

# Meme Karsinomlarında Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Enzim Kesimi İle p53 Gen Mutasyonlarının Araştırılması ve Dokuda İmmunohistokimyasal Olarak P53 Proteininin Gösterilmesi

*Researching p53 Gene Mutation in Breast Carcinomas by Polymerase Chain Reaction And Enzyme Restriction and Displaying p53 Protein in Tissue by Immunohistochemical Method*

Mihrican AYDIN ÖZGÜR<sup>2</sup>, Hale ŞAMLI<sup>1</sup>, Asuman ÖZGÖZ<sup>1</sup>,  
Mustafa SOLAK<sup>1</sup>, Hüsnüye DİLEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Afyonkarahisar  
<sup>2</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, Afyonkarahisar

**ÖZET:** Kanser bir seri progressif genetik değişiklikler sonucunda oluşan çok basamaklı bir hastalıktır. Şimdiye kadar bir grup protoonkogen ve tümör supressör gen üzerinde meydana gelen değişikliklerin kanser oluşumunda etkili olduğu ortaya konmuştur. Tümör supressör gen grubundan olan ve kanser oluşumunda etkili olan genlerin başında p53 gelmektedir. p53 meme kanserinin gelişiminde oldukça etkili olduğu bilinmektedir, bu nedenle p53 gen mutasyonlarının tespitinin hastalığın takibinde ve erken tanısında önemli bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, meme kanserlerinde p53 genindeki ekson 5 ve 7'ye ait mutasyonların görülme sıklığı ve immunohistokimyasal yöntem ile p53 proteininin varlığının tespitini amaçladık. Buna bağlı olarak meme kanseri tanısı konmuş 20 olguya ait tümör dokusundan izole edilen DNA örneklerinden PCR tekniği kullanılarak ekson 5 ve 7 amplifiye edildi ve enzim kesimi ile mutasyon varlığı araştırıldı. Çalışma sonunda 20 olguya ait p53 genindeki ekson 5 ve 7'ye ait mutasyon oranı toplam %30 olarak bulundu. Ekson 5'e ait mutasyon oranı %20 ve ekson 7'ye ait mutasyon oranı %11,8 olarak saptandı.

Aynı örneklerle immunohistokimyasal yöntem ile p53 antikorunu uygulandı. Boyanma sonrasında 4 olguya ait örnekte %90 ve üzeri, 1 olguda %3, 2 olguda %1 ve 2 olguda %0,5 p53 protein pozitifliğinin varlığı tespit edildi. Olguların 11 tanesinde p53 protein varlığı gözlenmedi.

**Anahtar Kelimeler:** p53 mutasyonu, meme kanseri, immunohistokimya

**ABSTRACT:** Cancer is a multi-step mechanism occurring as a result of series of progressive genetic alterations. So far, molecular genetic studies revealed that a group of tumor suppressor gene and protooncogen alterations were effective in cancer formation. p53 is the most important tumor suppressor gene that is effective in cancer formation. p53 is very effective in progression of breast cancer. Due to this, detection of p53 mutations are thought to be an important factor in prognosis and early diagnosis. In this study, we aimed to detect the frequency of mutations of p53, exon 5 and 7 and their relations with progression of the disease. Relevant to this, by PCR, amplification of 5th and 7th exons were performed from isolated DNA samples of tumor tissues of breast cancer diagnosed in 20 cases and mutation existence was tested by enzyme restriction. As result of the study, mutation rate of 20 cases was found to be 30%, whereas mutation rates of exon 5 and exon 7 were found to be 20% and 11,8%, respectively.

Same samples were evaluated by immunohistochemistry method using p53 antibody. After staining, in samples of 4 cases 90% and over; in sample of 1 case 3,2%; in samples of 2 cases 1% and in samples of 2 cases 0,5% p53 protein positivity were detected. In samples of 11 cases p53 protein existence was not detected.

