



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİNDE *HOXB13* VE *IL17BR* GENLERİNİN VE BU GENLER İLE
İLİŞKİLİ miRNA'LARIN PROGNOSTİK VE PREDİKTİF ÖNEMİ**

Elif DEMİRDÖĞEN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Bursa-2013



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MEME KANSERİNDE *HOXB13* VE *IL17BR* GENLERİNİN VE BU GENLER İLE
İLİŞKİLİ miRNA'LARIN PROGNOSTİK VE PREDİKTİF ÖNEMİ

Elif DEMİRDÖĞEN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Ünal EGELİ

Bursa-2013

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	IV
SUMMARY	V
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanserin Tanımı	3
2.2. Kanserin Görülme Sıklığı.....	3
2.3. Kanserin Hücresel Kökeni ve Gelişimi.....	4
2.4. Meme Kanseri	6
2.5. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması	8
2.6. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması.....	9
2.6.1. Luminal A:	9
2.6.2. Luminal B:.....	10
2.6.3. HER-2 Pozitif:.....	10
2.6.4. Bazal Benzeri:	10
2.7. Meme Kanserinin Genetiği	12
2.7.1. Meme Karsinogenezinde Genlerin Rolü	12
2.7.2. Meme Kanserinde Etkili Olan Onkogenler	13
2.7.2.1. <i>cerbB-2</i> (<i>HER2/neu</i>) Onkogeni:.....	14
2.7.2.2. <i>c-Myc</i> Onkogeni:	16
2.7.2.3. Siklinler ve Hücre Döngüsünün Düzenleyici Elemanları:	18
2.7.2.4. <i>RAS</i> Onkogeni:	19
2.7.3. Meme Kanserinde Etkili Büyüme Faktörleri ve Büyüme Faktörü Reseptörleri	20
2.7.3.1. <i>EGFR</i> (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü):	21
2.7.3.2. <i>VEGF</i> (Vaskular Endotelial Büyüme Faktörü):	23
2.7.4. Steroid Hormon Reseptörleri	24
2.7.4.1. Östrojen Reseptörü, Progesteron Reseptörü, Androjen Reseptörü	24
2.7.5. Meme Kanserinde Etkili Olan Tümör Baskılayıcı Genler	27

2.7.5.1. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genleri:	28
2.7.5.2. <i>TP53</i> Geni:	29
2.7.5.3. <i>PTEN</i> Geni:	31
2.7.5.4. <i>FHIT</i> Geni:	32
2.7.5.5. <i>RBI</i> Geni:	33
2.7.6. Meme Kanserinde Etkili Olan DNA Tamir Genleri	34
2.7.6.1. <i>ATM</i> (Mutant Ataxia-Telangiectasia) Geni	35
2.7.6.2. <i>ATR</i> (<i>ATM</i> ve Rad3-Related) Geni	35
2.7.6.3. <i>CHK2</i> (Cell Cycle Checkpoint Kinase 2) Geni	35
2.7.7. Meme Kanserinde Önemli Olan Sinyal İletim Mekanizmaları	36
2.7.7.1. <i>RAS/RAF/MEK/ERK</i> Sinyal Yolağı:	36
2.7.7.2. <i>PI3K/AKT/mTOR</i> Sinyal Yolağı:	38
2.7.7.3. <i>JAK/STAT</i> Sinyal Yolağı	40
2.7.8. Meme Kanserinde İnvazyon ve Metastaz Süreci	42
2.7.8.1. Homeobox (<i>HOX</i>) Genleri ve <i>HOXB13</i> (Homeobox B13):	44
2.7.8.2. İnterlökin (IL) Genleri ve <i>IL17BR</i> (İnterlökin 17 Reseptör B):	47
2.7.8.3. Meme Kanserinde <i>HOXB13:IL17BR</i> Gen Ekspresyon Oranı:	50
2.7.9. mikroRNA (miRNA) ‘lar	52
2.7.9.1. miRNA’ların Yapısı ve Biyogenezi:	52
2.7.9.2. miRNA’ların Fonksiyonu ve Kansere İlişkisi:	53
2.7.9.3. Meme Kanserinde Diagnostik, Prognostik ve Terapötik Rol Oynayan miRNA’lar	55
2.7.9.4. Meme Kanserinde <i>HOXB13</i> ve <i>IL17BR</i> Genlerini Hedef Alan miRNA’lar	58
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
3.1. Hasta Grubu	61
3.2. Gereçler	61
3.2.1. Kullanılan Aletler	61
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	62
3.3. Yöntemler	62
3.3.1. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi	62
3.3.2. Elde Edilen RNA’ların Miktar ve Kalite Tayini	63
3.3.3. RNA’lardan cDNA Sentezi	66

3.3.4. Real-Time PCR ile <i>HOXB13</i> , <i>IL17BR</i> Genlerinin ve Bu Genleri Hedef Alan miRNA'ların Ekspresyon Analizleri	68
3.3.5. qRT-PCR Analizi Sonucu Hedef Genlerin ve İlgili miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi	70
3.3.6. Periferik Kan Örneklerinden RNA Elde Edilmesi	71
3.3.7. Periferik Kandan Elde Edilen RNA' lardan cDNA Sentezi.....	72
3.3.8. Real-Time PCR ile Periferik Kandan <i>HOXB13</i> ve <i>IL17BR</i> Genlerinin Ekspresyon Analizleri	73
3.3.9. qRT-PCR Analizi Sonucu Periferik Kandan <i>HOXB13</i> ve <i>IL17BR</i> Genlerinin Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi	74
3.3.10. İstatistiksel Analiz	74
4. BULGULAR	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	91
6. KAYNAKLAR.....	97
7. TEŞEKKÜR.....	119
8. ÖZGEÇMİŞ.....	120

ÖZET

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Son yıllarda meme kanseri oluşumunda rol oynayan genlerin ve mikroRNA (miRNA)'ların işlevlerinin anlaşılmasına başlanması, hem meme kanserinin moleküler patolojisinin anlaşılmasını hem de yeni moleküler hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesini sağlamaktadır.

Çalışmada, ER(+) Türk primer meme kanserli 40 hastanın tümör, normal doku ve periferik kan örneklerinde; meme kanseri gelişiminde prognostik ve prediktif açıdan önemli olan *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ve bu genleri hedef alan miRNA'ların (miR-661, miR-1260, miR-1278 ve miR-1266) ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler; Bağımsız İki Örnek t-testi, İşlem Karakteristik Eğrisi, Lojistik Regresyon, Kaplan Maier ve Cox Oransal Risk Regresyon Analizi ile değerlendirilmiştir. Hastaların tümör dokularında normal dokuya göre, *HOXB13* ekspresyon seviyesinde 1.31 kat artış, *IL17BR* ekspresyon seviyesinde ise 0.80 kat azalış belirlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p=0.3559$, $p=0.3166$). *HOXB13:IL17BR* ekspresyon oranındaki artışın sağkalım ve tedaviye yanıt ile ilişkisi anlamlı bulunmuştur ($p=0.0491$, $p=0.0267$). miR-661, miR-1260, miR-1266 ekspresyon seviyeleri, tümör dokuda normal dokuya göre sırasıyla; 1.94, 1.59 ve 1.38 kat artış; miR-1278 ekspresyon seviyesi ise 0.30 kat azalış göstermiştir ($p=0.3578$, $p=0.3451$, $p=0.6930$, $p=0.2428$). Rekürens/metastaz (-) hastalar ile rekürens/metastaz(+) hastalar arasında *HOXB13*'ü hedef alan miR-1278 ve *IL17BR*'yi hedef alan miR-1266 ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p=0.0014$, $p=0.0048$). Hastaların periferik kanlarında ise *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ekspresyonu gözlenmemiştir.

Elde edilen bulgular ışığında; ER(+) primer meme tümörlerinde *HOXB13* ve *IL17BR*'yi hedefleyen miRNA düzeylerindeki farklılıklar değerlendirilerek, tümörün agresivitesi ve metastaz riski hakkında bilgi edinilebilecektir. Böylece, farklı etkin tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesi ve hastaların yaşam süresi ve kalitesinin geliştirilebilmesine yönelik çalışmalara katkı sağlanabilecektir. Ayrıca mevcut çalışma; ER(+) Türk primer meme kanserli hastalarda, kötü prognozun takibinde ve uygulanan tedavinin etkinliğinde faydalanılabilecek miRNA düzeyindeki biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda yapılacak ileri çalışmalara yol gösterici olan, uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlayabilecek nitelikteki ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, ER, *HOXB13*, *IL17BR*, mikroRNA.

SUMMARY

PROGNOSTIC AND PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF *HOXB13*, *IL17BR* GENES AND miRNAs ASSOCIATED WITH THESE GENES IN BREAST CANCER.

Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide. In recent years, understanding the functions of genes and miRNAs that play a role in breast cancer development, has been providing expectations for understanding the molecular pathology of breast cancer as well as developing new molecular targeted therapies.

In this study, the expression analysis of *HOXB13* and *IL17BR* genes and their target miRNAs (miR-661, miR-1260, miR-1278 ve miR-1266) carried out in tumor, normal tissue and peripheral blood samples of 40 ER(+) Turkish primary breast cancer patients. Obtained data were evaluated by Independent Samples t-test, ROC Curve, Logistic Regression, Kaplan Maier and Cox Proportional Hazards Regression Analysis. Expression levels of *HOXB13* is 1.31 fold higher and expression levels of *IL17BR* is 0.80 fold lower in tumor samples than normal tissues of patients but it isn't determined any statistical significance ($p = 0.3559$, $p = 0.3166$). An increase in *HOXB13:IL17BR* gene expression ratio is significantly correlated with survival of breast cancer patients and treatment response ($p = 0.0491$, $p = 0.0267$). miR-661, miR-1260 and miR-1266 expression levels are 1.94, 1.59 and 1.38 fold higher and miR-1278 expression level is 0,30 fold lower in tumor than normal tissue ($p = 0.3578$, $p = 0.3451$, $p = 0.6930$, $p = 0.2428$). *HOXB13* associated miR-1278 and *IL17BR* associated miR-1266 expression levels are significantly correlated with recurrence/distant metastasis ($p = 0.0014$, $p = 0.0048$). *HOXB13* and *IL17BR* gene expressions are not observed in peripheral blood samples of patients.

These data will be beneficial for evaluation of miRNA expression levels target *HOXB13* and *IL17BR* to obtain information about tumor aggressiveness and metastasis risk in ER(+) primary breast cancer patients. In this manner, it can be contributed to the studies of organization of different effective treatment approaches and improvement the quality of life and survival of patients. Moreover, the present study is the first study that can contribute to the international and national literature in terms of guide for further studies for the determination of biomarkers in miRNA levels providing follow-up of poor prognosis and evaluating the effectiveness of the treatment in ER(+) Turkish primary breast cancer patients.

Key words: Breast cancer, ER, *HOXB13*, *IL17BR*, microRNA.

1. GİRİŞ

Ülkemizde sıklıkla karşılaşılan ve ölümlere neden olan meme kanserinin tanı, takip ve tedavisinde kullanılabilecek biyobelirteçler yetersiz kalmaktadır. Son beş yılda elde edilen bulgular, hastalara uygulanacak tedavi kararlarının şekillenmesinde endokrin yanıtın ve prognostik risk faktörlerinin etkin sonuç verdiğini göstermiştir. Endokrin tedavide (Tamoksifen ile tedavi) hormon reseptör durumu standart hedef olarak belirlenmekle birlikte, bazı onkogenlerin yaptığı çeşitli moleküler değişikliklerin tümörün endokrin tedavisine vereceği yanıtı değiştireceği düşünülmektedir. Benzer olarak, hastalığın prognostik sürecinin hastanın yaşı ve menapoz durumu gibi klinik parametrelerle, tümör büyüklüğü, histolojik grade ve lenf nodu statüsü gibi patolojik parametrelere bağlı olduğu bilinmektedir. Ancak iyi prognoza sahip olarak nitelendirilen östrojen hormon reseptörü pozitif, lenf nodu negatif hastalarda tedavi sonrası nüks gerçekleşebilmektedir. Bundan dolayı meme kanseri gelişiminde etkili olan moleküler yolların anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı, ER sinyal yolağı aracılığı ile östrojen hormonu tarafından regülasyonun kontrolünü sağlamaktadır ve ER pozitif meme kanserli hastalarda, *HOXB13:IL17BR* ekspresyon oranındaki artış rekürrens, metastaz ve hastanın survisi ile ilişkili olup kötü prognoz belirteçidir.

Son yıllarda yapılan kanser araştırmalarında, protein kodlamayan küçük RNA molekülleri olan mikroRNA (miRNA)'lar tanımlanmıştır. Ökaryotik hücrelerde bulunup, protein kodlamayan ve gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde görev alan yaklaşık 22 nükleotid büyüklüğündeki bu moleküller miRNA olarak tanımlanmaktadır. miRNA' lar, mRNA' nın 3' kodlama yapmayan bölgesinde (3' UTR) baz eşleşmesi yaparak bu bölgede bulunan transkriptlerin translasyonunu baskılamakta ve bu şekilde gen düzenlenmesine etki etmektedir. Bu düzenlenmenin çeşitli mekanizmalarla bozulması hastalıklara ve kanser oluşumlarına sebep olmaktadır. Son yıllardaki kanserin genetik temellerini araştıran çalışmalarda, protein kodlamayan miRNA'ların *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin mRNA'larının fonksiyonunu etkilediği ve böylece hücrel olayların düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak meme kanseri gelişiminde etkisi olduğu bilinen *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ve bu genleri hedef alan miRNA' ların Türk popülasyonundaki ekspresyon seviyeleri bilinmemektedir. Bu amaçla planlanan çalışmada, Türk popülasyonuna ait, ER(+) özellikte, primer meme kanseri tanısı almış bireylerin tümör dokularında ve periferik kanlarında, meme tümörü gelişimi ile ilgili olabileceği belirtilen

HOXB13, *IL17BR* genlerinin ve bu genlere ait güncel miRbase sisteminde yer alan hedef miRNA'ların (*HOXB13* için; miR1278, miR-661 ve miR-1260, *IL17BR* için; miR-1266) ekspresyon profilleri değerlendirildi. Çalışmanın sonucunda, bu popülasyona özgü hastalara ait tümörlerde, *HOXB13* ekspresyon seviyesinde artış, *IL17BR* ekspresyon seviyesinde ise azalış belirlendi. *HOXB13:IL17BR* ekspresyon oranının, sağkalım ve tedaviye yanıt ile ilişkisi değerlendirilerek bu orandaki artışın hastalığın prognostik ve prediktif süreci ile ilgili olabileceği önerildi. *HOXB13* ile ilişkili miR-1278 ekspresyonundaki artışın ve *IL17BR* ile ilişkili miR-1266 ekspresyonundaki azalışın rekürens ve/veya metastaz ile ilişkisi olabileceği öne sürülerek prognostik ve prediktif açıdan önemli olduğu ifade edildi.

2. GENEL BİLGİLER

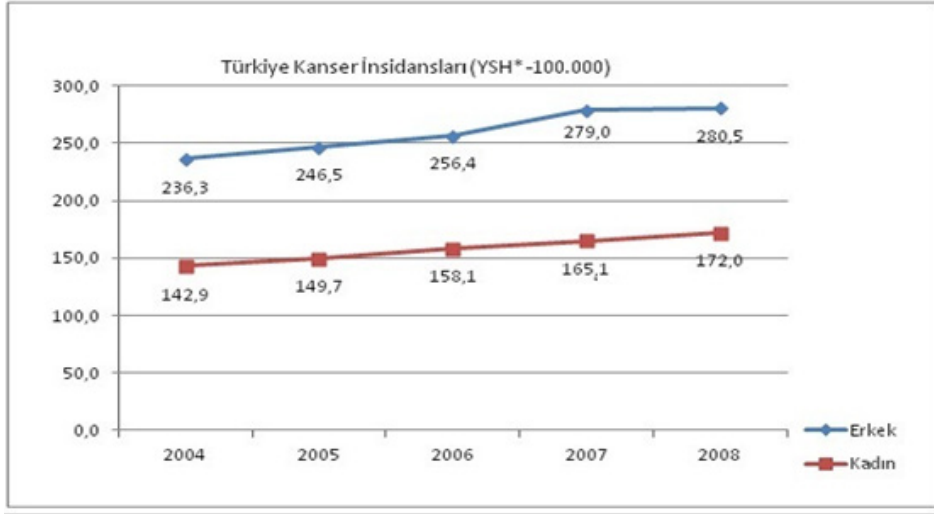
2.1. Kanserin Tanımı

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok sayıda faktörün (fiziksel ve kimyasal ajanlar, virüsler, genetik faktörler) neden olduğu çok basamaklı bir süreçtir (1). Bir kanser hücresi birçok açıdan organizmanın denetim mekanizmalarından bağımsız şekilde çoğalarak sağkalım avantajı elde eden saldırgan ve işgalci bir hücre olarak tanımlanabilir.

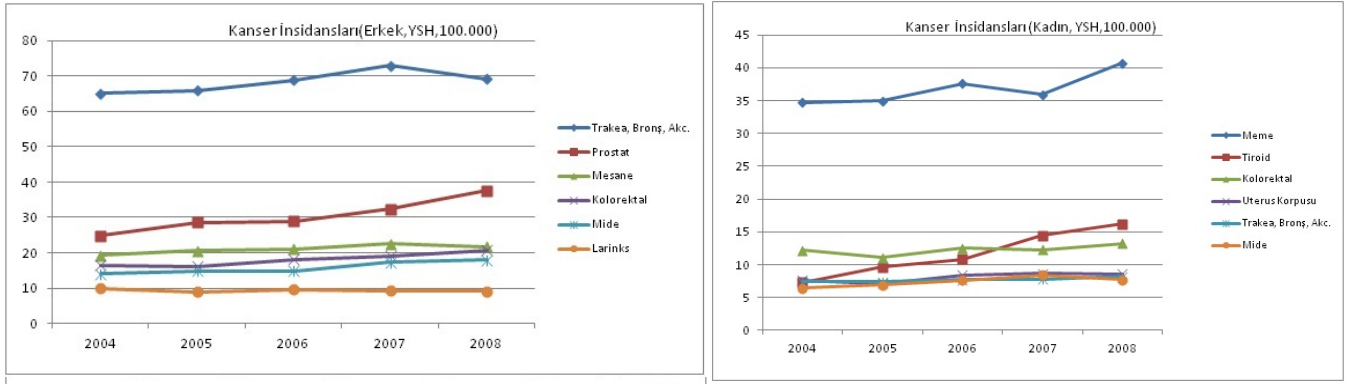
2.2. Kanserin Görülme Sıklığı

Dünyada her yıl 9 milyon insan kanser tanısı almakta ve 5 milyon kişi bu hastalık nedeniyle kaybedilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre 2008 yılında dünya genelinde 12 milyon kişiye kanser teşhisi konulurken, bu rakamın 2030 yılında 26 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir (www.saglik.gov.tr).

Kanser, Amerika ve İngiltere gibi gelişmiş ülkelerde ölüm sebepleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (2). Genellikle gelişmiş toplumların major sağlık problemi olarak düşünülmesine rağmen, son yıllarda gelişmekte olan ülkelerde yaşayan popülasyonların dörtte üçünde tüm kanser türlerinin yarısından fazlası görülebilmektedir. Türkiye'de kanser haritası incelendiğinde ise ülke genelinde yıllar içerisinde kanser sıklığında bir artış söz konusu olup (Şekil 1), her yıl yaklaşık 150,000 yeni kanser olgusu teşhis edilmektedir. Farklı kanser türlerinin cinsiyete göre dağılımı dikkate alındığında Türkiye'de erkeklerde en sık akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri görülmektedir (Şekil 2) (www.saglik.gov.tr). Dünyada, erkeklerde ilk üç sıra kanser türü, prostat, akciğer ve kolon iken, Türkiye'de bu sıralama akciğer, prostat ve mesane şeklindedir. Erkeklerde akciğer kanseri insidansı Türkiye'de 100.000'de yaklaşık 69'larda olup dünya ortalaması ise 100.000'de 30-35'lerde, Avrupa Birliği ortalaması ise 100.000'de 48'lerdedir. Kadınlarda ilk üç kanser türü dünyada meme, kolon ve akciğer kanseri iken Türkiye'de sıralama meme, tiroit ve kolorektal kanseri şeklindedir (www.kanser.gov.tr).



Şekil-1 Türkiye’de yıllara ve cinsiyete göre kanserin görülme sıklığı (www.saglık.gov.tr) (*YSH:Yaşa Standardize Hız)



(a)

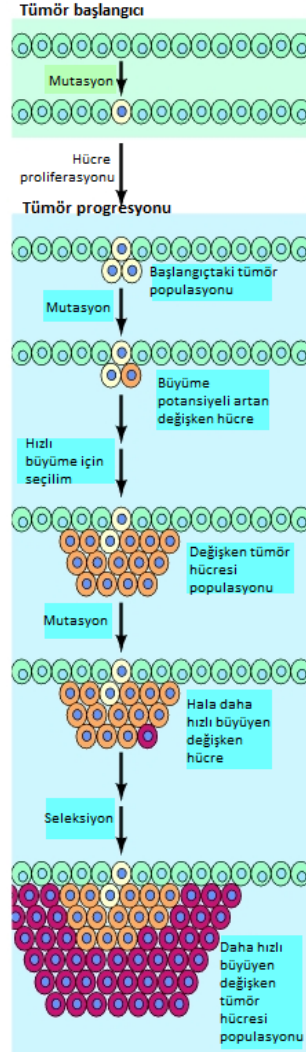
(b)

Şekil-2 Türkiye’deki farklı kanser türlerinin (a) erkek ve (b) kadın cinsiyetler arasındaki dağılımı (www.saglık.gov.tr) (*YSH:Yaşa Standardize Hız)

2.3. Kanserın Hücresel Kökeni ve Gelişimi

Çoğu kanser sadece tek bir hücreden ya da az sayıda hücreden meydana gelmektedir (3). Bu hücre/hücrelerin yapısal düzenlerinde meydana gelen değişiklikler, hücre bölünmesini, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik süreçlerde meydana gelen modifikasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Kanser gelişim sürecinin ilk basamağı olan tümör oluşumu, tek bir hücrenin anormal şekilde proliferasyonuna neden olan genetik değişimlerin sonucu olarak düşünülmektedir. Hücre proliferasyonu, klonal olarak çoğalan tümör hücresi popülasyonlarının büyümesine neden olmaktadır. Tümör

hücre popülasyonlarında genetik değişimler sonucunda oluşan mutasyonların birikmesi ile tümör gelişimi devam eder. Kanser hücresine seçici bir avantaj sağlayan bu mutasyonlar klonal seleksiyon adı verilen sürecin başlamasına ve çoğalma, hayatta kalma, invazyon ve metastaz kapasitesi artan tümör hücrelerinin seçilmesine olanak tanır (4). Bu hücreler lokalize oldukları bölgede varlıklarını sürdürdükleri sürece benign tümör olarak adlandırılır. Klonal seleksiyon periyodunun tümör gelişimi boyunca devam ettiği durumda ise tümör hücresi invaziv nitelik ve daha hızlı büyüme yeteneği kazanmakta ve malign özellik göstermektedir (5). Malign tümör özelliği gösteren kanser hücresinin köken aldığı dokudan uzaklaşarak lenf ya da kan dolaşımı aracılığı ile uzak organları kolonize ettiği yayılım süreci metastaz oluşumunu ifade etmektedir (Şekil 3). Metastatik kanser hücreleri yeni koşullara uyum sağlamakta yetenekli olup sitotoksik ilaçlar ya da radyasyon tedavileri gibi kendilerini öldürme çabalarına karşı koymaktadır (6).



Şekil-3 Tümör gelişim sürecinin evreleri (4)

2.4. Meme Kanseri

Meme kanseri, akciğer kanserlerinden sonra dünyada en sık rastlanan ikinci malign tümör olup kanserden ölüm nedenleri arasında yine ikinci sırada yer alırken, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü ve kansere bağlı ölümlerin temel nedeni olarak bilinmektedir (7, 8). Dünyada her yıl 1,300,000 den fazla kadına meme kanseri tanısı konmakta ve her yıl 450,000 den fazla kadın bu hastalık nedeniyle kaybedilmektedir (9). Türkiye’de ise meme kanseri görülme sıklığının kadınlar arasında %35 oranında olduğu görülmektedir (10). 1990’lı yıllardan bu yana birçok endüstrileşmiş toplumda meme kanseri insidansı giderek artmış olmasına rağmen, son yıllarda gelişmiş ülkelerin büyük çoğunluğunda, eğitim seviyesinin yükselmesi ile birlikte mamografik tarama programlarının geniş ölçüde yaygınlaşması ve daha etkili adjuvan sistemik tedavilerin gündeme gelmesi sonucunda meme kanserinden ölüm oranlarında belirgin bir azalma gözlenmektedir (11, 12).

Yaş faktörü ve kadın cinsiyet gibi major risk faktörlerine sahip meme kanserinin görülme sıklığı oranı 35 ve 39 yaşları arasında hızlı bir artış gösterip menapoz dönemine kadar orandaki bu artış devam etmektedir (13, 14). 50 yaş ve sonrasında daha yavaş seyirde yükselen meme kanseri insidansı (14, 15), 80 yaşından sonra ise plato seviyesine ulaşmaktadır (13, 14).

Dünya üzerindeki ülkeler arasında var olan coğrafi farklılıklar da meme kanseri insidansı ve mortalite oranlarının değişmesine neden olmaktadır (16). Özellikle; Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya’da bulunan endüstrileşmiş ülkelerde meme kanseri görülme riski daha az sanayileşmiş Asya ve Afrika popülasyonlarına göre daha yüksek olma eğilimindedir; ancak Japonya bir istisnadır (17).

Meme kanseri gelişiminde etkili olan risk faktörlerinden demografik özelliklerin (cinsiyet, yaş, ırk/etnisite gibi) yanı sıra kişinin reproduktif öyküsü, ailesel/genetik faktörler ve çevresel faktörler de önem taşımaktadır (18). Reproduktif açıdan östrojen hormonuna maruz kalınan sürede artış olması (erken menarş ve geç menapoz), ilk canlı doğumun daha ileri yaşta yapılması ve hiç doğum yapmamış olmak meme kanseri gelişme riskinde artışla ilişkilidir (19, 20). Aile öyküsü varlığı meme kanseri açısından önemli bir risk faktörüdür. Bir adet birinci derece akrabada meme kanseri olması, meme kanseri riskini 1.80 kat artırmaktadır (21). Bunun yanında moleküler genetik alanındaki gelişmelerle kalıtsal meme kanseri ile ilişkili *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* ve *PTEN* gibi çeşitli genler tanımlanmıştır. Bu

genlerde meydana gelen mutasyonların bireyin meme kanserine yakalanma olasılığının artmasında payı oldukça fazladır (22). Ayrıca; yüksek sosyoekonomik düzey, genç yaşta radyasyona maruz kalma, hormon replasman tedavisi (HRT) ve oral kontraseptif kullanımı gibi çevresel risk faktörlerinin de meme kanseri oluşumunda etkili olabileceği bilinmektedir (23-26).

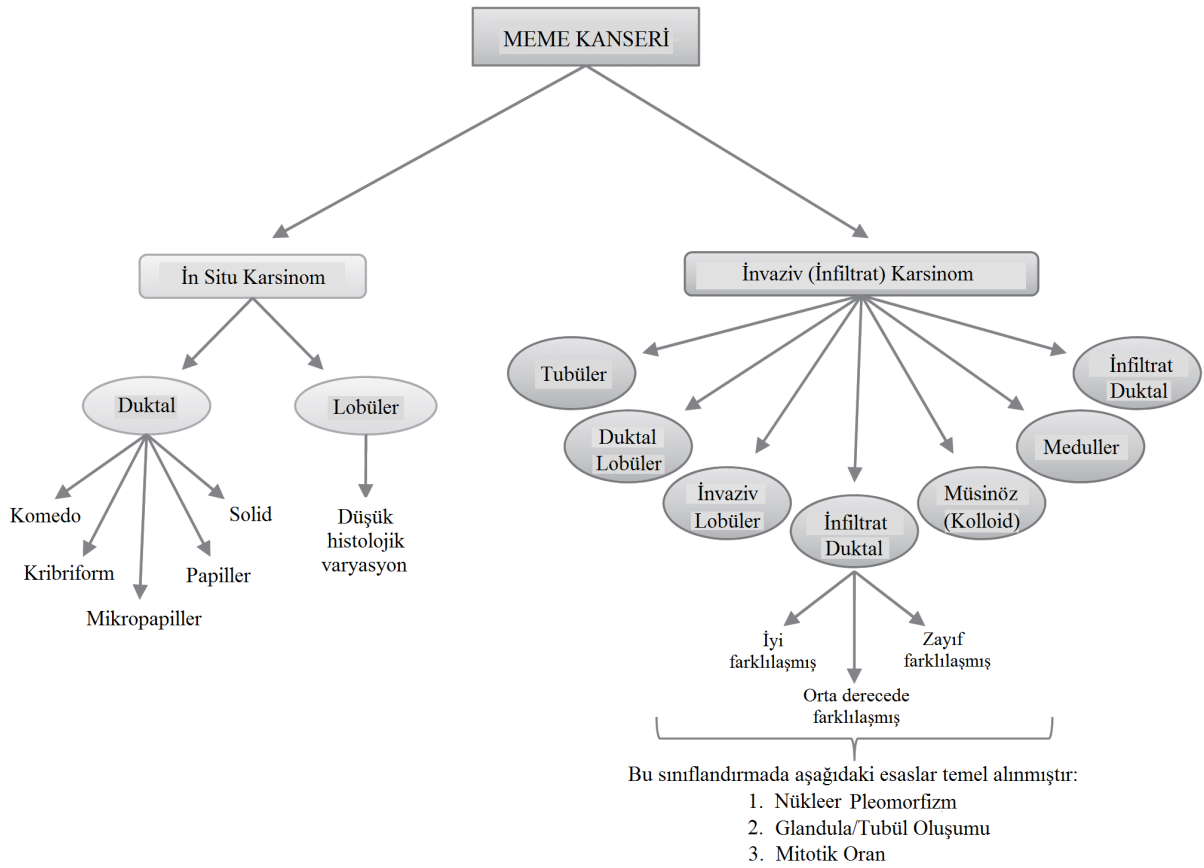
Erkeklerde meme tümörleri %0.5 ile %1 arasında değişen insidans oranları ile nadir olarak görülmektedir (27, 28). Amerika'da her yıl yaklaşık 2,140 vakaya erkek meme kanseri tanısı konmakta; yıllık ölümlerin sayısı ise 450'ye ulaşmaktadır (29). Kadınlarda görülen meme kanserine benzer özellikte yaş ile birlikte erkek meme kanseri riski de artmaktadır (27, 30). Ancak; erkeklerde kadınlara göre diağnoz yaşı daha geç olmakla birlikte (27, 30-31), kadınlardan farklı olarak erkek meme tümörlerinin %50'si evre 3 veya evre 4 olup agresif özellik göstermektedir (32).

Meme kanseri, farklı biyolojik davranışlar gösteren, farklı klinik-patolojik ve moleküler karakteristik özelliklere sahip çok sayıda alt tipi bulunan heterojen bir malignansidir. Bu alt tiplerin meme kanseri tedavisine verdikleri yanıt ve gösterdikleri prognoz da birbirinden belirgin bir biçimde ayrılmaktadır (33). Meme kanserinin farklı davranışlarını ve farklı tedavi seçeneklerine yanıtlarını belirleyen tümör çapı, tümör evresi, hasta yaşı, aksiler lenf nodlarının tutulumu ve hormon reseptörlerinin durumu gibi çok sayıda özellik günümüzde meme kanseri tanısında kullanılmakta olup temel prognostik faktör olarak saptanmıştır (34, 35).

Hastalığın prognozu ve buna yönelik uygun tedavi yaklaşımının ortaya konması adına meme kanserli hastaları farklı risk kategorisine ayırmada kullanılan klinik ve patolojik özellikteki bu faktörler, bireysel açıdan hastalığın prognostik özelliğini belirlemede ve risk değerlendirmesinde yetersiz kalmaktadır (34). Bu açıdan, bireye özgü yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, meme tümörlerinin özelliklerinin iyi anlaşılması ve buna paralel olarak hastalara uygulanacak tedavi protokolünün belirlenmesinde, meme tümörlerinin moleküler düzeydeki sınıflandırmalarının gerekliliği ortaya konmaktadır (35).

2.5. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması

Meme kanserinin histolojik yapısı in-situ karsinom ve invaziv (infiltrat) karsinom olmak üzere başlıca iki kategoride incelenmektedir. İn-situ meme karsinomu, büyüme paternleri ve sitolojik özellikleri ile birbirinden ayrılan duktal veya lobüler şeklinde iki alt grup ile sınıflandırılmaktadır. İn-situ duktal karsinom, lobüler karsinoma göre daha yaygın görülmekte ve heterojen özellikteki tümör gruplarının yapısal açıdan farklılık gösterdiği beş farklı alt sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; Komedo, Kribriform, Mikropapiller, Papiller ve Solid alt sınıflarıdır (Şekil 4) (36, 37).



Şekil-4 Meme kanseri alt tiplerinin histolojik sınıflandırılması (37)

Kanser hücresinin lenf ve kan damarları aracılığı ile çevre dokulara metastaz yapma eğilimi, invaziv (in-situ olmayan) özelliğini göstermektedir. İnvaziv meme karsinomları in-situ karsinoma benzer özellikte, histolojik alttiplere farklılaşan heterojen yapıdaki tümörlerdir. Bu grupta yer alan major tümör tipleri; infiltrat duktal, invaziv lobüler, duktal/lobüler,

müsinöz (kolloid), tubüler ve meduller meme karsinomlarını içermektedir (Şekil 1) (37). Bunlar arasında, invaziv (infiltrat) duktal meme kanseri tüm invaziv lezyonların %70-80'ini oluşturan en yaygın alt tiptir (38). İnvaziv duktal karsinom ile ilgili olarak tümör gruplarının moleküler evrelerine göre değişik ölçülerde farklılaştığı ve bu farklılaşmada nükleer pleomorfizm, tubül oluşumu ve mitotik index seviyelerinin etkili olduğu bilinmektedir (39).

2.6. Meme Kanserin Moleküler Sınıflandırılması

Mikroarray çalışmaları ile gerçekleştirilen gen ekspresyon profillerinin analizi sonucu meme kanserinin farklı moleküler alttipleri tanımlanmıştır (40, 41) (Şekil 5). Klinik açıdan değişen ölçüde heterojenite gösteren meme karsinomu; hormon reseptör pozitif ve hormon reseptör negatif olmak üzere temelde iki moleküler sınıf ile kategorize edilmektedir. Hormon reseptör pozitif meme kanserleri kendi içerisinde Luminal A ve Luminal B olarak adlandırılan alt tiplere ayrılmaktadır. HER-2 pozitif ve bazal-benzeri gruplar ise hormon reseptör negatif meme kanserleri içerisinde tanımlanan major moleküler alttiplerdir (34). Bunun yanında bazı çalışmalarda; Luminal A, Luminal B, *HER-2* pozitif ve bazal-benzeri gruplara göre klinik açıdan daha zayıf ölçüde nitelendirilen Luminal C ve normal meme-benzeri moleküler alttiplerden de bahsedilmektedir (42-48). Meme kanserinin moleküler sınıflandırılmasında tanımlanan bu gruplar, gen ekspresyon paternleri, klinik özellikleri, tedaviye yanıt ve prognoz gibi faktörler açısından birbirinden farklılık göstermektedir (34).

2.6.1. Luminal A

Luminal tipteki tümörler, luminal sitokeratinleri ve normal meme dokusuna ait luminal epitelyal hücrelerin genetik markırlarını yüksek seviyede eksprese eden tümörlerdir (49). Bu sınıftan olan Luminal A tipi tümörler; meme kanserleri içerisinde %50-60 oranı ile en yaygın görülen alt gruptur (37). Patolojik olarak düşük histolojik evre ve iyi ölçüde farklılaşma özelliği ile karakterize edilmektedir. Östrojen reseptörü (ER) pozitifliği progesteron reseptörü (PR) pozitifliğine göre daha çok görülmekle birlikte *HER-2* ekspresyonu gözlenmemektedir. Ayrıca, hücresel proliferasyon aktivitesini belirten Ki67 indexi genellikle düşük düzeyde olup %14'ün altındadır (34). Luminal A alt grubunu temsil eden tümörler iyi prognoz özelliği ile nitelendirildikleri gibi antiöstrojenlere karşı hassasiyet gösterip endokrin tedaviye olumlu yanıt vermektedir (47).

2.6.2. Luminal B

Tüm meme kanserleri içerisindeki görülme oranı %10 ile %20 arasında değişiklik gösteren ve prognostik olarak orta düzeyde sınıflandırılan alt gruptur (37). Luminal B tipi tümörlerin moleküler profilleri genel olarak ER ve/veya PR ekspresyonu, *HER-2* ekspresyon varlığı, yüksek histolojik evre ve yüksek derecede proliferasyon özelliği ile karakterizedir. Luminal B alt tipi, luminal A alt tipine benzemekle birlikte Luminal A tipi tümörlerden daha agresif fenotip, yüksek histolojik evre ve daha kötü prognoz özelliği ile ayrılmaktadır. Bu yüzden iki alt tip arasında belirleyici biyobelirteçleri bulmaya yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Bu grupta yer alan tümörlerin immünohistokimyasal tanımlanmasında ER,PR ve *HER-2*'nin yanında Ki67 proliferasyon indexinin de değerlendirilmesi daha doğru sonuç vermektedir. *HER-2* gen ekspresyonu Luminal B tipi tümörlerin yaklaşık %30'nda gözlenmekte olup *HER-2* ekspresyonu görülmeyen tümörlerde yüksek Ki67 proliferasyon oranı (>%14) belirtilmektedir. Tamoksifen ve aromataz inhibitörleri ile tedavi mümkün olmasına rağmen endokrin tedavi Luminal A grubu tümörlerde olduğu kadar başarılı değildir. Meme kanserinin bu alt grubunun tedavisi halen zor olmakla birlikte, kemoterapiye yanıtta Luminal A alt tipine kıyasla daha olumlu sonuçlar alınmaktadır (34).

2.6.3. *HER-2* Pozitif

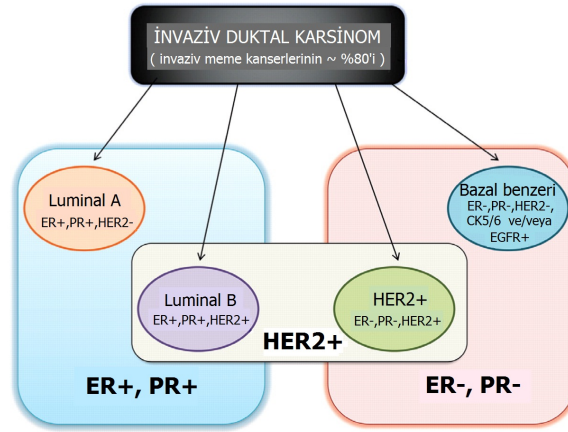
Bu sınıfta yer alan tümörler, tüm meme karsinomlarının %15'ini temsil etmekte olup *ERBB-2* (*HER-2/Neu*) geninin aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonuna karşılık steroid hormon reseptörlerinin (ER veya PR) ekspresyon yokluğu ile karakterize edilmektedir. *HER-2* pozitif tümörlerin patolojik açıdan kötü derecede farklılaşma özelliğinde ve lenf nodlarına metastaz yapma eğiliminde olduğu bilinmektedir (40). Moleküler histolojik evresi yüksek (%75'den fazla) olan bu tümörlerin proliferasyon aktiviteleri de artmış olup agresif nitelikleri ön plana çıkmaktadır. Luminal gruptaki tümörlere göre klinik açıdan daha kötü prognoz özelliği göstermektedir. *HER-2* pozitif meme karsinomlarının tedavisinde trastuzumab (Herceptin) adı verilen anti-*HER2* terapisi ve antrasiklin temelli kemoterapi seçenekleri büyük ölçüde başarı sağlayan uygulamalardır (34).

2.6.4. Bazal Benzeri

Hormon reseptörleri negatif meme kanserleri grubunda yer alan bu tümörler, tüm meme kanserlerinin %10-20'sini temsil etmektedir (40). Bazal fenotip gösteren meme karsinomları, diğer moleküler alt tiplerden farklı olarak gen ekspresyon profillerinin

değerlendirilmesi ile keşfedilmemiş; yaklaşık 30 yıl önce patologlar tarafından tanımlanmıştır (50). Bu sınıf içerisinde tanımlanan tümörlerin büyük çoğunluğu yüksek histolojik evre, solid yapı, genişken sınır ve nekroz ya da merkezi fibrotik odak alanı özelliklerini taşıyan invaziv duktal meme kansinomlarından oluşmaktadır (51-53). İmmünohistokimyasal çalışmalarda bazal benzeri alt grubu tanımlamada genellikle östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER-2 proteinin ekspresyon yokluğu (triple-negatif) ön plana çıkmaktadır. Bunun yanında epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*) ve bazal sitokeratinlerden sitokeratin 5/6 (*CK 5/6*) gibi belirteçlerin pozitif ekspresyonları görülmektedir. Ayrıca, kalıtsal *BRC1A1* gen mutasyonu taşıyan bireylerde bazal benzeri meme kanseri geliştiği bildirilmiştir (34).

Prognoz açısından en kötü grup içerisinde *HER-2* pozitif meme kansinomu tipi ile birlikte yer almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazal benzeri meme kansinomlarının histolojik özellikleri, gen ekspresyon profilleri ve klinik özellikleri bakımından heterojen bir grup olduğu ve kötü prognoz özelliğinin hastalar arasında eşit derecede olmadığı belirtilmektedir (54-57). Bu gruptaki hastalarda tedavi seçeneği kısıtlı olup endokrin tedavi veya anti-HER2 terapisinden yanıt alınmamakta ancak; platinyum temelli kemoterapi veya PARP inhibitörleri ile yapılan uygulamalardan bahsedilmektedir (34).



Şekil-5 Meme kanserinin farklı moleküler alttiplerinin şematik gösterimi (41)

2.7. Meme Kanserinin Genetiği

2.7.1. Meme Karsinogenezinde Genlerin Rolü

Meme kanseri tümör oluşum süreci, adım adım ilerleyen çok aşamalı karsinogenez modeli olarak tanımlanmaktadır (58). Tümör gelişim sürecinin klasikleşmiş bu modelinde, normal epitelyal hücrenin premalign atipik hücreye dönüşümü, ardından klonal büyüme ile premalign lezyona ve in situ karsinom olarak adlandırılan evreye geçiş gerçekleşmektedir. İn situ karsinom olarak oluşan lezyonlar invaziv hale dönüştükten sonra lenf ve kan damarları aracılığı ile yayılarak immün sistemi etkisiz hale getirmekte ve metastatik süreci başlatmaktadır. Tümörigenez süresince gerçekleşen her adımda tümör hücresine seçici bir avantaj sağlayarak büyüme ve yeni özellikler kazandıran önemli genetik olaylar meydana gelmektedir. Bu genetik olaylar küçük nokta mutasyonları, kromozomal delesyonlar, translokasyonlar ve amplifikasyonlar şeklinde olabileceği gibi kromozom kayıpları veya duplikasyonlar gibi geniş ölçüdeki değişiklikleri de içermektedir. Meydana gelen genetik değişimler, gen ekspresyonlarında bazı modifikasyonlar veya gen ürünlerinin fonksiyonel değişimi ile sonuçlanmakta ve tümör progresyonuna yol açmaktadır (59).

