



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BENİGN VE MALİGN MEME HASTALARINA AİT MEME DOKULARINDA  
FHT GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Gülşah ÇEÇENER**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Bursa-2005**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BENİGN VE MALİGN MEME HASTALARINA AİT MEME DOKULARINDA  
FHT GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Gülşah ÇEÇENER

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Ünal EGELİ

Bursa-2005

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne,

Bu tez, j¼rimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Adı ve Soyadı

İmza

Tez Danışmanı Prof. Dr. Ünal EGELİ

¼ye Prof. Dr İsmet Taşdelen


¼ye Prof. Dr. Nazan Bilgel

¼ye Prof. Dr. Melek Özt¼rk

¼ye Doç. Dr. Berrin Tunca

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunun .....26.05.2005... tarih, .....2005/16....  
sayılı toplantısında alınan .....12... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Kasım ÖZL¼K

Enstit¼ M¼d¼r¼

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	III
SUMMARY.....	IV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi.....	3
2.1.1. Görülme Sıklığı.....	4
2.1.2. Mortalite.....	5
2.2. Meme Kanserinin Etyolojisi.....	6
2.2.1. Reprodüktif Etkenler.....	7
2.2.2. Endokrin Etkenler.....	7
2.2.2.1. Hormonal Kontrol.....	8
2.2.2.2. Ekzojen Hormonlar.....	10
2.2.3. Çevresel Etkenler.....	11
2.2.3.1. Beslenme.....	11
2.2.3.2. Vitaminler.....	11
2.2.3.3. Selenyum.....	12
2.2.3.4. Alkol.....	12
2.2.3.5. Kafein.....	12
2.2.3.6. İyonizan Radyasyon.....	13
2.2.3.7. Fiziksel Aktivite.....	13
2.2.3.8. Sigara.....	14
2.3. Memenin Selim Lezyonları.....	14
2.4. Genetik Etkenler.....	15
2.4.1. Onkogenler.....	15
2.4.2. Büyüme Faktörleri.....	17
2.4.3. Büyüme Faktörü Reseptörleri.....	18
2.4.4. Tümör Supressör Genler.....	20
2.4.5. DNA Tamir Genleri'nin rolü.....	34
2.4.6. Mikrosatellit İnstabilitesi.....	35
2.4.7. Telomeraz Aktivitesi.....	35
2.4.8. Yeni Yaklaşımlar.....	36

2.5. PZR.....	37
2.6. SSCP.....	38
2.7. HDA.....	38
2.8. Gümüş Boyama.....	39
2.9. DNA Dizi Analizi.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	41
3.1. GEREÇLER.....	41
3.1.1. Aletler.....	41
3.1.2. Kitler.....	41
3.1.3. Kimyasal Maddeler.....	41
3.1.4. Çözeltiler.....	43
3.2. YÖNTEMLER.....	43
3.2.1. Örneklerin Toplanması.....	43
3.2.2. Hasta Grubunun Seçimi.....	43
3.2.3. DNA İzolasyonu.....	50
3.2.3.1. Parafin dokudan DNA İzolasyonu.....	50
3.2.3.2. Taze Dokudan DNA İzolasyonu .....	51
3.2.3.3. İzole edilen DNA'nın kalitatif analizi .....	51
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	52
3.2.5. Agaroz Jelin Hazırlanışı ve Elektroforezi.....	55
3.2.6. SSCP ve HDA Analizleri.....	55
3.2.7. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması ve PAGE Yükleme.....	56
3.2.8. Gümüş Boyama.....	56
3.2.9. DNA Dizi Analizi.....	57
3.2.10. İstatistiksel değerlendirme.....	58
4.BULGULAR.....	59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
6.KAYNAKLAR.....	73
TEŞEKKÜR.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	99

## ÖZET

### BENİGN VE MALİGN MEME HASTALARINA AİT MEME DOKULARINDA FHIT GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, malign ve benign meme hastalarında Fragile Histidine Triad (FHIT) gen mutasyonları araştırıldı. 67 malign ve 16 benign dokuda kodlanan ekzonların (5-9) “Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)” ve “Heteroduplex (HDA)” analizleri ve bunların DNA dizi analizleri sonucunda 4 farklı dizi değişimi belirlendi. Meme dokularında FHIT gen mutasyonları % 18.1 (15/83) oranında belirlendi. İki benign ve dört malign hastada (%7.23 oranında) 88. kodonda GCC(Ala)→GCT(Ala) (7.ekzon) ve yedi malign hastada (%8.43 oranında) 9. intronda insA (5'uç+17nükleotid) iki sessiz mutasyon belirlendi. Bir malign hastada (%1.2 oranında) CAG(Gln)→ACA(Thr) dönüşümüne neden olan 90. kodondaki insA (7. ekzon) ve yine bir malign hastada (%1.2 oranında) 197. kodonda GTG(Val)→TGA(stop) dönüşümüne neden olan kodon 146 delT (9. ekzon) çerçeve kayması mutasyonları tanımlandı. Bu çerçeve kayması mutasyonlar iki malign hastada premature stop kodon oluşumuna neden olmaktadır ve meme kanserinde ilk kez belirlenen çerçeve kayması mutasyonlardır.

Sonuç olarak, mevcut çalışmada FHIT geninde çeşitli mutasyonlar belirlendi. Bu mutasyonların genellikle sessiz tip mutasyonlar olduğu gözlemlendi. Bu durumun FHIT genini evrim boyunca korunmasında etkili olabileceği düşünüldü. Ayrıca, bu gende belirlenen iki yeni çerçeve kayması tip mutasyonun meme kanseri gelişiminde önemli olabileceği kanısına varıldı. Ancak, belirlenen mutasyonlar ile prognoz arasında bir ilişki kurulamadı. Bunun sonucunda, daha ileri çalışmalarla FHIT geninin yanında meme kanserinde etkili olabileceği düşünülen diğer gen mutasyonlarının ve gen ekspresyonlarının birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Malign ve benign meme hastalıkları, FHIT gen mutasyonları, SSCP, HDA, DNA dizi analizi

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF FHIT GENE MUTATIONS IN BREAST TISSUES OF MALIGN AND BENIGN BREAST PATIENTS

In the present study, it was investigated to mutations of Fragile Histidine Triad (FHIT) gene in the malign and benign breast tissues. Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) and Heterodublex (HDA) analysis of the coding exons (5-9) in the 67 malign and 16 benign tissues and their sequencing revealed four different sequence alterations. It has been found that 18.1% (15/83) of the breast tissues detected mutations in the FHIT gene. Two silent mutations identified at codon 88 [GCC(Ala) to GCT(Ala)] (exon 7) in two benign and four malign patients (7.23%) and intron 9 insA (5' end+17 nucleotides) in seven malign patients (8.43%). Two frameshift mutations identified at codon 90 (insA) (exon 7) which led to the change of aminoacid from CAG(Gln) to ACA(Thr) in one malign patient and codon 146 (delT) (exon 9) which led to the change of codon 197 from GTG(Val) to TGA(stop) in one malign patient (1.20%). These frameshift mutations resulted in premature stop codons and they have been determined as a first time in breast cancer in the literature.

Consequently, in this study it was identified various mutations in the FHIT gene. These mutations were generally non-sense types. In this case, these results appear to be effective of FHIT gene which has protected during evolution. We think that two new frameshift mutations which were determined in this gene may play a major role in the development of breast cancer. However, FHIT mutations identified were not significantly associated with prognosis. In further studies, other gene mutations and oncogene expressions may be analyzed associated with FHIT gene mutations.

**Key words: Malign and benign breast diseases, FHIT gene mutations, SSCP, HDA, Sequencing.**

## **Kısaltmalar**

<b>FHIT:</b>	<b>Fragile Histidine Triad</b>
<b>SSCP:</b>	<b>Single Strand Conformational Polymorphism</b>
<b>HDA:</b>	<b>Heterodubleks Analizi</b>
<b>LOH:</b>	<b>Loss of Heterozigosity</b>
<b>BRCA1:</b>	<b>Breast Cancer 1</b>
<b>BRCA2:</b>	<b>Breast Cancer 2</b>
<b>A:</b>	<b>Adenin</b>
<b>C:</b>	<b>Citozin</b>
<b>G:</b>	<b>Guanin</b>
<b>T:</b>	<b>Timin</b>
<b>Ala:</b>	<b>Alanin</b>
<b>Gln:</b>	<b>Glutamin</b>
<b>Thr:</b>	<b>Threonin</b>
<b>Phe:</b>	<b>Fenilalanin</b>
<b>Val:</b>	<b>Valin</b>
<b>bç:</b>	<b>Baz çifti</b>
<b>kD:</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>mM:</b>	<b>Milimolar</b>
<b>ng:</b>	<b>Nanogram</b>
<b>µl:</b>	<b>Mikrolitre</b>
<b>PZR:</b>	<b>Polimeraz Zincir Reaksiyonu</b>
<b>ins:</b>	<b>Insertion</b>
<b>del:</b>	<b>Deletion</b>
<b>ER:</b>	<b>Östrojen Reseptörü</b>
<b>PR:</b>	<b>Progesteron Reseptörü</b>
<b>Rb:</b>	<b>Retinoblastom Geni</b>
<b>DCIS:</b>	<b>Duktal insutu karsinom</b>
<b>OK:</b>	<b>Oral kontraseptif</b>
<b>TE:</b>	<b>Tris EDTA</b>
<b>TNM:</b>	<b>Tümör, Nodül, Metastaz</b>



## 1. GİRİŞ

Meme kanseri biyolojik ve klinik açıdan çok heterojenik özellikler gösterir. Meme kanserine bağlı denetimsiz hücre çoğalması genellikle (mutasyon, gen amplifikasyonu, delesyon, kromozomal düzenlenmeler gibi) genomik instabilite belirtileri ve belirli epitelyal özelliklerin ortadan kalkması gibi değişiklikler sergiler. Bu yüzden kanser gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların ve her hastada tümörün özelliklerinin bilinmesi ve buna en uygun tedavi yönteminin belirlenmesi önem taşır. Kanser gelişmesine, ilerlemesine ve yayılmasına neden olan moleküler değişiklikler anlaşıldıkça daha etkili tarama ve tedavi yöntemleri de uygulanabilmektedir.

Meme kanseri araştırmalarının genel amacı; kanser hücrelerinin davranışı hakkında yol gösteren, kanser gelişiminin erken aşamasında ortaya çıkan ve uygun tedavi şeklinin seçilmesi için yardımcı olabilecek moleküler değişiklikleri belirlemek, hatta bunlardan sağlıklı, fakat riskli bireylerde tarama açısından yararlanmaktır.

Meme kanserini de içine alan sık görülen pekçok kanser tipinde homozigot ve heterozigot delesyonlar 3p14.2 kromozom bölgesinde belirlenmiştir. Bu bölgede FHIT adı verilen bir tümör supressör genin lokalize olduğu 1996 yılında Sozzi ve ark. (1) tarafından gösterilmiştir. FHIT geni 1 mb'lık genomik DNA'dan meydana gelen, 1.1 kb'lık transkripti 10 ekzon tarafından kodlanan, evrim boyunca korunmuş, karsinojenlere hassas, genelde delesyon ile inaktive olan bir gendir. Histidin triad gen ailesinin bir üyesidir. Bu genin ürünü olan Fhit proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, bu proteinin hücre siklüsü, replikasyon ve apoptoz olayı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

FHIT geni, özellikle çevresel karsinojenlere maruziyetten oluşan tümörlerde inaktive olmaktadır. Bu tip tümörlerin başında akciğer kanserleri gelmektedir. Özellikle küçük hücreli akciğer kanserleri başta olmak üzere meme kanserleri, kolorektal kanserler, gastrik kanserler, ovaryum kanserleri, böbrek tümörleri, lösemiler vs gibi çok sayıda tümörde bu genin inaktivasyonu bilinmektedir. Meme kanserleri ile ilgili olarak gerçekleştirilen FHIT genindeki inaktivasyon çalışmaları meme kanserlerinde bu genin %30-35'ler civarında inaktive olduğunu ortaya koymuş bulunmaktadır. Bu oran, bir hastalığın genetik oluşum mekanizması için azımsanmayacak anlamlı bir orandır. FHIT tümör supressör genindeki değişimler akciğer, özefagus ve meme kanserlerinde kanser

gelişiminin oldukça erken safhasında meydana gelmektedir (2-5). Yine meme kanserinde, serviks ve endometrium kanserlerinde, bu değişimlerin ileri evre ile ve tümörün agresif davranışı ile de ilişkili olduğu görülmektedir (6-8). FHIT genindeki değişimlerin kanserin gerek erken, gerekse ileri döneminde meydana gelmesinden dolayı; FHIT gen mutasyonlarının çeşitli kanser tiplerinde hem premalign hemde malign dokularda moleküler biyolojik teknikler ile belirlenmesi, kanserin gelişiminde diagnostik ve prognostik informasyon sağlayabilmek açısından önemli bir marker olabilir.

Bu çalışmada amacımız, kadınlarda yaygın olarak görülen benign ve malign meme hastalıklarında FHIT geninin ekzon 5-9 mutasyonlarını SSCP, HDA ve DNA dizi analizi ile araştırarak Türk toplumuna ait meme hastalarında bu mutasyonların hangi ekzonlarda yoğunlaştığını ve tiplerini belirlemek, hastalığın prognozu ile bu mutasyonlar arasındaki ilişkinin varlığını araştırmak, bu mutasyonların bir prognostik biomarker olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da yılda 180 bin, Amerika Birleşik Devletleri'nde de yılda 184 bin yeni olgu saptanmaktadır (9, 10).

Gelişmiş ülkelerde 1948-1995 yılları arasında kadınlarda kanser nedeniyle meydana gelen ölümlerin % 80'i meme kanserine bağlı iken, 1985'den itibaren akciğer kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri sıralamasında meme kanserini geçmiştir (11). 2000 yılında ise, sıralamada meme kanseri diğer kanserleri geride bırakmıştır (Tablo-1) (12). Erkeklerde meme kanseri nadirdir. 1998 yılında ABD'nde 1600 erkek meme kanserli hasta saptanmış olup 400 kişi meme kanseri nedeniyle ölmüştür (9).

**Tablo-1: Dünyada kanser morbidite ve mortalitesi\*.**

ERKEKLER			KADINLAR		
KANSER TÜRÜ	MORBİDİTE	MORTALİTE	KANSER TÜRÜ	MORBİDİTE	MORTALİTE
Akciğer	34.92	31.43	Meme	35.66	12.51
Mide	21.46	15.62	Serviks	16.12	7.99
Prostat	21.23	7.95	Kolon rektum	14.44	7.58
Kolon rektum	19.11	9.78	Akciğer	11.05	9.53
Karaciğer	14.97	14.41	Mide	10.38	7.81

\*2000 yılı verileri, 1/100.000. [Bilgel N, 2005 (12)'den alındı.]

### 2.1.1. Görülme Sıklığı

Meme kanseri görülme sıklığı 1973'den itibaren ABD'de yılda %1.8; dünyanın çeşitli ülkelerinde de %1-2 oranında artış göstermekte olup, dünyada her yıl yaklaşık bir milyon yeni olguya tanı konulmaktadır (9). Ülkemizde ise, Sağlık Bakanlığının 1996 yılı verilerine göre; meme kanseri görülme sıklığı, 100.000'de 12.07'dir (Tablo-2). 1999 yılı verilerine göre ise; meme kanseri görülme sıklığı, 100.000'de 7.32'dir (www.saglik.gov.tr). 1999 yılında Türkiye'de teşhis edilen meme kanseri vakasının 2390 kişi olduğu bildirilmiştir. 2000 yılındaki verilere göre, yeni belirlenen erkek meme kanseri sayısı 123, kadın meme kanseri sayısı 3354'tür (Devlet İstatistik Enstitüsü 2000 yılı verileri).

**Tablo-2: Türkiye'de kanser morbiditesi\*.**

ERKEKLER		KADINLAR	
KANSER TÜRÜ	MORBİDİTE	KANSER TÜRÜ	MORBİDİTE
Akciğer	19.29	Meme	12.07
Mide	6.22	Mide	3.48
Larinks	4.54	Deri	2.64
Deri	3.67	Akciğer	2.03
Prostat	3.02	Kalın bağırsak	2.03
Kalın bağırsak	2.69	Serviks	2
Rektum	2.22	Rektum	1.74

\* 1996 yılı verileri, 1/100.000. [Bilgel N, 2005 (12)'den alındı.]

Yıllık görülme sıklığındaki artış, düşük riskli toplumlarda yüksek riskli toplumlara göre daha belirgindir ki bu nedenle de yıllar içinde Batı ülkelerinde yaşayan kadınlarla, Doğu ülkelerinde yaşayan kadınlar arasındaki meme kanseri sıklığı farkının kapanacağı beklenmektedir (9, 13). Görülme sıklığındaki en büyük artış Kanada, ABD, İspanya ve İsveç'de (1960-1975 yılları arasında %1.8) ortaya çıkmıştır.

Amerikalı bir kadında yaşam süresi boyunca meme kanseri gelişme olasılığı % 12.5, meme kanserinden ölüm olasılığı ise %3.4 olarak hesaplanmıştır (9). Fakat, bu değerler doğumdan 110 yaşına kadar olan bir süre için hesaplandığından abartılı

görülebilmektedir. Hastalık gelişme riski, yaş ile doğrudan ilişkili olup, yaş arttıkça hastalık görülme sıklığı giderek artar.

Meme kanseri 30 yaşından önce nadir olup, bu yaşı takip eden reproduktif yıllarda hızlı bir tırmanış gösterir; menopoz dönemindeki hafif bir azalmayı takiben de menopoz sonrası yıllarda yavaş eğimle sürekli devam eden bir artış ortaya çıkar (14). Bu nedenle 85 yaşındaki her 9 kadından birinde meme kanseri gelişebileceği beklenmektedir.

Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Hawaii, Kaliforniya, Kanada yılda yüzbinde 80-90 görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, aynı değer Japonya'da sadece yüzbinde 12-15 arasındadır (15). Avrupa ülkelerinde ise görülme sıklığı Kuzey ülkelerinden güneye ve Batı ülkelerinden doğuya doğru gittikçe azalmaktadır (13). Dünya ülkeleri arasında hastalık sıklığındaki bu fark özellikle menopoz sonrası kadınlarda görülmekte olup (16), menopoz öncesi dönemde ülkeler arası farklar çok azdır. Menopoz sonrası yıllarda mortalite, ABD 'de giderek artarken Yugoslavya'da sabit hale gelmekte, Japonya'da ise giderek azalmaktadır (14). Bu durumun nedeni ise bilinmemektedir. 1970'den bu yana Japonya, Singapur ve Çin'de ekonomide Batı tarzı gelişim ve doğurganlığın Batı'ya benzemesi nedeniyle meme kanseri görülme oranındaki fark giderek azalmaktadır (14).

Benzer şekilde, görülme sıklığındaki büyük farklılıklar aynı ülkede yaşayan farklı etnik gruplar arasında (ABD'deki Havaliler, Çinliler ve İspanyol kökenliler) ve beyaz - siyah ırk arasında da (ABD'de yıllık görülme sıklığı beyaz ırkta % 0.0105; siyah ırkta % 0.0087) izlenmektedir (16, 17).

Başka ülkelere göç eden ailelerde yapılan çalışmalar göç eden kadınlarda meme kanseri sıklığının, birkaç nesil sonra, göç ettikleri ülkenin görülme sıklığına ulaştığını göstermiştir (18, 19). Bu durum, özellikle Amerika'nın ve Afrika'da doğup İsrail'e göç eden müsevilerde izlenmiştir (20). Bu gözlem hastalığın ortaya çıkışında çevresel etkenlerin ve yaşam tarzının önemini bir kez daha ortaya çıkarmaktadır.

Meme kanseri sıklığı yaşa bağlı olarak da değişmektedir. 1991-95 yılları arasında Amerika'lı kadınlarda yapılan istatistiksel değerlendirmede 30-34 yaş arası 100 binde 25 olan oran 45-49 yaş arası kadınlarda 100 binde 200 olarak saptanmıştır. 45-50 yaş sonrasında sıklık artmaya devam etmekte, fakat daha yavaş bir artış göstermektedir. 70 - 74 yaş arası kadınlarda oran 100 binde 463'e kadar çıkmaktadır (9).

### **2.1.2. Mortalite**

1950'lerden beri meme kanser insidansı giderek artmaktadır. İnsidansdaki artışa paralel olarak mortalite de artmaktadır. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme

kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler ilk sırayı almaktadır (Tablo-1 ve 2). Görülme sıklığında olduğu gibi, mortalite de yaşa bağlı olarak artmakta ve 80 yaşındaki 100.000 kadından 155'i meme kanserinden ölmektedir. Kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri ile yaş grupları arasındaki ilişki araştırıldığında ise 15 yaş altında lösemnin, 55-74 yaşlar arasında akciğer kanserinin, 74 yaş üstünde kolorektal kanserlerin, 40-44 yaş arasında ise meme kanserinin 1. sırayı aldığı görülmektedir (21).

Dünyada meme kanserine bağlı mortalite, ülkeden ülkeye de değişmekte olup; İngiltere ve Galler'de en yüksek, Japonya ve Tayland'da (İngiltere ve Galler'deki mortalitenin onda biri) ise en düşük seviyededir (10).

Göç eden insanlarda zaman içinde oluşan mortalite değişikliği meme kanseri oluşumunda çevresel etkenlerin ve yaşam tarzının önemli faktörler olduğu görüşünü desteklemektedir. ABD'de ve Hawai'de yaşayan Japonlarda meme kanserine bağlı mortalitenin, Japonya'da yaşayan Japonlara göre; ABD'de doğan Japonlardaki mortalitenin de Japonya'da doğan ve ABD'de yaşayan Japonlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (22).

Meme kanseri görülme sıklığında olduğu gibi yıllık mortalite oranlarında da 1973 yılından itibaren bir artış görülmekle birlikte, bu artış görülme sıklığında olduğu kadar belirgin değildir (23). Takip, Epidemiyoloji ve Sonuç Programı (ABD) verilerine göre 1980'den 1989'a kadar meme kanseri sıklığında bir artış (100.000'de 85'den 100.000'de 105'e) ve 5 yıllık genel sağkalım değerlerinde de bir artış saptanırken, mortalitede herhangi bir değişiklik belirlenememiştir (10). Görülme sıklığındaki artışın yanında, mortalitede bir artış veya bir azalma (tedavilerin etkinliğindeki artışa karşın) olmaması şeklinde ortaya çıkan bu çelişkili durum henüz açıklanamamaktadır.

## **2.2. Meme Kanserinin Etyolojisi**

Meme kanserinin oluşmasında pekçok risk faktörünün söz konusu olduğu bilinmektedir. Genetik, çevresel, hormonal ve sosyobiyojik etkenlerin meme kanseri oluşumunda rol aldığı kabul edilmektedir. Ayrıca, bazı kimyasal maddeler, iyonizan radyasyon ve virüsler meme kanserinin gelişimine neden olurlar. Tüm bu ajanların mutasyonlara neden olabileceği ve kromozomal mutasyonların da insanda meme kanserinin ortaya çıkış ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (24).

### **2.2.1. Reprodüktif Etkenler**

#### **Menarş Yaşı**

Erken menarşın meme kanseri gelişiminde bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (25, 26). Genel olarak menarşın her bir yıl gecikmesi ile meme kanseri riskinin %20 azaldığı kabul edilmektedir (27).

#### **Menopoz Yaşı**

Meme kanseri riski ile menopoz yaşı arasında da bir ilişki mevcuttur. 45 yaşından önce menopoza giren kadınlarda meme kanseri riski, 55 yaşından sonra bu döneme giren kadınların yarısı kadardır (28). Yani aktif menstruasyon dönemi 40 yıl veya daha fazla süren kadınlarda risk aynı dönemi 30 yıl veya daha az olan kadınların iki katıdır (29). Ortalama olarak menopozun her bir yıllık gecikmesi meme kanseri riskini %3 arttırır.

#### **İlk Hamilelik-İlk Doğum Yaşı**

İlk olarak Mac Mahan (30) hamileliğin ve ilk hamilelik yaşının meme kanseri riski ile ilişkili olduğuna dikkatleri çekmiş ve evlenmemiş veya hiç doğum yapmamış kadınlarda, kanser riskinin doğum yapmış kadınlara göre 1.4 kat daha fazla olduğunu belirtmiştir.

#### **Laktasyon**

Laktasyonun meme kanseri oluşumundaki etkisinin hangi bölgede olduğu henüz anlaşılammıştır. Bununla beraber uzun süren laktasyonların toplam ovulatuvar dönem sayısını azaltarak koruyucu bir etki yapması beklenmektedir. Çin’de yapılan bir çalışma bu düşüneyi doğrulamış ve toplam 5 yıllık bir emzirme süresinin meme kanseri riskini %30 oranında azalttığı bildirilmiştir (31). Diğer bir çalışmada ise 4-12 ay arasında emziren kadınlarda riskin %11; iki sene veya daha fazla emzirenlerde ise %25 oranında azaldığı gösterilmiştir (32). 1998'e kadar yayınlanan 32 çalışmanın değerlendirilmesinde sadece 2 tanesinin prospektif olduğu görülmüştür ve 32 çalışmanın 16'sında uzun süreli emzirme ile düşük meme kanseri riskinin oluştuğu sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

### **2.2.2. Endokrin Etkenler**

Meme kanseri hormonların kontrolünde olan meme dokusundan çıktığından, meme kanseri oluşumunda hormonların rolünün olabileceği düşünülmektedir.

### 2.2.2.1. Hormonal Kontrol

Steroid hormon reseptörleri olarak bilinen HRE (Hormon Responsive Element)'ler DNA dizilerine bağlanarak ilgili genin transkripsiyonunu başlatırlar. HRE dizileri söz konusu genlerin promoter bölgesi içinde yer alır ve aynı zamanda transkripsiyonu uyarıcı yönde (enhancer) etki ederler. Steroid etkiye duyarlı genlerin transkripsiyonu hormonun reseptörüne bağlanması ile uyarıldığından bu hormonlar birer "indüklenebilir enhancer" olarak davranırlar. Steroid hormonlar transkripsiyonun regülasyonu yanında transkripsiyon sonrasında mRNA stabilitesinin ve mRNA'nın proteine dönüşme hızının düzenlenmesinde de rol oynarlar (33).

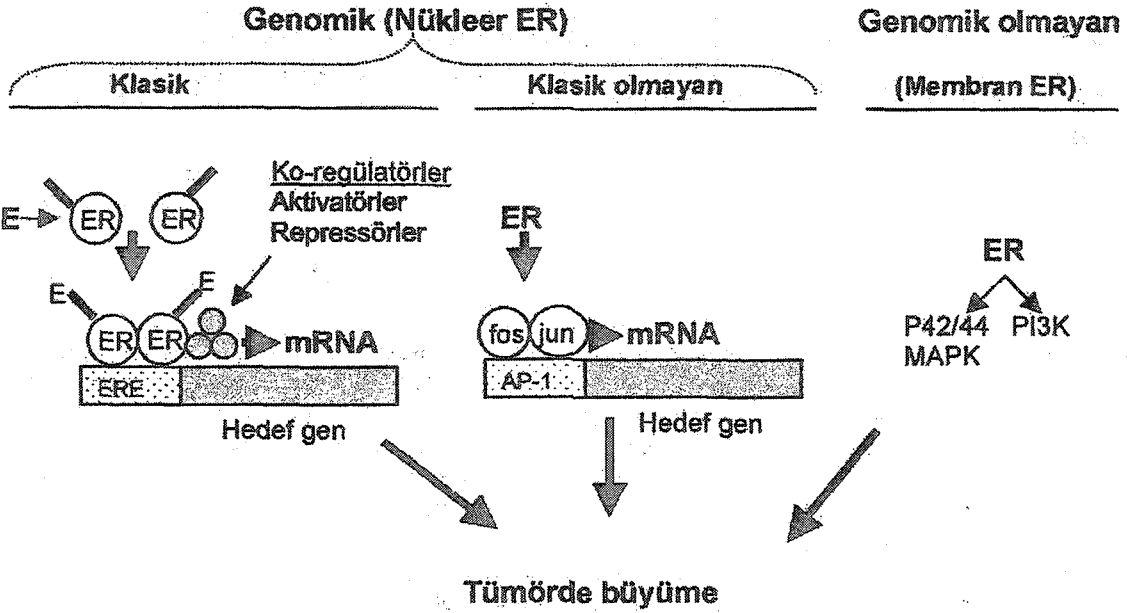
#### Östrojen reseptörü (ER):

Memede endokrin etkenlerin önemi büyüktür. Gerek östrojen, gerekse progesteron tümör oluşumunu ve gelişimini uyarır (34, 35). Östrojen ve progesteron reseptörleri (ER ve PR) duktal ve lobüler hücrelerde, kısmen farklılaşmış epitelde luminal bölgede yer alırlar.

Prognostik açıdan yol gösterici olmamakla birlikte östrojen reseptörü tayini 25 yılı aşkın süreden beri hormonal tedaviye cevap yeteneğini değerlendirmek amacıyla uygulanmaktadır. Ancak meme tümörlerinin % 60 -70'i ER pozitif olduğu halde bunların ancak yarısı ile üçte ikisi kadarı hormonal girişimlere cevap verir. Buna karşılık ER-negatif hastaların da bir bölümü hormon tedavisinden yararlanırlar. Bunun nedeni bilinmediği gibi normal ve malign hücrelerdeki reseptörlerin yapısal ve işlevsel açıdan aynı özellikleri taşıyıp taşımadığı da henüz bilinmemektedir.

Meme kanserinde ER ekspresyonu her aşaması östrojen tarafından kontrol edilen, çok aşamalı, kompleks bir işlemdir. Östrojen etkisiyle ER ekspresyonu ve dolayısıyla östrojen bağlama bölgelerinin sayısı azalır. Östrojen bu etkisini translasyon, transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamaların hepsinde gösterir (Şekil-1).





Şekil-1: ER'nin fonksiyonu [Demiray M 2005 (36)'den alındı].

Östrojen ligandına bağlandığında nükleer ER transkripsiyonu başlatır. Bu ya hedef gendeki promotorlarına bağlanarak (klasik yol), ya da diğer transkripsiyon faktörlerinin aktif kompleks oluşturmasıyla (klasik olmayan yol) oluşur. Membran reseptörü ile etkileşim sonucu büyüme faktörü bağımlı kinazlar aktive olur (36).

#### Progesteron Reseptörü (PR) :

Endokrin tedaviye cevap açısından önemli rol oynayan PR'nün ekspresyonu östrojen-östrojen reseptörü etkileşimi ile regüle edilir. Normal insan meme epitelinde PR'nün ER'ne bağımlı olup olmadığı ve luminal hücrelerde bu iki reseptörün birlikte bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Meme kanserinde PR saptanmaması ER'nün işlevindeki bir bozukluktan veya molekülün kendisinde gerçekleşen bir kusurdan kaynaklanabilir. PR ile hormonal tedaviye cevap arasındaki ilişki ideal olmaktan uzaktır. PR pozitif kanserlerin %70'i hormonal tedaviye cevap verirken PR-negatif kanserlerin de % 25-30 kadarı hormonal tedaviden yararlanır (37). Reseptör düzeyi ile cevap farklılıkları arasındaki uyumsuzluk ölçüm yöntemlerinin yetersizliği, mutasyon taşıyan ER'nün gen ekspresyonunu ligand bağlamadan da uyarabilmesi, tamoksifen metabolizmasındaki farklılık veya östrojen'e bağımlı proteinlerin ER'nden bağımsız bir yol üzerinden sentezlenmesi gibi nedenlerden kaynaklanabilir.

Meme kanseri hücrelerinin progesteron ile etkileşimi de östrojen etkileşimine benzer sonuçlar doğurur, transkripsiyon hızı düşer, mRNA düzeyi ve PR sayısı azalır.

