

**T.C. TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ESM-1(ENDOKAN) GENİNDEKİ
MUTASYONLARIN MEME KANSERİ
OLUŞUMUNDAKİ İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Serap DEDE

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr.ESRA GÜNDÜZ**

ANKARA-2013

**T.C. TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ESM-1(ENDOKAN) GENİNDEKİ
MUTASYONLARIN MEME KANSERİ
OLUŞUMUNDAKİ İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Serap DEDE

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr.ESRA GÜNDÜZ**

ANKARA-2013

**Turgut Özal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir Proje No: P53011216_G**

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

Serap Dede

ÖNSÖZ

Bu tezin teorik temellerinin oluşturulması, ön hazırlıkların ve deneylerin gerçekleştirilmesi, verilerin toplanıp yorumlanması ve yazılması aşamalarında bana yardımcı olan başta tez danışmanım Doç.Dr.Esra Gündüz olmak üzere Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Mehmet Gündüz'e çalışmalarım boyunca yakın ilgi ve sabırlarını benden esirgemeyerek; bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr.Muradiye Acar'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca benden manevi desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Gülhan Kaya ve Zahide Nur Ünal'a, tez çalışmalarım boyunca beni destekleyen kıymetli anneme, sabır ve fedakarlık gösteren kızım Şeyma Nur ve oğlum Mehmet Said'e her zaman yanımda olan değerli eşime çok teşekkür ederim.

Serap Dede

Mayıs 2013

ÖZET

ESM-1 (Endothelial cell-specific molecule-1) veya endocan endotelial hücreler tarafından salgılanan çözünebilir bir proteoglikandır. Bu genin ekspresyonu sitokinler tarafından düzenlenmektedir. ESM-1 ekspresyonu endotelial ve epitelyal hücrelerde VEGF, TNF α , LPS ve IL-1 β uyarısı ile artmaktadır.

ESM-1'in tümör anjiyogenez ve tümör büyümesinde önemli bir rolü olduğu ve akciğer, karaciğer, mide ve meme gibi birçok kanserin patogenezinde rol oynadığı tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ESM-1 geninin hücre çoğalması, hücre göçü, invazyon ve kanser hücrelerinin yayılmasına sebep olan metastaz oluşumunda etkin rolü olduğu keşfedilmiştir.

Meme kanseri dünyada akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Son yıllarda meme kanseri oluşumuna etki eden pekçok gen tespit edilmiştir. Bu çalışmada meme kanserinde etkili olabilecek ESM-1 geni mutasyonlarının tespit edilmesi hedeflendi. Bu amaçla, parafin bloktan elde edilen DNA örnekleri ile ESM-1 geninin üç ekzonuna sekans tekniği kullanılarak mutasyon analizi yapıldı.

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda bir vakada ekzon2'de daha önce tespit edilmemiş bir sessiz mutasyon bulunmuştur. Yine farklı bir vakada ekzon2'de polimorfizm tespit edilmiştir. Yaptığımız sekans analizi sonucu dokuz vakada ekzon3'ün poliA bölgesinde polimorfizm saptanmıştır. Bu bölgeye miRNA'ların bağlanması, söz konusu polimorfizmin önemli olabileceğini göstermektedir. ESM-1 geninin meme kanseri üzerine etkisinin net bir şekilde gösterilebilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: ESM-1, meme kanseri, metastaz, mutasyon, miRNA

ABSTRACT

ESM-1 or ENDOCAN (endothelial specific molecule-1) is an proteoglycan secreted by endothelial cells. Expression of this gene is regulated by cytokines. In endothelial and epithelial cells ESM-1 expression is stimulated by VEGF, TNF α , LPS and IL-1 β .

ESM-1 has been shown to play an important role in tumor angiogenesis and growth. It has been identified as playing a pathogenic role in lung, liver, stomach and breast cancer, among others. In recent work, ESM-1 was found to play an active role in cell growth, migration and invasion thus implicating it in cancer metastasis.

Breast cancer is one of the most common types of cancer in the world. In recent years, many genes involved in breast cancer development have been identified. In the work presented here, the aim was to identify whether mutations in the ESM-1 gene may play a role in breast cancer. DNA samples were isolated from paraffin-embedded pateint tissue samples and the three exons of the ESM-1 gene were sequenced to identify possible mutations.

In one of the samples, a previously identified silent mutation was found in exon two. In another, a polymorphism in exon two was identified. Based on the sequencing results, a polymorphism was identified in the polyA region of exon three in nine of the samples. As this is a region in which miRNAs are known to bind, this polymorphism could be important. To determine the effect of ESM-1 in breast cancer a more comprehensive study is necessary.

Keywords: ESM-1, breast cancer, metastasis, mutation, miRNA

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ	1
2.	GENEL BİLGİLER	3
	2.1. KANSER.....	3
	2.2. MEME KANSERİ	4
	2.3. MEME KANSERİNİN YAYILIMI.....	5
	2.4. MEME KANSERİ İLE İLİŞKİLİ RİSK FAKTÖRLERİ.....	6
	2.4.1. Yaş	6
	2.4.2. Cinsiyet	6
	2.4.3. Ailesel Yatkınlık ve Genetik Faktörler	6
	2.4.4. Hormonal Faktörler	7
	2.4.5. Radyasyona Maruziyet.....	8
	2.5. MEME KANSERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLER	8
	2.5.1. Tümör Çapı	8
	2.5.2. Tümör Diferansiyasyon Derecesi (Grade)	8
	2.5.3. Hormonal Reseptörler	9
	2.5.4. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	9
	2.6. MEME KANSERİNDE ETKİLİ ONKOGENLER	10
	2.6.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR).....	10
	2.6.2. CerbB-2 (HER2/Neu)	10
	2.6.3. c-Myc Geni.....	11
	2.7. MEME KANSERİNDE ETKİLİ TÜMÖR BASKILAYICI GENLER .	11
	2.7.1. TP53 Geni	11
	2.7.2. ATM Geni	12
	2.8. AİLESEL MEME KANSERİ VE YATKINLIK GENLERİ.....	12
	2.8.1. BRCA1 ve BRCA2 genleri	12
	2.9. EVRELEME	12
	2.9.1. Meme Kanserinde Evreleme	13
3.	ESM-1 (ENDOKAN) GENİ	17
	3.1. ESM-1 GEN YAPISI	17
	3.2. ESM-1 GENİNİN DİĞER GENLERLE İLİŞKİSİ.....	18

3.3. ESM-1 GENİNİN HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ	19
3.3.1. ESM-1 Geninin Mide Kanseri İle İlişkisi	19
3.3.2. ESM-1 Geninin Böbrek Kanseri İle İlişkisi	20
3.3.3. ESM-1 Geninin Karaciğer Kanseri İle İlişkisi	20
3.3.4. ESM-1 Geninin Akciğer Kanseri İle İlişkisi	21
3.3.5. ESM-1 Geninin Meme Kanseri İle İlişkisi.....	21
4. GEREÇ VE YÖNTEM	22
4.1. PARAFİN BLOKTAN DNA İZOLASYONU	22
4.2. DNA AMPLİFİKASYONU	22
4.3. PRİMERLERİN HAZIRLANMASI.....	23
4.4. GRADİYENT PZR	24
4.5. NORMAL PZR	25
4.5.1. ESM-1 Ekzon1 İçin İzlenen PZR Programı (373 bp)	25
4.5.2. ESM-1 Ekzon2 İçin İzlenen PZR Programı (383 bp)	26
4.5.3. ESM-1 Ekzon3 İçin İzlenen PZR Programı (306 bp)	26
4.6. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ	26
4.7. SEKANS İŞLEMİ.....	27
4.7.1. Örneklerin Exosap İle Muamelesi.....	27
4.7.2. Sekans PZR'un Yapılması:	27
4.7.3. Sekans Koşulları	27
4.7.4. Sephadex Hazırlanışı.....	28
4.8. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR	28
5. BULGULAR.....	29
5.1. ESM-1 EKZON1 GRADİYENT PZR ELEKTROFOREZ SONUCU... 29	
5.2. ESM-1 EKZON2 GRADİYENT PZR ELEKTROFOREZ SONUCU... 29	
5.3. ESM-1 EKZON3 GRADİYENT PZR ELEKTROFOREZ SONUCU... 30	
5.4. ESM-1 EKZON1 PZR ELEKTROFOREZ SONUCU	30
5.5. ESM-1 EKZON2 PZR ELEKTROFOREZ SONUCU	31
5.6. ESM-1 EKZON3 PZR ELEKTROFOREZ SONUCU	31
5.7. SEKANS BULGULARI.....	32
6.TARTIŞMA	35
7.SONUÇ.....	39
8.KAYNAKLAR	40

KISALTMALAR

Kısaltma	Açık Yazılışı
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BRCA1	Breast cancer1
BRCA2	Breast cancer2
ERBB2	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
ER	Estrogen Receptor
ESM-1	Endothelial cell specific molecule-1
PR	Progesteron Receptor
Rb	Retinoblastoma
TBE	Tris-Boric acid-EDTA
TNF- α	Tumor necrosis factor
TNM	Tumor Node Metastasis
TP53	Tumor protein 53
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT1	Wilms Tumor Protein

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa no
Tablo1. ESM-1 geninin izoformları.....	18
Tablo2. PZR reaksiyonunuda kullanılan primer çiftleri ve sırası.....	23
Tablo3. Gradyent PZR için kullanılan solüsyon karışımı.....	24
Tablo4. ESM-1 için izlenen PZR programı.....	25
Tablo5. Normal PZR için kullanılan solüsyon karışımı.....	25
Tablo6. ESM-1 Ekzon1 için izlenen PZR Programı	26
Tablo7. ESM-1 Ekzon2 için izlenen PZR Programı	26
Tablo8. ESM-1 Ekzon3 için izlenen PZR Programı	26
Tablo9. Sekans PZR için karışım.....	27
Tablo10. Elde edilen sekans sonuçları.....	34

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa no
Resim1. ESM-1 geninin şematik gösterimi.....	17
Resim2. ESM-1 geninin diğer genlerle ilişkisinin şematik gösterimi.....	19
Resim3. Ekzon1 gradiyent PZR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	29
Resim4. Ekzon2 gradiyent PZR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	29
Resim5. Ekzon3 gradiyent PZR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	30
Resim6. Ekzon1 PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	30

Resim7. Ekzon 2 PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	31
Resim8. Ekzon 3 PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	31
Resim9. Ekzon2 G/A homozigot mutasyonu.....	33
Resim10. Ekzon2 G/A heterozigot polimorfizmi.....	33
Resim11. Ekzon3 Poli A bölgesi C/T heterozigot polimorfizmi.....	34

1.GİRİŞ

Meme kanseri dünyada akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türüdür ve kadınlarda kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir [1]. 20- 34 yaş arası genç kadınlarda %12 oranında görülen meme kanseri gelişmiş ülkelerde kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biridir [2]. Meme kanserinin 30 yaşından önce görülmesi nadir olmakla beraber, bu yaşı takip eden üreme döneminde hızlı bir artış gösterir. Bu artış menapoz sonrasında da yavaş bir seyirle yükselmeye devam eder [3]. Bu nedenle 85 yaşındaki her 9 kadından birinde meme kanserinin oluşabileceği tahmin edilmektedir [1]. Ayrıca kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra üst sıralarda yer almaktadır [4,5].

Meme kanseri oluşumuna yol açan ya da ilerlemesini hızlandıran birçok faktör ileri sürülmüştür [6,7]. Bu nedenle meme kanseri olan hastalarda hastalığın seyrini iyi belirleyebilmek için daha iyi metodların geliştirilmesi gerekmektedir. Son yıllarda bu konudaki genetik çalışmalar hızla artmaktadır. Meme kanseri tarama programlarının daha etkin olarak gerçekleştirilmesi, gelişmiş tanı ve teknik yöntemlerle hastalık erken evrede teşhis edilebilmektedir.

Geniş genetik veri tabanlarının oluşturulması ve araştırmaların maliyetinin azaltılmasıyla, araştırmacılar çeşitli meme kanseri gen ekspresyon çalışmaları için çok sayıda potansiyel prognostik belirteçler elde edeceklerdir [8].

ESM-1 (Endothelial Cell Specific Molecule-1, Endotel hücre spesifik molekül-1 geni; Endokan) olarak da adlandırılmaktadır. ESM-1 ilk olarak endotel hücreler tarafından salgılanan çözünebilir bir proteoglikan olarak tanımlanmıştır. İki intron ile ayrılan üç ekzondan oluşmaktadır. ESM-1 tümör anjiyogenez ve tümör büyümesinde önemli bir rol oynar.

ESM-1 ekspresyonu endotel hücrelerde VEGF, TNF α , LPS ve IL-1 β uyarısı ile artmaktadır. Yapılan çalışmalar ESM-1 geninin bazı kanser türlerinde (karaciğer, akciğer ve böbrek kanserleri) potansiyel bir biomarker olabileceğini göstermiştir [9-11].