Genetik varyasyonların büyük bir kısmı sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken (somatik mutasyon) daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan maligniteler (germ-line mutasyon) kalıtsal özellik taşımaktadır. Genomdaki bu kalıtsal ve kalıtsal olmayan genetik değişimler, belirli hücresel olaylarda farklı etkiler gösteren onkogenler, tümör supresör (baskılayıcı) genler ve DNA tamir genleri olmak üzere üç grup gen sınıfı ile ilişkilendirilmektedir. Onkogenler, normal ölçüde fonksiyon gösteren proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Proto-onkogenler, hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve programlanmış hücre ölümü olan apoptoz için aldıkları iletileri hücre membranından başlamak üzere çekirdeğe kadar sürdürdükleri sinyal ileti mekanizmasında işlev gören birçok proteinin ekspresyonundan sorumlu olan genlerdir. Eğer bir mutasyon sonucu proto-onkogenin yapısı değişirse oluşan hasar genin, dolayısı ile gen ürününün yapısının değişmesine neden olur ve çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar ve malignite ortaya çıkar. Onkogenler hücre büyümesini hızlandırarak kanser oluşumuna neden olan genlerdir şeklinde tanımlanabilir (60).

Kanser oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu birbiriyle zıt yönde çalışarak karsinogenezde rol

alırlar. Tümör baskılayıcı genler; hücrenin büyüme, bölünme ve ölümüne neden olan faktörleri önleyen proteinleri eksprese etmektedir. Böylece hücre büyümesinde görev alan genlerin kontrolü sağlanarak tümör oluşumu inhibe edilmektedir. Genomda meydana gelen genetik değişimler sonucu bu genlerin yapısında ve fonksiyonunda hasar oluştuğunda büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser gelişimi söz konusu olmaktadır. Karsinogenez sürecinde proto-onkogenlerin aktivasyonu ile onkogenler oluşurken, tümör baskılayıcı genler inaktive olduklarında kanser oluşumuna yol açmaktadır (61).

Meme kanserinin gelişiminde üçüncü gen grubu olarak DNA onarımı ve kromozom bütünlüğünün korunmasında işlev gören DNA tamir genleri yer almaktadır. Kromozomların yapısında, organizmanın canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik bilginin taşındığı çift iplikli temel kalıtım molekülü olarak tanımlanan DNA; iyonlaştırıcı radyasyon, ultraviyole ışık ve çeşitli kimyasallar gibi çevresel faktörler ile zarar görmektedir. Bunun yanında DNA replikasyonu sırasında oluşan hatalar da mutasyonlara neden olmaktadır. Hücrede DNA hasarının onarılmasına yönelik, meydana gelen mutasyonları en aza indirgeyen belirli DNA tamir genleri bulunmaktadır. Bu genlerde ve gen ürünlerinde oluşan mutasyonlar DNA onarımını engelleyerek hücrede mutasyonların artarak birikimine sebep olmaktadır (62). Belli bir aşamadan sonra oluşan DNA hasarının miktarı hücrenin onarım kapasitesini aşıp DNA replikasyonu sırasında onarılamayan lezyonlar mutasyonların başlıca kaynağı durumuna gelmekte ve genomik instabilite gelişmektedir (63). Bu şekilde hücrede mutasyonların birikmesi kansere yol açan değişikliklere neden olmakta ve hücrenin kanserleşmeye doğru yönelimini arttırmaktadır (62). Böyle bir durumda sıklıkla mutasyona uğrayan genler için mutator genler ifadesi kullanılmaktadır. DNA onarımı veya genomik stabilitenin devamlılığında işlev gören genlerde meydana gelen mutasyonların sonucunda ise mutator fenotip oluşmaktadır. Buradan kanser hücreleri mutator fenotip göstermektedir şeklinde bir çıkarım yapılabilmektedir (63).

2.7.2. Meme Kanserinde Etkili Olan Onkogenler

Meme kanseri üzerinde yapılan genomik analizler, meme tümörü oluşumunun bazı onkogenlerin aktivasyonuna yol açan çeşitli genetik değişimler ile ilişkili olduğunu belirtmektedir. Onkogenlerin aktive edilmesi başlıca gen amplifikasyonu, nokta mutasyonları veya kromozomal translokasyon mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (64). Tüm bu mekanizmalar sonucu ortaya çıkan onkogenlerin ürünleri hücrede yerleştikleri yerlerde özel

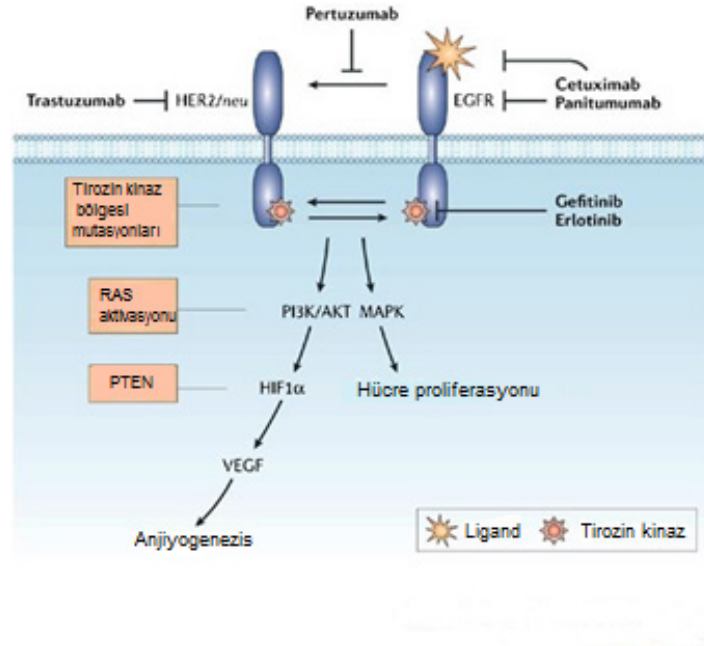
fonksiyonlar göstererek hücrenin fizyolojik aktivitesinde değişiklikler meydana getirmektedir. Meme kanserinde genetik mekanizmalar tarafından etkilenen hücresel yollar ve biyolojik süreçler birbirleriyle sıkı bir etkileşim halinde olduğundan hastalığın tanı (diagnoz) ve tedavi yaklaşımına yönelik uygulamalarda olası zorluklar söz konusu olmaktadır. Amplifikasyon, delesyon, nokta mutasyonu, kromozomal translokasyon ya da insersiyonel mutagenез yolu ile meme karsinogenezinde etki gösteren belirli spesifik onkogenler vardır. Bunlar; *cerbB-2* (veya *HER2/neu*), *c-myc*, *CCND1* (Cyclin D1), *Cyclin E* ve *RAS* genleri şeklindedir (60, 64). Bu genlerin dışında meme kanserinin büyümesinde ve proliferasyonunda etkili olan *EGF*, *VEGF*, *TGF*, *IGF* ve *FGF* gibi büyüme faktörleri ve büyüme faktörlerine ait reseptörler de onkogenik özellik göstermektedir. Steroid hormon reseptörleri grubuna dahil edilen östrojen hormonu reseptörü (ER), progesteron hormonu reseptörü (PR) ve androjen hormonu reseptörü (AR); meme dokusu ve kanserli hücrelerin büyüme ve gelişmesinde etkili temel moleküller olarak ayrı bir kategoride sınıflandırılmaktadır.

2.7.2.1. *cerbB-2* (*HER2/neu*) Onkogeni

HER-2 (human epithelial receptor 2, *HER-2/neu* veya *cerbB-2*) geni 17.kromozomun q12 kolunda lokalizasyon göstermekte ve 185 kDa büyüklüğünde transmembran tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörü kodlamaktadır (64, 65). Reseptör tirozin kinazlardan (RTK) *ERBB* gen ailesi birbiriyle ilişkili dört farklı üye içermektedir. *HER-2*'nin de içinde yer aldığı bu gen ailesinin üyeleri arasında *EGFR* (epithelial growth factor receptor), *ErbB2* (*Neu*, *HER-2*), *ErbB3* (*HER-3*) ve *ErbB4* (*HER-4*) genleri bulunmaktadır (66, 67). Hücre membranındaki büyüme faktörü reseptörleri, spesifik ligandlara bağlanarak ya da yeterli reseptör varlığında dimerizasyon ve reseptör otofosforilasyonu ile aktivasyon göstermektedir. Büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu sonucu hücrede çeşitli metabolik yolları etkileyen ard arda çok sayıda genetik aktarım olayı gerçekleşmektedir. *cerbB-2* geni bu şekilde etkin hale gelerek, hücrede proliferasyon, anjiyogenez (damarlanma), değişen hücre-hücre etkileşimleri, artan hücre motilitesi (hareket yeteneği), metastaz ve apoptoza karşı direnç gibi biyolojik süreçleri tetikleyen *MAPK* (mitogen activated protein kinase) ve *PI3K* (phosphotidil inositol 3 kinase)/*AKT* sinyal yollarını harekete geçirmektedir (Şekil 6) (64, 68, 69).

cerbB-2, meme kanseri araştırmalarında ve tedavisinde en yoğun çalışılan onkogenlerden biridir. *cerbB-2* gen amplifikasyonu ve overekspresyonunun (aşırı ekspresyon) meme karsinomlarının %20'si ile %30'u arasında değişen oranda görülmesi bu genin meme kanserinde büyük önem taşıdığını göstermektedir (67, 70, 71). Agresif meme

tümörleri ile yapılan ekspresyon çalışmalarında özellikle yüksek histolojik evreli invaziv duktal karsinom olmak üzere birçok in situ ve invaziv duktal karsinomda yüksek seviyede *cerbB-2* gen ekspresyonu belirtilirken hiperplazi ve displazi gibi benign meme hastalıklarında nadir olarak gözlenmektedir (67, 72, 73). Lenf nodu pozitif ve lenf nodu negatif primer meme tümörlerinde fazla miktarda eksprese olan *HER-2* geni klinik açıdan kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir (67, 73-75). Ayrıca erken evre meme kanserli hastalarda yüksek derecede rekürens riski, hormonal tedaviye ve antrasiklin harici kemoterapiye karşı direnç artışı ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanında *HER-2* geni overeksprese olan meme tümörlerinin doksorubisin ve bazı çalışmalarda taksan tedavisine karşı yüksek seviyede hassasiyet gösterdikleri sonucuna varılmıştır (64, 76). Bu açıdan prognostik özelliğinin yanı sıra terapötik uygulamalarda da etkili olduğu ve prediktif bir markır niteliği taşıdığı dikkat çekmektedir (64, 77).



Şekil-6 ERBB gen ailesi ile ilişkili genetik değişimler ve terapötik hedefler (69)

HER-2 geninin meme kanseri tedavisinde prediktif bir biyomarkır olarak nitelendirilmesi anti-*HER-2* temelli terapi yaklaşımları sayesinde mümkün olmaktadır. Anti-*HER-2* tedavisi olarak bilinen trastuzumab (Herceptin), *HER-2* proteininin ekstrasellüler bölgesini hedef alan rekombinant monoklonal bir antikordur (64, 78). Antikorlar, büyüme faktörü reseptörlerinin ekstrasellüler domain kısımlarına bağlanarak aktivitelerini baskılayan ve büyümeyi inhibe eden moleküllerdir (64, 79). Trastuzumab monoklonal antikoru, hücre sinyalleri üzerinde

düzenleyici fonksiyon göstermekle birlikte etki mekanizması immünolojik etkiler şeklinde de olabilmektedir (64, 80). Buna göre *HER-2* pozitif meme kanserli hastalarda adjuvant Herceptin kullanımı klinik açıdan hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım üzerinde olumlu gelişmeler sağlamaktadır (81-84). Yapılan çalışmalarda trastuzumab ile meme kanserinde kullanılan diğer kemoterapötik konvansiyonel ajanların (platinum, docetaxel, vinorelbine) birlikte kombine edildiğinde sinerjistik etki göstererek hastalık progresyonu, tedaviye yanıt ve sağkalım üzerinde önemli ölçüde ilerleme kaydettiği kanıtlanmıştır (85). Bu şekilde, büyüme faktörü reseptörlerinin içinde yer aldığı sinyal yollarının, hormon reseptör sinyali ve DNA onarımı gibi süreçleri kapsayan moleküler yollar ile etkileşim gösterdiği izlenimi öne sürülmektedir (64).

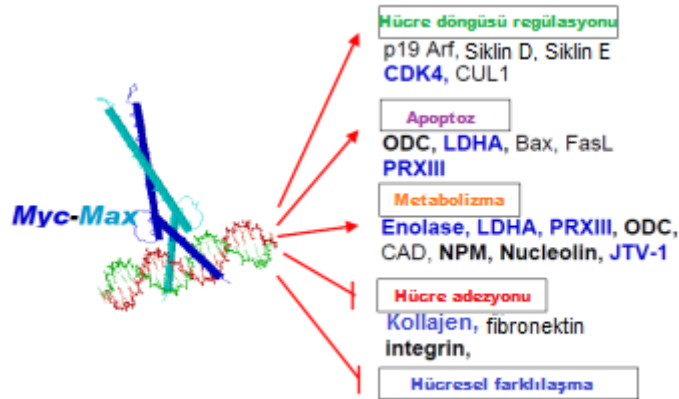
2.7.2.2. *c-Myc* Onkogeni

c-Myc onkogeni, 8q24 kromozom bölgesinde lokalize olmuştur ve hücre proliferasyonu, transformasyon ve apoptoz olaylarında görevli transkripsiyonel düzenleyici faktör rolünde *c-Myc1*, *c-Myc2* ve *c-MycS* olmak üzere üç farklı nükleer fosfoprotein kodlamaktadır (86-88). *c-Myc2*, birçok çalışmada ‘*c-myc*’ olarak adlandırılan, üç farklı protein içinden major form olarak nitelendirilen, 62 kD büyüklüğündeki bir proteindir. Proteinin amino ucundaki (N-terminal) transaktivasyon domaini olan TAD kutusu içerisinde *Myc* gen ailesi üyeleri arasında yüksek derecede korunmuş iki homolojik yapı (MBI ve MBII) bulunmaktadır. Karboksil ucu (C-terminal) ise, temel bölge (basic region, BR) ve bu bölge ile bağlantılı olan helix-loop-helix/leucine zipper (HLH/LZ) domain yapısını içermektedir (89). *c-Myc* proteini HLH/LZ domaini boyunca Max adı verilen diğer bir transkripsiyon faktörü ile heterodimer yapı oluşturmakta, oluşan bu *c-myc/Max* kompleksi E-kutusu (E-box) olarak isimlendirilen spesifik DNA tanıma dizisine bağlanmaktadır (86, 87, 90, 91). Düzenleyici bölgelerinde E-box yapısını içeren genler *c-Myc*'in hedef genleri arasında olup bu şekilde *c-Myc/Max* kompleksi tarafından transaktivasyon veya transrepressiyon mekanizmalarına tabi tutulmaktadır. *c-Myc* bu mekanizmalar aracılığı ile farklı hücre fonksiyonları (hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, hücre adezyonunun inhibisyonu ve hücre farklılaşma) ile ilişkili genleri hedef alarak fonksiyon göstermektedir (Şekil 7) (92, 93).

c-Myc, hücre döngüsünün G1 ve S fazları arasındaki geçiş mekanizmasında düzenleyici görev yapan siklin ve sikline bağımlı kinaz proteinlerinden *cyclin D1* ve *D2*, *cyclin E*, *CDK2*, *CDK4* ve *p27* gibi genleri aktive veya inhibe ederek hücre metabolizmasını hızlandırıp hücre proliferasyonu ve genomik instabiliteye neden olmaktadır. Apoptotik süreçte ise IL-3 proteini

ile ilgili olan çalışmalar *c-Myc* geni ile apoptoz arasındaki ilişkide ilk yapılan araştırmalardan biri olmuştur. IL-3 proteini yokluğunda artan *c-Myc* ekspresyonu, hücre çevriminde S fazına geçişi gerçekleştirerek hücre ölüm oranını hızlandırmaktadır (93).

Meme kanserlerinin %15-25'inde *c-Myc* gen amplifikasyonu ve overekspresyonu görülmektedir (94). Bu durum meme tümörlerinde kötü prognoz veya agresif klinik özellikler ile ilişkilidir (95). Birçok araştırmacı meme kanseri ile *c-Myc* overekspresyonu arasında net bir ilişki olduğunu savunmasına rağmen, aberant *c-Myc* ekspresyonunun tek başına meme karsinogenezi için yeterli olup olmadığına dair tartışma yaratan fikirler de bulunmaktadır. Berns ve arkadaşlarının primer meme kanserli hastalarda *c-Myc* gen amplifikasyonunu değerlendirdikleri bir çalışmada, *c-Myc* geni amplifiye olan ve özellikle lenf-nodu negatif ve steroid hormon reseptörü pozitif primer meme tümörlü hastaların 5 yıllık sağkalım sürecinde hastalısız sağkalım süresinin kısa olduğunu vurgulamışlardır. *c-Myc* geni bu açıdan meme kanserinde prognostik bir belirteç olarak nitelendirilmektedir (96). Terapötik önemi ele alındığında ise meme tümörlerinin hormon tedaviye verdiği yanıt ve kemoterapi dirençliliği konusunda *c-Myc* geninin rolü olduğu düşünülmektedir (97). Ayrıca, ailesel meme kanseri ile ilişkili olan tümör baskılayıcı gen özelliğindeki *BRCA1* geninin de (98), *c-Myc* ekspresyonu üzerinde önemli sayılabilecek etkileri bulunmaktadır. *BRCA1* geni fiziksel açıdan *c-Myc* proteinine bağlanıp transkripsiyonel aktivitesini baskılayabilme özelliğinde olduğundan, bu gende meydana gelen genetik kayıplar artan *c-Myc* aktivitesi ile birlikte meme kanseri hücrelerinin transformasyon potansiyelini hızlandırmaktadır (99).

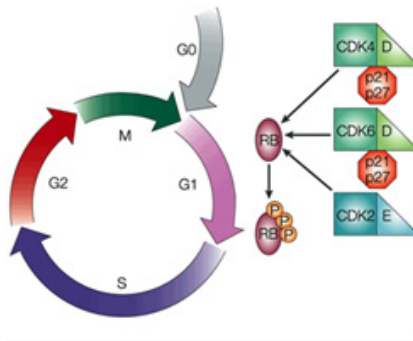


Şekil-7 Myc/Max (E box) yapısının hedef aldığı genler ve hücresel fonksiyonlar (93)

2.7.2.3. Siklinler ve Hücre Döngüsünün Düzenleyici Elemanları

Hücre döngüsü ve aktif proliferasyon (çoğalma) süreci farklı proteinler tarafından denetlenen düzenleme mekanizmalarına tabidir. Bu süreçte siklin proteinleri, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) olmak üzere hücre döngüsünü doğrudan kontrol eden proteinler rol oynamaktadır. CDK proteinleri, hücre döngüsünün safhaları boyunca stratejik olarak yerleşen, siklinler tarafından pozitif yönde, CDKI proteinleri tarafından ise negatif yönde düzenlenerek fonksiyon gösteren bir grup proteini içermektedir. Bu proteinler aktive edildiklerinde, başta hücre döngüsünün G0 adı verilen dinlenme fazından aktif döngü ve mitoz bölünme sürecinin başladığı S fazına geçişinde bekçi rolünde görev yapan Retinoblastoma (*pRb*) geni olmak üzere hücre döngüsündeki diğer tümör baskılayıcı proteinlerin fosforlanmasına ve inaktivasyonuna yol açmaktadır (Şekil 8) (100). *Siklin D* (*Cyclin D*) ve *Siklin E* (*Cyclin E*) gen ekspresyon seviyeleri hücrenin G1'den S fazına ilerleyişinde anahtar rol oynayarak hücre döngüsüne göre değişiklik göstermektedir (64, 101).

Siklin D1 proteinini kodlayan gen, 11q13 kromozom bölgesinde lokalize olmuştur. İnvaziv meme kanserlerinin %40-50'sinde aşırı eksprese, %10-20'sinde ise amplifiye şekilde bulunmaktadır (64, 102). *Siklin D1*, kendine özgü CDK proteini ile kompleks oluşturduğunda, *Rb* tümör baskılayıcı genin fosforlanması ile transkripsiyon faktörü *E2F* serbest kalarak DNA sentezi için gerekli proteinler uyarılmış olmaktadır. Bu şekilde hücre G0 fazından mitoz evresine geçiş yapmaktadır (64). *Siklin-D1*, ER ve PR ekspresyon seviyeleri ile güçlü pozitif korelasyon gösterip östrojene duyarlı hücrelerin proliferasyonunu düzenleme yeteneğine sahiptir. *Siklin-D1*' in aşırı ekspresyonunun yanısıra amplifikasyonu, erken nüks ve kötü prognoz ile ilişkili olup, hormon reseptör pozitif hastalarda prediktif faktör olarak nitelendirilmektedir (103).



Şekil-8 Ökaryotik Hücre Döngüsü (100)

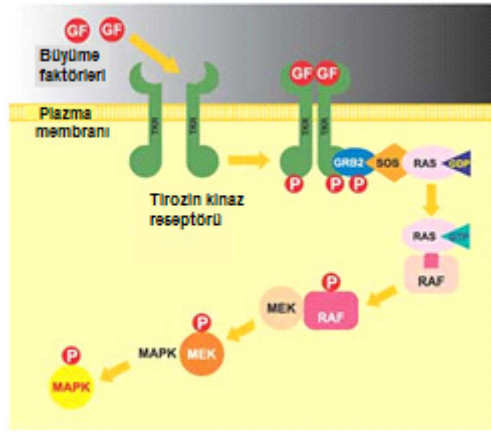
Hücre döngüsünde görev yapan diğer bir siklin proteini olan Siklin E ise, 19q12 kromozom bölgesinde bulunmaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık %2'sinde amplifikasyonlar şeklinde aktive olurken, %20-30'unda aşırı derecedeki ekspresyonları görülmektedir (104). Hücrede fazla miktarda eksprese olduğunda *Siklin D1*'deki mekanizmaya benzer şekilde *pRb* ve diğer bazı nükleer proteinlerin hipofosforilasyonuna ve proliferasyon aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. *Siklin D1* ile karşılaştırıldığında, *Siklin E1* ekspresyonu yüksek olan tümörler daha yüksek evre ve proliferasyon indexi ile birlikte hormon reseptörü negatif ve oldukça kötü prognoz özelliği göstermektedir (104, 105).

2.7.2.4. RAS ONKOGENİ

RAS ailesine ait olan genler; hücrel proliferasyon ve farklılaşma, hücre iskeletinin organizasyonu ve membran trafiği gibi birçok hücrel süreci düzenlemekle görevli guanozin 5'-trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinleri kodlayan 21 kilodalton (kD) büyüklüğündeki genlerdir. Memelilerde bu gen ailesinin bilinen üyeleri sırasıyla 1,11 ve 12. kromozomlarda yer alan *N-RAS*, *H-RAS* ve *K-RAS* genleridir (106). Meme kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmalar, *K-RAS* genindeki mutasyon oranının %13'e eşit olduğunu ve *K-RAS* mutasyonlarının meme tümörlerinde genellikle nadir olarak görüldüğünü belirtmektedir. Literatürde *RAS* genleri mutant olan iki farklı meme kanseri hücre hattı tanımlanmıştır. Bunlardan biri *K-RAS* G12C ve *N-RAS* Q61R mutasyonlarını taşıyan SK-BR-7 hücre hattı; diğeri ise *K-RAS* G13D ve *BRAF* G464V mutasyonlarını taşıyan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattıdır. *RAS* genlerinin dışında Rho ve Rac proteinleri ile birlikte *CDC42* ve *TC10* genlerini içeren Rho ailesi üyelerinden de bahsedilmektedir. Transformasyon potansiyeli yüksek olan Rho ailesi proteinleri, aynı zamanda hücre iskeleti organizasyonunun anahtar düzenleyicileri görevindedir. Yapılan çalışmalarda bu GTPaz ailesi tarafından oluşturulan sinyallerin hücrel invazyon ve metastazı etkilediğine dair bulgular elde edilmiştir (107). Zhao ve arkadaşları (108), *RHOA* geninin hücrel transformasyon ve meme kanseri ile ilişkili birçok yolda değişiklikler oluşturarak insan meme epitelyal hücrelerinde preneoplastik transformasyonu indüklediğini göstermişlerdir. Hücrel özelliklerine rağmen *RHO* gen ailesinin meme kanserinde Ras proteinleri ile aynı ölçüde dikkat çekmediği görülmektedir.

Meme kanserlerinde *RAS* geninin mutasyonlar ile gerçekleşen aktivasyon mekanizması nadir olarak görülmekte olup, hücrede fazla miktarda eksprese olan veya regülasyonu

bozulmuş tirozin kinaz genleri aracılığı ile normal Ras aktivitesinin upregulasyonuna daha çok rastlanılmaktadır (107). *RAS* geni, *RAS-RAF-MAP* Kinaz sinyal yolağında genellikle plazma membranındaki büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmik parçalarına yakın bölgeye yerleşip GTP ile aktifleştikten sonra tirozin kinazlar ile ilişkiye girerek sinyal iletiminde önemli aracı molekül görevini üstlenmektedir (Şekil 9) (109). Bu sinyal yolağında yer alan proteinler birbirleriyle etkileşime girerek çeşitli mutasyon, amplifikasyon ya da gen ekspresyon mekanizmaları ile *RAS* geninin aktivasyonuna neden olmaktadır. (110).



Şekil-9 *RAS-RAF-MAPK* sinyal yolağı (109)

2.7.3. Meme Kanserinde Etkili Büyüme Faktörleri ve Büyüme Faktörü Reseptörleri

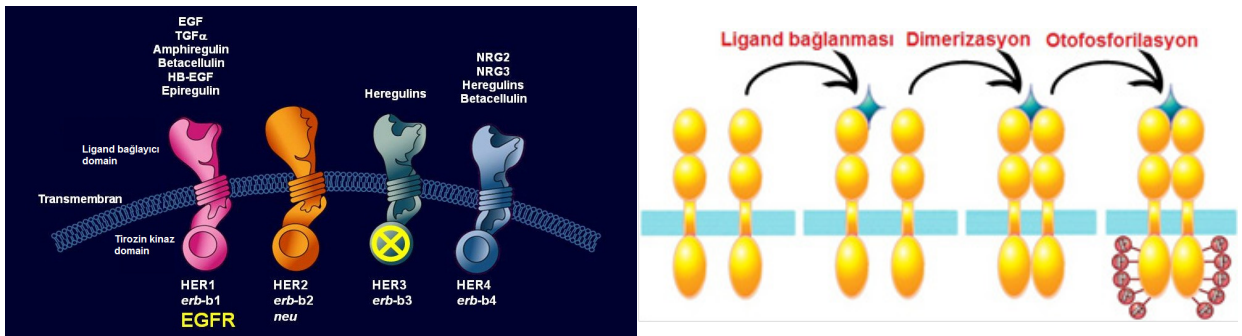
Hücrede kansere yol açan değişimlerin büyüme faktörü sentezinde artış ya da büyümeyi inhibe eden faktörlerin sayısında azalmaya bağlı olduğu iddia edilmiştir. Başlıca büyüme faktörü aileleri; *EGF* (Epidermal Büyüme Faktörü), *TGF* (Transforming Büyüme Faktörü), *IGF-I* (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1), *IGF-II* (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2), *VEGF* (Vaskular Endotelial Büyüme Faktörü), *PDGF* (Trombosit Türetilen Büyüme Faktörü) ve *FGF* (Fibroblast Büyüme Faktörü) aileleridir. Büyüme faktörleri, kendilerine ait reseptörlere bağlanarak işlev görmektedir. Plazma membranında bulunan tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörleri, spesifik ligandlara bağlanarak dimer oluşturmakta ve fosforilasyon mekanizması ile aktivasyon göstermektedir. Büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu sonucu hücrede çeşitli sinyal yollarını etkileyen ard arda çok sayıda genetik değişim ve biyolojik olay meydana gelmektedir (86). Meme kanserinde etkili büyüme faktörü reseptör ailelerinden en önemlileri *EGFR* diğer adıyla *HER* ailesi olarak bilinen reseptörlerdir. Büyüme faktörleri grubunda yer alan ve *VEGFR* adlı reseptörü kodlayan *VEGF* geni ise

tümör hücrelerinin anjiogenezinde (damarlanma) görev aldığından meme kanserinde ayrı bir öneme sahiptir.

2.7.3.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

Moleküler onkoloji alanındaki araştırmalar, tümör büyümesi ve gelişimini tetikleyen spesifik moleküllerin hedef alındığı yeni terapi yaklaşımlarını da beraberinde getirmektedir. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (*EGFR*), antitümör özellikteki yeni ajanlar tarafından hedef alınan ve kanser moleküler biyolojisinde ilk olarak tanımlanan önemli moleküllerden biridir (111). *EGFR* (*ErbB*) gen ailesinin üyeleri arasında *EGFR* (*ErbB1* ve *HER1*), *HER2* (*HER2/neu* ve *ErbB2*), *ErbB3* (*HER3*) ve *ErbB4* (*HER4*) reseptör genleri yer almaktadır (112) (Şekil 10). Bu genler arasında, meme tümörlerinin %20-25'inde overeksprese olan *HER2*, meme kanserlerinde en çok çalışılan ve bilinen terapötik hedeflerden biridir.

Transmembran glikoprotein özelliğindeki reseptör genleri, hücre membranı dışında bulunan ekstrasellüler ligand bağlayıcı domain ve sitoplazmik kısımda yer alan intrasellüler reseptör tirozin kinaz domain yapılarından oluşmaktadır. Ligandlar bağlandıklarında, reseptörler birbirleriyle homodimer veya heterodimer oluşturmakta ve aktive olan reseptörün hücre içinde bulunan bölümündeki tirozin kinaz fosforillenmektedir (Şekil 10). Böylece pek çok enzimin ve proteinin bağlanabileceği bölgeler açığa çıkmaktadır. Reseptörlere bağlanan enzim ve proteinler, hücre içerisinde nükleustaki transkripsiyon faktörlerine ulaşan bir sinyal ileti zincirini başlatmaktadır. İleti en son nükleer transkripsiyon faktörlerine ulaşarak proliferasyon, anjiyogenez ve apoptoz gibi önemli hücresel olayları tetiklemektedir. Ligandlar hücresel düzeyde; hücre proliferasyonunu indüklemekle kalmayıp, aynı zamanda adezyon ve motiliteyi (hareket) değiştirerek hücreyi apoptoza karşı korumaktadır. Fizyolojik seviyede ise invazyon ve anjiogenez olaylarını uyararak fonksiyon göstermektedir (113)



Şekil-10 *EGFR* reseptör tirozin kinaz ailesi ve reseptör aktivasyonu (112)

EGFR reseptörleri tarafından aktive olan major sinyal yolları *PI3K* (fosfatidilinozitol 3-kinaz), *RAS-RAF-MAPK* ve *JNK* (c-Jun N-terminal kinaz) ileti yollarıdır (114, 115). Bu sinyal ileti yolları *EGFR* yolunu çeşitli basamaklarda uyarabilmekte veya engelleyebilmektedir. *EGFR* overekspresyonu veya yapısal aktivasyonu ile sinyal yolağının regülasyonunun bozulması, anjiogenez ve metastaz olaylarını kapsayan tümör sürecini tetikleyebilmekte ve bu durum birçok malignanside kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (116, 117) (Şekil 11). *EGFR* overekspresyonunun gerçekleşmesi için gerekli olan *EGFR* amplifikasyonu oligodendroglioma (118), glioblastoma, akciğer kanseri (119), gastrik kanser ve meme kanseri gibi birçok kanser türünde gözlenmektedir (120). Meme kanseri ile ilgili olarak yapılan önceki çalışmalar, tümörlerin %0.8–14'ünde *EGFR* gen amplifikasyonu olduğunu belirterek bu gende meydana gelen amplifikasyonların meme kanserlerinin genelinde nadir olarak görüldüğünü açıklamaktadır (121, 122). Buna rağmen, triple-negatif meme kanserinin spesifik bir fenotipi olan metaplastik meme kanserlerinde gen amplifikasyonu, %25 gibi bir oran ile daha yüksek sıklıkta meydana gelmektedir (123-126). *EGFR* overekspresyonu için gerekli olan diğer mekanizma ise bu gende meydana gelen aktive edici mutasyonlardır. Merkezi sinir sistemi ve akciğer kanserlerinde daha sıklıkla görülen *EGFR* mutasyonları meme kanserinde seyrek olarak görülmektedir (127, 128).

EGFR'nin meme kanseri hücrelerinde aşırı derecedeki ekspresyonu; geniş tümör çapı, kötü farklılaşma özelliği gösteren tümör yapısı ve kötü klinik sonuç ile korelasyon göstermektedir (116, 117). İnvaziv duktal meme karsinomunda özellikle nod negatif hastalarda *EGFR* ekspresyonu, kötü prognoz ile ilişkilidir (129). ER-negatif meme kanseri hücrelerinde ise östrojenin yapacağı büyüme etkisi olmayacağı için *EGFR* ayrıca önem kazanmaktadır. *EGFR*'nin ekspresyon seviyesindeki artışı veya amplifikasyonu steroid hormon reseptörü olan ER ekspresyonu ile ters orantılıdır. Meme kanserlerinin bütün alt türlerinde *EGFR* overekspresyonu görülmesine rağmen, özellikle agresif yapıda olan triple-negatif meme kanseri (TNBC) ve inflamatuvar meme kanserleri (IBC)'nde ön plana çıkmaktadır.

TNBC'nin yaklaşık %50'si ve inflamatuvar meme tümörleri *EGFR*'yi aşırı derecede eksprese etmektedir (130). Son yıllarda yapılan çalışmalar, *EGFR* ve *EGFR* geninin içinde yer aldığı sinyal yolağında görevli alt moleküllerin hücrelerin epitel formdan mezenşimal forma dönüşünü simgeleyen EMT sürecini (epitelyal-mezenşimal geçiş), migrasyon ve tümör invazyonunu düzenlediğini belirtmektedir (131). İnvlamatuvar meme kanserlerinde yüksek

VEGFR-2 fosforilasyonuna ve *ERK1/2* ve *AKT* sinyal yollarının aktivasyonuna neden olduğu kanıtlanmıştır (133). Bunun yanında, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü olan *HER-2*'yi overeksprese eden tümörlerde, *HER-2* aktivasyonu sonucunda *VEGF*'nin hedef alınmasını doğrulayan ölçüde yüksek *VEGF* miktarı tespit edilmiştir (134).

Endotelial hücrelere spesifik büyüme faktörü olarak nitelendirilen *VEGF*'nin, son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda meme tümörü hücrelerini de içine alan epitelyal olmayan diğer hücre türlerinde proliferasyonu indüklediği gösterilmiştir. İnvaziv duktal meme karsinomunda, mikrodamar yoğunluk seviyesinin patolojik açıdan agresif olan lezyonlarda yükseldiği ve bu durumun artan *VEGF* protein miktarı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (135). Ayrıca, nod-pozitif ve nod-negatif meme kanserli hastalarda *VEGF* overekspresyonu, genel sağkalım ve nüksüz sağkalım için prognostik önem taşımaktadır (136, 137). Yüksek *VEGF* protein seviyesi vaskular yoğunluk ile doğru orantılı, steroid reseptör ekspresyonu ile ters orantılı ilişki göstermektedir. *VEGF* ve /veya *VEGFR-2* miktarının artması, metastatik meme kanserli hastalarda tamoksifen ve kemoterapiye karşı zayıf yanıt alınmasında prediktif bir faktör niteliğindedir (138, 139).

Östrojen, progesteron ve anti-hormon tedavilerinin tümör büyümesi üzerindeki rollerini değerlendirebilmek için kullanılan meme kanseri hücre hatlarında *VEGF*'nin proliferatif etkilerini karakterize eden çalışmalar mevcuttur. Hücrede *VEGF* ekspresyon seviyesinin artması meme kanserinde anti-hormon tedavisine verilen yanıt olumsuz yönde etkilemektedir. *VEGF* ayrıca; anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunu indükleyerek *BCL-2* down-regülasyonunu inhibe etmektedir. *BCL-2* ekspresyon seviyesindeki yükseliş, anti-hormon tedavilerinin varlığında bile tümör hücrelerinin proliferasyon ve sağkalım sürelerini arttırmaktadır. Bu durum klinik çalışmalarda, anti-hormon tedavilerine olan direnç mekanizması ve tümör progresyonunun bir açıklaması olma özelliği taşımaktadır. Bu açıdan, *VEGF*'yi yüksek düzeyde eksprese eden meme kanserlerinin tedavisinde, anti-hormonlar ve anti-anjiyojenik ajanlarla kombine edilen tedavi yöntemlerinin tercih edilmesi daha faydalı olabilmektedir (140).

2.7.4. Steroid Hormon Reseptörleri

2.7.4.1. Östrojen Reseptörü (ER), Progesteron Reseptörü (PR), Androjen Reseptörü (AR)

Östrojen ve progesteron, normal meme dokusunda gerçekleşen büyüme ve farklılaşma olaylarını düzenlemekle görevli hormonlardır ve meme kanserinin gelişimi ve ilerleyişinde

önemli moleküller olarak bilinmektedir (141-144). Bu hormonlar spesifik olarak nükleer türdeki reseptörler olan östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörüne (PR) bağlanarak hormona bağlı organların fonksiyonunu etkilemektedir (144-146). Östrojen ve progesteron reseptörleri, çeşitli organlarda geniş çeşitlilikteki fizyolojik süreçlerde hormonal sinyallerin aktarımını sağlayan ligand düzenleyici transkripsiyon faktörleri ailesine ait genler olarak karakterize edilmektedir. ER, östrojen bağlayan ligand yapısı ve DNA'ya bağlanan domain yapısı şeklinde iki farklı kısımdan meydana gelir (147-149). Östrojen-ER kompleksi direkt olarak DNA'ya bağlanır ve PR'nin de içinde yer aldığı östrojene bağlı genlerin ekspresyonunu düzenler (150, 151).

ER ile yapısal olarak ilişkili olan $ER\alpha$ ve $ER\beta$ izoformları, dokularda farklı ölçüde eksprese olan iki ayrı genin ürünüdür. $ER\alpha$; meme, uterus ve ovaryum dokularındaki epitelyal hücrelerde östrojen tarafından uyarılan mitojenik (mitoz bölünme sürecinde görev alan) sinyallerden sorumlu bir moleküldür (152). Meme salgı bezlerinin normal aktivitesi sırasında östradiol (E2), $ER\alpha$ ve $ER\beta$ 'ya bağlanarak hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını kontrol etmektedir (153). Her iki ER izoformu da normal meme dokusunda genellikle düşük düzeyde eksprese olmakla birlikte; meme kanseri hücrelerinde $ER\alpha$, $ER\beta$ 'dan daha fazla miktarda ekspresyon göstermektedir. Meme biyopsi çalışmalarında gerçekleştirilen immünohistokimyasal analizler ile belirlenen tek östrojen reseptörü $ER\alpha$ 'dır. Çekirdeksiz ER hücrelerini içeren tümörler "ER-negatif" tümörler grubunda sınıflandırılmaktadır. Meme kanserlerinin en az %70'i ER-pozitif (ER+)'tir ve çoğunlukla $ER\alpha$, progesterone reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü olan *HER-2* (*ErbB-2*, *HER/neu*) veya her üçünü birden eksprese etmektedir.

Klinikte ER ve PR seviyeleri, meme kanserli hastalarda hastalığın prognozunu ve adjuvan endokrin (hormon) tedavisine vereceği yanıtı tahmin etmede kullanılan prognostik belirteçlerdir. ER ve PR açısından pozitif özellikte tümöre sahip kadınlar, ER ve PR'si negatif tümörlü hastalara göre daha uzun yaşam süresi ve daha iyi endokrin tedavi yanıtı göstermektedir (154-158). ER ve PR pozitif meme kanserli hastalar, ER sinyalizasyonunu inhibe eden tedavi yöntemi olan hormon terapisi ile tedavi edilmektedir. Hormonal tedavi, anti-östrojenler (AE) aracılığı ile östrojen hormonuna ait ligandın ER'ye bağlanmasını antagonize etmek veya aromataz inhibitörleri (AI) aracılığı ile östradiol sentezini bloke etmek şeklinde iki farklı terapi yaklaşımı sunmaktadır (159).

Meme kanserinde anti-östrojenler aracılığı ile uygulanan hormon tedavi yönteminde selektif östrojen reseptörü modülatörleri (SERM'ler) olarak adlandırılan kimyasal moleküller

kullanılmaktadır. SERM'ler, vücutta bulunan hedefleri uyaran veya tepkisiz hale getiren sentetik, non-steroid bileşiklerdir. SERM'lerin öncüsü olan tamoksifen, ER(+) meme kanserinde ER'ye bağlanarak östrojenin etkisini bloke etmektedir (160) (Şekil 12).

Tamoksifen, son 30 yıldır meme kanserinin tedavisi için klinik uygulamada yaygın şekilde kullanılmaktadır ve günümüzde yüksek riskli kadınlarda meme kanseri riskinin azaltılması amacıyla uygulanmaktadır. Raloksifen ise, postmenopozal osteoporozlu kadınlarda kemik yoğunluğunu korumakta (östrojen benzeri etki) ve aynı zamanda hem yüksek, hem de düşük riskli (osteoporozlu) postmenopozal kadınlarda meme kanseri insidansını azaltmaktadır.

