübasyondan sonra her 1ml örnek başına 0,37 ml olacak şekilde 9,5 M'lık amonyum asetat çözültisi eklendikten sonra karıştırılır ve 3000rpm'de 25dk santrifüj edilerek proteinler çöktürülür. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falkona aktarılır ve üzerine 1:2 oranında %99'luk absölu alkol eklenir ve DNA'nın presipitasyonu sağlanır. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklenir ve DNA mikropipet ucuyla alınır. DNA %70'lik alkolde yıkanır ve korunmak üzere Tris-EDTA çözültisinde çözündürülerek +4°C'de saklanır.

PZR Yöntemi İle MMP-3 ve E-Kaderin Gen Bölgelerinin Çoğaltılması ve RFLP Yöntemiyle Polimorfizm Analizi

Genomik DNA örneklerinde MMP-3 ve E-Kaderin gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. DNA örneklerinin her birinin amplifikasyonu için 10x PCR tamponu (10mM Tris-HCl, 50 mM of KCl, 1,75 mM of MgCl₂), 2,5mM dNTP, 0,1 ünite Taq DNA polimeraz MMP-3 ve E-Kaderin gen bölgelerine özgü her bir primerden 100pmol/µl ve 500ng DNA içeren toplam 25µl'lik PZR karışımı hazırlandı.

Kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir:

E-Kaderin -160C/A polimorfizmi için;

Forward -5' TTCTGATCCCAGGTCCTTAGTGAGC 3'

Reverse- 5' GGTACCTGCAGCAGCAGCAGCAG 3'

MMP-3 -1171 5A/6A polimorfizmi için;

Forward- 5'

GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAgA 3'

Reverse- 5'

CTTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT 3'

MMP-3 -1171 5A/6A geninden 129 bp ve E-Kaderin -160 C/A Gen Polimorfizminin Belirlenmesi İçin PZR Ürünlerinde Restriksiyon Enzim Analizi

Tth1111 Kesim enzimi (10U/µl): Tth1111 enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte MMP-3 -1171 5A/6A gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı.

BanII Kesim enzimi (10U/µl): BanII enzim 10X Buffer B ile birlikte E-Kaderin -160C/A gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı.

Restriksiyon Enzim Kesimleri

PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacimleri 10,5 µl (distile su 4,5 µl; 10xTampon çözülti 0,5 µl; enzim 0,25 µl; PCR ürünü 5,25 µl) ve 11,35 µl (distile su 4,5 µl; 10xTampon çözülti 0,5 µl; enzim 0,35 µl; PCR ürünü 6 µl) olacak şekilde restriksiyon enzim kesimleri Tth1111 ve BanII enzimlerinin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu kesim işlemlerinde kullanılan Tth1111 enzim için optimum sıcaklık 37°C'de 2 saat olmuştur. BanII enzimi için optimum sıcaklık 37 °C'de 16 saat olmuştur.

Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS 11.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı p<0.05 olarak alınmıştır.

Genotip ve ailelerin görülme sıklığının gruplararası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki Kare, Fisher testleri kullanılmıştır. Allel frekansları gen sayma metoduna göre yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda yaş ortalaması 50,82±8,91 arasında olan 65 hasta ve yaş ortalaması 46,98±11,49 olan 54 sağlıklı kadın kontrolden alınan örnekler kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubu arasında yaşlar açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p>0.05). Hastalarımızın %27,9'i menapoz öncesi dönem, %72,1'si ise menapoz sonrası dönemdedir.

Çalışmaya dahil ettiğimiz meme kanserli hastaların %80'i invaziv duktal, %7,8'i invaziv lobüler, %7,8'i kombine, %2'si meduller ve %2'si müsinöz'dür.

Hastalarımız TNM evrelemesinde T evresine göre değerlendirildiklerinde %24,5'i T1, %46,9'u T2, %20,4'ü T3 ve %8,2'si T4 olarak gözlemlenmiştir. Bölgesel lenf nodu pozitifliğine bakıldığında ise hastaların %22,4'ü N0, %44,9'u

N1, %26,5'i N2, %6,1'i N3 evresinde bulunmuştur.

Meme kanserli hastalar histolojik diferansiyasyona göre değerlendirildiğinde %9,5'u iyi diferansiye, % 47,6'sı orta diferansiye ve %42,9'u az diferansiye olmuş tümörlerdir.

