TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNDE *PIK3CA* ve *TP53* GEN MUTASYONLARI ile *SALL4, PTEN* ve *PIK3R1* GEN EKSPRESYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

ARŞ. GÖR. EBUBEKİR DİRİCAN

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK

DANIŞMAN

PROF. DR. MUSTAFA AKKİPRİK

2018-İSTANBUL

REPUBLIC OF TURKEY

MARMARA UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

DETECTION of *PIK3CA* and *TP53* GENE MUTATIONS and ASSOCIATION with *SALL4*, *PTEN* and *PIK3R1* GENE EXPRESSION LEVELS in BREAST CANCER

RES. ASSIST. EBUBEKİR DİRİCAN

MEDICAL BIOLOGY and GENETICS

SUPERVISOR

PROF. DR. MUSTAFA AKKİPRİK

2018-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Doktora
Anabilim Dalı	: Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi	: Ebubekir DİRİCAN
Tez Başlığı	: MEME KANSERİNDE PIK3CA ve TP53 GEN MUTASYONLARI ile SALL4, PTEN ve PIK3R1 GEN EKSPRESYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ
Sınav Yeri	: Tıbbi Biyoloji AD.
Sınav Tarihi	: 12.03.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK	M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.	

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Ayşe ÖZER	M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.
Prof. Dr. Bahadır GÜLLÜOĞLU	M.Ü. Tıp Fak. Genel Cerrahi AD.
Prof. Dr. Uğur GEZER	İ.Ü. Onkoloji Ens. Temel Onkoloji AD.
Doç. Dr. Matem TUNÇDEMİR	İ.Ü. CerrahpaşaTıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 07/06/2018 tarih ve 57 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

Ebubekir DİRİCAN

İmza



I. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince her konuda özveri, sabır ve bilimsel katkıları ile bana destek olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa Akkiprik'e,

Akademik ve bilimsel tecrübeleri ile eğitim sürecime her konuda değer katan sayın hocam Prof. Dr. Ayşe Özer'e,

Kıymetli bilgilerinden istifade ettiğim sayın hocalarım Doç. Dr. Fatih Eren'e, Yrd. Doç. Dr. Can Erzik'e, ve Doç. Dr. İlter Güney'e,

Tez çalışmamın örneklerini temin etmede ve bilimsel yardımlarından ötürü Marmara Üniversitesi Pendik Eğt. ve Arş. Hastanesi Genel Cerrahi Bölüm'ünden Prof. Dr. Bahadır Güllüoğlu, Doç. Dr. Ümit Uğurlu hocalarıma ve Tıbbi Patoloji Bölüm'ünden ile Prof. Dr. Handan Kaya, Yrd. Doç. Dr. İpek Erbarut hocalarıma ve bölümlerindeki değerli asistan ve hocalarıma,

Gerek deneysel çalışmalarımda ve gerekse dostlukları, yardımları, sorduğum sorulara sabırla verdikleri cevaplar için değerli arkadaşlarım İrem Peker ve Burcu Hastürk'e,

Doktora eğitimime başladığım günden beri dostlukları, yardımları, sorduğum sorulara sabırla verdikleri cevapları, yol göstermeleri ve bilimsel tecrübeleri için M.Ü. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın kıymetli doktora ve yüksek lisans öğrencilerine,

Sevgili eşime, çalışmalarım esnasında göstermiş olduğu sabır, özveri, maddi ve manevi desteklerinden ve çalışmama kattığı tüm emeklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Sevgi, emek ve destek gösteren; her şeyimle özveriyle ilgilenen, eğitim hayatım boyunca her türlü zorluğuma sabırla ortak olan değerli aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırıma Projeleri Komisyonu Başkanlığınca, SAG-C-DRP-100216-0040 nolu proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

I. Teşekkür **i**

II. İçindekiler **ii**

III. Şekil ve Tablo Listesi **vii**

IV. Kısaltma ve Simgeler **x**

1. ÖZET 1

2. SUMMARY 2

3. GİRİŞ ve AMAÇ 3

3.1. Amaç ve Kapsam 3

4. GENEL BİLGİLER **7**

4. 1. Meme Kanseri 7

4.1.1. Risk Faktörleri 7

4.1.1.1. Yaş 8

4.1.1.2. Cinsiyet 8

4.1.1.3. Kalıtsal Gen Mutasyonları 8

4.1.1.4. Aile Öyküsü 9

4.1.1.5. Irk ve Etnik Yapı 9

4.1.1.6. Ashkenazi Jewish Kalıtımı 10

4.1.1.7. Meme dansitesi 10

4.1.1.8. Benign Proliferatif Meme Koşulları 10

4.1.1.9. Hormonal Faktörler 10

4. 1.1.10. Alkol Kullanımı 11

4.1.1.11. Kilo-vücut ağırlığı 11

4.1.1.12. Egzersiz 11

4.1.1.13. Diğer Araştırılmış Faktörler 12

4.1.2. Meme Kanser Tanısı 12

4.1.3. Meme Kanser Tipleri 12

4.1.3.1. İnvazif Meme Kanserin Hücresel Sınıflandırılması 13

4.1.3.2. İnvazif Meme Kanserin Diğer Tipleri 13

4.1.3.3. Çok Nadir İnvazif Meme Kanser Tipleri 14

4.1.4. Moleküler Alt tipler 14
4.1.5. Meme Kanser Safhaları 15
4.1.5.1. Klinik Safha Sistemi 15
4.1.5.1.1. Klinik Safha Sistemi: Nod 16
4.1.5.1.2. Klinik Safha Sistemi: Metastaz 16
4.1.5.2. Safha/Prognoztik Gruplar 17
4.1.5.3. Safhalara Göre Tanı 17
4.1.6. Prognozu 18
4.1.7. Prediktif Markerler 18
4.1.7.1. Östrojen, Progesteron ve Hormonal Reseptör Biyomarkerlar 19
4.1.7.2. Ürokinaz Plazminojen Aktivatör (uPA) 19
4.1.7.3. Ki67 19
4.1.8. Meme kanserinin moleküler mekanizması 19
4.1.8.1. Meme kanserinde DNA hasarı ve Genomik instabilite 20
4.1.8.1.1. DNA hasarı tamir yolağı 20
4.1.8.1.2. Meme kanserinde genomik instabilite 21
4.1.8.2. Meme kanserine yol açan genetik değişiklikler 21
4.1.8.3. Meme kanserinde epigenetik 22
4.1.9. Meme Kanser Tedavisi 22
4.1.9.1. Radyasyon Terapisi 22
4.1.9.2. Sistemik Tedavi 23
4.1.9.3. Kemoterapi 24
4.1.9.4. Hedefe Yönelik Tedavi 24
4.1.9.4.1. Trastuzumab (Herceptin®) 25
4.1.9.4.2. Pertuzumab 25
4.1.9.4.3. Lapatinib 25
4.1.9.5. Yeni Tedavi Yöntemleri 25
4.1.9.6. Endokrin Terapi 26
4.1.9.6.1. Tamoxifen 26
4.1.9.6.2. Aromataz İnhibitörleri 26
4.2. PI3K Sinyal Yolağı 27
4.2.1. PIK3CA geni 28
4.2.2. PIK3CA Geni Mutasyonları ve Kanser 29
4.2.3. PIK3CA Geni Mutasyonları ve Meme Kanser İlişkisi 29

4.2.4. PIK3CA Geni Mutasyonları ve Kanser Tedavisindeki Önemi 30
4.3. TP53 geni 31
4.3.1. TP53 Geni Mutasyonları ve Kanser 32
4.3.2. TP53 Geni Mutasyonları ve Meme Kanser İlişkisi 35
4.3.3. TP53 Geni Mutasyonları ve Kanser Tedavisindeki Önemi 36
4.4. PTEN geni 36
4.4.1. PTEN Geni Ekspresyonu ve Kanser 37
4.4.2. PTEN Geni Ekspresyonu ve Meme Kanser İlişkisi 38
4.4.3. PTEN Geni Ekspresyonu ve Kanser Tedavisindeki Önemi 38
4.5. PIK3R1 geni 39
4.5.1. PIK3R1 Geni Ekspresyonu ve Kanser 40
4.5.2. PIK3R1 Geni Ekspresyonu ve Meme Kanser İlişkisi 41
4.6. SALL4 geni 41
4.6.1. SALL4 Geni ve Kanser 43
4.6.2. SALL4 Geni Ekspresyonu ve Meme Kanser İlişkisi 46
4.6.3. SALL4 Geni Ekspresyonu ve Kanser Tedavisindeki Önemi 46
4.7. Mutasyon Tarama Yöntemleri 47
4.7.1. Direkt Mutasyon Tarama Yöntemleri 48
4.7.1.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 48
4.7.1.2. ASA (Allele Specific Amplification-ARMS Amplification Refractory Mutation System) 48
4.7.1.3. Primer Uzaması (Primer Extension, SNaPshot) 49
4.7.1.4. DNA Dizi Analizi 49
4.7.2. İndirekt Mutasyon Tarama Yöntemleri 49
4.7.2.1. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 49
4.7.2.2. Heterodupleks Analizi (Heteroduplex Analysis – HA 50
4.7.2.3. DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) 50
4.7.2.4. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting – HRM) 50
4.7.2.4.1. HRM yöntemi hakında genel bilgiler 50
4.7.2.4.2. HRM yöntemiyle yapılmış çalışmalar 53
5. GEREÇ ve YÖNTEM 54
5. 1. Kullanılan Aletler 54
5. 2. Kullanılan Sarf Malzemeleri 55
5. 3. Kullanılan Kimyasallar 56

5. 4. Kullanılan Çözeltiler 57
5. 5. Kullanılan Materyaller 57
5. 6. DNA ve RNA izolasyonu 57
5.6.1. DNA izolasyonu 57
5.6.2. RNA izolasyonu 58
5.7. HRM Yöntemi ile PIK3CA ve TP53 Gen Mutasyonların Belirlenmesi 59
5.8. Dizi Analizi (Sanger) 61
5.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Ekspresyonun Analizi 63
5. 10. İstatistiksel analizler 66
6. BULGULAR 67
6. 1. PIK3CA Geni Mutasyonlarının HRM Yöntemi ile Analizi 67
6. 2. TP53 Geni Mutasyonlarının HRM Yöntemi ile Analizi 68
6. 3. Konvansiyonel PZR 70
6.4. Dizi Analizi (Sanger) 73
6.4.1. PIK3CA geni ekzon 9 ve ekzon 20 mutasyonlarının dizi analiziyle tanımlanması 74
6.4.2. TP53 geni ekzon 5, 6, 7 ve 8 mutasyonlarının dizi analiziyle tanımlanması 76
6.5. HRM yönteminin Sanger dizi analizi ile uyumunun belirlenmesi 80
6.6. PIK3CA ve TP53 geni mutasyonları ile klinik veriler arasındaki ilişkinin belirlenmesi 81
6.6.1. PIK3CA mutasyonları ve klinik veriler arasındaki ilişkinin belirlenmesi 81
6.6.2. TP53 mutasyonları ve klinik veriler arasındaki ilişkinin belirlenmesi 88
6.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Ekspresyonun Analizi 95
6.7.1. PTEN Geni Ekspresyon Analizi 95
6.7.2. PIK3R1 Geni Ekspresyon Analizi 96
6.7.3. SALL4 Geni Ekspresyon Analizi 97
6.7.4. PIK3CA geni mutasyonları ile PIK3R1, SALL4 ve PTEN Gen Ekspresyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi 98
6.7.5. TP53 geni mutasyonları ile PIK3R1, SALL4 ve PTEN Gen Ekspresyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi 100
6.7.6. PIK3R1, SALL4 ve PTEN Gen Ekspresyonu ile Klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişkinin belirlenmesi 102
7. TARTIŞMA VE SONUÇLAR 104

8. KAYNAKLAR 110

9. EKLER 147

10. ÖZGEÇMİŞ 152

III. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Meme Kanser Risk Faktörleri 8
Tablo 2: Diğer araştırılmış risk faktörleri 12
Tablo 3: IDC alt tipleri 13
Tablo 4: Meme Kanserin Moleküler Alt tipleri ve Özellikleri 14
Tablo 5: TNM sınıflandırması 15
Tablo 6: Bölgesel Lenf Nodları 16
Tablo 7: Uzak metastaz 16
Tablo 8: Safha/Prognoztik Gruplar 17
Tablo 9: Nüks veya Metastatik Kanserde Tercih Edilen Kemoterapi Rejimleri 24
Tablo 10: Meme kanserinde tanımlanan PIK3CA mutasyonların özeti 74
Tablo 11: Meme kanserinde tanımlanan TP53 geni mutasyonların özeti 76
Tablo 12: PIK3CA mutasyonları ve klinik parametreler arasındaki ilişki (x^2 Test) (n=79) 87
Tablo 13: TP53 geni mutasyonları ve klinik parametreler arasındaki ilişki (x^2 Test) 94
Tablo 14: Gen ekspresyonu ve klinik parametreler arasındaki ilişki (x^2 Test) (n=112) 103
Şekil 1: PI3K sinyal yolağı 27
Şekil 2: PIK3CA genin 3. kromozomdaki lokalizasyonu 28
Şekil 3: PIK3CA geni ve sıcak nokta mutasyonları 28
Şekil 4: TP53 geni kromozom lokalizasyonu 31
Şekil 5: TP53 geni ve sıcak nokta mutasyonları 32
Şekil 6: PTEN genin lokalizasyonu 37
Şekil 7: PIK3R1 geni lokalizasyonu ve yapısı 40
Şekil 8: SALL4 Geni kromozom lokalizasyonu 42
Şekil 9: SALL4 gen ailesi 42
Şekil 10: SALL4 geni ve sinyalizasyonu 44
Şekil 11: SALL4'ün yapısı 45
Şekil 12: HRM analizinde homozigot ve heterozigot denatürasyon eğrileri 51
Şekil 13: HRM yönteminde reaksiyon mekanizması 52
Şekil 14: HRM analiz sonucu 52
Şekil 15: PIK3CA Ekzon 20 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü 67
Şekil 16: PIK3CA Ekzon 9 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü 67
Şekil 17: TP53 Ekzon 5 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü 68

Şekil 18: TP53 Ekzon 6 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü 68
Şekil 19: TP53 Ekzon 7 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü 69
Şekil 20: TP53 Ekzon 8 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü 69
Şekil 21: PIK3CA Ekzon 9 PZR agaroz jel görüntüsü 70
Şekil 22: PIK3CA Ekzon 20 PZR agaroz jel görüntüsü 70
Şekil 23: TP53 Ekzon 5 PZR agaroz jel görüntüsü 71
Şekil 24: TP53 Ekzon 6 PZR agaroz jel görüntüsü 71
Şekil 25: TP53 Ekzon 7 PZR agaroz jel görüntüsü 71
Şekil 26: TP53 Ekzon 8 PZR agaroz jel görüntüsü 72
Şekil 27: Sanger dizi analizi sonuçlarına göre belirlenen PIK3CA (n=33) ve TP53 (n=61) mutasyonların sayısı 73
Şekil 28: PIK3CA geni mutasyonlarının dağılımları 74
Şekil 29: PIK3CA mutasyonlarının DNA dizi analiziyle tanımlanması 75
Şekil 30: TP53 geni mutasyonlarının dağılımları 77
Şekil 31: TP53 mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tanımlanması. 77
Şekil 32: TP53 mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tanımlanması. 78
Şekil 33: TP53 mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tanımlanması. 79
Şekil 34: TP53 mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tanımlanması. 79
Şekil 35: PIK3CA ve TP53 gen mutasyonlarının belirlenmesinde HRM ve Sanger dizi analiz sonuçlarının karşılaştırılması 80
Şekil 36:PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser moleküler alt tiplere göre dağılımları 81
Şekil 37: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser histolojik tiplere göre dağılımları 82
Şekil 38: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser tümör evresine göre dağılımları 83
Şekil 39: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser nod durumuna göre dağılımları 83
Şekil 40: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser histolojik tümör derecesine göre dağılımları 84
Şekil 41:PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser hastalarının yaşlarına göre dağılımları 85
Şekil 42: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser hormon reseptör durumuna göre dağılımları 86
Şekil 43: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser Ki67 durumuna göre dağılımı 86
Şekil 44: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser moleküler alt tiplere göre dağılımları 88
Şekil 45: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser histolojik tiplere göre dağılımları 89
Şekil 46: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser tümör evresine göre dağılımları 90

Şekil 47: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser nod durumuna göre dağılımları 90
Şekil 48: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser histolojik tümör derecesine göre dağılımları 91
Şekil 49: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser hastalarının yaşlarına göre dağılımları 92
Şekil 50: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser hormon reseptör durumuna göre dağılımları 93
Şekil 51: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser Ki67 durumuna göre dağılımı 93
Şekil 52: PTEN genin tümörlü ve sağlıklı dokudaki mRNA ekspresyonu durumu 95
Şekil 53: PIK3R1 genin tümörlü ve sağlıklı dokudaki mRNA ekspresyonu durumu 96
Şekil 54: SALL4 genin tümörlü ve sağlıklı dokudaki mRNA ekspresyonu durumu 97
Şekil 55: PIK3CA mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki PTEN mRNA ekspresyon durumu 98
Şekil 56: PIK3CA mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki PIK3R1 mRNA ekspresyonu durumu 99
Şekil 57: PIK3CA mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki SALL4 mRNA ekspresyon durumu 99
Şekil 58: TP53 mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki PTEN mRNA ekspresyon durumu 100
Şekil 59: TP53 mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki PIK3R1 mRNA ekspresyon durumu 101
Şekil 60: TP53 mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki SALL4 mRNA ekspresyon durumu 101

IV. KISALTMA VE SİMGELER

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

TP53: Tumor protein 53

PIK3R1: Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

SALL4: Sal-like protein 4

HRM: High Resolution Melting

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

ER (ÖR): Östrojen reseptör

PR: Progesteron reseptör

PCR (PZR): Polimeraz zincir reaksiyonu

BRCA 1/2: Breast cancer 1/2

ATM: Ataksi telenjiektazi

PI3K: Fosfatidil-inozitol-3-kinaz

CDH1: E-cadherin geni

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

ASO: Allele-specific oligonucleotide

SSCP: Single-strand conformation polymorphism

LCIS: Lobülar In situ Karsinoma

DCIS: Duktal karsinoma in situ

CHEK2: Checkpoint kinase 2

MIMB: Minimal invaziv meme biyopsisi

ILC: İnvazif Lobülar Karsinoma

HER2 (*neu*/c-erbB-2): İnsan Epidermal Büyüme Faktör 2

uPA: Ürokinaz Plazminojen Aktivatör

TNM: Tümör, nod ve metastaz

LFT: Akciğer fonksiyon testi

PARP: Poly ADP-ribose polymerase

RTK: Reseptör tirozin kinaz

PIP2: Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate

PIP3: Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate

ERa: Östrojen reseptör alfa

TAD: Transkripsiyonel aktivasyon domain

PRD: Prolin zengin domain

DBD: DNA bağlanma domain

OD: Tetramerizasyon domain

CTD: Karboksi terminal domain

EMT: Epitelyal mezenkimal döşüm

ATF2: Aktive edici faktör 2

TGF-β: Transforme edici büyüme faktör

SH3: SRC homoloji 3 domain

BH: Breakpoint cluster region homoloji domain

nSH2: Amino terminal SRC homoloji 2 domain

iSH2: İnter SRC homoloji, domain

cSH2: Karboksi terminal SRC homoloji 2 domain

ZF: Çinko parmak motif

NLS: Nüklear lokalizasyon sinyali

VEGF-A: Vascular endothelial growth factor A

TNF: Tümör nekroz faktör

BCL2: B cell lymphoma 2 protein

c-Myc: MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor

KML: Kronik miyeloid lösemi

ARMS: Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi

DGGE: Denature edici Gradient Jel Elektroforezi

DHPLC: Denature edici Yüksek Performanslı Likid Kromatografi

SNaPshot: Single Base Primer Extension Assay

dNTP: Deoksi nükletit tri fosfat

ddNTP: Dideoksi nükletit tri fosfat

HA: Heteroduplex Analysis

Tm: Denatürasyon sıcaklığı

MAML1: Mastermind-like 1

NAT2: N-Acetyltransferase 2

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

IL: İnterlökin

TBE: Tris Buffered EDTA

DNA: Deoksiribonükleik asit

LC® 480: The LightCycler® 480

UV: Ultraviyole ışını

ExoSap: Exonuclease I - Shrimp Alkaline Phosphatase

DTT: Dithiothreitol

cDNA: Komplementer DNA

1. ÖZET

MEME KANSERİNDE *PIK3CA* ve *TP53* GEN MUTASYONLARI ile *SALL4, PTEN* ve *PIK3R1* GEN EKSPRESYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

Öğrencinin Adı: Arş. Gör. Ebubekir DİRİCAN
Danışmanı: Prof.Dr. Mustafa AKKİPRİK
Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Amaç: PI3K sinyal yolağı ve TP53 geni mutasyonlarının frekansı meme kanserinde yüksek olup, kanser gelişiminde önemli rol almaktadır. Bu çalışmada PIK3CA ve TP53 mutasyonlarının analizi ile PIK3R1, PTEN ve SALL4 gen ekspresyonu ve hastaların klinik parametreleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Meme kanser örneklerinde PIK3CA ve TP53 gen mutasyonların HRM analizi ve sonrasında Sanger dizileme, PIK3R1, PTEN ve SALL4 genlerinin ekspresyon düzeyleri ise RT-PZR yöntemleri ile analiz edilmiştir.

Bulgular: HRM analiziyle örneklerin 37/79'sinde PIK3CA ve 108/145'inde ise TP53 geni mutasyonları olabileceği gösterildi. Sanger dizilemeyle doğrulandığında, PIK3CA geninde 33(%42) ve TP53'te ise 55(%38) örnekte mutasyon saptandı. PIK3CA geni mutasyonlarının frekansı ER (+); TP53 ise N0, ER (+) ve HER2 (-) tümör örneklerinde yüksek ve anlamlı olduğu belirlendi ($p=0.0083$; $p=0.0295$; $p=0.0078$; $p=0.0005$). PIK3R1 ve PTEN gen ekspresyon seviyeleri tümörlü dokularda, sağlıklılara oranla daha yüksek, fakat SALL4 tümörlülerde düşük eksprese olduğu; TP53 mutasyonu taşıyanlarda ise, PIK3R1 gen ekspresyon seviyesinin yabanıl tiplere oranla düşük ekspresyon profili gösterdiği ve anlamlı olduğu gösterildi ($p<0.0001$; $p=0.0059$; $p=0.0378$; $p=0.0169$). PIK3CA mutasyonu taşıyan örneklerde PIK3R1, PTEN ve SALL4 ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu, ama bunun anlamlı bir fark olmadığı gösterildi ($p=0.1561$; $p=0.7119$; $p=0.1684$). PIK3R1 ekspresyon seviyesi ile G3 histolojik derece, ER (+), PR (+) ve HER2 (+) ve PTEN ekspresyonu ile ER (+) klinik parametreler arasında anlamlı farklar belirlendi ($p=0.0030$; $p=0.0010$; $p=0.0019$; $p=0.0272$; $p=0.0048$). SALL4, ER (+) hastaların %62'sinde amplifiye olmasına rağmen, anlamlı bir ilişki saptanamadı ($p=0.0799$).

Sonuçlar: Bulgularımız, gelecekte PIK3CA, PTEN, SALL4, TP53 ve PIK3R1 genlerine meme kanserinde dikkat edilmesi gerektiği ve potansiyel prognoztik biyo-belirteç olabileceklerini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: PIK3CA, TP53, PIK3R1, PTEN, SALL4

2. SUMMARY

DETECTION of *PIK3CA* and *TP53* GENE MUTATIONS and ASSOCIATION with *SALL4, PTEN* and *PIK3R1* GENE EXPRESSION LEVELS in BREAST CANCER

Student: Res. Assist. Ebubekir Dirican

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Akkiprik

Department: Medical Biology and Genetics

Aim: In breast cancer (BCa) the frequency of PI3K signaling pathway and TP53 gene mutations are high and have role cancer development. The aim of the present study was to assess PIK3CA and TP53 mutations and PIK3R1, PTEN and SALL4 gene expression analysis and correlation with clinical parameters.

Methods: PIK3CA and TP53 gene mutations in BCa samples were analyzed by HRM analysis followed by Sanger sequencing, and the expression levels of PIK3R1, PTEN and SALL4 genes were evaluated by RT-PZR methods.

Results: With HRM analysis were showed that PIK3CA and TP53 mutations may be respectively 37/79 and 108/145 of samples. After Sanger sequencing, PIK3CA and TP53 gene mutations defined respectively 33 (42%) and 55 (38%) in samples. The frequency of PIK3CA mutations were high in ER (+) and TP53 gene mutations were high N0, ER (+) and HER2 (-) tumor samples and have significant ($p=0.0083$; $p=0.0295$; $p=0.0078$; $p=0.0005$). PIK3R1 and PTEN gene expression levels were higher in tumor than healthy tissue ($p<0.0001$; $p=0.0059$). But, SALL4 gene expression level was lower in tumor tissue ($p=0.0378$).With TP53 mutations patients, PIK3R1 gene expression level was lower than wild type patients and have significant ($p=0.0169$). With PIK3CA mutations patients, PIK3R1, PTEN and SALL4 gene expression levels were higher than wild type patients and have no significant ($p=0.1561$; $p=0.7119$; $p=0.1684$). PIK3R1 and PTEN expression levels have significant respectively in G3 histological grade, ER (+), PR (+), HER2 (+); and ER (+) ($p=0.0030$; $p=0.0010$; $p=0.0019$; $p=0.0272$; $p=0.0048$). Although SALL4 amplified in 62% of ER (+) patients and have no significant ($p=0.0799$).

Conclusion: Our findings suggested that PIK3CA, PTEN, SALL4, TP53 and PIK3R1 genes should also be considered, and that these could be potential prognostic biomarkers in BCa patients.

Key words: PIK3CA, TP53, PIK3R1, PTEN, SALL4

3. GİRİŞ

3.1. Amaç ve Kapsam

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserler arasında ikinci sırada olup, akciğer kanserinden sonra en ölümcül kanser türü olduğu bilinmektedir. Moleküler biyolojideki son gelişmeler sayesinde, meme kanserinin moleküler temelini anlamayı biraz daha kolaylaştırmış ve hereditar meme kanserinde önemli bazı genlerdeki (BRCA1, BRCA2, PIK3CA, p53, ATM ve PTEN) mutasyonların rollerinin olduğu gösterilmiştir. Bu genlerin birçoğu tümör süpressör genler olup, DNA hasarında genomik stabiliteyi korumada farklı roller oynayan elemanlardır. Bu genlerdeki mutasyonların tamir edilememesi hücre proliferasyonunu tetiklediği ve kanser gibi farklı anormalliklerin ortaya çıkmasına sebep oldukları bilinmektedir.

Fosfatidil-inozitol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolağı, hücre proliferasyonu (Cantley, 2002) ve hücre sağkalımında önemli rol oynamaktadır. Sinif I PI3K katalitik domain, p110α, p110β, p110γ ve p110δ gibi farklı alt domainlerden oluşmaktadır (Fruman ve ark., 1998). p110α (PIK3CA geninden kodlanır) ve p110β her dokuda bulunurken; p110γ ve p110δ hematopoetik hücrelere spesifiktir (Fruman ve ark., 1998; Thorpe ve ark., 2015). PIK3CA mutasyonları meme kanserinde en yaygın görülen gen değişikliklerine sahip ve östrojen reseptör (ER (+)) pozitif meme kanserde %40'lara varan frekansta karşımıza çıkabilmektedir (Sabine ve ark., 2014). Liao ve ark. (2015) PIK3CA mutasyonlarının, premenapozal dönemdeki kadınlarda postmenapozal dönemdekilerden daha yüksek sıklıkta görüldüğü bildirilmişdir. Bir başka çalışmada ise uzun süre tamoksifen kullanımının PI3K sinyal yolağını upregüle ettiği (Cantley ve ark., 2002) ve böylece tamoksifen direncinin gelişmesine yol açtığı gösterilmiştir (Fruman ve ark., 1998; Thorpe ve ark., 2015; Fox ve ark., 2012). Clark ve ark. (2002) ise ER (+) hücre hatlarında LY294002 inhibitörünü kullanıp, apoptozu indükleyip tamoksifenin etkisini arttırmaya çalışmışlardır. PI3K sinyal yolağının hedeflenmesi ER (+) premenapozal meme kanser hastlarının tedavi edilmesinden sorumlu olabileceği vurgulanmıştır.

TP53, 17p13.1 lokusunda lokalize olan bir tümör süpresör gendir (Freed-Pastor ve Prives 2012). Genin ürünü olan p53 proteini, bir transkripsiyon faktörü olup, hücre döngüsünün duraksaması, yaşlanma, apoptoz, hücre stresiyle baş etme (Freed-Pastor ve Prives 2012; Soussi 2011) ve DNA tamiri gibi birçok hücre içi önemli işlevlerde rol alır (OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), Erişim tarihi: 21 Ocak 2013). TP53

genindeki mutasyonlar birçok kanser vakasında karşımıza çıkabilmektedir. TP53'ün 12 farklı Pan-kanser kohortunda örneklerin %42 'sinde en mutant gen olduğu gösterilmiştir. TP53 genindeki germline mutasyonların ailesel kanserlerin gelişimiyle bağlantılı olduğu da rapor edilmiştir (Kandoth ve ark., 2013). İlk kez 1969 yılında Li ve Fraumeni isimli bilim adamları tarafından dört çocukta ailesel yumuşak doku sarkoması belirlemişlerdir ve TP53 geni mutasyonu taşıdıkları belirtilmiştir (Li ve Fraumeni, 1969a). Bununla birlikte, TP53 mutasyonlarının hem yumuşak doku sarkomasında hem de meme kanserde sıklıkla mutant olduğu vurgulanmıştır. Bu durum özellikle bir ailedeki kanser paternine bağlı olarak 'Li-Fraumeni sendromu' olarak isimlendirilmiştir. Bu sendromun varlığı hem TP53 mutasyonlarını hem de farklı kanserlerin gelişim riskini de arttırabileceği düşünülmektedir. Yaklaşık kanserlerin %50'sinde bu gende mutasyon olduğu da belirtilmektedir (Olivier ve ark., 2002). Bu gende sıklıkla mutasyonların görüldüğü hot spot bölgeler olarak; ekzon 4-9 bölgeleri oldukları ve en önemli kodonların ise 175, 245, 248, 249, 273 ve 282 olarak bildirilmiştir (Pospisilova ve ark., 2012). Son olarak, bu gendeki mutasyonların ya genin protein sentez aktivitesinde yada oluşan proteinde konformasyonel değişiklikler oluşturabildikleri belirlenmiştir (Inoue ve ark., 2011). Ayrıca bu gende oluşan anormalliğin tipine göre, bazen bir tümör süpressör (baskılayıcı) bazen de bir onkogen gibi davrandığı da unutulmamalıdır (Kastan ve Berkovich, 2007).

PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue: Fosfotaz ve tensin homoloğu) tümör baskılayıcı gendir ve hücrenin büyümesi, yaşamı, çoğalması ve migrasyonu (hücre göçü) gibi çok sayıda hücresel fonksiyonları denetlemektedir (Yin ve Shen, 2008). PTEN geninde bazı somatik delesyon ve/veya mutasyonlar, çeşitli tümör tiplerinde oldukça sık karşımıza çikmaktadir. PTEN tirozin fosfataz olarak bilinen tümör baskılayıcı bir proteindir (Liaw ve ark., 1997). PI3K yolağındaki 3-fosfoinozidleri yıkma özelliği de gösteren bir gendir. Birçok kanser türünde bu gende oluşan mutasyon veya delesyon gibi anormallikler, PTEN inaktivasyonuna ve PI3K birikimine neden olur; böylece hücresel aktivasyon artar. Özellikle Cowden Sendromunda, PTEN geninde aktivite kaybı söz konusudur. Hem benign hem de malign tümörler oluşmasına sebep olur. PTEN kaynaklı oluşan meme tümörleri ise daha çok genç kadınlarda ve bilateral olarak görülme eğilimindedir (Starink ve ark., 1986). PTEN, lipid fosfataz ve protein tirozin fosfataz aktivitesi olan, önemli bir tümör supresör gen olmakla beraber, aynı zamanda ekstraselüler matriks ve hücre etkileşimlerinin negatif düzenleyicisidir. Meme kanserinde PTEN kaybı, ÖR ve progesterone reseptör (PR) ekspresyon durumunda azalma ve anöploidi ile korele bulunurken, hastaların sağkalım süreleri ile herhangi bir ilişki

gözlenmemiştir. İleri evre tümörlerde ve metastatik hastalıkta PTEN'in bialellik kaybı söz konusudur. 151 tane meme kanserli hastayla yapılan bir çalışmada hastalarda %48' oranında PTEN protein ekspresyonunda kayıp saptanmıştır. Aynı çalışmada hastalığa bağlı ölüm, evre, lenf nodu metastazı ve tümör derecesi ile PTEN kaybı arasında korelasyon gözlenmiştir. Ayrıca PTEN kaybıyla ÖR ve PR kaybı arasında da korelasyon saptanmıştır (Depowski ve ark., 2001).

SALL4 proteini, erken embriyonik gelişim sırasında önemli roller oynamaktadır. SALL4 proteini embriyonik kök hücrelerin kendi kendisini yenilemesinde ve bu sırada farkılılaşmama durumunun korunmasında önemli çeşitli roller alır (Ben-Porath ve ark., 2008). SALL4 proteini hücre proliferasyonu ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca SALL4'ün iki izoformu tanımlanmışıtır (SALL4A ve SALL4B). Germ hücrelerde ve solid tümörlerde anormal eksprese olduğu bildirilmiştir. SALL4 genindeki mutasyonların Okihiro sendromuna ve çoklu organ yetmezliğine sebep olduğu belirtilmiştir. Endometrial kanserde SALL4 proteinin anormal eksprese olduğu belirtilmiştir. Ayrıca endometrial kanser hücrelerin sağ kalımında, metastaz ve ilaç direnci gelişmesinde gerekli olduğu gösterilmiştir. SALL4 proteinin meme kaserinde hücre içi adezyonda ve hücre hareketinin korunmasında rol oynadığı belirtilmiştir. SALL4 proteini aynı zamanda meme kanserinde CDH1 ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Itou ve ark., 2013). MDA-MB-231 hücre hatlarında SALL4 ve STAT3 ekspresyon durumlarını incelemişler ve birbiriyle aynı yönde korelasyon gösterdikleri bildirilmiştir (Bard ve ark., 2009). SALL4 proteinin lösemi hastalığında PTEN'i aktive ettiği belirtilmektedir. Başka çalışmalarda SALL4 proteinin, lösemi hastalığının gelişimine katıldığı bildirilmiştir ve onkogen gibi davrandığı gösterilmiştir (Ma ve ark., 2006). Ayrıca SALL4 protein, TP53 ve PTEN'i aktive ederek apoptotik indüksiyonda rol oynamaktadır. Literatürde SALL4 genin meme kanserdeki önemi ve moleküler rolleri hakkında çok fazla çalışmayla karşılaşmadık ve bu durum belirsizliğini korumaktadır.

PI3K heterodimer yapıda olup, PIK3CA p110α domaininden ve PIK3R1 geni ise p85 domaininden kodlanmaktadır (Stemke-Hale ve ark., 2008; Saal ve ark., 2005; Li ve ark., 2006). PIK3CA geni onkogen özellikte olmasına karşın; PIK3R1 genin ise tümör süpressör özellikte olduğunu bilmekteyiz. Ayrıca PIK3R1 geni meme kanserinde mutant formda da karşımıza çıkabilmektedir. Ama PIK3R1 geni mutasyonlarıyla PIK3CA mutasyonu kıyaslandığında görülme sıklığı oldukça düşük olup yaklaşık %3-4 civarında olduğu bildirilmiştir (COSMIC, Erişim tarihi: 20 Ocak 2016). Bunun dışında özellikle meme kanser

vakalarının %20-30'unda PTEN kaybı görüldüğü, PIK3CA mutasyonların ise prognostik önemi olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca PIK3R1 genin ise anormal ekspresyonun azalması PI3K sinyal yolağın aktivasyonuna ve insanda tümör gelişimine yol açabileceği rapor edilmiştir (Shekar ve ark., 2005). PIK3R1'in hepatoselüler kanserde bir tümör süpressör gibi davrandığı gösterilmiştir. Bununla birlikte PIK3R1 ekspresyon azalış durumuyla sağkalım oranında azalışla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Cizkova ve ark., 2013). PIK3R1 geni ekspresyon durumunun meme kanserindeki önemi tam olarak açıklanamamıştır.

Günümüzde birçok mutasyon tarama yöntemi (RFLP, ASO PCR, HRM, Sanger dizileme gibi) bulunmaktadır (Dirican, 2013). Bu yöntemlerden bazıları direkt (RFLP ve ASA gibi) bazıları ise indirekt (SSCP, heterodupleks ve HRM gibi) olarak mutasyon analizi yapmamıza imkan tanımaktadır. Yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (HRM) analizi, eş zamanlı-(gerçek zamanlı) (Real-time) PZR'ın kullanıma girmesiyle birlikte, 1997'de geliştirilen bir yöntemdir (Lay ve Wittwer, 1997; Ririe ve ark., 1997). HRM analizi, sekans varyantlarının mutasyon taraması için güçlü ve kullanılabilir basit bir yöntemdir. Mutasyon taraması, ve genotiplendirme başta olmak üzere bağlanti analizleri, genetik haritalama, aday gen taraması ve DNA metilasyon analizi başta olmak üzere birçok çalışmada kullanılabilmektedir. Çift zincirli DNA'da erime sıcaklığı artmasıyla florasan değişiklikler saptanabilir ve wild-tip (yabanıl) ile heterozigot örneklerin erime noktalarında farklılaşmalar oluşur ve HRM mekanizması bunların tanımlanmasına dayalı bir yöntemdir (Simko, 2016). HRM yöntemi yeni nesil mutasyon tarama teknolojilerine hizmet etmekte ve diğer görüntüleme methodlarıyla kıyaslandığında maliyeti düşük ve ekonomik açıdan avantajlı olduğu için önerilmektedir. HRM yöntemi bir kapalı tüp sistemidir. Bununla birlikte, HRM yöntemi moleküler tanı ve klinik amaçlı araştırmalar için hızlı mutasyon tarama sonuçları alabilmek için kullanılabilmektedir.

Bütün bu bilgiler ışığında, bizde bu çalışmada HRM yöntemiyle meme kanserde sık karşılaşılan PIK3CA ve TP53 gen mutasyonlarını saptamak ve PIK3R1, PTEN ve SALL4 gen ekspresyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın görülen kanser tipidir. 40 ile 50 yaş arası Amerikalı kadınlar arasında mortalitesi yüksek ölümlerin en ciddi sebebi ve akciğer kanserinden sonra ikinci en sık görülen önemli kanser türüdür (Harris ve ark., 1992). Meme kanser tanısında medyan yaşının 61 olduğunu bilmekteyiz. Tüm vakaların %20'si 50 yaş üstü ve %40'ı ise 65 ve üstü olduğu bildirilmiştir. İnvazif meme kanseri gelişmiş bir kadında yaşam boyu riskin %12.6 olduğu ve her 8 kadında bir yaşamın herhangi bir döneminde meme kanseri gelişecebileceği belirtilmiştir (Greenlee ve ark., 2001). Ayrıca kombine östrojen ve progestin kullanımının meme kanser riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Meme kanseri kadınlar arasında yaygın olmasına karşın, 2000'den itibaren insidansında azda olsa düşme olduğu rapor edilmiştir. Bu düşüşün sebebi olarak menapozal replasman tedavisinin önemli olduğu gösterilmiştir (www.cdc.gov, Erişim rarihi: 22 Ocak 2016).

Meme kanser görülme sıklığının ırka etmik gruba göre değiştiği vurgulanmaktadır. Meme kanser insidansı beyaz ırklarda yüksektir. Fakat Afrikalı-Amerikanlarda sağkalım oranının düşük olduğu bildirilmiştir. Bu durum sosyoekonomik faktörlerle birlikte biyolojik farklılıklar ile açıklanmaktadır. Meme kanseri insidansı ve mortalitesi Hispanik bireylerde Hispanik olmayan beyaz ırka oranla %30-40 daha düşüktür. Bu durum ise kadınlarda üretkenlik ve ilk doğumla çok eşlilikle bağdaştırılmıştır (ACS, 2012a; Seigel ve ark., 2012; Seigel ve ark., 2012).

4.1.1. Risk Faktörleri

Yaş, cinsiyet ve aile öyküsü en önemli risk faktörleri arasında yer almasına karşın, meme kanser riskiyle ilişkili birçok faktör tanımlanmıştır (Tablo 1). Fakat bu faktörlerin hiçbiri birbiriyle aynı derecede risk oluşturmamaktadır. Ayrıca bu risklerden biri kontrol altına alınabilir ve modifiye edilebilir.

Tablo 1: Meme Kanser Risk Faktörleri		
Güçlü artış	**Ilımlı orta şiddette artış**	**Zayıf artış**
BCRA1 veya BCRA2 gen mutasyonları	Hiç çocuk sahibi olmamak veya 35 yaş sonrası ilk çocuk sahibi olmak	İlk periyot yaşı <12
Biden fazla birinci derece ailesi üyesi	Bir tane birinci dereceden aile üyesi	Menapoz yaşı >55
Yüksek meme densitesi	Kanda yüksek östrojen seviyesi veya androjen seviyesi postmenapoz	Alkol tüketimi
Atipik hiperplasi veya LCIS	Tipik hiperplasi	Askenazi Jewish kalıtımı
Bireyin kanser geçmişi	Menapoz sonrası kilo alma	Yüksek sosyoekonomik durum
Gençken radyasyon terapisi almış olmak	Post menapozal östrojen ve progestin	X-ray radyasyona maruziyet
	Yüksek kemik densitesi	
	Post menapozal tip 2 diyabet	Post menapozal östrojen
		Emzirmeme
		Uzun boylu olmak

(ww5.komen.org, Erişim tarihi: 10 Ocak 2016; Jancin, 2012)

4.1.1.1. Yaş

Meme kanser insidansı yaşla ilişkili olarak artmaktadır. Yaşla birlikte meme kanser riski artmaktadır (http://kanser.gov.tr, Erişim tarihi: 29 Mart 2017). 20 yaşta 1681 vakada 1 meme kanser görülürken, 40 yaşa doğru bu oran artmaktadır. En yüksek risk oranı 70 yaş ve üzerinde görülmektedir. Medyan yaşı erkeklerde 61 ve kadınlarda ise 68 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, Amerikalı popülasyonda 40 yaşın altında meme kanseri nadir görülürken, 55-64 yaşlarında meme kanser görülme oranında artış olduğu rapor edilmiştir. Yine Amerikalı ve Asyalı kadınlar arasında da meme kanser görülmesinde yaşın ayırt edici özelliği olduğu belirtilmiştir. Çinli popülasyonda ise meme kanser insidansı en çok 45-50 yaşları arasında pik yapmış durumdadır. Afrikalı kadınlarda ise Kafkas kadınlarından farklı olarak 46 yaşta meme kanser gelişme riskinin yüksek olduğu rapor edilmiştir (Abdulrahman ve Rahman, 2012).

4.1.1.2. Cinsiyet

Kadınlar, meme kanser riski açısından erkeklere oranla yaklaşık 100 kat risk taşımaktadır (http://kanser.gov.tr, Erişim tarihi: 29 Mart 2017).

4.1.1.3. Kalıtsal Gen Mutasyonları

BRCA1, BRCA2, p53, PTEN/MMA1, CHEK2 ve ATM mutasyonları meme kanser gelişimiyle ilişkili genlerdir. Mutasyonlar yalnızca tüm meme kanser vakalarının %5-10 kadarını oluşturmaktadırlar (http://www.breastcancer.org, Erişim tarihi: 17 Mayıs 2016).

BRCA1/2 genleri normalde mutasyondan koruma tamir gibi görevleri vardır. Yani DNA tamir genleri olarak bilinmektedir. Bu genlerde ki mutasyonlar bu koruma işlevinin yapılamamasına sebep olmaktadır. BRCA mutasyonlarına sahip kadınların yarısında yaşam boyu meme kanser gelişme riski %40-65 arasında olduğu belirtilmektedir. Kalıtsal kanserlerde tanı erken yaşta ve bilateral olabilir.

4.1.1.4. Aile Öyküsü

Meme kanserinin hereditar bir hastalık olduğu uzun bir süredir bilinmektedir. Yaklaşık kadınların %5-10'nunda otozomal dominant bir genin kalıtımından dolayı meme kanser riski taşıyabilmektedirler (Radford ve Zehnbauer, 1996). Bu riskin ailede daha önceden meme kanserine yakalamış olan bireylerin sayısına bağlı olduğu unutulmamalıdır. Birinci derecede aile üyelerinde daha önce bu hastalığı geçiren varsa, bu risk iki kat olabilmektedir. Ayrıca birinci derecede aile üyelerinin sayısı birden fazla ise bu risk 3-4 kat artış gösterebilmektedir. En büyük risk teşkil eden durum ise 50 yaştan önce tanı konmuş bir aile üyesi olmasıdır (http://www.breastcancer.org, Erişim tarihi: 17 Mayıs 2016).

Meme kanseri üzerine genetik etkileri olan BRCA1 ve 2 gibi birçok gen tanımlanmştır (TP53, PTEN, SKT11, LKB1 ve CDH1 gibi) ve hepsininde risk etkilerinin farklı olduğunu bilmekteyiz. BRCA1 ve 2 ailesel meme kanser vakalarının %5-10'undan sorumlu ve bu genlerden en az birinde mutasyon tespit edilmiştir (Maxwell ve Nathanson, 2013). BRCA genetic değişiklikleri en fazla Askenazi ırklarında saptanmıştır. Bu yüzden bu popülasyonda yaşamın her anında risk %25 ile %85 arasında değişim göstermektedir. Bu insanlada meme kanser tanısı konan bireylerde tümör derecesi, ÖR ve PR seviyelerinin yüksek olduğu ifade edilmiştir.

4.1.1.5. Irk ve Etnik Yapı

Beyaz ırklarda meme kanser riskinin arttığı ama Asya Amerikalılarda veya Pasifik Ada insanlarında bu riskin azaldığı vurgulanmıştır. Bu farklılıkların aşağıda belirtilmiş olan çeşitli risk faktörleriyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Chlebowski ve ark., 2005; Warner ve ark., 2013):

- Menarş yaşı
- Menapoz yaşı
- İlk doğum yaşı

- Doğum sayısı
- Vücut ağırlığı
- Emzirme patterni

4.1.1.6. Ashkenazi Jewish Kalıtımı

Amerika'da yahudi kadınlarda diğer kadınlardan daha sık meme kanserine yakalandıkları bilinmektedir. Bu kalıtıma sahip kadınlar yüksek BRCA 1/ 2 mutasyonları barındırdıkları belirlenmiştir ve yüksek risk grubundandırlar (http://www.breastcancer.org, Erişim tarihi: 17 Mayıs 2016). Bununla birlikte, Ashkenazi Jewish kadınların 1/40'ında BRCA1/2 genlerinde mutasyon belirlenmiştir (Heikkinen ve ark., 2016).

4.1.1.7. Meme dansitesi

Meme dansitesi mammogram ile ölçülmektedir. Memenin yapısı yağ ve meme doksundan oluşmaktadır. Meme dansitesinde bu yağ dokusu ve diğer konnektif dokular arası mammagromla gözlenmesidir. Yüksek meme dansiteli kadınların daha fazla glandular dokuya ve az yağ dokusuna sahip oldukları ifade edilmiştir. Düşük dansiteye sahip olanlarda meme kanser riskinin 4-5 kez daha fazla olduğu belirtilmiştir (Boyd ve ark., 2007; Yaghjyan ve ark., 2011). Ayrıca bunlarda mammagromda anormallikler görülebilir.

4.1.1.8. Benign Proliferatif Meme Koşulları

Bu faktörde meme lobüllerdeki veya süt kanallarındaki hücrelerin büyüme artışı kastedilmektedir. Eğer lobüllerde hücre büyüme artışı gerçekleşirse, bu 'lobüler hiperplasi' olarak tanımlanmaktadır. Eğer kanallarda gerçekleşirse, 'duktal hiperplasi' olarak adlandırılmaktadır. Hiperplasi genel olabilir. Veya tipik veya atipik olabilir. Atipik hiperplasi de meme kanser riski 4-5 kat artarken, genel hiperplaside ise bu risk 2 kat olarak belirtilmiştir.

4.1.1.9. Hormonal Faktörler

Hormonal faktörlerin meme kanser riskiyle ilişkisine dair birçok epidemiyolojik çalışma bulunmaktadır. Fakat bunların sadece birkaçı aşağıda özetlenmiştir (Chlebowski ve ark., 2003; Bernstein ve Ross, 1993; Rosner ve ark., 1994; ww5.komen.org, Erişim tarihi: 10 Ocak 2016).

- Hiç doğum yapmamış veya 35 yaşından sonra doğum yapmış kadınlarda bu risk giderek hızla artar.

- 12 yaşından önce menarşın başladığı kadınlarda veya 55 yaşından sonra menapoz gelişimi görülenlerde risk artar.
- Yaşam boyu en az bir yıl çocuk emzirmiş olanlarda risk düşüktür. Uzun süre emziren kadınlarda emzirmenin daha yararlı olduğu görülmüştür.
- Son zamanlarda doğum kontrol hapı kullanan kadınlarda riskin arttığı belirtilmiştir.
- Postmenapozal hormon kullanımı çeşitli etkilere sebep olmaktadır. Fakat 10 yıldan az östrojen kullanımı tek başına meme kanser riskini arttırmadığı ifade edilmiştir.
- Östrojen progestin ile birlikte meme kanser riskini arttırmaktadır. Bir kadındaki bir yıllık risk artışı her yıl giderek artar ve kombine hormon tedaviye devam edilir. Eğer bir kadın kombine hormon tedaviyi bırakırsa, bu risk 5-10 yıl içinde tekrar normale dönecektir. Biyoidentikal hormonlar aynı miktardaki sentetik hormonlar gibi riski arttırdıkları bildirilmiştir.

4. 1.1.10. Alkol Kullanımı

Alkol kullanımında meme kanser riski yaklaşık %7 artmaktadır. Bu artış alkolün östrojen üzerindeki etkisiyle ilişkili olabiliceği düşünülmektedir. Çünkü östrojen seviyesi alkol kullanan kadınlarda daha yüksektir (Hamajima ve ark., 2002; ww5.komen.org, Erişim tarihi: 10 Ocak 2016).

4.1.1.11. Kilo-vücut ağırlığı

Kilolu premenapozal kadınlarda meme kanser gelişim riski düşüktür. Ama menapoz sonrası kilolu olanlarda, östrojen pozitif meme kanser riski %30-60 zayıf olanlara kıyasla artmaktadır. Bu durumun östrojen üretim tarzıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Menapoz öncesi overde östrojenin büyük bir kısmı üretilmektedir. Menapoz sonrası östrojen, aromatazın androjene dönüşümüyle sonuçlanır. Yağ dokusu androjenden çok aromataz içerir ve bu östrojene çevrilir (Huang ve ark., 1997; Reeves ve ark., 2007; ww5.komen.org, Erişim tarihi: 10 Ocak 2016).

4.1.1.12. Egzersiz

Özellikle postmenaposal kadınlarda egzersizle meme kanser riskinin %10-20 azaldığı belirtilmiştir. Egzersizin östrojen seviyesini düşürebileceği vurgulanmıştır. (Eliassen ve ark., 2010; Gong ve ark., 2016; ww5.komen.org, Erişim tarihi: 10 Ocak 2016)

4.1.1.13. Diğer Araştırılmış Faktörler

Çevresel ve mesleki faktörler meme kanserle ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Tablo 2). Ama birçok çalışmada bu faktörlerle ilgili sonuçların birbiriyle bağdaşmadığı ve doğrudan meme kanserle ilişkili olabileceğiyle ilgili yeterli bilgilere sahip olunmadığı da belirtilmiştir.

Tablo 2: Diğer araştırılmış risk faktörleri		
Zayıf artış	**Artış yok veya risk azalışı**	**Yetersiz bulgular**
Gece ışıkta çalışmak veya iş değişiklikleri	Kan organoklorin seviyesi (pestizitlerden veya indüstriyal kimyasallar gibi)	Plastik veya parafin içerikli kozmetik ürünlerin kullanımı
	Meme implantları	Sigara içmek veya ikici el sigara kullanımı
	Deodorant kullanımı	Meme travması
	Düşük doğum veya fertilite ilaçları kullanımı	Kafein
	Saç boyaları	Cep telefonu
		Saç rahatlatıcıları
		Koltuk altları

(Mirick ve ark., 2002; Gikas ve ark., 2004; Guenel ve ark. 1993; Chen ve ark., 2010; ww5.komen.org, Erişim tarihi: 10 Ocak 2016)

4.1.2. Meme Kanser Tanısı

Kişinin kendi kendine kontrolü ve şüpheleri olabilir veya mammografiyle radyografik görüntüleme sistemleri kullanılabilmektedir. Bir şüpheli bulguya rastlanıldıysa, bir doku biyopsisi alınır ve tanı konmaya çalışılır. Dokuda altın standart olarak kabul edilen perkütanoz iğne ile minimal invaziv meme biyopsisi (MIMB) yapıp veri elde edebilmektir. MIMB açık cerrahi biyopsi, oldukça güvenilir ve birçok avantajı vardır. Ayrıca MIMB ekonomik olduğu bilinmektedir. Biyopsi ve histopatolojik çalışmalarla doğrulama yapılır. Diğer görüntüleme sistemleri arasında ultrasonografi, magnetic resonance görüntüleme, PET ve sintigrafi yer almaktadır (Bruening ve ark., 2012).