**Key Words:** p53 mutation, breast cancer, immunohistochemistry.

## GİRİŞ

Dünyada yılda görülen 10 milyon yeni kanser olgusunun %10'u, meme kanseri olgularına aittir. Her yıl 1 milyondan fazla meme kanseri tanısı alan olgulardaki ölüm ise 400.000 dolayındadır. Bu

ölümlerin %55'i gelişmiş ülkelerde görülmektedir (1). Meme kanserinde son 20 yılda hastalığın insidansı yükselmiş olmasına rağmen erken tanı ve sistemik yayılıma karşı daha aktif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin sonucu olarak prognoz daha iyi yönde gelişme göstermiştir (2). Ailesel, genetik, coğrafi çeşitlilik, yaş, kesintisiz adet görme, ilk doğum yaşı, gebeliğin, doğumdan önce sonlandırılması (özellikle ilk üç ayda) ve fibrokistik değişiklikler gibi birtakım faktörler meme kanseri riskini artırmaktadır (3-5).

Tümör baskılayıcı bir gen olan p53 geni 17. kromozomun kısa kolunda (p13) yer almaktadır (6-14). p53 geninin hücre siklusunda gerekli olduğu ve hücre bölünmesinde yaşamsal öneme sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca DNA'nın sentezi ve tamirinde, hücre farklılaşmasında ve programlanmış hücre ölümünde (apoptoz) görev almaktadır (6, 7, 15).

Tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de rapor edilen p53 gen mutasyonlarının büyük çoğunluğu evrim sürecinde çok iyi bir şekilde korunmuş olan 5-8. eksonlarında görülmektedir (6, 15, 16). p53 geninde en sık tanımlanan mutasyonlar nokta mutasyonları olup, delesyon ve insersiyon tipindeki mutasyonlar daha az görülmektedir (6, 17). Korunmuş bölgelerde bulunan 175., 248., 249., 273. ve 282. kodonlardaki mutasyonların insidansı diğer kodonlara göre daha yüksek bulunmuştur (6, 9, 18).

Meme karsinomlarında bulunan çoğu p53 gen mutasyonlarının, immünohistokimyasal (IHC) yöntemle saptanabilen kararlı, fonksiyonu yetersiz ve yıkılmayan p53 proteininin tümör hücrelerinde birikimine yol açtığı bildirilmiştir (19, 20).

Bu çalışmada meme kanseri tanısı konmuş olan hastalarda p53 geni ekson 5 ve 7'de yer alan 175. ve 249. kodona ait mutasyonlar HaeII ve HaeIII enzim kesimi ile belirlendi. Ayrıca hastalara ait tümör doku kesitlerine immünohistokimyasal yöntem ile p53 antikorunu uygulanarak p53 protein pozitifliği ile meme kanseri arasındaki ilişkiye bakıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada meme kanseri tanısı konulmuş 20 olguya ait parafine gömülü tümör doku örnekleri kullanıldı. Tek kullanımlık mikrotom bıçağı kullanılarak dokulardan 2 µm'lik 10'ar kesit alındı. Alınan kesitlere sırasıyla deparafinizasyon, yıkama, lizis, purifikasyon, presipitasyon, yıkama ve süspansiyon aşamalarından oluşan "ksilen - tuzla uzaklaştırma" yöntemi kullanıldı (21). Elde edilen DNA'ların saflık ve miktarını belirlemek için spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Olgulara ait DNA örnekleri p53 genine ait 5. ekson amplifikasyonu için 94 °C'de 7 dakika ilk denatürasyon, 35 döngü 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 2 dakika bağlanma, 72 °C'de 2 dakika uzama ve 72 °C'de 7 dakika son uzama, 7. ekson amplifikasyonu için 94 °C'de 7 dakika ilk denatürasyon, 35 döngü 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 1 dakika bağlanma, 72 °C'de 1 dakika uzama ve 72 °C'de 7 dakika son uzama olan PCR şartlarına programlanmış olan thermal cycler'da amplifikasyona bırakıldı.

397 bp uzunluğunda olan ekson 5 ve 6'ya ait primerler birlikte dizayn edildiğinden dolayı ekson 5'in amplifikasyonu ekson 6 ile birlikte gerçekleştirilmiştir. Ekson 7 ise 110 bp uzunluğundadır.

