



**MEME KANSERLİ TÜRK KADIN HASTALARDA KODON 12 VE KODON
61 BÖLGELERİNDEKİ H-RAS, K-RAS GEN MUTASYONLARININ
BELİRLENMESİ**

Mehmet Tuğhan KIZILTUĞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2016

Mehmet Tuğhan KIZILTUĞ tarafından hazırlanan “Meme Kanseri Türk Kadın Hastalarda Kodon 12 ve Kodon 61 Bölgelerindeki H-Ras, K-Ras Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüritarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan : Prof. Dr. Nursel GÜL

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye : Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma

Tarihi: 12/01/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

Mehmet Tuğhan KIZILTUĞ

(12.01.2016)

MEME KANSERLİ TÜRK KADIN HASTALARDA KODON 12 VE KODON 61
BÖLGELERİNDEKİ H-RAS, K-RAS GEN MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Mehmet Tuğhan KIZILTUĞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2016

ÖZET

Meme kanseri, kanser nedeniyle oluşan ölümler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Heterojen bir hastalık olan meme kanseri, hücre büyümesi ve gelişimini sağlayan önemli hücre yolaklarını etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir süreç sonucu ortaya çıkar. Çalışmamızda, meme kanserli Türk kadın hastalarda, birçok tümör gelişimine neden olan Ras proto-onkogenine ait genlerden H-ras kodon 12 ve 61, K-ras kodon 12 bölgesindeki gen değişimlerinin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan kan materyalleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji ve Patoloji Anabilim Dalı'nda meme kanseri tanısı konmuş 100 hasta ve 100 sağlıklı bireylerden elde edilmiştir. Elde edilen kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak H-ras kodon 12 ve 61, K-ras kodon 12'deki nokta mutasyonları, PCR-RFLP yöntemi kullanılarak araştırıldı. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, IBM SPSS 22.0 paket programıyla istatistiksel olarak değerlendirildi. K-ras kodon 12, H-ras kodon 12 ve 61'de herhangi bir mutasyon tespit edilemediğinden istatistiksel olarak "p" değeri bulunamadı. Sonuç olarak, diğer toplumlarda meme kanserli bireylere ait ras gen profilleri belirlenmiş olmasına karşın, Türk toplumunda daha önceden böyle bir çalışmanın olmaması nedeniyle literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 203.1.104
Anahtar : Meme kanseri, H-ras, K-ras, kodon 12, kodon 61, PCR-
Kelimeler RFLP.
Sayfa Adedi : 70
Danışman : Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

DETERMINATION OF H-RAS, K-RAS GENE MUTATIONS IN CODON 12 AND
CODON 61 IN TURKISH FEMALE PATIENTS WITH BREAST CANCER

(M. Sc. Thesis)

Mehmet Tuğhan KIZILTUĞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2016

ABSTRACT

Breast cancer is second among deaths due to cancer after lung cancer. The breast cancer that is a heterogenic disease arise from a multiple process which is associated with genetic alterations affecting important cell pathways providing cell growth and development. In the present study, we aim to determine gene alterations in codon 12 and 61 of H-ras gene and codon 12 of K-ras gene among genes related Ras proto-oncogenes which lead to development of several tumors in Turkish female patients with breast cancer. Blood materials obtained from 100 healthy and 100 patients diagnosed with breast cancer in this study are provided by the department of Radiology and the department of Pathology, Faculty of Medicine in Ankara University. As processing DNA isolation from the blood samples, the point mutations in codon 12 and 61 of H-ras gene and codon 12 of K-ras gene are researched by PCR-RFLP methods. The datas obtained from this study are statistically evaluated by IBM SPSS 22.0 software. p-value is statistically not found because of no mutation in codon 12 and 61 of H-ras gene and codon 12 of K-ras gene. Consequently, although ras gene profiles regarding patients with breast cancer in several population are determined, it is thought that this study will contribute to literature because of previously no relevant studies in Turkish population.

Science Code : 203.1.104

Key Words : Breast cancer, H-ras, K-ras, codon 12, codon 61, PCR-RFLP

Page Number : 70

Supervisor : Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezim için gerekli materyallerin toplanması aşamasında bana yardımcı olan, bilgileriyle bana yol gösteren Sn. Dr. Ayşe YILMAZ'a ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'ndan Sn. Dr. Ebru DÜŞÜNCELİ ATMAN'a, Sn. Dr. Evren ÜSTÜNER'e ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Koray CEYHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yöntem bölümünün oluşturulmasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, benden yardımlarını esirgemeyen, deneyimin gerçekleşmesi için laboratuvarını bana açan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, değerli hocam Sn. Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim için toplanan materyallerin saklanmasında, laboratuvar kullanımına izin vererek desteğini benden esirgemeyen, AÜTF İmmunoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Türker DUMAN'a ve değerli Biyolog Mine Abla'ya ve AÜFEF Biyoloji Bölümü öğrencisi Bürge ŞİRİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin deney aşamasında karşılaştığım tüm zorluklarda benim yanımda olan, bir abla sıcaklığıyla yaklaşan, bilgisini ve yardımını benden esirgemeyen, her zaman yanımda olduğuna inandığım, MEÜTF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan, değerli dostum Arş. Gör. Nisa UYAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca maddi ve manevi olarak her türlü desteği vererek beni buralara kadar getiren anneme, babama ve ablama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, her ne kadar hayatta olmasalar da lisans ve yüksek lisans eğitimimde büyük ekonomik yardımlarını gördüğüm dedem Mehmet SÖNMEZ ve anneannem Zekiye SÖNMEZ'e sonsuz rahmet dilerim.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimimde, maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, çok yönlü eğitimleriyle bilgilerimi artıran Türk Eğitim Vakfı'na (TEV), özellikle yabancı dil eğitimim konusunda en büyük yardımı gösteren TEV Ankara temsilcisi Sn. Ömer TURNA'ya ve Sn. Ebru SEKİZKÖK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Meme Kanseri	5
2.1.1. Epidemiyoloji	5
2.1.2. Etiyoloji.....	6
2.2. Meme Tümörlerinin Patolojik Özellikleri	14
2.2.1. Benign epitelyal tümörler.....	14
2.2.2. Malign epitelyal tümörler	15
2.3. Meme Kanserinde Hormonal ve Büyüme Faktörü Reseptörleri.....	19
2.4. Meme Kanserinin Moleküler Genetiği	20
2.4.1. Onkogenler	20
2.4.2. Tümör baskılayıcı genler.....	21
2.4.3. Metastaz baskılayıcı genler.....	24
2.4.4. Hücre Sağkalım ve Hücre Ölüm Yolakları.....	24
2.5. Hücre Sinyal İletimi ve Kanser	25
2.5.1. Ras geni.....	26

2.5.2. Ras protein yapısı ve işlevi	29
2.5.3. Ras mutasyonlarının onkogenezdeki rolü	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Denek Grubu.....	39
3.2. Yöntem	40
3.2.1. DNA izolasyonu.....	40
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile H-ras ve K-ras genindeki mutasyonların analizi	41
3.2.3. Ras genlerinin değişiminde kullanılan PZR koşulları.....	42
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi.....	44
3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PZR/RFLP) analizi	44
3.3. Araştırma Bulguları	45
3.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu bulguları.....	45
3.3.2. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) sonuçları	46
3.3.3. İstatistiksel analiz	50
4. TARTIŞMA.....	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Yıllara göre meme kanserli kadınlardaki tahmini rakamlar.....	6
Çizelge 2.2. Yaşa bağlı olarak gelişen meme kanserli kadınların risk tahmini	7
Çizelge 2.3. Meme tümörlerinin sınıflandırılması.....	16
Çizelge 3.1. Deney materyal sayısı	39
Çizelge 3.2. Deneyde kullanılan meme kanserli bireylerin histopatolojik sınıflandırılması	39
Çizelge 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	42
Çizelge 3.4. Ras genlerinin primer dizileri	42
Çizelge 3.5. PZR sonrası elde edilen oligonükleotidlerin gen ürün büyüklüğü ve dizileri.....	43
Çizelge 3.6. Ras genleri ve restriksiyon enzimleri	44
Çizelge 3.7. H-ras kodon 12 ve kodon 61 ile K-ras kodon 12'nin PCR-RFLP Ürünleri.....	50
Çizelge 3.8. H-ras kodon 12 ve 61 ile K-ras kodon 12 ki-kare testi sonuçları ...	51

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Memenin fonksiyonel komponentleri.....	5
Şekil 2.2. Emzirme hikayesi ve doğum sayısına göre doğum yapmış kadınlarda meme kanserinin göreceli riski.....	9
Şekil 2.3. Emzirme hayatı süresince ilişkili olan doğum yapmış kadınlarda meme kanserinin göreceli riski	10
Şekil 2.4. Fibroadenom.....	15
Şekil 2.5. Duktal karsinoma in situ ve invaziv duktal karsinoma	17
Şekil 2.6. Lobüler karsinoma in situ	18
Şekil 2.7. H-ras geninin sitogenetik lokasyonu	27
Şekil 2.8. K-ras geninin sitogenetik lokasyonu	27
Şekil 2.9. Ras genlerinin dört izoformu	28
Şekil 2.10. Ras proteinin üç boyutlu yapısı. Kırmızı ve yeşil renkte gösterilen nükleotid-duyarlı şalter I ve şalter II bölgeleri.....	29
Şekil 2.11. Ras post-translasyonel işlemi ve membran bağlantısı.....	30
Şekil 2.12. Reseptör tirozin kinazlara ligand bağlanmasını takiben Ras'ın aktivasyonu.....	31
Şekil 2.13. Ras ailesi G-proteinlerin işlevsel döngüleri	32
Şekil 2.14. Ras efektör yolları	33
Şekil 2.15. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolağı	34
Şekil 2.16. PI3K/PTEN/Akt/mTOR sinyal yolağı	36
Şekil 2.17. İnsan kanserlerinde görülen G12V ve Q61L mutasyonları GAP-uyarımli intrinzik GTP hidrolizini bozmaktadır	38
Şekil 3.1. H-ras kodon 12 (125 bç) genine ait bölgenin PZR ürünün %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü.....	45
Şekil 3.2. H-ras kodon 61 (135 bç) genine ait bölgenin PZR ürünün %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü.....	46

Şekil	Sayfa
Şekil 3.3. K-ras kodon 12 (101 bç) genine ait bölgenin PZR ürünün %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 3.4. H-ras kodon 12 bölgesinin NaeI restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü (a).....	47
Şekil 3.5. H-ras kodon 12 bölgesinin NaeI restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü (b).....	47
Şekil 3.6. H-ras kodon 61 bölgesinin EaeI restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü.	48
Şekil 3.7. K-ras kodon 12 bölgesinin MspI restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
dk	Dakika
sn	Saniye
rpm	Revolutions per minute
g	Gram
°C	Santigrat Derece
U	Unit
M	Molar
mM	Milimolar
pmol	Pikomol
bç	Baz Çifti
kb	Kilobaz
V	Volt

Kısaltmalar

Açıklamalar

AF-6	Afadin-6
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bad	Bcl-2-ilişkili ölüm promotör
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRCA1	Breast cancer 1
BRCA2	Breast cancer 2
CDH1	Cadherin-1
DAG	Diaçilgliserol

Kısaltmalar**Açıklamalar**

DCIS	Duktal karsinoma in situ
ddH₂O	Double-distile edilmiş su
dNTP	Deoksribonükleotit trifosfatlar
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ER	Östrojen reseptör
ERK	Ekstrasellüler sinyal-regüle edici kinaz
FDP	Farnesil difosfat
FFPE	Formalinde Fikse Edilmiş Parafine Gömülü
FKHR	Forkhead transcription factor
FTaz	Farnesiltransferaz
GAP	GTPaz aktive edici proteinler
GDP	Guanozin difosfat
GEF	Guanin değiş-tokuş faktörü
GGDP	Geranil-geranildifosfat
GGTaz	Geranil-geraniltransferaz tip-I
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3β	Glikojen sentaz kinaz 3
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
HER2/neu	İnsan epidermal büyüme faktörü 2
H-ras	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IARC	International Agency for Research on Cancer
Ik-K	İnhibitör kappa B protein kinaz
K-ras	Kirsten rat sarcoma oncogene homolog
LCIS	Lobüler Karsinoma İn Situ
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MgCl₂	Magnezyum klorür
MMAC1	Mutated in multiple advanced cancers 1
MST	Mammalian STE20-like protein kinase
Myc	Myelocytomatosis oncogene

Kısaltmalar**Açıklamalar**

NaCl	Sodyum Klorür
Na₂EDTA	Disodyum Etilendiamin tetraasetik asit
NF-κB	Nüklear faktör kappa B
Nm23/NME	Nucleoside Diphosphate Kinase
N-ras	Neuroblastoma rat sarcoma oncogene homolog
PDK	Fosfatidilinozitol-bağımlı kinazlar
PI3-K	Fosfoinositid 3-kinaz
PIP2	Fosfatidilinozitol 4,5 fosfat
PIP3	Fosfatidilinozitol 3,4,5 fosfat
PKC	Protein kinaz C
PLCε	Fosfolipaz Cε
PR	Progesteron resptör
PTaz	Palmitoiltransferaz
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RASSF	Ras association domain family
Rb1	Retinoblastoma-1 geni
Rce-1	Ras-dönüştürücü enzim 1
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RIN1	Ras inhibitor 1
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH2	Src Homology 2
SH3	Src Homology 3
Shc	Src homology 2 domain containing
SHIP	SH2 domain-containing inositol phosphatase
Sos	Son of sevenless
TBE	Tris-base, Borik asit, EDTA
TEP1	TGFβ-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1

Kisaltmalar**TERC****TERT****WHO****Açıklamalar**

Telomeraz RNA

Telomeraz ters transkriptaz

World Health Organization



1. GİRİŞ

Global bir problem olan meme kanseri, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır. 1975 yılında her 11 kadından biri meme kanseri tanısı alırken, bugün bu sayı her 8 kadından 1'e düşmektedir [1]. İnsidansı değişik bölgelerde yaşa, cinsiyete, ırka, aile öyküsüne ve sosyo-kültürel yapıya göre değişmektedir [2-5].

Meme kanser gelişimi, çeşitli onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin değişimiyle meydana gelen çok basamaklı bir süreci kapsar [6]. Onkogenler, hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma, sinyal iletimi, apoptoz gibi birçok hücrel mekanizmada işlev gören proto-onkogenlerin mutasyona uğramış formlarıdır [7-9].

Tüm insan tümörlerinin %30 kadarında ras genlerinde aktivasyona yol açan mutasyonlar, insan tümörlerinde en sık görülen onkogen anomalisidir [7, 8, 10]. Bir proto-onkogen olan ras geni, hücre membranının iç yüzeyine lokalize olmuş, GTPaz (Guanozin trifosfataz) aktivitesine sahip 21.000 Dalton (p21) ağırlığında olan hücrel büyüme kontrolünden sorumlu ras proteinini kodlar [7, 11, 12]. Bu protein, GAP'ler (GTPaz aktive edici proteinler) tarafından GTP (Guanozin trifosfat) bağlandığında "açılır (aktif)" ve GDP'ye (Guanozin difosfat) hidroliz edildiğinde ise "kapanır (inaktif)" [7, 13]. Hücre dışından gelen bir sinyalle ras proteini aktifleşerek, hücre içerisinde fosforillenme şelalesinin başlamasına neden olur ve böylece plazma membranından nukleusa sinyal iletilir [7, 14]. Bu sinyal sayesinde çeşitli hücrel olaylar düzenlenir. İnsan tümörlerinde sıklıkla bulunan H-ras (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, K-ras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) ya da N-ras (neuroblastoma rat sarcoma oncogene homolog) onkogenik mutasyonları bu sinyal yolağının normal akıbetini bozmasıyla bilinirler, böylece tümör gelişimine sebep olurlar [10]. Bazı mutasyonlar GTP hidrolizini engelleyerek anormal Ras-GTP formlarının hücre içerisinde birikmesine yol açarak kontrol dışı hücre proliferasyonuna ve tümörleşmeye neden olurlar. Amino asid değişikliğine neden olan bu somatik mutasyonlar, sıklıkla ras proteininin 12, 13 ve 61'inci amino asidlerinde değişikliğe yol açarlar [7].

Ras gen mutasyonlarının insan meme kanserlerinde nadir olarak görüldüğü rapor edilmiştir [6]. Ras genin mutant formları çoğunlukla meme kanseriyle ilişkili olmamasına karşın (<%5), hiperaktif ras proteininin meme kanser büyümesi ve gelişimini teşvik edebildiğine dair deneysel kanıtlar dikkate değerdir [15]. Yapılan literatür taramalarına göre, Kaliforniya'da yapılan bir çalışmada, 40'ı invaziv primer meme tümörü, 7'si lenf nod ve deri metastazlı, 9'u metastatik efüzyon ve 5'i kurulmuş meme kanser hücre hattı örneklerinden K-ras, H-ras ve N-ras kodon 12, 13 ve 61 bölge mutasyonları araştırılmıştır. Sonuçta, 40 primer tümörden birinde K-ras kodon 13 mutasyonu, 9 metastatik efüzyondan birinde K-ras kodon 12 mutasyonu ve 5 hücre hattından ikisinde K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonu saptanmıştır. Bu çerçevede, ras gen mutasyonlarının insan meme kanserinin inisiyasyon ya da metastatik progresyonunda nadir olarak ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır [16]. Yunanistan'da yapılan çalışmada da, parafin-gömülü 65 primer meme karsinomlu doku parçası örneklerinden yaptığı K-ras ve H-ras kodon 12 mutasyon çalışmasında, 65 tümör örneğinden 8'inin (%12,3) K-ras kodon 12 mutasyonu taşıdığını ancak H-ras mutasyonu taşımadığını bulmuştur. Sonuçta, K-ras mutasyonunun meme tümör gelişmesiyle düşük yüzdeli de olsa ilişkili olabileceği varsayılmıştır [17]. Yine Yunanistan'da yapılan başka bir çalışmada ise, 61 insan sporadik meme kanser tümör örneğinde K-ras kodon 12 mutasyonu analiz edilmiştir. 61 tümör örneğinden 4'ünde (%6,5) K-ras kodon 12 mutasyonu saptanmıştır. Çalışma sonucunda, K-ras kodon 12 nokta mutasyonu ve klinikopatolojik parametreler arasında bir korelasyon olamayacağı fikri öne sürülmüştür [6]. Amerika'da yapılan çalışmada da, insan meme epitelyal hücrelerinin radyasyon-uyarımlı neoplastik transformasyon süresince H-ras kodon 12 ve kodon 61 mutasyonları araştırılmış ve kontrol hücre hattıyla karşılaştırıldığında aynı dozlarda uyarılmış hücre hatlarında H-ras kodon 12 ve kodon 61'de çeşitli tiplerde nokta mutasyonlarının varlığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, radyasyon-uyarımı ile H-ras genindeki tek nokta mutasyonların anormal ekspresyonlara neden olarak neoplastik sürecin ve insan meme malignensilerinin gelişimine katkı sağladığı sonucuna varılmıştır [18]. Hollanda'da yapılan araştırmada ise, 40 insan meme kanser hücre hatlarında, tümör formasyonunda önemli olan PTEN, PIK3CA, KRAS, HRAS, NRAS ve BRAF gen mutasyonları araştırılmış ve 40 hücre hattından 7'sinde (%18) sekiz etkili RAS gen mutasyonları saptanmıştır. Bu hücre hatlarından beşinde farklı KRAS (G12C, G12D, G12R,

G12V ve G13D), ikisinde HRAS G12D ve birinde NRAS Q61R mutasyonu bulunmuştur [19]. İspanya'da yapılan bir başka çalışmada, 35 FFPE triple-negatif meme tümörlerinde EGFR ve KRAS Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Ser, Gly12Val ve Gly13Asp mutasyonal durumları analiz edilmiştir ve analiz edilen tümörlerin tümünde KRAS onkojenik mutasyona rastlanılmamıştır [20]. Çin'de yapılan başka bir çalışmada ise, meme kanserli Çin'li kadın hastalardan 143 FFPE tümörü toplanmış ve EGFR, KRAS gen mutasyonları araştırılmıştır. Sonuçta, 143 hastadan 1'inde (%0,7) KRAS Gly12Asp mutasyonu tespit edilmiştir [21]. Yine Çin'de yapılan bir çalışmada, 120 meme kanserli hasta üzerinde yaptıkları çalışmada 120 vakadan tümör örnekleri toplanmıştır. PIK3CA, AKT1, BRAF, EGFR, HRAS ve KRAS genlerinden 22 mutasyon türünün çalışılması hedeflenmiştir. Deney sonucu 120 örnekten 3 (%2,5) invaziv duktal meme karsinomada evre I KRAS G12C, evre II KRAS G13D ve evre III KRAS G13D mutasyonu tanımlanmıştır. HRAS geninde mutasyona rastlanılmamıştır [22]. Bununla birlikte, Almanya'daki çalışmada, 65 triple-negatif meme kanser vakasından elde edilen tümör örneklerinde, hedeflenebilir terapide prediktif marker olabileceğini düşündüğü EGFR, KRAS ve BRAF mutasyonlarını araştırmıştır. Ancak, herhangi bir mutasyona rastlamamıştır [23]. Buna karşın, Brezilya'da yapılan araştırmada, neoadjuvan kemoterapi tedavisi geçirmiş meme kanserli hasta kadınlarda hormon reseptör ekspresyonu, HER2 ve MYC genleri ile protein durumları ve KRAS kodon 12 mutasyonları değerlendirilerek, meme kanseri için prognostik veya prediktif marker bulabilmeyi amaçlamışlardır. 116 ileri evre invaziv duktal karsinomaya sahip kadın bireylerden tümör örnekleri toplanılmıştır. Mutasyonel analizler sonucunda, KRAS mutasyonu 1/49 (%2) luminal A'da, 1/5 (%20) luminal B'de, 4/23 (%17,4) HER2 aşırı eksprese edilmiş tümörlerde ve 3/39 (%7,7) triple-negatif tümörlerde tanımlanmıştır. Sonuç olarak, KRAS mutasyonunun evre 3 tümörlerde bir risk faktörü olduğu, aynı zamanda KRAS kodon 12 mutasyonlarına sahip meme tümörlerinde kötü prognoz varlığına işaret ettiği ve HER2 aşırı ekspresyonuyla ilişkili olduğu ifade edilmiştir [24]. Ayrıca, Avustralya'da Kafkas kadınlar üzerinde yapılan meme kanseri genetiği ile ilgili çalışmada, 50 bazal-benzeri ve 57 triple-negatif olmak üzere toplam 107 meme kanseri tümörlerinde, içlerinde KRAS ve NRAS'ında olduğu toplam 19 onkogende 238 hedef mutasyon araştırmışlardır. Yaptıkları araştırmaya göre, 107 hastadan

bazal-benzeri olanların birinde KRAS G12C (%0,9) diğerinde ise NRAS G13R (%0,9) olmak üzere toplam iki mutasyon bulunmuştur [25].

