



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÖSTROJEN VE PROGESTERON RESEPTÖRÜ NEGATİF MEME
KANSERLERİNDE *KRAS*, *BRAF* VE *PIK3CA* MUTASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Ashı NALDEMİR**

**KONURALP KAMPÜSÜ, DÜZCE
2020**

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÖSTROJEN VE PROGESTERON RESEPTÖRÜ NEGATİF MEME
KANSERLERİNDE *KRAS*, *BRAF* VE *PIK3CA* MUTASYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. Aslı NALDEMİR

TEZ DANIŞMANLARI
Prof. Dr. BİNNUR ÖNAL
Dr. Öğr. Üyesi SİNEM KANTARCIOĞLU COŞKUN

KONURALP KAMPÜSÜ, DÜZCE
2020

İÇİNDEKİLER

Sayfalar

TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
TABLOLAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Meme Anatomisi.....	4
2.2. Meme Embriyolojisi.....	4
2.3. Meme Histolojisi	5
2.4. Meme Tümörleri.....	6
2.4.1. Epidemiyoloji.....	6
2.4.2. Etiyoloji.....	8
2.4.3. Prognostik faktörler.....	10
2.4.4. Meme tümörlerinin sınıflandırılması.....	12
2.4.5. İmmünohistokimyasal değerlendirme	16
2.4.6. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması.....	18
2.5. Hücrel Sinyal İletimi ve Karsinogenez.....	22
2.6. Mutasyonlar.....	25
2.7. Genetik Analiz Yöntemleri.....	27
2.8. KRAS ve Meme Kanseri.....	30
2.9. BRAF ve Meme Kanseri.....	35
2.10. PIK3CA ve Meme Kanseri.....	37

3.	GEREÇ	VE
YÖNTEM.....		40
3.1.		Etik
Kurul.....		40
3.2. Olguların Seçilmesi.....		40
3.3. Mutasyonların Saptanması.....		41
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....		44
4. BULGULAR.....		45
4.1.	Demografik	ve
Veriler.....		45
4.2. Mutasyon	Sonuçlarının	Prognostik
İlişkisi.....		47
4.2.1. Histopatolojik ve moleküler tip ile ilişkisi.....		47
4.2.2. Mutasyonların lenf nodu metastazı ile ilişkisi.....		52
4.2.3. Histopatolojik derece ile ilişkisi.....		53
4.2.4. Tümör boyutu ile ilişkisi.....		54
4.2.5. Sağ kalım ile ilişkisi.....		54
5. TARTIŞMA.....		56
6. SONUÇLAR		64
7. KAYNAKLAR.....		67

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık tezimi; ‘moleküler patoloji’ alanında gerçekleştirme imkanı veren ve bilimin ilerlediği yönde gelecekteki çalışmalara yön verebilecek nitelikte olmasını sağlayan, her konuda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım yetişmemde emeği olan Anabilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam Prof. Dr. Binnur Önal’a, bu tezin ortaya çıkmasında desteklerini eksik etmeyen, her zaman saygı ve sevgi ile hatırlayacağım, çalışkanlığını örnek aldığım, diğer danışman hocam Dr. Öğr. Üy. Sinem Kantarcıoğlu Coşkun’a, yetişmemde katkıda bulunan ve bana örnek olan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Gamsızkan’a ve tezimin kritik okumasını yapan moleküler tıp uzmanı Dr. Öğr. Üy. Cem Horozoğlu hocama,

Çalışmamın uygulama aşamasında her türlü teknik yardımı sağlayan Biyolog Abdurrahman Demir’e, Moleküler Biyolog Ahmet Varış’a, Msc Biyolog Hüseyin Karacan’a,

Tezimin onkolojik verilerine ulaşmamı sağlayan, kıymetli hocam Doç. Dr. Onur Eşbah’a, tez çalışmamda istatistik konusunda her türlü yardımcı olan ve tüm sorularıma cevap veren Dr. Öğr. Üy. Mehmet Ali Sungur hocama,

Tezimin yapım aşamasında laboratuarda yardımlarını esirgemeyen Asiye Kasapoğlu’na ve asistanlık eğitimim boyunca sağladıkları tüm kolaylıklar ve yardımları için özverili ve çalışkan patoloji teknisyenlerimiz, Murat Süzen’e, Feride Yılmaz’a, Ayşe Pekcan Çelebioğlu’na, Beyda Aktepe’ye ve biricik sekreterimiz Gülçin Şahin’e,

Dostluklarını hep yanında hissettiğim ve birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, değerli araştırma görevlisi arkadaşlarım; Dr. Atike Bahcıvan’a, Dr. Şeyma Büyücek’e ve sonradan aramıza katılan değerli Dr. Ayşegül Ceyhan’a,

Bugünlere gelmemi sağlayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bana her zaman güç veren anneme, babama, kardeşim Dr. Hale Yalçın’a, her zaman yanımda olan beni destekleyen eşim Dr. İbrahim Feyyaz Naldemir’e ve küçük kızım Azra’ma çok teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç

Meme kanseri ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen malign tümör olup kadınlarda kanserden ölümlerin ikinci sebebidir. Geniş genetik heterojenitesi nedeniyle moleküler tedavi potansiyeli oldukça yüksektir. Tamoksifen ve türevleri gibi hormonal tedaviden faydalanamayacak, östrojen ve progesteron reseptörü negatif meme tümörlerinde; *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarını araştırmayı amaçladık. Üçlü negatif ve HER2'den zengin moleküler alt tipler arasında, bu mutasyonların görülme sıklığında farklılık olup olmadığını inceledik. Demografik veriler, TNM evresi, histopatolojik tanı, tümör derecesi, menopoz durumu ve sağkalım ile bu mutasyonlar arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Gereç ve Yöntem

DÜTF Patoloji ABD'da 2013-2019'da östrojen ve progesteron reseptörü negatif meme karsinomlu 24 hastanın mastektomi materyallerinin formalin ile fikse parafine gömülü doku bloklarından makrodiseksiyonla tümörlü alanlar seçildi; DNA ekstraksiyonunun ardından *KRAS/BRAF/PIK3CA* Multiplex Arrays kullanılarak mutasyon tayini gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS v.22 paket programı ile yapılmış kategorik değişkenlerin değerlendirilmesinde Pearson ki-kare testi uygulanmıştır.

Bulgular

Olguların ortalama tanı yaşı $60,29 \pm 12,41$ olup serimizdeki karsinomlar; invaziv meme karsinomu, NOS (n=18, %75), metaplastik (n=2, %8,6), lobüler (n=1, %4,3), papiller (n=1, %4,3), mikst (lobüler+duktal karsinom) (n=1, %4,3) ve apokrin diferansiasyonlu (n=1, %4,3) karsinomdur. Olguların 12'sinde mutasyon saptanmıştır; beş olguda (%21.7) *PIK3CA*, dört olguda (%17.3) *KRAS*, bir olguda (%4.3) *BRAF*, bir olguda (%4.3) kombine *BRAF/KRAS* ve bir olguda (%4.3) kombine *KRAS/PIK3CA* mutasyonları görüldü. Üçlü negatif ve HER2'den zengin gruplar arasında *PIK3CA* (p=0,640), *KRAS* (p=0,371) ve *BRAF* (p=0,949) mutasyon oranları açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Her üç mutasyon için histolojik derece, patolojik evre ve sağkalım ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık

bulunmamış olup *PIK3CA* mutasyonu ve tümör çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p=0,01$). Tümör çapı arttıkça *PIK3CA* mutasyonu görülme oranı artmakta olup kötü prognostik faktörlerle bu mutasyonun ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Sonuçlar

Literatürde; *PIK3CA* mutasyonu %20-45, HER2'den zengin grupta %23, üçlü negatif grupta %5-13.2 aralığında saptanmışken; çalışmamızda toplamda %26, HER2'den zengin grupta %18.2, üçlü negatif grupta %33.3 oranında saptanmıştır. *PIK3CA* mutasyonu (H1047R, E542K, H545K) ve tümör çapı arasında istatistiksel anlamlı ilişki gözlenmiştir ($p=0,01$). Tümör çapı arttıkça *PIK3CA* mutasyon görülme oranı artmakta olup, kötü prognostik faktörlerle bu mutasyonun ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Diğer çalışmalarda; meme kanserinde *KRAS* mutasyonu %7-12, HER2'den zengin grupta %17, üçlü negatif grupta %0-8 oranında tespit edilmiştir. Çalışmamızda *KRAS* mutasyonu (Q61H1, G12S, G12D, G12R, Q61R) toplamda %26, HER2'den zengin grupta %36.4, üçlü negatif grupta ise %16.7 bulunmuştur.

Literatürde *BRAF* mutasyonu %2-4 saptanmışken çalışmamızda (V600E) toplamda %8.6'dır.

Her üç genin de hedefe yönelik tedavileri halen araştırılmakta olup, mutasyon saptanan hastalarda bu ajanların rutinde kullanılması için geniş serili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler, Meme kanseri, Moleküler sınıflama, HER2, Üçlü negatif, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*

ABSTRACT

Aim

Breast cancer is the most common malignant tumor in women in Turkey and in the world, and it is the second cause of cancer deaths in women. Due to its wide genetic heterogeneity, its molecular therapy potential is quite high. We investigated *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations, in estrogen receptor and progesterone receptor negative breast tumors, that can't benefit from hormonal treatment such as tamoxifen and its derivatives. We analyzed whether there is a difference in the frequency of these mutations between triple negative and HER2 rich molecular subtypes. We investigated the relationship between these mutations with demographic data, TNM stage, histopathological diagnosis, tumour grade, menopausal status and survival.

Material and Methods

In Duzce University Medical School Pathology Department, between 2013 and 2019, tumor areas were selected by macrodissection from formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks of mastectomy materials of 24 patients with estrogen and progesterone receptor negative breast carcinoma. After DNA extraction, mutation determination was performed using *KRAS/BRAF/PIK3CA* Arrays. Statistical analyzes were made with the SPSS v.22 package program, and the Pearson chi-square test was used to evaluate the categorical variables.

Results

The median age of our cases was 60,29±12,41 years. Histopathological diagnoses of our cases were invasive breast carcinoma, NOS (75%), metaplastic (8.6%), lobular (4.3%), papillary (4.3%), mixed (lobular+ductal carcinoma) (4.3%) and apocrine carcinoma (4.3%). Mutations were detected in 12 of the cases; *PIK3CA* in five cases (21.7%), *KRAS* in four cases (17.3%), *BRAF* in one case (4.3%), combined *BRAF/KRAS* in one case (4.3%) and combined *KRAS/PIK3CA* in one case (4.3%). No significant difference was found between the triple negative and HER2 rich groups in terms of *PIK3CA* (p = 0.640), *KRAS* (p = 0.371) and *BRAF* (p = 0.949)

mutation frequencies. For all three mutations, no statistically significant difference was found with histological grade, pathological stage, and survival but statistically significant relationship was found between the *PIK3CA* mutation and tumor diameter ($p = 0.01$). As the tumor size increases, the incidence of *PIK3CA* mutation increases, and it was thought that this mutation may be associated with poor prognostic factors.

Conclusion

In the literature; While *PIK3CA* mutation was detected as 20-45% in all breast cancers, it was detected in the range of 23% in HER2-rich subgroup and 5-13.2% in triple negative subgroup. In our study, *PIK3CA* was detected as 26% in total, 18.2% in HER2-rich subgroup and 33.3% in triple negative subgroup. Statistically significant relationship was observed between the *PIK3CA* (H1047R, E542K, H545K) mutation and tumor size ($p = 0.01$). As the tumor size grows, the incidence of *PIK3CA* mutation increases, and it was thought that this mutation may be associated with poor prognostic factors.

In other studies; *KRAS* mutation in breast cancer was detected in 7-12%, 17% in HER2-rich subgroup, 0-8% in triple negative subgroup. In our study, *KRAS* mutation (Q61H1, G12S, G12D, G12R, Q61R) was found 26% in total, 36.4% in the HER2-rich subgroup, and 16.7% in the triple negative subgroup.

While the *BRAF* mutation was detected as 2-4% in the literature, (V600E) was 8.6% in our study.

Targeted therapies of all three genes are still being investigated, and large series studies are needed for the clinical use of these agents in patients with mutations.

Keywords, Breast cancer, Molecular classification, Triple negative, HER2, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*

SİMGELER VE KISALTMALAR

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AL	Lysis Buffer
ATL	Tissue Lysis Buffer
AW1	Wash buffer 1
AW2	Wash buffer 2
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü
ER	Östrojen reseptörü
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
GDP	Güanozin difosfat
GTP	Güanin trifosfat
H&E	Hematoksilen-Eozin
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
İHK	İmmünohistokimya
İLK	İnvaziv lobüler karsinom
İMK	İnvaziv meme karsinomu
LKİS	İn-situ lobüler karsinom
MAPK	Mitojen-aktif protein kinaz
NGS	Yeni nesil sekanslama
NOS	Özel tip olmayan
PAS	Periodik-asit-Schiff
PR	Progesteron reseptörü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
TDLU	Terminal Duktuler Lobüler Ünite
ÜNMK	Üçlü negatif meme kanseri

TABLÖLAR DİZİNİ

- Tablo 1:** İnvaziv meme tümörlerinin derecelendirmesi
- Tablo 2:** AJCC 2019 meme kanseri pTNM evrelemesi
- Tablo 3:** TNM'e göre meme karsinomu evrelemesi
- Tablo 4:** Meme tümörlerinin sınıflandırması
- Tablo 5:** İnvaziv meme karsinomlarının sınıflandırılması
- Tablo 6:** ER ve PR'nin Allred skorum sistemi
- Tablo 7:** HER2'nin İHK'sal olarak değerlendirilmesi
- Tablo 8:** İnvaziv meme karsinomlarında HER2'nin in-situ hibridizasyon ile değerlendirilmesi
- Tablo 9:** Meme karsinomu moleküler alt tiplerinin immünofenotipik özellikleri
- Tablo 10:** Meme kanserlerinin ana biyolojik tiplerinin özellikleri
- Tablo 11:** Çeşitli kanserlerde *RAS* mutasyon oranları
- Tablo 12:** Meme kanserinde moleküler sınıflandırmaya göre yaklaşık *KRAS* mutasyon sıklıkları
- Tablo 13:** Çeşitli kanserlerde *BRAF* mutasyon oranları
- Tablo 14:** Çeşitli kanserlerde *PIK3CA* mutasyon oranları
- Tablo 15:** HER2+ ve HER2- gruplar arasında demografik veriler ve histolojik derecenin karşılaştırılması
- Tablo 16:** HER2+ ve HER2- gruplar arasında pT, pN ve uzak metastaz karşılaştırılması
- Tablo 17:** Tüm olguların moleküler sınıflaması, histopatolojik tipleri ve mutasyon durumları/kodonları
- Tablo 18:** Moleküler sınıflamaya göre mutasyon durumları
- Tablo 19:** Patolojik T evresi ve mutasyon durumlarının karşılaştırması
- Tablo 20:** Tümör çapı ve *PIK3CA* ilişkisi
- Tablo 21:** Patolojik N evresi ve mutasyon durumlarının karşılaştırması
- Tablo 22:** Histopatolojik derece ile mutasyon durumlarının karşılaştırması
- Tablo 23:** Mutasyon durumları ile yaşam sürelerinin karşılaştırılması

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1:** Meme anatomisi, sagittal kesit ve memenin embriyolojik-fizyolojik gelişimi
- Şekil 2:** Normal meme lobülünün H&E kesiti
- Şekil 3:** Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları
- Şekil 4:** Meme kanserinin kadınlarda yaşa özel hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı)
- Şekil 5:** Ki-67 ile pozitif olan tümör hücrelerinin yüzdesini görsel olarak tanımlama
- Şekil 6:** Meme karsinomlarının intrinsek gen analizi
- Şekil 7:** Yaşa ve insidansa göre meme kanseri alt tipleri
- Şekil 8:** Ras aktivasyonunun şematik çizimi
- Şekil 9:** *RAS*, *RAF* ve *PIK3CA*'nın sinyal iletiminde ana yolları
- Şekil 10:** *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* ile saptanması hedeflenen nokta mutasyonlar
- Şekil 11:** Olguların histopatolojik dağılımı ve yüzdeleri
- Şekil 12:** Olguların patolojik evre oranları
- Şekil 13:** Metaplastik karsinom olgusu ve saptanan *PIK3CA* H1047R mutasyonu
- Şekil 14:** Mikst karsinom (İMK, NOS ve lobüler karsinom) olgusu ve saptanan *PIK3CA* H1047R mutasyonu
- Şekil 15:** Lobüler karsinom olgusu ve saptanan *KRAS G12D*, *KRAS G12R* mutasyonları
- Şekil 16:** Apokrin differansiasyon gösteren karsinom olgusu ve saptanan *BRAF V600E* ve *KRAS G12S* mutasyonları
- Şekil 17:** İnvaziv meme karsinomu, NOS olgusu ve saptanan *PIK3CA H1047R* mutasyonu
- Şekil 18:** İnvaziv papiller karsinomu olgusu ve negatif mutasyon durumu
- Şekil 19:** Olguların patolojik N evresine göre dağılım

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen malign tümördür. Kadınlarda dünya çapında kanserden ölümlerin ikinci en sık sebebidir (1). Meme kanseri, görülme sıklığı açısından coğrafi farklılıklar göstermektedir. Yalnızca ABD'de 2018'de 266.120 kadına yeni meme kanseri teşhisi konmuş ve 40.920 kadın bu hastalıktan hayatını kaybetmiştir. 2030 yılına gelindiğinde, 294.000 yeni vaka olacağı ve böylece meme kanserinin büyüyen bir halk sağlığı sorunu haline geleceği tahmin edilmektedir (1). Meme kanseri farklı morfolojik görünimleri ve klinik davranışları olan, oldukça heterojen bir hastalık grubudur. Son yıllarda, bu çeşitliliğin genetik değişikliklerin bir sonucu olduğu ortaya çıkmıştır (2).

Tümörlü dokuda östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörlerinin varlığı, tümörün hormonoterapi ve kemoterapiye vereceği cevap ile iyi koreledir. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (Human epidermal growth factor receptor 2, HER2); tirozin kinaz aktivitesine sahip, transmembran glikoproteinini kodlayan bir onkogendir. Bu onkogenin meme karsinomlarında overekspresyonu, transtuzumab tedavisine yanıtın mükemmel bir belirleyicisidir (3).

Meme kanseri, tedaviyi ve aynı zamanda tümör prognozunu etkileyen farklı gen ekspresyon profillerine göre alt gruplara ayrılır. Meme kanserinde hastalığın seyrini belirlemede ve hastalığın klinik yönetimi için moleküler biyobelirteçler olan ER, PR ve HER2 durumunun tespit edilmesi gerekmektedir. Bu spesifik moleküler belirteçlerin klinik olarak prognostik, terapötik ve prediktif önemleri kanıtlanmıştır (4).

Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) olarak adlandırılan moleküler alt grup; ER, PR ekspresyonu ve HER2 gen amplifikasyonunu içermeyen meme karsinomlarını kapsar (5). ÜNMK; tüm meme kanserlerinin %10-17'sini oluşturmaktadır. Bu tümörler, çoğunlukla daha genç yaşta (<50 yaş), BRCA mutasyon taşıyıcısı olan kadınlarda görülür ve çoğunlukla kemoterapiye dirençlidir, daha agresif klinik seyir ve kötü prognoza sahiptir (6).

Meme kanserli hasta popülasyonunda HER2; vakaların yaklaşık %10-15'inde eksprese edilir. Bu proteinin aşırı ekspresyonu; kanserli hücrelerin proliferasyonunu, hücre motilitesini ve anjiyogenezini arttırması nedeniyle daha agresif kanser

biyolojisinin gelişmesine neden olur. Bugün, standart anti-HER2 biyolojik terapide, trastuzumab (Herceptin) ile birlikte kullanılan birçok HER2 hedefli tedavi mevcuttur (7). Trastuzumab tedavisi, HER2 pozitif tümörü olan hastalar için prognozu iyileştirebilir, ancak maalesef bu hastaların bazıları da tedaviye cevap vermemektedir. Böyle bir tedavi başarısızlığının nedenleri, HER2'nin fonksiyonel etkilerini düzenleyen PIK3K, RAF ve MAPK moleküler yolağındaki bir veya daha fazla değişiklikten kaynaklanabilecek trastuzumab direncine bağlı olabileceği öne sürülmüştür (8).

Neoplazi oluşumunda; hücre proliferasyon ve canlılığını değiştiren çok sayıda moleküler değişimler mevcuttur. Yapılan son çalışmalarda meme kanserinde *KRAS* mutasyon prevalansı yaklaşık %7-12, *BRAF* mutasyonu %2-4 ve *PIK3CA* mutasyon oranları yaklaşık %20-45 oranında bulunmuştur. Bu gen mutasyonları saptandığında hedefe yönelik terapinin prognozda ve sağ kalımı iyileştirmede oldukça fayda sağlayacağı düşünülmektedir (9) (10) (11).

ER, PR negatif meme kanserleri; hem HER2 pozitif hem de HER2 negatif grupları içerir. Bu grupta çoğunlukla yüksek dereceli morfoloji, genetik kararsızlık, anöploid ve p53 mutasyonları oldukça yaygındır. ER, PR negatif, HER2 pozitif grupta, 17q12 amplifikasyonuna ek olarak *PIK3CA* mutasyonları da çok sık görülür. ER, PR ve HER2 negatif meme kanseri biyolojisinin önemli unsurları arasında; yüksek proliferatif aktivite, artmış immünolojik infiltrat, bazal benzeri veya mezenkimal fenotip ve homolog rekombinasyon yetersizliği vardır.

ER ve PR eksprese etmeyen meme tümörleri; tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Bu grup hastalar, hormonal terapiden fayda görememekte olup prognozları daha kötüdür (12).

Biz bu çalışmada ER ve PR negatif meme tümörlerinde; *KRAS* (G12A, G12R, G12D, G12C, G12S, G12V, G13D, G13C, G13R, Q61K, Q61L, Q61R, Q61H1, Q61H2, A146T, A146P) *BRAF* (V600E), ve *PIK3CA* (E542K, 545K, H1047R) genleri üzerindeki 20 farklı nokta mutasyonunu araştırmayı, üçlü negatif ve HER2'den zengin olan iki moleküler alt tip arasında bu mutasyonların görülme sıklığını karşılaştırmayı ve histolojik derece, patolojik evre, sağ kalım gibi prognostik belirteçlerin bu mutasyonlarla ilişkisi olup olmadığını incelemeyi

amaçladık. Ayrıca ileride geliştirilecek alternatif tedavi yöntemleri için de hedef haline gelebilecek yeni gen mutasyonlarına ışık tutmayı hedefledik.

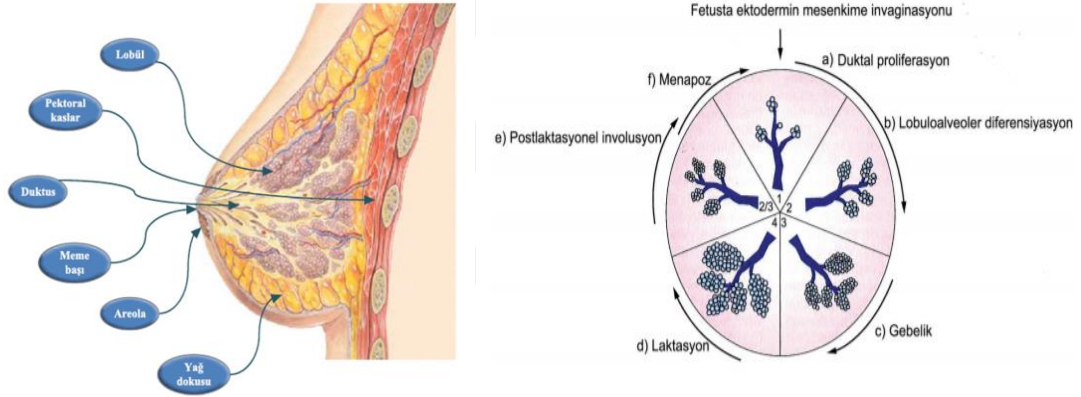


2. GENEL BİLGİLER

İnsanlarda göğüs duvarının üst kısmında pektoral kasın üzerinde çift meme bezi bulunur. Meme, organa özgü benign ve malign lezyonların kaynaklandığı özelleşmiş epitel ve stromadan oluşur.