Östrojene bağıl değişikliklerin aksine, mRNA'nın yarı ömründe değişiklik olmaz, buna karşılık PR'nün yarı ömrü kısadır. Östrojen etkisinden bir başka farklılık da etkinin sadece transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamaları kapsamasıdır.

#### 2.2.2.2. Ekzojen Hormonlar

Sentetik ve doğal östrojenler hamileliğin önlenmesi veya menopoş sonrası değişikliklerin giderilebilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Östrojen tedavisi alan veya oral kontraseptif kullanan kadınların meme parankim dokularından alınan biopsilerde, bu ilaçları kullanmayan kadınların biopsilerine göre belirgin değişiklik saptanmamasına karşın; yaygın kullanımları nedeniyle ekzojen hormonların karsinojenik etkilerinin olup olmadığının araştırılması çok önemlidir. Oral kontraseptifler ile meme kanseri ilişkisini araştıran 50'den fazla epidemiyolojik çalışma yapılmıştır.

#### Oral Kontraseptifler

Östrojen ve progesteron ihtiva eden oral kontraseptifler (OK) ve meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. Tüm bu çalışmalardan çıkarılabilecek tek kesin sonuç OK'lerin meme kanserine karşı koruyucu etkilerinin olmadığıdır. Elli dört epidemiyolojik çalışmanın sonucu büyük bir grup halinde toplam analiz edildiğinde meme kanserli 53.297 kadın ve 100.239 sağlıklı kontrol değerlendirilmiştir. Buna göre OK kullanımının süresiyle risk artışı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (38). Bu analizde her yaş grubundan kadın değerlendirilmiş olmakla birlikte postmenopoze veya 45 yaş üstü kadınlardaki uzun süreli OK kullanımı değerlendirildiğinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fakat premenopoze ve uzun süreli OK kullanmış kadınlarda rölatif risk bir metaanalizde 1.5, bir diğesinde 1.4 olarak bulunmuştur (39, 40). Genellikle 35 yaş ve altındaki kadınlarda daha belirgin risk artışı gözlenmektedir.

45 yaş altındaki genç kadınlarda uzun süreli OK kullanımının etkisini araştıran yedi çalışmanın tümünde meme kanseri riskinde istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterilmiş ve her OK kullanılan yıl için meme kanseri riskinin %3.1 arttığı hesaplanmıştır (41). Buna göre 10 yıl boyunca OK kullanan genç bir kadında hiç OK kullanmayan bir kadına göre meme kanseri oluşma riski %36 artmaktadır.

### **2.2.3. Çevresel Etkenler**

#### **2.2.3.1. Beslenme**

Beslenmenin ve özellikle yağdan zengin beslenmenin deney hayvanlarında meme tümörleri oluşturduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (42).

Dünya üzerinde meme kanseri görülme sıklığının ülkeden ülkeye değişmesi ve göç eden insanlarda artan meme kanseri sıklığının (göç ettikleri ülkeye uyan bir sıklığa erişmesi) sadece genetik etkenlerle açıklanamaması, dikkatlerin çevresel etkenler ve özellikle beslenme şekli üzerine toplanmasına neden olmuştur. Bu nedenle meme kanseri riski ile yağdan zengin beslenmenin, vücut ağırlığının, vitamin ve eser elementlerin ilişkileri araştırılmıştır.

#### **2.2.3.2. Vitaminler**

##### **A Vitamini**

A vitamininin içinde bulunduğu karotenoidler antioksidan özelliklere sahip olduklarından DNA hasarına yol açan reaktif oksijen radikallerine karşı hücresel savunmayı arttırabilirler (43). A vitaminini ayrıca hücre farklılaşmasında regülatör olarak rol aldığından hücrelerin malign forma geçişini önleyebilir (44). Retinol in vitro koşullarda insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini önlemiştir. Retinol asetat ise bazı hayvan çalışmalarında meme kanseri insidansını düşürmektedir. A vitamini ile meme kanseri riski ilişkisini araştıran olgu kontrol çalışmalarından ilkinde Graham, A vitamini alımının artması ile kanser riskinin azaldığını bildirmiştir (45). Daha sonra dokuz çalışmayı değerlendiren metaanalizde de A vitamininin meme kanseri oluşumu konusunda anlamlı bir koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (46).

##### **E Vitamini**

Antioksidan özelliklere sahip E vitamini ile yapılan prospektif çalışmalar, E vitamininin meme kanseri oluşumunda koruyucu bir etkiye sahip olduğunu gösterememişlerdir (47-49).

##### **C Vitamini**

A ve E vitaminleri gibi antioksidan özelliklere sahip C vitamini ile yapılan ilk olgu-kontrol çalışmasında koruyucu bir etkinin ortaya konmamasına karşın (45), aynı grup tarafından yapılan daha sonraki bir çalışmada C vitamininin meme kanseri oluşumuna karşı anlamlı bir koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (50). Howe'da yaptığı metaanalizde aynı sonuca varmıştır (47). Yapılan üç prospektif çalışmadan, ikisinin

koruyucu etkiyi doğrulaması yanında sonuncusunun bu etkiyi gösterememesi nedeniyle, C vitamininin koruyucu etkisi konusunda kesin bir yargıya varmak ancak yeni çalışmalar sonrası mümkün olacaktır (48, 49, 51). Amerika'da yapılan bir çalışmada uzun süre C vitamini alanların 14 yıllık takibi sonucunda risk azalması gözlenmemiştir (52).

#### **2.2.3.3. Selenyum**

Selenyum hücre proliferasyonunu inhibe eden ve antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidazın önemli bir komponentidir. Hayvan çalışmalarında, yüksek miktarlarda verildiğinde çeşitli kanserlere karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (52).

#### **2.2.3.4. Alkol**

Alkol alımıyla meme kanseri riski ilişkisi tartışmalı olmakla birlikte, gerek olgu-kontrol çalışmaları gerekse prospektif çalışmalar alkol alımının artması ile meme kanseri riskinin arttığını göstermektedir. Meme kanseri riski ve beslenme faktörlerinin ilişkisi araştırıldığında en belirgin olarak ortaya konulmuş olan risk artırıcı faktör alkoldür.

Oniki olgu-kontrol çalışmasının değerlendirildiği metaanalizde günde 12 gram alkol alan kadınlarda meme kanseri riski 1.4; günde 24 gr alkol alanlarda ise 1.7 olarak bulunmuştur (53).

Alkolün meme kanseri riskini arttırıcı etkisinin mekanizmasını araştıran Reichman günde 12 gr alkol alımının premenopoz kadınlarda total östrojen düzeyini arttırdığını göstermiştir (54).

Premenopoz kadınlarda 2 ölçü alkollü içkinin yarattığı plazma östradiol seviyesindeki yükselme postmenopozelerde tek ölçü alkol ile akut olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bulgular alkolün meme kanseri riskini artırma mekanizmasını açıklamaktadır. Alkolün bir diğer olumsuz etkisi folik asit inaktivasyonu üzerinden olmaktadır ki folat seviyesindeki düşme DNA replikasyonunda ve DNA tamir mekanizmasında defekte neden olmaktadır.

#### **2.2.3.5. Kafein**

Kafeinin selim meme hastalıklarındaki etkisi gözönüne alınarak meme kanserinde bir risk faktörü olabileceği düşünülmüştür. Olgu kontrol çalışmalarında böyle bir etki

gözlenmemiştir. Prospektif çalışmalarda da risk artışı saptanmamıştır (54, 55). Bu nedenle kahve veya çay içilmesi ile meme kanseri riski artışı ortaya konulamamıştır.

#### **2.2.3.6. İyonizan Radyasyon**

İyonizan radyasyonun dokular üzerindeki etkileri erken ve geç olmak üzere iki türdür. Geç etkiler somatik geç etkiler (ışınlanan kişide oluşan) ve genetik geç etkiler (ışınlanan kişiden sonraki nesilleri etkileyen) şeklindedir. Matürasyonunu tamamlamamış meme dokusu radyasyona çok duyarlı olup, radyasyona maruz kalma sonrası gelişim bozuklukları ve meme kanseri oluşabilir.

Hildreth, çocukluğunda timus genişlemesi nedeniyle radyoterapi uygulanmış 1201 kadında meme kanseri oluşma riskini, bu kadınların radyasyon almamış kızkardeşleri (n: 2469) ile karşılaştırarak araştırmıştır (56). Timus genişlemesi nedeniyle radyasyon alan grupta meme kanseri riskinin diğer gruba göre 3.6 kat arttığı ve 28 yıllık bir latent dönemin varlığı bildirilmiştir.

Hiroşima ve Nagazaki'de 2. Dünya Savaşı'nda atılan atom bombası tüm vücut ışınlamasına maruz kalan kazazedelerde yapılan değerlendirmede, tüm vücudu 0.9 santi Gray alan kadınlarda meme kanseri riskinin kontrol gruplarına göre 2-4 kat arttığı bildirilmiştir (57). Özellikle bombalama esnasında 10 yaşın altında olan kızlarda riskin en yüksek olduğu saptanmıştır.

#### **2.2.3.7. Fiziksel Aktivite**

Ağır fiziksel aktivitenin menarşi geciktireceği, düzenli olarak bale yapan, yüzen veya koşan kızların menarşlarının geç başlaması ile gözlenmiştir. Bale yapan kızların incelendiği bir çalışmada bale yapanların ortalama menarş yaşı 15.4; kontrol grubunun menarş yaşı ise 12.5 bulunmuştur (58).

Adolesan ve erişkin dönemde yapılan egzersizlerin meme kanseri riski üzerine etkisini araştıran yakın tarihli bir çalışmada da egzersizin 40 yaşın altındaki kadınlarda meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiş ve haftada 4 saat veya daha fazla egzersiz yapan kadınlarda kanser riskinin hiç egzersiz yapmayanlara göre %60 daha az olduğu bildirilmiştir (59).

### 2.2.3.8. Sigara

Çeşitli çalışmalarda östrojen metabolizmasını değiştirmesi ve menopoz yaşını erkene alması nedeniyle sigaranın meme kanserine karşı koruyucu bir etkisi olabileceği ileri sürülmüştür (60, 61). İlk çalışmalar riski azaltıcı hafif bir etkisinden bahsetmişlerse de, daha sonraki geniş olgu - kontrol ve prospektif çalışmalar meme kanseri riski ile sigara içimi arasında hiçbir ilişki gösterememişlerdir (62, 63).

### 2.3. Memenin Selim Lezyonları

Fibrokistik hastalık, kronik kistik hastalık, kronik kistik mastit, Schimmelbusch hastalığı, Reclus hastalığı isimleriyle de bilinen semptomatik fibrokistik değişiklikler reproduktif dönemde bulunan kadınlar için oldukça rahatsız edici bir durumdur.

Fibrokistik hastalığa sahip olan kadınlarda meme kanseri riskinin 1.86 ile 2.13 arasında değiştiği ileri sürülmüştür (64). Bununla beraber histopatolojik tanı esas alındığında fibrokistik hastalık sıklığı çeşitli çalışmalarda %13 ile %71 arasında bildirilmiştir (65-67).

Meme dokusundaki hangi selim değişikliklerin histolojik olarak prekanseröz olabileceğini araştıran en önemli çalışma Dupont ve Page tarafından yapılmıştır (68). Bu çalışmada 3303 hasta onbinden fazla biopsi yapılarak ortalama 17 yıl takip edilmiş ve çeşitli histolojik alt tipler ile meme kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Meme biopsisinde proliferatif değişikliklere (sklerozis; adenozis, papilloma) sahip olan ve grubun %51 'ini oluşturan kadınlarda meme kanseri riskinin proliferatif değişikliği bulunmayan kadınlardan 1.9 kat fazla olduğu hesaplanmıştır. Atipik hiperplazi saptanan kadınlarda ise meme kanseri oluşma riski 4.4 kat fazladır. Atipik hiperplazi ile birlikte ailevi meme kanseri hikayesi olanlarda, aile hikayesi olmayanlara göre kanser oluşma riski ise 9 kat fazladır (Tablo-3). Proliferatif değişikliklerle birlikte kalsifikasyonların bulunması riski arttırırken, selim kistlerin varlığı riski değiştirmemektedir. Bununla beraber riskin en yüksek olduğu grupta (atipik hiperplazi + aile hikayesi) dahi, 25 yıl süre boyunca olguların ancak %40'ında meme kanseri oluşmakta ve bunlarında 1/3'ünden azı hastalık nedeniyle kaybedilmektedir (68). Bu nedenle, araştırmacılar sadece aile hikayesi olanlarda biyopsi önermekte ve ancak biyopsilerinde proliferatif değişiklikler bulunanların sıkı bir takip programına alınmasını belirtmektedirler (68, 69).

**Tablo-3: Memenin selim lezyonları ve meme kanseri riski ilişkisi.**

Histoloji	Aile hikayesi	Hasta sayısı	Relatif risk
Tüm Hastalar	-	3303	1.5
	Yok	2934	1.4
	Var	369	2.5
Proliferatif değişiklik yok	-	1378	0.89
Proliferatif değişiklik var	-	1925	1.9
Atipik hiperplazi	-	232	4.4
	Yok	193	3.5
	Var	39	8.9

[ Darendeliler E ve ark. (69)'dan modifiye edildi.]

#### 2.4. Genetik Etkenler

Son yıllarda gerçekleştirilen moleküler genetik ve gen analizi çalışmaları kanserin genlerin hastalığı olduğunu göstermiştir. İster sporadik kanserler isterse ailesel kanserler olsun bu kural değişmemektedir. Ancak sporadik kanserlerin meydana gelmesi için sonradan oluşacak iki mutasyon gerekli iken ailesel kanserlerin oluşumu için tek mutasyon yeterlidir. Çünkü bu tür kanserlerde ilk germline mutasyonu yumurta yada sperm hücre-sinde meydana gelmiştir. Daha sonra aynı gen bölgesinde ikinci bir mutasyonun meydana gelmesi ile birlikte (LOH : Loss of heterozigosity = Heterozigozitenin kaybı) kanserleşme olayı açığa çıkmaktadır. Günümüze kadar kanser oluşumunun genetik mekanizmasını açıklamaya yönelik olarak gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar tüm kanserlerin oluşumunda üç gen sınıfının etkili olduğunu, bu genlerde meydana gelen mutasyonların kanserleşmenin esasını oluşturduğunu göstermektedir. Bu genler sırasıyla proto-onkogenlerin mutasyona uğramasıyla açığa çıkan aktif kanser genleri onkogenler, tümör supressör genler ve DNA tamir genleridir. Meme kanserlerinin oluşumunda da bu üç gen sınıfindaki mutasyonlar etkili olmaktadır.

##### 2.4.1. Onkogenler

Hemen tüm kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinde de birçok onkogene değişiklikler bildirilmiştir. Ancak bunların sadece bir bölümü bugün için klinik ya da tümör gelişimi açısından önem taşımaktadır.

Nükleer onkogenler ya doğrudan steroidleri etkileyerek, ya da MAP-kinaz, JAK/STAT kinaz veya PLC-PKC sinyal yolları üzerinden çoğalmayı uyarırlar. Mitojen uyarısına hedef olan birçok hücrede bu sinyal yollarının sonunda c-myc, c-fos, c-jun ve c-myb gibi protoonkogenlerin ürünleri yer alır.

c-myc, c-fos ve c-jun protoonkogenlerinin proliferasyon ile ilişkisi yanında östrojen ve progesteron etkisiyle de uyarıldıkları gösterilmiştir (70). C-myc proteini Max adı verilen protein ile dimer kurarak gen ekspresyonunu etkilerken, c-fos ile c-jun proteinleri de birbiriyle heterodimer oluşturarak AP-1 transkripsiyon faktörü ile etkileşirler.

#### **C-myc :**

C-myc geni transkripsiyon faktörü olarak görev yapan bir çekirdek proteini kodlar. Bu fosfoprotein hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve apoptozisin bazı aşamalarını kontrol eder (71). Farelerde yapılan çalışmalarda c-myc değişikliklerinin meme kanseri gelişiminde erken aşamada gerçekleştiği gösterilmekle birlikte (72) insan tümörlerinden elde edilen bulgular bu kadar kesin değildir.

Meme kanserinde en sık görülen değişikliklerden biri c-myc genindeki amplifikasyondur. Ancak c-myc proteininin yarı ömrünün çok kısa olması, hastaların yaklaşık üçte birinde gözlenen bu değişikliğin izlenmesini güçleştirir. Buna rağmen çok sayıda çalışmada c-myc amplifikasyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (73, 74).

#### **Ras:**

Ras geninde aktivasyon fare meme tümörlerinde oldukça sık görülen bir değişikliktir. Buna karşılık insan meme tümörlerinde ras geninin rolü belirsizdir. Meme tümörlerinde ras mutasyonu ender görülür (75) ancak H-ras geninde allel kaybının meme kanserinde agresiv seyir ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (76).

#### **Src:**

Endojen src proteini ile fosforillenmiş EGFR arasındaki ilişki bu etkileşimin meme epitelinin malign transformasyonunda önemli rol oynadığını düşündürmektedir (77). Meme tümörleri ile yapılan bir çalışmada incelenen tüm tümör örneklerinde protein tirozin kinaz aktivitesi yüksek bulunmuş ve bu aktivitenin büyük ölçüde src proteininden kaynaklandığı anlaşılmıştır (78). Meme tümörlerinde sitozolde saptanan tirozin kinaz aktivitesinin malignite ile orantılı olması ve src proteinine karşı geliştirilen antikorların bu aktiviteyi engellemesi src'nin meme kanserinde önemli rolüne işaret eder (79).

#### **Siklinler :**

Siklinler meme kanseri oluşumunda önemlidir. Bunlar arasında siklin D1 daha da önemli bir role sahiptir. Bu protein kromozom 11q13'de lokalize olan PRAD1 geni tarafından kodlanır (80). Siklin D1, CDK 4 ile birleştikten sonra retinoblastoma proteini Rb yi fosforifleterek hücre siklusunun G1 fazında ilerlemesini sağlar (81). Siklin D1 genini taşımayan transgenik farelerde gebelik sırasında normal over hormon düzeylerine



rağmen meme epitel hücrelerinde çoğalma olmaması bu genin meme dokusu açısından önemine işaret etmektedir (82). Mitojen sinyallerin etkisiyle CDK 4 ve CDK 6 yı aktive eden D grubu siklinler (Siklin D1, D2 ve D3) hücre siklusunda merkezi görevler üstlenmiştir. Bunların ekspresyonunda ortaya çıkan bozukluklar hücrenin mitojenik sinyallere bağımlılığını ortadan kaldırarak onkogenik transformasyonda rol oynarlar (83).

Siklin D1'in aşırı ekspresyonu kanserde gözlenen erken değişikliklerden biridir. Kanserde Siklin D1 değişiklikleri olguların %15-20'sinde gen amplifikasyonu, % 50 den fazlasında ise mRNA ve protein aşırı ekspresyonu (over expression) şeklinde görülür (84-87). Bu gözlemler Sikline bağlı değişikliklerin moleküler açıdan farklı düzeylerde ortaya çıkabildiğini göstermektedir.

Gen ekspresyonunda bu yolla gerçekleşen bozukluğun meme kanseri patogenezinde önemli rol oynadığı kabul edilir (88). Meme kanserinde Siklin D1 aşırı ekspresyonu sık gözlenir (87, 89). Selim lezyonlarda % 18 oranında görülmesine karşılık, Siklin D1'in amplifikasyonu meme kanserinde oldukça sık (% 76-83 oranlarında) görülür (90).

#### **2.4.2. Büyüme Faktörleri**

Hücrede kansere yol açan değişimlerin büyüme faktörü sentezinde artış ya da büyümeyi inhibe edici faktörlerin sayısında azalmaya bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Bir başka görüş de hücrede büyüme faktörü uyarısına cevap veren mekanizmalarda ortaya çıkan değişikliklerdir. Bu hipotezlerin doğruluğunu araştırmak için neoplastik hücrede çoğalmayı uyaran sinyal yollarının bilinmesi gerekir. Epitel hücrelerinin kültürde çoğaltılmasındaki güçlükler bu konuda bilgi edinilmesini geciktirmiştir. Bugün ise meme epitel hücreleri in vitro olarak çoğaltılabilmekle birlikte daha çok bazal epitelyal stem hücre niteliği taşıyan bu hücrelerin sergiledikleri özelliklerin insandakilerin aynı olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir.

#### **Epidermal büyüme faktörü (EGF) :**

Epidermal büyüme faktörü meme epitelinin gelişmesi, meme hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması açısından önem taşıyan bir moleküldür. Faktör membran üzerinde yer alan reseptörüne bağlanarak etkisini gösterir.

#### **TGF:**

Transforme edici büyüme faktörleri (TGF) iki grupta toplanır. Molekül ağırlıkları 6

- 44 kd arasında değişen ve genelde hücre çoğalmasını uyaran moleküllerden oluşan TGF- $\alpha$  ailesi tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler ile etkileşir . TGF- $\alpha$  ve bu grupta yer alan diğer moleküllerin (EGF, VGF, amfirogulin) çoğu tek zincirli, üç disülfid bağı içeren benzer bir yapıya sahiptir. TGF- $\beta$  ailesi ise birbirine çok benzeyen üç gen ailesini kapsar. Bu ailenin ürünlerinin TGF- $\beta$  reseptörleri ile etkileşimi sonucunda meme kanseri açısından önem taşıyan birçok hücrenel işlevi etkileyebilen üç değişik molekül ortaya çıkar.

TGF- $\beta$  ailesi gerek yapısal, gerekse işlevsel açıdan EGF ve FGF ailelerinden farklıdır. TGF- $\beta$  ailesinin ekspresyonu hem östrojen hem de progesteron etkisiyle baskılanır (91). Meme hücrelerinin malign transformasyonu sırasında TGF- $\beta$  sentezinin de arttığı görülür. Bu artış immun supresyon'un yanında angiogenezi hızlandırır ve hastalığa özgü fibröz desmoplastik stromanın gelişimine olanak sağlar. TGF- $\alpha$  sinyal yolu normal meme hücrelerinde çoğalmayı baskılayıcı rol oynadığı halde kanserleşme sırasında tümör-konak ilişkisinin değişik biçimde sürmesine imkan verir (92).

#### **Diğer büyüme faktörleri:**

Meme kanseri ile ilişkili en az dört büyüme faktörü ailesi daha vardır: IGF-I ve IGF-II, PDGF ve FGF ler. Bu grupların hepsinin tirozin kinaz özelliğine sahip birer reseptörü bulunur.

#### **2.4.3. Büyüme Faktörü Reseptörleri**

Meme kanseri açısından önem taşıyan reseptörlerin büyük çoğunluğunu HER ya da EGFR ailesi olarak bilinen reseptörler oluşturur. Büyüme faktörü reseptörlerinin hepsi hücre dışında yer alan amino ucu, membran içi bölge ve sitoplasmik bölge olmak üzere temelde benzer yapıya sahiptir. Hücre dışındaki bölüm; ikisi ligand bağlayan, ikisi ise yön tayin eden dört kısımdan oluşur. Membran içi bölge ise eskiden sanıldığı gibi aradaki bağlantıyı sağlayan pasif bir uzantı değil, reseptörlerin birbiriyle temasından ve dimerleşmeden sorumludur.

Büyüme faktörü reseptörlerinde aktivite artışı üç şekilde gerçekleşebilir:

1. Reseptörlerin yapısında ve sayısında bir değişiklik olmadığı halde ligand sayısında çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkan artış nedeniyle reseptör aktivitesi artar,
2. Reseptör molekülü normal yapısını koruduğu halde transkripsiyon artışı ve/veya gen amplifikasyonu sonucunda fazla sayıda eksprese olur,
3. Reseptör molekülü üzerinde gerçekleşen mutasyonlar nedeniyle molekül sürekli aktif

durumunu korur.

Meme kanseri ile ilişkili büyüme faktörü reseptörlerinin hemen hepsi tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Bu reseptörler arasında HER ailesinin üyeleri (HER 2-4), EGFR(Her-1), FGFR 1-2, IGF-1R, PDGFR, vs yer almaktadır.

#### **HER Ailesi:**

HER gen ailesinde dört değişik protein yer alır. Diğer büyüme faktörü reseptörlerinde olduğu gibi HER ailesindeki moleküller de ligand tarafından uyarıldıklarında dimerler oluşturarak başka molekülleri fosforile eder ve böylece belirli sinyal yollarının harekete geçmesini sağlarlar (48). Bu sinyal yolları hücrede eksprese olan reseptörlerin tipi ile sayısı yanında ligandında türüne ve sayısına bağlıdır. Tüm HER, molekülleri birbirleriyle kompleks kurabildiklerinden oluşması mümkün olan kompleks sayısı on tanedir. HER-1 (EGFR) ile HER-4 homodimerler oluşturabildikleri halde genelde heterodimer oluşumu daha çok görülür. Heterodimer oluşumu yoluyla aktifleşme özellikle sinyal yolunun harekete geçmesi için üç bileşenin (kompleks kuran iki reseptör ve bunlardan birini uyaran ligand) gerekli olması açısından önem taşır. Reseptörlerden arındırılmış hücre sistemlerinde HER-2 veya HER-3'ün tek başına ekspresyonu çok yüksek ligand konsantrasyonlarında dahi proliferasyon sinyallerine yol açmaz (90). Bu durum HER-2 nin de kendi başına değil, aynı sinyal sistemi içinde görev yapan iki molekül ile birlikte aktifleştiğini ortaya koymaktadır.

HER reseptörleri ile etkileşen ligandlar benzer yapıdadır. Bu yüzden çoğu birden fazla reseptöre bağlanabilirler. HER-2'nin yer aldığı komplekslerin aktivitesi genellikle diğer HER komplekslerine kıyasla daha yüksektir (50, 52). Üstelik bunların hepsi kendi reseptörlerine bağlandıklarında HER-2 ile dimerler kurarak HER-2 yi aktifleştirebilir.

Kanserlerin çoğunda HER-2 ye eşlik eden ikinci reseptör HER-1 dir. HER-1 amplifikasyonu veya ekspresyon artışı östrojen reseptörü ile ters orantılıdır. HER-1 ekspresyonu daha çok invaziv duktal karsinomda gözlenir ve özellikle nod negatif hastalarda kötü prognoz ile ilişkilidir (93).

#### **HER-2 (c-erb B2) :**

HER-2 insan solid tümörlerinde ortak özellik olarak gözlenen ve sonuçları bilinen moleküler anormalliklerin prototipidir. Bu gendeki değişikliklerin bilinen kötü prognostik özellikler ile ilişkisi ve bu moleküler değişikliğe karşı hedefe yönelik tedavi geliştirilme olanağı genin yeni bir tedavi hedefi olarak önemini vurgulamaktadır.

İnsan meme kanserinde klinik önemi kesin olarak bilinen HER-2 başlangıçta sıçan nöroblastomlarında neu adıyla tanımlanmıştır. Genin hücresel homologu ise sıçan ve insan

cDNA kütüphanelerinin kıyaslanması ile bulunmuş (54) ve *c-erb* B2 veya HER-2 olarak adlandırılmıştır (94). HER-2 geni EGFR ile büyük benzerlik taşıyan ve tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran protein kodlar (95). Meme kanserli hastaların üçte birinde HER-2 amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu görüldüğü bildirilmiş (56, 96), bunun ardından over kanserinde aynı özellikler saptanmıştır (97). HER-2 aşırı ekspresyonu görülen hastalarda erken nüks görülmesi ve genel sağkalımın kısa olması yüzünden bu gende ekspresyon artışı kötü prognoz belirtisi olarak yorumlanır.

#### **Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) :**

Epidermal büyüme faktörü reseptörü 170 kD molekül ağırlığında, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir glikoprotein reseptördür. EGFR ile tavuk eritroblastozis virüsünün onkogeni olan v-erb B arasındaki benzerlik EGFR nin bu onkogenin hücre sel homologu olduğuna işaret eder. Epidermal büyüme faktörü reseptörüne bağlandığı zaman reseptör hücre içine alınır ve fosforilasyon aktivitesi artar. EGFR aşırı ekspresyonunun fibroblastlarda epidermal büyüme faktöründen bağımsız transformasyon oluşturabilmesi reseptörün transformasyonda önemli rol oynadığına işaret eder.

#### **2.4.4. Tümör Supressör Genler**

Tümör baskılayıcı genler ilk olarak kanserli bir hücreyi normal hücreye dönüştürebilecek genler olarak tanımlanmıştır. Bu tanımlamaya göre tümör baskılayıcı genler, ya kromozomal delesyonlarla kaybedilmiş ya da daha küçük ölçekli mutasyonlarla (küçük delesyonlar, küçük insertionlar veya nokta mutasyonları) aktivitesini kaybetmiş genlerdir (98). Bir tümör baskılayıcı genin inaktive olması genin bir alelindeki (genin iki kopyasından biri) bir mutasyonla başlar. Tamamen inaktive olması için diğer alelin de kaybolması gerekir (ikinci alelde mutasyon veya daha sıklıkla kromozom kaybı). Eğer kanser kalıtsal değilse, iki alleldeki iki mutasyon somatik olarak (somatik hücrelerde ve genellikle doğumdan sonra) oluşur.

Ailesel olmayan kanserler, tüm kanserlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturur (>85%). Tüm kanserlerin % 5-15'inin ise kalıtımla yeni kuşaklara geçtiği düşünülmektedir ve bu kanserler "ailesel kanser" olarak tanımlanmaktadır (99-101). Ailesel kanserlerde, bir tümör baskılayıcı genin inaktivasyonunun ilk basamağı, ailenin eski nesil bireylerinden birinin üreme hücrelerinde (sperm veya yumurta) meydana gelir. Bu mutasyon üreme hücresi vasıtası ile sonraki nesillerin % 50'sine geçer (eğer mutasyon yeni oluşmuşsa, kanser kalıtsal olur fakat klinik olarak ailesel olmaz). Kalıtsal kanserlerde tümör

baskılayıcı gen inaktivasyonu doğmadan önce başladığı için tek bir vuruş (ikinci allelin inaktivasyonu) tümör baskılayıcı genin işlevini yok etmek için yeterlidir. Aynı hücrede iki allelin birden inaktive olması ihtimalinin bir allel den az olması kanser ailelerinde bireylerin kanser riskinin fazla olmasını açıklar. Ama kanser oluşumu için birden çok gende mutasyon olması gerektiği unutulmamalıdır. Bir başka deyişle, kalıtsal olarak herhangi bir genin bir allelinin inaktive olması kanser oluşumu için sadece küçük bir adımdır ve başka mutasyonlar da olması gerekmektedir (tümör baskılayıcı genin ikinci allelinin de inaktive olması, başka tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve proto-onkogenlerin aktivasyonu) (99-101).

İlk tümör baskılayıcı genin (Rb1, Retinoblastoma) ortaya konmasından bu güne kadar yirmiye yakın tümör baskılayıcı gen bulunmuştur. Tablo 4’de bilinen tümör baskılayıcı genler özetlenmiştir (102). Tabloda’da görüldüğü gibi tümör baskılayıcı gen mutasyonları hem kalıtsal hem de kalıtsal olmayan kanserlerde görülebilmektedir. Onkogenler ise genellikle yalnızca kalıtsal olmayan kanserlerde rol almaktadır (kalıtsal mutasyonu kansere yol açtığı bilinen tek gen ret onkogenidir). Birçok tümör baskılayıcı gen, ailesel kanser bireylerinin genomik DNA’larının araştırılmasıyla bulunmuştur. Bunların birkaç tanesinin (BRCA1, MLH1, MSH2) şu ana kadar sadece kalıtsal mutasyonlar sergilediği görülmüştür. Bu genlerin büyük bir çoğunluğu (p53, Rb1, APC, BRCA2) iki tip kanserde de etkindir.

