



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KALITSAL/AİLESEL MEME VE/VEYA OVER
KANSERİ TANISI ALMIŞ OLGULARDA
BRCA1/BRCA2 GEN MUTASYONLARININ
RETROSPEKTİF OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Zehra MANAV KABAYEĞİT

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gökay BOZKURT

AYDIN, 2019

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KALITSAL/AİLESEL MEME VE/VEYA OVER
KANSERİ TANISI ALMIŞ OLGULARDA
BRCA1/BRCA2 GEN MUTASYONLARININ
RETROSPEKTİF OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Zehra MANAV KABAYEĞİT

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gökay BOZKURT

AYDIN-2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, iyi niyetini ve desteğini her zaman hissettiğim, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı, tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Gökay Bozkurt'a,

Eğitimim süresince sorularıma bıkmadan cevap veren, bilimsel merakı ile her zaman daha fazla araştırmaya ve çalışmaya teşvik eden, akademik desteğinin yanı sıra manevi desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Ayşe Fahriye Tosun'a,

Rotasyonlarım süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, başta Prof. Dr. Haluk Akın olmak üzere Ege Üniversitesi Tıbbi Genetik AD'deki hocalarıma, Ege Üniversitesi Çocuk Metabolizma BD'deki hocalarıma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Perinatoloji BD'deki hocalarıma,

Hayatımın bir noktasında iyiki karşılaşmışım dediğim değerli meslektaşım, ablam Uzm. Dr. Ayşegül Öztürk Kaymak'a,

Asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım, benim için iş arkadaşından ve meslektaştan çok daha ötesi olan Dr. Mustafa Altan ve Dr. Lamiya Mardan'a, ADÜ Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım ve her birinden farklı şeyler öğrendiğim başta canım Cansu olmak üzere, Yeşim ablam, Aylin ve Ufuk'a

Liseden beri yanımda olan ve tez süresince de gönlümce nazlanabildiğim dostlarım Hacer ve Gülnihal'e,

Hayatım boyunca maddi manevi her zaman arkamda olan, kararlarımı her zaman destekleyen ve bazı adımları atmam için beni yüreklendiren canım annem, canım babam ve birtanecik kardeşime, ailemin diğer yarısı amcam, yengem, Gamze ve Ali Emre'ye,

Hayatımda olduğu ve beni her zaman desteklediği için sevgilim Barış'a, hayatımda olmalarından sonsuz mutluluk duyduğum patili çocuklarım Çaki ve Fiko'ya,

Ve tabiki sağlıklı, başarıyla bugünlere geldiğim ve ben olduğum için kendime teşekkür ediyorum..

Zehra MANAV KABAYEĞİT

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	ii
TABLolar DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. Kanserin Tarihçesi	2
2.1.2. Kanser Hücresinin Özellikleri	2
2.1.3. Kanser ve Genetik	5
2.1.3.1. Tümör Baskılayıcı Genler	5
2.1.3.2. Onkogenler	7
2.2. Dna Onarımı	8
2.2.1. DNA Hasarı	8
2.2.2. DNA Tamir Mekanizmaları	9
2.2.2.1. Direkt Tamir Mekanizmaları	9
2.2.2.1.1. Fotoreaktivasyon	9
2.2.2.1.2. O-6-Metilguanin Tamiri.....	9
2.2.2.1.3. Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu.....	9
2.2.2.2. Kesip-Çıkarma (Eksizyon) Tamirleri	9
2.2.2.2.1. Baz Eksizyon Tamiri (BER)	10
2.2.2.2.2. Nükleotid Eksizyon Tamiri (NER)	11
2.2.2.2.3. Yanlış Eşleşme Eksizyon Tamiri (MER).....	11

2.2.2.3. Rekombinasyonel Tamir	11
2.2.2.4. SOS Tamiri.....	12
2.2.2.5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri	12
2.2.2.5.1. Serbest Uçların Homolog Olmayan Bağlanması(NHEJ)	12
2.2.2.5.2. Homolog Rekombinasyon(HR)	12
2.3. Meme ve Over Kanseri	14
2.3.1. Meme Kanseri ve Epidemiyoloji.....	14
2.3.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri	18
2.3.3. Over Kanseri ve Epidemiyoloji	19
2.3.4. Over Kanseri Risk Faktörleri.....	20
2.3.5. Ailesel Meme/Over Kanseri	21
2.4. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genleri	21
2.4.1. <i>BRCA1</i> Geninin Yapısı.....	24
2.4.2. <i>BRCA2</i> Geninin Yapısı	25
2.4.3. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Mutasyonları	25
2.4.4. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Gen Mutasyonlarının Toplumlara Göre İnsidansı	26
2.5. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Analizinde Kullanılan Tanı Yöntemleri	28
2.5.1. Konvansiyonel Dizi Analizi	30
2.5.2. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing - NGS).....	31
2.5.2.1. Pirosekanslama (Pyrosequencing)	32
2.5.2.2. Siklik Geriye Dönüşümlü Sonlandırma (Cyclic Reversible Termination) ile Dizileme.....	33
2.5.2.3. Ligasyon Yoluyla Dizileme.....	33
2.5.2.4. İon Semikondüktör Dizileme.....	34
2.5.2.5. Nano Dizileme.....	34

2.5.3. Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification - MLPA).....	34
2.5.3.1. MS-MLPA (Metilasyona Spesifik MLPA)	36
2.5.3.2. RT-MLPA (Ters Transkriptaz MLPA)	37
2.5.3.3. Array-MLPA (Array Tabanlı MLPA)	37
2.5.4. Mikroarray	38
2.6. Meme Kanserinde Etik ve Genetik Danışma	38
2.6.1. Genetik Bilgilendirme	39
2.6.2. Genetik Ayrımcılık ve Yasal Düzenlemeler	39
2.6.3. Genetik Danışma	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. Hasta Grubu	42
3.2. Yöntem.....	43
3.3. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇ.....	55
7. ÖZET	56
8. SUMMARY	57
9. KAYNAKLAR.....	58
10. EKLER	70
10.1. Kabul ve Onay.....	70

TABLolar DİZİNİ

Tablo I. Tümör Baskılayıcı Genler	6
Tablo II. Onkogenler	8
Tablo III. Etnik Gruplara Göre Sık Görülen <i>BRCA</i> Mutasyonlarının Dağılımı	27
Tablo IV. Tümör Histopatoloji Sonuçları.....	45
Tablo V. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> 'de saptanan hastalık etkeni mutasyonlar	47
Tablo VI. <i>BRCA</i> mutasyonu saptanan olguların klinik ve patolojik özellikleri	48



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Warburg Etkisinin Moleküler Mekanizması.....	4
Şekil 2. İnsanda Eksizyon Tamir Mekanizması Basamakları	10
Şekil 3. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri	13
Şekil 4. <i>BRCA</i> Yolaklarında veya Çoklu Protein Ağlarında DNA Onarımı Mekanizması.....	14
Şekil 5. Dünyada En Yaygın Görülen 10 Kanserde, 2018'de Tahmini Yeni Kanser Vakalarının ve Kanser Kaynaklı Ölümlerin Erkek (a) ve Kadınlarda (b) Dağılımı.	16
Şekil 6. 2018 GLOBOCAN Verilerine Göre Türkiye’de a) Erkeklerde, b) Kadınlarda, c) Her İki Cinsiyette Tüm Yaşlarda Yeni Tanı Alan Kanser Vakaları.....	17
Şekil 7. Meme Kanseri İlişkili Genlerin Frekans ve Risk Dağılımı.....	18
Şekil 8. <i>BRCA</i> Genlerinin Fonksiyonel Özellikleri.....	23
Şekil 9. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Fonksiyonel Alanları ve Bazı Etnik Köken/Bölgelerde Sık Rastlanan Birkaç Mutasyonun Gösterimi	24
Şekil 10. Çalışmaya Dahil Edilen Olgularda <i>BRCA</i> Mutasyonları	46
Şekil 11. Saptanan Mutasyon Türleri	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AB	Avrupa Birliği
Abl	Abelson Geni
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADP	Adenozindifosfat
AFP	Alfa-fetoprotein
Akt-2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
AR	Androjen Reseptör
ARF	ADP Ribozilasyon Faktörü
AS	Angelman Sendromu
ATM	Ataxia Telenjiektazi Mutated
ATP	Adenozintrifosfat
ATR	Ataksi Telenjiektazi ve Rad3-İlişkili Protein
bç	Baz çifti
BARD1	<i>BRCA1</i> Birleşmiş RING Domain 1
Bcl-2	B Hücreli Lenfoma 2
BER	Baz çıkarma onarımı “Base excision repair”
BMI	Vücut Kitle İndeksi
<i>BRCA1</i>	Breast Cancer 1
<i>BRCA2</i>	Breast Cancer 2
<i>BRCT</i>	<i>BRCA1</i> C Terminal
<i>BRIP1</i>	<i>BRCA1</i> Etkileşimli C Terminal Helikaz
BWS	Beckwith-Wiedemann Sendromu
C	Sitozin
°C	Santigrat Derece
C-myc	Myc Protoonkogeni
C-terminal	Karboksi uç
CCD	Kızıl ötesi kamera
CDH1	E-cadherin

CDK1	Siklin Bağımlı Kinaz 1
cDNA	Komplementer DNA
CH3	Metil grubu
CHEK2	Checkpoint Kinaz 2
CNV	Kopya Sayısı Değişikliği
CPD	Siklobütan Primidin Dimeri
CpG	Fosfodiester bağı ile bağlı Sitozin-Guanin
CtBP1	C-terminal bağlayıcı protein 1
CtIP	C-terminal bağlayıcı protein 1 (CtBP1) etkileşimli protein
dATP	Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP	Deoksisitozin Trifosfat
ddATP	Dideoksiadenozin Trifosfat
ddCTP	Dideoksisitozin Trifosfat
ddGTP	Dideoksiguanin Trifosfat
ddNTP	Dideoksinükleotit Trifosfat
ddTTP	Dideoksitimin Trifosfat
del	Delesyon
dGTP	Deoksiguanin Trifosfat
dTTP	Deoksitimin Trifosfat
<i>DICER1</i>	Dicer 1, Ribonükleaz 3
<i>DMD</i>	Duchenne musküler distrofi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNA pol ϵ/δ	Deoksiribonükleik Asit polimeraz ϵ/δ
DNMT	DNA Metil Transferaz
DPC4	SMAD Ailesi Üyesi 4
DSB	Çift Zincir Kırığı
DSBR	Çift Zincir Kırıklarının Tamiri
dsDNA	Çift Zincir DNA
dup	Duplikasyon
EOK	Epitelyal Over Kanseri
ErbB-2	Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2

ERCC1	Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, kompleman grup 1
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FA	Fankoni Anemi
<i>FACJ</i>	<i>BRCA1</i> Etkileşimli C Terminal Helikaz
FANCA	FA Kompleman Grup A
FANCC	FA Kompleman Grup C
FANCD2	FA Kompleman Grup D2
FGFR2	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2
Fos	Fos protoonkogen
<i>FOXL2</i>	Forkhead Box L2
G	Guanin
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2	Gap 2
GINA	Genetik Bilgi Ayrımcılık Yasası
GLOBOCAN	Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalance
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları “Genome-Wide Association Studies”
H	Histon
H2AX	Histon 2A Ailesi Üyesi X
HBOC	Kalıtısal Meme Over Kanseri Sendromu
HR	Homolog Rekombinasyon
<i>INK4a</i>	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A
IVS	Araya Giren Dizi “intervening sequence”
ins	İnsersiyon
kb	kilobaz
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog..
L-myc	Myc Protoonkogen
LGR	Büyük Genomik Yeniden Düzenleme
LOH	Heterozigotluk Kaybı “Loss of Heterozygosity”
LSP1	Lenfosit Spesifik Protein 1

M	Mitoz
M.Ö.	Milattan Önce
M.S.	Milattan Sonra
MAP3K1	Mitojen Aktif Protein Kinaz Kinaz Kinaz 1
MER	Yanlış Eşleşme Eksizyon Tamiri
miRNA	Mikro Ribonükleik asit
MLH1	mutL homolog 1
MLPA	Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification..
MMR	Yanlış Eşleşme Onarımı
MRE11	Mayotik Rekombinasyon 11 Homolog 1
MRN	<i>MRE11-RAD50-NBS1</i> Kompleksi
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MSH2	mutS homolog 2
MSH6	mutS homolog 6
MS-MLPA	Metilasyon Spesifik MLPA
Myb	Myb Protoonkogeni
MYC	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
N-terminal	Amino terminal
NBS1	Nibrin
NCCN	The National Comprehensive Cancer Network
NER	Nükleotid çıkarma Onarımı (" <i>Nucleotide excision repair</i> ")
NF1	Nörofibromin 1
ng	nanogram
NHEJ	Serbest Uçların Homolog Olmayan Bağlanması
NHL	Hodgkin Dışı Lenfoma
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NGS	Yeni Nesil Dizileme
OH	Hidroksil Grubu
OKS	Oral Kontraseptif
p53	Tumor protein p53
PALB2	Partner and Localizer of <i>BRCA2</i>
PARP	Poly (ADP-Riboz) Polimeraz

PCNA	Prolifere Hücre Nükleer Antijen
PGR	Progesteron Reseptörü
PMS1	Postmeiotic segregation increased 1
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2
Ppi	Pirofosfat
PTCH	Protein Patched Homolog 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PWS	Prader-Willi Sendromu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAD50	DNA Repair Protein RAD50
RAD51	DNA Repair Protein RAD51 Homolog 1
RAD52	DNA Repair Protein RAD52 Homolog
Ras	Ras Protoonkogeni
RB1	Retinoblastoma 1
Ret	Ret Protoonkogeni
RING	İlgi Çekici Yeni Gen “Really Interesting New Gene”
Ros	Ros Protoonkogeni
RPA	Replikasyon Proteini A
RT-MLPA	Ekspresyon Profilleme
S	Sentez
SMAD4	SMAD Family Member 4
SOLiD	Desteklenen Oligonükleotid Ligasyonu ve Tespiti
SRS	Silver-Russell Sendromu
SSA	Tek İplikçik Kaynaştırma
ssDNA	Tek Zincir DNA
STK11	Serin/Treonin Kinaz 11
T	Timin
TAD	Transkripsiyonel Aktivasyon Alanı
TFIIH	Transkripsiyon Faktörü IIIH
TGFB1	Transforming Growth Faktör Beta 1
TOX3	Trinucleotide Repeat-Containing Gene 9 Protein
TSC1	Tuberoz Skleroz 1 Protein

TSC2	Tuberoz Skleroz 2 Protein
UI	Belirsizlik Aralığı
UV	Morötesi
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau Tümör Supresör
VUS	Önemi Bilinmeyen Varyant
XPA	Kseroderma Pigmentosum grup A
XPC	Kseroderma Pigmentosum grup C
XPF	Kseroderma Pigmentosum grup F
XPG	Kseroderma Pigmentosum grup G
XRCC2	X-Ray Repair Cross Complementing 2
XRCC4	X-Ray Repair Cross Complementing 4
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WNT	Wingless-type MMTV integration site family
WT1	Wilms Tümör 1

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, milattan önceki yıllardan bu yana varlığı bilinen, zamanın bilgisi ve bilimin sınırları kadar tarif edilebilmiş, günümüzde ise oluşumundan gelişimine, tanısından tedavisine çok fazla bilgiye sahip olduğumuz, bilgimiz arttıkça bilmediğimiz kısmın derinliğinin daha iyi farkına vardığımız bir hastalıktır.

Global Cancer Statistics 2018 (GLOBOCAN) verilerine göre Dünya çapında en sık görülen kanser kadınlarda meme kanseridir, ayrıca kadınlarda kanserden ölümlerin en sık nedenidir. Türkiye verileri de Dünya geneliyle örtüşmekte ve kadınlarda en sık görülen kanserin ülkemizde de meme kanseri olduğu bildirilmektedir.

Kalıtsal meme/over kanseri ise Breast Cancer 1 (*BRCA1*) ve Breast Cancer 2 (*BRCA2*) genlerindeki mutasyonların neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır. DNA onarımında görev alan bu iki gendeki hastalık yapıcı mutasyonlar kalıtsal meme/over kanserlerinin yaklaşık %5-10'undan sorumludur. Günümüze kadar *BRCA1/BRCA2* genlerinde meme/over kanserine neden olduğu bilinen 5000'den fazla mutasyon bildirilmiştir.

The National Comprehensive Cancer Network (NCCN) meme/over kanseri tanısı alan veya ailesinde meme/over kanseri tanısı almış olgular bulunan bireyler için *BRCA1/BRCA2* test kriterlerini belirlemiştir. Bu kriterlere uygun olarak seçilen olgularda, farklı genetik yöntemler kullanılarak *BRCA1/BRCA2* gen analizleri yapılabilir. Bu yöntemlerden en sık kullanılanları, konvansiyonel dizi analizi ve MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) iken, son yıllarda teknolojinin ilerlemesi, test çalışma süresinin daha kısa olması, aynı anda çok sayıda örneğin çalışılmasının mümkün olması gibi nedenlerle Yeni Nesil Dizileme (NGS) platformları ön plana çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran/konsulte edilen ailesel/kalıtsal meme/over kanseri olgularından *BRCA1/BRCA2* geni çalışma kriterlerini karşılayanların dosyalarının retrospektif olarak taranması, olguların *BRCA1/BRCA2* geni konvansiyonel dizi analizi sonuçlarının incelenerek toplumumuza özgü *BRCA1/BRCA2* gen mutasyonlarının ve mutasyon sıklıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Kanserin Tarihçesi

Kötü huylu tümörlerle ilgili ilk tanımlar M.Ö. 3000 yıllarına ait olduğu düşünülen Mısır Papirüsleri (Edwin Smith Papirüsleri), Babil çivi yazısı tabletleri ve eski Hint yazmalarında karşımıza çıkmaktadır (1). Edwin Smith Papirüsü ilk yazılı kanser belgesi olarak tarihe geçmiş olup, meme tümörü olan sekiz vaka tanımlanmakta ve tümörün tedavisinin olmadığından bahsedilmektedir. Ebers Papirüsü'nde (M.Ö.15-16. yüzyıl), ilk yumuşak doku tümörleri cerrahi yöntemlerle tedavi edilebilecek, taş gibi sert, nasır şeklinde bir damar tümörü olarak tanımlanmış, yaranın fazla kanamaması için operasyondan sonra yakılması önerilmiş ve tümör tedavisinin öldürücü olabileceği belirtilmiştir. Kanser terimi ise ilk defa Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-370) organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları için kullanılmıştır. Bu yeni yapılanmaları; Hipokrat "karkinos" ya da "karkinoma" olarak adlandırırken, Celsius (M.Ö. 25- M.S. 50) Yunanca "karkinos" teriminin Latince'de "kanser" olarak bahsetmiş, Galen (M.S. 130-200) ise tümörleri tanımlamak için "onkos" (şişkinlik) terimini kullanmıştır (2). Türk tıp tarihinde ise, Tarsuslu Osman Hayri Efendi'nin "Kenzüsıhhatül Ebdaniye" (1298) adlı eserinde fındık ya da küçük yumru büyüklüğünde, ağırlı, etrafı damarlı bir oluşum olarak tanımladığı "seretan" terimi, kanserli dokunun Türk tıp tarihindeki ilk adıdır (3). Tarihsel bilgiler ışığında, kanserin bilinirliğinin oldukça eski zamanlara dayandığı bir gerçektir ve ilk tanımlandığı zamanlardan bu yana, ağır klinikle seyreden, tedavisi zor ve ölümcül bir hastalık grubu olarak halen ciddiyetini korumaya devam etmektedir.