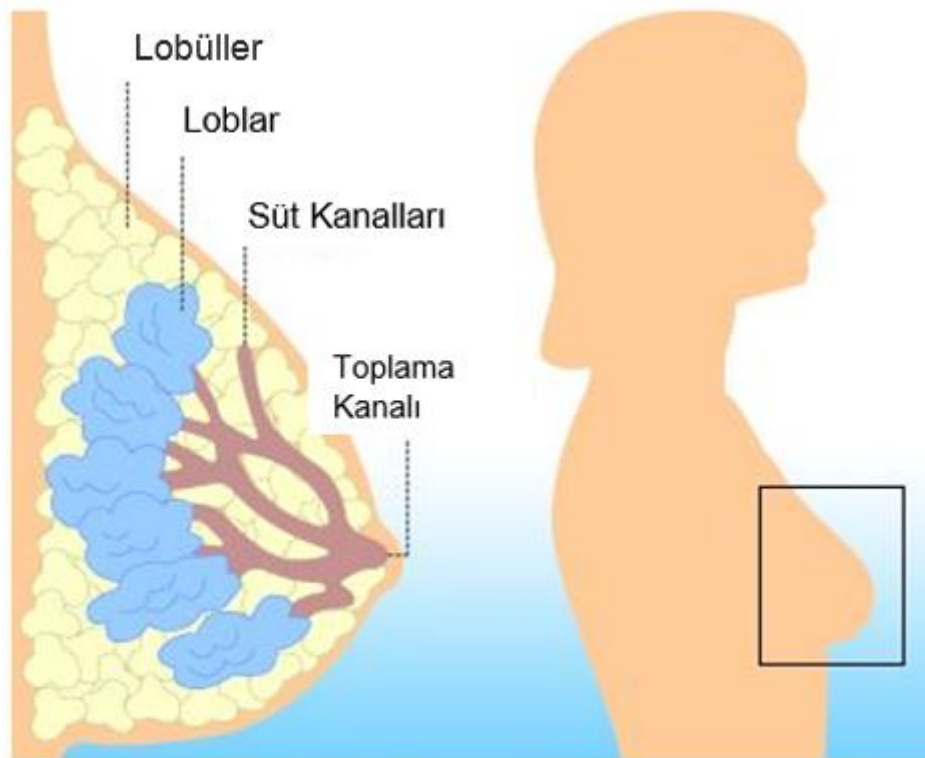
Yapılan bu çalışmalardan yola çıkarak çalışmamızda Türk populasyonunda mutant ras genlerinin, fibroadenom ve invaziv meme karsinomlarında meme kanser gelişimi açısından incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda kan materyali kullanılarak, meme kanserli hastalarda H-ras geninin kodon 12 bölgesi ve kodon 61 bölgesi ile K-ras geninin kodon 12 bölgesindeki mutasyonlar araştırılıp, sonuçlar istatistiki olarak değerlendirilerek ilgili gen değişimleri ortaya konulacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Yapısal olarak memede, salgı yapan hücreler tarafından oluşturulan lobül adı verilen birimler bulunmakta ve bu lobüllerin birleşmesiyle de oluşan loblar bulunmaktadır. Lobüller birbirlerine süt kanalları ile bağlanmakta ve bu süt kanalları da meme başına doğru gittikçe birleşmektedirler (Şekil 2.1). Meme kanseri, lobüller ya da süt kanallarındaki hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ile gelişmektedir. Lobüllerden kaynaklanan kansere lobüler karsinom, süt kanallarından meydana gelen kansere ise duktal karsinom adı verilmektedir [26].



Şekil 2.1. Memenin fonksiyonel komponentleri [27]

2.1.1. Epidemiyoloji

Bugün her 8 kadından 1'inde görülen meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen ve kanser ölüm sebeplerinden en yaygın olan (2012'de 522 000 ölüm) bir kanser tipidir [1, 2]. Amerikan Kanser Derneği'nin tahminine göre, bu

oranın yüzyılın sonunda 7 de 1 olacağı ileri sürülmektedir [28]. Dünya çapında meme kanseri görülme sıklığı her yıl ortalama %0,5 oranında artmaktadır. WHO (World Health Organization) ve IARC'ın (International Agency for Research on Cancer) ortak raporuna göre 2012 yılında dünyada 1.7 milyon kadın meme kanseri tanısı almıştır. Bununla birlikte, beş yıl öncesinde meme kanseri tanısı konmuş 6.3 milyon kadın hala yaşamını sürdürmektedir. 2008'den bu yana tahminlere göre meme kanser insidansı %20'den daha fazla, mortalitesi ise %14 artmıştır [29].

Türkiye'de ise meme kanser insidans dağılımı farklı bölgelerde coğrafik, ekonomik, sosyal, kültürel faktörlerden dolayı değişmektedir. Türkiye'nin batı bölgesindeki meme kanser insidansı (50/100.000) "Batı tarzı yaşam" dan dolayı (erken menarş, geç menapoz, ilk doğum yaşı >30, az emzirme vs) doğu bölgesine göre iki kat daha fazladır. Sağlık Bakanlığı kaynaklarının tahminlerine göre, 2007-2012 yılları arasındaki meme kanserli hastaların sayısı çizelge 2.1'de gösterilmiştir [2].

Çizelge 2.1. Yıllara göre meme kanserli kadınlardaki tahmini rakamlar [2]

Yıllar	Meme kanser vakalarının sayısı
2007	44.253
2008	45.696
2009	47.205
2010	48.809
2011	50.399
2012	51.990

2.1.2. Etiyoloji

İnsanlarda meme kanserinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Meme kanseri, çevresel ve genetik faktörler arasında güçlü bir bağın olduğu karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Son yapılan araştırmalar kadınlarda meme kanserini tetikleyen faktörlerin ne olduğunu bulmaya yöneliktir. Genetik, hormonal, sosyobiyojik ve psikolojik etkenlerin meme kanseri oluşumunda rol aldığı kabul edilmekle beraber, meme kanserli kadınların %70-80'i bu risk faktörlerine sahip değildir. Değişik ajanların mutasyonlara neden olarak kanserin ortaya çıkışı ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yeni çalışmalar en önemli belirleyici faktörün genetik olduğu yönündeki bilgileri doğrular niteliktedir [30].

Meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı halen tam olarak bilinmemesine rağmen, tüm dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görölme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmekte ve bu özelliklere de kısaca “risk faktörü” adı verilmektedir. Birçok risk faktörü ile bağlantılı olan meme kanserinin, risk faktörlerinin azalmasına ve artmasına göre, görölme sıklığı da farklılık göstermektedir. Kadınlarda meme kanseri görölme riskini artıran bu risk faktörleri řu şekilde sıralanmaktadır [26].

Cinsiyet

Sadece bir kadın olmak meme kanserinin gelişimi için en büyük risk faktörüdür. 2012 yılında Amerikan kadınlarında 190 000 kadar yeni invaziv meme kanser vakası ve 60 000 non-invaziv meme kanser vakası saptanmıştır. Erkeklerde meme kanseri gelişmesine karşın, tüm meme kanser vakalarının %1’inden daha az meydana gelmektedir. Yaklaşık olarak 2 000 meme kanser vakası 2012 yılında Amerikan erkeklerinde tanımlanmıştır [5].

Yaş

Meme kanseri için en güçlü risk faktörü (cinsiyetten sonra) yaşdır. Yaşa bağlı risk çizelge 2.2’de gösterilmiştir. Bu tahminler 2008 insidans ve ölüm verilerine dayanmaktadır [31].

Çizelge 2.2. Yaşa bağlı olarak gelişen meme kanserli kadınların risk tahmini, Birleşik Krallık, 2008 [4]

Yaş	Yakalanma Riski
29 yaş	2000’de 1
39 yaş	215’te 1
49 yaş	50’de 1
59 yaş	22’de 1
69 yaş	13’te 1
Yaşam süresi riski	8’de 1

Bir kadının meme kanserine yakalanma olasılığı yaşamı süresince artar, meme kanserlerinin çok büyük bir kısmı menopozdan sonraki yıllarda görülür. Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanserlerinin %95'i, 40 yaşın üstündeki kadınlarda görülür [28]. Örneğin, "American Cancer Society" e göre, invaziv meme kanserlerinin 8'de 1'i, 45 yaşından daha genç kadınlarda gelişmektedir. Buna karşın, invaziv meme kanserlerinin 3'te 2'si, 55 yaş ve üstü kadınlarda bulunmaktadır. Aslında, yaşlanma süreci meme kanseri için en büyük risk faktörüdür. Çünkü uzun yaşadığımızda vücudumuzda genetik hasar (mutasyonlar) için çok fazla fırsatlar doğmaktadır ve yaşa bağlı olarak, vücudumuzda genetik hasar tamirinin de yeteneği daha da azalmaktadır [5].

Irk

Beyaz kadınlarda, Afrikalı Amerikan, Hispanik ve Asyalı kadınlara göre meme kanseri biraz daha fazla gelişebilir. Ancak, Afrikan Amerikan kadınlarda genç yaşta çok daha agresif, çok daha ileri-evre meme kanseri daha fazla gelişebilir [5].

Meme kanseri riskini etkileyen üreme faktörleri

Menarş yaşı

Menarşta erken yaş meme kanserinin artmış riski ile tutarlı bir şekilde ilişki içerisindedir. Menarşta 5 yıllık gecikmenin riskteki tahmini azalışı %22'dir [32]. Gelişmiş ülkelerde ortalama menarş yaşı, 19. yüzyılın ortalarında yaklaşık 16-17 iken, bugün 12-13 yaşa düşmüştür [4]. Erken yaşam dönemlerinde iyi beslenme menarş yaşını düşürmektedir [32].

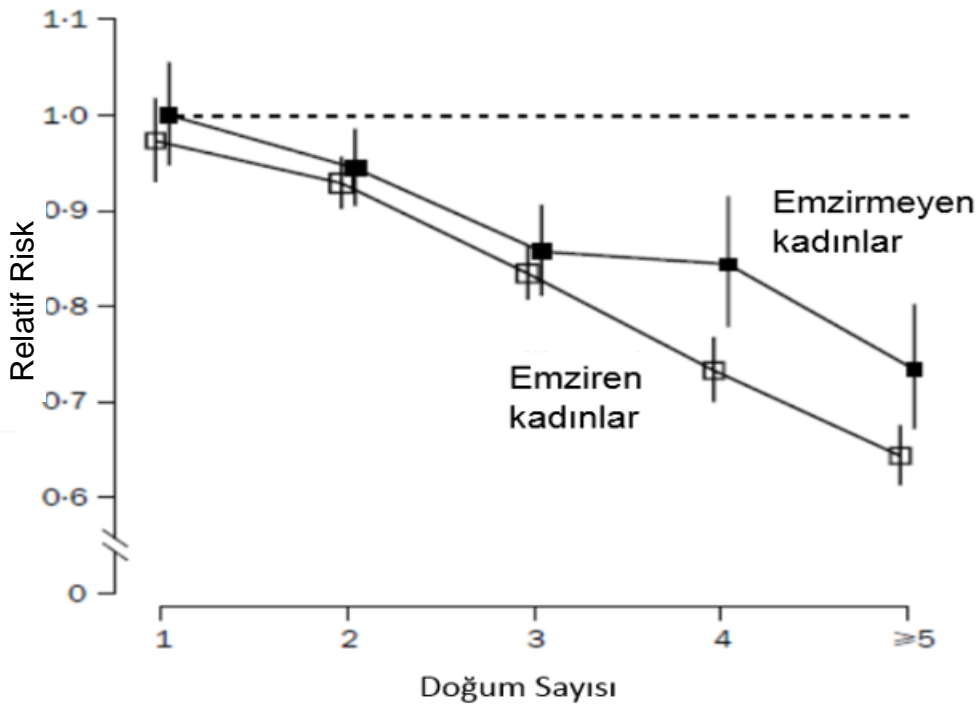
İlk doğum yaşı

Daha genç doğum yapan kadınlarda meme kanseri olma riski daha düşüktür. Gelişmekte olan meme kanserinin relatif riski, geciken her bir yıl için %3 kadar arttığı tahmin edilmektedir [33].

Doğurganlık durumu (Doğum Sayısı)

Doğum meme kanserinin riskini azaltmaktadır. Meme kanser riski tam süreli hamilelikte %7 kadar azalmaktadır ve doğum yapan kadınlar doğum yapmayanlara göre %30 daha düşük riske sahiptir [33]. İkiz doğum yapan kadınlar tek doğum yapan kadınlarla karşılaştırıldığında meme kanseri riskinde %15 azalma gösterilmiştir [34].

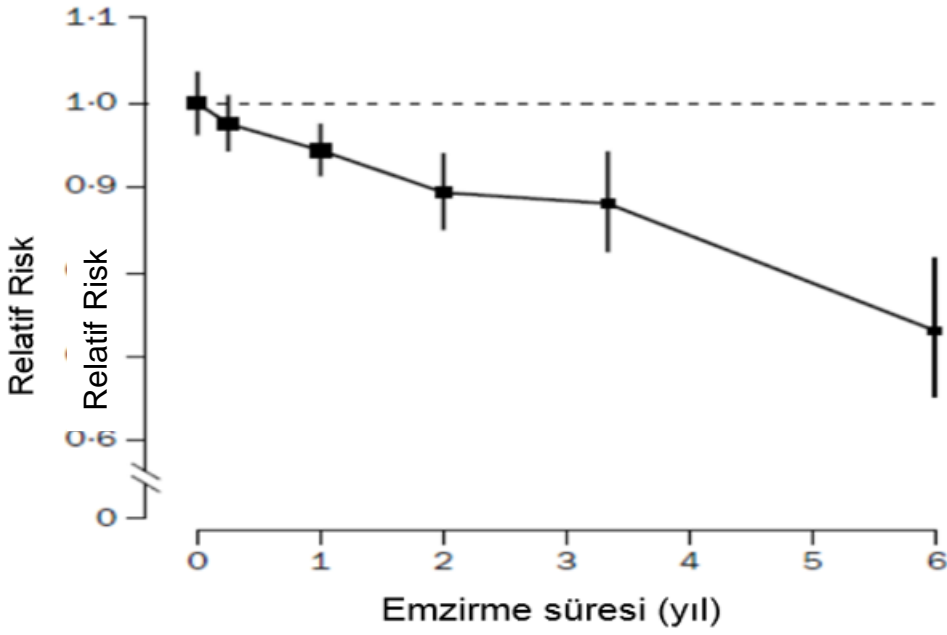
Gelişmiş ülkelerdeki kadınlar, daha az gelişmiş ülkelerdeki kadınlara göre artmış meme kanseri riskine sahiptirler. Bu varyasyonun büyük bir kısmı, gelişmiş ülkelerdeki kadınların ortalama daha az çocuk sahibi olma ve sınırlı emzirme süresi ile açıklanabilir (Şekil 2.2) [33].



Şekil 2.2. Emzirme hikayesi ve doğum sayısına göre doğum yapmış kadınlarda meme kanserinin göreceli riski [33]

Emzirme

Emziren kadınlarla emzirmeyen kadınlar karşılaştırıldığında, emzirenlerin meme kanserine yakalanma riski daha azdır. Uzun süre emziren kadının meme kanseri riski emzirmenin her 12 ayı için %4 kadar azalmaktadır (Şekil 2.3) [33].



Şekil 2.3. Emzirme hayatı süresince ilişkili olan doğum yapmış kadınlarda meme kanserinin göreceli riski [33]

Menopoz yaşı

Geç menopoz meme kanser riskini artırır. Aynı yaşta menopoz geçirmiş kadınlar, pre-menopozlu kadınlara göre daha düşük meme kanser riskine sahiptir. Menopoz yaş riski (doğal veya cerrahi ile uyarılmış), her bir yıl için yaklaşık olarak %3 kadar artar ki 45 yaşında menopoz geçirmiş bir kadın 55 yaşında menopoz geçirmiş kadınlara göre hemen hemen %30 daha yüksek riske sahiptir [35].

Meme dansitesi

Meme dansitesi, meme kanseri riski ile çok sıkı bir şekilde ilişkilidir. Meme dokusu yağ, bağ doku ve epiteliyal dokudan oluşmaktadır. Yağ dokusunun yüksek oranda bulunduğu memeler daha az yoğun olarak tanımlanır. Yüksek yoğunluklu memelere sahip kadınlar, daha az yoğun memelere sahip kadınlara göre hemen hemen 5 kat daha fazla meme kanser riskine sahiptirler. Meme dansitesi, menopozal durum, ağırlık ve çocuk sayısı ile etkilenir, buna karşın en önemli determinantın kalıtsal olduğunu gösteren bazı kanıtlar vardır [35].

Ailede Meme kanseri öyküsü

Bir kadının ailesinde meme kanseri öyküsü bulunması, kendisinde de meme kanseri gelişmesi olasılığını artırmaktadır. Aile bireyleri arasında genetik ve çevresel faktörlerin ortak oluşuna bağlıdır. Birincisi spesifik bir genetik defektin doğrudan doğruya kalıtımla geçmesi, ikincisi ise çevresel faktörlere dayalı bir eğilim olmasıdır. Genellikle meme kanserlerinin %10-15'i aile öyküsüyle ilişkilidir [28].

Daha önce meme kanseri geçirmiş olmak

Meme kanseri geçiren bir kadında, yaşamı boyunca ikinci bir meme kanseri görülme olasılığı %25-30'dan fazla değildir. İnvaziv kanser nedeniyle mastektomi yapıldıktan sonra öteki meme izlenirken, aynı memede kanser ortaya çıkma riski her yıl için %0.5-1'dir [28].

Birinci memedeki kanseri memenin tümünü eksize etmeyen bir ameliyatla çıkardıktan sonra aynı memede ikinci bir kanser gelişme olasılığı, diğer memede kanser gelişmesi olasılığı kadardır. Ancak, bu böyledir diye konservatif ameliyat yerine mastektomi tercih etmek de gerekmez, çünkü öteden beri, öteki memede kanser oluşması olasılığını düşünerek bilateral mastektomi yapılmamıştır [28].

Hormonlar

Endojen hormonların yüksek seviyelerinin meme kanseri riskini artırdığı hipotezi öne sürülmüştür. Çalışmalar, östrojen ve testosteron seviyeleri çok yüksek olan post-menopozal kadınların, düşük hormon seviyeli kadınlara göre riskinin 2-3 katı olduğunu göstermiştir [36]. Bu hormonlarla pre-menopozal meme kanseri riski arasındaki ilişki çok açık değildir. Prolaktin hormonun yüksek seviyeleri özellikle östrojen-reseptör-pozitif tümörlerde, meme kanser riskinin artışıyla ilişkilidir [4]. Hormon replasman terapisi almayan kadınlarda insülinin çok yüksek seviyeleri, post-menopozal meme kanserinin artmış riski ile ilişkilidir [37]. Çok yüksek insülin seviyeleri ve meme kanseri arasındaki bağlantı, meta-analizlerde gösterilen diabetli kadınlar için meme kanserinin risk artışı %20 olarak açıklanabilir [38].

Önceki meme hastalığı

Güçlü aile öyküsüne ve non-proliferatif meme lezyonlu kadınlar meme kanseri riskinde %60 artışa sahiptir. Ancak, aile öyküsü olmayan kadınlar için risk artışı yoktur [39]. Sellüler proliferasyon bulunan kadınlar için riskin orta şiddete (1,6 kat) artmış olduğu kabul edilmektedir. Proliferatif patternin atipik hiperplazi ile birlikte olduğu kadınlarda ise risk daha da çok artar (4,4 kat) ve eğer böyle kadında meme kanseri aile öyküsü de varsa riskin dramatik biçimde (9 kat) arttığı bildirilmiştir [38].

Düşük Vitamin-D seviyesi

Araştırmalar, vitamin-D seviyeleri düşük kadınlarda meme kanseri riskinin çok daha yüksek olduğunu göstermiştir. Vitamin-D normal meme hücre büyüme kontrolünde rol oynayabilmekte ve meme kanser hücre gelişimini durdurabilmektedir [5].

Çevresel faktörler

Diyet

Çeşitli ülkelerde insidans farklarını açıklayabilmek için birçok çevresel faktör incelenebilse de, en çok ele alınan, diyetle ilgili faktörler olmuştur. Önemli risk faktörü olarak diyet konusunda çok fazla tartışılmıştır [28]. Ülkeler arasında meme kanser oranlarındaki büyük farklılıkların gözlemlenmesi, diyetsel yağın aşırı alımının kadınlarda meme kanseri için önemli bir risk faktörü olduğu hipotezini öne sürmektedir [40]. Deneysel çalışmalarda, yağdan zengin diyetle beslenen sıçanlarda meme kanseri insidansının yüksek olduğu görülmüştür. Buna ek olarak, yine yapılan laboratuvar çalışmalarında, yağ miktarı yüksek ya da alçak olsun, alınan total kalori miktarının yüksek oluşunun insidansı artırdığını göstermiştir [28].

Çok miktarda meyve alımı meme kanser riskinde küçük bir azalmayla ilişkilidir. Meta analizler, antioksidan ve lif içerikli meyvelerin bu azalmadan sorumlu olabileceğini göstermiştir [41].

Vücut ağırlığı

Şişmanlık ile meme kanseri riskinin, yaş ve menopozal duruma göre değişen biçimde karmaşık bir ilişkisi vardır. Menopoz sonrası dönemde vücut ağırlığı arttıkça, meme kanseri riskinin de arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, puberteden ergenliğe kadar, giderek kilo alan kadınlarda, özellikle yaşamın üçüncü dekadında kilo alanlarda, meme kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir [28].

Boy uzunluğu

Meme kanseri riski ile boy uzunluğu arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Post-menopozal kadınlarda uzun boyluluktaki meme kanserinin artmış riski, boyda her 5 santimetrenin artışı hemen hemen %7'lik relatif risk artışıyla ilişkilendirilmektedir [42]. Bu sonuç milyonlarca kadın çalışmalarıyla son zamanlarda konfirme edilmiş olup, boyda her 10 santimetre artışı için meme kanserinin riskinde %17'lik bir artışın olduğunu da göstermiştir [4].

Alkol tüketimi

Meme kanseri riski ile alkol tüketimi arasında çok güçlü bir bağ vardır. Çeşitli çalışmaların sonuçlarına bakıldığında, günlük alınan alkol miktarının artışıyla relatif riskin de arttığı görülmektedir [28].

Sigara

Sigara içmenin meme kanseri riskini hem artırdığı hem de azalttığı bildirilmiştir. Azalmanın nedeni olarak sigara içenlerde serumda ve idrarda östrojen seviyelerinin azalması gösterilmiştir. Riskin arttığını gösteren çalışmalar ise, bunun sigara dumanındaki çeşitli karsinojenlerle (N-nitrozaminler, arsenik, benzen, heterosiklik aminler, izopren gibi) ilişkili olduğunu ileri sürmüştür [28]. 2011 yılında ABD'de yapılan bir çalışmada, sigara içen kadınların risk artışı içmeyenlerle karşılaştırıldığında %10-20 civarındadır [43].