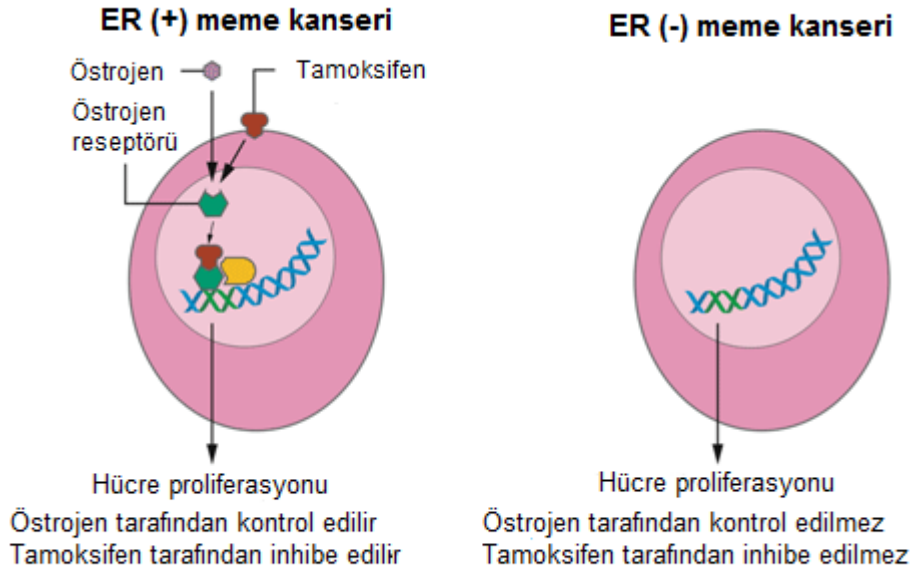
Tamoksifenin aksine, raloksifen endometriyum kanseri insidansını arttırmaz (160).

Klinik uygulamalarda kullanılan ilk terapötik hormon antagonisti olan tamoksifen, meme kanserinde tümör progresyonunun durdurulmasında hastaların yaklaşık %50'sinde etkili olmaktadır. Buna rağmen hormon tedaviye olan yanıt geçici olup tedavi edilen kadınlarda ortalama 20 aylık süreç içinde direnç gelişip nüks olayı gerçekleşebilmektedir (161).

Endokrin tedaviye olan direnç mekanizmasında; inaktive olan ER izoformlarının ekspresyonu, koaktivatör veya diğer transkripsiyon faktörlerinin (örneğin; *API*) artan aktiviteleri, post-translasyonel modifikasyonlar (örneğin; fosforilasyon ve metilasyon) ve membrandaki *EGF* ve *IGF* reseptörlerinde artan tirozin kinaz sinyal aktivitesi gibi çok farklı hipotezler bulunmaktadır (161-165). *PI3K/AKT* ve *ERK* sinyal yollarında görevli olan büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu ile hücre döngüsünün bozulması ve apoptoz süreci hormon tedaviye karşı olan dirençte önemli rol oynamaktadır (166, 167).

Östrojen ve progesteronun haricinde steroid cinsiyet hormonlarından olan androjen hormonu ve buna bağlanan androjen reseptörü (AR) de, normal meme dokusunda antiöstrojenik, büyümeyi inhibe edici etki göstermektedir. AR, primer meme tümörlerinin %90'ı ve metastatik tümörlerin %75'inde bulunarak in situ, invazif ve metastatik meme kanserlerinde yaygın olarak görülmektedir (168). AR ekspresyonu; ER α ve PR ekspresyonu, düşük evre ve ileri derecede farklılaşma özelliğindeki tümör markırları ile pozitif korelasyon göstermektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, AR'yi özellikle meme kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan ER α -pozitif tümörlerde bağımsız prognostik bir faktör olarak nitelendirmektedir. ER α -pozitif luminal meme tümörlerinde ortamda AR ve ER α miktarı yeterli seviyede iken AR, ER α 'yı bloke edip büyümeyi inhibe ederek tümör baskılayıcı gen olarak işlev görmektedir. ER α -negatif meme kanserli hastalarda ise ortamda AR seviyesi yükselerek AR, ER α gibi davranmakta ve onkogenik özellik taşımaktadır (169). Androjenler

sınıfına dahil olan Fluksimesteron, Kalusteron ve Testolakton gibi kimyasal ajanlar meme kanserinin tedavisinde kullanılan androjen etkili maddeler olarak bilinmektedir.



Şekil-12 ER(+) ve ER(-) meme kanseri (160)

2.7.5. Meme Kanserinde Etkili Olan Tümör Baskılayıcı Genler

Meme karsinogenez süreci, onkogenik değişimlerin yanı sıra farklı biyolojik olaylarda ve hücre metabolik yollarda görevli olan tümör supressör (baskılayıcı) genlerin inaktivasyonuna neden olan çeşitli genetik değişimler ile de ilişkilidir (64). Tümör baskılayıcı genler; normal fonksiyonu hücre transformasyonunu inhibe eden, inaktivasyonu ise tümör hücrelerinin büyüme ve çoğalması için bir avantaj olan proteinleri kodlamaktadır. Bu genlerde meydana gelen inaktivasyonlar; intragenik mutasyonlar, kromozomal delesyonlar ve metilasyon aracılı transkripsiyonel susturulma veya proteoliziz artışı ile meydana gelen ekspresyon kayıpları gibi farklı genetik mekanizmalar tarafından gerçekleşmektedir. Tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü ve apoptoz regülasyonu, farklılaşma, genomik kararlılığın devamlılığı, DNA hatalarının onarımı, sinyal iletimi ve hücre adezyonu gibi önemli hücre fonksiyonlarda kritik görevler üstlenmekte olduğundan, oluşan inaktivasyonlar ile tüm bu fizyolojik süreçler etkilenmektedir (170). Yapılan çalışmalar sonucu birçok tümör baskılayıcı genin farklı işlevleri ve hücre lokalizasyonu ile insan meme karsinogenezinde rol oynadığı

bildirilmiştir. Bu genler arasında, başta ailesel meme kanseri gelişiminde rol oynayan *BRCA1* ve *BRCA2* genleri olmak üzere *TP53*, *PTEN*, *FHIT* ve *RBI* genleri yer almaktadır.

2.7.5.1. *BRCA1* ve *BRCA2* Genleri

Meme kanserinin oluşumunda çeşitli genlerdeki sporadik mutasyonlar rol oynamakla birlikte, meme kanserine yakalanan kadınların %5-10'unda otozomal geçiş görülmektedir. Özellikle, genom devamlılığının koruyuculuğunda iş gören proteinleri üreten *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin germ hücrelerindeki mutasyonları kalıtsal (ailesel) meme kanseri oluşumunda rol oynamaktadır. Bu genlerdeki germinal mutasyonları içeren kadınların yaşamlarının bir döneminde meme kanseri geliştirme riskinin %50-85 arasında değiştiği gösterilmiştir (171, 172).

BRCA1 geni, kromozom 17q21'de, *BRCA2* ise kromozom 13q12'de yer almaktadır. *BRCA1* geni 1863 amino asitlik (aa), *BRCA2* geni ise 3418 aa'lık proteinleri kodlamaktadır. Bu proteinlerin hücre proliferasyonunun kontrolünde tümör baskılayıcı proteinler, DNA hasarına ve tamirine katılan proteinler, transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan proteinler, hücre siklusunun kontrol noktalarının önemli proteinleri ve rekombinasyonda iş gören proteinler ile yakın ilişkileri gösterilmiştir (171, 172). Genom devamlılığının koruyuculuğunda iş gören, DNA tamir mekanizmasında ve homolog rekombinasyonda görevli tümör baskılayıcı gen özelliğindeki *BRCA1* ve *BRCA2* genleri, meme kanseri başta olmak üzere ovaryum (*BRCA1/2*), pankreas (*BRCA2*) ve prostat kanseri (*BRCA1/2*) gibi birçok malignanside genellikle mutasyonlarla inaktive olmaktadır. Bu genlerde oluşan mutasyonlar, BRCA proteinleri ve dolayısıyla diğer “genom koruyucu” rolü olan proteinlerin inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürmektedir (171, 172).

BRCA1 ve *BRCA2* kalıtsal gen mutasyonları, ailesel meme kanserlerinin yüzde 5-10'undan sorumlu olup, özellikle triple-negatif meme kanseri tanısında, tiplendirilmesinde ve uygun tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Basal-like meme kanserlerinin bir türü olan triple-negatif meme kanseri (TNBC), kalıtsal yatkınlık genleri olan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde meydana gelen mutasyonlarla ilişkilendirilerek hastalığın tedavi sürecinde bu gen mutasyonlarının dikkate alınması gerektiğini vurgulamaktadır (173).

BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarında gözlenen meme tümörlerinde genellikle sporadik vakalardan farklı histopatolojik özellikler görülmektedir. *BRCA1* mutasyonuna sahip kadınlarda gelişen meme kanserleri karakteristik olarak erken yaşta görülme özelliğine

sahiptir. Bu tip kanserler, genellikle kötü prognoza sahip, triple negatif veya invaziv duktal karsinoma tipinde olup, yüksek dereceli histopatolojik özellik göstermektedir. Patolojik incelemede ise bu tümörler ER, PR ve *HER-2* ile negatif, bazal sitokeratinler olan *CK5/6* ile pozitif boyanmakta, *Siklin-E*, *p53* ve az miktarda da *p27* ekspresyonu göstermektedirler (174). *BRCA2* mutasyonu taşıyıcılarında saptanan tümörlerin patolojik özellikleri ile ilgili bazı çalışmalar ise bu tümörlerin, düşük histolojik dereceli ve invaziv lobüler ya da tübüler lobüler morfolojide olma olasılığının yüksek olduğunu belirtmektedir. Ayrıca, bu tümörlerin çoğunlukla sporadik gelişme gösteren tümörlere göre ileri evreli olduğu belirlenmiştir (175, 176).

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinde meydana gelen bazı mutasyonların topluma ve etnik gruba özgü olduğu düşünülmektedir. Aşkenazi Yahudileri ve Ruslar gibi etnik kökeni farklı bazı kapalı toplumlarda *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde ‘founder mutasyon’ olarak adlandırılan popülasyona özgü germline mutasyonlar belirlenmiştir (177). Türk popülasyonuna özgü yapılan çalışmalarda, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde belirlenen germline mutasyon oranının %10.5 olduğu belirtilmiştir (178).

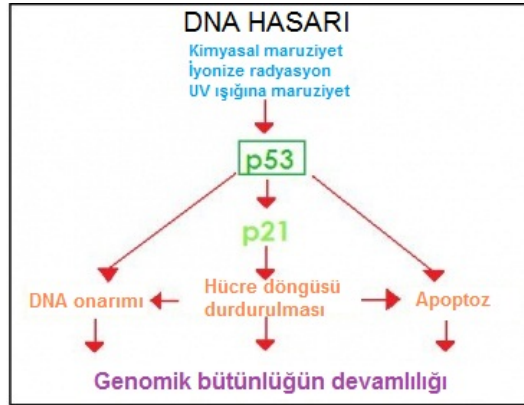
2.7.5.2. *TP53* Geni

TP53 geni, ilk olarak on dört yıl önce kolon ve akciğer kanserlerinde mutasyona uğrayan formunun keşfedilmesi ile kanserle ilgili araştırmalarda en çok çalışılan tümör baskılayıcı gen olarak nitelendirilmiştir (179, 180). İnsanlarda görülen tüm kanser türlerinin en az yarısında, meme kanserlerinin ise yaklaşık %20-30’unda *TP53* gen mutasyonları görülmektedir (181). Meme kanseri, sarkoma, lösemi ve beyin tümörleri gibi birçok malignansiye genetik yatkınlık gösteren ailesel Li-Fraumeni sendromu, *TP53* geninde meydana gelen germ-line değişimler ile ilişkilendirilmiş olup çok sayıda mutasyon bölgesi tanımlanmıştır. Bu hastalarda kanser görülme riskinin 40’lı yaşlarda %50 oranında olduğu, 80’li yaşlarda ise %90’a kadar yükseldiği tahmin edilmektedir (182, 183).

TP53 geni tarafından kodlanan p53, 17p kromozom bölgesinde lokalize olup, farklı yerlerde fosforilasyon ile düzenlenen ve birden çok fonksiyonu olan 393 kDa’lık protein kodlamaktadır. Sırasıyla p63 ve p73’ ü kodlayan, *TP63* ve *TP73* genlerinin de dahil olduğu büyük ölçüde korunmuş gen ailesi sınıfına aittir (184). *P53* geninin her iki alleldeki kaybı (heterozigotluk kaybı) veya nokta mutasyonları ile inaktive olması çeşitli tümörlerde ve meme kanserlerinde gösterilmektedir. Meme kanserlerinde *P53*’ ün yaklaşık %60’ ının nokta

mutasyonu şeklinde bulunduğu ve *P53* geni mutasyonlarına birçok kanser tipinde kimyasal kanserojenlerin neden olduğu ileri sürülmektedir (185-188).

p53 proteininin downregülasyonu, genellikle *TP53* ile kompleks halinde bulunan *MDM2* (mouse double minute 2) ligaz geni aracılığı ile gerçekleşmektedir (64). Protein, normal şartlar altında hücre bölünmesi için düzenleyici bir mekanizma görevinde iken, hücrede kemoterapi veya gama ışınları gibi kimyasal etmenler ile oluşan DNA hasarı söz konusu olduğunda, hücresel *p53* miktarı hızlı bir artış göstermektedir (189). Aktive olduğunda DNA ile direkt etkileşim halinde bulunup *p21* gibi belirli genlerin transkripsiyonunu ve DNA hasarının onarılması için hücre döngüsünün G1 veya G2/M fazında geçici olarak durdurulmasını sağlamaktadır (190) (Şekil 13). *p53* geni ayrıca, apoptoz ve farklılaşma olaylarını tetiklemek adına diğer hücresel yollar ile de iletişim halinde olabilmektedir (191). Bunun yanında farklı çalışmalarda, anjiyogenez ve metastaz sürecinde diğer tümör baskılayıcı veya düzenleyici genlerin ekspresyonlarında değişiklik yaptığı gösterilmektedir (192-194).



Şekil-13 *p53* geninin aktivasyonu ve fonksiyonları (190)

Meme kanserlerinde aşırı *p53* protein üretimi kötü prognoz için bir indikatör olarak tanımlanmaktadır. Meme tümörlerinde yapılan çalışmalarda, *p53* ekspresyon düzeyi ile yüksek tümör evresi, yüksek proliferasyon indeksi, aneploidi, ayrıca ER ve PR yokluğu arasında yakın ilişki olduğu belirtilmektedir (188). ER durumundan bağımsız olarak, *p53* geninde meydana gelen mutasyonlar meme kanserinde rekürens (nüks) riskini yaklaşık %33 oranında arttırmaktadır (195).

Histolojik açıdan değerlendirildiğinde, in situ duktal meme karsinomlarında *P53* mutasyonu belirlenmediği, buna karşılık meme karsinogenezinin erken evrelerinde *P53*

geninin mutasyona uğradığı bildirilmiştir. *P53* mutasyonlarının invaziv meme kanserlerinin gelişiminden önce ortaya çıktığı, özellikle yüksek histolojik dereceli DCIS' de hastalığın önlenmesi ve tedavisi için önemli bir belirteç olduğu ileri sürülmektedir (187). Bu açıdan *p53* geni, meme karsinomunda önemli prognostik bir markır olarak ifade edilmektedir (195). Son yıllarda meme tümörleri ile ilgili yapılan çalışmalarda hastalığın ilerlemesi, hastalık sonucu, tedaviye yanıt, tümör gelişimi ile mutant *P53* ekspresyonu arasındaki ilişkilere bakılarak *P53*'ün potansiyel bir biyomarkır olarak kullanılabilirdiği belirtilmektedir (184).

2.7.5.3. *PTEN* Geni

PTEN geni, birçok insan tümör tipinde heterozigosite kaybı sıklığı ile karakterize bir genomik bölge olan 10q23.3 kromozomal bandı üzerinde lokalize, 403 aminoasit içeren bir tümör baskılayıcı gendir (196). Fonksiyonel olarak, *PI3K* (fosfatidilinositol 3 kinaz) geni tarafından aktive edilen *PIP-3* molekülünden fosfat grubunu ayırarak *PI3K/AKT/mTOR* sinyal yolağını inhibe eden tümör baskılayıcı gen işlevi görmektedir (197-199). Negatif düzenleyici faktör olarak görev yapan *PTEN* geninde meydana gelen fonksiyon kayıpları, *AKT* geninin fosforilasyonu ile *PI3K* yolağının aktif hale gelmesine neden olmaktadır (200). Bu şekilde; somatik mutasyonlar, heterozigosite kaybı, epigenetik modifikasyonlar ve protein instabilizasyonu gibi farklı inhibitör mekanizmalar tarafından meydana gelen *PTEN* gen kayıpları *AKT/mTOR* ile ilişkili hücre proliferasyonunun aktivasyonuna öncülük etmektedir.

Meme, endometrium, prostat ve tiroid kanserleri gibi birçok malignanside *PTEN* geninde meydana gelen delesyon ve/veya mutasyona bağlı işlev kayıpları gözlenmektedir (201). Literatürde, *PTEN* geninde oluşan somatik mutasyonların sporadik olarak gelişen meme kanserlerinde nadir olarak gözleendiği ancak; germ-line (kalıtılmış) *PTEN* mutasyonlarının meme ve ovaryum kanser riskini önemli ölçüde arttırdığı belirtilmektedir (196). Meme tümörleri üzerinde yapılan çalışmalar, *PTEN* geninin ekspresyon seviyesinde azalma veya fonksiyon kaybının %33'e varan oranda olduğunu belirterek bu durumun meme kanseri progresyonu ile direkt olarak ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır (202, 203).

Hastalığın prognozu ve klinikopatolojik markırlar ile bu gende oluşan ekspresyon kayıplarının ilişkisi hakkında kanıtlanmış sonuçlar olmamasına rağmen; bazı çalışmalar yüksek tümör evresi, tümör büyüklüğü ve negatif hormon reseptör durumu ile *PTEN* gen kaybı arasında anlamlı bir bağlantı olduğuna dikkat çekmektedir (201). Depowski ve arkadaşlarının (204) çalışmasında, primer meme karsinomlu 151 hastada immünohistokimyasal yöntem ile *Pten* protein ekspresyonu değerlendirilmiş ve sonuçların

klirikopatolojik parametrelerle ilişkisi incelenmiştir. Ortalama takip sũresi 56 ay olan tũm grupta vakaların 73' ũnde (%48) Pten protein ekspresyonunda kayıplar saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizlerde, hastalığa bağlı Őlũm ile tũmũr evresi, lenf nodu metastazı ve *PTEN* ekspresyon seviyesindeki dũřũř arasında anlamlı korelasyon belirlenmiştir. Pten protein ekspresyonundaki kayıp ise lenf nodu tutulumu ve Östrojen reseptũr kaybı ile ilişkili gũsterilmiřtir.

Hũcre hatları ile ilgili olarak geręekleřtirilen araştırmalarda ise, *PTEN* geni defekt olan meme kanseri hũcre hatlarının ęoęunlukla *mTOR* molekũlũnũ hedef alan ajanlar tarafından baskılandığı ifade edilmektedir. *PTEN*, meme kanseri hũcre hattında bũyũmeyi *PI3K* sinyal yolunun downregũlasyonu ile baskılamakta, Öncelikle hũcre siklusu progresyonunda duraklamaya, ardından hũcre Őlũmũnũn indũksiyonuna yol açmaktadır. Weng ve arkadaşlarının (205), MCF-7 meme kanseri hũcre hattında mutant *PTEN* ekspresyon sonuğlarını inceledikleri bir araştırmada, *PTEN* genindeki aşırı ekspresyon varlığında hũcre bũyũmesinde baskılanma gũrũlmũřtũr. Bũyũmenin baskılanması erken dũnemlerde G1 fazında duraklamaya bağlı iken, ileri dũnemlerde hem G1 fazındaki duraklamaya hem de hũcre Őlũmũne bağlı olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda bũyũmenin baskılanması Öncesi *AKT* fosforilasyonunda azalma izlenmiştir.

2.7.5.4. *FHIT* Geni

Fragile histidine triad (*FHIT*) geni, kromozomlar ũzerinde gap (boşluk) şeklinde ifade edilen hassas ve kırılğan bũlgeler olarak tanımlanan frajil bũlge genlerinden biri olup histidine triad gen ailesinin bir ũyesidir. Biręok kanser tũrũnde homozigot ve heterozigot delesyonlar ile karakterize olan 3p14.2 kromozom bũlgesinde lokalize olan *FHIT* geni, tũmũr baskılayıcı gen Özelliği taşımaktadır. Bu bũlgede *FHIT* adı verilen bir tũmũr supressũr genin lokalize olduğu 1996 yılında Sozzi ve ark. (206) tarafından gũsterilmiřtir. *FHIT* geninin ũrũnũ olan Fhit proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, bu proteinin hũcre siklusu, homolog rekombinasyon onarımı ve apoptoz gibi Önemli biyolojik fonksiyonlar ile ilişkili olabileceği dũřũnũlmektedir (207) (şekil 14).

Meme kanseri ve diğer pekęok kanser tũrũnde genellikle delesyonlar ilk sırada olmak ũzere ęeřitli genetik ve epigenetik değişiklikler ile *FHIT* geni inaktive olmaktadır. Akciğer kanserleri gibi Özellikle ęevresel karsinojenlere maruziyetten oluşan tũmũrler başta olmak ũzere meme kanserleri, kolorektal kanserler, gastrik kanserler, ovaryum kanserleri, bũbrek tũmũrleri, lũsemiler vs gibi ęok sayıda tũmũrde bu genin inaktivasyonu bilinmektedir. Meme

ekspresyonlarını kontrol eden *E2F* transkripsiyon faktörüne bağlanıp inaktivasyon olayı ile hücre döngüsünün ilerleyişini durdurmaktadır. *RBI*, hücre siklusunun devamlılığı süresince kademeli olarak fosforlanmakta ve CDK kompleksleri (*Siklin D-cdk4/6* ve *Siklin E-cdk2*) tarafından inhibe edilmektedir (170).

İntragenik mutasyonlar, kromozomal delesyonlar ve transkripsiyonel baskılanma aracılığı ile meydana gelen *RBI* geni inaktivasyonları (217-219), sporadik gelişen meme kanserlerini de içeren pek çok kanserde ortaya çıkmaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde *RBI* gen mutasyonları görülmektedir (217). Özellikle bazal benzeri meme kanserinde bu genin her iki allelinin kaybı söz konusudur. Meme karsinomlarında bu gende gözlenen inaktivasyonların sıklığını ve prognostik önemini araştıran farklı çalışmalarda, *RBI* ekspresyonu ile bilinen prognostik faktörler arasında bir korelasyonun varlığı ile ilgili çelişkili sonuçlar bildirilmektedir. Buna rağmen, hastaların nüksüz sağkalım veya genel sağkalım süreleri ile *RBI* ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır (220-223).

2.7.6. Meme Kanserinde Etkili Olan DNA Tamir Genleri

Genom, DNA hasarına neden olan eksojen veya endojen kaynaklı çok sayıda farklı etkene maruz kalmaktadır. Tüm organizmalar genetik materyallerini bu çevresel etkenlerin oluşturduğu hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içermektedir. DNA onarımı, hücrede tek bir mutasyonla başlayan, hasarlı DNA oluşumu ve kanser tablosuyla son bulabilen yolda, hücreyi koruyan önemli bir mekanizmadır. DNA onarımında meydana gelen hatalar, kanserin karakteristik bir özelliği olan genetik kararsızlığa neden olmaktadır ve kanserlerin çoğunluğu tamir edilmemiş DNA hasarından kaynaklanmaktadır (224).

DNA onarımındaki bozukluklar, meme, kolon ve cilt kanseri gibi birçok kanser türüne neden olduğu gibi ayrıca, büyüme ve beyin anomalilerine de sebep olmaktadır (225). Birçok kanser hücresinde, artırılmış DNA onarımı, kanser tedavisine gelişen dirençle ilişkilendirilebilmekte ve böylece zayıf prognoza sebep olmaktadır. Bu nedenle birçok araştırmacı, DNA onarımında görev alan proteinlerin inaktivasyonu veya ekspresyonlarının azaltılması yönündeki tedavi şeklini kullanmaktadır (226). Meme kanseri oluşumu ve gelişiminde görev yapan DNA tamir genlerinin arasında, *p53* tümör baskılayıcı geni ile birlikte fonksiyon gösteren *ATM* (Mutant ataxia-telangiectasia), *ATM* ile ilişkili olan *ATR* (*ATM* ve Rad3-related) ve *CHK2* (Cell cycle checkpoint kinase 2-Hücre döngüsü kontrol noktası kinaz 2) genleri yer almaktadır.

2.7.6.1. *ATM* (Mutant Ataxia-Telangiectasia) Geni

ATM geni, 11.kromozomda yer alan, çok sayıda mutasyonun gözleendiği, resesif kalıtım şekli gösteren uzun ve kompleks yapıdaki DNA tamir genlerinden biri olup Ataxia-telangiectasia adı verilen sendromla ilişkilidir (227). Ataxia-telangiectasia, *ATM* geninde her iki allelin kaybı ile meydana gelen mutasyonların neden olduğu; serebral ataksi ve immün sistem yetmezliği ile karakterize olan, hematolojik malign neoplaziler ve meme karsinomu gelişme riski ile ilişkili otozomal resesif kanser sendromudur (228, 229). *ATM* proteini, *p53* ve *BRCA1* genlerini fosforlayarak hücre döngüsünün kontrol noktalarını aktive edip DNA onarım sürecine katılmaktadır (230-232). Heterozigot *ATM* mutasyonu taşıyıcılarında, meme kanseri gelişim riskinin çok yüksek olduğu gösterilmektedir (233). Sporadik meme kanserlerinde ise 11q22-23 kromozom bölgesinde oluşan heterozigosite kayıpları yaygın olarak görülmektedir (234). 1/200 ila 1/100 kadında meydana gelen *ATM* geni mutasyonları orta derecede artmış genetik risk olarak kalıtılmakta ve toplumdaki meme kanserinin %2-7'sinden bu genin sorumlu olduğu düşünülmektedir (227).

2.7.6.2. *ATR* (*ATM* ve Rad3-Related) Geni

ATM geni, iyonize radyasyon gibi çeşitli DNA hasarlarında *p53*'ü serin-15 bölgesinden fosforillemekte ve *p53*'ün stabilizasyonunu sağlamaktadır. Ancak, farklı hücre serileriyle yapılan çalışmalarda iyonize radyasyon uygulamasını takiben *ATM*'nin rolü her zaman tespit edilememektedir. Bu durum, *p53*'ün fosforillenmesinde diğer bir aday kinaz olan *ATM*-ilişkili polipeptid *ATR*'yi akla getirmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda *ATR*'nin de *ATM*'ye benzer bir şekilde *p53*'ü serin-15 bölgesinden fosforillediği gösterilmiştir. Özellikle UV'nin indüklediği DNA hasarlarında *ATR*, hasarı tanımlayarak tamirle ilgili çeşitli yolakları aktive etmektedir (235-237). Meme kanserli hastalarda *ATR* geninde meydana gelen değişimlerin incelendiği çalışmalarda, ilgili gende meme kanserine genetik yakınlıkla ilişkili germline mutasyonlar bulunamamış olmasına rağmen, belirlenen farklı splice bölgesi değişimleri DNA hasarının onarılmasında bir engel olarak değerlendirilmiştir (238, 239).

2.7.6.3. *CHK2* (Cell Cycle Checkpoint Kinase 2) Geni

Hücre döngüsünün kontrol noktalarında *p53* ve *BRCA1*'in aktivasyonunu sağlayarak görev yapan diğer bir tümör baskılayıcı gen niteliğindeki DNA tamir geni de *CHK2*'dir (240, 241). Hücrede oluşan DNA hasarına karşılık *ATM* proteini tarafından aktive edilmektedir. *CHK2* gen mutasyonları, germline *p53* mutasyonlarını içermeyen Li-Fraumeni sendromlu

hastalarda görülmekte; bu yüzden ilgili gende meydana gelen mutasyonlar *p53* inaktivasyonu için alternatif bir mekanizma olarak görev yapmaktadır (242). Buna rağmen, *CHK2* mutasyonları diğer ailesel meme kanseri sendromları ve sporadik meme kanserlerinde nadir olarak görülmektedir (243). Finlandiyalı hastalardan oluşan bir toplulukta %1 oranında belirlenen bir trunkat mutasyona ve bu gruptaki meme kanseri oluşum sıklığına dayanılarak, meme kanserine duyarlılıkta düşük penetrans gösteren bir gen olarak dikkate alınmaktadır (244).

2.7.7. Meme Kanserinde Önemli Olan Sinyal İletim Mekanizmaları

Sinyal iletimi, hücrede basit hücresel aktiviteleri organize eden, hücrenin davranışını düzenleyen haberleşme ağı içindeki kompleks sistemin önemli bir parçasıdır. Hücrede embriyogenez, çoğalma (proliferasyon), büyüme, farklılaşma (diferansiasyon) ve yaşamını sürdürme gibi biyolojik olayların gerçekleşebilmesi için hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimine gerek duyulmaktadır. Hücreye dışarıdan gelen uyarılar veya diğer hücrelerden gelen sinyaller, hücre içi sinyal iletim mekanizmaları ile her bir hücre tarafından algılanır ve hücre için önemli olan cevaplar oluşturulur. İnsan genomunda görev yapan genlerin yaklaşık beşte birinin bu görevde yer alması bu yolların hücre için ne denli önemli olduğunu ortaya koymaktadır (245, 246). Karsinogenezin temelinde hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik süreçleri etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır (246). Bu nedenle kanserlerde ilk etkilenen mekanizma genellikle hücre içindeki sinyal iletim yolları olmakta, bu yollarda meydana gelen değişimler ile başta kanser olmak üzere farklı hastalıklar oluşmaktadır (247). Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi, tümör gelişimi ve tümör hücrelerinin invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır. Meme karsinomunun oluşumu ve gelişiminde önemli olan sinyal iletim mekanizmaları; *RAS/RAF/MEK/ERK*, *PI3K/AKT/mTOR* ve *JAK/STAT* sinyal yollarıdır.

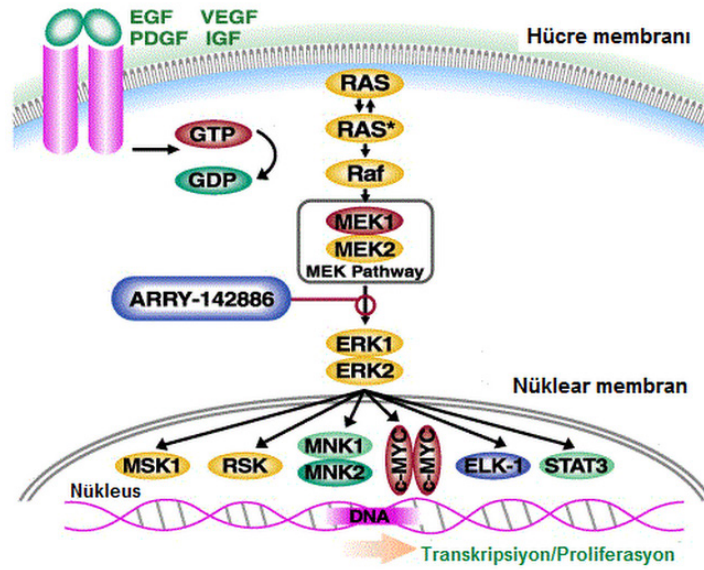
2.7.7.1. *RAS/RAF/MEK/ERK* Sinyal Yolağı

Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiasyon faktörleri ve tümör oluşumuna yardımcı maddelerin uyarımına yanıt olarak aktive olan *RAS/RAF/MEK/ERK* sinyal yolağında görev yapan elemanlar, *MAP* kinazlar denilen bir protein-serin/treonin kinaz ailesidir. Hücre içi ve dışı sinyallerle uyarılabilen *MAP* kinazlar hücrede büyüme, farklılaşma, apoptoz ve yapısal organizasyonda rol almaktadır (248). Bu sinyal yolağının aktivasyonu GTP bağlı protein olan Ras tarafından başlatılır ve sırasıyla Raf (= *MAPKKK*), Mek (= *MAPKK*) ve Erk (= *MAPK*)

proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler (249) (Şekil 15). Ras ve Raf aslında birer protoonkogendir, mutasyonlar sonucu onkogene dönerek hücrede neoplazm oluşumunu başlatmaktadır. Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için translasyon sonrası modifikasyondan sonra membrana yerleşmesi gerekmektedir. Ras, hücre yüzeyinde GDP ile bağlı iken inaktiftir (Ras-GDP). Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak aktif konformasyona dönüşüm (Ras-GTP) tetiklenmektedir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir ve bu aktivasyonda Sos (son of sevenless) ve Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) adaptör proteinleri aktif rol oynamaktadır. Bu sinyal yolunun efektör molekülleri, *SOS* üzerinde negatif düzenleyici etki ile Ras aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan Ras proteinleri, Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanmakta ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlamaktadır (250, 251). Ras aynı zamanda, *MEK* i fosforilleyerek aktifleştirmekte ve bu da tirozin ve treonin kalıntılarının fosforilasyonu ile *ERK* i (hücre dışı sinyalin düzenlediği kinaz) aktive etmektedir. Aktif *ERK*, hücre çekirdeğine giderek transkripsiyon faktörü *ELK-1* i fosforillemektedir. Aktif *ELK-1* ise *SRE* ye bağlanarak *SRF* ile bir kompleks oluşturmakta ve bu sayede gen uyarımı gerçekleşmiş olmaktadır (248, 251).

İnsan tümörlerinin %30'unda *RAS/RAF/MEK/ERK* sinyal yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur (250). Mutant Ras proteinleri, aktif *RAS-GTP* formunda kalmakta; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadır. Diğer yandan, farnezil transferaz inhibitörleri Ras aktivasyonunu önlemektedir. Klinik çalışmalar, bu ajanların antitümöral etkilerinden tedavide yararlanılabilme olasılığını güçlendirmektedir (252).

Meme kanserinde *EGFR* yolağıyla ER arasında kesişme noktası olarak fonksiyon gösteren *MAPK* sinyal ileti yolağı, endokrin direncinin gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. *MAPK* yolağı, meme karsinomunda ER tarafından aktive edilen bir kinaz yolağıdır ve fosforile *MAPK*, meme tümörlerinde endokrin tedaviye kısa süreli cevap ve kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedir (250).



Şekil-15 RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolağı (249)

2.7.7.2. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı

PI3K (fosfatidilinozitol 3-kinaz) sinyal yolağı, hücrel metabolizmanın kontrolünde özellikle glukoz transportu ve kullanımı, hücre büyümesinin regülasyonu, protein biyosentezi ve apoptozu önlemede fonksiyon göstermektedir (253, 254). Katalitik bir kinaz enzimi özelliğinde olan *PI3K*, malign transformasyonun birçok basamağında etkili olup proliferasyon artışı, büyüme, invazyon, metastaz, anjiyogenez ve hücre sağkalımının düzenlenmesinde görev almaktadır (255).

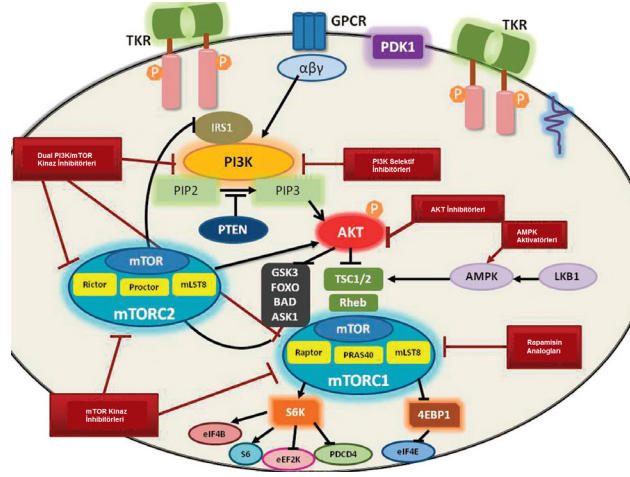
PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı, Ras proteinleri ve aktif reseptör tirozin kinazlarca uyarılmakta fakat aynı zamanda *RAS*'ın downstream (aşağı sinyal yolağı) yönünde yolağa geri bildirim yapılmaktadır (254). Reseptör tirozin kinazların aktivasyonu bu reseptörlerin sitoplazmik tirozin rezidülerinin otoposforilasyonuna neden olmaktadır. Bu da *PI3K*'nin düzenleyici alt birimi olan P85 proteinini etkinleştirmektedir (256). Sonrasında, *PI3K* katalitik alt birimi olan P110 proteini, fosfatidilinositol-4,5-bifosfatı (*PIP₂*) fosfatidilinositol-3,4,5-fosfata (*PIP₃*) dönüştürmektedir (257). *PI3K*, fosfataz ve tensin homoloğu olarak adlandırılan *PTEN* tümör baskılayıcı geni tarafından *PIP₃* defosforilasyonu ile negatif yönde kontrol edilmektedir. *PIP₃* molekülünün oluşumu, bir protein-serin/treonin kinaz olan *AKT*'nin aktive olmasına neden olmaktadır. *AKT*'nin hedefleri apoptoz baskılayıcıları olup; p21, p27, Nf-kB, Kaspazlar ve Bad gibi apoptozu düzenleyen çok sayıda protein

fosforillemektedir (258-260). *AKT*'ın aşağı sinyal yolağı efektörlerinden (downstream effectors) en önemlisi *mTOR*'dur.

mTOR; *PI3K/AKT* sinyal transdüksiyon yolağının bir bileşeni olup (261), *PI3K* aktivasyonunun sinyal iletiminde etkili temel bir kinazdır. Hücre büyümesini, hücre siklusu progresyonunu ve hücre metabolizması için gerekli proteinlerin mRNA ribozomal translasyonunu sağlamaktadır (257). Yine yapılan farklı çalışmalarda *mTOR*'un tümör hücre motilitesinde, anjiyogenezinde ve kanser metastazlarının regülasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (262). *mTOR* yolu, insan epidermal büyüme faktörü reseptörleri 1-4 (*HER1-4*), trombositten türeyen büyüme faktörü reseptörü (*PDGFR*)/*KIT* ve insülin büyüme faktörü reseptörü (*IGFR*) gibi aşırı eksprese edilmiş veya mutasyona uğramış tirozin kinaz reseptörleri dahil eksojen onkogenler ile aktive edilebilmektedir ve Ras doğrudan *PI3K p110* alt ünitesine bağlanmaktadır. *mTOR* sinyal iletiminde, *S6K1* veya *eIF4E* aşırı ekspresyonu ve/veya amplifikasyonu da onkogeneze katkıda bulunabilmektedir. Ayrıca, kanserde *mTOR* aktivasyonu için bir gerekçe daha vardır. Aktifleşen *p53* geni, *mTOR* molekülünün negatif düzenleyicisi olarak etkide bulunmaktadır. Örneğin, glukozdan yoksun kalınan koşullarda, kanserde *p53* fonksiyonu sıklıkla ortadan kalkmakta ve böylece bu durum *mTOR* yapısal aktivasyonunun lehine olabilmektedir (262, 263). Meme kanserinde etkili hücre içi sinyal iletim mekanizmalarından birisi olan *PI3K/AKT/mTOR* sinyal yolağı Şekil 16'da görülmektedir (201).

mTOR öncesi ve sonrası sinyal yollarının her ikisi de insan kanserlerinde yaygın olarak bozulmuştur. *mTOR*, *PI3K/AKT*'nin aşağı doğru akım yolağında fonksiyon gösteren anahtar bir kinaz olarak tanımlanmıştır ve bu yüzden onun inhibisyonu, potansiyel olarak önemli terapötik bir hedef olarak belirlenmiştir. En iyi bilinen *mTOR* inhibitörleri olan rapamisin ve türevlerinin klinik çalışmalarda uzun süreli objektif tümör yanıtı sağladığı bilinmektedir (264).

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının düzensizliği birçok kanser tipinin patogeneğinde rol oynamaktadır. Karsinogeneşte etkili olan *PI3K* sinyal yolu değişimleri; artan *PI3K* sentezini, *PTEN* tümör baskılayıcı geninde mutasyon ile meydana gelen fonksiyon kayıplarını ve *AKT* ile ilişkili *mTOR* düzenleyici proteinlerin inaktivasyonu ya da mutasyonlarını içermektedir (261). Metastatik meme kanserlerinde, *AKT* aktivasyonunun endokrin direncini indüklediği belirtilmektedir. *AKT* sinyal yolağının inhibisyonu ise, meme kanserinde endokrin tedavinin etkinliğini arttırabilmektedir (265, 266). *PTEN* geninde meydana gelen kalıtsal (germline) mutasyonlar da meme ve ovaryum kanseri riskinde büyük ölçüde önem taşımaktadır (260).



Şekil-16 *PI3K/AKT/mTOR* sinyal yolağı (201)

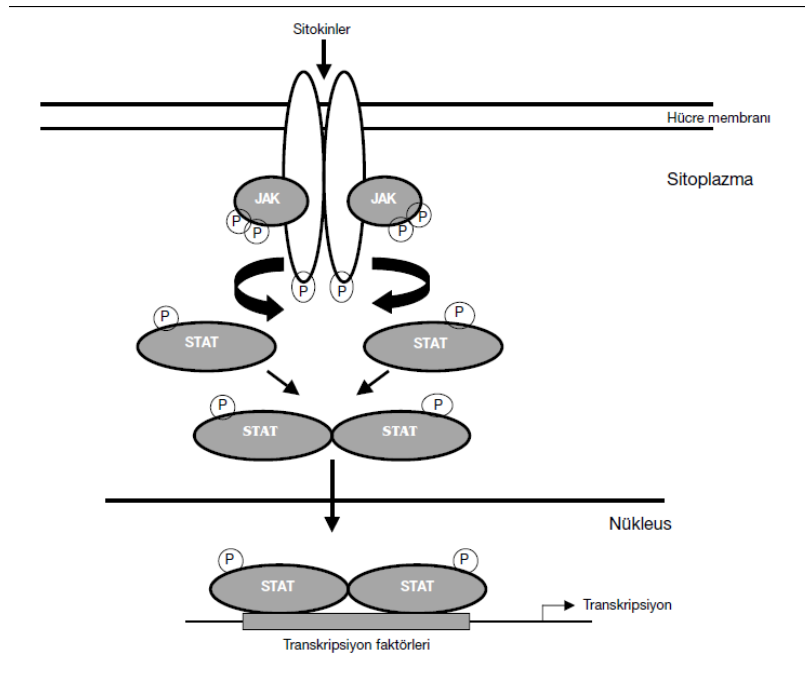
2.7.7.3. *JAK/STAT* Sinyal Yolağı

JAK/STAT sinyal yolu, hücre dışındaki kimyasal sinyallerden hücre membranına ve nükleusta DNA üzerinde yer alan transkripsiyon faktörlerine, DNA transkripsiyonu ve aktivitesini sağlayan bilgi aktarımını gerçekleştirmektedir. *JAK/STAT* sinyal sisteminin işleyişinde, sitokin reseptörleri, JAK (Janus kinase) ve STAT (Signal transducer and activator of transcription) proteinleri olmak üzere başlıca üç bileşen görev yapmaktadır (267). İnterferon, interlökin, büyüme faktörleri veya diğer kimyasal moleküllerden gelen sinyaller ile aktive olan reseptör bileşeni, *JAK* geninin kendini fosforlamasına neden olan kinaz fonksiyonunu aktifleştirmektedir. Bu fosfotirozinler çeşitli STAT proteinlerinin (predominant olarak STAT1, STAT3 veya STAT5) SH2 domainleri için bağlanma bölgesi olarak işlev göstermektedir. Stat proteinleri, SH2 bölümleriyle Jak protein-tirozin kinazın sitoplazma bölümüne bağlanmakta ve fosforile olmaktadır. Fosforillenmiş Stat proteinleri, dimerize olup hücre çekirdeğine taşınarak DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşmekte ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir (268) (Şekil 17).