PCR uygulaması sonucunda, amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektrofeziyle, BsuRI (HaeIII) Marker kullanılarak kontrol edildi. Ekson 5 ve 6'ya ait 397 bazlık PCR ürünleri sadece 5. eksonda yer alan 175. kodonda ki CGC sekansını tanıyan HaeII (Haemophilus aegyptius) enzimi ile muamele edildi. 7. ekson amplifikasyon ürünü 249. kodonda bulunan GGCC sekansını tanıyan HaeIII (Haemophilus aegyptius) enzimi ile muamele edildi. 5. ve 6. eksonların amplifikasyon ürününün Hae II enzimi ile ve 7. ekson amplifikasyon ürününün Hae III enzimi ile muamelesi için, 1 µl enzim, 1 µl 10X M tamponu ve 8,5 µl PCR amplifikasyon ürünü 0,2 ml'lik steril ependorf tüpüne konduktan sonra, 1 saat 37 °C etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası enzim aktivitesi 10X yükleme tamponu ile durduruldu. BsuRI (HaeIII) Marker kullanılarak, 5. ve 6. eksonların enzim kesim ürünü %2'lik agaroz jel, 7. ekson enzim kesim ürünü %10'luk (%5 gliserinli) poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlar UV transillüminatör de değerlendirildi.

5. ekson HaeII enzimi ile muamele edildiğinde mutasyon olmaması durumunda 163 ve 234 bazlık iki parçaya ayrılması, mutasyon olması halinde ise enzimin tanıdığı kesim bölgesi ortadan kalkacağı için kesilmemiş 397 bazlık tek parça görülmesi beklendi. Ekson 7 için değerlendirmede amplifikasyon ürününün HaeIII ile muamelesi sonucunda, mutasyon olmaması halinde kesim gerçekleşeceği için 75 ve 35 bazlık iki parçaya ayrılması, mutasyon olması halinde ise HaeIII kesim noktası ortadan kalktığından 110 bazlık kesilmemiş bir parça görülmesi beklendi.

p53 proteininin immünohistokimyasal yöntem ile tespit etmek için olgulara ait tümör dokularının parafin bloklarından 3 µm kalınlığında alınan kesitler

önce deparafinizasyon işlemi uygulanarak boyaya hazırlandı. Daha sonra bu kesitler antijenlerin ve hidrojenlerin açığa çıkartılması, proteinlerin bloke edilmesi, antikor ile inkübasyon, işaretleme ve kon-tur boyama basamaklarından geçirilerek boyama iş-lemi tamamlandı. Değerlendirmede nükleer boyan-ma gösteren p53 antikor mikroskopta incelenerek pozitiflik oranları belirlendi.

## BULGULAR

Çalışmada klinik ve laboratuvar olarak meme kanseri tanısı almış olan 20 hastaya ait olan parafine gömülü tümör doku örneği kullanıldı. Bunların histolo-jik türleri, lokalizasyonu, tümör boyutu, lenf nodu tutu-lumu (metastazı), lenf nodu sayısı ve çapı, östrojen-progesteron reseptör pozitifliği, derecesi ve immunohistokimyasal olarak çalışması yapılan p53 proteini ekspresyonu değerleri Tablo 1’de verilmiştir.

Çalışmamızda p53 geni ekson 5 ve 7’ye ait PCR ürünlerine uygulanan enzim kesimi sonuçları Tablo 2.’de verilmiştir.

Ekson 5’e ait çalışmalar sonucunda 20 olgunun PCR amplifikasyon sonuçları ve enzim kesim sonuç-ları eksiksiz gerçekleşirken, ekson 7’ye ait çalış-malar sırasında bir olguya ait amplifikasyon gerçekle-ş-tirilemezken, iki olguya ait kesim sonucu da alın-mamıştır. Bu hastaların örneklerine yapılan tekrarlar sonrasında yine aynı sonuçlarla karşılaşılmıştır.

İmmünohistokimya yöntemiyle p53 antikor-u uygulanan örnekler uzman patolog tarafından bo-yanma yüzdesine göre değerlendirildi. Bu sonuçlar Tablo 1’de verilmiştir. Sonuçlara ait seçilen 8 nolu olgunun hematoksil-eozin ve immünohistokimya metoduyla p53 boyanan preparatlarına ait resimler Şekil 1.’de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Parafine gömülü meme dokusu örneklerinin laboratuvar değerlendirme sonuçları.