Radyasyon

İonizan radyasyon meme kanseri için belirlenmiş bir risk faktörüdür [44]. Bu etki maruziyet yaşıyla güçlü bir şekilde ilişki içerisindedir, yani çok daha genç yaşta radyasyona maruz kalınma, riskin aşırı derecede artışına neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, 30 yaşından önce Hodgkin lenfoma için göğüsüne radyasyon terapisi uygulanmış kadınlar için ikincil meme kanseri gelişimini 12-25 kat arttığını göstermiştir [45]. 10-29 yaşları arasında pnömoni veya tüberküloz için göğsüne diagnostik x-ışınları alan kadınların ise, meme kanser riskinin 3 kat arttığı tespit edilmiştir [44]. Toraks duvarına yüksek dozda ionizan radyasyon meme kanseri riskini ciddi bir şekilde artırmaktadır. Ancak, mammografik ekipman son yıllarda çok değişmiş ve çok güvenli hale geldiğinden dolayı mamografiden de korkulmamalıdır [28].

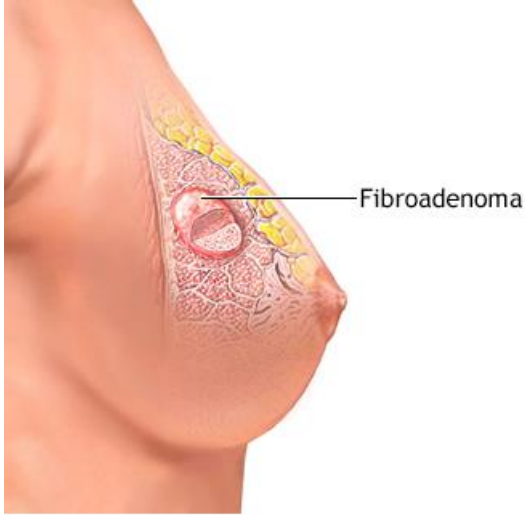
Genetik

Meme kanserinde genetik değişimlerin çoğu sadece kanser hücrelerinde gözlenirken (sporadik), daha az sıklıkla da germ hücrelerinde meydana gelen genetik değişimlerle de maligniteler kalıtsal özellik taşımaktadır. Tümörgenezde birden fazla role sahip olan genler arasında onkogenler (ras, c-myc, cerbB-2 (veya HER2/neu) genleri), tümör baskılayıcı genler (p53, BRCA1, BRCA2, nm23 genleri) ve apoptozda ro

2.2. Meme Tümörlerinin Patolojik Özellikleri

2.2.1. Benign epitelyal tümörler

Fibroadenoma çoğunlukla genç hastalarda (20-35 yaş) görülmekle birlikte her yaşta olabilen sık görülen bir benign meme tümörüdür [47, 48]. Bu lezyonlar hamilelik süresince büyürler ve kadın yaşlandıkça küçülme eğilimindedirler. Fibroadenomların çoğunun çapları 5 cm'den küçüktür ama daha büyük lezyon tipleri de görülebilir. Fibroadenomlar, mikroskopik olarak hem glandüler hem de stromal elemanların proliferasyonu ile karakterizedir (Şekil 2.4) [48].



Şekil 2.4. Fibroadenom [49]

2.2.2. Malign epitelyal tümörler

Meme malignensilerin %95'ten fazlası epitel elemandan kaynaklanır ve karsinom olarak isimlendirilir [48]. Meme karsinomları genel olarak iki ana kategoriye ayrılırlar: 1) Non-invaziv ya da in-situ karsinomlar 2) İnvaziv karsinomlar. Ayrıca, bunlar da duktal ve lobüler şeklinde de iki majör gruba ayrılırlar [48,50]. İn situ karsinomda malign epitelyal hücreler bazal membranla çevrili duktus ve asinuslar içinde sınırlı olmasına karşın, invaziv (infiltratif) karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedir. Bu sebeple invaziv karsinomlar, kan ve lenfatik damarları invaze ederek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir [50]. Meme tümörlerinin sık histolojik tipleri Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

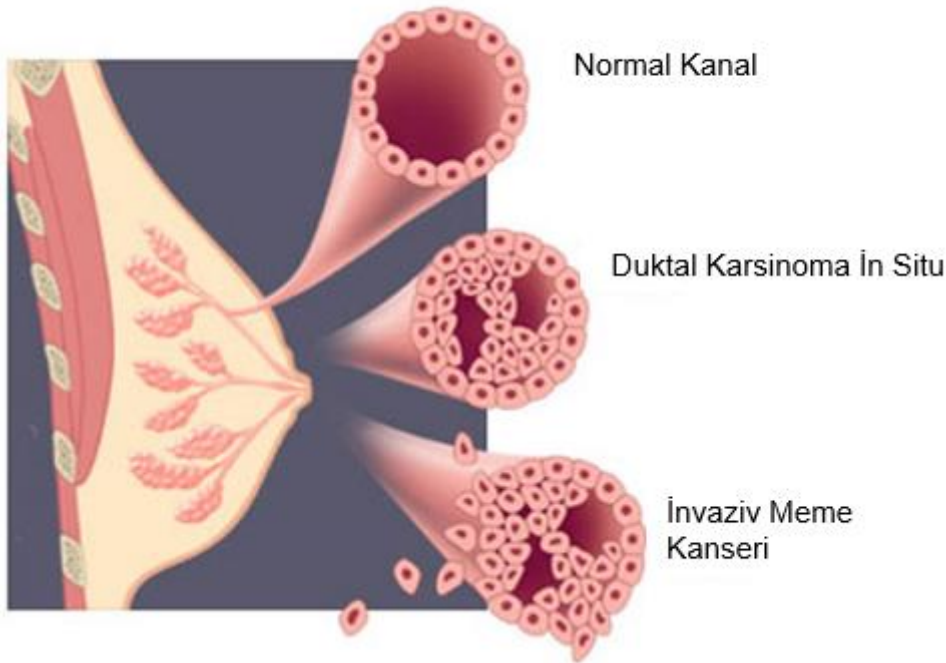
Çizelge 2.3. Meme tümörlerinin sınıflandırılması [48]

I.	Epitelyal Tümörler
	Benign
	Fibroadenoma
	Adenoma
	Intraduktal papilloma
	Malign
	In situ karsinoma
	In situ duktal karsinoma
	In situ lobular karsinoma
	Invaziv karsinoma
	Özel karakterde olmayan invaziv duktal karsinoma
	Lobular karsinoma
	Tübüler karsinoma
	Kribriform karsinoma
	Musinöz karsinoma
	Medullar karsinoma
	Papiller karsinoma
	Mikropapiller karsinoma
	Apokrine karsinoma
	Juvenil veya sekretuar karsinoma
	Metaplastik (sarkomatoid) karsinoma
	Özel klinik belirtileri olan karsinoma
	Meme başının Paget hastalığı
	İnflamatuar karsinoma
II.	Fibroepitelyal Tümörler
	Philloides tümörleri
III.	Mezenkimal Tümörler
	Benign
	Granular hücreli tümör
	Myofibroblastoma
	Malign
	Sarkomlar
IV.	Hematopietik Tümörler
V.	Meme dışı malign neoplazmlardan olan metastazlar

Noninvaziv Karsinomlar

Duktal Karsinoma İn Situ (DCIS)

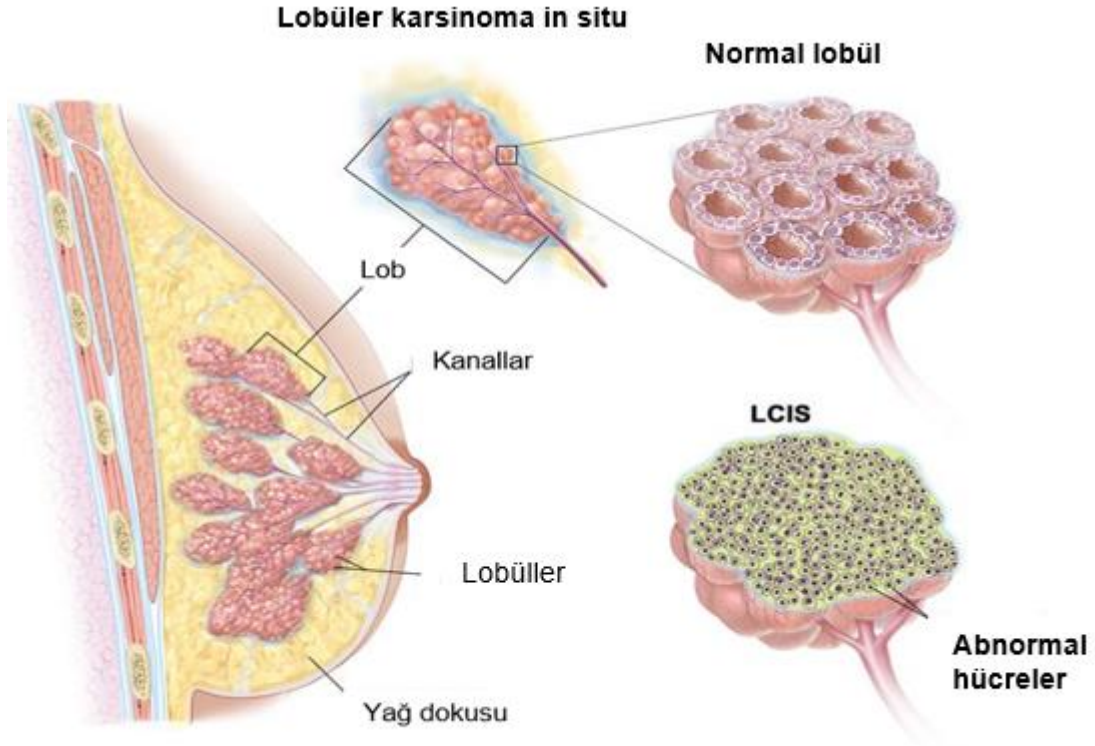
Duktal karsinoma in situ (DCIS), meme süt kanalında abnormal hücrelerin bulunmasıdır (Şekil 2.5) [51]. Histolojik olarak, küçük duktuslardaki epitelin proliferasyonu ile karakterizedir [52]. Bu lezyon komşu stromaya invazyonu olmayan malign hücre popülasyonundan oluşur, fakat hücreler duktal sistem boyunca da yayılabilirler [48]. DCIS'li meme kanserli kadınlarda invaziv meme kanseri gelişme olasılığı 5 kat daha fazladır [52].



Şekil 2.5. Duktal karsinoma in situ ve invaziv duktal karsinoma [53]

Lobüler Karsinoma İn Situ (LCIS)

Memenin terminal duktal lobüler ünitelerinden kaynaklanan monomorfik hücre popülasyonlarının proliferasyonu ile karakterizedir [48, 52]. Histolojisi, lobüller geniş ve yuvarlak nükleuslu, nispeten düzgün, yuvarlak, küçük-orta boy hücrelerdir (Şekil 2.6). Bir lobüler karsinoma in-situ tanısı almış kadının invaziv lobüler karsinom olma olasılığı 3 kattan daha fazladır [48].



Şekil 2.6. Lobüler karsinoma in situ [54]

İnvaziv Karsinomlar

İnvaziv Duktal Karsinom

Tüm invaziv meme karsinomların %70-80 kadarını oluşturur [48]. İnvaziv duktal karsinom tipik olgularda düzensiz sınırlı, şekil ve boyutları değişken nitelikte olup çevre stromaya doğru ince uzantılar oluşturur. Tümör kan ve lenf damarlarında invazyonlar oluşturabilir [30]. Bu tür karsinomlar tipik olarak östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif olup, HER-2/neu (c-erbB-2) overekspresyonu göstermezler [50].

İnvaziv Lobüler Karsinom

İkinci en sık tipte invaziv karsinom tipidir ve bütün invaziv meme karsinomların %5-15 kadarını oluşturur [55, 48]. Çevre doku sınırları daha düzensiz tümörlerdir [30]. Bu tür karsinomlar küçük, nispeten düzgün hücrelerin stromaya tek bir hücre bloğu veya normal duktuslarla lobüller arasında konsantrik bir tarzda yayılan

proliferasyonuyla karakterizedir [48]. %70-95'i östrojen reseptörü, %60-70'i progesteron reseptörü pozitif olup, pleomorfik tip dışında HER-2/neu genellikle negatiftir [50].

2.3. Meme Kanserinde Hormonal ve Büyüme Faktörü Reseptörleri

Meme kanser tipinin değerlendirilmesinde özellikle meme kanserli hastalarda östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve Her2 durumlarını doğru belirleyen biomarker testleri kullanılmaktadır [56, 57]. Biomarkerlar prognostik, prediktif veya her ikisi de olabilmektedir. Bununla birlikte, meme kanser hastalarındaki ER ve PR hormon reseptörlerinin ekspresyonu zayıf prognostik belirteç ancak güçlü prediktif biomarkerdir [56].

ER seviyesi yaş ile hemen hemen doğrusal olarak artarken, PR düzeyleri daha çok menopoz durumu ile ilişkilidir. Genellikle, ER hastalısız sağkalım için kuvvetli prediktif değer taşımakla birlikte, PR olasılıkla hastalık nüksü durumunda endokrin tedaviye daha iyi yanıt göstergesi olduğundan, genel sağkalımla ilişkili bulunmaktadır [30]. Meme kanser hastasının tümörü ER ve/veya PR eksprese ederse, invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %70'inde görüldüğünden, tamoxifen gibi endokrin terapiden yararlanabileceği tahmin edilebilmektedir [56].

Son on yılda prognostik ve prediktif değeri en çok araştırılmış büyüme faktörü reseptörü HER2/neu (İnsan Epidermal büyüme faktörü 2) reseptörüdür. HER2/neu reseptörü, normal meme epitelyal ve mioepitelyal dokusunda düşük seviyede eksprese edilir [30]. HER2 geninin amplifikasyonu meme kanseri hastalarının yaklaşık %25'inde görülür ve tümör hücrelerinde reseptör proteininin aşırı üretilmesine neden olur. Bu aşırı üretim ile meme kanseri hastalarının hastalık seyri, daha kısa ömür uzunluğu da dahil olmak üzere, bu anormalliği göstermeyen hastalara göre daha kötüdür. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, HER2 proteinine karşı monoklonal antikor geliştirilerek aşırı üretimin baskılanması amaçlanmaktadır [13].

2.4. Meme Kanserinin Moleküler Genetiği

2.4.1. Onkogenler

HER2/neu gen ailesi

17q21'de lokalize olan insan epidermal büyüme faktör reseptör-2 (HER2/neu) proto-onkogeni intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip 185 kDa ağırlığında bir transmembran glikoproteini kodlar [58]. HER2 gen amplifikasyonu ya da protein aşırı ekspresyonu insan meme kanserinin %20-30'unda rastlanılmıştır. HER2 eksprese eden hücreler proliferasyon, morfolojik olarak diferensiasyon ve migrasyon/invazyon gibi çok şiddetli biyolojik yanıtlara sahiptirler. Buna ek olarak, HER2'nin aşırı ekspresyonu ileri-evre meme kanseri ve kötü prognozun artmış riskiyle ilişkilidir. HER2 klinik açıdan önemli bir biyobelirteçtir ve meme kanseri terapi hedefidir [59, 60].

Myc

Myc (myelocytomatosis oncogene) sarmal-dönüş-sarmal/lösün fermuar süper aile genlerinin bir üyesidir. Kromozom 8q24'te lokalizedir ve Max proteiniyle heterodimerizasyon olduğunda hedef DNA dizilerine bağlanan bir DNA-bağlı proteini kodlar ve çok sayıda genlerin transkripsiyonunu indükler. Myc hücre siklus kontrolü, diferensiasyon, adhezyon ve apoptoz dahi birçok hücrel mekanizmalarda rol oynar. Primer meme tümörlerinde Myc amplifikasyonunun rapor edilmiş frekansları %4-41 arasında değişkenlik gösterir ve invaziv tümörlerde bu oran invaziv olmayan tümörlerle karşılaştırıldığında daha yüksektir. Amplifikasyon seviyesi 3'ten 18 gen kopya sayısı arasında çoğunlukla değişkendir. Myc amplifikasyonu meme kanseri hastalarında tümör büyüklüğü ve lenf nodlarına metastatik yayılımıyla, erken hastalık rekürensi ve kötü prognozla koreledir [13, 58].

Siklin D1 ve siklin E

G₁ siklin proteinleri hücre döngüsünün G₁-S fazı boyunca hücrenin progresyonunu düzenler. Siklin E tarafından takip edilen siklin D1'in ardışık aktivasyonu fosforilasyon yoluyla pRB1'in inaktivasyonuna neden olur ve hücreye S fazına geçiş için izin verir [61]. Çeşitli çalışmalar meme tümörlerinin yaklaşık %50'sinde siklin D1 proteininin aşırı eksprese edildiğini rapor etmiştir. Siklin E aşırı ekspresyonu meme tümörlerinde genellikle düşük siklin D1 ekspresyonu ve ER negatif durumuyla ilişkilidir. Ek olarak, siklin E aşırı ekspresyonu meme kanseri hastalarında kötü proznozla da koreledir [58].

Ras

Ras ailesi proteinleri GTP bağlı veya GDP bağlı formları ile iki konformasyon arasında gidip gelen, 21 kDa (p21) ağırlığında bir şalter proteindir. Bu sayede, hücre içerisindeki çeşitli proteinleri etkiler ve onların da konformasyonlarının değişmesine ve fosforilenmelerine yol açarak hücre içi sinyal iletimi tetiklenir [7]. Ras geninin onkogenik özellik kazanması aşırı ekspresyon veya nokta mutasyonu ile olur. Ras mutasyonları meme kanserlerinde sık görülmemekle birlikte, selim fibrokistik, fibroadenom ve karsinomlu kişilerde yapılan çalışmada ras gen ekspresyon seviyelerinin selim meme dokularından çok karsinomlarda daha yüksek oldukları bildirilmiştir [46].

2.4.2. Tümör baskılayıcı genler

p53

p53 mutasyonları insan kanserlerinde geniş bir spektruma sahiptir. p53 geni kromozom 17p13.1 bölgesinde lokalizedir. 393 kodon içerir ve 53 kDa büyüklüğünde nükleer bir fosfoprotein kodlar. DNA hasarını takiben büyüme arestini ya da apoptozu sağlayan genlerin transkripsiyonunu aktive eden p53 proteini "genomun gardiyanı" olarak tanımlanır. İnsan meme kanserlerinin %20-40'ında p53 gen mutasyonları görülmektedir. p53 germline mutasyonlu bireyler (Li-Fraumeni sendromu) yüksek meme kanseri ve diğer malignensi risklerine

sahiptirler. Dokuda mutant p53 pozitifliğinin tespiti, %80-90 oranında meme kanserlerini doğrular niteliktedir [46, 58, 62].

BRCA1 ve BRCA2

BRCA1 (Breast cancer 1) ve BRCA2 (Breast cancer 2) genlerinin tanımlanması meme patogenezinin anlaşılması yolundaki ilerlemelerde çok önemli bir yere sahiptir. BRCA1 ve BRCA2 tüm otozomal dominant ailesel meme kanserlerinin %80-90'ından sorumludur. Genomik DNA'da 100 kb yer kaplayan BRCA1 geni, kromozom 17q21'de lokalizedir ve 1863 amino asit sahip bir proteini kodlar. Ailesel meme kanser vakalarının %45'den sorumludur. BRCA1 gen ürünü DNA onarımını, apoptoz ve hücre siklus kontrolünü sağlar. BRCA1 proteini DNA onarım proteini Rad51, tümör baskılayıcı p53, RNA polimeraz II holoenzim, RNA helikaz A, c-myc, BRCA2 proteini gibi birçok hücresel proteinlere bağlanır. BRCA1'de meydana gelen mutasyon bu kompleksin kompozisyonu etkileyebilmektedir ve fonksiyonlarının disregülasyonu sonuç olarak malignensi gelişimiyle sonuçlanabilmektedir. Azalmış BRCA1 mRNA seviyelerinin meme ve ovarian kanser gelişimiyle ilişkili olduğu ve ileri-evre meme tümörlerinde azalmış BRCA1 protein ekspresyonu rapor edilmiştir. BRCA2 geni ise kromozom 13q12-13'te lokalize olmuştur ve 26 kodlayıcı ekzonu olan, 3418 amino asit kodlayan 10 254 baz çiftli kodlayıcı diziye sahip BRCA2, BRCA1'den daha büyüktür. BRCA2 proteini de BRCA1 gibi, transkripsiyonel regülasyonda ve DNA tamirinde rol oynar. Meme kanseri vakalarının %35'inden sorumludur [62-64].

Rb1

Rb1 (retinoblastoma) protein (pRb) önemli hücre siklus düzenleyicisi olarak işlev görür [58]. G₁ evresinde, Rb E2F'ye bağlanarak S evresi genlerinin transkripsiyonunu engeller. Hücre bölünme için sinyal aldığı anda Rb fosforillenir ve E2F'ye olan ilgisi azalarak Rb-E2F kompleksinden ayrılır. Serbest kalan E2F proteini S evresi gen ifadesini etkinleştirir [65]. Meme tümörlerinin %15-20'sinde RB1 mutasyonu veya azalmış protein ekspresyonu görülür [58].

INK4A/p19^{ARF}

INK4A siklin-bağımlı kinaz inhibitör, siklin-bağımlı kinazlar ve D siklinlere bağlanır ve inhibe eder. pRb'nin hipofosforilasyon sonucu G₁ fazında hücre siklus inhibisyonu gerçekleşir. Alternatif sprints değişimiyle INK4A (CDKN2A/p16) geni, hücre siklus arestini indükleyen ikinci bir protein olan p19^{ARF}'yi kodlar. Tümör hücrelerinde p16 ekspresyon kaybı p19^{ARF}'ye göre daha yaygındır. p16 fonksiyonunun kaybı delesyonlar, nokta mutasyonları ya da promoter hipermetilasyonu ile oluşabilmektedir. Primer meme tümörlerinde p16 mutasyonları nadir görülmektedir [58].

PTEN

MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers 1) ya da TEP1 (TGFβ-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1) olarak bilinen PTEN (Phosphatase and tensin homolog) geni kromozom 10q23'te lokalize olmuştur [48, 64]. PTEN, fosfoatidilinositol 3-kinaz (PI 3-K)-aracılı büyüme sinyal yolağında ve anoikiste rol oynamaktadır ve hücre adhezyonunun negatif regülasyonunda, migrasyonda ve tümör invazyonunda da ilişkili olduğu gösterilmiştir. PTEN lokusundaki heterozigozite kaybı ileri-evreli invaziv meme karsinomalarının ve meme kanser hücre hatlarının %29-50'sinde rapor edilmiştir [58].

p21

Kromozom 6q21'de lokalize olan p21 G₁-S hücre arestinde bunun yanında G₁-M faz geçişinde aracılık etmektedir. P21 gen mutasyonları meme kanserlerinde nadirdir. İleri-evre meme tümörlerinde p21'in aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir [58].

ATM

Kromozom 11q22-q23'te lokalize olan ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) geni [66] resesif olarak kalıtılır. Mutant iki allel hastalık gelişimine yol açar. Meme

kanserinde bir mutant allel taşıyanlarda riskin çok yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu gen, toplumdaki meme kanserlerinin %2-7'sinden sorumludur [46].