Meme kanserlerinin yaklaşık %5-10’u ailesel kökenlidir ve bu kanserlerin oluşumuna germ-line tümör supressör gen mutasyonları yol açmaktadır. Bilindiği gibi tümör supressör genler proto-onkogenlerin ve onkogenlerin aksine hücre büyümesini ve bölünmesini negatif yönde etkileyen genlerdir. Diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserlerinde de bu genlerde meydana gelen mutasyon ve delesyon olayları meme kanserinin oluşumunu sağlamaktadır. Bugüne kadar meme kanserleri ile gerçekleştirilen moleküler genetik ve gen analizi çalışmaları bu kanserlerin gelişiminde başta BRCA1 ve BRCA2 genleri olmak üzere p53, FHIT, PTEN, nm23, p16 (MTS1), Rb1, DCC, CHK2, ATM, FOXP1 gibi tümör supressör gen mutasyonlarının rolü olduğunu göstermiştir (103-108).

**Tablo-4: Tümör Baskılayıcı Genler**

Tümör baskılayıcı genler	Kromozomal lokus	Neoplazm
Rb1	13q14	Retinoblastom, osteosarkom, meme, mesane ve akciğer
p53	17p12-13.3	Beyin tümörleri, meme, kolon ve akciğer karsinoması, osteosarkom
WT1	11p13	Wilm's tümörü
DCC	18q21	Kolon karsinoması
NF-1	17q11.2	Nörofibromatozis tip I, nöroblastoma, glioma
NF-2	22q12	Nörofibromatozis tip II
APC ve MCC	5q21-22	Kolon karsinoması
MEN-1	11q13	Paratiroid, pankreas, tükrük bezi ve adrenal korteks tümörleri
MEN-2	10q11	Papiller tiroid karsinoma
BRCA1	17q21	Meme ve ovaryum kanseri
BRCA2	13q12-13	Meme ve ovaryum kanseri
FHIT	3p14.2	Akciğer, kolon, meme, pankreas kanseri
RCC	3p14.2	Böbrek tümörleri
P73	1p36	Beyin tümörleri
PTEN	10q23	Glioblastoma, endometrium, prostat, melanoma, renal kanserler
VHL	3p25-26	Von Hippel Lindau Sendromu

[Kurzrock M, (102)'den modifiye edildi.]

### **BRCA 1 ve BRCA 2 Genleri:**

Meme kanserli hastaların % 5- 10 unun anne veya kızkardeşlerinde, % 10-20 kadarının da birinci ya da ikinci derece akrabalarında meme kanseri görülür (109). Söz konusu bireylerin sayısı ve akrabalık derecesi risk açısından önem taşır. Kansere yakalanan aile bireyi ne kadar gençse diğer aile üyeleri için risk o kadar yüksektir. Çok sayıda kadın aile üyesi bulunan ailelerde hasta kadın sayısının sağlıklı kadınların sayısına oranı risk açısından daha çok önem taşırken az kadın bulunan ailelerde kalıtsal predispozisyonu saptamak güç olabilir. Bu gruptaki meme kanserleri otozomal dominant kalıtım özelliği gösterir.

Otozomal dominant kalıtıma işaret eden belirtiler şunlardır:

1. Kansere yatkınlığın vertikal geçiş göstermesi,
2. Kanser riski anne ya da babadan eşit olasılıkla geçebilir. Kusurlu geni taşıyan erkeklerin ancak bir bölümünde meme kanseri geliştiği halde gendeki kusur sonraki kuşağa babadan

da geçebilir.

3. Her kuşakta kusurlu geni taşıma riski % 50'dir. Ebeveynlerden birinde predispozisyon varsa her çocuk için aynı kusuru taşıma riski % 50'dir.

4. Kahtsal özellik gösteren kanserler genellikle daha erken yaşta ortaya çıkar.

BRCA genlerinin yapısı oldukça karmaşıktır. 24 eksonu bulunan 10 bin bp'lik BRCA1 geni, 1863 amino asitten oluşan bir proteini kodlar. BRCA2 geni ise 11.385 bp'lik, 27 eksondan oluşan ve 3418 amino asitten meydana gelen bir proteini kodlar. Her iki genin de 11. ekzonu (BRCA1 geninde 3.4 kb, BRCA 2 geninde ise 5 kb) oldukça büyüktür.

BRCA geninde mutasyon bulunan kadınlarda 50 yaşına kadar kanser gelişme riski % 50, hayat boyunca kansere yakalanma riski de % 80-85 dir (110). Mutasyon taşıyıcılarda aynı zamanda over kanseri riski de % 40 dolayında gözlenir. BRCA1 mutasyonu taşıyan erkeklerde prostat kanseri riski 3 kat, BRCA 2 mutasyonu taşıyanlarda ise 3 - 7 kat daha yüksektir (111). Mutasyonlar ayrıca her iki cinste de kolon (BRCA1) ve pankreas (BRCA2) kanseri riskinde 3 - 4 kat artışa neden olur (112).

BRCA1 ve BRCA2 genleri birçok dokuda ve hücre türünde ekspresse olur. Bu durum meme ve over kanserinde nedenin dokuya özgü ekspresyon olmadığını göstermektedir. BRCA1 ile transfekte edilen hücrelerde iki grup gende değişiklikler ortaya çıkar. Bunlar hücre siklusunu kontrol eden ve DNA hasarına karşı hücreyi koruyan genlerdir. Bu nedenle BRCA proteininin homolog rekombinasyon ve transkripsiyonun regülasyonunda da görev alan, DNA hasar gördüğünde aktifleşen ve DNA onarımında rol oynayan bir protein olduğu düşünülmektedir. BRCA1 proteini bulunmayan fare hücrelerinin oksidatif hücre hasarını (113), BRCA2 proteininden yoksun hücrelerin ise radyasyona bağlı hücre hasarını (114) onarmakta yetersiz kaldıkları gösterilmiştir. İki protein de homolog kromozom rekombinasyonu ve çift sarmal kırıklarının onarımından sorumlu RAD 51 proteini ile etkileşirler (115, 116). BRCA2'nin asetiltransferaz aktivitesine sahip olması da DNA onarımı ile transkripsiyondaki rolünü desteklemektedir (117). Bu bulgular BRCA genlerinde mutasyon bulunan kişilerde kanser görülmesinin onarım bozukluklarından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ancak, mutasyon taşıyıcılar genellikle heterozigot olduklarından kanser oluşumu genin normal kopyasının da somatik bir mutasyonla işlevini kaybetmesinden sonra ortaya çıkabilmektedir. BRCA2 geninde kusur bulunan hücre soylarının çift sarmal kırıkları oluşturan kemoterapötik ajanlara karşı özellikle duyarlı oldukları gösterilmiştir (114). Bu bulgular, yalnız BRCA2 nin tümör oluşturma mekanizması açısından değil, bu gende mutasyon taşıyan hastalarda tedavi

seçiminde genotipe yönelik yeni yaklaşımlara olanak sağlaması açısından da önem taşır.

Eldeki bulgular bu iki genin p53 gibi "genom bekçiliği" (gene keeper) görevini üstlendiklerini göstermektedir (118). P53 mutasyonlarının BRCA1'e bağlı kanserlerde oldukça sık, BRCA2'ye bağlı kanserlerde ise sık görüldüğü dikkat çekmektedir (119). BRCA mutasyonu taşıyan bireylerde saptanan p53 mutasyonları sporadik kanserlerde görüldenden farklıdır. Bu bulgular BRCA genlerinin bir tür "mutator" fenotip oluşturduğunu düşündürmektedir.

DNA da iyonizan radyasyon sonucu hasar oluştuğunda ATM proteini ile bir tirozin kinaz molekülü olan ATR, BRCA1 in belirli bölgelerini fosforile ederler. ATM aynı zamanda CtIp yi de fosforilleyerek BRCA1 den ayrılmasını ve GADD45 in aktifleştirmesini sağlar (120, 121). ATR'nin aktivitesi ise bundan bağımsızdır ve UV ışınlar ya da hidroksiüre etkisiyle de ortaya çıkar. Bu gözlem ATR ile ATM etkisiyle görülen BRCA aktivasyonunun farklı türden DNA hasarlarına karşı ortaya çıktığı hipotezini desteklemektedir (122). BRCA sinyal yolunun en önemli hedefleri arasında DNA hasarına bağlı olarak aktifleşen GADD45 geni yer alır. BRCA1 aktifleştğinde GADD45 gen ailesinde yer alan c-jun N-terminal kinaz/stres ile aktifleşen protein kinaz (TNKISAPK) sinyal yolunu aktifleştirerek apoptozisi başlatır (123). GADD45 aktivasyonu ile JNK/SAPK a bağlı apoptozisin p53'ten bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (124).

S fazında proteinin nükleer bölgede çift sarmal kırıklarının onarımından sorumlu RAD51 proteini ile birlikte bulunduğu gözlenir (115). Rad 51 ile BRCA2 arasında doğrudan etkileşim saptandığı halde Rad51-BRCA1 etkileşiminin daha dolaylı olduğu ve BRCA2 tarafından başlatıldığı düşünülmektedir (125). BRCA1'in retinoblastom proteinini defosforile ederek aktifleştirdiği ve böylece EF2 ye bağlanmasını sağlayarak S fazına girişi engellediği ve bu işlemin cdk2 aktivitesinin inhibisyonu ile yakından ilişkili olduğu da ileri sürülmüştür (126). BRCA1'e özgü bir görev de transkripsiyonun regülasyonudur. BRCA1 p53 ile in vivo ve in vitro koşullarda etkileşir (127). BRCA1 p21 WAF1/CIP1 proteinini, box promoterlerini ve transkripsiyonunu uyarır (128). Tümörlerden elde edilen ve transaktivasyon yeteneğine sahip olmayan mutant BRCA1 proteini ise p53'e bağlı transkripsiyonu başlatamaz. P53 ile etkileşim bölgesini koruyan, ama başka kısımları eksik BRCA1 proteininin p53'e bağımlı transkripsiyonu baskıladığı gösterilmiştir (123). Bu yüzden BRCA1 in transkripsiyonel regülasyonu ve kromozom bütünlüğünü koruyan bir genomik stabilite denetleyicisi olduğu kabul edilir.

BRCA genlerinin biokimyasal işlevine yönelik araştırmalar da iki genin de



transkripsiyonu uyardığını ve hedeflerden birinin de G<sub>1</sub>/S fazında hücre çoğalmasını etkili bir şekilde durduran p21-sikline bağımlı kinaz inhibitörü olduğunu göstermektedir (128, 129). İki genin transkripsiyonu da G<sub>1</sub> fazının geç aşamasında başlar ve S fazı boyunca sürer. Bu gözlem BRCA proteininin DNA sentezinde de rol oynadığını desteklemektedir (130, 131). BRCA1 ve BRCA2 nin genomik stabilitenin korunması açısından önem taşıyan rekombinasyonun denetiminde de rol oynadığına ilişkin bulgular bildirilmiştir (115, 132).

Yeni bulgular BRCA1'in transkripsiyonun kontrolünde de görev aldığına işaret etmektedir. Proteinin C ucu RNA polimeraz II nin hRPB2 ve hRPB10'a altbirimleri, RNA helikaz A ile N ucu ise p53, c-myc, STAT 1, ER $\alpha$ , siklik AMP ye bağılı transkripsiyon faktörü-1 (ATF1) ve KRAB-bölgesi proteini ZBRK1 ile etkileşir (120-122, 133-135). BRCA1 gen ekspresyonunda önemli görev üstlenen SW1/SNF kromatin kompleksi ile de etkileşir (136). Bu kompleks DNA nın organizasyonunu denetler ve transkripsiyonu düzenler. BRCA bir yandan bu yolla RNA polimeraz holoenzimin aktivatörü olarak p21 ve GADD45 gibi genlerin ekspresyonunu değiştirirken diğer yandan da (Rb, CtIP/CtBP ve histon deasetilazlar gibi) transkripsiyon reseptörlerine bağlanarak duruma göre transkripsiyonun pozitif veya negatif modülatörü gibi davranır. BRCA tarafından aktivitesi baskılanan genler arasında Bax, TIMP-1 ve TIMP-2 ve Topo IIa gibi genler bulunur. BRCA 1 in PCNA, RhoA, IGF-ye bağlanan protein 4 ve Katenin ekspresyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (124, 126).

Bugüne kadar; BRCA1 geninde 650'den, BRCA2 geninde ise 500'den fazla sayıda mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların büyük bölümü işlevsiz proteinlerin oluşumuna neden olan "frameshift" mutasyonlarıdır. Bu mutasyonların çoğu transkripsiyonun ve dolayısıyla ortaya çıkan proteinin erken sonlanmasıyla sonuçlanır. Normal koşullarda 800 kişide bir kişinin BRCA geninde mutasyon taşıdığı kabul edilir. Bazı durumlarda aynı mutasyon bir toplumda birbirinden bağımsız görünen çok sayıda ailede ortaya çıkar. Söz konusu mutasyon; taranan toplumun küçük ve izole olması, ortak bir topluluktan kaynaklanması gibi nedenlerden dolayı sıklıkla görülmektedir. İşte bu tip mutasyonlar, "founder" mutasyonlar olarak tanımlanmaktadır. Kökleri Orta ve Doğu Avrupa'dan gelen Ashkenazi musevilerinde görülen BRCA1 (185delAG ve 5382insC) ve BRCA2 (6174delT) mutasyonları, ya da İzlanda (BRCA2: 995de15) ve Hollanda'da (BRCA1: 2804delAA) gözlenen mutasyonlar bu tür "founder" mutasyonlara örnektir.

Bir topluma özgü "founder" mutasyonların bilinmesi o toplumda meme kanseri riskinin değerlendirilmesi ve ailelerinde meme kanseri bulunan bireylere genetik danışma

verilmesi açısından önem taşır. Mutasyon taşıyan bireyler arasında kaç kişide kanser görüleceği penetrans olarak değerlendirilir. BRCA genlerine bağlı meme kanseri penetransı % 36 -85 arasında değişir. 20 yaşına kadar penetrans sıfır kabul edilir. Mutasyon taşıyan erkeklerde bazı kanser türlerinin görülme riski artarsa da bunlar genelde 50 yaşından önce meydana gelmez.

BRCA genlerinin meme kanseri riskini bu kadar arttırdığı gözönüne alındığında bu genlerin kalıtsal olmayan meme kanseri ile ilişkisi olduğu da düşünülebilir. Ancak, sporadik meme kanserinde bu mutasyonların bulunmadığı veya son derece az görüldüğü bildirilmiştir (137, 138).

BRCA genlerindeki mutasyonların varlığı meme kanseri riskini arttırmaktadır. BRCA genlerinin DNA onarımı ve genom bütünlüğü açısından önem taşıyan görevleri gözönüne alındığında akla gelen sorulardan biri de bu genlerdeki kusurlara bağlı olarak neden sadece meme kanserinin ortaya çıktığıdır. Bu konudaki değişik açıklamalardan birine göre, bu olayda östrojenlerin hem hormonal, hem de kanserojen etkileri söz konusudur (137). Diğer bir görüş ise, BRCA proteininin mutasyon nedeniyle işlevini kaybederek puberte ve gebelik sırasındaki aşırı hormon uyarılarına karşı koruyucu görevini yerine getirememesidir. Bu durum, genlerin işlevinin bozulması hiperplastik bir durum oluşmasına neden olur ve p53 gibi daha başka genlerde de genetik kusurların birikmesini kolaylaştırarak kanserin ortaya çıkmasına olanak verir (139). Bu dönemden sonra gerçekleşen somatik BRCA1 mutasyonları ise aynı etkiyi göstermez ve bu nedenle sporadik tümör gelişimi açısından önem taşımaz (140). Benzer şekilde BRCA2 mutasyonlarının erkek meme kanseri ve bir ölçüde prostat kanseri gelişimi açısından önem taşımasının da BRCA2 proteininin erkeklerde etkili olan başka endokrin faktörler ile etkileşimini yansıttığı ileri sürülmüştür.

BRCA1 mutasyonu bulunan tümörlerde ER ve PR negatif olgulara rastlanma sıklığı kalıtsal olmayan kanserlerdekine kıyasla daha yüksektir (141, 142). Buna karşılık BRCA2 mutasyonu bulunan tümörlerin çoğunda iki reseptör de pozitif bulunur (143). Daha agresif histopatolojik özellikler gösteren BRCA1 tümörlerinde steroid reseptör yokluğu normal görünürken genelde düşük derecede, farklılaşma gösteren BRCA2 tümörlerinde reseptörlerin pozitif bulunması şarttır.

BRCA1 ile ilişkili kanserler daha çok invaziv duktal, yüksek grade'li (ileri evreli), daha yüksek mitotik aktivite, aneuploidi, daha fazla nükleer polimorfizm ve yüksek oranda lenfosit infiltrasyonu gösteren tümörlerdir (123, 144). BRCA1'den kaynaklanan tümörlerde daha çok medullar tip görülürken BRCA2 mutasyonu taşıyan tümörlerde ise

tubüler yapı daha az görülür (145). Bu bulgular BRCA genlerine bağlı kanserlerin sporadik tümörlerden daha farklı sinyal yollarını kullandıklarını düşündürmektedir (146).

BRCA mutasyonu bulunan tümörlerde sağkalım analizinin sonuçları hakkında çelişkili bulgular bildirilmiştir. 1996 ile 1999 arasında yapılan 31 çalışmanın altısında uzun sağkalım, beşinde kısa sağkalım bildirilmiş, geri kalanlarda ise fark bulunamamıştır (147). Ancak, bu tür çalışmaların hepsinde yetersiz yönler bulunmaktadır. Zira mutasyonların saptanması için hastanın sağ olması ve kanından DNA elde edilebilmesi gerekir. Bu yetersizliği gidermek için öngörülen yollar ya sağkalım analizine probandan katılmaması, ya da hastalara ait saklanan tümör materyalinde BRCA mutasyonlarının araştırılmasıdır. Ancak, bu ikinci yol da sadece tüm genin taranmasına gerek bulunmayan, "founder" mutasyonları bilinen toplumlar için geçerlidir. Bu yaklaşımlar denendiğinde mutasyon taşıyıcılar ile genel populasyon arasında sağkalım açısından bir fark bulunamamıştır (148-150).

Gelecekte kanserden korunmak amacıyla riskli bireylere genetik test uygulanacak ise bu testlerin beklenen koruyucu etkiyi sağlayıp sağlamadığı da sürekli olarak izlenmelidir. Ayrıca, her birey için riskin ve kazanılacak yaşam süresinin ayrı ayrı belirlenmesi, uygulanan tarama ve korunma yönteminin geçerliliğinin değerlendirilmesi, hastalığın özelliklerinin ve prognozunu ve hastanın yaşam kalitesi ile psikolojik faktörlerin hesaba katılması gerekir. Bütün bu faktörler ve mevcut olanaklar bireye göre değerlendirilip her olgu için ayrı ayrı karar verilmesi ve gerek karar, gerekse izleme aşamasında psikolojik destek sağlanması gereklidir.

#### **Retinoblastoma (Rb) geni :**

Rb geni tümör supressör genlerin klasik örneğidir. Kromozom 13q14 üzerinde yer alan gen 105 kD luk bir protein kodlar. Rb proteini fosforile olmadığı durumda bir transkripsiyon faktörü olan E2F ile kompleks kurarak hücre siklusunu G1 fazında durdurur.

Meme kanserinde hem kromozom 13q bölgesinde, hem de Rb geninde değişiklikler bildirilmiştir (151, 152). Bu değişiklikler genellikle ileri, anöploid, hızlı çoğalan tümörlerde gözlemlendiğinden Rb genindeki değişikliklerin başlangıçta değil, tümör gelişmesine paralel olarak genomda artan instabilite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada Rb değişikliklerinin aksilla tutulumu bulunmayan küçük (< 2cm) tümörlerde gözlemlendiği bildirilirken daha geniş bir hasta grubunda Rb geninde allel kaybının aksilla metastazı ile birlikte seyrettiği saptanmış, ancak her iki durumda da sağkalım ile Rb allel kaybı arasında ilişki bulunamamıştır (153, 154).

Östradiolün Rb gen ekspresyonunu baskıladığını gösteren çalışmalarda, östrojenin

kritik tümör supressör genlerin ekspresyonunu azaltarak bir tür tümör promotör etkisi yaptığı ileri sürülmüştür (155).

Buna karşılık Rb geninde mutasyon taşıyan meme kanseri hücrelerine retroviral gen transferi yoluyla normal Rb geni verildiğinde hücrelerin farelerde tümör oluşturma ve kültür ortamında tutunmadan çoğalma yeteneklerinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (156). Bugün meme kanserlerinin % 20'sinin Rb genindeki değişiklikler ile ilişkili olabileceği kabul edilmektedir (153).

#### **P53 geni:**

P53 geni ile meme kanseri arasındaki ilişki Li-Fraumeni sendromlu hastalarda gözlenen p53 mutasyonları ile ortaya çıkmıştır. Başta ekson 7 de gözlenen mutasyonların, daha sonra bütün gen üzerinde bulunduğu saptanmıştır (157). Kromozom 17 p de allel kaybı ve p53 mutasyonları yaygın olarak bildirilmekle birlikte bu mutasyonların varlığı ve türü klinik açıdan daha fazla bilgi vermektedir.

P53 mutasyonları ile östrojen reseptörü yokluğu (158, 159), indiferansiyel tümörler, yüksek proliferasyon hızı (160), EGFR varlığı (161, 162) ve genel sağkalım ile arasında ilişki yanında nod pozitif ve nod negatif olgular arasında mutasyonların farklılık gösterdiği bildirilmiştir (163). Bu nedenle p53 tedavi seçiminde de yol gösterici olabilir. P53 mutasyonu taşıyan nod pozitif olgularda adjuvan tamoksifen tedavisinin yararlı olmadığı gösterilmiştir. Radyoterapi ve kemoterapiye cevap da p53'ün gösterdiği işlev değişikliğine ve buna bağlı olarak DNA onarımındaki rolünü ne ölçüde gerçekleştirebildiğine bağlı olarak değişebilmektedir (164).

P53 ile meme kanseri arasındaki en önemli bağlantı p53 genindeki değişikliklerden kaynaklanan Li-Fraumeni sendromlu hastalarda erken yaşta gözlenen meme kanseri olgularıdır. P53 geninde mutasyon taşıyan meme kanseri hücre soylarına sağlam p53 verildiği zaman hücrelerin tümör oluşturma yeteneğinin ortadan kalkması bu ilişkiyi doğrulamaktadır. P53 gen mutasyonlarının meme kanseri ile ilişkisi değişik toplumlarda araştırılmış beyaz ve siyah ırklar arasında mutasyon türü ve sıklığı açısından fark saptanmadığı halde mutasyon taşıyan siyahlarda sağkalımın 4-5 kat daha kısa olduğu bildirilmiştir (165). P53 mutasyonları ile kemoterapötiklere direnç arasında ilk bulgu olarak proteinin DNA bağlama bölgesinde gerçekleşen mutasyonların Doksorubisin'e direnç sağladığı gösterilmiştir (163, 166).

#### **PTEN geni:**

PTEN geni 10q23 bölgesinde lokalize olan, 403 aminoasitlik protein kodlayan bir tümör supresör genidir. Bu genin ürününün fosfataz aktivitesine sahip olduğu, tirazin

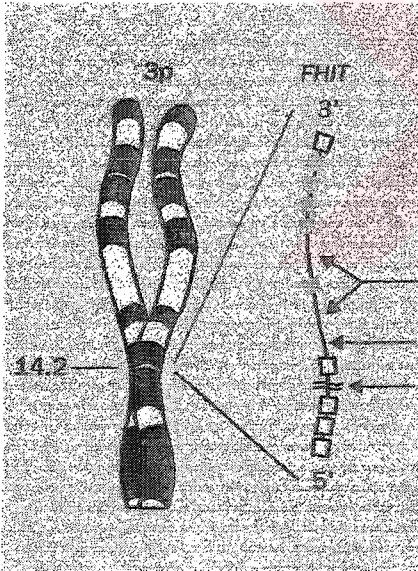
kinaz aktivitesine karşı çalıştığı bilinmektedir. PTEN genindeki homozigot delesyonların %6 oranında meme, %60 oranında böbrek ve prostat, %70 oranında glial tümörlerin oluşumunu sağladığı bilinmektedir (167).

#### **FOX P1 geni:**

2000 yılında klonlanmış olan (3p12.3-14.1) bölgesinde lokalize olan bir gendir. Bu genin ürününün bir transkripsiyon faktörünü kodladığı, bu proteinin solid tümörlerde nükleer ekspresyonu azalttığı belirlenmiştir. Bu genin meme, akciğer, baş-boyun, böbrek ve kolon kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğradığı gösterilmiştir (168).

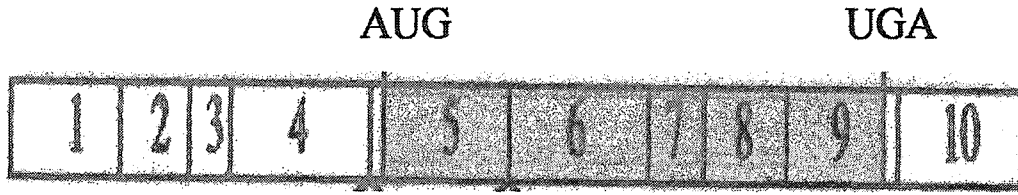
#### **FHIT Geni:**

Malign hastalıklarda kromozomal anomalilerin 3. kromozomun kısa kolunda lokalize olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu bölge üzerinde yapılan çalışmalarda, bu bölgenin 3p14 kromozom bölgesine karşılık geldiği ve karsinojenlere hassas bir bir frajil bölge (FRA3B) olduğu gösterilmiştir (169). Bu bölgede moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda, 1996 yılında Sozzi ve arkadaşları (1) tarafından 3p14.2 kromozom bölgesinde FHIT geni klonlanmıştır (Şekil-2) (170).



**Şekil-2: FHIT geni 3p14.2 kromozom bölgesinde lokalizedir.**  
[Yuri P ve ark.(170)'dan alındı.]

Bu gen 2 Mb'lık genomik DNA'dan meydana gelir. 1,1 kb'lık transkripti 10 ekzon tarafından kodlanır (Şekil-3). 5-9. ekzonlar FHIT proteinini kodlar. FHIT mRNA'sı 16.8kD'luk proteini şekillendiren 146 aa'lık zinciri kodlamaktadır. FHIT geni'ndeki değişimler, genellikle 4-6. ekzonlarda görülmektedir.



**Şekil-3: 1-2 Mb'lık FHIT geni 10 ekzondan oluşmaktadır.**

İnsan genomunda en sık ekspresyonu görülen frajil bölge FRA3B'dir. Frajil bölgeler, insan genomunda yer alan delesyon, translokasyon, gen amplikasyonu ve yeniden düzenlenmeleri içeren bölgelerdir. Bu yüzden FHIT geni'nin FRA3B'de belirlenmesi, en çok indüklenen yaygın frajil bölgeyi içermesinden dolayı anlamlıdır (171, 172). FHIT geni'nin FRA3B frajil bölgesindeki varlığı çeşitli çevresel karsinojenler tarafından indüklenebilen bir gen olabileceği ve bu genin frajilite ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (173-175). Bu genin frajilite ile ilişkili olabileceğine ilaveten, bu ilişkinin kanserde genetik yatkınlık ile de birlikteliği tartışılmaktadır (176, 177). Aphidicolin gibi DNA sentez inhibitörleri ile FRA3B frajil bölgesinin indüklenebilirliği konusundaki gözlemler, populasyondaki frajilitenin farklı bireylerde farklı davranış sergileyerek heterojenite gösterdiğini ve bunun kansere genetik yatkınlık ve frajilite fikri arasında korelasyonu incelemek için önemli olduğunu vurgulamaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, FRA3B'ninde yer aldığı frajil bölgelerin meme, akciğer ve kolorektal kanserlerinin de içinde bulunduğu birçok kanser tipinde genetik yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (176-180).

FHIT geni'nin proteini dimer şeklindedir. Bu yüzden iki dinükleotid trifosfat substratını bağlayabilir ve böylelikle yüksek fosforilize alana sahip olur (181). Bu enzim-substrat kompleksi tümör supressör molekül olabilir. Fakat efektörler veya birbirini etkileyen proteinler hala bilinmemektedir (181).

FHIT geni diadenosine hidrolaz'ı kodlar ve bu protein hücrelerin büyüme yollarının kontrolünde rol oynar. Hücre hatlarında, tümörigenez testlerinde ve nakavt farelerde yapılan çalışmalarda Fhit proteininin hücre çoğalması ve apoptosis ile ilişkili olduğu, bu nedenle tumor supressor aktivitesi olabileceği tartışılmıştır.

Meme kanserinin de içinde bulunduğu çeşitli kanser tiplerinde (meme, akciğer, baş-boyun, serviks, gastrointestinal, özafagus tümörlerinde) FHIT geni'nde meydana gelen değişiklikler oldukça yüksek orandadır (%20-80). Değişikliklerin çoğunluğu delesyonlar, DNA hipermetilasyonları, anormal transkript, RNA ve protein düzeyinde indirgenme

şeklinde (182). Bu bulgular insanlarda görülen kanserlerde, FHIT geninin sıklıkla değişime uğrayan bir gen olduğunu ifade etmektedir (8, 107, 173-175, 183-191).

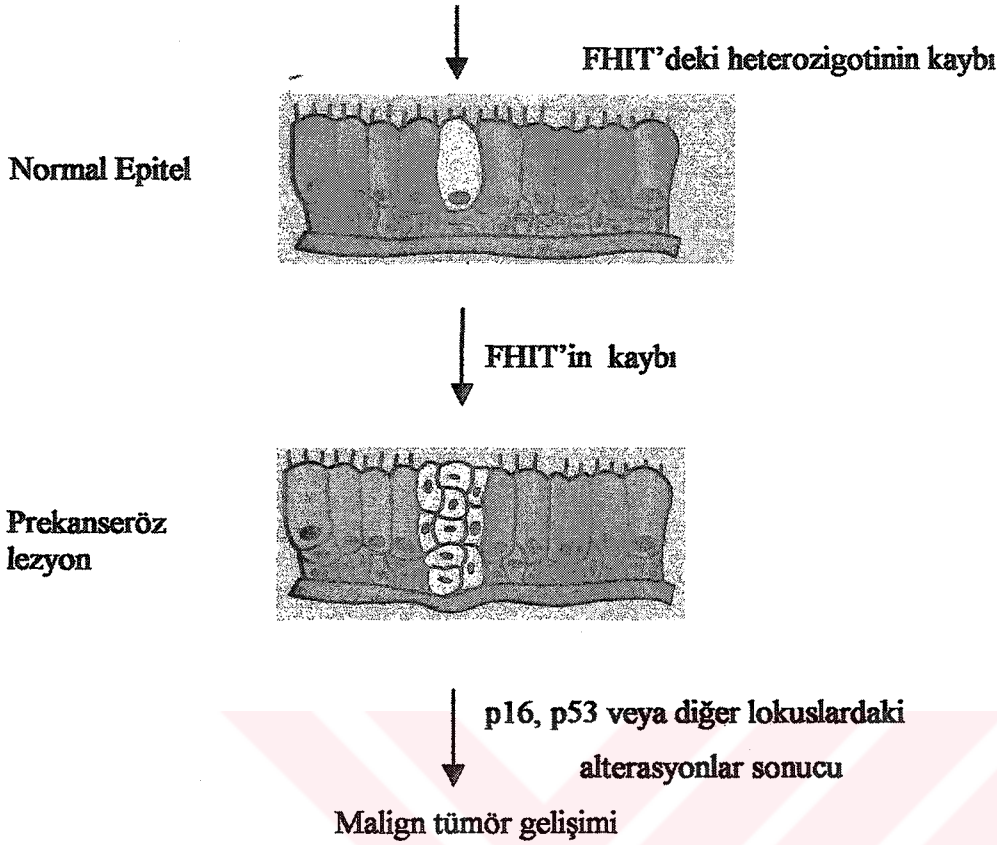
FHIT gen lokusu bazı tümörlerde kompleks alterasyonlar gösterir. Bu alterasyonlar; iki allelin herbirinde bağımsız ve protein sentezinin durmasına neden olan farklı delesyonlar veya birbirini kısmen kaplayan ayrı delesyonlar ile homozigot delesyon bölgeleri meydana getirir. Akciğer kanserlerinde FHIT geni yaklaşık %70 oranında inaktivedir (185, 186). Prekanseroz lezyonlarda FHIT gen ekspresyonu %85 azalmaktadır. FHIT geni fonksiyonunun kaybı, akciğer karsinogenezinde erken dönemde meydana gelir (186). FHIT gen ekspresyonundaki değişimler, EGFR'nin regülasyonunun bozulmasından ve p53 mutasyonlarından önce meydana gelmektedir (186). FHIT geni inaktivasyonu sigara kullanan hastalarda (%75), sigara kullanmayan hastalara (%39) oranla yaklaşık iki kat fazla olmaktadır (186, 187). Meme hastalarında FHIT geni inaktivasyonu %20-75 oranındadır (107, 192-194). Campiglio ve ark (193) ve Gatalica Z ve ark. (194); meme kanserinde FHIT geni'nin kaybının akciğer kanserine benzemeksizin, meme karsinogenezinde hastalığın başlangıç evrelerinden çok, ilerleyişi ile ilişkili olduğunu açıklamışlardır.