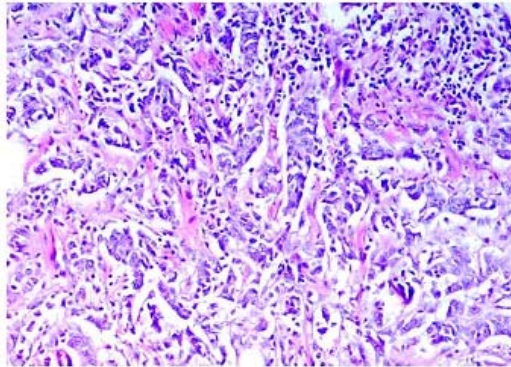
Olgu No	Yaş	Histolojik Tür	Lokali-zasyon	Tümör Boyutu (cm)	Lenf Nodu Sayısı	Lenf Nodu Çapı (cm)	ER-PR Reseptörü	Grade	p53 Boyanma Yüzdesi
1	65	IDC	-	1,5-0,5	7/30	2,5	%50+ / -	1	(-)
2	39	IDC	ÜİK,ADK	2-1	0/15	2-1	%95+ / %85+	1	(-)
3	62	IDC	ÜDK	2	0/33	2	- / -	2	(-)
4	78	IDC	ÜİK	2,3	2/23	≤1	%95+ / %25+	2	(-)
5	43	IDC	ADK	3,5	3/14	≤2	%95+ / %90+	1	(-)
6	55	IDC	ÜİK	-	-	-	- / -	1	(-)
7	83	IDC	ADK	1	-	-	- / -	1	%0,5
8	61	IDC	ÜİK	1,5 – 1	1/15	≤2	%10+ / %70+	2	%90
9	60	MEDÜLLER CA	ÜDK	5	0/2	-	- / -	3	(-)
10	43	IDC	AİK	3	3/3	≥2	- / -	3	%90
11	67	IDC/INTRA DC	ÜİK	1,7	0/20	-	%30+ / -	1	(-)
12	47	IDC	ÜDK	3	0/17	-	%70+ / %70+	1	%1
13	50	IDC	ÜDK	2,2	-	-	%80+ / %30+	2	%0,5
14	53	IDC	ÜDK	2,5	-	-	%60+ / -	3	%90
15	56	MEDÜLLER CA	ÜDK	3,5	0/22	-	- / -	3	%95
16	71	LOBÜLER CA	ADK	1,5	0/20	-	%90+ / -	1	(-)
17	63	IDC/INTRA DC	ÜDK	2,5	6/14	1,5	%40+ / %70+	1	%1
18	50	IDC	ÜİK	1	0/21	-	- / %30+	1	(-)
19	52	IDC+LOBÜLER CA	ÜDK	2,3	51/48	3	- / -	2	(-)
20	55	IDC	-	-	-	%80+ / %50+	1	%3	

**IDC:**İnvaziv Duktal Karsinom, **ÜİK:** Üst iç Kadran, **ÜDK:** Üst Dış Kadran, **ADK:** Alt Dış Kadran, **AİK:** Alt İç Kadran, **CA:** Karsinom

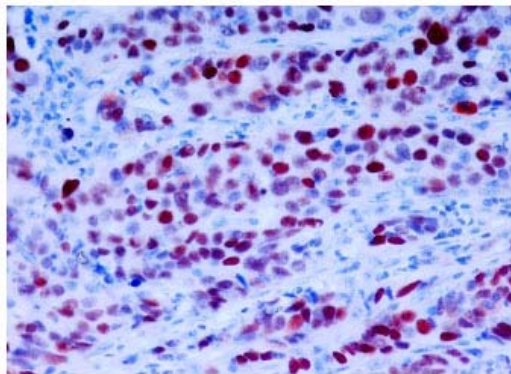
**Tablo 2.** Ekson 5 ve 7'ye ait enzim kesimi sonuçları.

Olgu No	Ekson 5 Mutasyon (Hae II Enzim Kesimi ile)	Ekson 7 Mutasyon (Hae III Enzim Kesimi ile)
1	Var	Yok
2	Yok	Yok
3	Yok	Yok
4	Yok	Yok
5	Yok	Yok
6	Yok	Yok
7	Yok	Yok
8	Yok	Yok
9	Var	Yok
10	Var	Yok
11	Var	Yok
12	Yok	Yok
13	Yok	Var
14	Yok	Yok
15	Yok	AY
16	Yok	Yok
17	Yok	Var
18	Yok	AY
19	Yok	Yok
20	Yok	Yok