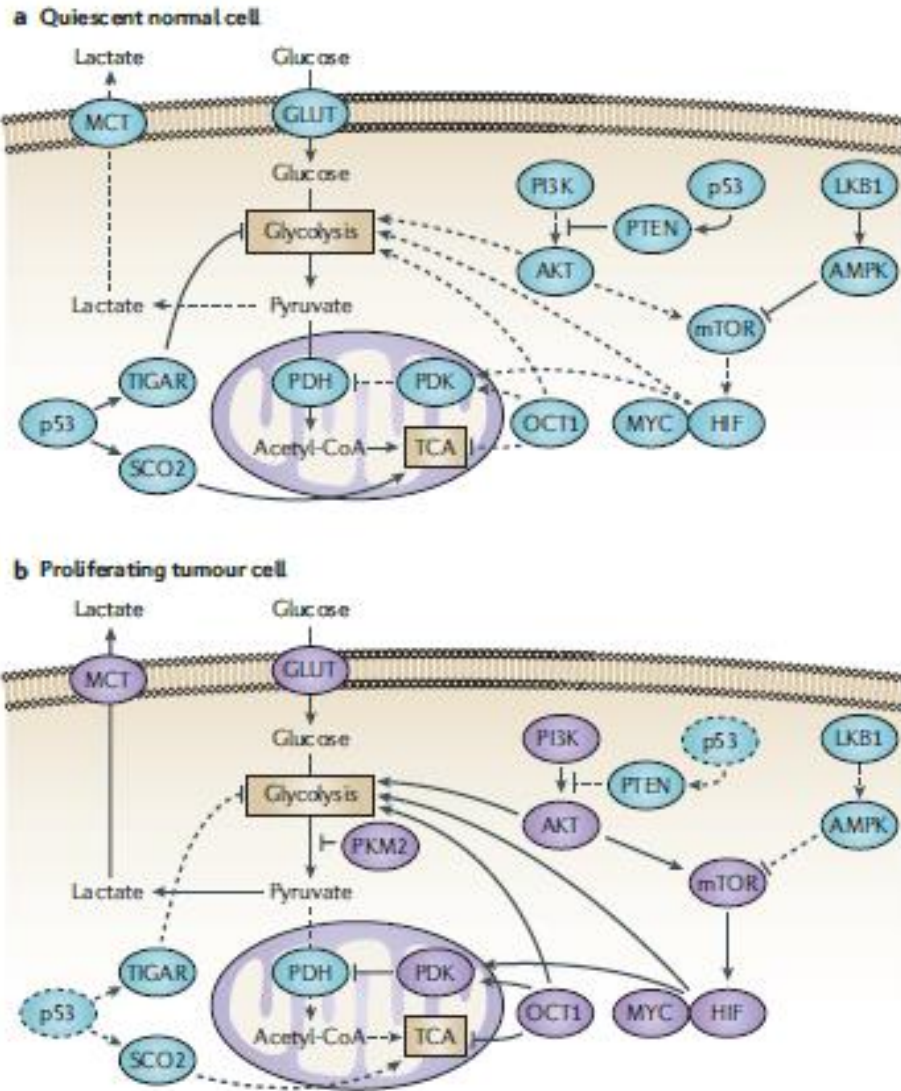
2.1.2. Kanser Hücresinin Özellikleri

Kanser; hücre proliferasyonu/apoptozis oranının proliferasyon lehine kontrolünün kaybedildiği yani kontrolsüz hücre çoğalmasının izlendiği genetik temelli bir hastalıktır. Tek bir hastalığı tanımlamaktan ziyade, kitle ve tümör oluşumuna yol açan çok basamaklı bir neoplaziyi tanımlar (4). Kontrolsüz çoğalma en önemli özellik olmakla beraber, kanser hücresinin diğer biyolojik özellikleri arasında; hücre kültüründe kontakt inhibisyonundan ve apoptozisten kaçabilme, dış uyaranlara gereksinim duymadan bölünebilme, çoğalmayı

baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme sayılabilir. İlk etapta ‘normal’ bir hücrenin, yer aldığı organizmanın ölümüne sebep olabilecek bu olumsuz özellikleri sonradan nasıl kazandığı, diğer bir ifadeyle ‘onkogene’ ya da ‘karsinogene’ olarak isimlendirilen bu süreçte hangi mekanizmaların rol oynadığı ancak yakın zamanlarda ve kısmen anlaşılabilmiştir (5). Buna göre onkogene, genetik değişiklikler; yani mutasyonlar aracılığı ile gelişen bir süreçtir. Bu süreç kişinin genetik özellikleri ve üç ana harici ajanın etkileşimi sonucunda ortaya çıkar. Gen dışı bu faktörler, fiziksel karsinojenler (ultraviyole ve iyonize radyasyon), kimyasal karsinojenler (asbest, tütün ve tütün ürünleri, arsenik vb.) ve biyolojik karsinojenlerdir (bazı virüsler, bakteri ve parazitler). Yaşlanma ise kanser gelişiminde rol oynayan bir diğer faktördür. Genel risk birikimi bir kişinin yaşlandıkça hücre tamir mekanizmalarının daha az etkili olmasıyla artar (6). Genellikle tümör baskılayıcı genler, onkogenler veya bunlarla etkileşen proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlardan veya daha büyük çaplı kromozomal yeniden düzenlenmelerden kaynaklanır. Bunlar çoğunlukla hücre proliferasyonunu etkileyen sinyal proteinleri, hücre döngüsü ve DNA tamir mekanizması ile ilişkilidir (7). Yakın dönemdeki çalışmalar transkripsiyonel aktivite bozuklukları, epigenetik değişimler ve miRNA defektlerinin de kanser oluşumunda rol oynadığını göstermiştir (8).

Kanser, hücrenin aşırı ve zamansız çoğalmasına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdiği, çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler, hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle olan ilişkilerini ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden mekanizmaların modifikasyonları sonucu ortaya çıkar. Kanserli hücrenin gelişmesi için bozulması gereken üç temel mekanizmanın ilki, hücrelerin sadece uygun sinyal ile bölünmesidir. Hücre bir hormon ya da büyüme faktörü ile uyarıldığında normal olarak aktif hale geçen devreler bir daha kapanmazsa bu mekanizma bozulmuş olur. Bir diğer mekanizma, hücrenin anormal koşullarla karşılaştığında, hasarlı olan genlerin DNA replikasyonunu başlatmak yerine apoptozisi aktif hale getirmesidir. Apoptozisten kaçmak için hücrelerin normalde aşırı hücre bölünmesini engelleyen mekanizmaları etkisiz hale getirmesi gerekmektedir. Bu mekanizmalar iki önemli gen tarafından düzenlenmektedir. Bu genler Retinoblastoma (*RB*) ve Tümör Protein P53 (*TP53*) genleridir. Bu iki mekanizma mutasyonla etkisiz hale geldiğinde hücreler sadece bölünmez, bununla birlikte apoptozisten de kaçarak ve böylece tümöral doku oluşumu başlar. Üçüncü mekanizma ise

normal hücrelerin sınırlı bölünmesiyle ilgilidir. Normal hücreler kromozomların ucunda bulunan telomerler nedeniyle sınırlı sayıda bölünmektedir. Telomerler, bölünmeyle kısalan DNA tekrarlarından oluşur. Tekrarlar bittiğinde hücre bölünme özelliğini yitmiş yaşlı hücre halini alır. Kanserli hücrede telomeraz enzimi kromozoma yeni tekrarlar ekleyerek bölünme özelliğinin devamlılığını sağlar ve hücre programlandığından çok daha uzun bir süre boyunca bölünür. Kanser hücreleri, atipik metabolik özellik gösterir. Hızlı proliferasyon olan tümörler, bir molekül glikozdan elde edilecek ATP miktarının çok az olmasına rağmen glikozu aerobik ortamda laktata dönüştürmektedir. Kanser hücrelerinin bu özelliği "Warburg Etkisi" olarak adlandırılmaktadır (9-10).



Şekil 1. Warburg etkisinin moleküler mekanizması (6). a) Bölünmeyen normal hücre b) Bölünen tümör hücresi.

2.1.3. Kanser ve Genetik

Hücrenin kanserleşmesi için, bazı özel genlerin mutasyona uğraması gereklidir. Bu genlerin işlevleri bakımından, bir proto-onkogen ya da bir tümör baskılayıcı gen olduğu tespit edilmiştir (11). Hücre bölünmesini, farklılaşmasını, DNA tamirini ve apoptozu kontrol altında tutan bu genlerde oluşan mutasyonlar kansere yol açabilmektedir. Bu süreçte oluşan mutasyonlar kendi kendine ya da radyasyon gibi mutajenik etkenlerle bağlantılı olarak oluşabilir (12). Normal hücrelerde DNA'da oluşan hasarların, DNA tamir enzimleriyle onarımı yapılmakta, onarılamadığı takdirde tümör baskılayıcı genler ve apoptotik genlerin ortak faaliyetleri ile hücre apoptoza yönlendirilmektedir. Bu durumlarda mutant tümör potansiyeli olan hücrelerin yaşayabilme kapasitelerinin yetersiz olması nedeni ile organizma kanserli hücrelerden arındırılır. Fakat genetik yatkınlıklar ile beraber mutant hücrelerin yaşamını devam ettirme potansiyeli kazanmaları, hücre sinyal sistemlerinin sürekli etkin kalması sonucu tümör hücreleri dokular arasında yayılmakta ve kanserleşmektedir (13).

2.1.3.1. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünün kontrol noktalarını düzenleyen genler olmalarının yanı sıra apoptoz sürecini de başlatan genlerdir. Tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinler, normal hücrelerde DNA hasarına veya dış çevreden kaynaklanan büyümeyi stimüle edici sinyallere yanıt olarak hücre döngüsünün tutulumunu gerçekleştirebilmektedir. Proliferasyonu direkt olarak baskılayan tümör baskılayıcı genlere 'bekçi' tipi genler ismi verilmiştir. Bekçi genler, hücre döngüsünü kontrol altında tutarlar. Hücreyi apoptoza sevk eden genler de bu gruptadır (14). Tümör baskılayıcı genlerde rastlanan işlev yitirici mutasyonlar hücreye çoğalma bakımından bir üstünlük sağlar. Hücre çoğalmasını direkt baskılayan bekçi tipi tümör baskılayıcı genlere ek olarak, dolaylı olarak etkisini gösterenler de vardır. Bu genlere de 'bakıcı' tipi tümör baskılayıcı genler adı verilmiştir. Bakıcı genler, genomun bütünlüğünün korunmasında görevli olan DNA tamir genleridir ve mutasyon oluşumunu engellerler. Bu genlerde işlev kaybına yol açan bir mutasyon oluştuğunda, genom boyunca mutasyonlar ortaya çıkmaya başlar ve genomik kararsızlık gelişir. Genomik kararsızlık, bekçi tipi tümör baskılayıcı genlerin ve proto-onkogenlerin mutasyona uğraması sonucu da oluşabilir. Tümör baskılayıcı genlerin etkisini kaybetmesi için her iki allelinin de fonksiyonunu yitirmesi gerekir. Tümör baskılayıcı bir

genin her iki allelinin de aktivitesini kaybetmesi sonucunda, hücrenin büyümesi ve bölünmesi sürekli devam eder ve hücre kanserleşmeye başlar (15). Bazı germ-line tümör baskılayıcı gen mutasyonları kalıtsal kanserlerle bağlantılıdır. Bu genlerin sporadik kanserlerde de mutasyon taşıdığı tespit edilmiştir (Tablo I.).

Tablo I. Tümör Baskılayıcı Genler (14,16,17)

Gen	Fonksiyon	Ailesel Kanser İlişkisi	Diğer Tümör İlişkileri
<i>p53</i>	Transkripsiyon faktörü	Li-Fraumeni Sendromu	Kanserlerin %50'den fazlası
<i>RB</i>	Transkripsiyonel baskılama	Retinoblastoma	Çok sayıda
<i>INK4a (p16)</i>	Cdk inhibisyonu (<i>RB</i> aktivasyonu)	Melanoma	Çok sayıda
<i>ARF</i>	Mdm2 antagonisti (<i>p53</i> aktivasyonu)	Melanoma	Çok sayıda
<i>APC</i>	Wnt/Wingless sinyal yolağı	Ailesel Adenomatöz Polipozis	Kolorektal kanser
<i>PTCH</i>	Hedgehog sinyal yolağı	Bazal Hücreli Nevüs (Gorlin) Sendromu	Medulloblastom, Bazal hücreli kanser, Rabdomyosarkom
<i>SMAD4/DPC4</i>	TGF-beta sinyal yolağı	Juvenil Hamartömatöz Polipozis	Pankreas ve kolon kanseri
<i>PTEN</i>	Lipid fosfataz	Cowden Sendromu	Glioblastom, Tiroid kanseri, Endometriyum kanseri, Prostat kanseri
<i>TSC1/2</i>	mTOR inhibisyonu	Tuberoz Skleroz	Renal hücreli kanser, anjiyofibrom
<i>NF1</i>	Ras için GTPaz aktive edici	Nörofibromatozis	Sarkom, Gliom
<i>MSH2 – MLH1</i>	DNA mismatch onarımı	Lynch Sendromu (HNPCC)	Endometriyum, Mide, Over, Mesane kanseri
<i>WT1</i>	Transkripsiyon faktörü	Wilm's Tümör	Rabdomyosarkom
<i>ATM</i>	DNA hasar sensörü	Ataksi Telenjektazi	Lenforetiküler maligniteler
<i>NBS1</i>	S fazında DNA onarımı kontrolü	Nijmegen Breakage Sendromu	Lenforetiküler maligniteler
<i>CHEK2</i>	Protein kinaz (G1'de kontrol)	Li-Fraumeni Sendromu	Meme, Prostat, Kolon kanseri
<i>BRCA1/2</i>	DNA onarımı	Ailesel Meme/Over Kanseri	Prostat, Endometriyum, Pankreas kanseri, Melanoma
<i>FA</i> genleri	DNA onarımı (S fazında kontrol)	Fankoni Anemisi	AML
<i>VHL</i>	E3 ligaz tanıma faktörü	Von Hippel-Lindau Sendromu	Renal hücreli kanser, Serebellar hemanjiyosarkoma
<i>AR</i>	Androjen üretimi	Prostat kanseri	Meme kanseri, Endometriyum kanseri
<i>CDH1</i>	Hücre hareket kontrolü	Mide kanseri	Meme kanseri, Over kanseri, Prostat kanseri, Endometriyum kanseri
<i>BARD1</i>	DNA onarımı	Meme kanseri	Over kanseri
<i>BRIP1</i>	DNA onarımı	Meme kanseri	Over kanseri
<i>PALB2</i>	DNA onarımı	Meme kanseri	Wilms tümörü, Medulloblastom

Tablo I. Tümör Baskılayıcı Genler (14,16,17) (devamı)

<i>STK11</i>	Hücrede enerji meabolizmasını düzenleme	Peutz-Jeghers Sendromu	Pankreas kanseri, Malign melanom
<i>RAD50</i>	DNA onarımı	Nijmegen Breakage Sendromu	Meme ve over kanseri
<i>RAD51</i>	DNA onarımı	Meme kanseri	Prostat kanseri

2.1.3.2. Onkogenler

Protoonkogenler, hücrenin normal döngüsünü kontrol altında tutan sinyal yollarında, hücre çoğalmasının ve canlılığının devam ettirilmesinde denetleme görevini yaparlar (18). Yani hücrelerin büyüme ve farklılaşmasında rol alan büyüme faktörleri ile bu büyüme faktörlerinin sinyal iletiminde yer alan proteinleri (reseptörler, sitoplazmik proteinler ve çekirdekte yer alan transkripsiyon faktörleri) kodlayan genlerdir. Onkogenler ise, protoonkogenlerin mutant formlarıdır. Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü sonucunda büyüme faktörlerinin üretimi artmakta, hücre bölünmesi üzerindeki kontrol kaybolmakta, hücre membranında büyüme faktörü uyarısıyla başlayıp, çekirdeğe ulaşan sinyal ileti sistemi kontrolsüz uyarılmakta, çekirdekte transkripsiyon faktörlerinin sentezi artmakta, hücre kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam etmektedir. Onkogenler hücrenel etki alanı olarak baskındır. Bu genlerin yalnızca tek bir allelindeki mutasyon, hücre fenotip değişimlerini tetikleyebilir. Hücre bölünmesini uyararak, tümör oluşumunu başlatırlar (19). (Tablo II)

Bazı normal genlerin onkogenlere dönüşebildiği ilk olarak tümör virüsleri ile ilgili çalışmalarda dikkati çekmiştir. Virüs ile enfekte konak hücre genomunda bulunan bazı genlerin viral onkoproteinleri sentezlettiği belirlenmiştir. Protoonkogenlerin kodladığı proteinler önlerine c (cellular) harfi alarak, onkogenlerin kodladığı proteinler ise izole edildiği virüsü tanımlayan üç harfli bir kelimenin önüne viral kaynaklı olduklarını ifade eden v harfi alarak ifade edilmektedir. Örneğin v-sis, Simian Sarkoma virüsüne ait proteini göstermektedir (20).

Tablo II. Onkogenler (19,21)

Onkogen	Fonksiyon	Kanser
Abl	Tirazin kinaz aktivitesi	KML
Akt-2	Serin/Treonin kinazı kodlar	Over kanseri
Bcl-2	Apoptozu önler	B hücreli lenfoma/lösemi
Egfr	Tirozin kinaz	Squamöz hücreli kanser
ErbB-2	Tirozin kinaz	Meme, tükrük bezi ve over kanseri
Fos	Transkripsiyon faktör	Osteosarkom
Myb	Transkripsiyon faktörü kodlar	Kolon kanseri ve lösemi
Myc	Hücre proliferasyonu ve DNA sentezi	Lösemi, meme, mide, akciğer, serviks ve kolon kanseri, nöroblastom, glioblastom
Ras	G proteinin mutasyona uğramış alt birimi	Lösemi, MDS, akciğer, kolon ve pankreas kanseri
Ret	Reseptör tirozin kinaz kodlar	Tiroid kanseri, MEN2
Ros	Tirozin kinaz	Sarkoma

2.2. DNA Onarımı

2.2.1. DNA Hasarı

Genetik bilgiyi taşıyarak nesilden nesile aktarılmasını sağlayan canlı genomu, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. Hasar kaynakları ekzojen veya endojen olabilir. DNA hasarına neden olan kimyasal ajanlar, X-ışınları, ultraviyole gibi çevresel etmenler ekzojen nedenlerden bazılarıdır. DNA replikasyonu ve rekombinasyonu gibi olaylar sırasında, hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne veya mutasyona neden olur. Her bir insan hücresinin DNA'sında her gün çok sayıda kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir. Yaşayan organizmalar, genetik materyallerini bu etkenlerin oluşturduğu hasara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizmasına sahiptirler (22).

2.2.2. DNA Tamir Mekanizmaları

2.2.2.1. Direkt Tamir Mekanizmaları

2.2.2.1.1. Fotoreaktivasyon

Ultraviyole ışığın neden olduğu siklobütan primidin dimerlerinin (CPD) fotoliz ve O-6-Metil-DNA-alkiltransferaz enzimi ile tamirine fotoreaktivasyon denir. Reaksiyon UV ile oluşan primidin dimerlerine spesifik olduğundan hata olasılığı olmadığı düşünülmektedir (23).

2.2.2.1.2. O-6-Metilguanin Tamiri

Guaninin 6. pozisyonundaki karbon DNA hasarına duyarlı bölgelerden biridir. Alkilleyici ajanlar varlığında bir metil grubu bağlayarak O-6-metilguanin oluşturur. O-6-metilguanin sadece iki hidrojen köprüsü oluşturabildiği için, sitozin yerine timinle eşleşir. O-6-Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'da yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal guanin oluşumunu sağlarken kendisi de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur (23).

2.2.2.1.3. Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu

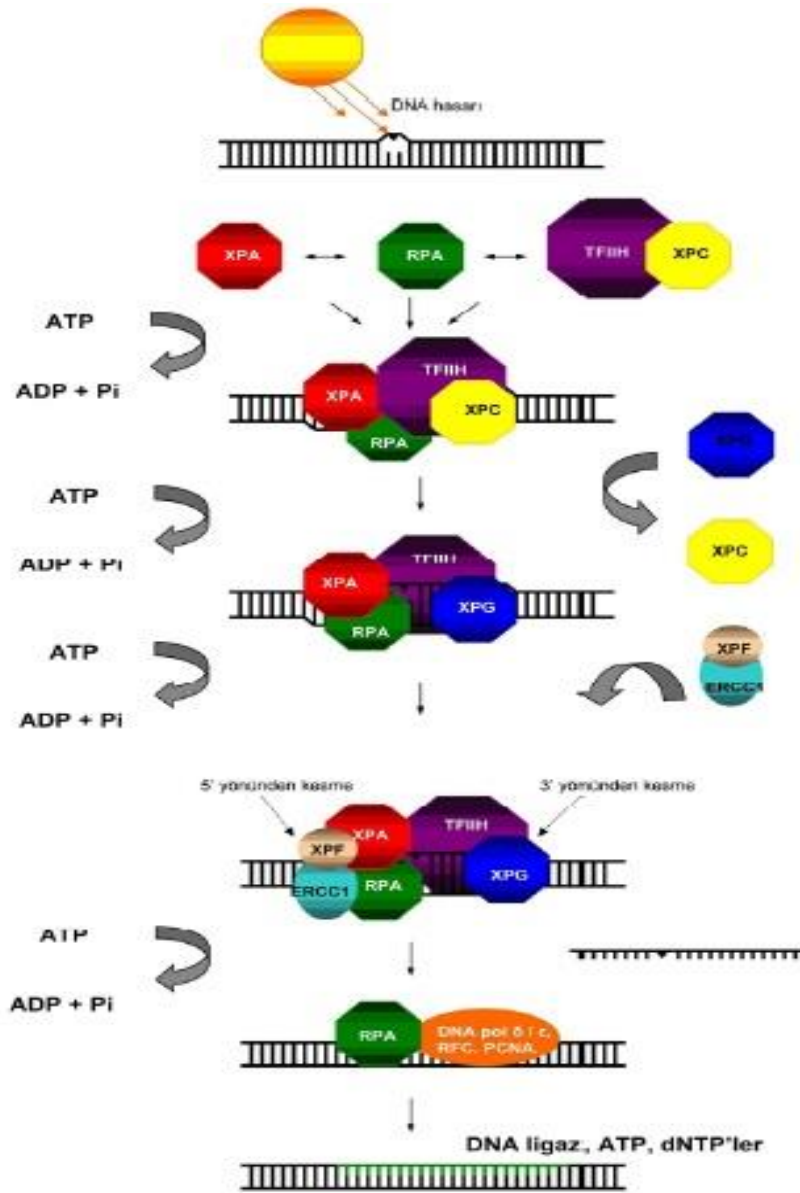
X ışını ya da peroksitler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Basit tek zincir kırıkları en yaygın DNA hasarlarından biridir ve hücrelerde hergün onbinlerce kez ortaya çıkmaktadır. Bir zincirde olan basit kırıkları DNA ligaz enzimi enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5'fosfat grubu ve 3'OH grubu arasında fosfodiester bağını oluşturarak tamir etmektedir (23). Kalıcı kırıklar replikasyon çatalını bozarak genomik dengesizliğe neden olmaktadır (24).