Çoğu kanser tipinde, FHIT geni'nin inaktivasyonunun mekanizması henüz aydınlatılmamıştır (107, 186-193). Örneğin; böbrek tümörlerinin çoğunda FHIT proteini kaybolur. Fakat DNA veya mRNA'daki delesyonlar çok az çalışmada açıklanmıştır (183-189). Çalışmalardaki farklılıklar gendeki değişimlerin çoğunluğunun büyük intronlarda yer almasından ve bu değişimleri kolayca belirlemenin mümkün olmamasından kaynaklanmaktadır (169).

FHIT geni proteininin ekspresyonunun kaybı, FHIT geni promoterinde meydana gelen metilasyonlar ile de ilişkilidir. Metilasyon meme kanserinde %50'nin üzerinde ve küçük hücre dışı akciğer kanserli hastalarda ise % 40 civarındadır (194).

FHIT geni, bronşial prekanseroz lezyonların büyük kısmında inaktivedir. Bu tip inaktivasyon kolon, serviks ve özafagus prekanseroz lezyonlarında da tanımlanmıştır (8, 173, 196-198). Bu lezyonların oluşumu, normal epitelial hücrelerde karsinojenlere maruziyetten hemen sonra meydana gelmektedir. Bu yüzden, FHIT geni inaktivasyonunun erken dönemde olduğu öne sürülmektedir (Şekil-4). Son yıllarda yapılan çalışmalardaki veriler bu teoriyi desteklemektedir (173-175). Hem sigara hemde asbestos gibi karsinojenlere maruziyet ve Çernobil nükleer patlama sonrası gama ışınlarına maruz kalan temizlik işçilerinde görülen akciğer kanserlerinde FHIT gen inaktivasyonunda artış belirlenmiştir (173-175).

Sigara ve diğer karsinojenlere maruziyet



**Şekil-4: Karsinojenler ile indüklenmiş tümörlerde FHIT'in inaktivasyonu**  
[Yuri P ve ark.(170)'den alındı.]

Birçok karsinojen DNA'da hasar meydana getirir ve allelik delesyonlar yolu ile inaktivasyona neden olur. Hücrelerde ilk oluşan hasarın onarılabilmesi için onarım ile ilgili olan BRCA1, BRCA2 ve hMSH2 genlerinin yanında (meme kanseri ile ilişkili olarak) FHIT geninin fonksiyonunun da önemli olabileceği ileri sürülmüştür (192, 199, 200). Kolorektal kanserli hastalarda FHIT'in ve hMSH2'nin kaybı arasında anlamlı bir ilişki belirlenmiştir. Benzer ilişki, meme kanserinde DNA onarımında rolleri olan BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar ile FHIT geni arasında ilişkiyi kurmak konusunda yardımcı olmuştur. DNA onarım mekanizmasında kusurların oluşmasında FHIT geni mutator etki gösterebilir. Bununla birlikte, bu konuda çalışan araştırmacılar bu ilişkinin daha iyi açıklanmaya ihtiyacı olduğunu vurgulamaktadırlar (192, 199, 200).

1997'de, Siproshevilli ve ark. (201), FHIT geni negatif tümör hücre hatlarında FHIT'in yeniden ekspresyonunu, *in vivo* hücrelerde tümör oluşumunu baskılayarak incelemişlerdir. Bu çalışmada, bu hücrelerde FHIT geninin ürünleri değerlendirilmiştir.



FHIT içermeyen kontrol hücreler immün sistemi baskılanmış farelere enjekte edilmiş ve 3 hafta sonra, bu farelerde büyük tümörler gelişmiştir. FHIT geni eksprese olan hücrelerin enjeksiyonu sonucunda ise tümör gelişimi gözlenmemiştir (201). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, FHIT yeniden ekspresyonunun etkisini akciğer kanser hücre hatlarında çalışmışlardır (202-204). Hücrelerde FHIT geni'nin adenoviral transdüksiyonunun hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (202, 203). Werner ve arkadaşları ise renal-hücre karsinomalı hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, ekzojen FHIT gen indüksiyonunun ancak hücre hatlarının yarısında supresyonu sağladığını bildirmişlerdir (205). Dolayısıyla; kanser hücre hatlarında, hücrelerin tamamı FHIT geni tarafından baskılanmamaktadır. Ishii ve arkadaşları özefagusa ait kanser hücre hatlarının %40'ında FHIT geni'nin tümör supresyonunu sağladığını göstermişlerdir (206). Hem adenoviral hemde "adenoassociated" viral vektörler kullanılarak FHIT negatif pankreas kanser hücre hatlarında yapılan bir diğer çalışma da ise, FHIT geninin yeniden ekspresyonunun tümör gelişiminin inhibisyonu'na ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (207).

FHIT geninin ürününün fonksiyonunu tanımlamak için, genin regülasyonunu değiştirerek hayvan modelleri geliştirilmiştir. Fong LY ve ark.(208)'nin geliştirdiği modelde, Fhit proteini eksprese olmayan fareler üretilmiştir. Kanser gelişiminde FHIT geninin rolünü tanımlamak için bu farelere ve normal farelere bir gastrik karsinojen olan "N-nitrosamethyl-benzylamine" (NMBA) verilmiş ve muameleden 10 hafta sonra Fhit(-) olan farelerin tümünde, yabani tip farelerin ise %25'inde gastrik tümör gelişimi gözlenmiştir. Zanesi N ve ark.(209)'nin geliştirdiği modelde ise yabani tip farelerde %8, FHIT geni mutant farelerde %53 oranında gastrik tümör gelişimi gözlenmiştir.

FHIT geninin tümör hücre hatları ve nakavt farelerde tümör supressör fonksiyonu açıklandıktan sonra, kanserde gen tedavi için bu bulgular üzerinde çalışılmaya başlanmıştır (210). Fhit knockout farelere FHIT geni vektörler yardımıyla ekzojen olarak verildiğinde, tümör gelişiminin %50 oranında azaldığı görülmüştür (211).

FHIT geni ile ilgili gen terapi çalışmaları, malign hastalıklarda FHIT geninin inaktivasyonu ve tümör supressör fonksiyonu rekombinant vektörler kullanılarak yapılmıştır. Fakat en ciddi problem, hiçbir gen tedavi stratejisi normal hücreleri etkilemeksizin sadece hedef hücrelere giderek etkisini göstermesi mümkün olmamaktadır. Adenoviral FHIT vektörlerinin çoğu dokuda ekspresyon düzeyleri uygun olmakla birlikte, güçlü immün yanıtı neden olmaktadır. "Adenoassociated" FHIT vektörleri immün yanıt ile ilgili problem yaratmamasına rağmen, bu virüs gastrointestinal sistem gibi sınırlı dokuda

kullanılabilmektedir (211). FHIT geninin terapötik ajanlar yolu ile endoskopik kullanımı özefagus kanserli hastalarda problem oluşturmamasına rağmen, bu ajanların uygun dokulara verilme stratejileri geliştirilemediğinden, akciğer ve pankreas kanserli hastalara verilmesinde ciddi problemler ile karşılaşmaktadır. Bu tip zorlukların aşılmasını takiben gelecekte FHIT geni'nde terapi, kanser tedavisi ve kanserin önlenmesinde önemli ilerleme sağlayacaktır.

#### 2.4.5. DNA Tamir Genleri'nin rolü

DNA tamir genleri ilk olarak kolon kanserli hasta ve yakınlarında mutasyonları belirlenen, kanserleşmeden sorumlu en son ve en yeni gen sınıfını oluşturmaktadır. Son yıllarda bu konuda gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalarda akciğer, baş-boyun, meme kanserleri ve glioblastomlarda da bu genlerin mutasyonları belirlenmeye başlanmıştır. Bu konuda en yeni bulgu 2000 yılında meme kanserlerinde hMLH1 geninde germline mutasyonlarının belirlenmiş olmasıdır (212).

DNA tamir genleri kanserleşmenin biyolojik mekanizmasında çok önemli yer tutmaktadır. Çünkü bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kendileri ile sınırlı kalmayıp proto-onkogen ve tümör supressör genlerdeki mutasyon sıklığını arttırmaktadır. Bunun sonucu genomda mutator bir fenotip meydana gelmekte ve zincirleme mutasyonlarla kişide kansere karşı genetik bir eğilim doğmaktadır. Son yıllarda gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalarda meme kanserinin oluşumunda en önemli rolü oynayan BRCA1 ve BRCA2 tümör supressör genlerinin aynı zamanda DNA'nın tamirinde de rol oynadığı gösterilmiştir. Bu iki genden BRCA1'in BAP1 adı verilen DNA tamir geni ile ilişkili olduğu saptanmıştır. BAP1 gen'i 3p21.3 bölgesinde lokalize 2000 yılında klonlanan bir genidir ve bu genin ürünü olan ubiquitin "carboxyl-terminal hydrolase" (UCH) BRCA1 proteinin "RING finger" bölgesine bağlanmakta ve böylece tamir olayı gerçekleşmektedir. Aynı şekilde BRCA2 geninde RAD 51 adı verilen DNA onarımında rol oynayan bir genle etkileşim gösterdiği ve bu yolla DNA tamirinin gerçekleştiği belirlenmiştir. BRCA geni bulunmayan nakavt fare embriyolarından elde edilen hücrelerin DNA tamirini gerçekleştiremedikleri gibi özellikle BRCA2 geninden yoksun hücrelerin radyasyona ve DNA molekülünde çift sarmal kırıkları oluşturan kemoterapötik ajanlara karşı aşırı duyarlı oldukları gösterilmiştir (213).

#### 2.4.6. Mikrosatellit İnstabilitesi

Tek, iki veya üç nükleotidden oluşan yapıların genom üzerinde gelişigüzel tekrarlanmasından oluşan diziler çok rastlanan ve son derece polimorfik değişik bir genetik özellik oluşturur. Mikrosatellit adı verilen bu dizilerin dağılımının incelenmesinden gen haritalaması ve bağlantı analizinde yararlanır. Bu dizilerin tekrar sayısında değişiklikler ile ortaya çıkan mikrosatellit instabilitesi ilk kez kolon tümörlerinde gözlenmiştir (214). HNPCC üzerinde yapılan çalışmalar mikrosatellit instabilitesinin DNA onarım genlerinde ortaya çıkan kalıtsal veya somatik mutasyonlardan kaynaklandığını göstermiştir. Meme kanserinde de gözlenen mikrosatellit instabilitesi bir ya da daha çok sayıda lokusu kapsayan ve HNPCC'dekine benzeyen ikili tekrarlar ile üçlü ve dördü nükleotidlerden oluşur (215, 216) ve genellikle kanserleşmenin erken aşamasında gerçekleştiği kabul edilir (217).

#### 2.4.7. Telomeraz Aktivitesi

Kromozomların ucunda bu bölgenin replikasyonunu ve dolayısıyla genomun devamlılığını sağlayan ve bu bölgenin DNA üzerinde onarılması gereken bir kırık olmadığını belirleyen diziler (TTAGGG tekrarları) bulunur. Telomer adı verilen bu diziler hücre bölünmesi sırasında giderek kısalır ve kritik bir uzunluğa geldiğinde hücre çoğalması durur (218). Normal hücrelerin çoğunda telomeraz aktivitesi görülmez. Bu nedenle her hücre bölünmesinde uçlar giderek kısalır ve sonunda hücre çoğalamaz. Herhangi bir şekilde bu denetimden kurtulan hücrelerde kromozom uçlarında birleşmelerle seyreden bir kriz durumu ortaya çıkar ve hücre apoptozise gider. Hücre krizde iken bazı hücrelerde telomeraz ekspresyonu gözlenebilir, bu sayede yeniden çoğalmayı sürdürebilen hücre telomer kompleksi, TRF'ler ve bazı onarım proteinlerinin işbirliği ile ölümsüzlük kazanabilir.

Son yıllarda telomerlerin yapısı ve işlevi hakkında yeni bilgiler açığa çıkmıştır. Telomerlerin 3' -ucunda guanin içeren uzantılar yer alır. Telomere bağlanan TRF 1 ve TRF 2 gibi proteinler bu bölgeyi nükleazların etkisinden, rekombinasyondan ve uçların yeniden birleşmesinden korur. Telomerlerin stabilitesi telomeraz adı verilen enzimin aktivitesindeki artış ile gerçekleşir (219). İnsanda bu enzim telomeraz ters transkriptaz katalitik altbirimi (hTERT) ile, bunun kalıp olarak kullandığı telomeraz RNA bileşeninden (hTR) oluşan kompleks bir proteindir. Bu protein kromozomun ucuna ilgili dizileri

ekleyerek stabilitesini korur (220). Telomeraz enzimi sadece germ hücreleri ve somatik kök hücreleri gibi çoğalan hücrelerde eksprese edilir.

İnsanda telomeraz aktivitesinin saptanmasına olanak veren bir yaklaşım (TRAP assay) geliştirildikten sonra kanser olgularında telomeraz aktivitesinin araştırılması mümkün olmuştur. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda meme kanserlerinin %95'inde telomeraz aktivitesinin varlığı saptanmıştır (221-223). Aspirasyon biopsi örneklerinde telomeraz aktivitesinin incelenmesinin doğru tam yüzdesini önemli ölçüde arttırdığı, kanserli dokularda telomeraz aktivitesi % 92 oranında pozitif bulunurken selim lezyonların % 94 ünde aktivitenin negatif olduğu bildirilmiştir (224). Bir başka çalışmada da iğne aspirasyon biopsisinde telomeraz aktivitesi saptanan örneklerin hepsinde cerrahi sonunda karsinom tanısı konulduğu bildirilmektedir (225). Çalışmalar tümörün histopatolojik özellikleri ile telomeraz aktivitesi arasında doğrudan ilişki bulunduğunu göstermektedir (223). Telomeraz aktivitesi ile tümör boyutu, lenf tutulumu ve evre arasında da anlamlı ilişki bildirilmiştir (226). Lenfatik ve vasküler yayılım ile yüksek telomeraz aktivitesi arasındaki bağlantı, bu parametrenin prognostik önemine işaret etmekte (227), yüksek telomeraz aktivitesi ile kısa hastalıklı sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunması bu gözlemi doğrulamaktadır (228).

Bu nedenle meme kanseri tedavisinde bir başka hedef de telomerazdır. Telomeraz aktivitesini engellemek amacıyla ("antisense" oligonükleotidler, ters transkriptaz inhibitörleri, gibi) birçok inhibitör denenmektedir. Bunlar arasında en çok kullanılan ters transkriptaz inhibitörü AZT nin (3'-azido-3'-deoksitimidin) meme kanseri hücrelerinde enzim aktivitesini ve hücre çoğalmasını durdurduğu gösterilmiştir (229, 230). Retinoik asit ile tamoksifenin de telomeraz aktivitesini engellediği bilinmektedir (231, 232).

Meme kanserli hastaların serumunda tümörden kaynaklanan telomeraz RNA'sının saptanması bu parametrenin tanı ve izleme yönünden de değerlendirilebileceğini düşündürmektedir (233).

#### **2.4.8. Yeni Yaklaşımlar**

DNA mikroarray teknolojisi, İnsan Genom projesinden elde edilen veriler ile birlikte değerlendirildiğinde, eksprese olan tüm genlerin aktivitesini ve birbiri ile ilişkisini aynı anda gözlemek mümkün olmaktadır. Bu sayede belirli moleküler özellikler gösteren tümörlerin ortak karakteristikleri ile evre ve grade, tedaviye cevap ve prognoz gibi klinik faktörler arasındaki belirli profiller ortaya çıkacaktır. Bu konuda yapılan yeni bir

çalışmada meme kanserinde 8102 farklı genin tedaviden önce ve sonra ekspresyonu incelenmiş, tümörlerde bugün mevcut teknolojiler ile belirlenemeyen altgruplar tanımlanmıştır (234). Morfolojik açıdan benzerlik gösteren tümörlerin gen ekspresyon profili açısından gösterdikleri farklılıklar klinikte büyük önem taşıyacaktır. Çünkü tümör tipinin ve özelliklerinin doğru olarak belirlenmesi uygun tedavinin seçilmesi ve mümkün olan en yüksek terapötik etkinliğin en düşük toksisite ile sağlanmasına olanak verecektir.

Genomların dizisinin belirlenmesi ve gen ekspresyonuna ilişkin yeni bilgiler proteinlerin geniş anlamda analizine de olanak vermektedir. Genlerin işlevine ait önemli bilgiler sağlayan bu yaklaşıma proteomiks adı verilir. Genom analizi için proteomiks son derece önemlidir. Zira genoma özgü veri tabanından genin işlevine ait bilgi edinmek her zaman mümkün olmamaktadır. Özellikle bilinen başka genler ile belirgin benzerlik taşımayan küçük genler için protein yapısı genomdan yola çıkarak kolay bir şekilde belirlenememekte, DNA dizisine bakarak proteinde sentez sonrası gerçekleşen modifikasyonlar, isoformlar belirlenememektedir. Bu özellikler ancak proteomik yöntemlerle saptanabilir.

Meme kanserinde proteomiks çalışmaları üç alanda yoğunlaşmıştır. Proteinlerin mikrokarakterizasyonu ve translasyon sonrası gerçekleşen değişikliklerin tanımlanması, hastalıkta ilgili protein düzeylerinin nasıl değiştiğini saptamak için bunların kıyaslanmasına olanak veren "diferansiyel display" ve protein-protein etkileşiminin incelenmesi. Proteomiks'in kanser alanındaki ilk uygulamaları büyük olasılıkla erken tanı alanında gerçekleşecektir. Başlıca amaçlardan biri patolojik değişimin daha başlangıç aşamasında kanserli hücrede farklı ekspresyon gösteren protein profillerini belirleyen basit bir diagnostik test geliştirilmesidir. Ancak, bunun için uygulanan yöntemlerin duyarlılığının geliştirilmesi gereklidir.

## **2.5. PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu)**

PZR reaksiyonunda üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürünün miktarı, teorik olarak, bu üç adımın tekrarlanma (döngü) sayısına bağlıdır.

1. İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir (90-95°C de, yaklaşık 5 dakika süreyle).

2. Sıcaklık 50 ila 70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotitlerdir (15-30

nükleotit uzunluğunda) ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar. Bizim çalışmamızda kullandığımız primerler ve bağlanma (annealing) sıcaklıkları Tablo-4'de verilmiştir. Şekil-5'te ise primerlerin FHIT gen dizisi üzerinde düzenlendikleri bölgeler gösterilmiştir.

3. DNA polimeraz tarafından DNA sentezi 70 ila 75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotitleri 3' OH ucuna ekleyerek 5'→3' yönünde primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.

Bu üç basamaktan oluşan bir reaksiyon seti çift zincirli ürünün tek zincirli hale getirilmesi (denaturation), primerlerin bağlanması (annealing) ve polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (extension) bir döngü olarak ifade edilir. PZR bir zincir reaksiyonudur, çünkü, yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve pek çok kez tekrar edilir. Yirmibeş-otuz döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1.000.000 kez artma olur. İşlem, "thermocycler" (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntem ile; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanmak üzere bol miktarlarda hedef DNA fragmentleri elde edilir.

## 2.6. SSCP

Bir baz değişiminin neden olduğu mutasyonlar bu yöntemle taranabilir. Tek zincirli DNA parçacığı bazı koşullarda nükleotit dizisine bağlı olarak belirli bir konformasyon alır. Farklı konformasyondaki parçacıklar elektroforezde farklı hareket eder. Bir baz değişimi DNA'nın konformasyonunu, dolayısıyla elektroforezdeki hareketini değiştirir. Yöntem hızlı ve basittir. DNA dizi analizi yapmadan önce potansiyel baz değişikliği saptanabilir (235).

## 2.7. HDA

HDA; jel matriksinde heterodubleks DNA moleküllerinin homodubleks yapıdaki DNA moleküllerinden daha farklı göç etmesine dayanmaktadır. Yöntem DNA örneklerinin yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten hemen sonra renatüre edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Renatürasyon esnasında mutant DNA ipliği ile yabancı DNA

ipliklerinin hibridize olması ile mutasyon noktasında yanlış eşleşme yapmış bir baz çifti bulunur, bu da heterodubleks DNA'ların oluşması anlamına gelir. HDA'nın, 300 baz çiftlik veya daha küçük bir DNA fragmanında %90-95 oranında güvenilirliği mevcuttur (236).

## 2.8. Gümüş Boyama

İlk kez 1991 yılında Ainsworth ve ark. (237) tarafından kullanılmış olan bu yöntem gümüşün formaldehit ve sodyum karbonat varlığında indirgenerek kahverengi renk vermesi prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem ile 1 mm<sup>2</sup>'de 1-10 pg DNA'nın varlığı dahi gümüş boyama ile bantlar şeklinde gösterilebilmektedir (238, 239). Gümüş boyama yöntemi radyoaktif olmayan, ekonomik, duyarlı ve düşük miktardaki DNA'ları bile belirlemeye yarayan bir yöntem olduğu için tercih edilmiştir. Boyama reaksiyonu yedi basamaktan oluşan bir protokolle gerçekleştirilir (237).

## 2.9. DNA Dizi Analizi

1970'lerde daha etkin ve doğrudan nükleotit dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in (240) kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Fred Sanger ve ark.'nın (241) geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA'ya dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır (her baz için bir tane). Bu dört reaksiyonun ürünleri, bir nükleotid uzunluğu kadar farklı, bir dizi DNA parçacıklarıdır. Dört reaksiyonun ürünleri bir jelde dört ayrı kuyucukta yanyana elektroforez ile ayrıştırılmaktadır. Jel hattındaki her bir bant belirli bir baza karşılık gelmektedir ve jeldeki bantlardan DNA parçacığının dizisi okunabilmektedir.

Enzimatik DNA sentezine dayanan Sanger'in DNA dizi analizi yönteminde, dizisi saptanacak olan DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır (241). Sentez reaksiyonu DNA polimeraz I ile kataliz edilir. Yöntemde, kimyasal değişikliğe uğratılmış (modifiye) dideoksinükleotit trifosfatlar kullanılarak bir dizi DNA parçacıkları elde edilir. Dideoksinükleotit trifosfatlarda 3' -OH grubu bulunmaz. Bu durumda, molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır ancak 3' -OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı kalıp DNA

zinciri, bir primer, radyoaktif nükleozit trifosfatların dördü (ATP, CTP, GTP, TTP) ve az miktarda dideoksiribonükleozit trifosfatlardan sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir dideoksinükleozit trifosfat bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleozit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak, bir dizi DNA parçacığı meydana gelir. Sentez sonrası, dört reaksiyondan elde edilen radyoaktif DNA parçacıkları elektroforez jelinde yan yana dört ayrı kuyucukta yürütülür. DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir.





### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. GEREÇLER

##### 3.1.1. Aletler

- 1- Santrifüjler (Hettich EBA 200, soğutmalı Hermle Z233 MK-2)
- 2- Yatay elektroforez tankları (Serva Blue Marin 100, Serva Blue Marin 200, EC Maxi ve EC Midi)
- 3- Yatay elektroforez için güç kaynağı (EC 250-90)
- 4- Dikey elektroforez sistemleri ve güç kaynağı (EC 4000P , EC1000-90)
- 5- Isıtıcı blok (Techne DB-2A)
- 6- Çalkalamalı su banyosu (Nüve ST402)
- 7- PZR cihazları (PE Gene AMP® PCR system 9700, Techne Flexigene, Techne Genius)
- 8- Görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat/Fransa)
- 9- Orbital Çalkalayıcı (Nüve SL350)
- 10- Vorteks (Velp marka)
- 11- Deiyonize su cihazı
- 12- Jel kurutma sistemi (EC 356 Gel drying system)
- 13- Spektrofotometre (Jenavay 6105)
- 14- pH metre (Nel pH890)
- 15- Kaba ve hassas terazi (Sartorius/Germany BL150, Gec Avery)
- 16- Isıtıcı, manyetik karıştırıcı (Ikamag®RH Jankle&Kunkel)
- 17- Çeker ocak
- 18- Mikro pipetler ve tüpler (Eppendorf)

##### 3.1.2. Kitler

1. Dokudan DNA İzolasyon kiti (Puregene™ DNA Isolation Kit D-7000A)
2. DNA dizi analiz kiti (USB P/N 70170 USA).

##### 3.1.3. Kimyasal Maddeler

1. EDTA (Etilentetradiaminasetikasit Sigma; E-5134)
2. Üre (Appli Chem; A1049-1000)
3. Trizma® Base (Sigma; T-6066)
4. APS (Amonyumpersülfat; Sigma A-7460)

5. Gliserol (Sigma; G-5516)
6. Gümüş nitrat (Merck; K291072101-148)
7. Borik asit (Merck; K27404860-016)
8. Sodyum sülfat (Sigma; L-4390)
9. Akrilamid/bis-akrilamid (Sigma; A-2917)
10. Agaroz (Sigma; A-5093)
11. Tris (Boehringer Mannheim; 708976)
12. Ksilen siyanol (Sigma; X-4126)
13. Brom fenol mavisi (Sigma; B-8026)
14. Sukroz (Sigma; S-7903)
15. TEMED (N,N,N',N'- Tetrametilendiamin; Sigma; T-7024)
16. Taq DNA polimeraz (Sigma D-6677)
17. MDE TM jel solüsyonu (BMA; 50620)
18. Kromotografi Kağıdı 3MM (Whatman; 3030,917)
19. Formaldehit ( Riedel-de Haen® ; 15512)
20. Absolute etanol (Riedel-de Haen® ; 34870 )
21. Formamid (Sigma; F-9037)
22. Sodyum karbonat (Riedel-de Haen® ; 13418)
23. Sodyum hidroksit (Sigma; S-8045)
24. Etidyum bromid (GibcoBRL® ; 1585-011)
25. Magnezyum klorür (Sigma; M-1028)
26. Deoksinükleozittrifosfatlar dNTP (Sigma; D-7295)
27. 10XPCR tamponu (Sigma; P-2192)
28. Marker (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas #SM0242)
29. Sigma cote (Sigma; SL-2)
30. Bind silane (Promega; Cas#2530-850)
31. Oligonükleotid primerler (IDT; Integrated DNA Technologies, Inc)
32. Radyoaktif madde [ $\alpha$ -35S]DATPS (Institute of isotopes Co,Ltd; SBS-203).

### 3.1.4. Çözeltiler

10X TBE çözeltisi: 108 gr Trisma® Base, 55 gr Borik asit, 9.3 gr EDTA deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve pH 8'e ayarlandı.

Yükleme çözeltisi: 0.0625 gr Brom Fenol Mavisi, 10 gr Sükroz, 1.5 ml 10X TBE steril distile su ile 25 ml'ye tamamlandı.

Durdurma çözeltisi: 0.005 gr Brom Fenol Mavisi, 0.005 gr Ksilen siyanol, 0.004 gr Sodyum hidroksit steril distile su ile 10 ml'ye tamamlandı.

TE çözeltisi: 1.07 gr Tris (10 mM), 0.368 gr EDTA (1 mM) steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve pH 8'e ayarlandı.

SSCP ve HDA yüklemeleri için jel solüsyonu: 17.3 ml deiyonize su, 14 ml MDE Tm jel, 2.8 ml Gliserol, 2.25 ml 10XTBE, 200µl %10'luk (w/v) APS ve 20µl TEMED'ten oluşmaktadır.

Dizi analizi için poliakrilamid jel solüsyonu: 45 ml deiyonize su, 6 ml 10XTBE, 9ml Akrilamid/Bisakrilamid solüsyonu, 25.2 gr Üre, 600µl %10'luk APS ve 30µl TEMED'ten oluşmaktadır.

## 3.2. YÖNTEMLER

### 3.2.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmamız 2000-2004 yılları arasında, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ait Kanser Genetiği Laboratuvarında gerçekleştirildi. U. Ü. Tıp Fakültesi Etik Kurulu 2002-26/2 no'lu kararı ile çalışmamızı uygun buldu. Çalışmamız Genel Cerrahi Anabilim Dalı Meme Ünitesine başvuran malign ve benign meme hastalarına ait, Patoloji Anabilim Dalı'nda parafinlenerek saklanan dokular ve operasyon sırasında çıkarılan taze dokular üzerinde gerçekleştirildi.

### 3.2.2. Hasta Grubunun Seçimi

Hastaların seçiminde, Meme Ünitesinin hastalarına ait arşivinden faydalanıldı. Başlangıçta 50 malign ve 35 benign hasta belirlendi. Belirlenen vakaların Patoloji raporlarından Patoloji numaraları belirlenerek, Patoloji Anabilim Dalı'ndan istendi. 50 malign vakanın 46'sının, 35 benign vakanın ise 26'sının parafinlenmiş bloklarına ulaşılabildi. 26 benign parafin blok'un, 16 tanesinin DNA izolasyonu yapılabildi.

Ayrıca, 2001-2003 yılları arasında Meme Ünitesine başvuran ve opere edilen malign hastalardan 21'inin taze meme dokuları çalışmamıza dahil edildi.

Çalışmamız 46 malign parafin blok, 21 taze malign meme dokusu ve 16 benign parafin blok olmak üzere toplam 83 meme dokusu üzerinde gerçekleştirildi.

Çalışma grubumuz, 67'si malign ve 16'sı benign olmak üzere 83 kadın hastadan oluştu. Malign hastaların yaşları 34 ile 85 arasında değişmekte olup, yaş ortalaması 52.4 idi (Tablo-5). Benign hastaların yaşları ise 15 ile 59 arasında değişmekte olup, yaş ortalaması 37.7 idi (Tablo-6). Malign hastaların 36'sı postmenaposal, 31'i ise premenaposal dönemde olup, 22 hastanın meme kanseri aile hikayesi mevcuttu. 32 hastanın tümör lokalizasyonu sağ, 31 hastanın sol, 4 hastanın ise bilateraldir. 3 hastanın tümör tipi Taşlı yüzük hücreli iken, 6'sı İnvazif-infiltratif lobuler, diğerleri ise İnvazif-infiltratif duktal tiptedir. Tümör dokularının TNM sınıflandırılması Tablo-5'de verildi. Tablo-7'dan evreleri değerlendirilerek vakaların evre I ile IV arasında dokulardan oluştuğu görüldü. Benign meme hastalarının 10'u premenaposal, 6'sı postmenaposal dönemde idi. Benign hastaların 10'unun meme kanserli aile hikayesi mevcut idi. Benign kitlelerin lokalizasyonu; 8'inde sağ, 7'sinde sol, 1'inde ise bilateraldir. 5 hastanın fibroadenom, 2 hastanın fibrokistik değişiklikleri, 1 hastanın fibrolipomatöz dokusu mevcut iken, diğer hastaların atipili duktal veya intraduktal hiperplazileri mevcut idi (Tablo-6).

