

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNVAZİV MEME KANSERİNDE 34 GENİN
EPIGENETİK İNCELEMESİ ve
GEN EKSPRESYON ANALİZİ**

TEMEL ONKOLOJİ PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

Dr AYDAN ÇELEBİLER (ÇAVUŞOĞLU)

Prof. Dr. MERAL SAKIZLI

(Danışman)

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2006.KB.SAG.31

ve

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu 105S465 sayı ile desteklenmiştir.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Dünyada, gelişmiş ülkelerde ve gelişmekte olan ülkelerde yeni tanı alan kanser vakaları, ve ölüm oranları,

Tablo 2: Kadınlarda göğüs kanseri risk faktörleri

Tablo 3: Meme tümör evreleri

Tablo 4: Meme kanseri histolojik tipleri

Tablo 5. Meme kanseri prognostik ve prediktif faktörler

Tablo 6: Kullanılan primer ve prob listesi

Tablo 7: Olguların demografik ve histopatolojik özellikleri

Tablo 8: Olguların hormon reseptörüne göre demografik ve histopatolojik özellikleri

Tablo 9: Gen amplifikasyon verimlilikleri

Tablo 10: *NormFinder* ile aday referans gen sıralaması.

Tablo 11: Tümör dokuda, 28 gen ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 12: Tümör dokuda, histopatolojik özelliklerle ilişkili gen ekspresyonları

Tablo 13: ER pozitif tümör dokuda, histopatolojik özelliklerle ilişkili gen ekspresyonları

Tablo 14: ER negatif tümör dokuda, histopatolojik özelliklerle ilişkili gen ekspresyonları

Tablo 15: Tümör komşu dokuda, histopatolojik özelliklerle 28 genin arasındaki ilişkisi

Tablo 16: Evre modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

Tablo 17: Histolojik grade modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

Tablo 18: Nükleer grade modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

Tablo 19: İnvaziv grade modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

Tablo 20: Diferansiasyon modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

Tablo 21: Nodal tutulum modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

Tablo 22: Metastaz modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Kanser hücresinin kazanımları

Şekil 2: Hücre siklusu

Şekil 3: Meme kanserinin ilerleyişi

Şekil 4: DNA metilasyonu

Şekil 5: DNA'dan proteine bilgi aktarımı

Şekil 6: qRT-PCR reaksiyonu

Şekil 7: Meme anatomisi

Şekil 8: Meme epitel hücre yapısı

Şekil 9: Meme kök hücresi ve olası progenitör hücreler

Şekil 10: Dünyada meme kanser insidans oranları

Şekil 11: Ülkeler arasında meme kanser ölüm oranları.

Şekil 12: Deneysel aşamalar

Şekil 13: Elde edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüleri

Şekil 14: Standart eğri örnekleri: ACTB ve B2M genlerinin standart eğrileri

Şekil 15: Deney sırasında örneklerin plate yerleşim örnekleri

Şekil 16: MSP Elektroforez görüntüsü

Şekil 17: İnvaziv meme kanserinde P16 ve CDH1 geninin metilasyon yüzdeleri

Şekil 18: İnvaziv meme kanseri evrelerine göre P16 geni ve CDH1 geninin metilasyon oranları

Şekil 19: Metilasyonu saptanan örneklerin ayrıntılı verileri

Şekil 20: Aday referans genlerin dokuların tümünde ekspresyon seviyeleri

Şekil 21: İnvaziv meme kanseri, tümör çevresi ve sağlıklı normal meme dokusunda aday referans genlerin ekspresyon seviyeleri.

Şekil 22: Benign, normal, tümör komşu ve tümör dokusunda gen ekspresyonları sıcaklık haritası (*heatmap*)

Şekil 23: ER pozitif, ER negatif tümör örneklerinde gen ekspresyonları sıcaklık haritası (*heatmap*)

Şekil 24: Hormon reseptörü ve evre'lere göre GSTP1 gen ekspresyonları

Şekil 25: Hormon reseptörü ve evre'lere göre TIMP3 gen ekspresyonları

Şekil 26: Histolojik tip ve evre'lere göre CDH13 gen ekspresyonları

Şekil 27: Histolojik grade ve hormon reseptörlerine göre P16 gen ekspresyonları

Şekil 28: Hormon reseptörleri ve BCL 2 ekspresyonu

Şekil 29 : CASP8 ekspresyonu ve metastaz

KISALTMALAR

- ACS: Amerikan Kanser Topluluğu
- ATM: Ataksi telenjektazi gen,
- BRCA1: Meme Kanser Geni 1
- BRCA2: Meme Kanser Geni 1
- CASP8: kaspaz 8
- CDH1: E-kadherin
- CDH13: H-kadherin
- CDK6: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
- cDNA: komplementer DNA
- CpG: Sitozin guanin dinükleotidi
- CV: Varyasyon katsayısı
- DEMTB: Dokuz Eylül meme tümör biyobank
- E: Amplifikasyon verimliliği
- EGF: Epidermal büyüme faktörü
- EGF: Epidermal büyüme faktörü
- ER: Östrojen reseptörü
- ESR: Östrojen reseptörü
- FISH: fluoresans in situ hibridizasyon
- GF: Büyüme faktörü
- GF: Büyüme faktörü
- GSTP1: Glutasyon S transferaz Pi
- HER2: Tirozin kinaz tip hücre yüzey reseptörü
- HRT: Hormon replasman tedavisi
- IHK: immunhistokimya
- IHK: İmmünohistokimyasal
- ITH: İzole tümör hücreleri
- IVDMVIA: İn vitro tanısal multivaryant indeks deneyi
- M: Metastaz
- MGMT: Metil guanin metil transferaz
- MLH1: MutL homologu 1
- MLH3: MutL homologu 3
- M-MuLV: moloney mürin lösemi virüsü

mRNA: mesajcı RNA
MSH6: MutS homologu 6
MSP: metilasyona spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
N: Lenf nodu
P15: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2B
P16: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
PCR: polimeraz zincir reaksiyonu
PgR: Progesteron reseptörü
PTEN: Fosfataz ve tensin homologu
qRT-PCR: kantitatif reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
RARb: Retinoik asit reseptör beta
RASSF1: Ras ilişkili protein
RB: Retinoblastoma geni
RT-PCR: reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
STK11: Serin treonin kinaz 11
T: Tümör boyutu
THBS1: Trombospondin1
TIMP3: Metalloproteinaz 3 doku inhibitörü

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında demokratik ve bilimsel bakış açısıyla bana yol gösteren, çalıőmamın her aşamasında duyduğu güven nedeniyle hocam sayın Prof. Dr. Meral Sakızlı'ya,
Projenin gerçekleőtirilmesi sırasında taze doku rneklelerinin elde edilmesi sırasında gösterdikleri yardım nedeniyle Prof. Dr. Serdar Saydam'a, Prof. Dr Tülay Canda'ya, Uzm Dr. Ali İbrahim Sevinç'e, klinik verilerin sağlanmasında yardımcı olan Dr. Zuhul Baőkan'a, sağlıklı normal meme doku elde edilmesini sağlayan İzmir zel Dr Cevdet Tuğrul Meme Hastalıkları Teőtis ve Tedavi Merkezi'ne,
Bilimsel yaklaőtımından yararlandığım ikinci danıőmanım sayın Prof Dr Gül Güner'e,
Doktora eğitimim boyunca gösterdikleri tolerans nedeniyle SB İzmir Eđitim Hastanesi Klinik Biyokimya Őefi sayın Baysal Karaca'ya ve mesai arkadaşlarıma,
Onkoloji Enstitüsü alıőanlarına,
Varlığı ve sabrı nedeniyle kızım Hazal avuőođlu'na teőtekkr ederim.

İNVAZİV MEME KANSERİNDE 34 GENİN EPİGENETİK İNCELEMESİ ve GEN EKSPRESYON ANALİZİ

Meme kanserinin tanısal sürecinde, tedavi seçiminde yardımcı olabilmek ve tümörün moleküler olarak tanımlanabilmesini sağlayabilmek amacıyla 64 meme tümör, 51 tümör çevre, meme redüksiyon ameliyatından elde edilen 4 sağlıklı meme dokusunda 6'sı referans toplam 34 genin ekspresyon verileri kantitatif revers transkriptaz PCR ile değerlendirildi. Analiz, taze dokularda gerçekleştirildi. Yine aynı amaçla, aynı örneklerde CDH1 ve P16 genlerinin epigenetik değişimleri metilasyon spesifik PCR ile incelendi. Bunların histolojik ve klinik verilerle ilişkileri araştırıldı.

Histolojik tiplere göre CDH1 metilasyon sıklığı: lobüler %32, duktal %10,5 mikstümörde %24 olarak bulundu. P16 metilasyonu evre sıfırda, CDH1 metilasyonu ileri evrelerde anlamlı olarak yüksekti.

Histolojik derecenin %90.1'inin BRCA2, P16, P53, P73, CDH1, THBS1, PAX5, STK11, BCL2, CASP8, ESR, RARb, MLH3, evre'nin % 73.6'sının BRCA1, BRCA2, CDH1, P16, P15, P73, CDK6, GSTP1, TIMP3, CDH13, ATM, CASP8, ESR, HER2, MLH3, nükleer derecenin %42,2'sinin BRCA1, BCL2, CASP8, ESR, MSH6, MLH3, invaziv grade'in %52,9'unun P53, CDK6, TIMP3, RASSF1, PAX5, STK11, BCL2, RARb, diferansiyasyonun %52.8'inin P53, CDK6, TIMP3, PAX5, STK11, BCL2, CASP8, RARb, lenf nodu tutulumunun %56.9'unun BRCA1, BRCA2, CDH1, P16, P15, CDK6, ATM, ESR, metastazın %55.5'inin CDH1, P73, P53, TIMP3, CDH13, ATM, CASP8, HER2, MSH6 gen ekspresyon değişiklikleri ile açıklanabileceği gösterildi. Ayrıca CDH1 ve TIMP3'ün gen ekspresyon değişiklikleri ile meme kanserinin histolojik tiplerine göre gruplandırılmasında %51.4; ESR, HER2, GSTP1 ve CDH13 gen ekspresyon değişikliklerinin ise meme kanserinin hormon reseptörüne göre (ER+HER2+, ER+HER-, ER-HER+,ER-HER2-) gruplandırılmasında %85.5 başarılı bulundu.

Elde edilen verilerin meme kanseri hastalarının daha doğru sınıflandırılmasında ve tedavi karar sürecinde yardımcı olabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, gen ekspresyonu, epigenetik

GENE EXPRESSION and EPIGENETIC ANALYSIS of 34 GENES in INVAZIVE BREAST CANCER

Quantitative Real Time PCR gene expression data of 34 genes (including 6 reference genes) from 64 breast tumor and 51 tumor neighboring tissues with 4 normal breast tissues obtained from breast reduction surgeries were analyzed to look for an opportunity of improving the period of diagnosis and determination of treatment modality by considering a molecular tumor classification. All PCR were performed on fresh tissue samples. Also epigenetic changes of CDH1 and P16 were examined by methylation specific PCR and their relation with histological and clinical data was studied. CDH1 methylation was observed as %32 in lobular, 10.5% in ductal and 24% in mixed tumors when sorted on the histologic types. Methylated states of P16 were significantly high at stage 0, while of CDH1 were found to be high at advanced grades.

More than ninety percent of the histological grades could be estimated by levels of BRCA2, P16, P53, P73, CDH1, THBS1, PAX5, STK11, BCL2, CASP8, ESR, RARb and MLH3 when 73.6% of the stages by: BRCA1, BRCA2, CDH1, P16, P15, P73, CDK6, GSTP1, TIMP3, CDH13, ATM, CASP8, ESR, HER2, MLH3; 42.2% of the nuclear grade by: BRCA1, BCL2, CASP8, ESR, MSH6, MLH3; 52.9% of the invasive grade by: P53, CDK6, TIMP3, RASSF1, PAX5, STK11, BCL2, RARb; 52.8% of the differentiation by P53, CDK6, TIMP3, PAX5, STK11, BCL2, CASP8, RARb; %56.9 of lymph node positivity by: BRCA1, BRCA2, CDH1, P16, P15, CDK6, ATM, ESR and 55.5% of the metastasis by: CDH1, P73, P53, TIMP3, CDH13, ATM, CASP8, HER2 and MSH6. CDH1 and TIMP3 gene expression changes could predict 51,4% of histologic typing in breast cancer when ESR, HER2, GSTP1 ve CDH13 expression changes predicts 85.5% of the sorting on hormone receptor status (ER+HER2+, ER+HER-, ER-HER+,ER-HER2-).

We suppose that these results could help in better classification of the breast cancer patients for their treatment decisions.

Key words: Breast Cancer, Gene Expression, Epigenetics

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	2
Karsinogenez.....	2
Epigenetik.....	5
Gen Ekspresyonu.....	7
Meme Anatomisi/Meme Epitelyum Hücre Organizasyonu/Meme Biyolojisi.....	11
Meme Kanseri Gelişimi.....	12
Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	14
Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	17
Meme Kanseri Evrelemesi.....	20
Meme Kanseri Histolojik Sınıflandırma.....	25
Meme Kanseri Moleküler Sınıflaması.....	27
Meme Kanseri Prognostik ve Prediktif Faktörler.....	28
Meme Kanseri Moleküler Prognostik ve Prediktif Testler.....	29
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
Dokunun Eldesi ve Depolanması.....	33
Epigenetik Analiz.....	34
Gen Ekspresyonu.....	35
İstatistik.....	39
IV. BULGULAR.....	40
V. TARTIŞMA.....	58
VI: SONUÇ ve ÖNERİLER.....	66
VII. KAYNAKLAR.....	67

I. GİRİŞ ve AMAC

Meme kanserinin yönetimi; yaygın tarama programlarının uygulanması, adjuvan kemoterapi ve hormonoterapinin kullanılmasıyla dramatik olarak değişikliğe uğradı. Son veriler, insidansın artmasına rağmen bu değişikliklerin hastalığın sonucunda önemli etkilere sahip olduğunu gösterdi (1). Hedefe yönelik tedavinin örnekleri olan tamoksifen tedavisinden yalnızca ER+, adjuvan tedavinin yanında ya da sonrasında trastuzumab tedavisinden HER2+ tümörlerin yarar görmesi, meme kanserinin heterojen bir hastalık grubu olduğu yolundaki görüşü destekler. Meme kanserinin biyolojik ve klinik heterojenitesini gösteren tümörlerin genetik içeriğindeki farklılıklar, moleküler tekniklerle doğrulandı. Bu ilerlemelere rağmen meme tümörünü daha kesin tanımlayacak, prognozu ve tedaviye yanıtı öngörecektir göstergelerin bulunmasına gereksinim vardır. Tümör dokusunun genetik profilinin bu gereksinimleri karşılayacağı, meme kanseri ile ilgili daha kesin kararları vermeye yarayacak pratik uygulamaya dönüşecek bilgileri içerdiği düşünülmektedir (2). Tümör dokusunu hem RNA hem de DNA düzeyinde tanımlama çabaları bu düşünceye hizmet eder.

Tümör dokusunun genetik profilinin yanında nükleotit dizilerinde değişiklik yaratmadan gen ekspresyonunu değiştiren epigenetik değişikliklerin kanserin başlangıcı ve progresyonunda önemli rol oynadığı düşünülür (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 süreci aydınlatmaya yönelik araştırmalar moleküler temelli önleyici ve tedavi edici yeni ajanlar için yol gösterici olabilir.

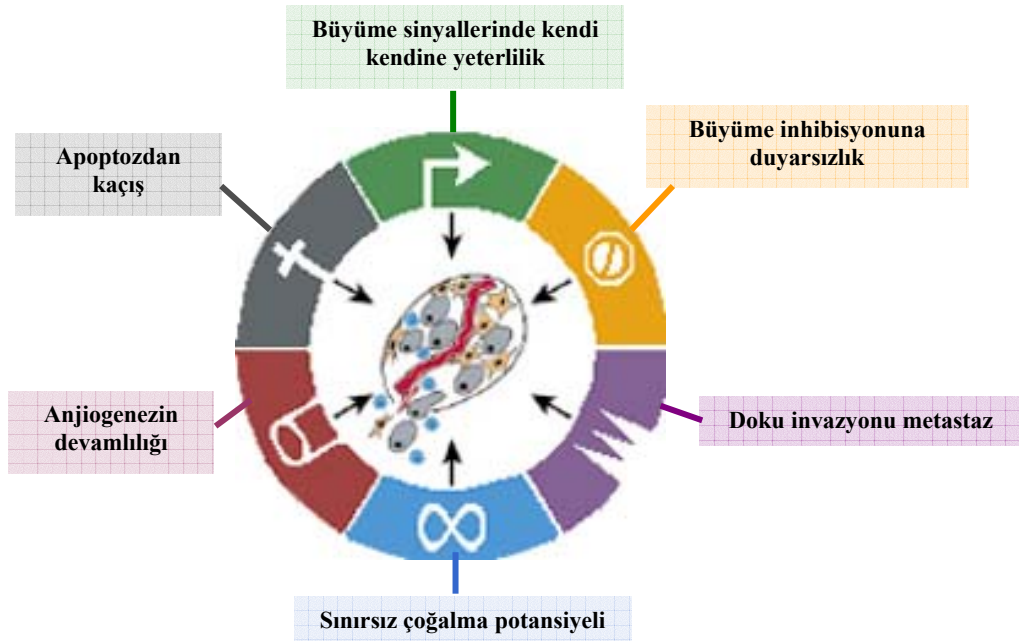
Bu proje ile sporadik meme kanserinde karsinogenezin önemli basamaklarında etkin rol aldığı düşünülen BRCA1, BRCA2, CDH1, P16, P15, P53, P73, CDK6, GSTP1, TIMP3, CDH13, RASSF1, ATM, THBS1, PAX6, PAX5, PTEN, STK11, BCL2, CASP8, CD44, ESR, HER2, RARb, MGMT, MLH1, MSH6, MLH3 gen ekspresyonlarının ve P16, CDH1 genlerinin metilasyon değişikliklerinin histolojik ve klinik parametrelerle olan ilişkileri, histolojik ve moleküler sınıflamayla birlikteliklerinin tanımlanması amaçlandı.

II. GENEL BİLGİLER

Karsinogenez

Hem deneysel modellerde kanser fenotipinin oluşturulması, hem de insan kanser hücrelerindeki değişikliklerin gösterilmesi sırasında onkogenleri baskın hale getiren, tümör supresör genleri sessizleştiren ya da fonksiyonunu önleyen mutasyonlar keşfedildi (6). Çok basamaklı süreç ile normal hücrelerin malign hücelere transformasyonunu yöneten hücresel olaylar, kanserlerin çoğunun belki de hepsinin ortak paylaşımıdır. Darwin evrim teorisine uygun olarak, genetik ya da epigenetik olaylarla diğer hücelere göre büyüme avantajı kazanan hücelerin tümör oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir.

Normal hücre proliferasyonu üzerindeki homeostaz, kanserin gelişimine direnci oluşturur ve kanser hücrelerine dönüşüm sürecinde bu engeller aşılmalıdır. Kanser hücre genotipini yansıttığı kabul edilen homeostatik değişiklikler: büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyümeyi engelleyen sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kurtuluş, sınırsız çoğalabilme gücü, devam eden anjiogenez, doku invazyon ve metastaz yeteneği olarak özetlenebilir (şekil 1) (6).



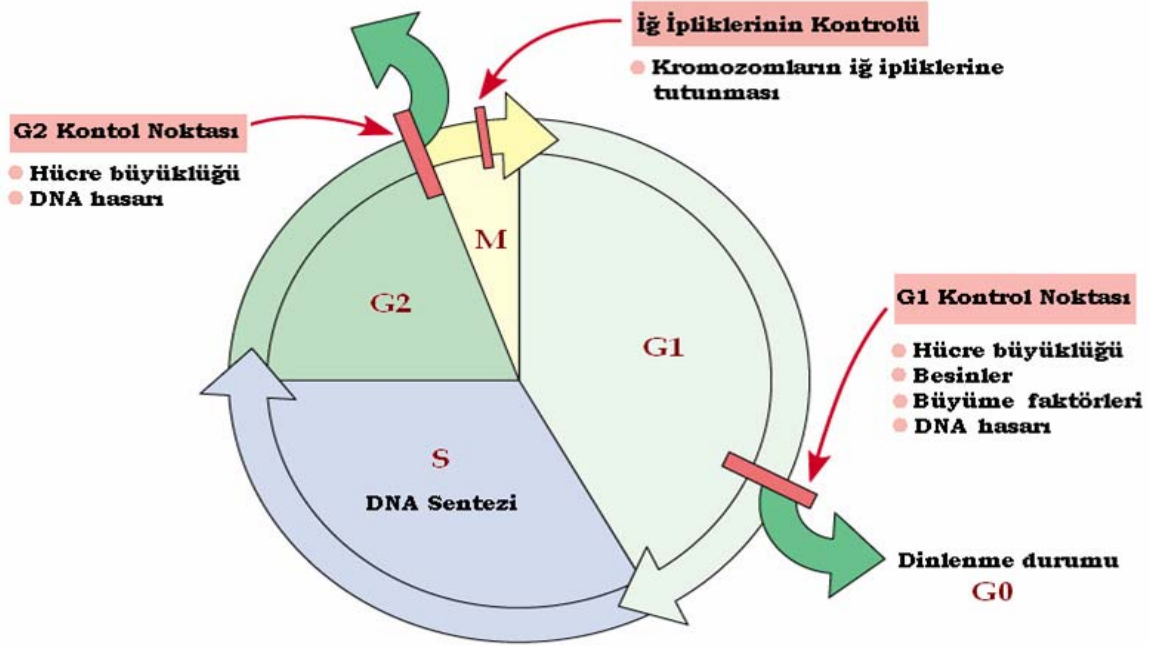
Şekil 1: Kanser hücrelerinin kazanımları (6)

Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik: Normal hücrelerin sessiz durumdan aktif proliferatif duruma geçişinden önce mitojenik sinyallere gereksinimi vardır. Bu sinyaller, genellikle sinyal moleküllerinin transmembran reseptörlere bağlanması ile hücre içine geçer. Normal hücrelerin çoğalma sürecinde büyüme sinyallerine bağımlılığı açıktır. Tümör hücrelerinin, büyüme sinyallerinin çoğunu kendi oluşturduğu, böylece normal doku mikroçevresinden gelecek uyarılara bağımlılığını azalttığı düşünülür. Hücre dışından gelen uyarılardan bağımsız davranış, doku içindeki hücre tiplerinin uygun davranışı için gerekli işleyişi sağlayan en önemli homeostatik mekanizma bozukluğudur. Kazanılan büyüme otonomisi baskın karakterde onkogenlerin aktivasyonu ile açıklanabilir. Büyüme faktörlerinin (GF) sinyallerini hücre içine taşıyan hücre yüzey reseptörleri tümör patogenezi sırasında önemli hedeflerdendir. Bu reseptörlerin çoğu sitoplazmik domainlerinde tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve bir çok kanser tipinde fazla ekspresyonları görülür. Reseptörün fazla ekspresyonu, fazla yanıt vermesine neden olabilir (7). Örneğin epidermal GF reseptörlerinden (EGF) HER2, mide ve meme kanserlerinde çok fazla eksprese olur (8, 9). Küntleşen EGF reseptörlerin yapısal değişiklikleri ligandan bağımsız sinyallerin oluşumuna neden olabilir (7). Aktif büyüme sinyalini alan ve nükleusa taşıyan SOS-Ras-Raf-MAPK gibi sinyal yollarındaki küçük sinyal moleküllerinin mutasyonu da kanser hücrelerinin otonomik büyümesini sağlayan sık bir mekanizmadır (10, 11).

Büyümeyi engelleyen sinyallere duyarsızlık: Normal dokuda proliferasyonu önleyen sinyaller, iki farklı mekanizma ile çalışır: 1- Hücreler aktif proliferatif sıklardan sessiz forma (Go) girebilir (şekil 2), 2- Hücreler kalıcı olarak proliferatif özelliklerinden vazgeçebilir, genellikle spesifik diferansiyasyon ile birlikte olan özellikleri kazanarak post mitotik forma dönüşebilir.

Hücre hücre siklusunun G1 fazında, sessiz forma mı dönüşeceğine, post mitotik forma girip diferansiye mi olacağına ya da sıklarda ilerleyip çoğalıp çoğalmayacağına karar verir. Moleküler düzeyde hücre siklusunun G1'den S fazına girerek ilerlemesi aşamasında normal hücre siklusunun kaybı, malign transformasyonda merkezi bir rol oynar (şekil 2) (12). Hücrelerin postmitotik, diferansiyasyonu tamamlanmış hücre formuna geçişi henüz tam olarak anlaşılmasa da tümör hücreleri, bu terminal diferansiyondan çeşitli yöntemleri kullanarak kurtulur (7).

Apoptozdan kurtuluş: Apoptoz, çok hücreli canlılarda doku bütünlüğünün ve fonksiyonunun devamına izin verir, hasarlı ya da istenmeyen hücreleri eler (13). Malign hücre birikimi, apoptozu düzenleyen genlerin de mutasyonlarına gereksinim duyar.



Şekil 2: Hücre siklusu

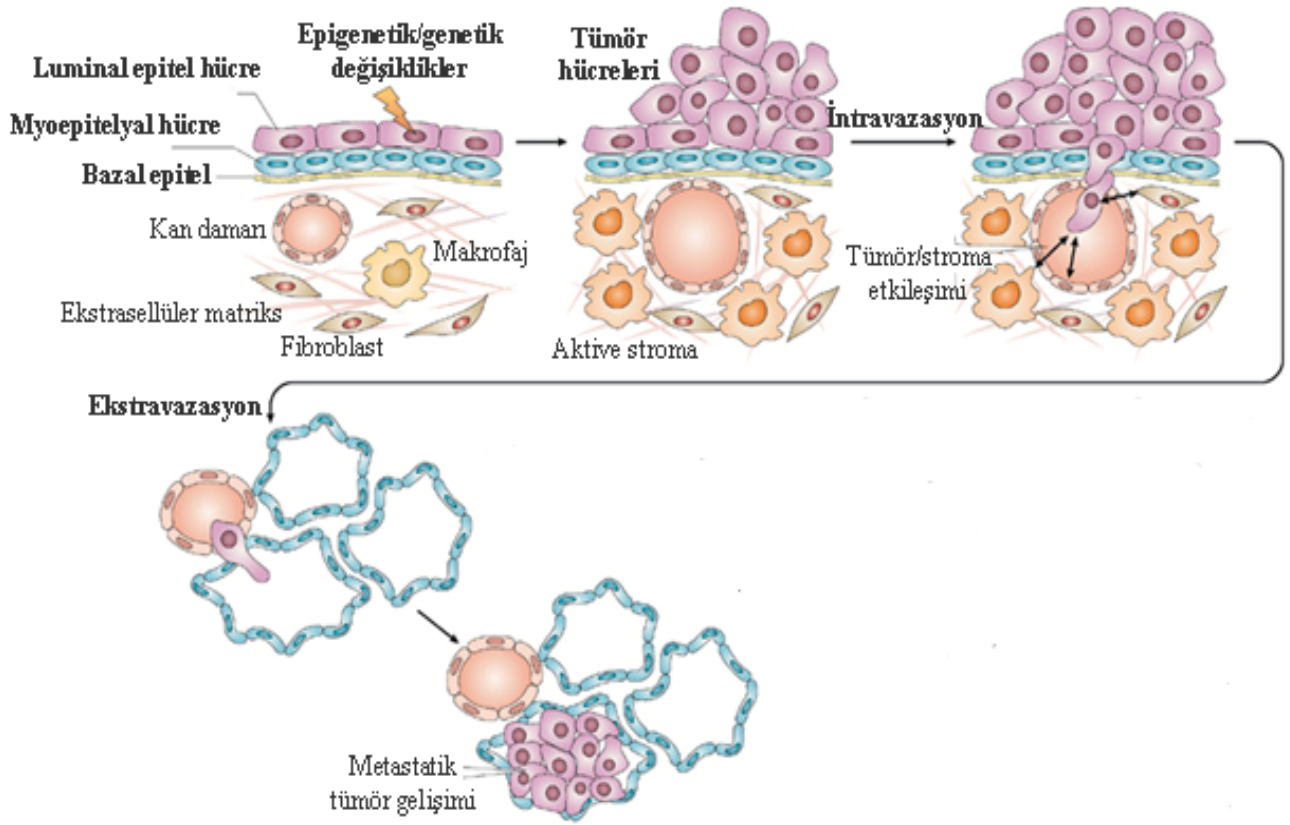
Sınırsız çoğalabilme gücü: Normal hücrelerin çoğu kendi replikasyonlarını sınırlamak üzere programlanmıştır. Tümör hücrelerinin sınırsız çoğalma yeteneğini kazanabilmesi, immortal özelliğini kazanması gereklidir (14).

Anjiogenezin sürekliliği: Normal doku fonksiyonlarının devamı oksijen ve besinlere ulaşılabilirliğine ve metabolik atıklarının temizlenmesine bağlıdır. Yeni kan damarlarının oluşma süreci olan anjiogenez, anjiogenez uyarıcı ve inhibe eden faktörlerin dengesi ile düzenlenir (14). Tümör hücrelerinde yaşamın devamlılığı bu dengenin uyarı yönüne kaymasını gerektirir.

Doku invazyon ve metastaz yeteneği: İnvazyon ve metastazın gerçekleşmesi diğer özelliklerin kazanımına ve ek hücrel değişikliklere bağlıdır. İnvazyon ve metastaz süreci son derece kompleksdir. Genetik ve kimyasal belirleyicileri tam olarak anlaşılmasa da birbirleriyle çok yakın iki süreçtir. Tümör hücrelerinin birbirinden ayrılması, matriks proteinlerine tutunması, ekstrasellüler matriksin parçalanması, dolaşıma geçmesi, dolaşımda immün sistemden kaçması ve yeni yerleşim yerinde bu basamakların tekrarı gereklidir (şekil 3) (7).

Kanserin fenotipik değişikliklerini oluşturan genetik yapısal değişiklikler genin ekspresyonundan başlayıp fonksiyonel protein oluşumuna kadar tüm süreci kapsar. Pek çok sayıda genetik ve epigenetik değişiklikler kanser hücresinde birikir. Monoklonal olarak başlayan

tümör, klinik olarak belirgin hale geldiğinde, bu biriken değişiklikler nedeniyle oluşan ve yaşayabilen alt klonların varlığı ile son derece heterojendir. Tümör hücresinin genetik profilinin tümörün davranışını belirlediğine inanılır.