2.2.2.2. Kesip-Çıkarma (Eksizyon) Tamirleri

Bu tamir mekanizmasında DNA hasarının tespit edilmesi ilk ve en önemli basamağı oluşturmaktadır. Hasarı içeren oligonükleotid parçaları bir nükleaz tarafından çift yönlü kesilip çıkartılır. Oluşan boşluklar DNA polimeraz tarafından doldurulur ve DNA ligaz son bağı kurarak oluşan boşlukları tamamen kapatır. Böylece DNA çift zincirinin bütünlüğü sağlanmış olur (25).

2.2.2.2.1. Baz Eksizyon Tamiri (BER)

Spontan veya kimyasallar nedeniyle meydana gelen alkilasyon, deaminasyon, oksidasyon ve DNA replikasyon hatalarının neden olduğu küçük DNA modifikasyonları önemli DNA tamir süreçlerinden birisi olan baz eksizyon tamiri ile düzeltilmektedir. DNA glikozilaz, AP endonükleaz ya da AP DNA liyaz, DNA polimeraz ve DNA ligaz enzimleri yanlış yerleştirilen veya hasarlı bazları uzaklaştırarak DNA onarımını gerçekleştirir (26).



Şekil 2. İnsanda eksizyon tamir mekanizması basamakları (25). XPA: Kseroderma Pigmentosum grup A; RPA: Replikasyon Proteini A; TFIIH: Transkripsiyon Faktörü IIIH;

XPC: Kseroderma Pigmentosum grup C; XPG: Kseroderma Pigmentosum grup G; XPF: Kseroderma Pigmentosum grup F; ERCC1: Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, complementation group 1; PCNA: Prolifere Hücre Nükleer Antijen; DNA pol ϵ/δ : DNA polimeraz ϵ/δ

2.2.2.2.2. Nükleotid Eksizyon Tamiri (NER)

UV ile indüklenmiş primidin dimerlerinin ya da çoğunlukla mutajenik kimyasalların ve kemoterapötik ajanların oluşturduğu DNA eklentilerinden kaynaklanan ve sarmal yapıda geniş bozulmalara neden olan DNA hasarlarının, özellikle de heliks distorsiyonuna neden olanların onarımı NER sistemi ile yapılır. BER'de bazlar kesilip çıkarılırken, NER'de hasarlı bazlar yaklaşık 24-32 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotid parçaları olarak kesilip çıkarılır. Memeli NER mekanizmasında 30'un üzerinde protein yer almaktadır (23,26).

2.2.2.2.3. Yanlış Eşleşme Eksizyon Tamiri (MER)

DNA polimeraz, replikasyon sırasında hata okuma (proofreading) yeteneğine sahiptir. Yanlış eşleşme eksizyon tamiri replikasyon sırasında meydana gelen ve çift sarmalda anormal boyutlara neden olan hataları düzeltir. MER sistemi küçük tek zincir DNA halkalarının ve yanlış eşleşmenin replikasyon sonrası tamirinden sorumlu olduğundan, DNA replikasyonu doğruluğunun en son sorumlusu olarak kabul edilir (23).

2.2.2.3. Rekombinasyonel Tamir

DNA hasarı, tamir sistemleri tarafından tamir edilememişse, replikasyondan sonra aktif olan mekanizmadır. DNA replike olurken, DNA polimeraz önce hasarlı bölgede duraklar. Hasarlı bölgeyi de içine alacak şekilde boşluk bırakarak atlar ve senteze devam eder. Rec A proteini, rekombinasyonel bir değiş tokuş işlemi ile hasarsız komplementer zincirde bulunan sekansı transfer eder. Komplementer zincirde oluşan boşluk DNA polimeraz - DNA ligaz enzimleri sayesinde doldurulur. Kalan lezyon diğer tamir sistemleri ile onarılır (23).

2.2.2.4. SOS Tamiri

DNA hasarının büyük olduğu ve diğer tamir mekanizmalarının başarılı olamadığı ya da devre dışı kaldığı durumlarda aktive olan acil cevap sistemidir. DNA sentezi sırasında, bir lezyonun üzerinden atlamak yerine sistem, DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonu devam ettirmesini sağlar. Replikasyonun doğruluğundan fedakarlık edildiğinden hataya meyilli sistem de denir (23).

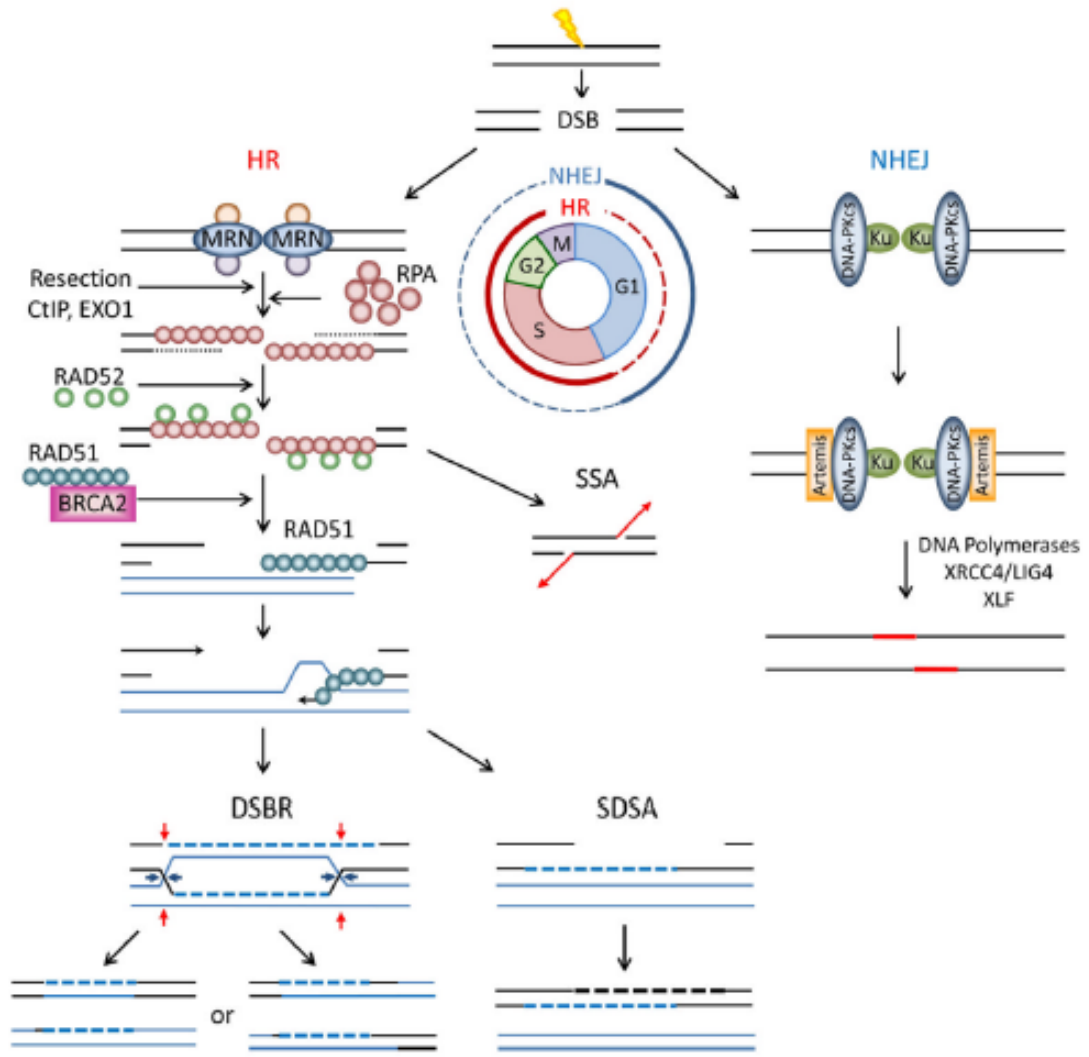
2.2.2.5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

2.2.2.5.1. Serbest Uçların Homolog Olmayan Bağlanması (NHEJ)

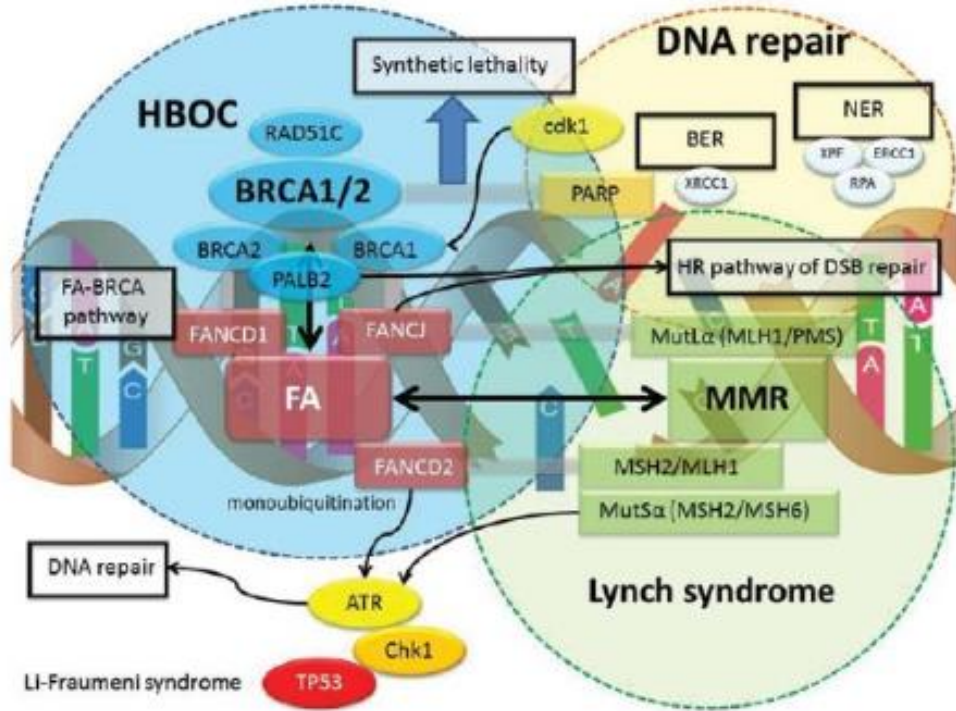
NHEJ, iyonize radyasyon ve radyomimetik ajanlarla oluşan çift zincir DNA kırıklarının tamirinde görev alır (22). Çift zincir kırık uçları modifiye ederek birbirine bağlar. Ku 70 - Ku 80 kompleksleri DNA kırık uçlarına bağlandığında, DNA bağımlı protein kinaz aktive olarak diğer proteinlerin hasar bölgesine gelmelerini sağlar. Bu protein komplekslerinin formasyonu DNA ligaz IV-XRCC4 kompleksinin kırık uçlarının bağlamasını sağlar. Bu tamir sistemi ile hasarlanmamış DNA kalıbına ihtiyaç duyulmaksızın hataya meyilli olarak, birkaç nükleotid kaybı ile DNA onarımı gerçekleşir (23).

2.2.2.5.2. Homolog Rekombinasyon (HR)

Homolog rekombinasyon kardeş kromatid iplikçisini kalıp olarak kullanarak çift zincir kırık onarımının hatasız olarak yapılmasını sağlar. HR bölünen hücrelerde, homolog kardeş kromatide ulaşılabildiği zaman yani hücre döngüsünün S, G2/M fazlarında gerçekleşmektedir. Ek olarak HR, replikasyon çatalının korunması, telomer bakımı ve mayoz I'de kromozom dağılımının korunmasında önemlidir. *RAD* ve *BRCA* genleri tarafından yönlendirilir. *MRE11-RAD50-NBS1* kompleksinin nükleaz aktivitesi ile kırık uçları degradesyona uğrar. *RAD52* proteini 3' uçlara bağlanır. *RAD51-BRCA2* kompleksi, rekombinasyon oluşturmak üzere kardeş kromatid zincirinin hasar bölgesine invazyonunu sağlar. Bu zincir kalıp olarak kullanılarak sentez yapılır ve hasar onarılır (DNA polimeraz - DNA ligaz) (24).



Şekil 3. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri (24). DSB: Çift Zincir Kırığı; HR: Homolog Rekombinasyon; NHEJ: Serbest Uçların Homolog Olmayan Bağlanması; MRN: *MRE11-RAD50-NBS1* Kompleksi; RPA: Replikasyon Proteini A; SSA: Tek İplikçik Kaynaştırma; DSBR: Çift Zincir Kırıklarının Tamiri; SDSA: Sentez Bağımlı İplikçik Kaynaştırma



Şekil 4. *BRCA* yollarında veya çoklu protein ağlarında DNA onarımı mekanizması. DNA onarımında görev alan meme/over kanseri duyarlılık genleri ve bunların fonksiyonel multiprotein ağları ve HBOC sendromunda FA, MMR ve diğer DNA onarım genleriyle etkileşimin altta yatan moleküler mekanizmaları gösterilmiştir. *BRCA1* ve *BRCA2*, genomik bütünlük ile ilişkili hücresel olaylarda görev alır. DNA hasarının tesbiti, stabilizasyonu ve onarımında rol oynayan mekanizmalarda bozulmaya yol açan mutasyonlar genom kararsızlığına neden olur (27).

2.3. Meme ve Over Kanseri

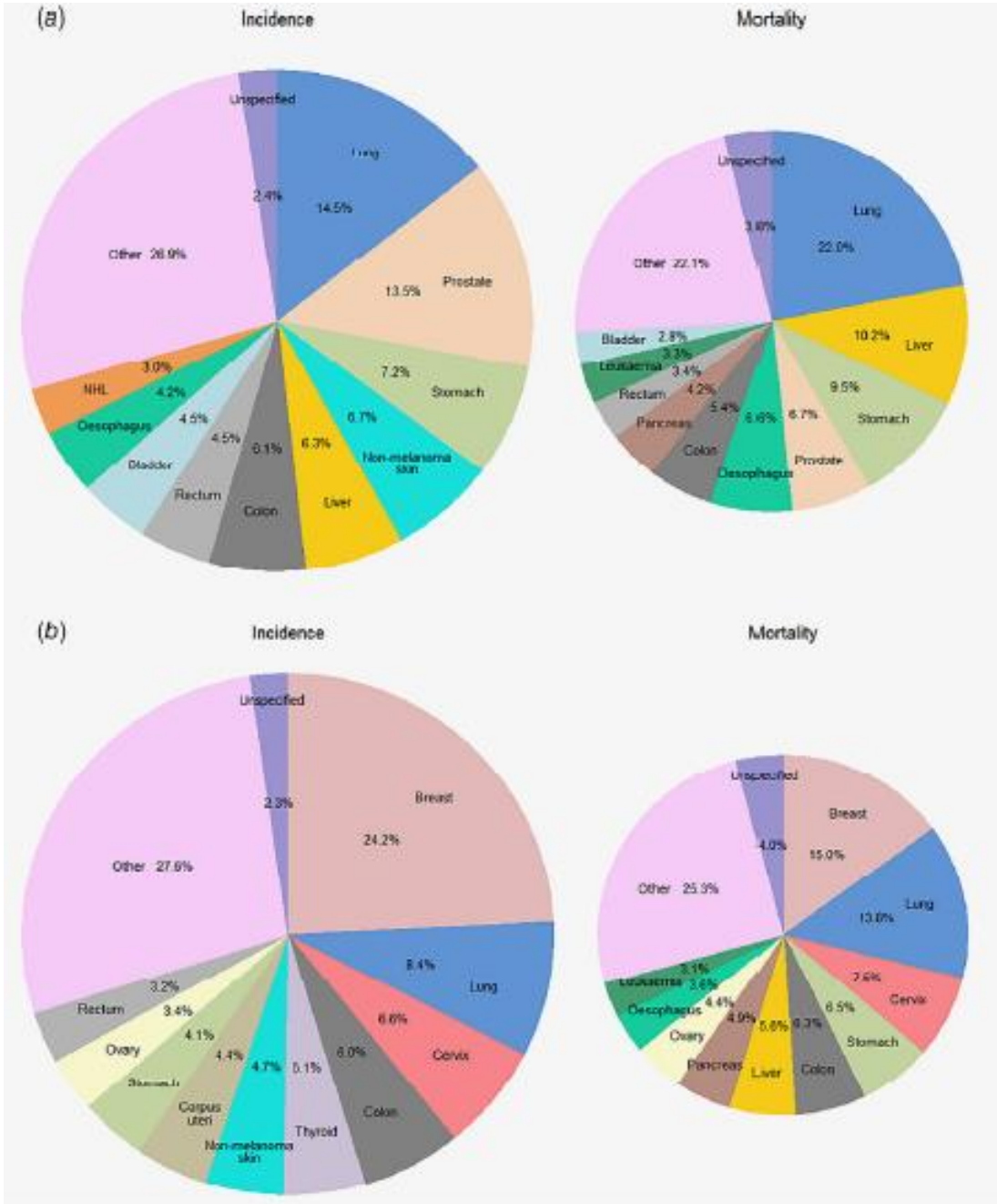
2.3.1. Meme Kanseri ve Epidemiyolojisi

Meme kanseri, memedeki hücrelerin kontrolden çıkıp malign proliferasyon göstermesi sonucu oluşan bir hastalıktır. Memedeki hangi hücrenin kanserleştiği, meme kanserinin tipini belirler. Dünya genelinde 2018 yılında 18,1 milyon (% 95 UI: 17,5–18,7 milyon) yeni kanser vakası ve 9,6 milyon (% 95 UI: 9,3–9,8 milyon) kanser nedeni ölüm olduğu tahmin edilmektedir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Derneği GLOBOCAN 2018 verilerine göre, Dünya 20 bölgede değerlendirilmiş ve bu 20 bölgenin 14'ünde en sık

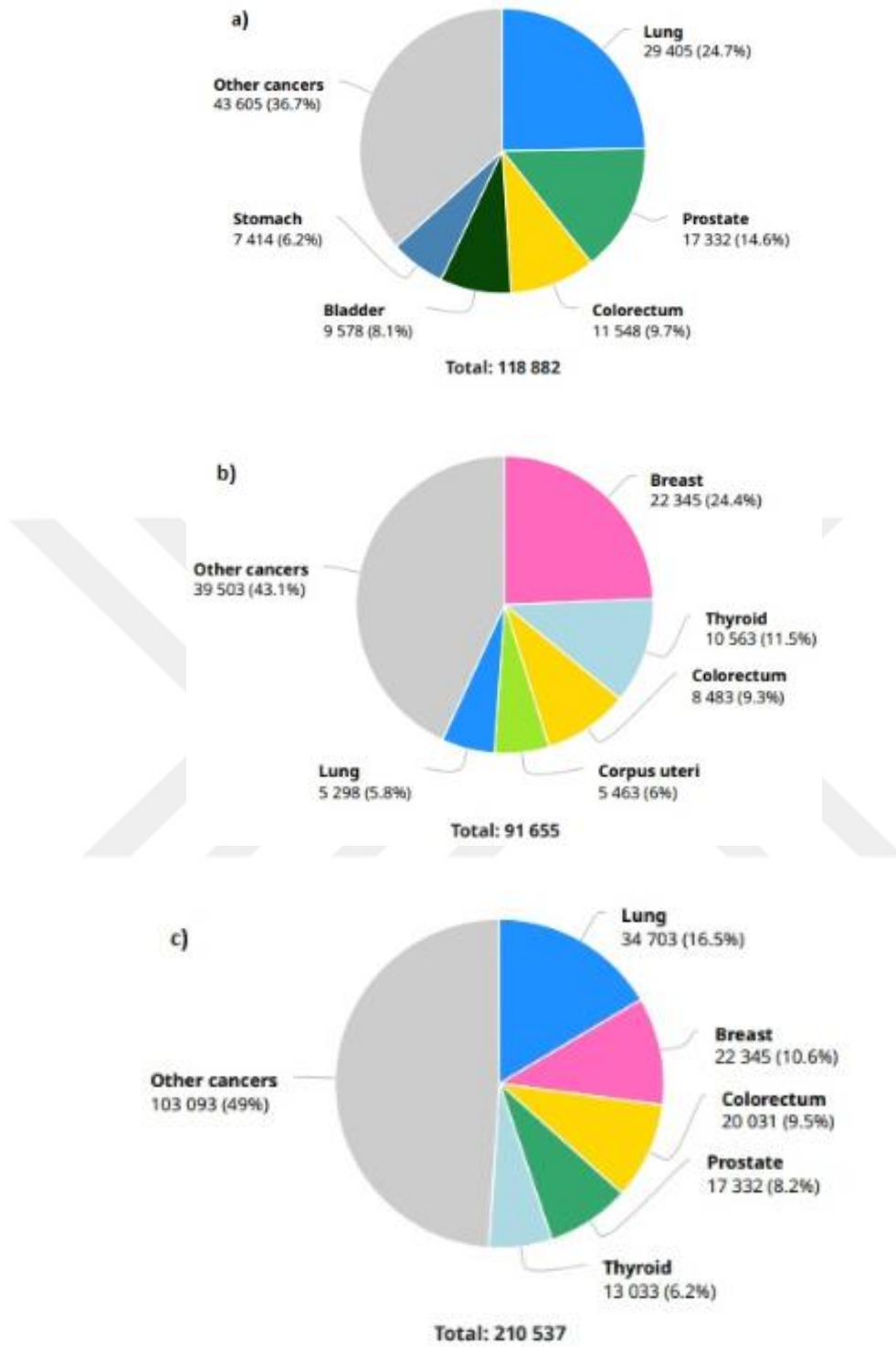
görülen kanserden ölüm nedeni akciğer kanseri, beşinde prostat ve birinde karaciğer kanseri olarak belirtilmiştir. Kadınlarda, serviks kanserinin en sık görüldüğü Doğu Afrika hariç tüm bölgelerde meme kanseri en sık görülen kanserdir. Meme kanseri aynı zamanda dünyanın 11 bölgesinde kanserden en sık ölüm nedeni iken, beş bölgede akciğer kanseri (Doğu Asya dahil) ve Sahra altı Afrika'nın dört bölgesinde rahim ağzı kanseri ölüm nedeni sıralamasında meme kanserini takip etmektedir (28). (Şekil 5-6)

2018'de Avrupa'da tahminen 3.91 milyon yeni kanser (melanom dışı cilt kanseri hariç) ve 1,93 milyon kanser nedeni ölüm vakası beklenmektedir. Kadın meme kanseri 523,000 yeni olgu ile en önde gelirken, bunu kolorektal (500,000), akciğer (470.000) ve prostat kanseri (450.000) izlemektedir. Bu dört kanser, kanser vakalarının yarısını oluşturmaktadır. Kanserden en yaygın ölüm nedenleri; akciğer (388.000 ölüm), kolorektal (243.000 ölüm), meme (138.000 ölüm) ve pankreas kanseri (128.000 ölüm) olarak hesaplanmaktadır. AB-28'e göre, yeni kanser vakalarının sayısı yaklaşık olarak 1,6 milyon erkek, 1,4 milyon kadın ve aynı yıl içerisinde kanserden ölmesi beklenen olgu sayısı 790.000 erkek ve 620.000 kadındır (29).