**Tablo-5: Malign meme hastalarına ait genel bilgiler.**

No	Yaş	MD Pre/Post	OK (Ay)	Menarj	Doğum sayısı	İlk Doğum Yaşı	Emzirme Süresi (Ort.Ay)	Aile hikayesi 1 (Meme kanseri)	Aile hikayesi 2 (Diğer kanserler)	Tümör Orijini (CA)	T N M Sınıflandırması	L.
1	54	Post.	-	12	4	15	12.8	-	Babası colon, ablası akciğer, ananesi mide	Invasif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b4</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
2	85	Post.	-	14	2	28	12	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
3	57	Post.	-	13	1	31	24	-	Babası akciğer	Invasif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>0</sub>	Sol
4	38	Pre.	-	13	4	19	19.5	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b4</sub> M <sub>0</sub>	Sol
5	46	Pre.	24	13	1	24	4	-	Amcası mide	Invasif duktal	T <sub>1a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
6	71	Post.	-	15	5	20	12	-	-	Invasif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
7	46	Post.	36	13	2	19	11	-	Babası özefagus	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
8	43	Pre.	-	14	1	30	-	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b4</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
9	65	Post.	-	14	2	18	12	-	-	Invasif duktal	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
10	42	Pre.	12	14	2	19	12	-	-	Invasif duktal	T <sub>3</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	Sol
11	49	Pre.	-	13	2	21	4.5	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
12	56	Post.	-	12	3	23	8.3	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
13	51	Pre.	-	16	2	18	4.8	-	Amcası akciğer	Invasif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
14	42	Pre.	-	12	3	32	-	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
15	36	Pre.	-	17	2	21	13	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b2</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
16	44	Pre.	24	12	2	17	22.5	-	Kardeşi lösemi	İnfiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>0</sub>	Sol
17	64	Post.	-	14	2	22	6	-	Kendi si kolon	Taşlı tüzük hücreli	T <sub>2</sub> N <sub>1b2</sub> M <sub>0</sub>	Sol
18	38	Pre.	24	14	3	17	2.3	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
19	39	Pre.	-	14	3	15	16	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b2</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
20	40	Post.	-	14	4	23	7.3	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>1b</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>1</sub>	Bil
21	43	Pre.	-	12	2	21	7.5	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>x</sub>	Bil
22	71	Post.	-	16	4	23	18	-	-	Invasif tübülobüler	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
23	34	Pre.	-	12	2	22	17.5	-	-	Invasif duktal	T <sub>4</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>x</sub>	Sol
24	41	Post.	-	13	2	15	18	-	Dedesı akc., halası cilt, amcası larinks	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
25	63	Post.	8	17	10	20	8	Kızı, 2 hala kızı, amcakızı	-	Taşlı yüzük hücreli	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
26	69	Post.	-	13	3	22	12.5	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>1b</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
27	52	Post.	-	12	2	18	11.5	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
28	63	Post.	-	13	4	19	15	Abla	-	İnfiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
29	60	Post.	-	13	4	23	18	-	Babası sarkom	Invasif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>x</sub>	Sol
30	43	Pre.	-	13	2	24	15	-	-	Invasif lobüler	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
31	54	Post.	-	13	2	22	7	-	Ağabeyi akciğer	Invasif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>x</sub>	Sağ
32	39	Pre.	-	14	2	24	2.5	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
33	36	Pre.	-	12	4	25	8.3	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>4d</sub> N <sub>1b</sub> M <sub>x</sub>	Sol
34	76	Post.	-	13	-	-	-	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	Sol
35	40	Pre.	-	14	2	30	15	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>1</sub> N <sub>2</sub> M <sub>x</sub>	Sağ
36	47	Post.	24	13	1	25	6	-	Annesi cilt	İnfiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
37	52	Post.	-	14	3	19	13.3	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
38	43	Pre.	-	13	5	20	8	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b4</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
39	46	Pre.	-	13	4	19	2.8	-	-	İnfiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
40	52	Post.	-	13	2	25	15	Teyze	-	Invasif duktal	T <sub>1b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol

MD:Menoposal Durum, Pre.:Premenoposal, Post.:Postmenoposal, OK:Oral kontraseptif kullanımı, L:Lokalizasyon, Bil:Bilateral.

**Tablo-5'in devamı**

No	Yaş	MD Pre/Post	OK (Ay)	Menarj	Doğum sayısı	İlk Doğum Yaşı	Emzirme Süresi (Ort.Ay)	Aile hikayesi 1 (Meme kanseri)	Aile hikayesi 2 (Diğer kanserler)	Tümör Orijini (CA)	T N M Sınıflandırması	L.
41	39	Pre.	-	11	2	23	6.5	Anne	-	Infiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Bil
42	73	Post.	-	13	1	39	6	Abla	-	Invasif duktal	T <sub>4a</sub> N <sub>1b</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
43	59	Post.	-	13	3	22	12.5	Ağabeyinin kızı, dayı kızı	Ağabeyi ve dayısının oğlu akciğer, Babasının amca kızı mide	Infiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
44	69	Post.	-	13	6	18	9	Anne	-	Infiltratif duktal	T <sub>4</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>0</sub>	Bil
45	46	Pre.	12	14	1	32	1.5	Kuzeni ve teyze çocukları	-	Infiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>x</sub>	Sol
46	64	Post.	-	13	-	-	-	Hala	-	Insutu duktal	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
47	69	Post.	-	13	1	26	6	Teyze kızı	-	Invasif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
48	41	Pre.	6	13	2	21	4	Teyze, hala kızı	-	Infiltratif duktal	T <sub>1</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
49	58	Post.	-	11	3	23	7.7	Abla	-	Infiltratif duktal	T <sub>1a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
50	41	Pre.	-	14	3	25	11	Kardeş, teyze	-	Invasif lobüler	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
51	45	Pre.	12	12	2	23	2.5	Hala kızı	-	Infiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
52	69	Post.	-	16	3	19	9	2 kızkardeşi	-	Infiltratif tubülobüler	T <sub>2</sub> N <sub>1b4</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
53	72	Post.	-	12	5	19	18	Kızı	-	Infiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
54	41	Pre.	120	14	3	16	12	Teyze	Amcası akciğer	Invasif duktal	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
55	54	Post.	24	14	3	25	20	-	Babası akciğer	Infiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b</sub> M <sub>0</sub>	Sol
56	56	Post.	-	14	2	20	11	Anne	-	Infiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
57	67	Post.	-	11	6	17	8.7	-	-	Invasif kribiform	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
58	50	Pre.	-	15	-	-	-	-	-	Infiltratif tubülobüler	T <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
59	44	Pre.	-	12	1	29	24	-	Babası larinks	Infiltratif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
60	73	Post.	-	14	2	27	27	-	-	Taşlı yüzük hücreli	T <sub>2</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>0</sub>	Sol
61	65	Post.	-	12	2	25	3	-	Ağabeyi prostat	Infiltratif duktal	T <sub>1a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
62	34	Pre.	-	13	2	20	8	-	Dedesesi akciğer	Invasif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>0</sub>	Sol
63	48	Pre.	-	14	8	15	16	Anne	-	Mikstinfiltratif duktal, lobüler	T <sub>2</sub> N <sub>1b</sub> M <sub>0</sub>	Sol
64	48	Post.	-	13	2	18	5	-	-	Invasif duktal	T <sub>2</sub> N <sub>1b3</sub> M <sub>0</sub>	Sağ
65	41	Pre.	-	16	2	19	14	Hala	-	Infiltratif duktal	T <sub>1c</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol
66	50	Pre	-	15	-	-	-	Anne	-	Infiltratif duktal	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>x</sub>	Sağ
67	63	Post	-	13	-	-	-	Kuzen	-	Infiltratif duktal	T <sub>1a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Sol

**Tablo-6: Benign meme hastalarına ait genel bilgiler**

No	Yaş	MD Pre/Post	OK (Ay)	Menarj	Doğum sayısı	İlk Doğum Yaşı	Emzirme Süresi (Ort. Ay)	Aile hikayesi 1 (Meme kanseri)	Aile hikayesi 2 (Diğer kanserler CA)	Tam	L.
1	43	Pre.	-	13	3	19	10	-	-	AİH+FD	Sağ
2	33	Pre.	-	14	1	26	6	-	Dayı larinks, teyze akciğer	Atipili mikroglandtler adenozis+FD	Sağ
3	47	Post.	-	12	1	40	27	-	-	ADH	Sağ
4	20	Pre.	-	14	-	-	-	Kuzeni	-	Fibroadenoma	Sol
5	59	Post.	-	12	2	25	2	İki kız kardeşi	-	İleri derecede İH+FD	Sol
6	23	Pre.	-	13	-	-	-	Anne	-	Fibroadenoma	Sağ
7	15	Pre.	-	14	-	-	-	Annesinin hala kızı	-	Juvenil fibroadenoma	Sol
8	43	Post.	24ay	13	2	18	3	-	-	AİH	Sol
9	27	Pre.	-	12	-	-	-	Baba hala kızı	-	FD	Sağ
10	55	Post.	-	17	4	27	18.4	Kız kardeşi	-	Fibrolipomatöz doku	Sol
11	49	Post.	24ay	16	3	22	12	Abla	Oğlu lenfoma	İH+FD	Sol
12	48	Pre.	-	14	3	22	6.3	-	-	AİH, İ. sklerozan papiloma	Sağ
13	23	Pre.	-	13	-	-	-	Anne hala	-	Fibroadenoma	Sol
14	23	Pre.	6ay	12	-	-	-	Anne teyze	-	Fibroadenoma	Bil
15	52	Post.	-	14	4	17	28.5	-	Anne dede akciğer, baba prostat	ADH	Sağ
16	42	Pre.	-	12	2	17	5.5	Anne	Anne babası larinks, dayı akciğer	FD	Sağ

MD:Menaposal Durum, OK:Oral kontraseptif kullanımı, L:Lokalizasyon, Pre.:Premenaposal, Post.:Postmenaposal, AİH:Atipili intraduktal hiperplazi, ADH:Atipili duktal hiperplazi, FD:Fibrokistik değişiklik, İH:intraduktal hiperplazi, Bil:Bilateral.

## TNM Sınıflandırması

Meme karsinomalı hastalarımızın TNM Sınıflandırması aşağıdaki kriterler kullanılarak yapıldı (242).

- T Primer Tümör  
TX Primer tümör tayin edilemedi.  
TO Primer tümör saptanamamış  
Tis Karsinoma in-situ  
T1s(DCIS) Duktal karsinom in-situ  
T1s (LCIS) Lobuler karsinom in-situ  
T1s (Paget) Tümör kitlesiz meme başının Paget hastalığı  
T1 Tümörün en büyük çapı 2.0 cm veya daha küçük  
T1Mic 0.1 cm veya daha küçük çaplı mikroinvazyon  
T1a Tümör 0.1 cm'den büyük 0.5 cm'den küçük çaplı  
T1b Tümör 0.5 cm'den büyük 1 cm'den küçük çaplı  
T1c 1.0-2.0 cm  
T2 En büyük çapı 2.0-5.0 cm  
T3 En büyük çapı 5.0 cm den büyük  
T4 Tümör herhangi çapta fakat deri veya göğüs duvarı tutulumu mevcut  
T4a Tümör göğüs duvarına yayılmış, pektoralis kasını tutmamış  
T4b Meme derisinde ödem veya ülserasyon, yada aynı meme derisinde satellit deri nodülleri varlığı  
T4c 4a ve 4b mevcut  
T4d İnflamatuvar karsinom
- Bölgesel lenf nodülleri:
- N Regional lenf nodları  
NX Regional lenf nodları bilinmiyor  
NO Regional lenf nodu metastazı yok  
N1 Aynı tarafta hareketli aksiller lenf nod(ları) metastazı vardır.  
N2 Aynı tarafta birbirine veya başka dokulara fikse aksiller nod(ları)metastazı  
N3 Aynı tarafta internal meme lenf nod(ları) metastazı  
M Uzak metastaz  
MX Uzak metastaz bilinmiyor  
MO Uzak metastaz yok  
M1 Uzak metastaz var



**Tablo-7: Meme Kanserinde Evreleme**

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
Evre IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1-N2	M0
	T4	Herhangi N	M0
Evre IV	Herhangi T	N3	M1

Tolunay Ş, 2005 ( 243)' dan modifiye edildi.

### 3.2.3. DNA İzolasyonu

#### 3.2.3.1. Parafin dokudan DNA İzolasyonu

Dokudan parafinin uzaklaştırılması:

Parafin blokdaki dokunun çalışma için uygun bölgesi Patolog tarafından işaretlenerek verildi. 5-10 mg doku içeren kısım, kesilerek çıkarıldı ve 1,5 ml'lik mikrotüpe aktarıldı.

- 1- Mikrotüpe 600µl ksilol ilave edildi ve 5dk vortekslendi. 5dk sonunda tüpteki sıvı kısım atıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
- 2- Mikrotüpe 600µl alkol ilave edildi ve 5dk vortekslendi. 5dk sonunda tüpteki sıvı kısım atıldı. Bu işlem de 3 kez tekrarlandı (Son basamakta tüpteki sıvı kısmın mümkün olduğunca alınmasına dikkat edildi).
- 3- Alkolden uzaklaştırılmış dokunun bulunduğu tüpün ağzına parafilm sarılıp, üzerlerine birkaç delik açılarak kurumaya bırakıldı.

Dokudan DNA İzolasyonu (Puregene™ DNA Isolation Kit D-7000A)

- 1- Dokunun üzerine, 300µl Hücre Lizis solüsyonu ilave edilerek hücrelerin parçalanması sağlandı ve 30-50 kez mikropipet ucu kullanılarak homojenize edildi.
- 2- 65°C'de 15-60 dak. lysate ile inkübe edildi.
- 3- Maksimum ürün elde edilmek istendiğinde, 1.5µl Proteinase K solüsyonu (20mg/ml) ilave edildi. 25 kez ters yüz edilerek karıştırıldı ve 56°C'de (3 saat-1 gece) doku tamamen homojen oluncaya kadar inkübe edildi.
- 4- RNaz ile muamele:
  - 1,5µl RNaz A solüsyonu (4mg/ml) ilave edildi. DNA'yı kontamine etmeden RNaz enzimi yardımıyla RNA'ların parçalanması sağlandı.
  - 25 kez ters yüz edilerek karıştırıldı ve 37°C'de 15-60 dk inkübe edildi.
  - 5dk buzda bekletildi.
- 5- Protein'in Çöktürülmesi:
  - Soğuk örnek oda sıcaklığına alındı.
  - 100µl Protein çöktürme solüsyonu ilave edildi.
  - Yüksek hızda 20 sn vortekslendi.
  - 13.000-16.000 g.'de 3dk santrifüj edildi. Çöken proteinler uzayan pellet şeklinde idi. Eğer protein pelleti gözle görülemiyorsa, 5dk buzda inkübe edildi, 2. ve 3. basamak tekrarlandı.

#### 6- DNA'nın Çöktürülmesi:

- 1.5ml.'lik 300µl %100 isopropanol içeren mikrofij tüpüne, DNA süpernatantı alındı. 1µl Glikojen solüsyonu (Gentra) (20mg/ml) isopropanole ilave edildi.
- 50 kez ters-düz edilerek karıştırıldı.
- 7- 13.000-16.000 g'de 5dk santrifuj edildi.
- 8- Üstteki süpernatant kısmı dikkatlice döküldü. Kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kuruması beklendi.
- 9- 300µl %70'lik etanol ilave edildi ve pelletin yıkanması için tüp ters yüz edildi.
- 10- 13.000-16.000 g'de 1dk santrifuj edilerek, DNA'nın tüpün dibine yapışması sağlandı.
- 11- Etanol dikkatlice döküldü. Kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kuruması için, 15dk beklendi.
- 12- 50µl DNA sulandırma solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 1 gece bekletildi.
- 13- Hazırlanan DNA aynı gün içinde kullanılacak ise +4°C'ye saklandı. Uzun süre kullanılmayacak ise, -20°C ya da -80°C'ye alındı.

#### 3.2.3.2. Taze Dokudan DNA İzolasyonu (Fenol-Kloroform yöntemi)

Cerrahi müdahale ile çıkarılan taze dokudan, ependorf tüpüne alınan 1-3 mm<sup>3</sup> doku parçasına; standart proteinase K inkübasyonunu içeren fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi uygulanarak, DNA izole edildi (244).

#### 3.2.3.3. İzole edilen DNA'nın kalitatif analizi

DNA örneklerinin konsantrasyonu spektrofotometre'de (Jenavay 6105) 260 ve 280 nm dalga boyunda optik yoğunlukları okunarak hesaplandı [DNA (µg/ml) = 260 nm'deki OD x Sulandırma oranı x Katsayı (50)]. DNA'nın saflığı 260 nm ile 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk değerlerinin oranıyla belirlendi. Saf DNA'nın OD(260/280) değeri 1.8'dir. Değer 1.8'in üzerinde ise RNA, altında ise protein kontaminasyonu vardır.

### 3.2.4. PZR

PZR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. PZR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotit primer [ileri (F) ve geri (R) primer], çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur (Tablo-8 ve Şekil-5). Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz (*Thermus aquaticus* isimli termal bir bakteriden izole edilmiş yüksek sıcaklıklara dirençli bir polimeraz enzimi olan Taq polimeraz enzimi), çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar.

**Tablo-8: FHIT Geni 5.-9. ekzonlarına ait primerler**

Ekzon No	Primer	Bağlanma (Annealing) Sıcaklığı(°C)	PZR ürün boyutu (bp*)
Ekzon5	F: 5' TAAGG TGGTATATGA ACTGAGT 3' R: 5' AAGGATACGTCCCTGGTACCACA 3'	59	200
Ekzon6 <sup>a</sup>	F: 5' TACCCAAAGCCAGCAGCATG 3' R: 5' TCACATCTGCCTCCTGGTAAG 3'	59	286
Ekzon7 <sup>a</sup>	F: 5' GCAGGAGATACCATCTATC 3' R: 5' GGGTCTCTCTGACCTCGAAGATAAC 3'	59	207
Ekzon8 <sup>a</sup>	F: 5' CATGAGAGCATCACTGTCAAG 3' R: 5' TAAGATCAGAGAGAACAGACCC 3'	57	169
Ekzon9	F: 5' TACTGGCCTCT AATTTGCAA T 3' R: 5' TAATGACGAAATGCAGTCTTTAC 3'	59	236

<sup>a</sup> Gemma ve ark. (245) tarafından düzenlenen primerler kullanıldı.

\*bp: baz çifti

İlgili gen bölgeleri Tablo-8'de verilen primer dizileri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. Gemma ve ark.'nın (245) düzenlediği 5. ve 9. ekzonlara ait primerler spesifik olmayan bant verdiği için, tarafımızdan tekrar düzenlendi. Reaksiyon 25 µl'lik hacimde gerçekleştirildi.

**Reaksiyon ortamı:**

dH <sub>2</sub> O.....	12.75µl
10xPCR buffer (10 mM TrisHCl;pH 8,3;500mM KCl,%0,01 jelatin)....	2.5µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM).....	1.9µl
dNTP (10 mM).....	1.25µl
F Primer (5 pmol).....	1.25µl
R Primer (5 pmol).....	1.25µl
Taq polimeraz(4U/µl).....	0.1µl
DNA (50-100ng).....	4 µl
Toplam hacim.....	25 µl

**FHIT geninin PZR döngüsü:**

Başlangıç	94°C.....5 dk	
	94°C.....40 sn	} 40 döngü
	57-59°C.....30 sn	
	68°C.....90 sn	
	68°C.....8 dk	

**FHIT Geni (5.-9. Ekzonları)**

**5. EKZON (331-450)**

1 agtagctgac aaatagggcc ttgtggattt gagttaaggt ggcaccgtga agtgcagagg  
61 gagtgaaggg gaaaaactgt tttattgtcc acgtggaagc ttctgcttga aaattgctaa  
121 ctctaataca gaaacactg gtagggagag tggagtattt tagaaagact tcccagaat  
181 gcanccttggt aacantcaat gaggaacaat ttcaatggca tcctctttgc aactaagaat  
241 ctgtagtaat ggaatttgc tttcttaagg tggtatatga actgagtttc ttaattgaat  
301 tttataacta tccattgtct tttcttttag ACTTCAACTG TGAGGACATG TCGTTCAGAT  
361 TTGGCCAACA TCTCATCAAG CCCTCTGTAG TGTTCTCAA AACAGAACTG TCCTTCGCTC  
421 TTGTGAATAG GAAACCTGTG GTACCAGCAC gtatcctttc tttttttttt nggagagggga  
481 aaataaaagt cttctgagcc taaccagcca aatgaatata aatacaagat tggcctccag  
541 tctgtccaaa aaggtaaata aagaatccat ctccctccca cttcggagac accaggtaaag  
601 atgttactca tattttattct gaatccagtt ggtggcacca gtaatatgct tgatcaatgt  
661 tgcagaactt ctgaggagag ttgcttagca accgtggctt

**6. EKZON (415-560)**

1 tacctagaga aaccaagtag atattccagt tgctttttca acctagtgcc tttggctgct  
61 gaagcggaca cagctttaga ataggggtca agagagaatg atctagaata gatcttgcct  
121 cctcgcataa tttatctcacc atacacttga gtctgtctgt acacgaatgt ccctttcttt  
181 tgcaagaat tcttctgcat accacagctt ctccctcaaa gtgtaattat ccatgtatgg  
241 aagctctctt tcaactctct ggagttcagt ggatggtaaa tatctgtttc ttcattcctt  
301 agtctttgag agttcaggcc ctggctccgag aggattcaat cctgtgggta tgaactgctt  
361 gtaagaaca ctaaccgaag ccagcagcat gggccttaac agacctgct acagATGTC  
421 TTGTGTGCC GCTGCGGCCA GTGGAGCGCT TCCATGACCT GCGTCTGAT GAAGTGGCCG  
481 ATTTGTTTCA GACGACCCAG AGAGTCCGGA CAGTGGTGA AAAACATTTT CATGGACCT  
541 CTCTCACCTT TTCCATGCAG gtgagtgtac agatttctca gaaatgattt tttctccctt  
601 tcatatcccg ccatgggctt tgctctctct gatatacttao caggagggca gatgtgattg  
661 tttgtatttt aggtagcagc caaaaaaaga gatttctaat gcagggcaac cctactgtcc  
721 attggcccca agatggaccg tggggatagt gtctaagggt atgtctgagg cttgtttacc  
781 aagcaggtgg gagtaatgga taagtgattt aatggacatt cagacattcc aaattgctta  
841 ctggaactgg gactggaaaa atcattttca tccatggta actaattttt gagcactgca  
901 tanactaagc cctgctctaa ttccaggggt

**7. EKZON (278-307)**

1 aattaaaacc atagcctaga gcaaagagca tgaaaagtag caaggagttg gcttgcctgga  
61 taatttatat cttttttata cataacttcg cacttactct caggcggaaa tggagaactg  
121 tctaataccg cacatttgaa gccaatggtc cccatgagaa tactataaat taacacacia  
181 tgaattgca tctaaattat taatgggtga ttttctgaa taagcaggag ataccatota  
241 tctattctca cctctgttgg ttttttctca cttctagGAT GGCCCCAAG CTGGACAGAC  
301 TGTGAAGTg agtgcattat atgtgcatac aaattaataa gaggcgatta tgagaactaa  
361 taaaaaatca caacgagtca tatgcagcac attgctgttt cattatgTTA tottogaggt  
421 cagagagacc ctcagtgTTA gagccgtaaa tcttgacatt ataaactctg ccaaaacaata  
481 tgtttcccat tggtttaca

**8. EKZON (289-357)**

1 taactacaac caagactgac aaccatgaat aattccacag agactctgaa acactctagc  
61 atttcgacc aactctcata tataccccaa gttgttctct cttgcttagt gcactctctt  
121 gctcggcaga tttcaggtat agttaccgaa ggtggatata aacttctctt gaaaaataac  
181 ccagcaggaa ccatctgTGA gtaattgggc ttcatgagag catcactgtc aagtctaaaa  
241 atacatgggg agataatcac atttttttc tttcttgtac attttcagCA CGTTCACGTC  
301 CATGTTCTTC CCAGGAAGGC TGGAGACTTT CACAGGAATG ACAGCATCTA TGAGGAGgtg  
361 ggtctgtctt ctctgatctt attgtttgat cacggggnac tgcggtggg atgacatcaa  
421 cctaataaat caagtattac cctagatag gtctgaaatg gaattctatt tagccagact  
481 tggaaagtgg caatagaggc caaggagtca agaattggcca tctgTGGaac ccatgactaa  
541 ttaattataa tgattttctt tttcaaatgg aaaaccagca gaaaccaagt gtccttTgta

**9. EKZON (351-451)**

1 accaatgggg aattctgcct tgatggtcca gtcacttgc accagggccc acctctgaca  
61 ctggggattc taatttgaca tgagatatgg gcaaggacac agacctatat catatcatca  
121 cccccctcag cctcagtaga tgattacaag atggcaaatg atctgattat tttaaatgtg  
181 gattcttgta taaagcctat ttgcaagttg tagcaactga aacaattaaa agatacacct  
241 actggcctct aatttgcaaa tttgttccag tctccccag cccccgaaa tttgttcaag  
301 gagatcccaa gggcccatga aagagcctct tctttttttt ttctccaaag CTCCAGAAAC  
361 ATGACAAGGA GCACTTTCCT GCCTCTTGGG GATCAGAGGA GGAAATGGCA GCAGAGCCG  
421 CAGCTCTGGC GGTCTACTTT CAGTGACACA Ggtaaagact gcatttctgto attaccocaga  
481 cctcccggtg ggcctcagga aagaggctgc actctcagaa tggggatgca caaaaacacc  
541 ttcaccagca tcttgggtg gtgggtgcaa aggacaaga gctggagggg agaaaaccct  
601 ggcccttgag tactgtattc ccagcctccc agtctcttcc aactctctg cctcttcaat

\*Büyük harfler ile yazılı olan nükleotidler ekzonların, altı çizili olan nükleotidler primerlerin lokalizasyonunu göstermektedir.

**Şekil-5: FHIT Geninin 5.-9. ekzonlarına ait normal dizi.**

### 3.2.5. Agaroz Jelin Hazırlanışı ve Elektroforezi

% 2'lik Agaroz (w/v) jel çözeltisi hazırlamak için 2 gr agaroz, 100 ml 0.5XTBE tamponu içinde kaynatıldıktan sonra 55°C'ye kadar soğutuldu. DNA jeldeki hareketini izleyebilmek için, jellere son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde Etidyum bromür ilave edildi. Agaroz çözeltisi donmadan önce üzerine 1mm kalınlığında 40 dişli iki tarak yerleştirilen 20x10 cm boyutlarındaki jel tabağına döküldü. Jel donduktan sonra içinde 0.5XTBE tamponu bulunan yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki ceplere yüklendi. Elektroforez işlemi 120V (35mA)'da 25-30 dak. sürdürüldü.

Sonuçlar Görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat)'nde UV ışık altında fotoğraf çekilmek suretiyle izlendi (Şekil 6-10). PZR ürünü elde edilemeyen yada kaliteli olmayan örnekler için PZR işlemi tekrar edildi.

### 3.2.6. SSCP ve HDA Analizleri

#### SSCP:

Çalışmamızda, mutasyon saptama yöntemlerinden biri olan, SSCP analizi kullanıldı (235).

Çoğaltılan çift zincirli DNA denatüre edilerek, tek zincirli hale getirildi ve elektroforez jeline yüklendi. Normal gene ait DNA da benzer şekilde çoğaltıldı, denatüre edildi ve jele yüklendi. Elektroforez sonrası, baz dizisi farklı olan DNA normal DNA'ya göre bant kayması (shift) gösterdi. Yöntemden iyi sonuç alınması için, kullanılan DNA parçacığının 200 bp'yi geçmemesi gerekmektedir.

Bu işlem için, PZR ürünlerinden 8 µl alınarak, 2'şer µl yükleme tamponu ilave edildi. SSCP analizi 95°C'de 5 dak., buz içinde 5 dak. ve +4°C'de 5 dak. bekletilerek gerçekleştirildi.

#### HDA:

HDA analizi için kaliteli PZR ürünlerine; 96°C'de 6 dak., 50°C'de 10 dak., 37°C'de 15 dak. ve 20°C'de 30dk'luk termal profil uygulandı. 4 µl ksilen siyanol içeren stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

### 3.2.7. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması ve PAGE Yükleme

Poliakrilamid jel elektroforezine ait camlar % 98'lik alkol ile temizlendi ve kuyruklu cama jelin yapışmasını sağlamak için "Bind silane" (Promega; Cas#2530-850) sürüldü. Diğer cama ise 700 µl Sigma cote (Sigma; SL-2) sürüldü. Her iki tarafa "Spacer" yerleştirilerek camlar kapatıldı ve polimerizasyon sırasında jelin akmasını engellemek için camların kenarları kalın ambalaj bandı ile kapatıldı.

Hazırlanan Poliakrilamid jel karışımı camların arasına döküldü ve tarak ters olarak takıldı. Polimerizasyonun gerçekleşebilmesi için camlar yatay olarak, minimum 4 saat veya bir gece bekletildi.

Tarak çıkarılarak ters takıldı ve her kuyuya 4 µl stop solüsyonu ilave edilerek ön yürütme yapıldı. İlk ve son kuyuya kontrol örnek olmak üzere 3.5 µl 36-38 örnek yüklendi. 600V (12mA)'da 10-12 saat yürütüldü.

### 3.2.8. Gümüş Boyama

1- Fiksasyon: Fiksasyon %10'luk glasiyel asetik asit ile gerçekleştirildi ve böylece DNA'nın jel matrisine difüzyonu engellendi ve tampon gibi istenmeyen kimyasallar jelden uzaklaştırıldı.

2- Jelin Yıkama: Fiksasyon sonrasında asidin ve çözünabilir jel artıklarının uzaklaştırılması için deiyonize su ile yıkandı. Ayrıca, gümüşün klor ile birleşerek koyu renkli çökeltiler oluşturmasını engellemek için gümüş boyama reaksiyonlarının hepsinde kullanılan çözeltiler deiyonize su ile hazırlandı.

3- Gümüş Boyama: Kontrastın ve hassasiyetin artması için 1000 ml %0.3'lük gümüş nitrat çözeltisine 2 ml formaldehit eklenerek 30-40 dakika kadar süre ile çalkalanarak boyama gerçekleştirildi.

4- Hızlı Yıkama: Gümüşün kahverengi çökeltiler oluşturmasını engellemek için 15-20 saniyelik kısa bir yıkama ile gümüş boya jelden uzaklaştırıldı.

5- Görüntüleme: Bu basamakta %3.4'lük sodyum karbonat çözeltisi kullanıldı. Bu developer çözeltisi jelde ani bir pH değişimi meydana getirerek bantların görünür hale gelmesini sağlamaktadır. Ancak, bu muamele sırasında serbest gümüş iyon konsantrasyonunun düşürülmesi gerekmektedir, çünkü bu çözünmeyen gümüş tuzlarının çökmesi sarı kahverengi zemin oluşumuna neden olur ki buda mutasyonların belirlenmesini güçleştirir. Bu nedenle serbest gümüş iyonları ile birleşerek çökecek gümüş tuzlarının oluşumunun engellenmesi için 1000ml'lik sodyum karbonat çözeltisine



1ml sodyumtiyosülfat eklendi, ayrıca kontrastlığı arttırmak amacı ile 0.5ml formaldehid ilave edildi.

**6- Reaksiyonun Durdurulması:** Boyama reaksiyonunun durdurulması pH değişimi ile gerçekleşmektedir. Bunun için en başta fiksatif olarak kullanılan asetik asit çözeltisi kullanıldı.

**7- Son Yıkama:** Jeli asitten arındırmak için deiyonize su ile yıkandı ve Görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat)'nde fotoğrafı çekildi.