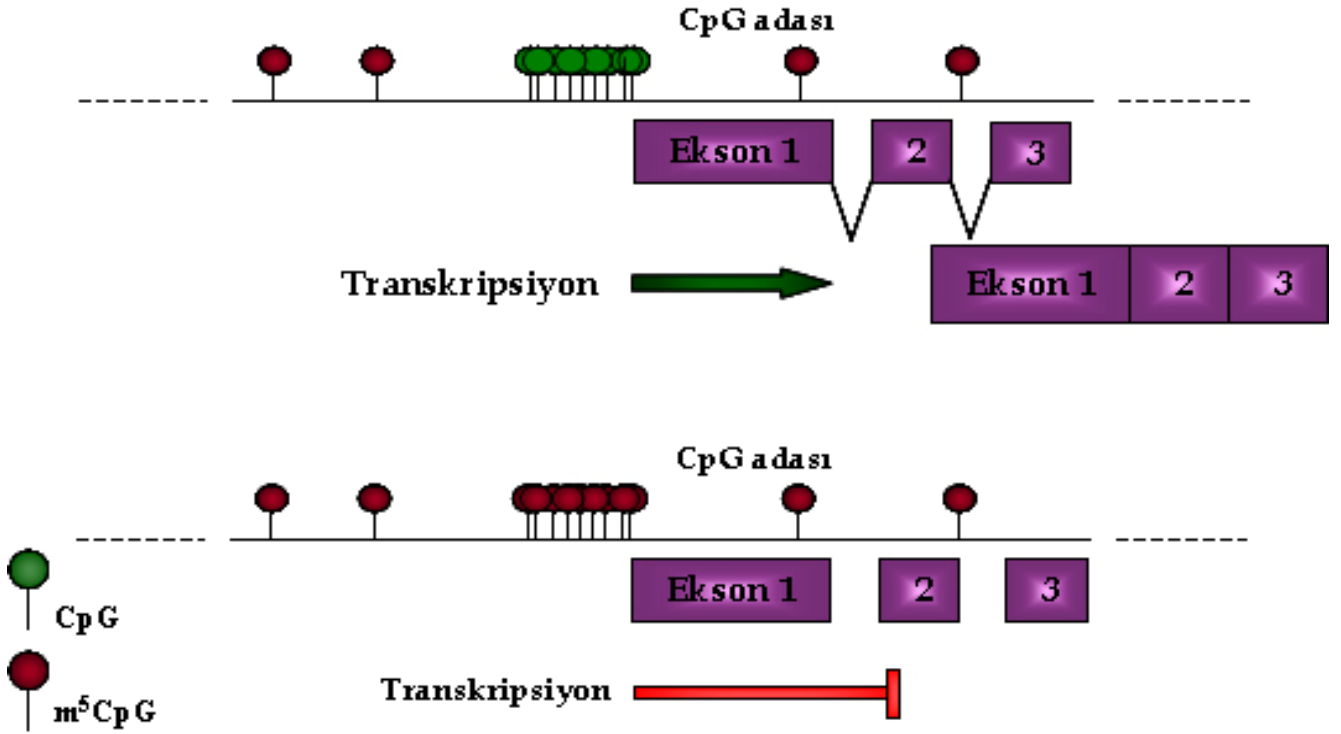
Şekil 3: Meme kanserinin ilerleyişi (15)

Epigenetik

Genetik içerikte değişikliğe neden olmadan DNA hipermetilasyonu ve histonların hipoasetilasyonu gibi epigenetik olaylar, DNA'nın ve kromozomun üç boyutlu yapısını değiştirerek gen ekspresyonunda, kalıtılabilir değişiklikleri neden olan mekanizmadır (16). Hücrelerin fonksiyonel aktivitesinde gerekli olan proteinlerin üretimindeki genel bilgi genetik şifre ile sağlanırken epigenetik bu bilginin nerede, ne zaman ve nasıl kullanılacağını belirler.

En iyi bilinen epigenetik markır DNA metilasyonudur. DNA metilasyonunun gen aktivitesinin kontrolünde ve nükleusun yapısında önemli bir rolü vardır. Metilasyon, guanin nükleotidlerinin önündeki sitozinlerde meydana gelir ve bu yapı CpG ikili nükleotid olarak adlandırılır (17, 18). CpG ikili nükleotidlerinden zengin bölgeler (CpG adaları) genom boyunca bir çok genin önünde genin düzenlenmesinde önemli bölgelerde yer alır. Bu adaların belirli gruplarının metilasyonuna normal dokuda rastlansa da genellikle normal hücrelerde metile değildir (17, 18).

Kısaca CpG adalarının metilasyonu; gen delesyonu ya da inaktive edici mutasyonlara eşit fonksiyon görererek genin susturulmasına neden olur (19) (şekil 4).



Şekil 4: DNA metilasyonu

Hücre yaşamını, proliferasyon ve diferansiasyonunu sıkı kontrol altında tutan bir çok genin önünde CpG adası vardır. Çeşitli deneysel çalışmalar kanser hücrelerindeki anahtar genlerin transkripsiyonunda CpG adacıklarının metilasyonunun önemli rol oynadığını, metal transferaz uygulamaları ile geri döndürülebildiğini ve tedavide yeni hedef mekanizma olabileceğini gösterdi (20).

Metilasyon ile genin aktivasyonunun değiştirilmesi, Knudson'un "çift vuruş" hipotezine alternatif bir yol sunar (19). Kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, tümör supresör genleri CpG adalarının metilasyonunun heterozigote kaybıyla bağlantılı olduğu, hipermetilasyonun karsinogeneze katkısı desteklendi (21). Bir çok kanser tipinde bir çok genin metilasyonu gösterildi (22).

Hücrenin kontrolsüz çoğalabilmesi hücre siklusunun G1 fazından ilerlemesini gerektirir. Bu aşamada etkinliği olan p16/retinoblastoma (RB) yolağı moleküller genetik ve epigenetik değişimin hedefidir. İnsan kanserlerinde P16 en fazla inaktive olan tümör supresör genlerden biridir (23). Siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür, siklin bağımlı kinaz 4 ve 6'ya bağlanıp inhibe

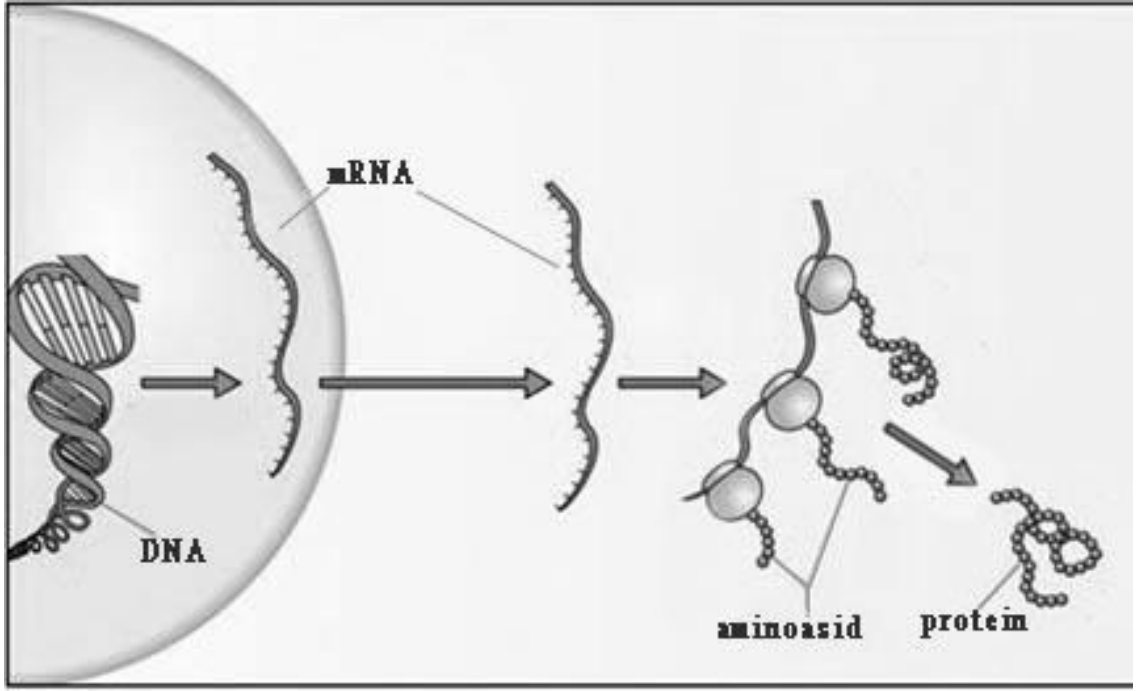
ederek hücre siklusunun negatif yönde düzenler (22). P16 inhibisyonunun meme epitel hücre büyümesinin geçici olarak durakladığı fazdan kurtulmasına neden olabileceği gösterildi (24).

CDH1 deneysel tümör modellerinde tümör hücre invazyonunu ve metastazı baskılar. Azalmış CDH1 ekspresyonu kötü diferansiye ileri evre kanserlerle birlikte. Meme kanser hücre hatlarında ve primer meme kanser dokularında bu genin CpG adasının yoğun olarak metile olduğu, normal dokunun ise metile olmadığı gösterildi (25).

Karsinogenezde, potansiyel olarak etkilenen yollarda bulunan genlerin metilasyon durumlarının meme kanserinde araştırılması, tümörün klinik davranışı ile gen veya genlerin birlikte değerlendirilmesi önemlidir. Kanser başlangıç ve progresyonunu gösterecek epigenetik değişikliklerin tespiti, bu değişikliklerin mekanizmalarının belirlenmesine ve bu bilginin de hastalığın erken tanısına yardımcı olacağı ve hastalığı önleyici çalışmalara katkıda bulunacağı umut edilmektedir.

Gen Ekspresyonu

Gen ekspresyonu DNA'daki bilginin proteine dönüşüm sürecinin ilk basamağını yansıtır. Her bir aşamanın sıkı şekilde denetlenmesi ve düzenlenmesiyle birlikte genel olarak DNA'daki bilgi mRNA'ya aktarılır, mRNA'daki bilgi içeriğine göre ve mRNA miktarıyla ilişkili olarak ilgili protein sentezlenir (şekil 5). Moleküler yöntemlerden kantitatif reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) hücre içindeki mRNA'nın miktarının ölçülmesine (= gen ekspresyonu) ve o genin aktivasyonu hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar, gen ekspresyon profilleri ile kanser dokusunun davranış biçiminin anlaşılabilmesi kabul edilir.

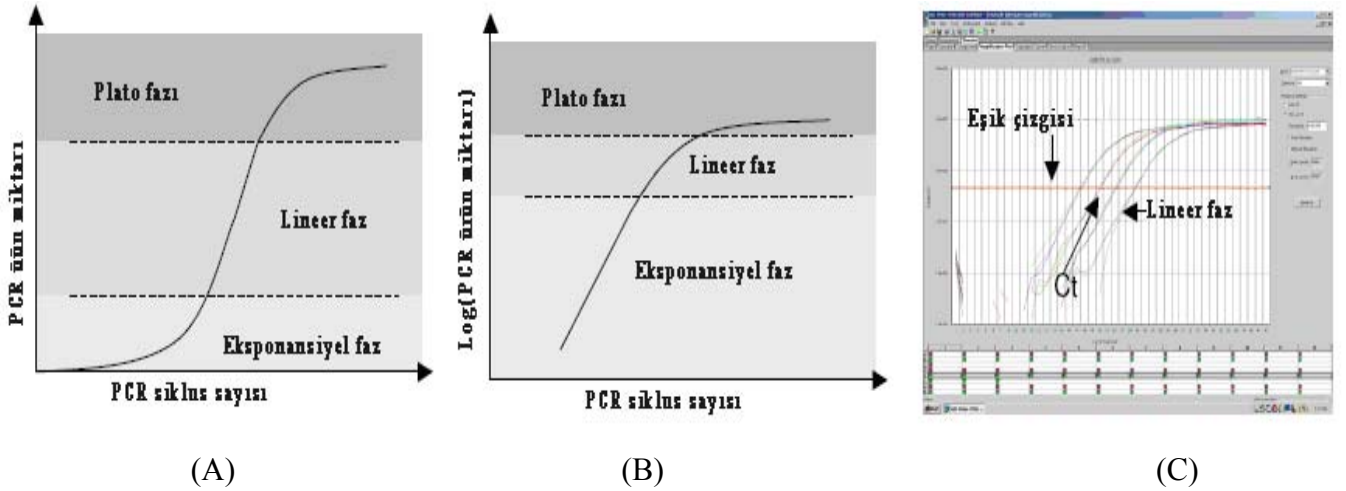


Şekil 5: DNA'dan proteine bilgi aktarımı

Kantitatif Gen Ekspresyonu

qRT-PCR gen ekspresyon analizinde güvenilir ve duyarlı bir yöntemdir. Mikroarray doğrulaması, patojen kantitasyonu, transgenik kopya sayısının belirlenmesi, ilaç tedavi uygulamaları ve kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılır (26-30).

PCR üç fazdan oluşur. Ekspansiyonel faz, lineer faz ve plato fazı. (Şekil 6)



Şekil 6: qRT-PCR reaksiyonu (A) PCR ürün miktarına karşı PCR döngü sayısının teorik grafiği: Ekspansiyonel faz, lineer faz ve plato fazı. (B) PCR ürün miktarının logaritmasına karşı PCR döngü sayısının teorik grafiği. (C) Seri dilüsyon deneyinin çıktısı (30).

Ekspansiyonel faz: PCR'in en erken segmentidir. Reaktifler henüz bol olduğundan ürün ekspansiyonel olarak artar. Lineer fazda ürün lineer olarak artar, reaktifler tükenmeye başlar.

Plato fazında ürün miktarı değişmez ve reaktifler tükenir. Real-time PCR eksponansiyel fazda PCR ürünün miktarı ideal koşullar altında başlangıçtaki kalıp miktarına orantılıdır (30, 31). Eksponansiyel faz sırasında PCR ürünü verimlilik tam ise (%100) her döngüde iki katına çıkar. PCR dinamikleri tipik olarak DNA bağlayan boyalar, hidroliz, hibridizasyon problemleri ile gözlenir (28). Real time PCR'ın temeli, amplikonların sayısı ile boya arasındaki direkt pozitif ilişkidir. Şekil 6B'de gösterildiği gibi lineer fazda orijinal kalıp miktarı ile korele olan floresans sinyalinin logaritmasında ürün verir. Eşik düzeyi daha sonraki analizler için ayarlanır. Logaritma temelli floresansın eşik düzeyinde döngü sayısı Ct olarak tanımlanır.

qRT-PCR PCR verileri mutlak veya nispi olarak kantite edilebilir. Mutlak kantitasyon tam olarak transkript kopya sayısına gereksinim olduğunda yapılırken nispi kantitasyon çoğu fizyolojik ve patolojik çalışma için yeterlidir. Nispi kantitasyon referans gene karşı hedef genin ekspresyonu ve aynı genin referans olarak alınan örneğe karşı araştırma yapılan örnek arasında karşılaştırmaya dayanır (32). Çoğu qRT-PCR deneyleri için nispi kantitasyon yeterli olduğundan çeşitli veri analiz yöntemleri geliştirilmiştir. İki matematik modeli çok yaygın olarak kullanılır: verimliliğin kalibre edildiği model (32) ve $\Delta\Delta Ct$ model (33). Her iki modelin deney sistemleri benzerdir. Deney, kontrol örneği ve referans geni içerir. Her örnekte hedef gen ve internal kontrol olarak referans gen seri olarak dilüe edilen örneklerde PCR amplifikasyon gerçekleştirilir. Tipik olarak her dilüsyon için çeşitli tekrarlar içerir. PCR amplifikasyon verimliliği ya yüzde olarak (0'dan 1'e) ya da her döngüde artan PCR ürününün zamanı olarak (1'den 2'ye) tanımlanabilir. Verimliliğin kalibre edildiği model, daha genelleştirilmiş $\Delta\Delta Ct$ modelidir. Ct sayısı cDNA sayısının girişinin yapıldığı grafiklerdir ve bu grafiğin eğimi, amplifikasyon verimliliğini (E) verir. Her bir gen (hedef ya da referans gen) için ΔCt , kontrol örneğinin Ct'sinden araştırılan örneğin Ct'si çıkarılarak hesaplanır. Eşitlik 1'de gösterildiği gibi; kontrole karşı tedavideki hedef genin ekspresyonunun oranı referans ΔCt 'nin (ΔCt referans) gücüne referans gen verimliliği (E referans) ve hedef ΔCt 'nin (ΔCt hedef) gücüne hedef gen verimliliği (E hedef) arasındaki orandan türetilir.

$$\text{Eşitlik 1} \quad \text{Oran} = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{hedef})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{referans})}}$$

$$\Delta Ct(\text{hedef}) = Ct(\text{kontrol}) - Ct(\text{örnek}), \Delta Ct(\text{referans}) = Ct(\text{kontrol}) - Ct(\text{örnek})$$

Eğer hem hedef hem de referans gen en yüksek PCR amplifikasyon verimliliklerine ulaşıyorsa $\Delta\Delta Ct$ model verimliliğin kalibre edildiği model'den türetilir. Hem hedef verimliliği (E

hedef) hem de kontrol verimliliği (E kontrol) 2'ye eşit (her döngü sırasında amplikonun 2 katına çıktığını gösterir) olma durumunda aynı oran $2^{-\Delta\Delta Ct}$ den türetilir (32, 33).

Eşitlik 2 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{referans}) - \Delta Ct (\text{hedef})$

Normalizasyon

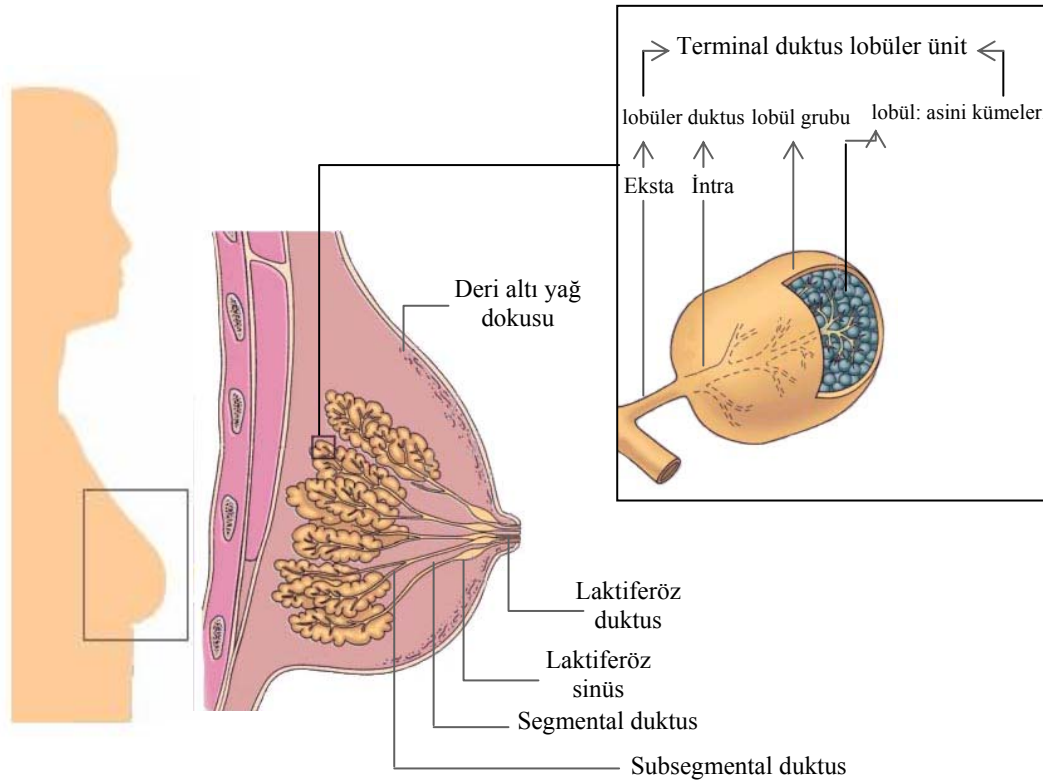
Farklara dayanan gen ekspresyonu çalışmalarının en büyük zorluğu doku örneklerinin heterojenitesinin nasıl normalize edileceğidir (34). Bu aşama deneysel sürecin sonuçlarını tamamen değiştirebilen, yanlış yorumlara yol açabilen en önemli basamaktır. Günümüzde genellikle kabul edilen; gen ekspresyon düzeylerinin hücresel giriş çıkışı, RNA kalitesi ve RT verimliliğindeki farklılıkların koşullarla değişmeden eksprese olan referans (= *housekeeping*) genlerine normalize etmektir. Bununla birlikte bu güne kadar altın standart olabilecek herhangi bir referans gen belirlenememiştir. Daha iyi bir yöntem bulunamadığından birbirinden bağımsız hücresel fonksiyonu olan çeşitli referans genlerin analiz aşamasına geçmeden stabilitesinin kontrol edilmesi ve birden fazla genin ortalama ekspresyonunun en uygun normalizasyonu yansıttığı kabul edilmeye başlamıştır. Bu amaçla internet üzerinden serbest olarak ulaşılabilen bilgisayar programları geliştirilmiştir (*geNorm* (35), *NormFinder* (36) gibi).

Meme

Anatomi

Erişkin bir kadında meme bezi, ön göğüs duvarının pektoral fasyanın yüzeysel ve derin tabakaları arasında bulunur, sternumun kenarından ön ve yan orta aksiler çizgiye kadar uzanır (37).

Gelişmiş meme; asinüs, duktus, ve stromal elamanlardan oluşur. Asinüsler memenin salgı yapan birimidir. İçleri küboid veya silindirik epitel ile döşelidir. Dışı ise bağ dokusu, kan ve lenf damarları ile sarıdır. Asinüsler bir araya gelerek lobülleri, lobüller de lobları oluşturur. Epitelyal parankim her biri ayrı bir salgı kanalı ile meme başına açılan 15-20 lobdan meydana gelir (37-41). Her lobda 20-40 kadar lobül içerir. Her duktus bir meme lobunu ve 20-40 kadar lobülü drene eder (şekil 7). Her bir lobülde toplayıcı duktus çevresinde gruplaşmış sayıları 10 ile 100 arasında değişen asinüsler bulunur. Lobüller meme bezinin esas yapısal birimini oluşturur. Genç kadınlarda sayıları fazla ve büyük görünümündedirler. Menapozdan sonra ise lobüllerin sayısı azalır ve her biri yalnızca birkaç asini içeren küçük üniteler şekline dönüşür.



Şekil 7: Meme anatomisi

Biyoloji

Meme bezinin kendine has bir çok gelişimsel özelliği vardır: embriyonal, ergenlik, gebelik, laktasyon, laktasyon sonrası ve menapoz evreleri boyunca değişime uğrar. Yetişkinlerde meme epitel hücrelerinin büyüme, diferansiyasyon ve regresyonu dönemler halinde tekrarlanır. Hamilelik, laktasyon ve involüsyonun her siklusu hücresele proliferasyon, fonksiyonel diferansiyasyon ve hücre ölümüyle birlikte dir. Bu gelişimsel basamaklar stromal epitel hücre etkileşimleri ile, lokal olarak rol oynayan steroid ve peptit hormonlar ile ve sistemik olarak düzenlenir (42). Hücrenin özelleşmesi, proliferasyon, diferansiyasyon, yaşam ve ölüm özelliklerini içeren hücre tanımlanmasını düzenleyen genetik faktörler halen araştırılmakta, meme bezinin temel biyolojisi ve gelişimi hakkındaki deneysel çalışmalar devam etmektedir. Gerçekleştirilen son genetik araştırma doku-özel nakavt fareler ile ya da genetik olarak modifiye edilmiş primer hücrelerin endojen epitelinin temizlendiği yağ yastıkçıklarına implantasyonu ile gerçekleştirildi. Bu deneysel çalışmalar yetişkin meme kök hücresinin izolasyonu ve genetik manüplasyonu ile tamamlandı (43).

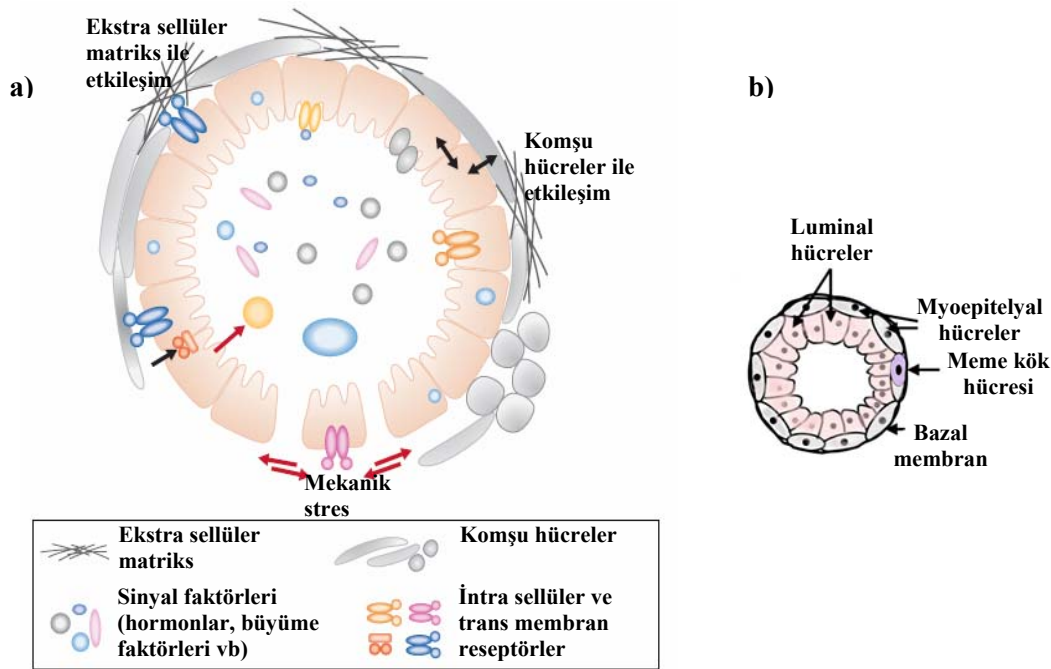
Meme epitel hücre organizasyonu

Meme bezi, meme yağ yastığı ve stromal konnektif dokunun içine gömülü olarak bulunan süt üreten alveolar epitel hücreleri ve duktal hücreleri içerir. Meme epitel hücreleri polarize morfolojiye, özelleşmiş hücre hücre etkileşimine ve bazal membrana spesifik bağlantılara bağımlı olarak üç boyutlu yapı içinde organize olur. Komşu hücreler gelen mekanik güç ve sinyaller de hücresele organizasyonu etkiler (şekil 8). Bu özellikler hücre proliferasyonu, sağ kalım, diferansiyasyon, migrasyon ve süt sekresyonunun uygun kontrolü için gereklidir (44-46). Transformasyona uğrayan meme epitel hücresi organizasyon yeteneğini kaybeder.

Meme Kanseri Gelişimi

Meme kanserinin temel biyolojisi üzerindeki çalışmalar, meme kanseri yatkınlığında, başlangıcında ve gelişiminde rolü bulunan genlerin ve hücrelerin tanımlamasında önemli gelişmelere yol açtı. Meme tümörleri, farklı hücre gruplarından meydana gelen heterojen yapıya sahiptir. Bu heterojen yapıyı açıklamak üzere iki hipotez vardır: 1- Meme bezinde var olan hücrelerin her biri genetik değişikliklerin birikimi ile tümörojenik olma kapasitesine sahiptir. 2- Yalnızca meme bezinde ender bulunan özel hücrelerden tümör gelişebilir (47). Meme kanserinin bu hipotezler doğrultusunda mı yoksa her ikisinin birlikteliğinden mi meydana geldiği halen araştırılmaktadır.

Yetişkin dokulardaki kök hücreler, belirli bir doku ya da organın normal fonksiyonu için gerekli olan hücre yapısına diferansiye olabilen, kendi kendini yenilemek için bölünme yeteneğindeki hücrelerdir. Son yıllarda kanser kök hücre hipotezi ile tümörlerin, kendi kendilerini yenileme süreçleri bozulan normal kök hücre ya da progenitör hücrede ortaya çıktığı kök hücre özellikleri kalan hücresel komponent ile yönetildiği ileri sürüldü (48). Hematopoetik sistem ve malignensileri üzerindeki çalışmalar kök hücre ve farklı özellikleri olan progenitör hücre gruplarının onkogenезin hedefi olduğu gösterildi (49).

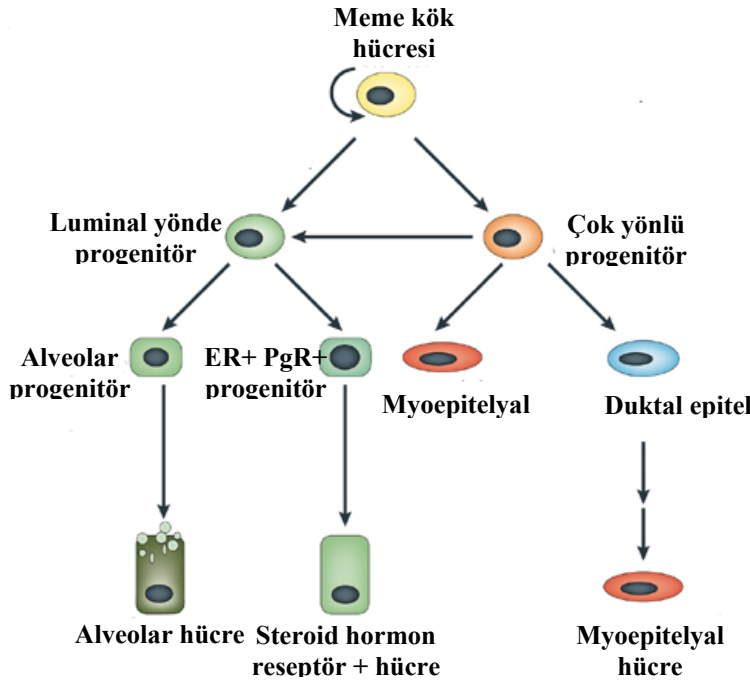


Şekil 8: Meme epitel hücre yapısı (43): a) Hücre yapının organize eden faktörleri, b) Meme asinüs yapısı

Meme bezi epitel kök hücresi de önemli derecede hem diferansiasyon, hem de kendi kendini yeniden üretme yeteneğine sahip olan meme bezi epitel kök hücrelerinden deneysel koşullarda fonksiyonel meme bezi oluşturuldu (50). Puberte, hamilelik, laktasyon ve involüsyon sırasında değişim gösteren meme bezinin normal büyüme ve diferansiasyonu için gerekli olduğu önerildi (51)(şekil 9).

Meme kanser kök hücre yaklaşımı henüz yeni olmasına rağmen araştırmacılar farelerde oluşan insan meme tümör kitlesinde meme kanser başlatıcı hücrelerini tanımladı (52). Bu transforme kök hücreler heterojen meme tümörlerini geliştirme yeteneğindedir ve bilinen tümör hücre

popülasyonunu göstermesinin mümkün olduğu önerildi. Bu bulgular tedavi alanlarında önemlidir. Bu hipotez için daha fazla doğrulamaya gereksinim vardır.



Şekil 9: Meme kök hücresi ve olası progenitör hücreler (51)

Meme Kanser Epidemiyolojisi

Amerika Kanser Topluluğu'nun (ACS) 2007 yılı için yaptığı tahminlere göre; gelişmiş ülkelerde 5.4 milyon, gelişmekte olan ülkelerde 6.7 milyon olmak üzere dünyada 12 milyondan fazla kişinin yeni kanser tanısı alması, gelişmiş ülkelerde 2.9 milyon, gelişmekte olan ülkelere ise 4.7 milyon olmak üzere toplam 7.6 milyon (günde yaklaşık 200 000) kişinin ise kanser nedeni öleceği beklenmektedir. Nüfusun artması ve yaşlanması nedeniyle 2050 yılında 27 milyon yeni kanser vakası 17.5 milyon kanser nedeni ölüm tahmin edilmektedir (Tablo1)) (53). Bu verilere göre meme kanseri hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelere kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. (şekil 10) (53). Uluslararası insidans oranı 25 kattan daha fazla değişir. Kuzey Amerika, Avustralya, Kuzey ve batı Avrupa'da insidans en yüksek, Doğu Avrupa'da orta derecede yüksekken Afrika ve Asya'nın büyük ölümünde insidans oranları düşüktür (şekil 10).