4.1.3. Meme Kanser Tipleri

Meme kanser heterojen bir hastalıktır. Ayrıca hücresel, histolojik ve moleküler olarak sınıflandırılmasının kanserin tedavi ve prognozunda yönlendirici yararları olduğunu bilmekteyiz. Meme kanseri invaizif veya non invazif olabilir. Kanserleşmenin bulunduğu yer önemlidir; kanallarda mı yoksa lobüllerde mi gelişmeye başladığı doğru bir şekilde belirlenmelidir.

- **Duktal karsinoma in situ (DCIS):**

Evre 0 olarak kabul edilir ve bunlarda palbleşme nadirdir. Bu yüzden genellikle mammagrafiyle tanı konmaya çalışılır.

- **Lobular Karsinoma in situ (LCIS):**

Bir kanser değildir. Fakat meme kanser gelişme riskini barındırmaktadır. (NCCN, Erişim tarhi: 10 Şubat 2016)

4.1.3.1. İnvazif Meme Kanserin Hücresel Sınıflandırılması

Meme kanseri lobüllerde veya kanalların membran dış kenarında yayılım göstermeye başladıysa invazif olarak ifade edilmektedir. Bu tip kanserde çevredeki doku istila edilir ve diğer dokulara da yayılım gösterebilir. Ayrıca invazif duktal karsinoma tüm invazif karsinomaların %70-80'nini oluşturmaktadır. Duktal karsinoma memenin süt kanallarından orjinlenmiştir. Bununla birlikte, birçok duktal karsinoma tipi olduğu bilinmektedir (Tablo 3).

Tablo 3: IDC alt tipleri

Tipi	**Karakteristik orjini**	**Yüzdesi**
Cribiform	Stroma	%5-6
Medullar	Medulla	%3-5
Mesinos (kolloid)	Müsin	%2-3
Papiller	Küçük parmak benzeri	%1-2
Tübüler	Tüp benzeri yapılar	%1-4

(www.breastcancer.org, Erişim tarihi: 22 Mart 2016)

4.1.3.2. İnvazif Meme Kanserin Diğer Tipleri

- **İnvazif Lobülar Karsinoma (ILC)**

ILC invazif meme kanserin ikinci en yaygın tipidir ve %10 sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Bu kanser meme süt üretim lobülünden orjinlenmektedir. Mammagrafiyle görüntülemek zordur. Çünkü hücreler kalın tabakalıdır.

- **İnflamator Meme Kanseri**

Biyolojik varlığı sınırlı olabilir. İnvazif meme kanserlerin %1-5'ini oluştururlar. Bu meme kanserin en agresif formu olup, daima lokal olarak ilerler ve metastatik değildir.

- **Paget Hastalığı**

Invazif meme kanserin <%5'ini oluşturur. Kanserleşme önce meme başındaki duktallardan başlar ve sonra yayılmaya başlar.

- **Phyllodes (yaprak şeklinde)**

Bu tümörler invazif meme kanserin <%1'ni oluşturmaktadır. Bu tümörler yaprak gibi bir pattern gösterir. Ayrıca nadir metastaz özelliği gösterirler

(www.breastcancer.org, Erişim tarihi: 22 Mart 2016; Dushkin ve Cristofanilli, 2011)

4.1.3.3. Çok Nadir İnvazif Meme Kanser Tipleri

- Adenoid kistik (<%0.1)
- Apokrin (%0.4)
- Metaplastik (%0.2-0.6)
- Sekrator (%0.15)

(Cadoo et al., 2012)

4.1.4. Moleküler Alt tipler

Mikroarray ile gen ekspresyonun tanımlanması meme kanserin moleküler alt tiplerin tanımlanmasını sağlamıştır (Tablo 4). Bu şekilde meme kanserin dört moleküler alt tipi tanımlanmıştır. Ama microarray analizin oldukça pahalı olması rutin tanıda kullanımını zorlaştırmıştır. Bu alttiplerin prognoztik önemi olduğu, fakat kemoterapiye yanıttaki önemleri tam olarak açıklanamamıştır.

Tablo 4: Meme Kanserin Moleküler Alttipleri ve Özellikleri

Alttip	**Prevalansı**	**Eğilim**	**Prognozu**
Bazal benzeri	%15-20	EP/PR/HER2 negatif, HER-2 ve HER-3 (+) p53 Mut. %71	Çok Kısa sağkalım
HER2 +	%10-15	ER(-), PR(-), HER2(+)	Kısa sağkalım
Luminal A	%40	ER(+) ve/veya PR(+), HER2-, düşük Ki67 (<14%)	En uzun sağkalım
Luminal B	%10-15	ER(+) ve/veya PR(+), HER2(-), yüksek Ki67 veya ER(+) ve/veya PR(+), HER2, Ki67 yok	Orta sağkalım

(ww5.komen.org, Erişim tarihi: 10 Ocak 2016, Goldhrisch et al. 2011)

4.1.5. Meme Kanser Safhaları

Safha terimi hastalığın derecesini ifade etmek için kullanılmaktadır. Bu terim prognozu ve tedavi şeklini belirlemede önemlidir. TNM (tümör, nod ve metastaz) sistemi bunun için kullanılan en yaygın safha sistemi olduğunu bilmekteyiz. Aynı zamanda safha gösterilmeden ön ek getirilebilir.

• **C** = *Klinik safha*; tedaviden önceki safhadır ve primer tedavi klavuzu olarak kullanılır.

• **P** = *Patolojik safha*; cerrahi incelemeden sonraki safhayı gösterir ve adjuvant kemoterapi ve prognozu tahmin etmek için kullanılır.

• **R** = *Gerileme safhası*; bir serbest hastalık aralığıdır ve tedavi klavuzu olarak kullanılır.

4.1.5.1. Klinik Safha Sistemi

Amerikan Kanser Ortak Komitesi tümör, nod ve metastaz (TNM) ölçüm sistemini önermektedir (Tablo 5).

Tablo 5: TNM sınıflandırması	
T_X	Değerlendirilmemektedir.
T_O	Tümörün varlığı yok
T_{IS}	In situ
T1	<20mm (2 cm)
	mi<1mm
	1a >1mm fakat <5mm
	1b >5mm fakat <10mm
	1c >10mm fakat<20mm
T2	>20mm fakat <50mm
T3	>50mm
T4	Doğrudan uzantısı ile herhangi bir boyut duvar ve/veya deri göğüs
	4a: Göğüs duvarına, daha fazla kas pektoralis
	4b: Ülserasyon ve/veya ipsilateral nodüller ve/veya deride ödem inflamatuvarsız meme kanseri
	4c: Hem 4a hem de 4b
	4d: İnflamatuvar meme kanseri

(www.nccn.org, Erişim tarhi: 10 Şubat 2016)

4.1.5.1.1. Klinik Safha Sistemi: *Nod Durumu*

Tablo 6: Bölgesel Lenf Nodları	
NX	Değerlendirilmez
N0	Bölgesel nod metastaz yok
N1	Mobil ipsilateral aksiller lenf nodlarına metastaz; meme içi, infraklavikuler ve "Rotter" nodları dahil
N2	Bir diğerine ya da diğer yapılara fikse "konglomere" ipsilateral aksiler lenf nodlarına metastaz
	2a: Komşu dokulara yapışık aksiller lenf nodu metastazı
	2b: Aksiller metastaz olmaksızın klinik veya radyolojik olarak görülebilen İM nodal metastaz
N3	İpsilateral internal mammarian lenf nodlarına metastaz
	3a: İpsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı + aksiller lenf nodu metastazı
	3b: Klinik + radyolojik olarak görülebilen ipsilateral İM lenf nodu
	3c: Supraklaviküler lenf nodu metastazı

(Aydıner ve Topuz, 2006)

4.1.7.1.2. Klinik Safha Sistemi: *Metastaz*

Tablo 7: Uzak metastaz	**Özellikleri**
MO	Bulgu yok
cMO	Klinik veya radyografik zak mettastaz bilgi yok, fakat moleküler veya mikroskobik tümör hücre varlığı
M1	Klinik veya radyografik olarak belirlenmiş 0.2 mm'den daha fazla uzak metastaz görülür.

(www.nccn.org, Erişim tarhi: 10 Şubat 2016)

4.1.5.2. Safha/Prognoztik Gruplar

Tablo 8: Safha/Prognoztik Gruplar		
Safha	**TNM**	**2001-2002 Yılları arasında kadınlardaki sağkalım oranı**
0	Tis N0 M0	%93
1A	T1 N0 M0	%88
1B	T0 N1miM0 T1 N1miM0	
IIA	T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0	%81
IIB	T2 N1 M0 T3 N0 M0	%74
IIIA	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0	%67
IIIB	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0	%41
IIIC	Any T N3 M0	%49
1V	Any T Any N M1	%15

(www.nccn.org, Erişim tarhi: 10 Şubat 2016)

4.1.5.3. Safhalara Göre Tanı

❖ **Safha I:**

- Tarihi ve fiziksel
- CBC, plateletler
- Akciğer fonksiyon testi (LFT) ve ALT düzeyi
- Bilateral mammagrom, ultrason prn
- Patolojik değerlendirme
- ER, PR ve HER2 durumlarının belirlenmesi
- Ailesel meme kanser tanısı olan varlığı
- Meme MRI
- Fertilite danışmanın bulguları

❖ **Safha IIA veya IIB:**

- İşaret ve semptomlara binaen ek çalışmalara başvurmak
- Kemik görüntüleme ile ağrı olan yerlerin belirlenmesi veya yüksek alkalen fosfataz varlığı
- Abdominal pelvik CT ve/veya MRI alkalen fosfataz yüksekse, anormal LFTs veya fiziksel muayene
- Pulmoner semptomlar için CT

❖ **Safha IIIA:**

- Göğüs CT
- Abdominal pelvik ve/veya MRI
- Kemik görüntüleme veya florid PET/CT
- FDG PET/CT

(www.nccn.org, Erişim tarihi: 10 Şubat 2016)

4.1.6. Prognozu

Meme kanserinde tedavi seçimi ve prognozunu etkileyen birçok faktör tanımlanmıştır.

- Yaş ve menapoz durum
- Tümörün nükleer derecesi
- Tümörün hormon reseptör durumu
- İnsan epidermal büyüme faktör tip 2 reseptör ekspresyonu
- Tümörün proliferatif kapasitesi
- Lenf vasküler invazyon varlığı
- Gen profili
- Moleküler alt tipler

4.1.7. Prediktif Markerler

Biyomarkerlar meme kanserinde patolojik ilerleme veya terapotik yanıtta önemli prognoztik ve prediktif markerlar (belirteçler) olarak tanımlanmışlardır. Prediktif biyomarkerlar terapotik etkiler üzerine bilgiler verir. Prognoztik biyomarlar ise terapiden bağımsız bir kanser hastası hakkında önemli bilgiler sağlayabilir. Bu anlamda Dünya Sağlık Örgütü ve Amerikan Klinik Onkoloji Derneği rutinde kullanılabilecek meme kanserdeki biyomarkerlar arasında;

- Östrojen Reseptör (ER)
- Progesteron Reseptör (PR)
- İnsan Epidermal Büyüme Faktör 2 (HER2, HER2/*neu*/c-erbB-2) göstermiştir (Beckze, 2011).

4.1.7.1. Östrojen, Progesteron ve Hormonal Reseptör Biyomarkerlar

ÖR durumunun, hem adjuvan terapide hem de metastatik uygulamalarda hormon terapiye yanıt vermede önemli prediktif değeri olduğu bilinmektedir. Ayrıca PR durumunun da prognoztik uygulamalarda hormonal terapiye yanıtta önemli olabileceği, fakat PR ve ÖR'ün önemi tam olarak adınlatılamamıştır. Ama önemli olduklarına dair çeşitli bulgulara rastlanılmıştır. ÖR/PR negatif tümörler hormonal tedaviye yanıt vermedikleri ve kötü prognoz gösterdikleri bildirilmiştir. HER2 bir tirozin kinaz büyüme faktörüdür.Sinyal yolaklarında uyarıldıklarında tümör büyümesini stimüle ettikleri gösterilmiştir. HER2 meme kanserde %15-30 aşırı eksprese olduğu ve zayıf prognoztik özellikte olduğu ve hedefe yönelik trastuzumab gibi ajanlar ile bloke edilebildiği gösterilmiştir. (Bishop, 2011)

4.1.7.2. Ürokinaz Plazminojen Aktivatör (uPA)

Amerikan Klinik Onkoloji Derneği yalnız nod negatif hastalara yeni tanı ve rutin risk değerlendirmeleri önerilmektedir. uPA ve PAI-1 tümörün parçalanması sürecinde önemli rol aldıkları belirtilmiştir. (Bishop, 2011)

4.1.7.3. Ki67

Ki-67 bir hücre peroliferasyon belirteci olduğu bilinmektedir. Ki67 bir nonhiston nükleer proteindir. Ki-67'nin kısa tüm sağkalım durumuyla ilişkili olduğunu belirtilmiştir. Bunun meme kanserinde kemoterapiye yanıtla korelasyon gösterdiği vurgulanmıştır. Ama henüz rutin bir tanı testi olarak değerlendirilmemektedir. (Bishop, 2011)

4.1.8. Meme kanserinin moleküler mekanizması

Meme kanserinin ortaya çıkışı ve tanımlanması yaklaşık 40 yıl öncesine dayanmaktadır ve bu kanser birçok insanın yaşam kalitesini ve mortalitesini önemli derecede etkilediği için de araştırılması ayrı bir öneme sahiptir. Kanser hücresinde çeşitli sistemlerde anormallikler gözlenmektedir. Bu sistemler arasında mitojenik sinyaller, hücre döngüsü kontrol sistemi, DNA tamir sistemi ve epigenetik ekspresyon modifikasyon sistemi yer almaktadır. Özelliklede bu sistemlerdeki anormalliklerin kanser hücrelerinde kontrol edilemez bir hücre bölünmesi, apoptoza direnç, invazyon ve metastazla birlikte anormal bir anjiyogenez mekanizması belirlenmiştir.

Östrojen ve büyüme faktör sinyalleri kanserleşme sürecinde etkin rol alırlar. Kanser hücresinde östrojen kendi reseptörüne bağlandığında bazı genlerin ekspresyonunu etkileyebilmektedir. Bu genler arasında IGF-I ve CCNDI yer almaktadır (Hall ve ark., 2001). Bunlarda ki anormallikte zamansız mitojenik sinyal yolağını uyarmaktadır. Büyüme faktörü reseptörleri de kanserde major terapotik hedef ajanlar oldukları bilinmektedir. Bu reseptörler ayrıca EGFR olan HER1 ve HER2 gibi faktörlerin regülasyonunu sağlamaktadır. Bu reseptörleri hedefleyen imatinib ve sorafinib gibi çeşitli ilaçlar geliştirilmiştir (Thery ve ark., 2014).

Meme kanserinin onkogenezini etkileyen hücre döngüsünde TP53, ATM, CCND1 ve CHEK2 gibi çeşitli genler belirlenmiştir. TP53 geni p53 tümör süpressör proteini kodlar ve birçok farklı kanserde tanımlanmıştır ve sıklıkla mutanttır. P53 proteini, DNA hasarında hücre stresine yanıtta rol alan ve hücre döngüsünde tutuklama veya apoptoz, senesens gibi mekanizmaları tetikleyip DNA tamir mekanizmasına katılmaktadır. CCND1 geni, siklin D1 proteinini kodlar siklin bağımlı kinaz 4 ve 6 ile etkileşip hücre dögüsünün regülasyonunda rol alan bir gendir. ATM, PI3/PI4-kinaz ailesinden bir proteini kodlar ve UV ışınlarından kaynaklı DNA hasarında hücre döngüsü kontol noktalarının regülasyonuna katılmaktadır. CHEK2 geni ise DNA hasarında hücre döngüsü kontrol noktalarında P53 ile etkileşerek hücre döngüsünün G1 evresinde durmasını sağlamaktadır. Bu genlere yönelik hedeleyici ajanlar geliştirilmeye çalışılmaktadır.

4.1.8.1. Meme kanserinde DNA hasarı ve Genomik instabilite

4.1.8.1.1. DNA hasarı tamir yolağı

Kanserleşmeye götüren DNA hasarının yeri ve çeşidi çok önemlidir. Bu yüzden hasarın yeri doğru tanımlanmalıdır. Bu değişiklik DNA da tek iplikte mi yoksa çift iplik kırıklarına mı sebep olduğu gösterilmelidir. Çünkü DNA molekülü önemli bilgileri taşır ve bu bilgilerin korunması gerekir. Bu DNA hasarlarının, çeşitli kseroderma pigmentosum (XPA, XPG) gibi sendromlarla bağlantılı oldukları gösterilmiştir ve de kanserleşmeyi etkileyen hastalıklar oldukları bilinmektedir. Yine bu şekildeki anormalliklerin sebep olduğu en önemli kanserler arasında küçük olmayan akciğer kanser hücreleri gösterilmektedir. Bununla birlikte Fanconi anemisiyle ilişkilendirilmiş FANCD1, FANC1, FANKJ, FANCN, PALB2 gibi çeşitli enzimleri sentezleyen genlerdeki anormalliklerde enzim sistemlerinde hereditar meme kanserde BRCA1 ve BRCA2 genleriyle ilişkili oldukları gösterilmiştir (Venkitaraman, 2002).

BRCA genleri hem birçok multifonksiyonel proteini kodlar hem de genetik olarak tümör süpressör gibi bir profil sergiler. Bu genlerdeki mutasyonlar meme ve over gibi kanserlere sebep olmaktadır. Bu genlerden kodlanan önemli proteinlerin DNA çift zincir kırıklarında homolog rekombinasyon tamir mekanizmasında işlev görmektedirler. Yani genomik stabilitenin korunmasından sorumludurlar. BRCA genlerinde heterozigot kaybı DNA hasarının onarılamamasına ve onkogenezin gelişmesine sebep olmaktadır. BRCA DNA tamirinde PARP1 ile birlikte işlev görür (Fong ve ark., 2009).

4.1.8.1.2. Meme kanserinde genomik instabilite

DNA tamir mekanizmasındaki sistemin bozulması DNA hasarının birikmesine, genomik instabilite ve anöploidi gelişimiyle bağlantılı kanserleşme sürecinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Meme kanserinde instabilite HER2 genindeki nokta mutasyonları ve amplifikasyonla ilişkilendirilmiştir. Sonra bu süreç kromozomda insersiyon veya delesyonlarla takip eden duplikasyonların veya delesyonların ortaya çıkabildiği durum görülür. Sonra da bu safhayı anöploidi takip eder ve bu da fetal kanser safhasıyla karakterizedir.

Meme kanserinde daha önceki bölümlerde de ifade edildiği gibi hücre döngüsü kontrol noktalarında TP53 ve CCDN1, ve DNA tamir genleri olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinin genomik stabilite sistemininin elemanlarını oluşturmaktadırlar (Weinberg ve ark., 2007). Bu genlerde veya sistemdeki anormallikler instabiteyi doğurur. Son olarak, bazı önemli genlerde (PIK3CA, MAP2K4 ve PTEN gibi) aşırı ekpresyon profilin veya epigenetik modifikasyonların da stabiteyi bozduğu bilinmektedir.

4.1.8.2. Meme kanserine yol açan genetik değişiklikler

İnvazif meme kanserde birçok farklı gende (TP53, PIK3CA, GATA3, MAP3K1, CDH1) genetik değişiklikler tanımlanmıştır ve bunlar arasında nokta mutasyonları, küçük insersiyonlar, delesyonlar ve amplifikasyonlar yer almaktadır. Meme kanserindeki genetik değişikliklerin prevalansı orta derecededir ve bu tümörlerde 60-80 farklı değişim belirlenmiştir. Dolayısıyla DNA'daki bu değişiklikler hücrenin RNA ve protein içeriğini de etkilemektedir (Kreeger ve Lauffenburger, 2010). Bu etki genlerin ekspreyon düzeylerinde değişime yol açar. Bu da kanser fenotipinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. En sık PIK3CA, TP53 ve GATA1 genlerinde meme kanserde mutasyonlar tanımlanmıştır.

4.1.8.3. Meme kanserinde epigenetik

DNA nükleusta histon ve diğer histon olmayan proteinlerle çevrelenmiş bir kromatin yapısına sahiptir. Epigenetik mekanizmalar (metilasyon, asetilasyon ve fosforilasyon) DNA etkileşiminde proteinlerin paketlenmesinde rol alırlar. Meme kanserinde daha çok iki temel epigenetik mekanizma tanımlanmıştır: DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu. Promoter bölgedeki sitozin bazlarının metilasyonu ilişkili genlerin transkripsiyonunu azaltır. Histon proteinlerindeki asetilasyonlar tekrar bu genlerin aktive olmasını sağlamaktadırlar. Kısaca bu epigenetik mekanizmalar hücre bölünmesinde, doku farklılaşmasında ve doku rejenerasyonu ve tamirinde kök hücrelerin korunmasında kritik rollere sahiptirler (Veeck ve Esteller, 2010).

Meme kanser genomundaki epigenetik değişiklikler erken onkogenez sürecinde görülmektedir. Bu yüzden, bu epigenetik değişikliklerin erken safhada tanısı tümörogenezis için biyomarker yararları olabileceği vurgulanmıştır. Bu amaçla HDAC'lar tripli negatif meme kanser için test edilmiştir ve östrojen ile progesteron reseptörlerin ekspresyonunu yeniden aktive etmişlerdir. Bu yöntemin tedavi amacıyla kullanılabileceği vurgulanmıştır (Fiskus ve ark., 2007).

4.1.9. Meme Kanser Tedavisi

Meme kanserinde çoklu tedavi şekilleri yer almaktadır. Hastalar için en iyi alınan sonuçlar, genellikle profesyonel onkoloji sağlık ekiplerince tedavi görebilme imkanına sahip olanlardır. Bunda ki başarının sırrı multidisiplinler arasındaki korelasyondaki sinerjide yattığını da tahmin etmek güç değildir. Tedavide en önemli şey, bireye özgü olan özelliklerin göz ününde bulundurulması gerekmektedir. Bunlar arasında meme kanser türü, safhası, bununla beraber eşlik eden başka rahatsızlığı olup olmadığı, menapoz durumu ve kişisel tercihlerin önemli olduğu vurgulanmıştır. Meme kanser tedavisi sistemik tedavinin yanısıra lokal tedaviden de oluşmaktadır. Lokal tedavi; cerrahi ve/veya radyasyon tedavisi olabilir. Sistemik tedavi ise; kemoterapi, endokrin terapi ve/veya biyolojik terapi olabilir. Bir hasta tedavi sürecinde bu tedavilerin birini veya hepsini alabilir.

4.1.9.1. Radyasyon Terapisi

Radyasyon terapisi cerrahi müdahaleden sonra klinik olarak kanser hücresi saptanamamış ise lokal kontrol için yapılır. Radyasyon meme kanser nüksünü %70 azaltmaktadır. Radyasyon uygulanan bölgeler arasında meme ve/veya aksilla ve/veya göğüs duvarı yer almaktadır. Radyasyon ya masektomide büyük tümörler görüldüğü zaman (>5 cm) yada lenf nodlar

saptandığı zaman uygulanır (4 veya daha fazla nod varsa pozitif olarak tanımlanır). Eğer adjuvan kemoterapi gerekliyse, radyasyon terapi bu terapi tamamlandıktan sonra uygulanması önerilir. Radyasyon terapi 70 yaş ve üzeri hastalarda T1 meme kanserli, negatif marjinli ve ER(+) ve nod negatif olan tamoksifen veya bir aromataz inhibitörü alacak bireylere uygulanır (www.nccn.org, Erişim tarhi: 10 Şubat 2016; www.breastcancer.org, Erişim tarihi: 17 Mayıs 2016).

Tedavi planlaması için CT görüntülemeye ihtiyaç vardır. Çünkü radyasyon dağılımı ve normal dokuda minimal toksisiteyi belirlemek için gereklidir. Geleneksel dış radyasyon terapisinde hedef tüm memedir. Bu tedavi birkaç dakika sürebileceği gibi bir haftadan 5-6 haftaya kadar da çıkabilmektedir. Bununla birlikte tedaviyi alacak olan kadının 50 yaşından küçük, aksillar nod pozitif veya lenfovasküler invazyon pozitif olması lokal ağrının yüksek olmasına sebep olabilir. Bu da tedavinin uzamasına sebep olabilir.

- **Yoğunluk modülasyonlu radyasyon terapisi:** Tüm memeye radyasyon uygulanırken radyasyon boyu varyans gösterir. Böylece hedeflenen yerlere doğru bir şekilde uygulanmasına imkan sağlar. Üç boyutlu CT planlama için kullanılır. Ayrıca 4 haftada tamamlanabilir.
- **Az parçalı radyasyon terapisi:** Her seferinde radyasyonun dozu arttırılır ve az zamanda total doza getirilir. Bu dozda düşük, orta ve yüksek olarak sınıflandırılır. İngiltere de ise standart tedavide 15 doz planlaması bulunmaktadır.

(AACR, 2012; www.breastcancer.org, Erişim tarihi 17 Mayıs 2016)

4.1.9.2. Sistemik Tedavi

Sistemik tedavide kanserli hastanın yüksek nüks risk durumlarının özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu terapi genellikle intravenoz veya oral olarak uygulanırken, nadiren intramüsküler olarak da uygulanabilmektedir. Sistemik tedavide hastanın cerrahi müdahaleden sonra 70 yaşından küçük olması gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak lokal tedavide hastalık nüks riski toksisite ve sistemik terapide morbiditeye karşı dengede olmalıdır (www.nccn.org, Erişim tarihi: 10 Şubat 2016).

- **Adjuvant terapi:** Klinik olarak meme kanser metastaz bulguları olmayan cerrahi ve/veya radyasyon terapisi alan hastalara uygulanır.
- **Neoadjuvant terapi:** Cerrahi müdahaleden önce büyük tumörlü veya çok agresif tümör hücrelerini parçalamak amacıyla uygulanır.

Son olarak, sistemik terapinin ayrıca metastatik veya nükslü hastalıkları tedavi etmek içinde kullanılmakta olduğunda bilmemiz gerekmektedir.

4.1.9.3. Kemoterapi

Adjuvant ve neoadjuvant terapi genellikle iki yada daha fazla ilacın kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır (Tablo 9). Uygulama da her 1-3 haftada 4-8 döngü şeklinde olabilmektedir. Metastatik hastalıklarda sıklıkla tek bir ilaç kulllanılmaktadır.

- **Tercih Edilen Meme Kanser Adjuvant Tedavi Rejimleri:**

• **TAC:** dosetaksal/doksorubusin/siklofosfamid

• **Dose-dense AC:** doksorubusin/siklofosfamid bunları her iki haftada paklitaksal takip eder.

• **AC:** doksorubusin/siklofosfamid her hafta paclitaxel takip eder.

• **TC:** dosetaksal /siklofosfamid

(www.nccn.org)

Tablo 9:Nüks veya Metastatik Kanserde Tercih Edilen Kemoterapi Rejimleri	
Tek Ajan	**Kombine**
Doksorubisin	CAF/FAC: siklofosfamid/doksorubisin/fluoroürasil
Epirubisin	FEC: fluoroürasil/epirubisin/siklofosfamid
Pegile lipozomal doksorubisin	AC: doksorubisin/siklofosfamid
Paklitaksal	EC: epirubisin/siklofosfamid
Dosetaksal	AT: doksorubisin/dosetaksal; doksorubisin/pakalitaksal
Capecitabine	CMF: siklofosfamid/methotoraks/fluoroürasil
Gemcitabine	Dosetaksal/kapesitabin
Vinorelbine	GT gemsitabin/paklitaksal
Erbulin	

(www.nccn.org, Erişim tarihi 10 Şubat 2016)

4.1.9.4. Hedefe Yönelik Tedavi

Hedefe yönelik tedavilerde hedef mutasyonlar yalnızca neoplastik hücreleri veya malin özellikteki hücreleri öldürmeyi amaçlar. Aynı zamanda normal hücreye az zarar vermeyi veya hiç zarar vermemeyi önemsiyor. Protein veya reseptörleri hedeflemede proliferasyon, sağkalım veya programlı hücre ölümden korur. Meme kanserde en yaygın hedeflenmiş ajanlar arasında HER2 aşırı ekspresyon durumunun baskılanmasi yer almaktadır.

4.1.9.4.1. Trastuzumab (Herceptin®)

Trastuzumab hücre proliferasyon sinyal yolağında yer alan HER2 reseptörünü hedefleyen bir monoklonal antikordur. 1 cm'den büyük ve tüm HER2 (+) tümörlerde uygulanan adjuvant terapinin bir bölümüdür. Herceptin paclitaxel ile birlikte verilmektedir. Bu tedavi yaklaşık 1 yıl sürmektedir. Bu ilaç kardiyak toksisiteden dolayı anthracycline durumunda verilmez. **(**www.nccn.org, Erişim tarihi 10 Şubat 2016)

4.1.9.4.2. Pertuzumab

Trastuzumab gibi bir insan monoklonal antikor olarak tanımlanmış ve HER2 reseptörün farklı bir bölümüne bağlanmaktadır. Ama trastuzumabtan farklı bir etki mekanizması kullanılmaktadır. Kombine tedavilerle uygulandıklarında tek tek uygulamadan daha etkili sonuçlar vermektedirler. Fakat bazı yan etkileri belirlenmiştir. En yaygın yan etkileri ishal, kızarıklık, mukozal inflamasyon ve deride kuruluk olduğu bilinmektedir (www.nccn.org, Erişim tarihi 10 Şubat 2016; Wilkes ve Barton-Burke, 2012).

4.1.9.4.3. Lapatinib

Bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Oral olarak alınan bir küçük moleküldür. Hücre membranında bulunan bir proteinle etkileşir ve hücre içine geçer. Bu ajan HER1 ve HER2'nin tirozin kinazlarıdır ve hücre büyümesi ve tümör hücrelerin ölümüne sebep olur. Yaygın yan etkileri arasında ishal, kızarıklık, mide bulantısı ve yorgunluk yer almaktadır. Lapatinib ayrıca trastuzumab direncine sebep olabilir (www.nccn.org, Erişim tarihi 10 Şubat 2016; Wilkes ve Barton-Burke, 2012).

4.1.9.5. Yeni Tedavi Yöntemleri

- **T-DM1:** HER2 meme kanser hastalarında iyi sonuçlar verdiği ve toksisiteyi azalttığı belirlenmiştir.
- **PARP (poly ADP-ribose polymerase) Inhibitörler:** DNA tamir enzimlerini hedefler ve aşırı ekspresyon durumdadır. Birçok kanser tedavisinde amaç kanserli hücrenin DNA'sını hasar uğratmaktır. Özellikle BRCA pozitif ve triple negatif meme kanserde kullanımı olumlu sonuçlar ortaya çıkarmıştır.
- **WX-671 (upamostat):** uPA'nın bir inhibitörüdür. Faz 2 denemelerinde serbest sağkalım durumunu arttırdığı ve metastatik HER2- meme kanser hastalarına uygulandığı ifade edilmiştir.
- **Everolimus (Afinitor®):** Hormon reseptör +, HER2-postmenapozal meme kanserli hastalarda exemestane ile birlikte uygulanmaktadır. Bu ilaç mTOR sinyal yolağının bir

inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Eğer bu yolak inhibe edilemezse, hücre büyümesi uyarılır ve proliferasyon artar ve anjiyogenez tetiklenir.

- **Vorinostat (Zolinza®) ve Panobinostat:** Bunlar HDAC inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. PARP inhibitör veya cisplatin ile kombine olarak triple negatif meme kanserde uygulanmaktadır.
- **PD033299:** Bir siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür. Bu ilaç hücre döngüsünün kontrolünü bloke eder. Faz 2 denemelerinde postmenapozal kadınlarda ER+, HER2- tümörlerde letrozol ile birlikte uygulandığı ifade edilmiştir.(NCI,n.d., www.breastcancer.org, Erişim tarihi: 17 Mayıs 2016; Bhallal et al., 2012)

4.1.9.6. Endokrin Terapi

Tüm ER ve/veya PR pozitif hastalara adjuvant endokrin terapi uygulanmaktadır.

4.1.9.6.1. Tamoksifen

Tamoksifen selektif ER modülatörüdür. Bu yüzden, östrojen reseptörünü bloke eder. Adjuvant tamoksifen premenapozal ve postmenapozal kadınlarda kullanılabilir. Beş yıllık adjuvant tamoksifen kullanımı kanser nüksünü %31-39 arasında azaltabilmektedir. Eğer hasta kemoterapi aldıysa tamoksifen önerilir (www.nccn.org, Erişim tarihi 10 Şubat 2016).

4.1.9.6.2. Aromataz İnhibitörleri

Aromataz inhibitörleri hormon terapinin bir farklı yaklaşımıdır. Postmenapozal kadınlarda östrojen üretimini baskılamak için kullanılmaktadır. Aromataz inhibitörleri postmenapozal kadınlarda metastatik tipteki tümörlerde öncü adjuvant terapi olarak kullanılmaktadır. Standart kullanım süresi beş yıl olarak belirtilmiştir. Yaygın yan etkileri arasında gece terlemesi ve vajinal kuruluk yer almaktadır. Bu sınıf ilaçlar özellikle iskelet kasları semptomlar, osteoporoz ve kemik kırıkların kullanılmaktadır.

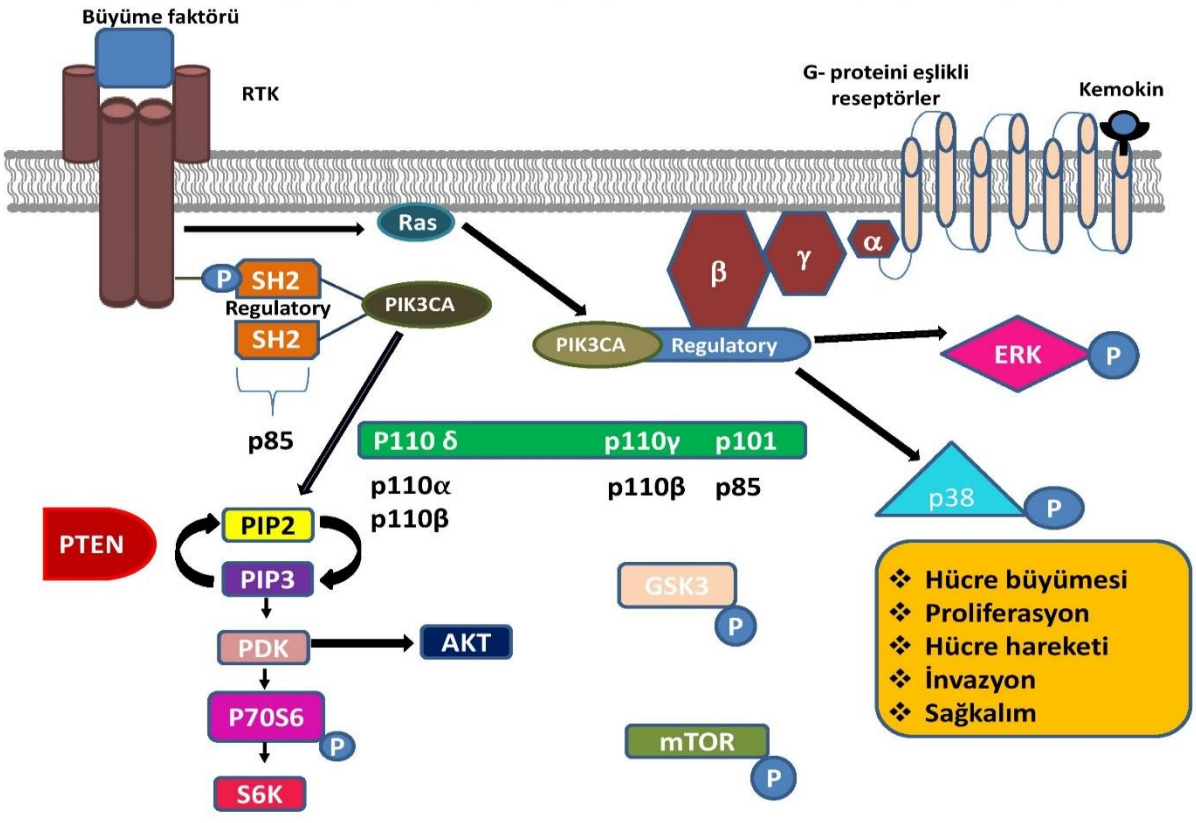
- **<u>Onaylanmış aromataz inhibitörler:</u>**

✓ Letrozole (Femara®)
✓ Anastrozole (Arimidex®)
✓ Exemestane (Aromasin®)

(www.nccn.org, Erişim tarihi: 10 Şubat 2016)

4.2. PI3K Sinyal Yolağı

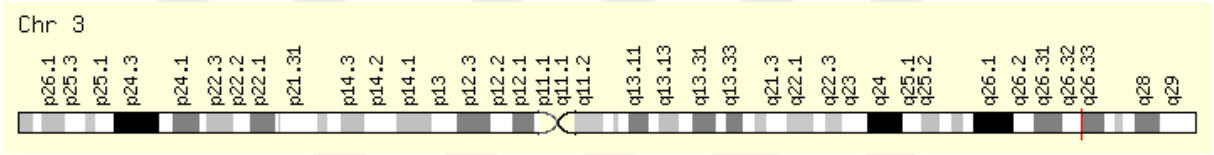
Fosfatidil-inositol-3-kinazlar (PI3Ks) yapılarına ve substrat spesifitelerine göre üç majör alt aileden oluşmaktadırlar (Cantley, 2002). Sınıf I PI3K'lar hücre yüzey reseptörleriyle aktive olurlar ve Sınıf IA ve Sınıf IB olarak iki alt aileden oluşurlar. Sınıf IA heterodimer yapıda, p110 katalitik ve p85 regülatör alt birimlerinden oluşur (Cantley, 2002; Ward ve Finan, 2003). Ayrıca p110'nun üç farklı katalitik izoformları bulunmaktadır. Bunlar p110α, p110β ve p110δ olup, sırasıyla PIK3CA, PIK3CB ve PIK3CD genlerinden kodlanırlar. p85 regülatör alt birim ise üç majör izoforma sahiptir. Bunlar ise; p85α, p85β ve p55γ olup, sırasıyla PIK3R1, PIK3R2 ve PIK3R3 genleri ile kodlanır. Ayrıca PIK3R1 iki kısa izoformdan oluşur. Bunlar ise p55α ve p50α'dır. Sınıf IB PI3K'lar heterodimer yapıda olup, p101 regülatör ve p110γ katalitik alt ünitelerden oluşur. p101'in homologları ise p84 and p87PIKAP'dır (Engelman ve ark., 2006). Sınıf IA PI3K'lar reseptör tirozin kinazlarla aktive olurlar ve Sınıf IB PI3K'lar ise G-protein ile eşlikli olarak aktive olmaktadır. Bu aktivasyonla Fosfatidilinositol 3,4-bifosfat (PIP2) fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfata (PIP3) dönüşür (Engelman ve ark., 2006; Hennessy ve ark., 2005). Buda AKT ve mTOR gibi alt yolakların aktivasyonunu sağlar. Diğer taraftan PTEN geni ise PI3K sinyal yolağın antagonisti olarak tanımlanmıştır. PTEN, PIP3'ün PIP2'ye geri dönüşümünü katalizler (Dirican ve ark., 2016) (Şekil 1).



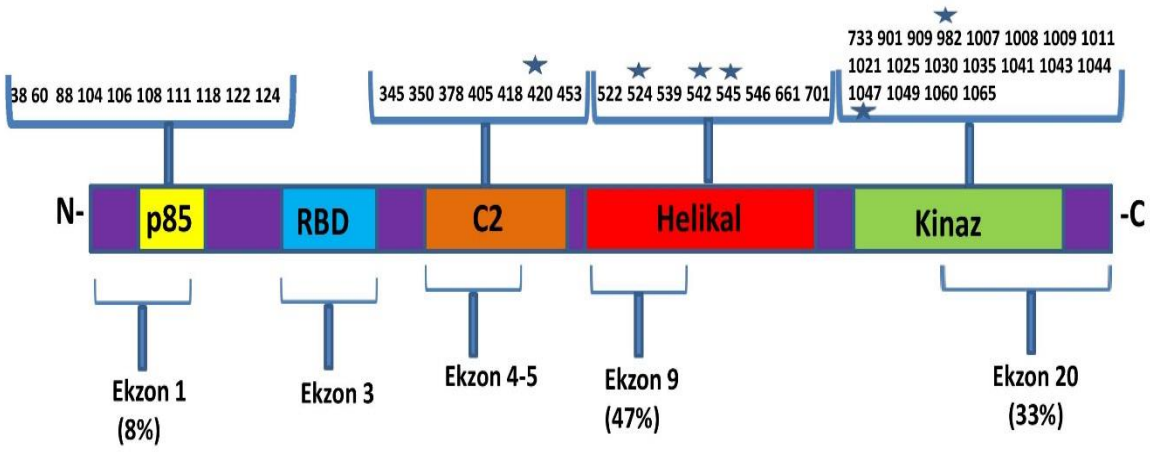
Şekil 1: PI3K sinyal yolağı (Dirican ve ark., 2016)

4.2.1. PIK3CA geni

Sınıf IA PI3K'lar p110a katalitik alt birim PIK3CA geninden kodlanır ve p85a regülatör alt birimlerden oluşan heterodimerik lipid kinazlardır. PIK3CA geni 3. kromozomda lokalize olmuştur (Dirican ve Akkiprik, 2016) (Şekil 2). PIK3CA geni spesifik mutasyonları ekzon 9 (E542/545K; katalitik domain) ve ekzon 20 (H1047R; kinaz domain) sıcak nokta (hot spot) bölgelerinde lokalize olmuşlardır (Dirican ve Akkiprik, 2016) (Şekil 3). Bu mutasyonlar PI3K/AKT sinyalini aktive eder ve hücrenin güçlü selektif büyüme avantajı kazanmasını sağlar. *In vivo* ve *in vitro*'da üç sıcak nokta bölgesinin tümörogenezde rol aldığı bildirilmiştir (Bader ve ark., 2006; Ikenoue ve ark., 2005; Isakoff ve ark., 2005; Kang ve ark., 2005; Samuels ve ark., 2005; Zhao ve ark., 2005).



Şekil 2: PIK3CA genin 3. kromozomdaki lokalizasyonu (http://www.genecards.org, Erişim tarihi: 28 Ocak 2016)



Şekil 3: PIK3CA geni ve sıcak nokta mutasyonları (Dirican ve ark., 2016)

4.2.2. PIK3CA Geni Mutasyonları ve Kanser

PIK3CA genindeki mutasyonlar, PI3K/AKT sinyalizasyondaki düzensizliğini, kinaz aktivitesinin regülasyonunu bozar ve malign transformasyona sebep olur. PI3K aktivitesinin arttışı mesane, over ve kolon gibi insan tümörlerinde gösterilmiştir (Phillips et al., 1998; Benistant ve ark., 2000; Yuan ve ark., 2000). PTEN ve PI3K p85a mutasyonları ve AKT amplifikasyonu ve PI3K p110a da değişiklikler insan kanserierinde kaydedilmiştir (Bellacosa ve ark., 1995; Cantley ve Neel, 1999; Shayesteh ve ark., 1999; Samuels ve ark., 2004). Bu değişiklikler kanser hücrelerindeki PI3K sinyal aktivasyonunu açıklayabilir. Son zamanlarda Samuels ve ark. (2004) fosfatidil inozitol-3-kinaz katalitik alfa (PIK3CA) mutasyonları barındıran genin p110a'dan kodlandığı ve birkaç kanser türünde tanımladıklarını rapor etmişlerdir. PIK3CA mutasyonları 74 kolorektal kanser hastasının %32'isinde, 15 glioblastomanın %27'sinde, 12 meme kanserin %8'inde ve 24 akciğer kanserin %4'ünde saptanmıştır. Buna karşın, 11 pankreatik kanserde ve 12 medullablastomada PIK3CA mutasyonları saptanmamıştır. PIK3CA mutasyonları somatik mutasyonların dışında bir küçük delesyon, yalnış anlamlı mutasyonlar ve yine mutasyonların %75'inden fazlası helikal ve kinaz domainlerinde saptanmıştır (Dirican ve Akkiprik, 2016). Fonksiyon deneyleri ile PIK3CA (H1047R) nokta mutasyonun wild-tip PIK3CA ile karşılaştırıldığında lipid kinaz aktivitesinde rol aldığı gösterilmiş ve tümörogenezde etkili oldukları bulgularına rastlanılmıştır. COSMIC veri tabanına göre PIK3CA mutasyonların insan kanser türlerine göre dağılımlarına baktığımızda, memede %27, endometriyumda %23, kolonda %17, üriner kanalda %15, servikste %14 ve kalınbağırsakta %13 olarak rapor edimiştir (COSMIC, Erişim tarihi: 20 Ocak 2016)

4.2.3. PIK3CA Geni Mutasyonları ve Meme Kanser İlişkisi

PIK3CA mutasyonları meme kanserinde (%27) en yaygın görülen genetik değişikliklerdir ve bu mutasyonların %80'den fazlası p110a'nın helikal (E542K ve E545K) ve kinaz (H1047R) domainlerinde görüldüğü belirtilmiştir (Dirican ve Akkiprik, 2016). Her mutasyon farklı mekanizmalarla katalitik aktivitenin artmasını tetiklemektedir (Zhao ve Vogt 2008). Bu da hücre transformasyonunu indüklediği ifade edilmiştir. H1047R mutantının ekspresyonunun transgenik farelerde meme tümör formasyonunu tetiklediği de ifade edilmiştir (Meyer ve ark., 2011). $PIK3CA_{H1047R}$ ekspresyonu genetik veya farmakolojik olarak inaktive edildiğinde, meme tümörlerinin kaybolmasıyla sonuçlandığı rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2011).

PI3K yolağındaki değişiklikler sıklıkla birlikte oluşurlar. Bu değişiklikler farklı mekanizmalarla kanser hücrelerine çeşitli avantajlar kazandırırlar. Örneğin, PIK3CA mutasyonları, PTEN kaybı olan veya HER2 aşırı ekspresyon profili sergileyen tümörlerde oluşabilmektedirler (Perez-Tenorio ve ark., 2007; Saal ve ark., 2007). P110a sinyalizasyon için, PIK3CA mutasyonu, RTKs ve/veya Ras mutantlarda p110β indüklü G-proetin eşlikli reseptörler ve PTEN eksikliği olan tümörogeneziste tümörlerin büyümesi için gereklidir (Jia ve ark., 2009). HER2 aşırı ekspresyon durumu ve PIK3CA mutasyonları varlığı, hem duktal karsinomada hem de in situ ve invaziv meme kanserde yaygın olduğu bildirilmiştir. Fakat PIK3CA mutasyonlarının intraepitelyal neoplastik lezyonlarda sıklığının düşük olduğu bilinmektedir. Bu durumun PIK3CA mutasyonların HER2 gibi diğer onkogenlerin PI3K yolağı aktivasyonu ile artabileceği vurgulanmıştır (Oda ve ark., 2008; Kalinsky ve ark., 2011). Moleküler analizler meme kanserin üç faklı alt tipten oluştuğunu göstermiştir. Bu farklılığın da meme kanserin seyrinde ve terapotik yanıtta faklılıklara sebep olduğunu göstermiştir. Meme kanseri östrojen reseptör alfa (ERa) ve progestereon reseptörü eksprese etmektedir. Bunlarda hormon bağımlı veya bağımsız olarak terapiye yanıtı değiştirmektedir. HER2 pozitif kanserler HER2 amplifikasyonu veya aşırı ekspresyon sergilemektedir. Bunların tedavisinde direkt olarak HER terapiler uygulanır. Tripli negatif meme kanserlerde ise ER, PR ve HER2 ekspresyonu saptanmamıştır. Bunlar da ise tedavide geleneksel kemoterapi kullanılmaktadır. Bu yüzden biz bu çalışmada ilerde PIK3CA mutasyonlarının varlığında hangi tedavi yöntemi uygulanabileceğine dair yönlendirici katkılarının olabileceğine inanmaktayız.

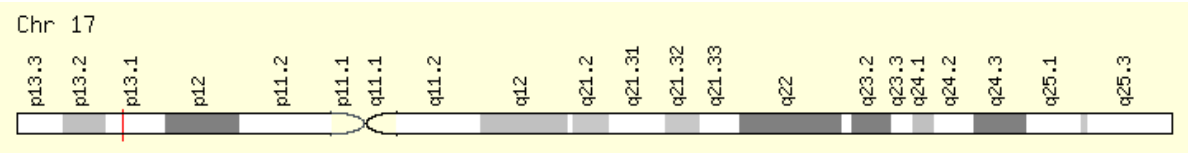
4.2.4. PIK3CA Geni Mutasyonları ve Kanser Tedavisindeki Önemi

Meme kanserinde PI3K seviyesini ayarlamayı hedefleyen birkaç ilaç klinikte geliştirilmiştir. İlk kez bir araştırmacı grup p110'un paketlenmesinde rol alan ATP için ters etkili olabilecek bir ürün ortaya koymuşlar. Bunlar bağlanıp mTOR'un inhibisyonuna yol açmaktadır. pan-PI3K ve p110α'ya özel inhibitörler p110α'nın onkogenik mutantlarına karşı geliştirilmiştirler (Folkes ve ark., 2008; Maira ve ark., 2008). Bir başka araştırmacı grup ise allosterik ve ATP yarışmalı inhibitörler, AKT'nin klinik öncesindeki antitümör aktiviteleri gösterilmiş olan üç izoformuna özgü geliştirmiş moleküllerdir (Chandarlapaty ve ark., 2011; Hirai ve ark., 2010). Ayrıca son zamanlarda bunların insan denemeleri de yapılmaya başlanmış. Allostreik inhibitörlerden MK-2206'nın PH domainine bağlandığı ve AKT'nin plazma membranına lokalizasyonunu önlediği gösterilmiştir (Hirai ve ark., 2010). Makrolid rapamycin ve onun analoglarının bir kompleks FK506-binding protein (FKBP12)'ne bağlandığı ve TORC1'in aktivitesini inhibe ettikleri gösterilmiştir (Dowling ve ark., 2010).

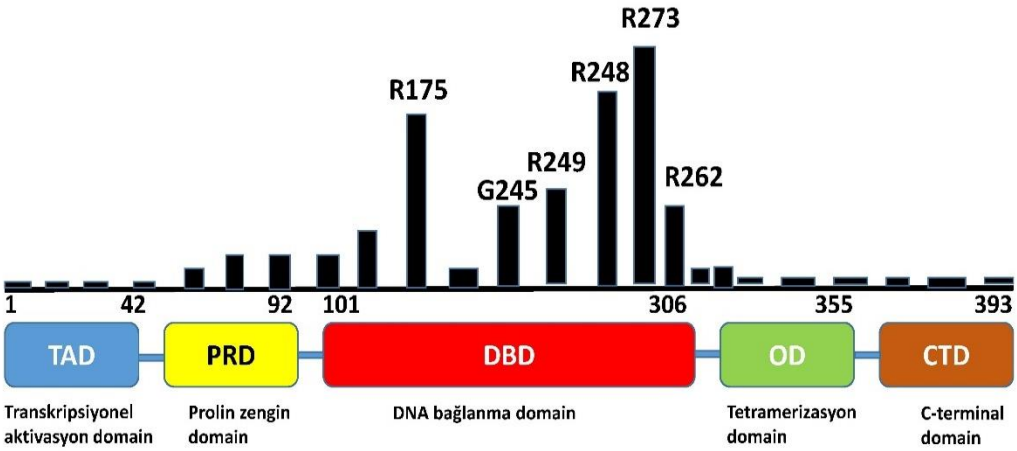
4.3. TP53 geni

p53 ilk olarak 1979 yılında tümör gelişiminde rol alan bir protein olarak tanımlanmıştır (Lane ve Crawford, 1979). 1989 yılında bu rolü tanımlanmış ama burda rol alan genin mutant formu olduğu ifade edilmiştir. p53'ün rolünün ortaya konmasıyla bu genin bir tümör süpressör gen olduğu ve ayrıca TP53'ün açılımı 'tümör protein 53' olanrak tanımlanmıştır (Varley ve ark., 1997; Velculescu ve El-Deiry, 1996). Kronolojik gelişimine baktığımızda 1993 yılında yılın molekülü olarak seçilmiş ve bu gen hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. P53 genin hücresel işlevleri arasında hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamir mekanizmasında, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü olduğu gösterilmiştir. p53, 393 amino asitten oluşan bir proteindir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). p53, 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yaklaşık 20 kb'lık bir alana yayılmış 11 ekzondan oluşan bir gen tarafından kodlanmaktadır (Varley ve ark., 1997) (Şekil 4).

P53 geni amino terminal domainde TAD1 ve TAD2 iki transnaktivasyon domain kapsar ve bu domainlerdeki mutasyonlar p53'ün tümör baskılayıcı özelliğini inaktive edilmesine sebep olmaktadır (Şekil 5). Karboksi terminal domain DNA'nın tek zinciriyle direkt etkileşir ve tetramerizasyon domaini olarak da tanımlanmıştır (Lane ve ark., 2011). P53 geninden birçok farklı protein izoformları; p53α, p53β, p53γ, Δ133p53, Δ133p53β, Δ133p53ɤ, and Δ 40p53p53 kodlanmaktadır. Bu izoformlar *alternatif splising intronları* olan intron 9 ve 2 olduğundan intron 4 *alternatif translasyon başlangıcı* olarak kullanılır (Wei ve ark., 2006).



Şekil 4: TP53 geni kromozom lokalizasyonu (www.genecards.org)



Şekil 5: TP53 geni ve sıcak nokta mutasyonları

4.3.1. TP53 Geni Mutasyonları ve Kanser

- **TP53 –protoonkogen:**

P53 proteini ilk kez SV40 virüsünde tanımlanmıştır (Lane and Crawford 1979; Linzer ve Levine, 1979). Bu proteinin birçok tümörde bolca üretildiği ve fakat normal hücrelerde eksprese olmadığı görülmüştür. Böylece hücresel onkogenik rolü olduğu ifade edilmiştir (DeLeo ve ark., 1979; Rotter, 1983). Bu bulgudan sonra p53 cDNA klonlandığında onkogenik Ras ile yarışmalı bir ilişkisi olduğu primer hücre kültüründe gösterilmiştir (Eliyahu ve ark., 1984; Parada ve ark., 1984). Bununla birlikte p53 over-eksprese durumunun diğer 53-null hücrelerde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Wolf ve ark., 1984). Bu yüzden ilk on yıl boyunca bu genin bir protoonkogen olabileceği kanısı oluşmuştu (Levine ve Oren, 2009).