Biz bu çalışmada ESM-1 genindeki mutasyonların daha önce çalışılmamış olan meme kanseri oluşumundaki rolünü araştırdık. Bu çalışmanın meme kanserinin moleküler temellerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sunacağını ve yeni tedavi hedeflerinin geliştirilmesinde yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin anormal veya kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Kanser hücrelerinde, hücre çoğalması, farklılaşması ve sağkalımı olaylarını düzenleyen mekanizmalar ortadan kalkar ve tümör vücudun diğer bölgelerine yayılarak doku ve organların işlevini etkiler. Kanser tümör hücresi davranış bakımından benign 'iyi huylu' ve malign 'kötü huylu' olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Benign tümörler çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırken malign tümörler hem çevredeki normal dokuya hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla uzak organlara yayılarak metastaz oluştururlar.

Kanser hücrelerinin başka doku bileşenleri ile etkileşimini değiştiren invazyon ve metastaz açısından önem taşıyan iki özelliği vardır. Birincisi malign hücrelerin hücre dışı matris bileşenlerini parçalayarak kanser hücresinin komşu dokunun içine girmesini sağlayan proteazları salgılamasıdır. İkincisi kanser hücreleri anjiyogenezi hızlandıran büyüme faktörlerini salgılamak [12].

Anjiogenezis oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstraselüler matriks, büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogeneizde temel rol oynar. Anjiyogeneizde yeni kandanlar oluşur. Oluşan bu kandanları tümör hücresi tarafından salgılanan ve çevre doku endotel hücrelerinin çoğalmasını uyaran büyüme faktörlerine yanıt olarak ortaya çıkar. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) en önemli sitokindir. Tümör hücreleri anjiyogenik uyarı sonucu oluşan yeni kılcallara kolayca girebileceğinden kanser hücrelerinin dolaşıma katılmasına ve metastazın başlamasına imkan sağlar [13].

Kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden biride normal bir şekilde farklılaşma göstermemeleridir. Apoptoz hücre farklılaşmasının en önemli ögesidir. Kanser hücreleri normal farklılaşma programını izlemek yerine sürekli aktif olarak çoğalırlar. Kanser hücresinde apoptoz görülmediğinden normal hücrelere göre daha uzun yaşarlar. Tümör hücrelerinin apoptoza uğramaması hem primer tümör

hücresinin gelişmesine hemde metastatik hücrelerin vücudun başka bölgelerinde canlılıklarını korumalarını ve çoğalmalarını sağlar. Böylece kanser hücrelerinin anormal şekilde çoğalmaları sağlanmış olur [12].

Kanser, hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen kritik genlerde gerçekleşen değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Protoonkogenler hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptosis için işlev gören birçok proteinin sentezinden sorumludur. Protoonkogenlerin mutasyona uğraması sonucunda büyüme faktörlerinin aşırı üretimi, transkripsiyon faktörlerinin sentezinin artması, hücre bölünmesine engel olunamaması gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Böylece protoonkogenler onkogenlere dönüşmekte buda kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarına ve büyümelerine yol açmaktadır [14].

Onkogen aktivasyonu hücrenin malign halinin devam ettirilmesinde kritik öneme sahiptir. Onkogen aktivasyon mekanizmaları nokta mutasyonu, kromozomal yeniden düzenlenmeler, gen amplifikasyonu ya da aşırı gen ekspresyonudur [14].

Tümör baskılayıcı genlerin kodladığı proteinler, onkogenlerin aksine hücrenin çoğalmasını ve sağ kalımını baskılar. Tümör süpresör genlerde protoonkogenler gibi hücre yüzeyinde, sitoplazmada ve nükleusta bulunabilmektedir. Rb ilk tanınan tümör süpresör genidir. Transkripsiyonu düzenleyen en iyi düzenleyici tümör süpresör genlere örnek olarak TP53, RB1 ve WT1 verilebilir [15].

2.2. MEME KANSERİ

Meme kanseri kadınlarda görülen en sık kanser olup, dünyada kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Amerikada tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %6.6'sı 40 yaş, %2.4'ü 35, %0.65'i 30 yaş ve aşağısında tespit edilmiştir

Dünyada meme kanseri 1975-2000 yılları arasında ikiye katlanmıştır. Bunun sebebi insanların yaşam şartlarının gelişmesi ile birlikte risk faktörlerinin artması söylenebilir. Meme kanseri insidansı artsada mortalite hızı son yıllarda düşme eğilimi göstermektedir. Bu düşüş hastalığın erken teşhisi, gelişmiş tedavi yöntemleri gibi birçok faktörün etkisi ile ortaya çıkmaktadır [16].

Meme kanserinde erken tanıda fiziksel muayene ve temel tanı yöntemlerinin kullanılması büyük önem arz etmektedir. Fiziksel muayene, kendi kendine muayene, memenin radyolojik incelemeleri en çok kullanılan yöntemlerdir. Erken teşhis yöntemleri ve tedavi yaklaşımları ile meme kanserinde mortaliteyi %30-%50 arasında azaltabileceği bildirilmektedir [17].

Mamografi erken tanı, ucuz, kolay uygulanabilir ve kolay erişilebilir olma özellikleri ile tarama için en uygun yöntemdir. Mamografi küçük meme tümörleri için yüksek duyarlılıkta ve özgüllüktedir. Amerikan kanser derneği tarafından kadınların 40 yaşından itibaren düzenli olarak mamografi çektirmeleri tavsiye edilmektedir [18].

2.3. MEME KANSERİNİN YAYILIMI

Meme kanseri öncelikle göğüsteki süt kanalları içerisinde başlar. Göğsün dışına çıkan kanser ilk önce koltuk altı lenf bezlerine sıçrar. Bölgesel lenf bezleri aşan kanser hücreleri kan dolaşımına katılarak başka organlara yayılarak metastaz oluşumuna sebep olur [19].

Metastaz; kanser hücresinin çevresindeki hücrelerden ayrılması, ekstrasellüler matriks içinde ilerleme, kan veya lenf damarlarına girme, dolaşımdan yenibir dokuya geçerek sekonder tümör ağının gelişmesi aşamalarından oluşmaktadır. Hücre adezyonu, hücre döngüsü kontrolü, anjiyojenik faktörler ve büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı sentezi metastazın önemli düzenleyicileridir [7].

Tümör büyümesi ve metastaz gelişiminde, yeni kan damarlarının oluşumu gereklidir. Yeni damar oluşumunun birçok düzenleyicisi vardır. Anjiyogenik düzenleyiciler içerisinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür. VEGF, hipoksik veya iskemik koşullardaki hücrelerden salınarak anjiyogenezisi uyarır [20]. Anjiyogenik faktörlerin sentezi ve sekresyonu tümörün etrafındaki konakçı dokuda bir kapiller ağ oluşturur. Meme kanseri en sık kemik metastazı yapar. İskelet sisteminde en çok yerleştiği yer

kaburgalar ve kafatası kemikleridir. Meme kanserinin en sık metastaz yaptığı organlar akciğer ve karaciğerdir [6].

2.4 MEME KANSERİ İLE İLİŞKİLİ RİSK FAKTÖRLERİ

Birçok kanser gibi meme kanserinin de tam olarak nedeni bilinmemektedir. Ancak epidemiyolojik çalışmalar risk faktörü olabilecek bazı kuvvetli bulgular ortaya koymaktadır. Tüm dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmekte ve bu özellikler “risk faktörü” olarak adlandırılmaktadır [21-23].

2.4.1. Yaş

Meme kanserine yakalanmada etkili olan risk faktörleri incelendiğinde ileri yaşa sahip olmanın önemli bir risk faktörü olarak ele alındığı görülmektedir [24,25]. Meme kanserinin insidansı 45-50 yaşından sonra artmaktadır [16, 26].

55 yaşın üzerindeki kadınların %64’ünde meme kanseri görülme sıklığı yaşa bağlı olarak artmaktadır. ABD’de meme kanseri olma riski 79-60 yaş arası kadınlarda 1/13, 40-59 yaş arası kadınlarda 1/24, 39 yaş ve daha genç kadınlarda 1/229 olarak tahmin edilmektedir [27,28].

2.4.2. Cinsiyet

Cinsiyet meme kanseri için en büyük risk faktörüdür, meme kanseri gerek meme dokusunun gelişimi gerekse hormonal etkiler nedeniyle kadınlarda erkekler göre yüz kat daha sık görülmektedir [16,29].

2.4.3. Ailesel Yatkınlık ve Genetik Faktörler

Ailede bir veya birden fazla birinci derece kan akrabalarında meme kanseri saptanmış olması ailevi meme kanseri olarak adlandırılmaktadır. Aile bireyleri arasında meme kanseri hastası bulunmasının, kadınların meme kanserine yakalanma olasılığını artırdığı ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler aile

öyküsü ve meme kanseri riski arasında birinci derece akrabalarda (anne, kız kardeş ve kız çocuğu) meme kanseri olma riskinin yaklaşık 2 -3 kat risk taşıdığı saptanmıştır [16,30]. Ayrıca daha önce meme kanseri geçiren ve tedavi olan kadınların, diğer memelerinde kanser gelişme olasılığının meme kanseri teşhisi konulmamış kadınlara göre 3-4 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir [25].

Genetik faktörler meme kanseri için sınırlı olmakla beraber önemli bir rol oynamaktadır. Meme kanserinin yaklaşık %5-%6'sı kalıtsal olarak kabul edilebilir [16]. Meme kanseri otozomal dominant olarak kalıtım yoluyla taşınmaktadır. Meme kanserinde iki yaygın mutasyon olan BRCA1 ve BRCA2 genleri sırasıyla 17. ve 13. kromozom üzerinde yer almaktadır. BRCA1 ve BRCA2 genleri hücre proliferasyonunun kontrolünde, DNA hasarı ve tamirinde görev alan proteinler ve hücre döngüsünün kontrol noktalarında görev alan proteinler ile yakın ilişkisi bulunmaktadır.

BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonu taşıyıcılarının meme ve over kanseri gelişimi açısından risk altında oldukları aştırmacıların yapmış olduğu çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir. [31]. BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında meme kanseri yaşam boyu risk % 80-85'dir [32].

2.4.4. Hormonal Faktörler

Meme kanseri gelişiminin hastanın östrojene maruz kalma süresiyle ilişkili olduğu saptanmıştır. Meme kanseri ile yapılan birçok çalışmada östrojen ve progesteronun meme hücreleri üzerinde büyümeyi ve proliferasyonu artırıcı etkisi olduğu ortaya koyulmuştur [33].

Kadınların adet görmeye erken yaşta başlamaları, buna bağlı olarak ilerleyen yaşlarda menopoz dönemine girilmesi, fertil çağın uzamasına neden olmaktadır. Bununla birlikte kadının daha uzun süre östrojen hormonuna maruz kalması sonucu meme kanseri gelişme riskinin artırdığına işaret edilmektedir [21,34].

Kadınların ilk çocuğunu doğurma yaşı meme kanserine yakalanma açısından önemli bulunmaktadır. Genç yaşta özellikle 20 yaşından önceki hamilelik meme kanseri insidansını belirgin bir şekilde azaltmaktadır. Bunun aksine hiç doğum

yapmamış veya ilk doğumunu 30 yaş sonrası yapan kadınlarda meme kanseri riski iki kat artmaktadır [35].

Menarş yaşında meme kanseri gelişme riskini etkileyen önemli bir faktördür. Erken menarş ve geç menopoz durumu bu sayının artışına neden olmakta ve yaklaşık olarak riski %30- 50 oranında artırmaktadır. Bununla birlikte geç menarş ve erken menopoz da bu riski aynı oranda azaltmaktadır [36].

2.4.5. Radyasyona Maruziyet

Radyasyon maruziyeti meme kanseri için bilinen bir risk faktörüdür. Atom bombasına maruz kalanlarda ve doğum sonrası memede abse, akne, aşırı tüylenme gibi nedenlerle radyoterapi alanlarda düşük veya orta derece radyasyon dozlarından sonra meme kanseri gelişme riskinde artış gözlenmiştir. Otuz yaşından önce iyonizan radyasyona maruz kalmak meme kanseri riskini artırmaktadır. Atom bombasına maruz kalan kadınlarda meme kanseri riski 3 kat artmıştır [37].

2.5. MEME KANSERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLER

2.5.1. Tümör Çapı

Tümör çapı meme kanserinde tekrar etme riski ve özellikle erken evrede hastalarda adjuvan tedavi seçimi için önemli ve güvenilir bir prognostik faktördür. Tümörün boyutu ne kadar küçükse hastalık o kadar iyi seyirli kabul edilebilir. Tümör boyutu arttıkça, aksiller lenf düğümü metastazı da artmakta ve buna bağlı olarak yaşama süresi azalmaktadır. Aksiller tutulum gösteren küçük çaplı tümörlerin prognozu, büyük çaplı olanlara göre daha iyidir [38].