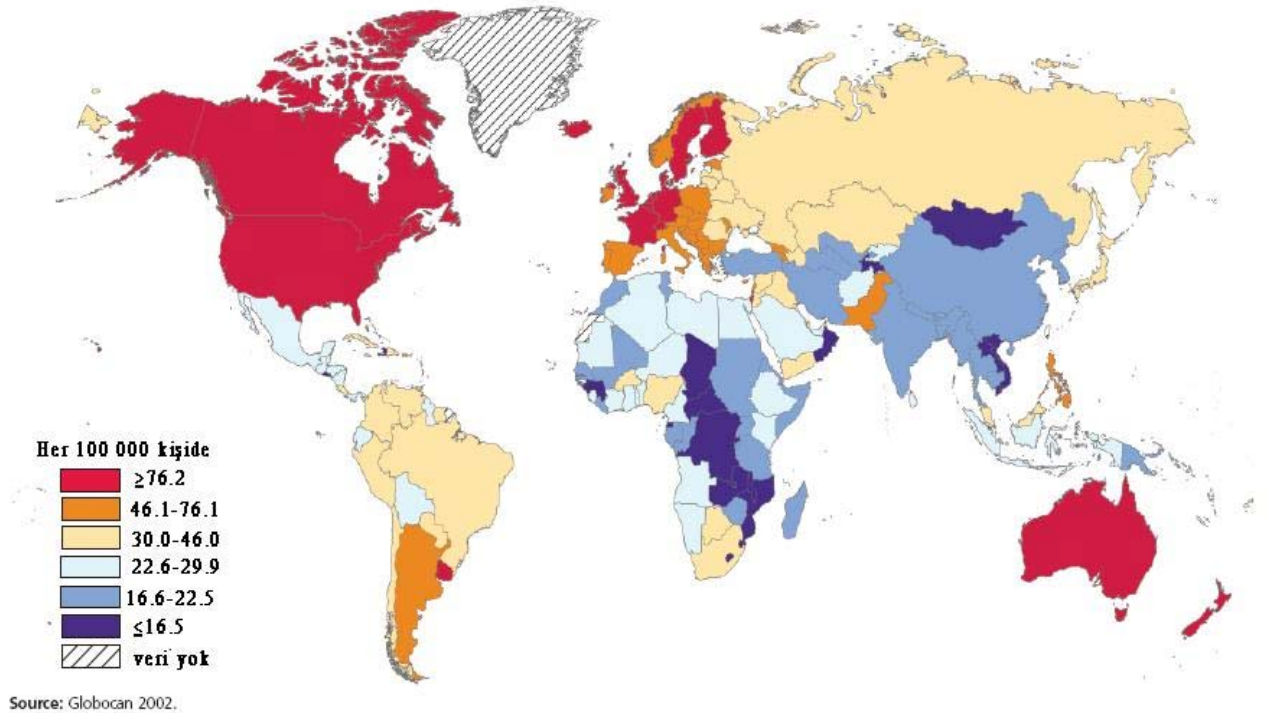
Tablo1: Dünyada, gelişmiş ülkelerde ve gelişmekte olan ülkelerde yeni tanı alan kanser vakaları, ve ölüm oranları, 2007 (53).

Cinsiyet	Dünya		Gelişmiş ülkeler		Gelişmekte olan ülkeler	
	Yeni vaka	Ölüm	Yeni vaka	Ölüm	Yeni vaka	Ölüm
Erkek	Akciğer 1 108 731	Akciğer 974 624	Prostat 566 841	Akciğer 465 540	Akciğer 564 306	Akciğer 496 287
	Prostat 782 647	Mide 511 549	Akciğer 529 176	Kolon/rektum 175 774	Mide 474 580	Karaciğer 399 317
	Mide 691 432	Karaciğer 474 215	Kolon/rektum 387 637	Prostat 143 834	Karaciğer 424 490	Mide 370 158
	Kolon/rektum 630 358	Özofagus 300 034	Mide 214 534	Mide 141 218	Özofagus 300 763	Özofagus 246 667
	Karaciğer 502 571	Prostat 253 906	Mesane 191 812	Karaciğer 78 174	Kolon/rektum 228 108	Kolon/rektum 137 500
	Özofagus 361 931	Lösemi 138 333	Böbrek 94 284	Pankreas 78 009	Prostat 194 914	Prostat 106 537
	Mesane 314 256	Pankreas 137 206	Non-Hodgin 89 816	Mesane 57 438	Oral kavite 129 356	Lösemi 87 305
	Oral kavite 200 774	Mesane 124 266	Karaciğer 81 448	Özofagus 55 186	Mesane 115 817	Oral kavite 68 124
	Non-Hodgin 196 298	Non-Hodgin 111 126	Pankreas 77 394	Lösemi 49 891	Lösemi 111 163	Non-Hodgin 67 280
			Lösemi 74 955	Böbrek 44 019	Non-Hodgin 103 433	Mesane 65 702
Kadın	Meme 1 301 867	Meme 464 854	Meme 679 682	Meme 203 528	Meme 529 233	Serviks 272 238
	Serviks 555 094	Akciğer 376 410	Kolon/rektum 335 756	Akciğer 173 842	Serviks 473 430	Meme 255 576
	Kolon/rektum 536 662	Serviks 309 808	Akciğer 209 707	Kolon/rektum 165 480	Mide 250 650	Mide 199 391
	Akciğer 440 390	Mide 288 681	Korpus uteri 146 866	Mide 89 620	Akciğer 224 580	Akciğer 198 066
	Mide 375 111	Kolon/rektum 284 169	Mide 123 773	Pankreas 72 681	Kolon/rektum 186 532	Karaciğer 166 685
	Over 230 555	Karaciğer 205 656	Over 103 332	Over 66 925	Karaciğer 171 794	Özofagus 129 080
	Corpus uteri 226 787	Özofagus 142 228	Serviks 87 466	Serviks 42 101	Özofagus 153 396	Kolon/rektum 112 471
	Karaciğer 208 557	Over 141 452	Non-Hodgin 72 368	Karaciğer 40 943	Over 123 761	Over 72 433
	Özofagus 167 352	Pankreas 122 185	Deri melanom 69 624	Lösemi 40 783	Oral kavite 84 111	Lösemi 65 629
	Lösemi 142 569	Lösemi 107 538	Pankreas 69 418	Non-Hodgin 36 940	Lösemi 82 840	Pankreas 46 750

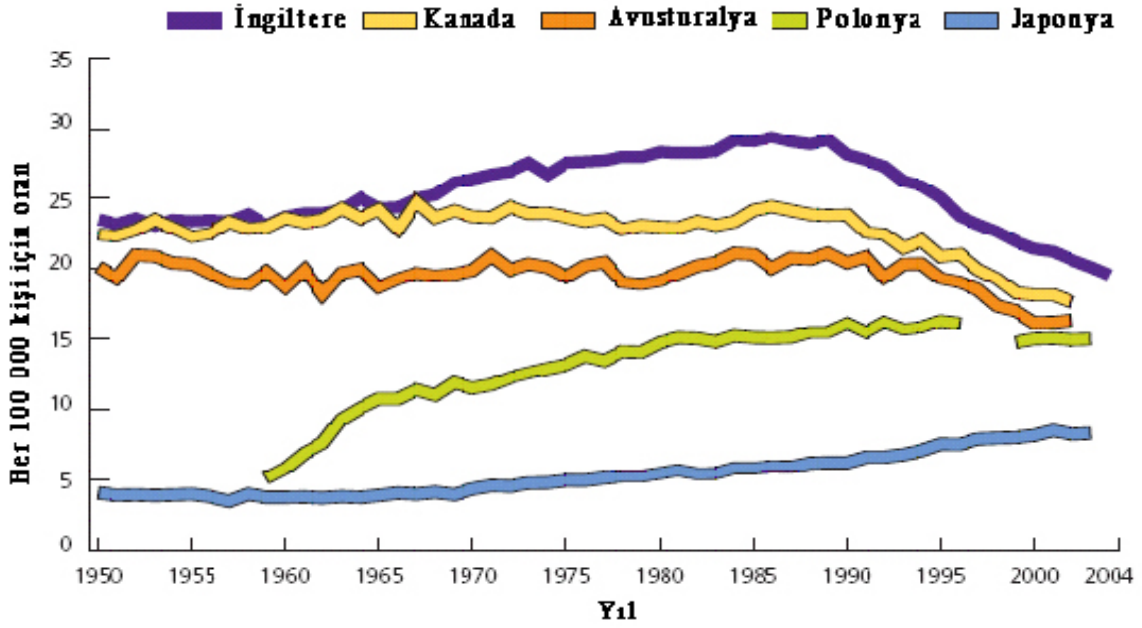
Meme kanseri gelişmiş ülkelerde en sık, gelişmekte olan ülkelerde ise ikinci sıklıkla kanserden ölüm nedenidir. 2007’de meme kanserinden 465 000 ölüm olacağı tahmin edilmektedir. Kadınlar arasında önde gelen kanser ölüm nedenidir.

Batılaşmış toplumlarda en azından son 25 yıldır meme kanser insidansı yaklaşık %30 artış gösterirken, ABD’de mamografi kullanımı ve hormon replasman tedavisine bağlanan nedenlerle 2001-2004 yılları arasında meme kanser insidansının insidansı azaldığı görüldü (54). Nedeni tam olarak anlaşılammakla birlikte üreme, beslenme özelliklerinin değişmesi ve fiziksel aktivitenin azalmasına bağlanan nedenlerle Asya ve Afrika’da gelişen ülkelerde insidans oranı arttı (54).

Meme kanser insidansının artmasına rağmen son 25 yıldır bazı ülkelerde (şekil 11) mortalite oranı sabit kaldı ya da azaldı (53). Gelişmiş ülkelerde mortalite oranının azalmasına mammografi ile erken tanının konması ve geliştirilen tedavilere bağlanabilir (55) Türkiye’de 1990 yılından itibaren kanser en sık görülen 2. ölüm nedenidir. Türkiye’de ve İzmir’de kadınlarda en sık görülen kanser meme kanseridir (56, 57).



Şekil 10: Dünyada meme kanser insidans oranları



Şekil 11: Ülkeler arasında meme kanser ölüm oranları. Kaynak WHO mortalite veri tabanı Kırık çizgiler kaydına ulaşamayan verileri göstermektedir.

Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri oluşumundan sorumlu bir çok risk faktörü tanımlandı. Bilinen meme kanser risk faktörlerinin çoğu (yaş, aile hikayesi, ilk hamilelik yaşı, erken menarj, geç menapoz meme yoğunluğu vb) değiştirilebilir faktörler değildir. Bununla birlikte post menapozal obezite, post menapozal hormonların kullanımı, alkol alımı, fiziksel inaktivite gibi faktörler değiştirilebilir. Bazı risk faktörleri (erken menarj, geç menapoz, obezite, hormon kullanımı) meme dokusunun dolaşımdaki over hormonlarının etkisini direk olarak artırır. Yüksek sosyoekonomik durum gibi risk faktörleri ise üreme davranışı ile ilişkilidir. Bu risk faktörleri ve birlikteliklerinin etki gücüyle tablo 2’de özetlendi (58).

Yaş: Yaş meme kanserinde en önemli risk faktörüdür. Meme kanser insidansı ve ölüm oranları genellikle yaş ile birlikte artar. 2000-2004 yılları arasında yeni vakaların %95’i ve meme kanser ölümlerinin %97’si 40 yaş ve daha üzeridir. 2000-2004 yılları arasında 20-24 yaşındaki kadınlar arasında en düşük meme kanser insidansı (her 100 000 kadında 1.4 vaka) görülürken 75-79 yaş arası (her 100 000 kadında 464.8 vaka) kadınlar en yüksek insidansa sahiptir (59). 2000-2004 yılları arasında meme kanser tanısı alan kişilerin ortalama yaşı 61’dir (59).

Tablo 2: Kadınlarda göğüs kanseri risk faktörleri. Nispi risk, faktörlerinin birliktelik halindeki risklerini göstermektedir.

Nispi Risk	Faktör
> 4.0	Cinsiyet
	Yaş
	Meme kanseri için kalıtılan genetik mutasyonlar (BRCA1, BRCA2 gibi)
	Erken yaşlarda birinci dereceden ≤ 2 akrabasında meme kanseri tanısı
	Kişinin meme kanseri hikayesi
	Yoğun meme dokusu
	Biyopsi ile doğrulanan atipik hiperplazi
2.1 - 4	Meme kanseri tanısı alan akraba
	Göğüs duvarına yüksek doz radyasyon
	Yüksek kemik dansitesi (post menopozal)
1.1 – 2.0	İlk tamamlanan gebeliğin ileri yaşlarda olması (> 30yaş)
	Erken menarj (<12 yaş)
	Geç menopoz (>55 yaş)
	Hamileliklerin tamamlanmaması
	Emzirmeme
	Son zamanlarda oral kontraseptif kullanımı
	Hormon replasman tedavisinin son zamanlarda ve uzun kullanımı
	Obezite (postmenopozal)
	Kişinin endometrium, kolon, over kanseri hikayesi
	Uzun boy
	Yüksek sosyoekonomik seviye
	Yahudi ırkı

Aile hikayesi/genetik yatkınlık: özellikle birinci dereceden akrabasında (anne, kız kardeş gibi) meme kanseri hikayesi olan kişiler meme kanseri için daha fazla risk taşırlar (60). Risk birden fazla birinci dereceden akrabasında meme kanseri varsa ve erken yaşlarda tanı konmuşsa risk daha yüksektir. Meme kanserlerinin %5-10'u BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki kalıtılan mutasyonlar ve değişikliklerden oluştuğu tahmin edilmektedir (61). Bu mutasyonlar genel toplumun %1'inden daha azında bulunur (62). Toplum bazlı çalışmalarda BRCA1 mutasyonu taşıyan 70 yaşındaki kadınlarda meme kanseri görülme riski %65'tir (63). Kalıtsal meme

kanserinden sorumlu bazı BRCA mutasyonlarını tanımlayan moleküler klinik testlere ticari olarak ulaşılabilir, ancak henüz bu testlerin yorumu ve tedavi kararı karmaşıktır ve zordur (64). Bu mutasyonları taşıyan kişilerde meme kanseri gelişip gelişmeyeceğini tamin etmek mümkün değildir. Ayrıca meme kanser riskini etkileyen genlerin tümüne ticari olarak henüz ulaşılmamaktadır. Meme kanser aile hikayesinin hastalık riskinde kalıtsal etkilerinin olduğu önerilmekle birlikte ailesel risk yalnızca BRCA1 ve BRCA2 genleri ile ilişkili değildir. Yaşam tarzı ve bu genetik yatkınlık arasındaki etkileşim ile meydana geldiğine inanılmaktadır (65).

Hormonal faktörler: Üreme hormonlarının kanserin büyümesini başlattığı kadar hücre proliferasyonu ve DNA hasarındaki etkileri nedeniyle meme kanserini etkilediği düşünülmektedir. Erken menarj, (<12 yaş), geç menapoz (>55 yaş), ilk doğum yaşının ileri yaşlarda olması (>30 yaş) ve hamileliğin az sayıda olması kadınlarda meme kanser riskini sentezlenen üreme hormonlarını etkileyerek arttırabilir (66). Emzirmenin meme kanser riskini azalttığı gösterilmiştir (67, 68). Son zamanlarda oral kontraseptif kullanımı hafifçe yükseltebilir fakat en az 10 yıl oral kontraseptif kullanmayan kadınlar hiç oral kontraseptif kullanmamışlarla aynı riske sahiptir (69). Kombine hormon replasman tedavisinin son zamanlarda uzun süre kullanımının meme kanser riskini arttırdığı gösterilmiştir (70-72). Östrojenin tek başına meme kanser riskini arttırdığı görülmemiştir (73-75).

Klinik faktörler: Yoğun meme dokusunun (glandüler dokunun yağ dokusuna rölatif oranı) meme kanser gelişiminde güçlü bağımsız risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda meme kanser riskini 4-6 kat arttırdığı bulunmuştur (76-79). Atipinin olmadığı proliferatif lezyonların meme kanseri riskini 1.5-2 kat arttırdığı atipisi olan proliferatif lezyonların ise 4-5 kat arttırdığı açıklanmıştır.

Obezite: Obezite postmenapozal meme kanser riskini arttırır. 18 yaşından sonra 20 kilo ve daha fazlasını alan kişilerde almayanlara göre meme kanseri riski 1.5 kat daha fazladır. Menapozdan sonra en azından 8 kilo kaybeden ve ağırlık kaybını devam ettirenler %57 oranında düşük meme kanser riskine sahipken menapozdan sonra 8-10 kilo alan kişilerde %18 meme kanser riski daha fazladır (80). Böylece daha fazla yağ dokusuna sahip olma östrojen seviyesini ve meme kanser gelişme riskinin olasılığını arttırdığı düşünülmektedir.

Fiziksel aktivite: Gittikçe artan veriler fiziksel aktivitenin meme kanser riskinde koruyucu etkisi olduğunu desteklemektedir (81-84). Bir çok çalışma haftada 5 ya da daha fazla gün 45-60 dakika ya da düzenli biçimde etkin olarak yapılan egzersizler post menapozal meme kanser riskinin azalacağını savunmaktadır (83, 85). Genelde fiziksel aktivitenin koruyucu etkisi premenapozal, çocuk sahibi ve zayıf kadınlarda daha fazla olabilir. Bu koruyucu etkinin altında

yatan mekanizma çok iyi anlaşılacak şekilde birlikte fiziksel aktivitenin hormon ve enerji dengesi üzerindeki düzenleyici etkisi nedeniyle önerilmiştir (86, 87).

Alkol kullanımı: Alkol kullanımı sabit olarak artmış meme kanser riski ile birlikte (88-91). 40 epidemiyolojik çalışmadan daha fazla çalışmanın meta analizi günde 24g alkol (2 double) tüketimi %21 artmış meme kanseri riski ile birlikte olabileceğini önermektedir. Bu artmış risk doz bağımlıdır ve süreklilikle ilişkilidir. Alkol tüketiminin artmış östrojen ve androjen düzeyleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (92).

Sigara: Çoğu çalışma aktif sigara içiciliği ve meme kanseri arasında direk ilişki bulamamıştır (89, 93).

Hormon replasman tedavisi (HRT): Kombine hormon replasman tedavisinin artmış meme kanseri ile birlikteliği bir çok çalışma tarafından gösterilmiştir (94, 95). HRT meme dokusu yoğunluğunu arttırıp mamografi etkinliğini azaltması ile daha geç evrelerde tanı konan meme kanser riskini arttırabilir (96).

Meme Kanseri Evrelemesi

Tümör evreleme sistemleri kanserin yayılımı ve ciddiyeti hakkında belli standartlara göre

bilgi edinilmesini sağlar. TNM Evreleme Sistemi'nde tümörleri sınırlamak için kullanılan kriterler;

tümör boyutu (T), aksiller lenf nodlarına yayılım (N) ve uzak bölgelere yayılımdır (M). Daha önceden tanımlanmış kriterlere göre bu üç özellik belirlenip kombine edilerek, TNM evresi hesaplanır.

Sistemin özetle 5 amacı vardır (97):

1. Hastaların prognozunu göstermesi,
2. Tedavi planlarında yol gösterici olması,
3. Uygulanan tedavi etkilerinin takibine yardımcı olması,
4. Tedavi merkezleri arasında bilgi paylaşımını kolaylaştıran ortak dilin geliştirilmesi,
5. Tümör araştırmalarına katkıda bulunması

Tüm kanser bölgelerine uyarlanabilecek evreleme sisteminin prensipleri ve kodları 1953 yılında cerrah Pierre Denoix tarafından geliştirildi, benimsendi ve 1968 yılında da yayınlandı (98, 99). American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından günümüze kadar 6 kez tanı ve tedavideki ilerlemelerin neden olduğu çeşitli düzenlemeler yapıldı (100-106). İki bin dokuz yılında ise 1 Ocak 2010 tarihinden sonra kanser tanısı alacak hastalarda kullanılmak üzere, kanıta dayalı verilerin eklendiği 7.basısı planlanmaktadır (107).

Meme Kanseri TNM Evrelemesi (2003) (AJCC)

Kılavuzda yer alan tanımlamalar

Klinik olarak belirgin: Lenfosintigrafi hariç görüntüleme yöntemleri, veya klinik muayene ile, veya patolojik olarak açıkça görülerek tümörün saptanması durumu,

Klinik olarak belirgin olmayan: Lenfosintigrafi hariç görüntüleme yöntemleri veya klinik muayene ile saptanamaması durumu,

İzole tümör hücreleri (ITH): Hemotoksilen eozin boyası ile doğrulanabilen ancak sıklıkla sadece immünohistokimyasal (IHK) veya moleküler yöntemlerle saptanan, 0.2 mm.den daha geniş olmayan tek tümör hücreleri veya küçük hücre kümeleri olarak tanımlanır. ITH, proliferasyon veya stromal reaksiyon gibi malign aktivite kanıtlarını genellikle göstermez.

Primer Tümör (T)

Patolojik ve klinik sınıflamalarda primer tümörün tanımlanması aynıdır. Tümör boyutu ölçümü eğer fizik muayene ile yapıldıysa, sınıflamada ana gruplar (T1, T2 veya T3), mamografik veya patolojik olarak yapıldıysa T1'in alt grupları kullanılabilir.

TX Saptanamayan primer

T0 Primer tümör yok

Tis Karsinoma in situ

Tis (DCIS) Duktal karsinoma in situ

Tis (LCIS) Lobuler karsinoma in situ

Tis (Paget) Meme başının kitlesiz Paget hastalığı

(Tümör olan Paget hastalığında sınıflama tümörün boyutuna göre yapılır.)

T1 Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha az

T1mic En büyük boyutu 0.1 cm veya daha az olan mikroinvazyon

T1a En büyük boyutu 0.1 cm.den büyük olan ancak 0.5 cm.yi geçmeyen tümör

T1b En büyük boyutu 0.5 cm.den büyük olan ancak 1 cm.yi geçmeyen tümör

T1c En büyük boyutu 1 cm.den büyük olan ancak 2 cm.yi geçmeyen tümör

T2 En büyük boyutu 2 cm.den büyük olan ancak 5 cm.yi geçmeyen tümör

T3 En büyük boyutu 5 cm.den büyük olan tümör

T4 Herhangi bir boyutta ancak (a) göğüs duvarına veya (b) cilde direkt yayılım

T4a Pektoral kasa ulaşmamış göğüs duvarı yayılımı

T4b Meme cildinde ödem (portakal kabuğu görüntüsü dahil) veya ülserasyon, veya aynı memede satellit deri nodülleri

T4c T4a ve T4b birlikte

T4d İnflamatuvar karsinom

Bölgesel Lenf Nodülleri (N)

Klinik Sınıflama

NX Saptanamayan bölgesel lenf nodları (örn. daha önce çıkartılmış)

N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1 ipsilateral lenf nod(lar)ında metastaz (fikse değil)

N2 Fikse veya gruplaşmış ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz veya klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı olmadığı durumlarda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal nodlarında metastaz

N2a Birbirlerine veya çevre dokulara fikse ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz

N2b Sadece klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı olmadığında klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal nodlarda metastaz olduğunda

N3 Aksiller lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın ipsilateral infraklavikular lenf nod(ları) metastazı veya klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nod(ları) metastazı ile birlikte klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı; veya aksiller ya da internal mammaryal lenf nodu metastazı olsun ya da olmasın ipsilateral supraklavikular lenf nod(ları) metastazı

N3a ipsilateral infraklavikular lenf nod(lar)ında metastaz

N3b ipsilateral internal mammaryal lenf nod(lar)ında veya aksiller lenf nod(ları)nda metastaz

N3c ipsilateral supraklaviküler lenf nod(ları)nda metastaz

Patolojik Sınıflama (pN)a

Sınıflama sentinel lenf nodu diseksiyonu uygulanan veya uygulanmayan aksiller lenf nodu diseksiyonuna göre yapılır. Ardından aksiller lenf nodu diseksiyonu uygulanmayan sentinel lenf nodu diseksiyonuna dayalı yapılan sınıflama, sentinel nod için (sn) ile belirtilir, örn ; pN0(i+)(sn).

pNX Saptanamayan bölgesel lenf nodları (örn. patolojik inceleme için daha önce çıkartılmış veya çıkartılmamış)

pN0 Histolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı olmayan, izole tümör hücreleri (ITH) için ek inceleme yok

pN0(i-) Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif IHK

pN0(i+) Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif IHK, 0.2 mm.den geniş IHK kümesi yok

pN0(mol -) Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif moleküler bulgular [reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)]

pN0(mol+) Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif moleküler bulgular (RT-PCR)

pN1 1-3 arası aksiller lenf nodlarında, ve/veya internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile saptanan mikroskopik hastalıkla birlikte metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil

pN1mic Mikrometastaz (0.2 mm.den geniş, 2.0 mm.den geniş değil)

pN1a 1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz

pN1b Sentinel lenf nodu diseksiyonu ile internal mammaryal nodlarda mikroskopik hastalık olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil

pN1c 1-3 adet aksiller lenf nodunda ve internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile mikroskopik olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil. (3 aksiller lenf nodundan fazla pozitif nod varsa, artmış tümör yükünü göstermek için internal mammaryal lenf

nodları pN3b olarak sınıflandırılır). (pN1a + pN1b)

pN2 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz, veya aksiller lenf nodu metastazı olmadığında internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz

pN2a 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm.den büyük en az bir tümör odağı)

pN2b Aksiller lenf nodu metastazı yokken, internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz

pN3 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda, veya infraklaviküler lenf nodlarında, veya 1 ya da daha fazla aksiller lenf nodu pozitif olduğunda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarında metastaz; veya internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak negatif

mikroskopik metastazla birlikte 3'ten daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz; veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

pN3a 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm.den büyük en az bir tümör

odağı), veya infraklaviküler lenf nodlarına metastaz

pN3b 1 veya daha fazla pozitif aksiller lenf nodu varlığında klinik olarak belirgin ipsilateral

internal mammaryal lenf nodu metastazı; veya sentinel lenf nodu diseksiyonuyla saptanan fakat klinik olarak belirgin olmayan mikroskopik hastalıkla birlikte 3 veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya internal mammaryal lenf nodlarında metastaz.

pN3c ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

Uzak Metastaz (M)

MX Uzak metastaz bulunamıyor

M0 Uzak metastaz yok

M1 Uzak metastaz var (Tümörün olduğu tarafta supraklaviküler lenf nodları ve karşı memenin bölgesel lenf nodlarına metastazlar dahil)

Histopatolojik Grade(G)

Meduller karsinom dışındaki tüm invaziv meme kanserleri derecelendirilmelidir. Buna invaziv lobuler ve müsinöz karsinomlar da dahildir.

Gx:Değerlendirilemiyor

G1: iyi diferansiye

G2: Orta derecede diferansiye

G3: Kötü Diferansiye

G4: indiferansiye

Rezidüel Tümör (R):

Hastada küratif amaçlı tedaviden sonra kalan tümör (örn. kür için cerrahi rezeksiyon) R sınıflaması

adı altında bir sistemle sınıflanır.

RX: Rezidü tümör varlığı gösterilememektedir

R0: Rezidü tümör yok

R1: Mikroskopik rezidü tümör

R2: Makroskopik rezidü tumor

Tablo 3: Meme tümör evreleri: Cerrahi sonrası görüntüleme yöntemleri uzak metastaz varlığını gösteriyorsa (inceleme tanıdan sonraki 4 ay içinde ve hastalık progresyonu yokken yapıldığında ve hasta henüz neoadjuvan tedavi almadıysa) evre değişebilir.*T1, T1mic'i de içerir.

EVRE	T	N	M
Evre 0	Tis	No	Mo
Evre I	T1*	No	Mo
Evre IIA	To	N1	Mo
	T1*	N1	Mo
	T2	No	Mo
Evre IIB	T2	N1	Mo
	T3	No	Mo
Evre IIIA	To	N2	Mo
	T1*	N2	Mo
	T2	N2	Mo
	T3	N1	Mo
	T3	N2	Mo
Evre IIIB	T4	N1-4	Mo
	T1*-4	N3	Mo
Evre IV	T1*-4	N1-4	M1 içeren tüm hastalar

Meme Kanserinin Histolojik Tipleri

Meme kanserinin en sık kullanılan histopatolojik sınıflandırma sistemi Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasıdır (tablo3) (108). Vakaların % 80'ini duktal % 10'nunu lobüler karsinom oluşturur. Diğer histolojik subtipler daha az oranda görülürler. İnvazif olmayalar ise ayrı grupta sınıflandırılır.

İnvaziv duktal karsinom (spesifik olmayan tip): İnvaziv meme karsinomlarının en sık görülen tipidir (%70-80) ve diğer alt tiplerden herhangi birine ait spesifik özellikleri taşımayan geniş bir grubu oluşturur.

Yaygın in situ komponent içeren invaziv duktal karsinom: İnvaziv karsinomlardaki in situ duktal karsinom komponenti oldukça değişkendir ve olguların çoğunda in situ ve invaziv komponentin grade'leri birbiri ile paralellik gösterir. Eğer tümör içinde veya çevresinde invaziv tümörün %25'inden fazlasını oluşturan in situ duktal karsinom var ise “yaygın in situ komponent içeren invaziv duktal karsinom” olarak isimlendirilir. Bu durum özellikle meme koruyucu cerrahi uygulanmış olgularda lokal nüksler açısından önem taşır.

İnvaziv lobüler karsinom: Tüm invaziv meme karsinomlarının %5-15'ini oluşturur ve hormon replasman tedavisi alan kadınlarda daha sık görülür. Diğer tip invaziv meme karsinomlarına göre daha yüksek oranda bilateral ve multifokal olurlar.

Tubuler karsinom: Meme karsinomlarının %2'sini oluşturmaktadır. Tubuler karsinomda prognoz çok iyidir ve multifokal olgular dışında aksiller metastaz genellikle %10'dan azdır.

İnvaziv kribriform karsinom: İnvaziv karsinomların ender görülen bir tipi olup tubüler karsinom gibi çok iyi prognoza sahiptir.

Müsinöz (kolloidal) karsinom: Az görülen bir tip olup meme karsinomlarının %1-6'sını oluşturur. Daha çok ileri yaşlarda görülür ve prognozu iyidir.

Medüller karsinom: Meme karsinomlarının %1-5'ini oluşturur. Medüller karsinom daha çok 50 yaş altındaki kadınlarda ve BRCA1 genini taşıyanlarda daha sık görülür.

İnvaziv papiller karsinom: İnvaziv meme karsinomlarının nadir görülen bir tipidir. Prognozu genellikle iyidir.

İnvaziv mikropapiller karsinom: İnvaziv meme karsinomlarının %1-2'sini oluşturur. Genellikle mikst tipe invaziv karsinomlarda, özellikle invaziv duktal karsinoma eşlik eden ikinci bir komponent şeklindedir. Bu tümörlerde lenfatik invazyon, lenf nodu metastazı ve multifokalite sık olduğundan prognozları kötüdür.

Sekretuar (juvenil) karsinom: Nadirdir ve genellikle 30 yaş altındaki kadınlarda görülür. Prognozu oldukça iyidir.

Metaplastik karsinom: Nadir bir tümör olup prognozu kötüdür.

Nöroendokrin karsinom: Meme karsinomlarının %2-5'ini oluşturur. Genellikle ileri yaş kadınlarda görülür. Bu grup tümörler gastrointestinal sistem ve akciğerdeki nöroendokrin tümörlere benzer morfolojik özellikler gösterirler. Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlası nöroendokrin belirleyicileri ekspres etmektedir.

Apokrin karsinom: Nadir görülen tümör grubudur. Prognozu aynı grade ve evredeki invaziv duktal karsinomlar ile aynıdır.

İnflamatuar karsinom: İnvaziv meme karsinomlarının özel bir klinik formudur. Dermal lenfatik invazyon sonucunda lenfatik drenaj bozulur ve deride ödem yanısıra eritem, endurasyon, hassasiyet ve portakal kabuğu görünümü vardır. İnflamatuar bir durumu taklit etmesi nedeniyle bu adı alır. Mikroskopik olarak herhangi bir inflammatuar tablo yoktur. Altta yatan invaziv karsinom genellikle yüksek grade'li invaziv duktal karsinomdur.