1989 yılında p53'ün protoonkogen rolü olabileceğine dair bulgular rapor edilmiştir. Vogelstein ve ark. (2000) kolorektal karsinomalarda genetik değişiklikleri göstermeyi amaçlamışlar ve bu tümörlerin %50'den fazlasının heterozigot kaybı gösterdikleri saptanmışlar. Levine ve Oren'in (2009) çalışma grubu yabanıl tip p53'ün aşırı eksprese olduğunu saptamışlar. Bu ve buna benzer elde edilmiş bulgular p53'ün bir tümör süpressör olabileceğini ciddi birşekilde düşündürmüştür.

- **TP53 –tümör süpressör:**

Yabanıl tip p53'ün bir tümör baskılayıcı rolü olduğunu gösteren birkaç çalışma yayınlanmıştır. 1960'ın sonlarına doğru Amerika ve Avrupada birçok kansere yatkın olan bir ailesel sendrom tanımlanmıştır (Li ve Fraumeni, 1969a, b). Bu ailesel kanser sendromu Li-Fraumeni sendromu olarak bilinmektedir. Bu sendrom meme kanseri, sarkomalar ve diğer neplazilere yol açtıkları rapor edilmiştir. Bu sendroma, TP53 germline mutasyonların sebep olduğu bildirilmiştir (Malkin ve ark., 1990; Srivastava ve ark., 1990). Bir fare modelinde p53 homolog rekombinasyonla yıkıma uğratıldığında, p53$^{-/-}$ farelerin gelişimleri normal olmasına karşın, bunların oldukça kansere yatkın oldukları gösterilmiştir (Donehower ve ark., 1992; Attardi ve Jacks, 1999). Literatürde binlerce çalışma, p53 mutasyonlarının kolorektal kanseri sınırlandırmadığı %50'den fazlasında tümör gelişimine sebep olduğu rapor edilmiştir. Böylece p53 mutasyonlarının insan kanserlerindeki en yaygın genetik olaylarda rol oynayan gen olduğu ortaya konmuş oldu (Levine ve Oren, 2009).

İlerleyen yıllarda, P53 genin birçok insan tümöründe rolü olabileceği hipotezi kurulmuştur (Polager ve Ginsberg, 2009). Tüm tümörlerin en az yarısında p53 mutasyonları gözlenmiştir ve birkaç mekanizmayla aktive olabileceği bildirilmiştir. Örneğin birçok vakada DNA tümör virüsü, proteinler kodlar ve p53'ü inaktive eder (Levine ve Oren, 2009). Bu etkileşimlerin biyolojik olarak ortaya konması HPV 16 ve 18 virüsleriyle serviks karsinogenezinde gösterilmiştir (Ferenczy ve Franco, 2002). Tümörlerdeki p53'ün inaktive edilmesiyle ilgili diğer mekanizma ise upregülasyon veya p53 negatif regülatörlerle ilişkili olan mekanizmadır. Mdm2 ve E3 ubikitin ligaz p53'ün majör negatif regülatörüdür ve p53'ün stressiz şartlar altında tutulmasına hizmet eder (Poyurovsky ve Prives, 2006; Manfredi, 2010; Marine ve Lozano, 2010). Mdm2'nin homogları, MdmX p53'ün negatif regülatörü olarak görev yapar (Marine ve ark., 2007). Bu yüzden Mdm2 ve MdmX'in her ikisininde çeşitli neoplasilerde aşırı eksprese olmasi süpriz olarak düşünülmemiştir (Marine ve ark., 2006). Yabanıl tip p53, kanser biyolojisinde kritik bir oyuncu olarak durmaktadır. Fakat biz bu çalışmamızda mutant p53'ün rolü ve önemini ortaya koymayı amaçladık.

Son yıllarda bilim insanları p53 mutasyonlarının tümörogeneziste ki rollerini açıklamaya çalışmışlardır. Yabanıl tip p53 normal bir transkripsiyon faktör gibi işlev görürken, mutant tip p53 transkripsiyon faktör işlevi dışında işlevlere katıldığı bildirilmiştir (Brosh ve Rotter, 2009). Mutant p53 ayrıca, anormal bir protein kompleksine sahiptir.

MRE11, p53'ün iki sıcak noktasıyla etkileşime giren bir faktör olarak tanımlanmıştır (p53-R248W ve p53-R273H) (Song ve ark., 2007). Nükleaz MRE11 ve p53 arasındaki etkileşim Hupki knock-farelerde yeniden fonksiyon kazanımında rol almasını sağladığı gösterilmiştir. Bu etkileşim Mre11–Rad50–NBS1 (MRN) kompleksle çift zincir iplikleri kırar ve ataxia telangiectasia-mutated (ATM)'ın aktive olmasını ve DNA kırıklarının tamirinde ve direnç gelişmesine sebep olduğu rapor edilmiştir (Song ve ark., 2007).

Son zamanlarda tümör örneklerinde mutant p53'ün başka faktörlerle etkileşerek onkogenik aktivitenin ilerlemesini sağladığı gösterilmiştir. Promiyolositik lösemi (PML) protein hücre proliferasyonu tetikler ve programlı hücre ölümüne yol açar. Bu aşamada mutant p53 fizyolojik olarak PML ile etkileşimdedir (Haupt ve ark., 2009). Bununla birlikte mutant p53 prolil izomeraz Pin 1 ile etkileşimde ve serin/treonin fosforilasyonuyla diğer prolin ve izomerazlara bağlanır ve protein stabilitesi ve aktivitesini değiştirir. Pin1, meme kanserinde mutant p53 ile yarışmalı ve bir '*proaggressiveness*' olarak transkripsiyonu indükler ve göç ve invazyonu ilerletir (Girardini ve ark., 2011). Bununla birlikte, bu etkileşim mutant p53'ün yeniden fonksiyon kazanması için gereklidir.

P53 tümör süpressör geni, insan kanserlerinde en yaygın mutant genlerden biridir (Vogelstein ve ark., 2000). P53 mutasyonlarının çoğu yanlış anlamlı mutasyonlardır ve ekzon 5 ile 8 de lokalize olmuşlardır (Hollstein ve ark., 1999; Nigro ve ark., 1989). TP53 mutasyonlarının %75'i yanlış anlamlı ve %9'u delesyonlar ve çerçeve kayması mutasyonları, %7 anlamsız mutasyonlar ve %5'i sessiz mutasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır (Hosoda ve ark., 2014; Petitjean ve ark., 2007). P53 mutasyonları meme duktal karsinoma 15-50% (Elledge ve Allred 1994), akut miyeloid karsinoma 4.5-9% (Nakano ve ark., 2000; Stirewalt ve ark., 2001), astrisitoma ve yumuşak doku sarkoması 11-20% (Taubert ve ark., 1998; Patterson ve ark., 1994) sıklıkla birçok kanserde saptanmıştır. P53 mutasyonlarının bu kanserlerdeki frekansları heterojenlik göstermektedir. Çünkü incelenen popülasyonların ve teknik farklılıklardan kaynaklanan farklılıklar söz konusu olabilmektedir. P53 mutasyonların varlığının hem prognoztik hem de terapotik yönelimde değerli olabileceği ifade edilmektedir. Bu yüzden p53 mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılacak olan yöntemlerin kritik öneme sahip olacağı göz ardı edilmemelidir.

4.3.2. TP53 Geni Mutasyonları ve Meme Kanser İlişkisi

Son zamanlarda yapılmış olan çalışmalarla birlikte TP53 mutasyonların sıklığının meme kanserinde %25-30 arasında olduğu COSMIC veritabanında rapor edilmiştir (COSMIC, Erişim tarihi:20 Ocak 2016). TP53 mutasyonlarının prevalansının kadınlar arasında erken evre meme kanserde popülasyondaki çeşitliliğe göre değişkenlik göstermektedir (Li ve ark., 1988; Mouchawar ve ark., 2010). McCuaig ve ark. (2012) 30 yaş altındaki meme kanser tanısı konumuş BRCA1/2 mutasyonları taşımayan kadınların %5-8'inde ileri yaşlarda TP53 varyasyonlarını beklediklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca TP53 mutasyonların sayısının Li-fraumeni sendromundan kaynaklı kanserlerde daha da artacağı ifade edilmiştir (Gonzalez ve ark., 2009). TP53 mutasyonu taşiyan meme kanser histopatolojisi üzerine yapılmış bir çalışmada, invazif duktal karsinomada ve duktal karsinomada daha sıklıkta bu mutasyonların görüldüğü bildirilmiştir (Masciari ve ark., 2012). Bir başka çalışmada ise 32 invazif dıuktal karsinomanın 30'unda TP53 mutasyonları saptanmıştır. Ayrıca mutasyon saptanan örneklerin %84'ü ER(+), %72'si PR (+) ve %63'ü HER2 (+) oldukları belirlenmiştir (Schon ve Tischkowitz, 2017). Melhem-Bertrandt ve ark. (2012) TP53 mutasyonu taşıyan kadınların HER2 amplifikasyonu veya aşırı ekspresyon profili sergiledikleri göstermişlerdir. Bu mutasyonların dağılımları başka bir çalışmada, tümörün alt tipleriyle ilişkili ve yüksek olduğu belirtilmiştir (Dumay ve ark., 2013). Bu mutasyonlar %26 luminal tümörlerde (%17 luminal A ve %41 luminal B), %69 moleküler apokrin tümörlerde ve %88 bazal benzeri karsinomalarda belirlenmiştir. Bununla birlikte HER2 tümörlerde bu mutasyonların %50'ye yakın olduğu rapor edilmiştir. Değişikliğin tipi, alt tiplerdeki frekansı değiştirebilmekte sıklıkla luminallerde görülse de, p53 protein p63'ün inaktive olmasını sağlar. Böylece yeni fonksiyonlar kazanabilmektedir. Buna karşın, moleküler apokrin ve bazal benzeri tümörlerde kompleks mutasyonlar (insersiyon/delesyon) yüksek frekansta olmasına karşın p53 protein eksikliğine yol açmaktadır (Bertheau ve ark., 2013). TP53 mutasyonları meme kanserin alt tiplerine bağlı olarak farklılıklar sergileyebildiğini daha önce vurgulamıştık. Luminal tümörlerde MDM2 veya MDM4'ün amplifikasyonu veya mutasyon durumu p53'ün inaktivasyonuna neden olduğuna dair bulgulara rastlanmıştır. Bununda endokrin terapiye direnç gelişimine yol açtığı belirtilmiştir (Ellis ve Perou, 2013). Bazal benzeri ve klaudin tip tümörlerde ise p53'ün epitelyal mezenkimal döşümde (EMT) ve kök hücre özelliklerini düzenlediği ifade edilmiştir (Coradini ve ark., 2012; Chang ve ark., 2011; Herschkowitz ve ark., 2012).

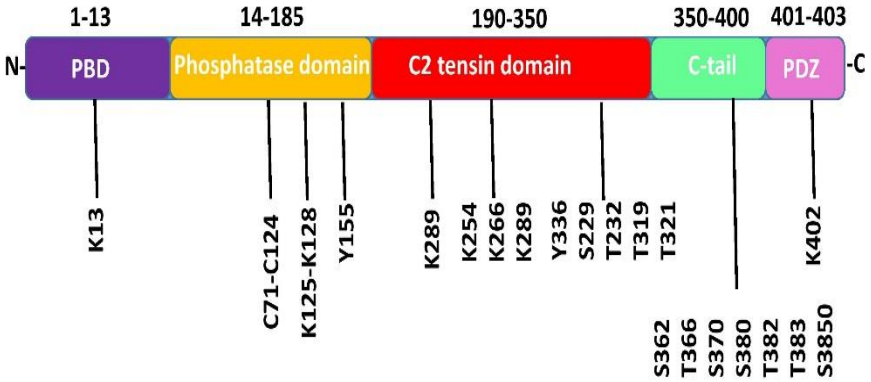
4.3.3. TP53 Geni Mutasyonları ve Kanser Tedavisindeki Önemi

Meme kanser hastalarında ER (+) ve yabanıl tip p53 genine sahip olanlarda sıklıkla kemoterapiye direnç geliştiği ve ER (-) -p53 mutant olanların ise kemoterapiye duyarlı oldukları gösterilmiştir. P53'ün kemoterapideki önemi birçok faktöre bağlıdır ve Bunz ve ark. (1999) hücresel modellerde bu durumu açıklamaya çalışmışlardır. Mutant p53 gene sahip meme tümörlerinde taxane tedavisine dayalı klasik doz duyarlılığıyla herhangi bir korelasyona saptanamamıştır (Chrisanthar ve ark., 2011). Fakat birkaç raporda TP53 durumuyla anthracycyline dayalı tedaviye yanıtta ya iyi ya da kötü yanıtta etkin olabileceğine dair ipuçları elde edilmiştir. L2 veya L3 DNA bağlama domainini üzerindeki etkileri anthracyclinlere dirençle bağlantılı olduğu saptanmış (Geisler ve ark., 2001). Ayrıca TP53 mutasyonları epirubicine monoterapiye yanıtta eksikliğe sebep olduğu belirlenmiş (Chrisanthar ve ark., 2011). Başka bir çalışmada ise, TP53 mutasyonuna sahip olanların doxorubicin–cyclophosphamide kemoterapiye yanıtın yaklaşık %50'ye ulaştığı gösterilmiştir. TP53 yabanıl tip tümörlerde ise tedavide hiçibir yanıt alınamamıştır (Bertheau ve ark., 2002; Bertheau ve ark., 2007; Lehmann-Che ve ark., 2010). Ayrıca mutantlardaki bu kemoterapiye yararın uzun dönemli olduğu belirlenmiştir. Başka bir araştırma grubu, ER (+) meme kanserlerde, ER'nin baskılanmasında p53'ün rolünü belirlemeye çalışmışlardır. ER'nin DNA hasarında p53'ün apoptotik yanıtı sırasında baskılıyıcı rolü olduğu saptanmıştır (Bailey ve ark., 2012). Yapılmış son bir çalışmada ise TP53 gen imzasının ER (+) ve ER (-) meme kanserde kemotrapi yanıtı ve prognozda önemli olduğu bildirilmiştir (Coutant ve ark., 2011).

4.4. PTEN geni

PTEN geni 10. kromozomda lokalize olmuş bir tümör süpressör gendir (Liaw ve ark., 1997). PTEN geni 9 ekzon, 3417 baz çifti uzunluğunda bir transkript ve 403 amino asitlik bir protein kodlar. PTEN amino terminal domain bir protein tirozin fosfataz olup katalitik aktivite rolü var (Lee ve ark., 1999). Karboksi terminal domain diğer sinyal transdusing moleküllerin yaygın olduğu önemli bir alt domaindir. PTEN fosfolipid membranında fosfolipid bağlanma bölgesiyle ilişkili bir karboksi domain içerir (Dirican ve Akkiprik, 2017). Karboksi terminal PDZ bağlanma motifi özellikte ve PDZ domaini içeren proteinlerle etkileşim içindedir. PDZ domainleri hücre sinyalizasyonunda protein-protein etkileşimlerinde önemli role sahiptir (Fanning ve Anderson, 1999). PDZ domainin kaldırılması PTEN'nin etkinliğinin azalmasına sebep olur. Yani PTEN işlevinde azalış, AKT'yi inhibe etme yeteneğinde azalma durumunu ortaya çıkarır. Karboksi terminal domain ayrıca, PEST sekansına sahip ve birkaç fosforilasyon bölge içerir (Dirican ve Akkiprik, 2017) (Şekil 6).

PTEN genindeki germline mutasyonlar, PTEN hamartoma tümör sendromunlarına (Cowden sendromu, Bannayan-Riley-Ruvalcaba sendromu, Proteus sendromu, Proteus-like sendromu) sebep olmaktadır. Cowden sendromu nadir görülen otozomal dominant ailesel kanser sendromu olarak bilinmektedir (Hobert ve Eng, 2009). PTEN genindeki heterozigot kaybı, kanserli dokunun ilerlemesinde önemli rol oynayabilmektedir (Morgan ve ark., 2009).



Şekil 6: PTEN genin lokalizasyonu (Dirican ve Akkiprik, 2017)

4.4.1. PTEN Geni Ekspresyonu ve Kanser

PTEN geni p53 ile birlikte insan kanserlerinde en yaygın görülen tümör süpressörler arasında yer almaktadır. PTEN değişiklikleri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Knobbe ve ark., 2002). PTEN geni kemik, yumuşak doku sarkoması ve meme kanseri gibi birçok tümörde rol aldığı gösterilmiştir. Fakat PTEN yaygın olarak kolon ve meme tümörlerde karşımıza çıkmaktadır (Li ve ark., 1988).

PTEN ekspresyonu, erken gelişim aşamasını regüle edici transkripsiyon faktör 1, peroksizom proliferator aktive edici reseptör γ (PPARγ), P53 ve aktive edici faktör 2 (ATF2) ile upregüle olurken (Teresi ve ark., 2006; Shen ve ark., 2006; Pan ve ark., 2007; Lee ve ark., 2007), transforme edici büyüme faktör (TGF-β), nükleer faktör κB ve Jun ise PTEN'nin negatif regülatörü olarak bilinmektedir (Yang ve ark., 2009; Han ve ark., 2008; Vasudevan ve ark., 2007). Bir araştırmada PTEN ekspresyonu K562 lösemi hücre hatlarında baskılanmıştır. Sonra da PTEN aktivitesi, fosforilasyon, asetilasyon ve oksidasyon ile posttranslasyonel

olarak aktive edilmiştir. PTEN'nin PI3K sinyal yolağında bir antagonistik rolü olduğu bilinmektedir. PTEN, PI3K sinyal yolağında PIP3'ün PIP2'ye dönüşümüne sebep olduğu bilinmektedir (Faurschou ve ark., 2008). PTEN geni metilasyonları, PTEN genin transkripsiyonel olarak susturulmasına sebep olduğu da bilinmektedir (Mueller ve ark., 2012). PTEN aşırı ekspresyon durumunda, hücre döngüsünü tutuklayarak büyümeyi baskılamaktadır (Choi ve ark., 2002; Petrella ve Brinckerhoff, 2009). PTEN aşırı ekspresyon durumunda, siklin D1'in hem nükleer lokalizasyonunu hem de seviyesini azaltarak büyümeyi uyarır (Yamamoto ve ark., 2006). PTEN, hücre döngüsünü tutuklama mekanizması p21kip1 inhibitörlerini arttırarak gerçekleştirir (Andrés-Pons ve ark., 2012).

4.4.2. PTEN Geni Ekspresyonu ve Meme Kanser İlişkisi

PI3K aktivitesinin yüksek olduğu luminal B meme kanserde PTEN ekspresyon seviyesinin azalmasıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Loi ve ark., 2007). Ayrıca PTEN ekspresyonundaki azalışların ER (-) meme kanserde PTEN kaybıyla sonuçlandığı belirtilmiştir (Network, 2012). PTEN ekspresyonundaki azalış, ER (+) hücrelerde antiöstrojen tedavisine dirençle yorumlanmıştır. PTEN ekspresyonundaki küçük değişiklikler bile bazen tedavide yönlendirici ve prognozla ilişkili olabilmektedir. PTEN ekspresyonundaki azalışın daha agresif biyolojik davranışlarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Lee ve ark., 2004). HER3 negatif ve PTEN kaybının, tüm sağkalım durumu için meme kanser için bir risk teşkil ettiği gösterilmiştir (Park ve ark., 2014). miR-301a'nın doğrudan PTEN'i hedeflediği ve baskıladığı Wnt/β-katenin sinyal kaskadın negatif regülatörü olduğu rapor edilmiştir. Bu bulguların meme kanser invazyonu ve metastazını indüklemeyle korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (Ma ve ark., 2014). Başka bir araştırmada miR21'in PI3K-AKT-mTOR inhibisyonunda, PTEN hedefli otofajide ve apoptozu düzenlediği gösterilmiştir (Yu ve ark., 2016). Bir çalışmada ise HER-2 pozitif meme kanserde PTEN durumunun lapatinib tedavisine yanıtı tahmin etmede önemli olabileceği rapor edilmiştir (Du ve ark., 2015).

4.4.3. PTEN Geni Ekspresyonu ve Kanser Tedavisindeki Önemi

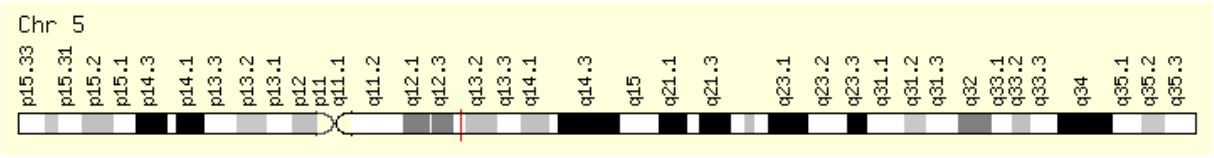
Nagata ve ark. (2004) HER-2 aşırı eksprese olan meme kanser hücrelerinde trastuzumab tedavisinin PTEN membran lokalizasyonunu ve fosfataz aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Diğer taraftan, PTEN'nin down-regülasyonu meme kanser hücrelerinde hem *in vivo* hem de *in vitro* trastuzumab direnci gelişmesine sebep olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2011). Önemli klinik çalışmalarda PTEN'nin meme kanserde trastuzumaba yanıtta prediktif marker olduğu gösterilmiştir. PTEN eksikliği olan meme kanser hastalarında

trastuzumaba yanıtın zayıf olduğu ve tüm sağkalım durumu PTEN'i eksprese etmeyenlerde edenlerle kıyaslandığında sağkalım durumunun kısa olduğu rapor edilmiştir (Nagata ve ark., 2004; Esteva ve ark. 2010). Kolorektal kanserde PTEN'nin down-regüle durumu, EGFR inhibitörlerine (cetuximab, gefitinib ve erlotinib) zayıf yanıtın tahmin edilmesinde bir biyomarker olarak kullanılmaktadır (Kokubo ve ark., 2005; Esteva ve ark., 2010; Frattini ve ark., 2007).

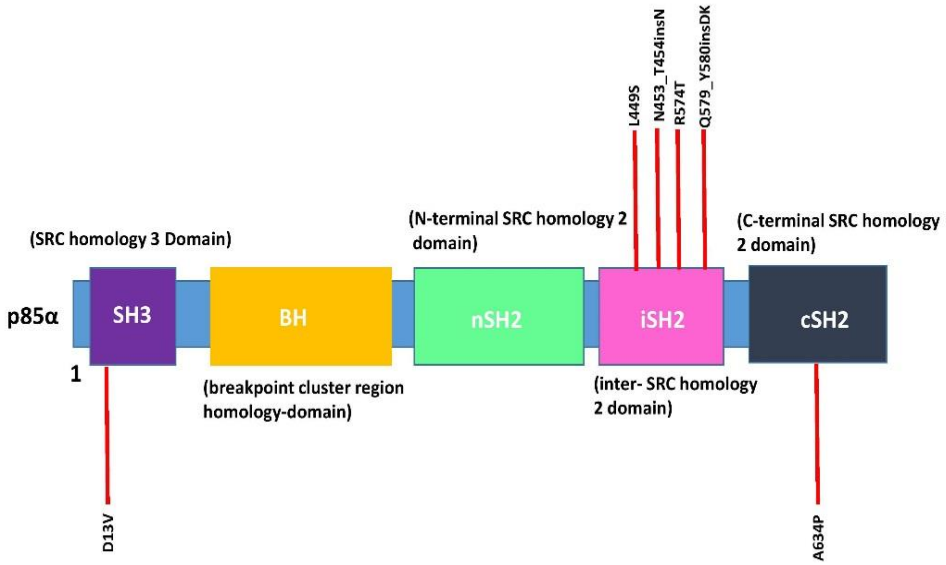
4.5. PIK3R1 geni

PI3K sinyal yolağı p110 ve p85 domainlerinden oluşmaktadır. P110 katalitik alt birim olup, PIK3CA kodlar. Bunun dışında 85 kD (p85), 55 kD (p55) veya 50 kD (p50) regülatör alt birimler kodlar. P85 helikal domaini teşkil etmektedir. P85 domain, p85α (PIK3R1), p85β (PIK3R2) ve p85γ (PIK3R3) olmak üzere 3 alt birimden oluşmaktadır. PIK3R1 geni kromozom 5'te lokalize olmuş ve 9 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 7a). PIK3R1'in esas fonksiyonu PI3K sinyal yolağını inhibe etmektir (Hon ve ark., 2007).

PIK3CA onkogenik mutasyonlarin aktivasyonu insan kanserlerinde yaygındır (Samuels ve ark., 2004; Dirican ve Akkiprik, 2017) (Şekil 7b). Buna karşın PIK3R1 mutasyonların sıklığı çok düşük olduğu belirtilmiştir (Philip ve ark., 2001; Sjoblom ve ark., 2006). Kanser Genom Atlas (TCGA) projesinin amacı geniş skalada genom sekanslaması yapıp kansere sebep olan genom değişikliklerini belirlemekti. TCGA gliablastoma multiforme örneklerinde ilk kez PIK3R1 mutasyonunu saptamışlardır (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Bu çalışmada 91 gliablastoma multiforme örneğin 9'unda PIK3R1 mutasyonu saptanmıştır. Bu PIK3R1 mutasyonlarının tümü N-terminal SH2 domain (ekzon 9) veya SH2 domainin içinde (ekzon 10, 12 ve 13) veya intron 12'de olduğu rapor edilmiştir. Bu domainlerde PI3K sinyalin, PIK3R1 tarafından inhibe olduğu gösterilmiştir (Hon ve ark., 2007).



A)



B)

Şekil 7: PIK3R1 geni lokalizasyonu (A) ve yapısı (B) (Dirican ve Akkiprik, 2017)

4.5.1. PIK3R1 Geni Ekspresyonu ve Kanser

PIK3R1 genin, insan karsinogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Miller ve ark., 2011; Urick ve ark., 2011; Huang ve ark., 2015). PIK3R1 geni over ve kolon tümörlerinde bir onkogen olarak görev yaptığı belirtilmiştir (Philp ve ark., 2001). Fakat hepatoselüler karsinomalarda bir tümör süpressör olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Taniguchi ve ark., 2010). PIK3R1 meme kanserde düşük eksprese durumda zayıf prognozla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Cizkova ve ark., 2013). Başka bir çalışmada bir yalnış anlamlı mutasyonun PIK3R1 ekspresyonunu azalttığı ve kolon kanserle ilişkili olduğu belrtilmiştir (Li ve ark., 2008). PIK3R1'deki bir anlamsız mutasyonun renal kanserle bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Huang ve ark., 2014). Bir çalışmada ise PIK3R1'in hepatoselüler karsinomada upregüle olduğu gösterilmiştir (Huang ve ark., 2014).

Uchino ve ark. (2010) PIK3R1'in MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında anlamlı derecede downregüle olduğu göstermişlerdir. Bunun da metastaz gelişimiyle ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Başka bir çalışmada p85α downregüle durumda olduğunda meme kanserinde bağımsız bir prognoztik marker olabileceği gösterildi (Taniguchi ve ark., 2010). PI3K sinyal yolağın meme kanserindeki önemi iyi bilinmesine ragmen, fakat literatürde p85α

(PIK3R1)'nın meme kanserdeki fonksiyonunu açıklayabilecek yeterli çalışma bulunmamaktadır. Lu ve ark. (2006) akciğer kanserinde PIK3R1'in ekspresyon dağılımını yüksek ve düşük olarak tanımlamışlar. Aynı çalışmada PIK3R1 ekspresyonu, akciğerin düşük risk grubunda düşük ekpresyon profili olduğunu göstermişlerdir.

Bunun dışında başka bir çalışmada PIK3R1 ekspresyonun hücre hatlarındaki seviyesinin hasta sağkalımını etkilediği belirlenmiştir (Serão ve ark., 2011; Weber ve ark., 2011).

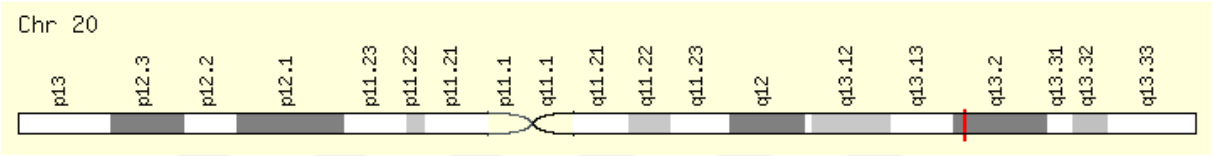
4.5.2. PIK3R1 Geni Ekspresyonu ve Meme Kanser İlişkisi

PIK3R1 meme kanserindeki mutasyon sıklığı %3'ten az olduğu rapor edilmiştir (Network CGA, 2012). Meme kanserindeki rolü ve baskılayıcı işlevin açıklığa kavuşturulabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. PIK3R1 baskılanmış ekspresyon durumunun PI3K yolağın aktivasyonuna ve tümör gelişimine insanlarda yol açtığı ve benzer şekilde hepatoselüler karsinomalarda da gözlenmiştir (Taniguchi ve ark., 2010). Bir araştırmada meme kanserde PIK3R1'in düşük eksprese durumu %61.8 olduğu bildirilmiştir. Bununda %90'nı HR (-) tümörlerde ve %55'i ise HR (+) meme kanserli örenklerde dağılım gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca aynı araştırmada PIK3R1 baskılanmış ekspresyon durumunun hasta sağkalımını düşürdüğü de bildirilmiştir (Cizkova ve ark., 2013). Thorpe ve ark. (2017) PIK3R1 genindeki hemizigoz delesyon varlığında, meme tümörlerinde PIK3R1 ekspresyonunda anlamlı derecede azalış olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada PIK3R1'in transformasyon olayında bir tümör süpressör gibi rol aldığını belirtmişlerdir. Chen ve ark. (2017) fibroblastlardaki PIK3R1 ekpresyon azalışının Wnt kanonikal sinyal yolağını uyararak kanser gelişiminde EMT olayını tetiklediğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, PIK3R1'in meme kanser tümörogenezisin regülasyonunda ve tümör mikroçevrenin şekillenmesinde önemli olduğunu vurgulamışlardır.

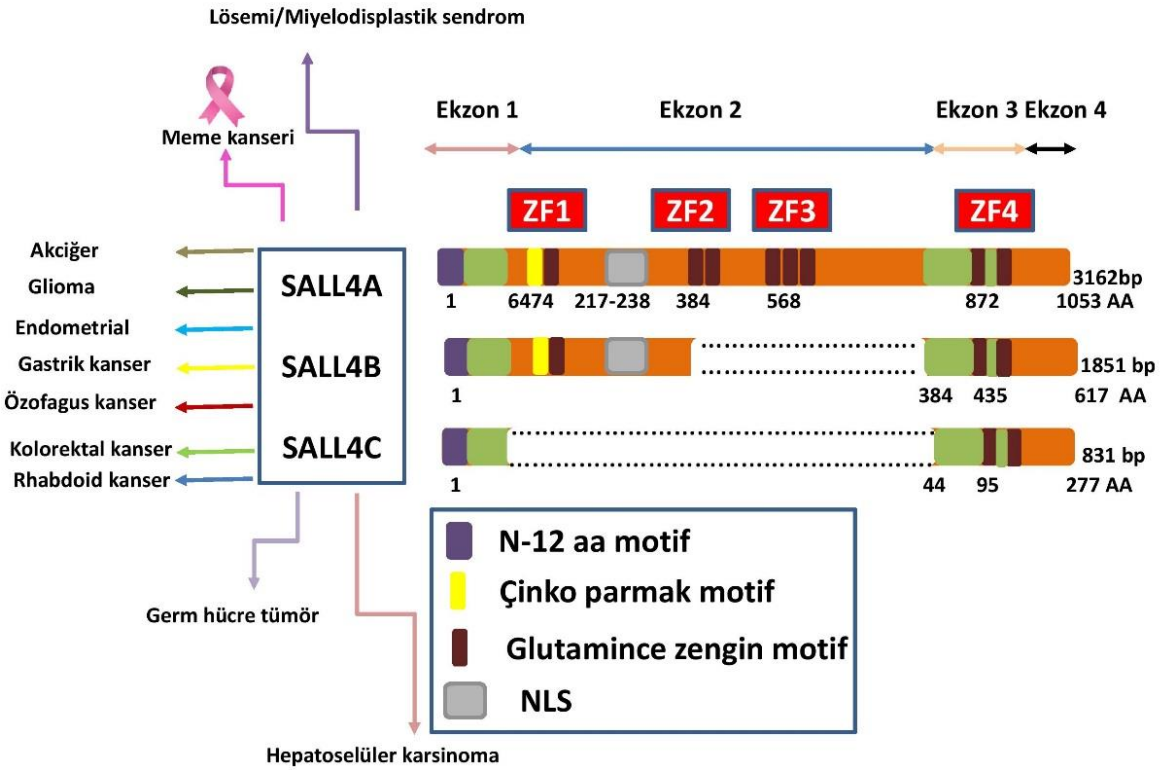
4.6. SALL4 geni

SALL gen ailesi SALL1, SALL2, SALL3 ve SALL4 üyelerinden oluşmaktadır. SALL1 lokususun Townes–Brocks sendromla ilişkili olduğu rapor edilmiş (Kiefer ve ark., 2003). Fakat bildiğiniz gibi SALL2 ve SALL3 henüz bir hastalık fenotipiyle ilişkilendirilmemiştir. SALL4 Drosophila 'spalt homeotic' gen, insan homolog geni olup C2H2 çinko parmak transkripsiyon faktör kodlar (de Celis ve Barrio, 2009). SALL4 geni 20q13.2 kromozomal bölgede lokalize olmuştur (Şekil 8). SALL4 genin SALL4A, SALL4B ve SALL4C olarak tanımlanmış izoformları bulunmaktadır (Şekil 9). SALL4 embriyonik kök hücrelerin

kendilerini yenileme ve pluripotensinin korunmasında anahtar rol oynar (Elling ve ark., 2006; Yang ve ark., 2010; Rao ve ark., 2010). Ayrıca SALL4 genin Okhiora sendromla ilişkili olabileceği rapor edilmiştir. SALL4 embriyonik kök hücrelerde Nanog ve yarışmacı genomik bölgelerle etkileşir (Wu et al., 2006). Bu gen embriyonik gelişim sırasında doku ve organların formasyonuna katılır. SALL4 proteinler transkripsiyon faktörlerdir ve özel genlerin aktivitelerini kontrol etmeye yardımcı olurlar. SALL4 proteinin fonksiyonları tam olarak tanımlanmamıştır. Başka organizmalardaki (Zebra balığı ve fare) benzer proteinlerin fonksiyonlarının temelinde kol veya bacak gelişimine katıldıkları rapor edilmiştir. Bu protein ayrıca göz hareketlerindeki sinirlerin gelişiminde rol aldıkları belirtilmiştir.



Şekil 8: SALL4 Geni kromozom lokalizasyonu (http://www.genecards.org, Erişim tarihi: 18 Şubat 2016)

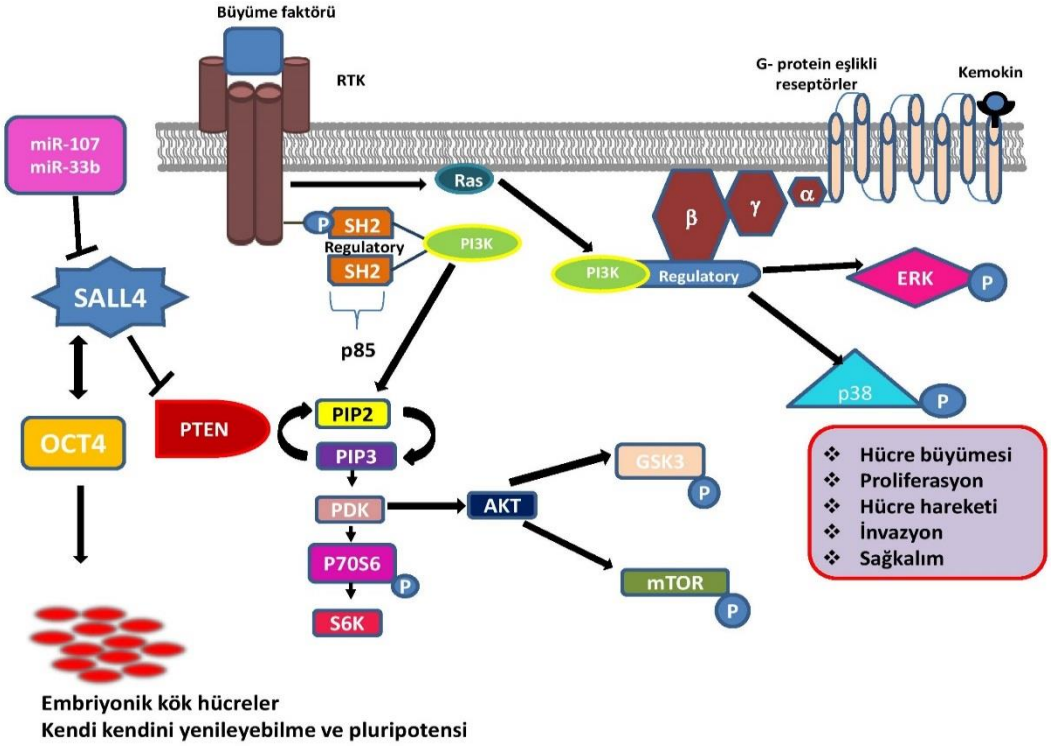


Şekil 9: SALL4 gen ailesi (Dirican ve Akkiprik, 2016)

4.6.1. SALL4 Geni ve Kanser

SALL genlerinin tümörogeneziste ve normal gelişimde rol aldıkları ifade edilmiştir (Kohlhase ve ark., 2000). Bu gen ailesinde SALL1'in anjiyogenezde rol alan VEGF-A'yı indüklediği belirlenmiştir (Yamamoto ve ark., 2010). SALL4'ün birkaç malin kanserde prognoztik özelliğe sahip olduğu ifade edilmiştir (Cao ve ark., 2009; Wang ve ark., 2009; Oikawa ve ark., 2013) ve yüksek SALL4 ekspresyonun metastaz artışı ve proliferasyonun ilerlemesiyle (Kobayashi ve ark., 2011;Yong ve ark., 2013) ve zayıf farklılaşmayla bağlantısı olduğu rapor edilmiştir (Aguila ve ark., 2011;Yang ve ark., 2011). Fare karaciğerde SALL4 ekspresyonun fetal karaciğer gelişiminde azaldığı ifade edilmiştir. Fetal karaciğerin erken evre gelişimi sırasında SALL4'ün rolü olabileceği düşünülmüştür (Oikawa ve ark., 2009). SALL4'ün ilk kez bir onkogenik rol oynadığı lösemide tanımlanmıştır. SALL4'ün insan akut miyeloid lösemide ve SALL4B'nin ise transgenik farelerin gelişiminde önemli rol alan bir gen ekspresyon profili sergilediği bildirilmiştir (Ma ve ark., 2006). Ayrıca SALL4'ün çeşitli kanser türlerinde ekspresyonun olduğu belirtilmiştir (Cui ve ark., 2006; Kobayashi ve ark., 2011). Bununla birlikte bu kanserlerde SALL4'ün prognoztik değeri olabileceği ifade edilmiştir (Cao ve ark., 2009; Wang ve ark., 2009; Oikawa ve ark., 2013). SALL4'ün hepatoselüler karsinomada zayıf prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Lee ve ark., 2006). Fare fetal karaciğerde SALL4'ün ekspresyonun olduğu ama yetişkin karaciğerde eksprese olmadığı rapor edilmiştir. SALL4'ün hepatoselüler karsinomada progenitor alt tipler için önemli marker olabileceği belirtilmiştir. Lösemik hücrelerde SALL4'ün sıklıkla hedeflediği genler arasında p53, BCL2, TNF ve PTEN olduğu belirtilmiştir (Guo ve ark., 2008). SALL4'ün siklin D1 ve siklin D2 ekspresyonunu regüle ederek hücre proliferasyonunda rol aldığı ve EMT'de invazyon ve kanser hücrelerin metastaz sürecine katıldıkları bildirilmiştir (Oikawa ve ark., 2013). Bununla birlikte, SALL4'ün Ki67 ve CA199 ekspresyonuyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Hematopeosis esnasında SALL4'ün CD34+ HSC/HPC popülasyonda eksprese olduğu gösterilmiştir. SALL4 ekspresyonu, olgun kan hücrelerinde down-regüle veya baskılanmıştır. Buna karşin akut miyeloid lösemi ve miyeloid hücre hattlarında ise eksprese olduğu belirtilmiştir. Ki67 ve CA199'un upregülasyonu kanser hücrelerinde proliferasyonu arttıran markerlardır. Bir seri raporda SALL4'ün hücre proliferasyonunda ve birkaç kök hücrede (lösemi ve meme kanser gibi) pluripotensinin korunmasında rol oynadığını göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2006; Elling ve ark., 2006; Yang ve ark., 2010). Hepatoselüler karsinomada SALL4 knocking down edildiğinde hücre canlılığının azaldığı, apoptozun arttığı ve tumorogenisitenin azaldığı ifade edilmiştir (Yong ve ark., 2013). SALL4'ün izoformları ya hematopoetik kök hücrelerde yada progenitorlerininin

hemetopoetik koloni formasyonunda ve *in vitro*'da ekspanse olayında aşırı ekspresyon profili sergilediği ifade edilmiştir (Milanovich ve ark., 2015). Bu şekilde SALL4 ekspresyonun upregüle olması, kanser hücrelerin proliferasyonunu arttırır ve vasküler invazyon ve nöral invazyonu indükler. Ayrıca bazı bulgular SALL4 ve kanser malin davranışı arasında bir bağa işaret eder. SALL4 apoptotik yolakta p53, BCL2, TNF ve PTEN gibi genlerine bağlanır (Guo ve ark., 2008). İlginç bir şekilde, SALL4 doğrudan β-catenin ve Wnt canonical yolağı aktive eder. Bunlar da diğer yolakların sinyalizasyonunu ve onkogenezin indüklenmesine sebep olurlar (Ma ve ark., 2006) (Şekil 10).



Şekil 10: SALL4 geni ve sinyalizasyonu (Dirican ve Akkiprik, 2016)

Meme kanser hücrelerinde SALL4 ekspresyonu, siRNA ile azaltılırsa hücre proliferasyonu hücre döngüsü tutuklandığı için ekspresyon tamamen baskılandığı gözlenmiştir (Itou ve ark., 2013). Buna karşın karaciğer kanserde SALL4'ün aşırı ekspresyon profili sergilediği ve bunun proliferasyonu tetiklediği rapor edilmiştir (Saito ve ark., 2003). Bunun dışında SALL4 aşırı eksprese durumunda gastrik kanserde proliferasyonun ilerlediği, ama SALL4 knockdown edildiğinde proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir (Forghanifard ve ark., 2013). Yine aynı şekilde, endometriyum kanser hücrelerinde SALL4 knockdown ise hücre büyümesinin

baskılandığı ve böylece hücre proliferasyonun da baskılanmış olduğu ve apoptozun indüklendiği saptanmıştır (Itou ve ark., 2013).

Bir araştırma grubu yaptıkları çalışmanın verilerine göre, SALL4 seviyesinin gastrik kanserde yüksek olduğu ve lenf nod metastazıyla ilişkili olduğunu vurgulamışlardır (Forghanifard ve ark., 2013). SALL4 aşırı eksprese iken Twist1, N-cadherin upregüle olduğu ve E-cadherin ise down regüle olduğu gösterilmiştir. Böylece EMT gastrik kanserde indüklenmiş olur. Endometriyal kanserde SALL4'ün down regülasyonu, kanser hücrelerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* da göç ve invazyon özelliklerini etkileyebilmektedir (Itou ve ark., 2013). SALL4 endometrital kanserde c-Myc promotor bölgesine bağlanır. SALL4'ün azalışı c-Myc ekspresyonun azalışına sebep olur. Ayrıca SALL4, E-kaderin ekspresyonunu baskılar ve bazal benzeri meme kanserde hücre dağılımını korur (Hupfeld ve ark., 2013). SALL4 intraselüler adezyon ve hücre hareketinin korunmasını da inhibe eder. Bu gen hücre-hücre etkileşimini ve hücre bölünmesinden sonra fenotipin dağılmasına sebep olur. Bununla birlikte SALL4 bazal benzeri meme kanser hücrelerinde EMT'ye yol açar. SALL4 mezenkimal gen ekspresyonu ve hücre dağılımına yol açtığından ve E-kaderin transkripsiyonunu baskıladığı için EMT'de ZEB1'i regüle eder. SALL4'ün kolorektal kanserde epigenetik olarak susturulduğu saptanmış ve diploid hücrelerde promotorün hipermetile olduğu belirlenmiştir. SALL4 upregüle olduğunda tümorogenezi etkilediği ve proliferasyonu tetiklediği saptanmıştır (Habano ve ark., 2007).



Şekil 11: SALL4'ün yapısı (www.phosphosite.org, Erişim tarihi: 19 Şubat 2016)

4.6.2. SALL4 Geni Ekspresyonu ve Meme Kanser İlişkisi

SALL4 mRNA seviyesi tümör örneklerinin %86.1'inde saptanmıştır (Takashima ve ark., 2011). Ayrıca SALL4 ekspresyon artışı erken safha tümörlerde gözlenmiştir (Kobayashi ve ark., 2011).Fakat SALL4 mRNA ekspresyonu ile meme kanserde klinikopatolojik veriler arasında anlamlı bir korelasyon saptanamamıştır (Kobayashi ve ark., 2011). SALL4 ekspresyonu sirküler meme kanser hücrelerinde gösterilmiştir (Panis ve ark., 2013). Meme kanser hücre hatlarında SALL4 trasnskripsiyonu STAT3 ile pozitif olarak regüle olmaktadır ve SALL4'ün baskılanması proliferatif inhibisyonu sağlamaktadır (Bard ve ark., 2009; Kobayashi ve ark., 2011). Bir araştırmada ise SALL4'ün hücre-hücre adezyonunda koruma ve bazal benzeri meme kanser hücrelerde hücre hareketinin korunmasında rol aldığı gösterilmiştir (Itou ve ark., 2013). Bir başka çalışmada SALL4 mRNA ekspresyonun kanserli dokuda (0.083±0.101) sağlıklı dokuya (0.013±0.011) ($p<0.001$) kıyasla inanılmaz derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Kobayashi ve ark., 2011). Dimri ve ark. (2002) Bmi-1 genin aşırı eksprese durumunun bir onkogen olarak kabul edilen SALL4 tarafından indüklendiği ve insan meme epitel hücrelerinde hücre transformasyonu ve telomeraz aktivitesini indüklediğini rapor etmişlerdir. SALL4'ün upregülasyonu meme kanserde karsinogenezini tetiklediği belirtilmiştir. Bununla birlikte Kobayashi ve ark. (2011) siRNA ile SALL4 ekspresyonunu baskıladıklarında hücre büyümesinin durduğu ve hücre döngüsünün G1 evresinde tutuklandığı gösterilmiştir. Bu araştırmanın sonuçları, SALL4'ün insan malignansisinde onkogenik potansiyeli olduğunu ve özellikle meme kanser gelişiminde Bmi-1'in indüklediğine işaret etmektedir. Böylece, meme kanserin tanısında SALL4 mRNA'nın ölçülmesinin önemli olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca SALL4'ün kanser tedavisinde yeni bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

4.6.3. SALL4 Geni Ekspresyonu ve Kanser Tedavisindeki Önemi

Kemoterapotiklerin metastatik kanser hastalarında en etkin tedaviyi sağladıkları bilinmektedir. Fakat ilaç direnci kemoterapinin başarısında ciddi bir sorun teşkil etmektedir (Gottesman ve ark., 2002). Kemoterapotik direnç mekanizmaları arasında birçok mekanizma yer almakta olup, ABC transporterla gelişen direncin bunların en önemlileri arasında olduğu bilinmektedir. ABC transporterların ayrıca farklı kanserlerde SALL4 tarafından geliştirilen kemoterapotik dirençte de önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Örneğin; SALL4 akut miyeloid lösemide kemoterapotik dirençte doğrudan ABCA3'ü regüle eder (Hupfeld ve ark., 2013). Aynı zamanda, SALL4'ün KML hastalarında kemoterapotik ilaç duyarlılığında ABCA3 ekspresyonunda pozitif regüle edici özelliği olduğu rapor edilmiştir (Hupfeld ve ark.,

2013). SALL4 over eksprese durumda iken hepatoselüler karsinomada hücre proliferasyonunda ABCG2'nin upregüle olmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Oikawa ve ark., 2013). Bir başka araştırmada ise SALL4'ün endometriyal karsinomada ABCB1'in anormal eksprese olmasına sebep olduğu gösterilmiştir (Terek ve ark., 2003).

4.7. Mutasyon Tarama Yöntemleri

Günümüzde birçok mutasyon tarama yöntemi bulunmaktadır (Dirican, 2013). Bu yöntemlerin birbirine göre çeşitli üstünlükleri bulunmaktadır. Özellikle doğru yöntemi seçerken zaman, iş kazancı ve maaliyet ön planda yer almaktadır. Ama hepsinden de öte doğru, kaliteli ve güvenilir yöntemlerin tercih edilmesi gerektiği hiçbir zaman akıldan çıkarılmamalıdır. Bununla birlikte yorumlanması kolay ve değerlendirmesi tutarlı ve doğrulanabilir yöntemler daima tercih edilmelidir. Bu yüzden mutasyon tarama yöntemleri kendi içlerinde direkt ve imdirekt tarama yöntemleri olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Aşağıda bu yöntemler ve özellikleri kısaca özetlenmiştir (Dirican, 2013).

a. Direkt Mutasyon Tarama Yöntemleri: Doğrudan araştırdığımız spesifik mutasyonun olup olmadığını gösterirler. Nokta mutasyonları için Allel Spesifik Olgonükleotid Hibridizasyon (ASO), Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (ARMS), dizi analizi gibi yöntemler tercih edilmektedir. Delesyonlar için de gap-PZR yöntemi bu gruba giren örnekler arasinda yer almaktadir.

b. İndirekt Mutasyon Tarama Yöntemleri: Belirli bir gen veya gen bölgesini, dizi değişikliği olup olmadığının anlaşılması için kullanılan yöntemlerdir. Denature edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE) ve Denature edici Yüksek Performanslı Likid Kromatografi (DHPLC) yöntemleri bu gruba girer. Ancak bu yöntemlerle mutasyonun yerinin saptanmasından sonra dizi analizi ile özgün değişikliğin ortaya konulması gerekir.

4.7.1. Direkt Mutasyon Tarama Yöntemleri

4.7.1.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon enzimlerinden yararlanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) olarak tanımlanmıştır.

Bu yöntemde restriksiyon endonükleazlar çift iplikli DNA'yı özel tanıma bölgelerinden keser. Özellikle bir bakteri bakteriyofajlar tarafından enfekte edildiği zaman, konakçı bakterilerin endonükleaz enzimleri fajların DNA'sını çeşitli noktalardan keser ve böylece o fajın konakçı bakteride çoğalmasını engeller (Griffiths ve ark., 1996). Ayrıca bu enzimlerin kesim bölgeleri 4-8 baz çiftlik DNA sıralarından tanıyarak gerçekleşir. Bazı enzimler ile kesim sonucu yapışkan uçlu parçacıklar ya da küt uçlu parçacıklar elde edilmektedir. PZR ile çoğaltılan DNA parçaları jel elektroforezi ile fragment büyüklüklerine göre ayrıştırılır ve DNA mutasyonları fragment sayısını değiştirir. Jelde denatüre olmuş DNA fragmanları Southern blot yöntemi ile nitroselüloz kâğıdı üzerine alınır. Radyoaktif işaretli bir DNA probu kullanılarak, spesifik DNA parçaları ve profili belirlenebilir (Botstein ve ark., 1980). Ayrıca genomda coding ve non-coding bölgelerde enzim tanıma bölgelerinin dağılımı değişkenlik gösterebiliyor. RFLP analizleri genetik hastalıkların bağlantı ve ilişki çalışmalarında tercih edilen bir yöntemdir. Araştirilan genin allel frekansları belirlenerek hedeflenen mutasyon ve hastalık ilişkisini ortaya koyabilmektedir. Analiz neticesinde elde edilen fragmant modellerine göre kesim noktasının varlığı veya yokluğuna göre hedeflenen farklılıklar saptanabilir. Bu yöntemde en önemli avantajı özgün dizi bilgisine gerek yoktur.

4.7.1.2. ASA (Allele Specific Amplification-ARMS Amplification Refractory Mutation System)

Bu yöntemde iki oligonükleotit probun hibridizasyonu söz konusudur. Bu oligonikleotit problardan biri mutasyonlu diğeri normal dizi için hazırlanmıştır (Saiki ve ark., 1989). Bununla birlikte bu yömtemde "dot blot" veya "reverse dot blot" uygulamalarla homozigot ve normal genotipe sahip bireyler rahatça belirlenebilir. Bunlardan "reverse dot blot" belli toplumlarda sık görülen mutasyonların PZR ile çoğaltılıp pratik bir şekilde tanımlanmasında kullanılan bir yöntemdir (Gold, 2003). Yöntemin temeli normal ve mutasyonlu problar membrana emdirildiği için genomik DNA hibridizasyonuyla normal ve mutant bantlar analiz edilerek değerlendirme yapılır.

4.7.1.3. Primer Uzaması (Primer Extension, SNaPshot)

Tek nükleotit polimorfizmleri ve nokta mutasyonlarını saptamada kullanılan bit metodtur. Tek bir bazlık dizi analiz reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Bu amaçla tasarlanmış olan primer mutasyon olan bazın bir öncesine denk gelecek şekilde sentez gerçekleştirilir. Bu reaksiyonda enzim, tampon çözelti, primer ve dört adet farklı floresan boya ile işaretlenmiş ddNTP'ler yer alır. Bunun dışında, reaksiyon süresince kalıp DNA'daki bazın eşleniği olan baz eklenir. Pikin rengine göre hangi örneğin hangi allel olduğu tanımlanır. Bu yöntem de DNA dizi analizi sistemlerine ihtiyaç duyar (Sümer, 2008).