2.4.3. Metastaz baskılayıcı genler

E-kaderin (CDH1- Cadherin-1)

E-kaderin α , β ve γ -katenin aracılığıyla aktin sitoskeletona tutunmasıyla bir hücre adhezyon molekülü olarak işlev gören bir transmembran glikoproteinidir. Fonksiyonel E-kaderin ya da kateninin kaybı metastatik progresyonu artırmaktadır. Heterozigozite kaybının yüksek frekansı (%50) 16q24'teki CDH1 lokusunda meme tümörlerinde rapor edilmiştir. İlâveten, invaziv duktal meme karsinomalarının yaklaşık olarak %50'sinde CDH1'in azalmış ekspresyonu görülmektedir [58].

Nm23 (NME1 ve 2)

nm23-H1 (Nucleoside Diphosphate Kinase 1-NME1) ve nm23-H2 (NME2) genleri kromozom 17q21.3 bölgesinde lokalizdir ve nükleosid difosfat kinaz A ve B'yi kodlar. Bu proteinler ATP kullanarak nükleosid difosfatların fosforilasyonunu katalizlemede görevlidirler. NME1 ve NME2'nin azalmış ekspresyonu bazı meme tümörlerinde ve hücre hatlarında çoğunlukla metastatik fenotiple ilişkilidir [58].

2.4.4. Hücre sağkalım ve hücre ölüm yolları

Telomeraz

İnsan kromozomları uç kısımlarında TTAGGG DNA sekans tekrarları içerirler [67]. Hücre replikasyonun düzenlenmesinde ve genom bütünlüğünün korunmasında önemli işlevlere sahiptir. Telomerlerin uzunluğu hücre bölünme sayısıyla azalır. Bu uzunluk kritik bir düzeye indiğinde hücreler senesense girer ya da apoptoz başlar. Kısalmış telomer uzunluğu sıklıkla genom instabilitesine neden olur, hücre-siklus kontrolü bozular ve kanser karakterize edilir [68]. Telomeraz ters transkriptaz (TERT), telomeraz RNA (TERC) ve diskerinden meydana gelen bir ribonükleoprotein kompleksi olan telomeraz, telomerlere TTAGGG tekrarlarını

ekleyerek uzamasını sağlayan bir nüklear enzimdir [67, 68]. Çoğu normal insan hücresi telomeraz aktivitesinden noksan olmasına rağmen, üreme hücrelerinde ve somatik kök hücrelerinde telomeraz ifade edilmektedir [67]. Telomeraz ifadesi erken karsinogenez boyunca düşüktür ancak kanser hücreleri senesense ve apoptoza girişten kaçtıkları için tümör invazyonunda önemli derecede artmaktadır [68]. Telomeraz aktivitesinin meme karsinomalarında %90'ının üzerinde arttığı rapor edilmiştir [58,68]. Çeşitli çalışmalar yüksek telomeraz aktivitesinin meme kanserinin kötü prognozuyla ilişkili olduğunu göstermiştir [68].

Apoptoz-ilişkili genler

Apoptoz ya da programlı hücre ölümünün inhibisyonu kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bax (Bcl-2-associated X protein), Bcl-X ve diğerlerini kapsayan Bcl2 ailesinin bazı üyeleri normal memede eksprese edilmektedir. Birçok çalışma Bcl2 ailesi proteinlerin meme kanserinde değişikliğe uğradığını göstermiştir. Anti-apoptotik bir protein olan Bcl2 meme tümör dokusunda sıklıkla eksprese edilmektedir. Bcl2 ailesinin pro-apoptotik bir üyesi olan Bax'ın ekspresyon kaybı meme tümörlerinde rapor edilmiştir ve kemoterapi cevabının yetersizliğiyle ilişkilidir ve metastatik meme hastalıklı kadınlarda sağkalım daha kısadır [58].

2.5. Hücre Sinyal İletimi ve Kanser

Hiçbir hücre izole yaşayamaz. Canlı organizmanın işlev ve yeteneklerine şekil veren hücreler haberleşme, tüm hücrelerin temel bir özelliğidir [13]. Hücre dışı kaynaklı sinyallerin hücre içi bir cevaba dönüştüren olaya *sinyal iletimi* ya da *sinyal aktarımı* denir [13, 69]. Organizmada bulunan sinyal üreten hücreler, hücre dışı sinyal moleküllerini sentezleyip salgırlar. Ortama salınan sinyal iletim molekülleri, sadece ilgili reseptörü içeren hedef hücrelerle etkileşerek özgün bir yanıt oluşturur [13].

İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomunda bulunan yaklaşık 32 000 genin %20'si, hücre sinyal iletiminde rol alan proteinleri kodlamaktadır. Bu sinyal iletim proteinler; hücre membranında yerleşen reseptörleri, G-proteinleri ve

sinyal ileten enzimleri kapsamaktadır. Sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu sağlayan protein kinazlar, membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar [70].

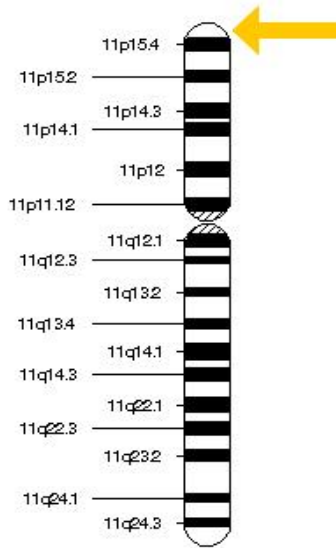
Karsinogenezin temelinde, büyümenin kontrolü, hücrenin yaşlanması ve farklılaşması gibi birçok biyolojik olayları etkileyen mutasyonların kademeli olarak biraraya gelmesi yer almaktadır. Böylelikle tümör hücreleri hızlı ve sınırsız çoğalma, çevre dokulara yayılma gibi birçok fenotipik özellikler kazanır. Proto-onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları, hücrenin malign fenotipik özellik kazanmasına katkıda bulunur [70].

Çoğu kanser türünde sinyal proteinlerini ve sinyal iletimi yollarını hedef alan onkojenik mutasyonlara sıklıkla rastlanılmaktadır. Hücre sinyal iletiminde meydana gelen bu değişimler, hücrenin çoğalma ve/veya sağkalım işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırarak onkojenik sinyal iletimi aracılığıyla tümör gelişimi ile invazyon/metastaz olaylarının gerçekleşmesini sağlamaktadır [70].

2.5.1. Ras geni

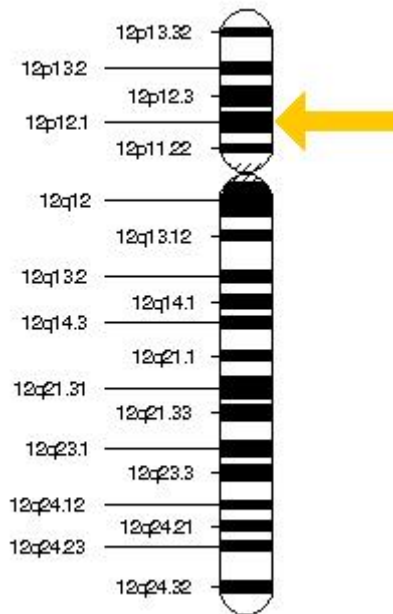
1970'lerin sonu ve 1980'lerin başında yapılan keşifler, sıçan-kaynaklı Harvey ve Kirsten kemirgen sarkoma retrovirüslerinin ras (rat sarkoma virüs) olarak adlandırılan ortak genlerin vasıtasıyla kanser patogenezeine katkı sağladıklarını göstermiştir. Bundan kısa bir süre sonra, gen transferi, DNA dizileme ve DNA haritalamadaki gelişmiş tekniklerin kullanımı, insan tümör patogenezinin yanında deneysel transformasyonda da kilit rol oynayan ras genlerinin belirlenmesine yol açmıştır [71]. Bu çalışmaları takiben, bazı viral genlerin homologlarının fare ve insan hücrelerinde de bulunduğu ortaya çıkmıştır [7]. Bu homologlar, Harvey ve Kirsten viral ras genleri veya H-ras ve K-ras olarak, protein isimleri ise Ha-Ras veya H-Ras ve Ki-Ras veya K-Ras olarak adlandırılmıştır [72]. Bu çalışmalardan sonra, ras genlerinin onkogenik aktivitesine dair ilk ipuçları, yapılan mesane, akciğer ve kolon kanseri hücre hattı çalışmalarında elde edilmeye başlanmıştır [7].

H-ras geni, kromozom 11'in kısa (p) kolunun 15.5 pozisyonunda, 532 241 bç'den 535 560 bç'ye kadar olan kısımda lokalizedir. 3 319 kb ağırlığındadır (Şekil 2.7) [73].



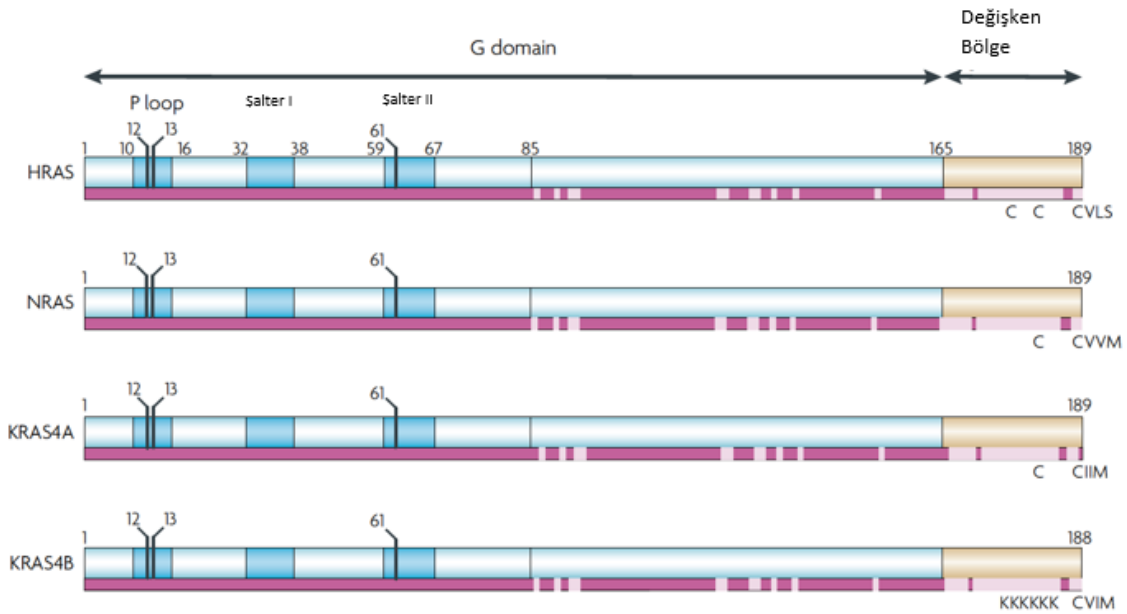
Şekil 2.7. H-ras geninin sitogenetik lokasyonu [73]

K-ras geni, kromozom 12'in kısa (p) kolunun 12.1 pozisyonunda, 25 205 245 bç'den 25 250 922 bç'ye kadar olan kısımda lokalizedir. 45 677 kb ağırlığındadır (Şekil 2.8) [74].



Şekil 2.8. K-ras geninin sitogenetik lokasyonu [74]

H-ras, K-ras ve N-ras genleri G domaini (1-165 amino asit) boyunca oldukça benzer. K-ras geni, C terminalindeki alternatif splayzingden dolayı K-ras4A ve K-ras4B olmak üzere iki farklı forma sahiptir. İlk 85 amino asit tüm 4 proteinde aynıdır ve guanozin difosfat (GDP) ve guanozin trifosfata (GTP) bağlama bölgelerini belirler. G domaini; GTP'nin γ -fosfatını bağlayan P-ilmeği (fosfat-bağlayan ilmek, 10-16 amino asit), Ras regülatörlerini ve efektörlerini bağlamayı regüle eden şalter I (32-38 amino asit) ve şalter II'yi (59-67 amino asit) içerir. Sonraki 80 amino asit (85-165), %85-90 dizi benzerliği gösterir. C-terminal değişken domaini (165-188/189 amino asit) ise H-ras, N-ras, K-ras4A'daki anahtar sisteinlerin palmitoilasyonunu ve C-terminaldeki CAAX (C, sistein; A, alifatik amino asit; X, terminal amino asit-metiyonin ya da serin) motifteki (CVLS, CVVM, CIIM ve CVIM) her bir izoformun farnesilasyonunu içeren post-translasyonel modifikasyonları boyunca membran lokalizasyonunu belirler. Bununla birlikte, K-ras4B'nin membran lokalizasyonu da CVIM motifine yakın lizinlerin (KKKKKK) uzamasıyla sağlanır (Şekil 2.9) [75].

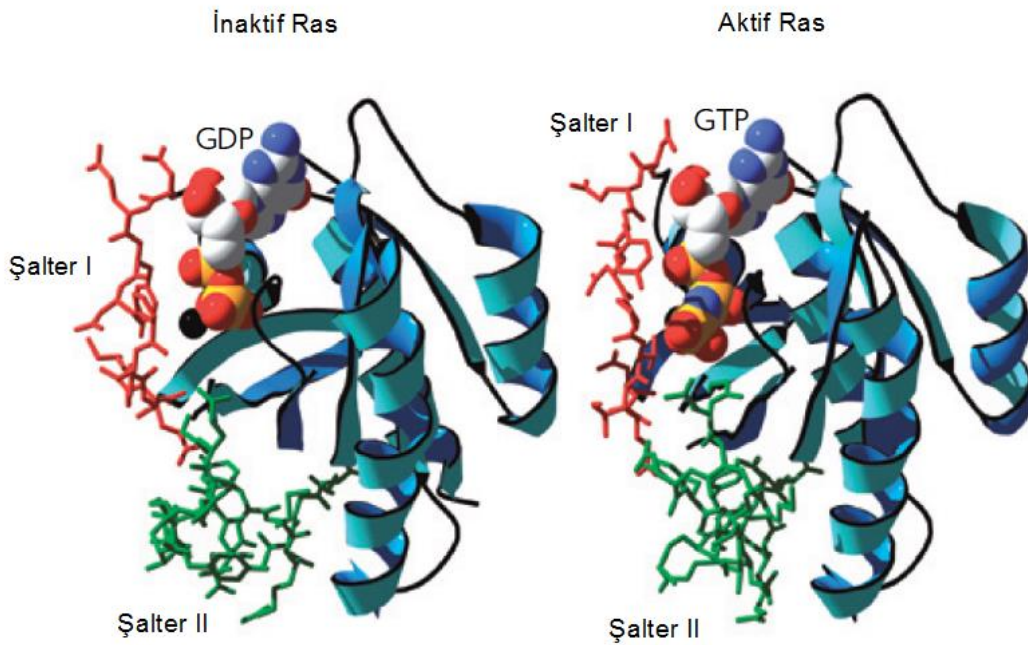


Şekil 2.9. Ras genlerinin dört izoformu [75].

Ras gen promotorları TATA veya CCAAT elementleri içermezler, bunun yerine hizmetçi genlere ait karakteristik çoklu G/C kutularını içerirler. Bu G/C elementleri Sp1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasında ilişkili olduğu gösterilmiştir [76].

2.5.2. Ras protein yapısı ve işlevi

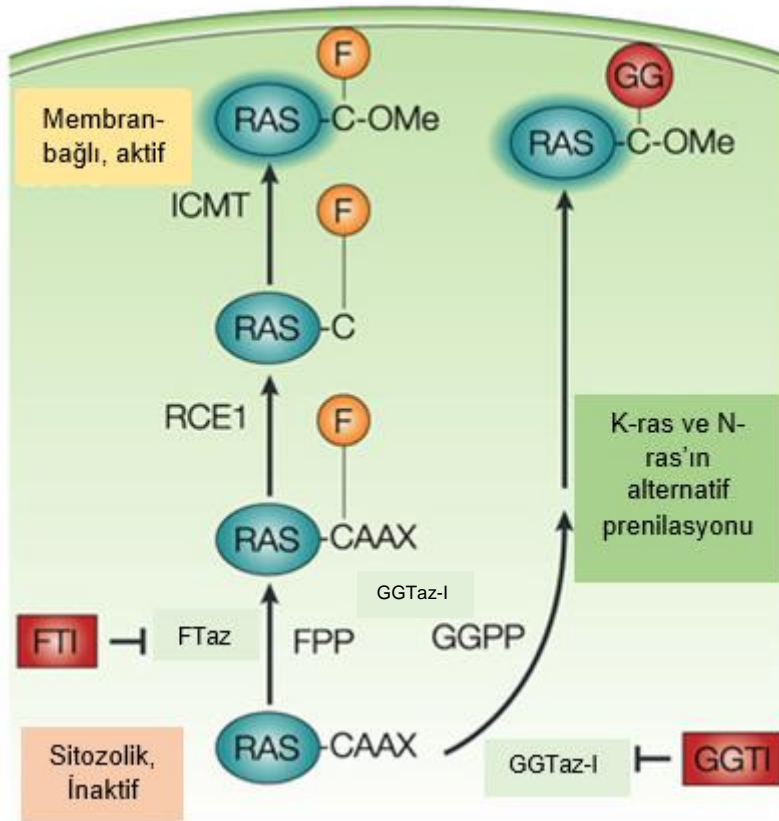
Ras gen ailesi üyelerinden (H-ras, K-ras ve N-ras) üretilen proteinler GTPaz'lardır [73, 74]. Bu genler, 188-189 amino asid uzunluğunda [77], 21 000 Dalton (p21) moleküler ağırlığında monomerik yapıda oldukça benzer proteinler kodlarlar [13, 72, 75, 78]. Ras proteinlerinin üç boyutlu katlanmasına dair ayrıntılı bilgiler 1990 yılında GDP- ve GTP-bağlı Ras proteinlerinin yapılarının kristallografik belirlemelerle elde edilmiştir (Şekil 2.10). Tüm Ras proteinlerinin üç boyutlu katlanma yapıları, on ilmek dizisiyle birbirine bağlanan beş α -heliks ve altı sarmallı β -tabakalarından oluşmaktadır [71].



Şekil 2.10. Ras proteininin üç boyutlu yapısı. Kırmızı ve yeşil renkte gösterilen nükleotid-duyarlı şalter I ve şalter II bölgeleri. GTP ve GDP nükleotidleri top yapısı şeklinde gösterilmiştir [71].

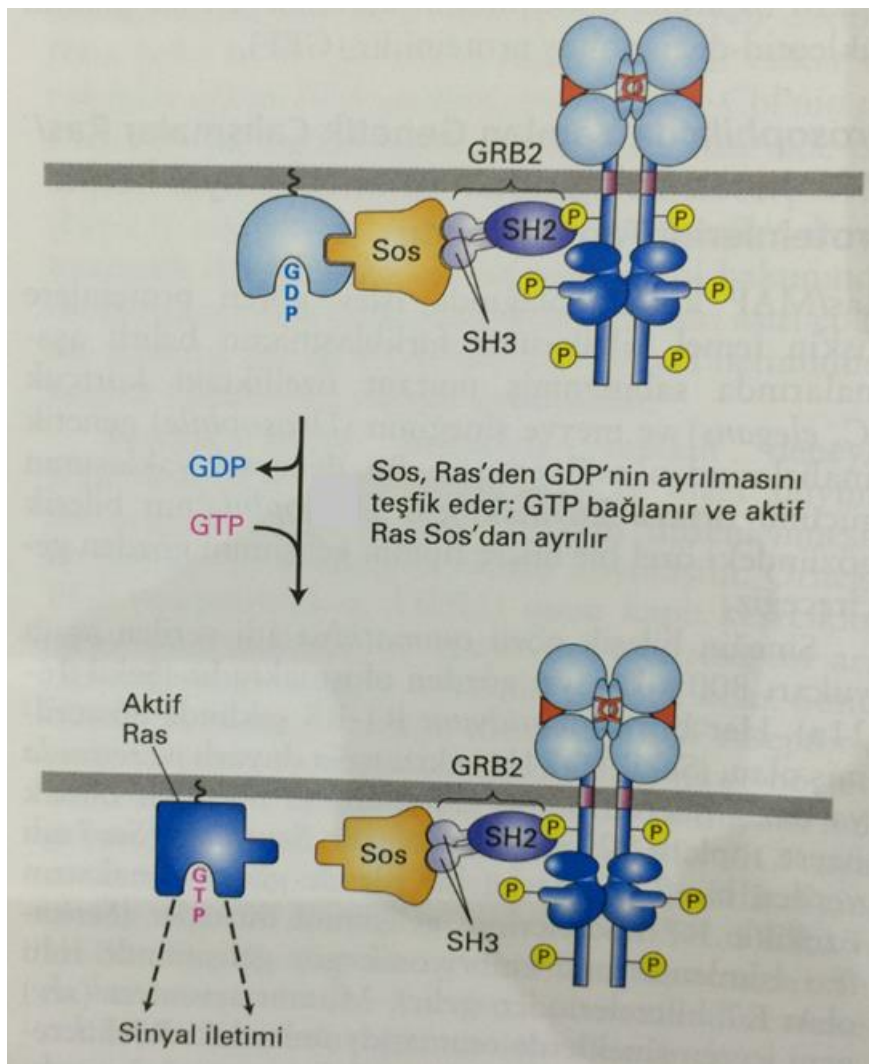
p21 proteini, karboksil terminaline bağlı farnesil molekülünden dolayı plasma membranının iç yüzeyinde lokalizedir [78]. p21 proteinleri, sitoplazmik öncül pro-Ras proteinleri olarak üretilir ve biyolojik olarak tam aktif olmak için çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara gerek vardır [77]. Ras proteininin hücre membranına konumlanabilmesi için, mutlaka farnesiltransferazla (FTaz) farnesillenmeli (H-,K- ve N-Ras) ya da geranilgeranil transferazla (N- ve K-Ras) geranilgeranillenmelidir. Farnesilasyon ve geranilgeranilasyon işlemde, CAAX

motifinin sistein rezidüsüne FTaz, farnesil difosfat (FDP) transfer ederken, GGTaz-I (geranil-geraniltransferaz tip-I), geranil-geranildifosfat (GGDP) transfer eder [77, 79]. GGTaz-I tercihen X rezidüsü lösin olan proteinleri preniller, ancak substrat spesifiteleri kesin değildir [77]. Ras tercihen farnesilasyona uğrar, ancak farnesilasyon inhibitörünün varlığında N-Ras ve K-ras4 geranilgeranilasyona uğrayabilir [71, 79]. Farnesilasyonda, prenilasyon işleminden sonraki basamakta, Rce1 endonükleaz (Ras-dönüştürücü enzim 1) –AAX tripeptidi parçalar ve Icmt (izoprenilsistein karboksil metiltransferaz) o anda terminal farnesillenmiş sisteini (O-Me) metiller [80]. İki palmitoilasyon bölgesine sahip H-ras ile tek palmitoilasyon bölgesine sahip N-ras palmitoiltransferaz (PTaz) aracılığıyla palmitoilasyona uğrar. Bununla birlikte, K-ras palmitoilasyondan bölgesinden yoksundur (Şekil 2.11). Palmitoilasyonun plazma membran mikrolokalizasyonunda bir role sahip olduğu düşünülmektedir [71, 79]. İşlemin tamamlanması ancak uygun Ras lokalizasyonu ve fonksiyonu ile sağlanır [81].