Memeli hücrelerinde her biri farklı bir DNA dizisine bağlanan yedi adet Stat proteini tanımlanmıştır. Bunlar; *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT4*, *STAT5a*, *STAT5b* ve *STAT6* olarak adlandırılmaktadır (268). Normal hücresel süreçte embriyonik gelişim, organogenez, immün fonksiyon, hücre farklılaşması, büyüme ve apoptozda görevli olan Stat proteinlerinin aktivasyonları geçici ve kısa sürelidir. *JAK/STAT* sinyal transdüksiyon yolağında genetik defektler sonucu meydana gelen fonksiyonel bozukluklar immün sistem hastalıkları ve kanserle sonuçlanmaktadır. Stat proteinleri, sürekli aktivasyon veya proteinin c-ucunun

mutasyona uğraması şeklinde iki mekanizma aracılığıyla karsinogenezde etkili olmaktadır. Özellikle, Stat1, Stat3 ve Stat5 aktivitelerinin kontrolsüz işleyişi malign transformasyonda rol oynamaktadır (269-271). *STAT* aracılı sinyal iletimi ile uyarılan hedef genlerin (örneğin; *c-myc*, *siklin D1* ve *BCL-XL*) hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak ve/veya apoptozisi önleyerek karsinogenez sürecinde etkili oldukları öne sürülmektedir. Ayrıca, *STAT* aracılı sinyal iletiminin malign sürecin gelişiminde *MAP* kinaz yolunun aktivasyonu ile etkileşebileceği düşünülmektedir (272).

STAT ekspresyonunun meme kanserindeki biyolojik rolü halen tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen meme gelişiminde ve karsinogenezinde Stat3 ve Stat5' in önemli rol oynadığı savunulmaktadır (273). Meme kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, Stat 3 aktivasyonunun tümör hücrelerinin büyümesini hızlandırdığı gösterilmiş, Burke ve arkadaşlarının bir çalışmasında ise Stat 3 yolağının engellenmesi ile meme kanseri gelişiminin yavaşladığı ileri sürülmüştür (274).

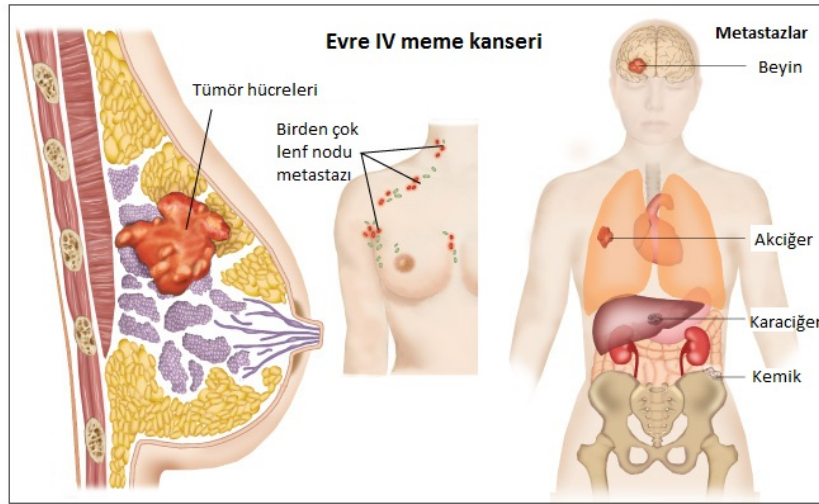


Şekil-17 JAK/STAT sinyal yolağının aktivasyonu (268)

2.7.8. Meme Kanserinde İnvazyon ve Metastaz Süreci

Tümör hücreleri, organizma içinde yayılma (invazyon) sürecinde uzak organ bölgelerine ulaşarak metastaz adı verilen sekonder tümörleri oluşturmaktadır. Metastaz oluşumu; kanser hücrelerinin başlangıçtaki tümörü terk ederek lenf ya da kan dolaşımına girdikleri (intravazyon olarak adlandırılan süreç), hayatta kalarak göç ettikleri ve uzak organları kolonize ettikleri bir dizi basamağı içermektedir. Yayılabilen tümör hücreleri kendilerini tedaviye ve immün sistem tarafından yok edilmeye karşı daha dirençli kılan özel özellikler edinmektedir. Bu nedenle, uzak yayılmalar ve metastazlar çoğu zaman hasta için kötü prognozun bir göstergesidir (275).

Metastazların organlara dağılımı primer tümörün türüne, yerine ve metastazlı hücrelerin yayılma yollarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (276). Metastazların en çok geliştiği yerler karaciğer, beyin, kemikler, akciğer ve adrenal bezlerdir (277) (Şekil 18). Belirli tümörlerin belirli organlara yerleşme eğilimi olduğu, ilk kez Stephen Paget tarafından 1889 yılında metastatik meme kanserinden ölen 700 kadında yapılan otopside yapılan gözlemler sonucunda ortaya atılmıştır. Bu çalışma ile, fizyolojik olarak kalsiyum gereksinimi olan meme kanseri hücrelerinin, kemikleri zengin bir kalsiyum kaynağı olarak kullanabildikleri için kemikte metastaz yapmayı seçtikleri gösterilmiştir (278).



Şekil-18 Metastatik meme kanseri (277)

Metastaz tedavisi, çoğunlukla metastazları uzaklaştırmayı ya da nötralize etmeyi hedefleyen lokal terapi ile mikrometastazları yok etmeyi ve yenilerinin oluşumunu engellemeyi hedefleyen sistemik terapinin bir kombinasyonundan oluşmaktadır (279, 280). Lokal tedaviler cerrahi yöntemlerden oluşurken, sistemik tedaviler arasında kemoterapi ve radyoterapinin yanı sıra biyolojik tedavi ve uygun olan durumlarda hormon terapi bulunmaktadır. Hastalarda uygulanacak tedavinin seçimi; kanserin türü, metastazların büyüklüğü, sayısı ve lokalizasyonu, hastanın genel durumu ve yaşı ve sekonder metastatik kanser vakalarında hastaya önceden uygulanan tedaviler olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Metastatik kanser için yeni, etkili ve daha iyi tolere edilebilen tedavilerin bulunması, şu andaki kanser araştırmalarının ve klinik denemelerin başlıca hedefidir.

Son yıllarda meme kanseri ile ilgili gerçekleştirilen araştırmalar kapsamında 2012 yılında Amerika'da invaziv özellik gösteren meme kanserli hastaların, tüm yeni tanı konmuş kanser vakalarının %29'undan, kansere bağlı ölümlerin ise %14'ünden sorumlu olduğu bilinmektedir (281). Erken tanı ve meme kanseri moleküler biyolojisi alanındaki gelişmelere rağmen, primer meme kanserli hastaların yaklaşık %30'unda hastalığın nüks ettiği görülmektedir (282). Hedeflenen tedaviler, ileri evre meme kanserli hastaların sağkalım süresini olumlu yönde etkilemiş olsa da, bu özellikteki birçok tümörde verilen ilaca karşı gelişen direnç mekanizmaları nedeniyle rekürens (nüks) olayı gerçekleşmektedir. Bazı bulgular, hormon reseptörü pozitif meme kanseri vakalarının %30-50'sinde, endokrin tedavi şekli olarak uygulanan tamoksifene karşı yanıt alınmadığını göstermektedir (283). Tolaney ve Krop'un yaptığı bir çalışmada da, *HER-2*'yi aşırı miktarda eksprese eden primer meme kanserli hastalarda metastazların gelişebileceği ve metastatik tümörlerin sadece %11-34'ünün anti-*HER-2* terapisi olan trastuzumab tedavisine yanıt verdiği öne sürülmektedir (284). Triple-negatif meme kanserli hastalarda ise, alınan kemoterapi cevabı yaklaşık %39 olmakla birlikte, rezidüel hastalık varlığı klinik çalışmalarda hedef tedavilerin etkinliğinin halen araştırıldığı (285) erken rekürens riski ile ilişkili bulunmuştur (286, 287).

Son on yıl içinde gerçekleştirilen çalışmalarda, meme kanserinin rekürens ve metastaz sürecinde farklı moleküler mekanizmaların rol oynadığına dair çeşitli bilimsel görüşler ileri sürülmüştür. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular, metastaz olayının davranışsal açıdan agresif fenotip doğrultusunda değişen primer tümör hücreleri içinde bulunan hücre alt populasyonlarının moleküler profillerinde meydana gelen genetik ve epigenetik değişimlerden kaynaklandığını göstermektedir (288).

Kliniksel mikroarray çalışmaları, primer meme tümörlerinin gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi ile iyi ve kötü prognoza sahip meme kanserli hastaların ayrımının yapılabildiğini ifade etmektedir (289). Gen ekspresyon analizleri ayrıca, spesifik bir tedaviden fayda sağlayabilecek hastaların seçiminde yararlı olabilen prediktif marker özelliği göstererek yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasını da kolaylaştırmaktadır (290). Bu açıdan yapılan bazı analizlerde, meme tümörlerine ait gen ekspresyon profilleri, ER durumu (291, 292) ve klinik yanıt ile ilişkilendirilmiştir (42, 293-295). Jansen MB. ve arkadaşlarının metastatik meme kanseri ile ilgili çalışmasında ise 44 genden oluşan ekspresyon ifadesinin endokrin (hormon) tedavi şekli olan tamoksifene karşı yanıt ile ilişkisi belirtilmiştir (296). Ayrıca; Paik ve arkadaşları, lenf nodu negatif meme kanserli hastalarda adjuvant tamoksifen tedavisi sonrası uzak organ metastazı olasılığı ile korelasyon gösteren 21 gene dayalı bir rekürens skoru geliştirmişlerdir (297). Bunun ardından Ma XJ. ve çalışma arkadaşları, genom tabanlı mikroarray analiz çalışmalarını gerçekleştirerek adjuvant tamoksifen ile tedavi edilen ER-pozitif primer meme kanserli hastalarda ekspresyon ifadesini iki gene indirgeyerek Homeobox B13 (*HOXB13*) ve interlökin 17B reseptörü (*IL17BR*) adlı iki genin ekspresyon profillerinin oranını tanımlamış ve bu oranın hastalısız sağkalım sürelerinde prediktif özelliğini vurgulamıştır (298). Bu çalışma ile, Homeobox B13 (*HOXB13*) ve interlökin 17B reseptörü (*IL17BR*) genlerinin ekspresyon oranının meme tümörlerinde rekürens ve tedavi yanıtı ile yüksek derecede korelasyon gösterdiği kanıtlanmıştır.

2.7.8.1. Homeobox (*HOX*) Genleri ve *HOXB13* (Homeobox B13)

Homeobox genleri, omurgalı canlılarda embriyolojik gelişim (morfogenez) ve hücre farklılaşmasını düzenleyerek genetik hiyerarşik düzende en üst düzeyde rol oynayan ve gelişimi kontrol eden genlerdir (299). Bu gen ailesi ilk olarak meyve sineği *Drosophila*'da keşfedilmiş ve mutasyona uğramış formu, vücut segmentlerinin transformasyonuna diğer adıyla homeotik transformasyon (embriyolojik gelişimsel dönüşüm) olarak bilinen olaya neden olan genler şeklinde tanımlanmıştır (300). Ağız ve yüzle ilgili doku tiplerini de içeren çeşitli tür dokularda temel gelişimsel süreçleri kontrol eden düzenleyici proteinleri ve homeodomain yapısındaki transkripsiyon faktörlerini kodlayan gen ailesi sınıfına aittir (301). *HOX* genleri, 180 nükleotidlik diziyi içeren homeobox yapısı ve bu yapının kodladığı transkripsiyon faktörleri görevinde olan spesifik nükleer proteinler (homeoprotein) den oluşmaktadır. Homeobox dizisi, DNA molekülüne spesifik bağlanmadan sorumlu 60 aminoasitlik homeodomain kodlamaktadır (302-304). Bağlanma özgünlüğü,

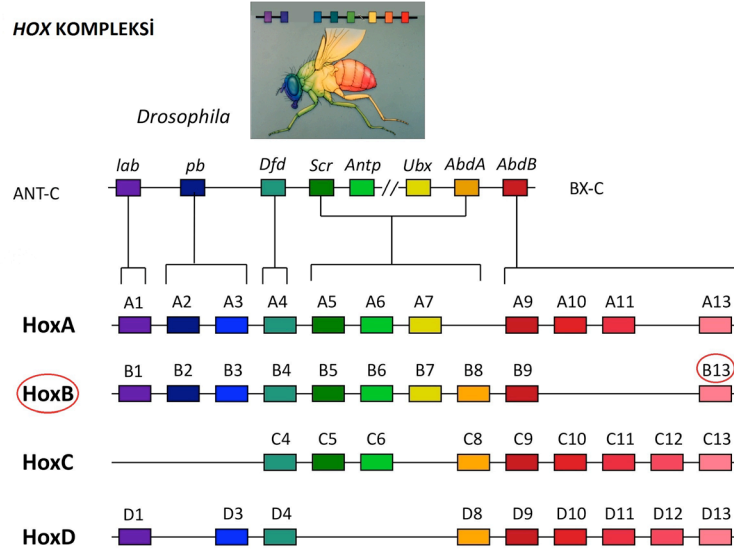
homeoproteinlerin hedef genlerin ekspresyonunu aktive etmesine veya baskılamasına olanak tanımaktadır (305).

İnsanda *HOX* lokusu olarak adlandırılan 100 kb uzunluğundaki dört farklı genomik kümede organize olan en az 39 adet *HOX* geni tanımlanmaktadır. *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* ve *HOXD* olarak isimlendirilen her gen kümesi sırasıyla 7p, 17p, 12p ve 2p kromozom bölgelerinde lokalize olup, homolog dizi organizasyonu ile düzenlenmiş 9 ila 11 genden oluşmaktadır (306) (Şekil 19). Bu genler apoptoz, reseptör sinyalizasyonu, farklılaşma, motilite ve anjiogenezis olaylarında rol almakta (307) ve vücudun anterior-posterior ekseninde boyunca normal uzuv ve organ gelişimine olduğu kadar (308), kan damarlarının oluşumu ve prostat bezlerinin gelişimine de temel oluşturmaktadır (309). Sağlıklı yetişkin bir insanda, kök hücrelerin fonksiyonunda ve hematopoietik farklılaşmada özellikle; *HOXA10*, *HOXB3* ve *HOXC4* genleri olmak üzere *HOX* gen ekspresyon örnekleri görülmektedir (310). Ayrıca, menstrüasyon döngüsü süresince özellikle implantasyon zamanında *HOXA10* ve *HOXA11* ekspresyon seviyelerinde ciddi artış gerçekleşmekte ve bu genlerin ekspresyonları farklı dönemlerde değişiklik göstermektedir. Bu örnekler, gelişmekte olan reproduktif sistem içerisinde *HOX* gen ekspresyonunu yansıtmaktadır (311).

Homeobox genlerinin ekspresyon seviyelerinin azalması veya artması şeklinde meydana gelen değişimler ya da düzensizlikler, kanser ve birçok genetik hastalık ile ilişkilendirilmektedir. Literatürde; lösemi, kolon, cilt, prostat, meme, ovaryum ve diğer kanser türlerinde *HOX* genlerinin ekspresyonu ya da değişimini belirten farklı çalışmalar mevcuttur. Son yıllarda yapılan çalışmalardan birinde, meme kanserinde malign transformasyona karşı hücreyi korumakla görevli *p53* geninde meydana gelen ekspresyon kaybının, *HOXA5* genindeki ekspresyon eksikliğinden kaynaklanabileceği gösterilmiştir (312). Meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise *HSIX1* ve *HOX11* genlerinin aşırı derecedeki ekspresyonlarının hücre döngüsünde G2 kontrol noktasının bozulmasına yol açtığı gözlenmiştir. Primer meme tümörlerinin %44'ünde, metastatik meme tümörlerinin ise %90'ında overeksprese olduğu bilinen *HSIX1* geninin, bu çalışma ile meme kanserinin progresyonunda önemli bir rol oynadığı görülmektedir (303). Bunun yanında yapılan farklı araştırmalarda homeobox genlerinden olan *HOXC6* geninden bahsedilmektedir. Meme salgı bezlerinin olgunlaşma ve gelişme çağında aktif durumda olan *HOXC6* gen transkriptleri, gebelik döneminde steroid hormonların negatif düzenlenmesi ile inaktif duruma dönüşmekte, ayrıca meme adenokarsinomlarında da inaktif formda bulunmaktadır (313).

Araştırmacılar, homeobox genlerinin birçok biyolojik süreçte ve kanser türlerinde gösterdikleri fonksiyonlar hakkında, önemli bilgi birikimine sahip olsa da, homeobox gen ailesinin üyelerinden biri olan *HOXB13* geninin, meme kanserindeki rolü ve endokrin dirençliliği konusunda üstlendiği görev hakkındaki bilgilerin açıklığa kavuşturulması henüz başlangıç sürecindedir.

HOXB13 geni, meme kanseri hücrelerinde normal meme epitel dokusu ile karşılaştırıldığında, upregülasyon mekanizması ile çalışmakta olup yüksek miktarda eksprese olarak bulunmaktadır (298, 314). Bu gen ayrıca, östrojen reseptörü (ER) ile negatif korelasyon göstererek östrojen hormonu tarafından düzenlenen bir gen olarak nitelendirilmektedir (315, 316). Östrojen hormonunun etkilerinin meme tümörigenezi ve meme kanseri progresyonuna direkt olarak yansıdığı, araştırmacılar tarafından bilinen bir gerçektir. Hormonla ilişkili meme kanserlerinin tedavisinde, antiöstrojen özellikteki tamoksifen adı verilen kimyasal molekül kullanılmaktadır. Son 30 yıldır meme kanserinin tedavisi için klinik uygulamalarda yaygın şekilde kullanılmakta olan tamoksifen, ER(+) meme kanserinde ER'ye bağlanarak östrojenin etkisini inhibe etmektedir. Tamoksifen, ER(+) meme kanserinin hormonal tedavisinde klinikte ilk ve en yaygın uygulanan ilaçlardan biri olup, meme tümörlerinde tümör progresyonunun durdurulmasında etkili olmaktadır. Ancak, ER(+) meme kanserli hastaların yaklaşık %40'ında yanıt alınmadığı ya da ilaca karşı direnç geliştiği görülmektedir. Antiöstrojen tedavisinde oluşan ilaç dirençliliği konusunda yoğun şekilde sürdürülen çabalar direnç mekanizmasında önemli rol oynayan moleküler biyomarkır (biyobelirteç) ların tanımlanmasının gerekliliğini vurgulamaktadır (315). Meme kanseri hücrelerinde yüksek seviyede ekspresyonu saptanan *HOXB13*, ER(+) tümörlerde tamoksifen dirençliliği ile ilişkilendirilen önemli bir biyomarkır olarak nitelendirilmektedir. Bu konuda yaptıkları çalışmaları ile Shah N. ve arkadaşları, *HOXB13*'ün, ER transkripsiyonunu ve protein ekspresyonunu baskılayıp ER'nin downregülasyonuna neden olarak direnç mekanizmasında rol oynadığını belirtmektedir (317). Ayrıca, *HOXB13* overekspresyonunun ovaryum kanseri hücrelerinin büyüme ve gelişiminde proliferatif modülatör niteliği taşıyarak, ER(+) ovaryum kanserli hastalarda da tamoksifen direncinin oluşumunda görev aldığı bilinmektedir (318).



Şekil-19 HOX gen kompleksi (306)

2.7.8.2. İnterlökin (IL) Genleri ve *IL17BR* (İnterlökin 17 Reseptör B)

İnterlökinler (IL), doğal ve adaptif immünette rol alan ve hücrelerin immün fonksiyonlarını sağlamada görevli olan sitokin grubu proteinlerdendir (319). Çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen ve salgılanan polipeptidler olan sitokinler, enflamasyon, hücre büyümesi, iyileşmesi ve yaralanmaya karşı sistemik yanıtı da içine alan bağışıklık ve enflamatuar olayları düzenlemektedir (320). Kökenlerine göre; mononükleer fagositler (monokin), lenfositler (lenfokin) ve lökositler (interlökin) olarak sınıflandırılmaktadır (319).

Doğal immünette rol alan sitokinler, *TNF* (Tümör nekrotizan faktör), *IL-1*, *IL-12*, *IFN* (Tip 1 interferon), *IL-10*, *IL-6*, *IL-15*, *IL-18* iken; adaptif immünette rol alan sitokinler, *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IFN- γ* (İnterferon- γ), *TGF- β* (Transforming büyüme faktörü- β), *LT* (Lenfotoksin), *IL-13*, *IL-16*, *IL-17* ve *IL-25* 'dir (319).

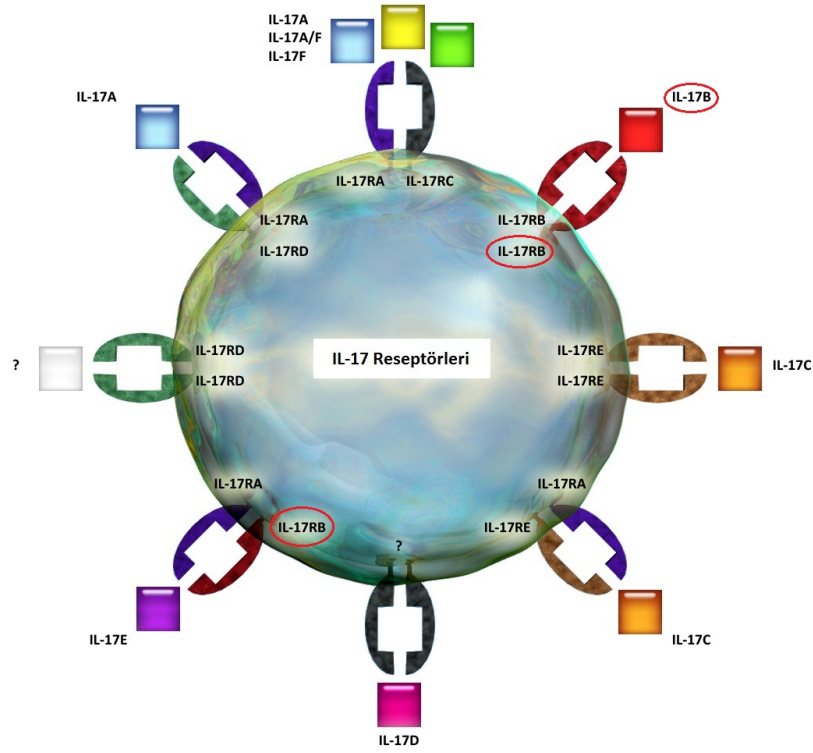
Sitokinler, diğer polipeptid hormonlarda olduğu gibi hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar. Tüm sitokin reseptörleri, bağlanmadan sorumlu ekstrasellüler bölge ve sinyal iletiminden sorumlu sitoplazmik bölge olmak üzere iki ana birimden oluşmaktadır (320) (Şekil 20). Bu reseptörler transmembran proteinler olup, ekstrasellüler domainleri vardır ve özel olarak sitokinleri ve büyüme faktörlerini tanır ve bağlanırlar (321, 322). Çoğu sitokinlere karşı oluşan hücresel yanıt, hedef hücrelerde gen ekspresyon değişimleri ile meydana gelmektedir. Böylece hedef hücreler yeni fonksiyonlar geliştirmekte veya proliferasyon olabilmektedir. Sitokin reseptörlerinin aktive

ettikleri sinyal ileti mekanizmaları arasında en önemli rolü *JAK/STAT* sinyal yolağı üstlenmektedir (320).

İmmün sistemin anti-tümöral yanıtta önemli ölçüde işlev göstermesi ve tümör hücreleri ile immün sistem arasındaki etkileşim, son on yıl içinde yoğun araştırma konularından biri haline gelmiştir (323 ,324). Sitokinlerin, relatif konsantrasyonlarına ve tümör mikroçevresi içinde yer alan diğer düzenleyici faktörlerin varlığına bağlı olarak, kanser gelişiminde hem uyarıcı hem de inhibitör etkilerinin olduğu bilinmektedir. Belirli grup sitokinler (*IL-1*, *IL-6*, *IL-11*, *TGFbeta*), etkili immün yanıtın oluşumunu engelleyip tümör gelişimine izin verirken, bazıları ise (*IL-12*, *IL-18*, *IFN-γ*) immün sistemin anti-tümöral yeteneğini arttırmaktadır (325). Kanser oluşumu ve gelişiminde immün sistemin yetersiz oluşu ve başarısızlığı sonucu tümör mikroçevresi içinde çeşitli inflamatuvar olaylar meydana gelmektedir. Bu mikroçevrede yer alan inhibitör sitokinlerin etkileri sonucu, anti-tümöral immün yanıt sağlanamamakta ve kanser gelişimi söz konusu olmaktadır.

Meme kanseri ve diğer pek çok kanser türünde sitokin grubu proteinler olan interlökin seviyelerinin değişiklik gösterdiği ve inflamasyona neden olduğu görülmektedir. Konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalarda, tümör mikroçevresi içerisinde meydana gelen inflamasyonun, meme kanseri ve diğer birçok malignanside invaziv özellik ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (326). Arduino S. ve çalışma ekibi tarafından, meme kanserli hastaların kan plazmasında bulunan *IL-2* konsantrasyon miktarının azalması ile hastalığın nüks etmesi arasında yakın bir ilişki gözlemlenmiştir (327). Benzer şekilde metastatik meme kanserli hastalar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, serumdaki artan *IL-6* konsantrasyonu, hastalarda kısa sağkalım süresi ve tedaviye yanıtta direnç oluşumu ile korelasyon göstermiştir (328). *IL-6*, tümör hücreleri ve farklı hücre türlerinde geniş çeşitlilikteki biyolojik aktivitelerde önemli rol oynayan multifonksiyonel bir sitokin proteinidir. Bu proteinin overekspresyonu, kanser hücrelerinin apoptozunu inhibe eden, anjiyogenezi uyarıcı ve ilaç dirençliliğine neden olan olaylar vasıtasıyla meme tümörü progresyonuna öncülük etmektedir (329).

Son zamanlarda, interlökinlerin meme kanserinde prognostik bir belirteç olarak nitelendirilmelerinin yanısıra terapötik rolleri üzerinde de durulmaktadır. Bu açıdan ileri evre meme tümörlerinin tedavi sürecinde *IL-2*, *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-γ*, *IL-6* ve *IL-12* gibi sitokinlerin sıklıkla kullanılmakta olduğu bilinmektedir. Böylece, meme kanserinde patolojik olarak aşırı miktarda üretilen interlökinlerin (örn; *IL-6* gibi) baskılanması yönündeki yaklaşımlar ile potansiyel terapötik stratejiler geliştirilebilmektedir (329).



Şekil-20 *IL-17* Reseptör Genleri (320)

Günümüze kadar yapılan çalışmalar ile, interlökin ailesinden olan interlökin-17 (*IL-17*) sitokin proteini ile ilgili olarak, inflamatuvar bağırsak hastalıkları (330), multipl skleroz (çoklu doku sertleşmesi) (331) ve romatoid artrit (eklem iltihabı) (332) gibi inflamatuvar ve otoimmün sistem hastalıklarında, doğal ve adaptif immün sistemin ara fazındaki anahtar molekül görevinde olduğu bilinmektedir. *IL-17*'nin inflamasyon ve otoimmünitede bilinen önemine rağmen, kanserde üstlendiği rol ile ilgili olarak şu ana kadar elde edilen veriler kısmen çelişkili olup, bu konuda araştırmacıların daha fazla bilgi birikimine ihtiyaçları vardır.

IL-17, CD4 pozitif (CD4+) T-yardımcı hücre altkümesi içinde yer alan Th17 (T-yardımcı hücre tip 17) hücreleri tarafından üretilen proinflamatuvar sitokin proteini olarak tanımlanmaktadır. İmmün sistem içerisinde, nötrofil ve monosit kemotaksisi, antimikrobiyal peptidlerin aktivasyonu ve inflamatuvar moleküllerin sekresyonu gibi işlevlere sahiptir. Chen WC. ve arkadaşları, meme kanserinde *IL-17* üreten tümör hücrelerinin infiltrasyonu ile klinikopatolojik parametrelerden yüksek histolojik evre, negatif ER/PR durumu ve triple-negatif moleküler alttipler arasında anlamlı ölçüde korelasyon belirlemişlerdir. Ayrıca, *IL-17*'yi fazla miktarda salgılayan hücrelerden oluşan tümöre sahip meme kanserli hastalarda

hastaliksız sağkalım süresinin daha kısa olduğunu ifade etmişlerdir. Böylelikle, elde edilen veriler sonucunda, meme tümörlerinin mikroçevresel ortamında salgılanan yüksek *IL-17* seviyesinin kötü prognostik bir faktör olduğu gösterilmektedir (333). XingWu Zhu ve çalışma ekibi ise, *IL-17* protein ekspresyonu yüksek olan meme kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarında, meme tümörlerinin invaziv özellik kazanmasında *IL-17*'nin rolü olduğunu belirterek, meme kanseri invazyonu ve tümör progresyonuna yeni bir bakış açısı getirmektedir (334).

Meme karsinogenezinde, *IL-17B* ligandına ait reseptör geni olan *IL-17BR* ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, amplifiye olan *IL-17BR* sinyalinin hücrelerde tümörigenez sürecini indüklediği ve normal meme epitel hücrelerinde asinus oluşumunu engellediği gösterilmektedir. Bu süreçte, nüklear-faktör- κ B (*NF- κ B*) sinyal yolağı aracılığıyla antiapoptotik faktör Bcl-2'nin upregölasyonu rol oynamaktadır. Aynı zamanda, meme kanserli hastaların kötü prognoz göstermesinde, artan *IL-17BR* ekspresyonu, *HER2*'ya göre daha etkili olup, *IL-17BR* ve *HER-2* ekspresyonu yüksek olan meme tümörlerinde sağkalım oranı oldukça düşüktür. Gerçekleştirilen bu araştırmalarda ayrıca, *IL-17B* ve *IL-17BR*'ye karşı geliştirilen antikörler ile yapılan tedavilerde, meme kanseri hücrelerinin tümörijenitesinin etkili bir şekilde azaldığı gözlenmektedir. Böylece, meme tümörlerinde tedavi uygulamalarının geliştirilmesi için, amplifiye olan *IL-17BR/IL-17B* sinyal yolağının terapatik hedef olarak kullanılabilirliği söz konusu olmaktadır (335).

2.7.8.3. Meme Kanserinde *HOXB13:IL17BR* Gen Ekspresyon Oranı

Günümüzde meme kanserinin tanı, tedavi ve tiplendirilmesinde hastanın yaşı ve menapoz durumu gibi klinik parametrelerle, aksiler lenf nodu tutulumu, tümör büyüklüğü, histolojik grade ve invazyon gibi histolojik ve patolojik özellikleri, hormon reseptör durumu ve *HER-2* gen ifadesi gibi farklı özellikleri birlikte kullanılmaktadır (34, 35). Ancak yapılan tiplendirme sonucu benzer özellikler gösteren meme tümörlerinin, uygulanan tedavi protokollerine farklı cevaplar verebildiği görülmektedir. Bu durum, hastaya uygulanacak tedavi protokolünün belirlenmesinde, tümörlerin moleküler düzeydeki sınıflandırmalarına gereksinimi ortaya koymaktadır (34).

Meme kanseri hücrelerinde östrojen hormonuna bağlı olarak saptanan östrojen reseptörü (ER) pozitifliği, meme tümörlerinin endokrin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajan olan tamoxifen yanıtında iyi bilinen pozitif bir biyobelirteçtir (316). Endokrin tedavisinde hormon reseptör durumu standart hedef olarak belirlenmekle birlikte, bazı onkogenlerin

yaptığı çeşitli moleküler değişikliklerin tümörün endokrin tedavisine vereceği yanıtı değiştireceği düşünülmektedir. Benzer olarak, hastalığın prognostik sürecinin hastanın yaşı ve menapoz durumu gibi klinik parametrelerle, tümör büyüklüğü, histolojik grade ve lenf nodu statüsü gibi patolojik parametrelere bağlı olduğu bilinmektedir. Ancak iyi prognoza sahip olarak nitelendirilen östrojen hormon reseptörü pozitif, lenf nodu negatif hastalarda, tedaviye direnç gelişip tedavi sonrası nüks gerçekleşebilmektedir. Bundan dolayı meme kanseri gelişiminde etkili olan moleküler yolların anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (336).

Adjuvant tamoksifen tedavisi almış ER(+) primer meme kanserli olgularda gerçekleşen ilaç dirençliliğinin sebebini araştıran çalışma sayısının yetersiz ve sahip olunan bilimsel verinin kısıtlı olmasından dolayı, ilaç dirençliliğinin oluşum mekanizmasının belirlenmesi, araştırmacılar için güncelliğini korumaktadır. Son yıllarda literatürde, hormonal düzenleme ve gelişimin erken ve ileri dönemlerinde görevli olan, homeobox gen ailesinden *HOXB13* geninin, immün sistemde rol oynayan, interlökin gen ailesinden *IL17BR* geni ile olan korelasyonu hakkında önemli sonuçlar elde edilmiş çeşitli çalışmaların bulunduğu görülmektedir. Xiao-Jun Ma. ve arkadaşları, parafine gömülü meme dokularından real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemine dayalı olarak yaptıkları çalışmalarında, adjuvant tamoksifen tedavisi almış 60 ER(+) primer meme kanserli hastada, *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ekspresyon profillerini değerlendirmiş ve bu iki genin ekspresyon oranınının, tamoksifen tedavisine verilen yanıtı değiştirdiğini ifade etmişlerdir (336, 337). Maurice P.H.M ve arkadaşları ise, Xiao-Jun Ma ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak, RT-PCR yöntemine dayalı olarak *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon indeksini tamoksifen tedavisi görmüş meme kanseri hastalarından elde edilen primer meme tümörlerinde belirlemişler ve elde edilen indeks oranınının, tamoksifen dirençliliği ile ilgili olmakla birlikte, hastanın survisini de olumsuz yönde etkilediğini belirtmişlerdir (338). Matthew P. Goetz ve çalışma ekibinin tamoksifen terapisi görmüş, ER(+) lenf nodu negatif meme kanserli kadınlarda gerçekleştirdikleri retrospektif araştırmalarının sonucunda ise, *HOXB13* ve *IL17BR* gen ekspresyonlarının rekürrens ile de ilişkili olabileceği açıklanmıştır (339).

Meme kanserinde erken tanı ve neoplastik oluşumlarda etkili olan moleküler mekanizmaların anlaşılması ve hastanın tedaviye vereceği yanıtı ve rekürrensi belirlemede etkin olan prognostik ve prediktif belirteç olarak nitelendirilen faktörlerin belirlenmesi, meme kanserinde etkin ve bireye özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (340). Prognostik bir faktör, adjuvant bir terapi olmaksızın, hastalıksız sağkalım

veya genel sağkalım periyodu ile ilişkilendirilen, ölçülebilir, klinik veya biyolojik karakteristik bir özellik olarak tanımlanırken; prediktif bir faktör, spesifik bir tedavi karşısında yanıt alınma ya da alınamama durumu ile ilişkili, ölçülebilen, herhangi karakteristik bir özellik şeklinde ifade edilmektedir (282). Bugüne kadar yapılan araştırmalar ve elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak, *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranından, hormon ile ilişkili ER(+) özellikteki primer meme tümörlerinin tedavisi ve takibinde, prognostik ve prediktif bir biyobelirteç olarak yararlanılabileceği gösterilmektedir.

2.7.9. mikroRNA (miRNA) 'lar

2000'li yıllardan sonra, hücre moleküler biyolojisi alanında yapılan çalışmalar ve kanser ile ilgili araştırmalarda miRNA moleküllerinin öneminden bahsedilmeye başlanmıştır. miRNA'ların keşfine kadar geçen süreç içerisinde genomda bulunan kodlamayan bölgelerin fonksiyonu bilinmemektedir. Günümüzde ise bu bölgelerin büyük çoğunluğunun miRNA'ları kodladığı açık ve net olarak belirtilmektedir. miRNA'lar, 17-25 nükleotid büyüklüğünde, RNA kodlamayan, çoğunlukla gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alan, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan moleküllerdir. miRNA'ların hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, strese karşı cevap, apoptosis, immünite ve transkripsiyonel düzenleme gibi hemen hemen tüm hücresel fonksiyonlarda rol aldıkları ve bu yolların durdurulması ya da bozulmasının da kanser oluşumu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Böylece, miRNA'ların tümör gelişiminde hem onkogen hem de tümör baskılayıcı fonksiyon gösterdikleri ortaya çıkmaktadır (341).

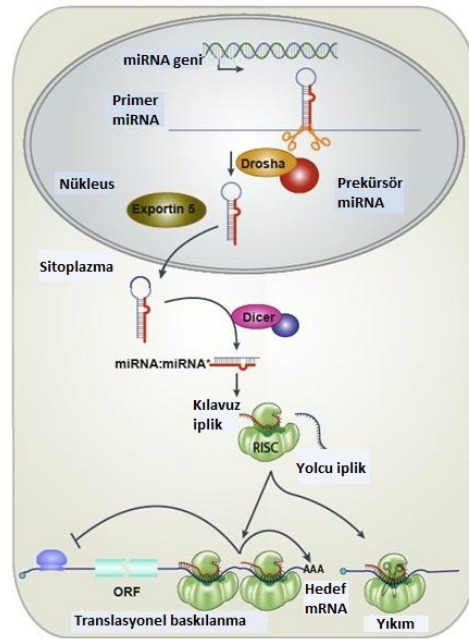
2.7.9.1. miRNA'ların Yapısı ve Biyogenezi

miRNA'ların biyogenezi, primer transkript olan primer miRNA (pri-miRNA)'nın RNA polimeraz II (RNA pol II) tarafından transkripsiyonu, nükleusta pri-miRNA'nın prekürsör miRNA (pre-miRNA)'ya dönüşümü ve son olarak sitoplazmada olgun (fonksiyonel) miRNA'ların oluşturulması olmak üzere birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelmektedir (342) (Şekil 21).

Pri-miRNA, çekirdek içerisinde RNAaz II enzimi tarafından genomik DNA üzerindeki ilgili genlerden sentezlenmektedir ve 500-3000 baz çiftine sahip olup "cap" ve "poli A" kuyruğundan oluşan sap-ilmik yapısındadır. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülmektedir (343). Pre-

miRNA molekülü bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP' ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınmaktadır. Sitoplazmada pre-miRNA, transaktivasyondan sorumlu RNA bağlayıcı protein (TRBP) ve Dicer enzimi tarafından kesilerek, bir zinciri kılavuz miRNA, diğer zinciri (yolcu zincir) ise kılavuz miRNA ile eşleşen diziyi barındıran çift zincirli molekül oluşmaktadır. Bu çift zincirli molekülün daha kararlı olan kılavuz zinciri, RNA ile uyarılan susturma kompleksi olan RISC kompleksinin içinde yer alan ve bir RNAaz olan Argonaute' nın (Ago2) etkisiyle RISC kompleksi ile birleşip hedef mRNA dizisinin inhibisyonuna neden olmakta veya translasyonunu engellemektedir, yolcu zincir ise RISC kompleksi tarafından parçalanmaktadır (343).

miRNA'lar hedef mRNA molekülüne kısmi yada tam komplementerlik göstererek bağlanabilmektedir. Hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3' bölgesi (3'UTR) ile miRNA çekirdek dizisi arasındaki komplementerliğin seviyesi miRNA'nın hedefini hangi seviyede ve nasıl baskılayacağını belirtmektedir.



Şekil-21 miRNA biyogenezi (342)

2.7.9.2. miRNA'ların Fonksiyonu ve Kansere İlişkisi

Yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, küçük RNA molekülleri olan miRNA'lar, hedef genlerin mRNA'larının 3'UTR bölgesine bağlanarak mRNA degradasyonu ya da translasyonel inhibisyon yoluyla gen

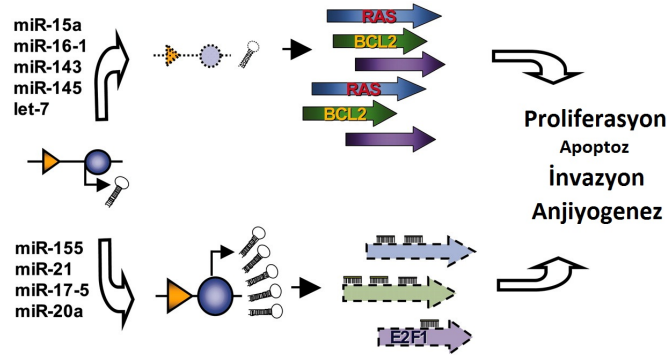
ekspresyonun düzenlenmesini sağlamaktadır (344). miRNA'ların mRNA'lara bağlanma özelliklerine dayanarak yapılan hesaplamalar, her bir miRNA'nın yaklaşık 100 farklı mRNA'yı hedefleyebildiğine işaret etmektedir (345).

Birçok kanser türünde etkili olan onkogen ve tümör supresör genlerin, 3'UTR bölgelerine bağlanan miRNA'ların sayısı ve çeşidinin bu bölgede belirlenen varyasyonlar sonucunda değiştiği gözlenmektedir. Bununla ilgili olarak Malinee Pongsavee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada meme kanserinde görev yapan *BRC1* geninin 3'UTR bölgesindeki 5711+421G>T değişiminin hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-523, hsa-miR-525-5p ve hsa-miR-520a-5p mikroRNA'larının 3'UTR bölgesi ile interaksiyonunu sağladığı gösterilmiştir. Bu şekilde spesifik 3'UTR genotipi içeren kanser hastalarında 3'UTR'ye bağlanan miRNA'ların sayısının ve çeşidinin değişmesi etkili genin mRNA'sını destabilize ederek kanser riskinin artmasının bir açıklaması olabildiği düşünülmektedir (346).

İnsanlarda mRNA'nın fonksiyonu, miRNA tarafından, translasyonun başlangıcının baskılanması, translasyonun uzama fazının baskılanması ve poli(A) kuyruğunun kısalması gibi basamaklarda düzenlenmektedir. Protein kodlayan genleri etkileyen amplifikasyon, translokasyon, delesyon, nokta mutasyonlar ve epigenetik mekanizmalar kanserli hücrelerde miRNA'nın da fonksiyonunu etkilemektedir. İnsan miRNA'larının yaklaşık %50'si, DNA üzerinde kanserle ilişkili genomik bölgelerden ve kromozomlarda boşluklar, kırıklar oluşması ve kromozomların yeniden düzenlenmesi sonucu meydana gelen hassas ve kırılabilir bölgeler olarak tanımlanan, kromozomlar üzerinde lokalize olmuş fragil bölgelerden kodlanmaktadır. Bu durum, miRNA'ların bu güne kadar açıklanamayan biyolojik olaylarda yer alan hedef moleküller olabileceğini düşündürmektedir (347).