Çalışma gruplarımızda MMP-3 5A/6A ve E-Kaderin -160 C/A genlerine ait genotip ve allel dağılımları tablo 1'de gösterilmiştir. Bulgularımıza göre hasta grubunda kontrol göre MMP-3 5A5A genotipi taşıma oranı anlamlı olarak azalmıştır (p:0,024, χ^2 :5,085, OR:0,292, %95CI:0,096-0,89). Bu bulgumuza paralel şekilde hasta grubunda da MMP-3 6A alleli taşıma oranı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı yüksek olarak saptanmıştır (p:0,024, χ^2 :5,085, OR:3,42, %95CI:1,12-10,45).

Çalışma gruplarımızı E-Kaderin -160C/A genotiplerine göre değerlendirdiğimizde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Her iki grubumuzda da AA genotipine ait bireye rastlanılmamıştır.

Tablo 1. Çalışma gruplarımızda MMP-3 5A/6A ve E-Kaderin -160 C/A genlerine ait genotip ve allel dağılımları

	Hasta (n:65)	Kontrol (n:54)
Genotipler		
6A6A	27 (%41,5)	16(%29,6)
5A5A	5(%7,7)	12 (%22,2)*
5A6A	33 (%50,8)	26(%48,1)
Alleller		
6A	87(%66,9)**	58(%53,70)
5A	43 (%33,1)	50(%46,30)
E-Kaderin	Hasta (n:65)	Kontrol (n:54)
Genotipler		
CC	28 (%43,1)	21 (%38,9)
AA	0 (%0)	0 (%0)
CA	37 (%56,9)	33(%61,1)
Alleller		
C	93 (%71,5)	75 (%69,4)
A	37 (%29,5)	33 (%30,6)

*(p:0,024, χ^2 :5,085, OR:0,292, %95CI:0,096-0,89)

***(p:0, 024, χ^2 :5,085, OR:3,42, %95CI:1,12-10,45)

Hasta grubumuzu nod metastazı görülmesi açısından MMP-3 gen polimorfizmi dağılımlarını incelediğimizde 5A5A genotipine sahip bireylerde nod metastazı gözlenmemiştir .

Buna ek olarak, 6A alleli taşıyan hastalarda ise taşımayan gruba göre anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır (p:0,038, %95CI:3,12-11,04) (Tablo 2).

Tablo 2. Hasta grubunda MMP-3 genotip dağılımına göre Nod metastazı varlığının ilişkilendirilmesi

	MMP-3 5A5A genotipine göre	
	Nod Metastazı var	Nod Metastazı yok
5A5A genotipi taşıma	2(%100)	0(%0)
5A5A genotipi taşımama	8(%17)	39 (%83)
MMP-3 6A alleleline göre		
	Nod Metastazı var	Nod Metastazı yok
6A alleli taşıma	39 (%83)*	8(%17)
6A alleli taşımama	0(%0)	2(%100)

* p:0,038, %95CI:3,12-11,04

Hastaların premenapoz yada postmenapoz döneminde olmalarıyla ilişkin olarak MMP-3 ve E-Kaderin genotip ve allel dağılımları açısından anlamlı bir bulguya rastlanmamıştır (p>0,05).

Tümör evrelendirmesi ve MMP-3 ve E-Kaderin gen

polimorfizmlerini incelediğimizde, MMP-3 gen polimorfizmleri ile tümör evrelendirilmesi açısından herhangi bir ilişki gözlenmezken, E-Kaderin CC genotipine sahip hastaların T3 veya T4 evresinde bulunma oranları anlamlı olarak artmış olduğu saptanmıştır (p:0,02, %95CI: 0,041-0,786) (Tablo 3).

Tablo 3. Hastalarda E-Kaderin genotiplerinin tümör evrelendirilmesine göre dağılımı

E-Kaderin Genotipleri	T1+T2 Evreleri	T3+T4 Evreleri
CC	13(%59,1)	9(%49)*
CA	24(%88,9)	3 (%11,1)

* p:0,02, %95CI: 0,041-0,786

Hastaları tümör nekrozu görülmesi açısından değerlendirdiğimizde %37 'sinde tümör nekrozu gözlemlenmiştir. Ancak MMP-3 ve E-Kaderin gen polimorfizmleri açısından tümör nekrozu ile anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0,05).