Şekil 2.11. Ras post-translasyonel işlemi ve membran bağlantısı [82].

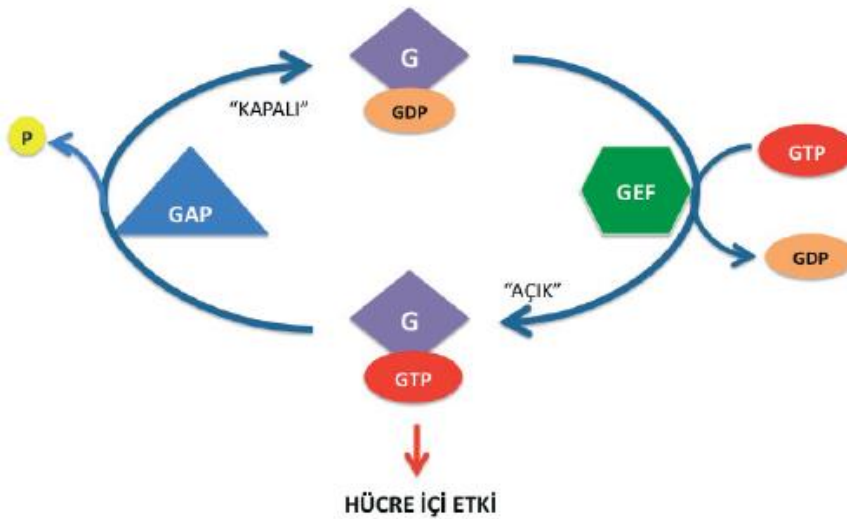
Aktif p21-Ras proteini, hücre dışından gelen çeşitli moleküler sinyalleri, hücresel proliferasyonu ve farklılaşmayı kontrol eden birtakım yollar aracılığıyla nükleusa ileterek diğer hücresel genlerin aktivasyonunun gerçekleşmesini sağlar [69, 78]. Hücre dışından gelen sinyal reseptör tirozin kinaza (RTK) bağlanarak aktive edilir. Aktive olan RTK'lara bağlanan SH2 (Src Homology 2) domaini ve Ras guanin nükleotid-değişim faktörü (GEF) olan Sos'a (son of sevenless) bağlanan iki SH3 (Src Homology 3) domaini içeren GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) adaptör proteini Ras'ı uyararak hücre sinyal iletimini başlatır (Şekil 2.12) [13].



Şekil 2.12. Reseptör tirozin kinazlara ligand bağlanmasını takiben Ras'ın aktivasyonu [13].

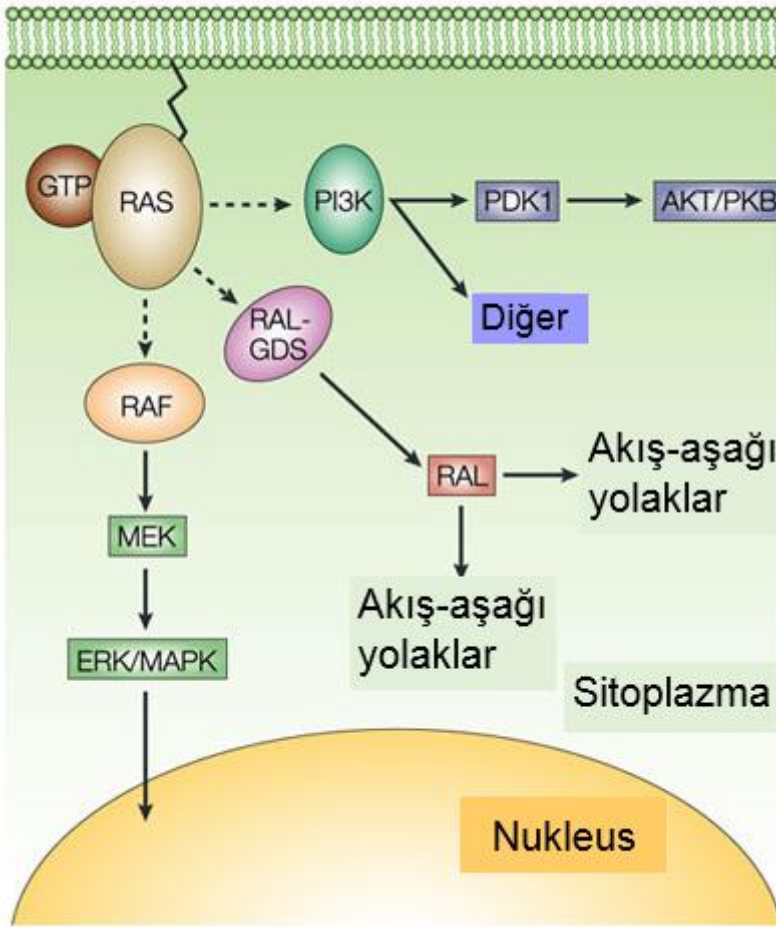
Ras ailesi proteinleri, GTP-bağlı ya da GDP-bağlı formları ile iki konformasyon arasında gidip gelerek hücre içi çeşitli proteinleri etkiler ve onların konformasyonlarının da değişmesine ve fosforillenmelerine yol açarak sinyal

iletimini tetiklerler [7]. Ras proteinleri GTP-bağlı iken aktif durumda, GDP-bağlı konformasyonda ise inaktif durumdadır [80]. İnaktif halden aktif hale sinyal uyarımlı dönüşüm, şalter proteinden GDP'nin uzaklaştırılmasına neden olan bir guanin nükleotid-değişim faktörü (GEF) ile yürütülür. GEF proteinleri, Ras-GDP ile etkileşir ve GDP'nin proteinden ayrılmasıyla, hücre içi konsantrasyonu yüksek olan GTP'nin bağlanmasına olanak tanırırlar (Şekil 2.13). Böylelikle, GTP, Ras proteininin en az iki korunmuş bölgesinde konformasyonel bir değişimi uyararak (şalter I ve şalter II) akış-aşağı diğer sinyal proteinlere bağlanmasına ve aktive olmasına olanak verir. Proteinin içsel GTPaz aktivitesi ve Ras'a bağlanan GTPaz aktive edici proteinler (GAP) ile GTP, GDP ve P_i'ye hidrolize edilir, böylece şalter I ve şalter II'nin yapısal dönüşümü aktif formdan inaktif forma geri döner [7, 13]. GAP, büyüme faktörlerin mitojenik etkisini inhibe ederek, sinyal iletim akışının durmasını sağlar [83]. GTP'nin hidroliz hızı, şalter proteinin aktif konformasyonda kalma ve sinyali akış-aşağı iletebilme süresinin uzunluğu ile düzenlenir. Hidroliz hızı yavaşladığında, proteinin aktif halde kalma süresi artar. GTP hidroliz hızı, hem GAP hem de G protein sinyali yapan proteinlerin düzenleyicisi ile ayarlanır ve hidroliz hızı artar. G protein aktivitesinin çok sayıdaki düzenleyicisi hücre dışı sinyaller yoluyla düzenlenir [13].



Şekil 2.13. Ras ailesi G-proteinlerin işlevsel döngüleri [7]

GTP-bağlı Ras proteinleri, sinyal yolağının alt basamağındaki efektör proteinlere doğrudan bağlanarak bu proteinleri aktif hale geçirirler. Bilinen Ras efektörleri genel olarak üç gruba ayrılır: 1) RAF (Rapidly accelerated fibrosarcoma ve MAPK (Mitogen-activated protein kinase)/ERK (Ekstrasellüler sinyal-regüle edici kinaz) kaskadındaki efektörler, 2) PI3-K (Fosfoinositid 3-kinaz) kaskadındaki efektörler, 3) Çeşitli değişik fonksiyonlara sahip Ras efektörleri (Şekil 2.14) [7].



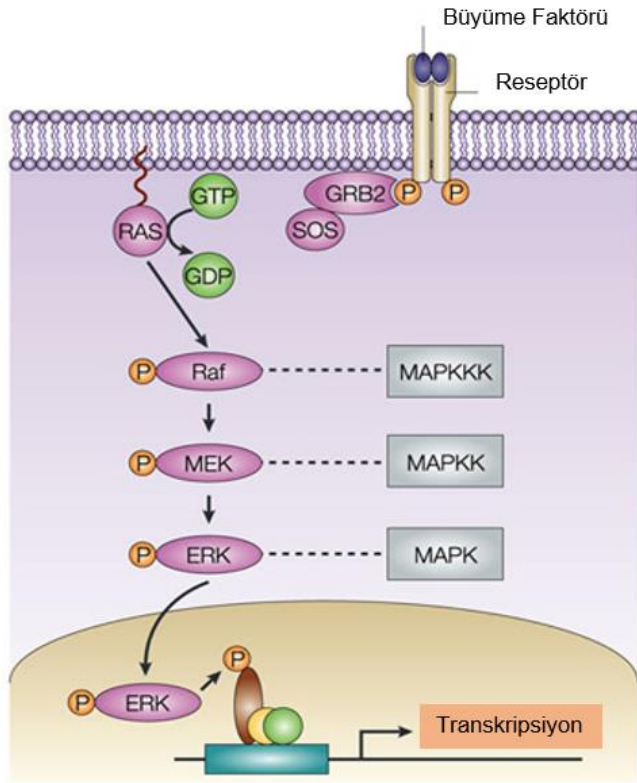
Şekil 2.14. Ras efektör yolakları [84]

Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolağı

Ras/Raf/MEK/ERK kaskadı, hücre yüzey reseptörlerinden gen ekspresyonunu regüle eden transkripsiyon faktörlerine kadar olan kısımda sinyallerin iletimini sağlar [85]. ERK (Extracellular signal-regulated kinase) Ras onkoproteininin majör efektörü olarak işlev gören bir MAPK'dir. MAPK yolakları efektör kinazı aktive eden ve fosforilleyen (MAPK) ara bir kinazı (MAPKK), dolayısıyla bunu da aktive eden

ve fosforilleyen başlangıç-GTPaz-düzenleyici kinazı (MAPKKK) içerirler [86]. Sırasıyla, Ras, Raf serin/treonin kinazları fosforiller, böylece MEK 1 ve 2 (mitogen-activated protein kinase kinase) kinazlar fosforillenir bu da ERK 1 ve 2'yi fosforillenmesini sağlar. Fosforillenmiş ERK nukleusa transloke olur ve hücre proliferasyonunu sağlayan çeşitli transkripsiyon faktörleriyle ilişkiye girer (Şekil 2.15) [87].

Ras/Raf/MEK/ERK yolağı Bad (Bcl-2-ilişkili ölüm promoter), kaspaz 9 ve Bcl-2 dahil apoptotik düzenleyici moleküllerin post-translasyonel fosforilasyonu ile apoptozun regülasyonunu derinden etkiler. Hücre tipine ve uyarımına bağlı olarak bu yolak, apoptoz ve hücre döngüsü progresyonunu düzenleyen önemli sinyalleri iletir [85].



Şekil 2.15. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolağı [88]

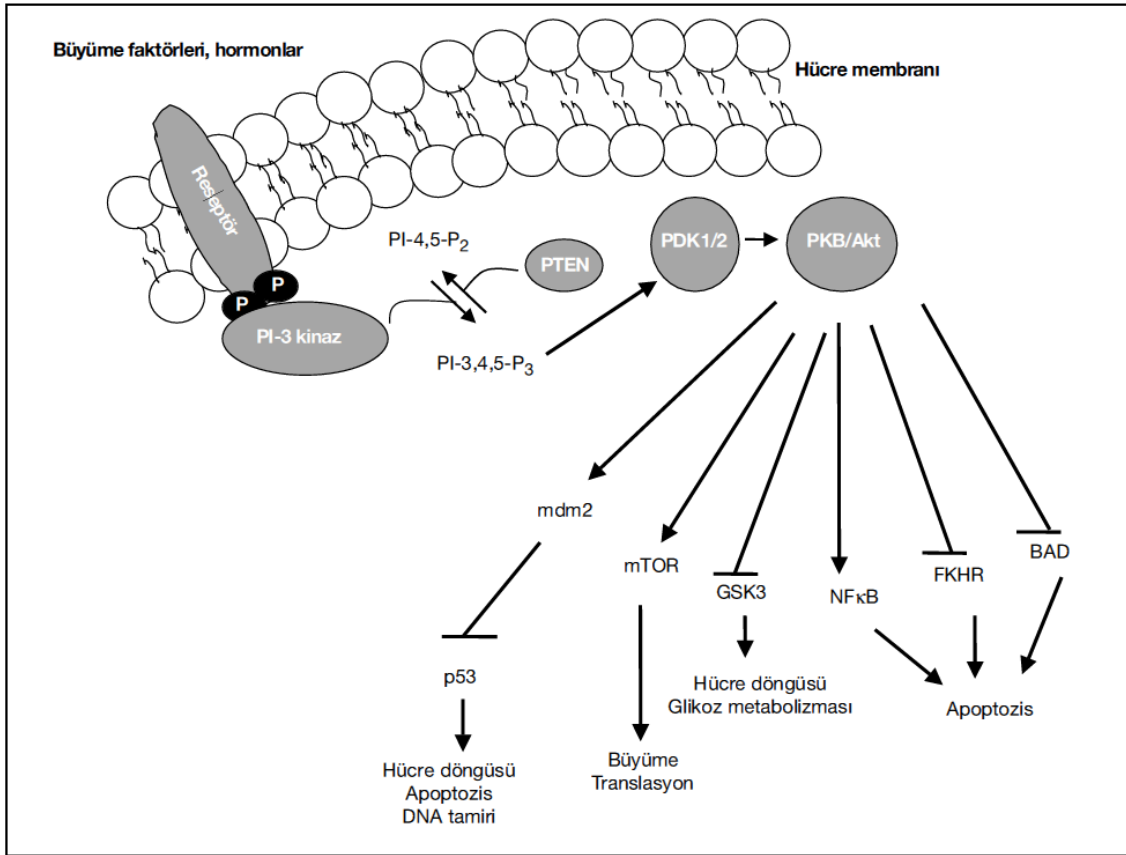
Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR sinyal yolağı

Bir başka önemli sinyal yolağı Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR sinyal yolağıdır [87]. Spesifik reseptörlere ligand bağlandıktan sonra, PI3K iki mekanizmayla aktive

edilebilir. Birincisi, reseptörde fosforillenmiş tirozin rezidüsü PI3K'nın p85 regülatör altbirimi için kenetlenme bölgesi olarak hizmet görür. Bu durum sayesinde, kompleksin PI3K'nın diğer altbirimi olan p110 katalitik altbirimini kuvvetlendirir. Alternatif olarak, uygun ligand tarafından sitokin reseptörü aktive edildiği zaman, Shc (Src homology 2 domain containing) protein, Ras'ın aktivasyonuna yol açarak bir kompleks oluşturan Grb-2 ve Sos proteinlerini etkinleştiren reseptöre bağlanır. Ras daha sonra membran translokasyonunu ve P3IK'nın p110 altbiriminin aktivasyonunu indükleyebilir [85].

Aktive olmuş PI3K, fosfatidilinozitol 4,5 fosfat'ı (PIP2) fosfatidilinozitol 3,4,5 fosfat'a (PIP3) dönüştürür [85]. Fosfatidilinozitol-bağımlı kinazlar (PDK'lar) Akt'nin aktivasyonundan sorumludurlar. Akt, iki rezidünün fosforilasyonu aracılığıyla aktive edilir, T308 ve S473. PDK1, T308'in fosforilasyonundan sorumlu bir kinazdır ve Akt'yi aktive eder [89].

Aktivasyondan sonra, Akt nukleusa transloke olabilir ve çok sayıda transkripsiyonel regülatörlerin aktivitesini etkileyebilir: CREB, E2F, inhibitör kappa B protein kinaz (Ik-K) yoluyla B hücrelerden nükleer faktör kappa B (NF-κB), transkripsiyon faktörlerinin forkhead ailesi (FKHR-Forkhead transcription factor) ve p53 aktivitesini regüle eden murine double minute 2 (MDM2). Transkripsiyon faktörlerinin dışında, Akt hücrenin sağkalım durumunu etkileyen çok sayıda diğer molekülleri de hedefleyebilir. Pro-apoptotik molekül olan Bcl-2-ilişkili ölüm promotör (BAD) ve glikojen-sentaz kinaz-3β (GSK-3 β). Sonuç olarak, Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR yolağı Wnt/β-katenin, p53 ve daha birçok başka yolaklarla ilişki içerisindedir (Şekil 2.16) [85, 89].



Şekil 2.16. PI3K/PTEN/Akt/mTOR sinyal yolağı [70]

İlaveten, bu yolak, PI3K aktivitesinin büyüme-arttırıcı etkilerini negatif şekilde düzenlemede hizmet eden fosfatazları da içerir. PTEN ve SHIP-1/2 (SH2 domain-containing inositol phosphatase) fosfatazlar PIP3'ten fosfatları ayırabilmektedir. Bu fosfatazlardaki mutasyonlar aktivitelerini elimine edeceğinden tümör progresyonuna neden olabilmektedir [85].

Diğer ras efektörleri

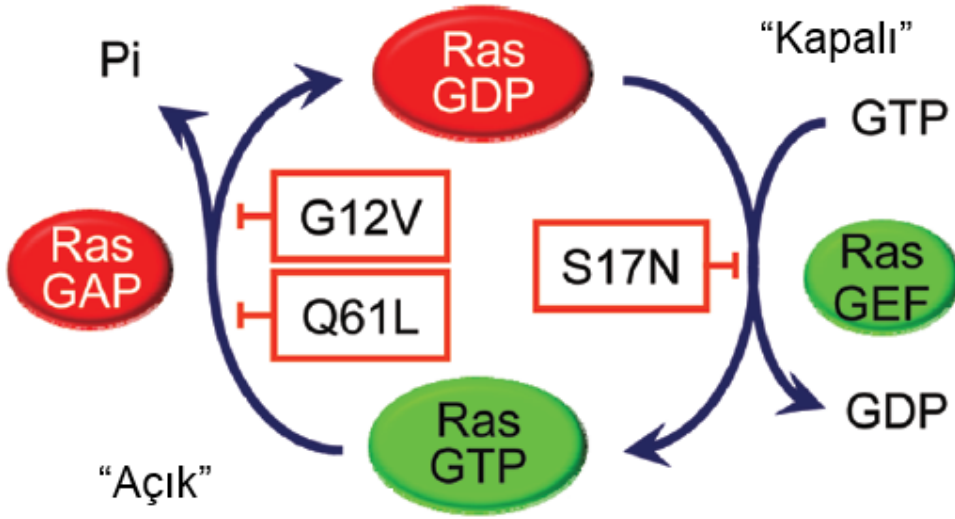
Yapılan çeşitli çalışmalarda Ras'la ilişkili daha birçok efektör olduğu ortaya konulmuştur. Ras benzeri (Ras-like) bir GTPaz olan Ral'ın aktivasyonuna yol açan bir nükleotid değişim faktörü (RalGEF) olan RalGDS (Guanine nucleotide dissociation stimulators) proteininin de Ras'ın efektörleri arasında olduğu gösterilmiştir. PLCε (fosfolipaz Cε) proteini Ras'ın doğrudan efektörüdür. PLCε aktivasyonu ile fosfatidil-inozitol(4,5)-fosfat'ın inozitol-1,4,5-trisfosfat DAG (Diaçilgliserol)'a dönüşmesine ve böylece Ca⁺⁺ salınımına ve PKC'nin (Protein

kinaz C) aktivasyonuna yol açmaktadır. Bir diğer efektör olan AF-6 (Fadın-6) ise, aktin ve mikrotübül bağlayıcı protein motifleri taşır ve böylece hücre iskeleti ile etkileşerek hücrenin polaritesini belirler. Diğer taraftan, RIN1 (Ras inhibitor 1), Ras'a yüksek afiniteyle bağlanarak Raf-MEK-ERK yolağına antagonist olarak çalışır. Son olarak diğer bir efektör de RASSF'dir (Ras association domain family). RASSF proteini MST1 ve MST2 (Mammalian STE20-like protein kinase) ile etkileşerek siklin E aktivitesini engeller ve hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza yol açar [7].

2.5.3. Ras mutasyonlarının onkogenezdeki rolü

Ras gen mutasyonları insan kanserlerinin yaklaşık %30'unda görülmektedir. İnsan kanserlerinde spesifik ras genleri, farklı malignansilerde mutasyona uğramıştır. K-ras mutasyonları pankreatik, kolorektal, endometrial, safra kanalı, akciğer ve servikal kanserlerde etkili iken, H-ras mutasyonları sıklıkla melanoma ve mesane kanserlerinde etkilidir [75].

Ras genleri insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğramaktadır. Bu nokta mutasyonları kodon 12, 13, 59 ve 61'de meydana gelmektedir [90]. Son 30 yılda farklı insan tümörleri üzerinde yapılan çok sayıdaki çalışmalarda, ras onkogenik mutasyona yönelik 2 sıcak nokta tanımlanmıştır. Bu sıcak noktalar çok iyi korunmuş kodlanan dizilerin sırasıyla kodon 12 ve 61'de lokalizedirler [10]. İnsan tümörlerinde, kodon 12'de oluşan mutasyon glisin rezidüsünü çoğunlukla serin, sistein, arjinin, asparajin, alanin ya da valine dönüştürür [85]. Prolin hariç glisin 12 pozisyonuna herhangi bir amino asitin gelmesi, Ras proteinini biyokimyasal olarak aktif hale getirir. Kodon 12 mutasyonu sonucu glisinin diğer amino asitlerle yer değiştirmesi, Ras proteininin GAP'lere dirençli hale gelmesine yol açar (Şekil 2.17) [75]. Ras'taki glisin değişikliklerinin tümü hücre transformasyonuna yol açmakla birlikte, farklı mutasyonların hücre morfolojileri üzerindeki etkilerinin farklı olduğu tayin edilmiştir. G12V ve G12R mutant formlar çok etkili transformasyon fenotiplere sahipken, G12S ve G12D mutantlarında bu etki daha az belirgindir [7].