2.1. Meme Anatomisi

Meme, erişkin kadınlarda koni şeklinde olup, düz olan yüzü sternal çizgi ve ön aksiller çizgi arasında, torakal 2 ve 6. kosta seviyesinde, pektoral kasın önünde, göğüs ön duvarının yüzeyel fasyası içinde yerleşiktir. Erkeklerde ve adölesan öncesi dönemdeki kadınlarda rudimenterdir. Meme dört katmandan oluşmaktadır. Bunlar: Cilt, cilt-altı dokusu, meme parankimi ve meme-altı bağ dokusudur (Şekil 1).



Şekil 1: Meme anatomisi, sagittal kesit ve memenin embriyolojik-fizyolojik gelişimi (<https://breast360.org/topics/2017/01/01/breast-anatomy>'den uyarlanmıştır)

Memenin dolaşımı: Arteryel dolaşım; aksiller, internal kostal ve internal torasik arterlerle sağlanır. Venöz dolaşım ise varyasyonlar gösterebilmekle beraber genellikle arteryel dolaşımı takip eder (13).

2.2. Meme Embriyolojisi

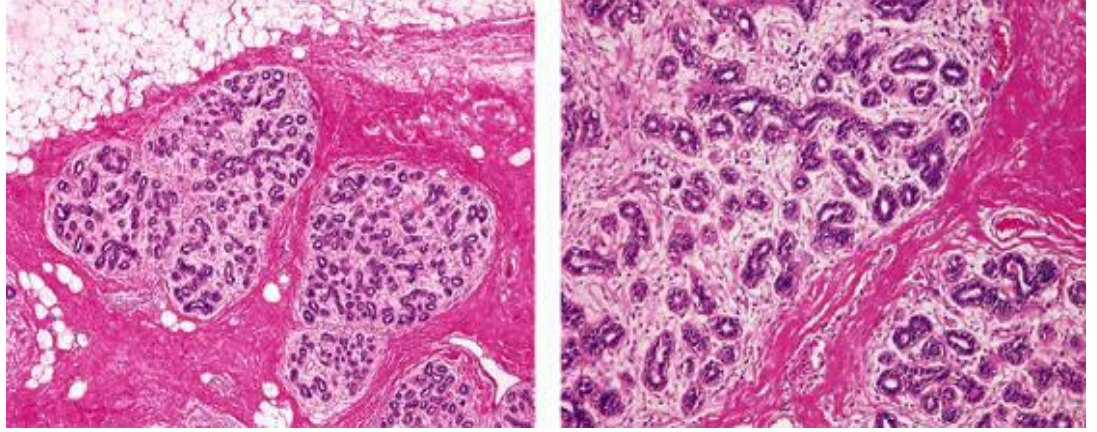
Gestasyonun 5. haftasında ektoderm katlantıları; fetüsün ön yüzüne yerleştiğinde meme dokusu gelişmeye başlar ve 15. Haftadan sonra, testosterona karşı duyarlılık başlar. Testosterona bağlı mezenkim, toraks ön duvarında memenin gelişeceği alanda epitelyal tomurcuğun etrafına yoğunlaşır. Sonrasında lobları oluşturan solid epitel ada uzanımları mezenkim içine girer. Bu alandaki

kollajenden zengin retiküler dermisde, meme dokusunun deriye tutunmasını sağlayan Cooper ligamentini oluşturmak üzere meme parankimi içine uzanır. 20. ve 32. haftalar arasında ise mezenkimin bir kısmı adipöz dokuya dönüşür. Gestasyonun 32. haftasından sonra ise epitelyal adalar lobüloalveolar yapıları oluşturmak üzere dallanırlar. Doğumdan birkaç hafta öncesinde fetüsün meme dokusu maternal ve plasental steroid hormonlara duyarlılık kazanır ve asiner yapılardaki epitelyal hücreler sekretuar aktivite gösterirler (14).

2.3. Meme Histolojisi

Meme histolojik olarak duktus ve lobül olmak üzere iki ana yapıdan, luminal ve miyoepitel olarak iki çeşit epitelyal hücreden, interlobüler ve intralobüler olmak üzere iki tip stromal yapıdan oluşur. Meme parankimi farklı oranlarda fibröz, lipomatöz dokudan oluşan stroma ile çok sayıda duktal ve lobüler asiner yapı içermektedir (Şekil 2). Luminal hücreler CK7, CK19, CK8, ve CK18 (düşük molekül ağırlıklı sitokeratinler) ile immünekspresyon gösterirler. Ayrıca EMA ve GCDFP-15 ile pozitif boyanırlar. Miyoepitelyal tabakadaki hücreler çeşitli morfolojide görülebilir. Bunlar başlıca; epiteloid, içsi, plazmositoid ve berrak morfolojidir. H&E kesitlerde çok belirgin olmadıkları durumlarda immünhistokimyasal olarak p63, S100, SMA, kalponin, kaldesmon, maspin, CD10 gibi miyoepitel hücre belirteçleri ile pozitiflik gösterilebilir. Ayrıca bu hücreler CK14, CK5/6 ve CK17 (yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinler) ile immünekspresyon gösterirler

Her bir segment dallanan bir yapı gösterir. Lobüller bir araya gelerek duktül ve duktuslara açılır, duktuslar birleşerek ana toplayıcı duktuslara ve son olarak meme başına açılır. Laktiferöz sinüsler ise meme başının altındaki ana duktusların genişlemesi ile oluşur. Memenin fonksiyonel ve yapısal birimi olan Terminal Duktuler Lobüler Ünite'yi (TDLU) lobül ile birlikte terminal duktus oluşturur. İn-situ duktal karsinom, kistler ve duktal epitelyal hiperplazi gibi meme lezyonlarının birçoğunun temel olarak TDLU'dan geliştiği bilinmektedir.



Şekil 2: Normal meme lobülünün H&E kesiti (Collins LC, Schnitt SJ. *Breast. In: Mills SE, Sternberg SS, eds. Histology for Pathologists. 3 ed. New York: Lippincott Williams and Wilkins, 2004:55-71*)

2.4. MEME TÜMÖRLERİ

Meme tümörleri çoğunlukla duktal ve lobüler epitelden gelişmekte olup stromal ve daha nadir lenfoid dokudan kaynaklanabilir.

İnvaziv meme tümörlerinin çoğu epitelden köken almakta olup adenokarsinom niteliğindedir. İn-situ karsinom; bazal membranı aşmamış malign epitelyal hücrelerin varlığı olarak tanımlanırlar, duktal ve lobüler olmak üzere iki gruba ayrılır. Meme karsinomunun TDLU'dan köken aldığı düşünülmektedir. Meme karsinomların çok farklı morfolojik fenotipleri ve spesifik histopatolojik alt tipleri mevcuttur. Bu grupların kendilerine özgü klinik bulguları veya prognostik özellikleri vardır (15).

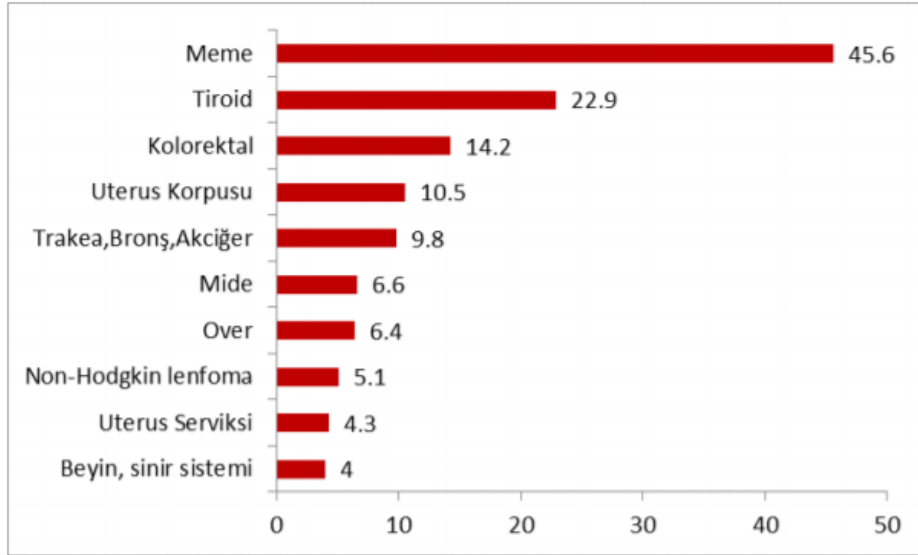
2.4.1. Epidemiyoloji

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen malign tümör olup kadınlarda tüm kanserlere bağlı ölümlerin yaklaşık 1/5'ini oluşturmaktadır (3). Meme kanserinin teşhisi ve tedavisindeki önemli gelişmelere rağmen, 2018'de teşhis edilen yaklaşık 2,1 milyon yeni vaka tespit edilmiştir. Kadınlarda yaşamı en çok tehdit eden hastalık olmakla birlikte kadınlarda tüm kanserlerin % 25'ini oluşturmaktadır. Cerrahi eksizyon, adjuvan kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilere karşın yılda 600,000 kadının meme karsinomundan öldüğü saptanmıştır (1).

Gelişmiş ülkelerde kadınlarda; kanserden ölümlerin ikinci en sık sebebi meme kanseridir. Ancak mamografik görüntülemeler ile kanser taramasının

artmasına bağlı erken tanı ve adjuvan kemoterapötiklerin uygulamasının sonucunda son senelerde hasta sağkalım oranlarında istikrarlı bir artış mevcuttur (16).

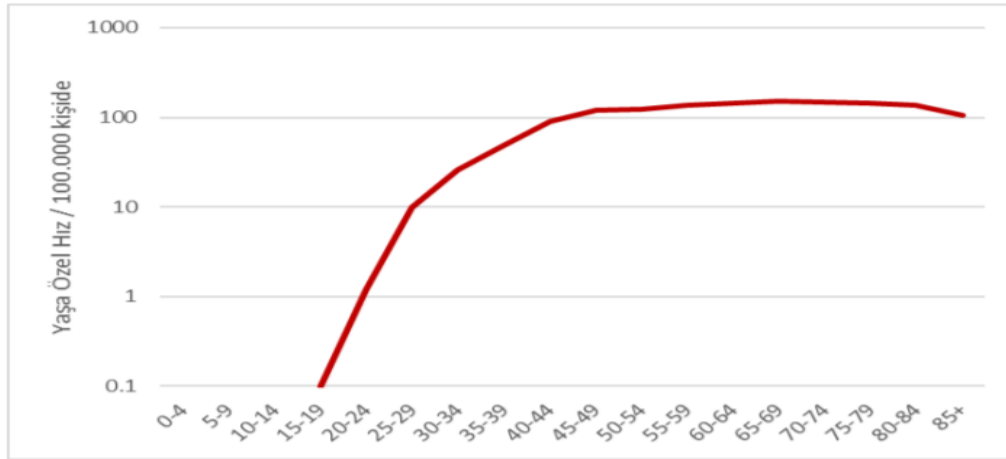
Bizim ölkemizde kanser kayıtlarına bakılırsa; *Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı* 2016 yılı verilerine göre kadınlarda en sık rastlanan kanser türü meme karsinomu olup insidansı %45,6'dır (17) (Şekil 4).



Şekil 3: Kadınlarda En Sık Görölen 10 Kanserın Yaş a Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleş ik Veri Tabanı, 2016) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kiş ide)

(https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf)

Ölkemizde bir sene içerisinde toplam 17.531 kadına meme karsinomu tanısı verilmiştir. Yaş la birlikte görülme sıklığı artmakta olup 25 yaş öncesinde nadir görölmektedir (17) (Şekil 5).



Şekil 4. Meme kanserinin kadınlarda yaşa özel hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2016'dan alınmıştır)
(https://hsqm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf)

Meme kanserinin prognozu diğer birçok malign tümöre göre daha iyidir. Özellikle gelişmiş ülkelerde meme kanseri taramasının artması ve yeni tedavi uygulamalarının yaygınlaşmasıyla sağkalım oranları artmıştır. Tüm evreler için meme kanserli hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı %88,8'dir (17).

Bir senede yaklaşık 15,000 yeni meme karsinomu tanısının konulduğu ülkemizde, veri tabanına göre invaziv tümörlerin sadece %11,5'i tanı sırasında uzak metastaza sahiptir (18).

2.4.2. Etiyoloji

Meme kanseri için en iyi bilinen risk faktörleri; genetik, çevresel ve endokrin faktörlerdir (19).

- *Aile öyküsü:* Meme kanserli hastaların 1/5'inde ailede meme kanseri hikayesi mevcut olup bu hastaların ¼'ünde otozomal dominant geçiş mevcuttur. Birinci derecede yakınlarında meme kanseri hikayesi olanlarda çok daha fazla artmış risk söz konusudur. Ayrıca aile hikayesi olan kadınlarda meme kanseri daha erken yaşta görülmekte ve bilateral olma ihtimali daha sıktır (20).
- *Yaş:* Yaş ilerledikçe meme karsinomu insidansı ve mortalite artmaktadır. 25 yaşın altında meme kanseri belirli familial vakalar dışında oldukça nadir

görülür. Tanı sırasında ortalama yaş 64 olup vakaların %77'si 50 yaşından sonra görülür (21).

- *Geçirilmiş meme kanseri öyküsü*
- *Hormonlar:* Endojen olarak östrojen ve progesteron hormonuna maruz kalmak meme kanseri riskinin artışında en önemli sebeplerden biridir (22).
- *İleri ilk doğum yaşı (>35 yaş)*
- *Erken menarş ve geç menopoz*
- *Emzirmeme*
- *Oral kontraseptif kullanımı*
- *Obezite*
- *Beyaz ırk*
- *Nulliparite*
- *Epitelyal meme lezyonları ve fibrokistik değişiklikler*
 - Kistler, hafif hiperplazi, duktal ektazi, adenozis, apokrin değişiklikler ve kompleks özellik içermeyen fibroadenom; karsinom riskinde artış yoktur.
 - Orta derecede ya da florid hiperplazi, sklerozan adenozis, radyal skar, kompleks özellikli fibroadenom ve papillom; yaklaşık 1,5-2 kat risk artışı mevcuttur.
 - Atipili duktal veya lobular hiperplazi; 5 kat risk artışı mevcuttur.
 - İn-situ lobuler veya duktal karsinom; yaklaşık 8-10 kat risk artışı mevcuttur (23).
- *Radyasyona maruziyet*
- *Germline mutasyonlar:* Ailesel meme kanseri ile ilgili bilinen mutasyonların olduğu genlerden bazıları; BRCA1 ve BRCA2 (ailesel meme ve over kanserleri), TP53 (Li-Fraumeni sendromu) ve PTEN 'Phosphatase and tensin homolog' (Cowden sendromu). Bu genler, tümör baskılayıcı genlerdir ve DNA hasarının onarılmasında önemli rolleri mevcuttur. Ailesel meme kanseri bütün meme karsinomu vakalarının yaklaşık %5-10'unu oluşturmakta olup 1/2'sinde BRCA1 ve 1/3'ünde ise buna ek olarak BRCA2 geninde mutasyon görülmektedir (24). *BRCA1* veya *BRCA2* geni mutasyonları taşıyan bir kadın için meme kanserine yakalanma riski %40-80 civarındadır. Bu da yaklaşık beş kat artmış bir riske işaret etmektedir.

- **Beslenme:** Yağdan zengin diyetle beslenenlerde, çok kahve tüketenlerde ve fazla miktarda alkol (>10g/gün) alanlarda risk artmaktadır.

2.4.3. Prognostik Faktörler

1. Yaş
2. Tümör boyutu
3. Lokal ileri evre hastalık
4. Lenfovasküler invazyon
5. Perinöral invazyon
6. Uzak metastaz
7. Derecelendirme: İnvaziv meme karsinomları Modifiye Bloom-Richardson derecelendirilme sistemi ile derecelendirilirler (25) (Tablo 1).

Tablo 1: İnvaziv meme tümörlerinin derecelendirmesi

Tübül /gland formasyonu:	Skor
- %75'den daha fazla	1
- %10-%75 arasında	2
- %10'dan daha az	3
Nükleer pleomorfizm	
- Küçük, düzenli uniform hücreler	1
- Çap ve şekillerde orta derecede farklılık	2
- Çap ve şekillerde belirgin derecede farklılık	3
Mitotik oran	
- 0-7 mitoz/10 BBA	1
- 8-16 mitoz/10 BBA	2
- >17 mitoz/10 BBA	3
Derece 1: Skor 3, 4 ve 5	
Derece 2: Skor 6 ve 7	
Derece 3: Skor 8 ve 9	

8. Histolojik alt tip
9. Evreleme: TNM evrelemesinde AJCC sistemi kullanılmakla birlikte 2019 yılında güncellenmiştir (Tablo 2) (Tablo 3) (26).

Tablo 2: AJCC 2019 meme kanseri pTNM evrelemesi

Tx: Primer tümör ölçülemiyor
T0: Primer tümöre ait kanıt yok
Tis: İn-situ karsinom Tis (DCIS): İn-situ duktal karsinom Tis (LCIS): İn-situ lobüler karsinom Tis (Paget): Meme parankiminde in-situ karsinom veya invaziv tümör ile ilişkili olmayan meme başının Paget hastalığı
T1: Tümörün en büyük çapı 2 cm veya daha küçük T1mi: 0,1 cm veya daha küçük çapta mikroinvazyon T1a: 0,1 cm'den büyük, 0,5 cm'den küçük T1b: 0,5–1 cm arasında T1c: 1–2 cm arasında
T2: Tümörün en büyük çapı 2-5 cm arasında
T3: Çap 5 cm veya 5 cm'den daha büyük
T4: Tümör her çapta olabilir. Göğüs duvarı veya cilde direkt yayılım mevcut T4a: Göğüs duvarına yayılım var. T4b: Meme cildinde ödem, ülserasyon ya da aynı taraf meme derisinde satellit nodül var. T4c: T4a ve T4b birlikte T4d: İnflamatuvar karsinom
Nx: Bölgesel lenf nodu değerlendirilemiyor
N0: Histolojik olarak lenf nodu metastazı izlenmedi N0 (i-): Histolojik olarak lenf nodu metastazı yok, İHK negatif N0 (i+): Tümör hücreleri 0,2 mm'den küçük ve 200 hücreden az N0(mol+): İzole tümör hücresi tespit edilmeyen RT-PCR ile pozitif moleküler bulgular
N1mi: Mikrometastaz (0,2 mm'den veya 200 hücreden fazla ancak 2 mm'den az) N1a: 1-3 aksiller lenf nodu pozitif (en az bir metastazın 2 mm'den büyük) N1b: İnternal mammarian lenf nodlarında klinik olarak saptanamayan fakat SLNB ile saptanan makro ya da mikro metastaz varlığı N1c: Aksiller lenf nodlarında 1-3 metastaz ve klinik olarak saptanamayan fakat SLNB ile makro ya da mikro metastazlı internal mammarian lenf nodu metastaz varlığı
N2a: 4-9 aksiller lenf nodu pozitif (en az bir lenf nodu 2 mm'den büyük) N2b: Aksiller lenf nodu metastazının yokluğunda klinik olarak saptanmış internal mammarian lenf nodu metastazı
N3a: 10 veya daha fazla lenf nodu pozitif (en az bir lenf nodu 2 mm'den büyük) ya da infraklaviküler lenf nodlarında metastaz N3b: Bir ya da daha fazla pozitif aksiller lenf nodunun varlığında klinik olarak saptanmış ipsilateral internal mammarian lenf nodu metastazı; ya da 3 ten fazla aksiller lenf nodu ve klinik olarak saptanmamış fakat SLNB ile makro ya da mikro metastaz saptanmış internal mammarian lenf nodu metastazları N3c: İpsilateral supraklaviküler lenf nodlarına metastaz
M0: Uzak organ metastazı yok M1: Uzak organ metastazı var (histolojik olarak en az 0,2 mm)

Tablo 3: TNM'e göre meme karsinomu evrelemesi

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1	N0	M0
Evre IB	T0, T1	N1mi	M0
Evre IIA	T0, T1 T2	N1 N0	M0
Evre IIB	T2 T3	N1 N0	M0
Evre IIIA	T0, T1, T2 T3	N2 N1, N2	M0
Evre IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Evre IIIC	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

10. Nekroz varlığı

11. Tümör hücrelerinin proliferasyon kapasitesi

12. Mikrodamar yoğunluğu

13. Hormon reseptör profili: ER ve PR durumu tedavi şansı için önemli bir role sahiptir. ER ve/veya PR pozitif ise adjuvan olarak tamoksifen tedavisi kullanılır (15).

14. HER2 gen onkojen tayini

15. Diğer: Elastozis varlığı, cerrahi sınırların durumu, BRCA1 mutasyonu, p53 mutasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (21).

2.4.4. Meme tümörlerinin sınıflandırılması

Meme tümörlerinin sınıflandırmasında Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) en son 2019 yılında yayınladığı sınıflandırma kullanılmaktadır (15) (Tablo 4). En büyük grubu invaziv meme karsinomu, NOS ('invasive carcinoma of no special type') oluşturmaktayken, diğer tüm epitelyal karsinomlar 'özel alt tipler' olarak gruplandırılmıştır (Tablo 5).

Tablo 4: Meme tümörlerinin sınıflandırması

I. Epitelyal Tümörler -Benign epitelyal proliferasyonlar ve prekürsörler -Adenozis ve benign sklerozan lezyonlar -Adenomlar -Epitelyal-miyoepitelyal tümörler -Papiller neoplazmlar -İnvaziv olmayan (non-invaziv) lobüler neoplaziler -İn situ duktal karsinom -İnvaziv meme karsinomu -Tükürük bezi tipi tümörler -Nöroendokrin neoplaziler
II. Mezenkimal Tümörler
III. Fibroepitelyal Tümörler ve Hamartomlar -Fibroadenom -Filloides Tümör -Hamartom
IV. Meme Başı Tümörleri -Meme başı adenomu -Siringomatöz Tümör -Meme başının Paget hastalığı
V. Hematolenfoid Tümörler
VI. Metastatik Tümörler
VII. Erkek Meme Tümörleri -Jinekomasti -İn-situ karsinom -İnvaziv Karsinom

Tablo 5: İnvaziv meme karsinomlarının sınıflandırılması

İnvaziv meme karsinomu, NOS	-İnfiltratif duktal karsinom -Onkositik karsinom -Lipidden zengin karsinom -Glijojenden zengin karsinom -Sebaseöz karsinom
Mikroinvaziv Karsinom	Tümör çapı ≤ 1 mm
İnvaziv Lobüler Karsinom	-Klasik lobüler karsinom -Pleomorfik lobüler karsinom
Metaplastik karsinom, NOS	-Düşük dereceli adenoskuamöz karsinom -Fibromatozis benzeri metaplastik karsinom -Skumöz hücreli karsinom -İğsi hücreli karsinom -Heterolog mezenkimal diferansiyasyon gösteren metaplastik karsinom -Mikst metaplastik karsinom
Tübüler karsinom Kribriform karsinom Müsinöz karsinom Müsinöz kistadenokarsinom Apokrin diferansiyasyon gösteren karsinom İnvaziv mikropapiller karsinom	

Tükürük bezi-tipi tümörler	-Asinik hücreli karsinom -Mukoepidermoid karsinom -Polimorföz adenokarsinom -Adenoid kistik karsinom -Sekretuar karsinom -Uzun hücreli karsinom
-----------------------------------	--

Diğerlerine göre nispeten daha sık görülen invaziv meme karsinomlarının histomorfolojik ve moleküler özellikleri;

- **İnvaziv meme karsinomu, (NOS):**

İnvaziv meme karsinomu (İMK), NOS, başlıca diğer histolojik alt tiplerin ekartasyonu ile tanı verilen meme karsinomlarının en sık görülen tipidir. Histomorfolojik bulgular oldukça heterojen olup, tümör hücreleri; iyi oluşmuş glandüler yapılar, kordonlar, yuvalanmalar veya çeşitli boyutta trabeküler yapılar ya da solid adalar şeklindedir. Özellikle tümörün perifer kısımlarında tek hücre infiltrasyonu görülebilir. Bazı invaziv meme karsinomları özel bir alt tip içerebilir. Bu özel tip %10-90 arasında ise ‘mikst invaziv meme karsinomu, NOS ve özel alt tip karsinom’ terimi kullanılabilir. Örneğin; ‘mikst invaziv meme karsinomu, NOS ve müsinöz karsinom’. %10’un altında bir özel alt tip mevcut ise tanı; invaziv meme karsinomu, NOS olur, %90’dan fazla özel alt tip var ise özel alt tipe göre tanı verilir (15).