Ülkemizde mevcut verilere göre meme kanseri sıklığının, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında olduğu tahmin edilmektedir. Bu rakamlardan yola çıkılarak, Türkiye'de her yıl meme kanserine yakalanan kadın sayısının yaklaşık on bin civarında olduğu hesaplanabilir. Ülkenin doğusu ile batısı arasındaki sıklık farkı, Türkiye'nin batı bölgelerindeki yaşamın batı toplumlarındakine benzerliğinden ("Westernizing life") kaynaklanmaktadır. Kadınlarda batı tipi yaşam biçiminde meme kanseri insidansını arttıran faktörler, erken menarş (<12 yaş), geç doğum (>30 yaş), geç menopoz (>55 yaş), daha fazla hormon replasman tedavisi alma, daha kısa laktasyon süresi ve beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler olarak sayılabilir (30).



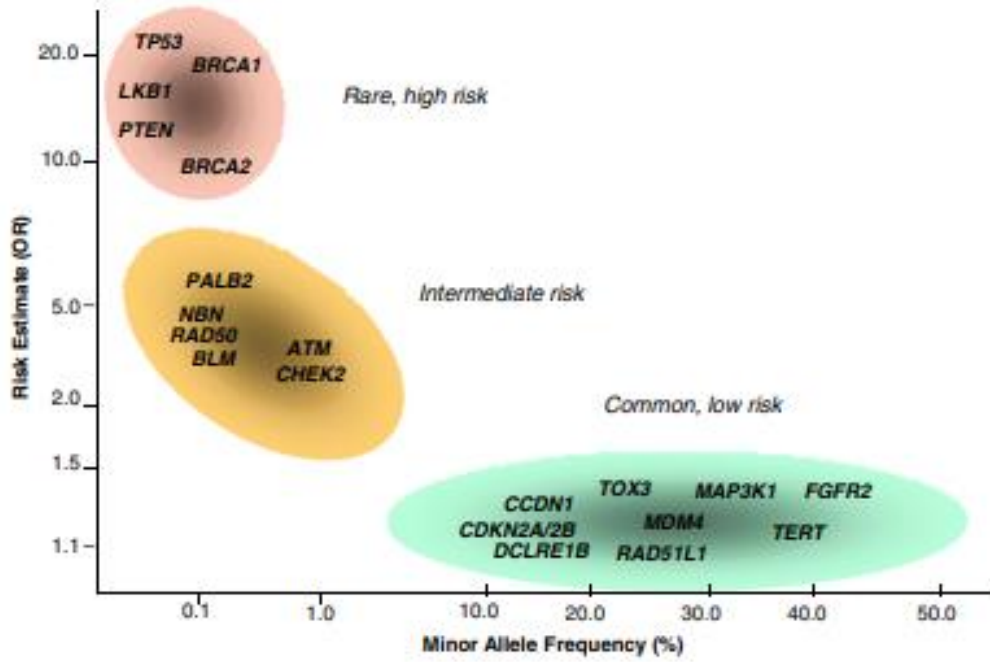
Şekil 5. Dünyada en yaygın görülen 10 kanserde, 2018'de tahmini yeni kanser vakalarının ve kanser kaynaklı ölümlerin erkek (a) ve kadınlarda (b) dağılımı (28). NHL: Hodgkin Dışı Lenfoma.



Şekil 6. 2018 GLOBOCAN verilerine göre Türkiye’de a) erkeklerde, b) kadınlarda, c) her iki cinsiyette tüm yaşlarda yeni tanı alan kanser vakaları (31)

2.3.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri gelişiminde etkili olan risk faktörlerinin başlıcaları; demografik özellikler (cinsiyet, yaş, ırk/etnisite gibi), reproduktif öykü (menarş yaşı, doğum yapma ve doğum sayısı, ilk tam dönem hamilelik yaşı, menapoz yaşı, laktasyon, infertilite, düşük yapma), ailesel/genetik faktörler (aile öyküsü, bilinen veya şüphe edilen *BRCA1/2*, *P53*, *PTEN* veya meme kanseri riski ile ilişkili diğer gen mutasyonları), çevresel faktörler (30 yaşından önce toraks bölgesine radyoterapi almak, hormon replasman tedavisi almak, alkol kullanımı, sosyoekonomik düzey, vb) ve kişisel meme kanseri öyküsü, meme biyopsi sayısı, atipik hiperplazi veya lobüler karsinoma in situ, dens meme yapısı, vücut kitle indeksi (BMI) gibi diğer parametrelerdir.



Şekil 7. Meme kanseri ilişkili genlerin frekans ve risk dağılımı (32).

Kadın cinsiyeti 100 kat artmış risk oluşturduğundan en büyük risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Yaşın ilerlemesi de en önemli risk faktörlerinden bir tanesidir. Günümüzde bir kadının hayat boyu riski non-invazif meme kanseri açısından altıda bir ve invazif meme kanseri bakımından sekizde birdir. Bu riskin büyük bölümü ileri yaşta ortaya çıkar. Meme kanseri ile ilgili önemli çelişkilerden bir tanesi de beyaz kadınlarda görülme sıklığının siyahi kökenlilere oranla %20 daha fazla olmasına rağmen, mortalite oranlarının siyahi ırkta daha fazla olmasıdır. Bu durumun büyük oranda yaşam tarzı ve

sosyoekonomik durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Östrojen hormonuna maruz kalınan sürede artış olması, meme kanseri gelişme riskinde artışla ilişkilidir [erken menarş (12 yaşından önce), geç menapoz (55 yaşından sonra)]; östrojene maruz kalınan sürenin azalmasının ise koruyucu olduğu düşünülmektedir. Tam dönem gebelikle ilişkili olan meme epitelinin terminal diferansiyasyonu da koruyucudur, dolayısıyla ilk canlı doğumun daha ileri yaşta (>35 yaş) yapılması ve hiç doğum yapmamış olmak meme kanseri riskinde artışa neden olur. Nulliparite meme kanseri rölatif riskinde 1.2-1.7 artışa neden olur. Laktasyon meme kanseri riskini azaltmaktadır. Farklı kanserlerde yapılan aile çalışmaları; etkilenmiş olan hasta bireyin birinci ve ikinci derece yakınlarında kanser riskinin normal popülasyona göre artmış olduğunu göstermektedir. Kalıtsal kanserler; tanı yaşının erken olması, yüksek penetranslı olması, çift olan organlarda bilateral görülmesi, her iki ebeveyninden de kalıtılabilmesi ve diğer tip tümörlerle birlikte görülmesi ile karakterizedir. Ailede aynı tip kanserin görülmesi durumunda kalıtsal kanser, farklı tip kanserlerin görülmesi durumunda ise kanser ailesi olarak tanımlanmaktadır. Aile öyküsü varlığı meme kanseri açısından önemli bir risk faktörüdür. Bir adet birinci derece akrabada meme kanseri olması, meme kanseri riskini 1.80 kat artırır. İki tane birinci derece akraba varlığında ise bu risk 2.9 kat artar. Meme kanserine yakalanmış olan akraba 30 yaşından önce tanı almış ise risk 2.9 kat, 60 yaşından sonra tanı konmuş ise risk 1.5 kat artar (33).

2.3.3. Over Kanseri ve Epidemiyoloji

Dünya çapında her yıl yaklaşık 240.000 kadın over kanseri tanısı almakta ve yarıdan fazlasının over kanseri nedeniyle ölmesi beklenmektedir. Over kanseri mortalite oranı, meme kanserinin yaklaşık üç katıdır ve over kanseri gelişmiş ülkelerde en ölümcül jinekolojik malignitedir. Evre III veya IV hastalığı olan olgularda 5 yıllık sağkalım oranı %25 civarındadır (34).

2014 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tümör morfolojisi ve sınıflandırmasına göre, primer over tümörleri üç kategoriye ayrılmıştır: epitelyal (%60), germ hücreli (%30) ve seks kord stromal tümörler (%8). Ancak, malign over tümörlerinin büyük çoğunluğu (%80 - %85) epitelyal olarak sınıflandırılan tümörlerdir (karsinomlar). Malign germ hücreli ve seks kord stromal tümörler tüm malign over tümörlerinin yaklaşık %10'unu oluşturur (35).

Over kanserlerinin büyük çoğunluğu epitelyal kanserlerdir (EOK). EOK, Tip I ve Tip II tümörleri şeklinde iki ana gruba giren çeşitli histolojik alt tiplere ayrılabilir. Tip I tümörleri, düşük dereceli seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli karsinomları içerir ve çoğu zaman daha yavaş büyümeye meyillidir. Buna karşılık, Tip II tümörler, yüksek derecelidir ve hastalık hızlı ilerler. Yüksek dereceli seröz over karsinoması en sık görülen Tip II tümördür ve tüm EOK'ların neredeyse % 75'ini oluşturur. Ne yazık ki, aynı zamanda en invaziv olanlardan biridir, erken tespiti için bir yöntem yoktur ve kadınların çoğunluğu kanser periton boşluğu gibi başka dokulara metastaz yaptığında teşhis edilir (34).

2.3.4. Over Kanseri Risk Faktörleri

Epitelyal over kanseri, malign epitelyal neoplazmaların büyük bir kısmını oluşturur ve sıklıkla menopoz sonrası kadınlarda teşhis edilir. Beyaz kadınlarda görülme sıklığı (100.000'de 12.8), siyah kadınlara göre (100.000'de 9.8) daha yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2003-2012 yılları arasında insidansı yılda %1,6 ve mortalitesi %2,1 düşüş göstermiştir. Over kanseri risk faktörlerinin çoğu reproduktif veya hormonalidir. Genel olarak, yumurtlama döngüsünün sayısını azaltan oral kontraseptif (OKS) ilaç kullanımı, multiparite, emzirme, geç menarş, erken menopoz ve tüp ligasyonu koruyucudur. Bununla birlikte, düşük doz OKS kullanan kadınlar arasında yapılan çalışmalarda, çok uzun süreli kullanım sürelerinin (>10 yıl) risk azaltıcı etkisi olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, progesteronla karşılanmamış östrojen ve kombine östrojen ve progesteron dahil olmak üzere hormonal terapi alanlarda risk artıyor gibi görünmektedir. Diğer risk faktörleri ise endometriozis, daha uzun boylu olmak ve ergenlikte vücut kitle indeksinin yüksek olmasıdır (36).

Over tümörlerinin küçük bir kısmı epitelyal olmayan bir kökene aittir ve genellikle risk modelleme çalışmalarında dikkate alınmamıştır. Spesifik olarak, seks kord stromal tümörler over kanseri vakalarının sadece %1.2'sini temsil eder. Bu tümörler, epitelyal over kanserinin aksine, daha erken evrelerde ve daha genç yaşlarda teşhis edilir. Beyaz olmayan, ailesel meme/over kanseri öyküsü olan obez kadınlarda bu alt tip için risk artmıştır. *BRCA* germline mutasyonları veya meme kanserine genetik yatkınlık ile ilişkisi bildirilmemiştir. Buna rağmen, *DICER1*'deki germline mutasyonlar ve *FOX2*'deki somatik mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir. Over germ hücreli tümörleri ise malign over tümörlerinin %5'ini oluşturur, genç yaşta görülür ve erken evrede teşhis edilebilir. Sıklığı

ergenlikte artar. Germ hücre tümörlü ailelerde kesin genetik anormallikler tanımlanmamıştır (36).

2.3.5. Ailesel Meme/Over Kanseri

Kalıtsal meme/over kanseri, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonların neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır. Bu gen mutasyonları kalıtsal meme/over kanserinin en yaygın nedenidir ve tüm ırklar ve etnik gruplarda ortaya çıkar. *BRCA1/2* mutasyonlarının genel prevalansı 200'de bir ile 800'de bir arasında değişmektedir. Askenazi Yahudileri'nde bu oran daha yüksektir (40'ta bir). *BRCA1/2* mutasyonları kalıtsal meme kanserlerinin %5 ila %10'unu oluşturur. Patojenik *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan bir kadının yaşam boyu meme ve/veya over kanserine yakalanma riski büyük oranda artar fakat patojenik *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan her kadın meme ve/veya over kanseri geliştirmez (27,37).

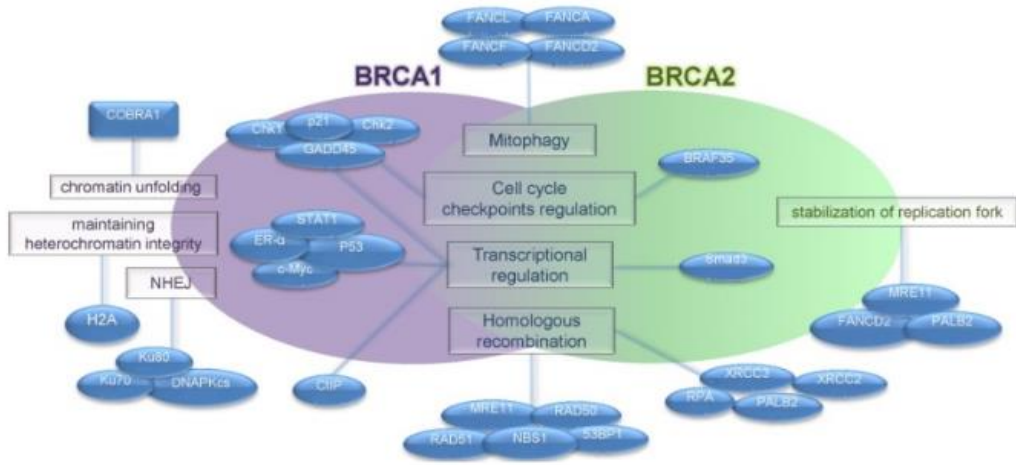
Epidemiyolojik araştırmalar, bir kadının birinci derece akrabasında meme kanseri olması halinde meme kanserine yakalanma ihtimalinin, genel popülasyona göre 1.7-4.0 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, aile öyküsü hastalık için önemli bir risk faktörüdür. Fakat bu istatistik, artmış insidansın çevresel, kültürel veya genetik etki ya da bu üçünün bir birleşiminin sonucu olup olmadığı ile ilgili net bir bilgi veremez. Genetik yatkınlık otozomal dominant kalıtılır ve patojenik varyantlar yüksek penetrasyon (patojenik mutasyon taşıyan kadınlar için 70 yaşından önce %67 ve 80 yaşından önce %80 hastalığa yakalanma riski) gösterir (38).

2.4. *BRCA1* ve *BRCA2* Genleri

BRCA1 ve *BRCA2* genleri yirmi yıldan uzun bir süre önce keşfedildi. O yıllarda kalıtsal genlerin kromozomal lokasyonlarını tespit etmek için bağlantı analizini kullanan çok sayıda araştırmacı vardı. Etkilenen aile bireylerinde bilinen lokasyonlara ait polimorfik genetik belirteçleri kullanarak, hangi belirteçlerin araştırılan hastalıkla birlikte kalıtıldığını analiz ettiler. 1990 yılında, Kaliforniya Üniversitesi'nde 23 aileden 146 erken başlangıçlı meme kanseri olgusunu kapsayan bağlantı çalışmaları yapıldı ve 17. kromozom üzerinde kalıtsal meme kanserinden sorumlu küçük bir bölge tespit edildi. 1994 yılında, 17q21 kromozomu üzerindeki *BRCA1* geni, pozisyonel klonlama yöntemleri ve single-strand

polimorfizm analizi kullanılarak klonlandı. Heterozigotluk kaybı çalışmaları (Loss of Heterozygosity - LOH) ile *BRCA1*'in bir tümör baskılayıcı gen olduğu anlaşıldı. Kısa süre sonra 15 meme kanseri ailesinden 146 meme kanseri olgusu ve 16 over kanser olgusu ile yapılan bağlantı analizinde 13. kromozom üzerinde meme kanseri ile ilişkili başka bir odak tespit edildi. 13. kromozomun q12 bölgesinde bulunan *BRCA2* 1995 yılında klonlandı (39).

Tümör oluşumunun iki ana mekanizması vardır: Tümör baskılayıcı genlerdeki işlev kaybı ve protoonkogenlerin aktive olması. *BRCA1* ve *BRCA2*'nin her ikisi de tümör baskılayıcı genlerdir. Alfred G. Knudson'un "iki vuruş hipotezi"ne göre; bir gende her iki allelde de mutasyon olması kanser oluşumuna neden olur. Germline hastalıklarda birinci vuruş kalıtılmış olan mutasyondur, ikinci vuruş yabancıl tip allelin somatik olarak mutasyona uğraması ile oluşur. Normal hücrelerde DNA sürekli olarak endojen (reaktif oksijen türleri ve serbest normal metabolizma radikalleri, intrensek replikasyon hataları gibi) veya ekzojen (ultraviyole ışınlar, kimyasal maruziyeti gibi) hasarlayıcılara maruz kalır. DNA'da meydana gelen hasarlar çeşitli tamir mekanizmaları ile onarılır (40). BRCA proteinleri, homolog rekombinasyon onarım yolundaki çift sarmallı DNA kırıklarının onarılmasında büyük rol oynar. Homolog rekombinasyon onarımı, çift sarmalın doğru tamir edilmesini sağlayan evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş bir yoldur. Sağlam olan kardeş kromatid tamir için bir şablon olarak kullanıldığından, homolog rekombinasyon hücre döngüsünün geç S ve G2 fazları sırasında gerçekleşir. Homolog olmayan uç birleştirme DNA onarımı için bir şablon kullanmadığından kendisi de hataya açık bir yoldur. Hücre döngüsünün G0 ya da G1 fazında meydana gelir ve kırık DNA uçlarını basitçe bir araya getirerek onarır. Sonuç olarak, küçük delesyon ve insersiyonlar oluşabilir. *BRCA1/2* hasarı olan hücrelerde, DNA tamiri hataya meyilli olan non-homolog yolla yapıldığından, genomik kararsızlık ve malign transformasyon riski artar (41,42).