Günümüze kadar farklı kanser tiplerinde miRNA ekspresyon düzeyindeki değişiklikleri tanımlayan birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Genom genelinde yapılan çalışmalar mikroRNA'ların tümörigenez süresince olan rollerini destekler nitelikte, bu moleküllerin kanserle ilişkili genomik bölgelerde lokalize olduğunu ve değişen derecedeki ekspresyonlarının onkogen ve tümör supressör gen fonksiyonu ile ilgili olduğunu göstermektedir (348). Kanserleşme sürecinde bazı miRNA'ların hücre proliferasyonunu arttırırken, diğerlerinin azalttığı bildirilmektedir (349) (Şekil 22). miRNA'ların bu iki sınıfı kanser gelişiminde onkogenler ve tümör supressör genler gibi merkezi bir rol oynamaktadır. miRNA'ların büyük çoğunluğunun kanserli hücrelerde düşük seviyede eksprese olduğu ifade edilmektedir (350). Normal dokularda, bu miRNA'ların bazılarının proto-onkogenlerinin translasyonunu inhibe ettiği (mRNA'ların 3' ucunu hedef alarak) bildirilmiştir. Bu nedenle bu

miRNA'lara "tümör supressör miRNA'lar (TS-miR) denmektedir. Çünkü bunların normal fonksiyonları, onkogenlerin ekspresyonlarını kontrol altında tutmaktır. Bazı miRNA'ların ise kanserli hücrelerde yüksek seviyelerde eksprese oldukları belirlenmiştir. Bu miRNA'lar ise oncomiR'ler (onco-miR) olarak tanımlanmaktadır. miRNA'ların birden fazla potansiyel hedefleri olduğu için, hücresel durumuna göre bir miRNA, TS-miR ya da onco-miR özelliği gösterebilmektedir (351).



Şekil-22 Karsinogenez sürecinde onkogenik ve tümör baskılayıcı özellik gösteren miRNA'ların fonksiyonları (349)

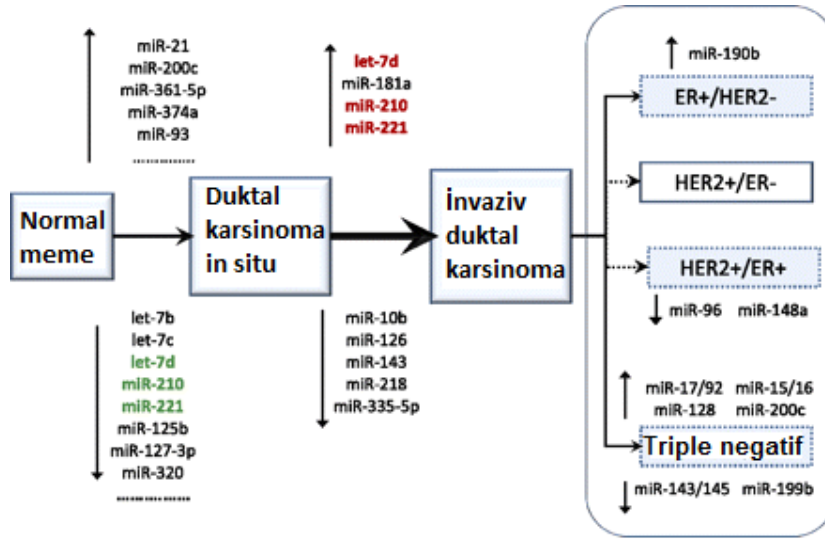
2.7.9.3. Meme Kanserinde Diagnostik, Prognostik ve Terapötik Rol Oynayan miRNA'lar

miRNA ekspresyon profilleri ile gerçekleştirilen genetik analizlerde, birçok meme kanseri hücre hattında, normal ve kanserli meme dokusunda farklı seviyelerde eksprese olan çok sayıda miRNA molekülünden bahsedilmiştir. Bu moleküller, normal meme hücrelerinin invaziv duktal meme karsinomuna dönüşümü şeklinde gerçekleşen meme tümörigenezi süresince farklı basamaklarda değişik ölçülerde ekspresyon göstermektedir (352) (Şekil 23). İnsan meme kanserlerini karakterize edici miRNA'ların varlığı ile ilgili ilk çalışma 2005 yılında yayımlanmıştır. Lu ve arkadaşları, flow sitometri tekniği ile meme kanserini de içine alan farklı tümör tiplerinde miRNA ekspresyon profillerini değerlendirerek miRNA ekspresyon düzeylerinin, normal dokulara kıyasla tümörlerde genel olarak düşük seviyelerde olduklarını belirlemişlerdir (350). Iorio ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, meme kanserine spesifik normal ve tümörlü dokularda farklı seviyelerde eksprese olan miRNA'lar tanımlanmıştır. Bu miRNA'lardan miR-10b, miR-125b ve miR-145 down-regüle; miR-21 ve miR-155 ise up-regüle olarak belirlenmiştir (353).

Meme kanserinin biyolojisinde önemli role sahip farklı seviyelerde eksprese olan miRNA' lardan, meme kanseri dokuları ve normal dokular karşılaştırıldığında ekspresyonunda en fazla artış görülen onkogenik özellikteki miR-21' in, meme karsinomunda overeksprese olup hücre sağkalımına ve proliferasyonuna aracılık ettiğini, Iorio ve Croce yaptıkları çalışmalarında kanıtlamışlardır (354). İlk tanımlanan onkogenik miRNA' lardan bir diğeri olan miR-155 ise, meme kanserinde sıklıkla up-regüle olup *TCL1*, *BCL2*, *TP53*, *PTEN* gibi tümör baskılayıcı genleri hedef almaktadır (355). miR-155 ekspresyon durumunun, insan meme kanserleri için terapötik hedef ve bağımsız bir prognostik faktör olarak kabul edilebileceği ifade edilmektedir.

miR-145, meme tümör dokularında genellikle down-regüle olup, etkisini *TP53* yolağının aktivasyonu aracılığı ile ER α ' yı hedefleyerek ortaya koymaktadır. Kim ve arkadaşları, miR-145' in terapötik potansiyelinin belirlendiği çalışmalarında meme kanser hücre hatlarında ve meme kanserli hasta dokularında, miR-145 ve hedef genlerinin ekspresyon seviyelerini karşılaştırmışlar ve aralarında ters korelasyon olduğunu bulmuşlardır. Dolayısıyla mevcut çalışmada, meme kanseri tedavisinde miR-145' in potansiyel bir hedef olarak düşünülebileceği ifade edilmektedir (356).

Son yıllarda yapılan miRNA profillemeye çalışmalarında, serum ve kan plazmasında sirküle miRNA' lar olarak tanımlanan moleküllerin varlığı tespit edilmiştir. Farklı kanser türleri ile yapılan çalışmalarda, miRNA ekspresyonlarındaki değişikliklerin, hastalığa spesifik bir değişiklik mi yoksa global bir kanser değişikliği mi olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Heneghan HM ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada; meme, kolon, prostat, böbrek tümörlü ve malign melanomlu hastalarda miR-195' in ekspresyonundaki artışın, meme kanserine özellikli olduğu ve diğer kanser türlerindeki ekspresyona göre oldukça anlamlı oranda farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.001$). Ayrıca yine bu çalışmada; 226 (83 meme kanseri, 30 kolon kanseri, 20 prostat kanseri, 20 böbrek kanseri, 10 melanoma ve 63 sağlıklı kontrol) bireyden alınan kan örneklerinde kanser gelişiminin erken evresinde önemli kanser biyomarkırı olabileceği düşünülen miR-10b, miR-21, miR-145, miR-155, miR-195 miR-16 ve let-7a' nın ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler değerlendirilmiştir. Çalışılan bu miRNA' lardan miRNA-195' in aşırı ekspresyonunun yalnızca primer meme kanserli hastalara özellikli olduğu ve *Her-2/neu(-)* meme kanserine oranla *Her-2/neu(+)* meme kanserinde, miR-195 seviyesinin önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir (357).



Şekil-23 Meme kanseri oluşum modelinde işlev gören miRNA'lardaki ekspresyon değişimleri (352)

Hongjiang Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise kan dolaşımında sirküle olan miR-125b'nin meme kanserli hastalarda kemoterapötik rezistans ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (358). Zhou M. ve arkadaşlarının meme kanseri hücre hatlarında gerçekleştirdikleri çalışmada da, miR-125b'nin taxol rezistansında rol oynadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar, miR-125b'nin hedef geninin *BCL-2*'nin antagonisti olan *BAK1* olduğunu ifade etmişlerdir (359). miRNA'ların çoklu ilaç dirençliliği mekanizmasında nasıl rol oynadığına dair yapılan çalışmalardan birinde ise miR-326'nın *MDR1* geninin içinde yer aldığı sinyal yolağını tersine çevirerek meme kanserli tümör hücrelerinin ilaç dirençlilik mekanizmasını yok ettiği bildirilmiştir (360). Meme kanserlerinde tamoksifen tedavisinin uygulanabilirliği ile ilişkili olarak da miRNA-30c nin belirleyici bir faktör olabileceğini belirten çalışmalar mevcuttur (361). Bu konuda Miller TM ve arkadaşları, meme tümörlerinde tamoksifen tedavisine karşı gelişen yanıtın *Her2/neu* overekspresyonu ile miR-221/222 ekspresyonu arasındaki ilişkiden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (362). Birbirinin homoloğu olan miR-221 ve miR-222' nin artmış ekspresyon seviyeleri, ER(-) meme tümörlerinde daha önce yapılan araştırmalarda belirlenmiş olup, son yıllarda da bu miRNA' lar ile ER durumu arasındaki ilişkiyi destekleyen çalışmalar ortaya çıkmıştır. miR-221 ve miR-222' nin ER(-) meme kanseri hücre hatları ve primer meme tümörlerinde sıklıkla up-regüle olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, miR-221 ve miR-222' nin artmış ekspresyon düzeyleri,

ER' nin negatif regülasyonu yoluyla tamoksifen direncine katkıda bulunurken, ekspresyon seviyelerindeki düşüş, tamoksifene duyarlılığı yeniden düzenlemektedir. Bu nedenle, miR-221 ve miR-222' nin ER(-) meme kanserleri için potansiyel terapötik hedef olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir (363).

Meme kanserinin invaziv ve metastatik özellik kazanmasında rol oynayan miRNA moleküllerinden miR-335 ve miR-126, metastazı baskılayan ilk miRNA' lar olarak bilinmektedir. Tavazoie SF. ve arkadaşları tarafından, primer meme tümörlerinde miR-335 ve miR-126' nın ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar analiz edilmiş ve bu miRNA' ların zayıf metastazlı sağkalım süreleri ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (364).

2.7.9.4. Meme Kanserinde *HOXB13* ve *IL17BR* Genlerini Hedef Alan miRNA' lar

Meme karsinogenezinde *HOXB13*, *IL17BR* genlerinin ve bu iki genin ekspresyon oranının tümör gelişimi ile ilgili rolleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiş olsa da, bu genleri hedef alan miRNA moleküllerinin meme tümörigenezi süresince olan fonksiyonlarının da açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Spesifik miRNA' ların dokudaki konsantrasyonlarının tümör invazyonu, metastatik potansiyeli ve diğer klinik karakteristik özellikleri ile ilişkili olduğu, kronik lenfolitik lösemi, meme, kolon, karaciğer, akciğer, pankreas ve prostat kanseri gibi birçok kanser türünde belirlenmiştir (365). 'TargetScanHuman' veri tabanından elde edilen bilgilere göre, hormona bağımlı ER(+) meme kanserli hastaların endokrin tedavisinde gelişen direnç mekanizması ile ilişkili olduğu bilinen *HOXB13* geninin regülasyonunda görevli olan miRNA' lar, miR1278, miR-661 ve miR-1260 iken; meme karsinomunda bağımsız prognostik bir faktör olarak nitelendirilen *IL17BR* geninin regülasyonundan sorumlu olan miRNA, miR-1266 'dır. Vetter G. ve arkadaşları, miR-661 ekspresyonu ile ilgili olarak, meme karsinogenezinde tümör hücrelerinin invazyonuna yol açtığını belirtmişlerdir. Bu anlamda miR-661' in, *SNAIL* tarafından indüklenen epitelyal-mezenşimal geçişte (EMT), hedef mRNA' ları olan hücre adhezyon proteini Nektin-1 ve lipid transferaz geni *STARD10*' u epitelyal markırların down-regülasyonu ile sonuçlanacak şekilde destabilize ettiği bilinmektedir (366). Reddy SD. ve arkadaşları ise Vetter G. ve çalışma ekibinden farklı olarak, miR-661' in meme kanserinde sıklıkla upregüle olan metastatik tümör antijen 1(*MTA1*)' i baskılayarak, meme kanseri oluşum sürecinde rol aldığını açıklamışlardır (367). Bu çalışmada, miR-661 ekspresyonunun, promotor bölgesine direkt olarak bağlanan *c/EBP* alpha transkripsiyon faktörü tarafından pozitif regülasyon mekanizması ile kontrol edildiği açıklanmaktadır. Söz konusu çalışmayı

gerçekleştiren araştırmacılara göre, meme kanseri oluşum süreci modelinde, miR-661 ve *c/EBP* alpha down-regüle olurken, MTA1 protein seviyesi artan bir biçimde up-regüle olmaktadır. Böylece, *c/EBP alpha*'ın meme kanseri hücrelerindeki ekspresyonu, miR-661 oranının artmasına ve MTA1 protein seviyesinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu araştırmadan elde edilen bulgular doğrultusunda, miR-661'in güçlü ekspresyonu, invaziv yapıdaki meme kanseri hücrelerinin motilitesini, invazyon özelliğini ve tümörijenitesini inhibe etmektedir.

HOXB13'ün regülasyonunda rol oynayan diğer bir miRNA olan miR-1260'ın meme kanseri ile olan ilişkisi üzerine yapılmış bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. Ancak, miR-1260 ve onun gibi henüz fonksiyonları tam olarak tanımlanmamış toplam on dokuz adet miRNA ekspresyonlarının kütanöz malign melanomlu hastalarda değerlendirildiği bir çalışmadan bahsedilmektedir. Sand M. ve araştırma ekibine ait olan bu çalışma ile (368), miR-1260 ekspresyonu up-regüle olarak belirlenmiş olup, malign melanom tümörlerinde yeni miRNA adaylarının tanımlanmasına olanak sağlamıştır.

ER(+) özellikteki meme tümörlerinde *HOXB13* geni ile zıt yönde eksprese olarak görev yapan *IL17BR* gen ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumlu miR-1266 için, literatürde yalnızca bir adet çalışmadan söz edilmektedir. İlgili çalışmada, sedef hastalarının serum düzeylerinde bulunan miR-1266 seviyesinin yüksek miktarda olduğundan bahsedilmektedir (369).

Sonuç olarak, bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmaların sonucunda elde edilen bulgulardan yola çıkılarak, *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ve bu genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyon profillerindeki değişimlerden, meme kanserinin diağnoz, prognoz ve tedavisinin takibinde biyobelirteç olarak faydalanılabileceği gösterilmektedir. Kanser gelişim sürecinde bir biyobelirteç veya terapötik ajan olarak gen ekspresyon ifadelerinden ve miRNA'lardan yararlanılması için elde edilen bilgilerin belirli standartlara getirilmesi gerekmekte ve yeni araştırma bulgularına ihtiyaç duyulmaktadır. Şimdiye kadar elde edilmiş veriler ışığında çalışmamızda, Türk popülasyonuna ait, tamoksifen tedavisi alan ve almayan, ER(+) primer meme kanserli bireylerin tümör doku ve periferik kan örnekleri kullanılarak, meme kanseri gelişiminde hücre yolaklarında görevli olan *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ve ilgili hedef genlerin miRNA'larının (*HOXB13* için; miR1278, miR-661 ve miR-1260, *IL17BR* için; miR-1266) ekspresyon seviyelerindeki farklılıkları incelemek ve bu farklılıktan yola çıkarak ilgili genlerin ve miRNA'ların meme kanserindeki prognostik ve prediktif önemini belirlemek amaçlanmaktadır. Böylece elde edilecek veriler sonucunda, yeni biyomarkır adayları olan

ilgili genler ve miRNA'ların Türk populasyonuna ait meme kanseri hastalarında hastalığın agresifliğinin ve prognostik sürecin anlaşılmasında ve buna bağlı tedavi protokollerinin yönlendirilmesinde kullanılabilirliği hakkında bilgi edinilmiş olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Çalışmamızda, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından 2006-2011 yılları arasında opere edilen ve takibe alınan, primer meme kanseri tanısı almış, hormon reseptörlerinden ER statüsü (+) özellikte olan hastalara ait tümör, normal doku ve periferik kan örneklerinde meme tümörü gelişimi ile ilgili *HOXB13, IL17BR* genleri ve bu genleri hedef alan miRNA'ların (*HOXB13* için; miR1278, miR-661 ve miR-1260, *IL17BR* için; miR-1266) ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, ER(+) 40 primer meme kanserli hastanın parafinize edilmiş tümör ve normal dokularına ait örneklerle, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın arşivinden ulaşılarak ve ilgili hastaların dokularının histopatolojik özellikleri Prof. Dr. Şahsine Tolunay tarafından değerlendirilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Belirlenen hastaların klinik özellikleri, aile öyküleri ve yaşam tarzlarına ait bilgiler ile tümörlerin histolojik ve patolojik özellikleri, Genel Cerrahi Anabilim Dalı rutin hasta arşivinden elde edilmiştir.

Planlanan tez çalışması ile ilgili olarak oluşturulan tez projesi, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Değerlendirme Fonuna 2010 yılının Aralık ayında sunulmuştur. Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 18 Şubat 2011 tarihli ve 2011-01 sayılı oturumunda alınan karar gereği, ilgili çalışma UAP(T)-2011/6 sayılı proje numarası ve 24.000,00 TL bütçe ile kabul edilmiştir. Çalışmaya dahil edilmesi planlanan meme kanserli hastaların tümör ve normal doku materyalleri, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'nun, 11 Ocak 2011 tarihli ve 2011-2/23 numaralı etik kurul kararı ile uygun bulunduktan sonra Patoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edildi.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan Aletler

- Gene Amp PCR 9700 Thermocycler, Applied Biosystems, USA.
- LightCycler 480II (Roche Diagnostics, USA)
- Isıtıcı blok (DB-2A), Techne, England.
- Su banyosu (BM 302), Nüve, İstanbul, Turkey.
- Santrifüj (Z-23), Hermle, Germany.

- Santrifüj (22R), Beckman Coulter, Germany.
- Plate santrifüjü, Thermo, USA.
- Manyetik Karıştırıcı (Vorteks), Velp Scientifica, Italy.
- + 4°C Buzdolabı, Alaska, İstanbul, Turkey.
- - 20°C Buzdolabı, Bosch, İstanbul, Turkey.
- - 80°C Buzdolabı, Nüve, İstanbul, Turkey.
- PCR UV kabini, Biosan, Latvia.
- Nanodrop (Nanodrop 2000), Thermo, USA.
- Pipet, (0.5-10 µl), Eppendorf, USA.
- Pipet, (10-100 µl), Eppendorf, USA.
- Pipet, (20-200 µl), Eppendorf, USA.
- Pipet F2, (100-1000 µl), Thermo, USA.

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Biostic Paraffin Removal Reagent, MO BIO, USA.
- RNeasy FFPE kiti (50 örneklik), Qiagen, USA.
- miRNeasy FFPE kiti (50 örneklik), Qiagen, USA.
- Taqman High Capacity RNA to cDNA Master Mix, Applied Biosystems, USA.
- Taqman MicroRNA Reverse Transkripsiyon Kiti, Applied Biosystems, USA.
- Taqman MaturemiRs Assays, Applied Biosystems, USA.
- Real Time Ready Catalog Assays, Roche Diagnostics, USA.
- Taqman Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA.
- Light Cyclers 480 Probe Master, Roche Diagnostics, USA.
- Etanol, Merck, Germany.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi

Operasyon sırasında çıkartılan, sonrasında formalin ile fikse edilip parafin içerisinde gömdürülen ve ilgili patalog tarafından değerlendirilen 40 primer meme kanserli hastaya ait tümör ve normal doku örneklerinden ilk olarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, deney prosedürü kapsamında, hastaya ait doku örneklerinden bistüri yardımıyla 0.2-0.5 cm kesilerek eppendorf tüpler içerisinde alınmıştır. Doku materyalleri, Biostic Parafin

Removal Reagent (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) kullanılıp, parafinden uzaklaştırma işlemine tabi tutularak, 3 serilik %100'lük alkol aşamalarından geçirilmiştir. Materyallerdeki alkol kalıntıları, oda sıcaklığında iyice uçurulduktan sonra, 40 hastaya ait tümör ve normal dokudan, parafin bloktan RNA izolasyonuna uygun ticari kit (RNeasy FFPE Kit, Qiagen) ve parafin bloktan miRNA izolasyonuna uygun ticari kit (miRNeasy FFPE Kit, Qiagen) kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Elde Edilen RNA' ların Miktar ve Kalite Tayini

Çalışmamızda izole edilen total RNA örneklerinin miktar ve kalitesi, NanoDrop 2000 Spektrometre (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA) cihazı kullanılarak ölçülmüştür ve ekspresyon analiz deneyleri için uygunluğu değerlendirilmiştir (Tablo-1).

Tablo-1a Hastalara Ait Tümör Doku Örneklerinden Elde Edilen Total RNA'ların Spektrofotometrik Ölçümleri

Örnek ID	HASTALARA AİT TÜMÖR DOKU ÖRNEKLERİ							Faktör
	Nükleik Asit kons.	Ünite	A260	A280	260/280	260/230	Örnek tipi	
1	864,6	ng/µl	21,616	11,519	1,88	1,91	RNA	40
2	663,3	ng/µl	16,582	9,172	1,81	2,18	RNA	40
3	359,5	ng/µl	8,988	4,826	1,86	2,06	RNA	40
4	538,3	ng/µl	13,457	7,312	1,84	2,02	RNA	40
5	241,8	ng/µl	6,046	3,317	1,82	1,64	RNA	40
6	459,4	ng/µl	11,484	6,389	1,8	2,02	RNA	40
7	481,9	ng/µl	12,047	6,319	1,91	1,89	RNA	40
8	206,6	ng/µl	5,165	2,856	1,81	1,63	RNA	40
9	1009	ng/µl	25,226	13,024	1,94	1,46	RNA	40
10	1150,4	ng/µl	28,76	15,502	1,86	2,13	RNA	40
11	1197,3	ng/µl	29,932	15,443	1,94	1,69	RNA	40
12	51	ng/µl	1,274	0,683	1,86	1,95	RNA	40
13	1354,8	ng/µl	33,869	17,726	1,91	2,18	RNA	40
14	514,7	ng/µl	12,868	6,821	1,89	2,15	RNA	40
15	1215,3	ng/µl	30,382	16,185	1,88	1,88	RNA	40
16	1939,1	ng/µl	48,477	25,588	1,89	2,08	RNA	40
17	357,7	ng/µl	8,941	4,799	1,86	2,07	RNA	40
18	1891,8	ng/µl	47,294	25,322	1,87	2,09	RNA	40
19	486	ng/µl	12,15	6,345	1,91	1,91	RNA	40
20	257,8	ng/µl	6,444	3,389	1,9	1,87	RNA	40
21	115	ng/µl	2,876	1,6	1,8	1,5	RNA	40
22	310,5	ng/µl	7,763	4,233	1,83	1,07	RNA	40
23	562,3	ng/µl	14,058	7,855	1,79	2,06	RNA	40
24	976,6	ng/µl	24,415	13,462	1,81	1,62	RNA	40
25	269,2	ng/µl	6,731	3,613	1,86	2,03	RNA	40
26	354,2	ng/µl	8,856	4,685	1,89	1,91	RNA	40
27	550,1	ng/µl	13,753	7,652	1,8	1,98	RNA	40
28	141,3	ng/µl	3,533	1,913	1,85	1,89	RNA	40
29	185,4	ng/µl	4,636	2,489	1,86	1,41	RNA	40
30	235,5	ng/µl	5,887	3,066	1,92	1,8	RNA	40
31	265,1	ng/µl	6,629	3,48	1,9	1,77	RNA	40
32	333,9	ng/µl	8,346	4,351	1,92	1,72	RNA	40
33	622,4	ng/µl	15,561	8,23	1,89	2,14	RNA	40
34	716	ng/µl	17,9	9,082	1,97	1,93	RNA	40
35	494,1	ng/µl	12,353	6,418	1,92	1,77	RNA	40
36	704,7	ng/µl	17,617	9,136	1,93	2,07	RNA	40
37	611,8	ng/µl	15,295	7,908	1,93	2,14	RNA	40
38	268,9	ng/µl	6,723	3,489	1,93	1,83	RNA	40
39	233,6	ng/µl	5,84	3,03	1,93	1,95	RNA	40
40	759,5	ng/µl	18,987	9,404	2,02	2,14	RNA	40

Tablo-1b Hastalara Ait Normal Doku Örneklerinden Elde Edilen Total RNA'ların Spektrofotometrik Ölçümleri

Örnek ID	HASTALARA AİT NORMAL DOKU ÖRNEKLERİ							Faktör
	Nükleik Asit kons.	Ünite	A260	A280	260/280	260/230	Örnek tipi	
1	1465,1	ng/µl	36,628	19,119	1,92	1,81	RNA	40
2	220	ng/µl	5,499	2,821	1,95	1,84	RNA	40
3	379,7	ng/µl	9,493	5,033	1,89	1,64	RNA	40
4	201,8	ng/µl	5,045	2,668	1,89	2	RNA	40
5	1312,8	ng/µl	32,82	16,779	1,96	2,09	RNA	40
6	44,8	ng/µl	1,12	0,602	1,86	0,73	RNA	40
7	408,1	ng/µl	10,204	5,303	1,92	1,95	RNA	40
8	150,8	ng/µl	3,771	2,126	1,77	1,11	RNA	40
9	254,5	ng/µl	6,361	3,451	1,84	1,63	RNA	40
10	298,5	ng/µl	7,463	3,684	2,03	0,61	RNA	40
11	342	ng/µl	8,551	4,29	1,99	1,84	RNA	40
12	111,2	ng/µl	2,78	1,524	1,82	1,62	RNA	40
13	39,6	ng/µl	0,991	0,516	1,92	1,4	RNA	40
14	29,5	ng/µl	0,737	0,379	1,95	0,77	RNA	40
15	549,9	ng/µl	13,748	7,368	1,87	2,01	RNA	40
16	17,5	ng/µl	0,438	0,234	1,87	0,98	RNA	40
17	25,6	ng/µl	0,64	0,35	1,83	1,12	RNA	40
18	25,7	ng/µl	0,642	0,361	1,78	0,33	RNA	40
19	118,3	ng/µl	2,957	1,62	1,83	1,4	RNA	40
20	225,2	ng/µl	5,629	2,99	1,88	1,79	RNA	40
21	1325,5	ng/µl	33,138	17,138	1,93	2,08	RNA	40
22	115,2	ng/µl	2,881	1,515	1,9	1,89	RNA	40
23	163,4	ng/µl	4,084	2,148	1,9	1,89	RNA	40
24	215,3	ng/µl	5,382	2,869	1,88	2,15	RNA	40
25	137,5	ng/µl	3,438	1,787	1,92	1,8	RNA	40
26	90,4	ng/µl	2,261	1,205	1,88	1,66	RNA	40
27	206,7	ng/µl	5,168	2,771	1,86	1,84	RNA	40
28	89,8	ng/µl	2,244	1,239	1,81	1,43	RNA	40
29	152,7	ng/µl	3,818	2,029	1,88	1,33	RNA	40
30	110	ng/µl	2,749	1,507	1,82	1,11	RNA	40
31	48,4	ng/µl	1,211	0,664	1,82	0,46	RNA	40
32	666,2	ng/µl	16,654	8,804	1,89	2,15	RNA	40
33	33,3	ng/µl	0,831	0,463	1,8	0,27	RNA	40
34	252,8	ng/µl	6,321	3,14	2,01	0,54	RNA	40
35	74,9	ng/µl	1,873	1,026	1,83	1,38	RNA	40
36	832	ng/µl	20,801	10,72	1,94	2,06	RNA	40
37	645,3	ng/µl	16,133	8,716	1,85	2,14	RNA	40
38	102,7	ng/µl	2,568	1,362	1,89	1,34	RNA	40
39	43	ng/µl	1,075	0,583	1,84	1,17	RNA	40
40	586,7	ng/µl	14,668	7,566	1,94	2,12	RNA	40

Elde edilen total RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için, RNA örneklerinin 260 ve 280 nm’deki dalga boylarında yapılan ölçümleri ve bu dalga boylarından elde edilen değerlerin birbirlerine olan oranları kullanılmıştır. RNA’nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranları esas alınmaktadır. 260 nm DNA’nın, 280 nm proteinin, 230 nm de fenolün maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyunu ifade etmektedir. A260/A280 oranınının 1,8-2,2 aralığında olması RNA’nın saf olduğunu göstermektedir. Fenol, protein veya benzeri diğer safsızlıkların olması durumunda bu oranlar belirtilen aralığın dışında çıkmaktadır.

RNA’nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA’nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA’nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır.

Total RNA (ng/μl) = 260 nm’deki absorpsiyon x 40 x Dilüsyon Faktörü

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 μg/mL’ye karşılık geldiği bilinmektedir.

3.3.3. RNA’lardan cDNA Sentezi

Konsantrasyon ve kalite tayinleri yapılan total RNA’lardan Taqman High Capacity RNA to cDNA Master Mix (Applied Biosystems, USA) kiti kullanılarak, değerlendirilecek hedef genlere özgü komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında, izole edilen total RNA’lardan, Taqman microRNA Reverse Transkripsiyon kiti ile, ilgili genleri hedef alan miRNA’ların ekspresyon analiz deneylerinde kullanılacak olan cDNA’lar da elde edilmiştir. Her iki cDNA sentez reaksiyonunda, PCR döngüsü esnasında oluşan spesifik PCR ürününü belirlemek ve eş zamanlı değerlendirmek amacıyla florasan ışığa yapabilen, Taqman prob işaretli primerler kullanılmıştır. Elde edilen total RNA örneklerinden cDNA eldesi için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) karışımları ve programları Tablo-2, Tablo-3, Tablo-4 ve Tablo-5’de verilmiştir.

Tablo-2 Değerlendirilecek Hedef Genlere Özgü cDNA Sentezi için Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Bileşenler	1 Örneklik Reaksiyon	Son konsantrasyon
Master Mix(or No-RT Control)	4.00 μl	1X
RNA örneği	16.00 μl’ye kadar	1pg- 1μg
RNase-free H ₂ O	Toplam hacim 20 μL olacak şekilde dH ₂ O ile tamamlanır	-
Total	20.00 μl	-

Tablo-3 Değerlendirilecek Hedef Genlere Özgü cDNA Sentezi için Kullanılan PCR Programı

	1.aşama	2.aşama	3.aşama	4.aşama
Sıcaklık (°C)	25°C	42°C	85°C	4°C
Zaman (dk)	5 dk	30 dk	5 dk	∞

Çalışılacak her bir örnek için 0,2 µl' lik PCR tüpü içerisinde Tablo-2' de verilen malzemelerden buz üzerinde 20 µl' lik bir reaksiyon karışımı oluşturulup, elde edilen miks pipetaj yapılarak karıştırılmış ve santrifüje alınarak spin atılmıştır. PCR tüpü içerisindeki miks, Taqman High Capacity RNA to cDNA Master Mix için optimize edilmiş PCR programına alınarak reaksiyon hacmi 20 µl'ye ayarlanmıştır. Reverse Transkripsiyon reaksiyonu sonrası elde edilen cDNA' lar, bir sonraki aşamaya kadar -20°C' de saklanmıştır.

Tablo-4 İlgili Genleri Hedef Alan miRNA'lara Özgü cDNA Sentezi için Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Bileşenler	15 µL' lik Reaksiyondaki Master Miks Hacmi (1 Örneklik)
100mM dNTP	0.15 µl
MultiScribe Reverse Transkriptaz Enzimi,50 U/µL	1.00 µl
10X Reverse Transkripsiyon Buffer	1.5µl
RNase inhibitör, 20 U/µL	0.19 µl
RNase-free H ₂ O	4.16 µl
Total	7.00 µl

Her 15 µL' lik reaksiyon; 7µl master miks, 3 µl 5X Reverse Transkripsiyon primeri ve 5 µl RNA örneği içerir.
15 µL' lik reaksiyon, 1-10 ng RNA örneği içermektedir.

Tablo-5 İlgili Genleri Hedef Alan miRNA'lara Özgü cDNA Sentezi için Kullanılan PCR Programı

	1.aşama	2.aşama	3.aşama	4.aşama
Sıcaklık (°C)	16°C	42°C	85°C	4°C
Zaman (dk)	30 dk	30 dk	5 dk	∞

Çalışılacak her bir örnek için 0,2 µl' lik PCR tüpü içerisinde Tablo-4' de verilen malzemelerden buz üzerinde 7 µl'lik bir reaksiyon karışımı oluşturulup, elde edilen master miks pipetaj yapılarak karıştırılmış ve santrifüje alınarak spin atılmıştır. PCR tüpü içerisindeki master miks içerisine, her miRNA için spesifik özellikte olan 3 µl 5X Reverse

Transkripsiyon primer ilave edilip iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan master miks ve primer karışımına, 1-10 ng olacak şekilde 5 µl RNA örneği eklenip toplamda 15 µl'lik reaksiyon elde edilmiştir. Elde edilen reaksiyon miksi, Taqman microRNA Reverse Transkripsiyon Kiti için optimize edilmiş PCR programına alınarak reaksiyon hacmi 15 µl'ye ayarlanmıştır. Reverse Transkripsiyon reaksiyonu sonrası elde edilen cDNA' lar, bir sonraki aşamaya kadar -20°C' de saklanmıştır.

3.3.4. Real-Time PCR ile *HOXB13*, *IL17BR* Genlerinin ve Bu Genleri Hedef Alan miRNA'ların Ekspresyon Analizleri

Çalışmamızda, meme kanseri gelişiminde prognostik ve prediktif öneme sahip olduğu bilinen, aynı zamanda ilaç direnci üzerine etkisinin var olduğu bildirilen *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ve bu genleri hedef alan miRNA'ların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Değerlendirilen genler, bu konuda literatürde son yıllarda yapılan çalışmalar göz önüne alınarak belirlenmiştir. Ekspresyon analizleri gerçekleştirilen miRNA'ların seçimi ise, *HOXB13* ve *IL17BR* genlerini hangi miRNA'ların hedef aldığı araştırılarak gerçekleştirilmiştir. İlgili miRNA'lar TargetScanHuman (<http://www.targetscan.org/>) veri tabanından seçilip, bu miRNA'lara ait özellikler miRbase (<http://www.mirbase.org/>) veri tabanından elde edilmiştir. Çalışmada değerlendirilen *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin meme tümörlerindeki ekspresyon durumları ve seçim kriterlerini ifade eden özellikleri Tablo-6'da verilmiştir. Seçilen 4 farklı miRNA'nın tümör dokularındaki ekspresyon durumları, kromozomal lokalizasyonları ve hedef genleri ile ilgili bilgiler ise Tablo-7'de verilmiştir. Meme tümörlerinin gen ve miRNA ekspresyon profillerinin ortaya çıkarılması amacıyla, Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) tekniğinden yararlanılmıştır.

Tablo-6 Meme Kanseri Gelişiminde Önemli Olan *HOXB13* ve *IL17BR* Genleri

Gen	Regülasyon Durumları	Prognostik/Prediktif Önem	Hangi Tip Meme Kanserinde Etkili
<i>HOXB13</i>	↑	Prognostik/Prediktif	ER(+) MEME KANSERİ, METASTATİK MEME KANSERİ
<i>IL17BR</i>	↓	Prognostik	ER, PR (-) MEME KANSERİ, İNVAZİV MEME KANSERİ
<i>HOXB13:IL17BR</i>	↑	Prognostik/Prediktif	ER(+) MEME KANSERİ, METASTATİK MEME KANSERİ

Tablo-7 HOXB13 ve IL17BR Genlerini Hedef Alan miRNA'lar ve Bilinen Özellikleri

miRNA Adı	miRNA Accession numarası	Regülasyon Durumları	Kromozom Lokalizasyonları	Hedef Genleri	Referans
hsa-miR-661	MIMAT0003324	↑ ↓	8q24.3	<i>STARD10, MTA1, MTA2, HOXB13, VCL, PVRL1, MCL, MAP3K3</i>	Vetter G, Saumet A, Moes M. ve ark. Reddy SD, Palala SB, Ohshiro K. ve ark.
hsa-miR-1260	MIMAT0005911	↑	Kromozom 14	<i>GPKOW, ZNF763, EIF2C1, HOXB13, HOXB5, HOXB9, HOXC10</i>	Sand M, Sikrygan M, Sand D. ve ark.
hsa-miR-1278	MIMAT0005936	Bilinmiyor	Kromozom 1	<i>ZNF146, APPBP2, E2F3, HOXB13, HOXA5, HOXC9</i>	www.mirbase.org
hsa-miR-1266	MIMAT0005920	↑	Kromozom 15	<i>MYO18A, SBK1, MAPK3, E2F7, ILI7A, IL17BR</i>	Ichihara A, Jinin M, Oyama R. ve ark.

Primer meme kanserli 40 hastanın cDNA örneklerinde çalışılması hedeflenen genler ve miRNA'lar ile ilgili Tablo-8 ve Tablo-9'da belirtilen qRT-PCR reaksiyon solüsyonları hazırlanarak, 96'lık well plate'lere yükleme yapılmıştır. *HOXB13*, *IL17BR* genleri ve bu genleri hedef alan 4 miRNA'nın ekspresyon analizleri, Light Cycler 480 II (LC480) RT-PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo-8 Hedef Genlere Ait qRT- PCR Reaksiyon Karışımı ve Programı

Bileşenler	1 örneklilik reaksiyon
Primer-probe miksi (10X)	1.00 µl
cDNA	2.00 µl
Light Cycler 480 Probes Master, 2X (vial 1)	10.00 µl
RNase-free H ₂ O (vial 2)	7.00 µl
Total	20.00 µl

Aşama	Siklus sayısı	Analiz modu	Sıcaklık (°C)	Acquisition mode	Zaman
Pre-inkübasyon	1	Yok	95	Yok	00:10:00
Amplifikasyon	45	Nicel değerlendirme	95	Yok	00:00:10
			60	Yok	00:00:30
			72	Tek	00:00:01
Soğuma	1	Yok	40	Yok	00:00:30

Tablo-9 miRNA'lara Ait qRT- PCR Reaksiyon Karışımı ve Programı

Bileşenler	1 örneklilik reaksiyon
Taqman Small RNA Assay (20 x)	1.00 µl
cDNA	1.33 µl
Taqman Universal PCR Master Mix II (2X)	10.00 µl
RNase-free H ₂ O	7.67 µl
Total	20 µl

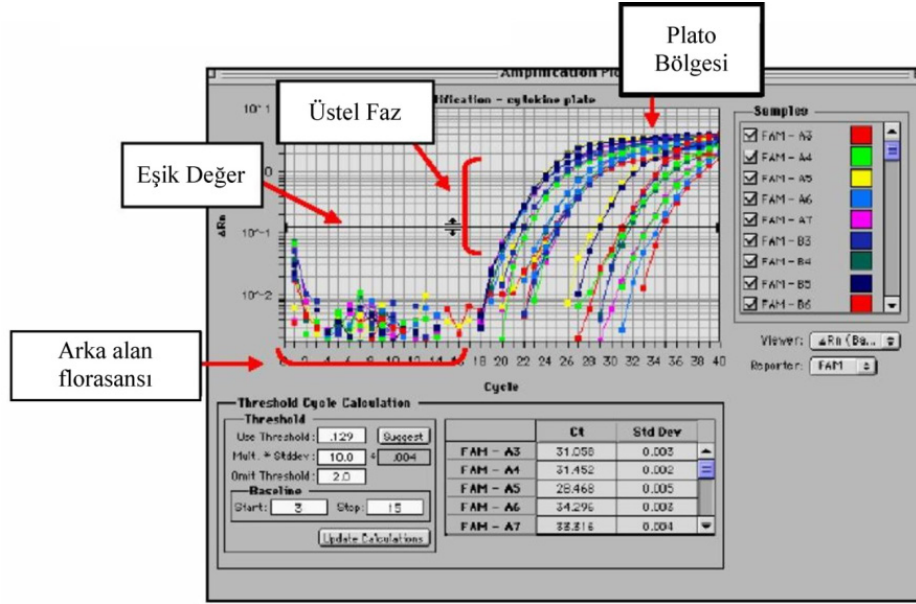
Aşama	Opsiyonlu AmpErase UNG Aktivitesi	Enzim Aktivitesi	PCR	
			40 sikluluk	
			Denatürasyon	Bağlanma/Uzama
Sıcaklık	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Süre	2 dakika	10 dakika	15 saniye	60 saniye

3.3.5. qRT-PCR Analizi Sonucu Hedef Genlerin ve İlgili miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve kesin sonuçlar veren nicel PCR metodlarından biri olan Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR), son ürün analizlerinden farklı olarak reaksiyonun gerçekleştiği zamanla eş zamanda reaksiyonu görüntülemektedir. Bu sistemlerdeki PCR reaksiyonunda, ardı ardına gerçekleşen döngülerde üretilen PCR ürününün miktarı, orantılı biçimde yayılan bir florasan sinyali ile ilişkilendirilmiştir. Her bir reaksiyon döngüsünde, üretilen PCR ürününün miktarı ile orantılı olarak bu sinyal artar. Her bir döngüde florasan sinyal miktarı kayıt edilir ve logaritmik faz boyunca PCR reaksiyonu görüntülenir. Florasan sinyalinin ilk önemli artışı hedef RNA'nın başlangıçtaki miktarı ile ilişkilidir.

Bir PCR reaksiyonunda çoğaltılmak istenen ampikonun florasan yöntemlerle tespitini özelleştirmek için PCR primer çiftlerinin içinde bulunan, florasan işaretleyiciler taşıyan, sekansa özel prob lar kullanılır. Sekans özel prob tabanlı qRT-PCR yöntemlerinden biri olan, degradasyon probu olarak bilinen Taqman prob yönteminde, Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi, 5' ucundaki reporter (haberci) florasan boya ile 3' ucundaki quencher (söndürücü) boya arasındaki probu degrade eder. Bu durum, amplifikasyon ilerledikçe florasan sinyalinin artmasına neden olur.