Tablo 4: Meme kanseri histolojik tipleri: WHO sınıflaması (108).

İn situ Karsinom
İn situ duktal karsinom
İn situ lobüler karsinom
İnvaziv Karsinom
İnvaziv duktal karsinom
İnvaziv duktal karsinom
Tübüler karsinom
İnvaziv kribriform karsinom
Medüller karsinom
Müsinöz karsinom
İnvaziv papiller karsinom
İnvaziv mikropapiller karsinom
Apokrin karsinom
Sekretuar (juvenil) karsinom
Adenoid kistik karsinom
Metaplastik karsinom
Nöroendokrin karsinom
İnflamatuar karsinom

Meme Kanserinin Moleküler Sınıflaması

Kanser dokusuna uygulanabilecek her moleküler analitik yöntem prognostik ve öngörüsül faktörleri tespit etme gücüne sahiptir. qRT-PCR ve mikroarray gibi moleküler tekniklerle gerçekleştirilen gen ekspresyon profilleri ile meme kanserinin heterojenitesini açıklama çabaları tümörün moleküler sınıflamasını gündeme soktu.

Sporadik meme kanserleri arasında gen ekspresyon farklılıklarını belirleyen ilk kapsamlı ve çığır açan girişim 2000 yılında Perou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilerek meme tümörleri 4 ana gruba ayrıldı (109):

- 1) Luminal hücre benzeri,
- 2) Bazal hücre benzeri,
- 3) Normal epitel benzeri ve
- 4) HER2 pozitif grup

Sonraki çalışmalarda luminal hücre benzeri grup içinde luminal A ve B olmak üzere 2 alt grup daha tanımlandı (110-111), meme kanserinin bu alt moleküler gruplarının ekspresyon farklılıkları doğrulandı (110, 112- 115).

Luminal hücre benzeri grubunun hepsi ER pozitifdir. Luminal A grubu en fazla ER ekspresyonu gösteren tümörlerdir (111). Luminal B grubu tümörler luminal gruba özgü genleri orta düzeyde eksprese eder ve bazıları HER2 pozitifdir. p53 gen mutasyon sıklığı luminal A grubunda luminal B grubundan daha sıktır (116, 117). Luminal hücre benzeri grubun yaklaşık

üçte ikisi düşük ya da orta düzey histolojik grade'e sahiptir, endokrin tedaviye duyarlıdır. Bazal hücre benzeri grubun %95'i ER negatiftir ve %91'i yüksek grade'dir (118). Bazal hücre benzeri grup aynı zamanda "triple" negatif meme kanser fenotipine sahiptir (ER-, PgR- ve HER2-). Ancak bazal hücre benzeri grubun heterojen olduğu ve alt grupları içerdiği düşünülmektedir (116, 117).

Farklı moleküler alt gruplarda prognozun ve kemoterapi duyarlılığının farklı olduğu gözlemlendi. Luminal hücre benzeri kanserlerin daha uzun sağ kalım oranları, bazal hücre benzeri ve HER2 pozitif tümörlerin ise birden fazla ajanla yapılan neoadjuvan tedaviye daha yüksek oranda patolojik tam yanıt verdikleri gösterildi (111, 118).

Meme kanserinin moleküler alt gruplarını küçük gruplarıyla birlikte tanımlayacak standardize yöntemlerin geliştirilmesi, prognostik ve öngörüsül göstergelerin çok daha büyük hasta gruplarını içeren klinik çalışmalarla birlikte denenmesi, moleküler tiplerin yeni alt gruplarının ortaya çıkmasına yol açması, bu grupların tedaviyi yönlendirmesi beklenen gelişimlerdir.

Meme Kanseri Prognostik ve Prediktif Faktörler

Prognostik faktörler hastalığın doğal seyriyle ilişkili olup sistemik adjuvan tedavinin yokluğunda sağ kalım ile ilişkili, öngörüsül faktörler ise tedaviye verilecek yanıt ile ilişkili ölçümlerdir. Hormon reseptör durumu ve HER2 ekspresyonu gibi durumlar hem prognostik hem de öngörüsül olabilir (119).

Meme kanseri tedavi karar sürecinde kullanılan prognostik ve prediktif faktörler tablo 4'te özetlendi.

Tablo 5. Meme kanseri prognostik ve prediktif faktörler *araştırma düzeyinde (119)

Prognostik faktörler	Prognostik ve prediktif faktörler
Lenf nodu durumu	ER ve PgR durumu
Tümör büyüklüğü	HER2 amplifikasyonu
Histolojik grade ve tip	İnvazyon faktörleri*
Lenfatik ve vasküler invazyon	Gen ekspresyon profili
Tanı yaşı	Dolaşımdaki tümör hücreleri
Etnik yapı	P53 mutasyonu
Proliferasyon markırları*	Dolaşımdaki anjiogenik faktörler
Katepsin D*	Topoizomeraz II durumu
Anjiogenez markırları*	BRCA gen mutasyonu
Kemik iliği mikrometastazı*	

Son 20 yıldır meme kanseri tedavi anlayışı ER ve HER2 sinyal yolağını hedefleyen tedavilerle birlikte değişti. Bununla birlikte kesin ve kullanılabilir prognostik ve prediktif faktörlerin kısıtlılığı nedeniyle hastaların bir bölümü tedaviden yararlanamayabilir. Günümüzde

kullanılan prognostik faktörlerle düşük riskli hastaların bir kısmı nüksedebilir ya da yüksek riskli gruba dahil hastalarda nüks görülmeyebilir. Daha genç kadınlara uygulanan daha agresif tedaviler uzun dönemde sekellere yol açabilir. Diğer sağlık problemlerinin varlığı nedeniyle daha yaşlı kadınlar agresif tedavinin toksisitetlerine daha duyarlı olabilir. Tedavinin ana hedefi yalnızca hastalısız sağ kalım değil, aynı zamanda toplam yaşam süresi ve yaşam kalitesi de olduğundan toksisiteden kaçınmak için adjuvan sistemik tedaviden yarar görebilecek hastaların seçiminde kullanılabilen yeni faktörlerin keşfedilmesini amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır.

Meme Kanseri Moleküler Prognostik ve Prediktif Testler

Nod negatif meme kanserinde adjuvan kemoterapi önerilen meme kanseri vakalarının bir bölümünün adjuvan tedavi almadan tedavi olması ve hastaların tedaviye verdikleri yanıtların farklılığı, hastaların nüks risklerine göre tanımlanmasını sağlayacak, tedaviye verilecek yanıtı öngörebilecek moleküler yaklaşımları gündeme getirdi. Mikroarray ve diğer yüksek işlem hacmine sahip deneylerde çoklu değişkenlerin test edilmesi, prognostik ve prediktif çalışmaların yürütülmesi için hem yöntemsel hem de istatistiksel değişikliklere yol açtı. FDA (Food and Drug Administration) 2007 yılında yayınladığı taslak kılavuzla tek bir laboratuvar tarafından geliştirilen, tek bir laboratuvarda uygulanan ve klinik laboratuvar hizmetleri olarak sunulmaya başlayan yeni genetik testleri (“*In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays*” [IVDMVIA]) düzenleme otoritesine sahip olduğunu açıklayarak yeni testlerin geliştirilmesi ve klinik kullanımının yolunu açtı (120).

IVDMVIA tanımında temel olarak 3 öge yer alır: gen ekspresyon farklılıkları gibi hasta örneğinde yapılan *testlerin verileri*, bu verileri kullanarak elde edilen *algoritma*, algoritma ile elde edilen skorlamaya göre *hasta sonucunun yorumlanarak klinisyene ulaştırılması* (120). Genetik testlerin dahil olduğu bir testin, laboratuvarları ve testleri denetleyen kuruluşlar tarafından onay alabilmesi için, testin analitik geçerliliği, klinik geçerliliği, klinik yararlılığı ve etik/yasal/duygusal etkilerinin tartışılıp kanıta dayalı olarak gösterilmesi beklenir. Kurumun güncel düşüncelerini yansıtan önerilerden oluşan FDA taslak kılavuzu, IVDMVIA olarak geliştirilen testlerin klinik yararlılığını sorgulamaz fakat analitik ve klinik geçerliliklerini denetler (121). Prognostik testlerin onayı için kullanılır, öngörülmesi testleri denetlemez.

Gen ekspresyon farklılıklarını prognostik veya öngörülmesi markır olarak kullanan IVDMVIA’ların geliştirilmesi terapötik ilaç geliştirilmesine benzetilebilir. Bu tasarıda faz I çalışmasının amacı iyi tanımlanmış grupta en uygun hasta sayısı ile markır keşfi ve uygun sınır değerlerin belirlenmesidir. Faz II çalışmasında testin performansı faz I’in gerçekleştirildiği hasta

örneklerinin dışındaki bağımsız örneklerle ölçülür. Eğer yöntem uygunsa bu iki süreç arşiv örneklerinde gerçekleştirilebilir. Faz III, prospektif olarak yürütülen randomize klinik çalışmayı içerir. Bu aşamada testin kullanımının ardından verilecek olan klinik kararın bu test sonucu olmadan verilen klinik karardan daha iyi sonuç verdiğini göstermek amaçlanır (122).

Meme kanseri tedavi kararını etkileyebilecek hastaları nüks riskine göre gruplandırmayı amaçlayan Oncotype DX (Genomic Health, California), MammaPrint (Agendia BV, Netherlands), ve H/I (AvariaDX, California) IVDMVA tanımına giren Faz I ve II'yi tamamlayan ve Faz III çalışmalarını başlatan, klinik uygulamaya sunulan örnek testlerdendir.

H/I (*HOXB13 / IL17BR*) iki gen ekspresyon indeksi, parafin doku örneklerinde çalışılan prognostik qRT-PCR testidir (123). *HOXB13* gen ekspresyonu neoplastik meme dokusunda artarken *IL17BR* gen ekspresyonu meme kanserlerinde azalır (123-126). *HOXB13* geninin hücre motilitesi ve invazyon ile ilişkili olduğu, *IL17BR* geninin ise immün yanıtta rol aldığı düşünülür. Nüks riskini değerlendiren prognostik bir testtir. Geniş ve heterojen hasta örneklerinde gerçekleştirilen araştırmalarla testin prognostik gücü gösterildi (123). CLIA (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*) tarafından prognostik test olarak onay aldı (127).

Oncotype DX erken evre ER pozitif meme kanserinde uygulanan 21 geni içeren formalinle fikse edilmiş parafinli doku örneklerinde (FFPE) çalışılan prognostik ve öngörüşel qRT-PCR testidir (128). ER genini, ER ile düzenlenen çeşitli genleri, HER2 ve proliferasyonla ilgili genlerin ekspresyonunu ölçer (128). Tamoksifen tedavisi alan ER pozitif, nod negatif meme kanserini nüks olasılığına göre düşük, orta ve yüksek riskli olmak üzere üç gruba ayırır (128). Bu prognostik özelliğin yanında, düşük risk grubundaki hastalara yalnız endokrin tedavi, yüksek riskli hastalara endokrin tedavinin yanında adjuvan kemoterapinin önerildiği tek testtir (129). TAILORx, Amerika ve Kanada'da yürütülen ER pozitif, HER2 negatif 10 000 erken evre meme kanseri hastasını incelemeyi hedefleyen Oncotype DX faz III çalışmasıdır (130). Hastalar Oncotype DX testi ile düşük (nüks skoru <11), orta (nüks skoru 11-25) ve yüksek (nüks skoru >25) nüks gruplarına ayrılır. Düşük risk grubu hastalar yalnız hormonoterapi, yüksek risk grubu hastalar ise kemoterapi ve hormonoterapi alır. Orta risk grubu hastalar tümör büyüklüğü ve menapozal duruma göre gruplandırılır, tedavi seçimi ya kemoterapi ve hormonoterapi birlikte, ya da yalnız hormonoterapi şeklinde randomize yapılır. Çalışmanın ana amacı orta risk grubu hastaların seçilen tedavi rejimlerinin sonuçlarını karşılaştırmak, düşük risk grubu hastaların tedavisinde tek başına alınan hormonoterapinin etkinliğini belirlemektir.

MammaPrint nod negatif, ER pozitif meme kanseri taze ya da frozen doku örneklerinde çalışılan, mikroarray temelli 70 gen profilidir. Analizini gerçekleştirdiği profilde esas olarak proliferasyon, invazyon, metastaz, stromal bütünlük ve anjiogenez ile birlikte olan genler vardır. Test IVDMVIA sınıfında, prognostik test olarak ilk FDA onayı alan testtir. Test cerrahi olarak çıkarılan doku örneğinde 70 genin ekspresyon düzeylerini ölçer ve 10 yıllık süre içinde uzak metastaz olasılığına göre hastaları yüksek ve düşük riskli olarak gruplandırır (131). St. Gallen prognostik kriterleri ile karşılaştırıldığında MammaPrint ile tanımlanan yüksek riskli hastaların St. Galen kriterleri ile tanımlanan yüksek riskli hastalardan daha fazla oranda metastaz gösterdikleri, yine MammaPrint ile düşük riskli gruba giren hastaların St. Galen kriterleri ile tanımlanan düşük riskli hastalardan daha fazla oranda hastaliksız sağ kalıma sahip oldukları gösterildi (132). Çeşitli tedavi protokollerine duyarlılık öngörü gücü henüz araştırılmadı (133). MINDACT, yaşları 18-70 yaş arası hormon reseptör ve HER2 durumuna bakmaksızın erken evre meme kanseri 6000 kadın hasta ile randomize, çok merkezli, prospektif, Avrupa’da yürütülen MammaPrint faz III çalışmasıdır (132, 134). Hasta grubunda adjuvan kemoterapi uygulanacak hastaların belirlenmesinde direk olarak MammaPrint ve Adjuvant Online’ı karşılaştırmak üzere kurgulandı. Adjuvant Online kriterleri ve MammaPrint ile düşük risk grubu hastalar uygunsa hormonoterapi alır, adjuvan kemoterapi almaz. Her iki düzenekle de yüksek risk grubuna giren hastalar kemoterapi ve uygunsa hormonoterapi alır. Risk grubu tam belirlenemeyen hastalar ise randomize seçilerek iki algoritmadan birine göre tedavi alır. MammaPrint ile düşük risk grubundaki hastaların adjuvan kemoterapi almaksızın 5 yıl uzak metastazsız sağkalım oranlarının yüksek olması öngörülerek kemoterapinin toksik etkilerinden kurtulacak hasta grubunu belirlemek amaçlanır (134).

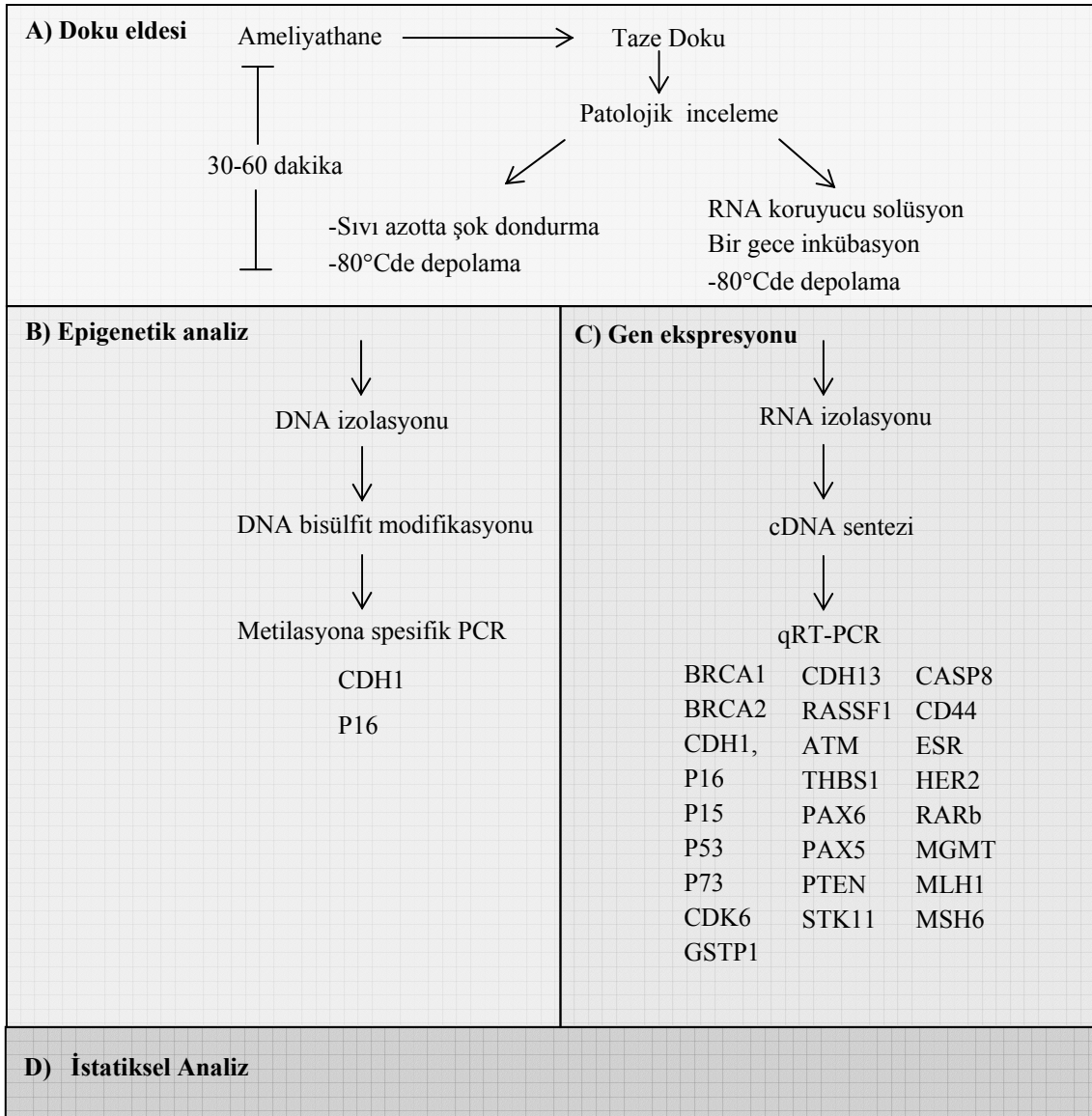
Oncotype DX ve MammaPrint farklı test yöntemlerini kullanan testlerdir. Her iki testte tek gen ortaktır. Bununla birlikte her iki testin de genleri proliferasyon, ER ve HER2 yolaklarında bulunur. MammaPrint, Oncotype DX testin sağlayabildiklerinden daha fazla farmokogenetik bilgi sağlayabilir ve ek yolakları değerlendirme şansı yaratabilir. MammaPrint’in hasta grubu içinde hem ER pozitif hem de ER negatif hastaların olması nedeniyle *oncotype DX*’den daha geniş endikasyonu vardır ve daha heterojen gruplarda araştırma yapılabilir. Oncotype DX’in hemen hemen tüm çalışmaları satın alınan testlerin kullanılmasıyla, MammaPrint verileri ise deneysel çalışmalardan elde edildi (135). Oncotype DX test FDA onayından muaf olmasına rağmen MammaPrint onay aldı (127). Oncotype DX CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) tarafından onaylandı. Oncotype DX ASCO Meme Kanseri Tümör Markır Komitesi tarafından “kullanım için tavsiye edilen” test

sınıfında yer alırken, MammaPrint “araştırma altında” olarak sınıflandırıldı (136). Her iki test için de bilimsel geçerlilik, klinik fayda ve maliyet etkinlik oranları ile ilgili araştırmalar halen devam etmektedir. Önümüzdeki yıllarda TAILORx ve MINDACT gibi başlamış çalışmaların testlerin klinik değerleri hakkında bilgi vereceği beklenmektedir.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Etik kurul raporu Hasta dokularında yapılacak olan analizler için Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 03.02.2006/03, 06.04.2006/88 tarih ve no ile gerekli onaylar alındı.

Yöntem Deneysel süreç 3 ana bölümde gerçekleştirildi: A) Dokuların eldesi ve depolanması, B) Epigenetik analiz, C) Gen ekspresyonu, D) İstatistiksel analiz (şekil 12).



Şekil 12: Deneysel aşamalar

A) Dokunun eldesi ve depolanması: Meme kanseri ve çevre normal taze doku örnekleri Dokuz Eylül Meme Tümör Biyobank'ından (DEMTB) elde edildi. DEMTB pilot çalışma olarak "European Society of Human Genetics" esaslarına göre DEÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı'nda meme kanseri ön tanısı ile opere edilen ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Meme Tümör Grubu tarafından takipleri yapılan gönüllü olgular ile oluşturuldu (137).

Uygun olan tümör doku örneklerinin çevre dokusu da araştırmaya dahil edildi. Sağlıklı normal meme dokusu ise İzmir Özel Dr Cevdet Tuğrul Meme hastalıkları Teşhis ve Tedavi Merkezi'nde meme redüksiyon ameliyatı spesmenlerinden elde edildi. Tüm dokuların makroskopik ve mikroskopik incelemeleri patolog tarafından gerçekleştirildi.

Cerrahi dokunun çıkarılmasının hemen ardından patolojik incelemesi yapılan taze dokudan alınan tümör ve çevresindeki normal doku 2 ayrı parçaya ayrılıp DNA'nın elde edileceği parça sıvı azotta donduruldu ve izolasyon anına kadar -80°C'de saklandı. RNA izolasyonu yapılacak olan parça RNA degradasyonunu önleyen solüsyon içerisinde (Trizol, İnvitrogen) bir gece bekletildi, ardından izolasyon anına kadar -80°C'de bekletildi.

B) Epigenetik analiz: Epigenetik analiz, DNA izole etmek üzere depolanan dokularda gerçekleştirildi.

DNA izolasyonu: DNA izolasyonu, dokunun mekanik olarak homojenizasyonunun ardından spin kolon yöntemi ile (RBC Bioscience, Genomic DNA Extraction, Mini-Tissue) izole edildi. Yaklaşık 1 mg doku kullanılarak başlanan izolasyon sonrasında 10-20 µg DNA elde edildi. İzole edilen DNA'nın UV spektrofotometre ile (UV-3600 Shimadzu) saflık ve konsantrasyon tayinleri yapıldı.

Epigenetik analiz: P16 ve CDH1 genlerinin promotör bölgedeki CpG adalarının metilasyon değişiklikleri spesifik ve sensitif bir yöntem olan metilasyona spesifik PCR (MSP) ile gerçekleştirildi (138). Yöntem iki basamaktır: 1-DNA sodyum bisüfit ile muamele edilir, metile olmayan DNA'lar urasile dönüştürülürken, metile olan sitozinler aynı kalır. 2- Hem metile olan DNA dizisine özgü (M), hem de metile olmayan DNA dizisine özgü primer (U) sentezlenerek PCR uygulanır. PCR ürünleri jel elektroforezi ile değerlendirilir.

Bisüfit dönüşümü ve MSP: İzole edilen doku DNA'sının bisüfit dönüşümü standardize edilmiş ticari reaktifler ile (MethylDetector, Active Motif), metilasyon analizleri *hot start* polimeraz (PyroStart Fast PCR Master Mix, Fermentas) kullanılarak ticari kit ile gerçekleştirildi (CpG WIZ P16 S7800, E-CADHERİN S7804, Chemicon). P16 geninin GenBank'ta yer alan X94154, E-CADHERİN geninin L34545 promotör bölgesi test edildi. Üç tip primer seti kullanıldı: Bisüfit modifikasyona uğrayan metillenmemiş DNA'nın amplifikasyonuna izin veren U primer seti, bisüfit modifikasyona uğrayan metillenmiş DNA'nın amplifikasyonuna izin veren M primer seti, kimyasal modifikasyona uğramamış DNA'nın herhangi bölümüne bağlanabilen W primer seti kullanıldı. W primer seti bisüfit modifikasyonun etkinliğini değerlendiren kontrol olarak kullanılan primer çiftidir. Her bir örnek için 7 RCR reaksiyonu kuruldu (U, M, W primerleri, U, M ve W primer çiftleri için pozitif kontrol ve DNA yerine

suyun eklendiği negatif kontrol). Optimizasyonların ardından 0.5 µg DNA kullanılmasına karar verildi. Her bir primer çifti için (U, M ve W primer çiftleri için ayrı ayrı) aşağıdaki karışım hazırlandı:

<u>Reaktif</u>	<u>1 reaksiyon</u>	<u>7 reaksiyon</u>
2x Hot start PCR miks	10 µl	70 µl
Primer set	0,8 µl	5,6 µl
		75,6 µl hacim her bir PCR

tüpüne 10,8 µl olarak dağıtıldı. DNA ve suyla her bir reaksiyon 20 µl'ye tamamlandı.

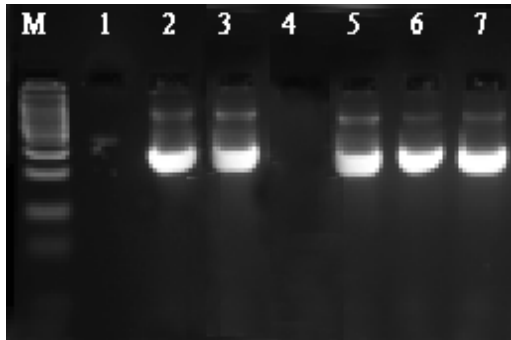
Termal program;

95 ⁰ C	10 dakika	} 35 döngü
95 ⁰ C	45 saniye	
60 ⁰ C	45 saniye	
72 ⁰ C	60 saniye	
72 ⁰ C	3 dakika,	+4 ⁰ C ∞

PCR'nunun bitmesinin ardından ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

C) Gen ekspresyonu: Gen ekspresyonu aşaması RNA izole etmek üzere depolanan dokularda gerçekleştirildi. Bu aşama RNA izolasyonu, cDNA sentezi, referans genler dahil tüm genlerin standart eğrilerinin oluşturulması, hasta örneklerinin her birinde referans genler dahil tüm genlerin qRT-PCR'u, referans genlerin seçimi, $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile her bir genin her bir örnekteki nispi ekspresyon verilerinin normalize edilerek hesaplanması.

RNA izolasyonu: Dokunun mekanik olarak homojenizasyonunun ardından spin kolon yöntemi ile (RBC Bioscience) gerçekleştirildi. Yaklaşık 1 mg doku kullanılarak başlanan izolasyon sonrasında 20-30 µg total RNA elde edildi. RNA saflığı ve konsantrasyonu UV spektrofotometre ile ölçüldü (UV-3600 Shimadzu). Örnek degradasyonları jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 14).



Şekil 13: Elde edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüleri 1 ve 4. örnekler tekrarlandı.

cDNA sentezi: Random primerler ve M-MuLV (moloney mürin lösemi virüsü ters transkriptaz) reverz transkriptaz enzimi (Revertaid First Strand, Fermentas) ile cDNA

sentezlendi. 1µg total RNA ve 0.2µg random heksamer toplam 12µl hacimde 5 dakika 70°C’de inkübe edildi ve buz içine alındı. Karışıma 4µl reaksiyon tamponu, 1µl ribonükleaz inhibitör (20U), 2µl dNTP karışımı (10mM) eklenerek 25°C’de 5 dakika bekletildi. Ardından 1µ (200U) RevertAid M-MuLV reverz transkriptaz enzimi eklendi. Reaksiyon 25°C’de 10 dakika’nın ardından 42°C’de 90 dakika’da gerçekleştirildi.

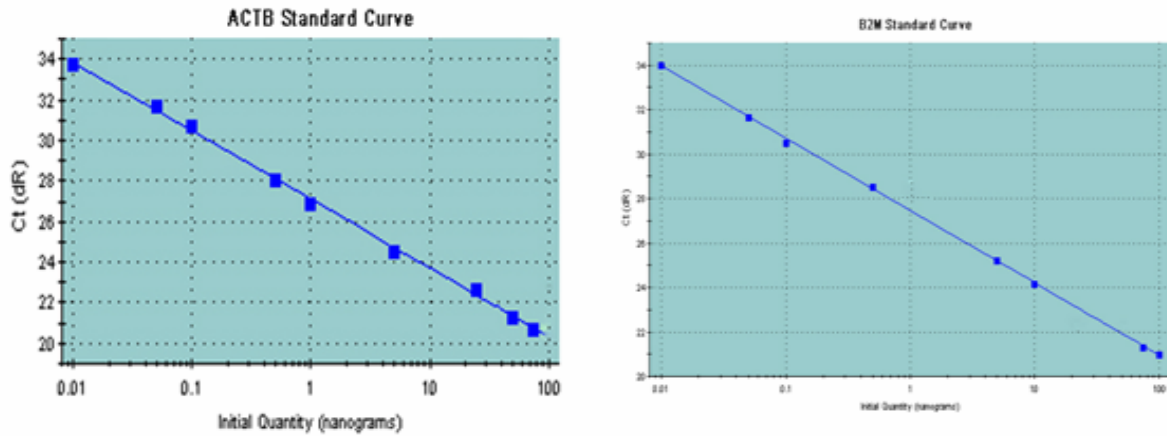
Tablo 6: Kullanılan primer ve prob listesi

Gen	GenBank/EMBL no	Primer 1 (<i>forward</i>)	Primer 2 (<i>revers</i>)	Prob no
BRCA1	ENSG00000012048	ttgtgatgtggaggagcaa	gattccaggttaaggggtcc	11
BRCA2	ENSG00000139618	agcttactccggccaaaa	ttctccaatgcttgtaaataa	50
CDH1	ENSG00000039068	gccgagagctacacttca	gaccggtgcaatcttcaaa	80
P16	ENSG00000147889	gtggacctggctgaggag	tcttcaatcggggatgtct	34
P15	ENSG00000147883	gcggggactagtggagaag	ctgccatcatcatgacct	17
P53	ENSG00000141510	ccccagccaaagaagaac	aacatctcgaagcgctcac	58
P73	ENSG00000078900	acgtttgagcacctctgga	cgcccaccacctcattatt	60
CDK6	ENSG00000105810	tgatcaactaggaaaaatcttgac	ggcaacatctctaggccagt	2
GSTP1	ENSG00000084207	gcaggagggctcactcaa	ggtctccgtctggaactt	24
TIMP3	ENSG00000100234	ctgtgcaactctgtggagag	ggcaggtagtagcaggacttg	14
CDH13	ENSG00000140945	gcgtgtacactgctctctcc	aaagtcccagtgcccgtag	59
RASSF1	ENSG00000068028	gctcgtctgctggactg	ccactccacaggctcgtc	23
ATM	ENSG00000149311	ccaggcaggaatcattcag	caatcctttaaatagacggaaagaa	53
THBS1	ENSG00000137801	gccacagttctctgatggag	ccatggagaccagccatc	56
PAX6	ENSG00000007372	ttcagagccccatattcgag	gagctgattcactccgctgt	20
PAX5	ENSG00000196092	acgctgacagggatggtg	cctccaggagctggtgtacg	83
PTEN	ENSG00000171862	ggggaagttaaggaccagagac	tccagatgattcttaacaggtagc	48
STK11	ENSG00000118046	ggaggccaactggaagaa	tgcttctctcgttgataaacat	42
BCL2	ENSG00000171791	gcacctgcacactggat	agccaggagaaatcaaacagag	57
CASP8	ENSG00000064012	agggtcctaaattctgcctac	ggcactggctgtttgctt	29
CD44	ENSG00000026508	tggatcaggcattgatgatg	gtcaaaagcccgtggtgt	67
ESR	ENSG00000091831	ttactgaccaactggcaga	atcatggagggtcaaatcca	24
HER2	ENSG00000141736	gggaaacctggaactcacct	ccctgcacctcctggata	4
RARb	ENSG00000077092	cacctgtcatcggaggactt	gctggtgctctgtgttcaat	16
MGMT	ENSG00000170430	caccgtttgcgacttgga	ctccagctcccaaaagg	47
MLH1	ENSG00000076242	aggagctgacctctcagg	gtccactccaggagtttg	36
MSH6	ENSG00000116062	ttaagaggcttgaattggcagt	cactcttatctgttacgtaagtgtgc	21
MLH3	ENSG00000119684	tggaaagagaagccaatgaac	gctccagttgttctcgataaa	55
RPL13A	NM_012423	gaggcccctaccacttcc	aacaccttgagacgggtccag	28
B2M	NM_004048	taggagggtggcaacttag	cttatgcacgcttaactatcttaaaa	32
ACTB	NM_001101	ccaaccgcgagaagatga	ccagaggcgtacaggatag	64
PUM1	NM_001020658	agtgggggactaggcgttag	gtttcatcactgtctgcatcc	22

BRCA1, BRCA2, CDH1, P16, P15, P53, P73, CDK6, GSTP1, TIMP3, CDH13, RASSF1, ATM, THBS1, PAX6, PAX5, PTEN, STK11, BCL2, CASP8, CD44, ESR, HER2, RARb, MGMT, MLH1, MSH6, MLH3 ve 4 referans genin ACTB (β -aktin), B2M (β -2-mikroglobulin), RPL13A (ribosomal protein L13a) ve PUM1 (homolog of Pumilio, Drosophila) primer ve hidroliz problemleri üniversal prob kütüphanesi veri tabanından (UPL -*universal probe*

library database-, Roche Diagnostics) elde edildi (tablo 6). qRT-PCR analizleri Stratagene Mx3000P (Stratagene, La Jolla CA, USA) cihazıyla gerçekleştirildi. Hem primer ve prob optimizasyonu hem de standart eğri çizimlerinde cDNA'ya dönüştürülen referans RNA (Universal Human Normal Tissue RNA, BioTaq) kullanıldı.