Özel morfolojik paternleri:

1. Medüller patern
2. Nöroendokrin diferansiasyonlu invaziv karsinom
3. Osteoklast benzeri stromal dev hücreli karsinom
4. Pleomorfik paternli
5. Koryokarsinomatöz özellikli karsinom
6. Melanotik patern
7. Onkositik patern
8. Lipidden zengin patern
9. Glikojenden zengin berrak hücreli patern
10. Sebasöz patern

- **Mikroinvaziv karsinom:**

İnvaziv meme karsinomu 1 mm veya daha küçükse bu tanı verilir. Ancak tümör tipi belirtilmelidir (27).

- **İnvaziv lobüler karsinom (İLK):**

Bütün invaziv meme tümörlerinin %5-15'ini oluşturmakta olup çoğunlukla insitu lobüler karsinom (LKİS) ile beraberdir (28).

Histomorfolojik olarak;

1. Klasik tip: En sık görülen alt tip olup tümörün stroması içerisine tek hücre dizilimi gösteren, lineer kordonlar ve diskoheziv görünümde atipik hücrelerin infiltrasyonu mevcuttur. Malign hücreler genellikle oval nükleuslu, belirsiz nükleollüdür. Bu tip İLK'lar çoğunlukla (yaklaşık %76 oranında) derece 2'dir. Derece 3 olan İLK'lar genel olarak klasik alt tip değildir (28).

2. Pleomorfik tip

İLK'larda ER'nin pozitiflik oranı yaklaşık %80-95 oranında olup PR ise %60-70 oranında pozitifdir. HER2 pozitifliği nadir olarak görülmektedir. İHK'sal olarak miyoepitelyal (p63, SMA), bazal (CK14, CK5/6) belirteçler ve p53 çoğunlukla negatifdir. Olguların yaklaşık %85-100'ünde e-kadherin kaybı izlenmektedir. Bu sebeple %15 civarındaki olgularda e-kadherin ile İHK'sal olarak pozitif saptanması İLK'u ekarte ettirmez (29). İLK'ların patogeneğinde en sık rastlanan somatik genomik değişiklikler; 16q kromozom kolu kaybı (neredeyse tüm vakalarda görülür), *CDH1* mutasyonları (%50-80) ve *PIK3CA* mutasyonlarıdır (~ %45) (30).

- **Tübüler karsinom:**

Bütün invaziv meme tümörlerinin yaklaşık %2'sini meydana getirmektedir. Tümör hücreleri iyi diferansiye, oval yuvarlak şekilli ve anguler görünümde tübül formasyonları ile karakteristik histomorfolojik görünüme sahiptirler. Tübül formasyonları tüm tümörün en az %90'ını oluşturması gerekmektedir. Eğer tübül yapısı %10-90 arasında olur ise tanı mikst karsinomdur ve eşlik eden komponent tanıda belirtilmelidir. İHK'sal olarak tübüler karsinomlar çoğunlukla ER, PR pozitif iken c-erb B2, EGFR, p53 ve HMWCK negatifdir (31).

- **Metaplastik Karsinom:**

Neoplastik epitelin yassı epitel hücreli veya içsi, rabdoid, kondroid, osseöz hücreler gibi mezenkimal farklılaşmasıyla karakterize bir tümördür. Tüm invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %0,2-5'i metaplastik karsinomlar oluşturmaktadır. İHK'sal olarak vakaların %90'ı üçlü negatifdir (32). TP53 ve PIK3CA mutasyonu

oldukça sık görülmektedir. Skuamöz metaplazi ve iğsi hücre morfolojisi bulunan metaplastik karsinomlarda EGFR overekspresyonu ve mutasyonu rapor edilmiştir (33). Patogeneizde özellikle PI3K yolağı (*PIK3CA*, *PTEN*), MAPK yolağı (*NF1*, *KRAS* ve *NRAS*) ve WNT yolağı aktiftir (34).

- **İnvaziv mikropapiller karsinom:**

Mikropapiller komponent mevcut olduğunda o bölgelerde *MYC* (%33), *CCND1* (%8) ve *FGFR1* (%17) amplifikasyonu rapor edilmiştir. Veriler sınırlı olsa da *PIK3CA*, *TP53*, *GATA3*, *MAP2K4* ve *MBPF10* mutasyonları mevcuttur (35).

- **İnvaziv Papiller Karsinom:**

İnvaziv tümör %90'ın üzerinde papiller morfoloji izlenen tümörlerdir. Bu tümörler temel olarak ovaryan seröz karsinomun, akciğer papiller karsinomun ve tiroit papiller karsinomun metastazları ile ayırıcı tanıya girer (36).

- **Apokrin diferansiasyon gösteren karsinom:**

Fokal apokrin diferansiasyon invaziv meme karsinomunun sık görülen bir özelliğidir ancak yaygın olarak apokrin diferansiasyon meme tümörlerinin yaklaşık %4'ünde görülür. Tümör hücreleri; geniş nükleuslu ve belirgin nükleollü, belirgin eozinofilik ve granüler sitoplazmalıdır. Sitoplazma, diastaza dirençli periodik-asit-Schiff (PAS) pozitifliği gösterir. İHK'sal incelemede tipik olarak GCDFP-15 pozitifken BCL-2 negatiftir. ER ve PR sıklıkla negatif olup androjen reseptörü (AR) pozitifdir (37). Bu tümörler sıklıkla *TP53* ve *PIK3CA/PTEN/AKT* genlerinde mutasyon gösterirler. MAPK yolağı (*KRAS*, *NRAS* ve *BRAF*) daha az sıklıkla mutasyonedir (38).

2.4.5.İmmünohistokimyasal değerlendirme

Meme karsinomlarının prognostik ve prediktif faktörlerden immünohistokimyasal - moleküler olarak değerlendirilebilen belirteçler; ER, PR, c-erbB2 (HER2) ve Ki-67'dir. Bunların ekspresyon durumlarının belirlenmesi neoadjuvant, adjuvan tedavinin belirlenmesinde, prognozun ön görüşünde kritik öneme sahiptir. Bilateral meme kanserlerinde her iki tümöre, tümörler multisentrik-multifokal olduğu durumlarda; morfoloji benzer ise en büyük çaptaki tümöre, morfoloji farklı ise her bir tümöre ayrı bu dört belirteç çalışılmalıdır (39).

ER ve PR immünohistokimyasal değerlendirilmede pozitif olan tümör hücre yüzdesi ve boyanma yoğunluğuna dayanan ‘Allred skoru’ kullanılır (40) (Tablo 6).

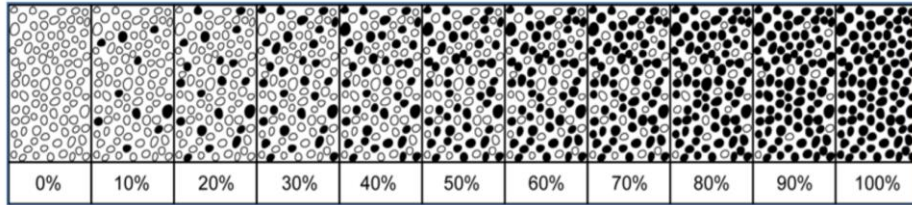
Tablo 6: ER ve PR’nin Allred skoru sistemi

Pozitif Tümör Hücrelerinin Yüzdesi	Skor	Boyanma yoğunluğu	Skor
0	0	Hiç yok	0
<%1	1	Zayıf, soluk	1
%1-10	2	Orta şiddette	2
%11-33	3	Güçlü	3
%34-66	4		
≥%67	5		

*Toplam skor 0-2: Negatif

*Toplam skor: 3-8: Pozitif

Ki-67’nin İHK’sal yöntemle değerlendirilirken doğru sonuç için en yoğun olduğu bölgeden (hot spot), nükleer pozitiflik gösteren hücrelerin yüzdesi ile belirlenir (41) (Şekil 5).



Şekil 5: Ki-67 ile pozitif olan tümör hücrelerinin yüzdesini görsel olarak tanımlama

c-erbB2; ilk olarak sıçan nöral hücrelerinden elde edildiği için ‘NEU’ olarak da adlandırılır. Meme kanserlerinin %15-20’si c-erbB2 ekprese etmektedir (39).

Tablo 7: HER2’nin İHK’sal olarak değerlendirilmesi

Skor 0 (negatif) Boyanma yok ya da invaziv tümör hücrelerinin %10 veya daha azında sitoplazmik membranı tümüyle çevrelemeyen, zayıf, güçlükle seçilebilen boyanma
Skor 1+ (negatif) İnvaziv tümör hücrelerin %10’undan fazlasında sitoplazmik membranı tümüyle çevrelemeyen, zayıf, güçlükle seçilebilen boyanma
Skor 2+ (şüpheli) İnvaziv tümör hücrelerin %10’undan fazlasında sitoplazmik membranı tümüyle çevreleyen, zayıf-orta şiddette boyanma ya da tümöral hücrelerin %10 veya daha azında sitoplazmik membranı tümüyle çevreleyen, kuvvetli boyanma
Skor 3+ (pozitif) Tümöral hücrelerin %10’undan fazlasında sitoplazmik membranı tümüyle çevreleyen, kuvvetli boyanma

İHK'sal olarak 'skor 2+' olarak değerlendirilen tümörde, aynı materyalde refleks in-situ hibridizasyon testi yapılır. Floresan mikroskopta FİSH yöntemiyle ya da ışık mikroskopunda CISH ya da SISH yöntemleriyle değerlendirme yapılabilir (Tablo 8). Değerlendirme mümkünse 3 farklı alanda en az 20-60 invaziv tümör hücresinde sinyal sayımı yapılmalıdır. Heterojen olan tümörlerde bu sayı artırılmalıdır (42).

Tablo 8: İnvaziv meme karsinomlarında HER2'nin in-situ hibridizasyon ile değerlendirilmesi

Sonuç	Single Probe	Dual Probe
Negatif (amplifikasyon yok)	Ortalama HER2 kopya sayısı <4	HER2/CEP17<2 ve ortalama HER2 kopya sayısı <4
Şüpheli*	Ortalama HER2 kopya sayısı ≥ 4 ve <6	HER2/CEP17<2 ve ortalama HER2 kopya sayısı ≥ 4 ve <6
Pozitif (amplifikasyon var)	Ortalama HER2 kopya sayısı ≥ 6	HER2/CEP17 ≥ 2 ya da ortalama HER2 kopya sayısı ≥ 6

*Single probe kullanıldı ise refleks ISH testi ya da yeni test (İHK, İSH) yapılır. Dual probe kullanıldı ise refleks İHK testi, alternatif CEP17 problu İSH testi yapılır.

2.4.6. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması

Meme tümörleri; histomorfolojik, prognostik ve verilen tedaviye yanıt verme açısından oldukça farklı olan heterojen bir gruptur. Bu heterojenite sebebi olarak; tümörün kaynaklandığı hücrelerin farklılığı, birbirinden farklı onkogenlerin aktivasyonu veya tümör supresor genlerin inaktivasyonundaki farklı kombinasyonlar bulunmaktadır. Ancak uzun bir süre histomorfolojik temelli bir sınıflandırmaya göre hareket edilmiştir.

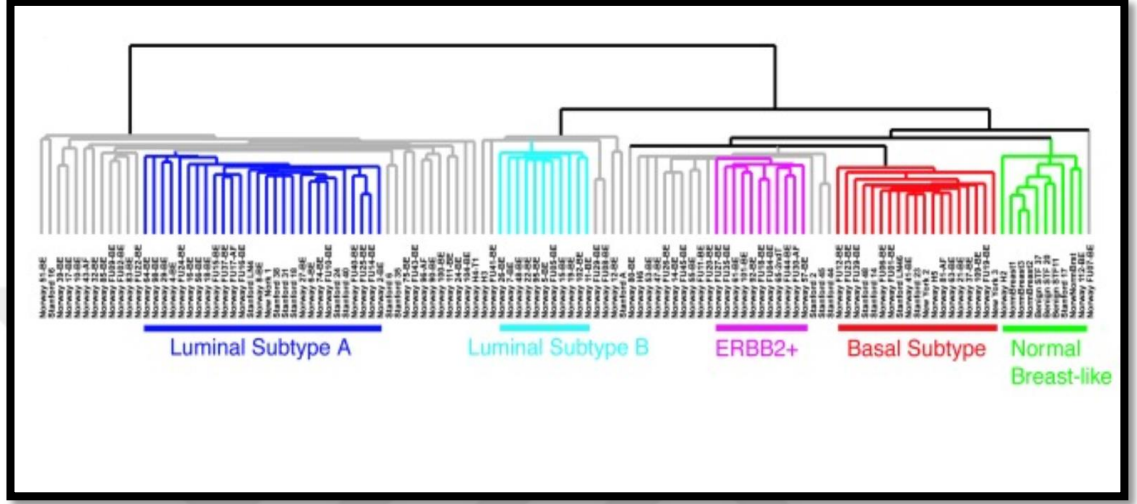
Son 20 senede moleküler çalışmalar oldukça hız kazanmış olup cDNA mikroarray yöntemi ile çok sayıda genin eş zamanlı değerlendirilerek tümör dokusundan gen ekspresyon profili çıkarılma imkanı doğmuştur. Bu çıkarılan profil ile meme karsinomlarında yeni bir moleküler sınıflama yapılmıştır.

Sporadik olarak gelişen meme karsinomları arasında gen ekspresyon farklılıklarını saptayan ilk geniş çalışma ve çığır açan sınıflandırma, 2000 senesinde Sorlie, Perou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilerek meme kanserleri dört ana gruba ayrıldı (43):

1. Luminal benzeri
2. Bazal hücre benzeri

3. Normal epitel benzeri (null tip)
4. HER2 pozitif grup

Sonraki çalışmalarda luminal benzeri grup kendi içerisinde luminal A ve luminal B olmak üzere iki alt tip daha oluşturuldu (Şekil 6). Meme kanserinin bu alt moleküler gruplarının gen ekspresyon farklılıkları doğrulandı (44).



Şekil 6: Meme kansinömlerinin intrinsek gen analizi. Perou ve arkadaşlarının 115 tümör dokulu örnekten alınarak hazırlanan meme kansinomu vakalarında intrinsek gen seti hazırlanarak yapılan gen ekspresyon profili sonucunda oluşan 5 alt grup (44)

Moleküler alt tiplerin prognoza etkilerinin önemi anlaşıldıktan sonra, bu tipleri daha ucuz ve kolay yolla saptayabilmek amacıyla İHK'sal incelemeler yapılmıştır. DNA mikroarray yöntemi ile karşılaştırılarak; sınıflama için uygulanabilecek en iyi İHK antikorları belirlenmiştir. DNA mikroarray yöntemi ve İHK'sal inceleme ile yapılan sınıflama; hormon reseptörleri ve HER2'yi kullanan moleküler kaynaklı bir sınıflandırmadır. (Tablo 9) (45).

Tablo 9: Meme karsinomu moleküler alt tiplerinin immünofenotipik özellikleri

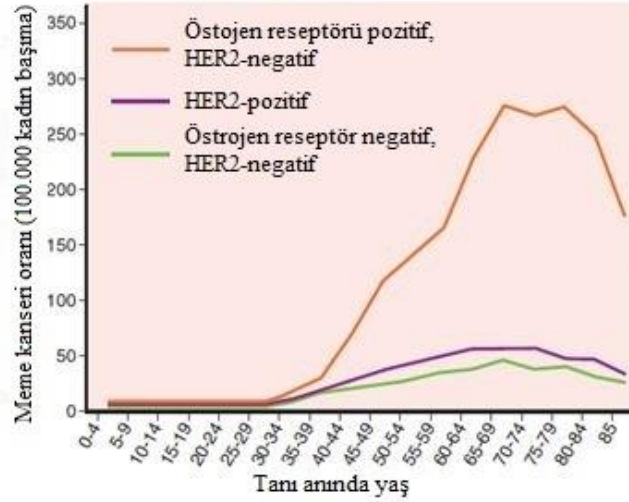
İntrensek alt tip	Klinikopatolojik Tanım
Luminal A	Luminal A -ER ve/veya PR pozitif -HER2 negatif -Ki-67 düşük (<%14)
Luminal B	Luminal B (HER2 negatif) -ER ve/veya PR pozitif -HER-2 negatif -Ki-67 yüksek ≥%14) Luminal B (HER2 pozitif) -ER veya PR pozitif -Ki-67 düşük veya yüksek -HER2 eksprese
Her2'yi aşırı eksprese eden	HER2'den zengin (luminal olmayan) -HER2 aşırı eksprese -ER ve PR negatif
Bazal benzeri tip	Üçlü negatif (duktal) -ER ve PR negatif -HER2 negatif -EGFR ve veya CK5/6 pozitif
Normal meme benzeri	Üçlü negatif -ER ve PR negatif -HER2 negatif

Çoğunlukla bazal benzeri tipi luminal benzeri alt tipinden ayırmak için EGFR ve CK 5/6 gibi miyoepitelyal belirteçler kullanılmıştır. ER, PR, HER2'ye ek olarak EGFR ve CK5/6'dan oluşan bu beşli İHK paneli; bazal benzeri tipi tanımlar ve yaşam süresini daha iyi ön görmeyi sağlar (46). Bu beşli İHK panelinin bazal benzeri alt tipi tanımlamada özgüllüğü %100, duyarlılığı %76 saptanmıştır (47). Değişik sınıflamalarda, antikor immünekspresyonu saptanmayan vakalar 'null tip' olarak kabul edilmiştir (46). Ancak 'null tip'in farklı bir alt tip olmadığı, miyoepitelyal belirteçler ile zayıf boyanan bazal benzeri tip olduğu veya ER ile teknik yetersizlikler sebebiyle yeterli immünekspresyon göstermeyen tümörlerin de bu alt tipe alındığını savunan araştırmacılar vardır (47).

Klinik olarak en kullanışlı sınıflandırma sisteminde meme kanserleri, hormon reseptörlerinin, ER ve PR ve HER2'ye dayalı olarak üç ana gruba ayrılır:

- ER pozitif (HER2 negatif; kanserlerin% 50-65'i)
- HER2 pozitif (ER pozitif veya negatif;kanserlerin% 20'si)
- Üçlü negatif (ER, PR ve HER2 negatif kanserlerin % 15'i)

Bu üç grup; hasta özellikleri, patolojik özellikler, tedaviye verdikleri cevap, metastatik paternler, nüks süresi gibi birçok sonuçta çarpıcı farklılıklar göstermektedir (Şekil 7) (Tablo 10) .



Şekil 7: Yaşa ve insidansa göre meme kanseri alt tipleri (Kumar V, Abbas AK, Aster JC, eds. *Robins Basic Pathologic. 10. ed.*'dan uyarlanmıştır)

Tablo 10: Meme kanserlerinin ana biyolojik tiplerinin özellikleri

	ER pozitif/ HER2 negatif	HER2 pozitif	Üçlü negatif
Görülme sıklığı	%50-65	%20	%15
Tipik hasta grupları	Yaşlı kadın-erkekler, germline BRCA2 mutasyonu	Genç kadınlar, germline p53 mutasyonu	Genç kadınlar, germline BRCA1 mutasyonu
Histolojik derece	Çoğunlukla derece 1-2	Çoğunlukla 2-3	Çoğunlukla 3
Sık görülen histolojik tipler	Lobüler, tübüler, müsinöz, papiller	Apokrin, mikropapiller	Medüller özellikler gösteren tip
Yaygın somatik mutasyonlar	PIK3CA (40%), TP53 (26%)	TP53 (75%), PIK3CA (40%)	TP53 (85%)

Üçlü negatif meme kanserleri (ÜNMK) tüm İMK'lerinin %10-20'ini oluşturmaktadır. Lenf düğümü tutulumunun sık olması, tümör çapının büyük olması, genç yaşta ortaya çıkması, histolojik derecenin yüksek olması gibi kötü prognostik faktörlerle ilişkilidir. Bu tümörler genç yaşta ortaya çıktığı için az bir kısmı mamografik görüntülemeye saptanmaktadırlar. Uzak metastaz ve rekürrens riski daha yüksektir. (48). Hedefe yönelik tedavi şansının olmayışı, agresif davranışı ve kötü prognoz sergilemesi gibi sebeplerden dolayı ÜNMK'li hastaların yönetimi oldukça zordur ve spesifik bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Bu tümörlerde

sitotoksik sistemik kemoterapi tedavide tek seçenek olduğu için bu hastalar özellikle geliştirilmiş hedefe yönelik tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır (49). Tüm bu nedenlerden dolayı son zamanlarda ÜNMK'li hastalarda hedefe yönelik tedavi şansı için yapılan araştırmalar artmaktadır.

HER2'den zengin alt tip, HER2 ve proliferasyonla ilişkili genlerin, proteinlerin (örn; ERBB2/HER2 ve GRB7) yüksek ekspresyonu ile seyreden hormon reseptörlerinin negatif olduğu moleküler tiptir. Tüm İMK'ların yaklaşık %15-20'sini oluştururlar. Bu tümörler DNA düzeyinde çok sayıda mutasyon içermekte olup; %72'sinde p53, %39'unda *PIK3CA* mutasyonu saptanmıştır. Genellikle kötü diferansiye olup ve proliferasyon indeksleri oldukça yüksektir. Beyin metastazı yaygın görülür. Bu tümörler hedefe yönelik (anti-HER2) tedaviye iyi yanıt verirler. Ancak trastuzumab tedavisine karşı direnç durumları gelişebildiğinden moleküler alt yapının daha fazla aydınlatılmasına ihtiyaç vardır (50).

2.5 Hücresel Sinyal İletimi ve Karsinogenez

Sinyal iletimi; hücrede basit hücresel aktiviteleri organize eden, hücre haberleşmesi içindeki karışık kompleks sistemin önemli bir parçasıdır. Hücre bilgi akışındaki hatalar başta kanser olmak üzere birçok hastalıkların ana sebebidir.

Hücrede büyüme, farklılaşma, çoğalma için hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimi gereklidir. Sinyallerin hücreye geldikten sonra hücre tarafından algılanması membran reseptörleri ve hücre içi sinyal iletim mekanizmaları vasıtasıyla gerçekleşebilmektedir. Genomda görev yapan genlerin yaklaşık beşte biri bu mekanizmalarda görev almaktadır (51).

Normal sitoplazmik sinyal iletili proteinlerin fonksiyonlarını taklit eden çok sayıda onkoprotein örneği bulunmuştur. Bu proteinlerin çoğu plazma membranının iç kısmına yerleşir ve hücre dışından gelen sinyalleri alıp (örn; büyüme faktörleri reseptörlerinin aktivasyonu ile) hücre nükleusuna iletir. Biyokimyasal olarak sinyal iletili proteinler heterojendir. Sinyal iletili onkoproteinlerin en iyi ve en çok çalışılmış örneği; guanin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinlerden (G proteini) *RAS* ailesidir.

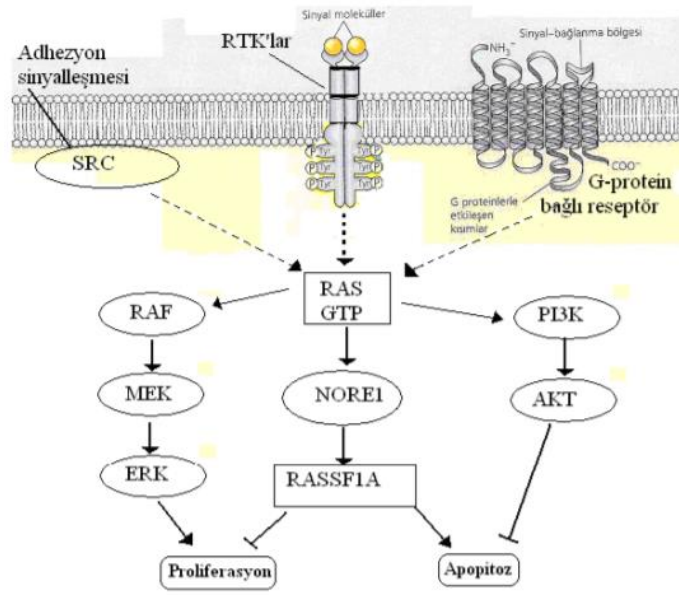
RAS proteinleri viral onkogenlerin ürünleri olarak bulunmuştur. İnsan tümörlerinde dominant onkogenlerin tek başına en sık görülen anomalisi; *RAS* ailesi

genlerindeki nokta mutasyonudur. Yaklaşık olarak tüm tümörlerin %15-20'si *RAS* mutasyonu taşır. Birçok çalışmada *RAS*'ın büyüme faktörlerince uyarılan mitogeneze önemli rol oynadığını göstermektedir. Örneğin spesifik antikorların mikroiinjeksiyonuyla *RAS* fonksiyonunun engellenmesi EGF, PDGF ve CSF-1'in proliferatif yanıtını bloke eder. Normal *RAS* proteinleri plazma membranının sitoplazmik tarafına bağlı olup, aktif bir sinyal üreten form ile inaktif sessiz bir durum arasında sürekli değişim gösterir. İnaktif durumda *RAS* proteinleri guanozin difosfata (GDP) bağlanır; hücreler büyüme faktörleri veya diğer reseptör-ligand etkileşimleri ile uyarıldığında *RAS*; GDP'yi GTP'ye dönüştürerek aktive olur. Aktif *RAS*, daha sonra sitozolik protein RF-1 ile bir araya gelerek MAP kinaz yolağı üzerine etki eder. Bu şekilde aktive olan MAP kinazlar nükleer transkripsiyon faktörlerini hedef alır ve mitogenezi uyarırlar. Normal hücrelerde *RAS* proteinin aktif sinyal iletilici dönemi geçicidir, çünkü intrinsek GTPaz aktivitesi ile GTP'yi GDP'ye hidrolize eder ve *RAS*'ı sessiz döneme sokar.