4.7.1.4. DNA Dizi Analizi

Fred Sanger (1977) ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Zincir sonlanma yöntemi olarak ifade edilmiştir. Temeli enzimatik DNA sentezine dayanmaktadır. En sık kulllanılan dizi analiz tekniği olarakta bilinmektedir. DNA dizi analizinde, dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıptır. Ayrıca DNA sentezi için Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilmektedir.Sanger dizi analizinde, DNA polimerazın dNTP' lerin yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanır. Reaksiyon sırasında sentezlenen DNA' ya bir ddNTP' nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur (htto://yunus.hacettepe.edu.tr, Erişim tarihi: 14 Aralık 2015). Dizi analizindeki reaksiyonlardan elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanır. Elektroforez sonucunda yürümeyle bir merdiven görüntüsü oluşur. Son olarak, jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okuma yapılır (Klug ve ark., 2000). Birçok laboratuvarda, diğer ucuz ve pratik tanı yöntemleri ile gösterilemeyen mutasyonları saptamak için uygulanmaktadır.

4.7.2. İndirekt Mutasyon Tarama Yöntemleri

4.7.2.1. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

SSCP analizi elektroforetik hareket boyunca sekans varyanslarını (nokta mutasyonları gib) saptamaya dayanan bir yöntemdir. Bu varyanslar DNA molekülünde konformasyonel değişikliklere sebep olmaktadır. Nondenatüre şartlar altında ve sıcaklık azaldığı zaman tek zincirli DNA molekülleri tek bir konformasyonel profil sergiler. Bu konformasyonel değişiklikler yürütmede farklılıklar oluşturabilir ve bu farklılıklar saptanabilir (Hayashi, 1991;

Isfahani ve ark., 2006). Bu yöntemin en önemli avantajı basit ve kolay uygulanabilir olmasıdır. Bununla birlikte ucuz ve hızlı olmasıda önemli yönlerinden biridir.

4.7.2.2. Heterodupleks Analizi (Heteroduplex Analysis - HA)

Bu yöntem oldukça basit bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Temelinde normal ve mutant DNA'lar arasında heterodupleksler oluşturarak gerçekleşir. Özellikle mutasyonun olduğu bölgede DNA yalnış eşleştiğinden bükülmeler gerçekleşir veya balonlaşmaya benzer yapılar sergiler (Kozlowski ve Krzyzosiak, 2010). Bunlarda jelde yürütme sırasında heterodupleklser yüzünden farklı hareketler gözlenir. Bu metot 20-600 bç'lik DNA'ları analiz etmek için idealdir. Bu yöntemin mutasyon saptama gücünün yaklaşık %80 olduğu bildirilmiştir (Özkara, 2003).

4.7.2.3. DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

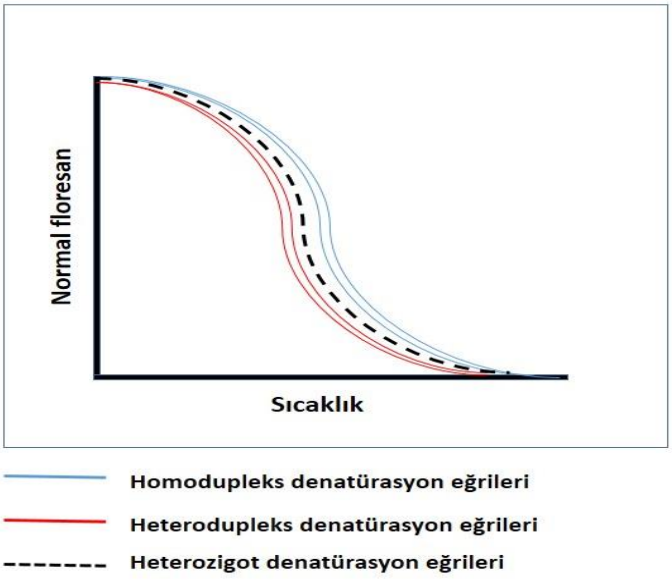
DHPLC insan klinik örneklerin PZR ile amplifiye edilmiş araştırılan genlerdeki varyantları saptamada kullanılan yeni bir analitik yöntemdir. Bu biyolojik materyallerdeki hastalıkla ilişkili genlerdeki mutasyonları tanımlamada kullanılmaktadır (Oefner ve Underhill, 1995; Oefner ve Underhill, 1999; Underhill ve ark., 1997; Xiao ve ark., 2001). Bununla birlikte son zamanlarda uygulama alanları klinik, çevre mikrobiyolojisi, immünoloji, viroloji ve toksikoloji olarak genişlemiştir. Bakteriyal kültürlerde 16S rRNA genlerini tanımlamada da önemli derecede kullanıldığı bilinmektedir (Goldenberg ve ark., 2007; Belda ve ark., 2004). İzole edilmiş ve tanımlanmış mikrobiyal örnekler bir karışımda DHPLC'e özgü primerler kullanılarak hedef gen fragmentleri amplifiye edilir. Filogenetik tanımlama sekanslamayla gerçekleştirilir.

4.7.2.4. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting – HRM)

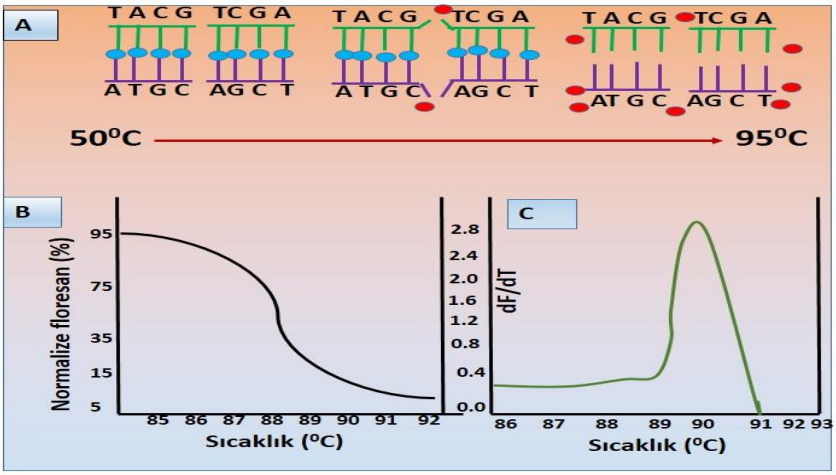
4.7.2.4.1. HRM yöntemi hakında genel bilgiler

HRM 1997 yılında ilk kez Real-time PCR (gerçek zamanlı-eş zamanlı PZR) yöntemine dayanan bir yöntem olarak geliştirilmiştir (Ririe, 1997). Başlangıç miktarına göre oluşan son PCR ürününün kantifikasyonu için kullanılır. HRM yöntemi özgün, hassas ve kolay bir yöntem olarak bilinmektedir. HRM yönteminin temeli, reaksiyon karışımında kullanılan floresan özellikteki boyalar ya da probların oluşturdukları sinyaller sayesinde çift zincirli DNA oluşumu eş zamanlı olarak görülmektedir (Dirican ve Akkiprik, 2017). HRM analizinde çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliği olan floresan boya varlığında hedef DNA bölgesi

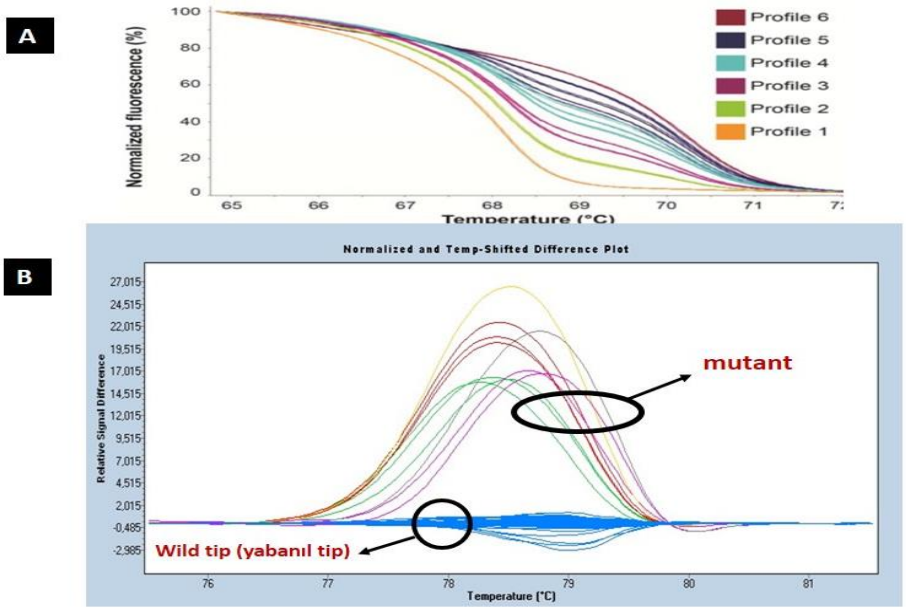
özgül primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılır. Bu kullanılan florasan boyaların en önemli özelliği sadece çift zincirli DNA'ya bağlanarak ışıma vermektedir. Fakat tek zincirli DNA ile etkileşim göstermemektedir. İlginç bir şekilde, floresan özellikteki boya ile hem amplifikasyon sırasında DNA konsantrasyonundaki artış hem de HRM analiziyle DNA'nın erimesi görüntülenmektedir.Sıcaklığın artmasıyla çift zincirli DNA'ya satüre olmuş floresan boya ortamdaki solüsyona geçeceği için floresan şiddetinde azalma görülecektir. Belirli bir DNA örneği için gözlenen erime profili karakteristik olduğu söylenmektedir. HRM yöntemi oldukça ucuz, basit ve yüksek işlem hacimli bir yöntemdir. HRM yöntemi PZR tüpünde kapalı bir sistemde gerçekleşir. En önemli vantajlarından biri ise bu kapalı tüp sistemi sayesinde kontaminasyon riskinin düşük olmasıdır (Dirican ve Akkiprik, 2017). Özetleyecek olursak; çift zincirli DNA örnekleri sıcaklığın artmasıyla ayrışır, boya salınır ve floresan azalır. Bu floresandaki azalış DNA'nın %50'sinin denatüre (Tm) olmasıyla giderek daha hızla artar (Ririe ve ark., 1997). Floresan ölçüm 'erime eğrisi (melt curve)' olarak kaydolur. Bu eğriler 'denatürasyon eğrileri' olarak da tanimlanmişlardir (Şekil 12). Bu eğriler HRM'den elde edilen ham veriyi bize sunmaktadırlar. Bu veri, gerçekte belli zaman dilimlerinde, sıcaklık artışına karşılık floresan sinyal şiddetindeki değişim olarak ifade edilir. Bu erime eğrileri, 65^{o} C'den 95^{o} C'ye kadar olan her 0.5^{o} C'lik sıcaklık artışlarını içermektedirler (Şekil 13). Her bir örneğin analizi, eğrinin şekli ve pozisyonuna göre yapılır (Şekil 14). Örnekler arasındaki her bir bazlık değişiklik hızlı bir şekilde saptanır ve tanımlanır (Ririe ve ark., 1997).



Şekil 12: HRM analizinde homozigot ve heterozigot denatürasyon eğrileri (Dirican ve Akkiprik, 2017)



Şekil 13: a-c. HRM yönteminde reaksiyon mekanizması. (a) Reaksiyon sırasında sıcaklık arttıkça çift iplikli DNA'nın denatüre olması, (b) Normalize eğrilerin oluşması, (c) Amplikonların melting (erime) eğrisi, erime sıcaklığına karşı negatif türev eğrisi (dF/dT) (Dirican ve Akkiprik, 2017)



Şekil 14: a-b. HRM analiz sonucu. (a) Normalize eğriler, (b) HRM analizinden sonraki türev eğriler ile wild tip (yabanıl tip) ve mutasyonların tanımlanması (Dirican ve Akkiprik, 2017)

Son olarak, HRM yöntemi tür tanımlanmasında, DNA haritalamada, metilasyon analizi, DNA parmak izi analizlerinde ve mutasyonların analizi gibi birçok alanda kullanımı bulunmaktadır.

4.7.2.4.2. HRM yöntemiyle yapılmış çalışmalar

Miller ve ark. (2015) HRM yöntemiyle 25 bilinmeyen *Pasteurellaceae* suşunun tanısını koyup, sonra da 16S rRNA sekanslayarak elde ettikleri verileri doğrulamışlardır. Fayaz ve ark. (2014) 100 tiroid karsinomada CHECK2 gen mutasyonlarını HRM ile analiz etmişler ve IVS2+1G?A ve Ile157Thr mutasyonlarını da kontrol grup olarak kullanmışlardır. Elde ettikleri verilere göre bu hastaların tamamının homozigot yabanıl tip olduğunu rapor etmişlerdir. Lopez ve ark. (2015) 151 donor kan örneğini HRM yöntemiyle genotipleme yapmışlar ve 149 IN*B homozigot ve 2 IN*A/B heterozigot olduğunu belirlemişlerdir. Putnik ve ark. (2016) embriyonik böbrek hücrelerde HRM yöntemiyle MAML1 geni metilasyonun RNA ekspresyonu üzerine etkilerini değerlendirmeyi amaçlamışlar. Elde ettikleri verilere göre MAML1 gen metilasyonun 11802 CpG bölgesi içerdiği ve 225 gen üzerinde ekspresyon farklılıklarına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Kasajova ve ark. (2015) 98 meme kanser hastasında ve 100 sağlıklı kontrolde NAT2 polimorfizmlerini HRM yöntemiyle belirlemeyi hedeflemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre günde 5 sigaradan fazla içenlerde AA genotipte rs1799930 polimorfizmi tanımlanmıştır. TT genotipte rs1041983, rs1801280 CC genotipte, and rs1799930 AA genotipte olan hastaların günde 5 sigara ve daha fazla kullandıkları ve hiç sigara içmeyen bireylerle karşılaştırdıklarında daha yüksek meme kanser riskine sahip oldukları gösterilmiştir. Papadopoulou ve ark. (2015) 1472 küçük olmayan akciğer kanser hücrelerinde HRM yöntemiyle, EGFR ve KRAS gen mutasyonların frekansını belirlemeyi amaçlamışlardır. EGFR mutasyonların frekansı %15.83 olarak gösterilmiştir. Ayrıca HRM ve Sanger yöntemlerinin tutarlılığının %99.8 olarak rapor etmişlerdir. Yang ve ark. (2017) Çinli popülasyonda ankilozan spondilit hastalarda IL-23R ve IL-17A polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi belirlemeye çalışmışlardır. Bu geneotipleme için HRM yöntemini kullanmışlardır ve IL-23R geni için rs6693831, rs7517847, rs1884444, rs10889677 ve IL-17A geni için de rs2275913 tek nükleotit polimorfizmleri tercih edilmiştir. rs2275913 polimorfizmin bu hastalıkta en yüksek morbiditeye sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca ilk kez ankilozan spondilitte rs6693831 ve rs1884444 polimorfizmleri IL-23R geninde ve rs2275913 polimorfizmi ise IL-17A geninde saptandığı vurgulanmıştır. Son olarak bizde 2014 yılında 101 meme kanser örneğinde 31 tane PIK3CA mutasyonunu HRM yöntemiyle belirlemiştik. HRM yöntemini, Sanger dizi analiziyle karşılaştırdığımızda %87 doğrulukla analiz ettiğini rapor etmiştik (Dirican ve ark., 2014).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5. 1. Kullanılan Aletler

- ABI 3500 (Holland)
- Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)
- Isı Bloğu, Techne DB-ZA (İngiltere)
- Soğutmalı Santrifüj IEC, MP4R (A.B.D.)
- Isı döngü cihazı (Biomtra, ABD)
- Manyetik Karıştırıcı, Elektro-Mag (Türkiye)
- Hassas Terazi, Mettler AT261 (İsviçre)
- Hassas Terazi, Mettler PJ6000 (İsviçre)
- Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (A.B.D.)
- Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)
- Etüv, Heraeus (Almanya)
- Laminar Flow, Özge A.Ş (Türkiye)
- Otoklav, All American (A.B.D)
- Spektrofotometre, Unicam 8625 (İngiltere)
- Kırık Buz Makinası, Scotsman (A.B.D.)
- Buz Dolabı, Arçelik (Türkiye)
- Derin Dondurucu -20oC, Philco (Türkiye)
- Derin Dondurucu -80oC, Thermo 702 (A.B.D.)
- Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)
- Biyolojik Güvenlik Kabini (A.B.D)
- Light Cycler 480, Roche (Almanya)

5. 2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Ependorf Tüp 1.5 mL, Axygen (A.B.D.)
- Ependorf Tüp 2.0 mL, Axygen (A.B.D.)
- Falkon Tüp 15 mL, TPP (İsviçre)
- Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)
- Filtreli Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)
- PerfectPure Kandan RNA İzolasyon Kiti, 5 PRIME (A.B.D.)
- LightCycler 480 HRM Master, Roche (Germany)
- Ependorf Tüp 1.5 mL, Axygen (A.B.D.)
- Ependorf Tüp 2.0 mL, Axygen (A.B.D.)
- Falkon Tüp 50 mL, TPP (İsviçre)
- Falkon Tüp 15 mL, TPP (İsviçre)
- Pozitif Yüklü Lam, Citoglas (İngiltere)
- Lamel, İso Therm (Türkiye)
- Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)
- Filtreli Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)
- Serolojik Pipetler (5mL, 10mL, 25 mL), Axygen (A.B.D.)
- High Pure miRNA İzolasyon Kiti, Roche (Almanya)
- Peroksidaz Deteksiyon Sistemi Kiti, Novacastra (İngiltere)
- Universal RT MicroRNA PZR Sybr Green Master mix, Exiqon (A.B.D)
- Universal cDNA Sentez Kiti, Exiqon (A.B.D)
- Kuvartz küvetler

5. 3. Kullanılan Kimyasallar

- DNA Ladder, GeneOn
- EtOH, Merck (Almanya)
- SDS, Sigma (A.B.D.)
- DEPC, Sigma (A.B.D.)
- Ksilen, Sigma (A.B.D.)
- HRM-PIK3CA Primer seti, HPLC grade primerler toplam 100 mer
- PIK3CA-HRM-ekzon 9-FP1: 5’ TGACAAAGAACAGCTCAAAGCAA 3ı ,
- PIK3CA-HRM-ekzon 9-RP1: 5’ TTTTAGCACTTACCTGTGACTCCA 3’,
- PIK3CA-HRM-ekzon 20-FP2: 5’ GCAAGAGGCTTTGGAGTATTTCA 3’
- PIK3CA-HRM-ekzon 20-RP2 : 5’ ATGCTGTTTAATTGTGTGGAAGATC 3’
- PIK3CA konvansiyonel PZR Primer seti, 100 nM PZR grade,
- PIK3CA-Ekzon 9-FP:5’ TGAAAATGTATTTGCTTTTTCTGT 3’,
- PIK3CA-Ekzon 9-RP: 5’ TGTAAATTCTGCTTTATTTATTCC 3’,
- PIK3CA-Ekzon 20-FP: 5’ TTTGCTCCAAACTGACCAA 3’
- PIK3CA-Ekzon 20-RP: 5’ GCATGCTGTTTAATTGTGTGG 3’
- TP53- HRM- Ekzon 5- FP: 5’TTC CTC TTC CTG CAG TAC TC 3’
- TP53- HRM- Ekzon 5- RP: 5’ CAG CTG CTC ACC ATC GCT AT3’
- TP53- HRM- Ekzon 6- FP: 5’CAC TGA TTG CTC TTA GGT CT 3’
- TP53- HRM- Ekzon 6- RP: 5’ AGT TGC AAA CCA GAC CTC AG3’
- TP53- HRM- Ekzon 7- FP: 5’GTG TTA TCT CCT AGG TTG GC3’
- TP53- HRM- Ekzon 7- RP: 5’ CAA GTG GCT CCT GAC CTG GA3’
- TP53- HRM- Ekzon 8- FP: 5’CCT ATC CTG AGT A GT GGT AA 3’
- TP53- HRM- Ekzon 8- RP: 5’TCC TGC TTG CTT ACC TCG CT3’
- PTEN Realtime Ready Catalog Assay, ROCHE
- SALL4 Realtime Ready Catalog Assay, ROCHE
- PIK3R1 Realtime Ready Catalog Assay, ROCHE
- High Perfect Pure RNA Tissue Kit
- Transcriptor High Fidelity CDNA Synthesis Kit
- Lightcycler 480 HRM Master, Roche (GERMANY)
- Lightcycler® 480 Probes Master
- RT Catalog Assay, Roche
- BİOMAX, Agarose, 100 g Prona

5. 4. Kullanılan Çözeltiler

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler;

***10X TBE (Tris Buffered EDTA) Hazırlanışı;**

108 g Tris baz

55 g Borik asit (pH 8,0)

7.44 g EDTA (40 ml, 0.4 M EDTA)

***1X TBE Hazırlanışı;**

10 X TBE'den 100 ml + 900 ml distile su eklenir.

5. 5. Kullanılan Materyaller

Bu çalışmada 2010-2012 yılları arasında yüksek lisans tez çalışmamız için topladığımız 66 ve 2016-2017 yılları arasında ise topladığımız 79 meme kanser taze doku örneği, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Örneklerin temini için ''09.2015.264 sayılı onayla Marmara Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu'ndan'' izin alınmıştır. Ayrıca Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuarlarının mevcut olanakları bölüm yetkililerinden yazılı olarak izin alınmış olarak kullanılmıştır.

5.6. DNA ve RNA izolasyonu

5.6.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu '**High Pure PCR Template Preparation Kiti**' ile gerçekleştirildi.

İzolasyon sırasındaki aşamalar aşağıda özetlenmiştir:

İzolasyon aşamaları;

1. 25-50 mg doku örneği iyice parçalanır, 200 µL Tissue Lysis Buffer ve 40 µL proteinaz K 1.5 mL'lik eppendorfa alınır, vortekslenir ve 1 saat 55^0C'de inkübasyona bırakılır.
2. Üzerine 200 µL Binding Buffer eklenir, vortekslenip 10 dk 70^oC'de inkübe edilir.
3. İnkübasyonun ardından tüpe 100 µL isopropanol eklenir ve vortekslenir.
4. High Pure filtre koleksiyon tüpüyle birleştirilir ve örnek filtreye aktarılır (600-700 µL)
5. 8000g'de 1 dk santrifüj edilir. Süzüntü atılır, filtre yeni koleksiyon tüpüne alınır.
6. Filtreye 500 µL Inhibitor Removal Buffer eklenir, 8000g'de 1 dk santrifüj edilir.
7. Süzüntü atılır, filtre yeni koleksiyon tüpüne alınır.
8. Filtreye 500 µL Wash Buffer eklenir, 8000g'de 1 dk santrifüj edilir.
9. Süzüntü atılır, filtre aynı koleksiyon tüpüne alınır maksimum hızda 15000 g'de 10 saniye santrifüj edilir.

10. Filtre elüsyon tüpüne alınır, filtreye 200 µL 70 ºC'ye ısıtılmış elüsyon buffer eklenir, 8000g'de 1 dk santrifüj edilir.
11. Eğer hemen kullanılmayacaksa -20 ^{0}C'de stoklanır.

5.6.2. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu '**High Pure RNA Tissue Kiti**' ile gerçekleştirildi. İzolasyon sırasındaki aşamalar aşağıda özetlenmiştir:

İzolasyon aşamaları;

1- 400 µL Lysis/Binding buffer ve max. 20-25 mg taze doku 1.5 mL'lik eppendorfa alınır ve iyice homojenize edilir, parçalanır.
2- Mikrosantrifüjde 2 dk maksimum hızda (13.000 g) edilir ve süpernatant sonraki aşamada kullanılır.
3- 200 µL (0.5 volumes) ethanol ve lizat süpernatantı iyice karıştırılır.
4- High Pure filtre koleksiyon tüpüyle birleştirilir ve örnek filtreye aktarılır (700 µL)
5- 30 saniye maksimum hızda (13.000 g) mikrosantrifüj edilir. Süzüntü atılır, filtre yeni koleksiyon tüpüne alınır.
6- 90 µL DNase Incubation Buffer (beyaz kapak) ve 10 µL DNase I çalışma solüsyonu 1.5 mL'lik eppendorfa alınır ve mix hazırlanır. Sonra bu mix filtreye eklenir.
--->15 dk (+15)-(+25)^{o} C'de inkübe edilir.
7- Filtreye 500 µL Wash Buffer I (vial 4) eklenir, 8000g'de 15 saniye santrifüj edilir. Süzüntü atılır, filtre yeni koleksiyon tüpüne alınır.
8- Filtreye 500 µL Wash Buffer II (vial 5) eklenir, 8000g'de 15 saniye santrifüj edilir. Süzüntü atılır, filtre yeni koleksiyon tüpüne alınır.
9- Filtreye 300 µL Wash Buffer II (vial 5) eklenir, 13000g'de 2 dk santrifüj edilir. Süzüntü atılır.
10- Filtre elüsyon tüpüne alınır, filtreye 100 µL elüsyon buffer eklenir, 8000g'de 1 dk santrifüj edilir.
11. Eğer hemen kullanılmayacaksa (-20) ^{0}C'de stoklanır.

5.7. HRM Yöntemi ile PIK3CA ve TP53 Gen Mutasyonların Belirlenmesi

HRM analizinde DNA ikili ipliğinin ısı ile açılması sırasında herhangi bir baz değişimi varlığında, ortamdaki iki farklı floresan boyar maddenin de yardımıyla bu bölgelerde yaydıkları ışınımın anlık izlenmesiyle normalden farklı pikler oluşmaktadır. Oluşan bu pikler 'erime eğrisi' olarak adlandırılmaktadır. HRM yöntemi için '**Lightcycler 480 HRM Master ROCHE'** kiti kullanılmıştır.

HRM karışımı:

dH2O	1,8 µl
Master miks	10 µl (1X)
Primer F	0,4 µl (0,2 µM)
Primer R	0,4 µl (0,2 µM)
MgCl2	2,4 µl (0,2 mM)
DNA	5 µl (20 ng)
TOPLAM	**20 µL**

- 96'lık plate çalışılacak örnek sayısı kadar kuyucuğa HRM karışımından 15 µl konur.
- Karışımın konulduğu her bir kuyucuğa 5 µl DNA örneklerinden konur.
-Blank'e sadece su konur.
-Plate'in üstü kapatılır.
-3000 rpm de 2 dk santrifüj edilir.
-Plate Roche-LC480 cihazına yerleştirilir.
-HRM programı ayarlanır ve program başlatılır.
-*Görüntüleme:* Sonuçlar için HRM sonrası jel gerekmemektedir. 'LightCycler®480 Gene Scanning module' programı ile değerlendirme yapılır ve çıktı alınır.

•**HRM programı:** HRM programı PIK3CA (ekzon 9 ve 20) ve TP53 geni (ekzon 5, 6, 7 ve 8) için aşağıdaki gibi ayarlanır.
Pre-Inkübasyon 95ºC'de 10 dakika; *Amplifikasyon* 95º C'de 10 saniye, 60ºC'de 15 saniye ve 72ºC'de 15 sn; *HRM* 95ºC'de 1 dakika, 40ºC'de 1 dk, 65ºC'de 1 saniye, 95ºC'de devam; *Soğuma* 40ºC'de 10 saniye olarak belirlendi.

PZR Yöntemi

HRM yöntemindeki ürünlerden mutasyon olabileceği tahmin edilen örnekler konvansiyonel PZR yöntemiyle amplifiye edilir. Bu çalışmada sekans analizinden önce hem PIK3CA geni hem de TP53 geni için konvansiyonel PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amaç sekans için daha temiz, kaliteli ve daha uzun bir amplifikasyon bölgesine sahip PZR ürünleri hazırlamaktır. Sonrada etidyum bromür kullanılarak jel elektroforezinde (%2'lik agaroz jel) yürütüldü ve UV'de görüntülenerek doğrulandı. Bu aşamadan sonrada sekans analizi için örnekler hazırlanmış oldu. Konvansiyonal PZR işlemi için PIK3CA geni ekzon 9 ve ekzon 20 bölgeleri için HRM yönteminde kullanılan primerlerin dışında primerler kullanıldı. Fakat TP53 geni bütçemiz kısıtlı olduğu için HRM analizinde kullanılan primerler tercih edildi.

PZR Programı

PZR programımız 40 siklustan oluşturuldu. 100 ng genomik DNA örneği kullanıldı.

PIK3CA geni için;

Ekzon 20 için PZR Programı:

Denatürasyon 94 °C'de 1 dk, annealing 53°C' de 1 dk, uzama safhası 72 °C' de 1 dk' da ve son uzama safhası ise 72°C'de 5 dk olarak thermal cycler (ısı döngüsü) cihazında gerçekleştirildi. Sonra PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür kullanılarak UV'de 300 bç'lik bantlar görüntülenerek doğrulandı.

Ekzon 9 için PZR Programı:

Denatürasyon 94 °C'de 1 dk, annealing 56°C' de 1 dk, uzama safhası 72 °C' de 1 dk'da ve son uzama safhası ise 72°C'de 5 dk olarak thermal cycler cihazında gerçekleştirildi. Sonra PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür kullanılarak UV'de 340 bç'lik bantlar görüntülenerek doğrulandı.

TP53 geni için;

Ekzon 5 için PZR Programı:

Denatürasyon 94 °C'de 1 dk, annealing 59°C' de 1 dk, uzama safhası 72 °C' de 1 dk'da ve son uzama safhası ise 72°C'de 5 dk olarak thermal cycler cihazında gerçekleştirildi. Sonra PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür kullanılarak UV'de 268 bç'lik bantlar görüntülenerek doğrulandı.

Ekzon 6 için PZR Programı:

Denatürasyon 94 °C'de 1 dk, annealing 57°C' de 1 dk, uzama safhası 72 °C' de 1 dk'da ve son uzama safhası ise 72°C'de 5 dk olarak thermal cycler cihazında gerçekleştirildi. Sonra PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür kullanılarak UV'de 181 bç'lik bantlar görüntülenerek doğrulandı.

Ekzon 7 için PZR Programı:

Denatürasyon 94 °C'de 1 dk, annealing 60°C' de 1 dk, uzama safhası 72 °C' de 1 dk'da ve son uzama safhası ise 72°C'de 5 dk olarak thermal cycler cihazında gerçekleştirildi. Sonra PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür kullanılarak UV'de 171 bç'lik bantlar görüntülenerek doğrulandı.

Ekzon 8 için PZR Programı:

Denatürasyon 94 °C'de 1 dk, annealing 58°C' de 1 dk, uzama safhası 72 °C' de 1 dk'da ve son uzama safhası ise 72°C'de 5 dk olarak thermal cycler cihazında gerçekleştirildi. Sonra PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür kullanılarak UV'de 230 bç'lik bantlar görüntülenerek doğrulandı.

5.8. Dizi Analizi (Sanger)

DNA dizi analizi için '**ABI 3500 Dizi Analizi Cihazı**' kullanıldı. Dizi analizi aşamaları aşağıda özetlenmiştir.

1. <u>Aşama</u>: *ExoSap Reaksiyonu*: PZR reaksiyonu ürünlerinin pürüfikasyonunu gerçekleştiren, özellikle reaksiyona girmemiş fazla kimyasalların ve artıkların uzaklaştırılması işlemidir. Bu işlemi gerçekleştiren enzimin adı ekzonükleazdır. EXOSAP işlemi için aşağıdaki karışım (3 µl) ve program hazırlanır, thermalcyler cihazında işlem gerçekleştirilir.

	<u>Kapak ısısı 98ºC</u>
1 µl ExoSap	37ºC 30' dk
2 µl PCR ürünü	80ºC 15' dk
	4ºC Durma

2. <u>Aşama:</u> ***Sekans Reaksiyonu:*** Bu işlem için gerekli karışım ve program hazırlanır, işlem gerçekleştirilir.

***Big Dye V3.1**

Karışım	**1X**
Big Dye	2µl
5X Buffer	2µl
F/R primer (2 pmol/ µl)	2µl
ExoSAP PCR ürünü	3µl
H_2O	1µl
TOPLAM	**10µl**

-Bir önceki aşamadaki ExoSAP (3µl) tüplerinin içine 7 µl sekans için yukarıda hazırlanmış olan miksten ekleyip ufak bir pipetaj yapılır.

-Aşağıdaki program thermalcycler cihazında ayarlanır ve sekans reaksiyonu başlatılır.

<u>PROGRAM</u>:

<u>Kapak ısısı 99ºC</u>
96 ºC 1' dk
96 ºC 10'' sn
50 ºC 5'' sn
60 ºC 4' dk
25x
4 ºC Durma

3. <u>Aşama</u>: ***Ethanol/EDTA/Sodyum Asetat Çöktürme***

Aşağıdaki hazırlanan karışımdan 3 µl dağıttıktan sonra, 10 µl sekans PZR ürünü 96'lık plate'e dağıtılır.

***BigDye sekans reaksiyon ürünlerinin temizliği aşamasıdır!!!**

Karışım	**1X**
EDTA (125mM)	1 µl
BM Sodyum asetat	1µl
Glikojen	1 µl
TOPLAM	**3 µl**

-Üzerlerine 25 µl %100 ethanol (soğuk) ilave edilir.

-Seal ile plate üzeri kapatılır 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.

-1750 g'de 45 dk santrifüj edilir.

-Seal aç ve peçeteye ters çevir, 165 g'de kısa spin edilir.

- Üzerine 35 µl %70 ethanol (soğuk) eklenir.

-Seal ile plate kapatılır.

-1650 g'de 15 dk santrifüj edilir.

-Seal aç ve peçeteye ters çevir, 160 g'de 1 dk santrifüj edilir.

-56 ^{o}C'de 3 dk inkübasyona bırakılır, Thermal cyler cihazın kapağı ve plate sealsiz açık birşekilde olmasına dikkat edilir.

4. <u>Aşama:</u> *Denatürasyon*

10 µl formamid veya dH_2O eklenir, 95 ^{o}C'de 3 dk septa ile kapalı bir şekilde Thermal cyler cihazında bekletilerek denatürasyon gerçekleştirilir. Ardından buza alınır sonra da sekans cihazına konur.

5. <u>Aşama:</u> *Sekans Cihazına Yükleme*

Cihazda program ayarlanır ve başlatılır.

5.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Ekspresyonun Analizi

Gen ekspresyonu için cDNA sentez reaksiyonu ‘’**Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis**’’ kiti ile gerçekleştirildi. Gen ekspresyon analizi aşamaları aşağıda özetlenmiştir.

- Önce 9.4 uL RNA örneği ve 2 uL random hexamer primer bir tüplerde hazırlanır.

- Termalcycler cihazında 65^{0}C'de 10 dakika denatüre edilir.

- Bu sırada kabinde cDNA sentez miksi hazırlanır. PCR tüplerimizin sayısı kadar aşağıdaki miktarlar hesaplanır. Aynı sıra ile ilave edilirler.

Karışımdaki Kimyasallar	**Miktarı**
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer	4 uL
Protector RNase Inhıbıtor	0.5 uL
Deoxynucleotide Mix	2 uL
DTT	1 µL
Transcriptor hifi Reverse Transcriptase	1.1 uL
TOPLAM	**8.6 uL**

- Termalcyclerdan alınan denatüre edilmiş RNA'lar üzerine yukarıda hazırlanmış olan miksten 8.6'şar uL pipetaj yapılarak ilave edilir. Tüplerin kapakları kapatılır. Tekrar örnekler Termalcycler cihazına aktarılır. Aşağıdaki program ayarlanır ve başlatılır.

29ºC 10 dk
48ºC 60 dk
85ºC 5 dk
4ºC Durma

- cDNA sentezinden sonra mRNA ekspresyonu Gerçek zamanlı PZR cihazında gerçekleştirmek için önce aşağıdaki karışım hazırlanır.

Master miks bileşenleri	**Reaksiyon ve örnek sayısına göre miks miktarları**
	1X
dH2O	4 µl
LightCycler480® Probes master (2X)	10 µl
Realtime ready Assay (20X)	1 µl
cDNA	5 µl
Toplam reaksiyon hacmi	**20** µl

- Yukarıdaki gibi karışım hazırlandıktan sonra dikkatlice pipetaj yapılır.

- LC480-96'lık plate'e önce 15 µl hazırlanan PCR miksten dağıtılır.

- Sonra da herbir örneğin 5 µl cDNA'sı konur.

- Seal ile plate kapatılır.

- 3000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir.

- Roche-LC480 cihazına transfer edilir.

-Aşağıdaki gibi program ayarlanır, kaydedilir ve başlatılır.

Pre-inkübasyon (1 siklus)	95^0C 10 dk
Amplifikasyon (45 siklus)	95^0C 10 sn 60^0C 30 sn 72^0C 1 sn
Cooling (soğuma) (1 siklus)	40^0C 30 sn

RT-PZR işleminden sonra, analiz sırasında PIK3R1, PTEN ve SALL4 mRNA ekspresyonlarının Ct değerleri, Light Cycler480 cihazının veri tabanından yararlanılarak elde edilir. Eşik değer (Threshold) olarakta tanımlanan CT (CP) değeri, floresan ışımada (ΔRn) artışın başladığı ilk siklusu ifade eder. Rn (+), yüklenen örneğin reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu, Rn (-) ise negatif kontrolün ve reaksiyonu gerçekleşmeyen örneklerin floresan emisyonu olarak tanımlanmaktadır. ΔRn, Rn (+) ve Rn (-) arasındaki fark olup, CT değerinin hesaplanmasında kullanılan temel göstergedir (Ceylan, 2015). Çalışmada, housekeeping gen olarak kullanılan beta-aktin geninin ortalama Ct değeri belirlenerek RT-PZR' den elde edilen verilerin normalisazyonu yapıldı. Bu yöntemin temeli, belirli şartlar altında ekspresyonu değişmeyen, her doku yada hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden eksprese edilen bir "house keeping" gen ekspresyonunun hedef gen ekspresyonu ile karşılaştırılması esasına dayanır. Bu yönteme *delta delta Ct (Cp)* adı verilmektedir. Bu yöntemde analiz yapılırken, hedef DNA molekülü ve standart olarak kullanılan DNA molekülün aynı verimlilik ile amplifiye olduğunu kabul ederek aşağıdaki formülasyona dayalı kantitasyon yapar.

$$\text{Oran} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta CP_{\text{hedef}}\,(\text{kontrol-örnek})}}{(E_{\text{referans}})^{\Delta CP_{\text{referans}}\,(\text{kontrol-örnek})}}$$

- *Oran*; hedef gen ekspresyonunun kontrole oranı,
- *E*; verimlilik,
- Δ*Cp* ise Ct değerleri arasındaki fark

Hedef gen ve kontrol geninin PZR verimlilikleri birbirine ve 2'ye eşit kabul edildiğinde yeni formülasyon aşağıdaki gibi olacaktır.

$$\text{Oran} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Bu formülasyon Pfaffl (2001) tarafından geliştirimiş ve günümüzde göreceli kantitasyon için kullanılmaktadır. Bu çalışmada house keeping gen olarak beta-actin alınmış ve genlerin ekspresyonlarının normalizasyonu bu gene göre yapıldı. Bizde ayrıca bu çalışmada, göreceli kantitasyonda ΔΔCt metodunu kullandık.

5. 10. İstatistiksel analizler

Bu çalışmada mutasyon ve ekspresyon değerlerinin istatistiksel olarak anlamlandırılmasında *Graphpad.Instat* ve *SPSS16.0* programları kullanıldı.

Klinik parametreler ile PIK3CA ve TP53 gen mutasyonları arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlandırılmasında ve tümör örneklerinde, mutasyon durumlarına ait verilerin dağılımına en uygun çözümleme yönteminin *Ki Kare* (Fisher's Exact Test) olduğu belirlendi.

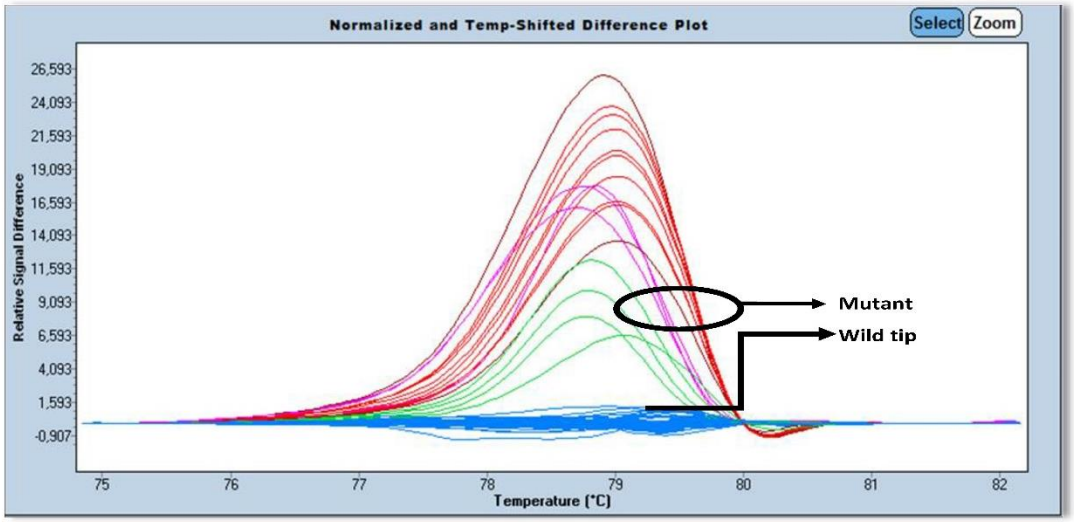
Ekspresyon değerlerinin istatistiksel olarak anlamlandırılmasında Beta-aktin ile normalize edilen örneklerin rölatif kantifikasyonu için *delta delta Ct* ($\Delta\Delta$Ct) metodu uygulanmıştır. Tümör örneklerinde, PIK3R1, PTEN ve SALL4 gen ekspresyon düzeylerine ait verilerin dağılımına en uygun çözümleme yönteminin *Mann Whitney U testi* olduğu belirlendi. Bununla birlikte, PIK3R1, PTEN ve SALL4 gen ekspresyonu ile klinik parametreler arasındaki ilişkinin belirlenmesinde ise en uygun çözümleme yönteminin *Ki Kare* (Fisher's Exact Test) olduğu belirlendi.

Son olarak istatistiksel çözümlemelerde $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilerek, 0,95 güven aralığında değerlendirme yapıldı.

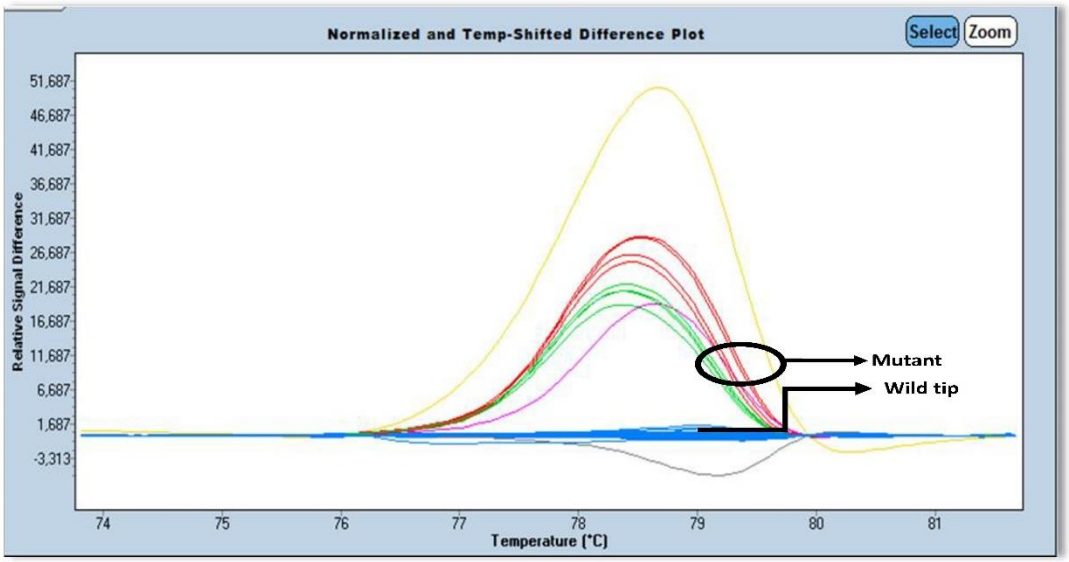
6. BULGULAR

6.1. PIK3CA Geni Mutasyonlarının HRM Yöntemi ile Analizi

2010-2012 yılları arasında toplanmış olan 66 örneğin, 2014 yılında PIK3CA mutasyon analizi yapılmıştı (Dirican ve ark. 2014). Bu yüzden sadece 2016-2017 yılları arasında toplanmış olan 79 meme kanser örneğinin HRM yöntemiyle PIK3CA geni mutasyon analizi gerçekleştirildi. Bu 79 örneğin HRM analizi sonucunda 24 örnekte PIK3CA geni ekzon 20 mutasyonu ve 13 örnekte de ekzon 9 bölgesinde olmak üzere toplam 37 tane mutasyon olabileceği belirlendi. Analiz için '**LightCycler®480 Gene Scanning module**' programı kullanıldı. Aynı mutasyonu taşıyan örneklerin aşağıdaki şekillerde gösterildiği gibi LC480 software analizinde aynı gruptaki eğrilerde toplanmış olabileceği düşünülürek değerlendirmeler yapıldı (Şekil 15-16).



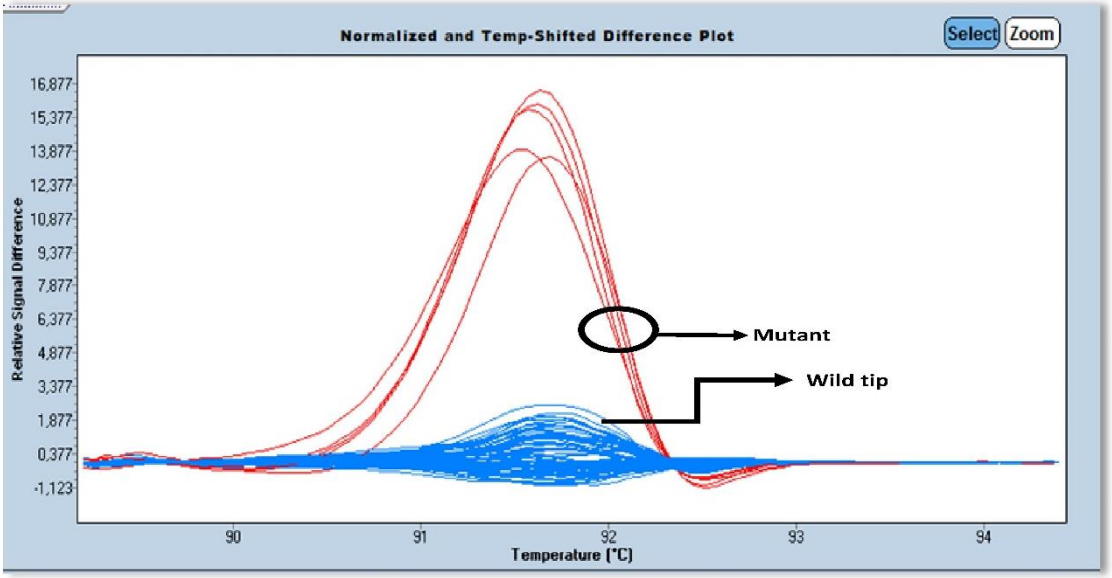
Şekil 15: PIK3CA Ekzon 20 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü



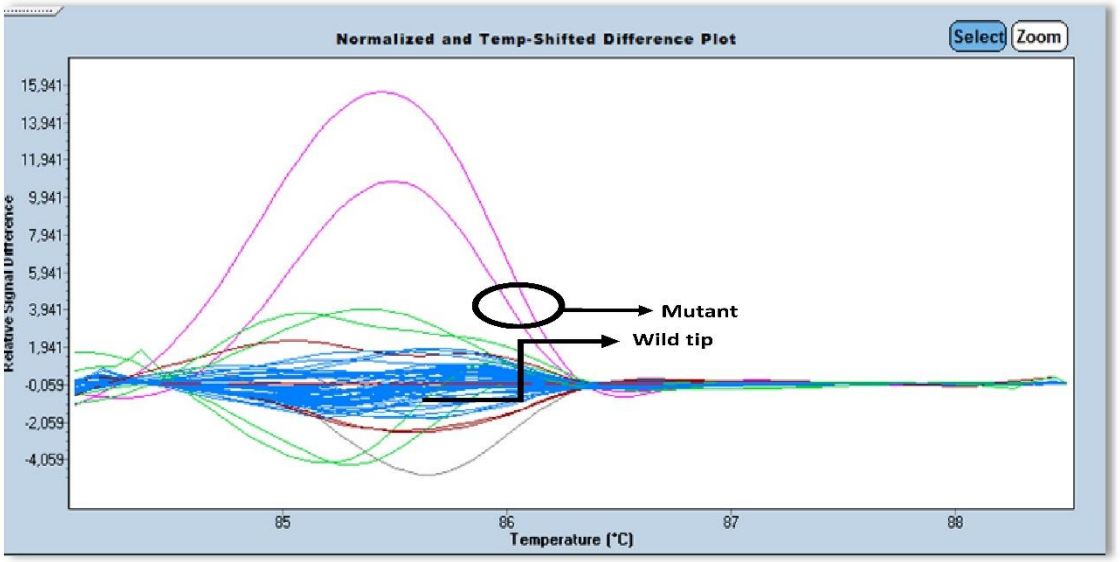
Şekil 16: PIK3CA Ekzon 9 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü

6.2. TP53 Geni Mutasyonlarının HRM Yöntemi ile Analizi

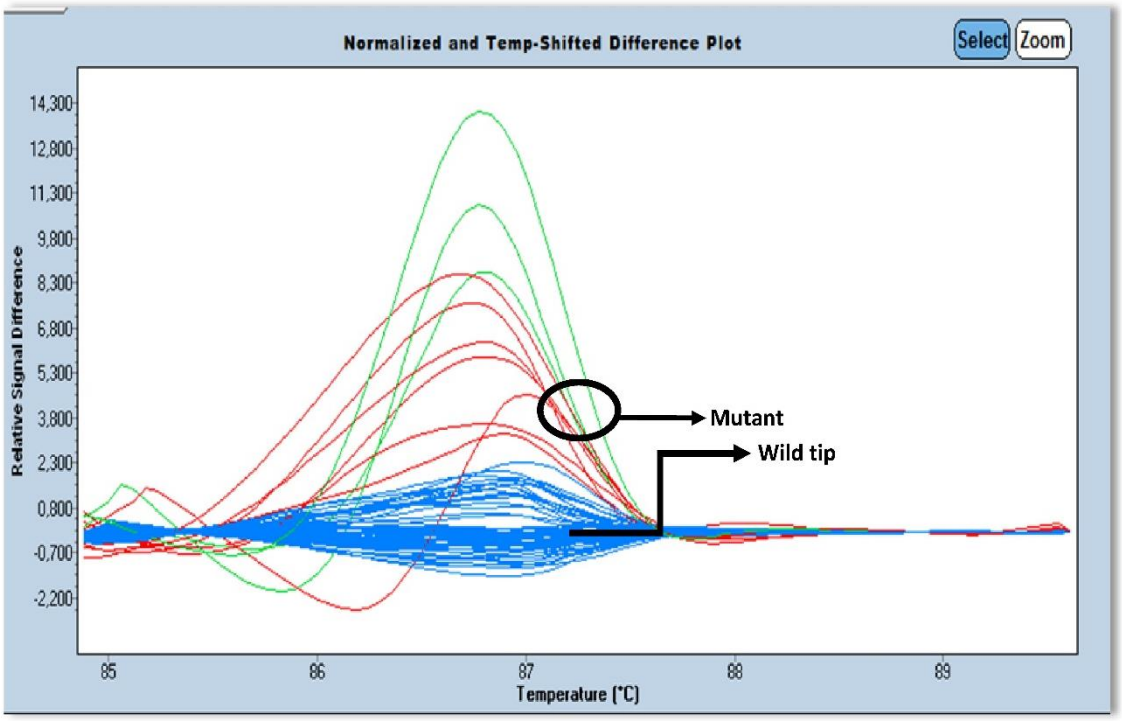
Bu çalışmada 2010-2012 yılları arasında 66 ve 2016-2017 yılları arasında toplanmış olan 79 meme kanser örneği olmak üzere toplam 145 hastanın HRM yöntemiyle TP53 geni mutasyon analizi gerçekleştirildi. Bu 145 örnek arasında HRM analizi sonucunda 23 örnekte TP53 geni ekzon 5, 24 örnekte TP53 geni ekzon 6, 23 örnekte TP53 geni ekzon 7 ve 38 örnekte ise TP53 geni ekzon 8 mutasyonu olmak üzere toplam 108 örnekte mutasyon şüphesi belirlendi. Yapılan HRM analizleri için '**LightCycler®480 Gene Scanning module**' programı kullanıldı. Aynı mutasyonu taşıyan örneklerin aşağıdaki şekillerde gösterildiği gibi LC480 software analizinde aynı gruptaki eğrilerde toplanmış olabileceği gösterildi (Şekil 17-20).