Hasta grubumuzu oluşturan bireylerin %16'sı östrojen reseptör negatif, %84'ü ise östrojen reseptör pozitif özellik taşımaktadır. CA genotipi taşıyan hastaların %91,7'si östrojen

reseptör pozitif bireyler iken, CC genotipi taşıyanlarda ise bu oran %73,7 olarak saptanmıştır.

Kapsül invazyonu varlığında MMP-3 ve E-Kaderin genotiplerinin dağılımını incelediğimizde MMP-3 genotip dağılımı açısından bir farklılık gözlemlenmezken, E-Kaderin CC genotipi taşıyan bireylerde kapsül invazyonu görülme sıklığının istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır (p:0,049, χ^2 :3,884, OR:0,308, %95CI: 0,094-1,011) (Tablo 4).

Tablo 4. Kapsül invazyonu varlığında E-Kaderin genotiplerinin dağılımı

E-Kaderin Genotipleri	Kapsül invazyonu	
	yok	var
CC	8(%38,1)	13(%61,9)*
CA	18(%66,7)	9 (%33,3)

* p:0,049, χ^2 :3,884, OR:0,308, %95CI: 0,094-1,011

Hastalarımızın %41,7'sinde perinodal invazyon bulunmaktadır. MMP-3 ve E-Kaderin genotiplerini sonrası MMP-3 genotip dağılımları ve perinodal invazyon bulunması arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir. Ancak E-Kaderin

genotip dağılımına göre CC genotipi taşıyan hastalarda CA genotipine göre perinodal invazyon bulunma oranı istatistiksel olarak artmıştır (p:0,012, χ^2 :6,291, OR: 4,64, %95CI:1,35-15,90) (Tablo 5).

Tablo 5. Perinodal invazyon varlığında E-Kaderin genotiplerinin dağılımı

E-Kaderin Genotipleri	Perinodal invazyon	
	yok	var
CC	13(%61,9)*	8(%38,1)
CA	7(%25,9)	20 (%74,1)

* p:0,012, χ^2 :6,291, OR: 4,64, %95CI:1,35-15,90

Çalışmamızda her iki genotip açısından riskli alleller olarak görülen MMP-3 6A ve E-Kaderin C allellerini birarada taşıma oranına göre çalışma gruplarımızı karşılaştırdığımızda,

hasta grubunda kontrol grubuna göre bu iki alleli bir arada taşıma oranı istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (p:0,024, χ^2 :5,085, OR: 3,42, %95CI:1,12-10,45) (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışma gruplarında MMP-3 6A ve E-Kaderin C allelini birarada taşıma oranının karşılaştırılması

	(6A+C) taşımayanlar	(6A+C) taşıyanlar
Hasta (n:65)	5 (%7,7)	60(%92,3)*
Kontrol (n:54)	12(%22,2)	42 (%77,8)

*p:0,024, χ^2 :5,085, OR: 3,42, %95CI:1,12-10,45

TARTIŞMA

Meme kanserinin nedenleri ile ilgili olarak kesin bir açıklama bulunmamakla birlikte meme kanseri riskini yükselten birçok risk faktörünün bulunduğu ifade edilmektedir. Bu risk faktörleri de; yaş, erken adet görme, geç menopoza girme, kalıtım, meme hastalıkları, alkol kullanımı vb.dir.

Bu çalışmada kadınlar arasında görülme sıklığı yüksek olan meme kanserinin fizyopatolojisinde rol oynadığı düşünülen MMP-3 ve E-Kaderin gen polimorfizmlerini çalışmayı amaçladık.

E-Kaderin, epitelyal dokuda eksprese edilen bir çeşit adezyon molekülüdür. Tümör baskılayıcı bir gendir. Hücre-hücre adezyonunda, hücre polarizasyonunda ve sinyal iletiminde ve doku morfolojisinde görevlidir. E-Kaderin genindeki mutasyonlar ya da ekspresyonunun azalması, hücre adezyonunun yok olmasına ve hücrelerin hareketliliklerinin artmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla E-Kaderin kanser gelişimi ve metastazında önemli rol oynamaktadır.

Tsukino ve ark. prostat kanserinin ilerleyişi ile ilgili Japon popülasyonunda yaptıkları çalışmada E-Kaderin genine ait -160 bölgesinde C>A değişimi incelenmiştir. Çalışmaya 219 prostat kanseri şüphesi olan ve 219 sağlıklı birey dahil edilmiştir.