2.5.2. Tümör Diferansiyasyon Derecesi (Grade)

Meme kanserinde grade, prognozu belirleyen önemli bir etken olarak kabul edilmiştir. Meme kanserinde histopatolojik önem derecesine göre üç grupta toplanır. Prognozu iyi olanlar müsinöz, tübüler, papiller; prognozu orta olanlar medüller, invaziv, lobüler; prognozu kötü olanlar infiltrative ductal, atipik medüllerdir [39].

Tümör diferansiyasyon derecesini belirlemede Scarff-Bloom-Richardson ve Fisher en sık kullanılan sistemlerdir. Her iki sistemde de mitoz sayısı, nukleus ve hücrenin şekli, tubuler ve glandüler yapı oluşturma özelliğine bakılır. Fisher sisteminde grade I ve II olan olgular iyi prognozlu grade III olan olgular ise kötü prognozlu kabul edilmiştir. Yüksek gradeli tümörlerin prognozu kötüdür ve erken metastaz yapar bununla birlikte sağkalım kısalmır [7].

2.5.3. Hormonal Reseptörler

Östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR):

Bir hormona özel noktalarda bağlanarak onları düzenleyen, intrasellüler ya da membran protein niteliğindeki moleküller reseptör olarak adlandırılır. Östrojen ve progesteron reseptörleri; intrasellüler proteinler olup, konsantrasyon değişimine bağlı olarak, dolaşımdan hücre içine alınan, hormon molekülüne seçici olarak bağlanarak hormon reseptör kompleksini oluştururlar. Aktive olan hormon–reseptör kompleksi, nükleus içindeki hormon yanıt elementleri olan kısa DNA sekanslarına bağlanır ve fizyolojik hormon aktivitesini sağlayan transkripsiyonu gerçekleştirirler [40].

ER ve PR pozitif tümörler hormonal tedaviye yanıt verir ve daha iyi prognoz gösterirler. ER ve PR pozitifliği hormonal tedaviye yanıtın en önemli belirleyici faktörüdür [41]. ER ve PR pozitifliği postmenopozal dönemde, premenopozal dönemden daha fazladır. In situ duktal karsinomalarda (süt kanallarındaki erken evreli kanser) nükleer grade arttıkça ER ve PR pozitifliğinin azaldığı saptanmıştır [42].

2.5.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir [43]. Endotel hücrelerinin proliferasyonunu, hücre migrasyonunu kolaylaştırır ve apoptozu inhibe eder [44,45]. VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli bir etkidir [46,47]. VEGF'ün aşırı ekspresyonu özellikle

invaziv meme kanserlerinde mikrodamar yoğunluğunda artış ve nod negatif meme kanserlerinde yineleme ile ilişkili bulunmuştur [6].

2.6. MEME KANSERİNDE ETKİLİ ONKOGENLER

2.6.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR)

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) hücrelerin yüzeyinde bulunan ve epidermal büyüme faktörü EGF'nin bağlandığı bir proteindir. Hücre membran reseptörü olan EGFR ailesi; HER1 (EGFR), HER2, HER3 ve HER4'den oluşur. Epidermal büyüme faktörü EGFR'ye bağlandığı zaman, tirozin kinaz enzimini aktif hale getirerek hücrelerin büyümesine ve çoğalmasına neden olan reaksiyonu tetikler. EGF'nin reseptörüne bağlanması sonucu reseptör uyarılır ve EGF hücre içine alınıp EGFR'nin otofosforilasyonunu ve diğer hücre içi substratların fosforilasyonunu sağlar. EGFR, EGF varlığında aşırı derecede bölünerek çoğalan kanser hücrelerinin birçok tipinde hücre yüzeyinde oldukça fazla bulunur.

EGFR gen amplifikasyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğu birçok karsinomada gösterilmiştir [48,49]. EGFR'ün meme kanserlerinde aşırı ekspresyonu olduğu gözlenmiştir. ER ve PR negatif tümörlerde EGFR pozitifliği 2 kat fazla bulunmuştur [6, 7].

2.6.2. CerbB-2 (HER2/Neu)

HER-2/Neu, diğer adı ile cerbB-2 olarak isimlendirilen bu onkogen 17. kromozomda q12 bölgesine yerleşmiş olup, protein ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasında görev almaktadır. Aşırı ekspresyon nedeniyle kanser patogenezinde rol alan bu onkogen, meme kanseri için önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir [50]. CerbB-2 geninin aşırı ekspresyonu meme kanserlerindeki transforme hücrelerin %10-40'ında tespit edilmiştir. Bu onkogenin ekspresyonunun artması ile tümör şiddetinde buna bağlı oranda arttığı tespit edilmiştir [51]. C-erbB2 pozitifliği, daha çok yüksek histolojik grade, ER ve PR negatif, lenf nodu pozitif ve yüksek proliferasyon oranı gösteren meme kanserlerinde

görülmekte ve bu durum genellikle kötü prognozu göstermekle beraber sağ kalımda azalma ile ilişkili bulunmuştur. ER, PR ve c-erbB2 reseptörlerinin her üçünde negatif olduğu olgular triple negatif meme kanserleri olarak adlandırılır [52].

2.6.3. c-Myc Geni

c-Myc geni kromozom 8q24 bölgesine lokalize olup hücre proliferasyonunun regülasyonunda etkili bir protein kodlar. C-Myc proteini hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenlemekte görev alır [53]. c-Myc gen amplifikasyonu hücre döngüsünün bozulmasına sebep olur ve p53'e bağlı yoldan hücrenin apoptoza gönderilmesinde rol oynar. c-Myc geninin aşırı eksprese olması ve gen yapısında meydana gelen değişiklikler meme kanserinin oluşmasına sebep olmaktadır [54]. c-Myc gen amplifikasyonu meme kanserinde en sık karşılaştığımız genetik değişikliklerden biridir. Meme kanserlerinin 1/3'ü bu genetik değişikliği taşımaktadır [55,56].

2.7. MEME KANSERİNDE ETKİLİ TÜMÖR BASKILAYICI GENLER

2.7.1. TP53 Geni

TP53 geni 17. kromozom üzerinde yerleşmiş olup hücre döngüsünün durmasında, DNA onarımı, apoptoz gibi kritik hücre fonksiyonların düzenlenmesinde görev almaktadır. TP53 meme kanseri dahil olmak üzere akciğer, mide, beyin gibi birçok kanser türünde mutant durumda bulunmaktadır [57].

TP53'ün mutant olması ile meme kanserlerinde malign histopatolojik özellikler arasında yakın ilişki bulunmaktadır [58]. Meme kanserinde yapılan çalışmalar TP53 ekspresyonu ile yüksek tümör derecesi, yüksek proliferasyon indeksi, ER ve PR yokluğu arasında yakın ilişki olduğu tespit edilmiştir. Teşhis sırasında lenf nodu metastazına sahip olanlar kadar kısa yaşam süresi ile TP53 ekspresyonu arasında prognostik bir anlamlılık tespit edilmiştir [59].

Meme kanserlerinin yaklaşık %20-30'unda TP53 geni inaktivasyonu gözlenmektedir. TP53 mutasyonlarının tespiti için in situ'dan invazif karsinomaya geçiş için bir marker olarak kullanılabilir. In situ duktal karsinomlar da TP53

mutasyonu gözlenmediği, bunun yanısıra meme karsinogenezinin erken evrelerinde TP53'ün mutasyona uğradığı saptanmıştır [60,61].

2.7.2. ATM Geni

ATM (Ataxia telangiectasia mutated) geni 11. kromozom üzerinde bulunur. Çok uzun ve kompleks bir gendir. ATM DNA çift zincir onarımında, hücre döngüsü, transkripsiyonel düzenleme ve apoptoz aktivasyonunu düzenleme gibi pekçok işlevde rol oynamaktadır. ATM geni resesif olarak kalıtılır. Çok sayıda mutasyon gözlenir. İki hasarlı mutant allel hastalık gelişimine neden olur. Meme kanseri için büyük risk taşır [62].

2.8. AİLESEL MEME KANSERİ VE YATKINLIK GENLERİ

2.8.1. BRCA1 ve BRCA2 genleri

BRCA1 geni 17q21 kromozomu üzerinde localize olup 24 ekzona sahiptir BRCA2 ise 13q12.3'te lokalizedir ve 27 ekzondan oluşmaktadır.. BRCA1 geni 1863 amino asitlik, BRCA2 geni ise 3418 aminoasitlik bir proteini kodlar. BRCA1 ve BRCA2, DNA tamirinde, transkripsiyonel regülasyonda, hücre büyüme kontrolünde rol oynar. Meme kanserine sahip ailelerin çoğunda BRCA1 ve BRCA2 germ soyu mutasyonları saptanmıştır. Meme ile birlikte ovaryum kanserine yatkınlık geni taşıyan ailelerde BRCA1 ile %80'e yakın ilişki tespit edilmiştir. Gene özgü meme kanseri ailelerde BRCA1 için bu oran % 45 iken BRCA2 için %35 tir [63].

2.9. EVRELEME

Meme kanserinde evreleme yalnızca hastaya hangi tedavinin seçileceği ve prognozun nasıl olacağı konusunda bilgi vermekle kalmaz, aynı zamanda farklı tedavi tiplerinin kıyaslanmasına da imkan sağlar [64].

2.9.1. Meme Kanserinde Evreleme

Meme kanseri evrelemesinde AJCC 2002 (American Joint Committee on Cancer) evreleme sistemi kullanılmaktadır ve TNM (Tümör-Nod-Metastaz) sınıflamasına göre yapılmaktadır. TNM sisteminde T harfi primer tümör boyutunu, N bölgesel lenf düğümlerini, M ise metastazı temsil etmektedir [65,66].

Primer tümör

Tx Değerlendirilemeyen primer tümör

To Primer tümöre ait bulgu yok

Tis In situ karsinom

Tis(DKIS) Duktal karsinom in situ

Tis(LKIS) Lobuler karsinom in situ

Tis(Paget) Meme başının paget hastalığı (primer başka tümör yok)

T1 En büyük çapı < 2,0 cm tümör

T1mic En büyük çapı < 0,1 cm mikroinvaziv tümör

T1a Tümör çapı > 0,1 cm, ancak < 0,5 cm

T1b Tümör çapı > 0,5 cm, ancak < 1,0 cm

T1c Tümör çapı > 1,0 cm, ancak < 2,0 cm

T2 Tümör çapı > 2,0 cm, ancak < 5,0 cm

T3 Tümör çapı > 5,0 cm

T4: Göğüs duvarı (GD) (a) veya deri (b) tutulumu

T4a: Göğüs duvarına invazyon

T4b: Memede ödem (portakal kabuğu görüntüsü ile, peau d'orange), cilt ülseri veya aynı memede uydu (satellit) cilt nodüllerinin olması

T4c: T4a ve T4b birlikte

T4d: İnflamatuvar meme karsinomu

Bölgesel lenf nodları (N)

Klinik sınıflama

- NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
- N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
- N1: Hareket edebilen ipsilateral aksiller lenf nodlarına metastaz
- N2: Birbirine veya çevreye yapışık ipsilateral aksiller lenf nodu metastazı veya klinik olarak aksilla (-) ancak ipsilateral internal mammaryan lenf nodu metastazı
- N2a: Birbirine veya çevreye yapışık aksiler ipsilateral lenf nodu metastazı
- N2b: Klinik olarak aksilla (-) iken, klinik ipsilateral internal mammaryan lenf nodu metastazı
- N3: İpsilateral aksiller lenf nodu tutulumu ile birlikte internal mammaryan lenf nodu metastazı veya infraklaviküler lenf nodu metastazı veya supraklaviküler lenf nodu metastazı.
- N3a: İpsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı
- N3b: İnternal mammaryan lenf nodu ve birlikte aksiller lenf nodu metastazı
- N3c: İpsilateral supraklaviküler lenf nodu metastazı

Patolojik sınıflama

pNX: Değerlendirilemiyor, daha önceden lenf nodları çıkarılmış, ya da hiç çıkartılmamış.