Eş zamanlı PCR uygulanırken florasan veri (Rn biriminde), döngü sayısına karşı sinyal miktarını bulmak için bir grafikte toplanmaktadır. qRT-PCR'da üç farklı aşama görmek mümkündür. Bunlar; arka plandaki sinyalle ilgili hafif dalgalanmaların olduğu ilk 'lag' aşaması, artan paralel verilerin bulunduğu ikinci logaritmik aşama (üstel faz) ve verilerin platoya ulaştığı üçüncü aşama olarak sıralanmaktadır (Şekil 24).



Şekil 24. qRT-PCR metodunun tipik aşamaları ve örneklerin Ct değerlerinin elde edilmesi

Çalışmamızda kullanılmak üzere belirlediğimiz genler ve miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, Ct metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Hedef genler ve miRNA ekspresyonlarının başlangıç kopya sayısı ve Ct değerleri, Light Cycler 480 II cihazının veri tabanından yararlanılarak elde edilmiştir. Eşik değeri (Threshold) olarak tanımlanan Ct değeri, floresan ışımada (ΔR_n) artışın başladığı ilk siklusu ifade eder. $R_n(+)$, yüklenen örneğin reaksiyona giren tüm bileşenlerin floresan emisyonu; $R_n(-)$ ise negatif kontrolün ve reaksiyonu gerçekleşmeyen örneklerin floresan emisyonu olarak tanımlanmaktadır. ΔR_n ; $R_n(+)$ ve $R_n(-)$ arasındaki fark olup, Ct değerinin hesaplanmasında kullanılan temel göstergedir. Çalışmada, ham verilerden elde edilen ortalama Ct değerleri, hedef genler için endojen kontrol olan housekeeping (referans) gen *ACTB* ve miRNA'lar için endojen kontrol olan housekeeping gen *RNU19* ile normalize edilmiştir.

3.3.6. Periferik Kan Örneklerinden RNA Elde Edilmesi

Mevcut çalışmada, tümör ve normal dokularında *HOXB13* ve *IL17BR* gen ekspresyonları değerlendirilmiş primer meme tümürlü 40 hastanın, yapılan istatistiksel hesaplama sonucunda *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon indeksleri ('İstatistiksel Analiz' kısmında anlatılmıştır) elde edilmiştir. Tümör dokularındaki *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon indeksi anlamlı olan hastaların periferik kan örneklerinden de bu iki genin ekspresyonlarının çalışılması amaçlanmıştır. Elde edilen gen ekspresyon indeks değerlerinin anlamlılığını belirlemek için bir cut-off değeri belirlemek adına *HOXB13* ve *IL17BR* raw Ct değerlerinden

faýdalanılmıştır. Mevcut çalışmada, tümör dokusu çalışılan primer meme kanserli hastaların % 85’inde *HOXB13* gen amplifikasyon döngüsü sonucunda belirlenen raw Ct değeri, analizde belirlenen eşik değer sınırını aştığından dolayı *HOXB13* gen ekspresyon seviyesi belirlenememiş olup, ekspresyon seviyeleri ölçülebilen eşik değer sınırında %50’ye ayarlanıp hesaplanmıştır. Eşik değer ayarlanmasından önce, *HOXB13* ve *IL17BR* genlerine ait raw Ct değeri belirlenemeyen hastaların eşik değer sınırının hesaplanması ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 2,86648E-10 olarak belirlenmiştir, gen ekspresyon oranı için cut-off değeri olarak 2,86648E-10 değeri baz alınmıştır. Bu değerden farklı bir değerde ekspresyon gösteren toplam 12 meme kanserli hastanın periferik kanlarında hedef iki genin ekspresyon analizi planlanmıştır. Bu amaçla, anlamlı olarak değerlendirilen 12 hastanın içinden ulaşılabilen 7 hastanın periferik kan örnekleri toplanıp -80°C’de saklanmıştır. Tümör dokularındaki *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon indeksi baz alınarak seçilen 7 hastaya ait periferik kan örneğinden, kandan RNA izolasyonuna uygun ticari kit (PureLink RNA Mini Kit, Invitrogen) kullanılarak periferik kandan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin miktar ve kalitesi, NanoDrop 2000 Spektrometre (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA) cihazı kullanılarak ölçülmüştür (Tablo-10).

Tablo-10 Hastalara Ait Periferik Kan Örneklerinden Elde Edilen RNA’ların Spektrofotometrik Ölçümleri

HASTALARA AİT PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİ								
Örnek ID	Nükleik Asit kons.	Ünite	A260	A280	260/280	260/230	Örnek tipi	Faktör
1	246,6	ng/µl	21,61	11,873	1,82	1,9	RNA	40
2	435,7	ng/µl	16,876	9,172	1,84	2,15	RNA	40
3	359,5	ng/µl	15,663	8,42	1,86	2,04	RNA	40
4	532,8	ng/µl	13,469	7,36	1,83	2,02	RNA	40
5	240,7	ng/µl	6,254	3,455	1,81	1,67	RNA	40
6	456,5	ng/µl	11,68	6,313	1,85	2,01	RNA	40
7	473,9	ng/µl	13,056	6,8	1,92	1,87	RNA	40

3.3.7. Periferik Kandan Elde Edilen RNA’lardan cDNA Sentezi

Konsantrasyon ve kalite tayinleri yapılan RNA örneklerinden High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) kullanılarak, değerlendirilecek hedef

genlere özgü komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez reaksiyonunda, PCR döngüsü esnasında oluşan spesifik PCR ürününü belirlemek ve eş zamanlı değerlendirmek amacıyla florasan ışığa yapabilen, Taqman prob işaretli primerler kullanılmıştır. Elde edilen RNA örneklerinden cDNA eldesi için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) karışımı ve programı tablo-11 ve tablo-12’de verilmiştir.

Tablo-11 Periferik Kandan Elde Edilen RNA’lardan cDNA Sentezi için Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Bileşenler	1 Örneklik Reaksiyon
10X RT Buffer	2.00 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primers	2.00 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.00 µl
RNase-free H ₂ O	20.00 µl’ye dH ₂ O ile tamamlanır.
RNA örneği	2 µg’ye kadar kullanılabilir.
Total	20.00 µl

Tablo-12 Periferik Kandan Elde Edilen RNA’lardan cDNA Sentezi için Kullanılan PCR Programı

	1.aşama	2.aşama	3.aşama	4.aşama
Sıcaklık (°C)	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman (dk)	10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.3.8. Real-Time PCR ile Periferik Kandan *HOXB13* ve *IL17BR* Genlerinin Ekspresyon Analizleri

Tümör dokularında *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon indeksi anlamlı ölçüde farklılık gösteren 7 hastanın periferik kan örneklerinden elde edilen RNA’lar kullanılarak sentezlenen cDNA örneklerinde çalışılması hedeflenen *HOXB13* ve *IL17BR* genleri ile ilgili Tablo-13’de belirtilen qRT-PCR reaksiyon solüsyonları hazırlanmıştır ve 96’ lık well plate’lere yükleme yapılmıştır. *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ekspresyon analizleri, Light Cycler 480 II (LC480) RT-PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo-13 *HOXB13* ve *IL17BR* Genlerine Ait qRT- PCR Reaksiyon Karışımı ve Programı

Bileşenler	1 örneklilik reaksiyon
Primer-probe miksi (10X)	1.00 µl
cDNA	2.00 µl
Light Cycler 480 Probes Master (2X) (vial 1)	10.00 µl
RNase-free H ₂ O (vial 2)	7.00 µl
Total	20.00 µl

Aşama	Siklus sayısı	Analiz modu	Sıcaklık (°C)	Acquisition mode	Zaman
Pre-inkübasyon	1	Yok	95	Yok	00:10:00
Amplifikasyon	45	Nicel değerlendirme	95	Yok	00:00:10
			60	Yok	00:00:30
			72	Tek	00:00:01
Soğuma	1	Yok	40	Yok	00:00:30

3.3.9. qRT-PCR Analizi Sonucu Periferik Kandan *HOXB13* ve *IL17BR* Genlerinin Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda kullanılmak üzere belirlediğimiz genlerin ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, Taqman prob yöntemine dayalı qRT-PCR Analizi sonucu Ct metodu kullanılarak hesaplanmıştır. İlgili gen ekspresyonları için Light Cycler 480 II RT-PCR cihazının yazılım programında örneklerin başlangıç kopya sayısı ve Ct değerleri elde edilmiştir. Ham verilerden elde edilen ortalama Ct değerleri, *HOXB13* ve *IL17BR* genleri için endojen kontrol olan housekeeping (referans) gen *ACTB* ile normalize edilmiştir.

3.3.10. İstatistiksel Analiz

Hedef genler ve ilgili miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişimleri inceleyebilmek için, öncelikle LightCycler 480 II RT-PCR cihazının veri tabanından, yüklenen örneklerin Raw Data ve Ct değerleri elde edilmiştir.

RT-qPCR analizinden elde edilen verilerin değerlendirilebilmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntemler, mutlak kantifikasyon ve göreceli kantifikasyondur. Mutlak kantifikasyon ile kalıp cDNA'dan çoğaltılan kopya sayısı, göreceli kantifikasyon ile ise, örneklem grubu ile kontrol grubuna ait cDNA'lardan çoğaltılan kopya sayılarının oranı hesaplanmaktadır. Bu amaçla geliştirilen ve en yaygın olarak kullanılan yöntem $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemidir. Çalışmamızda hedef genlerin ve ilgili miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki

değişimler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplandıktan sonra, bu yöntem ile bundan sonra yapılacak istatistiki analizler yönlendirilmiştir.

$2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi:

PCR'nin üstel amplifikasyonu,

$$X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n$$

eşitliği ile tanımlanmaktadır. Bu eşitlikte, " X_n ", n sayıda gerçekleşen PCR döngüsü sonucunda oluşan hedef molekül sayısını, " X_0 ", hedef molekülün başlangıç sayısını, " E_X ", hedef molekülün amplifikasyonunun verimliliğini ve "n" de PCR reaksiyonunda gerçekleşen döngü sayısını ifade etmektedir. RT-qPCR deneylerinde, floresan sinyal miktarının gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısını ifade eden Ct (cycle threshold) değeri;

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{Ct,X} = K_X$$

eşitliği ile açıklanabilmektedir. Bu eşitlikte, " X_T " ile hedef molekülün Ct sayısı, " $C^{T,X}$ " ile de hedef molekülün amplifikasyonu için gerçekleşen döngü sayısı tanımlanmaktadır. " K_X " ise sabit değerdir. Endojen kontrol için de benzer bir eşitlik söz konusudur. Buna göre,

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{Ct,R} = K^R$$

eşitliğinde, " R_T " ile referans molekülün CT sayısı, " $C^{T,R}$ " ile de referans molekülün amplifikasyonu için gerçekleşen döngü sayısı tanımlanmaktadır. " K_R " ise sabit değerdir. Hedef molekülün CT sayısının, referans molekülün CT sayısına bölünmesi ile oluşan,

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{Ct,X}}{R_0 \times (1 + E_R)^{Ct,R}} = \frac{K_X}{K_R} = K.$$

formülünden elde edilen sonuç ekspresyon değerini yani mutlak kantifikasyon değerini ifade etmektedir. Göreceli kantifikasyon değerinin hesaplanabilmesi için,

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta CT}$$

eşitliğinden yararlanılmaktadır. Bu eşitlikte yer alan " X_N " değeri örneklemin normalize edilmiş mutlak kantifikasyon değerini (X_T/R_T) ifade etmektedir. " ΔCT " değeri ise hedef molekülün ve referansın eşik döngüleri arasındaki farkı ($CT_{T,X} - CT_{T,R}$) ifade etmektedir.

En son basamakta ise, "q" adı verilen bir örneklemin " X_N " değeri ($X_{N,q}$), "cb" adı verilen bir kalibratörün " X_N " değerine ($X_{N,cb}$) bölünür.

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta CT_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta CT_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta CT}$$

Elde edilen değer, $-(\Delta CT_{T,q} - \Delta CT_{T,cb})$ 'ye eşit olup $-\Delta\Delta CT$ değeri olarak adlandırılmaktadır. 150bp'den daha küçük olan ampliconlarda ve primer ve Mg^{2+}

konsantrasyonları optimize edilmiş reaksiyonlarda “E_x” değeri 1’e yakın olduğundan dolayı, örneklemin miktarı endojen kontrole ve relatif kalibratöre normalize edilmektedir. Bu nedenle, reaksiyon sonunda elde edilen örneklem miktarı $2^{-\Delta\Delta CT}$ olarak hesaplanmaktadır.

$2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin hesaplanmasından sonraki aşama, gen ve miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin, tümör dokularda normal dokulara göre kaç kat arttığı ya da azaldığı ile ilişkilidir. Fold change (kat değişimi) olarak adlandırılan bu hesaplamada, hastaların normal meme dokularından elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin ortalaması alınarak, her bir hastaya ait tümör dokudan elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin, normal dokuların ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerine bölünme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin sonucundan elde edilen değerler ile, her bir hedef gen ve miRNA için ayrı olmak üzere fold change grafikleri çizdirilmiştir. Böylece, tümör dokularında normal dokuya göre, analiz edilen hedef gen ve ilgili miRNA’ların hangilerinin yüksek eksprese (up-regüle), hangilerinin düşük eksprese (down-regüle) olduğu ortaya konulmuştur. Periferik kan örnekleri için yapılan $2^{-\Delta\Delta CT}$ analizinde ise meme kanserli hastalar, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak fold change değerleri hesaplanmıştır. Buraya kadar yapılan istatistikler hem tümör doku, hem de periferik kan örnekleri için gerçekleştirilmiştir; ancak bundan sonraki hesaplamalar tümör ve normal parafin doku örneklerine aittir.

Mevcut çalışmada, ekspresyonu değerlendirilmesi amaçlanan hedef genler *HOXB13* ve *IL17BR* olmakla birlikte, bu iki genin analizi sonucu elde edilen değerlerden *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu sonucunda elde edilen değerlerden yola çıkılarak; *HOXB13*’ün $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinden, *IL17BR*’nin $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri çıkartılarak aşağıda formül ile gösterilen *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı elde edilmiştir.

$$HOXB13:IL17BR \text{ gen oranı} = 2^{-\Delta\Delta CT} (HOXB13) - 2^{-\Delta\Delta CT} (IL17BR)$$

Çalışmamızda, 40 hastanın 34’ünde (% 85’inde) *HOXB13* gen amplifikasyon döngüsü sonucunda belirlenen raw Ct değeri, analizde belirlenen eşik değer sınırını aştığından dolayı *HOXB13* gen ekspresyon seviyesi belirlenememiş olup, ekspresyon seviyeleri ölçülebilen eşik değer sınırında %50’ye ayarlanıp hesaplanmıştır.

Elde edilen gen ekspresyon indeks değerleri için bir cut-off değeri belirlemek adına *HOXB13* ve *IL17BR* raw Ct değerlerinden faydalanılmıştır. Eşik değer ayarlanmasından önce, *HOXB13* ve *IL17BR* genlerine ait raw Ct değeri belirlenemeyen hastaların eşik değer sınırının hesaplanması ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 2,86648E-10 olarak belirlenmiştir, gen ekspresyon oranı için cut-off değeri olarak 2,86648E-10 değeri baz alınmıştır.

Çalışmadan elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için MedCalc istatistiksel yazılım programı kullanılmıştır. MedCalc programında Bağımsız İki Örnek t-testi yapılarak her bir hedef gen ve miRNA'nın tümör ve normal dokular arasındaki ekspresyonu değerlendirilip p değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir. Hedef gen ve ilgili miRNA'ların hastaların aldıkları hormon tedaviye etkisini belirlemek amacıyla t-testi ve ROC Curve (İşlem Karakteristik Eğrisi) Analizi uygulanmıştır. *HOXB13* ile *IL17BR* gen ekspresyonları arasındaki ilişkiyi ve *HOXB13*'ü hedef alan miRNA'lar ile *IL17BR*'yi hedef alan miRNA arasındaki ilişkiyi açıklamak için Korelasyon Katsayı Analizi yapılmıştır. Hedef gen ve ilgili miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, hastaların klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak için Lojistik Regresyon Analizi gerçekleştirilmiştir.

İlk tanı ile hastalığın ilk yinelemesi arasında geçen süre hastalıksız sağkalım (disease-free survival), ilk tanı ile ölüm tarihi arasında geçen süre genel sağkalım (overall survival) süresi olarak hesaplanmıştır. Takip süresi, ilk tanı tarihi ile son kontrol veya ölüm tarihi arasındaki süreler dikkate alınarak belirlenmiştir. Hedef gen ve ilgili miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım süreleri ve hastaların almış olduğu tedaviler üzerine önemliliklerinin incelenmesi için Kaplan Meier Sağkalım Analizi uygulanmıştır. Ayrıca, hedef gen ve ilgili miRNA'larda belirlenen ekspresyon seviyeleri ve hastalara ait klinik parametreler ile hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım arasındaki korelasyonu belirten risk oranını hesaplayan Cox Oransal Risk Regresyon Analizi gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, 2005-2011 yılları arasında primer meme kanseri tanısı almış, östrojen reseptörü (ER) pozitif 40 hasta değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen meme kanserli 40 vakanın yaşları 33 ile 83 arasında değişmekte olup, ortalama yaş 55.00 ± 0.85 ' dir. Seçilen hastalar en az iki yıl takibe alınmış olup, 13 hastada nüks ya da uzak organ metastazı gözlenmiştir. Değerlendirilen hastalara ait klinik bulgular Tablo-10' da, hastalara ait tümörlerin patolojik özellikleri ise Tablo-11' de verilmektedir.

Tablo-10 Hastalara Ait Klinik Özellikler

Değerlendirilen parametreler		Hasta sayısı (%)
Yaş ortalaması	$55.00 \pm 0.85^*$ (33-83)	
Kanserin teşhis edildiği yaş	$51.00 \pm 0.57^*$ (28-79)	
Neoadjuvan tedavi		
+		18 (45)
-		22 (55)
Adjuvan Kemoterapi		
+		33 (82.5)
-		7 (17.5)
Radyasyon tedavisi		
+		37 (92.5)
-		3 (7.5)
Hormon tedavisi		
+		33 (82.5)
-		7 (17.5)

*: Standart sapma

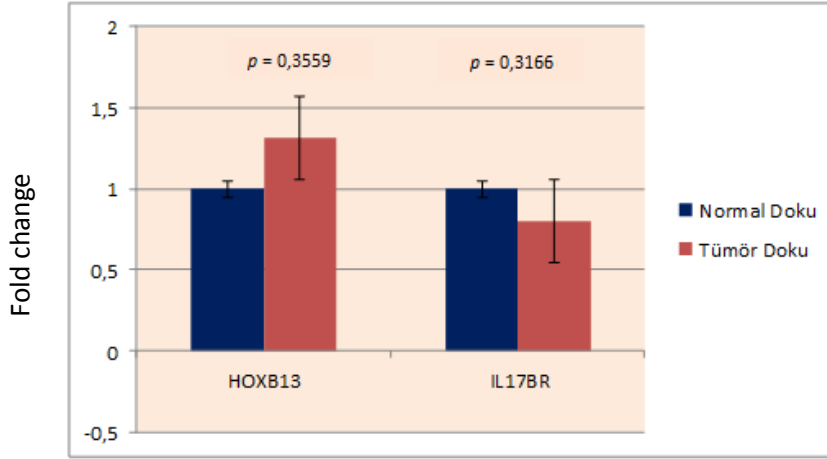
Tablo-11 Hastalara Ait Tümörlerin Özellikleri

Değerlendirilen parametreler	Hasta sayısı (%)
Tipi	
İnvaziv duktal meme kanseri	36 (90)
Diğer tip	4 (10)
Lokalizasyon	
Sol	22 (55)
Sağ	18 (45)
Ekstrakapsüler yayılım	
+	21 (52.5)
-	19 (47.5)
ER	
+	40 (100)
-	0 (0)
PR	
+	31 (77.5)
-	9 (22.5)
CerbB2	
+	20 (50)
-	20 (50)
İnvazyon	
+	19 (47.5)
-	21 (52.5)
Nüks ve/veya Uzak Organ Metastazı	
+	13 (32.5)
-	27 (67.5)

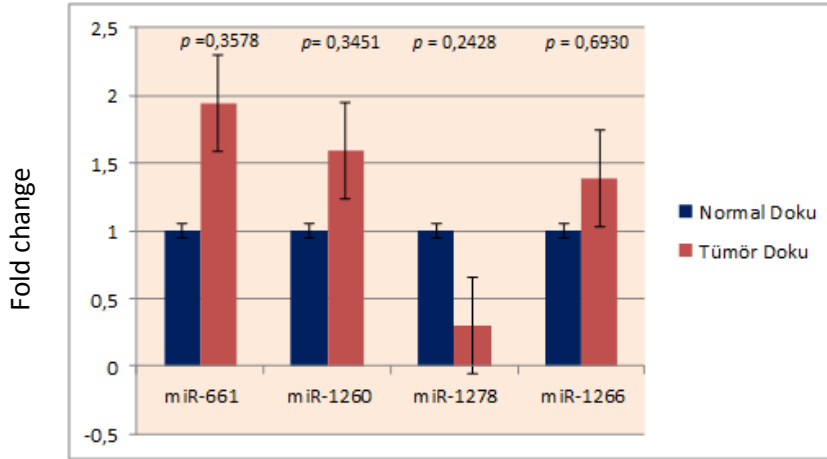
qRT-PCR yöntemi ile toplam 40 meme kanserli hastanın parafinize edilmiş tümör ve normal dokularından elde edilen RNA örneklerinde meme kanseri gelişiminde önemli *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ve bu genleri hedef alan 4 miRNA' nın ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Tümör dokuda *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranındaki farklılığı anlamlı olarak değerlendirilen hastalardan ulaşılabilen 7 hastanın periferik kan örneklerinden elde edilen RNA örnekleri için de *HOXB13* ve *IL17BR* genlerine ait ekspresyon analizleri yapıldı.

Hastaların normal meme dokularından elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin ortalaması alınarak, her bir hastaya ait tümör dokudan elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin, normal dokuların ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerine bölünme işleminin gerçekleştirilmesiyle her bir hastada *HOXB13* ve *IL17BR* genlerine ait fold change (kat değişimi) değerleri elde edildi. Buna göre, *HOXB13* gen

ekspresyon seviyesi tümör dokuda normal dokuya göre 1.31 kat artış gösterirken, *IL17BR* gen ekspresyon seviyesi tümör dokuda normal dokuya göre 0.80 kat azalış göstermiştir. miR-661, miR-1260, miR-1266 ekspresyon seviyeleri, tümör dokuda normal dokuya göre sırasıyla; 1.94, 1.59 ve 1.38 kat artış göstermesine rağmen miR-1278 ekspresyon seviyesi 0.30 kat azalış göstermiştir. Bu işlemin sonucundan elde edilen değerler ile, hedef genler ve miRNA'lar için ayrı olmak üzere fold change grafikleri çizildi (Şekil 25 ve Şekil 26).



Şekil-25 Meme Kanserli Hastaların Tümör Dokuları ile Normal Dokuları Arasındaki *HOXB13* ve *IL17BR* Gen Ekspresyon Seviyeleri



Şekil-26 Meme Kanserli Hastaların Tümör Dokuları ile Normal Dokuları Arasındaki miR-661, miR-1260, miR-1278 ve miR-1266 Ekspresyon Seviyeleri

Meme kanserli hastalara ait periferik kan örneklerinden elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin, sağlıklı kontrol grubunun ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerine bölünme işleminin gerçekleştirilmesiyle her bir hastada *HOXB13* ve *IL17BR* genlerine ait fold change değerleri elde edilmiştir. Buna

göre, *HOXB13* ve *IL17BR* gen ekspresyon seviyesi meme kanserli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre sırasıyla; 4.04737E-11 kat ve 3.27198E-11 kat azalış göstermiştir (Tablo-14). Hastaların periferik kan örneklerine ait elde edilen fold change değerleri, ‘0’ a çok yakın ve çok küçük bir değere karşılık geldiğinden, periferik kan örneklerinde bu iki genin ekspresyonu gözlenmemiştir ve Medcalc programında tümör dokular için yapılmış olan istatistiki hesaplamalar periferik kan örnekleri için gerçekleştirilememiştir.

Tümör dokudaki her bir hedef gen ve miRNA ekspresyon seviyeleri, normal dokudaki ekspresyon seviyeleri ile MedCalc programında yer alan Bağımsız İki Örnek t-testi ile karşılaştırılarak *p* değerleri hesaplanmıştır (Tablo-12 ve Tablo-13). Tümör ve normal dokular arasında *HOXB13*, *IL17BR* ve bu genleri hedef alan miRNA’ların gen ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilememiştir.

Tablo-12 Tümör ve Normal Dokular Arasındaki *HOXB13* ve *IL17BR* Gen Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

Değerlendirilen Genler	Normal Doku	Tümör Doku		Test istatistiği t	Fold change	Fold regülasyon	<i>p</i> değeri
	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	%95'lik güven aralığı				
<i>HOXB13</i>	0.00162	0.00212	-0.002550 ile 0.0009277	-0.929	1.31	Upregüle	0.3559
<i>IL17BR</i>	0.00296	0.00237	-3.4892 ile 10.6456	1.008	0.80	Downregüle	0.3166

Tablo-13 Tümör ve Normal Dokular Arasındaki miR-661, miR-1260, miR-1278 ve miR-1266 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

Değerlendirilen miRNA'lar	Normal Doku	Tümör Doku		Test istatistiği t	Fold change	Fold regülasyon	<i>p</i> değeri
	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	%95'lik güven aralığı				
miR-661	0.00311	0.00604	-0.009237 ile 0.003376	-0.925	1.94	Upregüle	0.3578
miR-1260	0.05340	0.08521	-0.09848 ile 0.03486	-0.950	1.59	Upregüle	0.3451
miR-1278	0.00022	0.00006	-0.0001088 ile 0.0004234	1.177	0.30	Downregüle	0.2428
miR-1266	0.00280	0.00388	-0.006511 ile 0.004349	-0.396	1.38	Upregüle	0.6930

Tablo-14 Periferik Kanda Meme Kanserli Hastalar ve Sağlıklı Kontrol Grubu Arasındaki *HOXB13* ve *IL17BR* Gen Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

Değerlendirilen Genler	Sağlıklı Kontrol Grubu	Hasta Grubu		
	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Fold change	Fold regülasyon
<i>HOXB13</i>	17049306.47	0.00069	4.04737E-11	Downregüle
<i>IL17BR</i>	17049306.47	0.00055	3.27198E-11	Downregüle

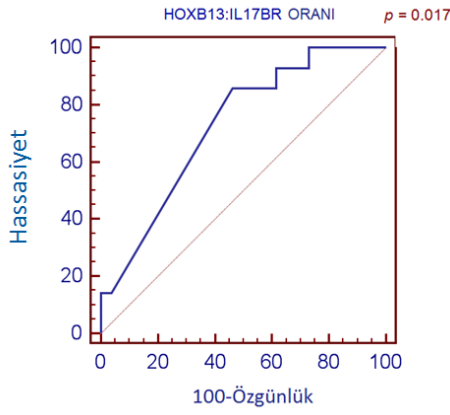
Hedef gen ve ilgili miRNA’ların hastaların aldıkları hormon tedavide prediktif özellik taşıyıp taşımadıklarını belirlemek amacıyla yapılan t-testinin sonuçlarına göre; rekürens

ve/veya uzak organ metastazına sahip, ER(+) olan primer meme kanserli hastalar ile rekürens ve/veya uzak organ metastazından yoksun ER(+) hastalar arasında, *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranında ve *IL17BR* gen ekspresyonunda istatistiksel olarak sırasıyla anlamlı bir artış ($2^{(-Avg.(Delta(Ct)) = -0.00149}$ 'dan -0.00020 'ye) ve azalış ($2^{(-Avg.(Delta(Ct)) = 0.00279}$ 'dan 0.00022 'ye) gözlemlendi ($p < 0.0001$ ve $p < 0.0001$). Ancak *HOXB13* gen ekspresyonunda gözlenen büyük bir azalış ($2^{(-Avg.(Delta(Ct)) = 0.00130}$ 'dan 0.00001 'e) sebebiyle *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranının ve *IL17BR* gen ekspresyonunun bu iki hasta grubu arasındaki anlamlılığının güçlendirilmesi gerekmektedir. Bu aşamada rekürens ve/veya metastaz(+) hasta grubunda vaka sayısının artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

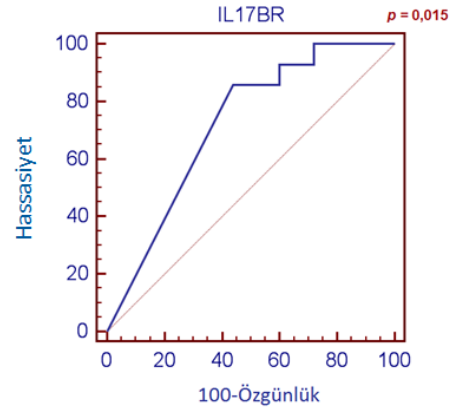
Aynı değerlendirme ve karşılaştırma, İşlem Karakteristik Eğrisi Analizi ile gerçekleştirildiğinde t-testinden elde edilen sonuçlara benzer bulgular elde edildi. Rekürens ve/veya uzak organ metastazı ve ER(+) olan primer meme kanserli hastalar ile rekürens ve/veya uzak organ metastazı olmayan ve ER(+) olan hastalar arasında, *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranında ve *IL17BR* gen ekspresyonunda istatistiksel olarak sırasıyla anlamlı bir artış ve azalış gözlemlendi (AUC =0.725, $p = 0.0017$ ve AUC = 0.717, $p = 0.0015$). Ancak yapılan t-testi'nde, *HOXB13* gen ekspresyonunda gözlenen büyük bir azalış nedeniyle İşlem Karakteristik Eğrisi Analizi'nden elde edilen anlamlılığın t-testi'nden elde edilen sonuçları destekleyebilmesi için vaka sayısının artırılması gerekmektedir. İşlem Karakteristik Eğrisi Analizindeki p değerleri, AUC (area under the curve) yani eğrinin altında kalan alan 0.5'den büyük olduğunda elde edilmiştir. t-testi ve İşlem Karakteristik Eğrisi Analizi ile elde edilen değerler Tablo-15'de verilmiştir. *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı ve *IL17BR* gen ekspresyonuna ait İşlem Karakteristik Eğrisi grafikleri ise Şekil 27'de gösterilmektedir.

Tablo-15 Rekürens ve/veya Metastaz (+) Hastalar ile Rekürens ve/veya Metastaz (-) Hastalar Arasında HOXB13, IL17BR Gen Ekspresyonları ve HOXB13:IL17BR Gen Ekspresyon Oranına Ait t-testi ve İşlem Karakteristik Eğrisi Analizi Sonuçları

Değerlendirilen Genler	Tümör Dokuda Rekürens/Metastaz (-)	Tümör Dokuda Rekürens/Metastaz (+)	t-testi		İşlem Karakteristik Eğrisi Analizi	
	$2^{(-Avg.(Delta(Ct))}$	$2^{(-Avg.(Delta(Ct))}$	t istatistiği	p değeri	AUC	p değeri
<i>HOXB13</i>	0.00130	0.00001	-0.998	0.3213	0.503	0.9648
<i>IL17BR</i>	0.00279	0.00022	4.517	< 0.0001	0.717	0.0015
<i>HOXB13:IL17BR</i>	-0.00149	-0.00020	4.595	< 0.0001	0.725	0.0017



(a)



(b)

Şekil-27 Rekürens ve/veya Metastaz (+) Hastalar ile Rekürens ve/veya Metastaz (-) Hastalar Arasında (a) *HOXB13:IL17BR* Gen Ekspresyon Oranı ve (b) *IL17BR* Gen Ekspresyonuna Ait İşlem Karakteristik Eğrisi Grafikleri

Rekürens ve/veya uzak organ metastazı ve ER(+) olan primer meme kanserli hastalar ile rekürens ve/veya uzak organ metastazı olmayan ve ER(+) olan hastalar arasında miRNA ekspresyon seviyeleri t-testi ile karşılaştırıldığında ise; miR-1278 ekspresyon seviyesindeki azalışın ($2^{-\text{Avg.}(\Delta\text{Ct})} = 0.00007$ 'den 0.00005 'e) ve miR-1266 ekspresyon seviyesindeki artışın ($2^{-\text{Avg.}(\Delta\text{Ct})} = 0.00233$ 'den 0.00711 'e) istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlılığı belirlendi ($p = 0.0014$ ve $p = 0.0048$). Ancak yapılan İşlem Karakteristik Eğrisi Analizinde bu miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde bir anlamlılık elde edilemedi ($p = 0.9895$, $p = 0.4459$). Değerlendirilen vaka sayısı arttırıldığında, miR-1278 ve miR-1266 ile ilgili bulguları destekleyecek istatistiksel anlamlılığa ulaşılabileceği düşünülmektedir. İşlem Karakteristik Eğrisi Analizindeki p değerleri, AUC (area under the curve) yani eğrinin altında kalan alan 0.5'den büyük olduğunda elde edilmiştir. t-testi ve İşlem Karakteristik Eğrisi Analizi ile elde edilen değerler Tablo-16'da verilmiştir.

Tablo-16 Rekürens ve/veya Metastaz (+) Hastalar ile Rekürens ve/veya Metastaz (-) Hastalar Arasında miR-661, miR-1260, miR-1278 ve miR-1266 Ekspresyonlarına Ait t-testi ve İşlem Karakteristik Eğrisi Analizi Sonuçları

Değerlendirilen miRNA'lar	Tümör Dokuda Rekürens/Metastaz (-)	Tümör Dokuda Rekürens/Metastaz (+)	t-testi		İşlem Karakteristik Eğrisi Analizi	
	$2^{-\text{Avg.}(\Delta\text{Ct})}$	$2^{-\text{Avg.}(\Delta\text{Ct})}$	t istatistiği	p değeri	AUC	p değeri
miR-661	0.00617	0.00576	0.995	0.3227	0.508	0.9325
miR-1260	0.07887	0.09840	-0.464	0.6443	0.578	0.3902
miR-1278	0.00007	0.00005	3.324	0.0014	0.501	0.9895
miR-1266	0.00233	0.00711	2.905	0.0048	0.575	0.4459

ER(+) primer meme kanserli hastaların klinik özellikleri ile *HOXB13*, *IL17BR* genlerinin ve bu genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar ve tedaviye verilen yanıt arasındaki ilişkiyi açıklamak ve bu ilişkiye ait olasılık oranını [Odds ratio(OR)] belirlemek için univariate (tek değişkenli) ve multivariate (çok değişkenli) Lojistik Regresyon Analizi uygulanmıştır. Bu analize göre; hem univariate hem de multivariate modelde, *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı diğer klinik parametrelerden bağımsız olarak istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (univariate modelde $p = 0.0386$, OR = 5.231; multivariate modelde $p = 0.0267$, OR= 12.2940) (Tablo-17). Aynı multivariate modelde; hastaların klinik özellikleri ile miR-661, miR-1260, miR-1278 ve miR-1266 ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p =0.7614$; $p =0.9053$; $p =0.5884$; $p =0.7587$).

Tablo-17 *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı ve klinik parametrelere ait Lojistik Regresyon Analizi Sonuçları

Tek değişkenli model			
Değişken	Olasılık Oranı	%95'lik güven aralığı	<i>p</i> değeri
<i>HOXB13:IL17BR</i>	5.9231	1.0982 ile 31.9467	0.0386

Bağımlı değişken:Metastaz/Rekürrens. ¹Pozitif; ⁰Negatif.

Tabloda gösterilen tüm değişkenler için: $-2\log$ likelihood = 45.161; $\chi^2(22) = 5.286$, $P = 0.0215$. Hosmer-Lemeshow statistics = 10.8781 with 8 df, $P = 0.2087$. Classification table overall percentage: 67.5.

Çok değişkenli model			
Değişkenler	Olasılık Oranı	%95'lik güven aralığı	<i>p</i> değeri
Tümör boyutu	1.0015	0.9832 ile 1.0202	0.8716
Tümör tipi	1.7452	0.0942 ile 32.3423	0.7085
Histolojik evre	0.4187	0.0514 ile 3.4096	0.4158
PR	1.1542	0.1112 ile 11.9834	0.9044
cerbB2	0.5335	0.0744 ile 3.8256	0.5319
Lenfatik invazyon	0.3372	0.0326 ile 3.4900	0.3619
Perinöral invazyon	9.9197	0.6358 ile 154.7663	0.1016
Ekstrakapsüler yayılım	0.2795	0.0274 ile 2.8496	0.2819
<i>HOXB13:IL17BR</i>	12.294	1.3359 ile 113.1387	0.0267

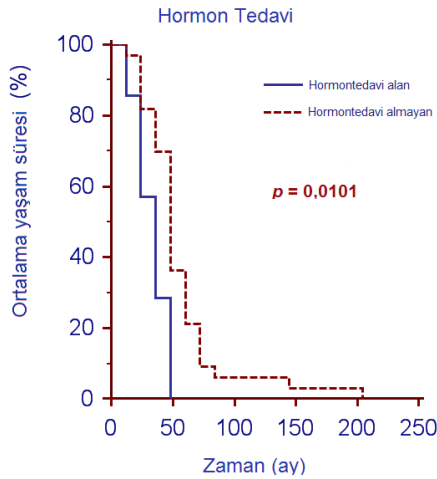
Bağımlı değişken:Metastaz/Rekürrens. ¹Pozitif; ⁰Negatif.

Tabloda gösterilen tüm değişkenler için: $-2\log$ likelihood = 36.481; $\chi^2(22) = 13.965$, $P = 0.1746$. Hosmer-Lemeshow statistics = 11.483 with 8 df, $P = 0.1758$. Classification table overall percentage: 80.0.

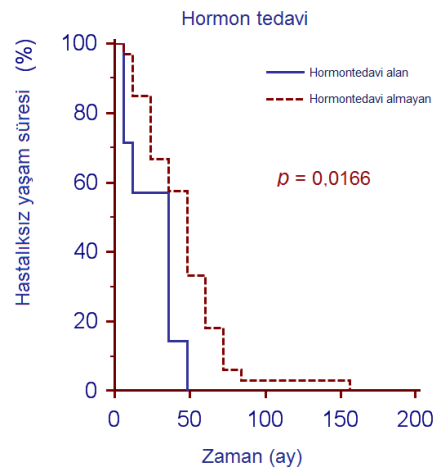
HOXB13 ile *IL17BR* gen ekspresyonları arasında nasıl bir ilişki olduğunun değerlendirilmesi ve *HOXB13*'ü hedef alan miRNA'lar ile *IL17BR*'yi hedef alan miRNA arasındaki ilişkiyi açıklamak için Korelasyon Katsayı Analizi gerçekleştirilmiştir. Buna göre;

HOXB13 ve *IL17BR* arasında anlamlı doğrusal bir korelasyon gözlenmemekle birlikte, iki genin ekspresyonlarının birbirine zıt yönde olduğu görülmüştür (Korelasyon katsayısı $r = -0.03375$, $p = 0.8362$). miR-661 ile miR-1266 ekspresyonu ve miR-1278 ile miR-1266 ekspresyonu arasında yüksek düzeyde anlamlılık saptandı ($p = 0.0005$ ve $p < 0.0001$). miR-1260 ile miR-1266 arasında anlamlı sayılabilecek bir korelasyon gözlenmemesine rağmen, iki miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin birbirine zıt yönde olduğu belirlenmiştir. ($r = -0.02451$, $p = 0.8807$).

Değerlendirilen hedef genler ve ilgili miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, ortalama ve hastaliksız yaşam süreleri ile hastaların almış olduğu tedaviler üzerine önemliliklerinin incelenmesi için Medcalc programında yer alan Kaplan Meier Sağkalım Analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde; neoadjuvan tedavi, adjuvan kemoterapi, adjuvan radyoterapi ve adjuvan hormonoterapi uygulamaları arasından adjuvan hormonoterapinin hastaların ortalama ve hastaliksız yaşam sürelerini olumlu yönde etkilemesi açısından anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p = 0.0101$; $p = 0.0166$) (Şekil 28 ve Şekil 29).



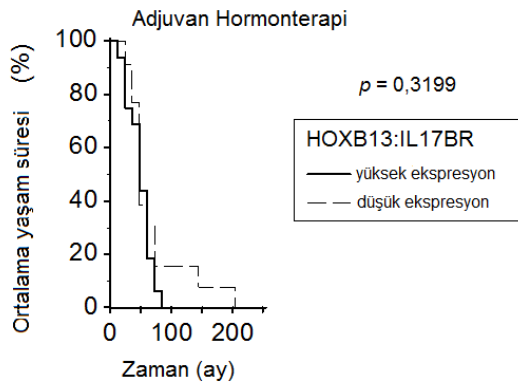
Şekil-28 Hormon tedavi alan ve almayan meme kanserli hastalarda ortalama yaşam süresi



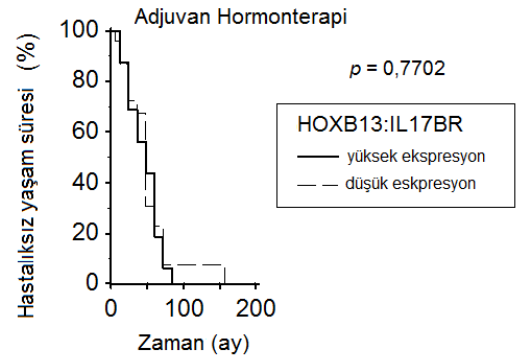
Şekil-29 Hormon tedavi alan ve almayan meme kanserli hastalarda hastaliksız yaşam süresi

Adjuvan hormon tedavisi, hastaların yaşam süreleri üzerinde anlamlı bulunduğundan; *HOXB13*, *IL17BR* genlerinin ve ilgili miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin hormon tedavisi varlığında hastaların ortalama ve hastaliksız yaşam sürelerine olan etkisi araştırılmıştır. *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı, hormon tedavisi varlığında hastaların ortalama ve hastaliksız yaşam sürelerinde anlamlı bir etki oluşturmamasına rağmen (log rank test $p =$

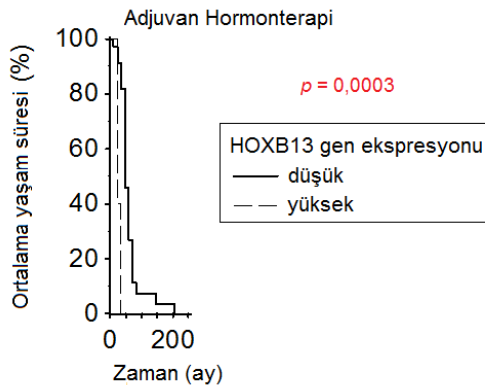
0.3199; log rank test $p = 0.7702$) (Şekil 30 ve Şekil 31), *HOXB13* gen ekspresyon seviyesinin her iki yaşam süresi üzerinde de anlamlı derecede etkili olduğu belirlenmiştir (ortalama yaşam süresi için log rank test $p = 0.0003$, hastaliksız yaşam süresi için log rank test $p = 0.0048$) (Şekil 32 ve Şekil 33). miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların hastaların almış oldukları hormon tedavi ile ortalama ve hastaliksız yaşam sürelerine olan etkisinin değerlendirilmesinde ise bir anlamlılık elde edilememiştir (ortalama yaşam süresi için miR-661'e ait $p = 0.3269$, miR-1260'a ait $p = 0.6442$, miR-1278'e ait $p = 0.4352$, miR-1266'ya ait $p = 0.5460$; hastaliksız yaşam süresi için miR-661'e ait $p = 0.7345$, miR-1260' ait $p = 0.6280$, miR-1278'e ait $p = 0.1384$, miR-1266'ya ait $p = 0.2835$).