Hasta grubunda CC genotipi % 60,7, CA genotipi % 35,2 ve AA genotipi %4,1 olarak bulunurken; kontrol grubunda CC genotipi % 67,1, CA genotipi % 30,1 ve AA genotipi %2,7 bulunmuştur. hastalarda A alleli taşıma oranı % 21,7 iken kontrolde %17,8 dir. C alleli taşıma oranı ise hastada %78,3 iken kontrolde %82,2 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada genotipler açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Prostat kanseri tümör farklılaşması ve aşamasına göre alt bölümlere ayrılmış, E-Kaderin polimorfizminin prostat kanserinde az farklılaşması, invazivlik durumu arasında bir ilişki bulunmamıştır (26). Bizim çalışmamızda genotipler açısından bakıldığında hasta grubunda CC genotipi % 43,1, CA genotipi % 56,9 kontrol grubunda ise CC genotipi % 60,7, CA genotipi % 61,1 olarak bulunurken AA genotipine rastlanmamıştır. Çalışma gruplarımızı E-Kaderin -160C/A genotiplerine göre değerlendirdiğimizde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Wang ve ark.nın yaptıkları yedi farklı kanser türünü içeren meta-analiz çalışmasında E-Kaderin -160 C/A polimorfizmi ile kanser riskini incelemişlerdir. Yüksek penetranslı genlerden BRCA1 ve BRCA2'ye ek olarak E-Kaderinin sık varyantlarının da meme kanser riskini arttırdığı bulunmuştur. 1043 meme kanserli hasta ve 817 sağlıklı bireyi içeren bu çalışmada genotipler açısından hasta ve kontrol grupları arasında

anlamli bir farka rastlanilmamıştır. -160A mutant allelinin meme kanseri riskinde belirleyici olmadığı bildirilmiştir (14). Bizim çalışmamızda da A alleli taşıma ile kanser riski arasında bir ilişki bulunmamıştır.

Yu ve ark. mın 468 meme kanserli hasta ve 470 sağlıklı bireyde yaptıkları E-kaderin -160C/A polimorfizmi çalışmasında genotip dağılımı hasta grubunda %47.5 CC , %43 CA ve %9.4 AA iken, kontrol grubunda %51.8 CC, %39.9 CA ve %8.3 AA olarak tespit edilmiştir (27).

Her ne kadar E-Kaderin -160 C/A polimorfizmi ve meme kanseri riski arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiş olsa da E-Kaderin CC genotipine sahip hastalarda T3 veya T4 evresinde bulunma oranının CA genotipine sahip olanlara göre anlamlı şekilde artmış olduğunu saptadık.

Ayrıca kapsül invazyonu görülme sıklığı açısından da E-Kaderin CC genotipi taşımanın riski arttırdığını gözlemledik. Buna paralel şekilde perinodal invazyonda da CC genotipini riskli olarak saptadık.

MMP-3 son zamanlarda meme kanserinde tümör etkileyici, tümörü hızlandırıcı olarak ortaya çıkmış ve risk üzerinde ilginç bir aday olduğu bildirilmiştir. Artmış MMP-3 ekspresyonu meme kanserli hücrelerde ve bu hücrelere ait stromalarda gözlenmiştir. MMP-3 ün promotör bölgesindeki yaygın bir polimorfizm olan -1171 5A/6A polimorfizminin fonksiyonel olduğu bildirilmiştir.

Ferre ve ark.nın yaptıkları -1171 5A/6A polimorfizm iki farklı Avrupa popülasyonunda çalışılmıştır. Hasta grubunda 5A5A genotipi %23.57, 5A6A genotipi %51.62, 6A6A genotipi %24.79 olarak; kontrol grubunda 5A5A genotipi %25.82, 5A6A genotipi %50.54, 6A6A genotipi ise %23.62 olarak tespit edilmiştir. Allel frekansları açısından hasta ve kontrol grupları incelendiğinde hasta grubunda 5A alleli %49.4, 6A alleli %50.6 iken; kontrol grubunda 5A alleli %51.1 ve 6A alleli %48.9 olarak saptanmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında genotip ve allel frekansları açısından farklılık saptanmamıştır. 5A alleli taşımaları bakımından meme kanserli hastalar ve sağlıklı bireylerde farklı olmadığı tespit edilmiştir (12).