AY: Amplifikasyon Yok



A: 10'lük objektif



B: 20'lük objektif

**Şekil 1.** 8 numaralı olguya ait hematoksilen eozin ve immünohistokimyasal p53 proteini boyanma görüntüleri

## TARTIŞMA

Yapılan pek çok çalışmada meme kanserlerinde p53 mutasyon sıklığının %15-71 arasında değiştiği tespit edilmiştir (22-24). Sporadik meme kanserlerinin oluşumunda p53 gen değişikliklerinin sıklığı ise %46 dolayındadır (8). Bu çalışmada ekson 5 ve 7 için yaptığımız enzim kesimi sonucunda elde ettiğimiz p53 gen mutasyon oranı %30 olarak gözlenmiştir.

Bir çok çalışmada saptanan sıklığın bütün genin veya ekson 5-8'deki korunmuş bölgelerin çalışılması ve farklı evrelerin farklı dağılımlar göstermesine rağmen popülasyonlar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (2).

Berns ve arkadaşları kodlanan bütün eksonları (ekson 2-11) içeren çalışmaların çoğunda değişimlerin yaklaşık %10'unun korunmuş bölgelerin (ekson 5-8) dışında olduğunu bildirmişlerdir (25).

p53 geninde çalıştığımız ekson 5 ve 7'ye ait mutasyon oranlarını ayrı ayrı değerlendirdiğimizde; ekson 5'de görülen mutasyon oranı %20, ekson 7 de ise %11,8'dir.

Bir çalışmada lenf nodu metastazı pozitif olanların, lenf nodu metastazı negatif olanlardan, büyük tümörlerin ya da ileri safhadaki hastalık tümörlerinin, küçük tümörlerden daha yüksek oranda mutasyona uğrama riskinin olduğu bildirilmiştir (2). Çalışmamızda kullandığımız 20 tümör örneğinden 8 tanesinde lenf nodu metastazı pozitif olup bu olgulardaki mutasyon oranı %25 (2 olgu) iken, lenf nodu metastazı olmayan 12 olguda ise bu oran %33,3 (4 olgu) olarak bulunmuştur. Lenf nodu metastazı pozitif olan mutasyonlu olgularda tümörler grade 1 dir. Bununla birlikte çalışmamızdaki lenf nodu metastazı pozitif ve grade 3 olan olgularda tümör boyutu ortalaması 2,7 cm'dir. Bu da yukarıda belirtilmiş olan veriyle ilişki göstermektedir.

Ho ve Done'nin çalışmalarına göre p53 mutasyonunun invaziv meme kanseri gelişiminden önce Duktal Karsinoma İn Situ (DCIS; Intraduktal karsinom)'da olduğu görülmüştür. Low-grade DCIS'da risk sıfır civarında iken, high-grade DCIS'da bu oran %30-40 kadardır (26, 27).

Çalışmamızda ise değerlendirdiğimiz kanserli olguların %70'inin histolojik türü invaziv duktal karsinomdur. Bunlarda mutasyon oranı %21,4 (14 olgudan 3 tanesinde) iken çalışmamızdaki diğer histolojik türlerde 6 olgudan 3 tanesinde mutasyon tespit edildi. Ayrıca çalışmamızda 2 olguya ait histolojik türde invaziv ve non-invaziv komponentler bir arada bulunmaktadır ve bu olguların ikisinde de mutasyon görülmüştür.

Berns ve arkadaşları, çalışmalarında genç olguların tümörlerindeki p53 gen mutasyonunun daha yüksek sıklıkta olduğunu bildirmişlerdir (25). Çalışmamızda yer alan 20 olguya ait yaş ortalaması 58'dir. Mutasyonlu olguların yaş ortalamaları da 58'dir. En fazla mutasyonlu hastanın bulunduğu yaş aralığı ise 61-70 arasındadır.

Östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği olgunun daha iyi bir prognoza sahip olduğunu bir göstergesidir. Reseptör pozitifliğinin araştırılması olgunun tedaviye yanıtı açısından önem taşır. Celmons ve Gross çalışmalarında antiöstrojen tedavisine en yüksek oranda (~%80) yanıtın östrojen ve progesteron reseptörlerin pozitif olduğu olgularda görüldüğünü, daha düşük seviyedeki yanıtların da (%25-45) reseptörlerin sadece birinin pozitif olduğu durumlarda izlendiğini, her iki reseptörün bulunmadığında ise çok az sayıda olgudan (%10'un altında) yanıt beklendiğini bildirmişlerdir (28). Bu çalışmada tümör örneklerini kullandığımız olgulardaki östrojen progesteron reseptör sonuçlarına göre; her ikisinin pozitif olduğu olgulardaki mutasyon oranı %25, her ikisinin negatif olduğu olgularda %28,6 ve birinin pozitif diğerinin negatif olduğu olgularda ise %50'dir.

Meme kanserlerinde mutasyona uğramış p53 proteininin varlığının belirlenmesinde immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bunun temelinde ise normalde yarı ömür kısa olan p53 proteininin missens mutasyonlar sonucunda yaygın genetik değişimi sonrasında yarı ömrünün uzamasına bağlı olarak hücrede birikmesi ve bu durumun monoklonal antikorlar aracılığıyla saptanması yer almaktadır (29, 30). p53 gen mutasyonlarının çoğunluğu ekson 5-8 arasındaki korunmuş bölgede bulunmaktadır. Bu bölgedeki mutasyonların yaklaşık %72'si immün boyama ile saptanabilen missens mutasyonlardır (15). Mutant p53 geninin meme kanseri prognozundaki rolünü açığa kavuşturmaya çalışan ilk çalışmalar IHC kullanılarak p53 birikimini saptamaya yöneliktir. Ayrıca 9000'den daha fazla meme kanseri hastasının analizinde p53 overekspresyonunun tahmine dayalı ve prognostik değeri zayıf bulunmuştur (31). Diğer yöntemlerden biri olan dizi analizi ile p53 mutasyonlarının saptanması kuvvetli prognostik öneme sahiptir (32-35). Nonberg ve Geisler, çalışmalarında meme kanserinde IHC ile ölçülen p53 protein birikimi ve dizi analizi ile saptanan p53 gen mutasyonu arasındaki ilişkinin %75'den daha az olduğunu bildirmişlerdir (36, 37).

İmmünohistokimyasal yöntemle p53 proteinin belirlenmesine yönelik 20 olgu üzerinde yapılan bu

çalışma sonrasında elde edilen bulgularla mutasyon bulguları karşılaştırıldığında önemli sayılabilecek bir ilişki olmadığı görülmüştür. Boyanma sonrasında 9 olguya ait örnekte %0,5-90 p53 protein pozitifliği tespit edildi. Bu 9 olgudan sadece 3 tanesinde p53 gen mutasyonu tespit edildi. p53 gen mutasyonlarının saptanmasında moleküler yöntemlerin duyarlılığı diğer yöntemlere göre daha başarılıdır. Sonuç olarak immünohistokimyasal yöntemle yapılan çalışmaların moleküler yöntemlerle desteklenmesi uygundur.

## KAYNAKLAR

1. Irgil E. Meme Hastalıkları. In: Ünal G, Ünal H Meme Kanseri Epidemiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd, 2001: 227-33.
2. Anne -Lise Borresan-Dale. TP53 and Breast Cancer. Hum Mutat, 2003; 21: 292-300.
3. Susan C., Lester, MD, PhD. The Breast. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N. Patolojik Basis Of Disease. Elsevier Saunders, 2005; 23: 1119-1154.
4. Haris JR., Lipman ME, Veronesi U, Willet W. Breast Cancer (First of the Three Parts). The New England Journal of Medicine, 1992; 327(5): 319-328.
5. Üskent N. Olgular Işığında Meme Kanseri. In: Karabece A Meme Kanserinin Doğal Seyri, Gelişimi, Risk Faktörleri, Dünyadaki Dağılımı ve Epidemiyolojisi. Turgut Yayıncılık, Astra Zeneca İlaç San, 2003: 1-14.
6. [http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal\\_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?PgId=40](http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?PgId=40) Erişim 20.06.2005
7. <http://www.bilkent.edu.tr/~infobil/> Erişim 20.06.2005
8. Bautista S, Theillet C. p53 mutations in breast cancer: incidence and relations to tumor aggressiveness and evolution of the disease. Pathol. Biol, 1997; 45: 882-892.
9. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell, 1997; 88: 323.
10. Prococimer M, Rotler V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: Projection on the hematologic cell lineages. Blood, 1994; 84(8): 2391-2411.
11. Eeles RA., Bartkova J, Lane DP, Bartek J. The role of TP53 in breast cancer development. Cancer Surveys, 1993; 18: 57-75.
12. Elledge RM et al. Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, 1993; 26(3): 225-235.
13. Levine AJ. The p53 Tumor Suppressor Gene and Product. Cancer Surveys, 1992; 12: 59-79.