RAS proteininin düzenli siklus göstermesi iki reaksiyona bağlıdır; birincisi; *RAS* proteinini aktive eden nükleotid değişimi (GTP ile GDP arasındaki), ikincisi; GTP'ye bağlı aktif *RAS*'ı GDP'ye bağlı inaktif forma dönüştüren GTP hidrolizi. Her iki süreç de enzimatik olarak düzenlenir.

Hücre içi sinyal iletiminde hücre membranından hücre çekirdeğine kadar ilerleyen yollar vardır ve önemli yollardan biri *RAS*/*RAF*/*MAP*/*ERK* sinyal iletim yoludur. *RAS* proteini ile aktifleşen *RAF*/*MAP*/*ERK* sinyal iletim yolu; insan kanserlerinin yaklaşık %30'unda etkilendiği bilinen önemli bir yoldur. *RAS* aktivasyonunu *RAF*, *MEK* ve *ERK* proteinlerinin aktivasyonları takip eder. *RAS* ve *RAF* aslında normal insanlarda bir protoonkogendir, mutasyonlar sonucu onkogene dönüşerek hücrede neoplazi oluşumunu başlatır. *RAS* hücre yüzeyinde GDP ile bağlı iken inaktiftir. Bir fosfat ile GTP olması sonucunda aktifleşir. Aktif *RAS*; *RAF* kinazlara bağlanır ve daha sonra sırasıyla *MAPK* ve *ERK*'in aktivasyonu ile devam eden ve nükleustaki transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açan sinyal yolağının aktive olmasını sağlar. *MAPK* ailesi; gen ekspresyonu, hücre bölünmesi, apoptoz, diferansiasyon ile ilişkili süreçlerin kontrolündeki sinyal iletim yollarını oluştururlar (52) (Şekil 8).

RAS'ın aktive ettiği diğer yolak fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K) yoluğadır. PI3K'nın fosforlanarak aktive olması sonucu protein kinaz B (AKT proteini) aktifleşir. Çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri bu yoluğı aktive ederek hücrenin yaşamsal faaliyetlerini düzenler. Tümör supresör genlerden *PTEN* bu yoluğın ilk adresi olan fosfoinozitol-3-fosfat oluşumunu inhibe ederek düzenleyici bir görev yapar. *PTEN* mutasyonu sonucu proteinin tümör baskılayıcı etkisinin ortadan kalkması ile hücrede neoplazi gelişir. Protein kinaz B uyarısı; hücrede çeşitli proteinlerin aktivitelerini etkiler. Bunlardan biri mTOR ('mammalian target of rapamycin') proteindir (53).



Şekil 8: Ras aktivasyonunun şematik çizimi (Kumar V, Abbas AK, Aster JC, eds. *Robins Basic Pathologic. 10. ed.'dan uyarlanmıştır*)

Ras aktivasyonu sonucu etkilenen ERK ve mTOR yolakları hücre büyümesi, proliferasyonu ve yaşamsal faaliyetlerini düzenlemede görevlidirler. Her kanser olgusunda sinyal iletim yolaklarında etkilenen moleküllerin bilinmesi önemlidir. Her hasta için karsinogenez basamaklarının mekanizmasının ortaya konması uygun tedavi protokollerinin kullanılmasını sağlayacaktır. Bu nedenle son günlerde her hastada hangi mekanizmalar ile kanser olduğunun ortaya konmasını sağlayacak 'kinase assay' yöntemi uygulama alanına girmektedir. Tüm bulunanlara rağmen hücre içi sinyal iletim yolaklarının kanserle ilgisi, halen birçok bilinmeyenleri barındırmaktadır. Kanseri prognozun belirlenmesi ve yeni tedavilerin uygulanması özellikle hücre içi sinyal iletimini aydınlatmakla mümkündür. Sinyal iletiminde

bozulan hedef molekülleri ortaya konmalıdır. Yeni tedavi protokolleri için hedefe yönelik moleküller bulunmalı ve bunlar tedavide kullanılmalıdır.

Hücre içi iletim mekanizmalarının çeşitli basamaklarında protoonkogen olarak rol alan *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* genlerindeki mutasyonu saptamak ve bu yolları aydınlatmak hastaların hedefe yönelik tedavi şansı için oldukça önemlidir.

2.6.Mutasyonlar

Mutasyon; DNA'daki kalıcı değişiklik olarak tanımlanabilir. Germ hücrelerini etkileyen mutasyonlar sonraki nesillere kalıtsal olarak aktarılan hastalıklara yol açabilir. Somatik hücrelerden kaynaklanan mutasyonlar, kalıtsal hastalık oluşturmaz. Ancak, kanserlerin gelişiminde ve bazı konjenital malformasyonlarda önem taşırlar. Genetik kalıtım paterni dörde ayrılır.

- 1) Kromozomal kalıtım
- 2) Tek gen kalıtımı
- 3) Multifaktöriyel kalıtım
- 4) Atipik kalıtım (mendelian olmayan)

Kromozom mutasyonları, genetik materyalin yeniden düzenlenmesi olup, kromozomlarda yapısal veya sayısal değişikliklere neden olur. Kromozomların sayı ya da yapısında değişikliklere neden olan mutasyonların çoğu (13, 18, 21,X, Y ve birkaç kromozom hariç), yaşamla bağdaşmayan değişiklikler olduğundan, nadiren sonraki nesillere aktarılır. Kalıtsal hastalıklarla ilişkili olan mutasyonların büyük bir çoğunluğu, mikroskopla görülemeyecek düzeydeki gen mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar, tek bir genin ya da daha sıklıkla tek bir bazın, kısmen ya da tamamen kaybına yol açabilir. Örneğin tek bir nükleotid bazının yerini farklı bir bazın alması, nokta mutasyonuna yol açar. Daha nadiren olarak, bir ya da iki baz çifti DNA'ya eklenebilir veya DNA'dan silinebilir (delesyon). Bu durum DNA sarmallarından birinde, nükleotid dizisi yapısının okunmasında ('reading frame') değişikliklere neden olabilir ve bu nedenle 'frameshift' (çerçeve kayması) mutasyonları olarak adlandırılır. Mutasyonun sonuçları, mutasyonun tipi ve etkilenen genom bölgesi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir.

- Ekzon mutasyonları; nokta mutasyonu (tek bir bazı yerini bir başkasının alması) üçlü baz kodunun değiştirerek, gen ürününde bir aminoasitin yerini diğerinin almasına yol açabilir. Bu mutasyonlar genetik kodun anlamını değiştirdikleri için

sıklıklar ‘missense mutasyonlar’ olarak adlandırılır. Eğer diğerrinin yerini alan aminoasit proteinin fonksiyonunda küçük bir değışikliğe yol açıyorsa; bu mutasyon ‘ılımlı (conservative)’ missens mutasyon olarak adlandırılır. Diğer yandan ılımlı olamayan (‘non-conservative’) missens mutasyonda, normal aminoasitin yerinin çok farklı özellikteki bir başka aminoasit alır. Bu tipin bir örneğı hemoglobinin β -globin zincirini etkileyen orak (‘sickle’) mutasyondur. Burada glutamik asiti kodlayan CTC (mRNA’da GAG) nükleotid üçlüsünün yerini, valini kodlayan CAC (mRNA’da GUG) almıştır. Bu tek aminoasit değışikliği hemoglobinin fiziko-kimyasal özelliklerini değıştirerek orak hücreli anemiye neden olur. Ayrıca nokta mutasyonlarındaki aminoasit değışikliği, aminoasit kodonunu sonlandırıcı zincir ya da ‘durdurucu kodon’ haline dönüştürebilir (anlamsız ‘nonsense’ mutasyon). Tekrar β -globin örneğine dönersek nokta mutasyonu ile kodondaki glutamini kodlayan CAG üçlüsünde, C’nin yerini U alırsa, durduru kodon (UAG) oluşur. Bu değışiklik β -globin gen translasyonunun erken sonlandırılmasına neden olur ve sonuçta oluşan kısa peptid yıkıma uğrar. Etkilenen kişilerde β -globin zinciri eksiktir ve β -talasemi olarak bilinen şiddetli bir anemi tipi gelişir.

- İntron varyasyonları (‘exon-exon boundary’ mutasyonlar); kodlayıcı bölgeleri (eksonları) tutmayan mutasyonlar da zararlı etkiler oluşturabilir. DNA’nın transkripsiyonu, gen üzerinde başlangıç noktasına uzak ya da yakın yerleşim gösteren başlatıcı (promoter) ve artırıcı (‘enhancer’) diziler tarafından boşaltılır ve düzenlenir. Bu düzenleyici sekansları tutan nokta mutasyonlar ya da delesyonlar, transkripsiyon faktörlerinin bağlanması engelleyebilir ve böylece transkripsiyonun belirgin olarak azalmasına ya da tamamen kaybına yol açar. Kodlayıcı olmayan bölgelerdeki nokta mutasyonları araya giren dizilerin birbirine hatalı bir şekilde eklenmesine neden olur. Bu durum sırasıyla, başlangıç mRNA kopyalarının normal işlemlerden geçmesini engeller, olgun mRNA kopyasının oluşmasında başarısızlığa neden olur ve translasyon oluşamayıp gen ürünü sentezlenemez.
- Delesyonlar ve insersiyonlar; kodlayıcı dizideki delesyon ve eklenmeler DNA zincirinden birinde nükleotid dizinin yapılanmasında değışikliklere yol açar. Bu yüzden bunlardan ‘frameshift mutasyonlar’ olarak söz edilir. Tutulan baz

çiftlerinin sayısı üç ve üçün katları ise ‘frameshift’ oluşmaz. Bunun yerine bir ya da daha fazla aminoasiti eksik olan anormal bir protein sentezlenir.

- Üç nükleotidli tekrar mutasyonları; bu mutasyonlar üçlü nükleotid dizisinin amplifikasyonu ile kendini gösterdiği için, özel bir başlıkta toplanırlar. Örneğin; frajil-X sendromunda, FMR-1 olarak adlandırılan bir genin içinde CGG dizisinin 250-4000 tekrarı vardır. Normal popülasyonda ise tekrar sayısı azdır ve ortalama 29’dur. Üçlü tekrar mutasyonlarının ayırt ettirici özelliği dinamik olmalarıdır (amplifikasyon derecesi gametogenez boyunca artar).

Özet olarak mutasyonlar protein sentezini çeşitli düzeylerde engelleyebilir. Transkripsiyon; gen delesyonları ve promoter bölgedeki dizileri tutan nokta mutasyonları tarafından ciddi olarak etkilebilir. Anormal mRNA oluşumu; kodlayıcı olmayan bölgeleri (intron) veya uçların birbiri ile bağlantı noktalarını ya da her ikisini etkileyen mutasyonlardan kaynaklanabilir. Eğer bir kodlayıcı bölge (ekzon) içerisinde durdurucu kodon oluşursa translasyon işlemi zarar görür. Son olarak, bazı nokta mutasyonlar, protein sentezindeki herhangi bir basamağı bozmadan anormal bir protein oluşumuna neden olabilir. (54).

2.7. Genetik Analiz Yöntemleri

İnsan somatik hücrelerinde 46 kromozom bulunur. Bunlar otozomların 22 homolog çifti ile kadınlarda XX, erkeklerde XY olmak üzere iki adet cinsiyet kromozomundan oluşur. Kromozom çalışmaları-karyotiplendirme sitogenetik çalışmalarının temel yöntemlerindendir. Kromozom yayması oluşturmaının klasik yollarından birisi, bölünen hücrelerde metafaz safhasında mitotik inhibitörleri kullanarak mitozu duraklatmak ve daha sonra kromozomları boyamaktır. Metafaz yaymasında her bir kromozom, sentromer bölgesinde bağlantılı olan iki kromotid şeklinde gözlenir. Karyotip görüntülenen bir boyalı metafaz yaymasında, kromozom çiftlerinin uzunluklarının giderek azalacak şekilde yerleşim gösterdiği standart bir düzenlenmedir.

Kromozomların uzunlukları boyunca birbirini izleyecek şekilde açık ve koyu bantlar şeklinde dizildiği kolaylıkla ayırt edilebilir ve güvenilir modele dayanarak, her bir kromozomun tanımlanmasına izin veren çeşitli boyama yöntemleri geliştirilmiştir. En çok uygulanan yöntem, Giemsa boyamasıdır ve bu nedenle ‘G

bantlama' olarak adlandırılır. G bantlama ile her haploid set için yaklaşık 400-800 bant saptanabilir.

-Floresan in situ hibridizasyon (FISH), rutin karyotiplemeye eşlik eden önemli bir yardımcı haline gelmiş ve sitogenetik analizlerin önemini büyük ölçüde artırmıştır. Karyotiplendirmenin başlıca kısıtlayıcı yanı, sadece bölünen ya da in vitro olarak bölünmesi sağlanan hücrelerde uygulanabilmesidir. Bu problem kromozoma özgü dizileri tanıyan DNA probları ile aşılabılır. Bu tür problemler floresan boyalar ile işaretlenerek interfaz nükleuslara uygulanır. Proben kromozomdaki tamamlayıcı dizisine bağlanarak spesifik kromozomu işaretlemesi sonucunda floresan mikroskopunda görülebilir. FISH, interfaz nükleuslarındaki kromozomları saymak için kullanılabilir. Ancak FISH uygulamaları interfazdaki nükleuslarla sınırlı değildir. Bu yöntem, kromozomların belirlenmiş bölgelerine özgü olan DNA problemlerini kullanarak rutin karyotipleme sonucunda kolaylıkla saptanmayan belirsiz mikrodelseyonlar, kompleks translokasyonlar ve telomer değişikliklerinin saptanmasında kullanılabilir. Tanı vermedeki kolaylığına ek olarak, FISH aynı zamanda klinik ilgi uyandıran yeni izole edilmiş genlerin fiziksel olarak haritalandırılması için bir araç olarak da kullanılabilir. Yeni DNA dizileri, floresan boyalarla işaretlenir ve daha sonra metafaz yaymasına uygulanır. DNA, tamamlayıcı dizisine bağlanarak, genin özgün yerleşim bölgesini kesin olarak belirler. FISH uygulamasında, farklı şekilde işaretlenen normal ve tümoral hücre popülasyonlarının DNA içeriklerinin normal metafaz kromozom yaymalarına ya da cam slaytlarda sıraya konulmuş genomik DNA klonları dizilerine (karşılaştırmalı genomik hibridizasyon) kohibridizasyonlarıyla doğrudan karşılaştırması yapılır. Bu şekilde, gen kopya sayısındaki tümöre özgü değişiklikler belirlenebilir (55).

Moleküler genetik teknikler; DNA'nın amplifikasyonunu içeren PCR analizi artık moleküler tanıda yaygın olarak kullanılmaktadır. RNA substrat olarak kullanılırsa, önce cDNA'yı elde etmek için revers-transkripsiyon yapılır ve ardından PCR ile amplifiye edilir. Revers-transkripsiyonu içeren bu yöntem genellikle RT-PCR olarak kısaltılır. Hedef DNA segmentini amplifiye etmek için, normal sekansın 3' ve 5' uçlarına bağlanan iki primer tasarlanır. Uygun DNA polimerazlar ve termal döngü kullanılarak, hedef DNA büyük ölçüde büyütülür ve iki primer bölgesi

arasında DNA dizisinin milyonlarca kopyasını üretir. PCR ürününün DNA dizisi daha sonra birkaç yolla analiz edilebilir:

Sanger sekanslama: Mucidi, Nobellaureate Frederick Sanger'in adını taşıyan Sanger sekanslama, orijinal İnsan Genom Projesi de dahil olmak üzere, uzun yıllardır genom dizilemesinin "iş gücü" olmuştur. Burada, amplifiye edilmiş DNA, bir DNA polimeraz, bir DNA primeri, nükleotidler ve farklı floresan etiketlerle etiketlenmiş dört (di-deoksi sonlandırıcı) nükleotid (A, T, G ve C) ile karıştırılır. Ardından gelen reaksiyon, bir kilobaza kadar olası tüm uzunluklarda bir dizi DNA molekülü üretir; her biri, sonlandırıcı nükleotidlerden birinin dahil edilmesi nedeniyle reaksiyonun durduğu baza karşılık gelen bir etiketle etiketlenir. Kapiler elektroforez ile boyut ayrımından sonra, mutasyonların varlığını saptamak için kesin dizi "okunabilir" ve normal dizi ile karşılaştırılabilir.

Sanger sekanslama: spesifik bir nükleotid pozisyonundaki mutasyonları saptamak için başka bir yaklaşım; (örneğin, KRAS onkogeninde glisini (GGT) 'yi aspartik aside (GAT) dönüştüren bir kodon 12 mutasyonu) PCR karışımına floresan etiketli nükleotidlerden C ve T eklemektir. Bu iki nükleotid farklı floroforlarla etiketlendiğinden, elde edilen PCR ürünü tarafından yayılan floresans, bir C veya T'nin primer uzatma işlemine dahil olmasına bağlı olarak başka renkte olabilir. Bu alele özgü uzatma stratejisinin avantajı, Sanger sekanslamadan daha duyarlı olması ve mutasyona uğramış DNA dizilerinin küçük bir fraksiyon (~%1) oluştursalar bile tanımlanmasına izin vermesidir.

Sanger sekanslama artık "ilk nesil" yöntem, DNA'nın (veya RNA'nın) değerlendirilmesini gerektiren neredeyse tüm moleküler tanımlama uygulamalarının yerini "yeni nesil sekanslama" (NGS) teknolojilerine bırakıyor. NGS teknolojisinin mevcudiyeti, nispeten düşük maliyetlerle dizileme verilerinin katıksız hacmi (günde 1 gigabaz çiftinden fazla veya 1.000.000.000 baz çiftinden fazla) moleküler tanıyı kökten değiştirme potansiyeline sahiptir. Tüm insan genomu 3 gigabazdan biraz daha fazlasına sahiptir, bu nedenle gerçek "tüm genom dizilimi" birkaç gün içinde birkaç kez gerçekleştirilebilir. Sanger dizilemesinin aksine, NGS teknolojileri, insan genomunun (DNA veya cDNA) birden çok parçasının paralel olarak sıralanmas hızının önemli ölçüde arttığı platformları kullanır. Floresan olarak etiketlenmiş nükleotidler, döngü başına şablon başına bir nükleotid eklenerek, katı bir faz

üzerinde hareketsizleştirilmiş şablon DNA ipliklerine tamamlayıcı olarak dahil edilir. Her döngünün sonunda bir görüntü yakalanır ve karmaşık biyoinformatik kullanarak her bir okumayı insan genomuna eşlemek için yeterli uzunlukta bir "okuma" oluşturulana kadar döngüler tekrarlanır. Zaman ve ölçek farklılıklarına ek olarak, NGS ile geleneksel Sanger dizilemesi arasındaki diğer bir önemli fark, birincisinin heterojen bir hücre karışımı içeren örneklerde düşük frekansta oluşan varyant alelleri tespit etme yeteneğidir. Sanger dizileme ile varyant allel frekansı için alt tespit sınırı % 20 veya daha fazladır, bu nedenle ya homojen örnekler (germ hattı DNA gibi) ya da normal doku içeren bir biyopside tümör hücrelerinin mikrodiseksiyonu gibi bazı zenginleştirme biçimlerini gerektirir. NGS'nin genomun aynı bölgesini birden çok kez "okuma" yeteneği (100 ile 1000 kat fazlalık), %1 kadar düşük allel frekanslarının saptanmasına izin vererek, NGS'yi özellikle tümör hücrelerinden daha fazla non-neoplastik stroma olan doku biyopsilerindeki mutasyonları ararken yararlı kılar.

NGS'nin klinik ve araştırma uygulamaları ile, hedeflenen dizileme (tipik olarak birkaç ile birkaç yüz genlik bir panel); insan genomunun tüm kodlama bölgelerini sorgulayan tüm ekzon dizileme DNA'ya ek olarak; kodlamayan RNA bölgeleri dahil olmak üzere insan genomunun % 99'unu içeren tam genom dizileme yapılabilmektedir (55).

2.8. KRAS ve Meme Kanseri

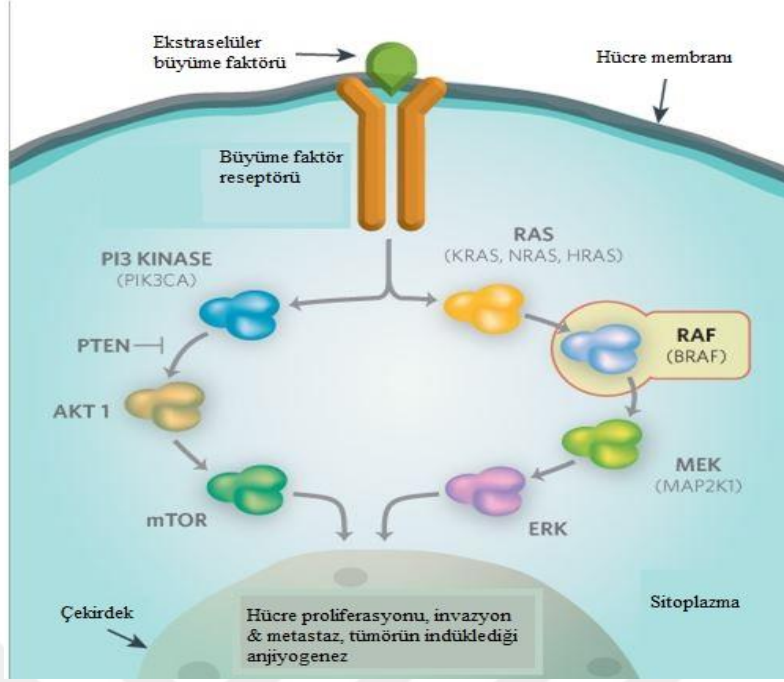
Neoplazi oluşumunda; genomik yapıda hücre proliferasyon ve canlılığını değiştiren birçok hücre içi ve dışı sinyal yolları ve düzenleyici moleküller rol oynamaktadır. Çok basamaklı karsinogeneizde birçok kanser türünde rol oynayan önemli yollardan birisi de Mitogen-activated protein kinase' (MAPK) yolağıdır (56).

MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumludur. Kaskad sistemi hem sinyalin amplifikasyonunda hem de sinyal kinetiğinde aktif rol oynar. Sinyal iletimi G proteini aracılığı ile Ras aktivasyonu ile başlamaktadır. Ras, NRAS, KRAS ve HRAS olmak üzere RAS geni tarafından kodlanmaktadır.. Kaskadın bir sonraki aşamasında ise MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. Bu aktivasyonda CRAF, BRAF ve ARAF'den oluşan RAF önemli rol oynamaktadır. MAPK yolu, fosfotidil inozitol 3-kinaz kaskadı (PI3K) ile birlikte,

hücre proliferasyonu ve hayatta kalmasına sebep olan sinyal proteinlerinin yolağa girmesine yol açan c-KIT'in aktivasyonu ile uyarılabilirler. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (57).

Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolağı üyelerinden RAS, proteinleri küçük monomer GTPaz'lar olup; hücre yüzeyinden nükleusa büyüme sinyalini iletmede önemli rol oynarlar. RAS onkogeninde oluşan aktive edici herhangi bir mutasyon, hücre proliferasyonunu ve canlılığını bağımsız bir şekilde uyaran büyüme faktörlerini etkileyerek, hücre transformasyonunu artırır (56).

RAS'ın fonksiyonları diğer GTPaz proteinlerinde olduğu gibi GDP-GTP tarafından düzenlenir. Hücre dışı sinyaller, tirozin kinaz reseptörleri ve G-protein bağımlı reseptörler (GPCR) gibi hücre zarına bağlı reseptörler tarafından karşılanır. En yaygın RAS nokta mutasyonları, 12, 13, 59 ve 61. Kodonlarda sıklıkla görülmektedir. Meydana gelen mutasyonlar sonucu onkogenik RAS proteini, yapısal olarak aktif GTP'ye bağlı kalır. Bu durum onkogenik RAS, efektörlerinin aktivasyonunun sürekli sürdürülmesine yol açar. RAS-GTP'nin aynı bölgesine, yani 32-40. arasındaki bölgeye bağlanan, RAF-kinaz, RAL-GEF ve PI3K olmak üzere üç ana efektörü vardır. Bu efektörlerin hepsi, RAS ile bağlandıktan sonra in vivo aktivitelerini artırırlar (58). (Şekil 9).



Şekil 9: RAS, RAF ve PIK3CA'nın sinyal iletiminde ana yolları (56 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır)

Ras gen ailesinin bir üyesi olan *KRAS*; Kirsten Rat Sarkoma (Ki- veya K-Ras) viral onkogen homologudur. *KRAS* geni, 12. kromozomun 12p12.1 bölgesinde lokalize olup 6 ekzondan oluşmaktadır. Küçük bir GTPaz olan *KRAS* proteini, 21 kDa'dan ve 189 aminoasitten meydana gelmektedir ve hücre zarının sitoplazmik bölgesine lokalizedir. *KRAS* geninde kodon 12 ve 13, GTP'nin bağlandığı "P-loop"da yer almaktadır. Kodon 61'in lokalizasyonu ise, RAS regülatörlerinin ve efektörlerinin bağlanmasını kontrol eden GDP/GTP duyarlı bölgelerdir (59). Tümörlerdeki en yaygın RAS mutasyonları, kritik RAS düzenleme noktalarında (12, 13, 61 ve daha az sıklıkla 63,117,119 numaralı kodonlar) ortaya çıkar.

KRAS mutasyon prevalansı kanser türüne göre değişkendir. RAS mutasyonları, kanserin agresifliği için bilgi sağlar, ayrıca aynı kanser türünde de farklılıklar gösterebilir. Genetik ve çevresel faktörlerin RAS mutasyonunun gelişiminde rolü olduğu görülmektedir. *KRAS* mutasyonunun en sık görüldüğü kanserler başlıca; pankreas, kolanjiyokarsinom ve kolorektal kanserlerdir. Son çalışmalara göre birçok kanser türünde RAS mutasyon oranları Tablo 11'da gösterilmiştir (9).

Tablo 11: Çeşitli kanserlerde RAS mutasyon oranları

Tümör tipi	KRAS (%)	NRAS (%)	HRAS (%)
Meme kanseri	7-12	5	<1
Larinks kanseri	4,8-11,5	0	0
Nazofarenks kanseri	0	4	<1
Oral kavite tümörleri	0-118	<1	35
Kolorektal kanser	27-56	1-7	<1
Mide kanseri	2,8-9,4	1,9	<1
Hepatosellüler kanser	0-5	15	29
Pankreatik kanser	90	<1	<1
Kolanjiyokarsinom	16-38	<1	<1
Küçük hücreli akciğer kanseri	1-16	<1	<1
Akciğer adenokarsinomu	12-36	<1	<1
Büyük hücreli akciğer karsinomu	14	<1	<1
Glioblastoma multiforme	0-2	2,1	0
Seröz over karsinomu	6	8	<1
Endometriyal kanser	11-35	0	0
Mesane kanseri	0-4	0-80	0-84
Renal hücreli karsinom	0-16	<1	<1
Yumuşak doku sarkomu	0-44	<1	0-16
Kutanöz malign melanom	<1	15-30	<1

Yapılan son çalışmalarda meme kanserinde *KRAS* mutasyon prevalansı yaklaşık %7-12 arasında saptanmış olup, *NRAS* mutasyonu yaklaşık %5 civarında ve *HRAS* mutasyonu %1'in altında bulunmuştur. Ayrıca moleküler sınıflandırmaya göre luminal A grubunda %2, luminal B'de %20, HER2'den zengin grupta %17 ve üçlü negatif'te %0-8 oranında *KRAS* mutasyonu saptanmıştır (Tablo 12). *KRAS* mutasyonunun meme kanserinde daha kötü prognoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (9).

Tablo 12: Meme kanserinde moleküler sınıflandırmaya göre yaklaşık *KRAS* mutasyon sıklıkları

	<i>KRAS</i> (%)
Meme kanseri	7-12
Luminal A tip	2
Luminal B tip	20
HER2'den zengin tip	17
Üçlü negatif tip	0-8

KRAS mutasyonu olan hastalar anti-EGFR hedefli monoklonal antikor tedavisi uygulanmaktadır. Ancak bu tedaviye cevap, kanser hücrelerinin farklı genomik özelliklerine bağlı olarak değişebilir. Ras proteininden önceki aşamaları durduran ilaçlar, *KRAS* mutasyonu gösteren hücrelerde tedaviye yeterli cevap alınamaz. Bu nedenle doğru tedavi ve uygun ilaç seçimi için potansiyel bir hedef olan *KRAS* geninin mutant olup olmadığını belirlemek hastanın prognozu açısından önemlidir (60).

Meme kanserinde RAS/MEK yolağı inhibitörlerinin terapötik kullanımı umut vaat etmektedir. RAS/MEK yolağında rol alan FDA onaylı MEK inhibitörleri özellikle üçlü negatif kanserli hastaların kemoterapötik tedavilerini tamamlayabilir.

Bu inhibisyonun kanserli kök hücre gelişmesini hedefleyerek tümörün metastatik potansiyelini önlediği gösterilmiştir (61).

Meme tümörlerinin yaklaşık %20-30'u kötü klinik prognozla ilişkili olan HER2'yi eksprese etmektedir. Bu sinyali baskılayan Trastuzumab monoklonal antikoru kullanılmaktadır. Buna rağmen ortalama %66 hastada Trastuzumab monoterapisine direnç gelişmektedir. Lapatinib EGFR (epidermal büyüme faktör reseptörü) ve HER2'yi hedefleyen, trastuzumab dirençli HER2 pozitif meme tümörlerinde kullanılan bir tirozin kinaz inhibisyonu yapan küçük bir moleküldür. Buna rağmen tüm HER2 pozitif tümörler lapatinibe cevap vermemektedir (62). Lapatinibe direnç mekanizmaları, PI3K-AKT ve Raf-MEK-ERK gibi intersellüler sinyal kaskadlarının aktivasyonuna izin veren efektör proteinlerdeki gen mutasyonları tanımlanmıştır (63). MEK inhibitörlerinden Refametinib ve Trametinib meme kanserli hücre kültüründe çalışmalar devam etmektedir. Refametinib daha önce hepatosellüler karsinom, pankreas, akciğer ve kolorektal kanserlerde test edilmiştir. Meme kanseri hücre kültüründe üçlü negatif alt tipte MEK inhibitörlerinden Trametinib ve PD-0325901 moleküllerinin antiproliferatif etkileri tespit edilmiştir (64). Ancak bununla birlikte HER2 pozitif meme kanseri hücre kültürlerinin hem Trametinib hem de PD-0325901'e duyarlı olduğunu gözlemlendi (65).

Faz 1 çalışmaları; insanlarda MEK inhibitörlerinin etkinliğini sınırlı göstermiş olsa da neoadjuvan veya adjuvan tedavilerle kombinasyonunu umut verici bir alternatif olacağını öngörmektedir. Ayrıca meme kanserinde PD-0325901 molekülü için faz 2 çalışmaları devam etmektedir (61).

2.9 BRAF ve Meme Kanseri

MAP kinaz yolağında RAS'ın aktivasyonu sonrasında aktive RAS proteinini RAF kinazlara yüksek afinite ile bağlanır ve sinyal kaskadı RAF üzerinden devam eder. RAF ailesinin ARAF, BRAF ve CRAF olmak üzere üç üyesi vardır. Bu yolda BRAF, RAS onkogeninden sinyal transdüksiyonu için MAPK yolağında anahtar rol oynayan bir serin/treonin kinazı kodlar (Şekil 9) (66).

BRAF, 75-100 kDa ağırlığındaki Raf kinaz ailesinin bir üyesi olan proteindir ve Ras-Raf-MAPK yolundaki en önemli MAP kinaz aktivatörüdür. *BRAF* geni, kromozom 7q34 bölgesinde bulunur ve bazı tümörlerde bu Ras-Raf-MAPK yolu anormal olarak aktive edilir. *BRAF* geninde 50'den fazla farklı çeşitte mutasyon

rapor edilmiştir; ancak en sık mutasyon, valinin, 600. pozisyonunda (V600E) glutamik asitin yerine geçmesidir (67). *BRAF* V600E mutasyonunun çeşitli neoplazmlarda bulunduğu bildirilmiştir ve tümörlerde bildirilen prevalansı; malign melanomda (%30-40), kolorektal karsinomda (% 5-22), tiroit papiller karsinomda (%57,8), gliomlarda % 11, overyan seröz karsinomda %30, meme karsinomlarında %2-4, akciğer adenokarsinomlarında % 4 ve tüylü hücreli lösemide % 58,3 düzeylerindedir (Tablo 13) (10).

Tablo 13: Çeşitli kanserlerde *BRAF* mutasyon oranları

	<i>BRAF</i> (%)
Meme kanseri	2-4
Melanom	30-40
Tiroit papiller karsinom	57,8
Tüysü hücreli (hairy-cell) lösemide	58,3
Kolorektal karsinom	10,3
Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu	4,7
Anaplastik tiroit karsinomu	32
Pilositik astrositom	26
Glioma	5-11
Ovaryan seröz karsinom	30
Mesane kanseri	3-4

BRAF V600E mutasyonu spesifik antikor kullanan İHK metodu üretilmiştir. MSI-H kolorektal karsinomlarla yapılan bir çalışmada, bu yöntem Sanger sekanslama yöntemiyle %98,9 oranında bir uyumluluk ve %98,8 özgüllük saptanmıştır. *BRAF* V600E mutasyonunu tespit etmede İHK'sal inceleme de kullanılabilir (68).

Meme kanseri geniş bir genetik heterojeniteye sahip olduğu bilinen bir neoplazmdir. Önceki çalışmalarda, meme kanserlerinin yaklaşık % 2-4'ünde *BRAF* mutasyonu rapor edilse de oldukça değişken sonuçlar mevcuttur. Daha önce yapılan hücre kültürü çalışmalarında meme kanserinde %10 oranında *BRAF* mutasyonu saptanmıştır (69). Diğer bir çalışmada meme kanserli hastalarda %12 oranında mutasyon saptanmışken, postmenapozal kadınlarda ve ER, PR negatif ve ÜNMK'lerinde *BRAF* mutasyonu daha sık bulunmuştur (70).

BRAF inhibitörlerinin etkinliği *BRAF* mutasyonu gösteren solid tümörlere karşı etkinliği araştırılmıştır. Solid tümörlere karşı dabrafenibin etkinliğini araştıran faz I çalışmasında, *BRAF* mutant kolorektal kanser, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, over kanseri ve tiroit kanseri olan yirmi sekiz hasta kısmi cevap gösterdi. V600E mutasyona uğramış anaplastik tiroit kanseri için Dabrafenib ve Trametinib üzerine yapılan faz II çalışmasında oldukça yüksek bir yanıt oranı gösterilmiştir (%69). *BRAF* V600E mutasyonlarını barındıran çeşitli melanom dışı kanserli hastalar için Dabrafenib ve Trametinib üzerine faz II çalışmalar devam etmektedir (71).

BRAF inhibitörü monoterapisi, direncin gelişmesi ve MAPK yolunun yeniden aktivasyonu nedeniyle genellikle uzun süreli kullanımda tercih edilmemektedir. Bu nedenle, *BRAF* inhibitörünün bir MEK inhibitörü (Trametinib) ile bir kombinasyon terapisinin MAPK kaynaklı edinilmiş direncin gelişimini geciktirmesi beklenir. Faz III çalışmaları kombine tedavinin monoterapiye kıyasla hem progresyonsuz sağkalımı hem de genel sağkalımın artırdığını göstermiştir (72).

2.10. *PIK3CA* ve Meme Kanseri

PIK3CA geni; sitogenetik lokasyonu 3. kromozomun uzun kolunda, 26.32 pozisyonunda lokalizedir (3q26.32) ve 179,148,114 ila 179,240,093 baz çifti içermektedir. *PIK3CA* geni, PI3K kinazın katalitik alt biriminin (p110a) izoformunu kodlar. Bu PI3K sınıfı, PI3K/AKT/mTOR yolu üzerinden hücre büyümesi, proliferasyonu, metabolizması ve migrasyonu gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünde kritik bir role sahiptir. Birkaç çalışma, bu yolun insan tümörlerinin % 30-40'ında aktive olduğu göstermiştir (73). *PIK3CA* somatik mutasyonları, erken dönem meme kanserlerinin yaklaşık %20-40'ında görülür ve hormon reseptörü pozitif hastalarda daha sık saptanır (74) (Tablo 14)

Tablo 14: Çeşitli kanserlerde *PIK3CA* mutasyon oranları

	<i>PIK3CA</i> (%)
Meme kanseri	33,4
Endometriyal karsinom	40,2
Akciğer skuamöz hücreli karsinom	15,3
Küçük hücreli akciğer karsinomu	7,04
Mide adenokarsinomu	6,5
Kolorektal karsinom	17
Melanom	4
Pankreatik karsinom	2,6
Ovaryan kanseri	6,3
Mesane kanseri	20,7

PI3K sinyalizasyonu hücre büyümesi ve çoğalmasını, yeni protein üretimini, hücre içi madde taşınımını ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar ve çoğu hücre aktivasyonu için oldukça önemlidir (76).

PIK3CA mutasyonları en sık üç ‘hotspot’ noktada meydana gelir: Ekzon 10’da yer alan p.E542K ve p.E545 K (sarmal alana karşılık gelir) ve ekzon 21’de p.H1047R (kinaz alanına karşılık gelir) (75).

Fosfotaz ve tensin homologu (PTEN), PI3K / AKT yolağının aktivitesini inhibe edebilir ve meme kanseri hastalarının %15’inde PTEN heterozigosite kaybı bildirilmiştir (11). *PIK3CA* mutasyonları ER, PR pozitif (% 35) ve HER2’yi aşırı eksprese eden meme kanserlerinde (%23); üçlü negatif meme kanserlerine göre (%5-13,2 arasında) daha yaygındır (77). Birçok çalışmada, tümörlerde bu yolağın aktivasyonu ile hormonal tedaviye dirençli hale gelebileceği gösterilmiştir. *PIK3CA* mutasyonu olan meme kanserlerinde hedefe yönelik tedavi de (Alpelisib), bu yolağın inhibitörleri ile tedavi edilen hastalarda kısmi yanıtın ve progresyonsuz sağkalımın arttığı öngörülmektedir (77). Ek olarak, bazı prelinik ve klinik çalışmalarda, geleneksel hormonal tedaviye bir mTOR inhibitörü eklenmesinin, daha önce dirençli tümör hücrelerine karşı duyarlılığı geri kazanabileceğini, hastalık tedavisini ve hormon reseptörü pozitif meme kanserli hastaların genel sağkalımını iyileştirebileceği gösterilmiştir (78).

Meme kanserinin patogenezinde; ER negatif olan tümörlerin yolağında 13q delesyonları, 11q13 kromozomal bölgenin insersiyonları, 17q12’nin amplifikasyonu gibi hücre proliferasyonu ve hücre siklus sürecinde görevli genler rol alır. *PIK3CA*

mutasyonu ER pozitif ve ER negatif olan iki yolda da görülebilir ancak ER negatif olan grupta 17q12 amplifikasyonuna ek olarak PIK3CA mutasyonu oldukça sık saptanır (79).

Therascreen *PIK3CA* mutasyon testi ve alfa spesifik PI3K inhibitörü Alpelisib, ileri evre *PIK3CA* mutant meme kanseri hastalarını tespit etmek ve tedavi etmek için FDA onaylıdır. Bununla birlikte, bu testin meme kanserinde *PIK3CA* mutasyonunu ne ölçüde tespit ettiği şu anda bilinmemektedir. Hormon reseptörü pozitif, HER2 negatif meme kanserli hastalarda mTOR yolu endokrin tedaviye direnç ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, bu yolun rolü HER2 pozitif ve ÜNMG'de giderek daha önemli hale gelmektedir. Bu nedenle, *PIK3CA* ile mutasyona uğramış meme kanserinde PI3K'nın inhibisyonu, son zamanlarda tedavinin ana odak noktası olmuştur.

Alpelisib, p110 α 'yı diğer izoformlardan yaklaşık 50 kat daha güçlü bir şekilde inhibe eden oral yoldan biyoyararlanımı yüksek, küçük moleküllü, α spesifik bir PI3K inhibitörüdür (80) . Başarılı prelinik ve faz 1 verilerinin ardından SOLAR-1 faz III randomize çalışmada, daha önce endokrin tedaviye yanıt vermeyen ER,PR+/HER2 negatif meme kanserli 572 hastada Alpelisib ve Fulvestrantın etkinliğini değerlendirdi (81) (82). Mayıs 2019'da FDA, *PIK3CA* mutant hormon reseptörü pozitif, HER2 negatif meme kanserli hastalarının tedavisi için Alpelisib'i onayladı (83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız için gerekli etik kurul onayı, Düzce Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 2017/131 karar no'lu rapor ile alındı. Ardından Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2018.04.02.794)

3.2. Olguların Seçilmesi

Bu çalışmaya Temmuz 2013 ile Mart 2019 yılları arasında Düzce Üniversitesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı almış 24 invaziv meme karsinomlu hasta dahil edilmiştir. Olguların hepsi kadın olup tüm hastalara lumpektomi/ mastektomi ile sentinel lenf nodu/ aksiller lenf nodu diseksiyonu yapılmıştır. Vakaların hepsi östrojen ve progesteron reseptörü negatif olup, 12'si HER2 pozitif (Grup 1), 12'si HER2 negatif (Grup 2) hastalardan meydana gelmektedir. Hastalara ait klinik ve demografik veriler hastane bilgi erişim sisteminden ve dosyalarından elde edilmiş olup olguların Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı lamaları tekrar değerlendirilerek ve dosya kayıtları gözden geçirilerek aşağıdaki parametreler kullanılmıştır

- Hastaların tanı aldıkları yaş

- Hastaların takip süreleri ve sağkalım durumları
- Tümör yerleşimi (sağ, sol meme)
- Tümörün histopatolojik tipi
- Histolojik derece (Modifiye Bloom-Richardson Derecelendirme Sistemi)
- Lenf nodlarında metastaz durumu, varsa metastatik lenf nodu sayısı
- İmmunohistokimyasal olarak ER ve PR boyanma durumu (Allred skorlama sistemi)
- İmmunohistokimyasal veya kromojen-in situ hibridizasyon (CISH) ile değerlendirilen HER2 ekspresyon durumu
- Ki67 proliferasyon indeksi
- Tümör boyutu (en büyük çap olarak)
- Tümörün moleküler sınıflaması
- Metastaz durumu
- Sağkalım

Olgularda, *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* Array (Randox, Birleşik Krallık) kiti ile mutasyonlarını belirlemek amacı ile lam arşivinden seçilen preparatlardan, moleküler patoloji yöntemleri için en uygun kesitler ve ilgili parafin bloklar seçildi. Bu kesitler; nekroz, kanama ve çevre sağlam doku gibi tümör dışı elemanlardan makrodiseksiyon ile temizlendi. Seçilen parafin bloktaki tümörden 5-10 µm doku, 1.5 ml steril eppendorf tüpüne eklendi.

3.3. Mutasyonların Saptanması

İlk olarak çalışılacak doku numunelerinde deparafinizasyon ve DNA ekstraksiyon işlemi 'QIAamp DNA FFPE Tissue Kit' (Qiagen, Almanya) protokolü takip edilerek gerçekleştirildi.

➤ Parafine gömülü dokularda genomik DNA saflaştırılması:

1. Eppendorfa 1 mililitre ksilen eklendi
2. Vorteks işlemiden geçirilip 2 dk oda sıcaklığında yüksek devir santrifüj yapıldı
3. Süpernatant atıldı
4. Pellet üzerine 1 ml etanol eklendi

5. 2 dk oda sıcaklığında yüksek devir santrifüj yapıldı
6. Süpernatant tekrar atıldı
7. Pellet 37 derecede tüplerin ağzı 10 dakika açık bırakılıp bu şekilde etanol buharlaştırıldı

➤ DNA ekstraksiyon işlemi:

1. Pellete 180 µl Buffer ATL (kısaltmalara eklendi) ve 20 µl proteinaz K ilavesi yapılarak vorteks işlemi uygulandı
2. 56 derecede 1 saat inkübasyon
3. 90 derecede 1 saat formaldehit bozulması için inkübasyon
4. Spin işlemi
5. 200 µl Buffer AL ve 200 µl etanol önceden hazırlanarak lizat üzerine eklenir ve hızlıca vorteks işlemi
6. Spin işlemi
7. Lizat QIAamp MinElute kolonuna alınır ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi
8. Kolona 500 µl Buffer AW1 eklenir 8000 rpm'de 1dk santrifüj işlemi
9. Kolona 500 µl Buffer AW2 eklenir 8000 rpm'de 1dk santrifüj işlemi
10. 14,000 rpm'de 3 dk santrifüj işlemi yapılarak kurutma işlemi
11. Kolonlar 1,5 ml santrifüj tüpüne alınıp 20-100 µl Buffer ATE eklendi
12. Oda sıcaklığında 1-5 dk inkübasyondan sonra 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi yapıldı.

Ekstraksiyon sonrasında DNA değerleri Colibri Nanodrop cihazında DNA-50 değeri ile ölçüldü. Çıkan DNA ölçüm sonuçlarına göre PCR için DNA oranları 100 ul'ye eşitlenmiştir. PCR işlemi VERITI cihazında, *KRAS/BRAF/PIK3CA* Array (Randox) kitinin Multipleks PCR protokolü takip edilerek gerçekleştirildi.

PCR sonucu çıkan ürünlerin, Mikroarray Hibridizasyonu, görüntüleme ve sonuç eldesi Evidence Investigator (Randox) cihazında EV3799A/B *KRAS/BRAF/PIK3CA* Array kitinin Mikroarray Hibridizasyonu, görüntüleme ve sonuç eldesi protokolleri takip edilerek gerçekleştirildi;

1. 'Hibridizasyon buffer EV889', 'Primer Wash Buffer' ve 'Sekonder Wash Buffer' analizden önce +60 dereceye getirildi

2. ‘*KRAS/BRAF/PIK3CA* Conjugate’ ve ‘Wash Buffer’ kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi
3. Önceden ısıtılmış ‘Hibridizasyon buffer EV889’ analiz edilecek biyoçip başına 245 µl eklenir. Biyoçip başına tek denatüre bir PCR reaksiyonunun 7,5 µl’ eklenir ve reaktiflerin buharlaşmasını önlemek için sızdırmaz folyo ile kapatıldı
4. Biyoçipler +60 derecede 370 rpm’de 30 dk inkübe edildi
5. Süre dolduktan sonra biyoçip içindeki reaksiyon atık olarak döküldü
6. Önceden ısıtılmış ‘Primer Wash Buffer’ biyoçip başına 245 µl eklenip +60 derecede 370 rpm’de 2 dk inkübe edilir. Daha sonra reaksiyon döküldü
7. Önceden ısıtılmış ‘Sekonder Wash Buffer’ biyoçip başına 245 µl eklenip +60 derecede 370 rpm’de 2 dk inkübe edilir. Daha sonra reaksiyon döküldü
8. Oda sıcaklığına getirilmiş ‘Wash Buffer’ ile 3 hızlı yıkama işlemi yapıldı
9. Oda sıcaklığına getirilmiş ‘*KRAS/BRAF/PIK3CA* Conjugate’tan 250 µl eklenip biyoçipler +37 derecede 370 rpm’de 30 dk inkübe edildi
10. Süre dolduktan sonra biyoçip içindeki reaksiyon atık olarak döküldü
11. Sinyal reaktifini hazır 1:1 oranında hazırlayıp, her bir biyoçiğe 250 µl sinyal reaktifi eklenir, 2 dk sonra ‘Evidence Investigator’a yüklenip mutasyon okuma işlemi gerçekleştirildi. Analiz edilen *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyon tipleri Şekil 10’da gösterilmiştir.