NOB: Histolojik olarak rejonel lenf nodu metastazı yok, izole tümör hücreleri için ek inceleme yapılmamış.

pNO (i-): lenf nodu metastazı yok İHK (-)

pNO (i+): histopatolojik olarak lenf nodu metastazı, İHK boyamada izole tümör hücre kümeleri 0.2 mm'den küçük

pNO (mol-): Histolojik olarak lenf nodu metastazı yok, moleküler bulgular negatif (RT-PZR)

pNO (mol+): Histolojik olarak lenf nodu metastazı yok, moleküler bulgular +(RT-PCR)

pN1: 1-3 aksiller lenf nodlarında metastaz ve/veya internal mammaryan lenf nodlarında mikrometastaz (klinik olarak (-))

pN1mi: Mikrometastaz (>0.2 mm, <2 mm)

pN1a: 1-3 aksiller lenf nodlarında metastaz

pN1b: İnternal mammaryan lenf nodlarında mikrometastaz (klinik olarak (-))

pN1c: 1-3 aksiller lenf nodlarında metastaz ve/veya sentinel lenf nodu diseksiyonu ile saptanan internal mammaryan lenf nodlarında mikrometastaz (klinik olarak (-)). Eğer 3'den fazla + aksiler lenf nodu ile birlikte ise pN3b olarak tanımlanır

pN2: 4 - 9 aksiller lenf nodlarında metastaz veya aksiler lenf nodu metastazı olmadan klinik olarak internal mammaryan lenf nodlarında metastaz

pN2a: 4 - 9 aksiller lenf nodlarında metastaz (en az biri >2mm)

pN2b: Aksiller lenf nodu metastazı olmadan klinik olarak internal mammaryan lenf nodlarında metastaz

pN3: 10 veya daha çok aksiller lenf nodlarında metastaz, veya infraklavikular lenf nodlarında metastaz, veya 1-3 aksiller lenf nodu metastazı varlığında internal mammaryan lenf nodlarında metastaz (klinik olarak (+)), veya >3 aksiller lenf nodu metastazı varlığında internal mammaryan lenf nodlarında mikrometastaz (klinik olarak (-)), veya ipsilateral supraklavikuler lenf nodu metastazı

pN3a: 10 veya daha çok aksiller lenf nodlarında metastaz, infraklavikular LN'da metastaz,

pN3b: 1'den fazla aksiller lenf nodu metastazı varlığında ipsilateral internal mammaryan lenf nodlarında klinik olarak (+), veya >3 aksiller lenf nodu metastazı varlığında internal mammaryan lenf nodlarında mikrometastaz (klinik olarak(-))

pN3c: ipsilateral supraklavikuler lenf nodu metastazı

Uzak metastaz (M)

- MX: Uzak metastaz belirlenemiyor
- M0: Uzak metastaz yok
- M1: Uzak metastaz

AJCC 2002 Meme Kanseri Evrelemesi

Evre 0 • Tis, N0, M0

Evre I • T1, N0, M0

Evre IIA • T0, N1, M0

- T1, N1, M0

- T2, N0, M0

Evre IIB • T2, N1, M0

- T3, N0, M0

Evre IIIA • T0, N2, M0

- T1, N2, M0

- T2, N2, M0

- T3, N1, M0

- T3, N2, M0

Evre IIIB • T4, N0, M0

- T4, N1, M0

- T4, N2, M0

Evre IIIC • Herhangi bir T, N3, M0

Evre IV • Herhangi bir T, herhangi bir N, M1

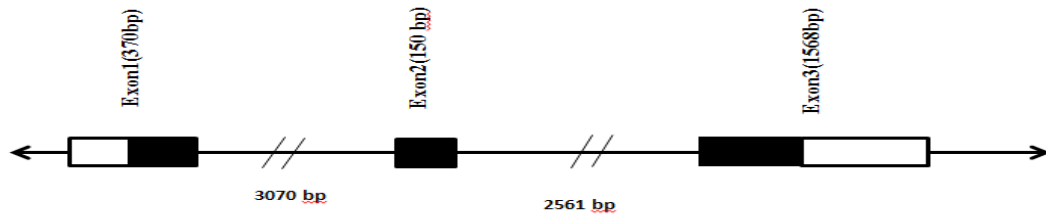
3. ESM-1 (Endokan) GENİ

ESM-1 kanda serbest dolaşabilen dermatan sülfat proteoglikan olarak tanımlanmıştır. Endotel hücrelerden salgılanmaktadır. ESM-1, HUVEC hücre hattından cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır. ESM-1'in cDNA sekansında 552 nükleotitik kısmı okunmaktadır [67,68]. Bu genin aşırı ekspresyonunun tümör büyümesi, gelişmesi ve anjiojenez oluşumunda önemli bir rolü vardır [69,70]. Endotel hücrelerinde ESM-1'in mRNA ekspresyonu anjiojenik faktörler, (VEGF) ve tümör nekroz gibi enflamatuar sitokinler (TNF) tarafından düzenlenir [71-73].

3.1. ESM-1 GEN YAPISI

ESM-1 insanlarda beşinci kromozom üzerinde 5q11.2 bölgesine yerleşmiş olup 2 intron tarafından ayrılarak 3 ekzon halinde düzenlenmiştir. Ekzon1 370 bp, ekzon2 150 bp ve ekzon3 1568 bp uzunluğundadır [74, 75].

Bu genin ekspresyonu endotel bağımlı patolojik bozukluklarda rolü olan sitokinler tarafından düzenlenmektedir [76].



Resim1. ESM-1 geninin şematik gösterimi

ESM-1'in İki izoformu bulunmaktadır. Birinci izoformu 184 amino sahip iken ekzon2'nin olmadığı ikinci izoform 134 amino asite sahiptir [76].

Tablo 1. ESM-1 geninin izoformları

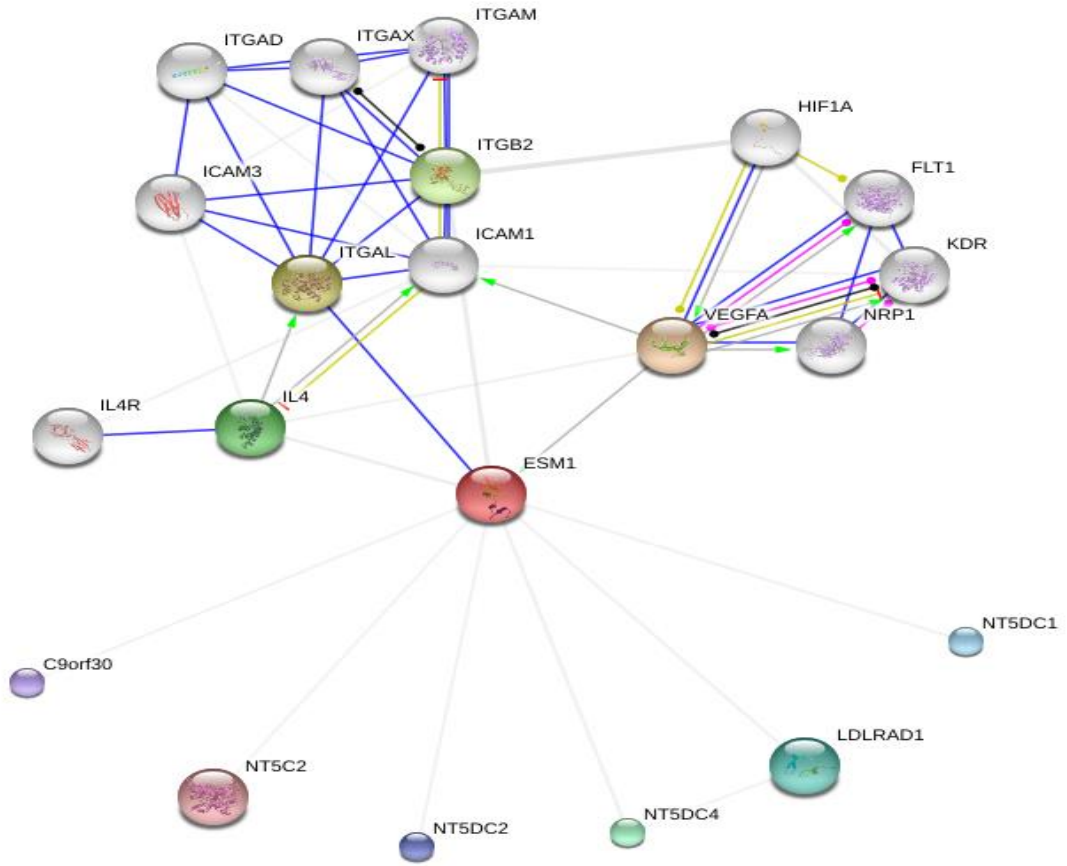
ESM-1	184 aa
ESM-1 ($\Delta 2$)	134 aa

3.2. ESM-1 GENİNİN DİĞER GENLERLE İLİŞKİSİ

VEGF, özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörüdür. Daha önce yapılan çalışmalarda VEGF'in ESM1 gen ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır [9-11].

LFA-1 bir heterodimerik transmembran glikoproteindir ve alfa/beta olmak üzere iki alt bölümden oluşmaktadır. Alfa bölümünün adı ITGAL (CD11A) olup, beta bölümünün adı ise ITGB2 (CD18)'dir [77]. ICAM-1 ise LFA-1'in karşı reseptörüdür [78]. ICAM ve LFA-1 etkileşimi birçok hücrel olay açısından önem taşımaktadır [79,80].

ESM-1, insan kanındaki lenfositlerin, monositlerin ve Jurkat hücrelerinin yüzeyinde bulunan LFA-1 proteinine doğrudan bağlanmaktadır. Bu etkileşim bazı kimyasal iyonlara (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) bağlı bir şekilde meydana gelmektedir. Bu bağlantıdan dolayı ESM-1 geninin LFA-1/ICAM-1 yolağını düzenlediği söylenebilir. Ayrıca ESM-1 geni ile ITGAL, ICAM genleri arasındaki ilişki [81] (şekil2'de) damarda dolaşan lenfositlerin inflamatuvar bölgelere çağrılmasını ve LFA-1 bağımlı lokosit adhezyonu ve aktivasyonunu da etkilemektedir [82].



Resim2. ESM-1 geninin diğer genlerle ilişkisinin şematik gösterimi [81]

3.3. ESM-1 GENİNİN HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ

ESM-1 geninin son zamanlarda yapılan araştırmalarda böbrek, karaciğer ve akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde rolü tespit edilmiştir [9-11, 68].

3.3.1. ESM-1 Geninin Mide Kanseri İle İlişkisi

Mide kanseri en agresif malign tümörlerden biridir. Çinde kanserden ölümlerin en önde gelen sebeplerinden biridir [83,84]. Erken teşhis ile hayatta kalma şansı önemli ölçüde artırılabilir. Bununla birlikte spesifik biomarkırların eksikliği hastalığın erken teşhisine engel teşkil etmektedir. Liu Ni ve arkadaşlarının yapmış

olduğu çalışmada tümör epitelyumda ESM-1'in aşırı ekspresyonunun uzak metastaz ile önemli ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca mide kanseri ve normal doku örneklerinde yapılan immünohistokimya analizleri sonucu mide kanser doku örneklerinde yüksek ESM-1 ekspresyonu izlenmiştir. Ayrıca ESM-1 ekspresyonunun hastaların yaşam süresi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yüksek ESM-1 ekspresyonunun hastaların yaşam süresinin kıaldığı saptanmıştır [9].

3.3.2. ESM-1 Geninin Böbrek Kanseri İle İlişkisi

Böbrek kanseri kötü prognoz gösteren bir kanser türüdür. Son yıllarda anjiogenezi hedef alan yeni tedavi yaklaşımları metastaz oluşumunun tedavisinde olumlu sonuçlar vermektedir. VEGF antikoru VEGF'in biyolojik aktivitesini etkisiz hale getirdiğinde metastazı olan hastalarda sağ kalım süresinin uzadığı gözlenmiştir. Sunitinib böbrek karsinomada VEGF'i etkisiz hale getirmek için kullanılan bir VEGF antikordur (11). Böbrek karsinomada VEGF'in indükleyerek ESM1 ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır [9,85].

Leroy X ve arkadaşlarının böbrek kanserinde sunitinib kullanarak VEGF'i etkisiz hale getirdiklerinde ESM-1'in salınımının kontrol edilebildiğini saptamışlardır. Ayrıca böbrek tümör hücrelerinde ESM-1' in ekspresyonunun normal böbrek hücrelerine göre arttığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar ESM-1' in böbrek kanserinde biomarkır olarak kullanılabileceğini göstermektedir [11].

3.3.2. ESM-1 Geninin Karaciğer Kanseri İle İlişkisi

Karaciğer kanseri dünyada yaygın olan kanserler arasında beşinci sırada yer almakla beraber kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır [86]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılması için yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır. Birçok kanser türünün tedavisinde olduğu gibi karaciğer kanser tedavisi içinde anti-anjiyogenez umut verici bir yaklaşım olmuştur. Tümör endotelial hücreleri anjiyogenez oluşumunda etkin bir rol oynamaktadır. Endotelial hücrelerin farklı organ, doku ve tümörlerdeki heterojen yapısı endotelial hücrelerin kanser tedavisinde yeni hedef olabileceğini göstermektedir [10].

Son yıllarda yapılan çalışmalar metastazın diğer kanser türlerinde olduğu gibi karaciğer kanseri oluşumunda da çok önemli bir yere sahip olduğunu göstermiştir. Hücre göçü ve invazyon tümör büyümesi için çok önemlidir; çünkü bunlar metastaz oluşumunu düzenlemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda ESM-1'in ekspresyonunun karaciğer kanser dokularında arttığı tespit edilmiştir. ESM-1 siRNA ile baskılandığında metastaz oluşumuna etkisi olan hücre göçü ve invazyon oluşumunun azalmış olduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucunda ESM-1'in karaciğer kanseri için bir biomarkır olabileceği saptanmıştır [86, 87].