Standart eğri: Dört referans ve diğer 28 genin amplifikasyon verimliliklerini elde etmek üzere standart eğrilerini çizmek için gerçekleştirilen çalışmada; referans RNA'dan çevrilen cDNA örneğinin en az 4 dilüsyonu kullanıldı. Varyasyonu azaltmak için tek oturumda referans RNA random primerler kullanılarak cDNA'ya çevrildi ve genlerin tümünde tek seferde hazırlanan aynı dilüsyon serisi kullanıldı. Başlangıç konsantrasyonu 100ng/μl olmak üzere 100 kat seyreltildi. Tüm deney için her bir dilüsyon için cDNA havuzu oluşturuldu ve bu aşamadaki değişkenler kontrol altına alındı. Her bir gen için cDNA karışımının 5 seri dilüsyon noktasında (1ng'dan 0.01 ng'a kadar) 3 tekrarla standart eğriler belirlendi. qRT-PCR reaksiyonu 10μl Taqman master miks (RBC Bioscience), 0.2μl (200nM) *forward* ve *revers* primerler, 0.2μl (100nM) prob, 2μl cDNA toplam hacim 20 μl olacak şekilde hazırlandı. 95°C'de 10 dakika'nın ardından 95°C'de 30 saniye, 59°C'de 40 saniye, 72°C'de 20 saniye 50 siklus amplifikasyon gerçekleştirildi. Floresans veriler *annealing* basamağının ardından elde edildi. ACTB ve B2M genlerinin standart eğrileri şekil 14'de gösterildi.



Şekil 14: Standart eğri örnekleri: ACTB ve B2M genlerinin standart eğrileri

Referans gen seçimi: Çalışılan örnekler arasında, test edilen referans genler içinde en uygun referans genin araştırılması *Excel* tabanlı program olan *NormFinder* ile gerçekleştirildi (36). *NormFinder* her bir aday referans genin stabilite değerini belirler. Bu değer, o genin normalizasyonda kullanılması durumunda ortaya çıkacak olan sistemik hatayı değerlendirmede kullanılan tahmini ekspresyon varyasyonları için direk ölçüdür. Normalizasyon için en iyi genin belirlenmesini sağlar, ne kadar küçükse o kadar stabildir.

$\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile nispi ekspresyon değerlerinin eldesi: Her bir gen için her bir örnekte belirlenen C_t değerleri ile referans gen arasındaki C_t farkı ile ΔC_t , normal dokuya kıyaslamak adına da ΔC_t değerinden normal doku örneği C_t 'si arasındaki farkı ile $\Delta\Delta C_t$ değeri elde edildi. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri hasta örneğinin normal dokuya göre kaç kat arttığı ya da azaldığını gösteren değerdir.

Çalışma içi ve çalışmalar arası varyasyon: Deneyin tümü çok sayıda plate ile tamamlandığından qRT-PCR çalışma içi kesinliğinin doğruluk ve tekrarlanabilirliği belirlendi. Çalışma içi ve çalışmalar arası varyasyon her bir deneyde iki farklı konsantrasyonda (10ng/ μ l ve 0.1ng/ μ l) universal RNA'dan hazırlanan cDNA örneği ikişer tekrarla PUM1 geni çalışılarak değerlendirildi. Çalışmalar sırasında kullanılan örneklerin plate yerleşiminin örneği şekil 15'da gösterildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
PUM1	A	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	10 ng/ μ l
	B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	10 ng/ μ l
RPL13A	C	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	1 ng/ μ l
	D	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	1 ng/ μ l
B2M	E	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	NTC
	F	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	NTC
ACTB	G	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	
	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	10 ng/ μ l
B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	10 ng/ μ l
C	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	1 ng/ μ l
D	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	1 ng/ μ l
E	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	NTC
F	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	NTC
G	S34	S35	S36	S37	S38	S39	S40	S41	S42	S43	S44	
H	S34	S35	S36	S37	S38	S39	S40	S41	S42	S43	S44	

Şekil 15: Deney sırasında örneklerin plate yerleşim örnekleri: A) Standart eğri oluştururken, B) Her bir genin çalışma düzeni.

Sıcaklık haritası (heatmap): Özellikle mikroarray çalışmalarında ekspresyon verilerinin sayısal değerlerini görselleştirmek için sık kullanılan bir yöntemdir. Gen verilerinin çok olması nedeniyle bu çalışmada da bu yöntem kullanıldı. Bu haritalama da; yatay eksen genleri, dikey eksen ise örnekleri göstermektedir. Matrisin her bir hücresi, o hücrenin ait olduğu genin, o hücrenin ait olduğu örnekteki nispi ekspresyon seviyesini temsil edecek şekilde renklendirildi. Nispi ekspresyon seviyesi, ilgili örneğin normalize edilmiş gen ekspresyon düzeyinin aynı genin sağlıklı normal dokudaki ekspresyon düzeyine oranıdır. Yeşil renk tonları ekspresyon düzeyindeki artmayı gösterirken, kırmızı renk tonları ise ekspresyonun azalması anlamını taşır. Parlak renkler, soluk renklere oranla ekspresyon değişikliği miktarının daha fazla olduğunu

gösterirken, siyah gözüken hücreler belirgin bir ekspresyon değişikliğinin olmadığını belirtmektedir. Bu çalışmada değer aralıkları, farklı genler için yaklaşık $10^{\pm 4} - 10^{\pm 6}$ aralığında değişmektedir. Değer aralıkları büyük olduğundan, her gen kendi standart sapmasına göre değerlendirilerek renklendirildi.

C)İstatiksel analiz: Veri grubunun normal dağılım testleri Kolmogorov-Smirnov ve ShapiroWilk testleri ile, gruplar arasındaki anlamsal farklılıklar Kruskal Wallis ve Mann Witney U ile, klinik parametreler ve gen ekspresyonları arasındaki, genler arasındaki ekspresyon ilişkisi korelasyon spearman ve pearson korelasyon testi ile, her bir histopatolojik veri üzerinde etkin genlerin keşfi regresyon analizi (nominal ve ayırım) ile değerlendirildi. Veriler 0'dan küçükse ($-1/\log X$), 0'dan büyükse ($\log X$) dönüşümü yapıldı. Analizlerde SPSS 15.0 ve SPSS Clementine paket programları kullanıldı.

IV. BULGULAR

Olgular: Yaşları 30-41 arasında (ortalama 36, ortanca 36.5) 4 adet normal; yaşları 48, 49, 55 olan (ortalama 50.7) 3 adet benign doku; yaşları 26-81 arasında (ortalama 51.2, ortanca 53) 64 adet invaziv tümör, tümörün çevresinden alınabilen 51 adet çevre olmak üzere toplam 71 olgu, 124 örnek çalışmaya dahil edildi. Olguların histolojik sınıflandırmasına ve hormon reseptör sınıflamasına göre demografik ve histopatolojik özellikleri sırasıyla tablo 7 ve 8’de gösterildi.

Tablo 7: Olguların histolojik sınıflandırmasına göre demografik ve histopatolojik özellikleri

		Duktal		Lobüler		Miks		Diğer		Toplam	
		n	%*	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*
Yaş	≤ 30	-	-	1	1.6	-	-	1	1.6	2	3.1
	31-40	2	3.1	2	3.1	1	1.6	2	3.1	7	10.9
	41-50	5	7.8	10	15.6	5	7.8	-	-	20	31.3
	51-60	5	7.8	4	6.3	6	9.4	4	6.3	19	29.7
	61≤	6	9.4	2	3.1	5	7.8	3	4.7	16	25.0
Evre	0	1	1.6	-	-	-	-	1	1.6	2	3.1
	1	5	7.8	6	9.4	2	3.1	3	4.7	16	25.0
	2	6	9.4	5	7.8	7	10.9	3	4.7	21	32.8
	3	2	3.1	4	6.3	8	12.5	3	4.7	17	26.6
	4	4	6.3	4	6.3	-	-	-	-	8	12.5
Histolojik grade	1	2	5.6	-	-	8	28.2	2	5.6	12	33.3
	2	10	27.8	-	-	6	16.7	2	5.6	18	50.0
	3	6	16.7	-	-	-	-	-	-	6	16.7
Nükleer grade	1	-	-	2	3.2	3	4.8	1	1.6	6	9.7
	2	5	8.1	9	14.5	9	14.5	4	6.5	27	43.6
	3	13	21.0	8	13.0	5	8.1	3	4.9	29	46.8
İnvazyon	1	-	-	1	1.64	1	1.64	2	3.28	4	6.56
	2	3	4.9	12	19.67	10	16.39	3	4.92	28	45.90
	3	14	23.0	6	9.8	6	9.8	3	4.9	29	47.5
Diferansiasyon	1	-	-	1	1.7	1	1.7	2	3.5	4	6.9
	2	2	3.5	11	19.0	10	17.2	2	3.5	25	43.1
	3	14	24.1	6	10.3	6	10.3	3	5.2	29	50.0
Hormon reseptörü	ER+HER+	5	8.1	14	22.6	16	25.8	2	3.2	37	59.7
	ER+HER-	2	3.2	1	1.6	1	1.6	3	4.8	7	11.3
	ER-HER+	5	8.1	2	3.2	-	-	3	4.8	10	16.1
	ER-HER-	5	8.1	2	3.2	-	-	1	1.6	8	12.9

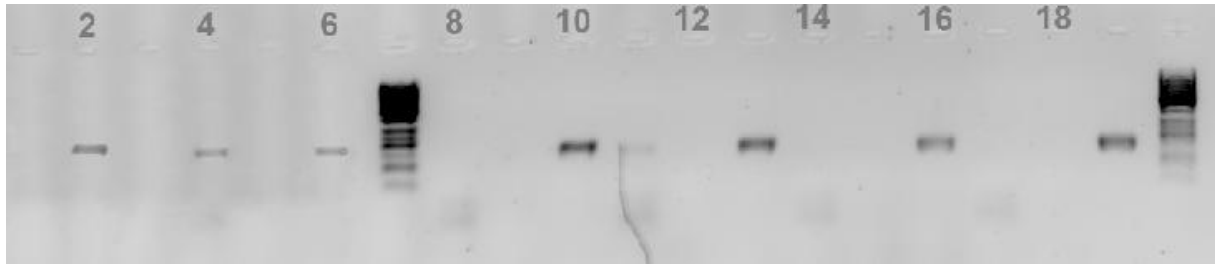
*Total içindeki yüzde

Tablo 8: Olguların hormon reseptörüne göre demografik ve histopatolojik özellikleri

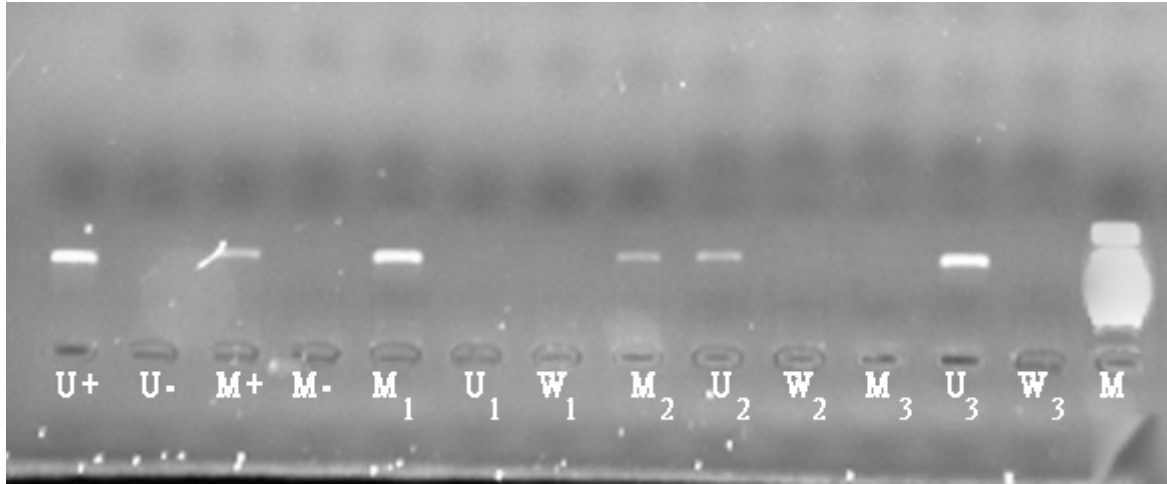
		ER+HER2+		ER+HER2-		ER-HER2+		ER-HER2-		Toplam	
		n	%*	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*
Yaş	≤ 30	-	-	-	-	2	3.2	-	-	2	3.2
	31-40	4	6.5	1	1.6	-	-	1	1.6	6	9.7
	41-50	12	19.4	2	3.2	4	6.5	2	3.2	20	32.3
	51-60	11	17.7	3	4.8	2	3.2	2	3.2	18	29.0
	61≤	10	16.1	1	1.6	2	3.2	3	4.8	16	25.8
Evre	1	9	14.5	4	6.5	3	4.8	-	-	16	25.8
	2	12	19.4	-	-	4	6.5	5	8.1	21	33.9
	3	12	19.4	2	3.2	3	4.8	-	-	17	27.4
	4	4	6.5	1	1.6	-	-	3	4.8	8	12.9
Histolojik grade	1	10	28.6	1	2.9	-	-	-	-	11	31.4
	2	9	25.7	3	8.6	3	8.6	3	8.6	18	51.4
	3	1	2.9	1	2.9	2	5.7	2	5.7	6	17.1
Nükleer grade	1	5	8.2	-	-	1	1.6	-	-	6	9.8
	2	18	29.5	3	4.9	1	1.6	4	6.6	26	42.6
	3	14	23	4	6.6	7	11.5	4	6.6	29	47.5
İnvazyon	1	4	6.6	-	-	-	-	-	-	4	6.6
	2	20	32.8	2	3.3	4	6.6	2	3.3	28	45.9
	3	13	21.3	5	8.2	5	8.2	6	9.8	29	47.5
Diferansiyasyon	1	4	6.9	-	-	-	-	-	-	4	6.9
	2	19	32.8	2	3.4	2	3.4	2	3.4	25	43.1
	3	13	22.4	5	8.6	5	8.6	6	10.3	29	50
Histolojik tip	Duktal	5	8.1	2	3.2	5	8.1	5	8.1	17	27.4
	Lobüler	14	22.6	1	1.6	2	3.2	2	3.2	19	30.6
	Miks	16	25.8	1	1.6	-	-	-	-	17	27.4
	Diğer	2	3.2	3	4.8	3	4.8	1	1.6	9	14.5
Mitotik aktivite	1	21	35.6	-	-	2	3.4	4	6.8	27	45.8
	2	10	16.9	4	6.8	2	3.4	2	3.4	18	30.5
	3	5	8.5	2	3.4	5	8.5	2	3.4	14	23.7
Tubuler yapı	0	4	9.1	3	6.8	-	-	-	-	7	15.9
	1	5	11.4	-	-	1	2.3	-	-	6	13.6
	2	15	34.1	2	4.5	4	9.1	-	-	21	47.7
	3	3	6.8	1	2.3	1	2.3	5	11.4	10	22.7
Tümör büyüklüğü	1	16	27.6	5	8.6	3	5.2	2	3.4	26	44.8
	2	13	22.4	1	1.7	7	12.1	4	6.6	25	43.1
	3	6	10.3	1	1.7	-	-	-	-	7	12.1
Nod tutulumu	0	13	22.8	5	8.8	7	12.3	2	3.5	27	47.4
	1	10	17.5	-	-	-	-	2	3.5	12	21.1
	2	7	12.3	1	1.8	2	3.5	2	3.5	12	21.1
	3	4	7.0	1	1.8	-	-	1	1.8	6	10.5
Metastaz	0	33	53.2	6	9.7	10	16.1	5	8.1	54	87.1
	1	4	6.5	1	1.6	-	-	3	4.8	8	12.9

Epigenetik analiz: Dokulardan izole edilen DNA örneklerinin 260/280 (\pm SD) oranları 1.75-2.10 (\pm 0.04) idi.

124 örnek üzerinde gerçekleştirilen P16 ve CDH1 genlerinin MSP jel fotoğrafı şekil 16'da, metilasyon yüzdeleri şekil 17'de, evrelere göre dağılım oranları şekil 18'de gösterildi. Benign ve normal doku örneklerinde metilasyona rastlanmadı. Çevre normal dokuda P16 metilasyonuna yoktu. CDH1 metilasyonu saptanan vakaların %25'inin çevre normal dokusu metileydi.



A)



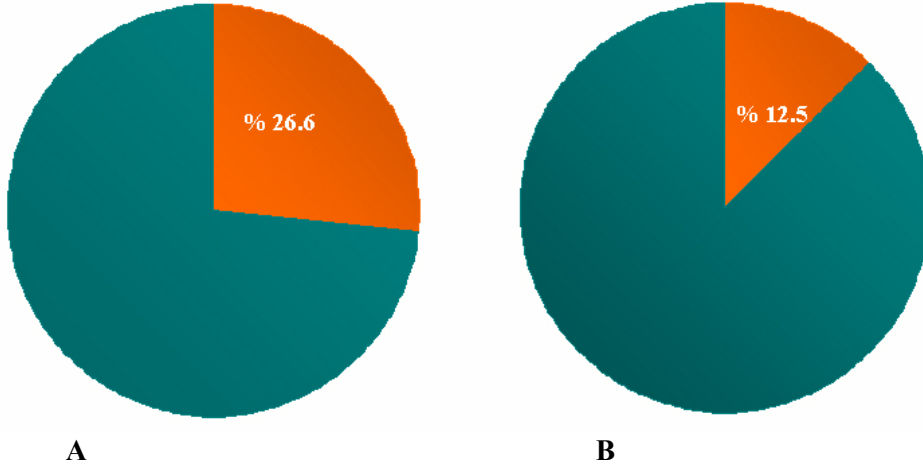
B)

Şekil 16: MSP Elektroforez görüntüsü A) P16 gen metilasyon analizi.

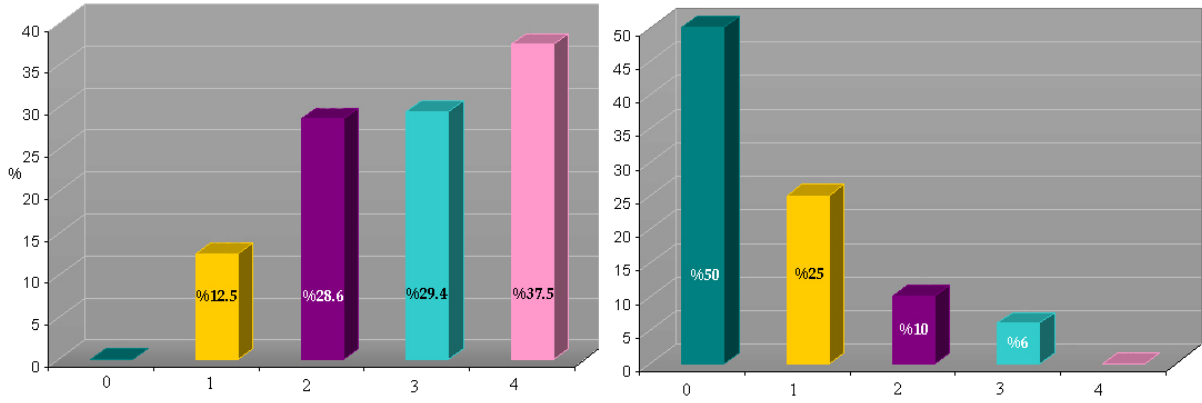
1: U_{negatif} kontrol, 2: U_{pozitif} kontrol, 3: M_{negatif} kontrol, 4: M_{pozitif} kontrol, 5: W_{negatif} kontrol, 6: W_{pozitif} kontrol, 7: 100bp marker, 8: 1.örnek W primer, 9: 1.örnek M primer, 10: 1.örnek U primer, 11: 2.örnek W primer, 12: 2.örnek M primer, 13: 2.örnek U primer, 14: 3.örnek W primer, 15: 3.örnek M primer, 16: 3.örnek U primer, 17: 4.örnek W primer, 18: 4.örnek M primer, 19: 4.örnek U primer, 20: 100bp marker.

B) E-CADHERİN gen metilasyon analizi.

U_{pozitif} kontrol, U_{negatif} kontrol, M_{pozitif} kontrol, M_{negatif} kontrol, 1.örnek M primer, 1.örnek U primer, 1.örnek W primer, 2.örnek M primer, 2.örnek U primer, 2.örnek W primer, 3.örnek M primer, 3.örnek U primer, 3.örnek W primer, Ma: 100bp marker.

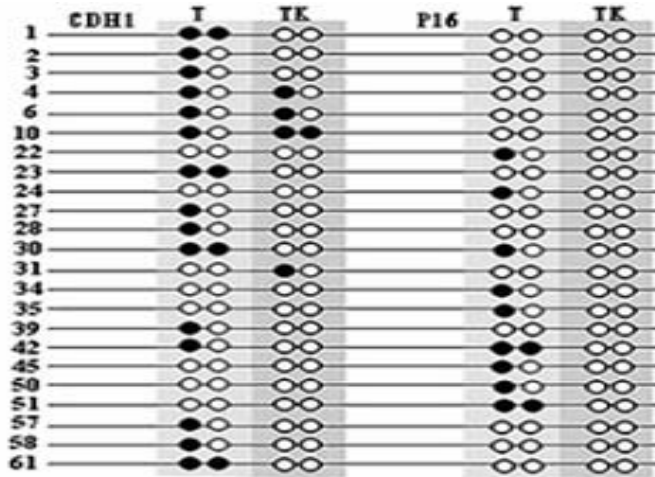


Şekil 17: İnvaziv meme kanserinde A) P16 geni ve B) CDH1 geninin metilasyon yüzdeleri



Şekil 18: İnvaziv meme kanseri evrelerine göre A) CDH1, B) P16 geninin metilasyon oranları

Histolojik tanılarına göre CDH1 geninin metilasyon sıklığı: lobüler %51, duktal %11, miks tümör %38 olarak bulundu. İki vakanın her iki geninde birden epigenetik değişiklik saptandı. Metilasyonu saptanan örneklerin tümör doku ve komşu normal doku arasındaki ayrıntılı veriler şekil 19'de gösterildi.



Şekil 19: Metilasyonu saptanan örneklerin ayrıntılı verileri: T tümör dokusunu, TK tümör komşu dokuyu, ● metillenmiş alleli, ○ metillenmemiş alleli göstermektedir.

CDH1 geninde her iki alleli metillenen örneklerde metilasyon ile gen ekspresyonları arasında orta derecede çok anlamlı korelasyon vardı (ρ 0.553 $p=0.003$) ancak hem aynı genin bir alleli metile olan örneklerinde hem de P16 geninin metile örnekleri ile ekspresyonları arasında korelasyon yoktu.

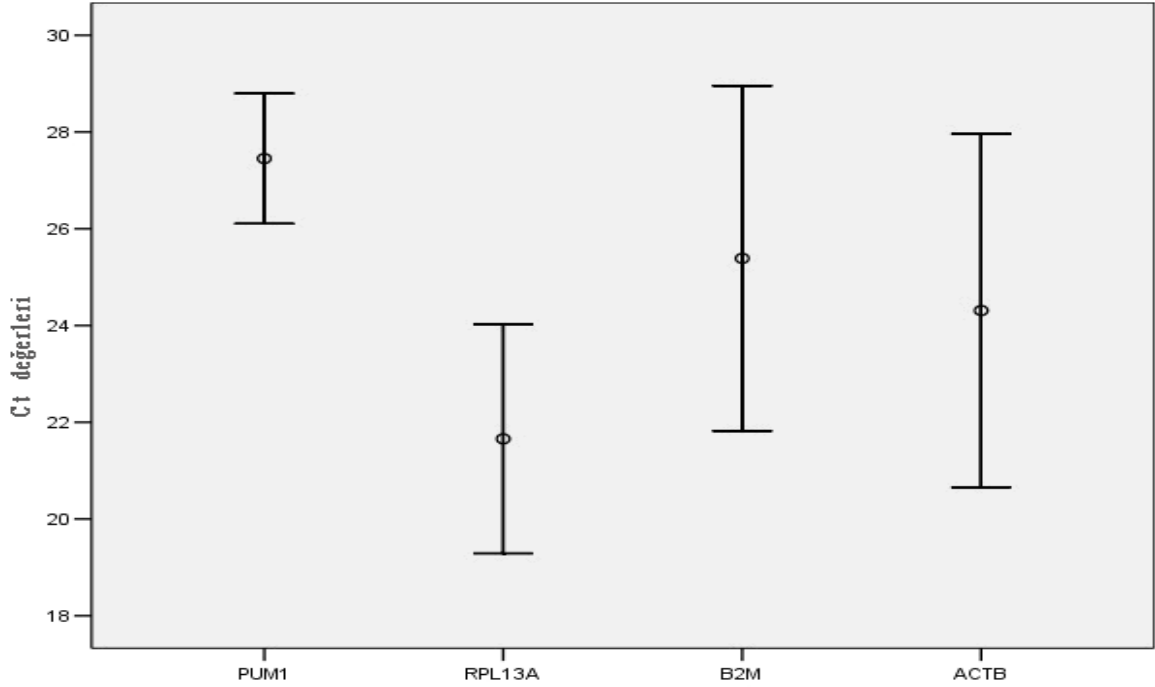
Gen ekspresyonu: İzole edilen RNA örneklerinin 260/280 (\pm SD) oranları 1.95-2.12 (\pm 0,03). Gerçekleştirilen tüm qRT-PCR deneylerinin yüzde varyasyon katsayıları (%CV) 10 ng ve 1 ng konsantrasyonları için sırasıyla çalışma içi 0.0342 ve 0.042 idi. Çalışmalar arası % CV ise 10 ng/ μ l konsantrasyon için 0.042, 1 ng/ μ l konsantrasyon için 0.024 idi.

Referans ve diğer genlerin verimlilikleri, çizilen standart eğrilerden elde edildi. Eğim, verimlilik ve eğimin kalite (RSq) değerleri Mx3000P programından elde edildi, tablo 9’de gösterildi.

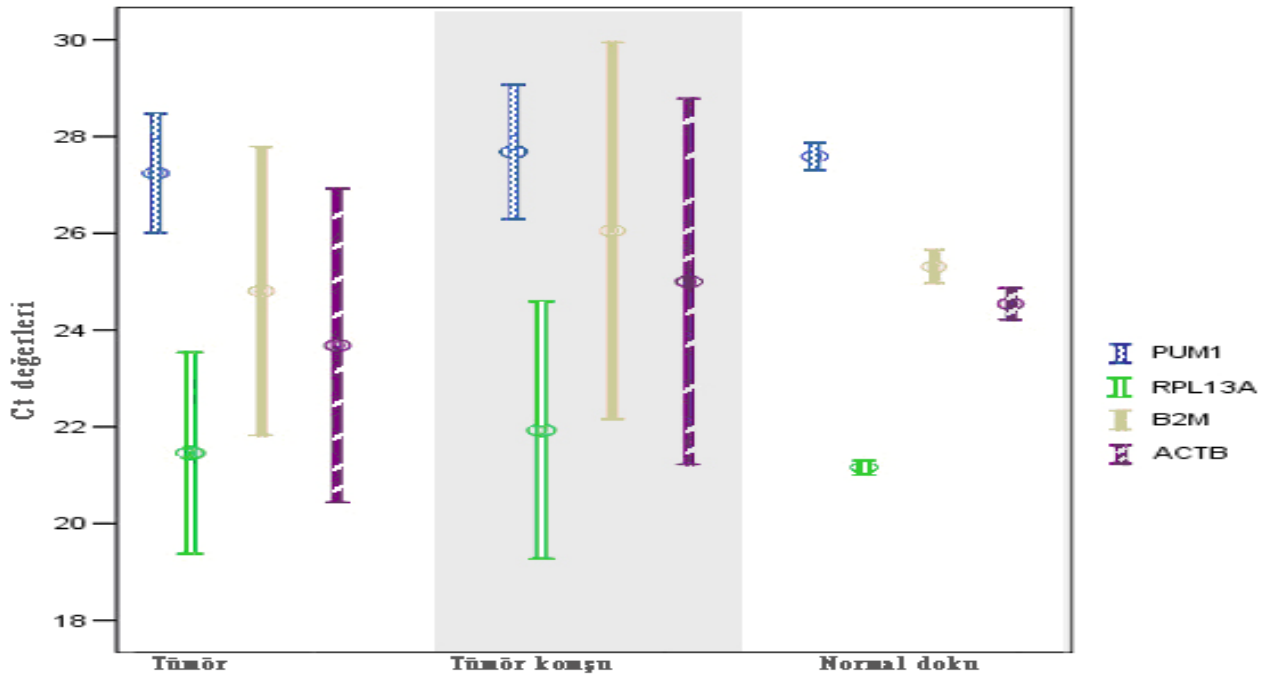
Tablo 9: Gen amplifikasyon verimlilikleri RSq: eğimin kalitesini gösteren değer

Gen	Verimlilik %(E)	Eğim	RSq
BRCA1	102,4	3,265	0.994
BRCA2	100,1	3,320	0.987
CDH1	100,4	3,313	0.997
P16	100	3,322	1.000
P15	101.2	3.293	0.989
P53	100	3.323	0.992
P73	100.7	3.301	0.995
CDK6	99.6	3.332	0.994
GSTP1	100.2	3,318	1.000
TIMP3	99.4	3,337	0.999
CDH13	99.8	3.326	0.997
RASSF1	100.6	3.308	0.992
ATM	101.3	3.291	0.989
THBS1	99	3.346	0.992
PAX6	100.4	3.313	0.998
PAX5	100.6	3.308	1.000
PTEN	100.6	3.308	0.992
STK11	100.4	3.312	0.991
BCL2	99.9	3.324	0.994
CASP8	100.8	3.202	0.997
CD44	100.4	3.312	0.999
ESR	101	3,299	0.999
HER2	97.6	3,380	0.998
RARb	100.4	3.313	0.998
MGMT	99.9	3.324	0.994
MLH1	99.6	3.331	0.991
MSH6	101,4	3,327	0,996
MLH3	100,2	3,318	1,000
RPL13A	101	3,288	0,998
B2M	86,1	3,717	0,999
ACTB	100,2	3,318	1,000
PUM1	101,4	3,327	0,996

Dört aday referans genin invaziv meme kanseri, tümör çevresi ve sağlıklı normal meme dokusundaki ekspresyon seviyeleri doku ayırımı yapmadan ve yaparak ayrı ayrı değerlendirildi (şekil 20 ve 21).