Şekil 2.17. İnsan kanserlerinde görülen G12V ve Q61L mutasyonları GAP-uyarımli intrinzik GTP hidrolizini bozmaktadır [72]

Glutamin 61 ise GTP hidrolizi için esastır. Glutamik asit hariç bu pozisyondaki herhangi bir amino asit değişimi hidrolizi bloke eder [75]. Bu tür mutasyonlar, Ras proteininin GTP aktivelerini bozarak GAP'lere karşı direnç gelişimine neden olur ve GTP-bağlı formda kalan mutant proteinlerin hücrede birikimine yol açar [7]. Böylelikle, yabancı-tip Ras proteini zayıf GTPaz aktivitesine sahipken, mutanti birkaç kat daha güçlü katalitik aktiviteye sahip olmuş olur [69]. Bu sayede, onkogenik özellik kazanmış Ras proteinleri, aşağıdakiş efektör proteinlerinin denetimini ortadan kaldırarak yolağın normal dışı çalışmasına ve kanser hücrelerinin kontrolsüz hücre büyümesi, sağkalım, kontrolsüz farklılaşma ve apoptoza direnç gibi özellikler kazanmasına yol açarlar [7, 75].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Denek Grubu

Bu tez çalışmasında, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'na tanı amacıyla başvuran, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanısı konmuş 41'i benign tümör ve 59'u malign tümöre sahip toplam 100 meme kanserli kadın hasta birey ve 100 kontrol birey olmak üzere toplam 200 birey çalışma grubunu oluşturmuştur (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2). Çalışma için gerekli etik kurul izni, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 13/12/2012 tarihinde alınmıştır. İlgili kişilerden gönüllü onam formu imzalatılarak alınan 7-8 ml periferik kan, 10 cc'lik mor kapaklı EDTA'lı (Etilendiamintetraasetikasit) tüplere alınmıştır. Periferik kandan DNA izolasyonu işlemi, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yapılmıştır. PCR-RFLP işlemleri ise Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Anabilim Dalı'nda ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Deney materyal sayısı

Grup Adı	Sayı
Kontrol	100
Hasta	100
TOPLAM	200

Çizelge 3.2. Deneyde kullanılan meme kanserli bireylerin histopatolojik sınıflandırılması

BENİGN TÜMÖR	MALİGN TÜMÖRLER				
Fibroadenom	Duktal Karsinoma In Situ (DCIS)	Lobüler Karsinoma In Situ (LCIS)	İnvaziv Duktal Karsinoma	İnvaziv Lobüler Karsinoma	TOPLAM
41	12	-	45	2	100

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA izolasyonu

Araştırmaya dahil olan hasta ve kontrol bireylerinden toplanan periferik kanlardan, Miller tuz çöktürme yöntemi kullanılarak DNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi.

Miller tuz çöktürme yöntemi

1. Gün işlemi;

1. EDTA'lı tüp içerisinde bulunan 7-8 ml periferik kan, 15 ml'lik santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine soğuk distile su eklenerek 12 ml'ye tamamlandı ve 2-3 dk hızlı bir şekilde çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra 10 dk 2000 rpm'de oda ısısında santrifüj edildi.
2. Santrifügasyondan sonra, süpernant kısmı transfer pipet aracılığıyla atılarak pelet üzerine distile su ilave edilerek 12 ml'ye tamamlandı ve hızla çalkalandı. Tamamlama işleminden sonra 10 dk 2000 rpm'de santrifüj edildi.
3. Supernant kısım berrak bir görünüm alana kadar yaklaşık 4-5 kez bu işlem tekrarlandı. Amaç, tüm eritrositlerin parçalanarak ortamdan uzaklaşmasını sağlamaktır.
4. Supernant kısım berraklaştıktan sonra atılarak, pelet üzerine 3 ml nüklei lizis tamponu [1.576 g Tris-HCl (Tris Hidroklorikasit) (Sigma, Almanya), 23.4 g NaCl (Sodyum Klorür), 0.7 g Na₂EDTA (Disodyum Etilendiamin tetraasetik asit) 1 lt distile suda çözündürülür] eklendi ve 15-20 kez tüp alt-üst edildi. Bu sayede, DNAaz'lar inhibe edilir ve DNA çözünür, stabil kalması sağlanır.
5. Tüplere 150 µl proteinaz K (Applichem, Almanya) ve 200 µl %10'luk SDS (sodyum dodesil sülfat) (Applichem, Almanya) ilave edildi ve hafifçe alt-üst edildi. Bu amaçla, peptid bağlarının yıkılması sağlanarak proteinlerin denatürasyonu, DNaz'ların inhibisyonu ve membranların eritilmesi sağlanır.
6. 37°C'de bir gece etüvde inkübe edildi.

2. Gün işlemleri;

1. İnkübasyon işlemi sonrası tüpler 55°C'de 1 saat bekletildi.
2. Tüpler alt-üst edilerek üzerine 2 ml, 6 M amonyum asetat (148 g amonyum asetat 200 ml distile suda çözündürülür) (Amresco, ABD) eklendi ve hızlıca alt-üst edildi.
3. Tüpler 15 dk 3500 rpm'de santrifüj edildi.
4. Süpernant başka bir tüpe alındı ve üzerine 12 ml'ye kadar oda ısısında bulunan absolü etanol (Merck, Almanya) ilave edildi. Böylelikle, DNA'nın yoğunlaşması sağlandı.
5. Yoğunlaşan DNA görünür hale geldiğinde, mikropipet ucu aracılığıyla 500 µl distile su konan ependorf tüplere alındı ve 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözünmesi sağlandı.
6. İzole edilmiş DNA, moleküler analizler için -20°C'de saklandı.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile H-ras ve K-ras genindeki mutasyonların analizi

Elde edilen DNA'larla, H-ras geninin kodon 12 ve 61 bölgeleri ile K-ras geninin kodon 12 bölgesindeki mutasyonların araştırılması için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapılmıştır.

Seçilen ras genlerinin mutasyon analizi için kullanılan PZR bileşenleri; amonyum sülfatlı 10xTaq tampon çözeltisi (Fermentas, ABD), 2 mM dNTP (Deoksiribonükleotit trifosfatlar) karışımı (Fermentas, ABD), 25 mM MgCl₂ (Magnezyum klorür) (Fermentas, ABD), son konsantrasyonu 20 pmol/µl olacak şekilde seyreltilen Forward ve Reverse primerler (Fermentas, ABD), 5 U/µl, 500 U Taq DNA polimeraz (Fermentas, ABD) belirli oranlarda kullanılarak PZR şartları sağlanmış ve son hacim 22,5 µl olacak şekilde ddH₂O (Double-distile edilmiş su) ile tamamlanmıştır. PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarlar Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
10xTaq tampon çözeltisi	500 U	2,5 µl
dNTP	2 mM	2,5 µl
Forward primer	20 pmol/µl	0,8 µl
Reverse primer	20 pmol/µl	0,8 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl, 500 U	0,2 µl
DNA		2,5 µl
ddH ₂ O		14,2 µl
Toplam karışım		22,5 µl

3.2.3. Ras genlerinin değişiminde kullanılan PZR koşulları

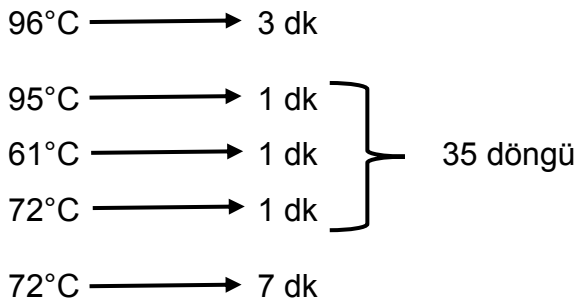
PZR'de kullanılan ras genlerine ait primer dizileri çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Ras genlerinin primer dizileri

Ras genleri	PRİMERLER
H-ras Codon 61	Primer F: 5' TGCCTGTTGGACATCCTGGATACCGCC 3' Primer R: 5' CTGGTGGATGTCCTCAAAAGACTTG 3'
H-ras Codon 12	Primer F: 5' AGGAGCGATGACGGAATATAAGC 3' Primer R: 5' GGCTCACCTCTATAGTGGGGTCGTATT 3'
K-ras Codon 12	Primer F: 5' TATAAAGTGTGGTAGTTGGAGCC 3' Primer R: 5' TCTATTGTTGGATCATATTCGTC 3'

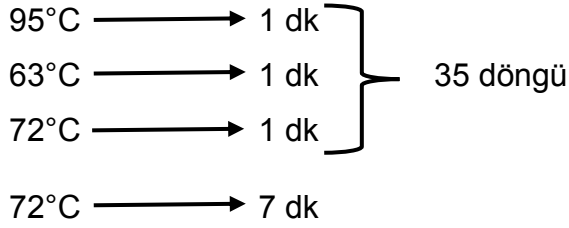
Ras genlerine ait polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık ve döngü koşulları;

H-ras kodon 12

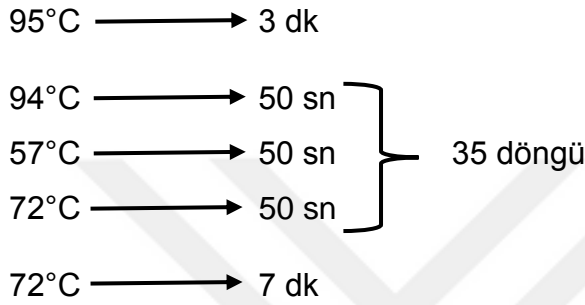


H-ras kodon 61

96°C → 3 dk



K-ras kodon 12



PZR sonrasında elde edilen çoğaltılmış oligonükleotidlerin gen ürün büyüklüğü ve dizileri Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. PZR sonrası elde edilen oligonükleotidlerin gen ürün büyüklüğü ve dizileri (primerler sarı renk, ilgili kodonlar kırmızı renkle gösterilmiştir)

Gen Adı	Ürün Büyüklüğü	Gen Dizisi
H-ras kodon 12	125 bç	AGGAGCGATGACGGAATATAAGCTGGTGG TGGTGGGCGCCGGC GGTGTGGGCAAGAG TGCCTGACCATCCAGCTGATCCAGAACC ATTTTGTGGACGAATACGACCCCACTATAG AGGTGAGCC
H-ras kodon 61	135 bç	TGCCTGTTGGACATCCTGGATACCGCCGG CCAGGAGGAGTACAGCGCCATGCGGGAC CAGTACATGCGCACCGGGGAGGGCTTCCT GTGTGTGTTTGCCATCAACAACACCAAGTC TTTTGAGGACATCCACCAG
K-ras kodon 12	101 bç	TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCT AATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT CCAACAATAGA

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Çalışmamızda, ras genlerinin ilgili bölgeleri için PZR ürünleri %3'lük agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. %3'lük agaroz jel hazırlarken 9 g agaroz (Amresco, ABD), 300 ml TBE 1X (Tris-base, Borik asit, EDTA) solüsyonu ile 300 ml'ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu eldesi için TBE 10X solüsyonunun 1/10 oranında ddH₂O ile seyreltilmesi gerekir. TBE 10X solüsyonunun hazırlanışı; 109 g Tris-base (Sigma, ABD), 55,6 g Borik asit (Merck, Almanya), 5,8 g EDTA (Merck, Almanya) ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır. %3 oranında hazırlanan agaroz, mikrodalga fırınında 7-8 dk kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra üzerine 15 µl etidyum bromid (Sigma, ABD) ilave edilerek homojen şekilde karıştırıldı ve jel tabağına döküldü. Jel tabağına uygun taraklar yerleştirildi ve polimerleşmesi için yaklaşık 45-50 dk beklendi. Polimerleşen jel, tabağıyla birlikte, içinde TBE 1X solüsyonu bulunan jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elde edilen PZR ürünlerinin değerlendirilebilmesi için GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas, ABD) marker kullanıldı. İstenilen uzunlukta çoğaltılan bölgelerin uzunluğunun doğruluğunu kontrol etmek için 5 µl PZR ürünü, 5 µl Orange G çözeltisi (3,232 g Na₂EDTA ve 200 mg Orange G, 60 ml gliserol ve 40 ml ddH₂O'da çözdürüldü) (Sigma, ABD) ile birlikte agaroz jel kuyucuklarına yüklendi. Yüklenen örnekler 120 V akımda 30-45 dk kadar yürütüldü. Transillüminatörde ultraviyole ışıkta jelin fotoğrafları çekildi.

3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PZR/RFLP) analizi

PZR bantları ile doğruluğu kanıtlanan ilgili gen ürünleri uygun restriksiyon endonükleaz enzimleriyle muamele edilerek kesimleri yapıldı. İlgili genler ve restriksiyon enzimleri çizelge 3.6'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Ras genleri ve restriksiyon enzimleri

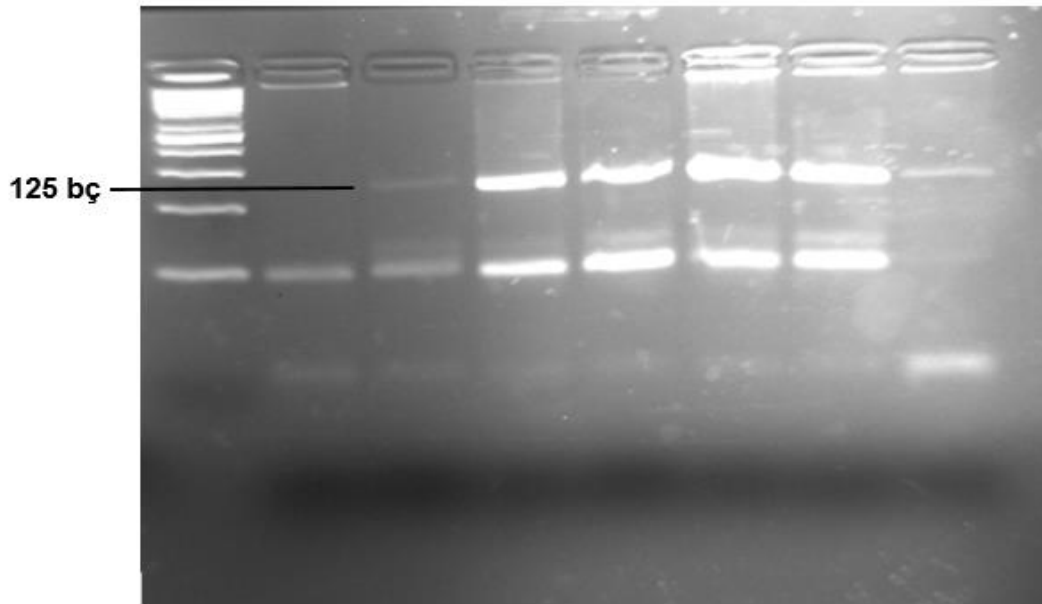
Ras Genleri	Restriksiyon Enzimleri
H-ras kodon 12	NaeI 1000 U (Fermentas, ABD)
H-ras kodon 61	EaeI 200 U (New England Biolabs, Birleşik Krallık)
K-ras kodon 12	MspI 3000 U (Fermentas, ABD)

Ras genlerinden elde edilen PZR ürünleri ile restriksiyon enzim karışımı bir ependorf tüpünde hazırlandı. Karışımın hazırlanışı; 9,5 µl ddH₂O, 2,5 µl enzim buffer, 1,5 µl ilgili enzim ve 12,5 µl PZR ürünü ependorf tüpüne eklendi. Kısa süre santrifüj edildikten sonra 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra elektroforezde 120 V'de 30-40 dk yürütüldü ve transillüminatörde jel görüntülenerek fotoğraflandı.

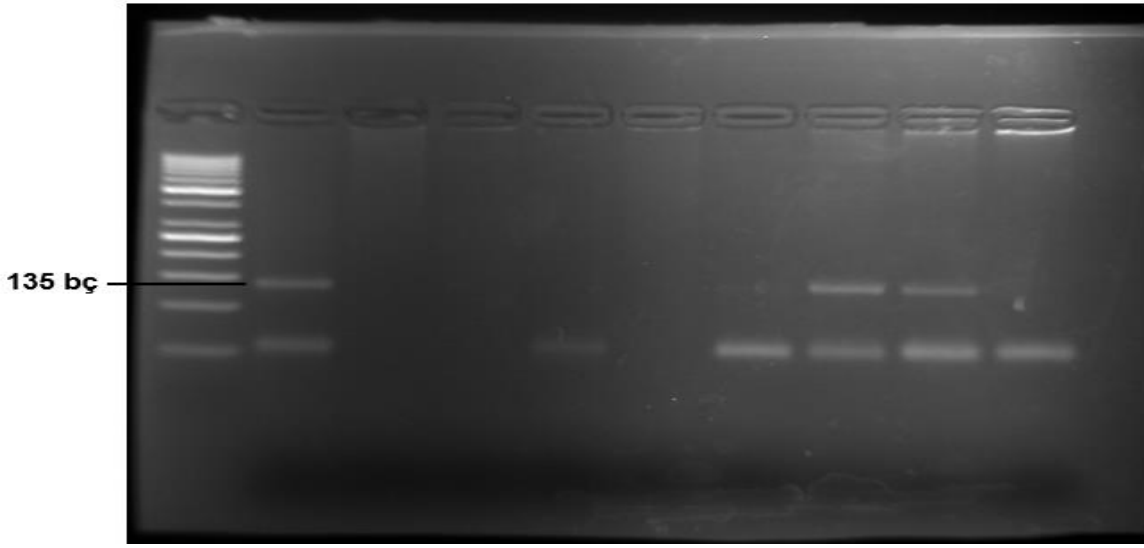
3.3. Araştırma Bulguları

3.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu bulguları

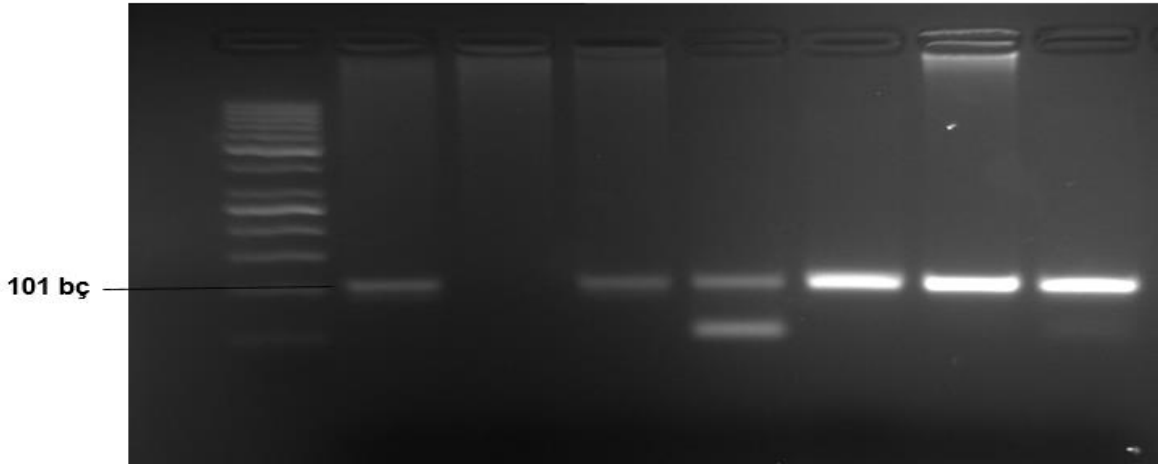
Hasta ve kontrol gruplarının DNA moleküllerinin ilgili gen bölgeleri PZR yöntemiyle çoğaltıldıktan sonra %3'lük agaroz jelde elektroforez yöntemiyle kontrolü sağlandı (Şekil 3.1, 3.2, 3.3).



Şekil 3.1. H-ras kodon 12 (125 bç) genine ait bölgenin PZR ürününün %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 3.2. H-ras kodon 61 (135 bç) genine ait bölgenin PZR ürününün %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü



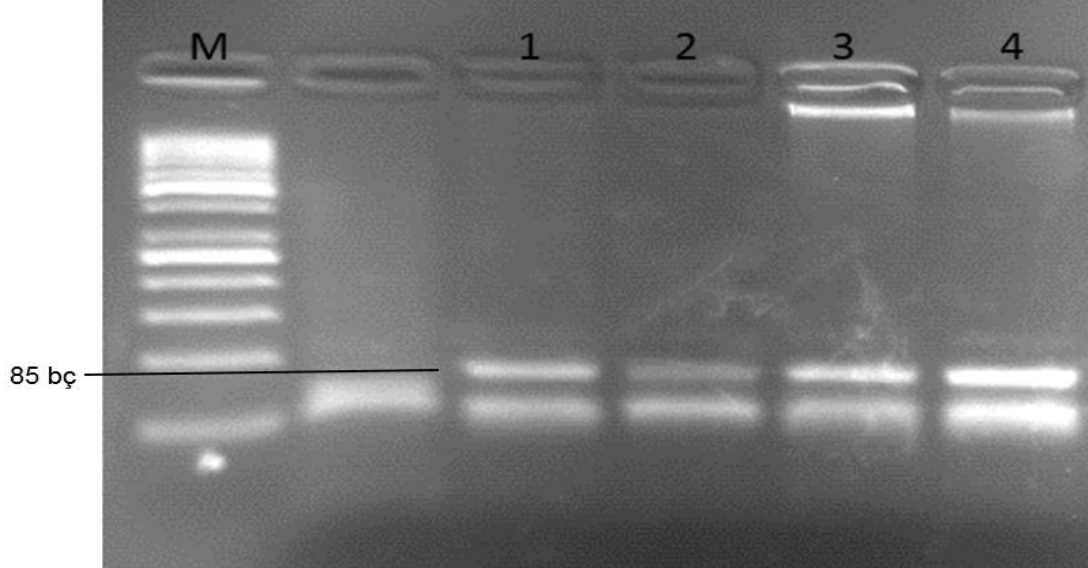
Şekil 3.3. K-ras kodon 12 (101 bç) genine ait bölgenin PZR ürününün %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü

3.3.2. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) sonuçları

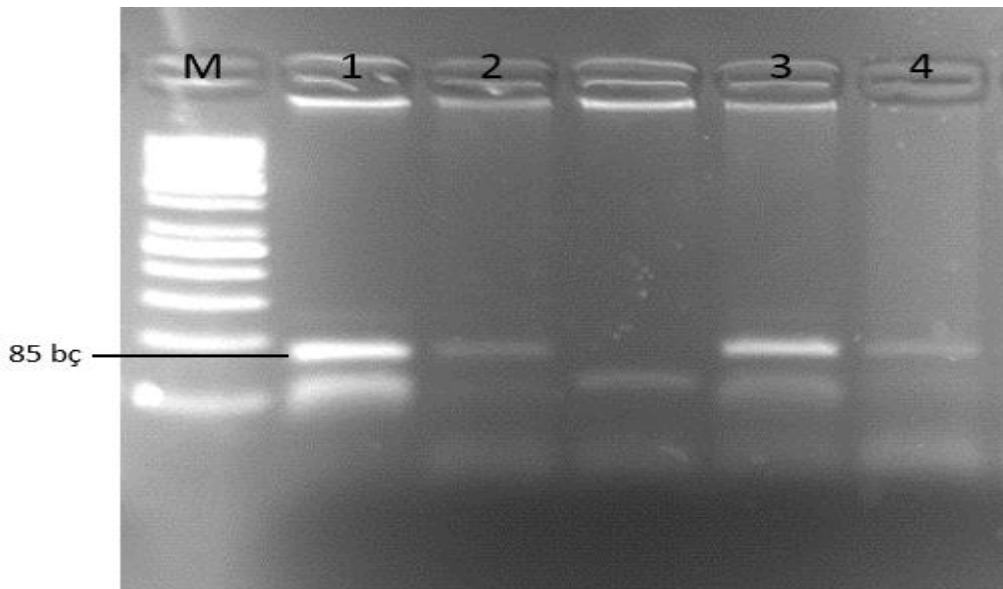
PZR sonucu görüntülenen gen bölgeleri, ilgili enzimlerle muamele edilerek kesimleri yapıldı ve bant profilleri görüntülendi.

H-ras geninin kodon 12 bölgesindeki mutasyonun saptanması için *NaeI* restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. Kesim sonucu homozigot yabani tip genotip gösteren bireylerde 85 ve 40 bç'lik iki bant, heterozigot genotip gösteren bireylerde 125, 85 ve 40 bç'lik üç bant, homozigot mutant genotip gösteren

bireylerde ise sadece 125 bç'lik tek bant gözlenecektir. Deney sonucu, H-ras kodon 12'de herhangi bir mutasyon saptanmadı (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).