Kontrol örneklerin gösterdiği normal bant özelliğinden, farklılık gösteren bantlar mutant olarak değerlendirildi. Farklı bant özelliği gösteren örneklerin, PZR ve SSCP-HDA analizleri tekrarlandıktan sonra halen farklı görüntü mevcut ise bu örneklerle mutasyonun lokalizasyonunu, tipini ve anlamlılığını belirlemek amacıyla DNA dizi analizi yapıldı.

### 3.2.9. DNA Dizi Analizi

Çalışmada enzimatik DNA sentezine dayanan Sanger'in (241) DNA dizi analizi yöntemi kullanıldı. Çalışma farklı bant özelliği gösteren vakaların, ilgili gen bölgeleri için USB (US70170) sekans kiti ve 35SdATP radyoizotopu ile o ekzona özgü primerler kullanılarak sekans reaksiyonu gerçekleştirildi.

1. 500 µl'lik işaretleme tüpüne; 7 µl PZR ürünü, 0.6 µl Ekzonükleaz I ve 0.5 µl S. Alkalen fosfotaz ilave edilerek 37°C'de 15 dak., 80°C'de 15 dak. ve 100°C'de 2 dak. bekletildi.
2. Bekleme süresinde reaksiyon karışımı (2 µl Sekuanaz tamponu, 1 µl dTT, 2 µl (1/5 oranında setreltme yapılan) labelling mixi, 1 µl sekans enzimi, 0.5 µl <sup>35</sup>S, 1 µl dH<sub>2</sub>O] hazırlandı.
3. Ayrıca, 4 yeni 500 µl'lik mikrofüj tüpüne A,C,G,T didioksinükleozid trifosfatlardan herbiri ayrı tüpe olmak üzere, 2.5 µl ilave edildi ve +4°C'de bekletildi.
4. İşaretleme tüpüne, inkübasyon süresi sonunda 2 µl uygun primer ilave edilerek 100°C'de 3 dak., buzlu suda 3 dak., buzda 5-15 dak bekletildi ve oda sıcaklığına alındı (2-5dak.).
5. Reaksiyon karışımı (7.5 µl) işaretleme tüpüne katıldı ve karışım 5 dak. oda ısısında bekletildi.
6. +4°C'de bekletilen ddNTP'ler oda sıcaklığına alındı (2-5 dak). Karışımdan her tüpe (A,C,G,T tüplerine) 3.5'ar µl ilave edildi ve 37°C'de 5-10 dak. bekletildi.
7. Tüplere 4'er µl durdurma solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu.

8. -20°C'de yükleme yapıncaya kadar bekletildi.

Reaksiyon sonrası örneklerden 3.5' ar µl, üre ile hazırlanan akrilamid- bisakrilamid jele yükleme yapılarak 1XTBE tampon ile 1500 V'da 1,5 saat yürütüldü. Whatman kağıdına aktarılarak kurutulan jeller Hypersensitive film kasedi ile Kodak röntgen filmine 3 gün süreyle maruz bırakıldı. Süre sonunda otomatik banyo cihazında banyo edilerek değerlendirildi. Ailesinde kanser hikayesi bulunmayan sağlıklı kontrol bireylere de aynı işlemler yapıldı ve aynı jelde hastalarla birlikte yürütülerek dizileri karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol birey arasında farklılık gösteren bazlar belirlendi. Mutasyonu tespit edilen örneklere sekans işlemi 2. kez tekrar edilerek değerlendirildi.

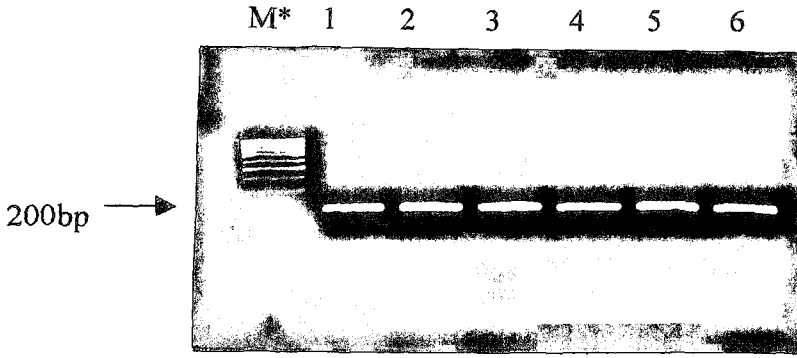
Ayrıca; hastalara ait örneklerin sekans analiz sonuçları, FHIT geninin normal dizisi (OMIM:601153; Gen Bank: NM 002012.1) ile de karşılaştırılarak mutasyonlar konfirme edildi (Şekil-5). Belirlenen mutasyonların amino asit dizisine yansımaları değerlendirildi (Şekil-13).

### **3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme**

Benign ve malign meme hastalarında belirlenen FHIT gen mutasyonları ile ileri evre, aile hikayesi, menaposal durum ve oral kontraseptif kullanımı arasındaki ilişki Ki-kare ve "Fisher Exact" Testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi  $p<0.05$  olarak kabul edildi.

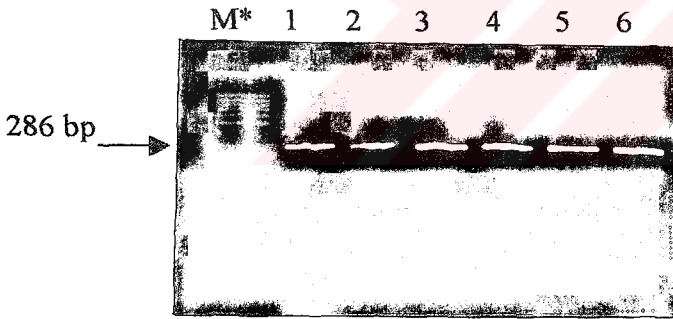
#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda 67 malign ve 16 benign olmak üzere toplam 83 meme hastasına ait doku incelendi. Çalışma grubumuza ait dokuların DNA'ları izole edildikten sonra PZR'nda FHIT geninin kodlanan 5.-9. ekzonlarının amplifikasyonları yapıldı (Şekil 6-10). PZR ürünleri kaliteli olmayan DNA örneklerinin amplifikasyonları tekrar edildi. Kaliteli PZR ürünlerine, öncelikle DNA'nın tek ipliğindeki mutasyonları belirleyen SSCP analizi uygulandı. SSCP analizi hem homozigot hem de heterozigot tip mutantları belirlemektedir. HDA ise, sadece heterozigot tip mutantları belirlemesine rağmen, kontrollü çalışmak amacıyla materyallerimize HDA'da uygulandı (Şekil-11, Şekil-12). SSCP ve HDA sonuçlarına göre farklı bant özelliği gösteren vakalara DNA dizi analizi uygulandı. 83 vakanın 15'inde (%18.1oramnda) değişik tipte mutasyonlar belirlendi. Mutasyon belirlenen 15 vakanın 13'ü (%19.4) malign, 2'si (%12.5) benign vaka idi (Tablo-9). 15 (% 18.1) vakada 4 farklı tipte mutasyon belirlendi (Şekil 13-17). Mutasyonların lokalizasyonlarının 7. ve 9. ekzonlarda yoğunlaştığı görüldü. 7. ekzonda 7 vakada (%46.7), 9. ekzonda 8 vakada (% 53.3) toplam 4 farklı mutasyon gözlemlendi. 7. ekzondaki 2 mutasyondan biri, 88.kodondaki C→T baz değişimi şeklinde olup, aminoasit değişimine neden olmadığı için [Ala(GCC)→Ala(GCT)] nonsense tipte bir mutasyondur. 7. ekzondaki diğer mutasyon ise 90. kodondaki Adenin insersiyonudur. Gln(CAG)→Thr(ACA) aminoasidine dönüşümüne neden olan bu mutasyon çerçeve kayması tiptedir. Bu değişim, nükleotidlerdeki kayma sonucu, 20 kodon sonra stop kodonun gelmesine neden olmaktadır (Şekil-13A). 9.ekzondaki mutasyonlardan birinin yerleşimi 146. kodonda olup, diğer mutasyon ise ekzonun 5' ucundan 17 nükleotid önce yer almaktadır. 146. kodondaki mutasyon Timin delesyonu olup, aminoasit değişimine neden olmamasına rağmen [Phe(TTT)→Phe(TTC)] nükleotidlerde kayma meydana getirdiği için 50 kodon sonra stop kodonu gelmektedir. 9.ekzondaki diğer mutasyon ise 9. ekzonun başlangıcından 17 nükleotid önce yapıya giren Adenin insersiyonu olup, intron bölgesinde yer aldığı için anlamlılığı bilinmemektedir (Şekil-13B). Ayrıca, bu çalışmada belirlenen FHIT mutasyonları ile benign ve malign meme hastalarının ileri evre, aile hikayesi, menaposal durum, oral kontraseptif kullanımı gibi özellikleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildi ve anlamlılık belirlenemedi ( $p>0.05$ ) (Tablo-10).



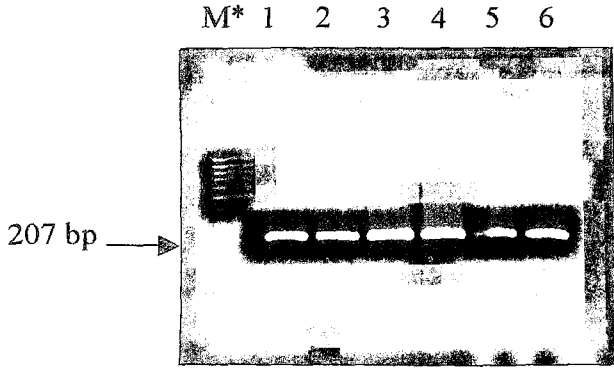
\*M:Marker (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp)

**Şekil-6: FHIT geninin 5. ekzonuna ait PZR ürünleri.**



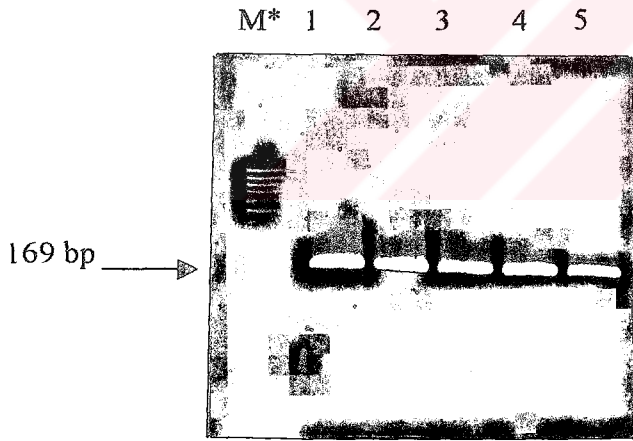
\*M:Marker (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp)

**Şekil-7: FHIT geninin 6. ekzonuna ait PZR ürünleri.**



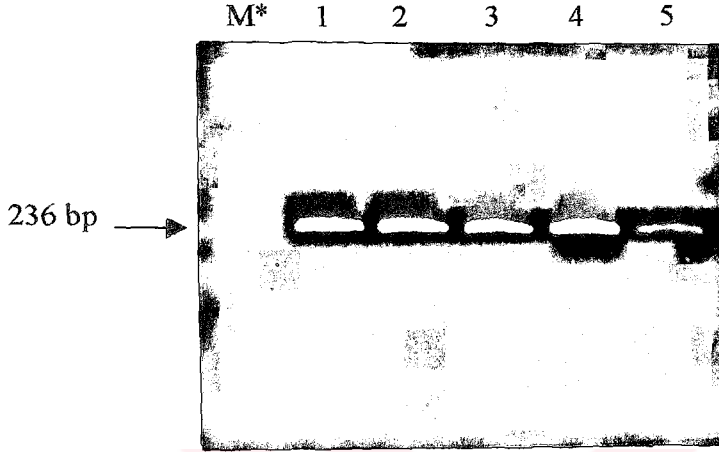
\*M:Marker (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp)

**Şekil-8: FHIT geninin 7. ekzonuna ait PZR ürünleri.**



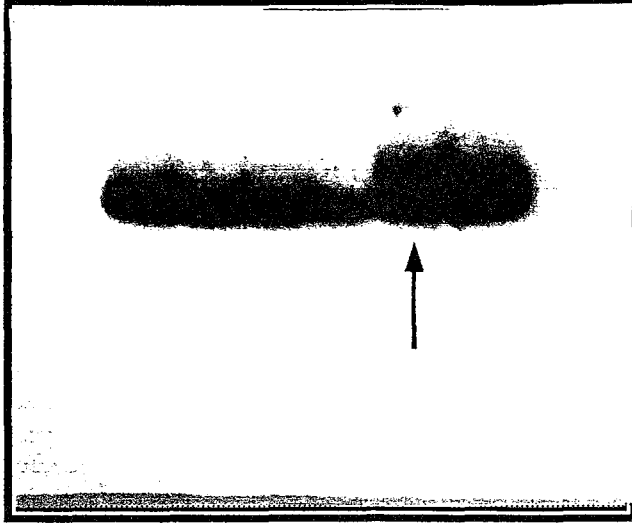
\*M:Marker (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp)

**Şekil-9: FHIT geninin 8. ekzonuna ait PZR ürünleri.**

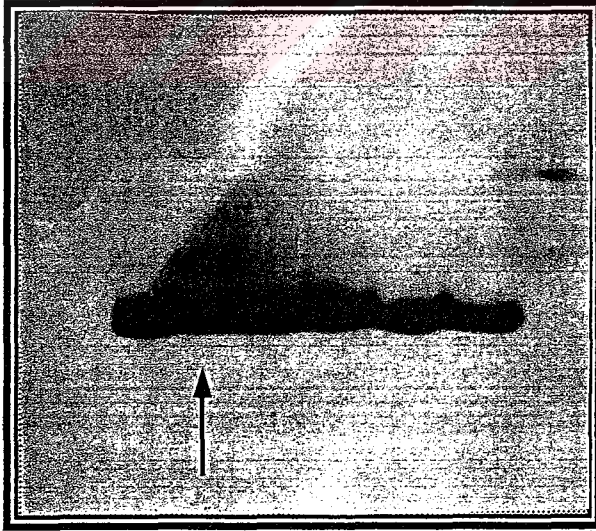


\*M:Marker (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp)

**Şekil-10: FHIT geninin 9. ekzonuna ait PZR ürünleri.**



**Şekil-11: FHIT geninin 7. ekzonuna ait SSCP analiz sonuçlarına göre, normal ve farklı bant özelliği gösteren örnekler (Ok 30M no'lu vakanın farklı bandını işaret etmektedir).**



**Şekil-12: FHIT geninin 9. ekzonuna ait HDA sonuçlarına göre, normal ve farklı bant özelliği gösteren örnekler (Ok 54M no'lu vakanın farklı bandını işaret etmektedir).**

**Tablo- 9: Malign ve benign hastalarda belirlenen mutasyonlar.**

Hasta No	Ekzon	Kodon	Baz değişimi	Aminoasit Değişimi	Mutasyon Etkisi	Mutasyon Sonucu	Pubmed
4M	intron 9	5'uç+17n¼kl.	ins A	-	K	-	-
7M	7	88	C→T	Ala→Ala	S	-	-
12M	intron 9	5'uç+17n¼kl.	ins A	-	K	-	-
30M	7	90	ins A	Gln→Thr	Çk	Stop	-
34M	7	88	C→T	Ala→Ala	S	-	-
36M	7	88	C→T	Ala→Ala	S	-	-
43M	intron 9	5'uç+17n¼kl.	ins A	-	K	-	-
44M	intron 9	5'uç+17n¼kl.	ins A	-	K	-	-
54M	9	146	del T	Phe→Phe	Çk	Stop	-
56M	intron 9	5'uç+17n¼kl.	ins A	-	K	-	-
58M	intron 9	5'uç+17n¼kl.	ins A	-	K	-	-
63M	intron 9	5'uç+17n¼kl.	ins A	-	K	-	-
64M	7	88	C→T	Ala→Ala	S	-	-
6B	7	88	C→T	Ala→Ala	S	-	-
10B	7	88	C→T	Ala→Ala	S	-	-

S:Sessiz, Çk:Çerçeve kayması, K:Kodlanmayan, M:Malign, B:Benign.

**Tablo-10: Benign ve malign meme hastalarında FHIT gen mutasyonlarının ileri evre, aile hikayesi, menaposal durum, oral kontraseptif kullanımı ile ilişkisi.**

		<i>P</i>			
		İleri evre (Evre III-IV)	Aile hikayesi	Menaposal durum	Oral kontraseptif kullanımı
FHIT mutasyon varlığı	Benign Hasta	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Malign Hasta	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05



A)

**EKZON 7**

**Normal Dizi** GAT GGC CCC GAA GCC GGA CAG ACT GTG AAG

↓

**Mutant Dizi** GAT GGC CCC GAA GCT GGA CAG ACT GTG AAG  
84 85 86 87 88 89 90 91 92 93

**EKZON 7**

**Normal Dizi** GAT GGC CCC GAA GCC GGA CAG ACT GTG AAG

↓

**insA**

**Mutant Dizi** GAT GGC CCC GAA GCC GGA ACA GAC TGT GAA GCA CGT TCA CGT CCA  
84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98

TGT TCT TCC CAG GAA GGC TGG AGA CTT TCA CAG GAA TGA  
99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111

**STOP**

B)

**EKZON 9-10**

**Normal Dizi**

CTC CAG AAA CAT GAC AAG GAG GAC TTT CCT GCC TCT TGG AGA TCA GAG GAG GAA ATG  
117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135

GCA GCA GAA GCC GCA GCT CTG CGG GTC TAC TTT CAG TGA CAC AG  
136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150

↓

**delt**

TTC AGT GAC ACA GAT GTT TTT CAG ATC  
146 147 148 149 150 151 152 153 154

CTG AAT TCC AGC AAA AGA GCT ATT GCC AAC CAG TTT GAA GAC CGC CCC CCC GCC TCT  
155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173

CCC CAA GAG GAA CTG AAT CAG CAT GAA AAT GCA GTT TCT TCA TCT CAC CAT CCT GTA  
174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192

TTC TTC AAC CAG TGA  
193 194 195 196 197

**STOP**

47 KODON ÖNCE STOP KODON OLUŞTU.

**EKZON 9 (5'uç+17 insA)**

**İleri primer**

tactggcctctaatttgcaaattttggttcag tctccccag cccccgaaa tttggttcag

↓

**insA**

gagatcccaa gggcccatga aagagcctct tcc ttttttt ttctccaaag **CTCCAGAAAC**

**ATGACAAGGA** GGACTTTCCT GCCTCTTGGA GATCAGAGGA GGAAATGGCA GCAGAAGCCG

CAGCTCTGCG GGTCTACTTT CAGTGACACA Ggtaaagact gcatttctgc att

**Geri primer**

**Şekil-13: A) 7. ve B) 9. ekzonlarda belirlenen mutasyonların aminoasit dizilerine yansımaları ve sonuçları.**

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen ve kliniği iyi bilinen malignitelere (246). Bu malignitede genetik değişikliklerin kliniğe yansımalarının önemli olduğu düşünülmesine rağmen, karsinogenezin çeşitli evrelerindeki tümörlerin davranışındaki genetik değişiklikler çok az bilinmektedir. Son yıllarda yapılan sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalarla kanserin genetik temelleri aydınlatılmaya başlanmış ve kanserin genetik bir hastalık olduğu sonucuna varılmıştır. Gerek Cecener ve ark.'nın (178) ve gerek ise Pazz-y-Mino ve ark.'nın (247) yaptığı çalışmada meme kanserli hasta ve yakınlarında, kontrol grubu sağlıklı bireylere göre frajil bölge ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. Böylece bu kişilerin meme kanserine genetik eğilimleri olduğu belirtilmiştir (178, 247). Meme kanserli hastalarda sitogenetik ve LOH analizi ile 3. kromozomun kısa kolunda belirlenen delesyonların özellikle Fra(3)(p14) bölgesinde anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir (5, 183, 185, 248). 1996 yılında Sozzi ve ark. (1) tarafından akciğer kanserlerinde gerçekleştirilen moleküler genetik bir çalışmada 3p14.2 bölgesinde FHIT adı verilen karsinojenlere hassas bir tümör supressör genin mevcudiyeti ve bu genin mutasyonları belirlenmiştir (1). Daha sonra bu konuda gerçekleştirilen çalışmalarda meme, baş-boyun, gastrik, renal, servikal, endometrium ve pankreas kanserlerinde farklı oranlarda aynı gendeki değişimler çeşitli analizler ile gösterilmiştir (107, 169, 172, 191, 245, 249, 250, 251). Çok az çalışmada, benzer değişimler benign proliferatif meme hastalıklarında çalışılmıştır (4-5, 184, 192).

Bu çalışma, FHIT geninin kodlanan bölgelerinde nükleotid düzeyinde değişimleri araştırmaya olanak sağlamıştır. Bu amaçla, malign ve benign meme hastalarında FHIT gen mutasyonları SSCP ve HDA analizleri ile tarandı. 300 bç'lik bir DNA fragmanında % 90-95 güvenilirliğe sahip HDA analizi ile güvenilirliği % 85-90 olan SSCP yöntemi birlikte kullanılarak değerlendirme yapıldı (235, 236). Farklı bant özelliği gösteren örneklerde analizler, ikinci kez tekrar edildi. Böylelikle güvenilirlikteki % 5-10'luk sapma oranı en aza indirilmeye çalışıldı.

Çalışmamızda FHIT geninin kodlanan 5 ekzonu (5-9) 16'sı benign ve 67'si malign olmak üzere toplam 83 vakada tarandı. HDA ve SSCP analizleri sonucunda farklı bant özelliği gösteren vakalara DNA dizi analizi uygulandı ve 83 vakanın 15'inde (%18.1 oranında) farklı tipte mutasyonlar belirlendi.

Literatürde; meme kanserli hastalarda LOH analizi ile FHIT geninin inaktivasyonu, bu konuda çalışan araştırmacılar tarafından %20-75 oranında belirlenmiştir (107, 169, 172,

191, 192, 194, 245, 249-251,). Campiglio M ve ark. (193), meme kanserli hastaların hem normal, hemde kanserli meme dokusunda FHIT geninin transkriptlerini RT-PZR yöntemi ile çalışmışlar ve her iki dokuda da LOH analizi ile %31 oranında FHIT transkriptlerinin azaldığını belirlemişlerdir. Ahmadian ve ark. (252) ise, primer meme kanserli hastalarda (6/16) %37 ve DCIS (duktal karsinoma insutu)'lu hastalarda (3/6) %50 oranında LOH kaybını belirlemişlerdir. FHIT geninde LOH belirlenen 5 primer invazif kanserin ve invazyonu olmayan bir DCIS'li hastada 6 normal epitel ve 8 intraduktal hiperplazi gösteren bölgelerden örnekler alınmış ve normallerin hiçbirinde LOH belirlenmez iken, intraduktal hiperplazi olan örneklerde (2/8) %25 oranında belirlenmiştir. Cavalli LR ve ark. (4), 4'ü BRCA1, 1'i BRCA2 taşıyıcısı olan meme kanserli 5 hastadan alınan 105 benign dokunun 59'unda (%56) FHIT geninde LOH belirlemişlerdir. Panagopoulos ve ark.'nın çalışmasında (184) ise, transkripsiyon analizi ile incelenen anormal FHIT transkriptleri meme karsinomalarının %30'unda belirlenmiştir. 3 benign atipili hiperplazili hastada da FHIT geninin homozigot delesyonları belirlenmiştir (184).

FHIT genindeki değişimler; bugüne kadar yapılan bu çalışmada içinde bulunduğu sınırlı sayıdaki çalışmada, çeşitli kanserlerde DNA dizi analizini kullanarak baz düzeyinde değerlendirilmiştir. Kwun M Fong ve ark. (253), 102 primer küçük hücre dışı akciğer kanserli hastada FHIT gen mutasyonlarını PZR-SSCP, DNA dizi analizi ile araştırmışlar ve %3.92 oranında sekans alterasyonları belirlemişlerdir. Bu alterasyonlar ekzon 8'in başlangıcında 13bp'lik delesyon (642-654. nükl) ve tek nükleotidlik polimorfizmler; nt524 GAA→GAG (Glutamin), nt626 GCC→GCT (Alanin), nt656 CAT→CAC (Histidin) değişimleridir. Gemma A ve ark. (245) ise, 40 gastrik kanserli hastada yaptıkları çalışmada; PZR-SSCP, DNA dizi analizi ile kodon 61'de ACG→ATG (Thr→Met) mutasyonu adenokarsinomali bir hastada (% 2.5 oranında) belirlemişlerdir. Thiagalingam S ve ark. (249) ise; Kolorektal kanserli hücre hatlarında % 9.7 oranında mutasyon belirlemişlerdir. 2 kanser hücre hattında, FHIT geninin 183. kodonunda G→A (Threonine) ve bir hatta ise 294. kodonunda C→T (Histidine) değişimlerini belirlemişlerdir. Yanagisawa K ve ark. (254) ise, 41 akciğer kanserli hücre hattında, FHIT genindeki değişimleri incelemişlerdir. Küçük hücre dışı kanserli hücre hatlarında; %29 oranında heterozigotinin kaybını, SSCP ve DNA dizi analizini kullanarak ise % 9.76 oranında sekans alterasyonları belirlemişlerdir. 2 kanser hücre hattında; kodon 294'de CAT→CAC sessiz nükleotid substitüsyonu ve yine iki farklı kanser hücre hattında Nt 871 del C değişimlerini açıklamışlardır. Kannan K. ve arkadaşları (255); meme tümörlerinde PZR-SSCP ve DNA dizi analizi ile p53 ekzon 5-8, FHIT ekzon 5-9, p16INK4a/p19ARF,

H-ras ekzon 1-2 bölgelerini taramışlardır. Tümörlerin %12'sinde p53 mutasyonu, %8'inde ise FHIT gen mutasyonları belirlenmiştir; p16INK4a/p19ARF ve H-ras mutasyonu belirlenmemiştir. Bu araştırmacılar, FHIT geninde; intron 8 TTCT→TACT mutasyonunun ve kodon 123'de ise GAG→GAA (Glu→Glu) sessiz mutasyonunun belirlendiğini açıklamışlardır. Meme tümörlerinde sekans alterasyonları çalışılan diğer bir çalışma ise, Ahmadian ve ark. tarafından (252) 32 tümör ve 18 normal hücre hattında yapılmıştır. Tümör hücre hatlarında 524 A→G (ekzon 6), 545 G→A (ekzon 6), 626 C→T (ekzon 7) ve 656 T→C (ekzon 8) sessiz polimorfizmlerini %12.5 (4/32) oranında ve 651 G→T (Ekzon 8 Val→Phe) nokta mutasyonunu %3.1 (1/32) oranında belirlemişlerdir.

Rosell R ve ark. (256)'nın meme ve akciğer kanserli hastalar üzerinde gerçekleştirdiği bir çalışmada FHIT, APC ve p16 genlerinde belirlenen polimorfizmlerin, Taxane ve Vinca alkaloidleri gibi kemoterapi ilaçlarına bireysel direncin açıklanmasında yardımcı olabileceği ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada ise; malign hastalarda %19.4 (13/67), benign vakalarda ise %12.5 (2/16) oranında mutasyonlar belirlendi. 7 vakada 7. ekzonda, 8 vakada 9. ekzonda toplam 4 farklı mutasyon belirlendi. 7. ekzondaki 2 mutasyondan biri, 88.kodondaki C→T baz değişimi şeklinde olup, aminoasit değişimine neden olmadığı için (Ala→Ala) sessiz tipte bir mutasyondur. 7. ekzonun 88. kodonundaki bu mutasyon 4 malign (% 5.97) 2 benign dokuda (%12.5) belirlenmiştir. Bizden önce FHIT gen mutasyonlarının analizi ile gerçekleştirilen dört çalışmada (249, 252-254) da bu tip sessiz mutasyonlar gösterilmiştir. Bilindiği gibi FHIT geni evrim boyunca korunmuş olan ve canlı oluşumu için olmazsa olmaz özellik gösteren bir gendir. Gerek akciğer, gerekse meme tümörlerinde bu gende meydana gelen sessiz mutasyonların aminoasit yapısında değişime yol açmaması sebebi ile bu tip mutasyonların bir çeşit koruma mekanizması sağladıkları düşünülebilir. 7. ekzondaki diğer mutasyon ise 90. kodondaki Adenin insersiyonudur. Gln(CAG)→Thr(ACA) aminoasidine dönüşümüne neden olan bu mutasyon çerçeve kayması tiptedir. Bu değişim ile meydana gelen nükleotidlerdeki kayma sonucu, 20 kodon sonra stop kodonun gelmesine neden olmaktadır. 9.ekzondaki mutasyonlardan birinin lokalizasyonu 146. kodonda olup, diğer mutasyon ise ekzonun 5' ucundan 17 nükleotid önce lokalizedir. 146. kodondaki mutasyon Timin delesyonu olup, aminoasit değişimine neden olmamasına rağmen (Phe→Phe) nükleotidlerde kayma meydana getirdiği için 50 kodon sonra stop kodonu gelmektedir. Ayrıca, burada şu da belirtilebilir ki bugüne kadar meme kanserinde FHIT geni ile gerçekleştirilen çalışmalar arasında mevcut çalışmamızda ilk kez çerçeve

kayması tip mutasyonlar belirlenmiştir. Deng FY ve ark. (257) 28 nazofaringeal karsinomali ve 16 normal nazofaringeal epitel örneklerinde FHIT gen mutasyonlarını taramışlar ve FHIT geninde literatürde ilk kez çerçeve kayması tipte mutasyon belirlemişlerdir. Belirlenen çerçeve kayması mutasyon 5. ekzonda belirlenmiştir. Zhao XR ve ark. (258), Peutz-Jeghers sendromlu 15 hastada FHIT gen mutasyonlarını taramışlar ve bir hastada 62. kodonda (6. ekzon) prematür protein oluşumuna neden olan, çerçeve kayması mutasyon etkisine sahip Guanin insersiyonu belirlemişlerdir. Bu mutasyon literatürde 2. belirlenen çerçeve kayması tip mutasyondur. Bu sendromdan etkilenen hastaların %35'inde meme, pankreas, serviks, tiroid ve mesane tümörleri gelişebilmektedir.

9.ekzondaki diğer değişim ise 9. ekzonun başlangıcından 17 nükleotid önce yapıya giren Adenin insersiyonudur. Bu çalışmada belirlenen mutasyonlar daha önce literatürde belirlenmemiş yeni mutasyonlardır. Ayrıca, mevcut çalışma Türk toplumunda yapılan ilk çalışmadır.

FHIT geninin fonksiyonunun kaybı, hücre büyümesinin kontrolünde ciddi sorunlara yol açarak kanser gelişimine neden olmaktadır. FHIT geni inaktivasyonu kanser gelişiminin farklı evrelerinde meydana gelebilir. Erken dönemde prekanseröz lezyonlarda veya kanserin geç evrelerinde etkili olabilmektedir. Önceki çalışmalarda, akciğer, serviks ve özefagus tümörlerinde kanser gelişiminin çok erken dönemlerinde prekanseröz lezyonlarda dahi FHIT geninin inaktivasyonu belirlenirken (173, 186, 198), meme karsinomlarında geç evrelerde inaktivasyon belirlenmiştir (193, 194). Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar 3p delesyonlarının meme karsinogenezinde erken dönemde meydana geldiğini göstermiş bulunmaktadır (4, 5, 184,192). Hayashi ve arkadaşları 61 primer meme kanserli hastayı inceleyerek FHIT transkriptlerindeki anomalilerini değerlendirdiklerinde tümörün erken dönemde oluşmasını sağladığı yönünde bulgular elde etmişlerdir (108). Özellikle 2004 yılında yayınlanan son makalelerden birinde, meme hastalarında meme glandlarında meydana gelen morfolojik değişikliklerden daha önce FHIT geninin kaybının oluştuğu, bu durumun özellikle BRCA mutasyon taşıyıcılarında erken genetik kanıt olabileceği vurgulanmaktadır (4). Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre benign ve malign hastalarda benzer oranda (%19.4 ve %12.5) mutasyon belirlenmesi son yıllarda yapılan çalışmaları destekler nitelikte görünmesine rağmen, benign vakalarda belirlenen mutasyonların sessiz tipte olması bu ilişkinin açıklanmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, benign vaka sayısının arttırılarak ilişkinin ileri çalışmalarla değerlendirilmesi gerekebilir.