3.3.4. ESM-1 Geninin Akciğer Kanseri İle İlişkisi

Akciğer kanseri kanserden ölümlerin en önde gelenidir [88]. Dünyada görülme sıklığının giderek artması ile hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılması için yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir [89]. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörüdür [43]. Daha önce yapılan çalışmalarda VEGF ile ESM-1 arasında anlamlı bir ilişki saptanmaktadır [9-11]. Akciğer kanser hücrelerinde yapılan çalışmada VEGF'in ESM-1 ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Bunun sonucunda ESM1'in akciğer kanseri için bir biomarkır olabileceği saptanmıştır [89].

3.3.5. ESM-1 Geninin Meme Kanseri İle İlişkisi

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık % 30' unu oluşturmaktadır. Kanser ölüm nedeni olarak akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır [16]. van't Veer LJ ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 98 meme kanseri kadın hastadan alınan örneklerde 5000 gene mRNA microarray analizi yapılarak ekspresyonu farklılık gösteren 70 gen saptanmıştır. Ekspresyonu farklı çıkan bu genlerin (cyclin E2, MCM6, RAB6B ve ESM-1) hastalığın prognozunu belirlemede önemli olduğu ve ESM-1'in ekspresyonunun bu hastalarda arttığı tespit edilmiştir. ESM-1'in prognozu kötü olan hastalarda biomarkır olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir [9].

4. GEREÇ VE YÖNTEM

2003 ve 2005 yılları arasında arasında Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda meme kanseri nedeniyle ameliyat edilen hastalardan tümör ve metastaz doku örnekleri alındı. 30 olgunun tümör ve metastaz örnekleri ESM-1 geninin Ekzon1, Ekzon2've Ekzon3'de çalışıldı. Çalışma grubu lenf nodu metastazı olan ve tümör olarak iki gruba ayrıldı. Her iki çalışma grubundaki hastaların primer tümörüne ait parafin bloklarından doku örnekleri alınıp DNA izolasyonları yapıldı.

4.1. PARAFİN BLOKTAN DNA İZOLASYONU

Lenf nodu metastazı saptanan ve tümör doku gruba ait parafin bloklardan DNA izole edebilmek için öncelikle klasik yöntemle (ksilol ve azalan alkol serileri) dokular parafinden arındırıldı. DNA izolasyonu için Invitrogen PureLink™ Genomic DNA Kit For purification of genomic DNA (Kat no: K1820-02) kiti kullanıldı. Kısaca parafinden arındırılan dokular üzerine 40 µl proteinaz K ve 380 µl parçalama solüsyonu eklenerek 55°C'de gece boyunca yaklaşık 14-15 saat inkübasyona bırakıldı. 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek yeni tüpe aktarılan supernatant üzerine 40 µl RNase A ilave edildi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 400 µl liziz bağlama solüsyonu eklendi ardından 400 µl %99 etanol eklendi vortekslenerek iki ayrı spin kolona aktarıldı. 10.000 g'de 1 dk 25 °C'de santrifüj edildi. Kolona bağlanan DNA yıkama solüsyonu 1 ve 2 ile yıkandı. DNA'yı çözmek için 100 µl elüsyon solüsyonu eklendi ve DNA'lar -20 °C'de saklandı.

4.2. DNA AMPLİFİKASYONU

ESM-1 geninin üç ekzon bölgesinde mutasyon bölgesini analiz etmek için primer tasarlandı.

Birinci ekzon için Forward Primer 5' AGCAAAGACCACGACTGGAG 3', Reverse Primer 5' GGGAGAGGTAAGGGGTCCTACT 3' kullanıldı. Yaklaşık 373 bp'lik bölge polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edildi

İkinci ekzon için Forward Primer 5' TTGGTTCAAATCGCAAGGCT 3', Reverse Primer 5' ACCCACCGTTCCCCTGAGTA 3' kullanıldı. Yaklaşık 383 bp'lik bölge amplifiye edildi.

Üçüncü ekzon için Forward Primer 5' GCAAAACTGTGTTGTCTTTGAGCTA 3', Reverse Primer 5' TTCTGGATCCACCATGCATCACA 3' kullanıldı. Yaklaşık 306 bp'lik bölge amplifiye edildi.

Tablo 2. PZR reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri ve sırası

Çalışılan Gen ESM1		Primer çiftlerinin baz sırası 5'-3'	Ürünün uzunluğu bp
EKZON1	Forward Reverse	AGCAAAGACCACGACTGGAG GGGAGAGGTAAGGGGTCCTACT	373 bp
EKZON2	Forward Reverse	TTGGTTCAAATCGCAAGGCT ACCCACCGTTCCCCTGAGTA	383 bp
EKZON3	Forward Reverse	GCAAAACTGTGTTGTCTTTGAGCTA TTCTGGATCCACCATGCATCACA	306 bp

4.3. PRİMERLERİN HAZIRLANMASI

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda 1x TE (Tris-EDTA) eklenerek 100pmol/ml'lik stok çözeltiler hazırlandı. PZR işleminde kullanılmak üzere stoktan 20 µL alınarak 80 µL 1x TE tamponu eklendi.

4.4. GRADİYENT PZR

Her ekzon için gradiyent PZR yapıldı. Deneyler boyunca kullanılacak olan gradiyent PZR işlemi için belirlenen karışım solüsyonu şu şekilde belirlendi:

Total PZR reaksiyon karışımı her bir örnek için 25 mikrolitre olacak şekilde hazırlandı. 10X buffer, MgCl₂ (25mM), dNTP, primerler, H₂O ve Taq Polimerazdan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi.

Tablo 3. Gradiyent PZR için kullanılan solüsyon karışımı

Solüsyon	Miktar
10X Buffer	2,5 µl
MgCl ₂	2,5µl
dNTP	0,5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
Taq polimeraz	0,2 µl
H ₂ O	16,3µl
DNA	2 µl

Gradiyent PZR yapmak üzere ESM-1 için belirlenen program koşulları şu şekildedir.

Tablo 4. ESM-1 için İzlenen PZR programı

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	55-65 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	5 dakika	

4.5. NORMAL PZR

Deneyler boyunca kullanılacak olan normal PZR işlemi için belirlenen master miks solüsyonu şu şekilde belirlendi:

Tablo5. Normal PZR için kullanılan solüsyon karışımı

Solüsyon	Miktar
10X Buffer	2,5 µl
MgCl ₂	2,5µl
dNTP	0,5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
Taq polimeraz	0,2 µl
H ₂ O	16,3µl
DNA	2 µl

Tablo6. ESM-1 Ekzon1 İçin İzlenen PZR Programı (373 bp)

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	55-65 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	5 dakika	

Tablo7. ESM-1 Ekzon2 İçin İzlenen PZR Programı (383 bp)

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	55-65 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	5 dakika	

Tablo8. ESM-1 Ekzon3 İçin İzlenen PZR Programı (306 bp)

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	55-65 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	5 dakika	

4.6. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Araştırdığımız gen bölgelerinin PZR ürünlerinin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için %2'lük agaroz jelde PZR ürünleri yürütüldü. 100 ml 1X TAE (Tris/Asetik Asit/EDTA) tamponunun içine 3 gr agaroz (Invitrogen kat no: 16500-100g) konuldu. Mikrodalgada agaroz iyice eriyinceye kadar tutuldu. 2.5 µl (10mg/ml) etidyum bromid (Invitrogen) ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek 30 dakika donmaya bırakıldı. PZR ürünlerinden 5 µl alınarak 1 µl 6x loading dye ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Jel 110 V'de 15 dk yürütüldükten sonra U.V transliminatörde görüntülendi.

4.7. SEKANS İŞLEMİ

4.7.1. Örneklerin Exosap İle Muamelesi

PZR tüplerinin içine 2 µl Exosap konuldu. Üzerine 5µl örnekten eklendi ve aşağıdaki termal cyclus programına konuldu.

- i. 37°C de 30 dakika başlangıç denatürasyonu
- ii. 80°C de 15 dakika son uzama
- iii. 4°C de son sıcaklık

4.7.2. Sekans PZR'ın Yapılması:

Sekans PZR için kazırlanan karışımı her bir tüpe 8 µl paylaştırıldı ve üzerine 2 µl exosapla muamele edilmiş DNA'lar eklendi. Sekans PZR'da kontrol olarak PGEM (pgem-3zf (+double stranded) dna kontrol) kullanıldı. PGEM ve bir örnek için hazırlanan karışımı aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Tablo 9. Sekans PZR için karışım

MİKS	Miktar	PGEM	Miktar
BigDye	2µL	BigDye	2µl
5XBuffer	2µL	5XBuffer	2µl
Primer (Reverse veya Forward)	2µL	M13 Primer	2µl
Nuclease free su	2µL	Nuclease free su	2µl
		Pgem	2µl

4.7.3. Sekans Koşulları

PZR koşulları:

- i. 96°C de 1 dakika başlangıç denatürasyonu
- ii. 96°C de 15 saniye denatürasyon
- iii. 50°C de 15 saniye primer bağlanma
- iv. 60°C de 4 dakika extension
- v. 25 döngü

4.7.4. Sephadex Hazırlanışı

1 gr toz sephadex tartılarak falkon tüpe alınır. Üzerine 14 ml ddH₂O su ilave edilerek vortekslenir ve 1 saat bekletilir. Sekans PZR amplikasyonundan sonra PZR ürünleri sephadex kolon pürifikasyonu ile pürifiye edildi. Örnekler ABI-3130 sekans cihazına yüklendi ve sonuçlar Seqscape V2.7 software programı ile değerlendirildi.

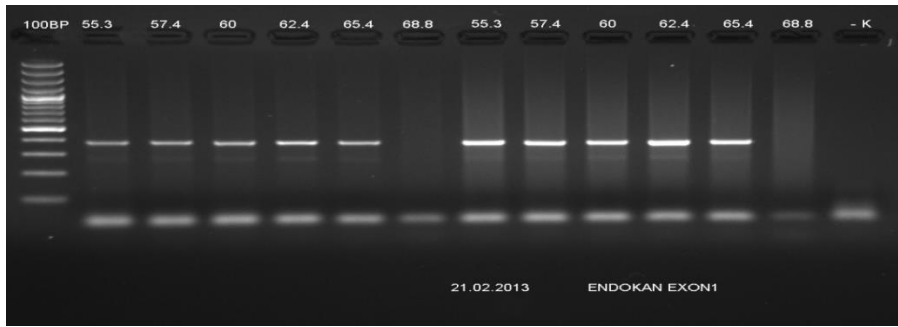
4.8. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR

Hettich Rotina 380R santrifüj (Germany), Nüve Bench Top santrifüj (Turkey), Memmert Benmari WNB-14 (Germany), Shimadzu AUW220D Hassas terazi (Japan), Herolab UV transluminator (Germany), ABI-3130 Sekans Analayzer Cihazı, VWR International Vortex (Germany), Scotsman AF80 Buz makinesi (IL, USA), VWR Galaxy Ministar spin arttırıcı (Korea), Thermo Scientific OWL EASYCASTTM B2 Jel elektroforez sistemi (USA), Techne TC-3000X PCR cihazı (normal PCR)(USA), Techne TC-5000 PCR cihazı (Gradient PCR)(USA), Schimadzu UV-Pharmaspec 1700 spektrofotometre (Japan),Schimadzu Biotech Biospec-nano spektrofotometre (Japan), Thermo Scientific Barnstead Easypure II ultra saf su cihazı (USA),Techne Dri-Block DB-2D heatblock (UK),Consort EV265 elektroforez güçkaynağı (Belgium), Cleaver Scientific MSCHOICE elektroforez tankı, Mikrodalga firmı SAMSUNG MV71E (Korea), VWR advanced VMS-C7 manyetik karıştırıcı (Korea)

5. BULGULAR

5.1. ESM-1 EKZON1 GRADİYENT PZR ELEKTROFOREZ SONUCU

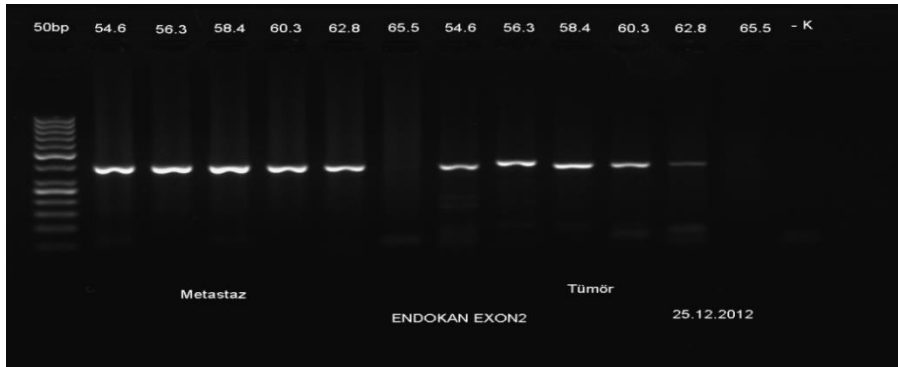
Gradyent PZR yapılan meme kanseri DNA örnekleri agaroz jelde yürütülerek bantlar 373 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. Optimize sıcaklığın 55-65 °C arasında herhangi bir sıcaklık olduğuna karar verildi (Resim.3).