GENE	Target	Base Change
BRAF	V600E	GTG>GAG
KRAS	G12A	GGT>GCT
	G12R	
	G12D	
	G12C	
	G12S	
	G12V	
	G13D	
	G13C	

Gene	Target	Base Change	Cosmic ID
BRAF	V600E	G <u>T</u> G>G <u>A</u> G	476
KRAS	G12A	G <u>G</u> T>G <u>C</u> T	522
	G12R	G <u>G</u> T>G <u>C</u> G	518
	G12D	G <u>G</u> T>G <u>A</u> T	521
	G12C	G <u>G</u> T>G <u>T</u> G	516
	G12S	G <u>G</u> T>G <u>A</u> G	517
	G12V	G <u>G</u> T>G <u>T</u> T	520
	G13D	G <u>G</u> C>G <u>A</u> C	532
	G13C	G <u>G</u> C>G <u>T</u> C	527
	G13R	G <u>G</u> C>G <u>C</u> G	529
	Q61K	C <u>A</u> A>C <u>A</u> A	549
	Q61L	C <u>A</u> A>C <u>T</u> A	553
	Q61R	C <u>A</u> A>C <u>G</u> A	552
	Q61H(1)	C <u>A</u> A>C <u>A</u> C	554
	Q61H(2)	C <u>A</u> A>C <u>A</u> T	555
	A146T	G <u>C</u> A>G <u>A</u> C	19404
	A146P	G <u>C</u> A>G <u>C</u> A	19905
PIK3CA	E542K	G <u>A</u> A>G <u>A</u> A	760
	E545K	G <u>A</u> G>G <u>A</u> G	763
	H1047R	C <u>A</u> T>C <u>G</u> T	775
BRAF	Control	N/A	N/A
KRAS	Control	N/A	N/A
PIK3CA	Control	N/A	N/A

Şekil 10: *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* ile saptanması hedeflenen nokta mutasyonlar

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Yaş değişkeninin dağılımı Shapiro-Wilk testiyle incelenmiş ve normal dağılım gösterdiği için grupların karşılaştırılmasında ‘Independent Samples T test’ kullanılmıştır. Kategorik veriler arası ilişkiler beklenen değer kuralına bağlı olarak Pearson-Chi-square veya Fisher’s Exact test ile incelenmiştir. Sayısal değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma, kategorik değişkenler sayı ve yüzde şeklinde özetlenmiştir. Yaşam sürelerinin analizinde Kaplan-Meier survival analizi kullanılmış ve gruplar Log-rank testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizler

SPSS v.22 paket programı ile yapılmış ve anlamlılık düzeyi 0,05 olarak dikkate alınmıştır.



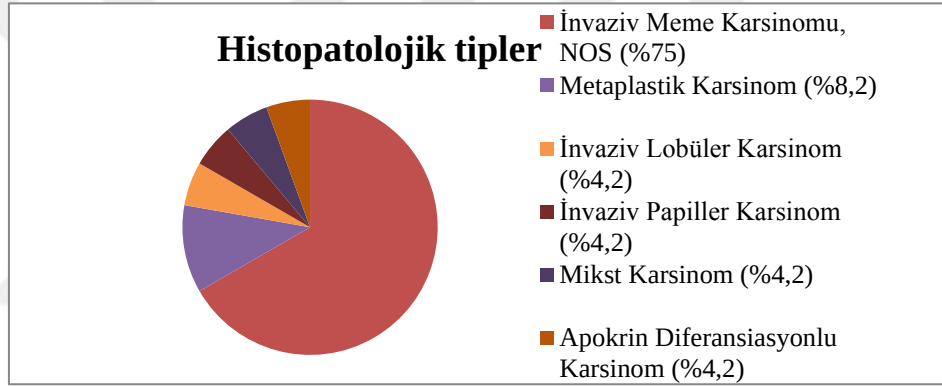
4. BULGULAR

Çalışmaya hormon reseptörleri negatif 24 meme kanserli vaka dahil edilmiş olup, yarısı HER2 pozitif, diğer yarısı HER2 negatiftir. Olguların tümörlü bloklarından *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonları bakılmıştır.

4.1. Demografik veriler ve Histopatolojik Dağılım

Çalışmadaki 24 hastanın tümü kadın olup, 12 hasta HER2+ ve 12 hasta HER2- gruptadır. 24 hastanın tanı anındaki yaşları 35 ile 70 arasında değişmekte olup ortalama tanı yaşı $60,29 \pm 12,41$ bulunmuştur. HER2+ grubun yaş ortalaması $58,42 \pm 14,21$ iken, HER2- grubun $62,17 \pm 10,65$ 'dir ve yaş ortalamaları benzerdir ($p=0,472$).

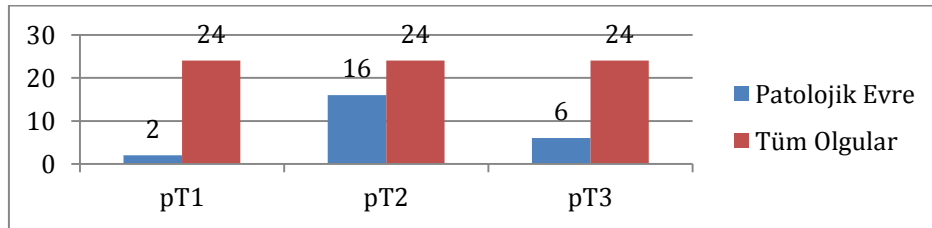
Histopatolojik açıdan olguların 18 tanesi invaziv meme karsinomu, NOS (%75), iki tanesi metaplastik karsinom (%8,2), bir tanesi invaziv lobüler karsinom (%4,2), bir tanesi invaziv papiller karsinom (%4,2), bir tanesi mikst karsinom (lobüler+duktal karsinom) (%4,2) ve bir tanesi apokrin diferansiasyon gösteren karsinom (%4,2) morfolojisindedir (Şekil 11). Olguların 8 tanesi modifiye radikal mastektomi, 16 tanesi ise segmenter mastektomi materyalidir.



Şekil 11: Olguların histopatolojik dağılımı ve yüzdeleri

Modifiye Bloom-Richardson derecelendirilme sistemine göre olguların yarısı (%50'si) derece 3 olup, diğer yarısı (%50'si) derece 2'dir.

Tümör çapı; 2 cm'nin altında olan (pT1) 2 olgu (%8,4), 2-5 cm olan (pT2) 16 olgu (%66,6), 5 cm'den büyük (pT3) olan ise 6 olgu (%25) mevcuttur (Şekil 12).



Şekil 12: Olguların patolojik evre oranları

Tüm hastalara lenf nodu diseksiyonu yapılmış olup; hastaların 15'inde (%62,5) lenf düğümü metastazı saptanırken, 9'unda (pN0) (%37,5) saptanmamıştır.

Lenf düğümü metastazı saptanan 15 hastadan; 6 tanesi pN1 (%25), 4 tanesi pN2 (%16,6) ve 5 tanesi pN3'dür (%20,8).

HER2 pozitif ve HER2 negatif olan iki grup arasında histopatolojik derece (p=0,414), lenf düğümü metastazı (p=0,400), tümör çapı (p=0,500) ve metastaz görülme durumu (p=0,500) bakımından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 15 ve 16).

Ölüm oranlarına bakıldığında hastaların 7'sinin (%29,1) ex olduğu, 17'sinin (%70,9) yaşadığı saptanmıştır. HER2+ olan grupta hastalardan sadece birinin (%8,3) ex olduğu görülürken, HER2- olan grupta 6 (%50) hastanın ex olduğu dikkati çekmiştir. Ölüm oranı HER2- olan (üçlü negatif) grupta HER2 pozitif (HER2'den zengin) gruba göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,025) (Tablo 15).

Tablo 15: HER2+ ve HER2- gruplar arasında demografik veriler ve histolojik derecenin karşılaştırılması

	HER2 (+) (n=12)	HER2 (-) (n=12)	p
Tanı aldıkları yaş	58,42±14,21	62,17±10,65	0,472
Histolojik Derece			
2	7 (%58,3)	5 (%41,7)	0,414
3	5 (%41,7)	7 (%58,3)	
Yaşam durumu			
Sağ	11 (%91,7)	6 (%50)	0,025
Ölü	1 (%8,3)	6 (%50)	

Tablo 16: HER2+ ve HER2- gruplar arasında pT, pN ve uzak metastaz karşılaştırılması

		HER2+	HER2-	p
		n (%)	n (%)	
T	PT1	1 (%8,3)	1 (%8,3)	0.500
	PT2	8 (%66,6)	8 (%66,6)	
	pT3	3 (%25)	3 (%25)	
N	N0	3 (%25)	6 (%50)	0,400
	N1	3 (%25)	3 (%25)	
	N2	3 (%25)	1 (%8,3)	
	N3	3 (%25)	2 (%16,7)	
M	M0	10 (%83,3)	10 (%83,3)	0.500
	M1	2 (%16,7)	2 (%16,7)	

4.2. Mutasyon Durumlarının Prognostik Parametrelerle İlişkisi

4.2.1. Mutasyonların histopatolojik ve moleküler tip ile ilişkisi

Çalışmamıza dahil edilen ER ve PR negatif 24 tane invaziv meme karsinomlu vakada *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonları bakılmış olup, toplam 12 (%51.9) vakada mutasyon saptanırken, 11 olguda (%48.1) mutasyon saptanmamıştır. Beş (%21.7) olguda *PIK3CA*, dört (%17.3) olguda *KRAS*, bir (%4.3) olguda *BRAF*, bir (%4.3) olguda kombine *BRAF* ve *KRAS* mutasyonları ve bir (%4.3) olguda kombine *KRAS* ve *PIK3CA* mutasyonları görülmüştür (Tablo 17). Bir olguda; moleküler olarak iki defa çalışılmasına karşın anlamlı sonuç elde edilememiştir.

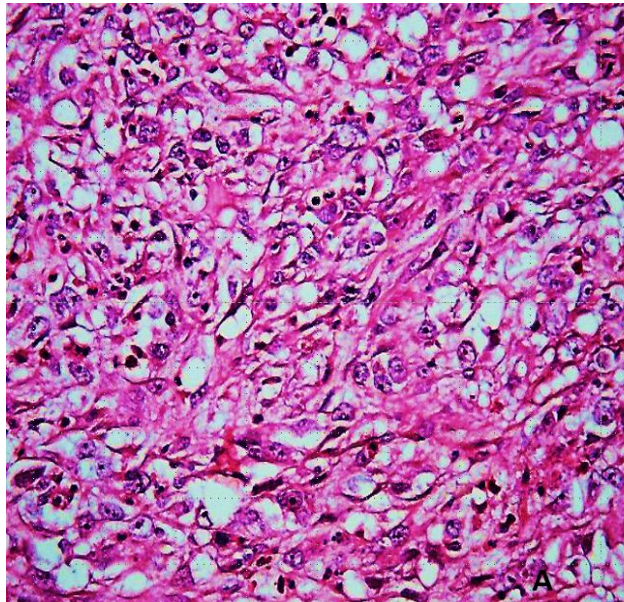
Çalışmamızdaki tüm olguların histopatolojik tanıları, moleküler sınıflaması, saptanan mutasyonlar ve kodon bölgeleri Tablo 17’de belirtilmiştir.

Tablo 17: Tüm olguların moleküler sınıflaması, histopatolojik tipleri ve mutasyon durumları/kodonları

Olgu no	Moleküler sınıflama	Histopatolojik tip	Mutasyon durumu/ Kodon bölgesi
O-1	Üçlü negatif	Mikst Karsinom (İnvaziv meme karsinom, NOS (%40) + İnvaziv lobüler karsinom (%60))	<i>PIK3CA</i> H1047R
O-2	HER2’den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	<i>KRAS</i> Q61H1
O-3	HER2’den zengin tip	Apokrin differansiasyon gösteren karsinom	<i>BRAF</i> V600E, <i>KRAS</i> G12S,
O-4	Üçlü negatif	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-5	HER2’den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-6	Üçlü negatif	İnvaziv meme karsinom, NOS	<i>PIK3CA</i> H1047R

O-7	Üçlü negatif	Metaplastik Karsinom	PIK3CA H1047R
O-8	Üçlü negatif	Metaplastik Karsinom	BRAF V600E
O-9	HER2'den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	PIK3CA E542K
O-10	Üçlü negatif	İnvaziv meme karsinom, NOS	PIK3CA E545K, KRAS G12S, KRAS Q61R
O-11	HER2'den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-12	Üçlü negatif	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-13	Üçlü negatif	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-14	Üçlü negatif	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-15	Üçlü negatif	İnvaziv papiller karsinom	Negatif
O-16	HER2'den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	KRAS G12R, KRAS G12D
O-17	HER2'den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-18	HER2'den zengin tip	İnvaziv lobüler karsinom	KRAS G12D, KRAS G12R,
O-19	HER2'den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-20	HER2'den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-21	Üçlü negatif	İnvaziv meme karsinom, NOS	KRAS G12D
O-22	Üçlü negatif	İnvaziv meme karsinom, NOS	Negatif
O-23	HER2'den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	PIK3CA H1047R
O-24	HER2'den zengin tip	İnvaziv meme karsinom, NOS	*

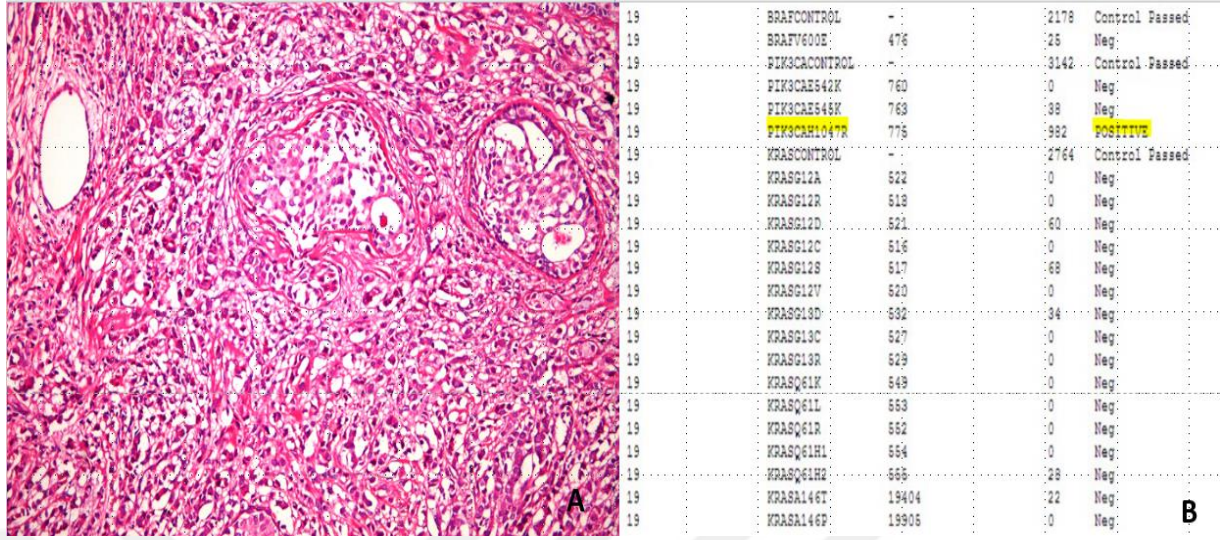
*Randox moleküler cihazıyla iki defa denenmesine karşın anlamlı sonuç elde edilemedi



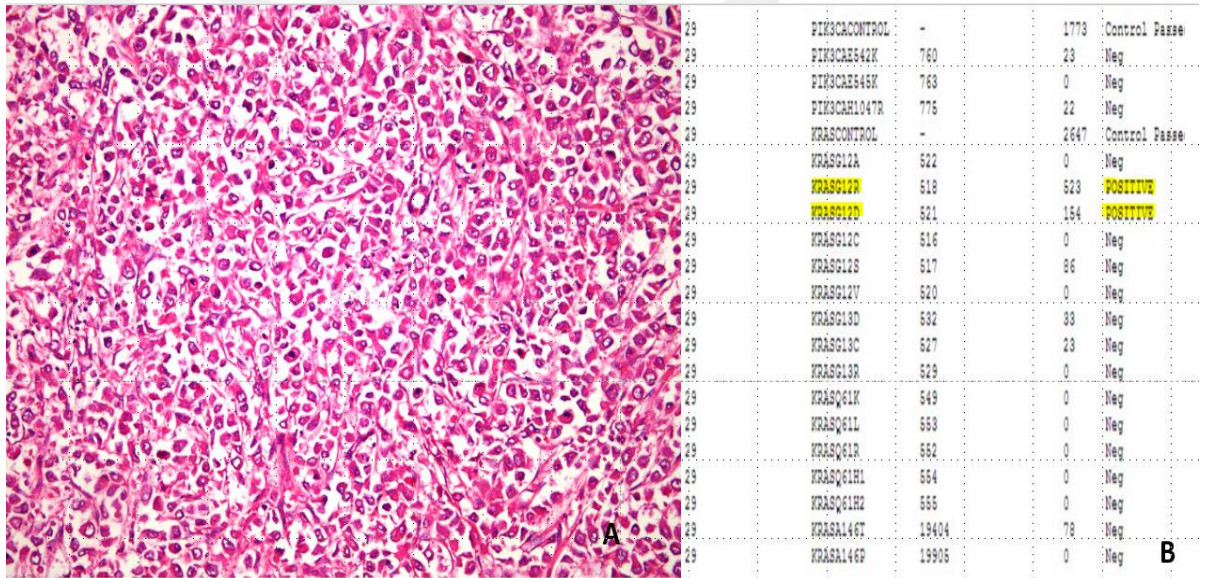
KRAS-BRAF-PIK3CA Array Report

Array Details:		KRAS-BRAF-PIK3CA Array	
Sample(s) Ran By:		gillian craig	
Batch Details:		1964	
Date of Sample(s):		09/21/2019	
25	BRAFCONTROL	-	2079 Control Passed
25	BRAFV600E	476	0 Neg
25	PIK3CACONTROL	-	2074 Control Passed
25	PIK3CAE542K	760	0 Neg
25	PIK3CAE545K	763	34 Neg
25	PIK3CAH1047R	775	470 POSITIVE
25	KRASCONTROL	-	2869 Control Passed
25	KRASG12A	522	0 Neg
25	KRASG12R	518	0 Neg
25	KRASG12D	521	100 Borderline - Repeat
25	KRASG12C	516	0 Neg
25	KRASG12S	517	52 Neg
25	KRASG12V	520	0 Neg
25	KRASG13D	532	27 Neg
25	KRASG13C	527	79 Neg
25	KRASG13R	529	0 Neg
25	KRASQ61K	549	0 Neg
25	KRASQ61L	553	0 Neg
25	KRASQ61R	554	0 Neg
25	KRASQ61H1	554	0 Neg
25	KRASQ61H2	555	0 Neg
25	KRASL146T	19404	57 Neg
25	KRASL146P	19905	0 Neg

Şekil 13: A-Metaplastik karsinom olgusu (H&Ex100) B-PIK3CA H1047R mutasyonu



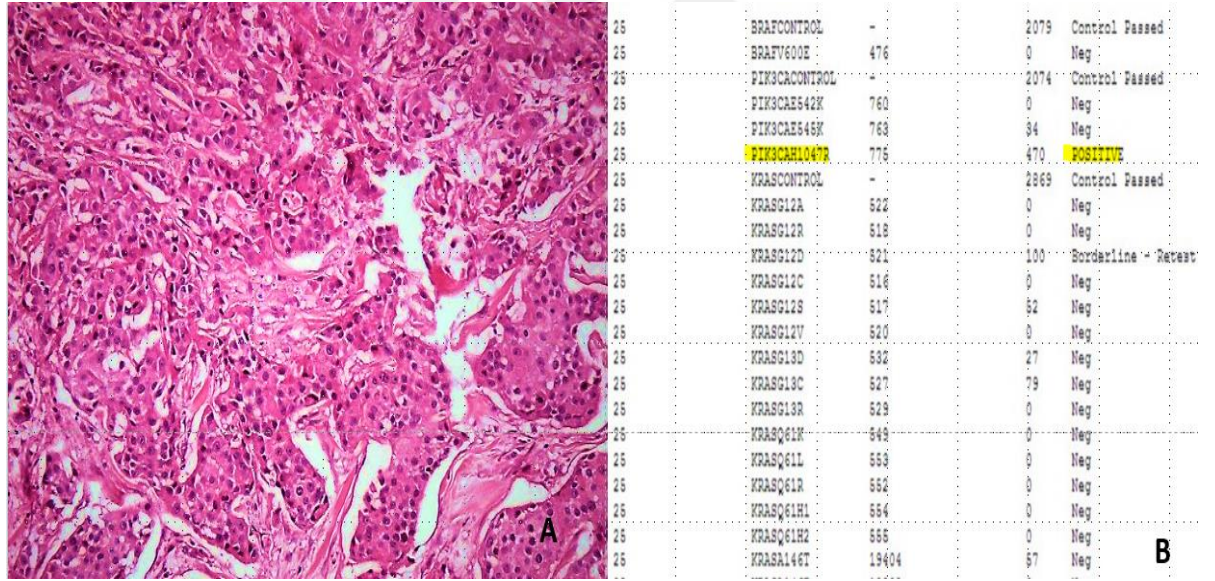
Şekil 14: A-Mikst karsinom (İMK,NOS ve lobüler karsinom) olgusu (H&Ex40) **B-** *PIK3CA* H1047R mutasyonu



Şekil 15: A- Lobüler karsinom olgusu (H&Ex100) **B-** *KRAS* G12D, *KRAS* G12R mutasyonları



Şekil 16: A- Apokrin differansiasyon gösteren karsinom (H&Ex40) **B-** *BRAF V600E* ve *KRAS G12S* mutasyonları



Şekil 17: A- İnvaziv meme karsinomu, NOS olgusu (H&Ex40) **B-** *PIK3CA H1047R* mutasyonu

Tümör çapı; 2 cm ve 2 cm'den küçük olan (pT1) 2 olgu (%8,4), 2-5 cm olan (pT2) 16 olgu (%66,6), 5 cm'den büyük (pT3) olan ise 6 olgu (%25) mevcuttur. Patolojik T1 olan 2 olgunun 1'inde (%50) *KRAS* mutasyonu, 16 tane pT2 olgunun 3'ünde (%18,7) *PIK3CA*, 4'ünde (%25) *KRAS*, 1'inde (%6,3) *BRAF* mutasyonu, 6 tane pT3 olguda ise 3'ünde (%50) *PIK3CA* ve 1'inde (%16,7) *BRAF* mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon durumu ile patolojik T evresi karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 19).

Tablo 19: Patolojik T evresi ve mutasyon durumlarının karşılaştırması

	Tümör çapı ≤2 cm pT1 (n=2)	Tümör çapı 2-5 cm pT2 (n=16)	Tümör çapı >5 cm pT3 (n=6)	p
<i>PIK3CA</i>				
Yok	2 (%100)	13(%81,3)	3(%50)	0,315
Var	0	3 (%18,7)	3(%50)	
<i>KRAS</i>				
Yok	1 (%50)	12(%75)	6(%100)	0,303
Var	1 (%50)	4 (%25)	0	
<i>BRAF</i>				
Yok	2 (%100)	15(%93,7)	5(%83,3)	0,565
Var	0	1(%6,3)	1(%16,7)	

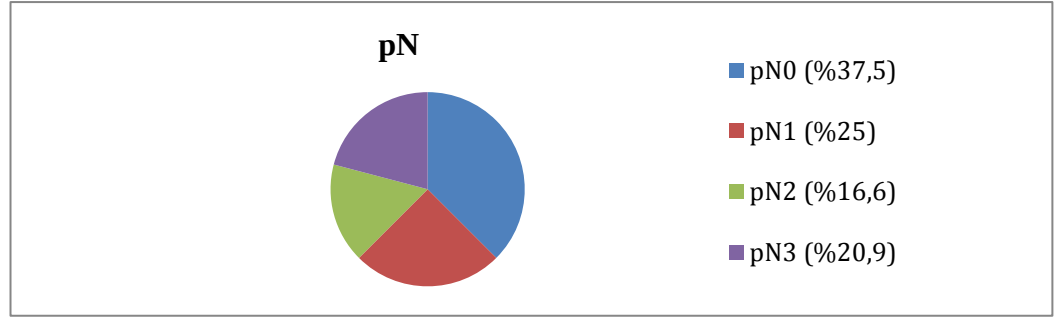
Ancak yapılan önceki çalışmalarda, meme kanserlerinde tümör boyutu ile *PIK3CA* mutasyonu arasında ciddi bir korelasyon saptanmış olup, biz de tümör çapının cut-off değerini 4 cm aldığımızda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptadık. Tümör çapı 4 cm ve altındaki 10 hastada hiç *PIK3CA* mutasyonu saptanmazken, tümörü 4 cm'den büyük olan 13 hastadan 6 'sında (%46,2) mutasyon saptanmıştır ($p<0,050$) (Tablo 20).