Şekil 8. BRCA genlerinin fonksiyonel özellikleri (44)

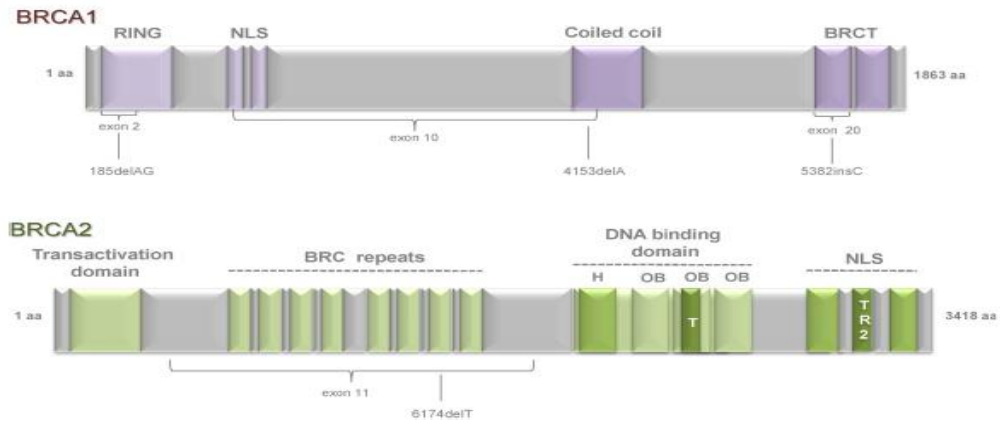
Homolog rekombinasyon onarım yolunun sadece *BRCA1/2*'nin değil aynı zamanda *ATM*, *CHEK2*, *BARD1*, *BRIP1*, *MRE11*, *RAD50*, *NSB1* (*NBN*), *RAD51C*, *RAD51D* ve *PALB2* gibi diğer DNA onarım proteinlerinin koordineli etkileşimini içerdiği unutulmamalıdır. Kısaca; *BRCA1*, *BARD1*'e bağlanarak DNA hasar bölgelerine toplanır. *BARD1* hasarlı DNA bölgelerinde poli ADP-ribozları tespit eder ve *BRCA1/BARD1* heterodimerini DNA hasar bölgelerine alır. MRN kompleksi (*MRE11-RAD50-NBS1*) gibi diğer tamir kompleksleri de, çift sarmallı DNA kırığının her iki tarafındaki 5' uçlarına bağlanır. *RAD51* ve aracı proteinler (*BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2*, *PALB2*), kardeş kromatidde homolog olan DNA dizisini bulur ve hasarlı DNA zincirinin DNA şablonunu (kardeş kromatid) referans olarak kullanmasını sağlar. *BRCA2* ayrıca *RAD51*'i (DNA hasarı olmadığında, *RAD51* *BRCA2* tarafından sekestre edilir) düzenler. *PALB2* de DNA hasarı sırasında *BRCA2*'nin nükleer lokalizasyonunu kolaylaştırır. *BRCA1*'in ek rolleri de vardır; *BRCA1*, homolog rekombinasyon onarımı, kromatin yeniden düzenlemesi ve hücre döngüsü düzenlemesini sağlar. *BRCA1*, çift sarmallı DNA kırıklarında *BRCA2-RAD51* tamir makinelerinin *PALB2*'ye bağımlı çalışmasını düzenler ve DNA onarım sahalarında γ -H2AX'ı (histon H2AX) bağlar. *BRCA1*'in ek rollerininin, *BRCA1* kaybının neden meme ve over kanserini riskini arttırdığının yanı sıra, olgularda kanserin ortaya çıkışının neden *BRCA2*'den daha erken yaşta olduğunu açıkladığı düşünülmektedir (42,44,45).

Kalıtsal meme/over kanseri olgularının tamamından *BRCA1* ve *BRCA2*'deki mutasyonlar sorumlu değildir. Fanconi anemisi genleri (*FANCD2*, *FANCA* ve *FANCC*),

MMR genleri (*MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* ve *EPCAM*), DNA kontrol noktası genleri (*ATM*, *ATR* ve *CHEK1/2*) ve tümör baskılayıcı genler (*TP53*, *SKT11* ve *PTEN*) başka kanser sendromlarının bir parçası olarak artmış meme ve over kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (27).

2.4.1. *BRCA1* Geninin Yapısı

BRCA1 (17q21, kromozom 17: baz çiftleri 43,044,294-43,125,482) 24 ekzonlu bir genidir ve 1,863 amino asitten oluşan bir proteini kodlar. En büyük ekzonu 11. ekzondur, ilk ekzon kodlama yapmaz. *BRCA1* geninin %4.8'ini oluşturan düşük yoğunluklu tekrar dizilerine karşı yaklaşık %41.5'i Alu dizilerinden oluşur (46). *BRCA1* geni çoklu fonksiyonları için ayrı ayrı önem taşıyan birkaç parçadan oluşur. N-terminal ucundaki çinko bağlayıcı parmak RING (Really Interesting New Gene) domaini, *BRCA1* ve *BARD1*'in (*BRCA1* ilişkili RING domain proteini 1) etkileşiminde rol oynar ve E3 ubiquitin ligaz kompleksinin oluşumu için esansiyeldir. C-terminal ucundaki iki fosfopeptit bağlayıcı *BRCT* (*BRCA1* C-terminali) domaini, *BRCA1*'in CtIP [C-terminal bağlayıcı protein 1 (CtBP1) etkileşimli protein], *BRCA1* A Kompleks Subuniti (ABRAXAS) ve *BRCA1* ile etkileşime giren protein C-terminal helikaz 1 (*BRIP1/FACJ*) gibi proteinlerle etkileşimi sağlar. *BRCA1*'in merkez parçası 11-13. ekzonlar tarafından kodlanır ve bu bölgelerdeki mutasyonlar sıklıkla meme kanseri hastalarında karşımıza çıkar. Bu parçalar iki nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLS) ve bir sarmal bobininden oluşur, *BRCA2* ve partneri *PALB2* arasındaki etkileşimi düzenler (43).



Şekil 9. *BRCA1* ve *BRCA2* fonksiyonel alanları ve bazı etnik köken/bölgelerde sık rastlanan birkaç mutasyonun gösterimi (43).

2.4.2. *BRCA2* Geninin Yapısı

BRCA2 (13q12.3, kromozom 13: baz çiftleri 32,315,479-32,399,671) 84.2 kb genomik DNA kapsar ve 27 ekzon içerir. 3418 amino asitten oluşan büyük bir proteindir. *BRCA1*'de olduğu gibi en büyük ekzonu 11. ekzondur, ilk ekzon kodlama yapmaz (46). N-terminalinde bir transkripsiyonel aktivasyon alanı içerir (TAD). Orta kısım en büyük ekzon olan 11. ekzon tarafından kodlanır, BRC tekrarları adı verilen ve *RAD51*'e bağlanan sekiz korunmuş motif içerir. *BRCA2* proteininin karboksil terminalinde bulunan DNA bağlayıcı alan, korunmuş bir sarmal alan, üç oligonükleotit bağlama bölgesi ve *BRCA2*'nin çift sarmallı DNA (dsDNA) ve tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) bağlanmasını kolaylaştıran bir parçadan oluşur (43).

2.4.3. *BRCA1* ve *BRCA2* Mutasyonları

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinin her biri için 3000'in üzerinde patojenik ve olası patojenik mutasyon tanımlanmıştır (39). Meme kanseri vakalarının yaklaşık %10-15'i kalıtsal genetik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Penetransı en yüksek olan mutasyonlar, genom stabilizasyonunda önemli işlevleri olan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde bulunur. *BRCA1*'de patojenik mutasyon taşıyan kadınların yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski %72, *BRCA2* mutasyonları olanlarda ise %69'dur (47). Over kanseri gelişme riski ise; *BRCA1* mutasyonu taşıyanlarda %40-50 ve *BRCA2* mutasyonu taşıyanlarda %20-30'dur (48). *BRCA*'daki mutasyonlar ayrıca prostat kanseri, melanom ve pankreas kanseri riskini de artırır. *BRCA* patojenik mutasyon taşıyıcılarının kanser tanısı almadan önce tanımlanması, bu olguların önleyici tedbirler, kemoprevensiyon ve koruyucu cerrahi ile kanser gelişiminden korunmaları açısından önemlidir (47).

BRCA1/2 genlerinin kodlayan ve kodlamayan bölgelerinde delesyon, insersiyon ve tek nükleotid değişimleri gibi farklı mutasyonlar bildirilmiştir. En yaygın mutasyon türleri; küçük delesyon ve insersiyonların neden olduğu çerçeve kayması mutasyonları, güdük protein oluşumuna neden olan anlamsız mutasyonlar ve splice bölgesini etkileyerek fonksiyonel olmayan *BRCA* proteininin oluşmasına yol açan mutasyonlardır (49). Alu sekanslarının yoğunluğuna bağlı olarak *BRCA1* geninde *BRCA2*'ye kıyasla daha yüksek delesyon/insersiyon oranı (sırasıyla %42 ve %20) gözlenmektedir (46). *BRCA1* geni ve psödogeni arasındaki homolog rekombinasyonun bir sonucu olarak büyük genomik

yeniden düzenlemeler (Large Genomic Rearrangements - LGR), *BRCA1* geninde meydana gelen tüm mutasyonların yaklaşık 1/3'ünü oluşturur (17). *BRCA2* geninde mutasyonların çoğu ekzon 10 ve 11'de meydana gelir ve genellikle, yanlış anlamlı değişiklik ve işlevsel olmayan güdük protein senteziyle sonuçlanan erken stop kodon oluşturan delesyon veya insersiyonlardır (49).

BRCA1 ve *BRCA2*'deki germline mutasyonlar, diğer genlerdeki mutasyonlar ile karşılaştırıldığında, artmış ailesel/kalıtsal meme/over kanseri sendromu riski ile daha yakından ilişkilidir. Mutasyon saptanamayan ailelerin üyelerinde de meme ve over kanseri riski artmıştır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (Genome-wide association studies - GWAS), meme ve over kanseri riskini artıran farklı genetik faktörler tanımlamıştır. *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarına ek olarak, kalıtsal meme ve over kanseri olası duyarlılık genleri arasında yüksek penetrasyonlu (*CDH1*, *NBS1*, *NF1*, *PTEN*, *TP53* ve *STK11*), orta penetrasyonlu (*ATM*, *ATR*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2*, *CDK1* ve *RAD50*) ve düşük penetrasyonlu (*FGFR2*, *LSP1*, *MAP3K1*, *TGFB1*, *TOX3*, *VEGF*, *PGR*, *KRAS* ve *PARP*) *BRCA1/2* ve DNA hasarı düzenleyici ("modifier") genler bulunur (27).

2.4.4. *BRCA1* ve *BRCA2* Gen Mutasyonlarının Toplumlara Göre İnsidansı

Farklı popülasyonlar ve farklı etnik gruplarda, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde görülen patojenik mutasyonların sıklığı değişiklik göstermekle birlikte, *BRCA1* geninde en sık görülen mutasyonlar 5382insC ve 185delAG; *BRCA2* geninde en sık görülen mutasyon 6174delT'dir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde oluşan mutasyonlara bağlı herediter meme kanserinin en sık görüldüğü toplum olan Askenazi Yahudileri'ndeki analiz sonuçları da bu şekildedir (50,51). Fransız kökenli Kanada'lı olgularda *BRCA1* C4446T mutasyonu en yaygın, *BRCA2* 8765delAG mutasyonu da ikinci en yaygın mutasyon olarak tespit edilmiştir (52). Belçikalı aileler ile yapılan bir çalışmada *BRCA1* IVS5+3A>G en sık tespit edilen mutasyon olmuştur (53). Finlandiya'da yapılan bir çalışmada *BRCA2* T8555G ve 999del5 mutasyonları o toplumda sık görülen ("founder") mutasyon olarak saptanmıştır (54). Polonya'da yapılan bir araştırmada *BRCA1* 5382insC, C61G ve 4153delA mutasyonlarına sık rastlanmıştır (55) (Tablo III).

Tablo III. Etnik Gruplara Göre Sık Görülen *BRCA* Mutasyonlarının Dağılımı (56) (\geq %2 Prevalans)

İrk/Etnik köken	Mutasyon		Gözlenen (Mutasyon yüzdesi)
	BRCA1	BRCA2	
Batı Avrupa (N=4389)			
	5385insC		228 (5.2)
	187delAG		128 (2.9)
	C61G		101 (2.3)
	6kb ekzon 13 ins		95 (2.1)
	IVS5-11 T>G		90 (2.1)
	4184del4		89 (2.0)
Afrika (N=279)			
	943ins10		28 (10.0)
	M1775R		22 (7.9)
	5296del4		16 (5.7)
	IVS13+1 G>A		12 (4.3)
	IVS16+6 T>C		10 (3.6)
Orta Avrupa (N=550)			
	5385insC		82 (14.9)
	C61G		36 (6.4)
		6174delT	25 (4.5)
	187delAG		23 (4.2)
	Q563X		15 (2.7)
Kuzey Amerika Yerlileri (N=105)			
	187delAG		7 (6.7)
	5385insC		4 (3.8)
Asya (N=184)			
	L63X		6 (3.3)
		R2494X	5 (2.7)
		Q1037X	4 (2.2)
	187delAG		4 (2.2)
Latin Amerika (N=287)			
	187delAG		35 (12.2)
	A1708E		14 (4.9)
	R71G		13 (4.5)
	3492insT		12 (4.2)
	2552delC		11 (3.8)
	E1308X		10 (3.5)
	3148delCT		10 (3.5)
Ortadoğu (N=46)			
	187delAG		7 (15.2)
	C44F		5 (10.9)
	Y978X		3 (6.5)
	L63X		6 (7.6)

Türk toplumunda yapılan mutasyon analiz çalışmalarının ilki Yazıcı ve arkadaşlarının (57) 2000 yılında yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada; kendisinde ve ailesinde meme ve/veya over kanseri öyküsü olan 53 olgu ve aile öyküsü olmadan elli yaş altı meme kanseri tanısı alan 52 olgu değerlendirilmiş, bu olgularda *BRCA1* ve *BRCA2*'de

insidansı yüksek olan spesifik bir mutasyon saptanmamıştır. Manguoğlu ve arkadaşlarının (58) 2003 yılında yaptıkları çalışmada ise; ailesel meme kanseri olan 23 olgu (bir olguda bilateral meme kanseri), erken başlangıçlı meme kanseri olan 18 olgu, 10 erkek meme kanseri olgusu, ailesel over kanseri olan bir olgu, meme ve over kanseri birlikteliği olan bir olgu ve 30 sporadik meme kanseri olgusu olmak üzere toplamda 83 olgu değerlendirilmiştir. Bu çalışmada da *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde belirgin insidans artışı gösteren bir mutasyon saptanmamıştır. Purcu ve arkadaşlarının (59) 2010 yılında yaptığı çalışmada, kendisinde ve birinci derece akrabalarında meme veya over kanseri hikayesi olan 25 kadın olgu ve kendisinde kanser hikayesi olmayıp birinci derece akrabalarında meme veya over kanseri öyküsü olan 25 kadın olgu Dünya’da en sık görülen mutasyonlar olan *BRCA1* 5382insC ve 185delAG; *BRCA2* 6174delT açısından değerlendirilmiş, dördü aynı aileden olmak üzere beş hastada *BRCA1* geninde 5382insC mutasyonu saptanmıştır.

2.5. *BRCA1* ve *BRCA2* Analizinde Kullanılan Tanı Yöntemleri

Genetik testler, kalıtsal kanser sendromlarına neden olan mutasyonlardan birini/birkaçını taşıyan bireyleri tanımlamak ve kanser riski hakkında bu bireylere bilgi vermek için kullanılabilir. Genetik testlerle yüksek kanser riski taşıdığı belirlenen bireyler, bu sonuçları kanser morbidite ve mortalitesini azaltmak amacıyla ilaç seçimi, tarama ve/veya kanserin ortaya çıkmadan önlenmesi için rehber niteliğinde kullanabilirler. Örneğin, ailesel meme/over kanser sendromu tanısı almış bir kadın profilaktik olarak bilateral mastektomi ve salpingo-ooferektomi yapılmasını tercih edebilir. Genetik test sonuçları probandın akrabalarını kanser riski ile ilgili bilgilendirmek ve onlara yapılabilecek genetik testlerde yol göstermesi için kullanılabilir. Ancak, genetik testlerden elde edilen tüm bilgiler klinik olarak işe yaramaz. Örneğin, taranamayan veya önlenemeyen kanserlerle ilişkili saptanan bir mutasyonun klinik olarak çok faydası olmaz. Buna palladin (*PALLD*) geninde saptanan ve ailesel pankreas kanseri ile ilişkilendirilmiş mutasyonları örnek verebiliriz. Çünkü pankreas kanseri için bilinen etkin bir tarama ve önleme yöntemi yoktur. Ayrıca genetik testler belirsiz sonuç verebilir. Örneğin, ailede bilinen mutasyon olmaması durumunda genetik testin negatif sonuçlanması kanser riskinin azaldığını göstermez. Bunlara ek olarak, bazı genetik değişikliklerin hastalığa neden olup olmadığı da net olarak anlaşılamamıştır (Variants of Uncertain Significance - VUS).

Bir kişi, kişisel ve/veya ailesel kanser geçmişine sahipse veya bir akrabasında tanımlanmış bir mutasyon varsa kalıtsal kanser sendromları genetik testi için klinik olarak adaydır. Genç yaşta kanser tanısı almak, nadir görölen bir kanserin bir ailede sık ortaya çıkması, belirli kanser grubundan kanser tanısı almış olan çok sayıda aile üyesi olması veya bir bireyde birden fazla kanser primeri olması kalıtsal bir kanser sendromunu düşündüren unsurlardandır (60). Genetik danışmanlık veren kişi, danışanın kişisel tıbbi bilgisine ve aile kanser geçmişine dayanarak bir risk değerlendirmesi yapar. Burada, subjektif değerlendirme ve bazen de ampirik kanser riski modellerine göre danışanın ortalama, ılımlı veya artmış bir kanser riskine sahip olup olmadığı değerlendirilir (61). Danışmanın daha sonra danışanın genetik test için aday olup olmadığını ve eğer adaysa hangi genetik testlerin nasıl önerileceğini belirlemesi gerekir. Bu aşamadan sonra danışanın genetik test yaptırıp yaptırmayacağına ve hangi testi yaptıracağına karar vermesi beklenir.

Bu kararlar, yeni nesil dizi analizi eşzamanlı olarak çok sayıda genin dizilenmesini sağladığından zaman içerisinde daha karmaşık hale gelmiştir (62). Sonuç olarak, tek bir panel içerisinde çok sayıda geni analiz etmek mümkündür ve sonuç olarak birçok şirket kanser riski değerlendirmesi için genetik testlere yeni yaklaşımlar açan çeşitli panel testleri sunmaya başlamıştır. řu anda, kanser genetik testine aşağıdakileri içeren dört genel yaklaşım vardır:

1. Sendroma spesifik test (ör. Ailesel meme/over kanseri için test)
2. Kansere özgü yüksek penetranslı gen paneli (ör. meme kanseri için yüksek risk oluşturan birkaç sendromun genleri)
3. Kansere özgü yüksek ve orta penetranslı genleri içeren panel (ör. meme kanseri riskinde artış ile bir bağlantısı olan birçok gen)
4. Çoklu kanserler veya kalıtsal kanser sendromları ile ilişkili genleri içeren kapsamlı kanser panelleri (ör. Ailesel meme/over kanseri, Lynch Sendromu ve diğer kanser sendromları ile ilişkili genler) (62).

Bu yaklaşımların her birinin klinik olarak belirgin avantajları ve dezavantajları vardır. Örneğin, bir panel içinde daha fazla sayıda genin tek seferde dizilenmesi daha ucuz

maliyet demektir ve kanser ilişkili mutasyonların saptanma ihtimalini arttırabilir. Ancak, bu yaklaşım ile aynı zamanda kanıta dayalı olmayan genlerde mutasyon bulma olasılığı ve klinik önemi belirsiz olan varyasyonların bulunması ihtimali artar ve testin sonuçlanma süresi uzar (62). Bu zorluklar göz önüne alındığında, National Comprehensive Cancer Network (NCCN) panellerin yalnızca kanser genetiği uzmanlarının görüşleri doğrultusunda çalışılmasını önermektedir (63).

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinin mutasyon analizinde farklı yöntemlere başvurulmaktadır. Bunlar arasında en sık olarak; Konvansiyonel Dizi Analizi (Sanger dizileme), Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) ve Next Generation Sequencing (NGS) yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca günümüzde pek kullanımı olmasa da, *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarını belirlemede Mikroarray ile Yeniden Dizileme yönteminden sınırlı olarak yararlanılabilir.

2.5.1. Konvansiyonel Dizi Analizi

DNA dizilimi terimi, bir DNA molekülündeki nükleotidlerin adenin, guanin, sitozin ve timin bazlarının sıralanışını belirlemeye yönelik yöntemleri kapsar. DNA dizilimi yönteminin bulunması ve gelişimine, 1977'de dideoksinükleotit trifosfatları (ddNTP'ler) kullanarak zincir sonlandırma yöntemini geliştiren Sanger, Nicklen ve Coulson (64), ayrıca DNA'nın kimyasal modifikasyonuna ve ardından belirli bazlarda bölünmeye dayalı bir yöntem geliştiren Gilbert ve Maxam tarafından öncülük edilmiştir (65). Sanger dizileme ile ilk dizilenen genom, 1977 yılında bakteriyofaj phi X 174'ün 5375 baz çifti büyüklüğündeki genomu oldu (66). 1980'lerde her DNA bazında dört floresan etiketli ddNTP kullanarak, optik algılamayı sağlayan dört renkli yarı otomatik Sanger dizileme geliştirilmiştir (67). Bu yöntem, kapiller elektroforez ile bir araya getirildiğinde, 1986'da Applied Biosystems Inc. (Now Life Technologies) tarafından pazarlanan ilk tamamen otomatik DNA dizileme sisteminin (ABI 370) arkasındaki anahtar teknolojidir (68). 1990'lar boyunca Sanger teknolojisi, insan genom dizileme projesi sayesinde geliştirilmiştir. 1998 yılında 96 kapiller elektroforezi kullanan ilk iki dizileme sistemi ABI 3700 adıyla Applied Biosystems Inc tarafından ve MegaBace adıyla Amersham Pharmacia Biotech tarafından pazarlandı (69). Sanger dizilemede gelişmeler 2000'li yıllarda devam etti ve 384'e kadar DNA fragmanının ~1,000 bp uzunluğa kadar %99,99'dan daha yüksek hassasiyetle paralel olarak dizilenmesi mümkün hale getirildi (70).