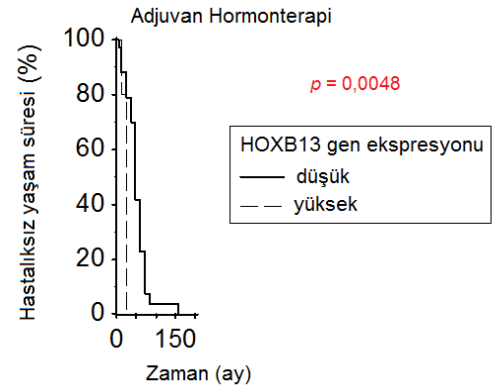
Şekil-30 *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranının adjuvan hormonoterapi ve ortalama yaşam süresine etkisi



Şekil-31 *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranının adjuvan hormonoterapi ve hastaliksız yaşam süresine etkisi



Şekil-32 *HOXB13* gen ekspresyonunun adjuvan hormonoterapi ve ortalama yaşam süresine etkisi



Şekil-33 *HOXB13* gen ekspresyonunun adjuvan hormonoterapi ve hastaliksız yaşam süresine etkisi

Çalışmada analiz edilen *HOXB13*, *IL17BR* genleri ve ilgili miRNA'larda belirlenen ekspresyon seviyeleri ve hastalara ait klinik parametreler ile meme kanserli hastaların ortalama ve hastalısız yaşam süreleri arasındaki korelasyon ve bu korelasyonu gösteren risk oranı [Hazard ratio (HR)], diğer bir sağkalım analizi olan Çok Değişkenli Cox Orantısal Risk Regresyon Analizi ile değerlendirilmiştir. Bu analize göre; ER(+) meme kanserli hastalarda belirlenen *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı ile hastaların ortalama yaşam süreleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamasına rağmen ($p = 0.1017$, HR = 3.9216) (Tablo-18), hedef iki genin ekspresyon oranının hastalısız yaşam süreleri üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0.0491$, HR= 5.2787) (Tablo 19).

Tablo-18 Primer meme kanserli hastaların klinik parametreleri ve *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı ile ortalama yaşam süreleri arasındaki ilişkiyi gösteren Çok Değişkenli Cox Regresyon Analizi

Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	<i>p</i> değeri
<i>HOXB13:IL17BR</i>	3.9216	0.7699 to 19.9764	0.1017
Tümör boyutu	0.9993	0.9864 to 1.0125	0.9214
PR	1.1428	0.2185 to 5.9771	0.8750
cerbB2	0.9683	0.2546 to 3.6824	0.9625
Perinöral invazyon	2.1855	0.5569 to 8.5770	0.2648
Ekstrakapsüler yayılım	1.0766	0.2456 to 4.7186	0.9224

Tablo-19 Primer meme kanserli hastaların klinik parametreleri ve *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı ile hastalısız yaşam süreleri arasındaki ilişkiyi gösteren Çok Değişkenli Cox Regresyon Analizi

Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	<i>p</i> değeri
<i>HOXB13:IL17BR</i>	5.2787	1.0147 to 27.4599	0.0491
Tümör boyutu	0.9978	0.9858 to 1.0099	0.7163
PR	1.3569	0.2661 to 6.9189	0.7149
cerbB2	1.1356	0.3194 to 4.0380	0.8450
Perinöral invazyon	3.5480	0.9247 to 13.6137	0.0663
Ekstrakapsüler yayılım	0.7859	0.1942 to 3.1810	0.7369

Cox Orantısal Risk Regresyon Analizinden elde edilen bulgulara göre, *HOXB13* ve *IL17BR* genlerini hedef alan miR-661, miR-1260, miR-1278 ve miR-1266 ekspresyon seviyeleri ve klinik özellikler ile hastaların ortalama ve hastalısız yaşam süreleri arasında istatistiki olarak anlamlı ölçüde değerlendirilecek bir ilişki gözlenmemiştir.

(Tablo-20, Tablo-21, Tablo-22 ve Tablo-23).

Tablo-20 Primer meme kanserli hastaların klinik parametreleri ve miR-661 ekspresyon seviyesi ile ortalama ve hastalısız yaşam süreleri arasındaki ilişkiyi gösteren Çok Değişkenli Cox Regresyon Analizi

Ortalama yaşam süresi için			
Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	p değeri
miR-661	1.4765	0.3155 to 6.9088	0.6224
Tümör boyutu	0.8366	0.2458 to 2.8468	0.7763
PR	0.9695	0.1989 to 4.7256	0.9696
cerbB2	0.7037	0.1767 to 2.8025	0.6200
Perinöral invazyon	2.2172	0.5075 to 9.6865	0.2923
Ekstrakapsüler yayılım	1.1973	0.2824 to 5.0760	0.8079
Hastalısız yaşam süresi için			
Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	p değeri
miR-661	1.7283	0.3834 to 7.7910	0.4786
Tümör boyutu	0.8816	0.2701 to 2.8775	0.8354
PR	0.9303	0.1981 to 4.3684	0.9274
cerbB2	0.7201	0.2064 to 2.5127	0.6084
Perinöral invazyon	3.4502	0.8803 to 13.5225	0.0771
Ekstrakapsüler yayılım	0.9098	0.2331 to 3.5508	0.8923

Tablo-21 Primer meme kanserli hastaların klinik parametreleri ve miR-1260 ekspresyon seviyesi ile ortalama ve hastalısız yaşam süreleri arasındaki ilişkiyi gösteren Çok Değişkenli Cox Regresyon Analizi

Ortalama yaşam süresi için			
Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	<i>p</i> değeri
miR-1260	0.9635	0.2638 to 3.5198	0.9554
Tümör boyutu	0.8965	0.2424 to 3.3159	0.8706
PR	1.0667	0.2324 to 4.8966	0.9342
cerbB2	0.6314	0.1614 to 2.4693	0.5108
Perinöral invazyon	2.0454	0.4923 to 8.4990	0.3272
Ekstrakapsüler yayılım	1.2325	0.2840 to 5.3478	0.7812
Hastalısız yaşam süresi için			
Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	<i>p</i> değeri
miR-1260	0.8727	0.2417 to 3.1511	0.8362
Tümör boyutu	0.9944	0.2799 to 3.5333	0.9931
PR	1.0821	0.2546 to 4.5997	0.9153
cerbB2	0.6442	0.1839 to 2.2561	0.4939
Perinöral invazyon	3.1006	0.8301 to 11.5813	0.0940
Ekstrakapsüler yayılım	0.9263	0.2319 to 3.7004	0.9141

Tablo-22 Primer meme kanserli hastaların klinik parametreleri ve miR-1278 ekspresyon seviyesi ile ortalama ve hastalısız yaşam süreleri arasındaki ilişkiyi gösteren Çok Değişkenli Cox Regresyon Analizi

Ortalama yaşam süresi için			
Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	<i>p</i> değeri
miR-1278	2.5346	0.2480 to 25.8996	0.4352
Tümör boyutu	0.8389	0.2484 to 2.8331	0.7784
PR	0.9384	0.1966 to 4.4801	0.9368
cerbB2	0.6419	0.1680 to 2.4528	0.519
Perinöral invazyon	2.1002	0.5014 to 8.7965	0.3124
Ekstrakapsüler yayılım	1.4461	0.3029 to 6.9045	0.6454
Hastalısız yaşam süresi için			
Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	<i>p</i> değeri
miR-1278	2.1600	0.2213 to 21.0831	0.5098
Tümör boyutu	0.9173	0.2848 to 2.9545	0.8856
PR	0.9667	0.2148 to 4.3509	0.9650
cerbB2	0.6632	0.1918 to 2.2929	0.5185
Perinöral invazyon	3.1383	0.8482 to 11.6124	0.0883
Ekstrakapsüler yayılım	1.0501	0.2448 to 4.5050	0.9478

Tablo-23 Primer meme kanserli hastaların klinik parametreleri ve miR-1266 ekspresyon seviyesi ile ortalama ve hastalısız yaşam süreleri arasındaki ilişkiyi gösteren Çok Değişkenli Cox Regresyon Analizi

Ortalama yaşam süresi için			
Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	p değeri
miR-1266	1.5593	0.1434 to 16.9526	0.7166
Tümör boyutu	0.8521	0.2494 to 2.9117	0.7995
PR	0.9962	0.2062 to 4.8127	0.9962
cerbB2	0.6125	0.1587 to 2.3636	0.4790
Perinöral invazyon	2.1035	0.5002 to 8.8452	0.3127
Ekstrakapsüler yayılım	1.3662	0.2783 to 6.7067	0.7021
Hastalısız yaşam süresi için			
Değişkenler	Risk oranı	%95'lik güven aralığı	p değeri
miR-1266	1.3220	0.1292 to 13.5307	0.8150
Tümör boyutu	0.9269	0.2854 to 3.0106	0.9000
PR	1.0359	0.2276 to 4.7144	0.9638
cerbB2	0.6449	0.1843 to 2.2558	0.4945
Perinöral invazyon	3.0957	0.8339 to 11.4922	0.0930
Ekstrakapsüler yayılım	0.9869	0.2248 to 4.3324	0.9861

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, farklı biyolojik davranışlar gösteren, farklı klinik-patolojik ve moleküler karakteristik özelliklere sahip çok sayıda alt tipi bulunan heterojen bir malignansidir (33). Gelişmiş ülkelerde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü olup, kanserden ölüm nedenleri arasında ise ikinci sırada yer almaktadır. Etkin tarama yöntemleri ve gelişen tedavi yöntemleri ile meme kanserinden ölüm oranlarında belirgin azalma olmasına rağmen yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, bu tümörün özelliklerinin iyi anlaşılması önemli rol oynamaktadır. Meme kanserinin farklı davranışlarını ve farklı tedavi seçeneklerine yanıtlarını belirleyen tümör çapı, tümör evresi, hasta yaşı, aksiler lenf nodlarının tutulması ve hormon reseptörlerinin durumu gibi çok sayıda özellik temel prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir (34,35). Ancak, tümörün belirtilen klinik davranışlarına göre sınıflandırılmasında yeteri kadar güvenilir veriler sağlanamaması, prognozun hastalığın daha erken evrede yapılabilmesinin gerekliliği ve aynı evredeki meme tümörlerinin uygulanan tedavi protokollerine farklı cevaplar vermesi, tedavi protokolünün belirlenmesinde tümörlerin moleküler düzeydeki sınıflandırmalarının gerekliliğini ortaya koymaktadır (34).

Günümüzde moleküler biyoloji ve genetik alanında yapılan çalışmalar sonucunda hücresel yollarda görevli olan genlerin ekspresyon profillerinin belirlenmesinin tümörün moleküler düzeydeki sınıflandırılmasında en etkin yöntemlerden biri olduğu düşünülmektedir (370-373). Ayrıca, meme tümörlerinin hücresel süreçlerinde görev alan genlerin ekspresyon profillerinin değerlendirilmesi, tümör hücrelerinin metastaz yapabilme ihtimali ile ilgili de daha erken süreçte fikir verebilmektedir. Bu konuda Sherene Loi ve arkadaşları, ER(+) meme kanserlerinde mikroarray teknolojisinden yararlanmışlar ve hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin meme kanserlerinde metastazın ve hastalığın nüksetmesinin erken belirlenmesinde güçlü birer belirteç olduğunu ifade etmişlerdir (374). Andrea Nicolini ve arkadaşları ise, meme kanserlerinde tümör büyümesi ve metastaz oluşumunda *EGFR*, *c-erbB-2*, *VEGF* gen ekspresyonlarının birer biyomarkır olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir (375). Bu bulgulardan farklı olarak, Britta Weigelt ve arkadaşları, ER (-) meme kanserli hastalarla yaptıkları çalışmada, mikroarray yöntemi ile gen ekspresyon profillerini değerlendirmişler ve primer tümör dokuları ve metastatik dokulardaki gen ekspresyon profillerinin benzer olduğunu göstermişlerdir (376). Bugüne kadar yapılmış olan, meme kanserlerinde metastaz gelişimine sebep olan genler ile ilgili araştırmaların verileri arasında

farklılıklar mevcut olup, bulguların kesinlik kazanabilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Meme kanseri hücrelerinde östrojen hormonuna bağlı olarak östrojen reseptörü (ER) pozitifliği saptanabilmektedir ve ER, meme kanserinin endokrin tedavisinde kullanılan bir ajan olan Tamoxifen yanıtında iyi bilinen pozitif bir belirteç olarak nitelendirilmektedir. ER gen ifadesinin, hormonal düzenlemede ve gelişimin erken ve ileri dönemlerinde görevli olan, homeobox gen ailesinden *HOXB13* ve immün sistemde rol oynayan, interlökin gen ailesinden *IL17BR* genleri tarafından regüle edildiği saptanmıştır (316, 336-339). Bugüne kadar meme tümör dokusunda gerçekleştirilen araştırmalar, *HOXB13* ve *IL17BR* gen ifadelerindeki değişikliklerin meme kanserine yol açtığını göstermektedir.

Xiao-Jun Ma ve arkadaşları, parafine gömülü meme dokularından RT-PCR yöntemine dayalı olarak yaptıkları çalışmalarında, *HOXB13:IL17BR* ekspresyon indeksinin erken evreli meme kanserlerinde bir prognostik faktör olduğunu ve bu gen ifadelerinin ER gen ifadesi ile ilişkili olarak tamoxifen tedavisine verilen yanıtı değiştirdiğini ifade etmişlerdir (336,337). Maurice P.H.M ve arkadaşları ise Xiao-Jun Ma ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak RT-PCR yöntemine dayalı olarak *HOXB13:IL17BR* ekspresyon indeksini tamoxifen tedavisi görmüş meme kanseri hastalarından elde edilen primer meme tümörlerinde belirlemişler ve elde edilen indeks oranının tamoxifen dirençliliği ile ilgili olmakla birlikte, hastanın survisini de olumsuz yönde etkilediğini ifade etmişlerdir (338). Matthew P. Goetz ve çalışma ekibinin tamoxifen terapisi görmüş, ER(+) lenf nodu negatif meme kanserli kadınlarda gerçekleştirdikleri retrospektif araştırmalarının sonucunda ise, *HOXB13* ve *IL17BR* gen ekspresyonlarının rekürrens ile de ilişkili olabileceği açıklanmıştır (339).

Mevcut çalışmada, hormon reseptörlerinden ER'si pozitif, primer meme kanserli hastaların tümör, normal doku ve periferik kanlarında, meme tümörü gelişimi ile ilgili olabileceği belirtilen *HOXB13*, *IL17BR* genlerinin ve bu genlere ait güncel miRbase sisteminde yer alan hedef miRNA'ların (*HOXB13* için; miR1278, miR-661 ve miR-1260, *IL17BR* için; miR-1266) ekspresyon düzeylerindeki değişimler değerlendirilmiştir. Meme kanserli hastaların tümör dokuları ile normal dokuları arasında *HOXB13*, *IL17BR* genleri ve bu genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemesine rağmen; *HOXB13* gen ekspresyon seviyesi tümör dokuda normal dokuya göre 1.31 kat artış gösterirken, *IL17BR* gen ekspresyon seviyesi tümör dokuda normal dokuya göre 0.80 kat azalış göstermiştir. Literatürde yapılan çeşitli çalışmalara paralel olarak (298), mevcut tez çalışmasında da, tümör dokuda *HOXB13* gen

ekspresyonu yüksek, *IL17BR* gen ekspresyonu ise düşük olarak belirlenmiştir. Ayrıca, gerçekleştirilen korelasyon analizinde de iki genin ekspresyonlarının birbirine zıt yönde olduğu gösterilerek ($r = -0.03375$) bu bulguyu destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. miR-661, miR-1260, miR-1266 ekspresyon seviyeleri, tümör dokuda normal dokuya göre sırasıyla; 1.94, 1.59 ve 1.38 kat artış göstermesine rağmen miR-1278 ekspresyon seviyesi 0.30 kat azalış göstermiştir. Değerlendirilen dört miRNA'dan ikisi (miR-661 ve miR-1260) ile ilgili olarak literatürde az ve yetersiz sayıda araştırma bulunurken, diğer ikisi (miR-1278 ve miR-1266) ile ilgili kanser hastalığında çalışılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan, miR-1278 ve miR-1266 ile ilgili elde edilen tüm bulguların özgün olduğu söylenebilir. Tümör dokudan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, G. Vetter ve arkadaşları (366) ve Sand M. ve araştırma ekibine (368) ait olan çalışmalara paralel olarak, miR-661 ve miR-1260 ekspresyonlarının tümör dokuda yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Ayrıca, mevcut çalışmada miR-1266 ekspresyon seviyesi için tümör dokuda yüksek ve miR-1278 ekspresyon seviyesi için ise tümör dokuda düşük olabileceği yönünde ifadeler kullanılabilir. Elde edilen bu verilerin güvenilirliğinin gösterilebilmesi açısından bahsi geçen miRNA'lar ile ilgili daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Hastaların periferik kanlarında değerlendirilen *HOXB13* ve *IL17BR* gen ekspresyon seviyeleri ise, sağlıklı kontrol grubunda her iki genin eksprese olmaması beklendiğinden sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Buna göre, *HOXB13* ve *IL17BR* gen ekspresyon düzeyleri hastaların periferik kanlarında sağlıklı kontrol grubuna göre sırasıyla; $4.04737E-11$ kat ve $3.27198E-11$ kat azalış göstermiştir. Elde edilen bu değerler '0' a çok yakın ve çok küçük bir değeri temsil ettiğinden dolayı, tümör dokular için yapılmış olan istatistiksel hesaplamalar periferik kan örnekleri için gerçekleştirilememiştir. Ekspresyon seviyelerine karşılık gelen değerlerin '0' a çok yakın ve çok küçük bir değer olmasından ötürü, periferik kan örneklerinde *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin ekspresyonu gözlenmemiştir şeklinde bir çıkarım yapılabilmektedir. Mevcut çalışmada, parafinize edilmiş dokularda ekspresyon analizleri gerçekleştirildiğinden, ekspresyon farklılığı belirlenen hastaların periferik kanlarına ulaşılabilmesinde sıkıntılar yaşanmış olup, sınırlı sayıda hastanın periferik kanından ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir ve periferik kan örneklerinde herhangi bir anlamlılık belirlenmemiştir.

Çalışmada, rekürens ve/veya uzak organ metastazına sahip ER(+) olan primer meme kanserli hastalar ile rekürens ve/veya uzak organ metastazından yoksun ER(+) hastalar arasında, *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranındaki artış ve *IL17BR* gen ekspresyonundaki

azalış istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermiştir ($p < 0.0001$ ve $p < 0.0001$). Ma XJ, Wang Z. ve arkadaşlarının çalışmasında elde ettiği bulgulara paralel olarak (298), tümör dokuda normal dokuya göre ekspresyonu yüksek olarak değerlendirdiğimiz *HOXB13*'ün rekürens/metastaz(+) hasta grubunda da ekspresyonunun yüksek olması beklenmektedir. Ancak; *HOXB13* gen ekspresyonunda saptanan önemli derecede büyük bir azalış, *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranındaki artışın ve *IL17BR* gen ekspresyonundaki azalışın bu iki hasta grubu arasındaki anlamlılığını ifade etmede engel oluşturmaktadır. Mevcut çalışmada değerlendirilen ER(+) primer meme kanserli hastalar arasında, rekürens/metastaz(+) meme kanserli hasta sayısının yetersiz oluşu da, elde edilen bulguların yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, vaka sayısı artırılarak istatistiksel açıdan daha anlamlı veriler elde edilebilir. ROC Curve Analizi'nde, T testi ile elde edilen bu bulgulara paralel ölçüde sonuçlar ortaya çıkmıştır (*HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı için $p = 0.0017$ ve *IL17BR* gen ekspresyonu için $p = 0.0015$). Bu analizden elde edilen anlamlılığın T Testi'nden elde edilen bulguları destekleyebilmesi için vaka sayısının artırılması gerekmektedir.

Rekürens ve/veya uzak organ metastazı pozitif ER(+) olan primer meme kanserli hastalar ile rekürens ve/veya uzak organ metastazı negatif ER(+) hastalar arasında miRNA ekspresyon seviyeleri T Testi ile karşılaştırıldığında ise; miR-1278 ekspresyon seviyesindeki azalış ile miR-1266 ekspresyon seviyesindeki artışın istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı olduğu görülmüştür ($p = 0.0014$ ve $p = 0.0048$). Literatürde, çeşitli araştırmacıların meme kanserinde *HOXB13*, *IL17BR* gen ekspresyonları ve *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (298,316,336-339). Ancak *HOXB13*'ü hedef alan miR-1278 ve *IL17BR*'yi hedef alan miR-1266 ile ilgili kanserde çalışılmış herhangi bir araştırma yer almamaktadır. Bu bulgu, meme kanserinde, miR-1278 ve miR-1266 ekspresyonlarındaki farklılığın rekürens ve/veya metastaz ile ilişkisi olabileceği kanısını ifade eden ilk özgün bulgu olma özelliğini taşımaktadır.

ER(+) primer meme kanserli hastaların klinik özellikleri ile *HOXB13*, *IL17BR* genlerinin ve bu genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar ve tedaviye verilen yanıt arasındaki ilişkinin olasılık oranını [Odds ratio(OR)] belirlemek için univariate (tek değişkenli) ve multivariate (çok değişkenli) Lojistik Regresyon Analizi uygulanmıştır. Bu analize göre; hem univariate hem de multivariate modelde, *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı diğer klinik parametrelerden bağımsız olarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (univariate modelde $p = 0.0386$, OR = 5.9231; multivariate modelde $p = 0.0267$,

OR= 12.2940). Elde edilen bulgular ışığında, meme kanserli hastaların aldıkları hormon tedavisine yanıtta prediktif açıdan önemli olan tümör boyutu, histolojik evre, PR ve *cerbB-2* gibi bilinen standart prognostik faktörlerin yanı sıra (377), *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranının da önemli prediktif özellikte olabileceği ifade edilebilir.

Değerlendirilen hedef genler ve ilgili miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, ortalama ve hastalısız yaşam süreleri ile hastaların almış olduğu tedaviler üzerine etkilerinin incelenmesi için Kaplan Meier Sağkalım Analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ile *HOXB13* gen ekspresyon seviyesinin hormon tedavi ve hastaların ortalama ve hastalısız yaşam süreleri üzerinde anlamlı derecede etkili olduğu belirlenmiştir (ortalama yaşam süresi için log rank test $p = 0.0003$, hastalısız yaşam süresi için log rank test $p = 0.0048$). Yapılan analizde, tümör dokusunda *HOXB13* gen ekspresyonu yüksek olan ER(+) primer meme kanserli hastaların, tümör dokusunda *HOXB13* gen ekspresyonu düşük olan ER(+) primer meme kanserli hastalara göre ortalama ve hastalısız yaşam süresinin daha kısa olduğu görülmüştür. Buradan, *HOXB13* gen ekspresyonunun hastaların sağkalım süreleri üzerinde dolayısıyla hastalığın prognostik sürecinde etkili olabileceği sonucu çıkarılabilir. Gerçekleştirilen diğer bir sağkalım analizi olan Multivariate Cox Proportional Hazard Regresyon Analizi'ne göre; ER(+) meme kanserli hastalarda belirlenen *HOXB13:IL17BR* gen ekspresyon oranı ile hastalısız yaşam süreleri arasında anlamlı ölçüde bir korelasyon saptanmıştır ($p = 0.0491$, HR= 5.2787). Gen ekspresyon oranının yüksek olması ile hastalısız yaşam süresinin daha kısa olması arasında anlamlı bir ilişki olduğundan, mevcut çalışmada iki genin ekspresyon oranının prognostik öneminden bahsedilebilir.

Bugüne kadar gerçekleştirilen meme tümörleri ile ilişkili çalışmaların büyük bir çoğunluğu Amerika ve Avrupa popülasyonlarını ele alarak gerçekleştirilmiştir. Tümörlerde meydana gelen genetik değişimlerin frekansları ve tipleri farklı etnik kökene sahip hastalar arasında değişiklikler göstermektedir. Meme hastalarında genetik süreçlerde görev alan genlerin moleküler düzeydeki sınıflandırılmalarının gen ekspresyonu ile değerlendirildiği Türk toplumuna ait bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda değerlendirildiğinde, mevcut çalışma Türk popülasyonuna ait ER(+) primer meme kanserli hastalarda; *HOXB13,IL17BR* genlerinin ve ilgili miRNA'ların ekspresyon değişimlerinin hastalığın tedavisi ve takibinde etkili biyobelirteç olarak yararlanılabileceği fikriyle oluşturulmuş literatürdeki ilk çalışmadır.

Elde edilen bulgular ışığında; ER(+) özellikte primer meme kanserli hastalarda *HOXB13* ve *IL17BR* genlerini hedef alan miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar değerlendirilerek, tümörün agresivitesi ve hastada metastaz gelişebilme riski ile ilgili bilgi

edinilebilecektir. Böylece diğer meme kanserli hastalar ile benzer tedavi yaklaşımları uygulanarak takip edilen bu hasta grubunda, *HOXB13* ve *IL17BR* genleri ile ilişkili miRNA'ların analiz edilmesi, farklı etkin tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesine yardımcı olarak hastaların yaşam süresinin ve kalitesinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara yol gösterici olabilecek ve katkı sağlayabilecektir.

Çeşitli araştırmacıların yaptığı çalışmalarda *HOXB13* ve *IL17BR* gen ekspresyonları meme kanserinde metastaz ve invazyon ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, bu genleri hedef alan ve mevcut çalışmada analiz edilen miRNA ifadelerinin değerlendirildiği bir araştırma literatürde bulunmamaktadır. Mevcut tez çalışması, Türk populasyonundan oluşan meme kanserli hastalarda, *HOXB13* ve *IL17BR* genlerinin regülasyonunda önemli rolleri olan miRNA'ların ekspresyonlarının ilk kez ilgili gen ekspresyonları ile eş zamanlı olarak değerlendirilmiş olması ve ER(+) primer meme kanserlerinde metastatik ve prediktif birer biyobelirteç olarak kullanılabilirliklerinin gösterilebilmesi yönünde yapılacak bundan sonraki ileri fonksiyonel çalışmalara yol gösterici olması açısından uluslararası literatüre katkı sağlar niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

1. MERLO LM, PEPPER JW, REID BJ. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, 6: 924-935, 2006.
2. JEMAL A, SIEGEL R, WARD E. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*,58(2): 71–96, 2008.
3. NOWELL PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23-28, 1976.
4. COOPER GM. The development and causes of cancer, *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition, 2000.
5. HARTWELL L. *Rediscovering Biology, Cell Biology and Cancer*, 5th edition, 2000.
6. YOKOTA J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*,21:497-503,2000.
7. JEMAL A. Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*,60(5):277-300, 2010.
8. HUTCHINSON L. Breast Cancer Challenges, Controversies, Breakthroughs. *Nature Reviews Clinical Oncology*.7(12):669-70,2010.
9. CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*; 490(7418):61-70,2012.
10. KANAVOS P. The rising burden of cancer in the developing world. *Annals of Oncology* 17 (Supplement 8): viii15–viii23,2006.
11. BERAL V, HERMON C, REEVES G, PETO R. Sudden fall in breast cancer death rates in England and Wales. *The Lancet*, 345:1642-1643, 1995.
12. PETO R, BOREHAM J, CLARKE M, DAVIES C, BERAL V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20–69 years. *The Lancet*, 355:1822,2000.
13. ANDERSON WF, JATOI I, DEVESA SS. Distinct breast cancer incidence and prognostic patterns in the NCI’s SEER program: suggesting a possible link between etiology and outcome. *Breast Cancer Research and Treatment*. 90: 127–37, 2005.
14. BENSON JR, JATOI I, KEISCH M, ESTEVA FJ, MAKRIS A, JORDAN VC. Early breast cancer. *The Lancet*, 373: 1463–79, 2009.
15. CLEMMESSEN J. Carcinoma of the breast; results from statistical research. *British Journal of Radiology*, 21: 583–90, 1948.
16. BYRNE C, SCHAIRER C, WOLFE J. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age and menopausal status. *Journal of the National Cancer Institute* , 87: 1622–29 1995.
17. PARKIN DM. International variation. *Oncogene* 23, 6329–6340,2004.
18. BEVERS TB, ANDERSON BO. Breast Cancer Screening and Diagnosis. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*,7:1060-1096, 2009.
19. HSIEH CC, TRICHOPOULOS D, KATSOUYANNI K, YUASA S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *International Journal of Cancer*, 46: 796-800, 1990.
20. COLDITZ GA, ROSNER B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses’ Health Study. *American Journal of Epidemiology*., 152:950-964, 2000.
21. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including

- 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *The Lancet*, 358(9291):1389-99, 2001.
22. ELLISEN L, HABER D. Hereditary breast cancer. *Annual Review of Medicine*, 49: 425-436, 1998.
 23. KELSEY JL, FISCHER DB, HOLFORD TR, LIVOISI VA, MOSTOW ED, GOLDENBERG IS, WHITE C. Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 67: 327-333, 1981.
 24. JOHN EM, KELSEY JL. Radiation and other environmental exposures and breast cancer. *Epidemiologic Reviews.*, 15: 157-162, 1993.
 25. Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone replacement therapy in the million women study. *The Lancet*, 362: 419-427, 2003.
 26. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *The Lancet*, 347: 1713, 1996.
 27. GIORDANO SH, COHEN DS, BUZDAR AU. Breast carcinoma in men: A population-based study. *Cancer*, 101:51-57, 2004.
 28. CZENE K, BERGQVIST J, HALL P. How to treat male breast cancer. *The Breast*, 16 (suppl 2):147-154, 2007.
 29. FULLERTON JT, LANTZ J, SADLER GR. Breast cancer among men: raising awareness for primary prevention. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners* ;9(5):211-6,1997.
 30. ANDERSON WF, ALTHUIS MD, BRINTON LA. Is male breast cancer similar or different than female breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 83:77-86, 2004.
 31. GIORDANO SH . A review of the diagnosis and management of male breast cancer. *The Oncologist*, 10:471-479, 2005.
 32. GÓMEZ-RAPOSO C, TÉVAR Z F, MOYANO SM. Male breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, (6): 451-457, 2010.
 33. ÇAKABAY B. Triple-Negative Breast Cancer: Frequency, Molecular Subtypes, and Therapeutic Options. *European Journal of Surgical Science*, 2(3):57-61, 2011.
 34. SCHNITT SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology*, 2: 60-64, 2010.
 35. GUARNERI V, CONTE PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 1: 149-161, 2004.
 36. CONNOLLY J, KEMPSON R, LIVOLSI V, PAGE D, PATCHEFSKY A, SILVERBERG S. Recommendations for the reporting of breast carcinoma. *Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology, Human Pathology*;27(3):220-4,1996.
 37. MALHOTRA GK, ZHAO X, BAND H, BAND V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology and Therapy*, 10(10):955-60,2010.
 38. LI CI, URIBE DJ, DALING JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 93:1046-52, 2005.
 39. LESTER SC, BOSE S, CHEN YY, CONNOLLY JL, DE BACA ME, FITZGIBBONS PL. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 133:1515-38, 2009.
 40. MACIEJCZYK A. New Prognostic Factors in Breast Cancer. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 22, 1-15, 2013.

41. SANDHU R., PARKER JS., JONES WD. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *LabMedicine* , 41:364-372, 2010.
42. SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:10869–10874, 2001.
43. SORLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:8418-8423, 2003.
44. BRENTON JD, CAREY LA, AHMED AA. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of Clinical Oncology*, 23:7350-7360, 2005.
45. RAKHA EA, EL-SAYED ME, REIS-FILHO JS. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology*, 52:67–81, 2008.
46. PARKER JS, MULLINS M, CHEANG MC. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 27:1160-1167, 2009.
47. SOTIRIOU C, PUSZTAI L. Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 360:790–800, 2009.
48. GEYER FC, REIS-FILHO JS. Microarray-based gene expression profiling as clinical tool for breast cancer management: are we there yet? *International Journal of Surgical Pathology*, 17:285-302, 2009.
49. RAKHA EA, EL-SAYED ME, GREEN AR. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *Journal of Clinical Oncology*, 25:4772-8, 2007.
50. RAKHA E, REIS-FILHO JS. Basal-like breast carcinoma: from expression profiling to routine practice. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 133:860–868, 2009.
51. LIVASY CA, KARACA G, NANDA R. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology*, 19:264–271, 2006.
52. FULFORD LG, EASTON DF, REIS-FILHO JS. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*, 49:22–34, 2006.
53. FADARE O, TAVASSOLI FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Advances in Anatomic Pathology*, 14:358–373, 2007.
54. LAAKSO M, LOMAN N, BORG A. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Modern Pathology*, 18:1321–1328, 2005.
55. FULFORD LG, REIS-FILHO JS, RYDER K. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Research*, 9:4, 2007.
56. SCHNEIDER BP, WINER EP, FOULKES WD. Triplenegative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clinical Cancer Research*, 14:8010–8018, 2008.
57. MOINFAR F. Is ‘basal-like’ carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. *Pathobiology*, 75:119–131, 2008.
58. BECKMANN WM, NIEDERACHER D, SCHNÜRCH H-G, GUSTERSON BA, BENDER HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine*, 75:429–39, 1997.
59. KENEMANS P, VERSTRAETEN R.A., VERHEIJEN R.H.M. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, 49:34–43, 2004.

60. GELMANN EP. Oncogenes in human breast cancer, *The Breast Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*, volume 1, Boston, 499-517, 1998.
61. FEARON ER, BOMMER GT. Progressing from Gene Mutations to Cancer. Editor: ABELOFF MD, ARMITAGE JO, LICHTER AS, NIEDERHUBER JE. KASTAN MB, MCKENNA WG, *Clinical Oncology*. 4th ed. page 207-222, 2008.
62. WILSON JF. Elucidating the DNA damage pathway. *The Scientist*, 16[2]:30, 2002.
63. LOEB LA. A Mutator Phenotype in Cancer. *Cancer Research*, 15;61(8):3230-9, 2001.
64. OSBORNE C, WILSON P, TRIPATHY D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist*, 9:361-377, 2004.
65. YARDEN Y, SLIWKOWSKI MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2:127-137, 2001.
66. HYNES NE, STERN DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1198: 165–184, 1994.
67. EVA Y.H.P. LEE AND WILLIAM J. MULLER. Oncogenes and Tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010.
68. OVED S, YARDEN Y. Signal transduction: molecular ticket to enter cells. *Nature*, 416:133-136, 2002.
69. KREJSA C, ROGGE M, SADEE W. Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6):507-521, 2006.
70. SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULLRICH A, MCGUIRE WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with the amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*, 235: 177–182, 1987.
71. SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES LA, HOLT JA, WONG SG, KEITH DE, LEVIN WJ, STUART SG, UDOVE J, ULLRICH A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244: 707–712, 1989.
72. ALLRED DC, CLARKGM, MOLINA R, TANDON AK, SCHNITT SJ, GILCHRIST KW, OSBORNE CK, TORMEY DC, MCGUIRE WL. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Human Pathology*, 23: 974–979, 1992.
73. MANSOUR EG, RAVDIN PM, DRESSLER L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer*, 74: 381–400, 1994.
74. ANTONIOTTI S, TAVERNA D, MAGGIORA P, SAPEI ML, HYNES NE, DE BORTOLI M. Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms. *British Journal of Cancer*, 70: 1095–1101, 1994.
75. RAVDIN PM, CHAMNESS GC. The c-erbB-2 protooncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: A paradigm for the development of other macromolecular markers—a review. *Gene*, 159: 19–27, 1995.
76. ROSS JS, FLETCHER JA, LINETTE GP. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *The Oncologist*, 8:307-325, 2003.
77. SLAMON DJ, LEYLAND-JONES B, SHAK S. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine*, 344:783-792, 2001.
78. CARTER P, PRESTA L, GORMAN CM. Humanization of an anti-p185^{HER2} for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 89:4285-4289, 1992.

79. HUDZIAK RM, LEWIS GD, WINGET M. p185^{HER2} monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitize human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular and Cellular Biology*, 9:1165-1172, 1989.
80. CLYNES RA, TOWERS TL, PRESTA LG. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine*, 6:443-446, 2000.
81. ROMOND EH, PEREZ EA, BRYANT J. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353:1673-84, 2005.
82. SMITH I, PROCTER M, GELBER RD. 2-year followup of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 369:29-36, 2007.
83. DOWSETT M, PROCTER M, MCCASKILL-STEVENS W. Disease-free survival according to degree of HER2 amplification for patients treated with adjuvant chemotherapy with or without 1 year of trastuzumab: the HERA Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27:2962-9, 2009.
84. PATANI N, MARTIN L AND DOWSETT M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *International Journal of Cancer*, 133:1-13, 2013.
85. SCHNEIDER JW, CHANG AY, GARRATT A. Trastuzumab cardiotoxicity: speculations regarding pathophysiology and targets for further study. *Seminars in Oncology*, 29(suppl 11):22-28, 2002.
86. HENRIKSSON M, LUSCHER B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Advances in Cancer Research*, 68:109-182, 1996.
87. FACCHINI LM, PENN LZ. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 12:633-651, 1998.
88. XIAO Q, CLAASSEN G, SHI J, ADACHI S, SEDIVY J, HANN SR. Transactivation-defective c-MycS retains the ability to regulate proliferation and apoptosis. *Genes and Development*, 12:3803-3808, 1998.
89. LIAO DJ, DICKSON RB. c-Myc in breast cancer. *Endocrine- Related Cancer*, 7(3):143-64, 2000.
90. AMATI B, ALEVIZOPOULOS K, VLACH J. Myc and the cell cycle. *Frontiers of Bioscience*, 3: 250-268, 1998.
91. DANG CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 1-11, 1999.
92. COLE MD, MCMAHON SB. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*, 18: 2916-2924, 1999.
93. GARDNER L, LEE L, DANG C. The c-Myc Oncogenic Transcription Factor. *The Encyclopedia of Cancer*, Second Edition, 2002.
94. NASS SJ, DICKSON RB. Defining a role for c-myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 44:1-22, 1997.
95. VARLEY JM, SWALLOW JE, BRAMMER WJ. Alterations to either c-erbB2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis. *Oncogene*, 1:423-430 1987.
96. BERNS EM, FOEKENS JA, VAN PUTTEN WL, VAN STAVEREN IL, PORTENGEN H, DE KONING WC, KLIJN JG. Prognostic factors in human primary breast cancer: Comparison of c-myc and HER-2/Neu amplification. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43: 13-19, 1992.

97. CARROLL JS, SWARBRICK A, MUSGROVE EA. Mechanisms of growth arrest by c-myc antisense oligonucleotides in MCF-7 breast cancer cells: implications for the antiproliferative effects of antiestrogens. *Cancer Research*, 62:3126–3131, 2002.
98. DENG CX, SCOTT F. Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene*, 19: 1059–1064, 2000.
99. WANG Q, ZHANG H, KAJINO K & GREENE MI. BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene*, 17:1939–1948, 1998.
100. COLEMAN C, MARSHALL CJ, OLSON MF. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5:355-366, 2004.
101. VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE DR, BERNEMAN ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36:131-149, 2003.
102. STEEG PS, ZHOU Q. Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 52:17-28,1998.
103. WEIGEL MT, DOWSETT M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: Prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer*, 17: 245-262, 2010.
104. KEYOMARSI K, TUCKER SL, BUCHHOLZ TA. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 347:1566-1575, 2002.
105. LODEN M, STIGHALL M, NIELSEN NH. The Cyclin D1 high and Cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node. *Oncogene*, 21:4680-4690, 2002.
106. RAEPPEL D, VON LINTIG F, ZEMOJTEL T, DUCHNIEWICZ M, JUNG A, LUBBERT M, BOSS GR, SCHEELE JS. Determination of Ras-GTP and Ras-GDP in patients with acute myelogenous leukemia (AML), myeloproliferative syndrome (MPS), juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), acute lymphocytic leukemia (ALL), and malignant lymphoma: assessment of mutational and indirect activation. *Annals of Hematology*, 88:319–324, 2009.
107. STAMATAKOS M, STEFANAKI C, KONTZOGLOU K. Recapitulation of Ras Oncogene Mutations in Breast Cancer. *Onkologie*, 33:540–544, 2010.
108. ZHAO X, LU L, POKHRIYAL N, MA H, DUAN L, LIN S. JAFARI N, BAND H, BAND V. Overexpression of RhoA induces preneoplastic transformation of primary mammary epithelial cells. *Cancer Research*, 69:483–491, 2009.
109. SORBERA, L.A., CASTANER, J., BOZZO, J., LEESON, P.A. *Drugs of the Future*, 27(12): 1141, 2002.
110. VON LINTIG FC, DREILINGER AD, VARKI NM, WALLACE AM, CASTEEL DE, BOSS GR. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 62(1):51-62,2000.
111. MASUDA H, ZHANG D, BARTHOLOMEUSZ C. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*,136:331–345,2012.
112. MENDELSON J, BASELGA J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21:2787–2799, 2003.
113. YAMANASHI Y, TEZUKA T, YOKOYAMA K. Activation of receptor protein-tyrosine kinases from the cytoplasmic compartment. *The Journal of Biochemistry*, 151(4):353-9,2012.
114. DOWNWARD J, YARDEN Y, MAYES E, SCRACE G, TOTTY N, STOCKWELL P. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307:521–527, 1984.