Literatürde FHIT genindeki değişimlerin aile hikayesi ile ilişkili olduğunu vurgulayan araştırmacılar olduğu gibi (4, 259), ilişkili olmadığını açıklayan araştırmacılar da mevcuttur (108, 260). Bu çalışmada ise, mutasyon belirlenen malign hastaların % 38.5'inde, benign hastaların ise ikisinde de meme kanseri aile öyküsü mevcut idi. Aile hikayesi pozitif mutasyon taşıyan 5 malign vakanın 4'ünde ve 2 benign vakada meme kanseri hikayesi birinci derece akrabalarında idi. Ancak, FHIT gen mutasyonlarının varlığı ve aile hikayesi arasındaki ilişki istatistiki olarak değerlendirildiğinde bir anlamlılık belirlenemedi ( $p>0.05$ ).

Ginestier C ve ark.(261) ve Guler G ve ark. nın (262) immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak gerçekleştirdikleri çalışmalarda, FHIT gen alterasyonlarının meme kanserli hastalarda ileri evre ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu konuda çalışan diğer araştırmacıların hiçbirisi, bu ilişkinin anlamlılığını istatistiksel olarak gösterememişlerdir(261, 262). Bu çalışmada ise FHIT gen mutasyonları ve ileri evre ilişkisi incelendiğinde, mutasyon belirlenen 13 malign vakadan sadece ikisinin evre 3 olduğu, diğer vakaların evrelerinin 1 ve 2 olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla; bulgular FHIT gen mutasyonlarının varlığı ile ileri evre arasında ilişkinin olmadığını göstermektedir. Ayrıca, çerçeve kayma mutasyon etkisi ile premature protein oluşumuna neden olan 7. ekzon 90. kodon insA mutasyonuna sahip 30. vaka evre IIA'dır. Yine aynı etkiye sahip, 9. ekzon 146. kodon delT mutasyonunu taşıyan 54. vaka ise evre IIB'dir. Bu iki patojenik mutasyona sahip vakaların ileri evreli olmaması da FHIT gen mutasyonları ve ileri evre ilişkisini desteklememektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız Türk populasyonundaki meme hastalarında FHIT gen mutasyonlarının 7. ve 9. ekzon bölgelerinde yoğunlaştığını göstermektedir. Bulunan sekans değişimleri daha önce belirlenmemiş değişimlerdir. Ayrıca, bu çalışmada meme kanserinde 2 adet çerçeve kayması tipte mutasyon ilk kez belirlenmiştir. Ancak, FHIT mutasyonları ile prognoz arasında bir ilişki belirlenememiştir. Bu yüzden, meme hastalarında erken evre ve kötü prognozu değerlendirmek için, FHIT gen mutasyonlarının yanında p53, Rb1, BRCA1, BRCA2 gen mutasyonlarının ve HER2, c-myc, ras, ER gibi onkogen ekspresyonlarının birlikte değerlendirildiği ileri çalışmalar planlanmalıdır.

## 6. KAYNAKLAR

1. SOZZI G, VERONESE M, BEGRINI M, BAFFA R, COTTICELLI M, INOUE H, TORNIELLI S, PILOTTI S, DE GREGORI L, PASTORINO , PIEROTTI M, OHTA M, HUEBNER K, CROCE C. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, 85: 17-26, 1996.
2. TSENG JE, KEMP BL, KHURI FR, KURIE JM, LEE JS, ZHOU X, LIU D, HONG WK, MAO L. Loss of Fhit is frequent in stage I non-small cell lung cancer and in the lungs of chronic smokers. *Cancer Research*, Oct 1;59(19):4798-803, 1999.
3. MICHAEL D, BEER DG, WILKE CW, MILLER DE, GLOVER TW. Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas. *Oncogene*, Oct 2;15(14):1653-9, 1997.
4. CAVALLI LR, SINGH B, ISAACS C, DICKSON RB, HADDAD BR. Loss of heterozygosity in normal breast epithelial tissue and benign breast lesions in BRCA1/BRCA2 carriers with breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 149(1): 38-43, 2004.
5. PANDIS N, JIN Y, GORUNOVA L, PETERSSON C, BARDI G, IDVALL I, JOHANSSON B, INGVAR C, MANDAHL N, MITELMAN F. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of 8 karyotypic subgroups. *Genes Chromosome & Cancer*, 12:173-185, 1995.
6. YURA Y, MANDAI M, KONISHI I, HAMID AA, TSURUTA Y, KUSAKARI T. Loss of Fhit protein expression in high-grade and advanced stage endometrial carcinomas. *Anticancer Research*, 23(3C):2837-43, 2003.
7. HUANG LW, CHAO SL, CHEN TJ. Reduced Fhit expression in cervical carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecologic Oncology*, Aug;90(2):331-7, 2003.
8. CONNOLLY DC, GREENSPAN DL, WU R, REN X, DUNN RL, SHAH KV, JOHN RW, BOSCH FX, MUNOZ N, CHO KR. Loss of fhit expression in invasive cervical carcinomas and intraepithelial lesions associated with invasive disease. *Clinical Cancer Research*, Sep;6(9):3505-10, 2000.
9. GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDEN S. *Cancer Statistics. A Cancer Journal of Clinicians*, 50: 7-33, 2000.

10. BORING CC, SQUIRES TS, TONG T. Cancer statistics, A Cancer Journal of Clinicians, 43: 4-26, 1993.
11. SILVENBERG E, LUBERA J. Cancer statistics. A Cancer Journal of Clinicians, 37: 19, 1987.
12. BİLGEL N. Meme kanserinin Epidemiyolojisi. Editörler: ENGİN K ve ÇETİNTAŞ S. Meme kanserleri, Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, sayfa 69-73, 2005.
13. VERONESI U, GOLDBIRSCHE A, YAMOLD J. Breast Cancer. In PECKHAM M, PINEDO H, VERONESI U (eds) : Oxford Textbook of Oncology, Oxford, University Press, pp: 1243-1289, 1995.
14. HOOVER R. Breast cancer: geographic, migrant, and time-trend patterns In: Former JSP, ed. Accomplishments in cancer research. New York: Lippincott-Rayen, 1996.
15. MUIR C, WATERHOUSE J, MACK T (eds). Cancer incidence in five continents, vol 5 IACR Scientific Publication No 88. Lyon International Agency for Cancer Research, 1987.
16. SEER J. Cancer statistics review 1973 - 1990. In MILLER B, GLOECKLER R, HANKEY B. (eds:) Breast. Bethesda, NIH publication, 1992.
17. FREEMAN HP. Cancer in the socio-economically disadvantaged. A Cancer Journal of Clinicians, 39: 267-287, 1987.
18. BUELL I. Changing incidence of breast cancer in Japanese American women. Journal of National Cancer Institute, 51: 479-487, 1974.
19. LOCKE FB, KING H. Cancer mortality risk among Japanese in the United States. Journal of National Cancer Institute, 64:1149 - 1156, 1980.
20. STEINITZ R. Cancer risks in immigrant populations in Israel. In AOKI K (ed) : Proceedings of the First UOICL Conference on Cancer Prevention in Developing Countries. Nagoya, Univer. of Nagoya Press, pp 363-381, 1982.
21. National Center for Health Statistics: Health, United States, 1991, Hyattsville MD, Public Health Service, 1992.
22. HAENZEL W, KURIHARA M . Studies of Japanese migrants. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. Journal National Cancer Institute, 40: 43-68, 1968.
23. STANLEY K, STJERNESWARD I, KORALTCHONK V. Cancer of the stomach, lung and breast. Mortality trends and strategies. Cancer, 41:107-126, 1988.
24. TANNOCK IF, HILL RP (eds) : The Basic Science of Oncology. 2nd ed. New York, Mc Graw - Hill, 1992.



25. PIKE MC, HENDERSON BE, CASAGRANDE JT, ROSARIO I, GRAY GE. Oral contraceptives use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *British Journal of Cancer*, 43: 72-76, 1981.
26. MACMAHON B, TRICHOPOULOS D, BROWN J, ANDERSEN AP, AOKI K, COLE P, DEWAARD F, KAURANIEMI T, MORGAN RW, PURDE M, RAVNIHAR B, STROMBY N, WESTLUND K, WOO NC. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer. *International Journal of Cancer*, 29: 13-20, 1982.
27. HENDERSON BE, PICK MC, CASAGRANDE JT. Breast cancer and the estrogen window hypothesis. *Lancet*, 2: 263 - 267, 1981.
28. APTER D, VINKO R. Early menarche, a risk factor for breast cancer, indicates early onset of ovulatory cycles. *Journal of Clinical Endocrine Metabolism*, 57: 82-87, 1983.
29. TRICHOPOULOS D, MAC MAHON B, COLE P. The menopause and breast cancer risk. *Journal of National Cancer Institute*, 48: 605-609, 1972.
30. MACMAHON B, COLE P, LIN TM, LOWE CR, MIRRA AP, RAVNIHAR B, SALBER EJ, VALAORAS VG, YUASA S. Age at first birth and cancer of the breast. A summary of an international study *Bull World Health Organisation*, 43: 203 - 212, 1970.
31. MUSEY VC, COLLINS DC, MUSEY PI, MARTINO-SALTZMAN D, PREEDY JR. Long - term effect of a first pregnancy on the secretion of prolactin. *New England Journal of Medicine*, 316: 229-232, 1987.
32. NEWCOMB PA, STORER BE, LONGNECKER MP, MITTENDORF R, GREENBERG ER, CLAPP RW, BURKE KP, WILLETT WC, MACMAHON B. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 330: 81-87, 1994.
33. DALAY N. Meme Kanserinin Biyolojik Özellikleri. Editörler: TOPUZ E, AYDINER A ve DİNÇER M. *Meme Kanseri, Nobel Tıp Kitabevleri*, sayfa 34-71, 2003.
34. WELSCH CV. Host factors affecting the growth of carcinogen induced rat mammary carcinomas: A review and tribute to Charles Brenton Huggins. *Cancer Research*, 45: 3415-3443, 1985.
35. ROBINSON SP, JORDAN VC. Reversal of antitumor effects of tamoxifen by progesterone in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Research*, 47: 5386-5390, 1987.

36. DEMİRAY M. Meme kanserinin Epidemiyolojisi. Editörler: ENGİN K ve ÇETİNTAŞ S. Meme kanserleri, Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, sayfa 75-79, 2005.
37. DICKSON RB, LIPPMAN ME. Molecular Basis of Breast Cancer. In Molecular Basis of Cancer, MENDELSON J, HOWLEY PM, ISRAEL MA, LIOLTA LA (eds), Philadelphia, Saunders, p 313-342, 2001.
38. DICKSON R, LIPPMAN ME . Growth factors in breast cancer. Endocrine Reviews, 16: 559-589, 1995.
39. WATSON PH, PON RT, SHIU RPC. Inhibition of c-myc expression by phosphorothionate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer. Cancer Research, 51: 3996-4009, 1991.
40. LE ROY X, ESCOT C, BROUILLET JP, THEILLET C, MAUDELONDE T, SIMONY-LAFONTAINE J, PUJOL H, ROCHEFORT H. Decrease of cerb B2 and c-myc RNA levels in tamoxifen-treated breast cancer. Oncogene, 6: 431-437, 1991.
41. LUTTRELL DK, LEE A, LANSING TJ, CROSBY RM, JUNG KD, WILLARD D, LUTHER M, RODRIGUEZ M, BERMAN J, GILMER TM. Involvement of pp60c-src with two major signaling pathways in human breast cancer. Proceeding of the National Academy of Science of the USA, 91: 83-87, 1994.
42. MUSGROVE EA, SARCEVIC B, SUTHERLAND RL. Inducible expression of cyclin D1 in T-47D human breast cancer cells is sufficient for Cdk2 activation and pRB hyperphosphorylation. Journal of Cell Biochemistry, Mar 1;60(3):363-78, 1996.
43. DICKSON C, FANTL A, LAMMIE S. Growth factor and cell cycle genes implicated in mammary tumorigenesis. Proceedings of the Cold Spring Harbor Meeting on Genetics and Molecular Biology of Breast Cancer, page 112, 1992.
44. FANTL V, RICHARDS MA, SMITH R, LAMMIE GA, JOHNSTONE G, ALLEN D, GREGORY W, PETERS G, DICKSON C, BARNES DM. Gene amplification on chromosome band 11q13 and estrogen receptor status in breast cancer. European Journal of Cancer, 26: 423-429, 1990.
45. BORG A, SIGURDSSON H, CLARK GM, FERNO M, FUQUA SA, OLSSON H, KILLANDER D, MCGURIE WL. Association of INT/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. British Journal of Cancer, 63: 136-142, 1991.
46. HENRY JA, HENNESSY C, LEVETT DL, LENNARD TW, WESTLEY BR, MAY FE. Int-2 amplification in breast cancer: association with decreased survival and

- relationship to amplification of c-erb B2 and myc. *International Journal of Cancer*, 53: 774-780, 1993.
47. CATZAVELOS C, BHATTACHARYA N, UNG YC, WILSON JA, RONCARI L, SANDHU C, SHAW P, YEGER H, MORAVA-PROTZNER I, KAPUSTA L, FRANSSEN E, PRITCHARD KI, SLINGERLAND JM. Decreased levels of the cell cycle inhibitor p27Kip1 protein. Prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Medicine*, 3: 227-230, 1997.
48. HUNTER T. Signaling-2000 and beyond. *Cell*, 100: 113-127, 2000.
49. PERRIMON N, PERKINS LA. There must be 50 ways to rule the signal: the case of the Drosophila EGF receptor. *Cell*, 89: 13-16, 1997.
50. KLAPPER LN, GLATHE S, VAISMAN N, HYNES NE, ANDREWS GC, SELA M, YARDEN Y. The ErbB2/HER-2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 96 4995-5000, 1999.
51. BUTTA A, MACLENNAN K, FLANDERS KC, SACKS NP, SMITH I, MCKINNA A, DOWSETT M, WAKEFIELD LM, SPORN MB, BAUM M. Induction of transforming growth factor beta 1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer Research*, 52: 4261-4264, 1992.
52. WANG LM, KUO A, ALIMANDI M, VERI MC, LEE CC, KAPOOR V, ELLMORE N, CHEN XH, PIERCE JH. ErbB2 expression increases the spectrum and pathway of ligand mediated signal transduction through ErbB4. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 95; 6809-6814, 1998.
53. LINGHAM RB, STANCEL GM, LOOSE-MITCHELL DS. Estrogen regulation of epidermal growth factor receptor messenger ribonucleic acid. *Molecular Endocrinology*, 2: 230235, 1988.
54. HUNG MC, SCHECHTER AL, CHEVRAY PY, STERN DF, WEINBERG RA. Molecular cloning of the neu gene: absence of gross structural alteration in oncogenic alleles. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 83: 261-264, 1986.
55. HAUGEN DR, AKSLEN LA, VARHAUG JE, LILLEHAUG JR. Expression of c-erb B3 and c-erb B4 proteins in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Research*, 56: 1184-1188, 1996.

56. SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULLRICH A, MCGUIRE WL. Human breast cancer: Correlation of relaps and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235 177-182, 1987.
57. LEE EY, CIBULL ML, STRODEL WE, HALEY JV. Expression of HER-2/neu oncoprotein and epidermal growth factor receptor and prognosis in gastric carcinoma. *Archieve Pathology Laboratory Medicine*, 118: 235-239, 1994.
58. GAMMON MD, HIBSHOSH H, TERRY MB, BOSE S, SCHOENBERG JB, BRINTON LA, BERNSTEIN JL, THOMPSON WD. Oral contraceptive use and other risk factors in relation to HER-2/neu overexpression in breast cancer among young women. *Cancer Epidemiology Biomarker Prevention*, 8:413-419, 1999.
59. GUY C, SCHALLER M, PARSONS T. Induction of mammary tumors in transgenic mice expressing the inactivated c-neu oncogene. *Proceedings of the Keystone Symposium on Breast and Prostate Cancer. Lake Tahoe*, page 45, 1992.
60. VAN DE VIJVER MJ, PETERSE JL, MOOI WJ, WISMAN P, LOMANS J, DALESIO O, NUSSE R. Neuprotein overexpression in breast cancer: association with comedo type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 319: 1239-1245, 1988.
61. QUIAN XL, DECKER SJ, GREENE MI. p185-c-neu and epidermal growth factor receptor associate into a structure composed of activated kinases. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 89: 1330-1334, 1992.
62. HARRIS AC, NICHOLSON S, SAINSBURG JR. Epidermal growth factor receptors in breast cancer association with early relapse and death, poor response to hormones and interaction with neu. *Journal of Steroid Biochemistry*, 34: 123-131, 1989.
63. SIEGEL PM, RYAN ED, CARDIFF RD, MULLER WJ. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *Journal of European Molecular Biology Organisation*, 18: 2149-2164, 1999.
64. CARPENTER G. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *Journal of Cell Biology*, 146: 697-702, 1999.
65. ZWICK E, HACKEL PO, PRENZEL N, ULLRICH A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signaling systems. *Trends Pharmacology Science*, 20: 408-412, 1999.
66. HYNES NE, STERN DF. The biology of erbB2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochemical Acta*, 1198: 165-184, 1994.

67. XIE Y, LI K, HUNG MC. Tyrosine phosphorylation of Shc proteins and formation of Shc/Grb2 complex correlate to the transformation of NIH3T3 cells mediated by the point mutation activate neu. *Oncogene*, 10: 2409-2413, 1995.
68. XIE Y, PENDERGAST AM, HUNG MC. Dominant negative mutants of GRb2 induce reversal of the transformed phenotypes caused by the point mutation-activated rat HER-2/neu. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 30717-30724, 1995.
69. DARENDELİLER E ve AĞAOĞLU F. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi. Editörler: TOPUZ E, AYDINER A ve DİNÇER M. Meme Kanseri, Nobel Tıp Kitabevleri, sayfa 13-33, 2003.
70. CHIAPPETTA C, KIRKLAND IL, LOOSE-MITCHELL DS, MURTHY L, STANCEL GM. Estrogen regulates expression of the jun family of proto-oncogenes in the uterus. *Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology*, 41: 113-123, 1992.
71. EVAN GI, WYLLIE AH, GILBERT CS, LITTLEWOOD TD, LAND H, BROOKS M, WATERS CM, PENN LZ, HANCOCK DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69: 120, 1992.
72. BERNS EMJ, KLIJN JGM, VAN PULTEN WLJ. C-myc amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Research*, 52: 1107-1113, 1992.
73. PIETILAINEN T, LIPPONEN P, AALTOMAA S, ESKELINEN M, KOSMA VM, SYRJANEN K. Expression of c-myc proteins in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. *Anticancer Research*, 15: 959-964, 1995.
74. OTTESTAD L, ANDERSEN TL, NESLAND IM. Amplification of c-erb B2, int-2, and c-myc genes in node negative breast carcinomas: Relationship to prognosis. *Acta Oncologica*, 32: 289-294, 1993.
75. ROCHLITZ CF, SCOTT GK, DODSON JM, LIU E, DOLLBAUM C, SMITH HS, BENZ CC. Incidence of activating ras oncogene mutations associated with primary and metastatic breast cancer. *Cancer Research*, 49: 357-360, 1989.
76. BLAND KI, KONSTADOULAKIS MNI, VEZERIDIS MP, WANEBO HJ. Oncogene protein coexpression: Value of H-ras, cmyc, c-fos and p53 as prognostic discriminants for breast carcinoma. *Annual Surgery*, 221: 706-718, 1995.
77. LUTTRELL DK, HAUSDORFF WP, MOYERS JE, GILMER TM, PARSONS SJ, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. Overexpression of pp60c-src is associated with altered regulation of adenylyclase. *Cell Signal*, Sep;4(5):531-41, 1992.

78. OTTENHOFF-KALFF AE, RIJKSEN C, VAN BUERDEN EA, HENNIPMAN A, MICHELS AA, STAAL GE. Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer. Involvement of the c-src oncogene product. *Cancer Research*, 52: 4773-4778, 1992.
79. HENNIPMAN A, VAN OIRSCHOT BA, SMITS J, RIJKSEN G, STAAL GE. Tyrosine kinase activity in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue. *Cancer Research*, 49: 516-521, 1989.
80. MOTOKURA T, BLOOM T, KIM HG, JUPPNER H, RUDERMAN JV, KRONENBERG HM, ARNOLD A. A novel cyclin encoded by a bcl-linked candidate oncogene. *Nature*, 350: 512-515, 1991.
81. SCHERR CJ. C1 phase progression cycling. *Cell*, 79 551-555, 1994.
82. SICINSKI P, DONAHER JL, GENG Y, PARKER SB, GARDNER H, PARK MY, ROBKER RL, RICHARDS JS, MCGINNIS LK, BIGGERS JD, EPPIG JJ, BRONSON RT, ELLEDGE SJ, WEINBERG RA. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*, Dec 5;384(6608):470-4, 1996.
83. SHERR CJ, ROBERTS JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of C 1-phase progression. *Genes and Development*, 13: 1501-1512, 1999.
84. JARES P, REY MJ, FERNANDEZ PL, CAMPO E, NADAL A, MUNOZ M, MALLOFRE C, MUNTANE J, NAYACH I, ESTAPE J, CARDESA A. Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumor proliferation and estrogen receptor status. *Journal of Pathology*, 182: 160-166, 1997.
85. BATES S, PETERS C . Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene. *Cancer Biology*, 6: 73-82, 1995.
86. JENNINGS BA, HADFIELD JE, WORSLEY SD, GIRLING A, WILLIS G. A differential PCR assay for the detection of c-erbB 2 amplification used in a prospective study of breast cancer. *Molecular Pathology*, Oct;50(5):254-6, 1997.
87. BARTKOVA J, LUKAS J, MULLER H. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *International Journal of Cancer*, 57: 553-561, 1994.
88. BUCKLEY MF, SWEENEY KJ, HAMILTON JA, SINI RL, MANNING DL, NICHOLSON RI, DEFAZIO A, WATTS CK, MUSGROVE EA, SUTHERLAND RL. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, 8: 2127-2133, 1993.
89. CILLET C, SMITH R. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Research*, 54:1812-1817, 1994.

90. HARARI D, YARDEN Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*, 19: 6102-6114, 2000.
91. BRATTAIN MG, KO Y, BANERJI SS, WU G, WILLSON JK. Defects of TGFbeta receptor signaling in mammary cell tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, 1: 365-372, 1996.
92. SACEDA M, KNABBE C, DICKSON RB, LIPPMAN ME, BRONZERT D, LINDSEY RK, GOTTARDIS MM, MARTIN MB. Posttranscriptional destabilization of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells by 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 17809-17814, 1991.
93. TORREGROSA D, BOLUFER I, LLUCH A, LOPEZ JA, BARRAGAN E, RUIZ A, GUILLEM V, MUNARRIZ B, GARCIA CONDE J. Prognostic significance of c-erb B2/neu amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clinica Chimica Acta*, 262: 99-119, 1997.
94. BERGMANN CI, HUNG MC, WEINBERG RA. The neu oncogene encode an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*, 319: 226-230, 1986.
95. YAMAMOTO T, IKAWA S, AKIYAMA T, SEMBA K, NOMURA N, MIYAJIMA N, SAITO T, TOYOSHIMA K. Similarity of protein encoded by c-erb B2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*, 319: 230-234, 1986.
96. GUSTERSON BA, GELBER RD, GOLDBIRSCH A, PRICE KN, SAVE-SODERBORGH J, ANBAZHAGAN R, STYLES J, RUDENSTAM CM, GOLOUH R, REED R. Prognostic importance of c-erb B2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 10: 1049-1056, 1992.
97. BERCHUK A, CAMEL A, WHITAKER R. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Research*, 50: 4087-4091, 1990.
98. SAGE R. Tumor suppressor gene: the puzzle and the promise. *Science*, 246:1406-12, 1989.
99. KNUDSON JR. Hereditary cancer, oncogenes and antiancogenes. *Cancer Research*, 45:1437-43, 1985.
100. GOLDGAR DE, EASTON DF, CANNON-ALBRIGHT LA. Systematic population based assessment of cancer risk in first degree relatives of cancer probands. *Journal of the National Cancer Institute*, 86:1600-8, 1994.

101. OFFIT K, BROWN K. Quantitating familial cancer risk a resource for clinical oncologists. *Journal of Clinical Oncology*, 12:1724-36, 1994.
102. KURZROCK R, TALPAZ M. *Molecular Biology in Cancer Medicine*. Martin Dunitz Ltd, UK, chapter 16, pp 98-111, 1996.
103. LEHMAN TA, HAFFTY BG, CARBONE CJ, BISHOP LR, GUMBS AA, KRISHNAN S, SHIELDS PG, MODALI R, TURNER BE. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Research*, 15; 60(4):1062-9,2000.
104. GREENBLATT MS, CHAPPUIS PO, BOND JP, HAMEL N, FOULKES WD. TP53 mutations in breast cancer asociated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Research*, 15;61(10):4092-7, 2001.
105. IAU PT, MACMILLAN RD, BLAMEY RW. Germ line mutations associated with breast cancer susceptibility. *European Journal of Cancer*, 37(3):300-21, 2001.
106. EISINGER F, CHARAFE-JAUFFRET E, JACQUEMIER J, BIRNBAUM D, JULIAN-REYNIER C, SOBOL H. Tamoxifen and breast cancer risk in women harboring a BRCA1 germline mutation: computed efficacy, effectiveness and impact. *International Journal of Oncology*, 18(1 ):5-10, 2001.
107. NEGRINI M, MONACO C, VORECHOUSKY, OHTA M, DRUCK T, BAFFA R, HUEBNER K, CROCE CM. The FHIT gene at 3p14-2 is abnormal in breast cancer. *Cancer Research*, 56:3173-9, 1996.
108. HAYASHI S, TANIMOTO K, HAJIRO-NAKANISHI K, TSUCHIYA E, KUROSUMI M, HIGASHI Y, IMAJ K, SUGA K, AND NAKACHI K. Abnormal FHIT Transcripts in Human Breast Carcinomas: A Clinicopathological and Epidemiological Analysis of 61 Japanese Cases. *Cancer Research*, 57: 1981-85, 1997.
109. YANG Q, KHOURY MJ, RODIRGUWZ C. Family history as a predictor of breast cancer mortality: prospective data from the Cancer Prevention Study II, United States, 1982-1991, *American Journal of Epidemiology*, 147: 652-659,1998.
110. EASTON DF, FORD D, BISHOP DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *American Journal of Human Genetics*, 56: 265-271, 1995.
111. FORD D, EASTON DF. Risks of cancer in BRCA1 mutation carriers. *Lancet*, 343: 692-295, 1994.
112. Breast Cancer Linkage Consortium: Cancer risks in BRCA2 mutatian carriers, *Journal of National Cancer Institue*, 91: 1310-1316, 1999.



113. MORIMATSU M, DONOHO G, HASTY P. Cells deleted for BRCA2 COOH terminus exhibit hypersensitivity to gamma radiation and premature senescence. *Cancer Research*, 58: 3441-3447, 1998.
114. ABBOT DW, FREEMAN ML, HOLT JT. Double-strand break repair deficiency and radiation sensitivity in BRCA2 mutant cancer cells. *Journal of National Cancer Institute*, 90: 978-985, 1998.
115. SCULLY R, CHEN J, PLUG A, XIAO Y, WEAVER D, FEUNTEUN J, ASHLEY T, LIVINGSTON DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*, 88: 265-275, 1997.
116. WONG AK, PERA R, ORMONDE PA, TAVTIGIAN SV, BARTEL PL. RAD51 interacts with the evolutionary conserved BRC motifs in human breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 31941-31944, 1997.
117. SIDDIQUE H, ZOU JP, RAO VN, REDDY ES. The BRCA2 is a histone acetyltransferase. *Oncogene*, 16: 2283-2285, 1998.
118. ZHANG H, TOMBLINE G, WEBER BL. BRCA1, BRCA2 and DNA damage response. *Cell*, 92: 433-436, 1998.
119. CROOK T, BROOKS LA, CROSSLAND S, CROSSLAND S, OSIN P, BARKER KT, WALLER J, PHILP E, SMITH PD, YULUG I, PETO J, PARKER G, ALLDAY MJ, CROMPTON MR, GUSTERSON BA. p53 mutation with frequent novel codons but not a mutator phenotype in BRCA1- and BRCA2-associated breast tumours. *Oncogene*, 17: 1681-1689, 1998.
120. WELCSH PL, OWENS KN, KING MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genetics*, 16: 69-71, 2000.
121. MONTEIRO AN. BRCA1 exploring the links to transcription. *Trends Biochemistry Science*, 25: 469-471, 2000.
122. SCULLY R, LIVINGSTON DM. In search of the tumor suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*, 408: 429-432, 2000.
123. PAVELIC K, GALL-TROSELJ K. Recent advances in molecular genetics of breast cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 79: 566-573, 2001.
124. HARKIN DJ, BEAN JM, MIKLOS D, SONG YH, TRUONG VB, ENGLERT C, CHRISTIANS FC, ELLISEN LW, MAHESWARAN S, OLINER JD, HABER DA. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*, 97: 575-586, 1999.
125. BORG A. Molecular and pathological characterization of inherited breast cancer.