14. Harris AL. p53 Expression in human breast cancer. *Advances in cancer research*, 1992; 59: 69-88.
15. Pezeshki AM, Farjadian S, Talei A, et al. p53 gene alteration and protein expression in Iranian women with infiltrative ductal breast carcinoma. *Cancer Letters*, 2001; 169: 69 -75.
16. Elledge RM, Fugua S, Clark G, Pujol P, Allred C. The role and prognostic significance of p53 gene alterations in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1993; 2: 95-102.
17. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 1994; 22: 3551-3555.
18. Levine AJ., Momand J, Finlay C. The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, 1991; 351: 453-456.
19. Nonberg T, Lennerstrand J, Inganas M, bergh J. Comparison between p53 protein measurements using the luminometric immunoassay and immunohistochemistry with detection of p53 gene mutations using cDNA sequencing in human breast tumors. *Int J Cancer*, 1998; 79: 376-383.
20. Geisler S, Lonning PE, Aas T, et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erb-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res*, 2001; 61: 2505-2512.
21. Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. p53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol*, 1994; 144(3): 511-517.
22. Andersen TI, Borresan AL. Alterations of the TP53 gene as a potential prognostic marker in breast carcinomas. Advantages of using constant denaturant gel electrophoresis in mutation detection. *Diagn Mol Pathol*, 1995; 4: 203-211.
23. Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 1999; 80: 1968-1973.
24. Hill KA., Sommer SS. p53 as a mutagen test in breast cancer. *Environ Mol Mutagen*, 2002; 39: 216-227.
25. Berns EM, Fockens JA, Vossen R, et al. Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. *Cancer Res.*, 2000; 60: 2155-2162.
26. Ho GH., Calvano JE., Bisogna M., et al. In microdissected ductal carcinoma in situ HER-2/neu amplification, but not p53 mutation, is associated with high nuclear grade and comedo histology. *Cancer*, 2000; 89: 2153-2160.
27. Done SJ, Eskandarjan S, Bull S, Redston M, Andrulis IL. p53 missense mutation in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst*, 2001; 93: 700-704.
28. Celmons M., Gross P. Estrogen and risk of breast cancer. *N Engl J Med*, 2001; 344: 276.
29. DeWolf WC. p53: an important key to understanding urologic cancer. *AUA Update Series*, 1995; ( XIV), 258.
30. Thorlacius S., Börresan AL., Eyfjörd J. Somatic p53 Mutations in Human Breast Carcinomas in in a Icelandic Population: A Prognostic Factor. *Cancer Research*, 1993; 56: 1637-1641.
31. Barbareschi M. Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas: a review of the literature involving over 9.000 patients. *Appl Immunohistochem*, 2002; 4: 106-116.
32. Kang JH, Kim SJ, Noh DY, Choe KJ, Lee ES, Kang HS. The timing and characterization of p53 mutations in progression from atypical ductal hyperplasia to invasive lesions in the breast cancer. *J.Mol.Med*, 2001; 79: 648-655.
33. Blaszyk H, Hartmann A, Cunningham JM, Schaid D, Wold LE, Kovach JS, Sommer SS. A prospective trial o midwest breast cancer patients: a p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int Cancer* 2000; 89:32-38
34. Hartmann A, Blaszyk H, Sommer SS. The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends Genet* 1997: 13:27-33
35. Pharoah PD, Day NE, Caldas C. somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999. 80:1968-1973.
36. Nonberg T, Lennerstrand J, Inganas M, Bergh J. Comparison between p53 protein measurements using the luminometric immunoassay and immunohistochemistry with detection of p53 gene mutations using cDNA sequencing in human breast tumors. *Int J Cancer*, 1998; 79: 376-383.
37. Geisler S, Lonning PE, Aas T, et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erb-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res*, 2001; 61: 2505-2512.