Resim.3 Ekzon1 gradiyent PZR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü

5.2. ESM-1 EKZON2 GRADİYENT PZR ELEKTROFOREZ SONUCU

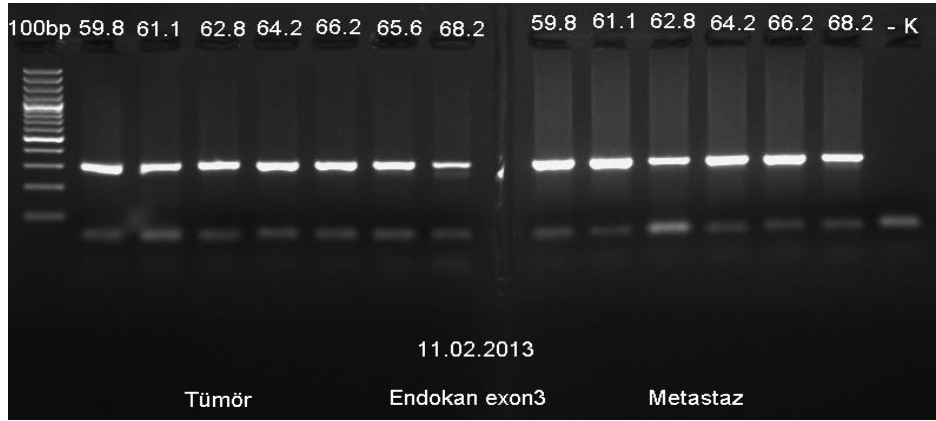
Meme kanseri DNA örnekleri agaroz jelde yürütülerek bantlar 383 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. Optimize sıcaklığın 54-60 °C arasında herhangi bir sıcaklık olduğuna karar verildi (Resim4).



Resim4. Ekzon2 gradiyent PZR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü

5.3. ESM-1 EKZON3 GRADİYENT PZR ELEKTROFOREZ SONUCU

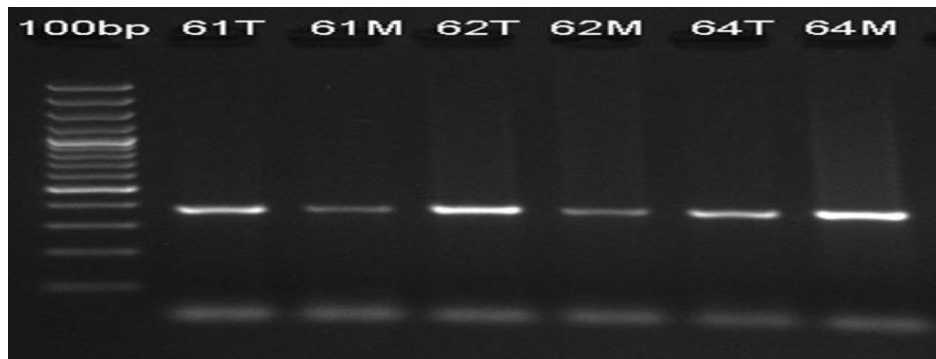
Meme kanseri DNA örnekleri agaroz jelde yürütülerek bantlar 306 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. Optimize sıcaklığın 59-68 °C arasında herhangi bir sıcaklık olduğuna karar verildi (Resim5).



Resim5. Ekzon3 gradiyent PZR sonucunda elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü

5.4. ESM-1 EKZON1 PZR ELEKTROFOREZ SONUCU

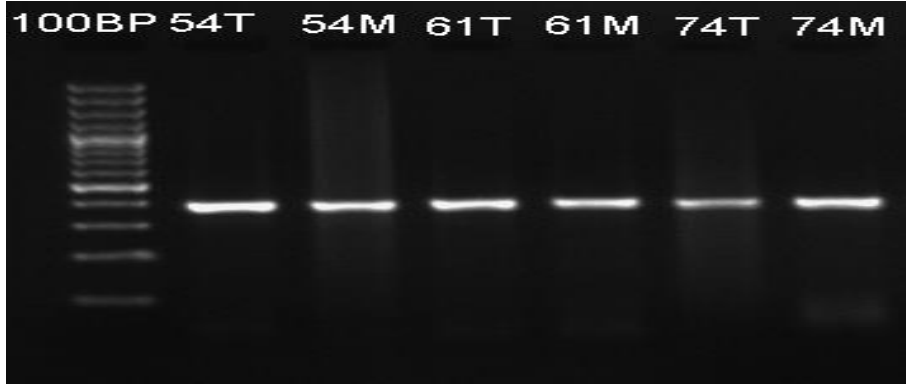
Araştırdığımız bölgenin PZR ürününü değerlendirmek için, tümör ve metastaz PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek 373 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. U.V transliminatörde görüntülendi (Resim6).



Resim6. Ekzon1 PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

5.5. ESM-1 EKZON2 PZR ELEKTROFOREZ SONUCU

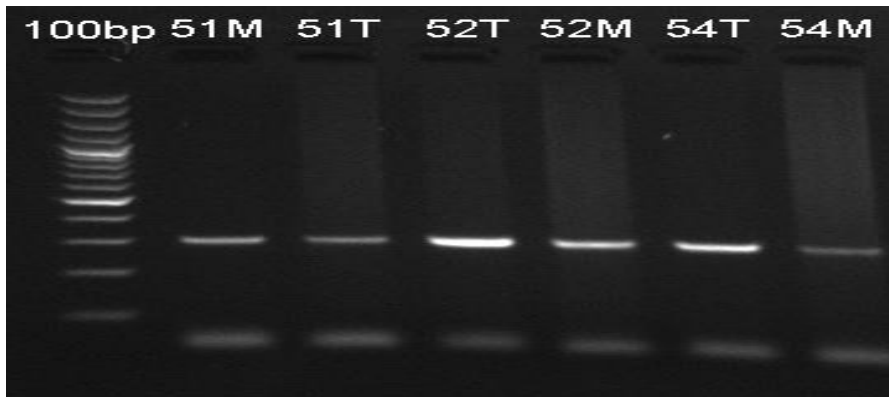
Araştırdığımız bölgenin PZR ürününü değerlendirmek için, tümör ve metastaz PZR ürünleri %2'lük agaroz jelde yürütülerek 383 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. U.V transliminatörde görüntüledi (Resim7).



Resim7. Ekzon 2 PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

5.6. ESM-1 EKZON3 PZR ELEKTROFOREZ SONUCU

Araştırdığımız bölgenin PZR ürününü değerlendirmek için, tümör ve metastaz PZR ürünleri %2'lük agaroz jelde yürütülerek 306 bp uzunluğu karşılayacak şekilde elde edildi. U.V. transliminatörde görüntüledi (Resim8).



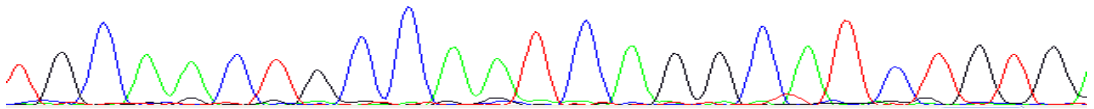
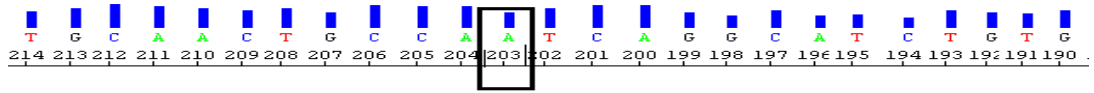
Resim8. Ekzon 3 PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

PZR ürününün varlığı tespit edildikten sonra DNA sekans yapılarak ESM1 geninin mutasyon etkisine bakıldı. PZR amplikasyonundan sonra PZR ürünleri sephadex kolon pürifilasyonu ile pürifiye edildi. Örnekler ABI-3130 sekans cihazına yüklendi ve sonuçlar değerlendirildi.

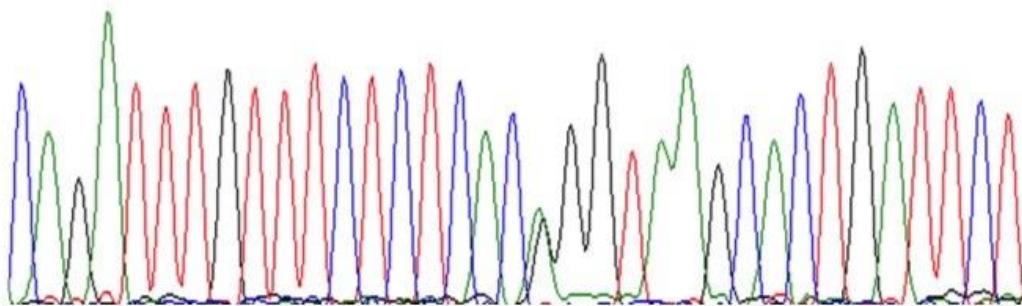
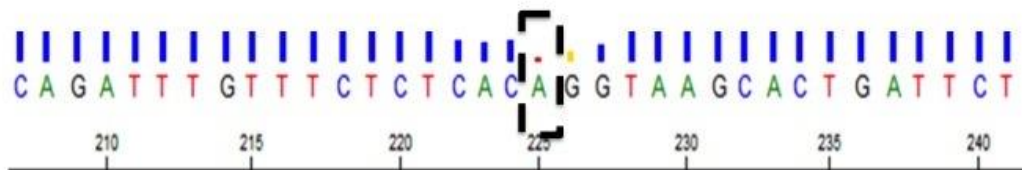
5.7. SEKANS BULGULARI

ESM-1 geninin 3 ekzonunda 30 meme kanseri ve metastaz örneklerinde PZR sonrası sanger sekanslama yöntemiyle analiz edildi. Toplu sonuçlar tablo10 verilmiştir. Sekans analizi yapılan 30 kanser ve metastaz örneğinde Ekzon 1'e ait herhangi bir nükleotid değişimi bulunmamıştır. Buna karşılık ekzon 2'nin sekans yapılan 30 kanser ve metastaz örneğin 2'sinde nükleotid değişimi saptanmıştır. Bu iki örnekteki değişim birinde sadece metastazda tespit edilirken örneklerin diğerinde hem primer hem de metastazında bu değişim saptanmıştır. Bir örnekte sadece metastazda 118 no'lu kodonda CAG---CAA homozigot değişimi saptanmıştır (Resim9). Bu nükleotid değişimi her iki durumda da glutamin kodlamış olup sessiz bir değişiklikle sonuçlanmıştır. Diğer örnekte ise hem tumor hem de metastazında CAG---CAA/G heterozigot değişikliği saptanmış olup burda da herhangi bir aminoasit değişikliği tespit edilmemiştir (Resim10).

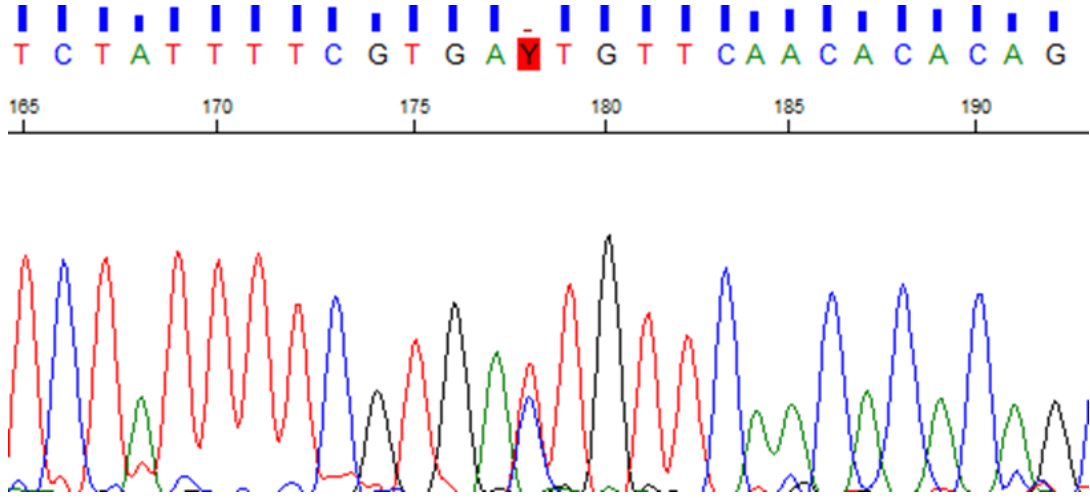
Diğer taraftan sekans analizi yapılan 30 primer tumor ve 30 metastaz örneğinin 9'unda poliA bölgesinde nükleotid değişimi saptanmıştır. Primer tumor örneklerinden 5'inde TTG---T/CTG heterozigot değişimi saptanmıştır. Bu değişim aynı tumor örneklerinin metastazındada saptanmıştır. Buna karşılık 4 metastaz örneğinde aynı nükleotid değişimi gözlenirken primer tümörlerinde bu değişim saptanmamıştır (Resim11).