Tablo 20: Tümör çapı ve *PIK3CA* ilişkisi

	Tümör çapı ≤4 cm (n=10)	Tümör çapı >4 cm (n=13)	p
<i>PIK3CA</i>			
Yok	10 (%100)	7 (%53,8)	0,019
Var	0	6 (%46,2)	

4.2.3. Mutasyonların lenf nodu metastazı ile ilişkisi

Olguların 15'inde (%62,5) lenf düğümü metastazı saptanırken, 9'unda (pN0) (%37,5) saptanmamıştır. Lenf düğümü metastazı saptanan 15 hastadan 6 tanesi pN1 (%25), 4 tanesi pN2 (%16,6) ve 5 tanesi pN3 (%20,9)'dür.



Şekil 19: Olguların patolojik N evresine göre dağılımı

Lenf nodu metastazı içermeyen (pN0) 8 olgunun 2'sinde (%25) *PIK3CA*, 2'sinde (%25) *KRAS*, 1'inde (%12,5) *BRAF* mutasyonu tespit edildi. Patolojik N1 6 olgunun 1'inde (%16,6) *PIK3CA*, 2'sinde (%33,3) *KRAS*, 1'inde (%16,6) *BRAF*, pN2 4 olgunun 1'inde (%25) *PIK3CA*, pN3 5 olgunun 3'ünde (%60) *PIK3CA* ve *KRAS* mutasyonları tespit edildi. Mutasyon durumu ile patolojik N evresi karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 21).

Tablo 21: Patolojik N evresi ve mutasyon durumlarının karşılaştırması

	pN0 (n=8)	pN1 (n=6)	pN2 (n=4)	pN3 (n=5)	p
<i>PIK3CA</i>					0,505
Yok	6 (%75,0)	5(%83,4)	3(%75)	2(%40)	
Var	2 (%25,0)	1(%16,6)	1(%25)	3(%60)	
<i>KRAS</i>					0,301
Yok	6 (%75,0)	4(%66,7)	4(%100)	2(%40)	
Var	2 (%25,0)	2(%33,3)	0	3(%60)	
<i>BRAF</i>					0,686
Yok	7 (%87,5)	5(%83,4)	4(%100)	5(%100)	
Var	1 (%12,5)	1(%16,6)	0	0	

4.2.4. Histopatolojik derece ile ilişkisi

Modifiye Bloom-Richardson derecelendirilme sistemine göre olguların yarısı (%50'si) derece 2 olup diğer yarısı (%50'si) derece 3'dir. Derece 3 olan 12 olgunun 4'ünde (%33,3) *PIK3CA*, 3'ünde (%25) *KRAS*, 1'inde (%8,3) *BRAF* mutasyonu, derece 2 olan 11 olgunun 2'sinde (%18,2) *PIK3CA*, 3'ünde (%27,3) *KRAS*, 1'inde

(%9,1) *BRAF* mutasyonu tespit edilmiştir. Her üç mutasyon için derece 2 ve 3 olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 22).

Tablo 22: Histopatolojik derece ile mutasyon durumlarının karşılaştırması

	Derece 2 (n=11)	Derece 3 (n=12)	p
<i>PIK3CA</i>			
Yok	9 (%81,8)	8 (%66,7)	0,640
Var	2 (%18,2)	4 (%33,3)	
<i>KRAS</i>			
Yok	8 (%72,7)	9 (%75,0)	0,901
Var	3 (%27,3)	3 (%25,0)	
<i>BRAF</i>			
Yok	10 (%90,9)	11 (%91,7)	0,949
Var	1 (%9,1)	1 (%8,3)	

4.2.5. Sağ kalım ile ilişkisi:

Çalışmamıza dahil edilen 24 tane meme tümörlü vakadan toplam 23 olgunun durumları; 12 vakada mutasyon saptanırken, 11 olguda mutasyon saptanmamıştır. Beş olguda *PIK3CA* mutasyonu, dört olguda *KRAS* mutasyonu, bir olguda *BRAF* mutasyonu, bir olguda kombine *BRAF* ve *KRAS* mutasyonu ve bir olguda kombine *KRAS* ve *PIK3CA* mutasyonu görülmüştür. Olguların mutasyon durumları ile yaşam süreleri karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0,828)

Tablo 23: Mutasyon durumları ile yaşam sürelerinin karşılaştırılması

Olguların mutasyon durumu	Ex n (%)	Yaşıyor n (%)	Median yaşam süresi (ay)
<i>PIK3CA</i> mutant (5 vaka)	1 (20)	4 (80)	41,2
<i>KRAS</i> mutant (4 vaka)	1 (25)	3 (75)	26,5
<i>BRAF</i> mutant (1 vaka)	1 (100)	0	48
<i>BRAF</i> + <i>KRAS</i> kombine (1 vaka)	0	1 (100)	69
<i>KRAS</i> + <i>PIK3CA</i> kombine (1 vaka)	0	1 (100)	40
Negatif (11 vaka)	4 (36,3)	7 (63,7)	32,8



5.TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malignite türü olup, kadınlarda akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin en sık ikinci sebebidir. Meme kanserlerindeki yüksek insidans ve mortalite oranını azaltmak için klinik, görüntüleme ve patolojik yöntemlerin üçlü yaklaşımı ile ince iğne aspirasyon sitolojisi uygulamaları (84), iğne biopsileri ve BI-RADS skorları ile üçlü negatif meme kanserleri özellikleri arasında korelasyon çalışmaları yapılmıştır (85). Bunlara karşın dünyada bir yıl içerisinde 2,1 milyon kadına meme kanseri tanısı verilmekte olup %15'i de meme kanserinden kaybedilmektedir. Son yıllarda meme kanserinin insidansında artış ve mortalitesinde azalma görülmektedir (86).

Meme kanserli hastaların tedavisinin planlanmasında en önemli parametre, tanı anındaki evresidir ve ayrıca prognozu belirleyen en önemli faktördür. Tümörün histolojik tipi ve derecesi, tümör boyutu, aksiller lenf düğümü metastazı, lenfovasküler invazyon varlığı, hormonal durum da prognozu belirleyen diğer önemli belirteçlerdendir. Meme kanserinin hormonal profili birçok çalışmada (87) araştırılmış olup yanı sıra hücre siklusu, proliferasyon ve apoptotik mekanizmalar üzerine de çalışmalar süregelmıştır (88). Buna rağmen bütün bu parametreler dikkate alındığında; hastalar arasında tedaviye verdikleri cevap, tümörün davranışı, rekürrensler, metastazlar ve genel prognoz açısından oldukça farklılıklar olduğu dikkati çekmektedir. Bu davranış farklılığı prognozu etkileyen başka faktörlerin varlığını düşündürmektedir (89). Son yıllarda, bu farklılıkların genetik değişikliklerin bir sonucu olduğu ortaya çıkmıştır (90).

Gen anlatım düzeyinin tayini meme kanserinin klinik davranış, tedavi yönetimi, prognoz açısından farklı moleküler alt tiplere ayırabileceğini göstermiştir. ER, PR ve HER2 durumunun tespit edilmesi gerekmektedir. Bu spesifik moleküler belirteçlerin klinik olarak prognostik, terapötik ve prediktif önemleri kanıtlanmıştır (3). Meme kanserinin moleküler biyolojisinin anlaşılması için devam eden çalışmalar hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır.

ER ve PR eksprese etmeyen meme tümörleri; tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaka olup, bu grup hormonal terapiden fayda görememekte ve prognozları daha kötü olduğu tespit edilmiştir.

Üçlü negatif olarak adlandırılan grup; ER, PR ekspresyonu ve HER2 gen amplifikasyonunu içermeyen meme karsinomlarını içerir. Bu moleküler tip; tüm meme kanserlerinin% 10-17'sini oluşturmakta olup, agresif tümör davranışı nedeniyle kötü prognozla karakterizedir. Hedefe yönelik tedavi seçeneğinin olmaması ve klinik davranışının kötü olması sebebiyle en çok araştırılan meme tümörlerindendir. Son yıllarda prognoz açısından önemli olabilecek ve tedaviyi geliştirebilecek yeni belirteçler üzerine çalışılmaktadır.

HER2'den zengin olarak adlandırılan grup ise ER ve PR ekspresyonu içermeyip HER2 gen amplifikasyonu içeren meme karsinomlarıdır. Bu profil, daha agresif kanser biyolojisinin gelişmesine sebep olabilmektedir (7). Trastuzumab tedavisi, HER2 pozitif tümörlü hastalar için hedefe yönelik tedavi seçeneğidir.

Ancak bazı hastalar bu tedaviden fayda görmemekte olup, bu durumun moleküler yolaklardaki bir veya daha fazla değişiklikten kaynaklanabileceği düşündürmektedir (8).

Meme kanseri oluşumunda; genomik yapıda hücre proliferasyon ve canlılığını değiştiren çok sayıda anahtar değişiklik mevcuttur. Bu değişikliklere neden olabilecek gen mutasyonları saptandığında, hedefe yönelik terapi prognozu iyileştirmede oldukça fayda sağlayacağı için son yıllarda çalışmalar moleküler temellidir.

Ras gen ailesinin bir üyesi olan *KRAS*; viral onkogen homologudur. *KRAS* proteini MAP kinaz / hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz yolunun yukarısında bulunan önemli bir düzenleyici faktördür (59). Son çalışmalarda meme kanserinde *KRAS* mutasyon prevalansı, yaklaşık ortalama %7-12 arasında saptanmış olup HER2'den zengin grupta yaklaşık %17, üçlü negatif grupta ise bu oran %0-8 aralığındadır (9). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak HER2'den zengin olan grupta; üçlü negatif gruba göre daha fazla *KRAS* mutasyonu saptanmıştır.

BRAF, Raf kinaz ailesinin bir üyesi olan protein olup, Ras-Raf-MAPK yolundaki en önemli MAP kinaz aktivatörüdür. *BRAF* geninde en sık mutasyon, valin'in, 600. pozisyonunda (V600E) glutamik asitin yerine geçmesidir. *BRAF* V600E mutasyonu çok çeşitli tümörlerde mevcut olup meme kanserinde yaklaşık %2-4 oranında saptanmıştır (67). Vemurafenib ve dabrafenib gibi hedefe yönelik tedavi ajanları geliştirildiğinden bu mutasyonu saptamak prognoz açısından oldukça önemlidir.

PIK3CA; fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) diye adlandırılan enzimin bir alt ünitesi olan p110 α proteininin yapımını sağlayan bir gen olup, meme tümörlerinde bu yolağın aktivasyonu ile hastaların hormonal tedaviye dirençli hale gelebileceği gösterilmiştir. HER2'den zengin meme kanserlerinde *PIK3CA* mutasyonu yaklaşık %23; üçlü negatif meme kanserlerine % 5-13,2 arasında bulunmuştur (77). Ancak bizim çalışmamızda farklı olarak üçlü negatif tümörlerde bu mutasyon HER2'den zengin olan gruba göre daha sık saptanmıştır. Alpelisib gibi bu yolağın inhibitörleri ile tedavi edilen hastalarda kısmi yanıtın ve progresyonsuz sağkalımın arttığı öngörülmekte olduğundan bu mutasyonu saptamak meme tümörlerinde önem kazanmaktadır.

PIK3CA, *KRAS* ve *BRAF* mutasyonlarının eş zamanlı değerlendirilmesi ile ilgili daha önce yayınlanmış çalışmalar, çoğunlukla kolorektal kanserler üzerine yoğunlaşmıştır (90). Aynı zamanda bazı çalışmalar, *KRAS* ve *PIK3CA* mutasyonlarının aynı tümör içinde bir arada bulunduğunu da öne sürmüştür (90). Bizim çalışmamızda da iki olguda kombine mutasyon saptanmış olup birinde *KRAS* ve *PIK3CA* diğerinde *KRAS* ve *BRAF* birlikteliği saptanmıştır.

Wang ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınladıkları; Çinli meme kanserli kadınlar üzerinde yaptıkları çalışmada, *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarını incelemişlerdir. 25 meme kanserli hastada 8 olguda (%32) *PIK3CA*, 5 olguda (%20) *KRAS*, 4 olguda (%16) *BRAF* mutasyonu saptanmıştır (92).

Erdoğan G. ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada ise toplam 68 hasta çalışmaya dahil edilmiştir ve 38 hasta üçlü negatif, 10 hasta HER2'den zengin tip, diğer 20 hasta ise luminal tip meme kanseridir. Yalnızca bir üçlü negatif olguda *KRAS* (G12D) mutasyonu saptanırken hiçbir olguda EGFR mutasyonu saptanmamıştır. *PIK3CA* mutasyonu ise; 9'u (%23,7) (2: E542K, 1: E54K, 5: H1042R ve 1: M1043I mutasyonu) üçlü negatif alt grupta, 8'i (%40) (3: E545K, 3: H1047R, 1: H1047L ve bir tümörde E542K ile M1043I mutasyonu) luminal tip grubunda olmak üzere toplam 17 olguda saptanmış olup HER2'den zengin grupta bu mutasyon izlenmemiştir. Ayrıca derece 1 ve 2, çapı küçük ve luminal tipte olan meme tümörlerinde, *PIK3CA* mutasyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (5). Ancak aksine Aleskandarany ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada *PIK3CA* mutasyonunu yüksek histolojik derece, büyük tümör boyutu ve lenfovasküler invazyon gibi kötü prognostik faktörler içeren tümörlü hastalarda daha sık olduğunu saptamışlardır (93). Bu farklılık ilk çalışmanın hasta sayısının az olmasına bağlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise histopatolojik derece, lenf nodu metastazı ve sağ kalım ile *PIK3CA* mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ancak tümör çapı 4 cm ve altında olan toplam 10 olguda *PIK3CA* mutasyonu saptanmazken, tümör çapı 4 cm'den büyük olan 13 olgudan 6'sında (%46,2) mutasyon izlenmiştir. Bizim bulgularımız Erdoğan ve arkadaşlarının bulduğu sonucun aksine, Aleskandarany ve arkadaşlarının çalışması ile daha uyumludur.

Kodaz ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada, insan solid kanserlerinde RAS mutasyonlarının oranlarını derlemişlerdir. Meme kanserinde *KRAS* mutasyonunu yaklaşık %7-12 oranında saptamışlardır. Moleküler tiplere göre incelendiğinde ise; luminal A tümörlerde %2, luminal B’de %20, HER2’den zengin tipte %17.4 oranında *KRAS* mutasyonu saptanırken üçlü negatif tümör grubunda mutasyon saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak HER2’den zengin grupta *KRAS* mutasyonu, üçlü negatif gruba göre daha sık bulunmuştur (9).

Jyelling ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada HER2 pozitif meme kanserlerinde *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarını incelemişlerdir. Toplam 85 HER2 pozitif tümürlü olguyu incelemişler ve bunlardan 45’inin ER negatif olduğunu bildirmişlerdir. Mutasyon oranlarına bakıldığında 23 olguda (%27) oranında *PIK3CA* (ekzon 9 ve 20), bir olguda *BRAF* (V600E) mutasyonu saptanmış olup *KRAS* (incelenen noktalar; G12S, G12A, G12C, G12D, G12A, G12V, G13S, G13A, G13V, G13D, G13A ve G13V) mutasyonu hiçbir olguda izlenmemiştir. Prognostik faktörlerle *PIK3CA* mutasyonu karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu çalışmada kolorektal kanserlerin aksine meme kanserinde *KRAS* mutasyonu hiç saptanmadığından HER2 pozitif meme tümörlerinin moleküler yolağında rol oynamadığını savunmuştur (8). Ancak bizim çalışmamızda bu çalışmayla uyumsuz olarak HER2’den zengin dört olgumuzda *KRAS* (Q61H1, G12D, G12S, G12R) mutasyonu saptanmıştır ve meme kanserinin moleküler yolağında, *KRAS*’ın da rol oynadığı düşünülmüştür. Çalışmamızda mutasyonu saptanan Q61H1 ve G12R noktaları, bu çalışmada değerlendirilmediği için farklı sonuçlara sebep olduğu düşünülmüştür.

Taveira ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada; trastuzumab dirençli HER2 pozitif metastatik meme kanserlerinin genomik özelliklerini incelemişlerdir. Bu çalışmada; HER2 pozitif olup, trastuzumaba gelişen direncin ardındaki mekanizmaları araştırmak amacıyla 22 tane bu özellikleri taşıyan olguda, *PIK3CA*, *KRAS* ve *BRAF* mutasyonlarını da kapsayacak şekilde çok sayıda gen incelenmiştir. 22 dirençli olgudan 10’unda (%45.4) *PIK3CA* (5: H1047R, 4: E545K, 1: E542K), mutasyonu saptanmış olup en sık mutasyona uğrayan gen bulunmuştur. Bunu üç olguya (%13.6) *BRAF* (2: I326T, 1: G469E), *EGFR* ve *KIT* genleri takip

etmektedir. Ayrıca iki olguda (%9) *KRAS* (2: Q61K) mutasyonu saptanmıştır. *PIK3CA* mutasyonun belirgin derecede yüksek çıkması, direncin ardındaki mekanizmanın fosfoinositol 3-kinaz (PI3K) yolağının aktivasyonu ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca *BRAF*, *EGFR* ve *KIT* mutasyonları yoluyla MAPK/ERK yolağının aktivasyonunun, trastuzumab direncinin diğer nedeni olabileceğini öne sürmüşlerdir. Trastuzumaba dirençli HER2 pozitif metastatik meme kanserinde mutasyonel yük oldukça değişken olduğundan, ileri çalışmalar yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (94). Bizim çalışmamızda ise *PIK3CA* ve *KRAS* mutasyonlarının görülme sıklığı benzer olup (yaklaşık %36) ,*BRAF* mutasyonu daha az sıklıkta (%8,6) saptanmıştır.

Eachkoti ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmada 50 tane meme tümörlü olguda *BRAF* V600E mutasyon araştırılmıştır. Mutasyon taraması, oldukça hassas bir teknik olan mutasyon alleleline spesifik multipleks PCR kullanılarak gerçekleştirilmiştir. %12 olguda *BRAF* mutasyonu saptanmıştır. Araştırmada ÜNМК'lerinde, yaşlı ve postmenapozal kadınlarda *BRAF* mutasyonunu daha anlamlı bulunmuş olup tümörün histopatolojik derecesi ve evresi ile anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu durumda yaşlı ve postmenapozal ÜNМК meme kanserli hastalarda, endokrin tedavisi yerine *BRAF* hedefli tedaviler, gelecekte olası hedefe yönelik tedavi olarak düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda ise yaş, histopatolojik derece, evre ve ÜNМК ile HER2'den zengin grup arasında anlamlı farklılık saptanmamışken *BRAF* V600E mutasyon oranı %8.6 oranında bulunmuştur (70).

Rocca ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada üçlü negatif meme kanserlerinde *PIK3CA* mutasyonunu incelemişlerdir. Çalışmada *PIK3CA* mutasyonunun yanı sıra *KRAS*, *BRAF*, *EGFR* ve *AKT1* genlerinin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta 97 tane üçlü negatif olan ve 36 tane üçlü negatif olmayan (15 luminal A, 12 luminal B, 9 HER2'den zengin tip) meme kanserli olgu değerlendirmeye alınmıştır. Üçlü negatif grupta %23.7 oranında *PIK3CA* mutasyonu saptanırken, luminal A grubunda %40, luminal B grubunda %25, HER2'den zengin grupta ise %33.3 oranında *PIK3CA* (ekzon 9 ve 20) mutasyonu saptanmıştır. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu şekilde üçlü negatif ve HER2'den zengin gruplar arasında *PIK3CA* mutasyonu görülme sıklığında farklılık saptanmamıştır, Ayrıca üçlü negatif

olan grupta *KRAS*, *BRAF*, *EGFR* ve *AKT1*'de mutasyon gösterilmemiştir (95). Ancak bizim çalışmamızda, üçlü negatif olgularımızdan 2'sinde *KRAS* G12D ve G12S, 1'inde *BRAF* V600E mutasyonunu saptadık. Bu çalışmada değerlendirilen diğer genlerde de mutasyonun saptanmaması; çalıştıkları yöntemle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

McCart Reed ve arkadaşlarının 2019 yılında metaplastik karsinomlarla yaptıkları bir çalışmada bu tümörlerde kondroid morfolojinin *PIK3CA* mutasyonu ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bizim iki metaplastik karsinomlu olgumuz mevcut olup birinde *PIK3CA* H1047R, diğerinde *BRAF* V600E mutasyonu saptanmıştır. Ancak bu çalışmanın aksine *PIK3CA* mutasyonu olan tümörde kondroid morfoloji saptanmamıştır (34).

Martinez-Saez ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları geniş serili çalışmalarında 6338 meme kanserli olguda 'real time' PCR ile *PIK3CA* mutasyonun görülme sıklığını araştırmışlardır. %35.7 oranına *PIK3CA* mutasyonu saptanmış olup en sık mutasyona olan eksonlar; H1047R (%35), E545K (%17), E542K (%11), N345K (%6), H1047L (%4) saptanmıştır. Ayrıca moleküler sınıflamaya göre ÜNMK'lerinde %16, ER, PR pozitif, HER2 negatif grupta %42, HER'den zengin grupta %31 oranında bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise *PIK3CA* %26 oranında saptananırken HER2'den zengin grupta %18.2, üçlü negatif grupta %33.3'dür. Mutasyona uğrayan eksonlar ise bu literatür ile uyumlu olarak; H1047R (%66.6), E545K (%33.3)'dür (83).

Vranic ve arkadaşlarının memenin apokrin diferansiasyon gösteren karsinomların moleküler özellikleri ile ilgili yaptıkları çalışmada *PIK3CA* ve *TP53* mutasyonun *KRAS* ve *BRAF*'a göre daha sık görüldüğünü tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda bir tane apokrin diferansiasyon gösteren meme karsinomlu olgu mevcut olup bu çalışmanın aksine *KRAS* ve *BRAF* mutasyonu tespit edilmiştir (38).

Seo ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladıkları bir olgu sunumunda; antrasiklin bazlı kemoterapiye dirençli üçlü negatif metaplastik karsinomlu hastada NGS ile *BRAF* V600E mutasyonu saptanmış ardından dabrafenib ve trametinib kombine tedavi uygulanmıştır. Ancak hastada *BRAF* ve MEK inhibitörlerine karşı direnç diğer tümörlerde bildirilenlerden daha erken gelişmiştir (96). Bizim çalışmamızda 2 hastamızda *BRAF* mutasyonu saptanmıştı. Bu hastalardan birinin

histopatolojik tanısı bu olgu ile benzer şekilde metaplastik karsinomdu. *BRAF* mutasyonunun özellikle tedavilere dirençli, kötü prognozlu meme kanserlerinde araştırılmasının bu hastaların sağ kalımını arttırmada faydalı olacağı öngörülmektedir.

Mosele ve arkadaşlarının 2020 yılında geniş vaka serili çalışmasında 649 metastatik meme kanserli olguda NGS yöntemi ile *PIK3CA* mutasyonu incelenmiştir. Hormon reseptörü pozitif, HER2 negatif tümörde %28 oranında, ÜNMK'inde %10 oranında saptanmıştır. *PIK3CA* mutasyonu gösteren ER, PR pozitif, HER2 negatif tümörlerin kemoterapiye daha az sensitif olduğu ve genel sağkalımın daha düşük olduğu izlenmiştir. Bizim olgularımızın hepsi hormon reseptörü negatif olmasına rağmen %26 oranında *PIK3CA* mutasyonu saptanmıştır. Ancak bizim çalışmamızın kısıtlılığı olgu sayımızın azlığıdır (97).