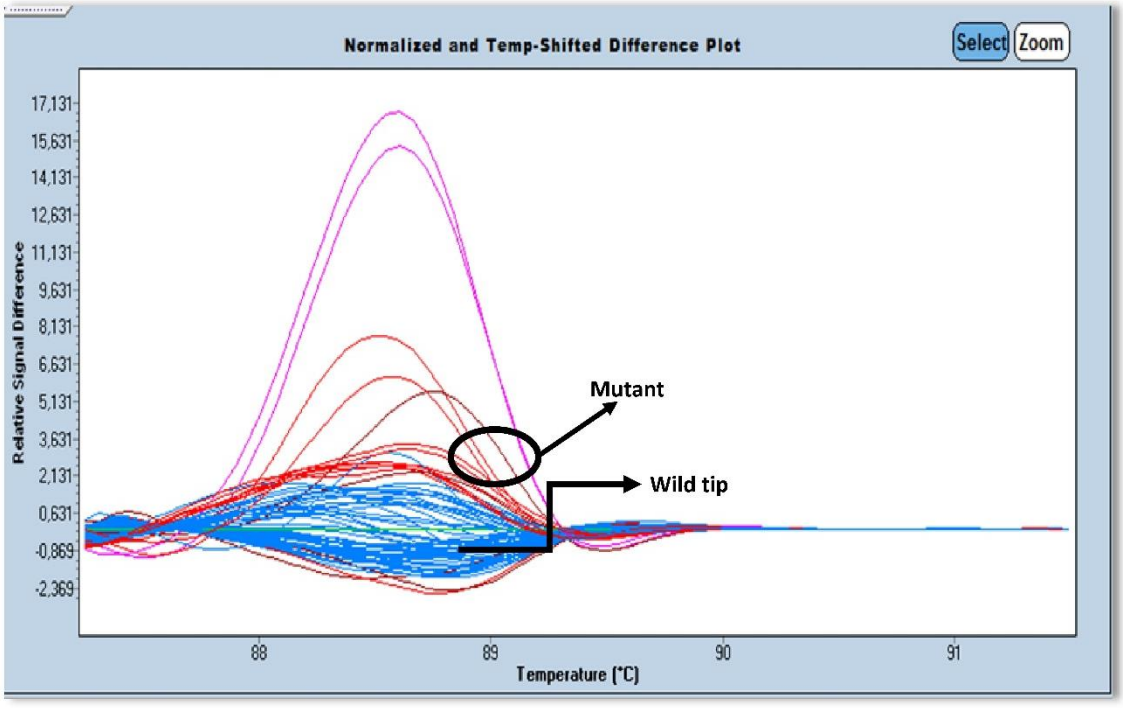
Şekil 17: TP53 Ekzon 5 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü



Şekil 18: TP53 Ekzon 6 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü



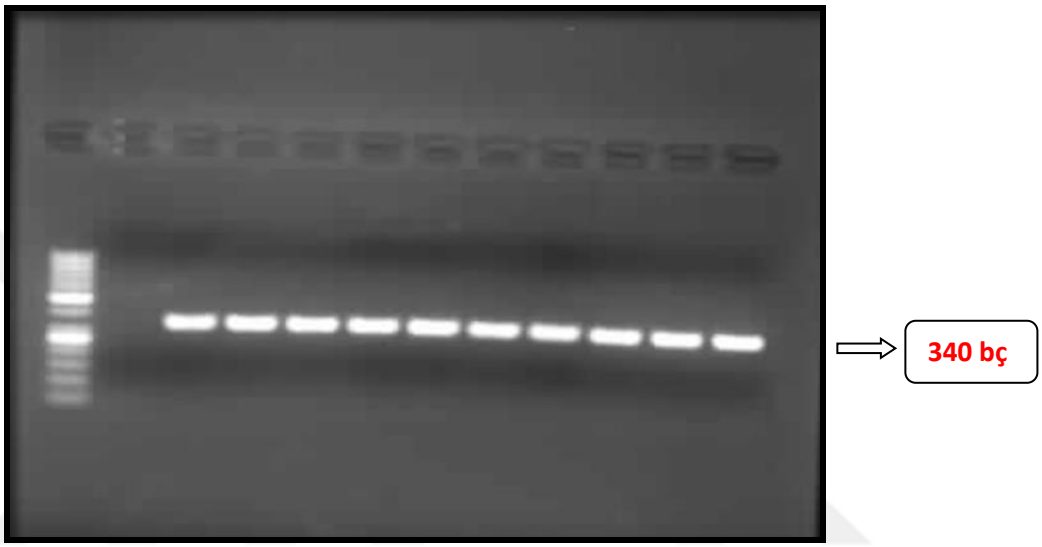
Şekil 19: TP53 Ekzon 7 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü



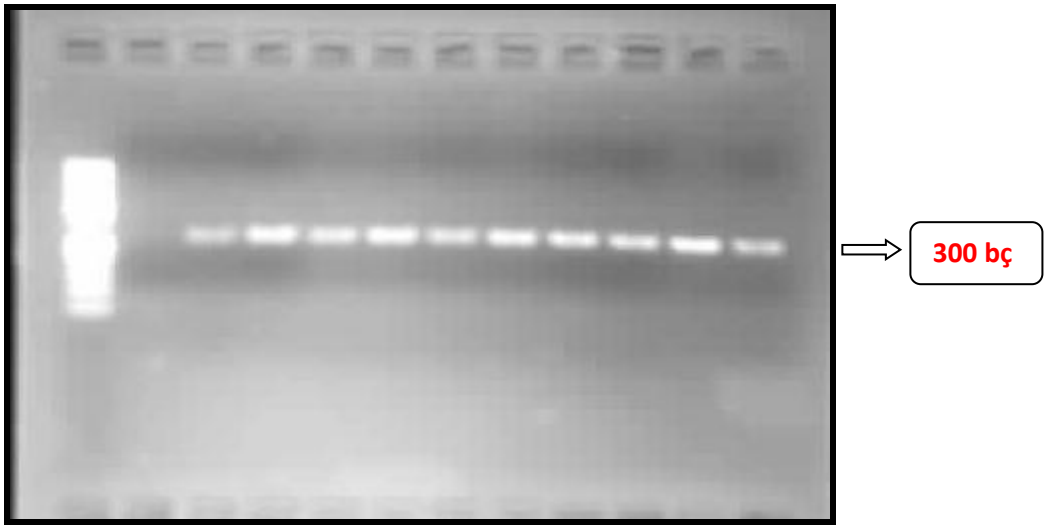
Şekil 20: TP53 Ekzon 8 HRM varyasyonların software analiz görüntüsü

6.3. Konvansiyonel PZR

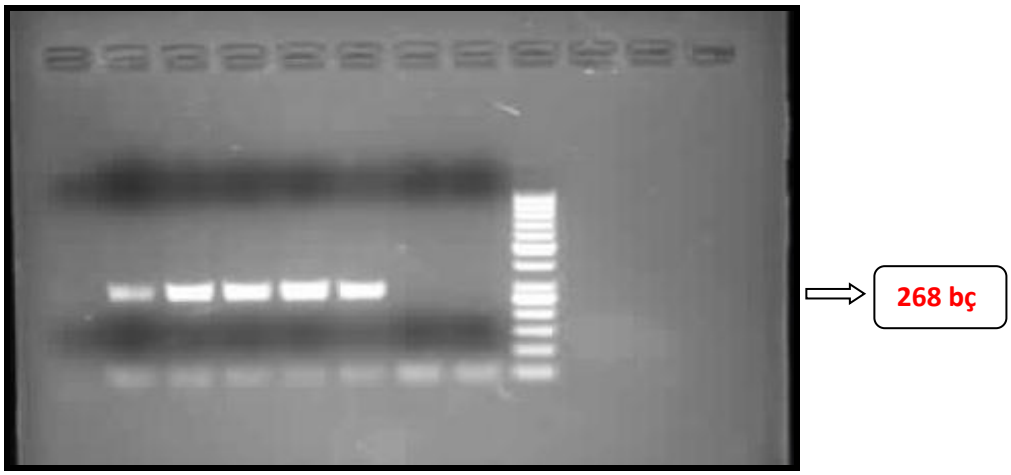
HRM yöntemiyle mutasyon taşıma şüphesi olan örnekler belirlenip ve gruplandırıldıktan sonra, bu örnekler doğrudan dizi analizi yapılmadan önce konvansiyonel PZR yöntemiyle amplifikasyon gerçekleştirildi. Ardından agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve etidyum bromürle UV'de herbir gen için hedeflenen bantlar marker kullanılarak görüntülendi (Şekil 21-26)



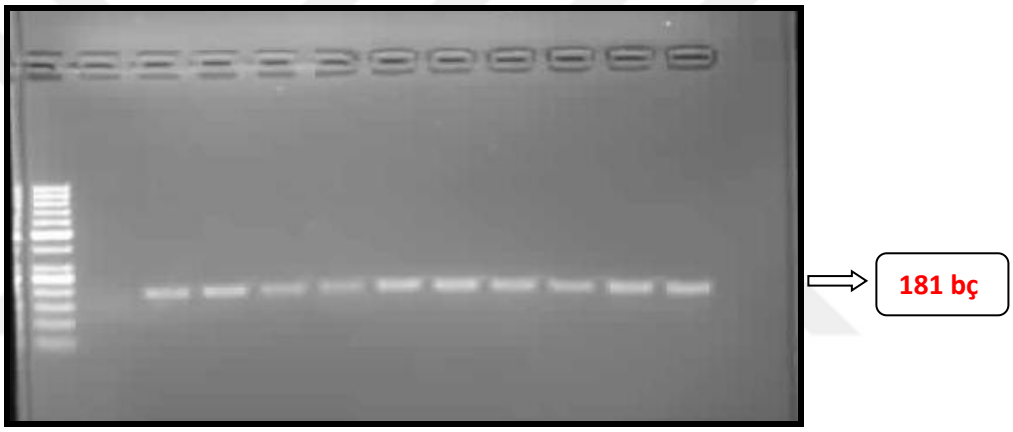
Şekil 21: PIK3CA Ekzon 9 PZR agaroz jel görüntüsü



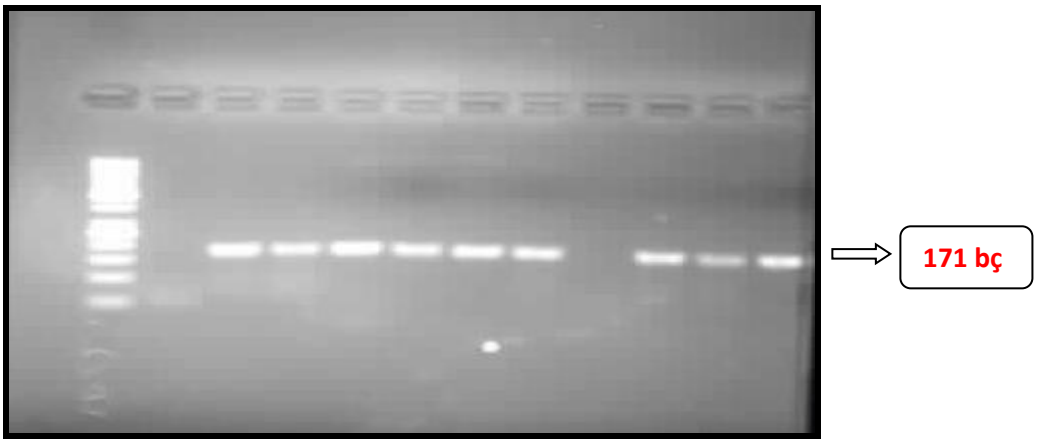
Şekil 22: PIK3CA Ekzon 20 PZR agaroz jel görüntüsü



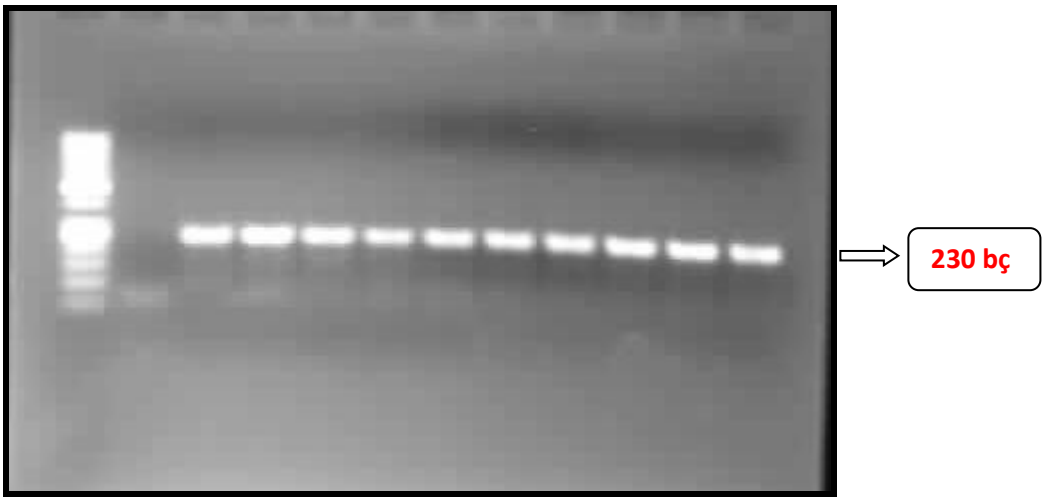
Şekil 23: TP53 Ekzon 5 PZR agaroz jel görüntüsü



Şekil 24: TP53 Ekzon 6 PZR agaroz jel görüntüsü



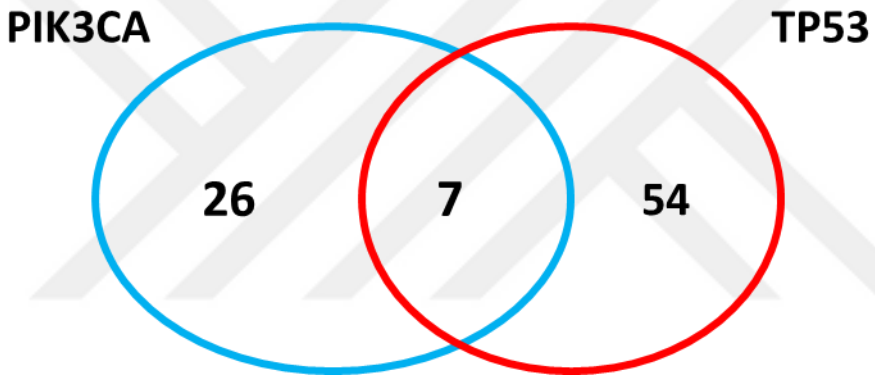
Şekil 25: TP53 Ekzon 7 PZR agaroz jel görüntüsü



Şekil 26: TP53 Ekzon 8 PZR agaroz jel görüntüsü

6.4. Dizi Analizi (Sanger)

PIK3CA (n=37) ve TP53 (n=108) genlerinin HRM analiz sonuçları Sanger dizi analiziyle doğrulandı. PIK3CA geninde 37 örneğin 33'ünde mutasyon tanımlandı. Diğer taraftan, TP53 geninde ise 108 örneğin 61'inde mutasyon saptandı. Hem PIK3CA hem de TP53 geni mutasyonu taşıyan 7 örnek belirlendi (Şekil 27). Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar tek tek aşağıda özetlenmiştir.



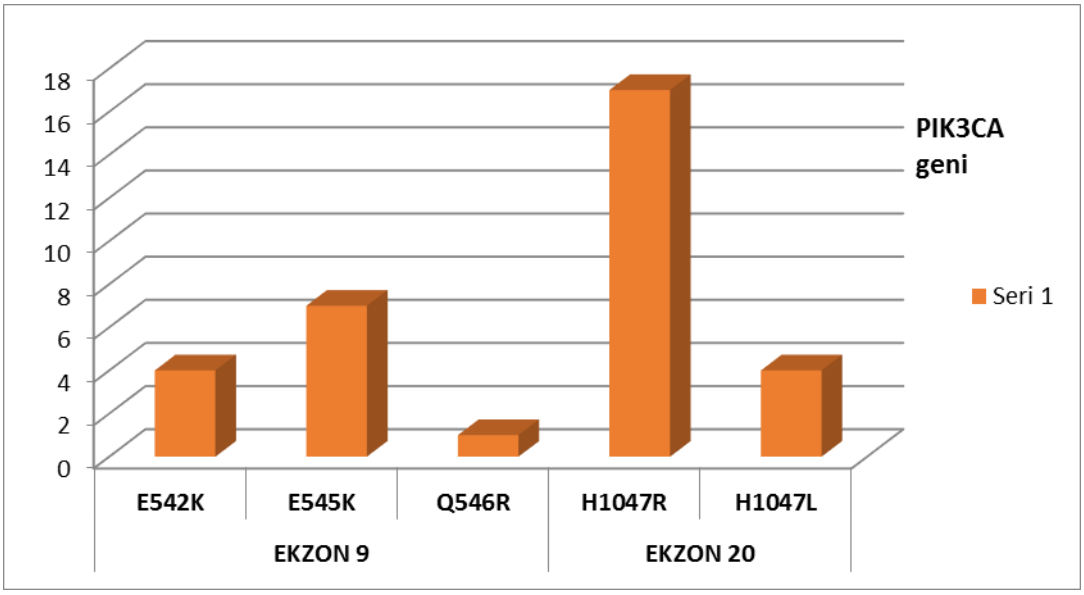
Şekil 27: Sanger dizi analizi sonuçlarına göre belirlenen PIK3CA (n=33) ve TP53 (n=61) mutasyonların sayısı

6.4.1. PIK3CA geni ekzon 9 ve ekzon 20 mutasyonlarının dizi analiziyle tanımlanması

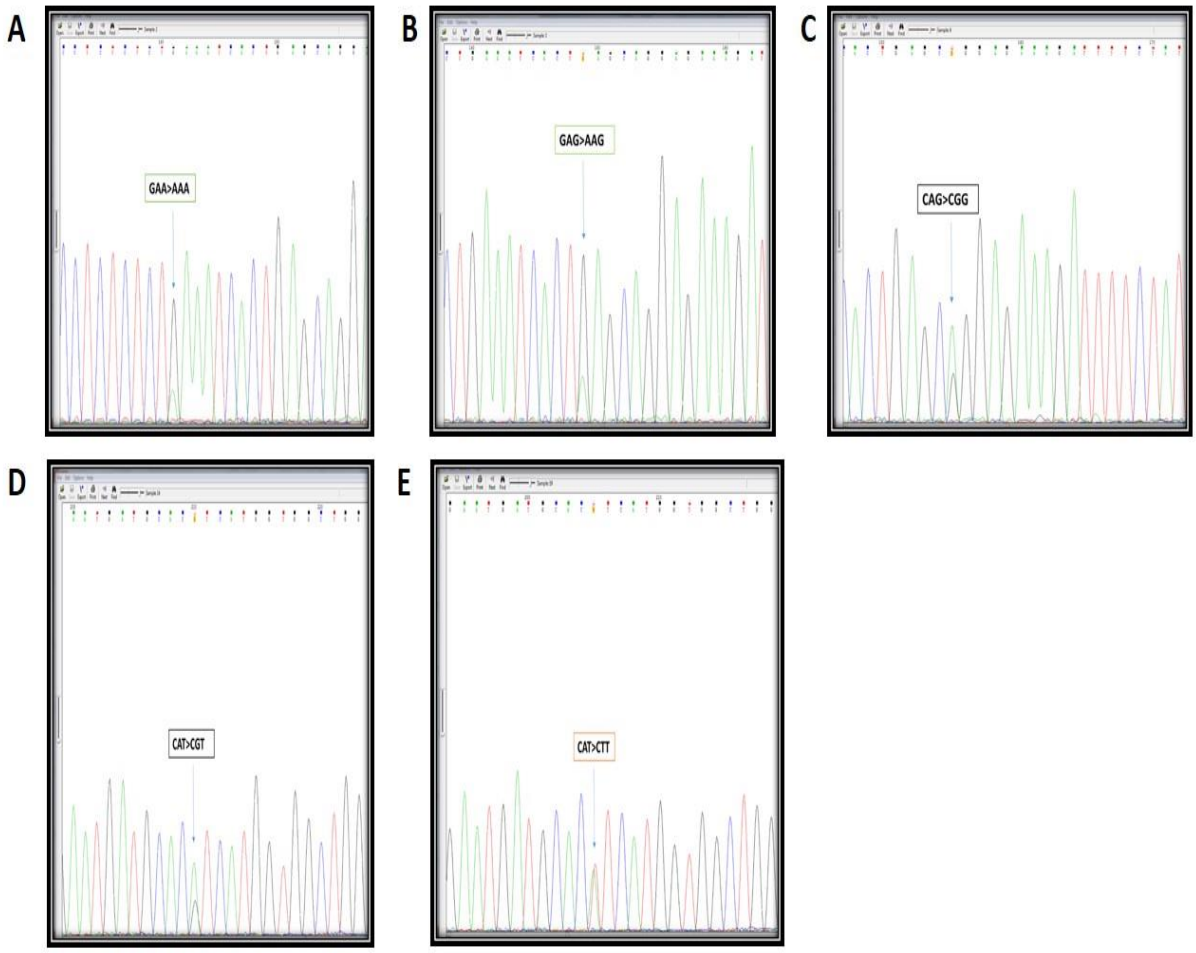
Mutasyon taşıma şüphesi olan örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülüp ardından UV'de görüntülendikten sonra dizi analizi yapılarak örneklerdeki mutasyonlar doğrulandı. Sanger dizi analizi sonuçlarına göre: 12 örnekte PIK3CA ekzon 9 ve 21 örnekte ise ekzon 20 mutasyonu saptandı. Bununla birlikte, ekzon 9'da Q546R, E545K ve E542K; ekzon 20'de ise H1047L ve H1047R mutasyonları dizi analizi sonuçlarıyla tanımlandı (Şekil 29). Bu tanımlanmış mutasyonlar aşağıda gösterilmiştir (Tablo 10 ve Şekil 28).

Tablo 10: Meme kanserinde tanımlanan PIK3CA mutasyonların özeti

Ekzon	Nükleotit	Kodon	Domain	n (%)
9	G1624A	E542K	Helikal	4 (5.06)
9	G1633A	E545K	Helikal	7 (8.9)
9	A1637G	Q546R	Helikal	1 (1.3)
20	A3140G	H1047R	Kinaz	17 (21)
20	A3140T	H1047L	Kinaz	4 (5.06)
Tanımlanan toplam mutasyon sayısı				**33**
Mutasyon taşıyan toplam örnek sayısı				**33**
İncelenen örnek sayısı				**79**
Mutasyon taşıyan örneklerin yüzdesi				**%42**



Şekil 28: PIK3CA geni mutasyonlarının dağılımları



Şekil 29: PIK3CA mutasyonlarının DNA dizi analiziyle tanımlanması.

A) Ekzon 9'daki E542K mutasyonu, **B)** Ekzon 9'daki E545K mutasyonu, **C)** Ekzon 9'daki Q546R mutasyonu, **D)** Ekzon 20'deki H1047R mutasyonu, **E)** Ekzon 20'deki H1047L mutasyonu

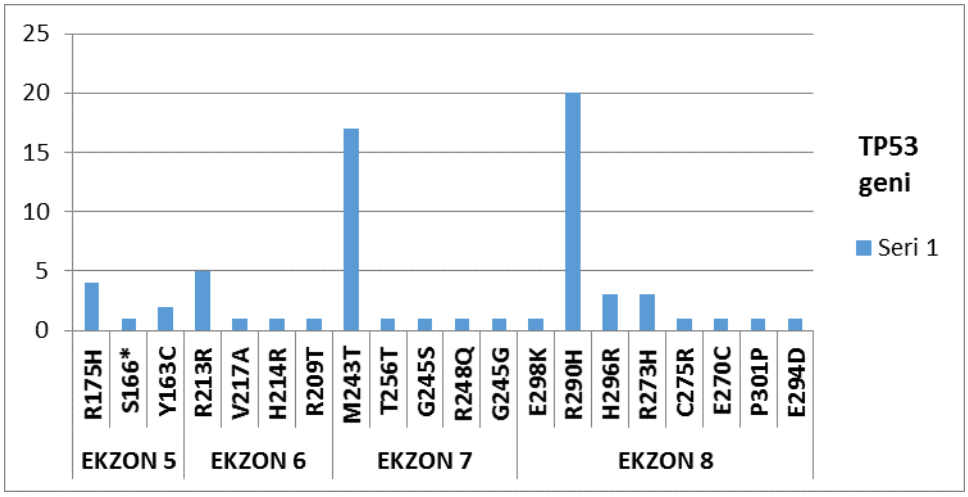
6.4.2. TP53 geni ekzon 5, 6, 7 ve 8 mutasyonlarının dizi analiziyle tanımlanması

Mutasyon taşıma şüphesi olan örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülüp ardından UV'de görüntülendikten sonra dizi analizi yapılarak örneklerdeki mutasyonlar doğrulandı. Sanger dizi analiz sonuçlarına göre: 7 örnekte TP53 ekzon 5, 8 örnekte ekzon 6, 20 örnekte ekzon 7 ve 26 örnekte ise ekzon 8 mutasyonu saptandı. Mutasyon saptanan 61 örneğin 6'sında 1 ekzonda 2 farklı mutasyon, 5'inde 2 farklı ekzonda ve 1 örnekte ise 3 farklı ekzonda mutasyonlar tanımlanmıştır. Sonuç olarak bu 4 ekzonda 20 farklı tip mutasyondan 67 tane tanımlanmıştır. Ekzon 5'te R175H, S166* ve Y163C; ekzon 6'da R213R, V217A, H214R ve R209T; ekzon 7'de M243T, T256T, G245S, R248Q ve G245G; ekzon 8'de ise E298K, R290H, H296R, R273H, C275R, E270C, P301P ve E294D mutasyonları dizi analizi sonuçlarıyla tanımlandı. Bu tanımlanmış mutasyonlar aşağıda gösterilmiştir (Tablo 11, Şekil 30-34).

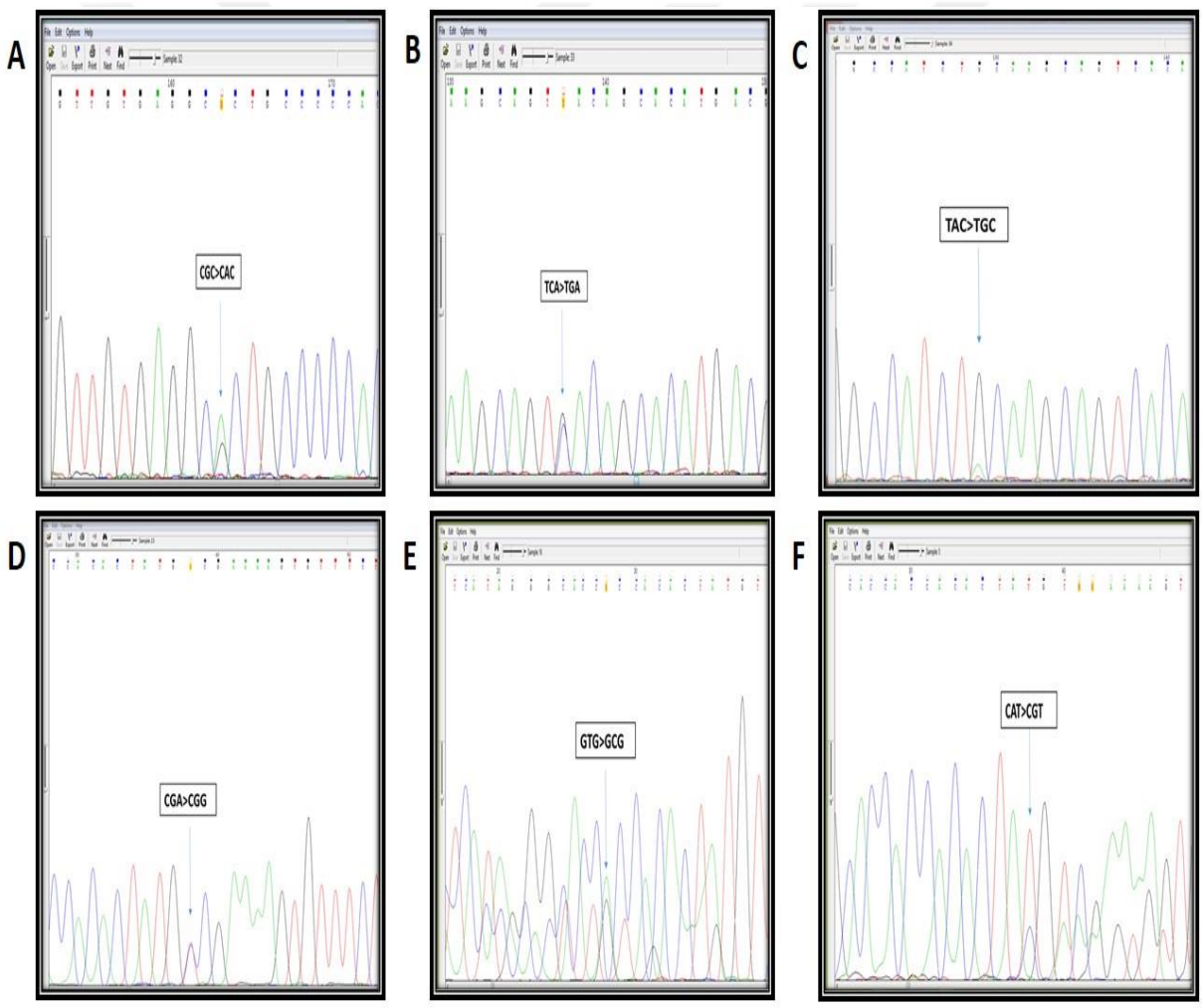
Tablo 11: Meme kanserinde tanımlanan TP53 geni mutasyonların özeti

Ekzon	Nükleotit	Kodon	n (%)
5	G524A	R175H	4 (2,74)
5	C497A	S166*	1 (0,7)
5	A488G	Y163C	2 (1,4)
6	A639G	R213R	5 (3,42)
6	T650C	V217A	1 (0,7)
6	A641G	H214R	1 (0,7)
6	G626C	R209T	1 (0,7)
7	T728C	M243T	17 (11,64)
7	A768T	T256T	1 (0,7)
7	G733A	G245S	1 (0,7)
7	G743A	R248Q	1 (0,7)
7	C735T	G245G	1 (0,7)
8	G892A	E298K	1 (0,7)
8	G869A	R290H	20 (13,7)
8	A887G	H296R	3 (2,1)
8	G818A	R273H	3 (2,1)
8	T823C	C275R	1 (0,7)
8	T809G	E270C	1 (0,7)
8	A903G	P301P	1 (0,7)
8	G880T	E294D	1 (0,7)
Tanımlanan toplam mutasyon sayısı			**67**
Mutasyon taşıyan toplam örnek sayısı			**55**
1 ekzonda 2 farklı mutasyon taşıyan örnek sayısı			**6**
2 farklı ekzonda mutasyon taşıyan örnek sayısı			**5**
3 farklı ekzonda mutasyon taşıyan örnek sayısı			**1**
İncelenen örnek sayısı			**145**
Mutasyon taşıyan örneklerin yüzdesi			**%38**

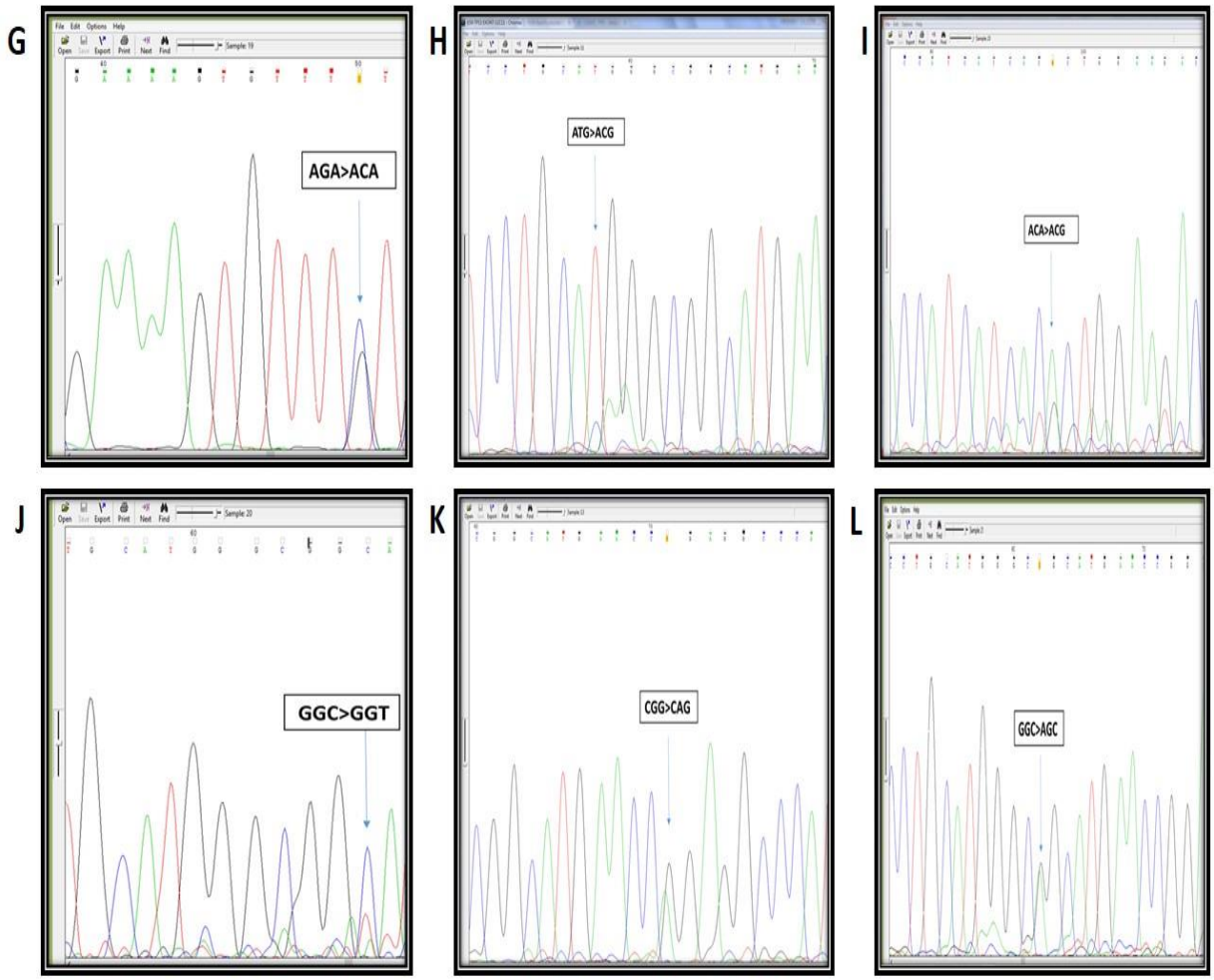
*****Substitution - Nonsense



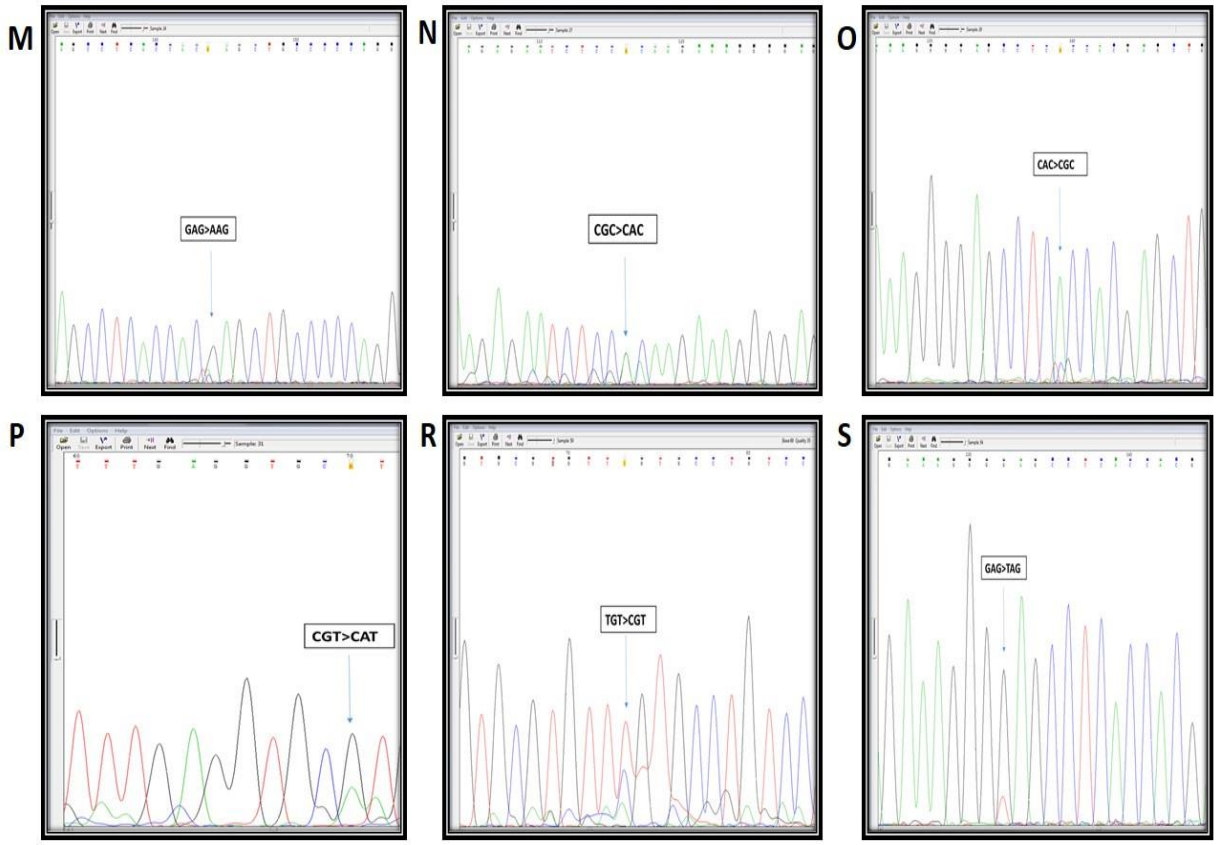
Şekil 30: TP53 geni mutasyonlarının dağılımları



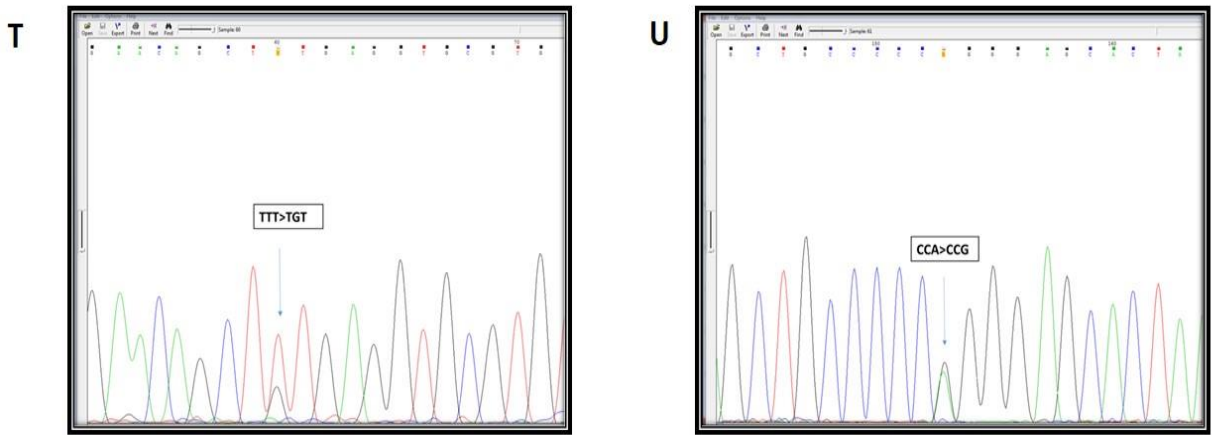
Şekil 31: TP53 mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tanımlanması. **A)** Ekzon 5'deki R175H mutasyonu, **B)** Ekzon 5'deki S166* mutasyonu, **C)** Ekzon 5'deki Y163C mutasyonu, **D)** Ekzon 6'daki R213R mutasyonu, **E)** Ekzon 6'daki V217A mutasyonu, **F)** Ekzon 6'daki H214R mutasyonu



Şekil 32: TP53 mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tanımlanması. **G)** Ekzon 6'daki R209T mutasyonu, **H)** Ekzon 7'deki M243T mutasyonu, **I)** Ekzon 7'deki T256T mutasyonu, **J)** Ekzon 7'deki G245G mutasyonu, **K)** Ekzon 7'deki R248Q mutasyonu, **L)** Ekzon 7'deki G245S mutasyonu



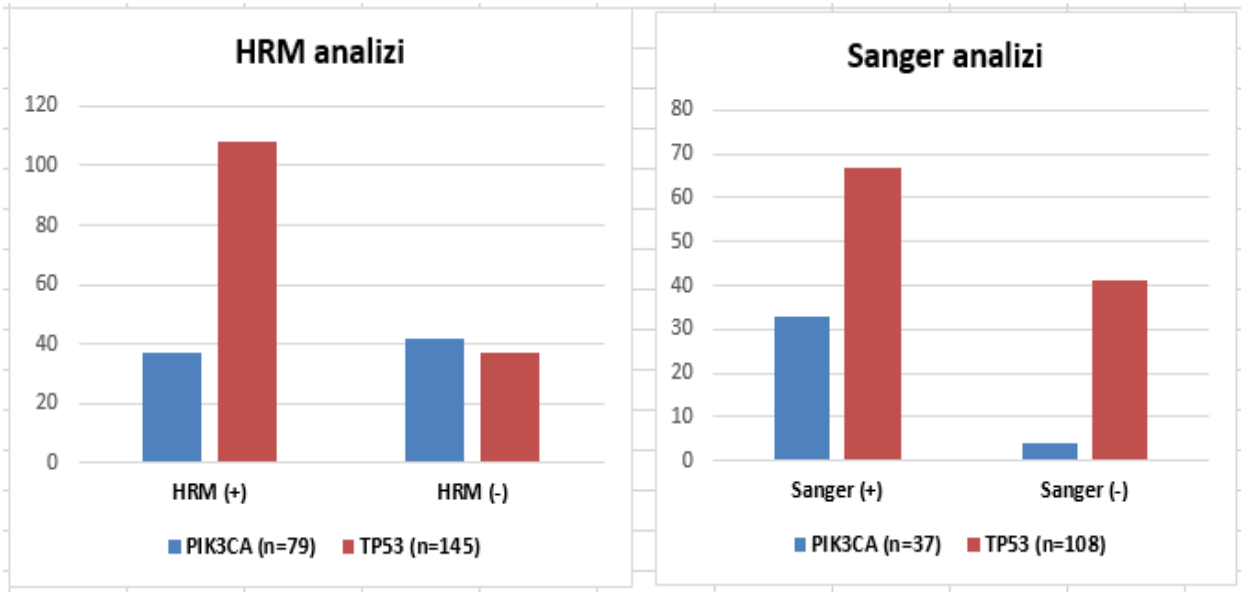
Şekil 33: TP53 mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tanımlanması. **M)** Ekzon 8'deki E298K mutasyonu, **N)** Ekzon 8'deki R290H mutasyonu, **O)** Ekzon 8'deki H296R mutasyonu, **P)** Ekzon 8'deki R273H mutasyonu, **R)** Ekzon 8'deki C275R mutasyonu, **S)**Ekzon 8'deki E294D mutasyonu



Şekil 34: TP53 mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tanımlanması. **T)** Ekzon 8'deki E270C mutasyonu, **U)** Ekzon 8'deki P301P mutasyonu

6.5. HRM yönteminin Sanger dizi analizi ile uyumunun belirlenmesi

HRM yönteminin Sanger dizi analizine göre etkinliğine ve doğruluk oranına baktığımızda bu oranların çalışılan gen ve çalışılan bölgelerin (ekzonların) büyüklüğüne göre değiştiğini belirledik (Şekil 35). Çünkü HRM yöntemi ile PIK3CA mutasyonlarını analiz ettiğimizde 79 örneğin 37'sinde mutasyon olabileceğini saptadık ve doğrulamak için Sanger dizi analizi yaptığımızda, bu mutasyonların 33 örnekte, 5 farklı tipte ve 33 tane olduğu gösterildi. HRM yönteminin PIK3CA mutasyonlarını saptamada Sanger dizi analiziyle uyum değeri %89.2 (33/37) olarak belirlendi. PIK3CA ekzon 9 mutasyonlarını saptamada HRM'nin doğruluk oranı %77 (10/13) ve ekzon 20'de ise %96 (23/24) olarak hesaplandı. Diğer taraftan HRM yöntemi ile 145 meme kanser örneğinde TP53 mutasyonlarını analiz ettiğimizde 108 örnekte mutasyon olabileceğini, Sanger dizilemeyle doğruladığımızda, bu mutasyonların 61 örnekte, 20 farklı tipte ve 67 tane olduğu tespit edildi. Böylece HRM'nin TP53 geni mutasyonu doğru saptama değeri %62.04 (67/108) olarak hesaplandı. Fakat TP53 geninde çalışılan bölgeler arasındaki farklılıklar göz önüne alındığında ekzon 5'teki HRM etkinliği %30.4 (7/23), ekzon 6'da %33.3 (8/24), ekzon 7'de %87 (20/23) ve ekzon 8'de ise %68.4 (26/38) olarak saptandı.



A) **B)**

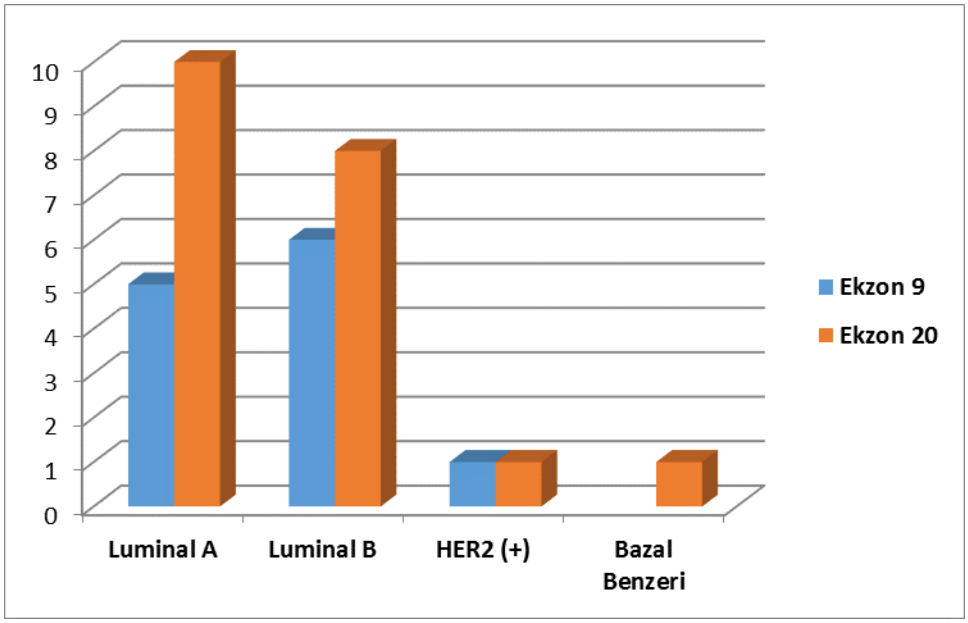
Şekil 35: a-b. PIK3CA ve TP53 gen mutasyonlarının belirlenmesinde HRM ve Sanger dizi analiz sonuçlarının karşılaştırılması. a) HRM sonuçlarının dağılımları; b) HRM sonuçlarının Sanger dizi analizi ile doğrulanması ve sonuçların dağılımları ((+): mutant, (-): yabanıl tip)

6.6. PIK3CA ve TP53 geni mutasyonları ile klinik veriler arasındaki ilişkinin belirlenmesi

6.6.1. PIK3CA mutasyonları ve klinik veriler arasındaki ilişkinin belirlenmesi

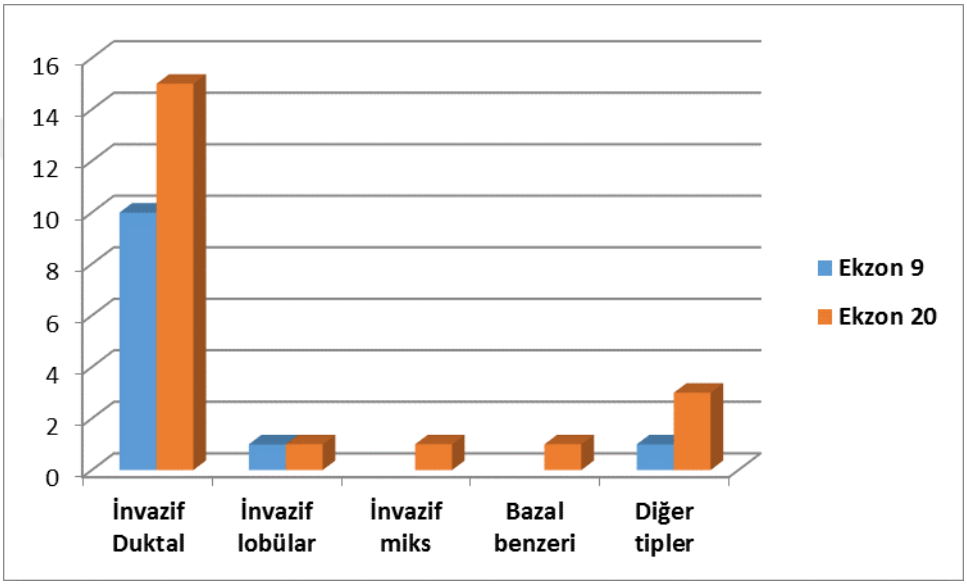
PIK3CA mutasyonu taşıyan örnekler (n=33) ile mutasyon taşımayan örneklerin (yabanıl/wild tip) (n=46) klinik veriler arasındaki ilişkisi tek tek değerlendirildi ve elde edilen veriler aşağıda özetlenmiştir (Şekil 36-43, Tablo 12). Bu değerlendirmelerde hem PIK3CA mutasyonlarının tüm hastalardaki istatiksel analizleri hem de ekzon 9 ve ekzon 20 mutasyonlarının ayrı ayrı istatiksel analizleri yapıldı.

PIK3CA mutasyonlarının moleküler alt tiplere göre dağılımlarına baktığımızda %19 (15/79) luminal A tip meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 36). Fakat PIK3CA mutasyonlarıyla moleküler alt tipler arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.0735).



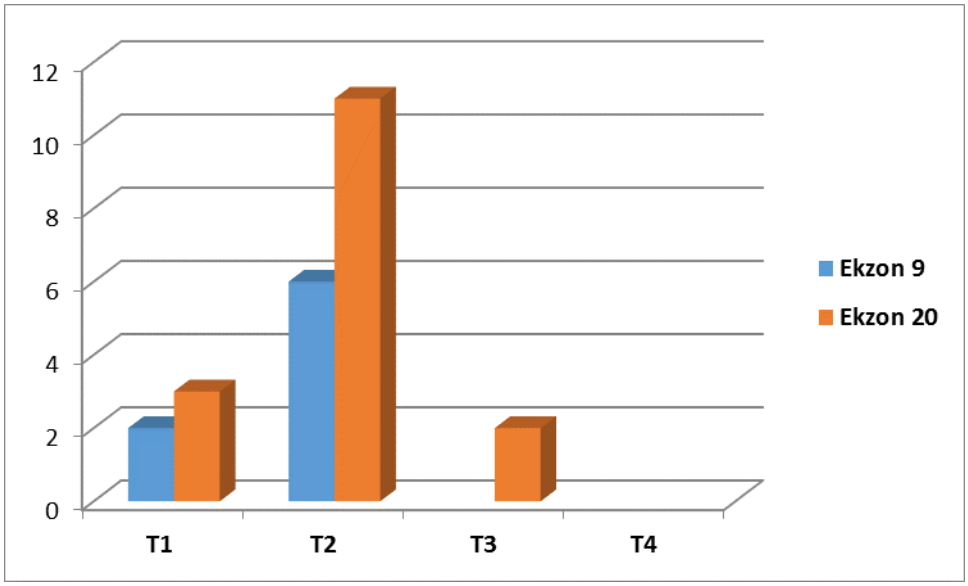
Şekil 36: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser moleküler alt tiplere göre dağılımları (p>0.05)

PIK3CA mutasyonlarının meme kanser histolojik tiplerine göre dağılımlarına baktığımızda %32 (25/79) invazif duktal tip meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 37). Fakat PIK3CA mutasyonlarıyla histolojik tipler arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.3131).



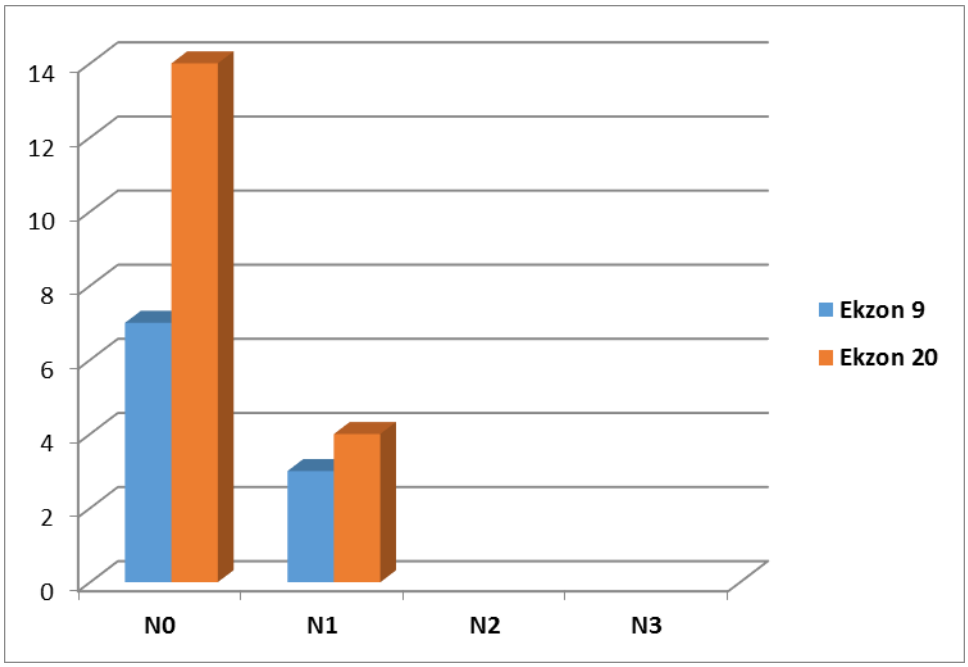
Şekil 37: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser histolojik tiplere göre dağılımları (p>0.05)

PIK3CA mutasyonlarının meme kanser tümör evresine göre dağılımlarına baktığımızda %22 (17/79) T2 evre meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 38). Fakat PIK3CA mutasyonlarıyla tümör evresi arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.5263).