- Cancer Biology, 11: 1-11, 2001.
126. MACLACHLAN TK, SOMASUNDARAM K, SGAGIAS M, SHIFMAN Y, MUSCHEL RJ, COWAN KH, EL-DEIRY WS. BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 2777-2785, 2000.
  127. ZHANG H, SOMASUNDARAM K, PENG Y, TIAN H, ZHANG H, BI D, WEBER BL, EL-DEIRY WS. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*, 16: 1713-1721, 1998.
  128. SOMASUNDARAM K, ZHANG HB, ZENG YX, HOUVRAS Y, PENG Y, ZHANG H, WU GS, LICHT JD, WEBER BL, EL-DEIRY WS. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21 WAF1/Cip1. *Nature*, 389: 187-190, 1997.
  129. OUCHI T, MONTEIRO AN, AUGUST A. BRCA1 regulates p52 dependent gene expression. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 95: 2302306, 1998.
  130. VAUGHN JP, CRISANO FD, HUPER G, BERCHUCK A, FUTREAL PA, MARKS JR, IGLEHART JD. Cell cycle control of BRCA2. *Cancer Research*, 56: 4590-4594, 1996.
  131. GUDAS JM, LI T, NGUYEN H, JENSEN D, RAUSCHER FJ, COWAN KH. Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells. *Cell Growth and Differentiation*, 7: 717-723, 1996.
  132. BLACKWOOD MA, WEBER BL. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *Journal of Clinical Oncology*, 16: 1969-1977, 1998.
  133. FAN S, MA YX, WANG C, YUAN RQ, MENG Q, WANG JA, ERDOS M, GOLDBERG ID, WEBB P, KUSHNER PJ, PESTELL RG, ROSEN EM. Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene*, 20: 77-87, 2001.
  134. HOUVRAS Y, BENEZRA M, ZHANG H, MANFREDI JJ, WEBER BL, LICHT JD. BRCA1 physically and functionally interacts with ATF1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 36230-36237, 2000.
  135. ZHENG L, PAN H, LI S. Sequence-specific transcriptional corepressor function for BRCA through a novel zinc finger protein. *Molecular Cell*, 6: 757-768, 2000.
  136. BOCHAR DA, WANG L, BENIYA H, KINEV A, XUE Y, LANE WS, WANG W, KASHANCHI F, SHIEKHATTAR R. BRCA1 is associated with a human

- SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell*, 102: 257-65, 2000.
137. LANCASTER JM, WOOSTER R, MANGION J, PHELAN CM, COCHRAN C, GUMBS C, SEAL S, BARFOOT R, COLLINS N, BIGNELL G, PATEL S, HAMOUDI R, LARSSON C, WISEMAN RW, BERCHUCK A, IGLEHART JD, MARKS JR, ASHWORTH A, STRATTON MR, FUTREAL PA. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nature Genetics*, 13: 238-240, 1996.
138. FUTREAL PA, LIU Q, SHATTUCK-EIDENS D, COCHRAN C, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, BENNETT LM, HAUGEN-STRANO A, SWENSEN J, MIKI Y. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 266: 120-122, 1994.
139. CLETON-JANSEN AM, COLLINS N, LAKHANI SR, FLESKEN-NIKITIN A, CHEN PL, BOYER TG, LEE WH. Loss of heterozygosity in sporadic breast tumors at the BRCA2 locus on chromosome 13q12-q13. *British Journal of Cancer*, 72: 1241-1244, 1995.
140. BERCHUCK A, HERON KA, CARNEY ME, LANCASTER JM, FRASER EG, VINSON VL, DEFFENBAUGH AM, MIRON A, MARKS JR, FUTREAL PA, FRANK TS. Frequency of germline and somatic BRCA1 mutations in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, Oct;4(10):2433-7, 1998.
141. LOMAN N, JOHANNSSON O, BENDAHL PO, BORG A, FERNO M, OLSSON H. Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 and BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer*, 83: 310-319, 1998.
142. ROBSON M, RAJAN P, ROSEN PP, GILEWSKI T, HIRSCHAUT Y, PRESSMAN P, HAAS B, NORTON L, OFFIT K. BRCA-associated breast cancer: absence of a characteristic immunophenotype. *Cancer Research*, 58: 1839-1842, 1998.
143. PEELLEN T, VAN VLIET M, PETRIJ-BOSCH A, MIEREMET R, SZABO C, VAN DEN OUWELAND AM, HOGERVORST F, BROHET R, LIGTENBERG MJ, TEUGELS E, VAN DER LUIJT R, VAN DER HOUT AH, GILLE JJ, PALS G, JEDEMA I, OLMER R, VAN LEEUWEN I, NEWMAN B, PLANDSOEN M, VAN DER EST M, BRINK G, HAGEMAN S, ARTS PJ, BAKKER MM, DEVILEE P. A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *American Journal of Human Genetics*, 60: 1041-1049, 1997.
144. MARCUS JN, WATSON P, PAGE DL, NAROD SA, LENOIR GM, TONIN P,

- LINDER-STEPHENSON L, SALERNO G, CONWAY TA, LYNCH HT. Hereditary breast cancer pathobiology, prognosis and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer*, 77: 697-709, 1996.
145. LAKHANI SR, JACQUEMIER J, SLOANE JP, GUSTERSON BA, ANDERSON TJ, VAN DE VIJVER MJ, FARID LM, VENTER D, ANTONIOU A, STORFER-ISSER A, SMYTH E, STEEL CM, HAITES N, SCOTT RJ, GOLDGAR D, NEUHAUSEN S, DALY PA, ORMISTON W, MCMANUS R, SCHERNECK S, PONDER BA, FORD D, PETO J, STOPPA-LYONNET D, EASTON DF. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *Journal of National Cancer Institute*, Aug 5;90(15):1138-45, 1998.
146. CHAPPUIS PO, NETHERCOT V, FOULKERS WD. Clinicopathological characteristics of BRCA1- and BRCA2 related breast cancer. *Seminol Surgical Oncology*, 1: 287-295, 2000.
147. CHAPPUIS PO, ROSENBLATT I, FOULKERS WD. The influence of familial and hereditary factors on the prognosis of breast cancer. *Annual Oncology*, 10: 1163-1170, 1999.
148. LEE JS, WACHOLDER S, STRUEWING JP, MCADAMS M, PEE D, BRODY LC, TUCKER MA, HARTGE P. Survival after breast cancer in Ashkenazi Jewish BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Journal of National Cancer Institute*, 91: 259-263, 1999.
149. VERHOOG LC, BREKELMANS CT, SEYNAEVE C, DAHMEN G, VAN GEEL AN, BARTELS CC, TILANUS-LINTHORST MM, WAGNER A, DEVILEE P, HALLEY DJ, VAN DEN OUWELAND AM, MEIJERS-HEIJBOER EJ, KLIJN JG. Survival in hereditary breast cancer associated with germline mutations of BRCA2. *Clinical Oncology*, 17: 3.3963402, 1999.
150. FOULKES WD, WONG N. Germ-line BRCA1 mutation is an adverse prognostic factor in Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 3: 2465-2469, 1997.
151. TANG A, VARLEY JM, CHAKRABARTY S. Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science*, 242: 263-266, 1988.
152. VARLEY JM, ARMOUR J, SWALLOW JE, JEFFREYS AJ, PONDER BA, TANG A, FUNG YK, BRAMMAR WJ, WALKER RA. The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumours. *Oncogene*,

- 4:725-730, 1989.
153. FUNG YK, TANG A. The role of the retinoblastoma gene in breast cancer development. *Cancer Treatment Research*, 61: 59-68, 1992.
  154. BERNS EM, DEKLEIN A, VAN PUTTEN WL. Association between RB-1 gene alterations and factors of favorable prognosis in human breast cancer without effect on survival. *International Journal of Cancer*, 64: 140-145, 1995.
  155. GOTTARDIS MM, SACEDA M, GARCIA-MORALES P, FUNG YK, SOLOMON H, SHOLLER PF, LIPPMAN ME, MARTIN MB. Regulation of retinoblastoma gene expression in hormone-dependent breast cancer. *Endocrinology* 136: 5659-5665, 1995.
  156. WANG NP, TO H, LEE WH, LEE EY. Tumor suppressor activity of RB and p53 genes in human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 8: 279-288, 1993.
  157. SANTIBANEZ-COREF MF, BIRCH JM, HARTLEY AL, JONES PH, CRAFT AW, EDEN T, CROWTHER D, KELSEY AM, HARRIS M. p53 germ line mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Lancet* 338: 1490-1491, 1991.
  158. ANDERSEN TL, HOLM R, NESLAND JM, HEIMDAL KR, OTTESTAD L, BORRESEN AL. Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. *British Journal of Cancer*, 68: 540-548, 1993.
  159. CALEFFI M, TEAGUE MW, JENSEN RA, VNENCAK-JONES CL, DUPONT WD, PARL FF. p53 gene mutations and steroid receptor status in breast cancer. *Cancer*, 73: 1241-1256, 1994.
  160. MERLO GR, BERNARDI A, DIELLA F, VENESIO T, CAPPAP AP, CALLAHAN R, LISCIA DS. In primary human breast carcinomas mutations in exons 5 and 6 on the p53 gene are associated with high S-phase index. *International Journal of Cancer*, 53: 531-535, 1993.
  161. JACQUEMIER J, MOLES JR. p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies comparison of staining and PCR:SSCP results. *British Journal of Cancer*, 69: 846-852, 1994.
  162. POLLER DN, HUTCHINGS CE, GALEA M, BELL JA, NICHOLSON RA, ELSTON CW, BLAMEY RW, ELLIS IO. p53 protein expression in breast carcinoma: relationship to epidermal growth factor receptor, c-erb B2 protein overexpression and estrogen receptor. *British Journal of Cancer* 66: 583-588, 1992.
  163. BERGH I, NORBERT I, SJOGREN S. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to

- adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature Medicine*, 1: 1029-1034, 1995.
164. LOWE SW, RULEY HE, JACKS T, HOUSMAN DE. p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 84: 957-967, 1993.
165. SHIAO YH, CHEN VW, SCHEER WD, WU XC, CORREA P. Racial disparity in the association of p53 gene alterations with breast cancer survival. *Cancer Research*, 55: 1485-1490, 1995.
166. AAS T, BORRESEN AL, GEISLER S, SMITH-SORENSEN B, JOHNSEN H, VARHAUG JE, AKSLEN LA, LONNING PE. Specific p53 mutations are associated with de nova resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature Medicine*, 2: 811-814, 1996.
167. LI J, YEN C, LIAW D, PODSY PANINA K, BOSE S, WANG SI, PUC J, MILIARESIS C, RODGERS L, MCCOMBINE R, BIGNER SH, GIOVANELLA BC, ITTMANN M, TYCKO B, HIBSHOOSH H, WIGLER MH, PARSONS R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 28;275(5308): 1943-7,1997.
168. BANHAM AH, BEASLEY N, CAMPO E, FERNANDEZ PL, FIDLER C, GATTER K, JONES M, MASON DY, PRIME JE, TROUGOUBOFF P, WOOD K, CORDELL JL. The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. *Cancer Research*, Dec 15;61(24):8820-9, 2001.
169. OHTA M, INOVE H, COTTICELLI MG, KASTURY K, BAFFA R, PALAZZO J, SIPRASHULLI Z, MORI M. MCCUE P, DRUCK T, CROCE CM, HUEBNER K. The human FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma associated translocation breakpoint is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, 84:587-597, 1996.
170. PEKARSKY Y, ZANESI N, PALAMARCHUK A, HUEBNER K, CROCE CM. FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *The Lancet Oncology*, 3:748-754, 2002.
171. GLOVER TW, STEIN CK. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. *American Journal of Human Genetics*, 43: 265-73, 1998.
172. KASTURY K, BAFFA R, DUCK T, OHTA M, COTTICELLI MG, INOUE H, NEGRINI M, RUGGE M, HUANG D, CROCE CM PALAZZO J, HUEBNER K. Potential gastrointestinal tumor suppressor locus at the 3p 14.2 FRA3B site identified by homozygous deletions in tumor cell lines. *Cancer Research*, 56: 978-983, 1996.

173. MON M, MIMORI K, SHIRAISHI T. Altered expression of FHIT in carcinoma and precancerous lesions of the esophagus. *Cancer Research*, 60: 1177-82, 2000.
174. PYLKKANEN L, WOLFFH, STJERNVALL T, TUOMINEN P, SIORIS T, KARJALAINEN A, ANTTILA S, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K. Reduced FHIT protein expression and loss of heterozygosity at FHIT gene in tumours from smoking and asbestos-exposed lung cancer patients. *International Journal of Oncology*, 20: 285-90, 2002.
175. CHIHIKOV V, CHIKINA S, GASPARIAN A, ZBOROVSKAYA I, STESHINA E, UNGIADZE G, SAMSONOVA M, CHERNYAEV A, CHUCHALIN A, TATOSYAN A. Molecular follow-up of preneoplastic lesions in bronchial epithelium of former Chernobyl clean-up workers. *Oncogene*, 21: 2398-405, 2002.
176. KARADAĞ M, TUNCA B, CECENER G, EGELİ Ü, ÖZYARDIMCI N, EGE E, GÖZÜ O. Chromosomal fragile sites and relationship between genetic predisposition to small cell lung cancer. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 22:31-40, 2002.
177. TUNCA B, CECENER G, GEBİTEKİN C, EGELİ U, EDİZ B, ERCAN I. Investigation of genetic susceptibility to non-small cell lung cancer by fragile site expression. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 22:205-215, 2002.
178. ÇEÇENER G, EGELİ Ü, TAŞDELEN İ, TUNCA B, DUMAN H AND KIZIL A. Common fragile sites expression and genetic predisposition to breast cancer. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 18:279-291,1998.
179. TUNCA B, EGELİ Ü, ZORLUOĞLU A, YILMAZLAR T, YERÇİ Ö, KIZIL A. The expression frequency of common fragile sites and genetic predisposition to colon cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 119:139-145, 2000.
180. TUNCA B, EGELİ Ü, ZORLUOĞLU A, YILMAZLAR T, YERÇİ Ö, KIZIL A. The Expression of fragile sites in lymphocytes of patients with rectum cancer and their relatives. *Cancer Letters*, 152:201-209, 2000.
181. PARE HC, GARRISOU PN, ROBINSON AK. Genetic, biochemical, and crystallographic characterization of FHITsubstrate complexes as the active signaling form of FHIT. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 95: 5484-89, 1998.
182. INGVARSSON S, SIGBJORNSDOTTIR BI, HUIPING C, JONASSON JG, AGNARSSON BA. Alterations of the FHIT gene in breast cancer: association with tumor progression and patient survival. *Cancer Detection and Prevention*, 25(3):292-8,

- 2001.
183. DRUCK T, HADACZEK P, FU T, OHTA M, SIPRASHVILI Z, BAFFA R, NEGRINI M, KASTURY K, VERONESE ML, ROSEN D, ROTHSTEIN J, MCCUE P, COTTICELLI MG, INOUE H, CROCE CM, HUEBNER K. Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Research*, 57: 504-12, 1997.
  184. BAFFA R, VERONESE M L, SANTORO R, MANDES B, PALAZZO JP, RUGGE M, SANTORO E, CROCE CM, HUEBNER K. Loss of FHIT expression in gastric carcinoma. *Cancer Research*, 58: 4708-14, 1998.
  185. CROCE C, SOZZI G, HUEBNER K. Role of FHIT in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17:1618-1624, 1999.
  186. SOZZI G, PASTORINO U, MOIRAGHI L, TAGLIABUE E, PEZZELLA F, GHIRELLI C, TORNIELLI S, SARD L, HUEBNER K, PIEROTTI MA, CROCE CM, PILOTTI S. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Research*, 58:5032-37, 1998.
  187. MAO L, LEE JS, KURIE TM, FAN YH, LIPPMAN SM, LEE JJ, RO JY, BROXSON A, YU R, MORICE RC, KEMP BL, KHURI FR, WALSH GL, HITTELMAN WN, HONG WK. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *Journal of National Cancer Institute*, 89: 857-862, 1997.
  188. GERADTS J, FONG KM, ZIMMERMAN PV, MINNA JD. Loss of FHIT expression in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 82:1191-97, 2000.
  189. HADACZEK P, SIPRASHVILI Z, MARKIEWSKI M. Reduction of FHIT expression in most clear cell renal carcinomas. *Cancer Research*, 58: 2946-51, 1998.
  190. GREENSPAN DL, CONNOLLY OC, WU R, LEI RY, VOGELSTEIN JT, KIM YT, MOK JE, MUNOZ N, BOSCH FX, SHAH K, CHO KR. Loss of FHIT expression in cervical carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Research*, 57: 4692-98, 1997.
  191. SIMON B, BARTSCH D, BARTH P, PRASNIKAR N, MUNCH K, BLUM A, ARNOLD R, GOKE B. Frequent abnormalities of the putative tumor suppressor gene FHIT at 3p14.2 in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 58: 1583-87, 1998.
  192. INGVARSSON S, AGNARSSON BA, SIGBJORNSDOTTIR BI, KONONEN J, KALLIONIEMI OP, BARKARDOTTIR RB, KOVATICH AJ, SCHWARTING R,



- HAUCK WW, HUEBNER K, MCCUE PA. Reduced FHIT expression in sporadic and *BRCA2*-linked breast carcinomas. *Cancer Research*, 59: 2682-89, 1999.
193. CAMPIGLIO M, PEKARSKY Y, MENARD S, TAGLIABUE E, PILOTTI S, CROCE CM. FHIT loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. *Cancer Research*, 59: 3866-69, 1999.
194. GATALICA Z, LELE SM, RAMPY BA, NORRIS BA. The expression of FHIT protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma. *Cancer*, 88: 1378-83, 2000.
195. ZOCHBAUER-MULLER S, FONG KM, MAITRA A, LAM S, GERADTS J, ASHFAQ R, VIRMANI AK, MILCHGRUB S, GAZDAR AF, MINNA JD. 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Research*, 61: 3581-85, 2001.
196. MORIKAWA H, NAKAGAWA Y, HASHIMOTO K, NIKI M, EGASHIRA Y, HIRATA I, KATSU K, AKAO Y. Frequent altered expression of fragile histidine triad protein in human colorectal adenomas. *Biochemical Biophys Research Communication*, 278: 205-10, 2000.
197. HAO XP, WILLIS JE, PRETLOW TG, RAO JS, MACLENNAN GT, TALBOT IC, PRETLOW TP. Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions. *Cancer Research*, 60: 18-21, 2000.
198. BIRRER MJ, HENDRICKS D, FARIEY J, SUNDBORG MJ, BONOME T, WALTERS MJ, GERADTS J. Abnormal FHIT expression in malignant and premalignant lesions of the cervix. *Cancer Research*, 59: 5270-74, 1999.
199. MORI M, MIMORI K, MASUDA T, YOSHINAGA K, YAMASHITA K, MATSUYAMA A, INOUE H. Absence of hMSH2 protein expression is associated with alteration of the FHIT locus and FHIT protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Research*, 61: 7379-82, 2001.
200. TURNER BE, OTTEY M, ZIMONJIK DB. The fragile histidine triad common chromosome fragile site 3B locus and repair deficient cancers. *Cancer Research*, 62: 4054-60, 2002.
201. SIPRASHVILI Z, SOZZI G, BARNES LD, MCCUE P, ROBINSON AK, ERYOMIN V, SARD L, TAGLIABUE E, GRECO A, FUSETTI L, SCHWARTZ G, PIEROTTI MA, CROCE CM, HUEBNER K. Replacement of FHIT in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 94: 13771-76, 1997.

202. JI L, FANG B, YEN N, FONG K, MINNA JD, ROTH JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Research*, 59: 3333-39, 1999.
203. SARD L, ACCORNERO P, TORNIELLI S, DELIA D, BUNONE G, CAMPIGLIO M, COLOMBO MP, GRAMEGNA M, CROCE CM, PIEROTTI MA, SOZZI G. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 96: 8489-92, 1999.
204. ROZ L, GRAMEGNA M, ISHII H, CROCE CM, SOZZI G. Restoration of fragile histidine thriad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 99: 3615-20, 2002.
205. WERNER NS, SIPRASHVILI Z, FONG LY, MARQUITAN G, SCHRODER JK, BARDENHEUER W, SEEGER S, HUEBNER K, SCHUTTE J, OPALKA B. Differential susceptibility of renal carcinoma cell lines to tumor suppression by exogenous FHIT expression. *Cancer Research*, 60: 2780-35, 2000.
206. ISHII H, DUMON KR, VECCHIONE A, TRAPASSO F, MIMORI K, ALDER H, MORI M, SOZZI G, BAFFA R, HUEBNER K, CROCE CM. Effect of adenoviral induction of the fragile histidine triad gene in esophageal cancer cells. *Cancer Research*, 61: 1575-84, 2001.
207. DUMON.KR, ISHII H, VECCHIONE A, TRAPASSO F, BALDASSARRE G, CHAKRANI F, DRUCK T, ROSATO EF, WILLIAMS NN, BAFFA R, DURING MJ, HUEBNER K, CROCE CM. Fragile histidine triad expression delays tumor development and induces apoptosis in human pancreatic cancer. *Cancer Research*, 61: 4827-36, 2001.
208. FONG LY, FIDANZA V, ZANESI N, LOCK LF, SIRACUSA LD, MANCINI R, SIPRASHVILI Z, OTTEY M, MARTIN SE, DRUCK T, MCCUE PA, CROCE CM, HUEBNER K. Muir- Torre-like syndrome in Fhit-deficient mice. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 97: 4742-47, 2000.
209. ZANESI N, FIDANZA V, FONG LY, MANCINI R, DRUCK T, VALTIERI M, RUDIGER T, MCCUE PA, CROCE CM, HUEBNER K. The tumor spectrum in Fhit-deficient mice. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 98: 10250-55, 2001.

210. LU SH, MONTESANO R, ZHANG MS, FENG L, LUO FJ, CHUI SX, UMBENHAUER D, SAFFHILL R, RAJEWSKY MF. Relevance of N-nitrosamines to esophageal cancer in China. *Journal of Cell Physiological Supplement*, 4: 51-58, 1986.
211. ISHII H, DUMON KR, VECCHIONE A, FONG LY, BAFFA R, HUEBNER K, CROCE CM. Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene: review of the preclinical studies. *JAMA*, 286: 2441-49, 2001.
212. BORG A, ISOLA J, CHEN J, RUBIO C, JOHANSSON U, WERELIUS B, LINDBLOM A. Germline BRCA1 and HMLH1 mutations in a family with male and female breast carcinoma. *International Journal of Cancer*, 15;85(6): 796-800, 2000.
213. RAUSCHER FJ, PATEL G, JENSEN DE. The BRCA1 associated protein BAP1 is required transcription coupled DNA repair and tumor- derived mutations in BAP1 abolish this function. *Cancer Detection and Prevention*, 24: 3, 2000.
214. THIBODEAU SN, BREN G, SCHAID D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 269: 816-819, 1993.
215. YIOOSTER R, CLETON-JANSEN AM. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genetics*, 6: 152-156, 1994.
216. PATE J, GRUNFEST-BRONIATOWSKI S, GUPTA M. Microsatellite instabilities in 5 chromosomes in primary breast tumors. *Oncogene*, 9: 3695-3700, 1994.
217. YEE CJ, ROODI N, VERRIER CS, PARL FF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Research*, 54: 1641-1644, 1994.
218. KRUPP G, KLAPPER W, PARWARESCH R. Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. *Cell Molecular Life Science*, 57 464-486, 2000.
219. GREIDER CW, BLACKBUM EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 43: 405-413, 1985.
220. BRITTNEY-SHEA H, WRIGHT WE, SHAY JW. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Research*, 3: 146-149, 2001.
221. SHAY JW, BACHETTI S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*, 33: 787-791, 1997.
222. CAREY LA, HEDICAN CA, HENDERSON GS, UMBRICH CB, DOME JS, VARON D, SUKUMAR S. Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancers *Clinical Cancer Research*, 4:435-440, 1998.

223. YASHIMA K, MILCHGRUB S, GOLLAHON LS, MAITRA A, SABOORIAN MH, SHAY JW, GAZDAR AF. Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 4:229-234, 1998.
224. POREMBA C, SHROYER KR, FROST M, DIALLO R, FOGT F, SCHAFFER KL, BURGER H, SHROYER AL, DOCKHORN-DWORNICZAK B, BOECKER W. Telomerase is a highly sensitive and specific molecular marker in the fine needle aspirates of breast lesions. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 2020-2026, 1999.
225. HIYAMA E, SAEKI I, HIYAMA K. Telomerase activity as a marker of breast carcinoma in fine needle aspirated samples. *Cancer Cytopathology*, 90: 235-238, 2000.
226. HOOS A, HEPP HH, KAUL S, AHLERT T, BASTERT G, WALLWIENER D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 79: 8-12, 1998.
227. MOKBEL KM, PARRIS CN, GHILCHIK M, AMERASINGHE CN, NEWBOLD RF. Telomerase activity and lymphovascular invasion in breast cancer. *European Journal of Surgery Oncology*, 26: 30-33, 2000.
228. CLARK GM, OSBOME CK, LEVITT D. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 88: 1874-1881, 1997.
229. MELENA SM, HOLLAND JF, POGO BGT. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Clinical Cancer Research*, 4: 693-696, 1998.
230. WHITE LK, WRIGHT WE, SHAY JW. Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnology*, 19: 114-120, 2001.
231. CHOI SH, KANG HK, IM EO, KIM YJ, BAE YT, CHOI YH, LEE KH, CHUNG HY, CHANG HK, KIM ND. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by retinoic acids. *International Journal of Oncology*, 17: 971-976, 2000.
232. ALDOUS WK, MAREAN AJ, DEHART MJ, MATEJ LA, MOORE KH. Effects of tamoxifen on telomerase activity in breast carcinoma cell lines. *Cancer*, 85: 1523-1529, 1999.
233. CHEN X, BONNEFOI H, PELTE MF, LYAUTEY J, LEDERREY C, MOVAREKHI S, SCHAEFFER P, MULCAHY HE, MEYER P, STROUN M, ANKER P. Telomerase RNA as detection marker in the serum of breast cancer

- patients. *Clinical Cancer Research*, 6: 3823-3826, 2000.
234. PEROU CM, SORLIE T. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752, 2000.
235. GROMPE M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics*, 5: 111-116, 1993.
236. NATARAJ JA, OLIVOS-GLANDER I, KUSUKAWA N, HIGHSMITH W. Single strand conformational polymorphism and heterodublex analysis for gel based mutation detection. *Electrophoresis*, 20: 1177-1185, 1999.
237. AINSWORTH PJ, SURH LC, COULTERMACKIE MB. Diagnostic single strand Conformational polymorphism (SSCP): A simplified nonradioisotopic method as applied to a Tay Sachs B1 Variant. *Nucleic Acid Research*, 19(2): 405-406, 1991.
238. PASTERNAK JJ. An introduction to human molecular Genetics. Fitzgerald Science Pres, Inc. P. 210-212, 1999.
239. BAILEY AL. Single Strand Conformational Polymorphisms. INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ (Eds). *PCR strategies*, Academic Press, 121-129, 1995.
240. MAXAM A, GILBERT W. A new method for sequencing DNA. *Biotechnology*, 1992;24:99-103, 1977.
241. SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 74: 463-67, 1977.
242. HERMANEK P, HUTTER RVP, SOBIN LH, WAGNER G, WITTEKIND C. *TNM Atlas Illustrated guide to the TNM / p TNM Classification of malignant tumours. Fourth Edition. Springer, Berlin 1999.*
243. TOLUNAY Ş. Meme Kanserlerinde histopatolojik etmenler ve evreleme. Editörler: ENGİN K ve ÇETİNTAŞ S. *Meme kanserleri, Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, sayfa 6191-200, 2005.*
244. MILLER M, DYKES DD, POLESKY HF. Procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acid Research*, 16: 1215, 1988.
245. GEMMA A, HAGIWARA K, KE Y, BURKE LM, KHAN MA, NAGASHIMA M, BENNETT WP, HARRIS CC. FHIT mutations in human primary gastric cancer. *Cancer Research*, 57: 1435-1437, 1997.
246. DICKSON B ROBERTS. The molecular basis of breast cancer. Eds:RAZELLE KURZROCK AND MOSHE TALPAZ. *Molecular Biology in Cancer Medicine, Martin Dunitz Ltd, London, pp241-72, 1996.*

247. PAZ-Y-MINA, C., P. MA SERANA, S. MA EUGENIA, et al. Comparative study of chromosome aberrations induced with aphidocolin in women affected by breast cancer and cervix uterine cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 94:120-124, 1997.
248. SATO T, AKIYAMA F, SAKAMOTO G, KASUMI F, NAKAMURA Y. Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. *Cancer Research*, 51, 5794-5799, 1991.
249. THIAGALINGAM S, LISITSYN NA, HAMAGUCHI M, WIGLER MH, WILLSON JKV, MARKOWITZ SD, LEACH FS, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Evaluation of the FHIT gene in colorectal cancers. *Cancer Research*, 56: 2936-2939, 1996.
250. ZBAR B, BRAUCH H, TALMADGE C, LINEHAN M. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature*, 327:721-724, 1987.
251. SU TH, WANG JC, TSENG HH, CHANG CP, CHANG TA, WEI HJ, CHANG LG. Analysis of FHIT transcripts in cervical and endometrium cancers. *International Journal of Cancer*, 76: 216-22, 1998.
252. AHMADIAN M, WISTUBA I, FONG KM, BEHRENS C, KODAGODA DR, SHAY J, TOMLINSON GE, BLUM J, MINNA JD, GAZDAR AF. Analysis of the FHIT Gene and FRA3B region in sporadic Breast Cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. *Cancer Research*, 57:3664-3668, 1997.
253. FONG KM, BIESTERVELD EJ, VIRMANI A, WISTUBA I, SEKIDO Y, BADER SA, AHMADIAN M, ONG TS, RASSOL FV, ZIMMERMAN PV, GIACCONE G, GAZDAR AF, MINNA JD. FHIT and FRA3B 3p14.2 Allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Research*, 57: 2256-67, 1997.
254. YANAGISAWA K, KONDO M, OSADA H, UCHIDA K, TAKAGI K, MASUDA A, TAKAHASHI T, TAKAHASHI T. Molecular analysis of the FHIT gene at 3p14.2 in lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 56: 5579-82, 1996.
255. KANNAN K, KRISHNAMURTHY J, FENG J, NAKAJIMA T, TSUCHIDA N, SHANMUGAM G. Mutation profile of the p53, fhit, p16INK4a/p19ARF and H-ras genes in Indian breast carcinomas. *International Journal of Oncology*, 17(5): 1031-35, 2000.
256. ROSELL R, MONZO M, O'BRATE A, TARON M. Translational oncogenomics: toward rational therapeutic making. *Current Opinion Oncology*, 14(2): 171-9, 2002.

257. DENG YF, TIAN F, LU YD, CHEN ZC, XIE DH, YANG XM, SHAO XY. Mutation and abnormal expression of the fragile histidine triad gene in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*, Sep; 111(9): 1589-92, 2001.
258. ZHAO XR, KANG LC, ZHOU YS, JIA YX, CHEN Z, KANG SH, LI WM, CUI JT, SUN AL, LU YY. Mutations of fragile histidine triad gene in Peutz-Jeghers syndrome and canceration. *Ai Zheng*, 22(1): 50-54, 2003.
259. STEC-MICHALSKA K, ANTOSZCZYK S, KLUPINSKA G, NAWROT B. Loss of FHIT expression in gastric mucosa of patients with family histories of gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, Jan 7;11(1):17-21, 2005.
260. BUTTITTA F, MARCHETTI A, RADI O, BERTACCA G, PELLEGRINI S, GADDUCCI A, GENAZZANI AR, BEVILACQUA G. Evaluation of FHIT gene alterations in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, Apr;77(7):1048-51, 1998.
261. GINESTIER C, BARDOU VJ, POPOVICI C, CHARAFE-JAUFFRET E, BERTUCCI F, GENEIX J, ADELAIDE J, CHAFFANET M, HASSOUN J, VIENS P, JACQUEMIER J, BIRNBAUM D. Loss of FHIT protein expression is a marker of adverse evolution in good prognosis localized breast cancer. *International Journal of Cancer*, 10;107(5): 854-62, 2003.
262. GULER G, UNER A, GULER N, HAN SY, ILIOPOULOS D, HAUCK WW, HUEBNER K. The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinate in invasive breast carcinoma. *Cancer*, 15; 100(8): 1605-14, 2004.

## TEŞEKKÜR

Tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve yorumlanmasında yardım ve önerilerini esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Ünal EGELİ'ye, çalışmamın her aşamasında emeği olan tecrübelerinden faydalandığım Sayın Doç. Dr. Berrin TUNCA'ya, yapıcı fikirleri ile tezimin olgunlaşmasında büyük emekleri olan tez izleme komitesi üyeleri; Sayın Prof. Dr. İsmet TAŞDELEN'e ve Sayın Prof. Dr. Nazan BİLGEL'e vakaların materyallerinin sağlanmasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Şahsine TOLUNAY'a, deney sonuçlarımın yorumlanması konusunda bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ve her konuda destek olan Sayın Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU'na, istatistiksel analizlerim konusunda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Bülent EDİZ'e, deneylerimin her aşamasında emeğini benimle paylaşan çalışma arkadaşım Araş. Gör. Özgür VATAN'a, çalışmalarım sırasında manevi yönden daima destek olan aileme ve eşime teşekkürlerimi sunarım.



## ÖZGEÇMİŞ

09.11.1973 tarihinde Bursa'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Atatürk İlkokulu ve Bursa Kız Lisesi'nde tamamladım. 1991-92 öğretim döneminde Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girmeye hak kazandım. Aynı fakülteden 1995 Haziran döneminde mezun oldum. Şubat 1996'da Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Yüksek Lisans öğrenimime başladım. "Meme Kanserli Hasta ve Ailelerinde Genetik Yatkınlığın Araştırılması" konulu yüksek lisans tezimi Ocak 1999'de tamamlayarak yüksek lisansımı bitirdim. Yine Şubat 1999'da, aynı Enstitüde Moleküler Biyoloji ABD'nde doktora öğrenimime başladım. 2001 bahar yarıyılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD'na yatay geçiş yaptım. Halen Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD'da Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Yabancı dilim İngilizcedir. Evli ve ikiz çocuk annesiyim.

Araş. Gör. Gülşah Tutar ÇEÇENER