Solassol ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çok merkezli bir çalışmada kolorektal kanserli dokular üzerinde; *KRAS* mutasyonunu birçok farklı yöntem ile değerlendirmişler ve bu çeşitli yöntemlerin doğruluğunu birbirleri ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışma; bizim çalışmamızda kullandığımız Randox hızlı tanı testi yanı sıra, sanger sekanslama, pirosekanslama, cobas *KRAS* mutasyon kiti, Idylla *KRAS* mutasyon testi, yeni nesil sekanslama (NGS) gibi birçok yöntemi içermektedir. Sonuç olarak bu çalışma, hızlı tanı testlerinin; NGS gibi çok pratik olmayan yöntemler yerine kullanılabileceğini düşündürmüştür (98).

Biz de bu literatürler ışığında 24 invaziv meme kanserli olguda *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarını Randox moleküler araştırma cihazı ile inceledik. Tamoksifen ve türevleri gibi antiöstrojenik hormonal tedaviden faydalanamayacak ve tüm meme karsinomlarının yaklaşık %20'sini oluşturan ER ve PR negatif olguları seçtik. Beş olguda *PIK3CA* mutasyonu, dört olguda *KRAS* mutasyonu, bir olguda *BRAF* mutasyonu, bir olguda kombine *BRAF* ve *KRAS* mutasyonu ve bir olguda kombine *KRAS* ve *PIK3CA* mutasyonu görülmüştür. Moleküler sınıflamaya göre olgularımızın yarısı üçlü negatif, diğer yarısı HER2'den zengin grup seçildi. Ancak bu iki grup arasında mutasyon görülme oranları açısından bir farklılık saptanmamıştır.

Kolorektal kanserli hastalarda anti-EGFR tedavisi için prognozda *KRAS* gen mutasyonu kritik öneme sahip olup meme kanserli hastalarda henüz yeterince araştırılmamıştır. Literatürde *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarını meme kanserlerinde inceleyen çalışmalar henüz yeterli değildir. Çalışmamızın amacı daha önce diğer karsinomlarda saptanan *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonlarını; üçlü negatif ve HER2'den zengin tip meme karsinomlarında araştırmak ve prognostik verilerle karşılaştırmaktır. Olgu sayımızın azlığı nedeniyle, prognostik verilerle ve iki grup arasında bu mutasyonlar arasında anlamlı farklılık saptanamadı. Ancak bu üç genin de hedefe yönelik ajanları mevcut olduğundan, mutasyon saptanan hastalarda prognozu va sağ kalımı artırmak için gelecekte bu tedavilerden yararlanılacağını öngörmekteyiz.

6. SONUÇLAR

- 1) HER2 pozitif ve HER2 negatif olan iki grup arasında histolojik derece, lenf düğümü metastazı ve tümör çapı bakımından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

- 2) HER2'den zengin grupta hastalardan sadece birinin (%8,3) ex olduğu görülürken, üçlü negatif olan grupta 6 (%50) hastanın ex olduğu dikkati çekmiştir. *PIK3CA* mutasyonu görülen 5 olgudan birinin (%20) ex olduğu, *KRAS* mutasyonu saptanan 4 olgudan birinin (%25) ex olduğu, *BRAF* mutasyonu tespit edilen bir vaka ex olmuştur. Ayrıca *KRAS+BRAF* ve *KRAS+PIK3CA* kombine mutasyonları saptanan iki hasta yaşamaktadır.
- 3) Ölüm oranı üçlü negatif grupta HER2'den zengin gruba göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,025$).
- 4) Mutasyon durumlarına bakıldığında; toplam 12 olguda (%52) mutasyon saptanırken, 11 olguda (%48) mutasyon saptanmamıştır.
- 5) Beş olguda *PIK3CA* mutasyonu, dört olguda *KRAS* mutasyonu, bir olguda *BRAF* mutasyonu, bir olguda kombine *BRAF* ve *KRAS* mutasyonu ve bir olguda kombine *KRAS* ve *PIK3CA* mutasyonu görülmüştür.
- 6) Moleküler sınıflamaya göre HER2'den zengin ve üçlü negatif olan iki grup arasında *PIK3CA* ($p=0,640$), *KRAS* ($p=0,371$) ve *BRAF* ($p=0,949$) bakımından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.
- 7) Her üç mutasyon için histolojik derece 2 ve 3 olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.
- 8) Mutasyon durumu ile patolojik T ve N evresi karşılaştırıldığında; aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır.
- 9) Tümör çapı 4 cm ve altında olan 10 hastanın hiç birinde *PIK3CA* mutasyonu saptanmamışken, tümör boyutu 4 cm'den büyük olan 13 olgudan 6'sında (%46,2) mutasyon saptanmıştır. *PIK3CA* mutasyonu ve tümör çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p=0,01$). Tümör çapı arttıkça *PIK3CA* mutasyonu görülme oranı artmakta olup kötü prognostik faktörlerle bu mutasyonun ilişkili olabileceği düşünülmüştür.
- 10) Sağ kalım ile *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır.

ER ve PR negatif tümörler, tüm meme kanserlerinin beşte birini oluşturmakta olup hormonoterapiden fayda görememektedir. Bizim çalışmamızda da hasta grubumuzu oluşturan bu grubun; tedavi şansını artırmak için tümör gelişiminde rol oynayan moleküler yolların daha fazla araştırılması gerekmektedir. Tedaviye dirençli

meme kanserli hastalarda, direnç sebebi olarak RAS/RAF/MAP/ERK yolağı sorumlu tutulmakta olup çalışmamızda; *BRAF* V600E mutasyonu %8.6, *KRAS* G12R, G12S, G12D, QG1H1, Q61R ise %26 oranında saptanmıştır. Tedaviye yanıtı olmayan hastalarda yolakların daha net aydınlatılabilmesi için daha geniş serili ve daha ayrıntılı genetik profilin incelendiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Genellikle meme kanserlerinde mutasyonlar nadir görülmekte olup NGS ile en sık saptanan mutasyonlar sırasıyla TP53, PIK3CA ve GATA-3'tür. Bu mutasyonlar klinik ve patolojik özellikler ile ilişkilidir. Luminal A ve B tipi tümörlerde PIK3CA mutasyonu daha sık görülmektedir. Genel mutasyon oranı luminal A alt tipinde en düşük olup, ÜNMG ve HER2'ye zengin grupta en yüksek mutasyon oranı bulunmaktadır. Bizim tüm olgularımızın üçlü negatif ve HER2'ye zengin olması, saptanan mutasyon oranlarımızın yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir.

Klinik olarak hedefe yönelik kullanılan birçok ajanın, spesifik mutasyonlarıyla eşleştirildiğinde etkinliği henüz kanıtlanamamıştır. Birden fazla genetik varyasyon, belirli bir tedaviye verilen yanıtı değiştirebilir ve bu nedenle, bir değişikliğin varlığı, terapötik bir yanıtı garanti etmez. Daha iyi tasarlanmış denemeler ve çalışmalar gereklidir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları; Randox array platformunda tespit edilen mutasyonların Real time PCR veya dizi analizi ile doğrulanamamış olması, çalışma grupları oluşturulduktan sonra her gruba düşen olgu sayısının düşük olması, ilgili genlerin klinik önemi olan mutasyonlarının tümünün çalışılamamış olması ve BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının tespit edilmemiş olmasından dolayı herediter ve sporadik formların ayrıştırılmadan örneklemin oluşturulmasıdır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda meme kanserinde *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* mutasyonları incelenmiştir. Ancak bu mutasyonların görülme sıklığını; üçlü negatif ve HER2'ye zengin gruplar arasında karşılaştıran çalışmalar yeterli değildir.

Sonuç olarak günümüzde kadınlarda en sık görülen malign tümör olan meme kanseri; geniş genetik heterojeniteye sahip ve oldukça karmaşık moleküler yolağı bulunan bir neoplazidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla bu heterojenitenin sebep olduğu, hedefe yönelik tedavi yöntemlerindeki zorluklar aşmaya çalışılmaktadır. Bizim hedefimiz; henüz tam olarak aydınlatılmamış olan genetik yolağa ışık tutmak ve literatüre katkıda bulunmaktır. Gen mutasyonları tümör

gelişiminde çok önemli rol oynadığından, meme kanserinin tedavisini iyileştirmeyi amaçlayan bir çalışma niteliğindedir.



7. KAYNAKLAR

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018; 68(6):394-424.

2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019 Jan;69(1):7-34.
3. Cetin I, Topcul M. Triple Negative Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(6):2427-31.
4. Barnes DM, Hanby AM. Oestrogen and progesterone receptors in breast cancer: past, present and future. *Histopathology* 2001, 38:271-274.
5. Erdoğan G., Özcan M., Karaveli F. Ş. and Peştereli H. E. KRAS, EGFR and PIK3CA mutation in triple negative breast carcinomas. *International Journal of Medical Research & Health Sciences* 2016, 5, 3:95-104.
6. Comen E, Davids M, Kirchhoff T, Hudis C, Offit K, Robson M. Relative contributions of BRCA1 and BRCA2 mutations to “triple negative” breast cancer in ashkenazi women. *Breast Cancer Res. Treat* 2011; 129, 185–190.
7. Ishikawa T, Ichikawa Y, Shimizu D, Sasaki T. The role of HER-2 in Breast Cancer. *J Surg Sci* 2014; 2(1): 4–9.
8. Jylling AMB, Rasmussen AA, Jakobsen EH, Christensen R, Sorensen FB. Are mutations in K-RAS, BRAF and PIK3CA genes critical for response to adjuvant trastuzumab treatment in patients with HER-2 positive breast cancer. *Journal of Cancer Therapeutics & Research* 2014; 3:3.
9. Kodaz H, Kostek O, Hacıoğlu M, Erdogan B, Elpen C, Hacıbekiroğlu İ et al., Frequency of RAS Mutations. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology* 2017; 1(1): 1-7.
10. Jung YY, Jung WH, Koo Sj. BRAF mutation in breast cancer by BRAF V600E mutation-specific antibody. *Int J Clin Exp Pathol* 2016; 9(2):1545-1556.
11. Ahmad F, Badwe A, Verma G, Bhatia S, Das BR. Molecular evaluation of PIK3CA gene mutation in breast cancer: determination of frequency, distribution pattern and its association with clinicopathological findings in Indian patients. *Med Oncol* 2016; 33(7).

12. Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist* 2011; 16 Suppl 1:1-11.
13. Hoda SA, Brogi E, Koerner F. C, Rosen PP. Rosen's Breast Pathology. 4th ed, Chapter I: Anatomy and Physiologic Morphology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2014, 27-35.
14. Schnitt SJ, Mills SE. Histology for Pathologists, 4th ed. Chapter II: Breast. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 2012: 67-84.
15. Kimberly HA, Edi B, Ian OE, Stephen BF, Elizbeth AM, Aysegul S. WHO Classification of Tumours 5th edition Breast tumours (IARC WHO Classification of Tumours). Chapter II: Epithelial tumours of the breast. Lyon, France: IARC pres, 2019: 128-180.
16. Safarpour D, Tavassoli FA. A Targetable Androgen Receptor–Positive Breast Cancer Subtype Hidden Among the Triple-Negative Cancers. *Arch Pathol Lab Med*, 2014; 139: 612-617. 18.
17. Türkiye Kanser İstatistikleri, 2018 https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser.db/istatistik/Trkiye_Kanser_statistikleri_2018.pdf. (erişim tarihi: 22.10.20)
18. Türkiye Kanser İstatistikleri, 2018 <https://dosyasb.saglik.gov.tr/36134,2018trpdf>. (erişim tarihi: 22.10.20)
19. Garber J. Risk Factors. In: Breast cancer, Oxford; Elsevier Saunders; 2005; 26-53.
20. Boecker W. Preneoplasia Of The Breast-a New Conceptual Approach to Proliferative Breast Disease. Elsevier: 2006; 63-85.
21. Lester SC, Kumar V, Abbas AK, Aster JC. The Breast. In: Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease Philadelphia. Elsevier Saunder; 2015; 1043-72.
22. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast

- cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*. 2002 J 20;360(9328):187-95.
23. Ernster VL, Barclay J, Kerlikowske K, Wilkie H, Ballard-Barbash R. Mortality among women with ductal carcinoma in situ of the breast in the 131 population-based surveillance, epidemiology and end results program. *Arch Intern Med* 2000; 160 (7): 953-8.
 24. Hortobagyi GN, Esserman L, Buchholz TA. Neoplasm of the breast. In: Holland JF, Frei E. *Cancer medicine*. 7th ed. London: BC Decker Inc, 2006: 1584-643. 28.
 25. Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Late mortality from pT1N0M0 breast carcinoma. *Cancer* 1999;85:2183–2189.
 26. Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly J, Baca M, Fitzgibbons P et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast 2016; College of American Pathologists (CAP). (https://webapps.cap.org/apps/docs/cancer_protocols/2005/breast05_pw.pdf) (erişim tarihi:10.11.20)
 27. Bianchi S, Vezzosi V. Microinvasive carcinoma of the breast. *Pathol Oncol Res*. 2008, 14(2):105-11.
 28. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Research: BCR* 2004; 6 (3): R149-56.
 29. Chen Z, Yang J, Li S, Lv M, Shen Y, Wang B et al. Invasive lobular carcinoma of the breast: A special histological type compared with invasive ductal carcinoma. *Plos One* 2017; 1;12(9).
 30. Michaut M, Chin SF, Majewski I, Severson TM, Bismeyier M, Koning L et al. Integration of genomic, transcriptomic and proteomic data identifies two biologically distinct subtypes of invasive lobular breast cancer. *Sci Rep* 2016; 6: 18517.

31. Rakha EA, Lee AH, Evans AJ, Menon S, Assad NY, Hodi Z, et al. Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(1), 99-104.
32. Hasbay B, Bolat FA, Aytaç HÖ, Aslan H, Purbager A. Metaplastic Carcinoma of the Breast: Analysis of 38 Cases from a Single Institute. *Türk Patoloji Derg* 2019; 36:23-30.
33. Weigelt B, Eberle C, Cowell CF, Ng C, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinoma: more than a special type. *Nat Rev Cancer*. 2014 ;14(3):147-8.
34. McCart AE, Kalaw E, Nones K, Bettington M, Lim M, Bennet J et al. Phenotypic and molecular dissection of metaplastic breast cancer and the prognostic implications. *J Pathol* 2019;247(2):214-227.
35. Natrajan R, Wilkerson PM. Characterization of the genomic features and expressed fusion genes in micropapillary carcinomas of the breast. *J Pathol*. 2014; 232(5):553-65.
36. Vani D, Geetanjali S, Punja GM, Bharathi M. A case of invasive papillary breast carcinoma: Fierce façade with favorable prognosis. *J Cancer Res Ther*. 2015; 11(4):1029.
37. Vranic S, Schmitt F, Sapino A, Costa JL, Reddy S, Castro M, Gatallica Z. Apocrine carcinoma of the breast: a comprehensive review. *Histology and Histopathology* 2013; 28(11):1393-1409.
38. Vranic S, Feldman R, Gatalica Z. Apocrine carcinoma of the breast: A brief update on the molecular features and targetable biomarkers. *Bosn J Basic Med* 2017; 21;17(1):911.
39. Aka F, Aker F, Bozkurt KK, Calay Z, Canöz Ö, Elagöz Ş, et al. Patoloji Dernekleri Federasyonu, 2017; Meme Çalışma Grubu (<http://www.tmhdf.org.tr/> /MEME_CALISMA_GRUBU_Rehberi_2017) (erişim tarihi: 10.11.20)

40. Fitzgibbons PL, Bartley AN, Connolly JL. Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Breast. 2019; College of American Pathologists. (<https://documents.cap.org/protocols/cp-breast-18biomarker-1201.pdf>) (erişim tarihi: 10.11.20)
41. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in breast cancer working group. J Natl Cancer Inst. 2011;103(22):1656-1664.
42. Gunn S, Yeh IT, Lytvak I. Clinical array-based karyotyping of breast cancer with equivocal HER2 status resolves gene copy number and reveals chromosome 17 complexity. BMC Cancer 2010;10:39.
43. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000;17;406(6797):747-52.
44. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hatie J, Marron JS, Nobel A et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(14):8418-23.
45. Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, Jacks LM, Patil SM, King T, Morrow M. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. Ann Surg Oncol 2009; 16(10):2705-10.
46. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. Clin Cancer Res 2008; 14(5):1368-76.
47. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res 2004;10(16):5367-74.
48. Kim K, Lee E, Lee J; Korea Breast Cancer Society. Clinicopathologic Signature of TNBC Patients with Good Prognosis. Cancer Research 2009; 69:24(4065).

49. Davis SL, Eckhardt SG, Tentler JJ, Diamond JR. Triple-negative breast cancer: bridging the gap from cancer genomics to predictive biomarkers. *Ther Adv Med Oncol.* 2014; 6(3): 88–100.
50. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* 2015, 24:S26-35.
51. Çoban ZD, Güran Ş. The role of signal transducing mechanisms in cancer diagnosis and treatment. *Cumhuriyet Med J* 2013; 35: 302-310.
52. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(10):a003236.
53. Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(8): 1263-84.
54. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Genetic and Pediatric Diseases. In: *Robins Basic Pathology*. Philadelphia: Elsevier Saunder; 2018: 90-295.
55. Bombonati A, Sgroi DC. The Molecular Pathology of Breast Cancer Progression. *J Pathol* 2011; 223(2): 307–317.
56. P, Wang Y, Li X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2019;9(5):871-879.
57. Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol*, 2012; 196(2): 189– 201.
58. Pejnova S, Dzokic G, Tudzarova-Gjorgova S, Panov S. Molecular Biology and Genetic Mechanisms in the Progression of the Malignant Skin Melanoma. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 2016; 37(2-3):89-97.

59. Wicki A, Herrmann R, Christofori G. KRAS in metastatic colorectal cancer. *Swiss Med Wkly*. 2010;140(4546).
60. Zhao XC, Chia-Chen C, Tsung-Liang L, Chii W. Detection of KRAS mutations of colorectal cancer with peptide-nucleic-acid-mediated real-time PCR clamping. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2016; 30: 1155-1162.
61. Galie M. RAS as Supporting Actor in Breast Cancer. *Front Oncol* 2019; 9:1199.
62. Garrett JT, Arteaga CL. Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol Ther*. 2011; 11: 793-800.
63. Elster N, Collins DM, Toomey S, Crown J, Eustace AJ, Hennessy BT. HER2-family signalling mechanisms, clinical implications and targeting in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015; 149: 5-15.
64. Daemen A, Griffith OL, Heiser LM, Wang NJ, Enache OM, Sanborn Z et al. Modeling precision treatment of breast cancer. *Genome Biol* 2013; 14: R110.
65. O'Shea J, Cremona M, Morgan C, Milewska M, Holmes F, Espina V et al. A preclinical evaluation of the MEK inhibitor refametinib in HER2-positive breast cancer cell lines including those with acquired resistance to trastuzumab or lapatinib. *Oncotarget* 2017; 8:85120-85135.
66. Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* 2003; 104: 527–532.
67. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33:19–20.
68. Capper D, Voigt A, Bozukova G, Ahadova A, Kickingereider P, Von Deimling A et al. BRAF V600E- specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI- H colorectal cancer. *Int J Cancer* 2013;133(7):1624-30.

69. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JH, Kallemeijn WW, Schutte M. Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Res* 2007; 5:195–201.
70. Eachkoti R, Farooq S, Reshi R, Rehman MU, Rashid T, Naikoo NA et al. Mutation allele-specific multiplex PCR for the detection of BRAFV600E mutations in breast carcinomas. *World Academy of Sciences Journal* 2019; 1: 145-150.
71. Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, Cho JY, Jan HM, Schellens JH et al. Dabrafenib and trametinib treatment in patients with locally advanced or metastatic BRAF V600–mutant anaplastic thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2018; 1;36(1):7-13.
72. Robert JC, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 2015; 1;372(1):30-9.
73. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok C, Beare D et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: 945-950.
74. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 1;65(7):2554-9.
75. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot U et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(16): 5049e5059.
76. Dhillon S. Everolimus in combination with exemestane: a review of its use in the treatment of patients with postmenopausal hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Drugs* 2013;73(5):475-85.

77. Copur MS, Jonglertham P. Alpelisib for PIK3CA-Mutated Advanced Breast Cancer. *N Eng J Med* 2019; 381(7):686-687.
78. Shtivelband MI. Everolimus in hormone receptor-positive advanced breast cancer: Targeting receptor-based mechanisms of resistance. *The Breast* 2013; 22(4):405-10.
79. Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490(7418):61-70.
80. Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C, Schnell C, Reddy A, Liu M, et al. Characterization of the novel and specific PI3Ka inhibitor NVP-BYL719 and development of the patient stratification strategy for clinical trials. *Mol Cancer Ther* 2014;13(5):1117-2.
81. Juric D, Janku F, Rodon J, Burris HA, Mayer IA, Schuler M, et al. Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-altered and PIK3CA-wild-type estrogen receptor positive advanced breast cancer: a phase 1b clinical trial. *JAMA Oncol* 2019; 5(2):1-9.
82. Andre F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2019; 380(20):1929-40.
83. Martinez-Saez O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, Gonzales-Farre M et al. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2020; 22,45.
84. Kocjan G, Bourgain C, Fassina A, Hagmar B, Herbert A, Kapila K, et.al. The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice. *Cytopathology*. 2008, 19(5):271-8.
85. Oktay M, Oktay NA, Besir FH, et.al. Relation between radiographic BI-RADS scores and triple negativity in patients with ductal carcinomas. *Int J Clin Exp Med*. 2014, 15;7(8):2334-8.

86. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019; 69(1):7-34.
87. Ž. P. Marinšek, N. Nolde, I. Kardum- Skelin,et.al. Multinational study of oestrogen and progesterone receptor immunocytochemistry on breast carcinoma fine needle aspirates. *Cytopathology* 2013, 24 (1): 7-20.
88. Arikok AT, Onal B, Han U. Expressions of Cyclin D1, p53, bcl-2, and bax in Infiltrative Ductal Carcinoma of the Breast: Correlations With Clinicopathologic Characteristics. *The Breast Journal* 2006, 12(4):391-2.
89. Tavassoli A. Breast tumours In: *Pathology Of The Breast*. Stamford:Connecticut: 1999; 85-96
90. Rao C, Shetty J, Prasad HLK. Immunohistochemical Profile and Morphology in Triple Negative Breast Cancers. *J Clin Diagn Res*, 2013; 7:1361-1365.
91. DeRoock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11: 753-762.
92. Wang YL, Dai X, Li YD, Cheng RX, Deng B, Geng XX, Zhang HJ. Study of PIK3CA, BRAF, and KRAS mutations in breast carcinomas among Chinese women in Qinghai. *Genet Mol Res* 2015; 23;14(4):14840-6.
93. Aleskandarany MA, Rakha EA, Ahmed MA, Powe DG, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. PIK3CA expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat*, 2010; 122(1):45-53.
94. Oliveira TM, Nabavi S, Wang Y, Tonellato P, Esteva FJ, Cantley LC, Wulf GM. Genomic characteristics of trastuzumab-resistant Her2-positive metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143(7):1255-1262.

95. Cossu-Rocca P, Orru S, Muroi MR, Sanges F, Sotgiu G, Ena S et al. Analysis of PIK3CA Mutations and Activation Pathways in Triple Negative Breast Cancer. PLoS One 2015;10(11):e0141763.
96. Seo T, Naguchi E, Yoshida M, Mori T, Tanioka M, Sudo K et al. Response to Dabrafenib and Trametinib of a Patient with Metaplastic Breast Carcinoma Harboring a BRAF V600E Mutation. Case Rep Oncol Med 2020;2518383.
97. Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, Dien AT, Garberis I, Droin N et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. European Society for Medical Oncology 2020; 377-386.
98. Solassol J, Vendrell J, Markl B, Haas C, Bellosillo B, Montagut C et al. Multi-Center Evaluation of the Fully Automated PCR-Based Idylla™ KRAS Mutation Assay for Rapid KRAS Mutation Status Determination on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue of Human Colorectal Cancer. PLoS One 2016;11(9):e0163444.