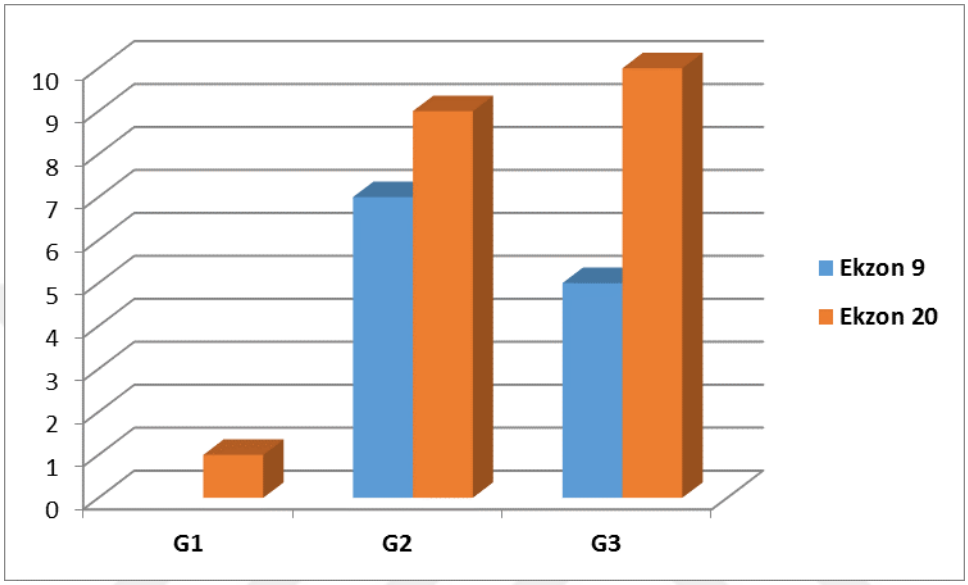
Şekil 38: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser tümör evresine göre dağılımları (p>0.05)

PIK3CA mutasyonlarının meme kanser nod durumlarına göre dağılımlarına baktığımızda %27 (21/79) N0 meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 39). Fakat PIK3CA mutasyonlarıyla nod durumu arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.5802).



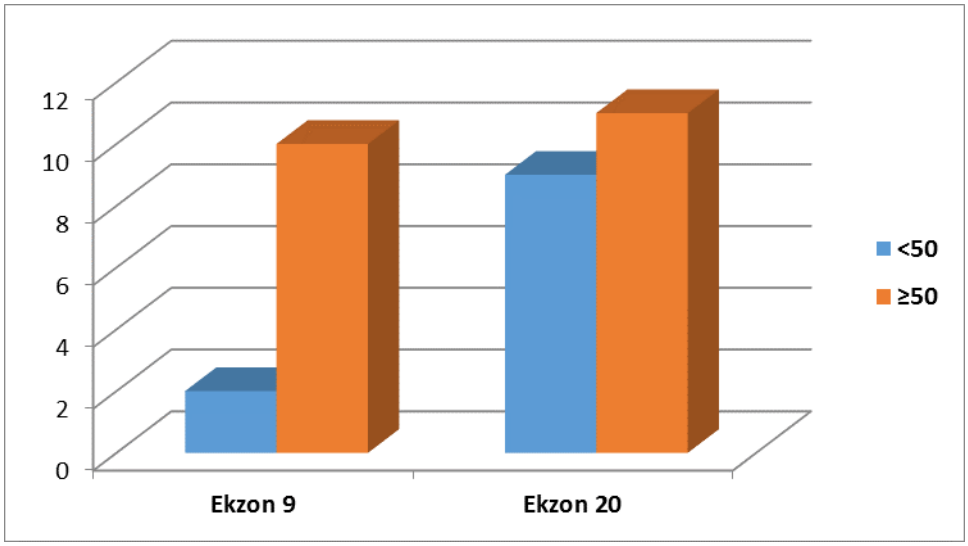
Şekil 39: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser nod durumuna göre dağılımları (p>0.05)

PIK3CA mutasyonlarının meme kanser histolojik derecelerine göre dağılımlarına baktığımızda %20 (16/79) G2 meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 40). Fakat PIK3CA mutasyonlarıyla histolojik derece arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.1030).



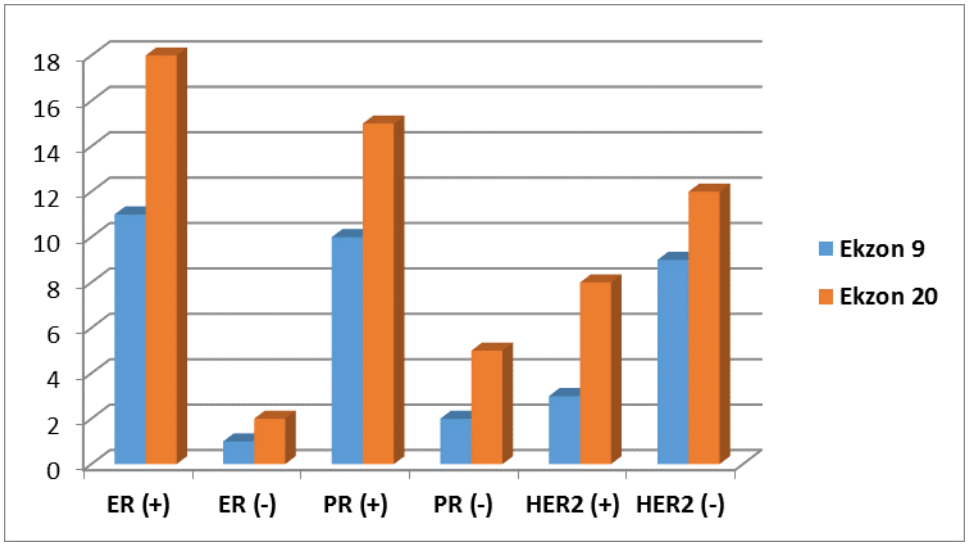
Şekil 40: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser histolojik tümör derecesine göre dağılımları (p>0.05)

PIK3CA mutasyonlarının meme kanser hastalarının yaşlarına göre dağılımlarına baktığımızda %27 (21/79) 50 yaş ve üzeri meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 41). Sadece PIK3CA ekzon 9 mutasyonlarını taşıyan 50 yaş ve üzeri hasta grubunda istatiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p=0.0095). Fakat her iki ekzondaki PIK3CA mutasyonları ile tüm hastaların yaşları arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.0502).



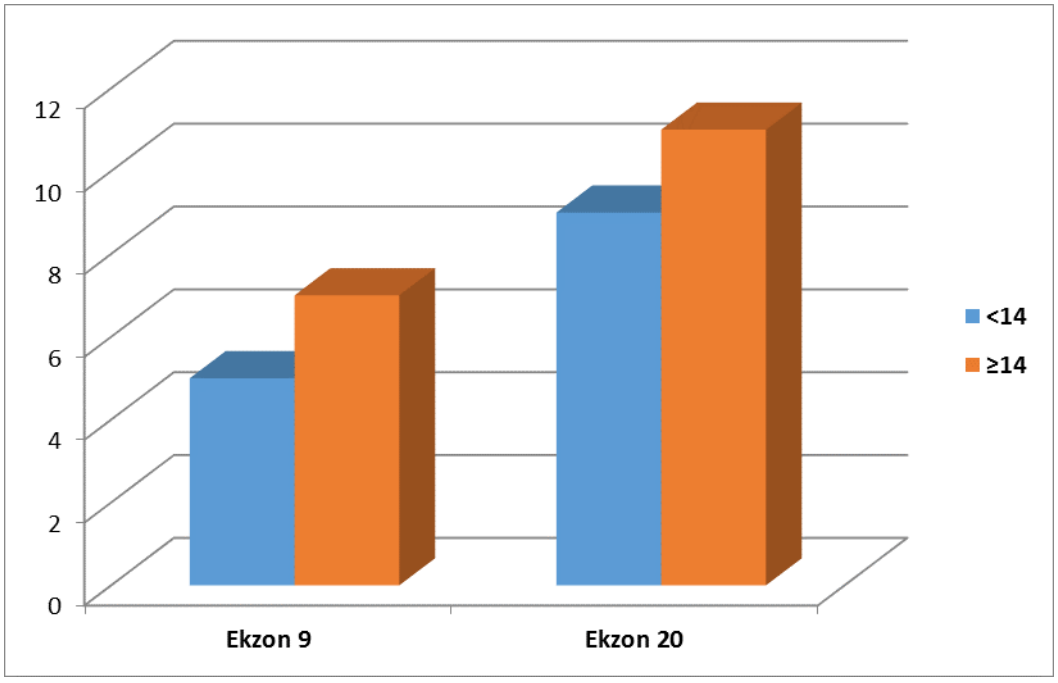
Şekil 41: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser hastalarının yaşlarına göre dağılımları ($p>0.05$)

PIK3CA mutasyonlarının meme kanser hormon reseptör durumlarına göre dağılımlarına baktığımızda %37 (29/79) östrojen reseptör pozitif, %32 (25/79) progesteron reseptör pozitif ve %27 (21/79) HER2 (-) meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 42). Sadece ekzon 9 veya sadece ekzon 20 mutasyonu taşıma durumuyla ER (+) arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (sırasıyla $p=0.0429$ ve $p=0.0420$). Aynı zamanda her iki ekzondaki PIK3CA mutasyonları ile tüm hastaların ER (+) durumu arasında da istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlendi ($p=0083$). Fakat PIK3CA mutasyonlarıyla PR (+) ve HER2 (-) arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir ($p=0.6178$ ve $p=0.3624$).



Şekil 42: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser hormon reseptör durumuna göre dağılımları

PIK3CA mutasyonlarının meme kanser hastalarının Ki-67 durumu göre dağılımlarına baktığımızda %23 (18/79) Ki67 %14 ve daha fazla olan meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 43). Fakat PIK3CA mutasyonlarıyla Ki67 durumu arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.2459).



Şekil 43: PIK3CA geni mutasyonlarının meme kanser Ki67 durumuna göre dağılımı (p>0.05)

Tablo 12: PIK3CA mutasyonları ve klinik parametreler arasındaki ilişki (x^2 Test) (n=79)

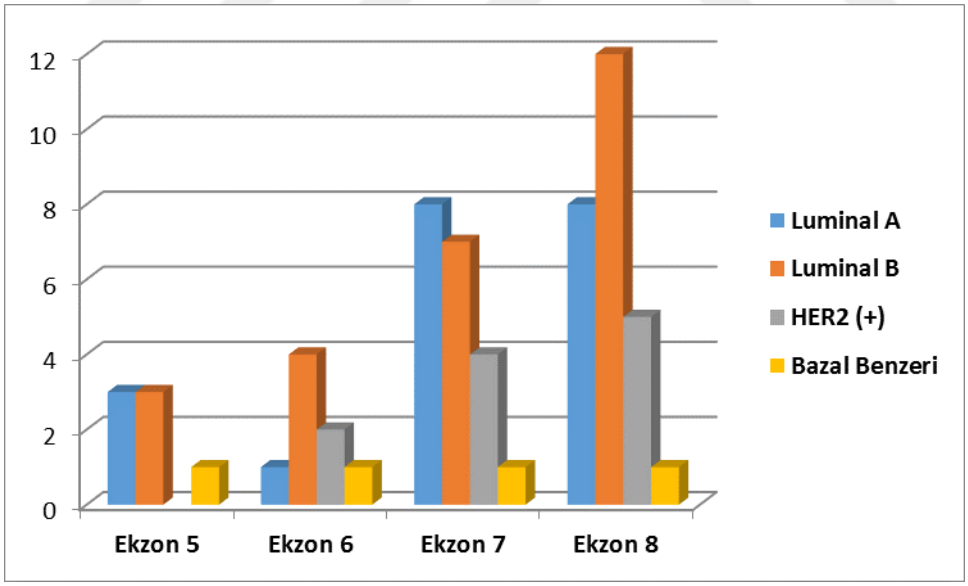
Klinikopatolojik parametreler	**Toplam mutant sayısı**	**Mutant örnek sayısı (%)**				***Yabanıl tip***	****p* değeri**
		Ekzon 9	****p***	**Ekzon 20**	****p***		
	33	12 (15.2)		21 (27)		**46**	
Moleküler alt tip							
Luminal A	15	5 (6.3)	***0.4937***	10 (13)	***0.0817***	12	***0.0735***
Luminal B	14	6 (8)		8 (10)		22	
Bazal benzeri	1	0		1 (1.3)		8	
HER2	2	1 (1.3)		1 (1.3)		4	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	
Histolojik tip							
İnvazif duktal	25	10 (13)	***0.9017***	15 (19)	***0.1998***	39	***0.3131***
İnvazif miks	1	0		1 (1.3)		1	
İnvazif lobülar	2	1 (1.3)		1 (1.3)		2	
Bazal benzeri	1	0		1 (1.3)		0	
***Diğer*	3	1 (1.3)		2 (2.6)		4	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	
Tümör evresi							
T1	5	2 (2.6)	***0.5880***	3 (3.8)	***0.6284***	6	***0.5263***
T2	17	6 (7.6)		11 (14)		27	
T3	2	0		2 (2.6)		4	
T4	0	0		0		0	
****Diğer*	8	4 (5)		4 (5)		9	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	
Histolojik derece							
G1	1	0	***0.0733***	1 (1.3)	***0.1234***	1	***0.1030***
G2	16	7 (8.9)		9 (11.4)		14	
G3	15	5 (6.3)		10 (12.7)		31	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	
Nod durumu							
N0	21	7 (8.9)	***0.4603***	14 (17.8)	***0.8125***	32	***0.5802***
N1	7	3 (3.8)		4 (5.06)		9	
N2	0	0		0		1	
N3	0	0		0		1	
*****Diğer*	4	2 (2.6)		2 (2.6)		3	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	
Yaş							
<50	11	2 (2.6)	****0.0095***	9 (11.4)	***0.2278***	27	***0.0502***
≥50	21	10 (12.7)		11 (14)		19	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	
Hormon reseptör durumu							
ER (+)	29	11 (14)	****0.0429***	18 (23)	****0.0420***	28	****0.0083***
ER (-)	3	1 (1.3)		2 (2.6)		18	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	
PR (+)	25	10 (12.7)	***0.8196***	15 (19)	***0.4120***	37	***0.6178***
PR (-)	7	2 (2.6)		5 (6.3)		9	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	
HER2 (+)	11	3 (3.8)	***0.2439***	8 (10.13)	***0.6786***	20	***0.3624***
HER2 (-)	21	9 (11.4)		12 (15.2)		26	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	
Ki-67 durumu							
<14	14	5 (6.3)	***0.5566***	9 (11.4)	***0.4170***	15	***0.2459***
≥14	18	7 (9)		11 (14)		31	
Tanımsız	1	0		1 (1.3)		0	

(* p<0.05 istatiksel olarak anlamlı**, **** İnvazif apokrin karsinom, pleomorfik lobüler karsinom, metaplastik karsinom, *** T1a, T1b, T1c, T2a, T3a, T4b, **** N1a, N2a, N3a)

6.6.2. TP53 mutasyonları ve klinik veriler arasındaki ilişkinin belirlenmesi

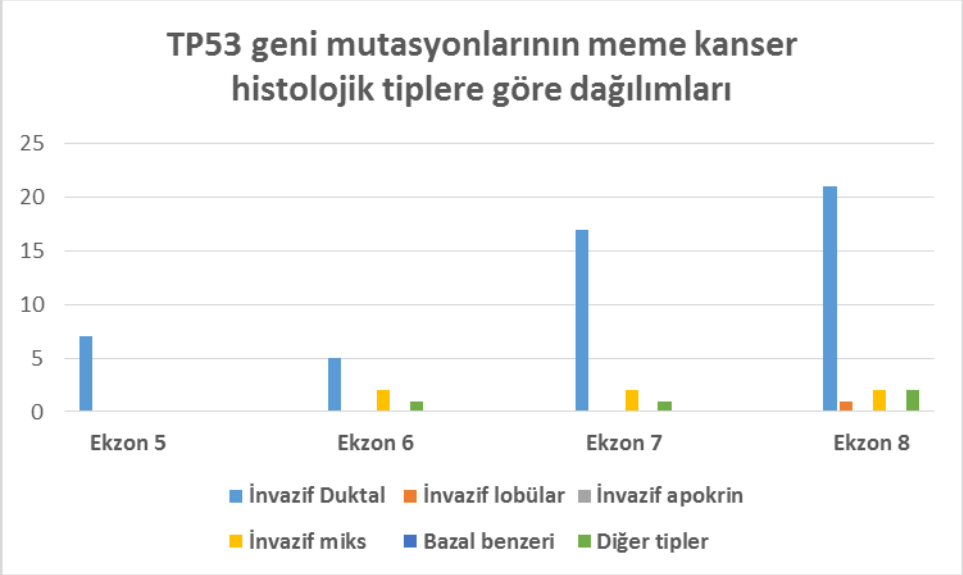
TP53 gen mutasyonu taşıyan (n=61) ile yabanıl tip (wild tip) örneklerin (n=90) klinik veriler arasındaki ilişki tek tek incelendi. Bu incelenen hastalardan klinik verisi bilinen ve mutasyon analizi yapılan 145 örnekten elde edilen veriler aşağıda özetlenmiştir (Şekil 44-51, Tablo 13). Ayrıca bu değerlendirmelerde hem TP53 mutasyonlarının tüm hastalardaki istatiksel analizleri hem de ekzon 5, 6, 7 ve 8 mutasyonlarının ayrı ayrı analizleri yapıldı.

TP53 mutasyonlarının moleküler alt tiplere göre dağılımlarına baktığımızda %18 (26/145) luminal B tip meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 44). Fakat TP53 mutasyonlarıyla moleküler alt tipler arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.4487).



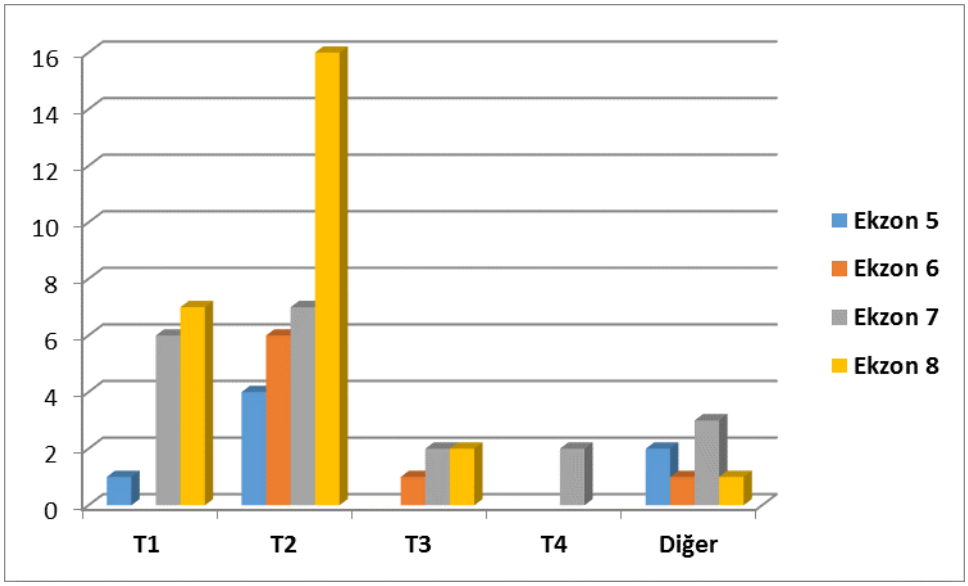
Şekil 44: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser moleküler alt tiplere göre dağılımları (p>0.05)

TP53 mutasyonlarının meme kanser histolojik tiplerine göre dağılımlarına baktığımızda %34 (50/145) invazif duktal tip meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 45). Fakat TP53 mutasyonlarıyla histolojik tipler arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.6418).



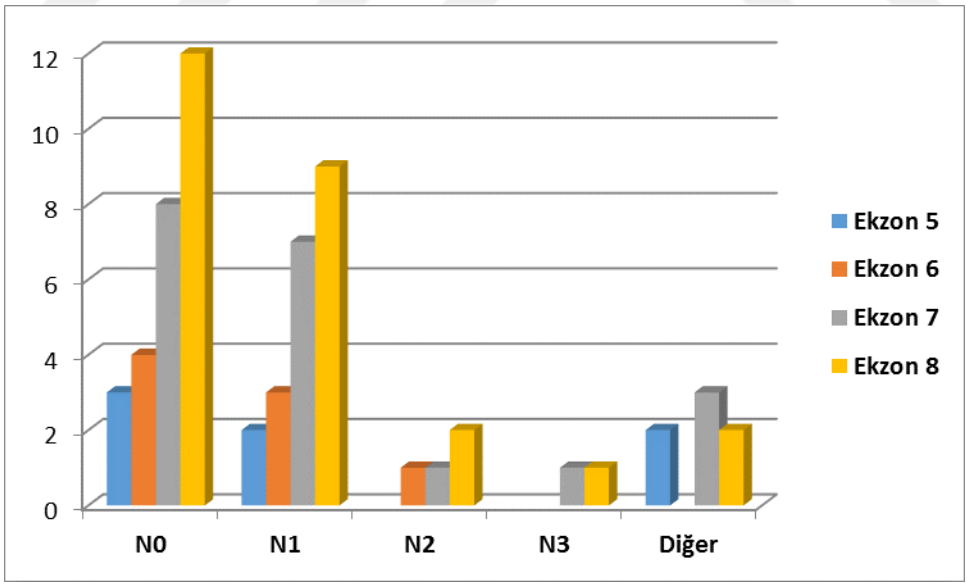
Şekil 45: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser histolojik tiplere göre dağılımları (p>0.05)

TP53 mutasyonlarının meme kanser tümör evresine göre dağılımlarına baktığımızda %23 (33/145) T2 evre meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 46). Fakat TP53 mutasyonlarıyla tümör evresi arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.7184).



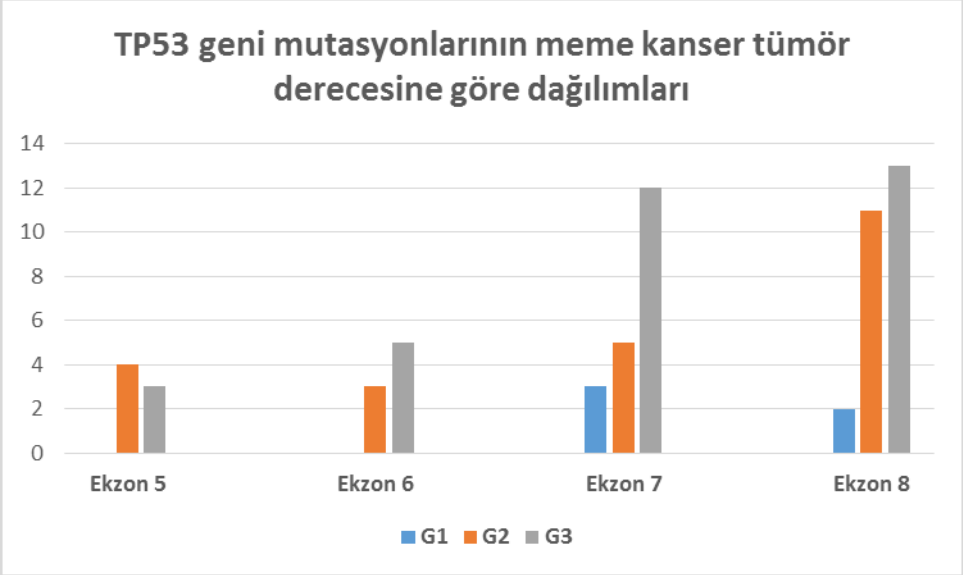
Şekil 46: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser tümör evresine göre dağılımları (p>0.05)

TP53 mutasyonlarının meme kanser nod durumlarına göre dağılımlarına baktığımızda %19 (27/145) N0 meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 47). TP53 mutasyonlarıyla nod durumu arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenmiştir (p=0.0295).



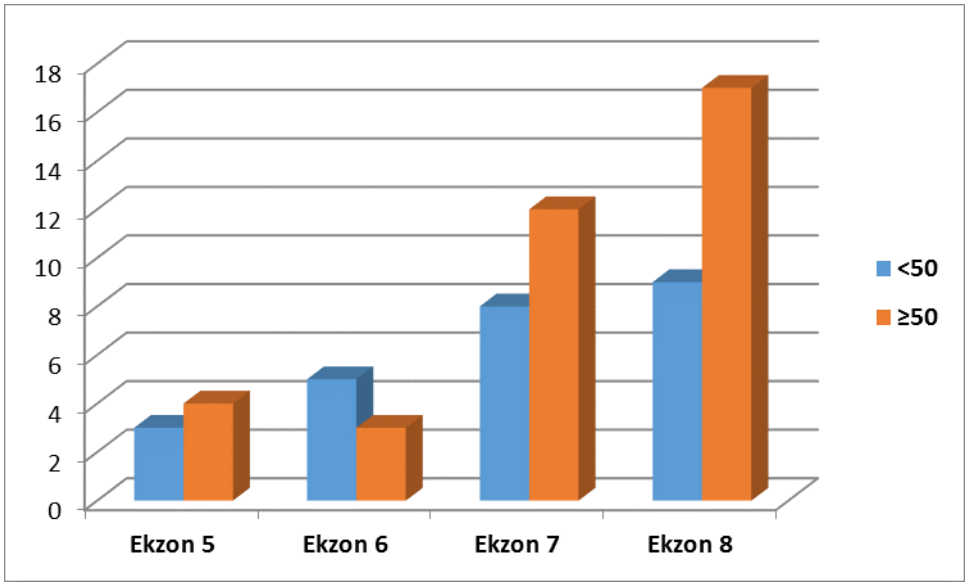
Şekil 47: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser nod durumuna göre dağılımları (*p<0.05)

TP53 mutasyonlarının meme kanser histolojik derecelerine göre dağılımlarına baktığımızda %23 (33/145) G3 meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 48). Fakat TP53 mutasyonlarıyla histolojik derece arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.3701).



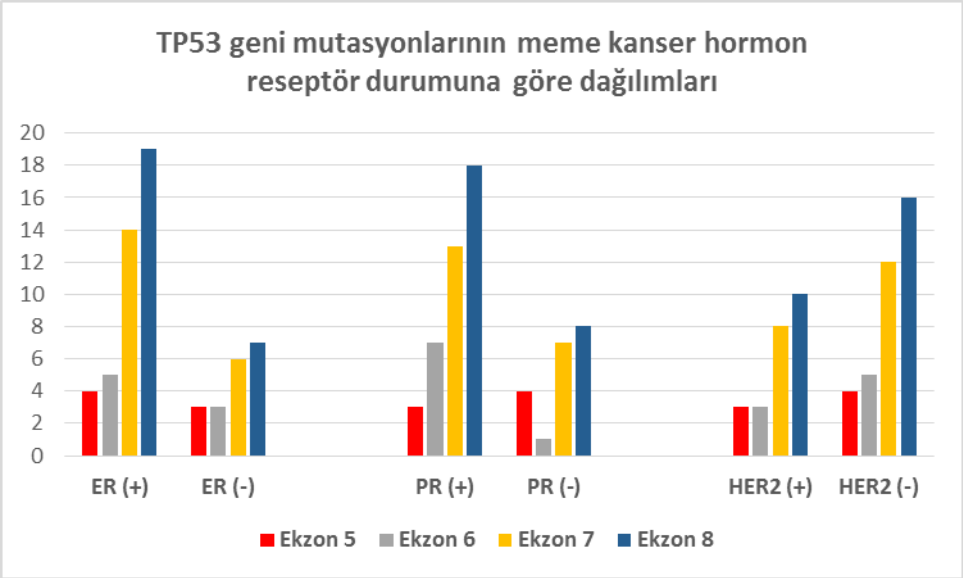
Şekil 48: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser histolojik tümör derecesine göre dağılımları ($p>0.05$)

TP53 mutasyonlarının meme kanser hastaların yaşlarına göre dağılımlarına baktığımızda %25 (36/145) 50 yaş ve üzeri meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 49). Fakat TP53 mutasyonlarıyla hastaların yaşları arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir ($p=0.9038$).



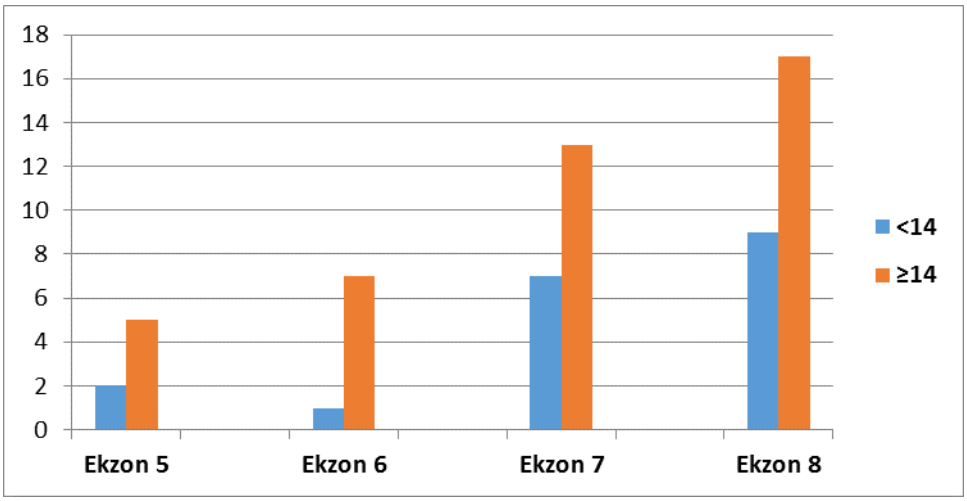
Şekil 49: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser hastalarının yaşlarına göre dağılımları ($p>0.05$)

TP53 mutasyonlarının meme kanser hormon reseptör durumlarına göre dağılımlarına baktığımızda, bu mutasyonlar %29 (42/145) ER (+), %28 (41/145) PR (+) ve %26 (37/145) HER2 (-) meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 50). Sadece ekzon 5 mutasyonu taşıyan hastalarda hem ER (+) hem de PR (+) kilinik veriler arasında bir anlamlı ilişki saptandı ($p=0.0374$; $p=0.0238$). Bunun dışında, sadece ekzon 7 veya sadece ekzon 8 mutasyonu taşıyan hastalarda HER2 (+) verilerde anlamlı bir fark gösterildi (sırasıyla $p=0.0201$ ve $p=0.0069$). Son olarak, TP53 geninde dört ekzonda saptanan mutasyonlarla tüm hastalardaki ER (+) ve HER2 (+) klinik veriler arasinda istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlendi ($p=0.0078$ ve $p=0.0005$). Fakat TP53 mutasyonlarıyla PR (+) arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir ($p=0.0756$).



Şekil 50: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser hormon reseptör durumuna göre dağılımları

TP53 mutasyonlarının meme kanser hastaların Ki-67 durumu göre dağılımlarına baktığımızda %29 (42/145) Ki67 %14 ve daha fazla olan meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta saptanmıştır (Şekil 51). Fakat TP53 mutasyonlarıyla Ki67 durumu arasında istatiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir (p=0.1683).



Şekil 51: TP53 geni mutasyonlarının meme kanser Ki67 durumuna göre dağılımı (p>0.05)

Tablo 13: TP53 geni mutasyonları ve klinik parametreler arasındaki ilişki (x^2 Test)

Klinikopatolojik parametreler	**Toplam mutant sayısı**	**Mutant örnek sayısı (%)**								***Y. tip***	****p***
		Ekzon 5	****p***	**Ekzon 6**	****p***	**Ekzon 7**	**** p***	**Ekzon 8**	****p***		
	61	7 (4.8)		8 (5.5)		20 (14)		26 (18)		**90**	
Moleküler alt tip											
Luminal A	20	3 (2.1)	***0.97***	1 (0.7)	***0.95***	8 (5.5)	***0.85***	8 (5.5)	***0.80***	38	***0.4487***
Luminal B	26	3 (2.1)		4 (2.7)		7 (4.8)		12 (8.2)		44	
Bazal benzeri	4	1 (0.7)		1 (0.7)		1 (0.7)		1 (0.7)		4	
HER2	11	0		2 (1.4)		4 (2.7)		5 (3.4)		4	
Histolojik tip											
İnvazif duktal	50	7 (4.8)	***0.17***	5 (3.4)	***0.28***	17(11.7)	***0.53***	21 (14.4)	***0.83***	71	***0.6418***
İnvazif miks	6	0		2 (1.4)		2 (1.4)		2 (1.4)		7	
İnvazif lobülar	1	0		0		0		1 (0.7)		3	
***Diğer*	4	0		1 (0.7)		1 (0.7)		2 (1.4)		9	
Tümör evresi											
T1	14	1 (0.7)	***0.98***	0	***0.19***	6 (4.1)	***0.19***	7 (4.8)	***0.34***	22	***0.7184***
T2	33	4 (2.7)		6 (4.1)		7 (4.8)		16 (11)		46	
T3	5	0		1 (0.7)		2 (1.4)		2 (1.4)		7	
T4	2	0		0		2 (1.4)		0		1	
****Diğer*	7	2 (1.4)		1 (0.7)		3 (2.1)		1 (0.7)		14	
Histolojik derece											
G1	5	0	***0.59***	0	***0.39***	3 (2.1)	***0.28***	2 (1.4)	***0.76***	6	***0.3701***
G2	23	4 (2.7)		3 (2.1)		5 (3.4)		11 (7.5)		42	
G3	33	3 (2.1)		5 (3.4)		12 (8.2)		13 (9)		42	
Nod durumu											
N0	27	3 (2.1)	***0.31***	4 (2.7)	***0.49***	8 (5.5)	***0.06***	12 (8.2)	***0.14***	56	****0.029***
N1	21	2 (1.4)		3 (2.1)		7 (4.8)		9 (6.1)		13	
N2	4	0		1 (0.7)		1 (0.7)		2 (1.4)		8	
N3	2	0		0		1 (0.7)		1 (0.7)		3	
*****Diğer*	7	2 (1.4)		0		3 (2.1)		2 (1.4)		10	
Yaş											
<50	25	3 (2.1)	***0.88***	5 (3.4)	***0.21***	8 (5.5)	***1.00***	9 (8.1)	***0.61***	36	***0.9038***
≥50	36	4 (2.7)		3 (2.1)		12 (8.2)		17 (11.7)		54	
Hormon reseptör durumu											
ER (+)	42	4 (2.7)	****0.03***	5 (3.4)	***0.06***	14 (10)	***0.06***	19(13,01)	***0.09***	78	****0.007***
ER (-)	19	3 (2.1)		3 (2.1)		6 (4.1)		7 (4.8)		12	
PR (+)	41	3 (2.1)	****0.02***	7 (4.8)	***0.60***	13 (9)	***0.14***	18 (12.4)	***0.24***	72	***0.0756***
PR (-)	20	4 (2.7)		1 (0.7)		7 (4.8)		8 (5.5)		18	
HER2 (+)	24	3 (2.1)	***0.18***	3 (2.1)	***0.08***	8 (5.5)	****0.02***	10 (7)	****0.00***	61	****0.000***
HER2 (-)	37	4 (2.7)		5 (3.4)		12 (8.2)		16 (11)		29	
Ki-67 durumu											
<14	19	2 (1.4)	***0.47***	1 (0.7)	***0.09***	7 (4.8)	***0.55***	9 (6.2)	***0.48***	38	***0.1683***
≥14	42	5 (3.4)		7 (4.8)		13 (9)		17 (12)		52	

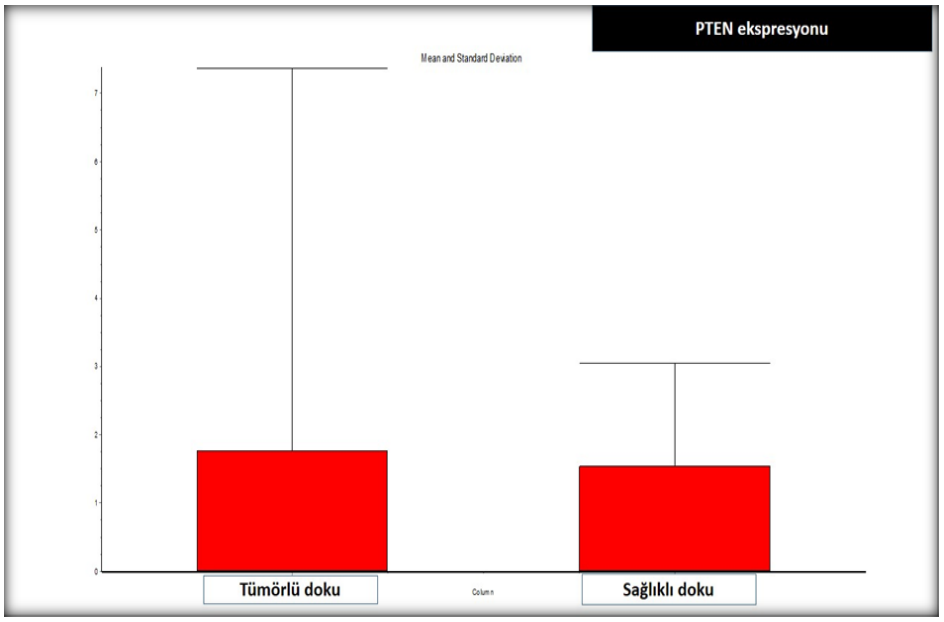
(*p<0.05 istatiksel olarak anlamlı**, **** İnvazif apokrin karsinom, pleomorfik lobüler karsinom, metaplastik karsinom, *** T1a, T1b, T1c, T2a, T3a, T4b, **** N1a, N2a, N3a)

6.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Ekspresyonun Analizi

Bu çalışmada PIK3R1, PTEN, SALL4 gen ekspresyonu gerçek zamanlı PZR ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar tek tek analiz edildi. Analiz sırasında PIK3R1, PTEN ve SALL4 genlerinin meme kanser hastalarındaki tümörlü ve sağlıklı dokulardaki eskpresyonları ile PIK3CA ve TP53 gen mutasyonları ayrı ayrı değerlendirilip aralarındaki korelasyon ortaya konmaya çalışıldı. Meme kanser taze dokudan elde edilen RNA örneklerinin, cDNA dönüşümü gerçekleştirildikten sonra RT-PZR ile analiz edildi. Bu yöntemde ekspresyon, absolut kantitasyon olarak değil, beta actin (house keeping gen)'e göre normalize edilerek kantifiye edilir. Kullandığımız sistemde mRNA ekspresyonu çift iplikli DNA molekülüne bağlanan floresan boya ile tayin edilmektedir. Sistem floresan ışımayı her reaksiyonda ölçerek amplifiye olan örneğin belirlenmesini sağlamaktadır. Hedef cDNA örnekte ne kadar fazla temsil ediliyorsa o kadar erken ışıma verecektir. Bu yöntemde ayrıca Ct değeri kullanılarak '***delta delta Ct***' ($2^{-\Delta\Delta CT}$) analizi yapıldı.

6.7.1. PTEN Geni Ekspresyon Analizi

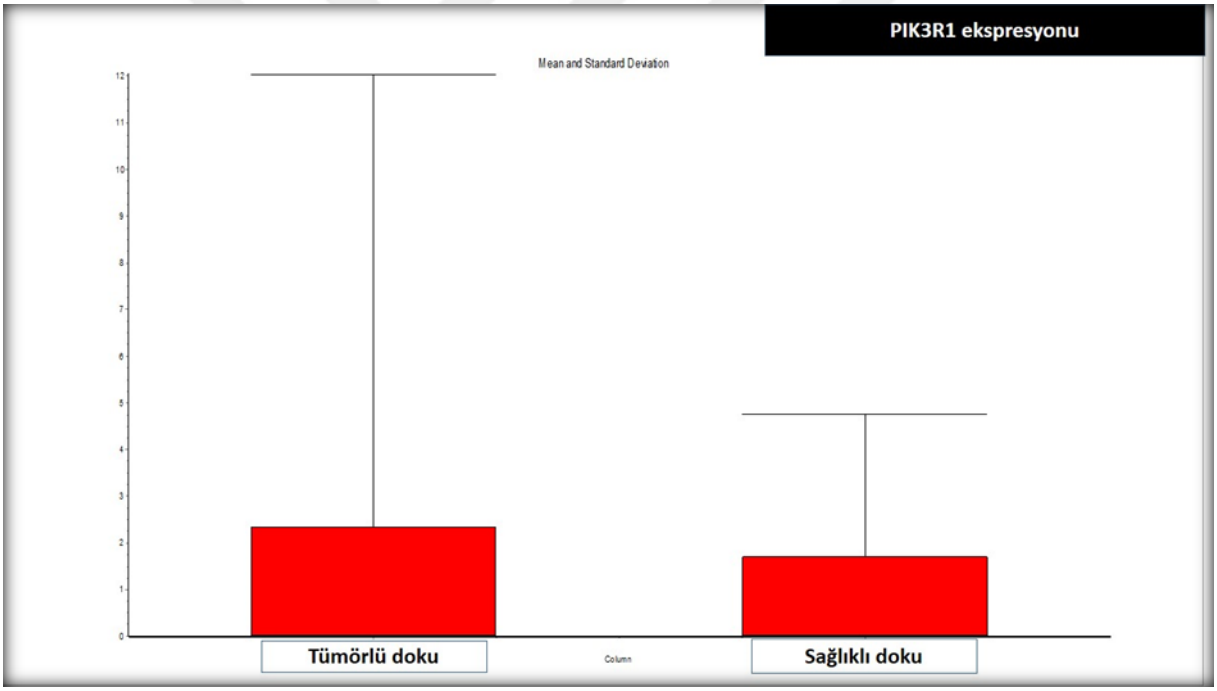
PTEN genin mRNA ekspresyonu tümörlü dokularda sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (p=0.0059). İstatiksel analizlerde mean (ortalama) değeri tümörlü dokularda 1.767 iken sağlıklı dokularda 1.541 olarak belirlendi. Yani PTEN geni tümörlü dokularda sağlıklı dokulara oranla daha yüksek eksprese olduğu gösterilmiş oldu (Şekil 52).



Şekil 52: PTEN genin tümörlü ve sağlıklı dokudaki mRNA ekspresyon durumu (*p<0.05)

6.7.2. PIK3R1 Geni Ekspresyon Analizi

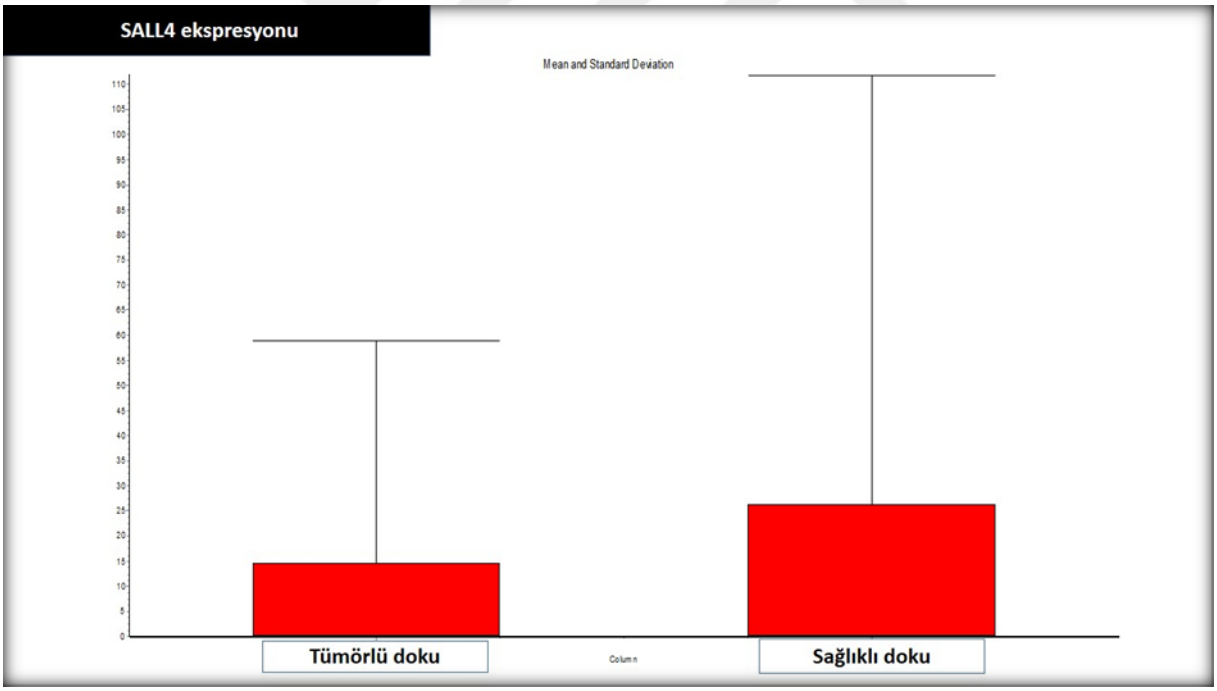
PIK3R1 genin mRNA ekspresyonu tümörlü dokularda sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0.0001$). İstatiksel analizlerde mean değeri tümörlü dokularda 2.334 iken sağlıklı dokularda 1.706 olarak belirlendi. Yani PIK3R1 geni tümörlü dokularda sağlıklı dokulara oranla daha yüksek eksprese olduğu gösterilmiş oldu (Şekil 53).



Şekil 53: PIK3R1 genin tümörlü ve sağlıklı dokudaki mRNA ekspresyon durumu (*$p<0.05$)

6.7.3. SALL4 Geni Ekspresyon Analizi

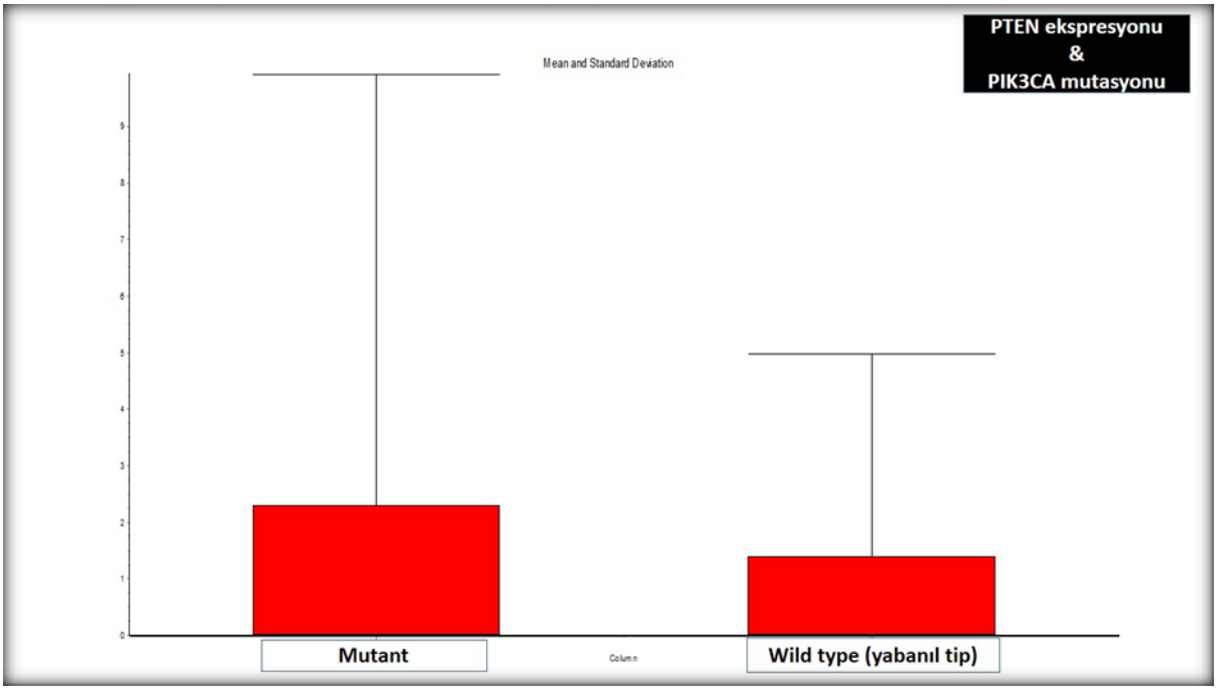
SALL4 genin mRNA ekspresyonu tümörlü dokularda sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (p=0.0378). İstatiksel analizlerde mean değeri tümörlü dokularda 14.681 iken sağlıklı dokularda 26.233 olarak belirlendi. Yani SALL4 geni tümörlü dokularda sağlıklı dokulara oranla daha düşük eksprese olduğu gösterilmiş oldu (Şekil 54).



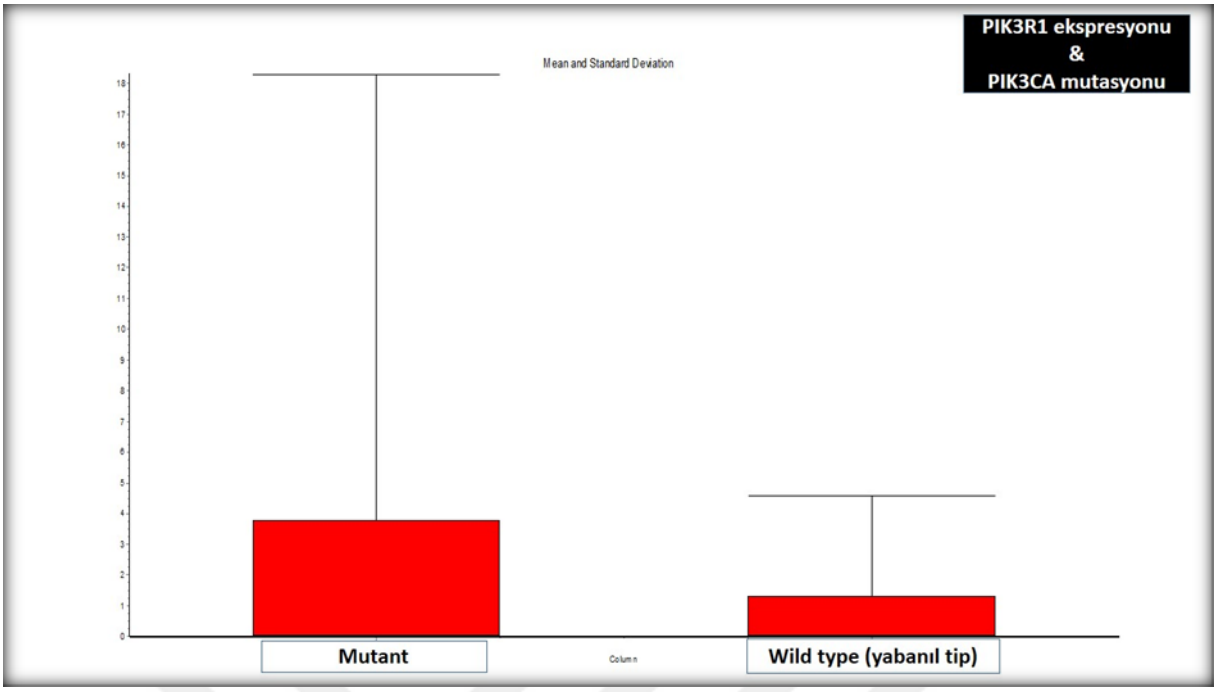
Şekil 54: SALL4 genin tümörlü ve sağlıklı dokudaki mRNA ekspresyon durumu (*p<0.05)

6.7.4. PIK3CA geni mutasyonları ile PIK3R1, SALL4 ve PTEN Gen Ekspresyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi

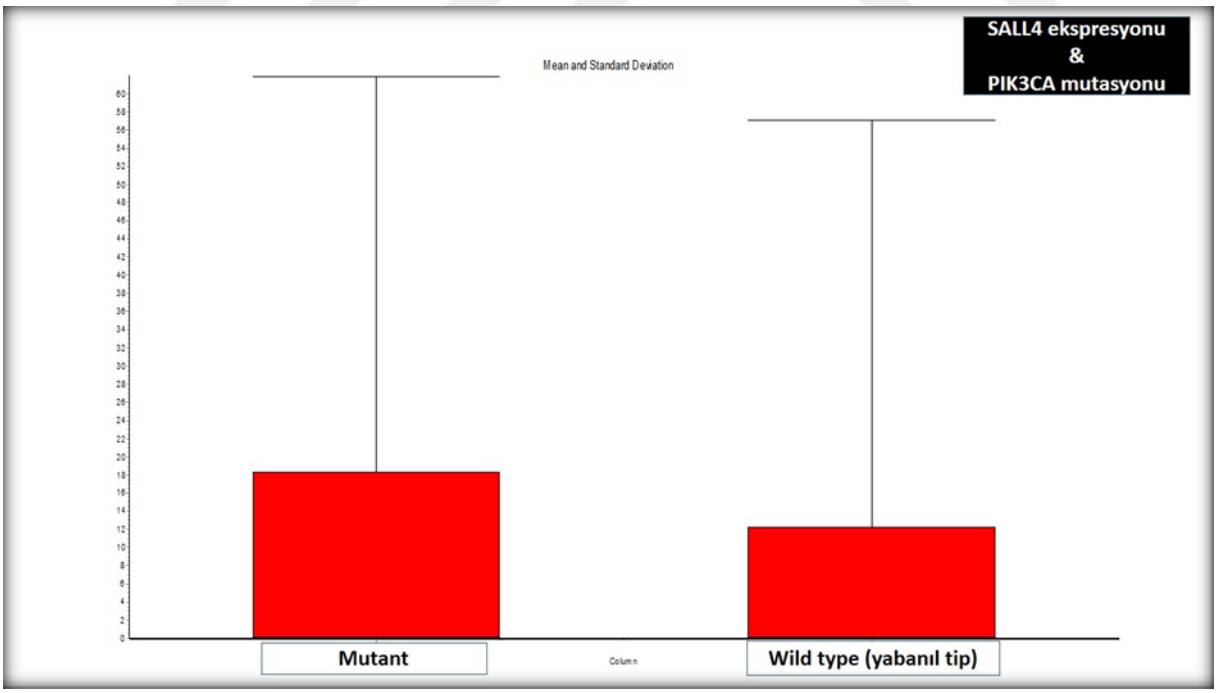
PIK3CA geni mutasyonlarıyla PIK3R1, PTEN ve SALL4 gen ekspresyonları analiz edildiklerinde PIK3CA mutasyonları ile bu üç gen eskpresyon seviyeleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark belirlenemedi (p=0.1561; p=0.7119 ve p=0.1684). Fakat bu üç genin ekspresyonu PIK3CA mutasyonu taşıyan hastalarda daha yüksek oldukları gösterildi (Şekil 55-57).