115. SCHULZE WX, DENG L, MANN M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Molecular Systems Biology*, 1:2005–2008, 2005.
116. SAINSBURY JR, FARNDON JR, NEEDHAM GK, MALCOLM AJ, HARRIS AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *The Lancet*, 1:1398–1402, 1987.
117. SALOMON DS, BRANDT R, CIARDIELLO F, NORMANNO N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 19:183–232, 1995.
118. FALLON KB, PALMER CA, ROTH KA, NABORS LB, WANG W, CARPENTER M. Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63:314–322, 2004.
119. GIACCONE G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23:3235–3242, 2005.
120. AL-KURAYA K, SCHRAML P, TORHORST J, TAPIA C, ZAHARIEVA B, NOVOTNY H. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Research*, 64:8534–8540, 2004.
121. RO J, NORTH SM, GALLICK GE, HORTOBAGYI GN, GUTTERMAN JU, BLICK M. Amplified and overexpressed epidermal growth factor receptor gene in uncultured primary human breast carcinoma. *Cancer Research*, 48:161–164, 1988.
122. SPYRATOS F, DELARUE JC, ANDRIEU C, LIDEREAU R, CHAMPEME MH, HACENE K. Epidermal growth factor receptors and prognosis in primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 17:83–89, 1990.
123. YATABE Y, KOSAKA T, TAKAHASHI T, MITSUDOMI T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 29:633–639, 2005.
124. REIS-FILHO JS, PINHEIRO C, LAMBROS MB, MILANEZI F, CARVALHO S, SAVAGE K. EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *Journal of Pathology*, 209:445–453, 2006.
125. BHARGAVA R, GERALD WL, LI AR, PAN Q, LAL P, LADANYI M. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Modern Pathology*, 18:1027–1033, 2005.
126. WEBER F, FUKINO K, SAWADA T, WILLIAMS N, SWEET K, BRENA RM. Variability in organ-specific EGFR mutational spectra in tumour epithelium and stroma may be the biological basis for differential responses to tyrosine kinase inhibitors. *British Journal of Cancer*, 92:1922–1926, 2005.
127. TAKANO T, OHE Y, SAKAMOTO H, TSUTA K, MATSUNO Y, TATEISHI U. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23:6829–6837, 2005.
128. MORONI M, VERONESE S, BENVENUTI S, MARRAPESE G, SARTORE-BIANCHI A, DI NICOLANTONIO F. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to anti EGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *The Lancet Oncology*, 6:279–286, 2005.
129. TORREGROSA D, BOLUFER P, LLUCH A, LÓPEZ JA, BARRAGÁN E, RUIZ A, GUILLEM V, MUNÁRRIZ B, GARCÍA CONDE J. Prognostic significance of *CerbB2/Neu* amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary

- breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clinica Chimica Acta*, 262: 99-119, 1997.
130. DENT R, TRUDEAU M, PRITCHARD KI, HANNA WM, KAHN HK, SAWKA CA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13:4429–4434, 2007.
 131. RADISKY DC. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Scim* 118:4325–4326.
Kalluri R, Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 112:1776–1784, 2005.
 132. FERRARA N, GERBER HP & LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9:669–676, 2003.
 133. PRESTA LG, CHEN H, O'CONNOR SJ, CHISHOLM V. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Research*, 57(20):4593-9,1997.
 134. MASOOD R, CAI J, ZHENG T, SMITH DL, HINTON DR, GILL PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood*, 98(6):1904-13,2001.
 135. GUIDI AJ, SCHNITT SJ, FISCHER L, TOGNAZZI K. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*, 80(10):1945-53,1997.
 136. TOI M, MATSUMOTO T, BANDO H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *The Lancet Oncology*, 2(11):667-73,2001.
 137. LINDERHOLM B, TAVELIN B, GRANKVIST K. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 16(9):3121-8,1998.
 138. RYDÉN L, STENDAHL M, JONSSON H, EMDIN S. Tumor-specific VEGF-A and VEGFR2 in postmenopausal breast cancer patients with long-term follow-up. Implication of a link between VEGF pathway and tamoxifen response. *Breast Cancer Research and Treatment*, 89(2):135-43,2005.
 139. FOEKENS JA, PETERS HA, GREBENCHTCHIKOV N. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Research*, 61(14):5407-14,2001.
 140. LIANG Y, BREKKEN RA, HYDER SM. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocrine-Related Cancer*, 13 905–919, 2006.
 141. PIKE MC, SPICER DV, DAHMOUSH L. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiologic Reviews*, 15:17-35, 1993.
 142. COLDITZ GA, HANKINSON SE, HUNTER DJ. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine*, 332:1589-93, 1995.
 143. HENDERSON BE, BERNSTEIN L. Endogenous and exogenous hormonal factors. Editors: HARRIS JR, MORROW M, LIPPMAN ME. *Diseases of the breast*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 185-200, 1996.
 144. FUQUA SAW. Estrogen and progesterone receptors and breast cancer. Editors: HARRIS JR, MORROW M, LIPPMAN ME. *Diseases of the breast*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven:261-71,1996.
 145. STANFORD JL, SZKLO M, BRINTON LA. Estrogen receptors and breast cancer. *Epidemiologic Reviews*, 8:42-59, 1986.

146. HABEL LA, STANFORD JL. Hormone receptors and breast cancer. *Epidemiologic Reviews*, 15:209-19, 1993.
147. RAYTER Z. Steroid receptors in breast cancer. *British Journal of Surgery*, 78:528-35, 1991.
148. GRONEMEYER H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annual Review of Genetics*, 25:89-123, 1991.
149. PARKER MG. Steroid and related receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 5:499-504, 1993.
150. HAWKINS RA, ROBERTS MM, FORREST AP. Oestrogen receptors and breast cancer current status. *British Journal of Surgery*, 67:153-69, 1980.
151. DICKSON RB, LIPPMAN ME. Growth regulation of normal and malignant breast epithelium. Editors: BLAND KJ, COPELAND EM. *The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases*. Philadelphia, PA: Saunders, 518-63, 1991.
152. ALI S, COOMBES RC. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5(3):271-81, 2000.
153. HELGUERO LA, FAULDS MH, GUSTAFSSON JA, HALDOSEN LA. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*, 24(44):6605-16, 2005.
154. CLARK GM, MCGUIRE WL, HUBAY CA. Progesterone receptors as a prognostic factor in Stage breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 309:1343-7, 1983.
155. MCGUIRE WL. Prognostic factors in primary breast cancer. *The Journal of Cancer Survivorship*, 5:527-36, 1986.
156. FISHER ER, SASS R, FISHER B. Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project. Correlations with concordant and discordant estrogen and progesterone receptors. *Cancer*, 59:1554-9, 1987.
157. HORWITZ KB. The central role of progesterone receptors and progestational agents in the management and treatment of breast cancer. *Seminars in Oncology*, 15(2 suppl 1): 14-19, 1988.
158. DONEGAN WL. Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer*, 70(6 suppl): 1755-64, 1992.
159. RENOIR JM, MARSAUD V, LAZENNEC G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical Pharmacology*, 85:449-465, 2013.
160. JORDAN VC, O'MALLEY BW. Selective Estrogen Receptor Modulators and Antihormonal Resistance in Breast Cancer. *Journal Of Clinical Oncology*, 2:53-60, 2008.
161. ALI S, COOMBES RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Reviews Cancer*, 2(2):101-12, 2002.
162. LE ROMANCER M, POULARD C, COHEN P, SENTIS S, RENOIR JM, CORBO L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocrine Reviews*, 32(5):597-622, 2011.
163. CLARKE R, LIU MC, BOUKER KB, GU Z, LEE RY, ZHU Y. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*, 22(47):7316-39, 2003.

164. JORDAN VC, O'MALLEY BW. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(36):5815–24, 2007.
165. NICHOLSON RI, HUTCHESON IR, HISCOX SE, KNOWLDEN JM, GILES M, BARROW D. Growth factor signalling and resistance to selective oestrogen receptor modulators and pure anti-oestrogens: the use of anti-growth factor therapies to treat or delay endocrine resistance in breast cancer. *Endocrine- Related Cancer*, 12 Suppl 1:29-36, 2005.
166. NICHOLSON RI, HUTCHESON IR, JONES HE, HISCOX SE, GILES M, TAYLOR KM. Growth factor signalling in endocrine and anti-growth factor resistant breast cancer. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8(3):241–53, 2007.
167. MUSGROVE EA, SUTHERLAND RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(9):631–43, 2009.
168. MISHRA AK, AGRAWAL U, NEGI S. Expression of androgen receptor in breast cancer & its correlation with other steroid receptors & growth factors. *Indian Journal of Medical Research*, 135, 843-852, 2012.
169. MOINFAR F, OKCU M, TSYBROVSKYY O, REGITNIG P, LAX SF, WEYBORA W. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas. potential relevance to new therapeutic strategies. *Cancer*, 98:703-11, 2003.
170. OLIVEIRA AM, ROSS JS, FLETCHER JA. Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer, The Gatekeepers and the Caretakers. *American Journal of Clinical Pathology*, 124(Suppl 1):16-28, 2005.
171. MIKI Y., SWENSEN J., SHATTUCK-EIDENS D., FUTREAL P.A., HARSMAN K. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266:66-71,1994.
172. WOOSTER R. , NEUHAUSEN S.L., MANGION J., QUIRK Y., FORD D. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q-12-13. *Science*, 30(265)5181: 2088-90,1994.
173. GRIFFITHS CL, OLIN JL. Triple Negative Breast Cancer: A Brief Review of its Characteristics and Treatment Options. *Journal of Pharmacy Practice*, 25(3):319-323,2012.
174. CAVALLI LR, SINGH B, ISAACS C, DICKSON RB, HADDAD BR. Loss of heterozygosity in normal breast epithelial tissue and benign breast lesions in BRCA1/BRCA2 carriers with breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 149: 38-43, 2004.
175. WOOSTER R, NEUHAUSEN SL, MANGION J, QUIRK Y, FORD D, COLLINS N, NGUYEN K, SEAL S, TRAN T, AVERILL D, ET AL. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q-12-13. *Science*, 181:2088-2090, 1994.
176. ALPERT TE, HAFFTY BG. Conservative management of breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. *Clinical Breast Cancer*, 5: 37-42, 2004.
177. ROA B.B.,BOYD A.A., VOLČIK K., RICHARD C.S., Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutation in BRCA1 and BRCA2. *Nature Genetics*, 14:185-7,1996.
178. EGELI U, CECENER G, TUNCA B, TASDELEN I. Novel germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish women with breast and/or ovarian cancer and their relatives. *Cancer Investigation*, 24(5):484-91,2006.
179. TAKAHASHI T, NAU MM, CHIBA I. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, 246:491-494,1989.

180. NIGRO JM, BAKER SJ, PREISINGER AC. Mutations in the *p53* gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 342:705-708,1989.
181. HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B. *p53* mutations in human cancers. *Science*, 253:49-53,1991.
182. MALKIN D, LI FP, STRONG LC. Germ line *p53* mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250:1233-1238,1990.
183. LI FP. Familial cancer syndromes and clusters. *Current Problems in Cancer*, 14:73-114,1990.
184. LACROIX M, TOILLON RA, LECLERCQ G. *P53* and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer*, 13: 293-325, 2006.
185. NORBERG T, JANSSON T, SJØGREN S, MÅRTENSSON C, ANDRÉASSON I, FJÄLLSKOG ML, LINDMAN H, NORDGREN H, LINDGREN A, HOLMBERG L, BERGH J. Overview on human breast cancer with focus on prognostic and predictive factors with special attention on the tumour suppressor gene *p53*. *Acta Oncologica*, 35: 96-102, 1996.
186. LANE DP. *P53*; guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16, 1992.
187. CATTORETTI G, RILKE F, ANDREDA S, MATO LDA, DELIA D. *P53* expression in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 41:178-183, 1998.
188. SIRVENT JJ, FORTUNO MAR A, OLONA M, ORTI A. Prognostic value of *p53* protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histology and Histopathology*, 16: 99-106, 2001.
189. LEVINE AJ. *p53*, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88:323-331,1997.
190. HARRIS SL, LEVINE AJ. The *p53* pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17):2899-908,2005.
191. LANE DP, LU X, HUPP T. The role of the *p53* protein in the apoptotic response. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 345:277-280,1994.
192. ZOU Z, GAO C, NAGAICH AK. *p53* regulates the expression of the tumor suppressor gene *maspin*. *Journal of Biological Chemistry*, 275:6051-6054,2000.
193. WALES MM, BIEL MA, EL DEIRY W. *p53* activates expression of *HIC-1*, a new candidate tumor suppressor gene on 17p13.3. *Nature Medicine*, 1:570-577,1995.
194. MASHIMO T, WATABE M, HIROTA S. The expression of the *KAI1* gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by *p53*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 95:11307-11311,1998.
195. FITZGIBBONS PL, PAGE DL, WEAVER D. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 124:966-978,2000.
196. UEDA K, NISHIJIMA M, INUI H. Infrequent mutations in the *PTEN/MMAC1* gene among primary breast cancers. *Japanese Journal of Cancer Research*, 89:17-21,1998.
197. LI J, YEN C, LIAW D. *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275:1943-1947,1997.
198. LI DM, SUN H. *TEP1*, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Research*, 57:2124-2129,1997.
199. VAZQUEZ F, SELLERS WR. The *PTEN* tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1470:M21-M35,2000.

200. CARNERO A, BLANCO-APARICIO C, RENNER O. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Current Cancer Drug Targets*, 8:187–198,2008.
201. LEONEL F. HERNANDEZ-AYA, ANA M. GONZALEZ-ANGULO. Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway in Breast Cancer. *The Oncologist*, 16:404–414,2011.
202. PERREN A, WENG LP, BOAG AH. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *American Journal of Pathology*, 155:1253–1260,1999.
203. BOSE S, WANG SI, TERRY MB. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene*; 17:123–127,1998.
204. DEPOWSKI PL, ROSENTHAL SI, ROSS JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Modern Pathology*, 14: 672-676, 2001.
205. WENG LP, SMITH WM, DAHIA PL, ZIEBOLD U, GIL E, ENG C. PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 Arrest followed by cell death. *Cancer Research*, 59: 5808-5814, 1999.
206. SOZZI G, VERONESE M, BEGRINI M, BAFFA R, COTTICELLI M, INOUE H, TORNIELLI S, PILOTTI S, DE GREGORI L, PASTORINO , PIEROTTI M, OHTA M, HUEBNER K, CROCE C. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, 85: 17-26, 1996.
207. MARTIN J, ST-PIERRE MV, DUFOUR JF. Hit proteins, mitochondria and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta.*;1807(6):626-32.,2011.
208. TSENG JE, KEMP BL, KHURI FR, KURIE JM, LEE JS, ZHOU X, LIU D, HONG WK, MAO L. Loss of Fhit is frequent in stage I non-small cell lung cancer and in the lungs of chronic smokers. *Cancer Research*, Oct 1;59(19):4798-803, 1999.
209. MICHAEL D, BEER DG, WILKE CW, MILLER DE, GLOVER TW. Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas. *Oncogene*, Oct 2;15(14):1653-9, 1997.
210. PANDIS N, JIN Y, GORUNOVA L, PETERSSON C, BARDI G, IDVALL I, JOHANSSON B, INGVAR C, MANDAHL N, MITELMAN F. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of 8 karyotypic subgroups. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 12:173-185, 1995.
211. YURA Y, MANDAI M, KONISHI I, HAMID AA, TSURUTA Y, KUSAKARI T. Loss of Fhit protein expression in high-grade and advanced stage endometrial carcinomas. *Anticancer Research*, 23(3C):2837-43, 2003.
212. HUANG LW, CHAO SL, CHEN TJ. Reduced Fhit expression in cervical carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecologic Oncology*, 90(2):331-7, 2003.
213. CONNOLLY DC, GREENSPAN DL, WU R, REN X, DUNN RL, SHAH KV, JOHN RW, BOSCH FX, MUNOZ N, CHO KR. Loss of fhit expression in invasive cervical carcinomas and intraepithelial lesions associated with invasive disease. *Clinical Cancer Research*, 6(9):3505-10, 2000.
214. CHAU BN, WANG JY. Coordinated regulation of life and death by RB. *Nature Reviews Cancer*, 3:130-138,2003.
215. CLASSON M, HARLOW E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2:910-917,2002.
216. BURKHART DL, SAGE J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, 8: 671–682,2008.

217. FUNG YK, T'ANG A. The role of the retinoblastoma gene in breast cancer development. *Cancer Treatment and Research*, 61:59-68,1992.
218. T'ANG A, VARLEY JM, CHAKRABORTY S. Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science*, 242:263-266,1988.
219. LEE EY, TO H, SHEW JY. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science*, 241:218-221,1988.
220. CECCARELLI C, SANTINI D, CHIECO P. Retinoblastoma (RB1) gene product expression in breast carcinoma: correlation with Ki-67 growth fraction and biopathological profile. *Journal of Clinical Pathology*, 51:818-824,1998.
221. BERNIS EM, DE KLEIN A, VAN PUTTEN WL. Association between *RB-1* gene alterations and factors of favourable prognosis in human breast cancer, without effect on survival. *International Journal of Cancer*, 64:140-145,1995.
222. SAWAN A, RANDALL B, ANGUS B. Retinoblastoma and p53 gene expression related to relapse and survival in human breast cancer: an immunohistochemical study. *Journal of Pathology*, 168:23-28,1992.
223. PIETILAINEN T, LIPPONEN P, AALTOMAA S. Expression of retinoblastoma gene protein (Rb) in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. *European Journal of Cancer*, 31A:329-333,1995.
224. LIU J, KIM J, OBERDOERFFER P. Metabolic modulation of chromatin: implications for DNA repair and genomic integrity. *Frontiers in Genetics*, 17;4:182,2013.
225. CHU G, YANG W. Here comes the sun: recognition of UV-damaged DNA. *Cell*, 135(7):1172-4,2008.
226. BELZILE JP, CHOUDHURY SA, COURNOYER D, CHOW TY. Targeting DNA repair proteins: a promising avenue for cancer gene therapy. *Current Gene Therapy*, Feb;6(1):111-23,2006.
227. AHMED M, RAHMAN N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*, 25;25(43):5906-11. 2006.
228. BECKER-CATANIA SG, GATTI RA. Ataxia-telangiectasia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 495:191-198,2001.
229. STANKOVIC T, KIDD AM, SUTCLIFFE A. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia,lymphoma, and breast cancer. *American Journal of Human Genetics*, 62:334-345,1998.
230. WATERMAN MJ, STAVRIDIS ES, WATERMAN JL. ATM dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nature Genetics*, 19:175-178,1998.
231. BANIN S, MOYAL L, SHIEH S. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*,281:1674-1677,1998.
232. SHILOH Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*, 3:155-168,2003.
233. DORK T, BENDIX R, BREMER M. Spectrum of *ATM* gene mutations in a hospital-based series of unselected breast cancer patients. *Cancer Research*, 61:7608-7615,2001.
234. HAMPTON GM, MANNERMAA A, WINQUIST R. Loss of heterozygosity in sporadic human breast carcinoma: a common region between 11q22 and 11q23.3. *Cancer Research*, 54:4586-4589,1994.
235. LAKIN ND, HANN BC, JACKSON SP. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene*, 8;18(27):3989-95,1999.

236. FEI P, EL-DEIRY WS. P53 and radiation responses. *Oncogene*, 1;22(37):5774-83,2003.
237. SILICIANO JD, CANMAN CE, TAYA Y, SAKAGUCHI K, APPELLA E, KASTAN MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes and Development*, 11(24):3471-81,1997.
238. HEIKKINEN K, MANSIKKA V, KARPPINEN SM, RAPA K, WINQVIST R. Mutation analysis of the ATR gene in breast and ovarian cancer families. *Breast Cancer Research*, 7(4):R495-501,2005.
239. DUROCHER F, LABRIE Y, SOUCY P. Mutation analysis and characterization of ATR sequence variants in breast cancer cases from high-risk French Canadian breast/ovarian cancer families. *BioMed Central Cancer*, 29;6:230,2006.
240. VOGELSTEIN B, LANE D, LEVINE AJ. Surfing the p53 network. *Nature*, 408:307-310,2000.
241. CARR AM. Cell cycle: piecing together the p53 puzzle. *Science*, 287:1765-1766,2000.
242. BELL DW, VARLEY JM, SZYDLO TE. Heterozygous germ line *hCHK2* mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science*, 286:2528-2531,1999.
243. INGVARSSON S, SIGBJORNSDOTTIR BI, HUIPING C. Mutation analysis of the *CHK2* gene in breast carcinoma and other cancers. *Breast Cancer Research*, 4:R4,2002.
244. VAHTERISTO P, BARTKOVA J, EEROLA H.A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *American Journal of Human Genetics*, 71:432-438,2002.
245. ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition, New York, 2008.
246. DOĞAN AL, GÜÇ D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*; 35: 34-42,2004.
247. BLUME-JENSEN P, HUNTER T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411: 355-65,2001.
248. ROWINSKY EK, WINDLE JJ, VON HOFF DD. Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 3631-36.
249. SLOMOVITZ BM, COLEMAN RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(21):5856-64,2012.
250. KOLCH W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, 351:289-305,2000.
251. LEE JT, MCCUBREY JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*, 16:486-507,2002.
252. KARP JE, LANCET JE, KAUKMANN SH. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: A phase I clinical-laboratory correlative trial. *Blood*, 97: 3361-9,2001.
253. WA SCHULZ. *Molecular Biology of Human Cancers*. The Netherlands: Springer, 2007.
254. WEBER GF. *Molecular Mechanisms of Cancer*. The Netherlands: Springer, 2007.
255. VIVANCO I, SAWYERS CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews*, 2: 489-501, 2002.
256. WYSOCKI PJ. mTOR in renal cell cancer: modulator of tumor biology and therapeutic target. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9: 231-41,2009.

257. SHAW RJ, CANTLEY LC. Ras, PI(3)K, and mTOR signalling controls tumor cell growth. *Nature*, 441:424-30,2006.
258. CANTLEY LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*, 296: 1655-1657, 2002.
259. MICHAEL JOHN FRY. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: How big a role might it play? *Breast Cancer Research*, 3: 304-312, 2001.
260. MILLS GB, LU Y, FANG X, WANG H, EDER A, MAO M, SWABY R, CHENG KW, STOKOE D, SIMINOVITCH K, JAFFE R, GRAY J. The role of genetic abnormalities of PTEN and the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast and ovarian tumorigenesis, prognosis, and therapy. *Seminars in Oncology*, 28:125-41, 2001.
261. FAIVRE S, KROEMER G, RAYMOND E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews*, 5:671- 8, 2006.
262. ZHOU H, HUANG S. mTOR signaling in cancer cell motility and tumor metastasis. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20:1-16,2010.
263. TOSCHI A, LEE E, GADIR N, OHH M, FOSTER DA. Differential dependence of hypoxia- inducible factors 1a and 2a on mTORC1 and mTORC2. *The Journal of Biological Chemistry*, 283:34495-9,2008.
264. YEKATERINA Y. ZAYTSEVA, JOSEPH D. Valentino, Pat Gulhati, B. Mark Evers. mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Letters*, 319:1-7,2012.
265. NAKATANI K, THOMPSON DA, BARTHEL A, SAKAUE H, LIU W, WEIGEL RJ, ROTH RA. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 21528-21532, 1999.
266. 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, TESTA JR. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International Journal of Cancer*, 64: 280-285, 1995.
267. AARONSON DS, HORVATH CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*, 296(5573):1653-5,2002.
268. BOWMAN T, GARCÍA R, TURKSON J. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19:2474-88,2000.
269. RAMANA CV, CHATTERJEE-KISHORE M, NGUYEN H, STARK GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*, 19: 2619-2627, 2000.
270. GARCIA R, JOVE R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *Journal of Biomedical Science*, 5: 79-85, 1998.
271. CATLETT-FALCONE R, DALTON WS, JOVE R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. *Signal transducer and activator of transcription. Current Opinion in Oncology*, 11: 490-496, 1999.
272. BENEKLI M, XIA Z, DONOHUE KA. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood*, 99:252-7,2002.
273. BROMBERG J. Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. *Breast Cancer Research*, 2: 86-90, 2000.
274. BURKE WM, JIN X, LIN HJ, HUANG M, LIU R, REYNOLDS RK, LIN J. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene*, 20(55):7925-34,2001.
275. YOKOTA J. Tumor progression and metastasis *Carcinogenesis*, 21: 497-503,2000.

276. CHAMBERS AF, GROOM AC, MACDONALD IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites; *Nature Reviews Cancer*, 2:563-572,2002.
277. ZARDAVAS D, BASELGA J, PICCART M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(4):191-210,2013.
278. JODELE S, BLAVIER L, YOON JM. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25: 35-43,2006.
279. FIDLER IJ. Critical determinants of metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 12: 89-96,2002.
280. FIDLER IJ, KIM SJ, LANGLEY RR. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101: 927-936,2007.
281. SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A: Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62:10-29, 2012.
282. GONZALEZ-ANGULO AM, MORALES-VASQUEZ F, HORTOBAGYI GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 608:1-22,2007.
283. GIRAULT I, BIECHE I, LIDEREAU R: Role of estrogen receptor alpha transcriptional coregulators in tamoxifen resistance in breast cancer. *Maturitas*, 54:342-351, 2006.
284. TOLANEY SM, KROP IE: Mechanisms of trastuzumab resistance in breast cancer. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9:348-355,2009.
285. ARNEDOS M, BIHAN C, DELALOGUE S, ANDRE F: Triple-negative breast cancer: are we making headway at least? *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 4:195-210, 2012.
286. HUOBER J, VON MÜNCKWITZ G, DENKERT C, TESCH H, WEISS E, ZAHM DM, BELAU A, KHANDAN F, HAUSCHILD M, THOMSEN C, HOGEL B, DARB-ESFAHANI S, MEHTA K AND LOIBL S: Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 124:133-140, 2010.
287. LIEDTKE C, MAZOUNI C, HESS KR, ANDRE F, TORDAI A, MEJIA JA, SYMMANS WF, GONZALEZ-ANGULO AM, HENNESSY B, GREEN M, CRISTOFANILLI M, HORTOBAGYI GN AND PUSZTAI L: Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26:1275-1281,2008.
288. NGUYEN DX, BOS PD AND MASSAGUE J: Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, 9:274-284, 2009.
289. WEIGELT B, PETERSE JL, VAN'T VEER LJ: Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5:591-602,2005.
290. TRAPÉ AP, GONZALEZ-ANGULO AM. Breast cancer and metastasis: on the way toward individualized therapy. *Cancer Genomics and Proteomics*, 9(5):297-310,2012.
291. GRUVBERGER S, RINGNER M, CHEN Y. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Research*, 61(16):5979-5984,2001.
292. SOTIRIOU C, NEO SY, MCSHANE LM. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the*

- National Academy of Science of the United States of America, 100(18):10393–10398,2003.
293. VAN 'T VEER LJ, DAI H, VAN DE VIJVER MJ. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871):530–536,2002.
 294. WANG Y, KLIJN JG, ZHANG Y. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *The Lancet*, 365(9460):671–679,2005.
 295. VAN DE VIJVER MJ, HE YD, VAN 'T VEER LJ. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 347(25):1999–2009,2002.
 296. JANSEN MP, FOEKENS JA, VAN STAVEREN IL. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. *Journal of Clinical Oncology*, 23(4):732–740,2005.
 297. PAIK S, SHAK S, TANG G. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 351(27):2817–2826,2004.
 298. MA XJ, WANG Z, RYAN PD. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*, 5(6):607–616,2004.
 299. MARK M, RIJLI FM, CHAMBON P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatric Research*, 42:421-9,1997.
 300. NUNES FD, DE ALMEIDA FC, TUCCI R, DE SOUSA SC. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. *Pesquisa Odontologica Brasileira*, 17(1):94-8,2003.
 301. SHARPE PT. Homeobox genes and orofacial development. *Connective Tissue Research*, 32:17-25,1995.
 302. CILLO C, FAIELLA A, CANTILE M, BONCINELLI E. Homeobox genes and cancer. *Experimental Cell Research*, 248:1-9,1999.
 303. FORD HL. Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and cancer. *Cell Biology International*, 22:397-400,1998.
 304. SCOTT GA, GOLD SMITH LA. Homeobox genes and skin development: a review. *Journal of Investigative Dermatology*, 101:3-8,1993.
 305. LEVINE M, HOEY T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell*, 55:537-40,1988.
 306. CILLO C, CANTILE M, FAIELLA A, BONCINELLI E. Homeobox genes in normal and malignant cells. *Journal of Cellular Physiology*, 188:161-9,2001.
 307. SHAH, N. AND SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 10:361–371,2010.
 308. WELLIK, D.M. Hox genes and vertebrate axial pattern. *Current Topics in Developmental Biology*, 88:257-278,2009.
 309. HUANG, L., PU, Y., HEPPS, D., DANIELPOUR, D, PRINS, G.S. Posterior Hox gene expression and differential androgen regulation in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology*, 148:1235–1245,2007.
 310. SAUVAGEAU, G. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 91:12223–12227,1994
 311. TAYLOR, H.S., IGARASHI, P., OLIVE, D.L, ARICI, A. Sex steroids mediate HOXA11 expression in the human peri-implantation endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84:1129–1135,1999.

312. RAMAN V, MARTENSEN SA, REISMAN D, EVRON E, ODENWALD WF, JAFFEE E. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, 405:974,2000.
313. FRIEDMANN Y, DANIEL CA, STRICKLAND P, DANIEL CW. Hox genes in normal and neoplastic mouse mammary gland. *Cancer Research*, 54:5981-5,1994.
314. CANTILE M, PETTINATO G, PROCINO A, FELICIELLO I, CINDOLO L, CILLO C: In vivo expression of the whole HOX gene network in human breast cancer. *European Journal of Cancer*, 39:257-264,2003.
315. RODRIGUEZ BA, CHENG AS, YAN PS, POTTER D, AGOSTO-PEREZ FJ, SHAPIRO CL, HUANG TH: Epigenetic repression of the estrogen-regulated Homeobox B13 gene in breast cancer. *Carcinogenesis*,29:1459-1465,2008.
316. WANG Z, DAHIYA S, PROVENCHER H, MUIR B, CARNEY E, COSER K, SHIODA T, MA XJ, SGROI DC: The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 13:6327-6334,2007.
317. SHAH N., JIN K., CRUZ LA., PARK S. HOXB13 mediates tamoxifen resistance and invasiveness in human breast cancer by suppressing ER α and inducing IL-6 expression. *Cancer Research*, 73(17):5449-58,2013.
318. MIAO J. HOXB13 promotes ovarian cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104:17093–17098,2007.
319. ABUL K.ABBAS, ANDREW H. LICHTMAN. *Cellular and Molecular Immunology*, 5th. Ed. Saunders, 243-275,2003.
320. HANNUM CH, WILCOX CJ, AREND WP, JOSLIN FG. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature*, 343(6256):336-340,1990.
321. NORORIHA IL, NIEMIR Z. STEIN H, WALDHER R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 10:775-786,1995.
322. OPPENHEIM JJ, RUSCETTI FW, FALTYNEK C. Cytokines. Editors : STITES DP, TERR AI. *Basic and Clinical Immunology*, 105-123,1994.
323. DRANOFF G: Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4:11-22, 2004.
324. BEN-BARUCH A: Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Research*, 5:31-36, 2003.
325. RAO VS, DYER CE, JAMEEL JK, DREW PJ, GREENMAN J. Potential prognostic and therapeutic roles for cytokines in breast cancer (Review). *Oncology Reports*, 15(1):179-85,2006.
326. GOLDBERG JE, SCHWERTFEGER KL. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. *Current Drug Targets*, 11(9):1133-46,2010.
327. ARDUINO S, TESSAROLO M, BELLINO R. Reduced IL-2 level concentration in patients with breast cancer as a possible risk factor for relapse. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 17:535-537, 1996.
328. BACHELOT T, RAY-COQUARD I, MENETRIER-CAUX C, RASTKHA M, DUC A AND BLAY JY: Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, 88:1721-1726, 2003.
329. GUO Y, XU F, LU T, DUAN Z, ZHANG Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 38(7):904-10,2012.

330. FUJIYAMA Y: Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52:65-70,2003.
331. TZARTOS JS, FRIESE MA, CRANER MJ, PALACE J, NEWCOMBE J, ESIRI MM, FUGGER L: Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *American Journal of Pathology*, 172:146-155,2008.
332. CHABAUD M, GARNERO P, DAYER JM, GUERNE PA, FOSSIEZ F, MIOSSEC P: Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 12:1092-1099,2000.
333. CHEN WC, LAI YH, CHEN HY. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology*, 63(2):225-33,2013.
334. ZHU X, MULCAHY LA, MOHAMMED RA. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research*, 10(6):R95,2008.
335. HUANG CK, YANG CY, JENG YM. Autocrine/paracrine mechanism of interleukin-17B receptor promotes breast tumorigenesis through NF- κ B-mediated antiapoptotic pathway. *Oncogene*, 2013.
336. MA XJ, HILSENBECK SG, WANG W. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(28):4611-9,2006.
337. MA XJ, SALUNGA R, DAHIYA S, WANG W, A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(9):2601-8,2008.
338. JANSEN MP, SIEUWERTS AM, LOOK MP, RITSTIER K. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *Journal of Clinical Oncology*, 25(6):662-8,2007.
339. GOETZ MP, SUMAN VJ, INGLE JN. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clinical Cancer Research*, 12(7 Pt 1):2080-7,2006.
340. STOFF-KHALILI MA, DALL P, CURIEL DT. Gene therapy for carcinoma of the breast. *Cancer Gene Therapy*, 13(7):633-47,2006.
341. GROSSHANS H, FILIPOWICZ W. The expanding world of small RNAs. *Nature*, 451: 414-416, 2006.
342. KWAK PB, IWASAKI S, TOMARI Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Science*, 101: 2309-2315, 2010.
343. LEE Y, AHN C, HAN J, CHOI H, KIM J, YIM J, LEE J, PROVOST P, RÅDMARK O, KIM S, KIM VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415-419, 2003.
344. SEUX M, IOVANNA J, DAGORN JC, DUSETTI NJ. MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma: new diagnostic and therapeutic clues. *Pancreatology*, 9(1-2):66-72,2009.
345. YAKUT T, BEKAR A, DOYGUN M, ACAR H, EGELI U, OGUL E. Evaluation of relationship between chromosome 22 and p53 gene alterations and the subtype of meningiomas by the interphase-FISH technique. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 22(3):217-25, 2002.

346. PONGSAVEE M, YAMKAMON V, DAKENG S. The BRCA1 3'-UTR: 5711+421T/T_5711+1286T/T genotype is a possible breast and ovarian cancer risk factor. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(3):307-17,2009.
347. CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRU CD. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:2999–3004,2004.
348. RACHAGANI S, KUMAR S, BATRA SK. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Letters*, 292(1):8-16,2010.
349. CIMMINO A, CALIN GA, FABBRI M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39):13944-9,2005.
350. LU J, GETZG, MISKA EA. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435:834–838,2005.
351. PANG JC, KWOK WK, CHEN Z. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *Acta Neuropathologica*, 117:599-611,2009.
352. ZHANG L, HUANG J, YANG N, GRESHOCK J, MEGRAW MS, GIANNAKAKIS A, LIANG S, NAYLOR TL, BARCHETTI A, WARD MR, YAO G, MEDINA A, O'BRIEN-JENKINS A, KATSAROS D, HATZIGEORGIOU A, GIMOTTY PA, WEBER BL, COUKOS G. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 9136-9141, 2006.
353. IORIO MV, FERRACIN M, LIU CG, VERONESE A, SPIZZO R, SABBIONI S, MAGRI E, PEDRIALI M, FABBRI M, CAMPIGLIO M, MÉNARD S, PALAZZO JP, ROSENBERG A, MUSIANI P, VOLINIA S, NENCI I, CALIN GA, QUERZOLI P, NEGRINI M, CROCE CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65:7065-7070, 2005.
354. IORIO MV, CROCE CM. MicroRNAs in cancer: Small molecules with a huge impact. *Journal of Clinical Oncology*, 27:5848-5856, 2009.
355. KONG W, HE L, COPPOLA M, GUO J, ESPOSITO NN, COPPOLA D, CHENG JQ. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 17869-17879, 2010.
356. KIM SJ, OH JS, SHIN JY. Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 155(3):427-34,2011.
357. HENEGHAN HM, MILLER N, LOWERY AJ, SWEENEY KJ, KERIN MJ. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *Journal of Oncology*, 2009.
358. HONGJIANG WANG, GUANG TAN, LEI DONG, LEI CHENG, KEJUN LI, ZHONGYU WANG, HAIFENG LUO. Circulating MiR-125b as a Marker Predicting Chemoresistance in Breast Cancer. *Public Library of Science One*, 7(4):e34210,2012.
359. ZHOU M, LIU Z, ZHAO Y, DING Y, LIU H, XI Y, XIONG W, LI G, LU J, FODSTAD O, RIKER AI, TAN M. microRNA-125b Confers The Resistance Of Breast Cancer Cells To Paclitaxel Through Suppression Of Pro-Apoptotic Bcl-2 Antagonist Killer 1 (Bak 1) Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 285:21496-21507,2010.
360. LIANG Z, WU H, XIA J, LI Y, ZHANG Y, HUANG K, WAGAR N, YOON Y, CHO HT, SCALA S, SHIM H. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of

- breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochemical Pharmacology*, 79(6):817-24,2010.
361. RODRIGUEZ-GONZÁLEZ FG, SIEUWERTS AM, SMID M, LOOK MP, MEIJER-VAN GELDER ME, DE WEERD V, SLEIJFER S, MARTENS JW, FOEKENS JA. MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127:43-51,2010.
 362. MILLER TE, GHOSHAL K, RAMASWAMY B, ROY S, DATTA J, SHAPIRO CL, JACOB S, MAJUMDER S. MicroRNA-221/222 Confers Tamoxifen Resistance in Breast Cancer by Targeting p27Kip1. *The Journal of Biological Chemistry*, 283:29897-29903,2008.
 363. ZHAO JJ, LIN J, YANG H, KONG W, HE L, MA X, COPPOLA D, CHENG JQ. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 31079-31086, 2008.
 364. TAVAZOIE SF, ALARCON C, OSKARSSON T, PADUA D, WANG Q, BOS PD, GERALD WL, MASSAGUE J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 451: 147-152, 2008.
 365. CLAUDINE L, BARTEL S, TSONGALIS GJ. MicroRNAs:Novel Biomarkers for Human Cancer. *Clinical Chemistry*, 55:4623–631,2009.
 366. VETTER G, SAUMET A, MOES M. miR-661 expression in SNAI1-induced epithelial to mesenchymal transition contributes to breast cancer cell invasion by targeting Nectin-1 and StarD10 messengers. *Oncogene*, 29(31):4436-48,2010.
 367. REDDY SD, PAKALA SB, OHSHIRO K., RAYALA SK, KUMAR, R. MicroRNA-661, a c/EBPalpha target, inhibits metastatic tumor antigen 1 and regulates its functions. *Cancer Research*, 69(14):5639-5642,2009.
 368. SAND M, SKRYGAN M, SAND D. Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi. *Cell and Tissue Research*, 351(1):85-98, 2013.
 369. ICHIHARA A, JINNIN M, OYAMA R. Increased serum levels of miR-1266 in patients with psoriasis vulgaris. *European Journal of Dermatology*, 22(1):68-71,2012.
 370. VAN'T VEER LJ, PAIK S, HAYES DF. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. *Journal of Clinical Oncology*, 23(8):1631-5,2005.
 371. SHERRY XY, SETH MS, DAT NG, THOMAS WU, ZORAMODRUSAN SANDRAM, S WAIN. Gene Expression Profile and Angiogenic Markers Correlate with Response to Neoadjuvant Bevacizumab Followed by Bevacizumab plus Chemotherapy in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 5893,2008.
 372. MELLO-GRAND M, SINGH V, GHIMENTI C, SCATOLINI M, REGOLO L, GROSSO E, ZAMBELLI A, DA PRADA GA, VILLANI L, FREGONI V, BAIARDI P, MARSONI S, MILLER WR, COSTA A, CHIORINO G. Gene expression profiling and prediction of response to hormonal neoadjuvant treatment with anastrozole in surgically resectable breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2010.
 373. MARCHIONNI L, WILSON RF, MARINOPOULOS SS, WOLFF AC. Impact of Gene Expression Profiling Tests on Breast Cancer Outcomes. Evidence Report/Technology Assessment (Full Report), (160):1-105,2007.
 374. LOI S, PICCART M, SOTIRIOU C. The use of gene-expression profiling to better understand the clinical heterogeneity of estrogen receptor positive breast cancers and tamoxifen response. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 61(3):187-94,2007.

375. NICOLINI A, CARPI A, TARRO G. Biomolecular markers of breast cancer. *Frontiers in Bioscience*, 11:1818-43,2006.
376. WEIGELT B, GLAS AM, WESSELS LF, WITTEVEEN AT, PETERSE JL, VAN'T VEER LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 100(26):15901-5,2003.
377. JEREVALL PL, MA XJ, LI H, SALUNGA R. Prognostic utility of HOXB13 : IL17BR and molecular grade index in early-stage breast cancer patients from the Stockholm trial. *British Journal of Cancer*, 104:1762 – 1769,2011.

7. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilimsel ve manevi desteğini gördüğüm; bilgisi, karakteri ve yardımseverliği ile bana çok şey öğrettiğine inandığım, eğitime ve bilime önem veren, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemi sağlayan her zaman sevgi ve saygı ile anacağım çok değerli hocam, danışmanım ve aynı zamanda Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ünal EGELİ' ye, eğitimime katkı sağlayan, karşılaştığım her türlü sorunda benden, hoşgörü ve sabrını esirgemeyerek bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran, yakın ilgisini her zaman gördüğüm ve bana çok şey öğrettiğine inandığım değerli hocam Doç Dr. Gülşah ÇEÇENER' e, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, emek, hoşgörü ve sabrını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya ve ayrıca Uludağ Üniversitesi'nde öğrencilik yaşamım boyunca bana emeği geçen değerli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda emeği geçen, her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri çok değerli hocalarım Prof. Dr. Şehsuvar GÖKGÖZ ve Prof. Dr. İsmet TAŞDELEN' e teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan her zaman onur duyduğum, zorluklara birlikte göğüs gerdiğimiz, birçok sıkıntılı andan hoşluklar yaratmaya çalıştığımız; destek ve dostluklarını her zaman minnetle anacağım çok değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Grv. Gülçin TEZCAN' a, uzman biyolog Görkem UMUT'a, doktora öğrencisi Seçil AK'a ve ayrıca desteklerini hissettiğim tüm arkadaşlarıma, tezimin kaynaklar kısmında yer alan tüm araştırmacı ve yazarlara teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca birbirimize karşı saygı, sevgi ve yardımlarımızı hiçbir zaman esirgemediğimiz, bana verdikleri destek ve dostluklarını minnetle anacağım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nın tüm personeline, Sağlık Bilimleri Enstitüsü sekreteri Lütfullah FIÇICI' ya, öğrenci işleri şefi Emine ÖZGÜRGEN' e ve tüm personele teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde destekçilerim olan, beni yetiştirip maddi ve manevi her sıkıntıda yardımına yetişen, hayatımın bugününü onlara borçlu olduğum sevgili aileme, sonsuz teşekkür ederim.

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılı Bursa doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Altıparmak Fethi Açıncıcek İlköğretim Okulu' nda tamamladım. Bursa Anadolu Kız Lisesi' nden 2005 yılında mezun oldum. 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Fen/Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne girdim ve 2010 yılında mezun oldum. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimime başladım. Eğitimime halen devam etmekteyim.