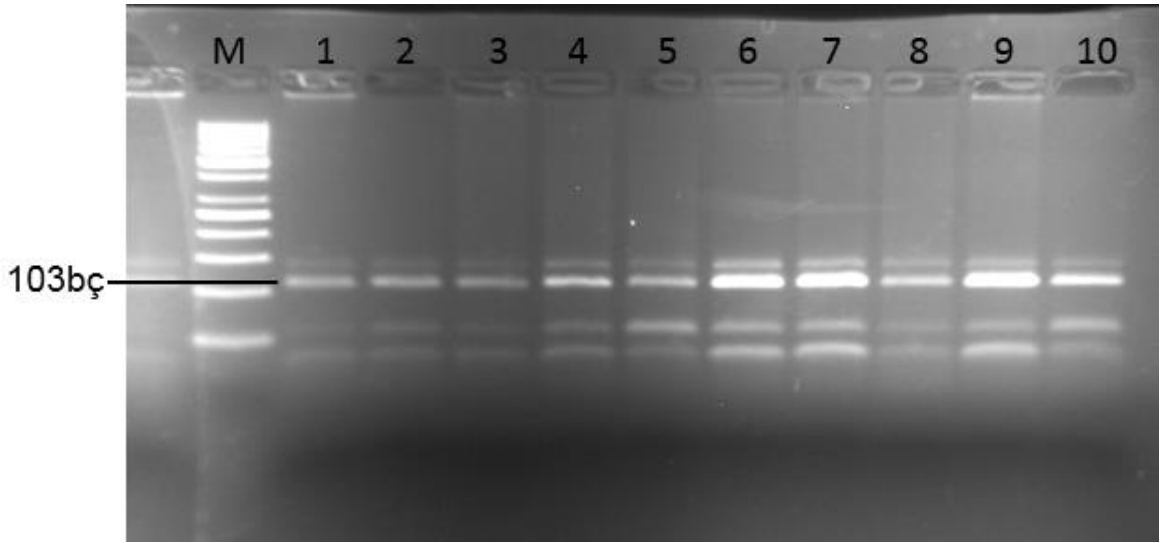


Şekil 3.4. H-ras kodon 12 bölgesinin *NaeI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü. M→Marker, *NaeI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilmiş 1→ normal birey (85bç) 2,3→ fibroadenomlu birey (85 bç), 4→DCIS (85 bç) sahip meme kanserli hasta birey



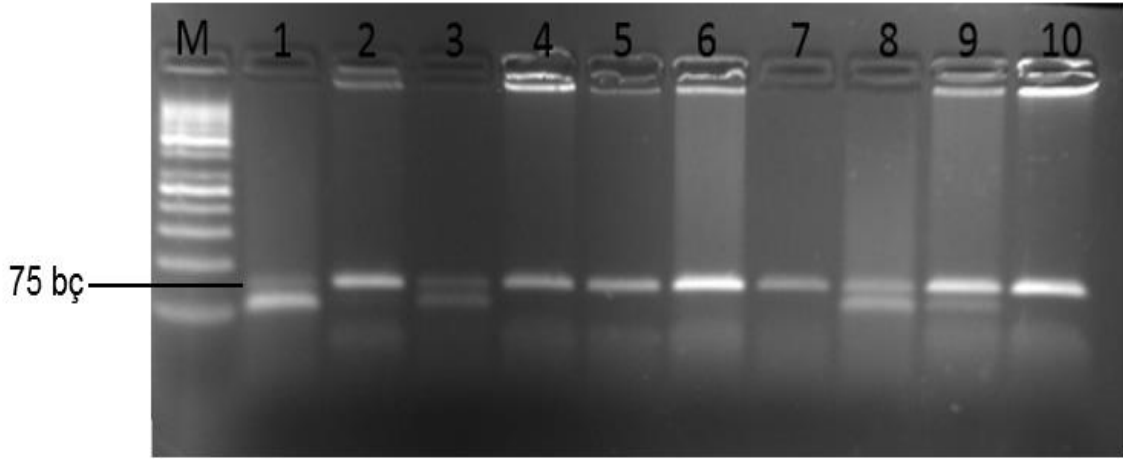
Şekil 3.5. H-ras kodon 12 bölgesinin *NaeI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü. M→Marker, *NaeI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilmiş 1,2,3→invaziv duktal karsinoma (85 bç), 4→invaziv lobüler karsinoma (85 bç) sahip meme kanserli hasta birey

H-ras geninin kodon 61 bölgesindeki mutasyonun saptanması için *EaeI* restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. Kesim sonucu homozigot yabancıl tip genotip gösteren bireylerde 103 ve 32 bç'lik iki bant, heterozigot genotip gösteren bireylerde 135, 103 ve 32 bç'lik üç bant, homozigot mutant genotip gösteren bireylerde ise sadece 135 bç'lik tek bant gözlenecektir. Deney sonucu, H-ras kodon 61'de herhangi bir mutasyon saptanmadı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. H-ras kodon 61 bölgesinin *EaeI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agarozel görüntüsü. M→Marker, *EaeI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilmiş 1,2→ normal bireyler (103 bç), 3,4,5→ fibroadenomlu bireyler (103 bç), 6,7→DCIS (103bç), 8,9→invaziv duktal karsinoma, 10→invaziv lobüler karsinoma (103bç) sahip meme kanserli hasta bireyler

K-ras geninin kodon 12 bölgesindeki mutasyonun saptanması için *MspI* restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. Kesim sonucu homozigot yabancıl genotip gösteren bireylerde 75 ve 26 bç'lik iki bant, heterozigot genotip gösteren bireylerde 101, 75 ve 26 bç'lik üç bant, homozigot mutant genotip gösteren bireylerde ise sadece 101 bç'lik tek bant gözlenecektir. Deney sonucu, K-ras kodon 12'de herhangi bir mutasyon saptanmadı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. K-ras kodon 12 bölgesinin *MspI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü. M→Marker, *MspI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edilmiş 1,2→ normal bireyler (75 bç), 3,4,5→ fibroadenomlu bireyler (75 bç), 6,7→DCIS (75 bç), 8,9→ invaziv duktal karsinoma, 10→invaziv lobüler karsinoma (75 bç) sahip meme kanserli hasta bireyler

PCR-RFLP sonucu H-ras kodon 12 ve 61 ile K-ras kodon 12'nin farklı tip meme kanserli bireylerdeki durumu, Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. H-ras kodon 12 ve kodon 61 ile K-ras kodon 12'nin PCR-RFLP ürünleri

Gen		Enzim	Yabanıl tip	Mutant tip
H-ras kodon 12	Fibroadenom (41 birey)	<i>NaeI</i>	85 bç ve 40 bç	Yok
	DCIS (12 birey)	<i>NaeI</i>	85 bç ve 40 bç	Yok
	İnvaziv duktal karsinom (45 birey)	<i>NaeI</i>	85 bç ve 40 bç	Yok
	İnvaziv lobüler karsinom (2 birey)	<i>NaeI</i>	85 bç ve 40 bç	Yok
H-ras kodon 61	Fibroadenom (41 birey)	<i>EaeI</i>	103 bç ve 32 bç	Yok
	DCIS (12 birey)	<i>EaeI</i>	103 bç ve 32 bç	Yok
	İnvaziv duktal karsinom (45 birey)	<i>EaeI</i>	103 bç ve 32 bç	Yok
	İnvaziv lobüler karsinom (2 birey)	<i>EaeI</i>	103 bç ve 32 bç	Yok
K-ras kodon 12	Fibroadenom (41 birey)	<i>MspI</i>	75 bç ve 26 bç	Yok
	DCIS (12 birey)	<i>MspI</i>	75 bç ve 26 bç	Yok
	İnvaziv duktal karsinom (45 birey)	<i>MspI</i>	75 bç ve 26 bç	Yok
	İnvaziv lobüler karsinom (2 birey)	<i>MspI</i>	75 bç ve 26 bç	Yok

RFLP sonucu gen değişimi saptanan bireylerin mutasyon tipini belirlemek için sekans analizi yapılacaktır. Ancak, herhangi bir mutasyon saptanmadığı için sekans analizi yapılmadı.

3.3.3. İstatistiksel analiz

Çalışmamızda hastalar ve kontroller arasındaki genotip karşılaştırması, IBM SPSS 22.0 paket programı ile ki-kare testi uygulanarak yapılmıştır. Sonuçta, H-ras kodon 12, H-ras kodon 61 ve K-ras kodon 12 bölgesinde herhangi bir değişiklik söz konusu olmadığından istatistikleri hesaplanamadı (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. H-ras kodon 12 ve 61 ile K-ras kodon 12 ki-kare testi sonuçları

Gen	Kodon	Grup Adı		Toplam
		Kontrol	Hasta	
H-ras kodon 12	GGC	100 (%100)	100 (%100)	200 (%100)
H-ras kodon 61	CAG	100 (%100)	100 (%100)	200 (%100)
K-ras kodon 12	GGT	100 (%100)	100 (%100)	200 (%100)

Genotiplerde herhangi bir değişim saptanmadığından dolayı allel frekansları ve popülasyon denge durumu Hardy Weinberg dengesi ile belirlenemedi.





4. TARTIŞMA

Meme kanseri konusunda farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda ras genlerindeki mutasyonel aktivasyon incelenmiştir. Ras çeşitli hücrel sinyal iletim yollarını yöneten intrinik GTPaz aktivitesine sahip küçük G proteinler ailesinin bir üyesidir. Ras genleri çoğunlukla kanser biyolojisiyle ilişkili en önde gelen genler arasındadır. Gen içindeki çeşitli nokta mutasyonları sonucu ras proteininin fonksiyonel kaybı, temelde kansere yol açan aktif Ras-MAPK yolağının oluşumundan dolayı prognostik faktör olarak kabul edilmektedir [91]. Son otuz yılda farklı insan tümörlerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, ras onkojenik mutasyonu için iki sıcak nokta olan, son derece korunmuş kodlayıcı diziler olan kodon 12 ve 61 bölgeleri tanımlanmıştır [10]. Bundan dolayı, biz de Türk popülasyonundaki meme kanserli kadınların H-ras kodon 12 ve 61 ile K-ras kodon 12 bölgelerindeki mutasyonların sıklığını belirledik. Sonuçta, H-ras kodon 12 (%0) ve 61 (%0) ile K-ras kodon 12 (%0) bölgelerinde herhangi bir mutasyon saptanmadı.

Meme kanserlerinde H-ras mutasyonu %1, K-ras mutasyonu ise %5 sıklıkta görülmektedir [81]. Bugüne kadar yapılan farklı çalışmalarda bu oran çeşitlilik gösterebilmektedir. Rochlitz ve ark. (1989) tarafından Kaliforniya'da yapılan bir çalışmada, 40 primer tümörden birinde K-ras kodon 13 mutasyonu (%3), 9 metastatik efüzyondan birinde K-ras kodon 12 mutasyonu (%11) ve 5 hücre hattından ikisinde K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonu (%40) saptanmıştır. Bu çerçevede, ras gen mutasyonlarının insan meme kanserinin inisiyasyon ya da metastatik progresyonunda nadir olarak ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır [16]. Bununla birlikte, Hollestelle ve ark. (2007)'nin Hollanda'da yaptıkları hücre hattı çalışmasında da, 40 farklı insan meme kanser hücre hatlarında, tümör formasyonunda önemli olan PTEN, PIK3CA, KRAS, HRAS, NRAS ve BRAF gen mutasyonları araştırılmış ve 40 hücre hattından 7'sinde (%18) sekiz etkili RAS gen mutasyonları saptanmıştır. Bu hücre hatlarından beşinde farklı KRAS (G12C, G12D, G12R, G12V (%10) ve G13D (%1)) (%12,5), ikisinde HRAS G12D (%5) ve birinde NRAS Q61R mutasyonu (%2,5) bulunmuştur [19]. Bu çalışmalara ek olarak, Amerika'da yapılan başka bir in vitro çalışmada ise, Roy ve ark. (2003)

insan meme epitelyal hücre hattının radyasyon-uyarımlı neoplastik transformasyon süresince H-ras kodon 12 ve kodon 61 mutasyonları araştırılmış ve kontrol hücre hattıyla karşılaştırıldığında farklı dozlarda uyarılmış hücre hatları ile hem radyasyon ile uyarılmış hem de 17 β -estradiol uygulanmış hücre hatlarında H-ras kodon 12 ve kodon 61'de çeşitli tiplerde nokta mutasyonlarının varlığı tespit edilmiştir. Deney sonucunda, radyasyon-uyarımı ile H-ras genindeki tek nokta mutasyonların anormal ekspresyonlara neden olarak neoplastik sürecin ve insan meme malignensilerinin gelişimine katkı sağladığı sonucuna varılmıştır. İlâveten, östrojenle H-ras'ın transkripsiyonel regülasyonun meme kanserinin progresyonunda rol oynayabileceği fikri ortaya atılmıştır [18]. Yapılan in vitro deneylere göre, oran oldukça yüksektir. Özellikle, Rochlitz ve ark. (1989) ile Hollestelle ve ark. (2007)'nin yaptıkları çalışmada K-ras kodon 12 mutasyon sıklıkları sırasıyla %20 ve %10 oranında çıkmıştır. Hollestelle ve ark. (2007) yaptıkları çalışmadaki H-ras kodon 12 mutasyon sıklığı ise %5 oranında çıkmıştır. In vitro çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, özellikle K-ras kodon 12'nin meme kanser gelişiminde etkili olabileceği, H-ras kodon 12'nin ise kısmen etkili olabileceği fikrini akla getirebilmektedir.

In vitro çalışmalardan sonra, yapılan in vivo çalışmalarda ise oran ilginç bir şekilde değişmektedir. Yunanistan'da Miyakis ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, 61 insan sporadik meme kanser tümör örneğinde K-ras kodon 12 mutasyonu analiz edilmiştir. 61 tümör örneğinden 4'ünde (%6,5) K-ras kodon 12 mutasyonu saptanmıştır. Çalışma sonucunda, K-ras kodon 12 nokta mutasyonu ve klinikopatolojik parametreler arasında bir korelasyon olamayacağı fikri öne sürülmüştür [6]. Bununla birlikte, Yunanistan'da yapılan benzer diğer bir çalışmada Koffa ve ark. (1994), parafin-gömülü 65 primer meme karsinomlu doku parçası örneklerinden yaptığı K-ras ve H-ras kodon 12 mutasyon çalışmasında, 65 tümör örneğinden 8'inin (%12,3) K-ras kodon 12 mutasyonu taşıdığını ancak H-ras mutasyonu taşımadığını bulmuştur. Sonuçta, K-ras mutasyonunun meme tümör gelişmesiyle düşük yüzdeli de olsa ilişkili olabileceği varsayılmıştır. Ayrıca, bu mutasyonların evre II ve evre III (daha yüksek insidansla)'lü tümörlerde dikkate değer olduğu vurgulanmıştır [17]. Koffa ve ark. (1994) tarafından yapılan çalışmadan elde edilen oran (%12,3), Hollestelle ve ark. (2007) yaptıkları in vitro çalışmadaki orana (%10) yakın değerdedir. Miyakis ve ark. (1998) ve Koffa ve ark.

(1994)'nın yaptıkları çalışmalar, Yunan popülasyonunda meme kanserinde K-ras kodon 12 mutasyon oranını, yaklaşık olarak %5-15 civarında değişiklik gösterebildiğini ortaya koymuştur. Hollestelle ve ark. (2007)'nin in vitro çalışmadaki H-ras kodon 12 mutasyon oranı %5 iken, Koffa ve ark. (1994)'nin in vivo çalışmasında herhangi bir mutasyon gözlemlenmemiştir. Türkiye ile Yunanistan arasındaki coğrafi yakınlık baz alındığında Yunanistan'daki orana yakın bir değer Türkiye içinde düşünmek kaçınılmazdır. Ancak, Miyakis ve ark. (1998) Koffa ve ark. (1994) bulgularına zıt olarak, çalışmamızda H-ras kodon 12 ve 61 ile K-ras kodon 12'de herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir.

Tong ve ark. (2012)'nin Çin'de, Çinli meme kanserli hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada 120 vakadan tümör örnekleri toplanmıştır. PIK3CA, AKT1, BRAF, EGFR, HRAS ve KRAS genlerinden 22 mutasyon türünün çalışılması hedeflenmiştir. Deney sonucu 120 örnekten 3'ünde (%2,5), biri invaziv duktal meme karsinomada evre I KRAS G12C (%0,83), diğeri evre II KRAS G13D ve sonuncusu evre III olmak üzere KRAS G13D mutasyonu tanımlanmıştır. HRAS geninde mutasyona rastlanılmamıştır [22]. Bununla birlikte, Lv ve ark. (2012)'nin Çin'de yaptıkları benzer bir çalışmada ise, meme kanserli Çin'li kadınlardan 143 FFPE tümörü toplanmış ve EGFR, KRAS gen mutasyonları araştırılmıştır. Sonuçta, 143 hastadan 1'inde (%0,7) KRAS Gly12Asp mutasyonu tespit edilmiştir [21]. Örnek sayısında yaklaşık 2 kat artış olmasına rağmen, Yunanistan'da yapılan çalışmalara göre [6, 17] oranın ciddi şekilde düşük çıkması, etiyolojik farklılıkların meme kanserinde ras gen mutasyonlarını etkileyebileceği fikrini ortaya koymuştur. Çin popülasyonunda oldukça düşük yüzdeli de olsa ras gen mutasyonu meme kanser gelişiminde etkili olabilmektedir. Ancak, çalışmamıza göre Türk popülasyonunda bu durumdan söz etmek şu an için mümkün görünmemektedir.

Meme kanserinde ras gen mutasyon çalışmaları 2010 yılından itibaren yelpazesini biraz daha genişleterek, histopatolojik, prognostik ve prediktif (hastalığın seyrini etkileyen ve presemptomatik) faktörler açısından benzer tümör örnekleri arasında mutasyon taramaları yapılmaya başlanmıştır. Sánchez-Muñoz ve ark. (2010) tarafından İspanya'da yapılan çalışmada, 35 FFPE triple-negatif meme tümörlerinde EGFR ve KRAS Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Ser, Gly12Val ve Gly13Asp mutasyonel durumları analiz edilmiştir ve analiz

edilen tümörlerin hiçbirinde KRAS onkojenik mutasyonuna rastlanılmamıştır [20]. Almanya'da Grob ve ark. (2012)'nin yaptıkları benzer örnekle çalışmada ise, 65 triple-negatif meme kanser vakasından elde edilen tümör örneklerinde, hedeflenebilir terapide prediktif marker olabileceğini düşündüğü EGFR, KRAS ve BRAF mutasyonları araştırılmıştır. Ancak, herhangi bir mutasyon saptanmamıştır [23]. Bu çalışmalar ile triple-negatif meme tümörlerinde ras gen mutasyonlarının etkili olmadığı sonucuna varılabilmektedir. Tilch ve ark. (2014) Avustralya'da Kafkas kadınlar üzerinde meme kanseri genetiği ile ilgili yaptıkları çalışmada, 50 bazal-benzeri ve 57 triple-negatif olmak üzere toplam 107 meme kanseri tümörlerinde, içlerinde KRAS ve NRAS'ında olduğu toplam 19 onkogende 238 hedef mutasyon araştırmışlardır. Yaptıkları araştırmaya göre, 107 hastadan bazal-benzeri olanların birinde KRAS G12C (%0,9) değerinde ise NRAS G13R (%0,9) olmak üzere toplam iki mutasyon bulunmuştur [25]. Sánchez-Muñoz ve ark. (2010), Grob ve ark. (2012) ve Tilch ve ark. (2014) yaptıkları çalışmalar sonucunda, triple-negatif meme tümörlerinde yine herhangi bir mutasyon saptanmamış ancak bazal-benzeri tümörlerde düşük yüzdeli de olsa bir mutasyon varlığı göze çarpmaktadır. Bu literatürlerden elde edilen bilgiler ışığında, prognostik ve prediktif faktörler açısından farklılık gösteren patolojik olarak farklı tümörlerde, farklı gen ekspresyon profillerinin ras geninde mutasyonel aktivasyona yol açabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak, Pereira ve ark. (2013)'nin Brezilya'da yaptıkları araştırmada, neoadjuvan kemoterapi tedavisi geçirmiş meme kanserli hasta kadınlarda hormon reseptör ekspresyonu, HER2 ve MYC genleri ile protein durumları ve KRAS kodon 12 mutasyonları değerlendirilerek, meme kanseri için prognostik veya prediktif marker bulabilmeyi amaçlamışlardır. 116 ileri evre invaziv duktal karsinomaya sahip kadın bireylerden tümör örnekleri toplanılmıştır. Mutasyonel analizler sonucunda, KRAS mutasyonu 1/49 (%2) luminal A'da, 1/5 (%20) luminal B'de, 4/23 (%17,4) HER2 aşırı eksprese edilmiş tümörlerde ve 3/39 (%7,7) triple-negatif tümörlerde tanımlanmıştır. Sonuç olarak, KRAS mutasyonunun evre 3 tümörlerde bir risk faktörü olduğu, aynı zamanda KRAS kodon 12 mutasyonlarına sahip meme tümörlerinde kötü prognoz varlığına işaret ettiği ve HER2 aşırı ekspresyonuyla ilişkili olduğu ifade edilmiştir [24]. Daha önce yapılan çalışmalardaki raporlardan elde edilen verilere göre meme kanserinde K-

ras mutasyonunun sıklığı %5 iken, Pereira ve ark. (2013)'nin Brezilya popülasyonundaki yaptıkları çalışmada K-ras mutasyon oranı %7,76 olarak bulunmuştur. Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalara göre [20, 23, 25], triple-negatif tümörde görülen artış, etiyolojik farklılıkların önemli olduğu fikrini desteklemektedir. Çalışmamız açısından yapılan araştırma değerlendirildiğinde, luminal A, luminal B, HER2 ve triple-negatif tümörlere sahip hastalarımızda herhangi bir mutasyonun varlığı söz konusu değildir ancak hastalarımız herhangi bir kemoterapiye maruz kalmamıştır. Pereira ve ark. (2013) ve Roy ve ark. (2003)'nin yaptıkları çalışmaların ışığı altında, ileri evre meme kanserli, kemoterapi ve radyoterapi alan hastalarda ras gen mutasyon araştırmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Yaptığımız bu çalışma ile Türk popülasyonundaki meme kanseri hastalarının, histopatolojik olarak ayrımı yapılarak, iki sıcak nokta olan H-ras kodon 12 ve 61 ile K-ras kodon 12'de mutasyon taramaları yapılmış ve herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir. Bunun farklı sebepleri olabilir. Birincisi, çalışma kapsamına alınan meme kanserli bireylerin sayısıdır. Hasta sayısının artırılması, ilgili mutasyonun gözlenebilme sıklığını artıracaktır. İkincisi, hasta bireylerin, bir proto-onkogenin onkogene dönüşümünde etkili olan karsinojenler, mutajenler, radyasyon gibi çevresel faktörlere maruz kalma süreleridir. Maruziyet süresinin uzunluğu ile ras geninde çeşitli değişimler görülebilecektir. Ancak, çalışma kapsamına alınan hastalarımızda böyle bir hikaye olmadığı için, ras geninde mutasyon olma olasılığı azaldığından, mutasyon görülememiş olabilir. Buna ek olarak, ileri yaş ile maruziyet süresi arttığından, ras proto-onkogeninin transformasyonu gerçekleşebilecektir. Bundan dolayı, çalışmamızda daha ileri yaşta meme kanserli kadınların (>59 yaş) sayısını daha da artırabilseydik, ras geninde muhtemelen mutasyon saptayabilirdik. Üçüncüsü, bireyler arasındaki genetik yapı farklılıklarından kaynaklı, ras proto-onkogeninin onkogene dönüşümünün farklı olabilmektedir.