Resim9. Ekzon2 G/A mutasyonu



Resim10. Ekzon2 A/G heterozigot polimorfizmi



Resim11. Ekzon3 PoliA bölgesi C/T heterozigot polimorfizmi

Tablo10. Elde edilen sekans sonuçları

ESM-1	Hasta Sayısı	Mutasyon görülen hasta sayısı	Mutasyon	Yeri	a.a dönüşümü
EKZON1	30	yok	-	-	-
EKZON2	30	1 1	CAG→CAA Hom. CAG →CAG/A Het.	118.kod. 150.kod.	Gln→Gln Gln→Gln
EKZON3	30	9	TTG →T/CTG Het.	PoliA bölgesi	

6. TARTIŞMA

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, günümüzde kadınlar arasında kanser nedeni ile ölüm oranlarına bakıldığında akciğer kanseri ile birlikte ilk sırada yer almaktadır.

Kadınlarda 40-45 yaş arasında kansere bağlı ölüm nedenleri arasında en sık görülen kanser türü meme kanseridir [6]. Hastalığın karakteri ile ilgili tedavi süreci ve klinik davranışı değişiklik göstermektedir. Fakat ortak görüş klinik gidişi primer olarak etkileyen faktörün metastaz olma durumudur. Meme kanseri tanısı konan hastalarda tanı anında metastaz saptanmamış olsa bile, tanı ve tedavi sonrası uzun süre metastaz riski devam etmektedir [91].

Meme kanserinin gelişmekte olan ülkelerin çoğunluğunda hala kanser kaynaklı ölümlerde üst sırada yer alması moleküler patogenezi belirlemek amacıyla her geçen gün artan hızda moleküler çalışmaların yapılmasına neden olmuştur. Hastalığın seyrini öngören prognostik markırların bulunması tüm bu süreçleri pozitif yönde etkileyeceğinden bu konu hakkında yapılan çalışmalar oldukça önem kazanmıştır.

Karsinogenezde ve metastatik süreçte genetik faktörlerin de rol aldığı saptanmıştır. Metastaz oluştuğu durumlarda, özellikle uzak metastazlarda prognoz oldukça kötüdür. Metastaz oluşumu anjiojenez, invazyon, migrasyon gibi birbirleriyle ilişkili olaylar zinciri ile gerçekleşir [92]. Anjiojenezde birçok ajan rol oynar.

Anjiojenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı vasküler endotelial growth faktör (VEGF)'dir. Ayrıca anjiojenezisi uyaran faktörler içerisinde hem anjiojenik etki gösteren hem de damar geçirgenliğini arttıran tek faktör VEGF'dür [93]. VEGF, özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip multifonksiyonel bir büyüme faktörüdür. Endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna, ve differensiasyonuna sebep olur [94].

ESM-1 geni endothelial hücrelerden salgılanmaktadır ve bu genin ekspresyonu endotelial ve epitelyal hücrelerde VEGF tarafından arttırılmaktadır [95]. Daha önce ESM-1 geni ile ilgili akciğer, karaciğer, böbrek, mide kanserlerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar sonucunda ESM-1 geninin anjiyogenezde ve tümör oluşumunda rol oynadığı tespit edilmiştir. Çalışmalar ESM-1 geninin potansiyel bir tümör biomarkır olarak kullanılabileceğini göstermiştir [9-11].

ESM-1'in tümör büyümesi ve anjiyogenezde önemli bir rolü olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen meme kanserinde mutasyon oluşumuna etkisi hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Genlerin fonksiyonlarının anlaşılması, metastaz oluşumunun altında yatan biyolojik mekanizmaların anlaşılmasını sağlayacaktır.

Van't Veer LJ ve arkadaşlarının meme kanseri hastalarından alınan örneklerle cyclin E2, MCM6, MMP9, RAB6B ve ESM-1 ile yapılan microarray çalışmasında metastaz gösteren hastalarda ekspresyon farklılığı saptanmıştır. Uzak metastaz olan hastalarda ESM-1'in ekspresyonunun arttığı ve prognozu kötüye giden hastalar için markır olarak kullanılabilir bir grup gen arasında ESM-1'in de olduğu bulunmuştur [90]. ESM-1 geni ile ilgili ayrıntılı bir mutasyon sekans incelemesi yapılmamıştır.

Bu sebeple bizde çalışmamızda ESM-1 geninin, meme kanseri üzerindeki mutasyon oluşumuna etkisini araştırmayı planladık. Literatürde çalışma konumuzla bire bir ilgili araştırmalar bulunmadığından benzer çalışmalarla karşılaştırmalar yapılacaktır.

ESM-1 geni ile ilgili çeşitli tümöral hastalıklar arasındaki ilişkilere bakıldığında; Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gastrik kanser dokuları normal gastrik dokusu ile karşılaştırıldığında ESM-1'in mRNA ekspresyon seviyelerinin çok daha yüksek çıktığını görmüş ve ESM-1'in ekspresyonunun pozitif görüldüğü hastalarda sağ kalımın negatif bulunanlara göre daha kısa olduğunu tespit etmiştir.

ESM-1'in tümör progresyonundaki mekanizmalar üzerinde etkisi olduğunu savunmuştur [9].

Maurage ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise ESM-1'in oligodendroglioma, astrocytoma ve oligoastroctoma beyin tümör hücreleri üzerinde etkisi araştırılmış yüksek dereceli gliom hücrelerinde ESM-1'in ekspresyonu pozitif, düşük dereceli gliom hücrelerinde ESM-1'in ekspresyonun negatif olduğu saptanmıştır [71].

Chen ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada karaciğer kanser dokusunda ESM-1'in mRNA ekspresyon seviyesinin normal karaciğer doku hücrelerine göre çok daha yüksek olduğu saptanmıştır [10].

Grigoriu ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada ise akciğer kanser doku örneklerinde ESM-1'in mRNA seviyesinin VEGF'e bağlı olarak arttığını gösteren bir çalışmada mevcuttur [89].

Kang ve arkadaşlarının ESM-1'in kolon kanseri üzerine yapmış oldukları bir çalışmada bulunmaktadır. Bu çalışmada ESM-1'in ekspresyonu siRNA ile baskılandığında metastaz oluşumuna sebep olan hücre göçü ve invazyon oluşumunun azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda ESM-1'in kolon kanser tedavisinde markır olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir [96].

Ameur ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada tiroid kanserinde RET geninin mutasyonlarına bakıldığında, ESM-1 geninin mutasyon olan tümör dokularında fazla eksprese olduğunu tespit etmişlerdir. Bu bulguyu doğrulamak için aynı dokuda immünohistokimyasal boyama yapıldığında ESM-1 protein seviyesinin yüksek olduğunu saptamışlardır [97].

Bir başka çalışmada ise beyinde görülen Arteriovenöz Malformasyon (AVM) hastalığında mikrosatellit markır kullanılarak üç bölge tespit edilmiş ve bu bölgeler arasında sekans analizi yapılmış ve sekans sonucunda içerisinde ESM-1 genide

olmak üzere MAP3K1, DAB2, OCLN, FGF10, ITGA1, ITGA2, EGFLAM, ERBB2IP ve PIK3R1 on aday gen tespit edilmiş. Bu genlerin AVM hastalığının oluşmasında mutasyon oluşumu etkisine bakıldığında ESM-1 geninde mutasyon olmadığı saptanmıştır [98]. Bazı hastalıklar için bir grup genin ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler bu genlerin ekzon bölgelerinde meydana gelen mutasyonlarla doğrudan ilgili olmayabilir. Genin ekspresyonunu etkileyen başka hücrel faktörlerin olduğu da bir gerçektir.

Bizde çalışmamızda meme kanserinde daha önce çalışılmamış olan ESM-1 geninin üç ekzonunda mutasyon taramasını yaptık. Elde ettiğimiz verilere dayanarak Ekzon2'nin bitiş noktasında 30 vaka içinden bir vakanın hem primeri hemde metastazında 150. kodonda CAG→CAG/A **rs142604597** G/A heterozigot polimorfizmi saptanmıştır. Yine Ekzon2 de 30 vaka içinden bir vakanın sadece metastazında 118. kodon bölgesinde daha önce saptanmamış sessiz bir mutasyon tespit ettik. Bu mutasyon CAG → CAA değişimi olup amino asitte (Gln → Gln) herhangi bir değişikliğe sebep olmamaktadır. İleriki çalışmalarda bu mutasyonun başka araştırmalarla da desteklenmesi gerekmektedir.

Ekzon3 de **rs3776032** bölgesinde yapılan sekans analizi sonucu otuz vakadan dokuzunda 9/30 ekzonun poliA bölgesinde T/C heterozigot durumu saptanmıştır. Son yıllarda miRNA'ların kanser oluşumuna etkisinin olabileceğine dair çalışmalar hızla artmaktadır. miRNA'ların genler üzerindeki regülasyonunda 3'UTR bölgelerinin rolü olduğuna dair yayınlarda bulunmaktadır [99-101]. Bu durum örneklerimizdeki poliA bölgesindeki değişikliklerin meme kanseri oluşumu ve metastazında miRNA'lar üzerinden rolleri olabileceğini düşündürmektedir. ESM-1 geninin meme kanseri üzerine etkisinin net bir şekilde gösterilebilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. SONUÇ

Bu çalışmada 2003 ve 2005 yılları arasında Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda meme kanseri nedeniyle ameliyat edilen hastalardan tümör ve metastaz doku örnekleri alındı. 30 olgunun tümör ve metastaz örnekleri ile ESM-1 geninin üç ekzonunda mutasyon analizi yapıldı ve aşağıdaki sonuçlara ulaşıldı:

1. Meme kanseri doku örnekleri ile yapılan bu çalışmada ESM-1 geninin meme kanseri üzerinde mutasyon oluşumuna etkisinin araştırılması ilk kez yapıldı.
2. Ekzon1'de herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.
3. Elde ettiğimiz verilere dayanarak bir vakada metastaz örneğinde ekzon2'nin bitiş noktasında 30 vakadan birinde 150. kodonda CAG→CAG/A **rs142604597** noktasında G/A heterozigot polimorfizmi tespit edilmiştir
4. Yine ekzon2 de farklı bir vakanın metastaz örneğinde 118. kodon bölgesinde daha önce saptanmamış sessiz bir mutasyon tespit ettik. Bu mutasyon (118.kodon CAG→CAA'ya dönüşmüştür fakat Gln → Gln aminoasit değişikliğine sebep olmamaktadır. İleriki çalışmalarda bu mutasyonun başka araştırmalarla da desteklenmesi gerekmektedir.
5. Ekzon3'de 5 farklı vakanın hem tümör hem metastaz örneklerinde ve 4 farklı vakanın sadece metastaz örneklerinde ekzonun poliA bölgesinde T/C heterozigot saptanmıştır. Bu durum poliA kısmına bağlanma ihtimali bulunan miRNA'ların olabileceğini düşündürmektedir. ESM-1 geninin meme kanseri üzerine etkisinin net bir şekilde gösterilebilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

1. Hutchinson L. Breast cancer: Challenges, controversies, breakthroughs. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010; 7(12):669-70.
2. Hickey, M, et al, Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. *Hum Reprod Update*, 2009; 15(3): p. 323-39.
3. Hoover R. Breast Cancer: Geographic, Migrant, and Time-Trend Patterns. In: Fortner JSP, ed. Accomplishments in cancer research. *New York: Lippincott-Raven*, 1996; 403-25.
4. Baring CC, Squires TS, Tang T. Cancer Statistics 1993 CA. *Cancer J Clin.* 1993; 43: 426
5. Sivenberg E, Lubera J: Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.*1987; 37; 19
6. Kirby IB, Coppeland EM. Breast. In: Seymour IS, Shires GT, Spencer FC, Husser WC. Principles of surgery, vol 1, 6th edition. New York: Mc Graw Hill, 1994; 531-93.
7. Sayek, İ, ed. Temel Cerrahi. Meme, ed. i. sayek. Vol. Kısım 7 2004, Güneş Kitapevi: İstanbul
8. Miecznikowski, J.C, et al, Comparative survival analysis of breast cancer microarray studies identifies important prognostic genetic pathways. *BMC Cancer*, 2010; 10: p.573.
9. Liu Ni. Zhang Lian-hai, Du Hong, et al. Endothelial Cell Specific Molecule-1 (ESM-1) in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.*2010;17: 2628-2639
10. Chen L-Y et al. Over-expression of the Endocan Gene in Endothelial Cells from Hepatocellular Carcinoma is Associated with Angiogenesis and Tumour Invasion. *The Journal of International Medical Research* 2010. 38: 498 - 510
11. Leroy,X, Aubert, S, Zini, L, Franquet, H, Kervoaze, G, Villers, A, Delehedde, M, Copin, M.C. & Lassalle, P. Vascular endocan (ESM-1) is markedly overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology.* 2010; 56, 180-187.
12. Cooper M.G, Hausman R.E, Hücre moleküler yaklaşım, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, TR, 2006; 633-667
13. Donnem T, Al-Saad S, Al Shibli K, Delghandi MP, Perrson M, Nilsen MN, et al. Inverse prognostic impact of angiogenetic marker expression in tumor cells versus stromal cells in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6649-57
14. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; 385:503-511
15. Kopnin, B.P Targets of oncogenes and tumor supressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry.*2000: Vol 65. No 1, pp. 2-27.
16. Anders CK, Johnson R, Litton J, et al. Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol* 2009;36: 237-49.