Şekil 55: PIK3CA mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki PTEN mRNA ekspresyon durumu (p>0.05)



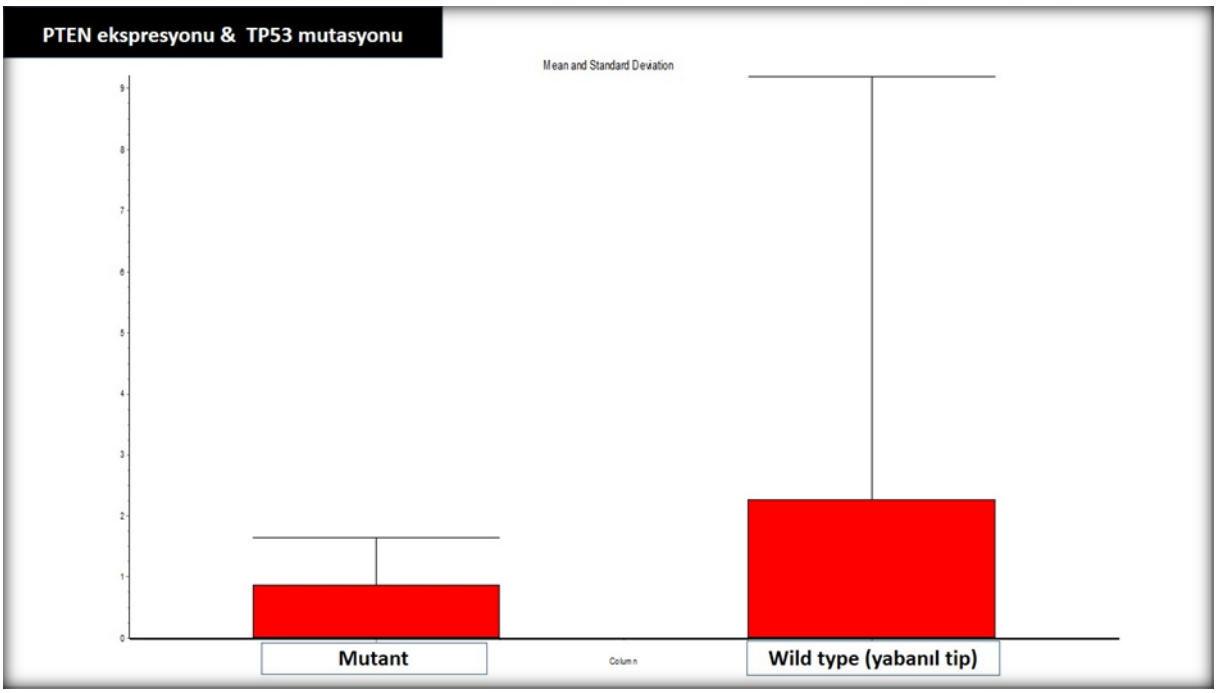
Şekil 56: PIK3CA mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki PIK3R1 mRNA ekspresyon durumu (p>0.05)



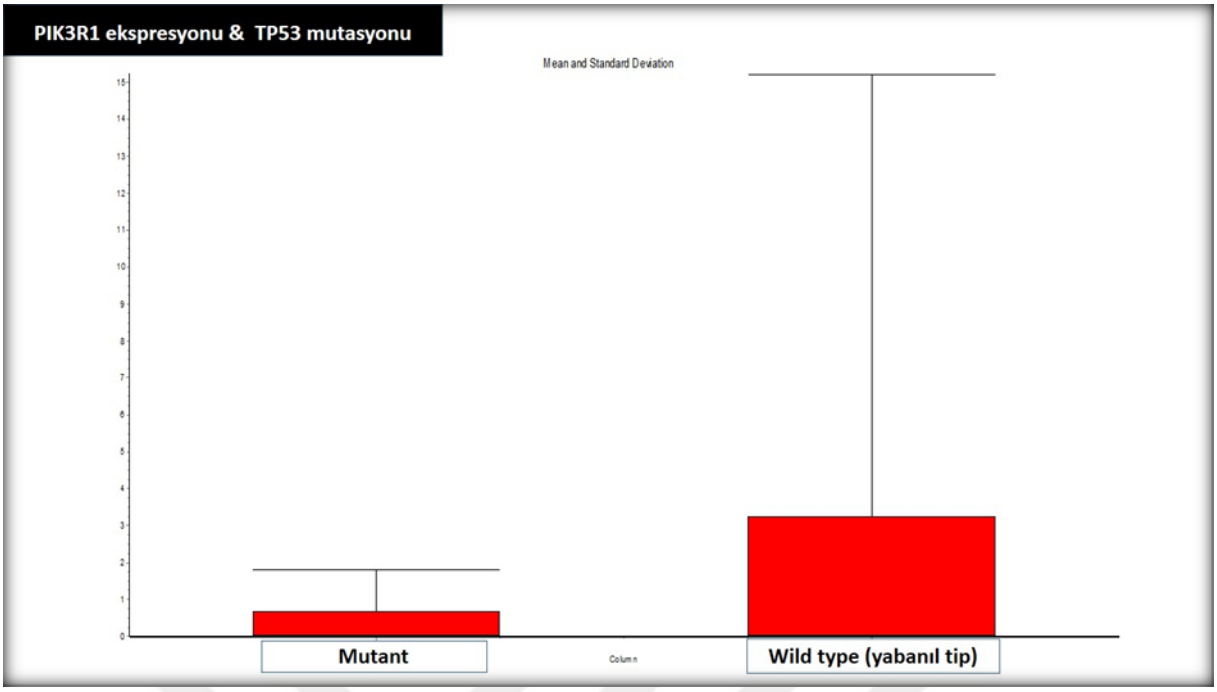
Şekil 57: PIK3CA mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki SALL4 mRNA ekspresyon durumu (p>0.05)

6.7.5. TP53 geni mutasyonları ile PIK3R1, SALL4 ve PTEN Gen Ekspresyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi

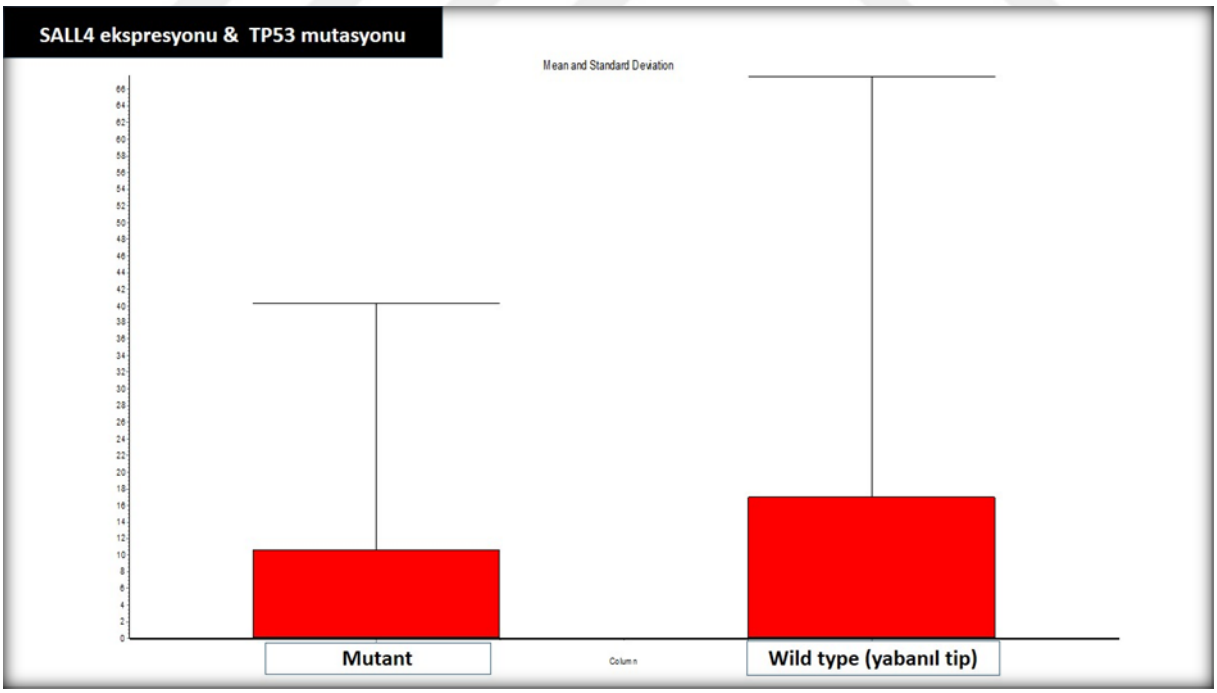
TP53 geni mutasyonlarıyla PIK3R1, PTEN ve SALL4 gen ekspresyonları analiz edildiklerinde TP53 mutasyonları ile PIK3R1 gen ekspresyonu arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark belirlenirken (p=0.0169), SALL4 ve PTEN gen eskpresyonu ile anlamlı bir fark belirlenemedi (p=0.7851 ve p=0.1010). Ayrıca PIK3R1, PTEN ve SALL4 ekspresyonu TP53 mutasyonu taşımayan yabanıl tip (wild tip) örneklerde daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 58-60).



Şekil 58: TP53 mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki PTEN mRNA ekspresyon durumu (p>0.05)



Şekil 59: TP53 mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki PIK3R1 mRNA ekspresyon durumu (*p<0.05)



Şekil 60: TP53 mutasyonu taşıyan tümör dokusundaki SALL4 mRNA ekspresyon durumu (p>0.05)

6.7.6. PIK3R1, SALL4 ve PTEN Gen Ekspresyonu ile Klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Bu çalışmamızda yeterli dokusu olan ve RNA izole edebildiğimiz 112 örnekteki PIK3R1, PTEN ve SALL4 mRNA ekspresyonları ile klinikopatolojik veriler arasında istatiksel analizler yaptığımızda, ekspresyon değerlerinde medyanın üstünde ekspresyon gösteren örneklere '*yüksek eksprese olanlar*' ve medyanın altında eksprese olanlar da '*düşük eksprese olan örnekler*' diye iki gruba ayırdık. Bununla birlikte, RT-PZR ile yaptığımız mRNA ekspresyona analiz sonuçlarina göre, PIK3R1 geninde %97 (109/112), PTEN geninde %94 (105/112) ve SALL4 geninde ise %80 (89/112) amplifikasyon (düşük/yüksek) belirlenmiştir. PIK3R1 ekspresyon seviyesi ile G3 histolojik derece, ER (+), PR (+) ve HER2 (+) klinik parametreler arasında istatiksel olarak anlamlı farklar belirlendi (sırasıyla p=0.0030; p=0.0010; p=0.0019; p=0.0272). Bununla birlikte, PTEN ekspresyon seviyesi ile ER (+) klinik parametre arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark gösterildi (p=0.0048). SALL4 geni ER (+) hastaların %62'sinde amplifiye olmasına rağmen (düşük/yüksek), istatiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı (p=0.0799). Ayrıca her üç gende de meme kanseri moleküler alt tipleri, histolojik tipleri, tümör evresi, nod ve Ki-67 durumları ile ekspresyon arasında istatiksel olarak bir anlamlı ilişki belirlenememiştir. Elde edilmiş veriler aşağıda ki Tablo 14'te özetlenmiştir.

Tablo 14: Gen ekspresyonu ve klinik parametreler arasındaki ilişki (x^2 Test) (n=112)

Klinikopatolojik parametreler	Ekspresyonu çalışılan örnek sayısı (%)								
	PIK3R1			PTEN			SALL4		
	Düşük	Yüksek	*p	Düşük	Yüksek	*p	Düşük	Yüksek	*p
	52 (47.7)	57 (52.3)		55 (52.4)	50 (37.6)		46 (51.7)	43 (48.3)	
Moleküler alt tip									
Luminal A	21	15		20	13		14	13	
Luminal B	25	25		27	22		23	19	
Bazal benzeri	2	6	***0.5589***	1	7	***0.4363***	3	4	***0.5268***
HER2	1	11		4	8		4	6	
Tanımsız	3	0		3	0		2	1	
Histolojik tip									
İnvazif duktal	37	44		39	40		34	34	
İnvazif miks	6	4		4	5		5	2	
İnvazif lobülar	1	2	***0.8219***	3	0	***0.4907***	0	1	
Bazal benzeri	1	0		0	1		1	0	***1.000***
***Diğer*	5	7		7	4		4	6	
Tanımsız	2	0		2	0		2	0	
Tümör evresi									
T1	8	9		7	9		6	7	
T2	31	32		35	26		28	22	
T3	4	3		3	4		2	4	
T4	0	0	***0.5525***	0	0	***0.1573***	0	0	***0.3823***
****Diğer*	6	13		7	11		8	9	
Tanımsız	3	0		3	0		2	1	
Histolojik derece									
G1	2	3		2	3		0	2	
G2	27	15		25	15		21	15	
G3	20	39	****0.0030***	25	32	***0.0708***	23	25	***0.5226***
Tanımsız	3	0		3	0		2	1	
Nod durumu									
N0	31	35		35	28		25	29	
N1	12	8		12	8		10	6	
N2	3	3	***1.000***	1	4		0	2	
N3	0	3		0	3	***0.3088***	2	1	***0.2711***
*****Diğer*	3	8		4	7		7	4	
Tanımsız	3	0		3	0		2	1	
Yaş									
<50	17	23		18	19		13	16	
≥50	33	34	***0.5515***	37	31	***0.6831***	31	27	***0.5003***
Tanımsız	2	0		2	0		2	0	
Hormon reseptör durumu									
ER (+)	45	37		46	32		37	28	
ER (-)	4	20	****0.0010***	6	18	****0.0048***	7	14	***0.0799***
Tanımsız	3	0		3	0		2	1	
PR (+)	43	34		41	33		32	28	
PR (-)	6	23	****0.0019***	11	17	***0.1847***	12	14	***0.6404***
Tanımsız	3	0		3	0		2	1	
HER2 (+)	13	28		21	18		16	18	
HER2 (-)	36	29	****0.0272***	31	32	***0.6875***	28	24	***0.6597***
Tanımsız	3	0		3	0		2	1	
Ki-67 durumu									
<14	21	16		21	13		15	14	
≥14	27	41	***0.1052***	31	36	***0.2060***	29	28	***1.000***
Tanımsız	4	0		3	1		2	1	

(*p<0.05 istatiksel olarak anlamlı**, **** İnvazif apokrin karsinom, pleomorfik lobüler karsinom, metaplastik karsinom, *** T1a, T1b, T1c, T2a, T3a, T4b, **** N1a, N2a, N3a)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada PIK3CA ve TP53 gen mutasyonlarının HRM yöntemiyle analizi ve PIK3R1, PTEN, SALL4 gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu genlerin meme kanser tanısında birer marker olarak kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır. Birçok çalışmada belli genlerin kanser tanısında aday marker olup olamayacakları ekspresyon ve mutasyon analizleriyle değerlendirilmektedir. Fakat kanserli olmayan dokudaki bu genlerin ekspresyon seviyeleri ve mutasyon taşıyıp taşımadıkları ihmal edildiği için, bu genlerin klinik yararları çok sınırlı kalmaktadır. Bu yüzden bu çalışmada ilk kez meme kanser taze dokusunda kanserli ve sağlıklı dokuda PIK3CA ve TP53 mutasyonları ile PIK3R1, PTEN ve SALL4 mRNA ekspresyon seviyeleri ve klinik veriler arasındaki ilişki aydınlatılmaya çalışılmıştır

PIK3CA ve TP53 mutasyonları meme kanserde en sık mutasyonların saptandığı ve meme kanserde önemli rol oynayan iki gen olduğunu bilmekteyiz. Özellikle meme kanserde PIK3CA mutasyonlarının frekansının %27 ve TP53 geni mutasyonlarının ise yaklaşık %24 civarında olduğu rapor edilmiştir (COSMIC, Erişim tarihi: 20 Ocak 2016). Bizde bu çalışmada PIK3CA ve TP53 geni mutasyonlarını HRM yöntemiyle analiz ve Sanger DNA dizi ile analiziyle de doğruladığımızda PIK3CA mutasyonlarının frekansı %42 (33/79) ve TP53 mutasyonlarının frekansını ise %38 (55/145) olarak gösterdik. Yine literatürde PIK3CA sıcak nokta mutasyonlarının ekzon 9 ve ekzon 20 bölgelerinde lokalize oldukları rapor edilmiştir. Bizde bu çalışmada PIK3CA geninde tanımladığımız 33 mutasyonun %36'sını (12/33) ekzon 9 ve %64'ünü de (21/33) ekzon 20 bölgesinde olduklarını gösterdik. Diğer taraftan, TP53 geni mutasyonlarını aynı yöntemlerle analiz ettiğimizde ekzon 5, 6, 7 ve 8 bölgelerinde sıcak nokta mutasyonlarının olduğu ve bu bölgelerde 61 örnekte, 20 farkli tip mutasyondan 67 tane tanımlanmıştır. Bu mutasyonların %4.8'i (7/61) ekzon 5, %5.5 (8/61) ekzon 6, %14'ü (20/145) ekzon 7'de ve %18'i (26/145) ekzon 8 bölgelerinde saptandığı gösterildi.

PIK3CA ve TP53 mutasyonlarının meme kanser hastalarının klinikopatolojik verileriyle ilişkisine baktığımızda, PIK3CA mutasyonlarının ER (+) meme kanser hastalarında yüksek sıklıkta görüldüğü ve istatiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0.0083). Ayrıca PIK3CA mutasyonlarının luminal A tip moleküler alt tiplerde, invazif dukal karsinomalı, T2 tümör evresine sahip, G2 histolojik derecesi olan, nod sıfır (N0), 50 yaş üzeri, PR (+), HER2

(-), Ki-67 değeri 14'ten büyük olan hastalarda frekansının yüksek olduğu, fakat istatiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı gösterildi.

TP53 mutasyonlarının meme kanser hastalarının klinikopatolojik verileriyle ilişkisine baktığımızda, nod sıfır (N0), ER (+) ve HER2 (+) meme kanser hastalarında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (sırasıyla p=0.0295; p=0.0078; p=0.0005). Son olarak, TP53 mutasyonlarının luminal B moleküler alt tipte, invazif duktal kasinomalarda, T2 tümör evresine sahip, G3 histolojik derecesi olan, 50 yaş üzeri, PR (+), Ki-67 değeri 14'ten büyük olan hastalarda frekansının yüksek olduğu belirlendi. Fakat istatiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı gösterildi.

PIK3CA mutasyonları üzerine yapılan çalışmalara literatüre baktığımızda, Bernichon ve ark. (2017) 193 meme kanser örneğinin 31'inde (%21.2) PIK3CA mutasyonlarını göstermişler ve bu mutasyonların hastaların tekrar kötüleşme durumuyla düşük risk teşkil ettiklerini, radyo sensitivitede biyolojik yolakların etkilerinin araştırılması gerektiğini rapor etmişlerdir. İn siliko analizlerin yapıldığı bir çalışma da ise PIK3CA mutasyonlarının luminal A'da hem ekzon 9 hem de ekzon 20 mutasyonlarının lokalize oldukları ama luminal B'de daha çok ekzon 9 mutasyonların saptandığı gösterilmiştir (Ramirez-Ardila ve ark., 2017). Takeshita ve ark. (2017) endokrin terapiye dirençli metastatik tümör hücrelerinde sirküler DNA'da PIK3CA mutasyonlarının frekansını %28.9 olarak bulmuşlardır. Filipenko ve ark. (2017) III. safha meme kanser hastalarında PIK3CA mutasyonu taşıyanlarda rölaps serbest sağkalım durumunun önemli decede azaldığını rapor etmişlerdir. Arsenic ve ark. (2015) 64 meme tümörünün 52'sinde PIK3CA ekzon 9 ve ekzon 20 mutasyonları saptamışlardır ve hormon reseptör pozitif, HER2 negatif, tümör derecesi ve lenf nod durumuyla anlamlı derecede bir ilişki belirlendiğini bildirmişlerdir. Fu ve ark., (2013) PIK3CA mutasyona sahip ER (+) hastaların endokrin terapiye iyi yanıt verdiklerini göstermişlerdir. PIK3CA mutasyonları büyüme faktörün stimülasyonundan bağımsız bir şekilde PI3K sinyal yolağının aktivitesini arttırmaktadır (Vogt ve ark., 2007; Isakoff ve ark., 2005). Ekzon 20 mutasyonlarının agrasif meme tümörlerinde sık görüldüğü ve bu tümörler için önemli bir biyomarker olabileği gösterilmiştir. Ayrıca bu mutasyonların kinaz aktivitesini tetikleyerek hücre proliferasyonunu uyarabileceği vurgulanmıştır (Li ve ark., 2006; Hoadley ve ark., 2014). Ekzon 9 mutasyonların ise sıklıkla tümör derecesi I/II olanlarda III'ten daha fazla görüldüğü ifade edilmiştir (Perez-Tenorio ve ark., 2007; Dunlap ve ark., 2010; Dupont ve ark., 2011; Miron ve ark., 2010).

İnsan meme karsinomalarda TP53 mutasyonların transgenik hayvan ve deneysel hücre çalışmalarından elde edilen tüm veriler TP53'ün meme karsinogezinde önemli rol oynadığını göstermektedir. TP53 mutasyonu taşıyan meme tümörlerde yalnızca bir bölümde olmasına rağmen, son zamanlarda bu değişikliklerin TP53 sinyalizasyonunda upstream veya downstreamda aktivasyon veya inaktivasyon şeklinde kendini gösterebildiğine dair veriler elde edilmiştir. TP53 mutasyonlarının %30-40 duktal in situ karsinomalarda saptandığı rapor edilmiştir (Ho ve ark., 2000). TP53 mutasyonları ekzon 2-11 arasında lokalize oldukları bilinmektedir. Fakat daha çok ekzon 5-8 bölgelerinde frekanslarının yüksek olduğu vurgulanmıştır (Berns ve ark., 2000). Son zamanlarda yapılmış araştırmalarda TP53 mutasyonlarının, BRCA1 ve BRCA2 germ-line mutasyonları taşıyan tümörlerde sporadik kanserlerden daha yaygın olduğu rapor edilmiştir (Greenblatt ve ark., 2001). Nedelcheva ve ark. 1998 yılında yaptıkları çalışmada glutatiyon S- transferazlardaki genotip farklılıklarına göre meme kanserde TP53 mutasyonlarının frekansının değiştiğini ve en çok GSTP1 genotipte olduğunu, TP53 mutasyon frekansının %38 ile %21 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. 16 çalışma ve 3500 hastadan oluşan bir popülasyonla yapılan meta analiz sonuçları TP53 mutasyonlarının kötü sağkalım durumuyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Pharoah ve ark., 1999). 243 hastadan oluşan bir çalışmada ise tamoksifen yanıtta TP53 mutasyonların meydana geldiği kodonların önemli olduğunu, bunların DNA'nın bağlanmasını etkilediklerini vurgulamşlardır. Özellikle çinko bağlanma domainindeki L3 bölgesinde etkilerinin olduğunu saptamışlardır. Ayrıca TP53 mutasyonu taşıyan ve kemoterapi alan hastalarda zayıf yanıt alındığı veya hiç tedaviye yanıt vermedikleri tespit edilmiştir (Kandioler-Eckersberger ve ark., 2000).

Günümüzde birçok mutasyon tarama yöntemi (Sanger, SSCP, RFLP vs.) olduğunu bilmekteyiz. Fakat biz bu çalışmada ucuz, verimi yüksek ve kolay analiz edilebilen yeni bir yöntem olan PZR temelli HRM yöntemini kullandık. HRM yönteminin Sanger dizi analiziyle etkinliğine ve doğruluk düzeyine baktığımızda bu oranların çalışılan gen ve çalışılan bölgelerin (ekzonların) büyüklüğüne göre değiştiğini belirledik. HRM yöntemi ile PIK3CA mutasyonlarını analiz ettiğimizde 37 örnekte mutasyon olabileceğini saptadık ve doğrulamak için Sanger dizileme yaptığımızda bu mutasyonların 33 tane olduğu belirlendi. HRM yöntemiyle PIK3CA mutasyonlarını doğru saptama değeri %89.2 (33/37) olarak hesaplandı. Aynı yöntemle, TP53 mutasyonlarını analiz ettiğimizde ise, 108 örneğin 67'sinde Sanger dizilemeyle bu gende mutasyonlar tanımlandı. Böylece HRM'nin TP53 geni mutasyonu doğru saptama değeri %62.04 (67/108) olarak hesaplandı.

HRM yöntemiyle yapılmış çalışmalara baktığımızda, Tserga ve ark. 2016 yılında 75 meme karsinamasında PIK3CA ve AKT2 mutasyonlarını HRM ve pürsekanslamayla analiz etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre 75 hastanın 21'inde PIK3CA mutasyonlarını saptamışlardır. 2014 yılında yaptığımız çalışmada 101 meme kanser örneğin 31'inde HRM analiziyle PIK3CA ekzon 9 ve ekzon 20 mutasyonlarını tanımladık (Dirican ve ark., 2014). Harlé ve ark. (2013) ise 149 meme kanser örneğin 30'unda HRM yöntemiyle mutasyon olabileceğini, yine ARMS PZR yöntemiyle ise aynı örneklerin 27'sinde mutasyon olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu iki yöntemin mutasyon saptamada yüksek sensitiviteye sahip olduklarını vurgulamışlardır. Son yapılmış bir çalışmada ise Gonzalez-Bosquet ve ekibi (2011) yılında 216 pediatrik küçük çevreli mavi hücreli tümör taze doku örneği ile 180 karışık tümör örneğinde, HRM yöntemiyle PIK3CA, ERBB2, KRAS, TP53, EGFR, BRAF, GATA3 ve FGFR3 genlerini analiz etmişler ve 39 taze doku örneğinde mutasyon gösterdiklerini rapor etmişlerdir. HRM yönteminin sensitivitesini %97 ve spesifitesini ise %87 olarak bildirilmiştir.

PIK3R1, PTEN ve SALL4 genlerinin meme kanserdeki mRNA ekspresyon seviyelerini analiz ettiğimizde, bu üç genin de ekspresyon seviyelerinde tümörlü dokuda sağlıklı dokudan istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu bulduk ($p<0.0001$; $p=0.0059$; $p=0.0378$). PIK3R1 ve PTEN genlerinin ekspresyon seviyesi tümörlü dokuda daha yüksek bulunurken, SALL4 genin ekspresyonu sağlıklı dokuda daha yüksek olduğunu gösterdik. PIK3CA geni mutasyonlarıyla bu üç genin ekspresyon seviyelerini değerledirdiğimizde istatiksel olarak anlamlı bir fark belirleyemedik. Fakat PIK3CA geni mutasyonu taşıyan bireylerde PIK3R1, PTEN ve SALL4 ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu gösterildi. TP53 geni mutasyonu taşıyan bireylerde PIK3R1 geni ekspresyonu arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark belirledik ($p=0.00169$). Ayrıca bu üç genin ekspresyonu wild tip (yabanıl) örneklerde daha yüksek olduğu gösterdik. Diğer taraftan PIK3R1, PTEN ve SALL4 mRNA ekspresyonları ile klinikopatolojik veriler arasındaki korelasyonu incelendiğimizde, örneklerin %52.3 (57/112)'ünde PIK3R1 geninde yüksek ekspresyon profili belirlenirken, fakat %52.4 (55/105)'ünde PTEN geninde ve %51.7 (46/89)'unda ise SALL4 geninde düşük ekspresyon profili belirlenmiştir. PIK3R1 ekspresyon seviyesi ile G3 histolojik derece, ER (+), PR (+) ve HER2 (+) klinik parametreler arasında istatiksel olarak anlamlı farklar belirlendi (sırasıyla $p=0.0030$; $p=0.0010$; $p=0.0019$; $p=0.0272$). Bununla birlikte, PTEN ekspresyon seviyesi ile ER (+) klinik parametre arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark gösterildi ($p=0.0048$). SALL4 geni ER (+) hastaların %62'sinde amplifiye olmasına rağmen (düşük/yüksek), istatiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı ($p=0.0799$). Ayrıca her üç gende de meme

kanseri moleküler alt tipleri, histolojik tipleri, tümör evresi, nod ve Ki-67 durumları ile ekspresyon arasında istatiksel olarak bir anlamlı ilişki belirlenememiştir.

PIK3R1, PTEN ve SALL4 genleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Fakat bu çalışmalar tam olarak bu genlerin meme kanserindeki rollerini ve mekanizmalarını aydınlatmayı başaramamıştır. PI3K sinyal yolağının aktivasyonu p85 regülatör ve p110 katalitik alt birimler arasındaki dengeye bağlı olduğunu bilmekteyiz. p85'in tamamen etkinliğinin azalması, PI3K sinyalizasyonunda azalmaya sebep olduğu için, apoptozu önemli derecede arttırmaktadır (Taniguchi ve ark., 2010; Ueki ve ark., 2002). Bu yüzden p85 regülatör alt birimin, PI3K sinyal yolağındaki tümörogenezis mekanizmasında hem pozitif hem de negatif etkileri olabiliyor. p85 (PIK3R1) ekspresyonun azalışı kolon ve akciğer gibi solid tümörlerde p85'in tümör süpressör etki göstermesine sebep olurken, başka çalışmalarda p85 varlığının sinyalizasyonu arttırdığı gösterilmiştir (Katoh ve ark., 2005). Bu olayda p85'in asıl işlevinin p110 katalitik alt birime bağlanması ve PI3K sinyal yolağını inhibe etmesidir (Miled ve ark., 2007; Yu ve ark. 1998). Bununla birlikte, p85'in ekspresyonu dışında belirlenen birkaç p85 mutasyonların da p110'un inhibisyonuna ve PI3K'na bağlı onkogenezin aktivasyonuna sebep oldukları gösterilmiştir (Cancer Genome Atlas Research, 2008; Jimenez ve ark., 1998). Yang ve ark. (2016) yüksek PIK3R1 ekspresyon seviyesinin zayıf sağkalım durumuyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu yüksek PIK3R1 ekspresyon durumunun zayıf prognozlu hastalarda bir marker olabileceğini belirtmişlerdir. Chen ve ark. (2017) p85α (PIK3R1) eskpresyonunun meme kanser dokusunda azaldığını, tümör mikroçevresini modifiye ederek malignant progresyonu ve meme tümörogenezisi regüle ettiğini bildirmişlerdir. p85'in p110'un stabilizasyonunu ve onun katalitik aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir (Araújo ve ark., 2014). Uchino ve ark. (2010) ise PIK3R1'in MDA-MB-231 hücre hatlarında anlamlı derecede downregüle olduğu ve metastaz gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise PIK3R1'in downregülasyon durumunun meme kanserde bağımsız bir prognoztik marker olabileceğini rapor etmişlerdir (Cizkova ve ark., 2013). Cizkova ve ark. (2013) analiz ettikleri örneklerin 283 (%61.8)'inde PIK3R1 genin baskılanmış ekpresyon durum gösterdiğini saptamışlardır. Bununla birlikte, PIK3R1 genin HR-/ERBB2- ve HR-/ERBB2+ olan tümörlerde çoğunlukla underekseprese olduğunu rapor etmişlerdir.

Palimaru ve ark. (2013) PTEN ve PIK3CA mRNA ekspresyonunu araştırmışlardır ve meme kanser örneklerinde yüksek eksprese olduklarını göstermişlerdir. Fakat bu yüksek ekspresyon durumunun lenf nod metastazla korelasyon göstermediğini ifade etmişlerdir. Yndestad ve ark.

(2017) yüksek intratümoral PTEN gen ekspresyonu TP53 geni wild tip lokal meme kanser gelişimi olan hastalarda zayıf prognozla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Xu ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları bir meta-analiz sonuçlarına göre, PTEN ekspresyonunun azaldığı ve ER/PR negatif, aksillar nod metastaz drumla anlamlı bir ilişki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca düşük PTEN ekspresyon durumunun zayıf prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bir başka çalışmada ise ER (+) metastatik meme karsinomalarında örneklerin %84.6'sında PTEN ekspresyonunda kayıp olduğu rapor edilmiştir (Bajpai ve ark., 2017). Gschwantler-Kaulich ve ark. (2017) HER2 aşırı eksprese olan metastatik meme kanserde trastuzumaba dayalı tedaviye yanıtta bir prediktör olabileceğini rapor etmişlerdir. Koo ve ark. (2015) düşük PTEN gen ekspresyon durumuyla zayıf kemoterapi yanıtla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, Zhou ve ark. (2003) ise lösemi hücrelerinde PTEN geni ekspresyon kaybıyla ilaç direnci arasında bir ilişki olduğu belitrilmiştir.

Chen ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada ilaç direnci özelliği gösteren MCF-7/ADR meme kanser hücre hattında SALL4'ün upregüle olduğunu ifade etmişlerdir. Bu yüzden SALL4'ün meme kanserde tedavide potansiyel bir hedef molekül olabileceğini söylemişlerdir. Kilic ve ekibi de 2016 yılındaki yaptıkları çalışmada SALL4'ün 347 meme kanser örneğinde ekspresyonunu göremediklerini rapor etmişlerdir. Yue ve ark. (2015) meme kanser dokusunda yüksek stoplazmik SALL4 eskpresyon profili yakalamışlardır. Bu yüksek stoplazmik SALL4 ekspresyonun tümör invazyonu, lenf nod durumu, ER, PR, HER2 ve TNBC'le istatiksel olarak anlamlı bir ilişki sergilediğini saptamışlardır. Itou ve ark. ise 2013'te yaptıkları çalışmada SALL4'ün bazal benzeri meme kanser örneklerinde hücre dağılımını CDH1 eskpresyonunu baskılayarak gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. Kobayashi ve ark. (2011) SALL4 ekspresyonu meme kanserde %86.1 (31/36) olarak göstermişlerdir ve bu ekspresyonun erken safha meme kanser gelişimi için gerekli olabileceğini vurgulamışlardır.

Sonuç olarak; meme kanserinde önemli olan bu aday genlerin genetik (mutasyon/ekspresyon analizleri gibi) ve epigenetik (metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon gibi) mekanizmalarının ve önemli sinyal yolaklarındaki profillerinin yeni nesil analiz yöntemleri kullanılarak çıkarılması gelecekte hedefe yönelik tanı ve tedavi stratejilerinin ortaya çıkmasına imkan sağlıyacaktır. Bu yüzden elde edilen verilerin, başka geniş hasta popülasyonlarında denenmesi ve klinik verilerle doğrulanması elde edilen bulguların istenen amaçlara ulaşması için çok değerli olacaktır.

8. KAYNAKLAR

Araújo TG, Paiva CE, Rocha RM, Maia YC, Sena AA, Ueira-Vieira C, Carneiro AP, Almeida JF, de Faria PR, Santos DW, et al. A novel highly reactive Fab antibody for breast cancer tissue diagnostics and staging also discriminates a subset of good prognostic triple-negative breast cancers. Cancer Lett. 2014;343:275-285.

Arsenic R, Treue D, Lehmann A, Hummel M, Dietel M, Denkert C, Budczies J. Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer. BMC Clin Pathol. 2015;15:20.

Andrés-Pons A, Gil A, Oliver MD, Sotelo NS, Pulido R: Cytoplasmic p27 Kip1 counteract sthepro-apoptotic function of the open conformation of PTEN by retention and destabilization of PTEN outside of the nucleus. Cell Signal. 2012;24: 577-587.

Aydıner A, Topuz E. Meme Kanseri, Tanı-Tedavi-Takip. İstanbul Konsensusu. P.6, 2006. Nobel Tıp Kitabevleri.

Abdulrahman GO, Rahman GA. Epidemiology of breast cancer in Europe and Africa. J Cancer Epidemiol. 2012:5.

Aguila J, Liao W, Yang J, Avila C, Hagag N, Senzel L, Ma Y (2011) SALL4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells. Blood. 2011; 118:576-585

Attardi LD, Jacks T. The role of p53 in tumour suppression: Lessons from mouse models. Cell Mol Life Sci 1999;55: 48-63.

American Cancer Society. (2012a) Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society.

American Association for Cancer Research. Dec. 6, 2012. Hypofractionated Radiotherapy Was Safe, Effective for Early Breast Cancer Treatment at 10-year Follow-up. Retrieved December 14, 2012 from http://www.aacr.org/home/public--media/aacr-press-releases.aspx?d=2995.

Bertheau P, Plassa F, Espié M, Turpin E, de Roquancourt A, Marty M, et al. Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high-dose chemotherapy Lancet. 2002; 360 (2002), 852-854.

Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirot B, Porcher R, Turpin E, Plassa LF, de Roquancourt A, Bourstyn E, de Cremoux P, Janin A, Giacchetti S, Espié M, de Thé H. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. Breast. 2013;22 (2):S27-9.

Becze E. An Update on Breast Cancer Biomarkers, Clinical Journal of Oncology Nursing. 2011. Retrieved from: http://www.onsconnect.org/2011/02/5min/an-update-on-breast-cancer-biomarkers.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragmentlength polymorphisms. Am J Hum Genet. 1980; 32: 314-331.

Berns EM, Foekens JA, Vossen R, Look MP, Devilee P, Henzen- Logmans SC, van Staveren IL, van Putten WL, Inganas M, Meijer-van Gelder ME, Cornelisse C, Claassen CJ, Portengen H, Bakker B, Klijn JG. Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. Cancer Res. 2000; 60:2155-2162.

Bajpai J, Ramaswamy A, Chandrasekharan A, Mishra S, Shet T, Gupta S, Badwe RA. Activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt/mechanistic target of rapamycin pathway and response to everolimus in endocrine receptor-positive metastatic breast cancer-A retrospective pilot analysis and viewpoint. South Asian J Cancer. 2017 ;6(3):102-105.

Bard JD., Gelebart P, Amin HM., Young LC, Ma Y, Lai R. Signal transducer and activator of transcription 3 is a transcriptional factor regulating the gene expression of SALL4. FASEB J. 2009;23, 1405-1414.

Bhallal K, Raol R, Sharmal P, Das Guptal S, Chauhan L, Stecklein S, Fiskus W. Treatment with Histone Deacetylase Inhibitors Creates BRCAness and Sensitizes Human Triple Negative Breast Cancer Cells to PARP Inhibitors and Cisplatin, abstract 3-7. 2012 CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium.

Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. Nat Genet. 2008; 40:499–507

Belda E, Sentandreu V, Silva FJ. Identification and separation of PCR products based on their GC content by denaturing high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B. 2004; 811:263-268.

Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: News from the mutant p53 field. Nat Rev Cancer. 2009;9: 701-713.

Bailey ST, Shin H, Westerling T, Liu XS, Brown M. Estrogen receptor prevents p53-dependent apoptosis in breast cancer Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109:18060-18065.

Bishop C. Biomarkers in Breast Cancer. Journal of Advanced Practitioner Oncology. 2011;2(2),101-110.

Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Benedetti Panici P, Mancuso S, Neri G and Testa JR. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. Int. J. Cancer. 1995; 64, 280-285.

Bader AG, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2006;3: 1475e1479.

Bertheau P, Turpin E, Rickman DS, Espié M, de Reyniès A, Feugeas JP, et al. Exquisite sensitivity of TP53 mutant and basal breast cancers to a dose-dense epirubicin-cyclophosphamide regimen PLoS Medicine. 2007;4: e90.

Bernichon E, Vallard A, Wang Q, Attignon V, Pissaloux D, Bachelot T, Heudel PE, Ray-Coquard I, Bonnet E, de la Fouchardière A, Faure C, Chopin N, Beurrier F, Racadot S, Sunyach MP, Rancoule C, Perol D, Corset V, Agrapart V, Tinquaut F, Blay JY, Magné N, Genomic alterations and radioresistance in breast cancer: an analysis of the ProfiLER protocol. Trédan O. Ann Oncol. 2017 Sep 1. doi: 10.1093/annonc/mdx488.

Benistant C, Chapuis H and Roche S. A specific function for phosphatidylinositol 3-kinase alpha (p85alpha-p110alpha) in cell survival and for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in de novo DNA synthesis of human colon carcinoma cells. Oncogene. 2000; 19, 5083-5090.

Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. N Engl J Med. 2007; 356(3):227-36.

Bruening W et al (2012) Noninvasive diagnostic tests for breast abnomalities, vol 47, Comparative effectiveness reviews. Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville.

Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. Epidemiol Rev. 1993;15(1):48–65

Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. J Clin Invest. 1999;104(3):263-9.

Cantley LC and Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway.Proc. Natl Acad Sci USA. 1999; 96:4240-4245.

Chen YY, Li ZZ, Ye YY, Xu F, Niu RJ, Zhang HC, Zhang YJ, Liu YB, Han BS. Knockdown of SALL4 inhibits the proliferation and reverses the resistance of MCF-7/ADR cells to doxorubicin hydrochloride. BMC Mol Biol. 2016;2(17):6.

Chlebowski RT, Chen Z, Anderson GL, et al. Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome. J Natl Cancer Inst. 2005;16;97(6):439-48.

Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 2008; 455: 1061-1068

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science (New York, N.Y.) 2002;296:1655-1657.

Chlebowski RT et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative randomized trial. JAMA. 2003; 289(24):3243-3253.

Cui W, Kong NR, Ma Y, Amin HM, Lai R, Chai L. Differential expression of the novel oncogene, SALL4, in lymphoma, plasma cell myeloma, and acute lymphoblastic leukemia. Mod Pathol. 2006; 19:1585-1592.

Chen Y, Zeng C, Zhan Y, Wang H, Jiang X, Li W. Aberrant low expression of p85α in stromal fibroblasts promotes breast cancer cell metastasis through exosome-mediated paracrine Wnt10b. Oncogene. 2017;36(33):4692-4705.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 2008;455:1061-8.

Cao D, Li J, Guo C, Allan R, Humphrey P. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. Am J Surg Pathol. 2009;33:1065-1077.

Cao D, Humphrey PA, Allan RW. SALL4 is a novel sensitive and specific marker for metastatic germ cell tumors, with particular utility in detection of metastatic yolk sac tumors. Cancer. 2009; 115:2640-2651.

Choi Y, Zhang J, Murga C, *et al*. PTEN, but not SHIP and SHIP2, suppresses the PI3K/Akt pathway and induces growth inhibition and apoptosis of myeloma cells. Oncogene. 2002;21: 5289-5300.

Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder PK, Baselga J, Rosen N: AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. Cancer Cell. 2011; 19:58-71.

Coradini D, Fornili M, Ambrogi F, Boracchi P, Biganzoli E. TP53 mutation, epithelial-mesenchymal transition, and stemlike features in breast cancer subtypes. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012;2012: 254085.

Chen Y, Zeng C, Zhan Y, Wang H, Jiang X, Li W. Aberrant low expression of p85α in stromal fibroblasts promotes breast cancer cell metastasis through exosome-mediated paracrine Wnt10b. Oncogene. 2017;36(33):4692-4705.

Ceylan S. Kolorektal Kanserlerde MACC1,MET ve NM23-H1 gen ekspresyonlarinin prognozla ilişkisi. (Danişman: Doç.Dr.Ersin ÖZTÜRK). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi uzmanlık tezi. 2015.

Chang CJ, Chao CH, Xia W, Yang JY, Xiong Y, Li CW, et al. p53 regulates epithelial emesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. Nature Cell Biology. 2011;13:317e23.

Chen C, Ma X, Zhong M, Yu Z. Extremely low-frequency electromagnetic fields exposure and female breast cancer risk: a meta-analysis based on 24,338 cases and 60,628 controls. Breast Cancer Res Treat. 2010;123(2):569-76.

Chrisanthar R, Knappskog S, Løkkevik E, Anker G, Østenstad B, Lundgren S, et al. Predictive and prognostic impact of TP53 mutations and MDM2 promoter genotype in primary breast cancer patients treated with epirubicin or paclitaxel
PLoS One. 2011; 6:e19249

COSMIC, Erişim tarihi: 20.01.2016

Cizkova, M. et al. PIK3R1 underexpression is an independent prognostic marker in breast cancer. BMC Cancer. 2013; 13: 545.

Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. Mol Cancer Ther. 2002;1(9):707-17.

Coutant C, Rouzier R, Qi Y, Lehmann-Che J, Bianchini G, Iwamoto T, et al. Distinct p53 gene signatures are needed to predict prognosis and response to chemotherapy in ER-positive and ER-negative breast cancers Clinical Cancer Research. 2011;17:2591-2601

Cizkova M, Vacher S, Meseure D, Trassard M, Susini A, Mlcuchova D, Callens C, Rouleau E, Spyratos F, Lidereau R, et al. PIK3R1 underexpression is an independent prognostic marker in breast cancer. BMC Cancer. 2013;13:545.

de Celis JF, Barrio R. Regulation and function of Spalt proteins during animal development. Int J Dev Biol. 2009; 53:1385-1398.

DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc Natl Acad Sci. 1979; 76: 2420-2424.

Dirican E. Meme kanserinde fosfatidilinositol-3-kinaz katalitik Alfa gen mutasyonları ile insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-5 ekspresyon düzeyinin ilişkisi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. M. Akkiprik) 2013.

Dirican E, Akkiprik M. Functional and clinical significance of SALL4 in breast cancer. Tumour Biol. 2016;37(9):11701-11709.

Dirican E, Akkiprik M, Özer A. Mutation distributions and clinical correlations of PIK3CA gene mutations in breast cancer.Tumour Biol. 2016;37(6):7033-45.

Dirican E, Akkiprik M. Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 and phosphatase and tensin homolog as therapeutic targets in breast cancer. Tumour Biol. 2017;39(3):1010428317695529.

Dirican E, Kaya Z, Gullu G, Peker I, Ozmen T, Gulluoglu BM, Kaya H, Ozer A, Akkiprik M. Detection of PIK3CA gene mutations with HRM analysis and association with IGFBP-5 expression levels in breast cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(21):9327-33.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature. 1992; 356: 215-221.

Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. Biochim Biophys Acta. 2010; 1804:433-439.

Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. Mod Pathol. 2001;14(7):672-6.

Dushkin, H. and Cristofanilli, M. (2011). Inflammatory Breast Cancer. Journal of the National Comprehensive cancer Network. 2011; 9(2), 233-241.

Dimri GP, Martinez JL and Jacobs JJ, et al: The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. Cancer Res. 2002; 62: 4736-4745.

Du G, Bian L, Wang T, Xu X, Zhang S, Guo Y, Zhuo J, Song S, Jiang Z.PTEN loss correlates withthe clinical efficacy of lapatinib in HER2 positive metastatic breast cancer with trastuzumab-resistance. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2015;95(28):2264-7.

Dirican E, Akkiprik M. Moleküler Tanıda Yüksek Çözünürlüklü Erime Yöntemi ve Klinik Önemi.Clin Exp Health Sci. 2017; 7: 20-26.

Dunlap J, Le C, Shukla A, Patterson J, Presnell A, Heinrich MC, Corless CL, Troxell ML. Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. Breast Cancer Res Treat. 2010; 120:409-418.

Dupont S, Jensen J, Laenkholm AV, Knoop A, Ewertz M, Bandaru R, Liu W, Hackl W, Barrett JC, Gardner H. PIK3CA mutations may be discordant between primary and corresponding metastatic disease in breast cancer. Clin Cancer Res. 2011; 17(4):667-677.

Dumay A, Feugeas J-P, Wittmer E, Lehmann-Che J, Bertheau P, Espié M, et al. Distinct TP53 mutants in breast cancers subgroups. International Journal of Cancer. 2013;132:1227e31.

Ellis MJ, Perou CM. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. Cancer Discovery. 2013;3:27e34.

Elling U, Klasen C, Eisenberger T, Anlag K, Treier M. Murine inner cell massderived lineages depend on Sall4 function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103:16319-16324.

Elledge RM and Allred DC: The p53 tumour suppressor gene in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 1994; 32: 39-47.

Engelman JA1, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. Nat Rev Genet. 2006;7(8):606-19.

Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. Nature. 1984; 312: 646-649.

Eliassen AH, Hankinson SE, Rosner B, Holmes MD, Willett WC. Physical activity and risk of breast cancer among postmenopausal women. Arch Intern Med. 2010;170(19):1758-64.

Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, Sahin AA, Hortobagyi GN, Yu D. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. Am. J. Pathol. 2010;177: 1647-1656.

Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. Br J Cancer. 2007; 97, 1139-1145

Fayaz S, Fard-Esfahani P, Torbati PM. Lack of CHEK2 gene mutations in differentiated thyroid carcinoma patients using high resolution melting analysis. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(12):5019-22.

Faurschou A, GniadeckiR, CalayD, Wulf HC. TNF-alphaimpairstheS-G2/M cell cycle check point and cyclobutan epyrimidine dimer repair in premalignants kin cells: role of the PI3K-Akt pathway. J Invest Dermatol. 2008;128: 2069-2077.

Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, Alix S, Baker SJ, Box G, Chuckowree IS, Clarke PA, Depledge P, Eccles SA, Friedman LS, Hayes A, Hancox TC, Kugendradas A, Lensun L, Moore P, Olivero AG, Pang J, Patel S, Pergl-Wilson GH, Raynaud FI, Robson A, Saghir N, Salphati L, Sohal S, Ultsch MH, Valenti M, Wallweber HJ, Wan NC, Wiesmann C, et al.: The identifi cation of 2-(1Hindazol- 4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4- yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. J Med Chem. 2008; 51:5522-5532.

Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. Genes Dev. 2012;26(12):1268-86.

Fu X, Osborne CK, Schiff R. Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/HER2-negative breast cancer. Breast. 2013;22(2):S12-8.

Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. Lancet Oncol. 2002; 3: 11-16.

Filipenko ML, Os'kina NA, Oskorbin IA, Mishukova OV, Ovchinnikova LK, Gershtein ES, Kushlinskii NE. Association between the Prevalence of Somatic Mutations in PIK3CA Gene in Tumors and Clinical and Morphological Characteristics of Breast Cancer Patients. Bull Exp Biol Med. 2017;163(2):250-254.

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. Annual review of biochemistry. 1998;67:481-507.

Fiskus W et al. Hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitors attenuate estrogen receptor-alpha levels and transcriptional activity: a result of hyperacetylation and inhibition of chaperone function of heat shock protein 90. Clin Cancer Res. 2007; 13(16):4882-4890.

Fox EM, Arteaga CL, Miller TW. Abrogating endocrine resistance by targeting ERalpha and PI3K in breast cancer. Frontiers in oncology. 2012;2:145.

Fanning AS, Anderson JM. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. J Clin Invest. 1999;103(6):767-72.

Fong PC et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. N Engl J Med. 2009; 361(2):123-134.

Forghanifard MM, Moghbeli M, Raeisossadati R, Tavassoli A, Mallak AJ, Boroumand-Noughabi S, et al. Role of SALL4 in the progression and metastasis of colorectal cancer. Journal of biomedical science. 2013;20:6.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nature reviews Cancer. 2002;2(1):48-58.

Goldhirsch, A., Wood, W., Coates, A. Gelber, R. Thurlimannm B. Senn, H. et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Brest Cancer 2011. Annals of Oncology. 2011;22, 1736-1747.

Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N, Foulkes WD. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. Cancer Res. 2001; 61:4092-4097.

Gong Z, Hong CC, Bandera EV, et al. Vigorous physical activity and risk of breast cancer in the African American breast cancer epidemiology and risk consortium. Breast Cancer Res Treat. 2016;159(2):347-56.

Geisler S, Lønning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer Cancer Research. 2001; 61: 2505-2512.

Gold B. Origin and utility of the reverse dot-blot. Expert Rev Mol Diagn. 2003;3:143-152.
Gonzalez KD, Buzin CH, Noltner KA, Gu D, Li W, Malkin D et al. High frequency of de novo mutations in Li–Fraumeni syndrome. J Med Genet. 2009; 46(10):689-693.

Girardini JE, Napoli M, Piazza S, Rustighi A, Marotta C, Radaelli E, Capaci V, Jordan L, Quinlan P, Thompson A, et al. A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer. Cancer Cell. 2011; 20: 79-91.

Guo Y, Mantel C, Hromas RA, Broxmeyer HE. Oct-4 is critical for survival/ antiapoptosis of murine embryonic stem cells subjected to stress: effects associated with Stat3/survivin. Stem Cells. 2008; 26:30-34.

Greenlee RT, Hill-Harmon MD, Murry T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. CA Cancer J Clin. 2001;51:15.

Goldenberg O, Herrmann S, Marjoram G, Noyer-Weidner M, Hong G, Bereswill S, Gobel UB. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. J. Microbiol. Methods. 2007;68:94-105.

Gschwantler-Kaulich D, Tan YY, Fuchs EM, Hudelist G, Köstler WJ, Reiner A, Leser C, Salama M, Attems J, Deutschmann C, Zielinski CC, Singer CF. PTEN expression as a predictor for the response to trastuzumab-based therapy in Her-2 overexpressing metastatic breast cancer. PLoS One. 2017;12(3):e0172911.

Guenel P, Raskmark P, Andersen J, et al. Incidence of cancer in persons with occupational exposure to electromagnetic fields in Denmark. Br J Industr Med. 1993;50:758-64.

Gikas PD, Mansfield L, Mokbel K. Do underarm cosmetics cause breast cancer? Int J Fertil Womens Med. 2004; 49:212-4.

Gonzalez-Bosquet J, Calcei J, Wei JS, Garcia-Closas M, Sherman ME, Hewitt S, Vockley J, Lissowska J, Yang HP, Khan J, Chanock S. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers. PLoS One. 2011;6(1):e14522.