Ghilardi ve ark.nın İtalyan popülasyonunda yaptığı çalışmada MMP-3 geninde -160 C/A polimorfizmi incelenmiştir. Çalışmada, 5A allelinin sıklığı meme kanseri grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Meme kanseri grubu metastaz gelişmeyen (M-) ve metastaz gelişen (M+) grup olarak ikiye ayrılmıştır. 5A alleli, M+ grupta

kontrole göre daha yaygındır. MMP-3 geninin promotöründe genel bir varyant tanımlanmıştır. *in vitro* çalışmalarla 5A alleli, 6A allele göre iki kat daha yüksek promotör aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri hastalarında, MMP-3 allelik varyasyonları kontrollerle karşılaştırıldığında önemli farklılık olduğu ve dağılım eğrisinin 5A homozigotluk sıklığının artışı yönünde değiştığı gösterilmiştir. Meme kanseri teşhisinin sırasında TNM düzeyi ile MMP-1 ve MMP-3 gen promotörlerinin polimorfizmleri arasında istatistiksel korelasyon bulunamamıştır. 5A alleli ve M+ altgrupları ile kontroller arasında MMP-3 promotör polimorfizmi açısından güçlü bir korelasyon bulunmuştur. 5A allel sıklığı, kontrol ve M-hastalarında istatistiksel farklılık bulunmamıştır. 5A allel homozigotları M+ hastalarında kontrole göre daha yaygındır. M+ ve M- hastalarında bu farklılık istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşamadığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak, meme kanseri hastalarında MMP-3 gen promotör dizisinde 5A allelinin bulunması kanserin büyümesi ve metastazında etkili olduğu bulunmuştur (28).

Biz çalışmamızda MMP-3 5A/5A genotipine sahip hastalarda nod metastazı gözlemlenmedi.

Peter Krippel ve ark.nın Avusturya popülasyonunda yaptıkları çalışmada fonksiyonel MMP-3 5A/6A promotör polimorfizmi meme kanseri ile ilişkilendirilmemiştir. Bu çalışma ile MMP-3 aktivitesinin tümör büyümesi ve gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (29).

Çalışmamızda gruplarımızı MMP-3 5A/6A genotip ve allel dağılımlarına göre değerlendirdiğimizde kontrol grubunda hasta grubuna göre MMP-3 5A5A genotipi taşıma oranı anlamlı olarak artmıştır. Bu bulgumuza paralel şekilde hasta grubunda da MMP-3 6A alleli taşıma oranı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı yüksek olarak gözlemledik. Ancak MMP-3 5A/6A polimorfizmi ile hastalığın TNM evrelemesi ve diğer risk faktörleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Çalışmamız sonucunda MMP-3 6A alleli meme kanseri için risk faktörü olarak gözlemlenmiştir. Buna ek olarak bu alleli taşıyan bireylerde nod metastazı taşıma riskinin de arttığı saptanmıştır. E-Kaderin CC genotipinin ise T evreleme, kapsül invazyonu ve perinodal invazyon ile ilişkili olduğunu tespit ettik. Vaka sayısının artırılması ile her iki gen polimorfizm açısından da popülasyondaki meme kanseri riskinin değerlendirilmesinde daha anlamlı sonuçlar elde edileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 10750