Şekil 20: Aday referans genlerin 124 meme dokusunda ekspresyon seviyeleri: Değerler standart deviasyonlarıyla beraber Ct ortalamaları olarak gösterildi.



Şekil 21: Aday referans genlerin tümör, tümör çevresi ve normal meme dokusunda ekspresyon seviyeleri: Değerler standart deviasyonlarıyla beraber Ct ortalamaları olarak gösterildi.

İnvaziv meme kanseri, tümör komşu doku ve sağlam meme dokusu verilerinin tümü ele alındığında aday referans genlerin *NormFinder* ile sıralaması tablo 10’de gösterildi.

Tablo 10: *NormFinder* ile aday referans gen sıralaması.

Sıralama	Aday genler	Stabilite değeri	Standart hata
1	PUM1	0.259	0.104
2	RPL13A	0.525	0.074
3	B2M	0.774	0.076
4	ACTB	1.365	0.102

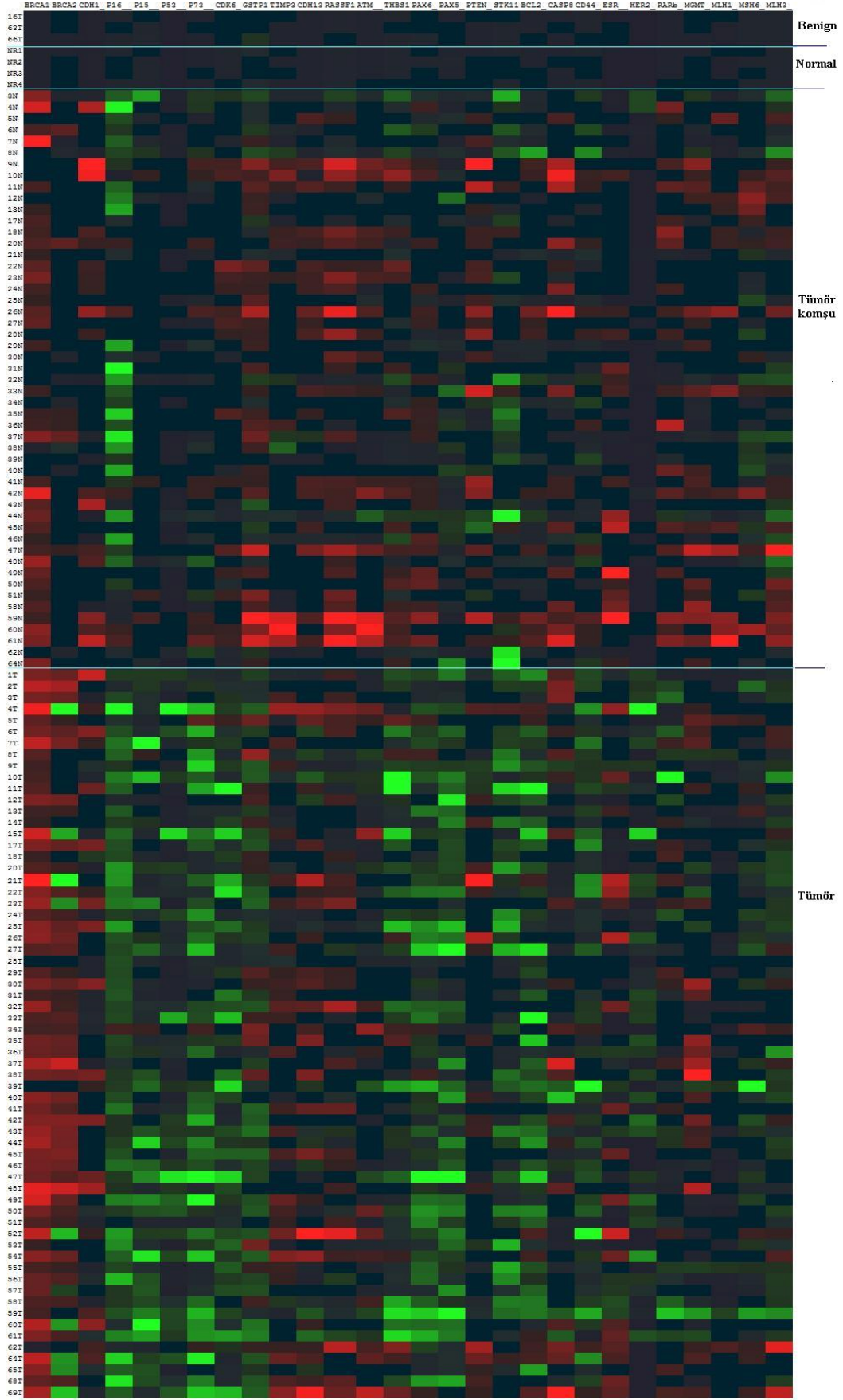
Tümör, tümör komşu, normal ve benign dokular arasında CASP8, ESR, MGMT, MSH6, MLH3 genlerin dışındaki genlerin ekspresyonları anlamlıydı ($p < 0.001$). Tümör, tümör komşu, normal ve benign dokular arasında gen ekspresyonları sıcaklık haritası (*heatmap*) şekil 22’de gösterildi.

Tümör dokusunda 28 gen ekspresyonu arasındaki ilişki tablo 11’da gösterildi.

Tablo 11: Tümör dokuda, 28 gen ekspresyonu arasındaki ilişki. +: 0.05, ++: 0.001 anlamlılık düzeyinde pozitif yönde ilişki, ↓: 0.05 anlamlılık, ↓↓: 0.001 anlamlılık düzeyinde negatif yönde ilişki

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
1		+	++			↓↓			↓↓	++	+	+	++				++	++		+		++	+				++		
2	+			+																+								++	
3	++									+	++										↓↓	+	↓				+		
4		++					++		+										↓↓		+	↓↓							
5						++	+		++					+	++	+				↓↓					+				
6	↓↓				++		++		++					++	++	++					++			++					
7				++	+	++			++					+	+	+					++								
8														+	+									++					
9	↓↓			+	++	++	++			↓↓					++				↓	↓			↓						
10	↓↓		+						↓↓		++	++	++	+			++	++	++			++	↓	+			+	+	
11	+		++							++		++	++	++		++	++	++	++			++			++	++	++	+	
12	+									++	++		++	++			++	++	++			++		++		++	+	++	
13	++									++	++	++		++		++	++	++	++	++	++		+		++	++	++	++	++
14					+	++		+		+	++	++	++		++	++	++	++	++	++	++	++	+		++	++	++	+	+
15					++	++	+	+						++		++					++	++		++		++	++	+	
16					+	++	+				++		++	++	++			+	++	++	++				++		++	+	
17	++				+				++	++	++	++	++	++				++	++			++		++	++	++	++		
18	++								↓	++	++	++	++	++		+	++		++	+		++		+		++	++	++	
19				++					↓	++	++	++	++	++		+	+	++				++		+			+		
20	+							+					++	++	++	++		+			+				++	+	+	++	
21			↓↓	+		++	++							++	++	++					+				++				
22	++		+	↓↓					↓	++	++	++	++	+			++	++	++					++		+	+		
23			↓			++		++		↓					++													+	
24										+	++	++	++	++			++	+	++			++				++	+		
25											++	+	++	++	++	++	++	++	++		++	++				++		+	
26	++		+								++	++	++	++	++		++	++		+		+		++	++		++	++	
27		↓↓								+	++	+	++	+	+	++		++	+	+		+	+	+	+	+	++	+	
28										+	+	++	++	+		+		++		++					++	++	+		

1: BRCA1, 2: BRCA2, 3: CDH1, 4: P16, 5: P15, 6: P53, 7: P73, 8: CDK6, 9: GSTP1, 10: TIMP3, 11: CDH13, 12: RASSF1, 13: ATM, 14: THBS1, 15: PAX6, 16: PAX5, 17: PTEN, 18: STK11, 19: BCL2, 20: CASP8, 21: CD44, 22: ESR, 23: HER2, 24: RARb, 25: MGMT, 26: MLH1, 27: MSH6, 28: MLH3



Şekil 22: Benign, normal, tümör komşu ve tümör dokusunda gen ekspresyonları sıcaklık haritası (*heatmap*)

Tümör dokusunda, ER pozitif ve ER negatif tümörlerde, tümör komşu dokuda histopatolojik özelliklerle ilişkili gen ekspresyonları sırasıyla tablo 12, 13, 14 ve 15’de gösterildi.

Tablo 12: Tümör dokusunda, histopatolojik özelliklerle ilişkili gen ekspresyonları. +: 0.05, ++: 0.001 anlamlılık düzeyinde pozitif, ↓: 0.05, ↓↓: 0.001 anlamlılık düzeyinde negatif yönde ilişki

	yaş	nekroz	lenf dm	kan dm	evre	tub. gr	nuk. gr	mit. gr	hist. gr	difer.	T	N	M	inv. gr
BRCA1					↓↓		↓↓		↓↓		↓	↓↓	↓↓	
BRCA2					↓↓	+			++			↓		
CDH1					↓↓		↓↓		↓↓	↓↓	↓	↓↓		↓↓
P16						+	+		++	+				
P15	+		+		+							+		
P53			+	+	++		+				++	+	++	
P73			+	+	++		++		++		+	+		
CDK6										+				+
GSTP1					++								+	
TIMP3	↓				↓↓	↓↓	↓		↓	↓↓		↓		↓↓
CDH13						↓↓	↓↓		↓↓	↓↓	↓	↓		↓↓
RASSF1						↓			↓	↓				↓
ATM	↓					↓↓				↓				↓
PTEN									↓↓	↓				
STK11														↓
CASP8					↓								↓↓	
CD44				++	+		+	+	+	+		++		+
ESR						↓↓	↓↓		↓↓	↓				
HER2			+		+		++				+	++		
RARb						↓↓			↓↓	↓↓				↓↓
MGMT					↓							↓	↓	
MLH1							↓↓		↓↓	↓			↓	↓
MSH6						↓↓								
MLH3							↓↓						↓↓	

Tablo 13: ER pozitif tümör dokuda, histopatolojik özelliklerle ilişkili gen ekspresyonları. +: 0.05, ++:0.001 anlamlılık düzeyinde pozitif, ↓:0.05, ↓↓:0.001 anlamlılık düzeyinde negatif yönde ilişki

	yaş	nekroz	lenf dm	kan dm	evre	tub. gr	nuk. gr	mit. gr	hist. gr	difer.	T	N	M	inv. gr
BRCA1					↓↓		↓					↓↓	↓↓	
BRCA2			↓		↓↓							↓↓		
CDH1			↓		↓↓	↓	↓↓		↓	↓	↓	↓↓		↓↓
P15	+	+												
P53			+	+	++					++		+		
P73												+		
GSTP1					++			+				+	+	
TIMP3				↓						↓↓				↓↓
CDH13										↓				↓
ATM					↓	↓								
STK11					↓			↓						
BCL2				+					↓	↓				↓
CASP8														↓↓
CD44				+			+							
ESR						↓	↓		↓↓	↓				
HER2			+	+	++							++		
RARb										↓↓				
MGMT					↓↓							↓		
MLH1							↓↓		↓	↓				↓
MSH6	↓					↓↓								
MLH3							↓↓		↓↓				↓↓	

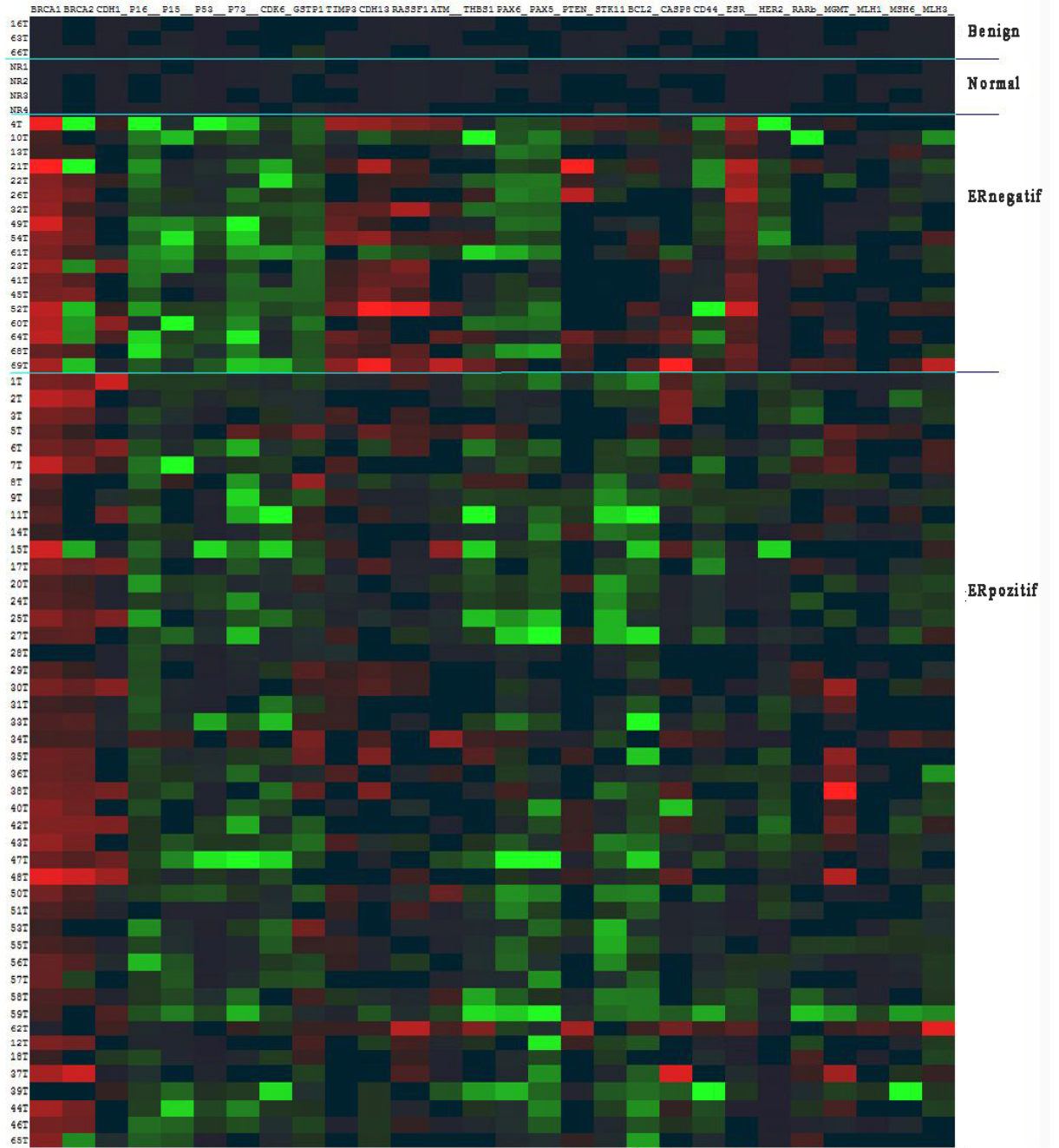
Tablo 14: ER negatif tümör dokuda, histopatolojik özelliklerle ilişkili gen ekspresyonları +: 0.05, ++: 0.001 anlamlılık düzeyinde pozitif yönde ilişki, ↓: 0.05 anlamlılık ↓↓: 0.001 anlamlılık düzeyinde negatif yönde ilişki

	nekroz	kalsif.	lenf dm	kan dm	evre	tub. gr	hist. gr	difer.	T	N	M	inv. gr
BRCA1					↓		↓↓			↓		
BRCA2							+					
CDH1					↓					↓		
P16		+					++					
P15			++							+		
P53					++				+	+		
P73			+		++				+	+		
TIMP3					↓					↓↓		
CDH13	↓							↓				
RASSF1	↓							↓↓				↓↓
ATM	↓		↓		↓↓							
THBS1				↓	↓							
PAX6				↓		↓↓						
STK11										↓↓		
BCL2	↓↓			↓								
CASP8				↓							↓↓	
CD44					+		+			++	+	+
ESR											+	
MLH1				↓								
MSH6					↓↓						↓	
MLH3											↓	

Tablo 15: Tümör komşu dokuda, histopatolojik özelliklerle 28 genin arasındaki ilişkisi. +: 0.05, ++: 0.001 anlamlılık düzeyinde pozitif yönde ilişki, ↓: 0.05 anlamlılık ↓↓: 0.001 anlamlılık düzeyinde negatif yönde ilişki

	yaş	kalsif.	lenf dm	evre	N	M	inv. gr
BRCA1			↓	↓↓	↓	↓↓	
BRCA2				↓			
CDH1							+
P15					+		
P53					+		
P73					+		
RASSF1		+					
THBS1		++					
CASP8							+
ESR	↓↓	++					

ER pozitif, ER negatif tümör örneklerinde gen ekspresyonları sıcaklık haritası (*heatmap*) şekil 23'de gösterildi.



Şekil 23: ER pozitif, ER negatif tümör örneklerinde gen ekspresyonları sıcaklık haritası (heatmap)

Evre'nin % 73.6'sını, histolojik grade'in %90.1'ini, nükleer grade'in %42,2'sini, invaziv grade'in %52,9'unu, diferansiasyonun %52.8'ini, nodal tutulumun %56.9'unu, metastazın %55.5'ini açıklayan model tanımları ve modeldeki her bir gen ekspresyonlarının modele etkisi sırayla tablo 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22'de gösterildi.

Tablo 16: Evre modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

	B	p	%95 CI
Model A	0,615	0.001	0.252 - 0.979
GSTP1	0.067	0.001	0.03 - 0.104
TIMP3	0.023	0.046	0 - 0.046
MLH3	0.021	0.048	0 - 0.043
P16	0.017	0.034	0.001 - 0.033
BRCA1	-0.016	0.000	(-0.023) - (-0.009)
CASP8	-0.015	0.010	(-0.026) - (-0.004)
ATM	-0.013	0.031	(-0.025) - (-0.001)
P15	0.012	0.029	0.001 - 0.023
CDK6	0.012	0.047	0 - 0.024
CDH13	-0.011	0.051	(-0.023) - (0)
P73	0.010	0.004	0.003 - 0.017
BRCA2	-0.008	0.000	(-0.012) - (-0.004)
CDH1	-0.004	0.014	(-0.007) - (-0.001)
ESR	0.004	0.000	0.002 - 0.006
HER2	0.003	0.045	0.001 - 0.002

Tablo 17: Histolojik grade modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

	B	P	%95 CI
Model B	1.678	0.000	1.434 - 1.922
STK11	-0.029	0.000	(-0.039) - (-0.019)
MLH3	-0.015	0.028	(-0.028) - (-0.002)
BCL2	-0.016	0.000	(-0.009) - (-0.023)
THBS1	0.014	0.011	0.004 - 0.025
RARB	-0.010	0.046	-0.020 - 0.000
CASP8	0.009	0.001	0.004 - 0.015
CDH13	0.009	0.006	0.003 - 0.015
P16	0.009	0.049	0.000 - 0.019
BRCA2	0.007	0.000	0.005 - 0.009
PAX5	0.006	0.022	0.001 - 0.010
P73	0.005	0.021	0.001 - 0.010
P53	-0.002	0.001	(-0.003) - (-0.001)
ESR	-0.002	0.003	(-0.003) - (-0.001)

Tablo 18: Nükleer grade modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

	B	P	%95 CI
Model	1.909	0.000	1.607 - 2.211
MLH3	-0.036	0.001	(-0.058) - (-0.015)
MSH6	0.016	0.010	0.004 - 0.027
CASP8	0.015	0.005	0.005 - 0.025
BRCA1	-0.008	0.012	-0.013 - (-0.002)
BCL2	-0.007	0.061	(-0.001) - (-0.014)
ESR	-0.001	0.048	(-0.003) - (0.000)

Tablo 19: İnvaziv grade modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

	B	P	%95 CI
Model D	2.020	.000	1.666 – 2.374
RARb	-0.016	0.001	(-0.025) – (-0.007)
RASSF1	-0.018	0.058	(-0.036) – (0.001)
STK11	-0.013	0.025	(-0.025) – (-0.002)
TIMP3	-0.012	0.030	(-0.022) – (-0.001)
CDK6	0.009	0.032	0.001 – 0.17
PAX5	0.007	0.040	(0.000) – (0.013)
BCL2	-0.01	0.006	(-0.003) – (-0.016)
P53	-0.001	0.019	0.000 – 1.666

Tablo 20: Diferansiyasyon modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

	B	P	%95 CI
model	2.096	0	1.867 - 2.325
STK11	-0.019	0.002	(-0.031) – (-0.008)
TIMP3	-0.018	0.003	(-0.030) – (-0.007)
RARb	-0.016	0.002	(-0.025) – (-0.006)
CDK6	0.012	0.01	0.003 - 0.021
PAX5	0.009	0.009	0.002 - 0.015
BCL2	-0.009	0.017	(-0.002)- (-0.016)
CASP8	0.007	0.054	(-0.001)- 0.009
P53	-0.001	0.056	(-0.002) - 0.000

Tablo 21: Nodal tutulum modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

	B	P	%95 CI
model	-0.566	0.028	(-1.066) – (-0.065)
BRCA1	-0.180	0.001	(-0.027) – (-0.008)
P16	0.019	0.043	0.001- 0.037
P15	0.017	0.018	0.003 – 0.032
ATM	-0.016	0.036	(-0.031) (-0.001)
CDK6	0.011	0.117	(-0.003) – 0.026
CDH1	-0.010	0.000	(-0.015) – (-0.006)
BRCA2	-0.006	0.027	(-0.012) – (-0.001)
ESR	0.004	0.001	0.002 – 0.006

Tablo 22: Metastaz modelinde yer alan gen ekspresyonlarının etkisi.

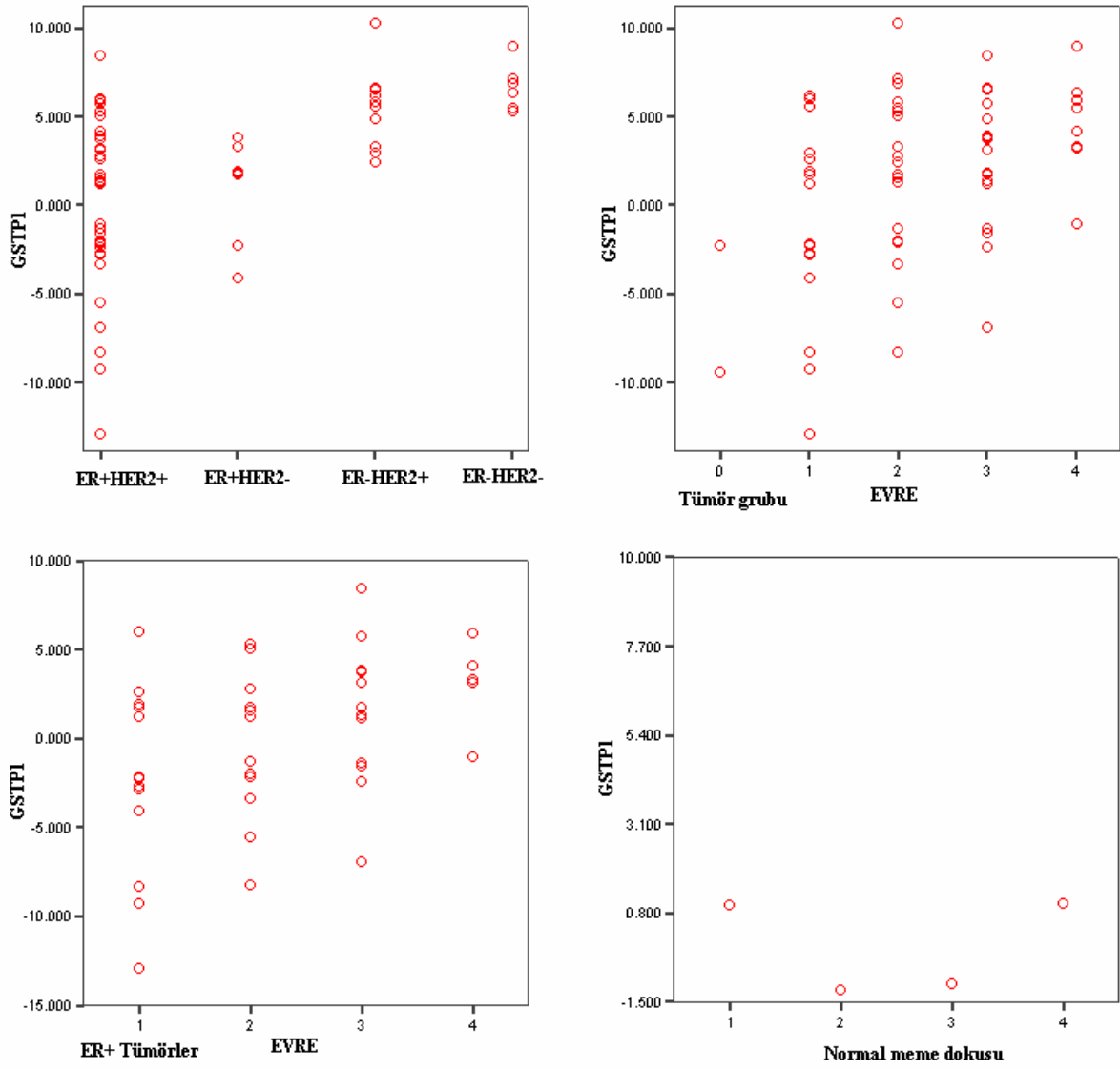
	B	P	%95 CI
model	0.0462	0.029	(-0.054) – 0.147
CASP8	-0.0094	0.000	(-0.013) – (-0.005)
CDH13	-0.0072	0.001	(-0.011) – (-0.003)
ATM	-0.0058	0.037	(-0.011)- (0.000)
MSH6	0.0052	0.049	0.000- 0.011
P73	0.0052	0.050	(-0.002) – (-0.004)
TIMP3	0.0037	0.045	0.000 – 0.007
HER2	-0.0032	0.013	0.002- 0.007
P53	0.0028	0.048	0.000 - 0.006
CDH1	-0.0024	0.000	(-0.004) – (-0.001)

Histolojik tipler ve gen ekspresyonları arasında ayırım analizi yapıldığında; CDH1 ve TIMP3'ekspresyonları birlikte değerlendirildiğinde histolojik tipler arasındaki ayırımın % 51.4'ünü açıklayabilir ve istatistiksel olarak çok anlamlıdır (p: 0.000, özdeğer [*eigenvalue*] 1.057). Histolojik tiplerin ayırımında CDH1 % 80.3, TIMP3 % 76.4 oranında önemlidir. Yapı matriksine göre de ayırma fonksiyonu ile en yüksek korelasyon CDH1 (.662) ve TIMP3 (.614)'tür. İlk gruplamaya göre vakaların % 49.6'sında doğru sınıflama yaptığı görüldü.

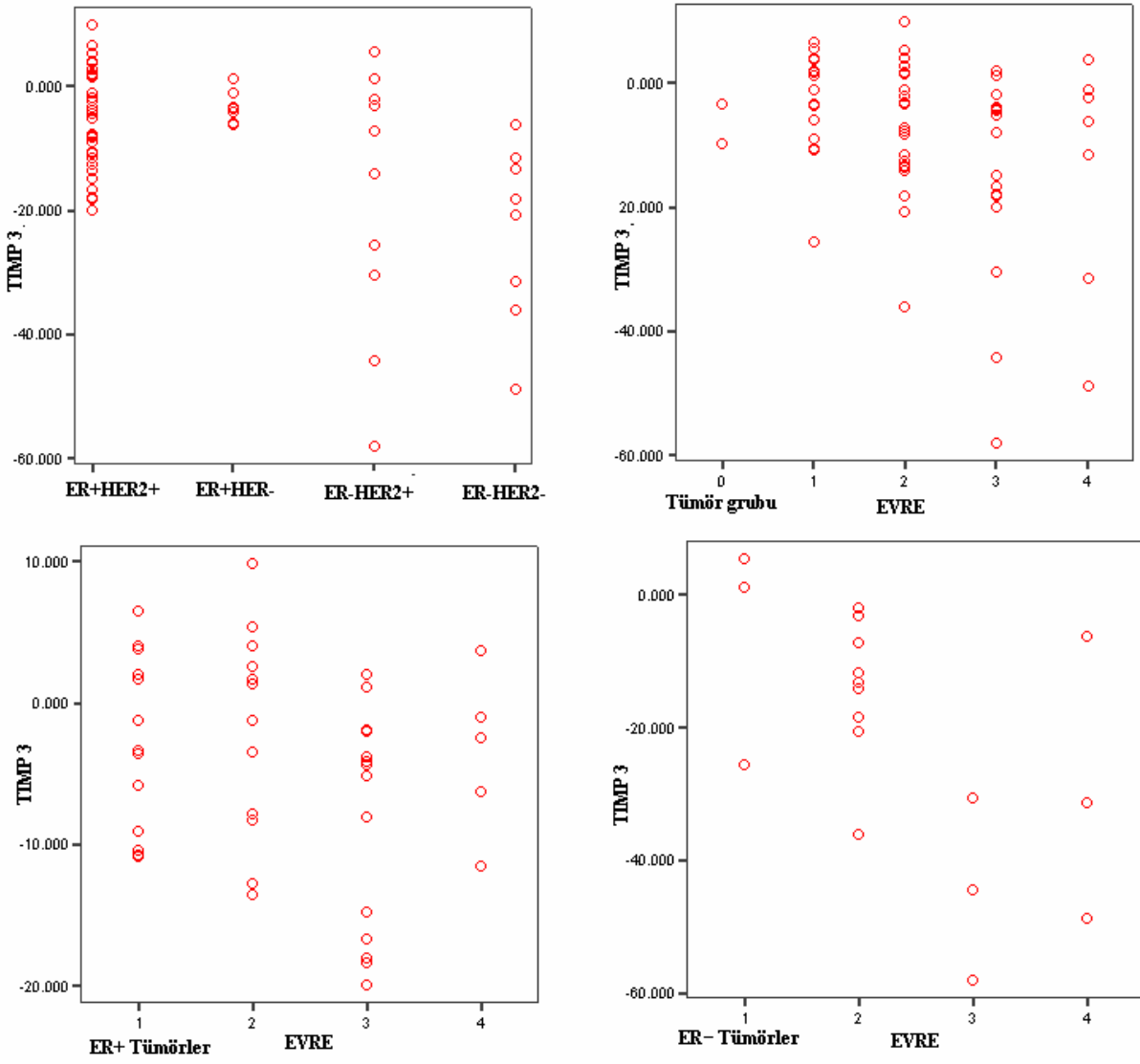
Östrojen reseptörünün varlığına göre gen ekspresyonları arasında ayırım analizi yapıldığında; BRCA1, GSTP1, CD44 ve ESR genlerinin ekspresyonlarının birlikte değerlendirilmesi tümörleri ER varlığına göre % 95.9'unu anlamlı olarak gruplama yeteneğindedi (p: 0.000, özdeğer: 4.476). Bu ayırma ESR'nin %89, BRCA1'in %33, GSTP1'in %61, CD 44'ün % 34 katkısı vardı.