Sanger yönteminin temel prensibi, dideoksinükleotid trifosfatların (ddNTP'ler) DNA zinciri sonlandırıcıları olarak kullanılmasıdır. Zincir sonlandırma yönteminde, tek sarmallı bir DNA şablonu, bir DNA primeri, bir DNA polimeraz, radyoaktif veya floresan işaretli nükleotidler ve DNA iplikçiklerinin uzamasını sonlandırın modifiye nükleotidlere ihtiyaç vardır. DNA örneği standart deoksinükleotidleri (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve DNA polimerazı içeren dört ayrı reaksiyonuna ayrılır. Her reaksiyonda uzayan zincire dört dideoksinükleotidden (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) sadece biri eklenir. Bu dideoksinükleotidler iki nükleotid arasında bir fosfodiester bağının oluşması için gereken 3'-OH grubu içermediklerinden DNA iplikçığının uzaması sonlanır ve değişen uzunluktaki DNA fragmanları oluşur. Yeni sentezlenmiş ve etiketlenmiş DNA fragmanları, ısı ile denatüre edilir ve jel elektroforezi ile poliakrilamid-üre jel üzerinde boyutlarına göre ayrılır. Dört reaksiyonun her biri jel elektroforezinde ayrı ayrı kuyucuklarda (A, T, G, C çizgileri) gerçekleşir. Daha sonra bu DNA bantları otoradyografi veya UV ışığı ile görüntülenebilir ve DNA dizisi doğrudan X-ışını filmi veya jel görüntüsünden okunabilir. Bir çizgide koyu renkte bir bant, bir dideoksinükleotitin (ddATP, ddGTP, ddCTP veya ddTTP) zincir sonuna eklenmesi ile sonlanan zincirin oluşturduğu DNA parçasını gösterir. Farklı bantların dört kuyucuk arasındaki göreceli konumu DNA dizisini okumak için (aşağıdan yukarıya doğru) kullanılır. Zincir sonlandırma yöntemi, büyük ölçüde basitleştirilmiş bir DNA dizileme yöntemidir. Yöntemin sınırlamaları; primerin spesifik olmayan DNA'ya bağlanarak DNA'nın doğru okunmasını engellemesi ve DNA sekonder yapılarının dizilemenin kalitesini etkileyebilmesidir (64).

Zamanla bu yöntem geliştirilmiştir ve günümüzde DNA fragmanları otomatik bir dizileme cihazında bulunan uzun bir kapiller tüp içindeki jel elektroforezinde yürütülerek uzunluklarına göre ayrılabilir ve yaydığı ışımaya göre tanınabilir. Hedef bölge ileri (forward) ya da geri (reverse) oligonükleotid primerler kullanılarak kaydedilir. Oluşan iki tamamlayıcı dizi bilgisayar tarafından eşleştirilir ve dizi gözle görülür hale gelir (64).

2.5.2. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing - NGS)

Sanger dizilemenin etkinliğinin anlaşılmasından bu yana yıllar içinde teknik olarak geliştirilmesine rağmen, rutinde insan genomunu dizilemenin maliyeti çok yüksek kalmıştır. 2000'lerin ortalarında, milyonlarca dizileme reaksiyonunu paralel olarak gerçekleştiren ikinci nesil dizileme teknolojileri ortaya çıkmıştır. Bu teknolojilere topluca

Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing - NGS) adı verilir. Yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak genom, transkriptom, mRNA profili, snRNA profili, transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin genom karakterizasyonu, kromatin yapısı ve metilasyon paterni, atasal DNA araştırması ve metagenomik araştırmalar yapılabilmektedir. Yeni nesil dizileme için ilk önce Pirodizileme metodu (Pyrosequencing), ardından farklı metodlara dayanan ligasyon yoluyla dizileme, ion semikondüktör dizileme ve nano dizileme gibi yeni nesil dizileme yöntemleri geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır.

2.5.2.1. Pirosekanslama (Pyrosequencing):

1988'de, ilk "sentezleme ile dizileme" yöntemi olan pirosekanslama Edward D. Hyman tarafından yayınlandı (71). Yöntem, Pål Nyrén tarafından icat edilen bir kavram olan nükleotid birleşmesi sırasında açığa çıkan pirofosfatların gerçek zamanlı saptanması esasına dayanır (72,73). Çalışan bir dizileme yöntemi ortaya çıkarmak 10 yıldan fazla zaman almıştır ve bilim insanlarının bunu başarması ancak 1996'da mümkün olmuştur (74-76). İlk ticari otomatize pirosekanslama sistemi ise 1999'da Pyrosequencing AB tarafından piyasaya sürülmüştür (74). Pirosekanslamada gerçek zamanlı (real-time) kantitatif bir dizi analizi yapılmaktadır. Primerler kalıp tek sarmal DNA'ya bağlandıktan sonra sentez başlar ve DNA polimeraz deoksiribonükleotid trifosfatların (dNTP) sarmala eklenmesini kataliz eder. dNTP DNA kalıbına bağlanırken üzerindeki iki fosfat açığa çıkar ve iki fosfatlı bir yapı olan pirofosfat (Ppi) serbestleşir. Her nükleotid eklenmesinde bir pirofosfat ortama geçmiş olur. Bu pirofosfatlar ATP'ye çevrilir. Oluşan ATP'nin yardımı ile ortama substrat olarak eklenmiş olan lusiferin oksilusiferine dönüşür. Oksiluciferin ise görünür bir ışık yayar. Bu ışın kızıl ötesi (Charge-Coupled Device - CCD) kamera ile tespit edilir ve seri tepecikler şeklinde kaydedilir. Nükleotid dizisi bu sinyal tepeciklerinden saptanır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aşamasından sonra pirosekanslama, sekanslanacak baz sayısına bağlı olarak 10 dakika kadar kısa sürede sonuç verebilmektedir ve kolaylık, eleman, zaman, maliyet açısından avantajlara sahiptir. Halen bir PZR ürününün dizi analizini yapan en hızlı yöntemdir ve doğruluk oranı oldukça yüksektir. Sanger tekniğindeki gibi işaretli primer, işaretli nükleotid ve jel elektroforezine ihtiyaç olmaması bu tekniğin önemli avantajlarıdır (77,78).

2.5.2.2. *Siklik Geriye Dönüşümlü Sonlandırma (Cyclic Reversible Termination) ile Dizileme:*

Balasubramanian ve Klenerman tarafından Cambridge Üniversitesi'ndeki çalışmalarının sonucunda geliştirilen seri paralel sıralama teknolojisi, daha sonra Solexa tarafından ticarileştirildi. Bu yöntemde, DNA şablonu bir slayt üzerine sabitlenmiş primerlere bağlanır ve DNA çoğaltılır. Dizileme işlemi birkaç döngüde gerçekleşir. Her döngüde, florasanla işaretlenmiş tersinir sonlandırılmış nükleotitler (ddNTP) reaksiyona eklenir ve yeni sentezlenen zincirin yapısına girmeyen ddNTP'ler yıkanarak uzaklaştırılır. Bir görüntü alınır, daha sonra tepkimenin bir sonraki baza ilerlemesini sağlamak için boya ve sonlandırıcı, kimyasal olarak uzaklaştırılır. Çekilen görüntüler çalışmadan sonra bilgisayar programları ile analiz edilir ve her döngüde hangi bazın eklendiği baza özgü renk ile belirlenir. Bu yöntem şimdi bir DNA fragmanının her iki ucundan 100 baz çifti okuma alındığında, çalışma başına 600 gb üretmektedir (79,80).

2.5.2.3. *Ligasyon Yoluyla Dizileme:*

SOLiD (Supported Oligonucleotide Ligation and Detection) ilk olarak 2008 yılında Applied Biosystems Instruments (ABI) tarafından yayınlanan ve Life Technologies tarafından pazarlanan yeni nesil bir dizileme aracıdır (81). Ligasyon yöntemiyle dizileme, bir veya iki baz kodlanmış prob ve DNA ligaz kullanılması ile siklik geriye dönüşümlü sonlandırma ile dizilemeden ayrılır. En basit haliyle, florasan işaretli bir prob, hazır şablondaki tamamlayıcı dizisine hibridize olur. Daha sonra boya ile işaretlenmiş probu primere bağlamak için DNA ligaz eklenir. Serbest kalan problemler yıkanır, ardından bağlanan probu belirlemek için florasan görüntüleme yapılır. Döngü, floresan boyayı uzaklaştırıp 5'-PO₄ grubunu sonraki ligasyonlar için açığa çıkararak ya da şablona yeni primer ekleyerek tekrarlanabilir (82). Günümüzde bu teknolojiye sahip dizileme cihazları, tüm genom, ekzom ve transkriptomları içeren küçük ve büyük ölçekli projelerde kullanıma uygundur. Bu yöntemin avantajı, her bir bazın iki kez doğrulanmasıdır. En büyük dezavantajları; kısa okuma uzunlukları (50-75 bp), 7-14 günlük çok uzun çalışma süreleri, ham verilerin analizi için ileri teknoloji gerektiren altyapı ve uzman personel ihtiyacıdır (81).

2.5.2.4. *Ion Semikondüktör Dizileme:*

Ion semikondüktör dizileme doğrudan kimyasal olarak kodlanmış bilgileri (A, C, G veya T) yarı iletken bir aygıt tarafından tespit edilen voltaj sinyallerine dönüştürür. Bu yöntem, DNA'nın polimerizasyonu sırasında ortaya çıkan, hidrojen iyonlarının saptanmasına dayanır. Reaksiyon kuyucuklarına sırayla A, C, G ve T nükleotitlerinden biri eklenir. Uygun nükleotit, şablon DNA zincirini tamamladığında hidrojen iyonu salınımı olur. Hidrojen iyonları hipersensitif iyon sensörleri tarafından algılanır ve reaksiyon kuyucuğundaki elektrik potansiyelinde bir değişikliğe neden olur. Kalıp DNA'da homopolimer tekrarlarının varlığında, tek siklusta birden fazla nükleotid yeni zincirin yapısına girecek ve salınan hidrojen iyonlarının sayısına göre daha fazla elektronik sinyal elde edilmesiyle DNA dizisi belirlenecektir (80,83).

2.5.2.5. *Nano dizileme:*

Nanopore dizilimi, uzun DNA veya RNA parçalarının doğrudan, gerçek zamanlı analizini sağlayan bir dizileme yöntemidir. Nanoporların içinden iyonik bir akım geçirilir ve nükleik asitler nanopore'den geçerken elektrik akımındaki değişiklikler izlenir. Ortaya çıkan sinyaller, spesifik DNA veya RNA sekansını okumak için kullanılır. Bir nanopore nano ölçekli bir deliktir. Delikler, proteinleri delen membranlardan (biyolojik nanoporlar) veya katı malzemelerden (katı hal nanoporlar) oluşturulabilir. Bir protein nanopore elektriksiz olarak dirençli bir polimer zarına yerleştirilir. Bu membran boyunca bir voltaj ayarlayarak bir iyonik akım nanopore içinden geçirilir. Bir analit gözenekten veya açıklığının yakınından geçerse, bu olay akımda karakteristik bir bozulma yaratır. Bu akımın ölçülmesi, söz konusu molekülü tanımlamayı mümkün kılar (84,85).

2.5.3. *Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification – MLPA)*

Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA), belirli bir DNA bölgesindeki kopya sayısı değişikliklerinin (Copy Number Variation – CNV) tespiti için kullanılan moleküler sitogenetik tekniklerden biridir. MLPA ilk önce *BRCA1*, *MSH2* ve *MLH1* genlerindeki ekzon delesyon/duplikasyonlarının ve Down, Patau ve Edward sendromu gibi trizomilerin tespit edilmesi için kullanılmıştır (86). Son yıllarda orjinal

teknikte yapılan çeşitli modifikasyonlarla eklenen uygulamalar; metilasyon durumunun belirlenmesi (Metilasyon spesifik MLPA - MS-MLPA), ekspresyon profillemesi (RT-MLPA) ve son olarak da array temelli MLPA'dır (87). MLPA prensibi, hedef DNA'nın farklı bölgelerine hibridize olan ligasyon problemlerinin amplifikasyonu ile polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) dayanmaktadır. MLPA ile aynı anda çok sayıda numunenin çalışılması mümkündür, böylece laboratuvar çalışmalarının verimini önemli ölçüde artırır.

MLPA, her biri incelenen DNA segmentinin farklı bir kısmı için spesifik olan yaklaşık 45 probun kullanıldığı multipleks bir reaksiyondur. Hedef DNA dizilerinin göreceli kopya sayılarını belirlemek için kullanılır. Her MLPA probu, kısa sentetik bir oligonükleotit ve uzun bir oligonükleotitten oluşur. Her iki nükleotid de hedefe spesifik bir dizi içerir. Bu hedef dizilerin seçimi MLPA prob tasarımında kritik adımdır ve bu dizilerin benzersiz olması gerekir (87). MLPA kitlelerinin çoğu, uzunlukları birbirinden farklı ve hedefe spesifik yaklaşık 35-42 probdan oluşur. Elektroforetik ayırmaya izin vermek için problemlerdeki boyut farklılıkları gereklidir. MLPA problemleri eklenmiş DNA, denatürasyon ve hibridizasyon işlemlerinden geçer. Bir sonraki adımda, hedef dizilere hibridize olan tüm problemler bir ligaz enzimi ile birleştirilir. Ligaz ile birleştirilen problemler PZR ile çoğaltılır. Her bir DNA hedef dizisinden elde edilen PZR ürünleri farklı şekilde göç eder. Amplifiye edilen problemler, kapiller elektroforezle tespit edilip ölçülebilir. Çoğu MLPA reaksiyonu yaygın olarak kullanılan tek veya çok kapillerli DNA analiz cihazları ile uyumludur. MLPA tekniği, gerçekleştirilmesi oldukça kolay olan bir reaksiyonda 45 farklı hedef DNA dizisinin göreceli olarak ölçülmesine izin verir. Sadece bir termal döngü cihazı ve bir kapiller elektroforez gereklidir. MLPA problemlerinin tasarımı ve hazırlanması zaman alıcıdır, ancak birçok MLPA kiti ticari olarak çeşitli şirketler tarafından üretilmiştir (88). MLPA'nın en büyük avantajlarından biri özgüllüğüdür. Bu yöntem, sadece bir nükleotidde farklılık gösteren dizileri ayırt edebilir. Spesifikliği artırmak için, MLPA hibridizasyonu ve ligasyon reaksiyonları, Ligaz-65 için çok önemli olan 54-60°C'de gerçekleştirilir (89,90). Ek bir avantaj, bir MLPA reaksiyonunun gerçekleşmesi için 20-50 ng DNA'nın yeterli olmasıdır (86). MLPA incelemesi için farklı kökenlere sahip dokulardan (amniyotik sıvıdan, periferik kandan, tümör dokusundan) izole edilen DNA kullanılabilir. MLPA'nın bazı sınırlamaları vardır: PZR reaksiyonunun kontaminasyona hassas olması laboratuvar çalışmasının laminar akım kutusunda yapılmasını gerektirir. Sonuçlar, DNA'nın kalitesine bağlıdır. DNA zarar görmüşse, veri analizi zor olabilir ve bulgular alternatif bir yöntemle

teyit edilmelidir. MLPA, CNV'leri ayırt edebilir ancak dengeli kromozomal değişiklikleri saptayamaz.

MLPA, meme/over kanseri hastalarında *BRCA1/2* delesyon/duplikasyonlarının taranmasında (91,92) ve kalıtsal non-polipozis kolorektal kanserde *MLH1* ve *MSH2* ekzon delesyonlarının saptanmasında (93,94) kullanılır. MLPA, rutin prenatal klinik uygulamada yaygın kromozomal anöploidilerin (13, 18, 21, X ve Y) amniyotik sıvı hücrelerinden tespitinde alternatif bir yöntem olarak belirlenmiştir (95). Duchenne musküler distrofisi olan hastalarda DMD genindeki mutasyonların tanımlanması MLPA ile gerçekleştirilebilir (96,97). Klinik tanıda MLPA, subtelomerik kopya sayısı değişikliklerinin (98,99) veya mikrodelesyon sendromlarının taranması için (100) kullanılabilir.

2.5.3.1. MS-MLPA (*Metilasyona Spesifik MLPA*):

MS-MLPA, CNV tespitinin metilasyon profillemeye ile birleştirildiği bir MLPA tekniğidir. Bu yöntem, hedef genlerin CNV'lerinin yanı sıra, CpG adalarının epigenetik anormal metilasyon kalıplarının tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır. Protokol, geleneksel MLPA'ya çok benzer; genomik DNA ilk önce denatüre edilir, sonra MS-MLPA problemleri ile hibridize edilir, daha sonra prob-DNA kompleksi metilasyona spesifik enzimler tarafından bağlanır ve sindirilir. CpG bölgesi metillenmişse normal bir MLPA ürünü tespit edilir. CpG bölgesi metillenmemişse, DNA-prob kompleksi, metilasyona duyarlı enzim ile sindirilecek ve amplifikasyon ürünü oluşmayacaktır (101). MS-MLPA, Prader-Willi (PWS)/Angelman Sendromu (AS) olan hastalarda metilasyon profilini ve CNV'leri belirlemek için yaygın olarak kullanılır. PWS/AS'nin hedef bölgesi olan 15q11q13'te bulunan genler DNA'nın metilasyonu ile damgalanır, bu da bu genlerin ifadesinin hangi ebeveyninden geldiğine bağlı olduğu anlamına gelir. PWS babadan gelen, AS ise anneden gelen alleldeki ifadenin kaybı ile ilişkilidir. PWS/AS vakalarının çoğu (%65-75), 15q11q13'teki yaklaşık dört Mb'lık bir bölgenin de novo silinmesinden kaynaklanmaktadır. Bu bölgedeki ikinci yaygın genetik anormallik, PWS'de maternal uniparental dizomi veya AS'de paternal uniparental dizomidir (102). MS-MLPA analizi, PWS/AS'ye sebep olan moleküler mekanizmaların çoğunluğunu (delesyon ve metilasyon anormalliği) tek reaksiyonda tespit etme avantajına sahiptir (103-105). Benzer bir durum Beckwith-Wiedemann (BWS) ve Silver-Russell Sendromu (SRS)'nda da vardır. BWS/SRS ile ilgili bölge olan 11p15, büyümenin regülasyonunda görevli bir dizi damgalanmış gen içerir.

11p15'teki kopya sayısı değişiklikleri veya epigenetik değişiklikler MS-MLPA ile saptanabilir (106,107).

2.5.3.2. RT-MLPA (*Ters Transkriptaz MLPA*):

mRNA profillemesi için geliştirilen RT-MLPA, northern blot, gerçek zamanlı PZR veya ekspresyon mikroarray gibi diğer ekspresyon profillemeye tekniklerine alternatif bir yöntemdir. Diğer yandan, RT-MLPA tüm genomun ekspresyon profillemesini gerçekleştiremez, sadece seçilen gen ürünlerini tarayabilir. RT-MLPA, kısa mRNA parçalarını cDNA'ya kopyalayan bir ters transkriptaz reaksiyonu ile başlar. RT reaksiyonundan sonra, işlem standart bir MLPA gibi devam eder. Parafine gömülü, formaldehitte muamele edilmiş dokulardan elde edilen RNA'yı kullanmak mümkün olsa da başarı oranları doku koşullarına (pH seviyesi, yaş gibi) bağlıdır. RT-MLPA'nın bir uygulaması, hücrenin enflamatuar koşullara yanıtında merkezi rol oynayan bir dizi geni ve apoptozun direkt düzenlenmesini içeren bir dizi geni ile tarif edilmiştir (108). Ek çalışmalarda, insan endotel hücrelerinde (109) veya akut miyeloid lösemideki (110) enflamasyonla ilişkili genlerin RNA ekspresyonundaki değişiklikleri izlemek için bir araç olarak RT-MLPA kullanılabilir.

2.5.3.3. Array-MLPA (*Array Tabanlı MLPA*):

En yeni uygulama, 200'e kadar farklı probu tespit etmek için MLPA'yı array bazlı hibridizasyonla birleştirir. Kullanılan alüminyum oksit matrisinin gözenekli yapısı, numunenin dizi boyunca ileri geri pompalanmasına izin verir ve sonuç olarak hibridizasyon süresini azaltır (20 dakika). Florasan sinyal yoğunluğu, bir CCD görüntüleme sistemi tarafından yakalanır. Array bazlı MLPA, rutinde değerli bir tanı yöntemi olarak tanımlandı, çünkü hızlı, kullanıcı dostu ve nispeten düşük maliyetlidir. 2011 yılında iyi bilinen interstisyel mikrodelyasyon/mikroduplikasyon sendromu bölgelerini (Williams-Beuren, Miller-Dieker, Prader-Willi/Angelman, Rubinstein-Taybi, Smith-Magenis vb.) ve kromozomal subtelomerik bölgeleri kapsayan problemlerden oluşan bir MLPA seti geliştirilmiştir. Bu prob seti sadece bilinen aberasyonları tespit etmek için dizayn edilmiştir; bu dizaynın sonucu olarak da, tüm genomu tarayan, klinik yorumlamanın her zaman açık olmadığı ve daha önce karşılaşılmamış kromozomal

anormallikleri tespit edebilen array-CGH yöntemiyle karşılaştırıldığında array-MLPA verisinin klinik yorumu basit ve açıktır (111).