Kaynaklar

1. Hulpiaua P, Roya F. Molecular evolution of the cadherin superfamily, *The International J BiochemCell Biol* 2009;41:349–369.
2. Güc D. Adezyon Molekülleri, *Ankem Dergi* 2004; 18 (Ek 2):158-163.
3. Hazan RB, Qiao AR, Keren BR, Badano AI, Suyamaa K. Cadherin Switch in Tumor Progression, *Ann NY Acad Sci* 2004;1014: 155–163.
4. Qureshi HS, Linden MD, Divine G, Raju UB. E-Cadherin Status in Breast Cancer Correlates With Histologic Type but Does Not Correlate With Established Prognostic Parameters, *Am J Clin Pathol* 2006;125:377-385
5. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases, *Breast Cancer Res* 2003;5(6):R217-22.
6. Beeghly-Fadiel A, Lu W, Gao YT, Long J, Deming SL, Cai Q, Zheng Y, Shu XO, Zheng W. E-cadherin polymorphisms and breast cancer susceptibility: a report from the Shanghai Breast Cancer Study, *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121:445–452
7. Singhai R, Patil V,W, Jaiswal SR, Patil SD, Tayade MB, Patil AV. E-Cadherin as diagnostic biomarker in breast cancer, *North Am J Med Sei* 2011; 3: 227-233.
8. Suciuc C, Cimpean AM, Mureşan AM, Izvernariu D, Raica M. E-cadherin expression in invasive breast cancer, *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2008, 49(4):517–523
9. Angst BD, Marozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily, *J Cell Sei* 2001; 114, 625-626.
10. Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F. Mutations of the Human E-Cadherin (CDH1) Gene, *Hum Mutat* 1998;12(4):226-37.
11. Li LC, Chui RM, Sasaki M. A Single Nucleotide Polymorphism in the E-cadherin Gene promoter alters transcriptional activities, *Cancer Res* 2000;60:873-876.
12. Ferre N, Camps J, Joven J. Lack of Association of the 1171 (5A) Allele of the MMP3 Promoter with Breast Cancer, *Clin Chem* 2002; 48:5.
13. Amălinei C, Căruntu ID, Giuşcă SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions, *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2010, 51(2):215–228.
14. Wang GY, Lu CQ, Zhang RM, Hu XH, Luo ZW. The E-cadherin Gene Polymorphism 160C/A and Cancer Risk: A HuGE Review and Meta-Analysis of 26 Case-Control Studies, *Am J Epidemiol* 2008; 167 (1): 7-14.
15. Li LC, Chui RM, Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, Au HC, Nojima D, Carroll P, Dahiya R. A Single Nucleotide Polymorphism in the E-cadherin Gene Promoter Alters Transcriptional Activities, *Cancer Res* 2000;60:873-876.
16. Peçina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells, *Cancer Cell Int.* 2003; 3: 17.
17. Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression, *Breast Cancer Res* 2001; 3:289–293
18. Cattaneo F, Venesio T, Molatore S, Russo A, Fiocca R, Frattini M, Scovassi AI, Ottini L, Bertario L, Ranzani GN. Functional Analysis and Case-control Study of –160C/A Polymorphism in the E-cadherin Gene Promoter: Association with Cancer Risk, *Anticancer Research* 2006; 26: 4627-4632
19. Motovali-Bashi M, Hojati Z, Hajihosein S. The role of matrix metalloproteinase-3 functional 5A/6A promoter polymorphism in tumor cell progression and metastasis of breast cancer, *IJB*, 2008; 6:45-49.
20. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of Coronary Atherosclerosis Is Associated with a Common Genetic Variant of the Human Stromelysin-1 Promoter Which Results in Reduced Gene Expression, *J Biol Chem* 1996; 271(22):13055-60.
21. Samnegård A, Silveira A, Lundman P, Boquist S, Odeberg J, Hulthe J, McPheat W, Tornvall P, Bergstrand L, Ericsson CG, Hamsten A, Eriksson P. Serum matrix metalloproteinase-3 concentration is influenced by MMP-3 -1612 5A/6A promoter genotype and associated with myocardial infarction, *J Intern Med* 2005;258(5):411-9.
22. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of Matrixmetalloproteinases in primary human, *BMC Cancer* 2009; 9:188
23. Doizer KJ, Mahon SM. Cancer Prevention, Detection and Control, *A Nursing Perspective*, Oncology Nursing Society Pittsburgh, PA, 2002; 389-444.
24. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics, *BMJ* 2000;321(7261): 624-628.
25. Radisky ES, Radisky DC. Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer, *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15:201–212
26. Tsukino H, Kuroda Y, Imai H, Nakao H, Qiu D, Komiya Y, Inatomi H, Hamasaki, T, Kohshi K, Osada Y, Katoh T. Lack of Evidence for the Association of E-Cadherin Gene Polymorphism with Increased Risk or Progression of Prostate Cancer, *Urol Int* 2004;72(3):203-7.
27. Lo YL, Yu JC, Chen ST, Hsu GC, Mau YC, Yang SL, Wu PE, Shen CY. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the mitotic checkpoint genes: a multigenic study on cancer susceptibility, *Carcinogenesis* 2007; 28(5): 1079–1086.
28. Ghilardi G, Biondi ML, Caputo M. A Single Nucleotide Polymorphism in the Matrix Metalloproteinase-3 Promoter Enhances Breast Cancer Susceptibility, *Clin Cancer Res* 2002;8:3820-3823.
29. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W. The 5A/6A Polymorphism of the Matrix Metalloproteinase 3 Gene Promoter and Breast Cancer, *Clin Cancer Res* 2004;10:3518