Tümörlerin östrojen ve HER2 reseptörü birlikteliğini (ER+HER2+, ER+HER2-, ER-HER2+, ER-HER2-) temsil eden gen ekspresyon değişikliklerinin araştırılmasında kullanılan ayırım analizde ise; GSTP1, CDH13, ESR, HER2 gen ekspresyonları birlikte değerlendirildiğinde grupların % 81.5'ini anlamlı olarak (p: 0.000, özdeğer: 4.443) açıklayabildiği görüldü. Bu gruplamada ESR % 88.5, GSTP1 % 48.8, CDH13 % 24.1, HER2 % 13.4'ü oranında önemlidir. Yapı matriksine göre ayırma fonksiyonu ile gen ekspresyonları arasındaki korelasyon ise ESR (.840), GSTP1 (.318), CDH13 (.234), HER2 (.111) olarak bulundu. İlk gruplamaya göre vakaların % 85.5'inde doğru sınıflama yaptığı görüldü.

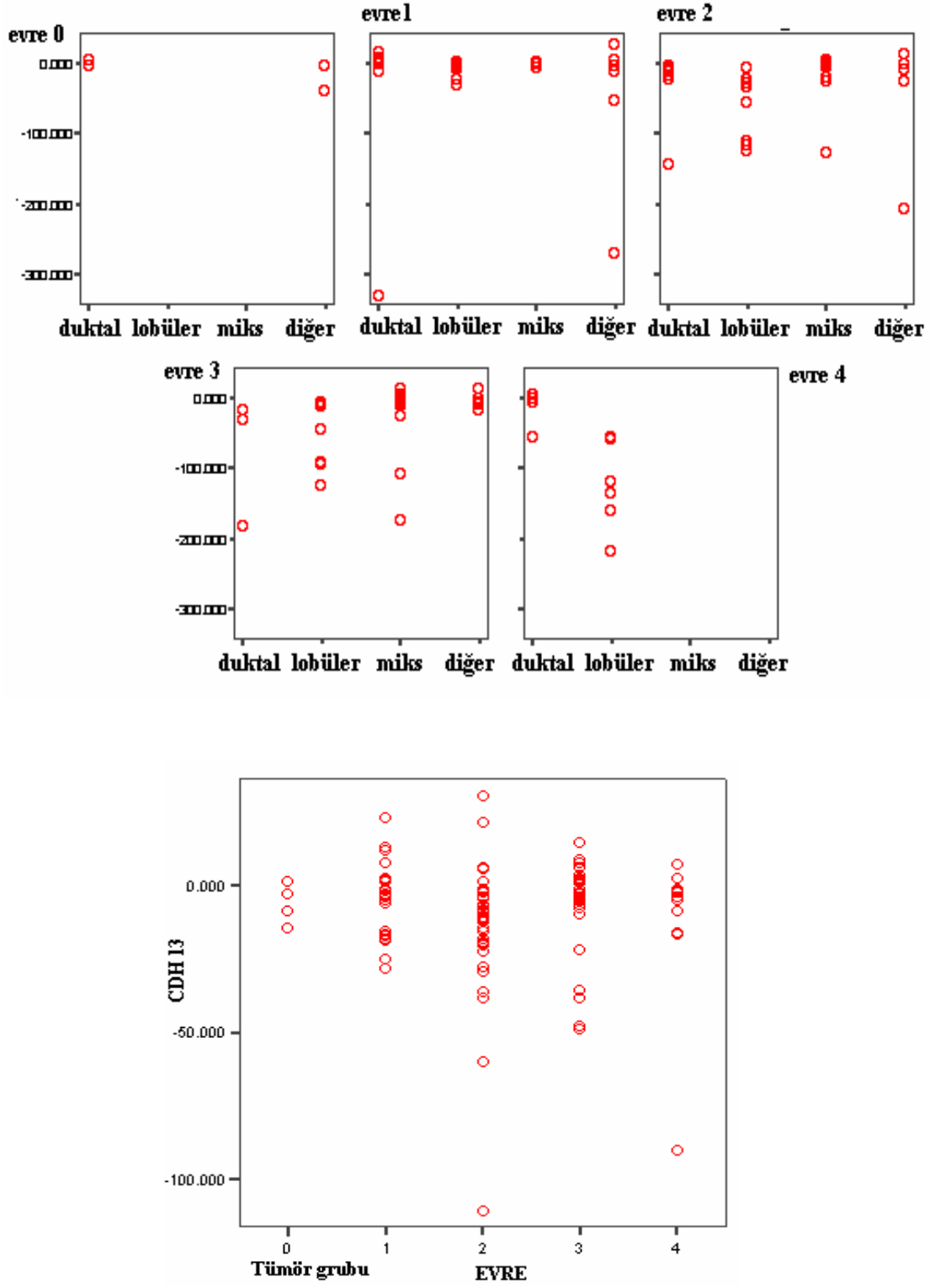
Hormon reseptörü ve evrelere göre GSTP1 ve TIMP3 ekspresyonu şekil 24 ve 25'te, histolojik tip ve evrelere göre CDH13 ekspresyonu şekil 26'da, histolojik grade ve hormon reseptörüne göre P16 ekspresyonu şekil 27'de, hormon reseptörüne göre BCL2 ekspresyonu şekil 28'de, metastaz ve CASP8 ekspresyonu şekil 29'da gösterildi.



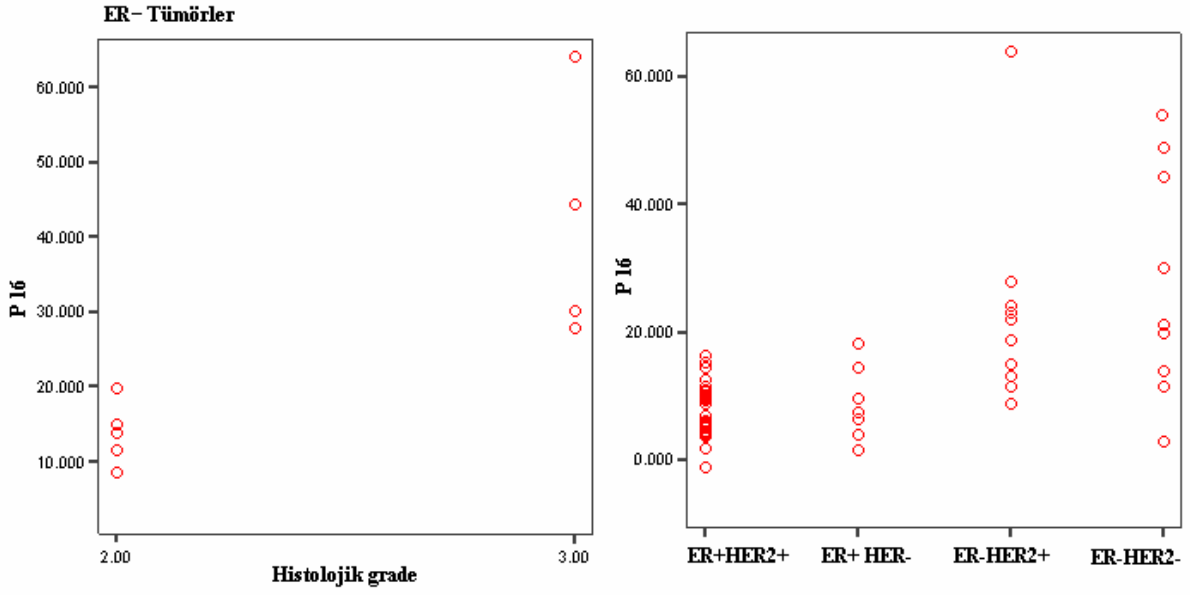
Şekil 24: Hormon reseptörü ve evre'lere göre GSTP1 gen ekspresyonları



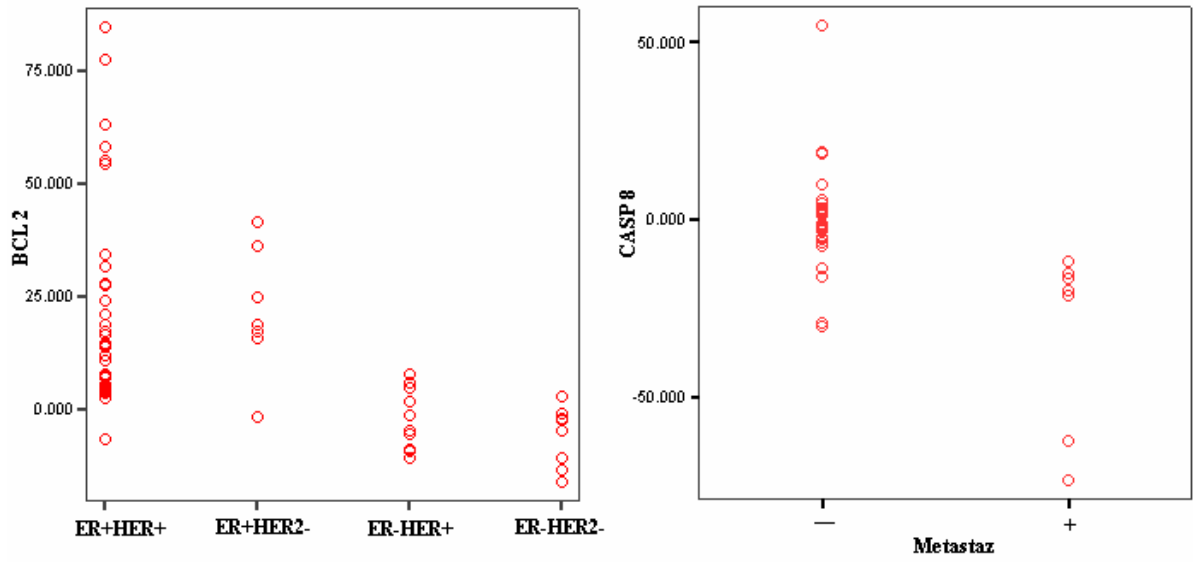
Şekil 25: Hormon reseptörü ve evre'lere göre TIMP3 gen ekspresyonları



Şekil 26: Histolojik tip ve evre'lere göre CDH13 gen ekspresyonları



Şekil 27: Histolojik grade ve hormon reseptörlerine göre P16 gen ekspresyonları



Şekil 28: Hormon reseptörleri ve BCL 2 ekspresyonu Şekil 29 : CASP8 ekspresyonu ve metastaz

V. TARTIŞMA

İnsan tümör örneklerinin analizinde genomik teknolojinin kullanılması klinik kararı ve prognozu iyileştirmeyi amaçlayan araştırmalara yeni kaynaklar sağladı. Son yıllarda meme kanserinden ölüm oranını azaltmanın yolunun meme kanseri başlangıcı ve progresyonunun moleküler yapısını anlamak ve bu bilgi ile moleküler temelli hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesini sağlamak olduğu inancı yaygınlaştı. Biz de bu araştırmada kanserin malign hücre özellikleri ile ilişkili gen ekspresyonlarının meme kanserinin klinik özellikleri ile ilişkisini araştırmayı hedefledik, genlerin klinik parametreleriyle bağımsız ilişkisinden daha çok hangi gen birlikteliklerinin kanserin biyolojik davranışını açıklayabileceğini keşfetmeye çalıştık. Bunu yaparken hem histolojik tip gibi klasik sınıflandırmaları hem de meme kanserinin moleküler sınıflandırmasında esas olan östrojen ve HER2 reseptörlerinin ekspresyonlarını temel alan sınıflandırmayı kullandık. Yapılan araştırma genel hatlarıyla 2 ana bölümde incelenebilir: Epigenetik ve gen ekspresyonu ile istatistiksel analiz.

Epigenetik olayların kanserin başlangıcı ve ilerlemesinden genetik anomaliler kadar sorumlu olduğu açık hale geldi 1990'ların başında kanser hücre hatlarındaki inaktif genlerin CpG adalarının metilasyonu ile birlikte olduğu ve ayrıca hemen hemen tüm insan kanser tiplerinde DNA metilasyonunun normal kontrolünü kaybettiğini gösterildi (139). Promotör bölgelerin hipermetilasyonunun genlerin susturulmasına nasıl katıldığını ve metilasyon kaybının kromozom yapısını nasıl değiştirdiğini tanımlamak zordur. Yine de kanser hücrelerinde DNA'nın anormal metilasyonun bulguları, klinikte potansiyel önemi olduğu yolundadır. Promotör bölgelerinin metilasyonundaki değişiklikler kanser hücreleri için potansiyel pozitif sinyaldir ve klasik yöntemlerle tespit edilebilir. Genlerin metilasyon sıklığı ve dağılımı, allellerdeki önemli CpG adalarının metilasyonunu gösteren MSP ile incelendi. Yöntem kalitatiftir ancak anormal metilasyonun varlığını belirlemede sen sivitesi ve spesifitesi açısından son derece etkindir. Bu çalışmada hücre siklus genlerinden P16 ile invazyon ve metastazda önemli CDH1 genlerinin meme kanserinin histolojik tipleri ve evreleri ile olan ilişkisi araştırıldı. P16 siklin bağımlı kinaz inhibitörü Rb fosforilasyonu yoluyla G1'den S fazına geçişi düzenler (140). Bir çok kanserde homozigot delesyonla oluşan P16 kaybı ya da nokta mutasyonu bulunur. Yapılan çalışmalarda meme kanseri hücre hatları ve primer meme kanserlerinin %20-30'unda 5'promotör'un ve ekson 1'in metilasyonu gözlemlendi (141, 142). Ancak var olan metilasyonun çeşitli klinik parametrelerle ilişkisi gösterilmedi. Bizim çalışmamızda invaziv meme kanserinin %14,30'unda P16 metilasyonu saptanırken histolojik tipler arasında P16 metilasyonunda anlamlı

bir fark yoktu. Evre 0'daki metilasyon sıklığının yüksekliği karsinogenezin erken aşamalarında P16 metilasyonu olan kanser hücrelerin selektif büyüme avantajı kazandırması ile uyumludur.

CDH1 geni epitel dokuda hücre yüzey adezyon molekülünü kodlar (143). Önemli bulgular CDH1 proteinin ekspresyon ve fonksiyon kaybı meme kanserinde proliferasyon, invazyon ve metastaza katkıda bulunduğunu gösterdi (144). CDH1 ekspresyon ve fonksiyonun kaybında klasik mutasyon ve delesyonlar açıkça önemli bir rol oynar (145, 146). Ayrıca bazı meme kanseri hücre hatlarında ve primer meme kanserlerinin yaklaşık %50'sinde metilasyon ile CDH 1 geninin epigenetik olarak susturulduğu (147, 148), ekspresyon kaybı ile tümör progresyonu ve azalmış yaşam süresi ile birlikteliği gösterildi (149). Bizim çalışmamızda histolojik ve klinik özellikleri ile daha heterojen bir grubu oluşturan lobüler kanserlerde CDH 1 geninin metilasyon sıklığı anlamlı olarak fazlaydı, Bae ve arkadaşlarının yaptığı araştırma ile uyumluydu (150). CDH1'in evre 2 ve 3'te metilasyon sıklığı dikkat çekicidir, invazyon ve metastaz yeteneğini kazanmasıyla ilgilidir. Evre 4'te bu genin metilasyon yüzdesinin azalması tümör hücresinin sekonder organlarda hücre adezyonunun yeniden başlaması düşüncesi ile uyumludur (151). Çevre normal dokudaki metilasyonun varlığı (%25) tümör agresyonu ile ilgilidir (152). CDH1 geninin her iki allelinin metillendiği durumlarda metilasyon ve ekspresyon arasında saptanan anlamlı korelasyon bu genin düzenlenmesinde epigenetik mekanizmaların önemli olduğunu göstermektedir.

Son yıllarda teknolojiye ilerlemeler karsinogenez sürecinde gelişen moleküler değişiklikleri saptama şansını arttırmaktadır. Bu teknolojilerin başında kantitatif RT-PCR gelmektedir. Kantitatif RT-PCR meme kanseri araştırmalarında sıklıkla kullanılan değerli bir tekniktir. Ancak protokolün standardizasyonu, kullanılan reaktiflerin seçimi, deneyin tasarısı ve verilerin değerlendirilmesi özel dikkat gereklidir (153).

Deney sırasında kullanılan primer ve problemlerin niteliği deneyin güvenilirliği ile doğrudan ilişkilidir. Bu araştırmada modifiye edilmiş RNA nükleotidlerinden (*locked nucleic acid*) (LNA) oluşan hidroliz problemleri tercih edildi. LNA nükleotidinin riboz parçası 2' ve 4' karbonları bağlayan ekstra bağlayan köprü ile modifiye edilir. Köprü 3'yapısal konformasyonda ribozu kitler, bazların düzenini ve iskelet yapısını organizasyon öncesi güçlendirir. Bu yapı oligonükleotidlerin termal stabilitesini anlamlı olarak artırır (154).

Standart eğriyi kullanan absöüt kantitasyon zaman alıcı ve zahmetliyen incelenen genin metabolik olaylar, hormonlar, hücre döngüsü gibi hücre sel varyasyonlardan etkilenmeyen genin/genlerin mRNA miktarına direk olarak oranlanması daha kolay ve daha kesindir. Nispi kantitasyon olarak bilinen bu yöntemin güvenilirliğini etkileyen en önemli faktör verilerin

normalizasyonunda izlenen yoldur. Normalizasyonda günümüzde geçerli olan yöntem referans genlerin kullanılmasıdır (155). Teorik olarak referans olarak kullanılan genler in vivo ve in vitro deney koşullarından etkilenmeden eksprese edilmelidir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar referans olarak önerilen genlerin bir kısmının ekspresyonunun diferansiasyon, kanser progresyonu, hormonal metabolizma gibi durumlarda değiştiğini göstermiştir (28, 153). Bu nedenle de her bir deney kurgulanırken uygun referans genleri tanımlamak gereklidir. Bu özellikle biyolojik örnekler ile gerçekleştirilen gen profili ve altgrup analizlerinde küçük farklılıklar araştırıldığında önemlidir. Reaksiyonlarda kullanılan enzim verimliliklerindeki değişikliklere, RNA miktarındaki ve kalitesindeki farklılıklara olan duyarlılığı azaltmak için bir referans genden daha fazla genin kullanılması yaygın olarak kabul edilen bir uygulamadır (156, 157). Meme kanserinin heterojenitesi uygun referans genin test edilmesini zorunlu kılar. *NormFinder* referans gen seçiminde internet üzerinden ulaşılabilen serbest bir programdır ve bu araştırmada kullanılmıştır. Normalizasyon için en iyi geni araştırırken her bir aday referans genin stabilite değerini belirler. Bu değer, o genin normalizasyonda kullanılması durumunda ortaya çıkacak olan sistemik hatayı değerlendirmede kullanılan tahmini ekspresyon varyasyonları için direk ölçüdür. Az sayıdaki örnekle yapılan bir çalışmada normal meme dokusu ve meme tümöründeki veri normalizasyonunda TBP, RPLP0 ve PUM1 kullanılması önerilmekle birlikte (158). 124 örnekle gerçekleştirilen bizim araştırmamızdaki veriler tümör, tümör çevre dokusu ve normal dokunun birlikte değerlendirildiği durumlarda iki gen kullanılacaksa PUM1 ve RPL13A, tek gen kullanılacaksa PUM1 genlerinin kullanılabileceğini göstermiştir. Şekil 21’de referans gen olarak sık kullanılan ACTB, B2M gibi genlerin tümör, tümör çevresi ve normal dokuda ekspresyonlarının değiştiğini görülmektedir, ki bu yanlış verilerin elde edilmesinin başlıca nedenidir. İnvaziv meme kanseri, tümör komşu doku ve sağlam meme dokusu verilerinin tümü ele alındığında aday referans genlerin *NormFinder* ile sıralaması tablo 10’da gösterildi. Bu aşamadaki veriler deneyin kurgulanırken araştırmaya dahil edilen dokuların niteliğine göre referans genlerin seçilmesi ve stabilitesinin test edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Kantitatif RT-PCR deneylerinin çoğu standart eğri tasarısını içermez ve de amplifikasyon verimliliğini tahmin eden yöntemi kullanmaz. Biz real time PCR’ın verimliliğinin oran tahmininde anlamlı bir etkisi olduğundan uygun kalite kontroller olmaksızın real time verilerinin güvenilir olmayacağını düşünüyoruz. Örneğin PCR %80 amplifikasyon verimliliğine sahipse (PCR ürünü, döngü başına iki kere yerine $2^{0.8}$ kere artacaktır) sadece 3 ΔCt değeri, 8 kere yerine oranda 5.27 kere farklılığa dönüştürülecektir. Bu problem $\Delta\Delta Ct$ ya da ΔCt

değerlerinde katlanarak büyür ve yorumlarda şiddetli yanlışlıklara neden olabilir. Bu nedenle insan doku havuzundan elde edilmiş üniversal referans RNA'dan çevrilmiş cDNA örneğinin seri dilüsyonları ile her bir genin amplifikasyon verimliliğini belirleyerek verilerin daha güvenilir karşılaştırılmasını sağladığımızı düşünüyoruz.

Her kantitatif RT-PCR çalışmasının kendi içinde değişkenlikleri taşıması nedeniyle değişkenleri azaltmak ve tekrarlanabilirliği güvence altına almak amacıyla her çalışma sırasında hem hasta örneklerinin hem de kontrol olarak kullanılan üniversal RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi ardışık olarak yapıldı. Her birinden örnek havuzları ve bunların dilüsyon serileri oluşturuldu. Deney tamamlanıncaya kadar aynı örnek havuzu kullanıldı. Ayrıca örneklerin çift çalışılması, her çalışmaya aynı dilüsyon örneğinden 2 farklı konsantrasyonda kontrol RNA'nın dahil edilmesi çalışma içi ve çalışmalar arası değişkenlik katsayısını hesaplamamızı sağladı. Her iki konsantrasyon için de bu değişkenler düşük olması çalışmanın güvenilirliğini göstermesi açısından çok önemlidir.

Sıcaklık haritası (*heatmap*) genellikle mikroarray uygulamalarında sayısal değerlerin görselleşmesini sağlayan bir yöntemdir. Ancak bizim de araştırdığımız gen sayısının çokluğu nedeniyle verilerimizin anlaşılmasını kolaylaştırdı. Şekil 22 ve 23'te ilk 3 sıra benign sonraki dört sıra normal dokuları içermektedir. Şekil 22'de normal dokuyu sırasıyla tümör çevre ve tümör dokuları izlemektedir. Şekil 23'te ise normal dokudan sonra ER+ ve ER- tümör örnekleri yerleştirilmiştir. En parlak kırmızı gen ekspresyonunda azalmayı, en parlak yeşil gen ekspresyonunda artmayı, siyah renkler ise ekspresyonda bir değişiklik olmadığını göstermektedir. Normal ve benign dokularda tüm genler için renkler siyaha yakın tonlar olarak gözlenmektedir. Bunun yanı sıra komşu normal ve tümör dokuları arasında bazı genler için belirgin derecede bir fark göze çarparken, diğer bazı genler için ise komşu normal dokuların ekspresyon düzeylerinin sağlıklı normal dokudan daha çok ziyade tümör dokusuna benzemesi dikkat çekicidir. Karsinogenezde hücrel mikroçevrenin rolü tam olarak açıklanamamıştır. Erken çalışmalar stromal dokunun meme kanser hücrelerinin büyümesi ve diferansiasyonunu düzenlediğini (159, 160) çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ise meme kanserinin fibroblastlar, myofibroblastlar, lökositler ve myoepitelyal hücrelerden hücrelerden oluşan çevre stromal dokudan etkilendiğini gösterdi (161, 162, 163). Ayrıca meme kanserinin lenfositik infiltrasyon, fibrozis, anjio-lenfanjiogenez gibi prognostik anlamı olan histopatolojik özellikleri tümör mikroçevresinin rolünü göstermektedir. Normal ve kanser meme dokusundaki çeşitli hücre tipleri arasında etkileşime aracılık eden genler ve bunların meme karsinogenezindeki rollerinin bilgisi sınırlıdır (164). Yapılan çalışmalar heterozigozite kaybının yalnız kanser hücresinde değil

stromal hücrelerde de olduğunu gösterdi (165). Stromal hücrelerdeki bu genetik olaylar ile birlikte olan genler tanımlanmamıştır ve bunların meme karsinogenezindeki rolü henüz bilinmiyor.

Bizim araştırmamızda tümör çevre dokusunda incelenen genlerin tümünün ekspresyonları hem kanser dokusundan hem de normal dokusundan farklı olarak bulunmuştur. Ayrıca çevre dokudaki BRCA1'in evre, nodal tutulum ve metastazla, BRCA2'nin evre ile negatif ilişkisi, CDH1 geninin invaziv grade ile p15, p53 ve 73'ün evre ile CASP8'in invaziv grade ile pozitif ilişkisi stromal değişikliklerin tümör invazyon ve metastazında olduğu kadar karsinogenezin erken basamaklarında da rolü olduğunu desteklemektedir.

Bu araştırma kantitatif RT-PCR ile hem yüksek sayıda genin eş zamanlı olarak çalışılması hem de klasik prognostik faktörleri açıklayan gen ekspresyon birlikteliklerini açıklayan algoritma yaklaşımıyla yenidir. BRCA2, P16, P53, P73, CDH1, THBS1, PAX5, STK11, BCL2, CASP8, ESR, RARb, MLH3 ekspresyon değişikliklerinin birlikte değerlendirilmesi histolojik grade'in % 90.1'ini, BRCA1, BRCA2, CDH1, P16, P15, P73, CDK6, GSTP1, TIMP3, CDH13, ATM, CASP8, ESR, HER2, MLH3 evre'nin % 73.6'sını, BRCA1, BCL2, CASP8, ESR, MSH6, MLH3 nükleer grade'in % 42,2'sini, P53, CDK6, TIMP3, RASSF1, PAX5, STK11, BCL2, RARb invaziv grade'in % 52,9'unu, P53, CDK6, TIMP3, PAX5, STK11, BCL2, CASP8, RARb diferansiasyonun % 52.8'ini, BRCA1, BRCA2, CDH1, P16, P15, CDK6, ATM, ESR lenf nodu tutulumunun % 56.9'unu, CDH1, P73, P53, TIMP3, CDH13, ATM, CASP8, HER2, MSH6 metastazın % 55.5'ini gen ekspresyon değişiklikleri ile açıklanabileceği gösterildi. Ayrıca CDH1 ve TIMP3'ün gen ekspresyon değişiklikleri ile meme kanserinin histolojik tiplerine göre gruplandırılmasında % 51.4; ESR, HER2, GSTP1 ve CDH13 gen ekspresyon değişikliklerinin ise meme kanserinin hormon reseptörüne göre (ER+HER2+, ER+HER-, ER-HER+,ER-HER2-) gruplandırılmasında % 85.5 başarılı bulundu. Bu birliktelikler IVDMVA testlerinin keşif çalışmasına benzetilebilir ve alt gruplarda yüzlerce hastanın bulunduğu daha geniş hasta gruplarında geçerliliğinin kanıtlanması gereklidir. Bunun içinde en önemli yol klinik araştırmalarla birlikte denenmesidir.

Bu geniş kapsamlı algoritma modellerinin yanında gen ekspresyonlarının bağımsız faktör olarak düşünülüp klinik özelliklerle ilişkileri ve genlerin kendi aralarındaki ilişkileri yeni verileri sunmaktadır.

GSTP1 diğer verilerle uyumlu olarak östrojen reseptör ekspresyonuyla ters ilişkilidi (166). GSTP1 geninin metilasyonu prostat kanseri için sensitif ve spesifik biyomarkır olarak önerilmesine rağmen meme kanserlerinde yapılan araştırma azdır (167). ER negatif tümörlerde

immunhistokimya ile yapılan önceki bir çalışmada GSTP1 ekspresyonunun daha iyi bir yaşamla birlikte olduğu gösterildi (168). Bizim araştırmamızda GSTP1 ekspresyonu artışının ER negatif tümörlerde klinik parametrelerle ilişkisi yoktu, fakat ER pozitif tümörlerde evre artışı, nodal tutulum ve metastaz varlığı ile ilişkiliydi (tablo 13). ER pozitif yüksek evre tümörlerde yüksek ekspresyon eğilimi (şekil 24), ER pozitif tümörlerde ekspresyon artışının kötü prognozla ilişkisini düşündürmektedir.

TIMP3 ekstrasellüler matriksin yıkımı sağlayan bir grup proteazın inhibisyonunda rol oynayan bir gendir (169). Bu çalışmada TIMP3 azalmış ekspresyonu tümörün yüksek evre ve tubuler yapı ile kötü diferansiasyonla ve azalmış östrojen reseptör ekspresyonu ile ilişkili olarak bulundu. Bu evre ile ilişkisini gösteren ilk çalışmadır. ER negatif meme kanserinde nükleer grade ve histolojik grade ile ilişkiyi gösteren çalışmaya rağmen biz bu parametrelerle ilişkiyi görmedik, ancak hem ER pozitif hem de ER negatif tümörlerde evre attıkça ekspresyonun azaldığını gösterdik (şekil 25). Diferansiasyon azaldıkça ekspresyonun da azalması daha agresif biyolojik davranışı gösteren tümörlerin özelliği olduğunu düşündürmektedir. Bu gene ait veriler nodal tutulumu olan meme kanseri hastalarında TIMP3 ekspresyonunun kısa azalmış sağ kalımla ilişkisini gösteren çalışma ile uyumludur (170). İnvitro çalışmalar TIMP3 geninin invazyonu baskıladığı, apoptotik yolakla ilişkili olduğunu gösterdi (171-173). BCL2 apoptozun negatif düzenleyicisidir ve apoptozu uyardığı önerilmiştir (174, 175). Bu çalışmada TIMP3 ile BCL2 arasında pozitif yönde ilişkisi gösterildi (tablo 11). Bizim verilerimizle uyumlu olarak TIMP3^{-/-} farelerde laktasyon sonrası epitel hücre apoptozunda artış gösterildi ve meme bezinde TIMP3'ün varlığının azalmış apoptozis ile birlikte olabileceği önerildi (176). Östrojen ile pozitif yöndeki birlikteliği önceki çalışmalarla uyumluydu (177, 178).

Meme kanserinde Bcl-2'nin apoptozla birlikte hücre diferansiasyonu ve proliferasyonunda da önemli rol oynar. Ekspresyonunun östrojenle düzenlendiğini gösteren verilerimizde ER pozitif ve negatif tümörler arasında anlamlı ekspresyon farkı vardı (p=.0000). Hormon reseptör durumuna göre BCL2 ekspresyonu şekil 28'de gösterildi. Önce yapılmış çalışmalarla uyumlu olarak iyi diferansiye tümörlerde ekspresyon daha yüksekti. Ayrıca histolojik, nükleer grade ve invaziv özelliklerle korelasyonu vardı (tablo 17, 18, 19, 20) (179, 180). Bu veriler BCL2'nin yalnızca apoptozu inhibe etmediği, aynı zamanda proliferasyonu da engellediği görüşlerini desteklemekte tümörün agresif biyolojik davranışında BCL2 kaybının önemli olduğunu göstermektedir (181, 182). Apoptozda önemli rolleri olan diğer grup gen kaspazlardır, apoptozun başlangıcında rol alır. Anormal apoptotik düzenleme karsinogenez ve tedavi direnciyle ilişkilidir (183) ile birliktedir. Bizim verilerimizde CASP8 ekspresyon azalması

özellikle evre 4, metastazlı vakalarda belirgindi (tablo 12) (şekil 29). tümör çevre dokuda CASP8 tümörün invaziv özellikleriyle ilişkiliydi (tablo 15).