2.5.4. Mikroarray

DNA mikroarrayleri belirli bir hücreden, dokudan veya organizmadan gelen genlerin biyolojik süreçlerini büyük ölçekli araştırmak için güçlü bir araçtır. Bu sistemde, her biri bir geni temsil eden binlerce prob (genellikle cDNA veya oligonükleotitler), cam slaytlar veya benzeri katı materyaller üzerine düzenli olarak yerleştirilmiştir. Bu platform DNA çipleri olarak da bilinir. Tekniğin prensibi, çipin üzerindeki proplar ve analiz edilen örneğin (florasan etiketli DNA, cDNA veya cRNA molekülleri) arasındaki spesifik hibridizasyona dayanır (112). Mikroarray, hastalık ilişkili yeni genlerin keşfedilmesinden, biyobelirteçleri kullanarak klinik tanı koymaya kadar geniş bir yelpazede etkin bir şekilde kullanılabilir. Mikroarray yöntemi, hastalıkla ilişkilendirilmiş genlerin veya hastalığa neden olan ajanların belirlenmesinde ve genotiplemesinde, tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) taranmasında, kromozomal anomalilerinin belirlenmesinde ve posttranslasyonel modifikasyonların belirlenmesinde kullanılmaktadır (113). Mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde; biyolojik materyal PZR ile çoğaltıldıktan sonra, 20-200 bç büyüklüğünde fragmanlara ayrılır ve biotinle işaretlenir. Daha sonra PZR ürünleri çipe yerleştirilir ve hibridizasyon sağlanır. Son aşamada eklenen boya lazer tarayıcıda görüntülenmeyi sağlar ve dizileme işlemi gerçekleşir. Elde edilen veriler bilgisayar analiz program yardımıyla değerlendirilir (114).

2.6. Meme Kanserinde Etik ve Genetik Danışma

Günümüzde genetik bilimi ve teknolojideki hızlı gelişmeler genetik hastalıkların tanısını yaygınlaştırmıştır. Bu gelişmeye paralel olarak genetik tanı testlerinin uygulama alanları hızla genişlemiştir. Yalnız kalıtsal hastalıkların tanınmasına yönelik başlayan genetik tanı testleri bu temel amacının çok daha üzerine çıkarak, kalıtsal yatkınlıkların belirlenmesi, tedavi hedeflerinin saptanması ve yaşam boyu hastalık risklerinin belirlenmesi gibi alanlarda da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunun doğal sonucu olarak koruyucu tıp uygulamalarının yanında, medikal ve cerrahi tedavi uygulamalarında da yol gösterici hale gelmiştir. Tüm bunların sonucunda, genetik tanı uygulamalarının genişleyen yelpazesi tıp alanında etik ve legal sorunların da türünü ve

boyutunu etkilemiştir. Özellikle son yıllarda hızla yaygınlaşan presemptomatik, prediktif testler hem uygulama şekli hem de taşıdığı bilginin etkileri nedeni ile yeni etik başlıklar doğurmuştur. Diğer bütün uygulamalarda olduğu gibi bu konuda da tıbbi yaklaşım ve etik yaklaşımın birlikte gelişmesi kaçınılmazdır. Bu süreçte gelişmelerden fayda sağlanırken aynı zamanda olası zararlarından kaçınmak için bazı sorunların ön görülmesi gerekliliği unutulmamalıdır (81).

2.6.1. Genetik Bilgilendirme

Kanser tanısı olan olgular, bu durumdan sadece fizyolojik olarak ya da bireysel olarak etkilenmez. Kanserden etkilenen bireyler ve aile üyeleri, hastalığın nedenini sorgularlar ve psikososyal olarak etkilenirler. Ailede kanser tanısı almış birden fazla bireyin olduğu durumlarda, aile üyeleri hastalığın tüm sürecini ve ölüm de dahil olmak üzere sonuçlarını yaşamışlardır. Bu bireylerin birçoğu endişelerini gidermek ve önleyici müdahaleler hakkında bilgi almak için genetik hekimlerinden destek istemektedir. Bu da ailesel kanser sendromu genetik danışmasında bazı zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Danışmanlar, danışanın kanser riskini arttıran ve azaltan davranışlarını belirlemek veya ailede başka bir bireyde/bireylerde saptanmış olan patojenik mutasyonu taşıyıp taşımadığını tespit etmek, danışan ise kanser tanısı almışsa, kansere yatkınlık yapan bir mutasyona sahip olup olmadığını bilmek isteyebilir. Kanser geliştirme riskinin doğru bir şekilde anlaşılması, düşük riskli bireyler arasındaki psikolojik sıkıntıyı ve gereksiz muayeneler nedeniyle ortaya çıkacak ekonomik maliyetleri azaltır. Yüksek riskli bireylerde ise kanser insidansını ve mortaliteyi azaltmak için kanserden korunma konusunda danışmanlık yapmak çok önemlidir. Kanser arkasındaki mekanizmalar tam çözülememekle birlikte, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimini içeren multifaktöriyel ve yaygın bir hastalık olduğu bilinmektedir. Çoğu kanser, somatik mutasyonlar nedeniyle gelişir, ancak bazı mutasyonlar doğuştan genetik yapıda var olup, bireyin kansere yakalanma riskini arttırabilir (115-117).

2.6.2. Genetik Ayrımcılık ve Yasal Düzenlemeler

BRCA1/BRCA2 genlerinde mutasyon taşıyan bireyler için genetik ayrımcılık sonucu, aileleri ve toplum tarafından daha az ideal eş ve/veya ebeveyn sayılarak yabancılaşma ve reddedilme durumu ortaya çıkabilmektedir. *BRCA1/BRCA2* genlerinde

mutasyon taşıma riski olan birçok birey; sağlık sigortası veya işverenler ile aileleri ve toplum tarafından ayrımcılığa uğrama korkusu nedeniyle test yaptırmaktan kaçınmaktadır. Bu sebeplerle test yaptırmayan kişilerin; koruyucu önlemler, izleme ve/veya test sonrası takip ve diğer müdahalelerden mahrum kaldıkları için zarar görme ihtimali gündeme gelir. Genetik ayrımcılığın önlenmesi amacıyla, ABD’de ve diğer bazı gelişmiş ülkelerde ayrımcılık karşıtı kanunlar bulunmaktadır. ABD Kongresi 2008 yılında genetik bilgiye bağlı olarak sağlık sigortası şirketleri ve işverenler tarafından ayrımcılığa karşı bireyleri korumak için Genetik Bilgi Ayrımcılık Yasası’nı (GINA) yürürlüğe koymuştur. GINA, sigorta şirketlerinin risk analizi yaparken genetik bilgiyi ve aile öyküsünü dikkate almasını yasaklamaktadır. Böylece, mutasyon taşıyıcılarının, daha yüksek sigorta primi ödemelerinin veya sağlık sigortası kapsamından çıkarılmalarının önüne geçilmiştir. Genetik Ayrımcılık Mevzuat’ı, bireylerin genleri üzerinde hiçbir kontrollerinin olmadığı gerçeğine dayanmaktadır. Ancak Avrupa’da genetik test ve genetik bilginin yasalar içerisinde net bir tanımı ve sınırı olmadığından, genetik ayrımcılıkla ilgili yasaların etkinliği tam olamamaktadır. Bu nedenle genetik hastalığa sahip olanlar, hastalık taşıyıcıları, genetik olmayan hastalığa sahip olanlar ve engelliler açısından ayrımcılığa son vermek için düzenleyici yasal yaptırımların ötesinde, derin kültürel değişimler gerekmektedir (118-120).

2.6.3. Genetik Danışma

Genetik bilgilendirme, hastanın kendisine ve/veya dördüncü dereceden akrabalarına kadar uygulanan; genetik test ve bunun sonrasında genetik danışmayı kapsamaktadır. Bu nedenle genetik bilginin, diğer tıbbi bilgilere göre çok özel bir yönü vardır ve testin uygulandığı bireyler dışında, aile bireyleri için de ayrıca önemi bulunmaktadır. Klinik genetikte, bazı kalıtsal kanserlerin yönetiminde genetik testlere başvurulması yaygın hale gelmiştir. Bu testler, danışana özgü kanser gelişme risklerini oraya koyarak danışanın kendi sağlığı ile ilgili bilinçli kararlar vermesini ve tedbirler almasını sağlayabilir. Ancak, kalıtsal hastalığın ailesel yapısı nedeniyle, genetik testler sadece proband için değil aynı zamanda aile fertleri için genetik hastalık riskini ortaya çıkarabilmektedir. Genetik bilginin paylaşılan doğası gereği, test yapılan bireyin gizlilik ihtiyacı ve ailenin genetik risk bilgilerine erişim ihtiyacı arasında bir çatışma olabilir. Bu çatışma, genetik bilginin diğer aile üyelerine açıklanması sürecinin genetik danışman tarafından hassasiyetle

yönetilmesini gerektirir. Genetik danışmanlar, test sonuçlarının ailevi etkilerinin tam olarak farkında oldukları için risk altındaki aile üyelerini belirleyerek danışan ile risk altındaki bireylerin iletişimde arabulucu rolü oynarlar. Bu profesyonel görev, danışan genetik bilgiyi saklamak istediğinde genetik danışman için sıkıntılı bir durum ortaya çıkarmaktadır. Bu gibi durumlarda, danışmanlar etik bir ikileme karşı karşıya kalmaktadırlar: Bir yandan; danışanın tıbbi bilgilerinin gizliliği ve mahremiyetinin korunması görevi vardır, öte yandan danışanın risk altında olan akrabalarına karşı sorumluluğu bulunmaktadır. Araştırmalar, genetik danışmanların test sonuçlarının risk altındaki aile bireylerine iletilmesi konusunda etik sorumluluklarının bilincinde olduğunu göstermektedir. Örneğin Avustralya’da, sağlık için ciddi bir tehdit varsa ve test sonucunun açıklanması bu tehdidi azaltacak ya da önleyecekse, genetik danışmanlar danışanların kişisel tıbbi bilgilerini, belirli şartlarda risk altındaki akrabalara açıklayabilir. Bununla birlikte, bu koşulları sağlayan kanserler nadirdir (ör. Ailesel Adenomatöz Polipozis) ve genetik bilginin paylaşılması sorumluluğu her zaman danışana düşer (121).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

1 Ocak 2013 - 30 Haziran 2019 tarihleri arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne başvuran veya konsültasyon ile yönlendirilen kalıtsal/ailesel meme ve/veya over kanseri ön tanısı olan olguların dosyaları taranmıştır. NCCN kılavuzunda (versiyon 3.2019) belirtilen, kalıtsal/ailesel meme ve/veya over kanserli olgularda *BRCA1/BRCA2* genleri çalışma kriterlerini karşılayan 157 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- ✓ Meme kanseri tanısı almış olması + aşağıdaki kriterlerden en az birini taşıyor olması:
 - ≤45 yaşında meme kanseri tanısı alması
 - 46-50 yaşında meme kanseri tanısı alan bir olguda:
 - Birden fazla primer meme kanseri olması
 - Herhangi bir yaşta meme kanseri tanısı almış en az bir akrabasının olması
 - Herhangi bir yaşta pankreas kanseri tanısı almış en az bir akrabasının olması
 - Herhangi bir yaşta prostat kanseri tanısı almış en az bir akrabasının olması (Gleason≥7)
 - Bilinmeyen ya da sınırlı aile öyküsünün olması
 - ≤60 yaş tanı alanlarda:
 - Triple negatif meme kanseri saptanmış olması
 - Herhangi bir yaşta tanı almış olanlarda:
 - Bir veya daha fazla akrabada ≤50 yaşta meme kanseri tanısı olması

- Bir veya daha fazla akrabada over kanseri olması
 - Bir veya daha fazla erkek akrabada meme kanseri tanısı olması
 - Bir veya daha fazla akrabada metastatik prostat kanseri olması
 - Bir veya daha fazla akrabada pankreas kanseri olması
 - Olguda ve/veya iki veya daha fazla akrabada herhangi bir yaşta meme kanseri tanısı olması
- ✓ Over kanseri tanısı almış olması
 - ✓ Erkek olguda meme kanseri tanısı olması
 - ✓ Yukarıdaki kriterleri karşılamayan bir olgunun, kriterlerden birini karşılayan ≥ 1 birinci veya ikinci derece akrabasının olması (Aile öyküsü)

Birbiriyle akrabalık bağı olan olgulardan sadece probandın genetik analizi dikkate alınmış, istatistiksel verilerde hata olmaması için diğer aile bireyleri çalışmaya dahil edilmemiştir. Genetik analizi germline olarak çalışılmayan, sadece dokudan mutasyon analizi yapılmış olan olgular çalışma kapsamının dışında tutulmuştur. Çalışmanın amacı toplumumuza özgü mutasyon sıklığını belirlemek olduğundan, yabancı uyruklu olgular ve yabancı uyruklu olup sonradan Türk vatandaşlığına geçenler çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2. Yöntem

1 Ocak 2013-30 Haziran 2019 tarihleri arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne herediter meme/over kanseri nedeniyle başvuran veya konsültasyon ile yönlendirilen olgulardan, *BRCA1/BRCA2* genleri sekans analizi yapılanların dosyaları retrospektif olarak taranmış ve NCCN kılavuzu versiyon 3.2019'da belirtilen, *BRCA1/BRCA2* gen analizi kriterlerini karşılayan 157 olgunun dosyaları seçilmiştir. Kriterlere uygun olduğu için seçilen dosyalarda; tanı, tanı yaşı, kanser tipi, tümörün hormon reseptörü özelliği (östrojen reseptörü, progesteron reseptörü, insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 -HER2-), pedigr, genetik test sonuçları değerlendirilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

1 Ocak 2013-30 Haziran 2019 tarihleri arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne herediter meme/over kanseri nedeniyle başvuran veya konsültasyon ile yönlendirilen olgulardan, *BRCA1/BRCA2* genleri dizi analizi yapılanların dosyaları taranarak, retrospektif tanımlayıcı bir çalışma yapılmıştır. Dosya taramasından elde edilen veriler ile, SPSS18 programı kullanılarak, sayı ve yüzde hesaplaması yapılmıştır. Değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikler verilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 157 olgudan 154'ü (%98.1) kadın, üçü (%1.9) erkektir. 114 olguda meme kanseri (%72.6), 10 olguda over kanseri (%6.4), dört olguda meme ve over kanseri (%2.5) tanısı bulunurken, 29 olgu (%18.5) aile öyküsü nedeniyle çalışmaya dahil edilmiştir.

Meme kanseri tanısı alan 111 kadın olgunun yaş ortalaması 40.36, üç erkek olgunun yaş ortalaması 47.66'dır. Over kanseri tanısı alan 10 kadın olgunun yaş ortalaması 45.2'dir.

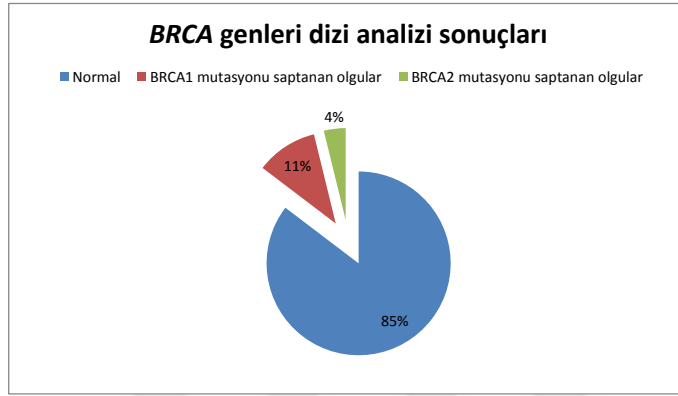
Meme kanseri tanısı olan 114 olgunun 74'ünde (%64.9) tümörün histolojik tipi invaziv duktal karsinom, bir tanesinde filloides tümör (%0.9), bir tanesinde invaziv lobüler karsinom (%0.9) ve üç tanesinde duktal karsinoma in situ (%2.6) olarak belirlenmiştir. Meme kanseri olgularının 35 tanesinde (%30.7) tümörün histolojik tipi bilinmemektedir. Over kanseri saptanan 10 olgunun dokuz tanesinde (%90) tümörün histopatolojisi seröz over karsinomu iken, bir olgunun (%10) tümör histolojisi bilinmemektedir.

Tümörün histopatolojik özelliklerinin bilindiği olgularda, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 (CerbB2) sonuçları tablo IV'te verilmiştir.

Tablo IV. Tümör histopatoloji sonuçları (NA: bilinmiyor)

ER		Frekansı	Yüzdesi
	Pozitif	64	%50
	Negatif	22	%17.2
	NA	42	%32.8
	Toplam	128	%100
PR			
	Pozitif	62	%48.4
	Negatif	24	%18.8
	NA	42	%32.8
	Toplam	128	%100
HER2			
	Pozitif	52	%40.6
	Negatif	24	%18.8
	NA	52	%40.6
	Toplam	128	%100

Çalışmaya dahil edilen 157 olgunun *BRCA1/2* dizi analizinde saptanan mutasyonlar, American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)'in önerdiği gibi beş grupta sınıflanmıştır; pathogenic (patojenik), likely pathogenic (olası patojenik), variant of uncertain significance (VUS – klinik önemi belirsiz varyant), likely benign (olası benign), benign. 17 olguda (%11) *BRCA1*, altı olguda (%4) *BRCA2* dizi analizinde hastalıkla ilişkili patojenik/olası patojenik bir mutasyona rastlanmıştır. *BRCA1/2* genlerindeki patojenik/olası patojenik mutasyonlar Tablo V'te, mutasyon tipleri Şekil 11'de gösterilmiştir. *BRCA* mutasyonu saptanan olguların klinik ve patolojik özellikleri Tablo VI'da verilmiştir.



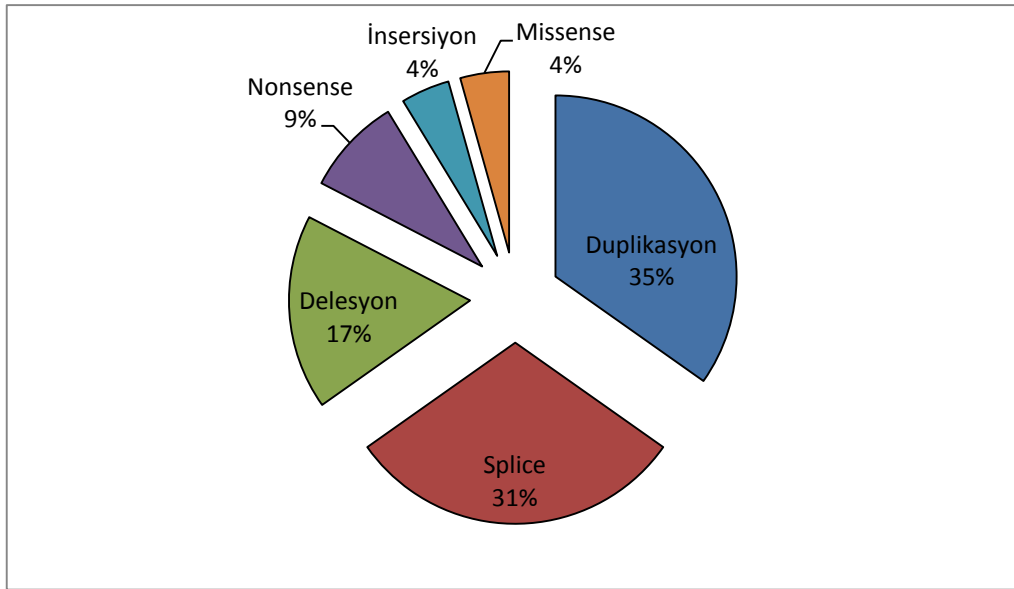
Şekil 10. Çalışmaya dahil edilen olgularda *BRCA* mutasyonu sıklıkları

BRCA1/2'de saptanan patojenik/olası patojenik 23 mutasyonun; sekizi küçük duplikasyon (%35), yedisi splice bölge mutasyonu (%31), dördü küçük delesyon (%17), ikisi nonsense mutasyon (%9), biri missense mutasyon (%4) ve biri küçük insersiyon (%4)'dur (Şekil 11). *BRCA1*'de olgu 7'de saptanan c.4986+5G>A ve olgu 12'de saptanan c.302-3C>G splice bölge değişimleri, *BRCA2*'de olgu 13'te saptanan c.8414_8415insT (p.Leu2805Phefs*7) ve olgu 22'de saptanan c.6468_6469delTC (p.Gln2157Ilefs*18) çerçeve kayması mutasyonları daha önce literatürde yer almayan “novel” varyantlardır. Bu varyantlar; in-siliko analiz programlarıyla değerlendirildiğinde ACMG kriterlerine göre

olası patojenik olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca olgu 7 ve olgu 22'nin aile öyküsü de varyanların olası patojenitesini desteklemektedir.