Goldhirsch A, Wood W, Coates A, Gelber R, Thurlimannm B, Senn H., et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Brest Cancer 2011. Annals of Oncology. 2011;22:1736-1747.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC ve Gelbart WM (1996). An Introduction to Genetic Analysis. 6th Ed., W.H. Freeman and Company, 916, New York

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery, Nat. Rev., Drug Discov. 2005;4: 988-1004.

Han S, Ritzenthaler JD, Zheng Y, Roman J. PPAR beta/delta agonist stimulates human lung carcinoma cell growth through inhibition of PTEN expression: the involvement of PI3K and NF-kappa B signals. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008; 294: L1238-L1249.

Hobert JA, Eng C. PTEN hamartoma syndrome: an overervieiew. Genet Med. 2009;11(10):687-94.

Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al. for the Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 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. 2002;87(11):1234-45.

Harris J, Lippman M, Veronesi U, et al. Breast Cancer (3 parts). N Engl J Med. 1992:327:319-479.

Habano W, Sugai T, Jiao YF, Nakamura SI. Novel approach for detecting global epigenetic alterations associated with tumor cell aneuploidy. Int J Cancer. 2007;121:1487-1493.

Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, et al. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. JAMA. 1997;278: 1407-11.

Haupt S, di Agostino S, Mizrahi I, Alsheich-Bartok O, Voorhoeve M, Damalas A, Blandino G, Haupt Y. 2009. Promyelocytic leukemia protein is required for gain of function by mutant p53. Cancer Res. 2009; 69: 4818-4826.

Ho GH, Calvano JE, Bisogna M, Borgen PI, Rosen PP, Tan LK, Van Zee KJ. 2000. In microdissected ductal carcinoma in situ, HER-2/neu amplification, but not p53 mutation, is associated with high nuclear grade and comedo histology. Cancer. 2000; 89:2153-2160.

Hosoda M, Yamamoto M, Nakano K, Hatanaka KC, Takakuwa E, Hatanaka Y, et al. Differential expression of progesterone receptor, FOXA1, GATA3, and p53 between pre‐ and postmenopausal women with estrogen receptor‐positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2014;144:249‐61.

Hupfeld T, Chapuy B, Schrader V, Beutler M, Veltkamp C, Koch R, et al. Tyrosinekinase inhibition facilitates cooperation of transcription factor SALL4 and ABC transporter A3 towards intrinsic CML cell drug resistance. British journal of haematology. 2013;161(2):204–13.

Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, Miyama K, Taguchi S, Tsujioka K, Ueno Y, Hatch H, Majumder PK, Pan BS, Kotani H: MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor effi cacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther. 2010; 9:1956-1967.

Herschkowitz JI, Zhao W, Zhang M, Usary J, Murrow G, Edwards D, et al. Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109:2778e83

Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S, Leiserson MD, Niu B, McLellan MD, Uzunangelov V, Zhang J, Kandoth C, Akbani R, Shen H, Omberg L, Chu A, Margolin AA, Van't Veer LJ, Lopez-Bigas N, Laird PW, Raphael BJ, Ding L, Robertson AG, Byers LA, Mills GB, Weinstein JN, Van Waes C, Chen Z, Collisson EA, Network CGAR, Benz CC, Perou CM, Stuart JM. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. Cell. 2014; 158(4):929-944

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery Nat Rev Drug Discov. 2005;4(12):988-1004.

Heikkinen S, Koskenvuo M, Malila N, Sarkeala T, Pukkala E, Pitkäniemi J. Use of exogenous hormones and the risk of breast cancer: results from self-reported survey data with validity assessment. Cancer Causes Control. 2016;27(2):249-58.

Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. J Biol Chem. 2001; 276(40):36869-36872.

Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, Bartsch H, Wang ZQZQ and Hainaut P: New approaches to understanding p53 gene tumour mutation spectra. Mutat Res. 1999; 31:199-209.

Harlé A, Lion M, Lozano N, Husson M, Harter V, Genin P, Merlin JL. Analysis of PIK3CA exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: correlation with clinicopathological criteria. Oncol Rep. 2013;29(3):1043-52.

Huang XP, Hou J, Shen XY, Huang CY, Zhang XH, Xie YA, Luo XL. MicroRNA-486-5p, which is downregulated in hepatocellular carcinoma, suppresses tumor growth by targeting PIK3R1. FEBS J. 2015;282(3):579-94.

Huang Y, Gao S, Wu S, Song P, Sun X, Hu X, Zhang S, Yu Y, Zhu J, Li C, Qin Z, Xie L, Yao Q, Tang A, Li Z, Guo G, Wan S, Dong P, Sun L, Li W, Wang D, Gui Y, Yang H, Zhou F, Zhang X, Cai Z. Multilayered molecular profiling supported themonoclonal origin of metastatic renal cell carcinoma. Int J Cancer. 2014; 135, 78-87.

Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods Appl. 1991;1:34-38.

Inoue Y, Iemura S, Natsume T, Miyazawa K, Imamura T. Suppression of p53 activity through the cooperative action of Ski and histone deacetylase SIRT1. J Biol Chem. 2011;286(8):6311-20.

Isfahani BN, Tavakoli A, Salehi M, Tazhibi M. Detection of rifampin resistance patterns in Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Iran by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism and direct sequencing methods. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2006;101:597-602.

Ikenoue, T., Kanai, F., Hikiba, Y., Obata, T., Tanaka, Y., Imamura, J., et al. Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. Cancer Res. 2005;65, 4562e4567.

Itou J, Matsumoto Y, Yoshikawa K, Toi M. Sal-like 4 (SALL4) suppresses CDH1 expression and maintains cell dispersion in basal-like breastcancer. FEBS Lett. 2013;587(18):3115-21.

Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, Pearline RV, et al. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. Cancer Res. 2005;65(23):10992-1000.

Jia S, Roberts TM, Zhao JJ: Should individual PI3 kinase isoforms be targeted in cancer? Curr Opin Cell Biol. 2009; 21:199-208.
Jancin B. Diabetes confers 27% increase in breast cancer risk.OncologyPractice.com. Retrieved December 26, 1012 from www.oncologypractice.com

Jimenez C, Jones DR, Rodríguez-Viciana P, Gonzalez-García A, Leonardo E, Wennström S, von Kobbe C, Toran JL, R-Borlado L, Calvo V, Copin SG, Albar JP, Gaspar ML, Diez E, Marcos MA, Downward J, Martinez-A C, Mérida I, Carrera AC. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. EMBO J. 1998; 17: 743-753.

Koo DH, Lee HJ, Ahn JH, Yoon DH, Kim SB, Gong G, Son BH, Ahn SH, Jung KH. Tau and PTEN status as predictive markers for response to trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-positive breast cancer. Tumour Biol. 2015;36(8):5865-71.

Kozlowski P, Krzyzosiak WJ. Economical protocol for combined single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis on a standard capillary electrophoresis apparatus. Methods Mol Biol. 2010;653:181-92

Knobbe CB, Merlo A and Reifenberger G: Ptensignaling in gliomas. Neuro Oncol. 2002; 4: 196-211.

Kalinsky K, Heguy A, Bhanot UK, Patil S, Moynahan ME: PIK3CA mutations rarely demonstrate genotypic intratumoral heterogeneity and are selected for in breast cancer progression. Breast Cancer Res Treat. 2011; 129:635-643.

Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C et al. Mutational landscape and signifcance across 12 major cancer types. Nature. 2013; 502(7471):333-339.

Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3- kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102, 802e807.

Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H, Loukopoulos P, Kanai Y, Kosuge T, Fukayama M, Kondo T, Sakamoto M, Hosoda F, Ohki M, Imoto I, Inazawa J and Hirohashi S. Genetic profile of hepatocellular carcinoma revealed by array-based comparative genomic hybridization: identification of genetic indicators to predict patient outcome. J Hepatol. 2005; 43: 863-874.

Kilic E, Tennstedt P, Högner A, Lebok P, Sauter G, Bokemeyer C, Izbicki JR, Wilczak W. The zinc-finger transcription factor SALL4 is frequently expressed in human cancers: association with clinical outcome in squamous cell carcinoma but not in adenocarcinoma of the esophagus. Virchows Arch. 2016;468(4):483-92.

Kobayashi D, Kuribayshi K, Tanaka M, Watanabe N. SALL4 is essential for cancer cell proliferation and is overexpressed at early clinical stages in breast cancer. Int J Oncol. 2011;38(4):933-9.

Kreeger PK, Lauffenburger DA. Cancer systems biology: a network modeling perspective. Carcinogenesis. 2010; 31(1):2-8.

Klug SW, Cummings WR. Concept of Genetics, Prentice Hall, New Jersey. 2000; 745

Kokubo Y, Gemma A, Noro R, Seike M, Kataoka K, Matsuda K, Okano T, Minegishi Y, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S. Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA). Br J Cancer. 2005; 92, 1711-1719.

Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlbock M, Gnant M, Steger G, Jakesz R. TP53 mutation and p53

overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. Clin Cancer Res. 2000; 6:50-56.

Kastan MB, Berkovich E. p53: a two-faced cancer gene. Nat Cell Biol. 2007;9(5):489-91.

Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N. Overexpression of SALL4 in lung cancer and its importance in cell proliferation. Oncol Rep. 2011; 26:965-970

Kohlhase J, Altmann M, Archangelo L, Dixkens C, Engel W. Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of msal-2. Mamm Genome. 2000; 11:64-68.
Kiefer SM, Ohlemiller KK, Yang J, McDill BW, Kohlhase J, Rauchman M. Expression of a truncated Sall1 transcriptional repressor is responsible for Townes-Brocks syndrome birth defects. Hum Mol Genet. 2003;12(17):2221-7.

Kasajova P, Holubekova V, Mendelova A, Lasabova Z, Zubor P, Kudela E, Biskupska-Bodova K, Danko J. Active cigarette smoking and the risk of breast cancer at the level of N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms. Tumour Biol. 2016;37(6):7929-37.

Li SY, Rong M, Grieu F, Iacopetta B. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. Breast Cancer Res Treat. 2006; 96(1):91–95 40.

Lopez GH, Mcbean RS, Wilson B, Irwin DL, Liew YW, Hyland CA, Flower RL. Molecular typing for the Indian blood group associated 252G>C single nucleotide polymorphism in a selected cohort of Australian blood donors. Blood Transfus. 2015;13(1):78-85.

Lu Y, Lemon W, Liu PY, Yi Y, Morrison C, Yang P, Sun Z, Szoke J, Gerald WL, Watson M, Govindan R, You M. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. PLoS Med. 2006;3:e467.

Li FP, Fraumeni JF Jr. (1969a). Rhabdomyosarcoma in children: Epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. J Natl Cancer Inst. 1969; 43: 1365-1373.

Li FP, Fraumeni JF Jr. (1969b). Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? Ann Intern Med. 1969; 71: 747-752.

Li L, Plummer SJ, Thompson CL, Tucker TC, Casey G. Association between phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit p85alpha Met326Ile genetic polymorphism and colon cancer risk. Clin Cancer Res. 2008;14(3):633-7.

Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat. Genet. 1997; 16: 64-67.

Liao S, et al. The molecular landscape of premenopausal breast cancer. Breast cancer research: BCR. 2015; 7;17:104.

Lee JS, Kim HS, Kim YB, Lee MC, Park CS, Min KW. Reduced PTEN expression is associated with poor outcome and angiogenesis in invasive ductal carcinoma of the breast. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2004;12(3):205-10.

Lee JS, Heo J, Libbrecht L, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. Nat Med. 2006; 12:410-416.

Loi S, Haibe-Kains B, Majjaj S, Lallemand F, Durbecq V, Larsimont D, et al. PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:10208-13.

Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. Nat Rev Cancer. 2009; 9: 749-758.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. J Natl Cancer Inst. 1969a;43(6):1365-73.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome Ann Intern Med. 1969b;;71(4):747-52.

Lay MJ, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. Clin Chem. 1997;43(12):2262-7.

Lee DSC, Yoon S-Y, Looi LM, Kang P, Kang IN, Sivanandan K et al. Comparable frequency of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutations in a multi-ethnic Asian cohort suggests TP53 screening should be ofered together with BRCA1/2 screening to early-onset breast cancer patients. Breast Cancer Res BCR. 2012;14(2):R66.

Lehmann-Che J, André F, Desmedt C, Mazouni C, Giacchetti S, Turpin E, Espié M, Plassa LF, Marty M, Bertheau P, Sotiriou C, Piccart M, Symmans WF, Pusztai L, de Thé H. Cyclophosphamide dose intensification may circumvent anthracycline resistance of p53 mutant breast cancers. Oncologist. 2010;15(3):246-52.

Lee YR, Yu HN, Noh EM, *et al*: Peroxisomeproliferator-activated receptor gamma andretinoicacid receptor synergistically up-regulate the tumor suppressor PTEN inhumanpromyeloidleukemiacells. Int J Hematol. 2007; 85: 231-237.

Lu Y, Lemon W, Liu PY, Yi Y, Morrison C, Yang P, Sun Z, Szoke J, Gerald WL, Watson M, Govindan R, You M. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. PLoS Med. 2006;3(12):e467.

Li L, Plummer SJ, Thompson CL, Tucker TC, Casey G. Association between phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit p85alpha Met326Ile genetic polymorphism and colon cancer risk. Clin Cancer Res. 2008; 14, 633-7.

Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association.Pavletich Cell. 1999; 99:323-334.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature. 1979; 278: 261-263.

Liu P, Cheng H, Santiago S, Raeder M, Zhang F, Isabella A, Yang J, Semaan DJ, Chen C, Fox EA, Gray NS, Monahan J, Schlegel R, Beroukhim R, Mills GB, Zhao JJ. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. Nat Med. 2011; 17:1116-1120.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell. 1979; 17: 43-52.

Lane DP, Brown CJ, Verma C, Cheok CF. New insights into p53 based therapy. Discov Med 2011;12:107‑17

Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, Ellis P, Harris A, Bergh J, Foekens JA, Klijn JG, Larsimont D, Buyse M, Bontempi G, Delorenzi M, Piccart MJ, Sotiriou C. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. J Clin Oncol. 2007;25:1239-1246.

Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, *et al*: A cancer family syndrome in twenty-four kind reds. Cancer Res. 1988; 48: 5358-5362.

Morgan TM, Koreckij TD and Corey E. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. Curr Cancer Drug Targets. 2009;9:237-249.

Mouchawar J, Korch C, Byers T, Pitts TM, Li E, McCredie MRE et al. Population-based estimate of the contribution of TP53 mutations to subgroups of early-onset breast cancer: Australian breast cancer family study. Cancer Res. 2010; 70(12):4795-4800.

Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Backer JM, Williams RL.Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. Science. 2007; 317:239-42.

Melhem-Bertrandt A, Bojadzieva J, Ready KJ, Obeid E, Liu DD, Gutierrez-Barrera AM et al. Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. Cancer. 2012; 118(4):908-913.

Mirick DK, Davis S and Thomas DB. Antiperspirant use and the risk of breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2002;94:1578-80.

Manfredi JJ. The Mdm2–p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. Genes Dev. 2010; 24: 1580-1589.

Masciari S, Dillon DA, Rath M, Robson M, Weitzel JN, Balmana J et al. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li Fraumeni syndrome consortium efort. Breast Cancer Res Treat. 2012; 133(3):1125-1130.

Mueller S, Phillips J, Onar-ThomasA, *et al*: PTEN promotermethylationandactivationof thePI3K/Akt/mTOR pathwayin pediatric gliomas and influence on clinical outcome. Neuro Oncol. 2012; 14: 1146-1152.

Ma Y, Cui W, Yang J, Qu J, Di C, Amin HM, Lai R, Ritz J, Krause DS, Chai L. SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. Blood. 2006;108(8):2726-35.

Miron A, Varadi M, Carrasco D, Li H, Luongo L, Kim HJ, Park SY, Cho EY, Lewis G, Kehoe S, Iglehart JD, Dillon D, Allred DC, Macconaill L, Gelman R, Polyak K. PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas. Cancer Res. 2010; 70(14):5674- 5678.

McCuaig JM, Armel SR, Novokmet A, Ginsburg OM, Demsky R, Narod SA et al. Routine TP53 testing for breast cancer under age 30: ready for prime time? Fam Cancer. 2012; 11(4):607-613

Miller M, Zorn J, Brielmeier M. High-Resolution Melting Curve Analysis for Identification of Pasteurellaceae Species in Experimental Animal Facilities. PLoS One. 2015;10(11):e0142560.

Milanovich S, Peterson J, Allred J, Stelloh C, Rajasekaran K, Fisher J, Duncan S, Malarkannan S, Rao S. Sall4 overexpression blocks murine hematopoiesis in a dose-dependent manner. Exp Hematol. 2015;43(1):53-64.e1-8

Ma F, Zhang J, Zhong L, Wang L, Liu Y, Wang Y, Peng L, Guo B. Upregulated microRNA-301a in breast cancer promotes tumor metastasis by targeting PTEN and activating Wnt/β-catenin signaling.Gene. 2014;535(2):191-7.

Ma Y, Cui W, Yang J, Qu J, Di C, Amin HM, Lai R, Rit J, Krause DS, Chai L. SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. Blood. 2006; 108,2726-2735.

Marine JC, Lozano G. 2010. Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. Cell Death Differ. 2010;17: 93-102.

Marine JC, Dyer MA, Jochemsen AG. MDMX: From bench to bedside. J Cell Sci. 2007; 120: 371-378.

Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. Cell Death Differ. 2006;13(6):927-34.

Maxwell KN, Nathanson KL. Common breast cancer risk variants in the post-COGS era: a comprehensive review. Breast Cancer Res. 2013; 15(6):212

Meyer DS, Brinkhaus H, Muller U, Muller M, Cardiff RD, Bentires-Alj M: Luminal expression of PIK3CA mutant H1047R in the mammary gland induces heterogeneous tumors. Cancer Res. 2011; 71:4344-4351.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science. 1990; 250: 1233-1238.

Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, García-Echeverría C. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. Mol Cancer Ther. 2008;7(7):1851-63.

Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. Breast Cancer Res. 2011; 13:224.

Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. Cancer Cell. 2004; 6, 117-127.

Network CGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2012;49:61-70.

National Cancer Institute. SEER stat fact sheets: breast. http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html. Erişim tarihi:16.01. 2013.

Nedelcheva KV, Andersen TI, Erikstein B, Geitvik G, Skovlund E, Nesland JM, Borresen-Dale AL. Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. Pharmacogenetics. 1998; 8:441-447.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature. 1989; 342: 705-707.

Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H, et al. Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukaemia. Eur J Haematol. 2000; 65: 23-31.

Oikawa T, Kamiya A, Zeniya M, Chikada H, Hyuck AD, Yamazaki Y, et al. Sal-like protein 4 (SALL4), a stem cell biomarker in liver cancers. Hepatology. 2013;57(4):1469-83.

Oikawa T, Kamiya A, Kakinuma S, et al. Sall4 regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/ progenitor cells. Gastroenterology. 2009;136:1000-1011.

Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA-sequencing by denaturing high-performance liquid-chromatography (DHPLC). Am. J. Hum. Genet. 1995;57:1547.

Oefner PJ, Underhill PA. DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). Supplement 19. Wiley-Interscience, New York, NY. 1999.

Oda K, Okada J, Timmerman L, Rodriguez-Viciana P, Stokoe D, Shoji K, Taketani Y, Kuramoto H, Knight ZA, Shokat KM, McCormick F. PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to eff ect oncogenic transformation. Cancer Res. 2008; 68:8127-8136.

OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®) 2013

Özkara HA. Mutasyon Tarama Yöntemleri.Türk Klinik Biyokimya Derg. 2003;1:47-53.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. Hum Mutat. 2002;19(6):607-14.

Pan L, LuJ, Wang X, *et al*: Histone deacetylase inhibitor trichostatin apotentiates doxorubicin-induced apoptosis by up-regulating PTEN expression. Cancer. 2007; 109: 1676-1688.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen‐Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene 2007;26:2157‐65.

Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. Br J Cancer. 1999; 80:1968-1973.

Panis C, Pizzatti L, Herrera AC, Cecchini R, Abdelhay, E. Putative circulating markers of the early and advanced stages of breast cancer identified by high-resolution label-free proteomics. Cancer Lett. 2013; 330, 57-66.

Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. Nature. 1984; 312: 649-651.

Phillips WA, St Clair F, Munday AD, Thomas RJ and Mitchell CA. Increased levels of phosphatidylinositol 3-kinase activity in colorectal tumors. Cancer. 1998; 83, 41–47.

Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: Partners in life and death. Nat Rev Cancer. 2009; 9: 738-748.

Palimaru I, Brügmann A, Wium-Andersen MK, Nexo E, Sorensen BS. Expression of PIK3CA, PTEN mRNA and PIK3CA mutations in primary breast cancer: association with lymph node metastases. Springerplus. 2013;2:464.

Perez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjold B, Rutqvist LE, Skoog L, Stal O. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. Clin Cancer Res. 2007; 13:3577-3584.

Poyurovsky MV, Prives C. Unleashing the power of p53: Lessons from mice and men. Genes Dev. 2006;20: 125-131.

Park YH, Jung HA, Choi MK, Chang W, Choi YL, Do IG, Ahn JS, Im YH. Role of HER3 expression and PTEN loss in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer (MBC) who received taxane plus trastuzumab treatment. Br J Cancer. 2014;110(2):384-91.

Patterson H, Gill S, Fisher C, et al: Abnormalities of the p53 MDM2 and DCC genes in human leiomyosarcomas. Br J Cancer. 1994; 69: 1052-1058.

Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, Thomas RJ, Phillips WA. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85 alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. Cancer Res. 2001; 61, 7426-9.

Petrella BL, Brinckerhoff CE. PTEN suppression of YY1 induces HIF-2 activity in von-Hippel-Lindau-null renal-cell carcinoma. Cancer Biol Ther. 2009;8:1389-1401.

Putnik M, Brodin D, Wojdacz TK, Fagerström-Billai F, Dahlman-Wright K, Wallberg AE. The transcriptional coregulator MAML1 affects DNA methylation and gene expression patterns in human embryonic kidney cells. Mol Biol Rep. 2016;43(3):141-150.

Philip AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, et al. The phosphatidylinositol 3′-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. Cancer Res. 2001;61:7426-9.

Papadopoulou E, Tsoulos N, Tsirigoti A, Apessos A, Agiannitopoulos K, Metaxa-Mariatou V, Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Kasarakis D, Kakolyris S, Dahabreh J, Vlastos F, Zoublios C, Rapti A, Papageorgiou NG, Veldekis D, Gaga M, Aravantinos G, Karavasilis V, Karagiannidis N, Nasioulas G. Determination of *EGFR* and *KRAS* mutational status in Greek non-small-cell lung cancer patients. Oncol Lett. 2015;10(4):2176-2184.

Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, Cymbalista F, Eichhorst B, Hallek M, Döhner H, Hillmen P, van Oers M, Gribben J, Ghia P, Montserrat E, Stilgenbauer S, Zenz T; European Research Initiative on CLL (ERIC). ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2012;26(7):1458-61.

Perez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjold B, Rutqvist LE Skoog L, Stål O. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. Clin Cancer Res. 2007; 13(12):3577-3584

Pfaffl Michael W. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29(9): E45.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem. 1997;245(2):154-60.

Rao S, Zhen S, Roumiantsev S, McDonald LT, Yuan GC, Orkin SH. Differential roles of Sall4 isoforms in embryonic stem cell pluripotency. Mol Cell Biol. 2010; 30:5364-5380.

Radford DM, Zehnbauer BA. Inherited breast cancer. Surg Clin North Am. 1996; 76(2):205-220.

Ramirez-Ardila D, Timmermans AM, Helmijr JA, Martens JWM, Berns EMJJ, Jansen MPHM. Increased MAPK1/3 Phosphorylation in Luminal Breast Cancer Related with PIK3CA Hotspot Mutations and Prognosis. Transl Oncol. 2017;10(5):854-866.

Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. Am J Epidemiol. 1994; 139(8):819-835.

Rotter V. p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1983;80(9):2613-7.

Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. BMJ. 2007;335(7630):1134.

Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86:6230-6234.

Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancerprone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature. 1990; 348: 747-749.

Saal LH, Johansson P, Holm K, Gruvberger-Saal SK, She QB, Maurer M, Koujak S, Ferrando AA, Malmström P, Memeo L, Isola J, Bendahl PO, Rosen N, Hibshoosh H, Ringnér M, Borg A, Parsons R: Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:7564-7569.

Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmström PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. Cancer Res. 2005;65(7):2554-9.

Seigel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics for Hispanics/Latinos, 2012. CA A Cancer Journal for Clinicians. 2012; 62(5), 283-298.

Seigel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A, Smith, T. et al. Cancer Treatment and Survivorship Statistics. CA A Cancer Journal for Clinicians. 2012; 62(4), 220-242

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B and Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science. 2004;304 (5670):554.

Song H, Hollstein M, Xu Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. Nat Cell Biol. 2007; 9: 573-580.

Samuels Y, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, Delong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. Cancer Cell. 2005;7:561e573.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science 2004;304:554.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors Offsite Link," Proc Nat Acad Sci (USA). 1977; 74: 546-67.

Stirewalt DL, Kopecky KJKJ , Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL and Radich JP: FLT3, RAS and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukaemia. Blood. 2001; 97: 3589-3595.

Schon K, Tischkowitz M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. Breast Cancer Res Treat. 2017 Oct 16. doi: 10.1007/s10549-017-4531-y.

Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. Nat Genet. 1999;21(1):99-102.

Simko I. High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research. Trends Plant Sci. 2016;21(6):528-37.

Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science. 2006;314:268-74.

Starink TM, van der Veen JP, Arwert F, de Waal LP, Lange GG, Gille JJ, Eriksson AW: The Cowden disease: A clinical and genetic study in 21 patients. Clin Genet. 1986; 29:222-233.

Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. Adv Cancer Res. 2011;110:107-39.

Shen YH, Zhang L, Gan Y, *et al*: Up-regulationof PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosometen) mediatesp38 MAPK stresssignal-inducedinhibitionof insulinsignaling. A cross-talk betweenstresssignaling andinsulinsignaling inresistin-treatedhumanendothelial cells. J Biol Chem. 2006;281: 7727-7736.

Sümer H. Nokta Mutasyonlarinin Saptanmasinda Yüksek Çözünürlüklü Erime Tekniğinin Verim Ve Hassasiyetinin Değerlendirilmesi. 9;2008, Ankara

Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, Carey M, Hu Z, Guan Y, Sahin A, Symmans WF, Pusztai L, Nolden LK, Horlings H, Berns K, Hung MC, van de Vijver MJ, Valero V, Gray JW, Bernards R, Mills GB, Hennessy BT. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. Cancer Res. 2008;68(15):6084-91.

Shekar SC, Wu H, Fu Z, Yip SC, Nagajyothi, Cahill SM, Girvin ME, Backer JM. Mechanism of constitutive phosphoinositide 3-kinase activation by oncogenic mutants of the p85 regulatory subunit. J Biol Chem. 2005;280(30):27850-5

Sabine VS, Crozier C, Brookes CL, Drake C, Piper T, van de Velde CJ, Hasenburg A, Kieback DG, Markopoulos C, Dirix L, Seynaeve C, Rea DW, Bartlett JM. Mutational analysis of PI3K/AKT signaling pathway in tamoxifen exemestane adjuvant multinational

pathology study. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2014;32:2951-2958.

Saito T, Nishimura M, Yamasaki H, Kudo R. Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferention and myometrial invasion in endometrial carcinoma. Cancer. 2003;97(4):1002–9.

Serão NV, Delfino KR, Southey BR, Beever JE, Rodriguez-Zas SL. Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival. BMC Med Genomics. 2011;4:49.

Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, et al. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. J Exp Med. 2011;208:285–294.

Terek MC, Zekioglu O, Sendag F, Akercan F, Ozsaran A, Erhan Y. MDR1 gene expression in endometrial carcinoma. International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society. 2003;13(5):673–7.

Tserga A, Chatziandreou I, Michalopoulos NV, Patsouris E, Saetta AA. Mutation of genes of the PI3K/AKT pathway in breast cancer supports their potential importance as biomarker for breast cancer aggressiveness. Virchows Arch. 2016;469(1):35-43.

Tenen D. Oncofetal gene SALL4 in aggressive hepatocellular carcinoma. N Engl J Med. 2013; 13:2266-2276.

Thorpe LM, Spangle JM, Ohlson CE, Cheng H, Roberts TM, Cantley LC, Zhao JJ. PI3K-p110α mediates the oncogenic activity induced by loss of the novel tumor suppressor PI3K-p85α. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(27):7095-7100.

Thery JC et al. Resistance to human epidermal growth factor receptor type 2-targeted therapies. Eur J Cancer. 2004; 50(5):892-901.

Taubert H, Würl P, Bache M, et al: The p53 gene in soft tissue sarcomas: prognostic value of DNA sequencing versus immunohistochemistry. Anticancer Res. 1998;18: 183-187.

Teresi RE, Shaiu CW, Chen CS, ChatterjeeVK, Waite KA and Eng C: Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPAR gamma by Lovastatin and Rosiglitazone. IntJ Cancer. 2006;118: 2390-2398.

Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, Omoto Y, Iwase H. Analysis of ESR1 and PIK3CA mutations in plasma cell-free DNA from ER-positive breast cancer patients. Oncotarget. 2017;8(32):52142-52155.

Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. Nature reviews. Cancer. 2015;15:7–24.

Taniguchi CM, Winnay J, Kondo T, Bronson RT, Guimaraes AR, Alemán JO, Luo J, Stephanopoulos G, Weissleder R, Cantley LC, Kahn CR. The phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha can exert tumor suppressor properties through negative regulation of growth factor signaling. Cancer Res. 2010;70:5305–5315.

Urick ME. et al. PIK3R1 (p85alpha) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. Cancer Res. 2011; 71, 4061-7.

Uchino M, Kojima H, Wada K, Imada M, Onoda F, Satofuka H, Utsugi T, Murakami Y. Nuclear beta-catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive MCF-7 breast cancer cells. BMC Cancer. 2010;10:414.

Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC and Kahn CR. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. Mol Cell Biol. 2002; 22: 965-977.

Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli Sforza LL, Oefner PJ. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. Genome Res. 1997;7:996-1005.

Ward SG, Finan P. Isoform-specific phosphoinositide 3 -kinase inhibitors as therapeutic agents. Curr Opin Pharmacol. 2003;3(4):426-34.

Wang L, Zhang Q, Zhang J, Sun S, Guo H, Jia Z, Wang B, Shao Z, Wang Z, Hu X. PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib.
BMC Cancer. 2011 Jun 15;11:248.

Wilkes, G. & Barton-Burke, M. (2012). Oncology Nursing Handbook. Burlington, MA: Jones &Bartlett Learning.

Wolf D, Rotter V. Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia virus-like DNA sequences. Mol Cell Biol. 1984; 4: 1402-1410.

Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, et al. A global map of p53 transcription‐factor binding sites in the human genome. Cell. 2006;124:207‐19.

Weber GL, Parat MO, Binder ZA, Gallia GL, Riggins GJ. Abrogation of PIK3CA or PIK3R1 reduces proliferation, migration, and invasion in glioblastoma multiforme cells. Oncotarget. 2011;2:833-849.

Wang, Z. X., Lu, B. B., Wang, H., Cheng, Z. X. and Yin, Y. M. MicroRNA-21 modulates chemosensitivity of breast cancer cells to doxorubicin by targeting PTEN. Arch. Med. Res. 2011;42:281-290.

Wu Q, Chen X, Zhang J, Loh YH, Low TY, Zhang W, Zhang W, Sze SK, Lim B, Ng HH. Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. J Biol Chem. 2006;281:24090-4.

Warner ET, Tamimi RM, Boggs DA, et al. Estrogen receptor positive tumors: do reproductive factors explain differences in incidence between black and white women? Cancer Causes Control. 2013;24(4):731-9.

Wang F, Liu A, Peng Y, et al. Diagnostic utility of SALL4 in extragonadal yolk sac tumors: an immunohistochemical study of 59 cases with comparison to placentallike alkaline phosphatase, alpha-fetoprotein, and glypican-3. Am J Surg Pathol. 2009; 33:1529-1539.

Vogt PK, Kang S, Elsliger MA, Gymnopoulos M. Cancerspecific mutations in phosphatidylinositol 3–kinase. Trends Biochem Sci. 2007; 32:342-349

Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell. 2002; 108(2):171-182.

Varley JM, Evans DGR, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome-a molecular and clinical review, Brit J Cancer. 1997; 76(1):1-14.

Vasudevan KM, Burikhanov R, GoswamiA andRangnekar VM: Suppressionof PTEN expression is essential for antiapoptosis and cellular transformation by oncogenic Ras. Cancer Res. 2007; 67: 10343-10350.

Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. Clin Chem. 1996; 42 (6): 858-68.

Veeck J, Esteller M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2010; 15(1):5-17.

Vogelstein B, Lane D and Levine AJ: Surfing the p53 network. Nature. 2000; 408:307-310.
Yang J, Gao C, Chai L, Ma Y. A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells. PLoS One. 2010; 5:e10766.

Yong KJ, Gao C, Lim JS, Yan B, Yang H, Dimitrov T, Kawasaki A, Ong CW, Wong KF, Lee S, Ravikumar S, Srivastava S, Tian X, Poon RT, Fan ST, Luk JM, et al. Oncofetal gene SALL4 in aggressive hepatocellular carcinoma. N Engl J Med. 2013;368:2266-2276.

Yamamoto C, Fukuda N, Matsumoto T, Higuchi T, Ueno T, Matsumoto K. Zinc-finger transcriptional factor Sall1 induces angiogenesis by activation of the gene for VEGF-A. Hypertens Res. 2010; 33:143-148.

Yang B, Xu Y, Liu X, Huang Z, Wang L. IL-23R and IL-17A polymorphisms correlate with susceptibility of ankylosing spondylitis in a Southwest Chinese population. Oncotarget. 2017;8(41):70310-70316.

Yang Y, ZhouF, Fang Z, *et al*: Post-transcriptional andpost-translational regulationof PTEN bytransforming growthfactor-beta1. Cell Biochem. 2009;106: 1102-1112.

Yamamoto M, TamakawaS, Yoshie M, YaginumaY and Ogawa K. Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis. Mol Carcinog. 2006;45: 901-913.

Yndestad S, Austreid E, Knappskog S, Chrisanthar R, Lilleng PK, Lønning PE, Eikesdal HP. High PTEN gene expression is a negative prognostic marker in human primary breast cancers with preserved p53 function. Breast Cancer Res Treat. 2017;163(1):177-190.

Yaghjyan L, Colditz GA, Collins LC, et al. Mammographic breast density and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women according to tumor characteristics. J Natl Cancer Inst. 2011;103(15):1179-89.

Yue X, Xiao L, Yang Y, Liu W, Zhang K, Shi G, Zhou H, Geng J, Ning X, Wu J, Zhang Q. High cytoplasmic expression of SALL4 predicts a malignant phenotype and poor prognosis of breast invasive ductal carcinoma. Neoplasma. 2015;62(6):980-8.

Yang J, Gao C, Chai L, Ma Y. A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells. PLoS One. 2010; 5(5):e10766.

Yang J, Aguila J, Alipio Z, Lai R, Fink L, Ma Y (2011) Enhanced self-renewal of hematopoietic stem/progenitor cells mediated by the stem cell gene Sall4. J Hematol Oncol. 2011;4:38.

Yumei Yang Y, Li M, Li Y. High expression of PIK3R1 (p85α) correlates with poor survival in patients with metastatic breast cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2016;9(12):12797-12806.

Yong K, Gao C, Lim J, Yan B, Yang H, Dimitrov T, Kawasaki A, Ong C, Wong K, Lee S, Ravikumar S, Srivastava S, Tian X, Poon R, Fan S, Luk J, Dan Y, Salto-Tellez M, Chai L, Yu X, Li R, Shi W, Jiang T, Wang Y, Li C, Qu X.Silencing of MicroRNA-21 confers the sensitivity to tamoxifen and fulvestrant by enhancing autophagic cell death through inhibition of the PI3K-AKT-mTOR pathway in breast cancer cells. Biomed Pharmacother. 2016;77:37-44.

Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. Oncogene. 2008;27:5443-5453

Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA and Backer JM. Regulation of the p85/ p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. Mol Cell Biol. 1998; 18: 1379-1387.

Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI, Wang G, Ma X, Jiang C, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ. Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. Oncogene. 2000;19:2324-2330.

Xu F, Zhang C, Cui J, Liu J, Li J, Jiang H. The prognostic value and potential drug target of phosphatase and tensin homolog in breast cancer patients: A meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2017;96(36):e8000.

Xiao WZ, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. Hum. Mutat. 2001;17:439-474.

Zhao JJ, Liu Z, Wang L, Shin E, Loda MF, Roberts TM. The oncogenic properties of mutant p110a and p110b phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. Proc. Natl Acad Sci USA. 2005; 102, 18443e18448.

Zhao L, Vogt PK: Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by diff erent mechanisms. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105:2652-2657.

Zhou M, Gu L, Findley HW, et al. PTEN reverses MDM2-mediated chemotherapy resistance by interacting with p53 in acute lymphoblastic leukemia cells. Cancer Res. 2003; 63, 6357-62.

Zhang J, Tam WL, Tong GQ, Wu Q, Chan HY, Soh BS, Lou Y, Yang J, Ma Y, Chai L, Ng HH, Lufkin T, Robson P, Lim B. Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. Nat Cell Biol. 2006; 8:1114-1123.

9. EKLER

Ek 1.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	**PROTOKOL KODU**	09.2015.264	70737436-050.06.04-
	PROJE ADI	Meme Kanserinde Pık3ca Ve Tp53 Gen Mutasyonları İle Sall4, Pten Ve Pık3r1 Gen Ekspresyonları Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Doç. Dr. Mustafa AKKİPRİK	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih : 02.10.2015 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, bütçe vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılma	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Atila KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Tolga GÜVEN	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Yrd.Doç.Dr: Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	Var Yok	Evet Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Av.Ümit ERDEM	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var Yok	Evet Hayır	

Ek 2.

Review

Tumor Biology

Tumor Biology
March 2017: 1–16
© The Author(s) 2017
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1010428317695529
journals.sagepub.com/home/tub
SAGE

Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 and phosphatase and tensin homolog as therapeutic targets in breast cancer

Ebubekir Dirican and Mustafa Akkiprik

Abstract

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer among women in Turkey and worldwide. It is considered a heterogeneous disease and has different subtypes. Moreover, breast cancer has different molecular characteristics, behaviors, and responses to treatment. Advances in the understanding of the molecular mechanisms implicated in breast cancer progression have led to the identification of many potential therapeutic gene targets, such as Breast Cancer 1/2, phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha, and tumor protein 53. The aim of this review is to summarize the roles of phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 (alpha) (alias p85α) and phosphatase and tensin homolog in breast cancer progression and the molecular mechanisms involved. Phosphatase and tensin homolog is a tumor suppressor gene and protein. Phosphatase and tensin homolog antagonizes the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway that plays a key role in cell growth, differentiation, and survival. Loss of phosphatase and tensin homolog expression, detected in about 20%–30% of cases, is known to be one of the most common tumor changes leading to phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in breast cancer. Instead, the regulatory subunit p85α is a significant component of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, and it has been proposed that a reduction in p85α protein would lead to decreased negative regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and hyperactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 protein has also been reported to be a positive regulator of phosphatase and tensin homolog via the stabilization of this protein. A functional genetic alteration of phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 that results in reduced p85α protein expression and increased insulin receptor substrate 1 binding would lead to enhanced phosphatidylinositol 3-kinase signaling and hence cancer development. Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 underexpression was observed in 61.8% of breast cancer samples. Therefore, expression/alternations of phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 and phosphatase and tensin homolog genes have crucial roles for breast cancer progression. This review will summarize the biological roles of phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 and phosphatase and tensin homolog in breast cancer, with an emphasis on recent findings and the potential of phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 and phosphatase and tensin homolog as a therapeutic target for breast cancer therapy.

Keywords

Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1, phosphatase and tensin homolog, phosphatidylinositol 3-kinase, breast cancer, therapy, phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha

Date received: 4 October 2016; accepted: 10 January 2017

Introduction

Breast cancer (BCa) is the most diagnosed cancer in women worldwide and occurring with the highest frequency in industrial countries (the United States, Australia, and the European Union (EU)). Moreover, 131,000 of the 464,000

Department of Medical Biology, School of Medicine, Marmara University, Istanbul, Turkey

Corresponding author:
Mustafa Akkiprik, Department of Medical Biology, School of Medicine, Marmara University, Başıbüyük Mah., Maltepe Başıbüyük Yolu Sok., No: 9/1, Maltepe, Istanbul 34854, Turkey.
Email: akkiprik@yahoo.com

Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 License (http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage).

Ek 3.

Tumor Biol. (2016) 37:11701–11709
DOI 10.1007/s13277-016-5150-7

REVIEW

Functional and clinical significance of SALL4 in breast cancer

Ebubekir Dirican[1] · **Mustafa Akkiprik**[1]

Received: 3 May 2016 / Accepted: 11 July 2016 / Published online: 21 July 2016
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2016

Abstract The gene encoding Sal-like 4 (Drosophila) (SALL4) is a zinc-finger transcriptional factor and a vertebrate orthologous of the Drosophila gene spalt (sal), which is up-regulated in some cancers. SALL4 is expressed in the early developmental stages of Drosophila. Moreover, murine SALL4 plays a vital role in protecting the properties of embryonic stem (ES) cells and guiding the outcome of the primal inner cell mass by interacting with OCT4 and NANOG. SALL4 in ES cells and tumor cells is known as a regulator for controlling cell growth, proliferation, and apoptosis. However, the downstream goals of SALL4 remain largely uncharted. SALL4 expression has been detected in various cancers, including a subset (30 %) of solid tumors, such as breast cancer (BCa), ovarian cancer, gastric cancer, Wilms tumor, and germ cell tumors. A study has reported that SALL4 expression is commonly upregulated in human breast tumors (~86 %) and that overregulation of this gene is often linked to tumor progression. In this review, we provide an overview concerning the role of SALL4 in BCa development and progression. Furthermore, this review may identify some drugs/inhibitors for the development of BCa-specific therapies by targeting SALL4. In the future, SALL4 may be a new biomarker as a diagnostic/therapeutic target of BCa, which would be a new direction in targeted BCa therapy. To our knowledge, this is the first review of the role of SALL4 in BCa development and progression.

✉ Mustafa Akkiprik
akkiprik@yahoo.com

[1] School of Medicine Department of Medical Biology, Marmara University, Başıbüyük Mah., Maltepe Başıbüyük Yolu Sok., No: 9/1, 34854 Maltepe, Istanbul, Turkey

Keywords SALL4 · Breast cancer · ES cells · Therapy · OCT4 · NANOG

Introduction

SALL4 is a member of the SALL gene family, which has a homology for the Drosophila spalt (sal) gene [1–3]. SALL4 is also a zinc-finger transcription factor and a sal homeotic gene. It is crucial for the progression of the posterior head and anterior tail segments of Drosophila [4]. SALL4 is significant in initial development, and homozygous loss-of-role mutations might be fatal to the embryo [5]. SALL4 has been identified as vital for normal development in mice and humans, and it also plays roles in various congenital disorders [6]. In humans, the SALL gene family is also involved in tumorigenesis [3–8]. Haploinsufficiency truncating heterozygous SALL4 mutations are the cause of Okihiro syndrome, which is related to ray defects (deficient eye movements, thumb and limb defects, etc.) [8, 9]. SALL4 is also overexpressed in mice with acute myeloid leukemia, which indicates an oncogenic capability [7].

Breast cancer (BCa) is a major cause of fatality among women in the USA [10]. Among various subtypes of BCa, some genes (such as SALL4, PTEN, PIK3R1, and TP53) are overexpressed or downregulated. Recently, emerging evidence has shown that after birth, SALL4 expression is downregulated and absent in adult tissues; however, it is re-expressed in a subset (30 %) of various solid tumors, such as breast [11], ovarian [12], gastric [13], Wilms [14], and germ cell [15–17] tumors. In the present review, we evaluate studies targeting the biological properties of SALL4 and its role in human breast tumors.

Ek 4.

Tumor Biol. (2016) 37:7033–7045
DOI 10.1007/s13277-016-4924-2

REVIEW

Mutation distributions and clinical correlations of PIK3CA gene mutations in breast cancer

Ebubekir Dirican[1] · **Mustafa Akkiprik**[1] · **Ayşe Özer**[1]

Received: 13 October 2015 / Accepted: 28 January 2016 / Published online: 26 February 2016
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2016

Abstract Breast cancer (BCa) is the most common cancer and the second cause of death among women. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathway has a crucial role in the cellular processes such as cell survival, growth, division, and motility. Moreover, oncogenic mutations in the PI3K pathway generally involve the activation phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase-catalytic subunit alpha (PIK3CA) mutation which has been identified in numerous BCa subtypes. In this review, correlations between PIK3CA mutations and their clinicopathological parameters on BCa will be described. It is reported that PIK3CA mutations which have been localized mostly on exon 9 and 20 hot spots are detected 25–40 % in BCa. This relatively high frequency can offer an advantage for choosing the best treatment options for BCa. PIK3CA mutations may be used as biomarkers and have been major focus of drug development in cancer with the first clinical trials of PI3K pathway inhibitors currently in progress. Screening of PIK3CA gene mutations might be useful genetic tests for targeted therapeutics or diagnosis. Increasing data about PIK3CA mutations and its clinical correlations with BCa will help to introduce new clinical applications in the near future.

Keywords Breast cancer · PIK3CA · Mutation · p110α · PI3K

✉ Mustafa Akkiprik
akkiprik@yahoo.com

[1] Department of Medical Biology, School of Medicine, Marmara University, Başıbüyük Mah., Maltepe Başıbüyük Yolu Sok., No: 9/1, 34854 Maltepe, Istanbul, Turkey

Introduction

Breast cancer (BCa) is a complex disease often necessitating multimodal care. It is a disease which is developed by the accumulation of genetic and epigenetic alterations. These alterations are activated oncogenes and silenced tumor suppressors in mammalian ductal or lobular tissues [1]. Furthermore, the altered phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling pathway is frequently involved in the regulation of cellular processes required for breast carcinogenesis. Interestingly, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase-catalytic subunit alpha (PIK3CA) mutations in exons 9 (helical domain) and 20 (kinase domain) lead to amino acid changes and result in increased PI3K activity. Increased PI3K activity can cause cell proliferation and progression in cancer cells [2]. PIK3CA mutation can be an emerging tumor marker and it might affect or alter BCa treatment modalities. Further studies about this gene would be helpful to design new treatment strategies.

Breast cancer

Among cancers affecting women, BCa is the most deadliest [3]. Recently, the mortality rate of BCa has declined in the USA and Europe, by means of improved detection and treatment [4]. Statistical data predict more than 231,840 women in the USA will be diagnosed with invasive BCa in 2015. Also, 1/12 women in the West has developed BCa at some point in their life [5]. Therefore, better tools are needed for diagnosis and monitoring. Recent strategies for early diagnosis of BCa are not sufficient despite the increased prognosis rate of the disease.

It has been known that the most important indicators for identifying patients with BCa are mammography, histopathology, and blood tests [6]. Mammography detects about 80–

Ek 5.

Clinical and Experimental Health Sciences

Derleme / *Review*

Moleküler Tanıda Yüksek Çözünürlüklü Erime Yöntemi ve Klinik Önemi

High Resolution Melting Method in Molecular Diagnostics and Their Clinical Importance

Ebubekir Dirican, Mustafa Akkiprik

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Her geçen gün moleküler biyoloji alanında teknolojinin gelişmesiyle paralel, birçok yeni moleküler analiz yöntemleri ortaya çıkmaktadır. Biz de bu derlemede, moleküler tanıda önemli olduğu gösterilmiş olan Yüksek Çözünürlüklü Erime (High Resolution Melting) (HRM) analizini, uygulama alanlarını ve klinikte yapılmış çalışmalarla önemini anlatmayı amaçladık. HRM kapalı tüp sisteminde, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR: PCR) sonrasına dayalı genetik varyasyonları belirlemek için kullanılan yeni bir yöntemdir. HRM'nin çalışma prensibi nükleik asit örneklerinin erime davranışına dayanmaktadır. Çift zincirli DNA'nın denatürasyonu erime sıcaklığının artmasıyla oluşan floresan değişikliklerinin saptanmasıyla belirlenir. Wild type (yaban tip) ve heterozigot örneklerinin farklılıkları erime grafiklerinde kolaylıkla saptanabilmektedir. Bu yöntemde erime eğrisi analiziyle daha fazla bilgi ve detay elde edilebilmektedir. HRM analizi, örneklerin sekans, uzunluk, guanin sitozin (GC) içeriğine göre ayrımını yapabilmektedir. Popülasyonda yaygın görülen tek nükleotit değişikliklerinin (SNP) tespiti, hastalıklarla ilişkili gen mutasyon taramaları ve DNA metilasyon analizleri HRM yöntemi ile hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanabilmektedir. PZR ürünlerindeki nükleotit dizi değişimleri ve çeşitli varyasyonlar DNA erime eğrisi şekilleriyle HRM yönteminde saptanabilmektedir. Kombine yeni nesil DNA boyaları ve geliştirilen gen tarama yazılımları sayesinde güçlü analiz yapabilme kapasitesinin yanı sıra kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyetli olma özelliği ile gerçek zamanlı HRM yöntemi pek çok klinik uygulamada ön plana çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Yüksek çözünürlüklü erime, tek nükleotit değişiklikleri, erime eğrisi, mutasyon, metilasyon

Abstract

Along with the development of technology in the field of molecular biology, many new molecular analyses are being developed each day. In this review, we aim to explain high-resolution melting (HRM) analysis, which has been shown to be important in molecular diagnostics, its applications, and its importance in the areas of clinical practice. The HRM system in a closed tube is used to determine post-polymerase chain reaction (PCR)-based genetic variations as a new method. The working principle of HRM is based on the melting behavior of nucleic acid samples. The denaturation of double-stranded DNA is determined by detecting the fluorescence change caused by increased melting temperature. The differences between wild-type and heterozygous samples may be easily detected in melting graphics. Using this method, melting curve analysis can be performed with more precision. In HRM analysis, the samples can be distinguished according to the guanine cytosine (GC) content and sequence length. Thus, the detection of common single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the population, scanning of gene mutations associated with diseases, and analysis of DNA methylation can be performed quickly and reliably using the HRM method. Nucleotide sequence variations and several variations in the PCR products can be detected with the DNA melting curve shape using the HRM method. In addition to being low-cost and easily implementable, the real-time HRM method enables powerful analysis because of the combined new-generation DNA dyes and developed gene scanning software, thereby standing out in many clinical applications.

Keywords: High-resolution melting, single-nucleotide polymorphism, melting curve, mutation, methylation

GİRİŞ

Pek çok genetik hastalığın moleküler gelişim sürecinde, genetik ve epigenetik mekanizmaların önemli olduğu kabul edilen bir gerçektir. Bu olaylarda birçok gendeki kusur veya anomalilerin bu hastalıkların tetiklenmesinde rol aldıklarını bilmekteyiz. Bu anomalilerin başında ise mutasyonlar, tek nükleotit değişimleri (SNPs) ve metilasyon durumu önemli genetik değişikler arasında yer almaktadır. Bu genetik değişiklikler her zaman için anomali oluşturacağına dair kesin bir bilgi olmamakla birlikte, klinikte tanımlanmış bazı genetik değişimlerin rutinde hastalıkların tanısında kullanılmakta olduğunu bilmekteyiz. Bu yöntemle daha önce bazı tanımlanmış genler olmakla beraber (TP53, PIK3CA, CDH1 ve PTEN gibi) yeni tanımlanacak genlerdeki anormalliklerin hem tanıda hem de tedavide yönlendirici olabileceği düşünülmektedir. Bu tanı ve tedavideki doğru yaklaşımın hastalığın seyrini nasıl etkileyeceğini de düşündüğümüzde bu araştırmaların önemi ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden bu derlemede, HRM analiziyle özellikle kanser ve birçok genetik hastalığın moleküler tanısında kullanılmış olan çalışmalar ile tedavide yol gösterici olduğunu gösteren uygulamalar derlenmiştir.

İnsan genomunun moleküler analizi için birçok pahalı teknolojik yönteme gereksinim duyulmaktadır. Bu yöntemlerin bütçesi yüksek olan araştırmaların dışında kullanımı, yani rutinde ve klinikte hastaların tanısında kullanımının zor olması hastaların tedavisine yardımcı olabilmemizi kısıtlamaktadır. Bu yüzden her geçen gün maliyeti düşürmek için tanı ve tedaviye yönelik yeni analiz yöntemleri geliştirilmektedir. Fakat doğru ve güvenilir yöntemlerin tanımlanması ve kullanılması bu hastalar için oldukça önemlidir. Biz de bu derlemede, moleküler tanıda rutin kullanımının artacağını beklediğimiz güvenilir ve hızlı analiz yapabilen HRM yöntemiyle önemli

Sorumlu Yazar/Correspondence Author: Mustafa Akkiprik E-posta/E-mail: makkiprik@marmara.edu.tr
Geliş Tarihi/Received: 23.05.2016 Kabul Tarihi/Accepted: 08.09.2016 Çevrimiçi Yayın Tarihi/Available Online Date: 24.02.2017 DOI: 10.5152/clinexphealthsci.2017.104
©Telif Hakkı 2017 Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü - Makale metnine www.clinexphealthsci.com web sayfasından ulaşılabilir
©Copyright by 2017 Journal of Marmara University Institute of Health Sciences - Available online at www.clinexphealthsci.com

10. ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ebubekir	**Soyadı**	Dirican
Doğum Yeri	Malatya	**Doğum Tarihi**	10.05.1987
Uyruğu	T.C	**Tel**	0538 971 1396
E-mail	ebubekir.dirican@marmara.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniv. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD.	2018
Yüksek Lisans	Marmara Üniv. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD.	2013
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Bahçeşehir Atatürk Lisesi (YDA)	2005

İş Deneyimi

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
	Araştırma Görevlisi	Marmara Üniv. Tıbbi Biyoloji ABD.	2012-2018

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İngilizce	İyi	Orta	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
İYİ	İYİ

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.