CDH1 tümör hücre hücre adezyonuna aracılık eder ve ekspresyonunun kaybı meme kanserinde kötü prognozla birlikte (184, 185). Meme kanserinde CDH1 gen ekspresyonunun azalması ya da olmamasının metatetik davranış, diferansiasyonun kaybı, invazyon özelliklerinin kazanımı, artmış tümör grade ile birlikteliği gösterildi (186). Lobüler kanserlerin bir özelliği ile ilgili görülürken daha sonra araştırmacılar tarafından mutasyonel değişikliklerin lobüler kadar duktal kanserlerde de olduğunu buldu (187, 188). Bizim çalışmamızda da diğer veriler ile uyumlu olarak nükleer grade, evre, tümör büyüklüğü ve nodal tutulum ile CDH1 ekspresyonu arasında ters ilişki vardı. Ayrıca tümör çevresinde de ekspresyon kaybının da invazyon derecesi ile ilişkiliydi (tablo 15). Bu değişkenler arasında tümör büyüklüğü ve evre ilişkisi yeni bulgudur. Lobüler tümörlerdeki ekspresyon kaybı daha fazladır ve tümör progresyonunda önemli bir gen olduğunu doğrulayan şekilde evre ilerledikçe ekspresyonun azalma eğilimi vardır.

CDH13 gen ekspresyonunun meme akciğer ve over kanserlerinde anlamlı olarak azaldığı gösterildi (189-190). Erken evrede görüldüğü belirtildi (186). Bizim verilerimiz metastaz öncesi ekspresyon değişikliğini göstermektedir (şekil 26).

P16 gen ürünü siklin bağımlı kinaz inhibitörü 4'e bağlanır ve bunun siklin D ile etkileşimde bulunmasını önleyerek hücre siklusunun G1 fazını geçmesini önler (192). P16'nın büyümeyi önleyici etkileri fonksiyonel RB proteinin varlığına bağlıdır (192, 193).

Bununla ilişki olarak RB proteini negatif hücrelerde P16 düzeyinin yüksek seviyelerinin olabileceği (194-198), RB ekspresyonunun P16 ektopik ekspresyonu ile transkripsiyonel olarak baskılanabileceği (199) ve yüksek P16 düzeylerinin RB'nin düşük ekspresyonunun ya da RB proteinin inaktivasyonunun göstergesi olabileceği önerildi (200). Bu önerileri destekleyen bizim verilerimizde yüksek P16 mRNA seviyesi evre ve histolojik grade artışıyla, nodal tutulumla birlikteydi (tablo 16, 17, 21). Ayrıca bu birliktelik ER negatif tümörlerde daha belirgindi (şekil 27). Bu, P16 ekspresyon artışının meme kanser hücrelerinde proliferasyon için ER gereksinimini azaltabileceğini gösterebilir ve kötü prognozun işareti olabilir. P15 ekspresyonunun ise evre ve nodal tutulum ile birlikteliği vardı.

CDK 6'nın daha önceden astrositlerde gösterilen diferansiasyona etkisine rağmen meme dokusunda bu gen ve diferansiasyon arasında bir ilişki şimdiye kadar gösterilmedi (201). Bizim verilerimizde CDK6'nın hem invazyon hem de diferansiasyon arasındaki ilişki yenidir.

DNA tamir genlerinden olan MLH1, MSH6 ve MLH3 replikasyon hatalarını düzelterek genom bütünlüğünün sağlanmasına katkıda bulunur. Meme kanserinde MLH1 ekspresyon

kaybının ilaç direncinde rolü gösterilmiş olmasına rağmen klinik parametrelerle arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma yoktur (202).

Östrojen alfa reseptör gen (ESR) ekspresyonu meme kanser biyolojisi ile yakından ilişkilidir, örneğin ER kaybı daha agresif davranışı olan tümör tipini yansıtır. Ayrıca tümör dokuda ER ekspresyonu endokrin tedavide prognozun iyi göstergesidir. Bir çok araştırma ER ekspresyonu ile düzenlenen bir çok geni belirlemesine karşın meme tümörlerinin progresyonu ve proliferasyonunu açıklayan mekanizma hala tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (203-206). ER pozitif ve negatif kanserler arasında büyük moleküler farklılıklar vardır (şekil 23). Bizim örneklerimizde BRCA1, GSTP1, CD44 ve ESR gen ekspresyon değişiklikleri birlikte değerlendirildiğinde tümörleri östrojen reseptörünün varlığına göre %95.9'unu doğru olarak sınıflandığı görüldü. Bu veriler hastaların yönetiminde önemli olabilecek tümör davranışının anlamlı işaretlerini vermektedir.

Meme kanseri tek bir hastalık değildir, biyolojik olarak farklı hastalıkların topluluğudur. Meme kanserine bağlı denetimsiz hücre çoğalması genellikle genomik instabilite belirtileri ve belirli epitelyal özelliklerin ortadan kalkması gibi değişiklikleri sergiler. Bu yüzden kanser gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların ve her hastada tümörün özelliklerinin bilinmesi ve buna uygun tedavi yönteminin belirlenmesi önem taşır. İnsan kanser dokusuna uygulanabilecek her moleküler analitik yöntem prognostik/prediktif olma potansiyeline sahiptir. Farklı alt grupların farklı bilgileri olabileceğinden çeşitli moleküler sınıfları tanımlamak faydalı olabilir. Ayrıca özel grupları tanımlayan moleküler işaretler yeni terapötik hedeflerin ve tedavilerin keşfine yol açabilir. Bir çok genin birleştirilen ekspresyon değerleri klasik tek gen markırlarından daha doğru olarak moleküler sınıfları tanımlayabilir. Bu bakış açısıyla, bu araştırmanın dayanak noktası, tümörleri daha doğru olarak sınıflandırmak ve klasik histolojik parametrelerle ilişkisini belirlemek için bir çok gen ekspresyonunu ölçmek ve bu ölçümleri birlikte kullanmaktır. Aktarımsal (translational) araştırmanın bir örneği olan bu çalışma en büyük kısıtlılığı hasta izlem notlarının olmaması ve tümör alt gruplarının az sayıda olmasıdır. Sonuçların laboratuvar içi ve laboratuvarlar arasında üretkenliği değerlendirilmelidir ve farklı örneklerde farklı çalışmalarla doğrulanmalıdır.

VI: SONUC ve ÖNERİLER

Her geçen gün moleküler onkoloji alanındaki bilgi birikimi hızla artmakta ve kısa bir süre içinde, laboratuvar çalışmaları tıbbi uygulamalara dönüşmektedir. Riskli gruplarının belirlenmesi, yeni moleküler hedeflerin tanımlanması ile yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, gerek kemoterapiye gerekse radyoterapiye yanıtta bireysel farklılıkları belirleyen genetik çeşitliliğin ortaya konması ile kişiye özel tedavi yöntemleri gibi çalışmalar tıbbi uygulamaların örneklerindedir.

Moleküler biyolojik alanda baş döndürücü gelişmelerin yaşandığı günümüzde kanserli olgulardan elde edilen biyolojik örneklerden elde edilen genetik materyalin uygun koşullar altında saklanması, kısa ve uzun vadede yapılacak olan multidisipliner geniş çaplı araştırmalar için zengin bir kaynak oluşturmaya, verilerden kliniğe uyarlanan ticari testler klinik kullanıma sunulmaya başlamıştır.

Klinik verileriyle beraber, tümör dokularından elde edilen genetik materyalin depolanması ve kişisel bilgilerin güvenilir olarak arşivlenmesi, multidisipliner yaklaşım ile gerçekleştirilebilir.

Ulusal çapta; temel ve klinik bilim alanındaki akademisyenleri, hasta hakları ile ilgili sivil toplum örgüt üyelerini, hukukçuları, ilaç ve sanayi sektörünün temsilcilerini, sağlık bakanlığı temsilcilerini, içeren geniş bir platform kurulmalı,

Lokal ve bölgesel biyobankaların kurulması desteklenmeli ve özendirilmeli,

Uluslararası çalışmalara örnekler yerine verilerle entegre olabilecek prosedürler ve veri tabanları oluşturulmalı,

Bölgesel biyobankaların bağlanabileceği “Ulusal Biyobankalar”sağlık politikaları içine alınmalı, aynı zamanda genetik verilerin anlamı konusunda toplum bilinçlendirilmelidir.

VII. KAYNAKLAR

1. Peto R, Boreham J, Clarke M, et al: UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet* 2000; 355:1822
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. (HC). Hanahan D and Weinberg RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000: Vol. 100, 57–70.
7. Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. Growth factors. In *Cancer Medicine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), 1997: pp. 41–64.
8. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science* 1987: 235, 177–182.
9. Yarden, Y., and Ullrich, A. EGF and erbB2 receptor tumors. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 1988: 57, 443–478.
10. Hunter, T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997: 88, 333–346.
11. Rommel, C., and Hafen, E. Ras: a versatile cellular switch. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1988: 8, 412–418.
12. HC Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995: 81, 323–330.
13. Ghobrial IM, Witzig, TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:178-194.
14. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:401-410.
15. Vargo-Gogola T & Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews* 2007: *Cancer* 7, 659-672
16. Lawrence M, L. A. Harold, B.A. Bonnie Genes, Chromatin and Breast Cancer; Epigenetic Tale. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 2001: 6:169-182.
17. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349: 2042-54.
18. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007;39:457-66.
19. M.Widschwendter, P. A. Jones DNA Methylation and Breast Carcinogenesis. *Oncogene* 2002: 21; 5462-5482
20. Lehmann U. Langer F, et all. Quantitative Assessment hypermethylation during breast cancer development of Promoter *AJP* 2002: 160 No 2 (605-612)
21. S. A. Wajed, P. W. Laird, T. R. DeMeester DNA Methylation: An Alternative Pathway to Cancer. *Annals of Surgery* 2001: 234; 10-20
22. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-9
23. Heard E, Clerc P, Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet.* 1997;31:571-610.

24. Heard E, Avner P. Role play in X-inactivation. *Hum Mol Genet.* 1994;3 Spec No:1481-5
25. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J. Biol.Chem.* 2000: 275:2727-2732
26. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Statistical analysis of real-time PCR data *BMC Bioinformatics* 2006: 7:85
27. Klein D Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Mol Med* 2002: 8:257-260
28. Bustin SA Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays *Mol Endocrinol* 2000: 25:169-93
29. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FD Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends in Mol Med* 2003: 9:189-195
30. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994 (1996)
31. Gibson UE, Heid CA, Williams PM A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996: 6:995-1001 (1996)
32. Pfaffl MW A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR *Nucl Acids Res* 2001: 29:2002-2007
33. Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method *Methods* 2001: 25:402-408
34. Jacques BK, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes *Laboratory Investigation* 2005: 85: 154–159
35. Vandesompele Jo, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes *Genome Biology:* 2002: 3
36. Andersen CL Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets 2004: 64: 5245-5250
37. Sikorak K, et al. Genes, dreams and cancer. *BMJ* 1994: 308; 1217-21.
38. Spratt JS, Tabin GR. Gross anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS, eds. *Cancer of the breast.* 4th edition. Philadelphia. London: W.B.Saunders 1995: 22-42
39. Kalaycı G, Acarlı K, Demirkol K, Ertekin C. Meme anatomisi ve gelişmesi. *Genel cerrahi cilt 1. Türkiye, İstanbul.* Nobel: 2002: 537-542; 2002.
40. Osborne MP. Breast development and anatomy. In: Harris JR, Helleman S, Henderson IC, Kinve DW, eds. *Breast disease.* 2nd edition. Philadelphia: J.B Lippicott: 1991: 1-13.
41. Romrell LJ, Blend KI. Anatomy of the breast, axilla, chest wall and related metastatic sites. In: Blend KI, Copeland EM, eds. *The breast comprehensive management of benign and malignant disease.* 2nd edition. Philadelphia, London. W.B.Saunders: 1995: 16-21.
42. Hennighausen L, Robinson G Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005: 6: 715–725
43. McGee SF, Fiona Lanigan F, Emer Gilliga E& Bernd Groner B Mammary gland biology and breast cancer *EMBO reports* 2006: 7: (11) 1084-88

44. Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW The organising principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* 2002; 70: 537–546
45. O'Brien LE, Zegers MM, Mostov KE Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 531–537
46. Rodriguez-Boulan E, Salas PJ External and internal signals for epithelial cell surface polarization. *Annu Rev Physiol* 1989; 51: 741–754
47. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001, 414:105-111.
48. National Cancer Institute Breast Cancer Progress Report: Addressing the Recommendations of the Breast Cancer Progress Review Group, October 2004
49. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and trans differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:387-403.
50. Kordon EC, Smith GH. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development.* 1998 May;125(10):1921-1930.
51. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution *J. Clin. Invest.* 2007; 117:3155–3163
52. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-3988.
53. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. *Global Cancer Facts & Figures 2007.* Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.
54. Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. Epidemiology – identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev.* 2006;6:75-83.
55. Althuis MD, Dozier JD, WF A, et al. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int J Epidemiol.* 2005;34:405-412.
56. Haydaroğlu A, Dubova S, Özşaran Z, Bölükbaşı Y , Yılmaz R, Kapkaç M, Özdedeli E Ege Üniversitesinde Meme Kanseri: 3897 Olgunun Değerlendirilmesi *Meme Sağlığı Dergisi* 2005, Cilt 1 (1) 006-011)
57. <http://www.ism.gov.tr/kidem/index.html>. Erişim tarihi 20.12.2008
58. American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008.* Atlanta: American Cancer Society, Inc.
59. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al., eds. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/, based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER Web site, 2007. Erişim tarihi: 20.12.2008
60. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet.* Oct 27 2001;358(9291):1389-1399.
61. National Cancer Institute. *Genetics of Breast and Ovarian Cancer (PDQ).* Available at: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/breast-and-ovarian/healthprofessional>. Erişim tarihi 15.12.2008
62. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* Mar 1998;62(3):676-689.

63. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* May 2003;72(5):1117-1130.
64. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* Jul 13 2000;343(2):78-85.
65. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol.* Jun 15 2003;21(12):2397-2406.
66. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas.* Feb 28 2001;38(1):103-113; discussion 113-106.
67. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet.* Jul 20 2002;360(9328):187-195.
68. Shantakumar S, Terry MB, Teitelbaum SL, et al. Reproductive factors and breast cancer risk among older women. *Breast Cancer Res Treat.* May 2007;102(3):365-374.
69. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet.* Jun 22 1996;347(9017):1713- 1727.
70. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet.* Oct 11 1997;350(9084):1047-1059.
71. Li CI, Malone KE, Porter PL, et al. Relationship between long durations and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer. *JAMA.* Jun 25 2003;289(24):3254-3263.
72. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* Jul 17 2002;288(3):321-333.
73. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet.* Aug 9 2003;362(9382):419-427.
74. Stefanick ML, Anderson GL, Margolis KL, et al. Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA.* Apr 12 2006;295(14):1647-1657.
75. Zhang SM, Manson JE, Rexrode KM, Cook NR, Buring JE, Lee IM. Use of oral conjugated estrogen alone and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol.* Mar 1 2007;165(5):524-529.
76. Vacek PM, Geller BM. A prospective study of breast cancer risk using routine mammographic breast density measurements. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* May 2004;13(5):715- 722.
77. Barlow WE, White E, Ballard-Barbash R, et al. Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. *J Natl Cancer Inst.* Sep 6 2006; 98(17):1204-1214.
78. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* Jan 18 2007;356(3):227-236.
79. Byrne C, Schairer C, Brinton LA, et al. Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). *Cancer Causes Control.* Feb 2001; 12(2):103-110.

80. Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *JAMA*. Jul 12 2006;296(2):193-201.
81. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Weight control and physical activity in cancer prevention. *Obes Rev*. Feb 2002;3(1):5-8.
82. McTiernan A, Kooperberg C, White E, et al. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *JAMA*. Sep 10 2003;290(10):1331-1336.
83. Lahmann PH, Friedenreich C, Schuit AJ, et al. Physical activity and breast cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Jan 2007;16(1):36-42.
84. Dallal CM, Sullivan-Halley J, Ross RK, et al. Long-term recreational physical activity and risk of invasive and in situ breast cancer: the California teachers study. *Arch Intern Med*. Feb 26 2007;167(4):408-415.
85. The National Heart Lung and Blood Institute. Postmenopausal Hormone Therapy: Facts About Postmenopausal Hormone Therapy. http://www.nhlbi.nih.gov/health/women/pht_facts.htm.
86. International Agency for Cancer Research (IARC). IARC Handbook of Cancer Prevention. Volume 6: Weight control and physical activity. Lyon: IARC Press; 2002.
87. McTiernan A, Kooperberg C, White E, et al. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *JAMA*. Sep 10 2003;290(10):1331-1336.
88. Fentiman IS. Fixed and modifiable risk factors for breast cancer. *Int J Clin Pract*. Oct 2001;55(8):527-530.
89. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*. Nov 18 2002;87(11):1234-1245.
90. Terry MB, Zhang FF, Kabat G, et al. Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. *Ann Epidemiol*. Mar 2006;16(3):230-240.
91. Zhang SM, Lee IM, Manson JE, Cook NR, Willett WC, Buring JE. Alcohol consumption and breast cancer risk in the Women's Health Study. *Am J Epidemiol*. Mar 15 2007;165(6):667-676.
92. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA*. Nov 7 2001;286(17):2143-2151.
93. International Agency for Research on Cancer (IARC) monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon: IARC Press; 2004.
94. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA*. Jun 25 2003;289(24):3243-3253.
95. Anderson GL, Chlebowski RT, Rossouw JE, et al. Prior hormone therapy and breast cancer risk in the Women's Health Initiative randomized trial of estrogen plus progestin. *Maturitas*. Sep 20 2006;55(2):103-115.
96. US Preventive Services Task Force. Postmenopausal hormone replacement therapy for primary prevention of chronic conditions: recommendations and rationale. *Ann Intern Med*. Nov 19 2002;137(10):834-839.

97. Bosze P. Prognostic factors and staging the role of molecular markers *CME J Gynecologic Oncology* 2001 (6) 232-234
98. Denoix PF. Nomenclature classification des cancers [in French]. *Bull Inst Nat Hyg (Paris)* 1952;7: 743–748.
99. International Union Against Cancer. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Geneva, Switzerland: International Union Against Cancer; 1968.
100. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin*. 2006 Jan-Feb;56(1):37-47
101. Beahrs OH, Carr DT, Rubin P, eds. *Manual for Staging of Cancer*. Philadelphia: Lippincott; 1977.
102. Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, et al. *International Union Against Cancer (UICC): Prognostic Factors in Cancer*. New York, NY: Springer-Verlag; 1995.
103. Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RV, et al. *Prognostic Factors in Cancer*. 2nd ed. New York, NY: Wiley-Liss; 2001.
104. Gospodarowicz MK, O’Sullivan B, Sobin LH. *Prognostic Factors in Cancer*. 3rd ed. New York, NY: Wiley; 2006.
105. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York, NY: Springer; 2002.
106. Sobin LH, Wittekind C. *International Union Against Cancer (UICC) TNM Classification Of Malignant Tumors*. 6th ed. New York, NY: Wiley- Liss; 2002.
107. Greene FL, Sobin LH. The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J Clin*. 2008 May-Jun;58(3):180-90.
108. World Health Organization. *Histological typing of breast tumours*. 2nd edition. Geneva, Switzerland: 1981
109. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406:747-752.
110. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor sub types in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8418–8423.
111. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869–10874.
112. Pusztai L, Ayers M, Stec J et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:2406–2415.
113. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10393–10398.
114. Fan C, Oh DS, Wessels L et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:560–569.
115. Hu Z, Fan C, Oh DS et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006;7:96.
116. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367–5374.
117. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007;9:R65.

118. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:5678–5685.
119. R.E. Mansel et al. (eds.), *Metastasis of Breast Cancer*, Netherlands: Springer 2008 279–305
120. Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories and FDA Staff - In Vitro Diagnostic Multivariate Index Analysis (www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1610.pdf) erişim tarihi 23.12.2008
121. (<http://www.phgfoundation.org/news/3964/>) erişim tarihi 23.12.2008
122. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist*. 2006 Sep;11(8):868-77.
123. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, Muir B, Mohapatra G, Salunga R, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004;5:607–616.
124. Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W et al. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:4611–4619.
125. Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN et al. A two-gene expression ratio of ho meobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2006; 12:2080–2087.
126. Wang Z, Dahiya S, Provencher H, Muir B, Carney E, Coser K, Shioda T, Ma XJ, Sgroi DC. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:6327–6334.
127. (www.devicelink.com/ivdt/archive/08/11/008.html) erişim 23.12.2008
128. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817–2826.
129. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24:10.1200/JCO.2005.04.7985.
130. Sparano JA. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clin Breast Cancer* 2006; 7: 347–350.
131. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415:530-6.
132. Bogaerts J, Cardoso F, Buyse M, Braga S, Loi S, Harrison JA, Bines J, Mook S, Decker N, Ravdin P, Therasse P, Rutgers E, van 't Veer LJ, Piccart M; TRANSBIG consortium. Gene signature evaluation as a prognostic tool: Challenges in the design of the MINDACT trial. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:540–551.
133. Ross JS, Hatzis C, Symmans WF, Pusztai L, Hortobágyi GN. Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *Oncologist*. 2008 May;13(5):477-93.
134. Buyse M, Loi S, van't Veer L et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1183–1192.
135. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res*. 2006;8:R25.

136. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5287–5312.
137. Celebiler Cavusoglu A, Saydam S, Alakavuklar M, Canda T, Sevinc AI, Kılıc Y, Harmancioglu O, Kocdor MA, Kinay M, Alanyali H, Gorken I, Balcı P, Demirkan, Sakizli M, Güner G A pilot study for human tumor/DNA banking: returned more questions than answers. *Med Oncol* 2008; 25:471–473
138. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9821-6
139. Antequera F, Boyes J. and Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990; 62, 503-514
140. Liggett-Sidransky Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16 1197–1206
141. Herman JG Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D & Baylin SB Inactivation of the CDKN2/p16/ MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Research* 1995; 55 4525–4530
142. Woodcock DM, Linsenmeyer ME, Doherty JP & Warren WD DNA methylation in the promoter region of the p16 (CDKN2/ MTS-1/INK4A) gene in human breast tumours. *British Journal of Cancer* 1999; 79 251–256.
143. Ilyas M & Tomlinson IP 1997 The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *Journal of Pathology* 2000: 182 128–137
144. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y & Mori T Correlation between E-cadherin expression and metastasis in human breast cancer: preliminary report. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 93 105 (1992)
145. Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Callen DF, Sutherland GR, Hansen B, Devilee P & Cornelisse CJ At least two different regions are involved in allelic imbalance on chromosome arm 16q in breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1994; 9 101–107
146. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF & Boyd J Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nature Genetics* 1994; 7 98–102.
147. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE & Baylin SB E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Research* 1995; 55 5195–5199
148. Hiraguri S, Godfrey T, Nakamura H, Graff J, Collins C, Shayesteh L, Doggett N, Johnson K, Wheelock M, Herman J, Baylin S, Pinkel D & Gray J Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. *Cancer Research* 1998; 58 1972–1977
149. Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HF, Debruyne FM & Schalken JA 1993 Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Research* 1993; 53 3241–3245
150. Bae YK, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler MJ, Sukumar S, Herman JG, Gabrielson E. Hypermethylation in Histologically Distinct Classes of Breast Cancer *Clinical Cancer Research* 2004; Vol. 10, 5998–6005
151. Ferguson AT, Nass SJ DNA Methylation and Breast Cancer *Current Genomics*, 2000; 1 (1): 41-58
152. Parrella P CpG Island hypermethylation in Breast Cancer progression and metastasis. In: Etseller M (ed). *DNA Methylation, Epigenetics and Metastasis* Springer, 81-132 (2005)

153. Bustin SA, Nolan T Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech.*2004; 15(3):155-66
154. You Y, Moreira BG, Behlke MA and Owczarzy R Design of LNA probes that improve mismatch discrimination *Nucleic Acids Res.*2006; 34 (8)
155. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.*2005: 6:279–284
156. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M, Fleischmann A, Altermatt HJ, Jaggi R. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest.*2005; 85:1040–1050
157. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem.* 2002; 309:293–300
158. Lyng MB, Laenkholtm AV, Pallisgaard N, Ditzel HJ. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas *BMC Cancer* 2008; 8:20
159. DeCosse, J.J., Gossens, C.Kuzma, J.F., and Unsworth, B.R. Breast cancer: induction of differentiation by embryonic tissue. *Science* 1973; 181, 1057–1058
160. DeCosse, J.J., Gossens, C., Kuzma, J.F., and Unsworth, B.R. Embryonic inductive tissues that cause histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 1975; 54, 913–922
161. Bissell MJ and Radisky D Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* 2001; 1, 46–54
162. Radisky D, Hagios C and Bissell MJ Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin. Cancer Biol.*2001; 11, 87–95
163. Tlsty TD and Hein PW Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001: 11, 54–59
164. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 2004: Jul;6(1):17-32.
165. Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou XP and Eng C Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat. Genet.* 32, 355–357 (2002)
166. Moscow, J. A., Townsend, A. J., Goldsmith, M. E., et al. Isolation of the human anionic glutathione-5-transferase gene and the relation of its expression to estrogen receptor content in primary breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988: 85:6518-6522.
167. Singal R, Wert J and Bashambu M. Cytosine Methylation Represses Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) Gene Expression in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* 2001 61, 4820-4826.
168. Rønneberg JA, Tost J, Solvang HK, Alnaes GI, Johansen FE, Brendeford EM, Yakhini Z, Gut IG, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Gabrielsen OS, Kristensen VN. GSTP1 promoter haplotypes affect DNA methylation levels and promoter activity in breast carcinomas. *Cancer Res* 2008;68(14):5562–71
169. Freije, J; Balbin, M; Pendas, AM; Sanchez, LM; Puente, XS; Lopez-Otin, C. Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol.* 2003;532:91–107.7
170. Mylona E, Magkou C, Giannopoulou I, Agrogiannis G, Markaki S, Keramopoulos A, Nakopoulou L. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-3 protein in invasive breast carcinoma: relation to tumor phenotype and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):R57.

171. Baker, AH; Zaltsman, AB; George, SJ; Newby, AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2 or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation and death *in vitro*. *J Clin Invest*. 1998;101:1478–1487
172. Ahonen, M; Baker, AH; Kahari, VM. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res*. 1998;58:2310–2315.
173. Baker, AH; George, SJ; Zaltsman, AB; Murphy, G; Newby, AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer*. 1999;79:1347–1355.
174. Bond, M; Murphy, G; Bennett, MR; Newby, AC; Baker, AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem*. 2002;277:13787–13795.
175. Leco, KJ; Waterhouse, P; Sanchez, OH; Gowing, KL; Poole, AR; Wakeham, A; Mak, TW; Khokha, R. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest*. 2001;108:817–829
176. Span, PN; Lindberg, R; Manders, P; Tjan-Heijnen, VC; Heuvel, JJ; Beex, LV; Sweep, CG. Tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrine therapy success. *J Pathol*. 2004;202:395–402.
177. Kotzsch, M; Farthmann, J; Meye, A; Fuessel, S; Baretton, G; Tjan-Heijnen, VC; Schmitt, M; Luther, T; Sweep, FC; Magdolen, V, et al. Prognostic relevance of uPAR-del4/5 and TIMP-3 mRNA expression levels in breast cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41:2760–2768.
178. Takeichi M: Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995, 7:619–627
179. Rhee J, Han SW, Oh DY, Kim JH, Im SA, Han W, Park IA, Noh DY, Bang YJ, Kim TY. The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2008 Oct 23;8:307.
180. w. Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer*. 2008 May 29;8:153
181. Reed JC. Balancing cell life and death: Bax, apoptosis, and breast cancer. *J Clin Invest* 1996;97:2403–4.
182. Huang Y, Ray S, Reed JC, et al. Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:73–81.
183. Yang S, Liu J, Thor AD, Yang X. Caspase expression profile and functional activity in a panel of breast cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2007 May;17(5):1229-35.
184. Asgeirsson KS, Jo JG, Tryggvadottir L, Olafsdottir K, Sigurgeirsdottir JR, Ingvarsson S, Ogmundsdottir HM: Altered expression of E-cadherin in breast cancer. Patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur J Cancer* 2000, 36:1098–1106
185. Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hiro-hashii S: Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:7416-7419
186. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB: E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995, 55:5195-5199

187. Lei H, Sjöberg-Margolin S, Salahshor S, Werelius B, Jandáková E, Hemminki K, Lindblom A, Vorechovský I. CDH1 mutations are present in both ductal and lobular breast cancer, but promoter allelic variants show no detectable breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2002 Mar 10;98(2):199-204.
188. Sato M., Mori Y., Sakurada A., Fujimura S., Horii A. The H-cadherin (*CDH13*) gene is inactivated in human lung cancer[published erratum appears in *Hum. Genet.* 103: 532, 1998]. *Hum. Genet.*, 1998 103: 96-101.
189. Lee S. W. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat. Med.*,1996 2: 776-782
190. Kawakami M., Staub J., Cliby W., Hartmann L., Smith D. I., Shridhar V. Involvement of H-cadherin (CDH13) on 16q in the region of frequent deletion in ovarian cancer. *Int. J. Oncol.*, 1999 15: 715-720
191. Takeuchi T., Misaki A., Chen B. K., Ohtsuki Y. H-cadherin expression in breast cancer. *Histopathology*, 1999: 35: 87-88
192. Guan, K. L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera, A. G., and Xiong, Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.*, 1994 8: 2939–2952.
193. Medema, R. H., Herrera, R. E., Lam, F., and Weinberg, R. A. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995 92: 6289–6293.
195. Parry, D., Bates, S., Mann, D. J., and Peters, G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO J*.1995 14: 503– 511.
195. Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Mishina, T., Akie, K., Nishi, M., Hiroumi, H., Hommura, F., and Kawakami, Y. Altered p16INK4 and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. *Cancer Res.*, 1996 56: 5557–5562.
196. Khleif, S. N., DeGregori, J., Yee, C. L., Otterson, G. A., Kaye, F. J., Nevins, J. R., and Howley, P. M. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996 93: 4350–4354, 1996.
197. Dublin, E. A., Patel, N. K., Gillett, C. E., Smith, P., Peters, G., and Barnes, D. M. Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters. *Int. J. Cancer*, 1998 79: 71–75.
198. Nielsen, N. H., Emdin, S. O., Cajander, J., and Landberg, G. Deregulation of cyclin E and D1 in breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein. *Oncogene*, 1997 14: 295–304.
199. Fang, X. J., Jin, X. M., Xu, H. J., Liu, L., Peng, H. Q., Hogg, D., Roth, J. A., Yu, Y. H., Xu, F. J., Bast, R. C., and Mills, G. B. Expression of p16 induces transcriptional downregulation of the *RB* gene. *Oncogene*, 1998 16: 1–8.
200. Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI, Robertson JF, Sutherland RL. INK4a Gene Expression and Methylation in Primary Breast Cancer: Overexpression of p16INK4a Messenger RNA Is a Marker of Poor Prognosis *Clinical Cancer Research* 2000 Vol. 6, 2777–2787.
201. Slomiany P, Baker T, Elliott ER, Gressel MJ. *J Cell Biochem*. Changes in motility, gene expression and actin dynamics: Cdk6-induced cytoskeletal changes associated with differentiation in mouse astrocytes. 2006; 1: 99(2):635-46

202. Mackay HJ, Cameron D, Rahilly M, Mackean MJ, Paul J, Kaye SB, Brown R. Reduced MLH1 expression in breast tumors after primary chemotherapy predicts disease-free survival. *J Clin Oncol.* 2000 Jan;18(1):87-93
203. Finlin BS, Gau C-L, Murphy GA, Shao H, Kimel T, Seitz RS, Chiu Y-F, Botstein D, Brown PO, Der CJ, Tamanoi F, Andres DA & Perou CM *RERG* is a novel *ras*-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *Journal of Biological Chemistry* 2001 276 42259–42267.
204. Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R & Friend SH Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002 415 530–536.
205. Soulez M & Parker MG Identification of novel oestrogen receptor target genes in human ZR75-1 breast cancer cells by expression profiling. *Journal of Molecular Endocrinology* 2001 27 259–274.
206. Inoue A, Yoshida N, Omoto Y, Oguchi S, Yamori T, Kiyama R & Hayashi S-I Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002 29 175–192.