17. Kitamura Y, Ohno Y, Kasahara S, Murata K, Sugiyama H, Oshima A, Tsukuma H, Ajiki W, Hasegawa T. Statistical estimation of the number of breast cancer patients with disabilities resulting from surgery. *Breast cancer* 2005;12: 130-4.
18. Zackrisson S, Andersson I, Janson L, Manjer J, Garne JP: Rate of overdiagnosis of breast cancer 15 years after end of Malmö mammographic screening trial: follow-up study. *BMJ*, 332;689-692, 2006
19. Solomayer EF., Diel I.J, Meyberg G.C, Gollan C.H., Bastert G. (2000) “Metastatic Breast Cancer: Clinical Course, Prognosis and Therapy Related to the First Site of Metastasis”, *Breast Cancer Research and Treatment*; 59: 271-278.
20. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. : Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2005;9: 777-794.
21. Campbell J.B. Breast Cancer-Race, Ethnicity, and Survival: A literature Review. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2002;74: 187-192.
22. Smith R.A, Cokkinides V, Von Eschenbach A.C, Levin B, Cohen C, Runowcz C.D, Sener S, Saslow D, Eyre H.J. American Cancer Society Guidelines for the Early Detection of Cancer. *CA Cancer Journal for Clinicians* January- February. 2002; 52(1): 8-22.
23. Bottorff JL, Johnson JL, Bhagat R, Grewal S, Balneaves L.G, Clarke H, Hilton B.A. Beliefs Related to Breast Health Practices: The Perceptions of South Asian Women Living in Canada. *Social Science and Medicine.* 1998;47(12):2075-2085.
24. Hall A.M., Hooper C. The Frequency of Breast Screening in Older Women. *Professional Nurse.* 1999 December;15(3):155-159.
25. Schmidt RT, Tsangaris TN, Cheek JH. Breast cancer in women under 35 years of age. *Am J Surg* 1991;162:197-201
26. Rosen, Paul P. *Rosen's Breast Pathology.* Third Edition Lippincott Williams & Wilkins (LWW) 2008.
27. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D M. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No. 5. version 2. 0. Lyon: IARC Press, 2004.
28. American Cancer Society. Probability of developing invasive cancer over selected age intervals, by sex, US, 1999–2001. www.cancer.org, 2005.
29. Gnerlich, J.L, Deshpande AD., et al., Poorer Survival Outcomes for Male Breast Cancer Compared with Female Breast Cancer May Be Attributable to In-Stage Migration. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(7): 1837-44
30. Elinor Washbrook Risk factors and epidemiology of breast cancer *Women's Health Medicine*, Volume 3, Issue1 January–February 2006, Pages 8-14
31. Miki, Y, et al, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1994. 266(5182): p. 66-71.
32. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997; 336: 1401-1408

33. Bland, K, Copeland, EM, . Second edition. 1998, ed. The breast comprehensive management of benign and malignant diseases. ed. W. Sanford H.B, J, Gradishar, AR. MarshallnMU. Vol. 2. 1992, *W B Saunders*: USA.
34. Cuzick J. Epidemiology of Breast Cancer. *The Breast*. 2003;12: 405-411.
35. Daling JR, Malone KE, Voigt LF, et al: Risk of breast cancer among young women: Relationship to induced abortion. *J Natl Cancer Inst* 1994; **86**: 1584–1592.
36. Vogel VG. Breast Cancer Prevention: A Review of Current Evidence. *CA Cancer L Clin*. 2000; 50: 156-170.
37. Garber J. Risk Factors. in: Silva EO, Zumda S (Eds.). Breast cancer. 3^{dh} ed. Oxford: *Elsevier Sounders*; 2005. P26-53
38. Joensuu H, Toikanen S, Klemi PJ. DNA index and S phase fraction and their combinations as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer*. 1990; 66: 331-40
39. McGuire WL. Prognostic factors and treatment decisions in axillary node negative breast cancer patients. In: *ASCO Educational BOOK*, 1991.
40. Green S, Chambon P. The oestrogen receptor from perception to mechanism. In: Parker MG. Nuclear hormon receptors. *London: Academic Press*, 1991: 15-38.
41. Giri, D.D, et al, Oestrogen receptors in benign epithelial lesions and intraduct carcinomas of the breast: an immunohistological study. *Histopathology*, 1989. **15**(6): p. 575-84.
42. Jakesz, R. et al. [Tumor histology and steroid receptors in breast carcinoma]. *Onkologie*, 1981. 4(2): p. 73-8.
43. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al.: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996; 93:1493-1495
44. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 1017 21
45. Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
46. Shalaby R, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62.
47. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factors. *Cancer Res*. 2000. 60(2): 203-12
48. Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmits PLM, Foekens JA. The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev*.1992; 13: 3- 17
49. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*.2006. 17; 366(1):2-16

50. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. Similarity of protein encoded by the human *cerbB2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1986; 319,230-234
51. Kurebayashi JJ. Biological and clinical significance of *her2* overexpression in breast cancer. *Breast Cancer*. 2001; 8(1):45-51
52. Paik, S., et al., *erbB-2* and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90(18): p. 1361-70.
53. Dang CV. *c-Myc* target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(1):1-11
54. Robanus-Maandag EC, Bosch CA, Kristel PM, et al. Association of *C-MYC* amplification with progression from the in situ to the invasive stage in *C-MYC*-amplified breast carcinomas. *J Pathol*. 2003;201: 75-82
55. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogene and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*. 2004; 9: 361-77
56. Liao DJ, Dickson RB. *C-Myc* in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7(3):143-164
57. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the *p53* tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54: 4855–78.
58. Norberg T, Jansson T, Sjogren S, Martensson C, Adreasson I, et al. Overview on human breast cancer with focus on prognostic and predictive factors with special attention on the tumor suppressor gene *p53*. *Acta Oncologica 35 (suppl 5)* 1996:96-102
59. Sirvent JJ, Fortuno Mar A, Olona M, Orti A. Prognostic value of *p53* protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histol Histopathol*. 2001; 16 (1):99-106
60. Cattoretti G, Rilke F, Andreda S, Mato LDA, Delia D. *p53* expression in breast cancer. *Int J Cancer*. 1998; 41:178-183
61. Powell B, Soong R, Iacopetta B, Seshadri R, Smith DR. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the *p53* gene in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6: 443–51.
62. Ahmed M, Rahman N. *ATM* and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 2006; 25;25(43):5906-11
63. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richard CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutation in *BRCA1* and *BRCA2*. *Nat Genet*. 1996;14: 185-7
64. Ciatto S, Pacini P, Axini J, et al. Preoperative staging of primary breast carcinoma. *Cancer*. 1988; 61: 1038-1764
65. Donegan WL. Staging and primary treatment. In: Donegan WL, Spratt JS. *Cancer of the breast*, 4th ed. Philadelphia: *W.B.Saunders*, 1995; 375-442.

66. Yeatman TJ, Blond KI. Assessment and designation of breast cancer stage. In: Blond KI, Copeland EM. The breast: Comprehensive management of benign and malignant diseases. Philadelphia: *WB Saunders*, 1998;:567-76
67. Bechard D, Gentina T, Delehedde M, Scherpereel A, Lyon M, Aumercier M, Vazeux R, Richet C, Degand P, Jude B, Janin A, Fernig DG, Tonnel AB, Lassalle P: Endocan is a novel chondroitin sulfate/ dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem*. 2001; 276(51):48341-48349
68. Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV, Tavernier J, Fiers W, Devos R, Tonnel AB: ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem* 1996, 271(34):20458-20464.
69. Scherpereel A, Gentina T, Grigoriu B et al. Overexpression of endocan induces tumor formation. *Cancer Res*. 2003; 63; 6084–6089.
70. Roudnicky F, Poyet C, Wild P, Krampitz S, Negrini F, Huggenberger R, Rogler A, Stöhr R, Hartmann A, Provenzano M, Otto VI, Detmar M. Endocan is upregulated on tumor vessels in invasive bladder cancer where it mediates VEGF-A-induced angiogenesis. *Cancer Res*. 2013 ;73(3):1097-106.
71. Maurage CA, Adam E, Minéo JF, Sarrazin S, Debunne M, Siminski RM, Baroncini M, Lassalle P, Blond S, Delehedde M. Endocan expression and localization in human glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68(6):633-41.
72. Aitkenhead M, Wang SJ, Nakatsu MN, Mestas J, Heard C, Hughes CC: Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc Res* 2002, 63(2):159-171.
73. Abid MR, Yi X, Yano K, et al. Vascular endocan is preferentially expressed in tumor endothelium. *Microvasc Res* 2006;72:136Y45
74. Sarrazin S, Adam E, Lyon M, Depontieu F, Motte V, Landolfi C, Lortat-Jacob H, Bechard D, Lassalle P, Delehedde M. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochem Biophys Acta*.2006; 1765: 25–37
75. Zuo L, Zhang SM, Hu RL, Zhu HQ, Zhou Q, Gui SY, Wu Q, Wang Y Correlation between expression and differentiation of endocan in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*.2008; 14: 4562–4568
76. Depontieu F, Grigoriu BD, Scherpereel A, Adam E, Delehedde M, Gosset P and Lassalle P. Loss of Endocan tumorigenic properties after alternative splicing of exon2 *BMC Cancer* 2008, 8: 14
77. Hynes, R.O.Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69: 11
78. Diamond, M.S, and T.A. Springer. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr. Biol*.1994;4: 506.
79. Shaw,A.S.,and M.L.Dustin.Making the cell receptor go the distance. A topogical view of Tcell activation. *Immunity* 1997 6: 361

80. Hogg, N, and R.C.Landis. Adhesion molecules in cell interactions. *Curr. Opin Immunol.* 1993; 5: 383.
81. <http://string80.embl.de>
82. Bechard D, Scherpereel A, Hammad H et al. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* 2001; 15: 3099-106.
83. Poste G. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature.* 1980; 283: 139-46.
84. Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 17-20.
85. Rennel E, Mellberg S, Dimberg A, Petersson L, Botling J, Ameer A, Westholm JO, Komorowski J, Lassalle P, Cross MJ, Gerwins P. Endocan is a VEGF-A and PI3K regulated gene with increased expression in human renal cancer. *Exp Cell Res.* 2007 Apr 15; 313(7): 1285-94
86. Kang YH, Ji NY, Lee CI, Lee HG, Kim JW, Yeom YI, Kim DG, Yoon SK, Kim JW, Park PJ, Song EY. ESM-1 silencing decreased cell survival, migration, and invasion and modulated cell cycle progression in hepatocellular carcinoma. *Amino Acids.* 2011 Mar; 40(3): 1003-13.
87. Huang GW, Tao YM, Ding X. Endocan Expression Correlated with Poor Survival in Human Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2009; 54: 389-394
88. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ: Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56(2): 106-130.
89. Grigoriu BD, Depontieu F, Scherpereel A, Gourcerol D, Devos P, Ouatas T et al. Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 4575-4582
90. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002; 415: 530-6.
91. Bloom, H.J., The Natural History of Untreated Breast Cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1964; 114: p. 747-54.
92. Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis. *Eur J Cancer* 1998; 34: 214-221.
93. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) Gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000; 12: 1232-1235
94. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-8.
95. Zhang SM, Zuo L, Zhou Q, Gui SY, Shi R, Wu Q, Wei W, Wang Y. Expression and distribution of endocan in human tissues. *Biotech Histochem.* 2012 ; 87(3): 172-8
96. Kang YH, Ji NY, Han SR, Lee CI, Kim JW et al. ESM-1 regulates cell growth and metastatic process through activation of NF- κ B in colorectal cancer. *Cell Signal* 2012; 24(10): 1940-9

97. Ameer N, Lacroix L, Roucan S, Roux V, Broutin S, Talbot M, Dupuy C, Caillou B, Schlumberger M, Bidart JM. Aggressive inherited and sporadic medullary thyroid carcinomas display similar oncogenic pathways. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Dec;16(4):1261-
98. Oikawa M, Kuniba H, Kondoh T, Kinoshita A, Nagayasu T, Niikawa N, Yoshiura K. Familial brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: linkage analysis with clipped fingernail DNA on high-density SNP array. *Eur J Med Genet*. 2010, 53(5):244-9
99. Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene* 2006;25: 6170-6175
100. Le Brigand K, Robbe-Sermesant K, Mari B, Barbry P. MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics* 2010; 26(24):3131-2.
101. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999-3004