Sonuç olarak, Türkiye'de meme kanseri ile ras gen değişimleri arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmamız ile Türk popülasyonundaki ras gen profilleri açığa çıkartılmıştır. Bununla birlikte, yaptığımız bu çalışma dışında, daha önceden yapılan meme kanser genetiği araştırmalarında H-ras kodon 61 bölgesinde

mutasyon incelemesinin yapılmamış olması, çalışmanın literatüre katkısını da ortaya koymaktadır. Bu bakımdan, daha sonra bu alanda çalışma yapacak araştırmacılar için bir araştırma kaynağı olma özelliği taşıyacak olmasının da önemli olduğunu düşünmekteyiz.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Meme karsinomu için en önemli risk faktörleri hormonal ve genetik risktir. Genetiksel risk faktörlerinin araştırılması ve hastalığın patolojisinin aydınlatılabilmesi için meme kanseriyle ilişkili birçok gen tanımlanmıştır. Çalışmamızda bizde, bu tanımlanan genlerden biri olan ras gen ailesinden H-ras ve K-ras genlerindeki değişimleri araştırdık.

Çalışmamızda, 100 sağlıklı kontrol, 41 fibroadenoma, 12 duktal karsinoma in situ, 45 invaziv duktal karsinoma, 2 lobüler karsinoma olmak üzere toplam 200 bireyde H-ras kodon 12 ve kodon 61 ile K-ras kodon 12 meydana gelen mutasyonları, PCR-RFLP yöntemi kullanılarak araştırıldı. H-ras kodon 12 ve 61 ile K-ras kodon 12'de herhangi bir mutasyon tespit edilemediğinden istatistiksel olarak "p" değeri bulunamadı.

Meme kanser gelişimi çeşitli genetik ve çevresel faktörlerle ilişkili olduğundan meme kanseri heterojen bir hastalık olduğundan, başka ülkelerde yapılan çalışmalarla ilgili populasyonların meme kanserindeki ras genlerine ait gen profilleri açığa çıkartılarak farklılıklar ve benzerlikler ortaya konulmuştur. Bu çalışma sonucunda, Türk populasyonunda meme kanseriyle ilişkili H-ras kodon 12 ve 61 ile K-ras kodon 12 gen profilleri belirlenerek populasyon karşılaştırması açısından yerini almıştır. Bu sayede, kanser terapisine yönelik mutant ras proteinlerini (onkojenik) hedefleme stratejilerine yardımcı olabilecektir.

Birçok çalışmada mutant ras gen formu bulunmamasına karşın, aktif Ras proteinin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Bundan dolayı, meme kanseriyle Ras ilişkisinin aydınlatılması açısından hasta sayılarının artırılarak ras genine ait epigenetik değişimlerin, ras genlerinin diğer kodonlarının, ras ekspresyonunu arttıracak faktörlerin, ras geni ile etkileşen mikroRNA ekspresyon düzeylerinin ve Ras proteini ile etkileşen diğer proteinlerin incelenmesi yararlı olabilecektir. Buna ek olarak, meme kanser gelişimi, çeşitli onkogenlerin (HER2/neu, Myc gibi) ve tümör baskılayıcı genlerin (p53, BRCA1 gibi) değişimiyle meydana gelen

multifaktöriyel bir süreci kapsadığından diğer genlerle ilişkisinin de araştırılması, gelecek çalışmalara ışık tutabilmesi açısından oldukça önemlidir.



KAYNAKLAR

1. İnternet: The Breast Cancer Landscape. Department of Defense Breast Cancer Research Program. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fcdmrp.army.mil%2Fbc-rp%2Fpdfs%2Fbc_landscape13.pdf&date=2015-09-01, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.
2. Özmen, V. (2008). *Breast cancer in the world and Turkey. **The Journal of Breast Health***, (4), 7-12.
3. Sasieni, P.D., Shelton, J., Ormiston-Smith, N.J., Thomson, C.S., Silcocks, P.B. (2011). *What is the lifetime risk of developing cancer?: The effect of adjusting for multiple primaries. **British Journal of Cancer***, (105), 460-465.
4. İnternet: Breast cancer risk factors. Cancer Research UK. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.cancerresearchuk.org%2Fcancer-info%2Fcancerstats%2Ftypes%2Fbreast%2Friskfactors%2Fbreast-cancer-risk-factors&date=2016-01-09>, Son Erişim Tarihi 09.01.2016.
5. İnternet: Breast Cancer Risk Factors. BreastCancer.org. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.breastcancer.org%2Frisk%2Ffactors&date=2016-01-09>, Son Erişim Tarihi 09.01.2016.
6. Miyakis, S., Sourvinos, G., Spandidos, D.A. (1998). *Differential expression and mutation of the ras family genes in human breast cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications***, (251), 609-612.
7. Telkoparan, P., Tazebay, U.H. (2011). *Ras protein ailesi: hücresel işlevi, moleküler kontrolü, onkogenezdeki rolü. **Türk Biyokimya Dergisi***, 36(4), 367–373.
8. Onat, T., Emerk K., Sözmen E.Y. (2006). *İnsan biyokimyası (İkinci baskı)*. Ankara: Palme Yayıncılık, 720-721.
9. Başaran, N. (2003). *Tıbbi genetik ders kitabı (Sekizinci baskı)*. İstanbul: Güneş&Nobel Tıp Kitapevi, 375-376.
10. Fernández-Medarde, A., Santos, E. (2011). *Ras in cancer and developmental diseases. **Genes & Cancer***, 2(3), 344 –358.
11. Kim, Y.C., Park K.O., Kern, J.A., Park, C.S., Lim, S.C., Jang, A.S., Yang, J.B. (1998). *The interactive effect of ras, HER2, p53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients. **Lung Cancer***, (22), 181–190.
12. Özkan, A. (2009). *Pediyatrik onkoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 113-127.

13. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. (2011). *Moleküler hücre biyolojisi (Altıncı Baskı)*. (Çev. H. Geçkil, M. Özmen, Ö. Yeşilada). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2007'de yayımlandı), 633-634, 682, 623-624, 634, 686-687, 633.
14. Lintig, F.C., Dreilinger, A.D., Varki, N.M., Wallace, A.M., Casteel, D.E., Boss G.R. (2000). *Ras activation in human breast cancer*. **Breast Cancer Research and Treatment**, (62), 51–62.
15. Eckert, L.B., Repasky G.A., Ülkü A.S. et al. (2004). *Involvement of ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis*. **Cancer Research**, (64), 4585-4592.
16. Rochlitz, C.F., Scott, G.K., Dodson, J.M. et al. (1989). *Incidence of Activating ras Oncogene Mutations Associated with Primary and Metastatic Human Breast Cancer*. **Cancer Research**, (49), 357-360.
17. Koffa, M., Malamou-Mitsi, V., Agnantis, N.J., Spandidos, D.A. (1994). *Mutational activation of K-ras oncogene in human breast tumors*. **International Journal of Oncology**, (4), 573-576.
18. Roy, D., Calaf, G., Hei, T.K. (2003). *Allelic imbalance at 11p15.5–15.4 correlated with c-ha-ras mutation during radiation-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells*. **International Journal of Cancer**. (103), 730-737.
19. Hollestelle, A., Elstrodt, F., Nagel, J.H.A. et al. (2007). *Phosphatidylinositol-3-OH kinase or ras pathway mutations in human breast cancer cell lines*. **Molecular Cancer Research**, (5), 195-201.
20. Sánchez-Muñoz, A., Gallego, E., Luque, V., Pérez-Rivas, L., Vicioso, L., Ribelles, N. et al. (2010). *Lack of evidence for KRAS oncogenic mutations in triple-negative breast cancer*. **BMC Cancer**, 10(136), 1-9.
21. Lv, N., Lin, S., Xie, Z., Tang, J., Ge, Q., Wu, M. et al. (2012). *Absence of evidence for epidermal growth factor receptor and human homolog of the Kirsten rat sarcoma-2 virus oncogene mutations in breast cancer*. **The International Journal of Cancer Epidemiology, Detection, and Prevention**, (36), 341-346.
22. Tong, L., Yang, X.X., Liu, M.F., Yao, G.Y., Dong, J.Y., Ye, C.S. et al. (2012). *Mutational Analysis of Key EGFR Pathway Genes in Chinese Breast Cancer Patients*. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 13(11), 5599-5603.
23. Grob, T.J., Heilenkötter, U., Geist, S., Paluchowski, P., Wilke, C., Jaenicke, F. et al. (2012). *Rare oncogenic mutations of predictive markers for targeted*

- therapy in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, (134), 561-567.
24. Pereira, C.B.L., Leal, M.F., Souza, C.R.T., Montenegro, R.C., Rey, J.A., Carvalho, A.A. et al. (2013). *Prognostic and predictive significance of Myc and Kras alterations in breast cancer from women treated with neoadjuvant chemotherapy*. **Plos One**, 8(3), 1-9.
 25. Tilch, E., Seidens, T., Cocciardi, S., Reid, L.E., Byrne, D., Simpson, P.T. et al. (2014). *Mutations in EGFR, BRAF and RAS are rare in triple-negative and basal-like breast cancers from Caucasian women*. **Breast Cancer Research and Treatment**, (143), 385-392.
 26. Somunoğlu, S. (2007). *Meme kanserinde risk faktörleri*. **Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi**, (5), 2-12.
 27. İnternet: Breast Biology. National Breast Cancer Research Institute. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.nbcni.ie%2Fpage.asp%3Fmenu%3D105%26page%3D261&date=2016-01-09>, Son Erişim Tarihi: 09.01.2016.
 28. Alican, F. (2007). *Genel cerrahi, ikinci cilt*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 875-884.
 29. İnternet: Latest world cancer statistics global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. The International Agency for Research on Cancer (IARC). URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.iarc.fr%2Fen%2Fmedia-centre%2Fpr%2F2013%2Fpdfs%2Fpr223_E.pdf&date=2015-09-01, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.
 30. Topuz, E, Aydın, A, Dinçer, M. (2003). *Meme kanseri*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 13-15, 248, 249, 83, 84.
 31. Sasieni, P.D., Shelton, J., Ormiston-Smith, N.J., Thomson, C.S., Silcocks, P.B. (2011). *What is the lifetime risk of developing cancer?: The effect of adjusting for multiple primaries*. **British Journal of Cancer**, (105), 460-465.
 32. Koprowski, C., Ross, R.K., Mack, W.J., Henderson, B.E., Bernstein, L. (1999). *Diet, body size and menarche in a multiethnic cohort*. **British Journal of Cancer**, (79), 1907-1911.
 33. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002). *Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease*. **Lancet**, (360), 187-95.

34. Ji, J., Försti, A., Sundquist, J., Hemminki, K., (2007). *Risks of breast, endometrial, and ovarian cancers after twin births.* **Endocrine-Related Cancer**, (14), 703-711.
35. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1997). *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer.* **Lancet**, (350), 1047-1059.
36. The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. (2002). *Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies.* **Journal of the National Cancer Institute**, (94), 606-616.
37. Gunter, M.J., Hoover, D.R., Yu, H. et al. (2009). *Insulin, insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer in postmenopausal women.* **Journal of the National Cancer Institute**, (101), 48-60.
38. Larsson, S.C., Mantzoros, C.S., Wolk, A. (2007). *Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis* **International Journal of Cancer**, (121), 856-62.
39. Hartmann, L.C., Sellers, T.A., Frost, M.H. et al. (2005). *Benign breast disease and the risk of breast cancer.* **The New England Journal of Medicine**, (353), 229-237.
40. Byers, T. (1994). *Nutritional Risk Factors for Breast Cancer.* **Cancer**, (74), 288-295.
41. Aune, D., Chan, D.S., Vieira, A.R. et al. (2012) *Fruits, vegetables and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies.* **Breast Cancer Research and Treatment**, (134), 479-493.
42. Brant, P.A.V., Spiegelmann, D., Yaun, S.S. et al. (2000). *Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk.* **American Journal of Epidemiology**, (152), 514-527.
43. Xue, F., Willett, W.C., Rosner, B.A., Hankinson, S.E., Michels, K.B. (2011). *Cigarette smoking and the incidence of breast cancer.* **Archives of Internal Medicine**, (171), 125-133.
44. John, E.M., Phipps, A.I., Knight, J.A. et al. (2007). *Medical radiation exposure and breast cancer risk: Findings from the breast cancer family registry.* **International Journal of Cancer**, (121), 386-394.
45. Alm El-Din, M.A., Hughes, K.S., Finkelstein, D.M. et al. (2009). *Breast cancer after treatment of hodgkin's lymphoma: Risk factors that really matter.* **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, (73), 69-74.

46. Öztürk, M. (2006). *Meme kanserinin genetiği ve risk faktörleri. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi*, (54), 15-26.
47. Bayrak, İ.K., Özmen, Z., Elmalı M., Kale, M. (2008). *Dev juvenil fibroadenom: ultrasonografi ve manyetik rezonans bulgularıyla iki olgu sunumu. The Journal of Breast Health*, 4(1), 43-45.
48. Sayek, İ. (2004). *Temel cerrahi (Üçüncü Baskı)*. Ankara: Güneş Kitabevi, 930-937.
49. İnternet: Fibroadenoma. University of Maryland Medical Center. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fumm.edu%2Fhealth%2Fmedical%2Fspanishency%2Fimages%2Ffibroadenoma&date=2015-09-01>, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.
50. İlvan, Ş. (2006). *Meme karsinomu patolojisi. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi*, (54), 65-71.
51. İnternet: Diseases and conditions ductal carcinoma in situ (DCIS). Mayo Clinic. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.mayoclinic.org%2Fdiseases-conditions%2Fdcis%2Fbasics%2Fdefinition%2Fcon-20031842&date=2016-01-09>, Son Erişim Tarihi: 09.01.2016.
52. Aydın, A., Topuz, E. (2006) *Meme kanseri tanı-tedavi-takip*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 3-9.
53. İnternet: Breast Reconstruction and the Stages of Breast Cancer. Cosmetic Surgery Forums. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.cosmeticsurgeryforums.com%2Fbreast_reconstruction_cancer_stages.htm&date=2015-09-01, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.
54. İnternet: Lobular carcinoma in situ. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.cancer.gov%2FCcommon%2FPopUps%2FpopDefinition.aspx%3Fid%3DCDR0000046315%26version%3DPatient%26language%3DEnglish&date=2015-09-01>, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.
55. Haltas, H., Bayrak, R., Yenidunya, S., Kosehan, D., Sen, M., Akin, K. (2012). *Invasive lobular carcinoma with extracellular mucin as a distinct variant of lobular carcinoma: a case report. Diagnostic Pathology*, 7(91), 1-6.
56. İnternet: Biomarker testing: ER, PR and Her2. Johns Hopkins Medicine Breast Cancer & Breast Pathology. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fpathology.jhu.edu%2Fbreast%2Fbiomarker-testing.php&date=2015-09-01>, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.

57. İnternet: Types of Breast Cancer: ER Positive, HER2 Positive, and Triple Negative. Breast Cancer Health Center. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.webmd.com%2Fbreast-cancer%2Fbreast-cancer-types-er-positive-her2-positive&date=2015-09-01>, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.
58. Cowell, J.K. (2001). *Molecular genetics of cancer (Second Edition)*. USA: BIOS Scientific Publishers Limited, 73-82.
59. Lee, S.C., Hou, M.F., Hsieh P.C., Wu S.H., Hou, L.A., Ma, H., Tsai, S.M., Tsai, L.Y. (2008). *A case-control study of the HER2 Ile655Val polymorphism and risk of breast cancer in Taiwan. Clinical Biochemistry*, (41), 121-125.
60. Akisik, E., Dalay, N. (2004). *Estrogen receptor codon 594 and HER2 codon 655 polymorphisms and breast cancer risk. Experimental and Molecular Pathology*, (76), 260-263.
61. Fernandez, P.L., Jares, P., Rey, M.J., Campo, E., Cardesa, A. (1998). *Cell cycle regulators and their abnormalities in breast cancer. Molecular Pathology*, (51), 305-309.
62. Ergül, E., Sazcı, A. (2001). *Molecular genetics of breast cancer. Turkish Journal of Medical Sciences*, (31), 1-14.
63. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F. (2005). *Thompson&Thompson tıbbi genetik. (Altıncı baskı)*. (Çev. Komisyon), Ankara: Güneş Kitabevi. (Eserin orijinali 2004'de yayımlandı), 323-326.
64. Haberal, A. (2004). *Meme ve over kanserlerinde genetik tarama: yalnız araştırma amaçlı mı yoksa rutin tarama mı olmalıdır?. TJD Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi*, (6), 26-29.
65. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Hücrenin Moleküler Biyolojisi. (Dördüncü Baskı)*. (Çev. N. Buyru, N. Dalay, M. Özgüç, M. Öztürk, M. Sakızlı), Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA). (Eserin orijinali 2002'de yayımlandı), 1005.
66. İnternet: Genes, ATM. Genetics Home Reference. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fghr.nlm.nih.gov%2Fgene%2FATM+&date=2015-09-01>, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.
67. Herbert, B.S., Wright, W.E., Shay, J.W. (2001). *Telomerase and breast cancer. Breast Cancer Research*, (3), 146-149.
68. Lu, L., Zhang, C., Zhu, G., Irwin, M., Risch, H., Menato, G., Mitidieri, M., Katsaros, D., Yu, H. (2011). *Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. Breast Cancer Research*, (13), 1-8.

69. Spandidos, D.A., Sourvinos, G., Tsatsanis, C., Zafiropoulos, A. (2002). *Normal ras genes: Their onco-suppressor and pro-apoptotic functions*. **International Journal of Oncology**, (21), 237-241.
70. Doğan, L., Güç, D. (2004). *Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser*. **Hacettepe Tıp Dergisi**, (35), 34-42.
71. Karnoub A.E., Weinberg, R.A. (2008). *Ras oncogenes: split personalities*. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, (9), 517-531.
72. Cox, A.D., Der, C.J. (2010). *Ras history*. **Small GTPase**, 1(1), 2-27.
73. İnternet: HRAS. Genetics Home Reference. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fghr.nlm.nih.gov%2Fgene%2FHRAS+&date=2015-09-01>, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.
74. İnternet: KRAS. Genetics Home Reference. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fghr.nlm.nih.gov%2Fgene%2FKRAS&date=2016-01-09>, Son Erişim Tarihi: 09.01.2016.
75. Schubbert, S., Shannon K., Bollag G. (2007). *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. **Nature Reviews Cancer**, (7), 295-308.
76. Donninger, H. (2001). *Gene mutations and expression in breast cancer*. (Doctoral dissertation, Faculty of Health Sciences University of Cape Town, 2001). South Africa, 10.
77. Li, T., Sparano, J.A. (2003). *Inhibiting Ras Signaling in the Therapy of Breast Cancer*. **Clinical Breast Cancer**, 3(6), 405-416.
78. Newton, H.B. (2006). *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy*. USA: Academic Press, 174-176.
79. Kiaris, H., Spandidos, D.A. (1995). *Mutations of ras genes in human tumours*. **International Journal of Oncology**, (7), 413-421.
80. McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong E.WT., Chang F. et al. (2007). Roles of the RAF/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1773(8), 1263–1284.
81. Bradshaw, R.A., Dennis, E.A. (2010). *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*. USA: Academic Press, 2763-2766.
82. Stamatakis, M., Stefanaki, C., Kontzoglou, K., Masouridi, S., Sakorafas, G., Safioleas, M. (2010). *Recapitulation of Ras Oncogene Mutations in Breast Cancer*. **Onkologie**, (33), 540–544.
83. Sebti, S.M., Der, C.J. (2003). *Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors*. **Nature Reviews Cancer**, (3), 945-951.

84. Gomperts, B.D., Kramer, I.M., Tatham, P.E.R. (2003). *Signal Transduction, (Third Edition)*. USA: Elsevier Academic Press, 93.
85. McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Lee, J.T., Chang, F., Bertrand, F.E. et al. (2006). *Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/ AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. **Advances in Enzyme Regulation**, (46), 249-279.*
86. Mendoza, M.C., Er, E.E., Blenis, J. (2011). *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends in Biochemical Sciences**, 36(6), 320-328.*
87. Suter, R., Marcum, J.A. (2007). *The molecular genetics of breast cancer and targeted therapy. **Biologics: Targets & Therapy**, 1(3), 241-258.*
88. İnternet: Ras-Raf-MEK-ERK-MAPK pathway. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fflipper.diff.org%2Fapp%2Fpathways%2F1874&date=2015-09-01>, Son Erişim Tarihi: 01.09.2015.
89. Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Kempf, C.R., Long, J., Laidler, P. Et al. (2011). *Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. **Aging**, 3(3), 192-222.*
90. Coleman, M.L, Marshall, C.J., Olson M.F. (2004). *Ras and Rho GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, (5), 355-366.*
91. Rajasekharan, S.K., and Raman, T. (2013). *Ras and Ras mutations in cancer. **Central European Journal of Biology**, 8(7), 609-624.*

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KIZILTUĞ, Mehmet Tuğhan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 03.08.1989, Ankara
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0 (532) 201 69 45
 Faks : -
 e-mail : mehmetkiziltug@mersin.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Mersin Üniversitesi /SBE/Tıbbi Biyoloji AD	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi /FBE/Biyoloji AD	Devam Ediyor
Lisans	Anadolu Üniversitesi/İF/Uluslararası İlişkiler	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi /FF/Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Kurtuluş Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-Halen	Mersin Üniversitesi /Tıp fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	Araştırma Görevlisi (ÖYP)

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Erdal M.E., Görücü Yılmaz Ş., Uzun C., Kızıltuğ M.T., Güler H., Taşdelen B., Erdal N. Sağlıklı sıçanların kan ve beyin dokularında bazı mikroRNA ekspresyon düzeylerinin CT yöntemi ($\Delta\Delta CT$) ile karşılaştırmalı analizi, XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 27-30 Ekim 2013, Pine Bay Otel Kuşadası-Aydın, Poster Bildirisi, PS-07 (16).
2. Kızıltuğ, M.T., Taştan, H., Düşünceli Atman, E., Üstüner, E. Determination of H-Ras, K-Ras gene mutations in codon 12 and codon 61 in Turkish patients with

breast cancer. 5th International Congress of Molecular Medicine, 2015-05-20, 2015-05-22, İZMİR, Türkiye, 2015.

Hobiler

Kitap okuma, Klavye (Org) çalma, Yüzme.





GAZİ GELECEKTİR..