Tablo V. *BRCA1* ve *BRCA2*'de saptanan hastalık etkeni mutasyonlar

<i>BRCA1</i>	Frekansı	Yüzdesi
c.66dupA (p.Glu23Argfs*18) Heterozigot	4	%17.39
c.135-2 A>G Heterozigot	3	%13.04
c.5266dupC (p.Gln1756Profs*74) Heterozigot	3	%13.04
c.4358-3 A>G Heterozigot	2	%8.69
c.181 T>G (p.Cys61Gly) Heterozigot	1	%4.35
c.302-3 C>G Heterozigot	1	%4.35
c.2611_2612delCC (p.Pro871Valfs*31) Heterozigot	1	%4.35
c.2963 C>A (p.Ser988Ter) Heterozigot	1	%4.35
c.4986+5 G>A Heterozigot	1	%4.35
<i>BRCA2</i>		
c.658_659delGT (p.Val220Ilefs*4) Heterozigot	1	%4.35
c.3751dupA (p.Thr1251Asnfs*14) Heterozigot	1	%4.35
c.6246delA (Glu2082Aspfs*4) Heterozigot	1	%4.35
c.6468_6469delTC (p.Gln2157Ilefs*18) Heterozigot	1	%4.35
c.8414_8415insT (p.Leu2805Phefs*7) Heterozigot	1	%4.35
c.9318 G>A (p.Trp3106Ter) Heterozigot	1	%4.35
Toplam	23	%100



Şekil 11. Saptanan mutasyon türleri

Tablo VI. *BRCA* mutasyonu saptanan olguların klinik ve patolojik özellikleri
(na: bilinmiyor, N: normal, IDK: İntraduktal Karsinom, Ca: kanser)

	Tanı Yaşı	Tanı	Tümör Tipi	ER	PR	HER2	<i>BRCA1</i> mutasyonu	<i>BRCA2</i> mutasyonu
Olgu 1	18	Meme Ca	na	na	na	na	missense	N
Olgu 2	29	Meme Ca	na	na	na	na	N	nonsense
Olgu 3	44	Meme Ca	na	na	na	na	N	delesyon
Olgu 4	46	Over Ca	Seröz karsinom	pozitif	pozitif	-	duplikasyon	N
Olgu 5	-	Aile Öyküsü	-	-	-	-	splice	N
Olgu 6	42	Meme Ca	IDK	pozitif	pozitif	pozitif	nonsense	N
Olgu 7	48	Meme Ca	IDK	pozitif	pozitif	pozitif	splice	N
Olgu 8	39	Meme Ca	Medüller Ca	negatif	negatif	negatif	duplikasyon	N
Olgu 9	52	Over + Meme Ca	na	na	na	na	splice	N
Olgu 10	43	Over Ca	Seröz karsinom	na	na	na	splice	N
Olgu 11	55	Meme Ca	na	na	na	na	delesyon	N
Olgu 12	34	Meme Ca	IDK	pozitif	pozitif	pozitif	splice	N
Olgu 13	39	Meme Ca	IDK	pozitif	pozitif	pozitif	N	insersiyon
Olgu 14	41	Over + Meme Ca	IDK	negatif	negatif	pozitif	duplikasyon	N
Olgu 15	48	Meme Ca	IDK	pozitif	pozitif	negatif	duplikasyon	N
Olgu 16	36	Meme Ca	na	na	na	na	duplikasyon	N
Olgu 17	27	Meme Ca	IDK	negatif	pozitif	negatif	duplikasyon	N
Olgu 18	46	Meme Ca	na	na	na	na	splice	N
Olgu 19	49	Over Ca	Seröz karsinom	pozitif	negatif	-	duplikasyon	N
Olgu 20	38	Over + Meme Ca	na	na	na	na	N	delesyon
Olgu 21	50	Meme Ca	IDK	negatif	negatif	pozitif	splice	N
Olgu 22	44	Meme Ca	na	na	na	na	N	delesyon
Olgu 23	45	Meme Ca	na	na	na	na	N	duplikasyon

5. TARTIŞMA

Tarihsel bilgiler ışığında, kanserin bilinirliği oldukça eski zamanlara dayanır. Kanser, ilk tanımlandığı zamanlardan bu yana, ağır klinikle seyreden, tedavisi zor ve ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir ve çağımızda toplumu sosyal ve maddi yönden olumsuz yönde en çok etkileyen hastalıklarından biridir. Giderek artan sıklığı ise ciddi bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. GLOBOCAN 2018 (28) verilerine göre; Dünya genelinde 18.1 milyon yeni kanser vakası ve 9.6 milyon kanser nedeniyle ölüm vakası bildirilmiştir. Toplumda her beş kişiden birinin 75 yaşından önce hayatının bir döneminde bu hastalıkla karşılaşabileceği gerçeği ve bu kişilerin %10'unun kanser nedeni ile ölmesinin beklenmesi de kanserin önemini daha da arttırmaktadır. Meme kanserine baktığımızda ise, %24.2 sıklıkla Dünya genelinde kadınlarda en fazla görülen kanser olup, %15'lik ölüm oranıyla da kadınlarda kanser kaynaklı ölümlerin en başında gelmektedir.

GLOBOCAN 2018 (28) Türkiye istatistiklerine göre; 210.537 yeni kanser vakası kayda geçerken, 116.710 kişi kanser kaynaklı nedenlerle ölmüştür. Yeni tanı alan kanser olguları dikkate alındığında, erkeklerde en sık görülen kanser %24.7 ile akciğer, ikinci %14.6 ile prostat ve üçüncü %9.7 ile kolorektal kanserlerdir. Kadınlarda; %24.4 ile meme ilk sırada gelirken, bunu %11.5 ile tiroid ve %9.3 ile kolorektal kanserler takip etmektedir. Her iki cinsiyeti birlikte değerlendirdiğimizde; akciğer %16.5 ile birinci, meme %10.6 ile ikinci ve kolorektal %9.5 ile üçüncü sıradadır.

BRCA1 veya *BRCA2* mutasyonu taşıyan olgularda; 70 yaşına kadar meme kanseri gelişme riski yaklaşık %45-87, *BRCA1* mutasyonu taşıyanlarda over kanseri gelişme riski %45-60 ve *BRCA2* mutasyonu taşıyanlarda over kanseri gelişme riski %11-35'tir (122). *BRCA* mutasyonu taşıyıcılarında kanserli meme dokusunun en sık görülen histopatolojisi invaziv duktal karsinomdur (IDK) ve IDK sadece kalıtsal değil, sporadik meme kanserinde de en sık görülen subtiptir. Öte yandan, *BRCA* mutasyonu taşıyıcılarında pre-invaziv lezyonlar olan duktal karsinoma in situ (DCIS) ve lobüler karsinoma in situ (LCIS) çok fazla bildirilmemiştir, ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda *BRCA* mutasyonu taşıyıcılarına uygulanan profilaktik mastektomi sonrası incelenen meme dokusunda premalign lezyonlar tespit edilmiştir. Araştırmalar, *BRCA1* mutasyon taşıyıcılarında, triple negatif meme kanseri görülme ihtimalinin taşıyıcı olmayan hastalardan daha fazla

olduğunu göstermiştir. Triple negatif terimi; östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) negatif olan tümörler için kullanılır ve bu histopatolojik özelliği taşıyan tümörler daha yüksek nükleer grade ve daha yüksek proliferasyon hızıyla diğer alt tiplerden daha agresif olma eğilimindedirler. *BRCA2* mutasyonu taşıyıcıları ise, taşıyıcı olmayan hastalarla benzer tümör patolojisini göstermektedir (122). Bizim çalışmamızda; *BRCA1*'de mutasyon tespit edilen 17 olgudan sadece sekiz tanesinin tümör histolojisi biliniyordu ve bunlardan sadece bir tanesi triple negatifti. Bu oran literatür bilgisi ile uyuşmamaktadır. Bunun nedeni olarak; tümör histolojisini bilmediğimiz olguların olması, *BRCA1* mutasyonu taşıyan yeterli sayıda olgumuzun olmaması, tümör histolojisi sonuçlarının yanlış olması ihtimalleri düşünülmelidir. Sekiz olgunun tamamında tümör tipi intraduktal karsinom olarak raporlanmıştı. Bu sonuç, literatür bilgisi ile uyumludur.

Meme ve over kanseri ailelerinde saptanan *BRCA1/2* mutasyonlarının çoğu, kısa ve işlevsel olmayan *BRCA1/2* proteini üretimine yol açar; bunun *BRCA1/2* mutasyon taşıyıcılarında görülen meme kanserlerinin daha agresif seyretmesinin nedenini açıklayabileceği düşünülmektedir. *BRCA1/2* genlerinde en yaygın görülen mutasyon tipleri; çerçeve kaymasına neden olan küçük delesyon ve insersiyonlar, anlamsız mutasyonlar ve splice bölgesi mutasyonlarıdır. Heterozigosite kaybı (LOH) da *BRCA* ile ilişkili meme kanserlerinde yüksek oranda gösterilmiştir. Bu mutasyonlar, multipleks ligasyona bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA) yöntemi kullanılarak belirlenebilmektedir (122). Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak en sık görülen mutasyonlar; küçük delesyon, duplikasyon ve insersiyonlar, splice bölgesi mutasyonları ve anlamsız mutasyonlardır.

Over kanseri Dünya genelinde en sık ölüme neden olan jinekolojik kökenli kanserdir. Diğer jinekolojik kanserlerden farklı olarak tanı yaşı çok erken olabilir. Kadınlarda görülen kanserlerin %2.5'ini, kanserden ölümlerin ise %5'ini oluşturur. Ölüm oranının yüksek olmasının ana nedeni, tanı anında her 5 kadından 4'ünde hastalığın çok ileri evrede olmasıdır. Bir kadının hayatı boyunca over kanserine yakalanma riski ise %1.3'tür. Over kanserinin %90'ı epitelyal tiptir, epitelyal over kanseri içerisindeki en yaygın alt grup da seröz karsinomadır. Over kanserleri içinde germ hücreli tümörler %3, seks kord-stromal tümörler de yaklaşık %2'lik bir paya sahiptir. Epitelyal over

kanserlerinin diğer histolojik tiplere göre daha saldırgan seyrettiği bilinmektedir. Over kanseri için en kuvvetli risk faktörü ailede meme veya over kanseri öyküsü olmasıdır. Birinci derece akrabasında over kanseri öyküsü olan bir olguda invaziv epitelyal over kanseri riski %50 artarken, birinci derece akrabasında meme kanseri öyküsü olan bir olguda bu risk %10 artar. Epitelyal over kanserinin yaklaşık %18'inin, özellikle yüksek dereceli seröz karsinomaların, *BRCA1* ve *BRCA2* ile kalıtılan ve yüksek risk oluşturan mutasyonlar nedeniyle olduğu tahmin edilmektedir. *BRCA1* ve *BRCA2*'deki mutasyonlar, ailede hastalık öyküsü olan kadınlarda over kanseri olgularının yaklaşık %40'ını oluşturur. Epitelyal over kanseri için nadir görülen ve ılımlı penetrasyon gösteren gen mutasyonları, *BRIP1*, *RAD51C* ve *RAD51D*'de karşımıza çıkmaktadır. Epitelyal olmayan over kanserleri genellikle *BRCA1/2* gen mutasyonları ile ilişkilendirilmez; yetişkin tipi granüloza hücreli tümörler *FOXL2* ile, Sertoli-Leydig hücreli tümörler *DICER1* ile ilişkilendirilmiştir. Tanımlanmış genetik mutasyonların yüksek prevalansı nedeniyle NCCN over kanseri teşhisi konan tüm kadınlar için genetik test önermektedir (123). Bizim çalışmamızda; over kanseri tanısı alan 10 olguya, ilk tanısı over kanseri olduğu için over ve meme kanseri tanısı olan dört olgu da dahil edildiğinde; tanı yaşı ortalama 45.5'tur, tümör histolojisi bilinen 10 olgunun hepsinde tümör tipi seröz karsinomdur. Bu bulgular literatürle uyumludur.

Alemar ve arkadaşlarının (124) Güney Brezilya'da *BRCA* çalışma kriterlerine uygun olarak seçtikleri 418 kalıtsal meme/over kanseri olgusu ile yaptıkları çalışmada, 80 olguda (%19.1), yedi tanesi daha önce bildirilmemiş olan 83 patojenik/olası patojenik mutasyon saptanmıştır. 49 olguda *BRCA1*, 28 olguda *BRCA2*, iki olguda hem *BRCA1* hem *BRCA2*, bir olguda iki farklı *BRCA2* mutasyonu saptanmıştır. Saptanan 83 mutasyon içinde *BRCA1* mutasyon sıklığı %61.4 olarak belirlenmiştir. 340 olguya MLPA ile delesyon/duplikasyon analizi yapılmış, sadece dört olguda mutasyon saptanmıştır. Sadece kanser öyküsü olanlardaki *BRCA* mutasyon sıklığı %20, aile öyküsü nedeniyle çalışmaya alınanlar hesaplamaya dahil edilirse mutasyon sıklığı %13 olarak bulunmuştur. Meme kanseri olanlarda mutasyon sıklığı %37.8, over kanseri olanlarda %19.7'dir.

Apossos ve arkadaşlarının (125) 898 Yunan ailesinde yaptığı çalışmada; değerlendirilen 889 kadın ve dokuz erkek olgunun yaş ortalaması 45, mutasyon oranı %12.9 (116 mutasyon) olarak saptanmıştır. Bunların %9'u daha önce literatürde yer

almayan mutasyonlar, %14.7'si de (17 mutasyon) büyük genomik yeniden düzenlemelerdir ve büyük genomik yeniden düzenlemeleri saptamak için yapılan delesyon/duplikasyon analizi, dizi analizi sonucunda mutasyon saptanmayan olgulara uygulanmıştır. Hastalık yapıcı mutasyonların 82'si (%70.7) *BRCA1*'de, 34'ü (%29.3) *BRCA2*'de yer almaktadır. 17 olguda saptanan delesyon/duplikasyonların ise, 15'i (%18.3) *BRCA1*'de, ikisi (%5.88) *BRCA2*'de yer almaktadır.

Mutasyonların belirlenmesi için yapılan erken dönem çalışmalarda sadece nokta mutasyonlar veya küçük delesyon/duplikasyonlar taranmıştır fakat son çalışmalarda bazı popülasyonlarda her iki gendeki mutasyonların %10-30'unu büyük genomik yeniden düzenlemelerin oluşturduğu gösterilmiştir. Daha spesifik olarak; Yunan, İtalyan ve Hollandalı ailesel meme/over kanseri ailelerindeki çalışmalarda, *BRCA1*'deki delesyon/duplikasyon sıklığının sırasıyla %17, %23 ve %27-36 olduğu gösterilirken, Danimarka popülasyonunda bu oran sadece %3.8 olarak bulunmuştur. Delesyon/duplikasyonların *BRCA2* genini daha az etkilediği bilinmektedir ve çalışılan popülasyona bağlı olarak bu oranın %0-11 arasında değiştiği gösterilmiştir (125).

Konecny ve arkadaşlarının (126) 585 Slovak herediter meme/over kanserli olgu ile yaptığı çalışmada; dizi analizinde 100 olguda (%17.1) mutasyon tespit edilmiştir (mutasyonların %88'i *BRCA1*'de ve %12'si *BRCA2*'de). *BRCA1*'deki c.80+4del4, c.1938_1947del10 ve c.1166delG ve *BRCA2*'deki c.6589delA mutasyonları sadece Slovak toplumunda tanımlanmıştır. MLPA analizi ile üç ailede iki büyük genomik yeniden düzenleme tespit edilmiştir. Bunlar; *BRCA1*'de 21 ve 22. ekzonların silinmesi ve çok nadir bir değişiklik olan *BRCA1*'in tamamen silinmesidir. Ayrıca; 27 farklı önemi belirsiz varyant (dördü novel mutasyon) ve 14 farklı tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tespit edilmiştir. *BRCA1* mutasyonu taşıyan olgularda tanı yaşı ortalama 42.7, *BRCA2* mutasyonu taşıyan olgularda tanı yaşı ortalama 46 olarak hesaplanmıştır.

Arjantin'de Solano ve arkadaşlarının (127) yaptığı çalışmada; ailesinde ve/veya kendisinde meme/over kanseri öyküsü olan 940 proband değerlendirilmiş, beşi delesyon/duplikasyon ve 22'si novel mutasyon olmak üzere, 179 patojenik mutasyon (%19.04) tespit edilmiştir. Bunların 105'i *BRCA1*'de, 74'ü *BRCA2*'dedir. Çalışmada ≤ 40 yaş tanı alan bir, >40 yaş tanı alan 12 ve aile öyküsünden dolayı çalışmaya alınan bir kişi olmak üzere toplamda 13 erkek olgu bulunmaktadır. Bunlardan birinde *BRCA1*'de, üçünde

BRCA2'de mutasyon saptanmıştır. Saptanan 22 novel mutasyonun sekizi *BRCA1*'de, 14 tanesi *BRCA2*'dedir.

Bizim çalışmamızda; Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne Ocak 2013-Haziran 2019 arasında başvuran/konsulte edilen ailesel/kalıtsal meme/over kanseri olgularının dosyaları retrospektif olarak taranarak, NCCN versiyon 3.2019'a göre *BRCA1/2* analizi kriterlerini karşılayan 157 olgu çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın amacı toplumumuza özgü *BRCA1/2* mutasyonlarını ve mutasyon sıklıklarını belirlemektir.

Farklı popülasyonlar ve farklı etnik gruplarda, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde görülen patojenik mutasyonların sıklığı değişiklik gösterir. *BRCA1/BRCA2* mutasyonlarına bağlı herediter meme kanserinin en sık görüldüğü toplum olan Askenazi Yahudileri'nde *BRCA1*'de en sık 5382insC ve 185delAG; *BRCA2*'de en sık 6174delT mutasyonları görülmüştür (50,51). Fransız kökenli Kanada'lı olgularda *BRCA1* C4446T mutasyonu en sık, *BRCA2* 8765delAG mutasyonu da ikinci sıklıkta tespit edilmiştir (52). Belçikalı olgularla yapılan bir çalışmada *BRCA1* IVS5+3A>G en sık tespit edilen mutasyon olmuştur (53). Finlandiya'da yapılan bir çalışmada *BRCA2* T8555G and 999del5 mutasyonları o toplumda sık görülen ("founder") mutasyon olarak saptanmıştır (54). Polonya'da yapılan bir araştırmada *BRCA1* 5382insC, C61G ve 4153delA mutasyonlarına sık rastlanmıştır (55). Türk toplumunda yapılan mutasyon analiz çalışmalarının ilki Yazıcı ve arkadaşlarının (57) 2000 yılında yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada; kendisinde ve ailesinde meme ve/veya over kanseri öyküsü olan 53 olgu ve aile öyküsü olmadan elli yaş altı meme kanseri tanısı alan 52 olgu değerlendirilmiş, bu olgularda *BRCA1* ve *BRCA2*'de insidansı yüksek olan spesifik bir mutasyon saptanmamıştır. Manguoğlu ve arkadaşlarının (58) 2003 yılında yaptıkları çalışmada ise; ailesel meme kanseri olan 23 olgu (bir olguda bilateral meme kanseri), erken başlangıçlı meme kanseri olan 18 olgu, 10 erkek meme kanseri olgusu, ailesel over kanseri olan bir olgu, meme ve over kanseri birlikteliği olan bir olgu ve 30 sporadik meme kanseri olgusu olmak üzere toplamda 83 olgu değerlendirilmiştir. Bu çalışmada da *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde belirgin insidans artışı gösteren bir mutasyon saptanmamıştır. Purcu ve arkadaşlarının (59) 2010 yılında yaptığı çalışmada, kendisinde ve birinci derece akrabalarında meme veya over kanseri hikayesi olan 25 kadın olgu ve kendisinde kanser hikayesi olmayıp birinci derece akrabalarında

meme veya over kanseri öyküsü olan 25 kadın olgu, Dünya’da en sık görülen mutasyonlar olan *BRCA1* 5382insC ve 185delAG; *BRCA2* 6174delT açısından değerlendirilmiş, dördü aynı aileden olmak üzere beş hastada *BRCA1* geninde 5382insC mutasyonu saptanmıştır. Cecener ve arkadaşlarının (128) meme kanseri tanısı alan 603 olgu ile yaptığı çalışmada; 15 olguda *BRCA1*, 15 olguda *BRCA2* mutasyonu saptanmıştır. *BRCA1*’de beş olguda saptanan c.5266dupC ve *BRCA2*’de dört olguda saptanan c.9097dupA ve üç olguda saptanan c.8940delA en sık karşılaşılan mutasyonlar olmuştur. Bizim çalışmamızda ise; *BRCA1*’deki en sık mutasyonlar 17 olgunun dördünde saptanan c.66dupA, 17 olgunun üçer tanesinde saptanan c.135-2 A>G ve c.5266dupC olmuştur. Dünya genelinde en sık bildirilen *BRCA1* 5382insC ve 185delAG mutasyonlarına bizim örneklemimizde rastlanmamıştır. *BRCA2*’de ise, saptadığımız altı patojenik mutasyon arasında sıklığı artmış bir değişim bulunmamaktadır. Dünya genelinde veya Dünya’nın farklı bölgelerinde sık rastlanan mutasyonlar ile toplumumuzda rastlanan mutasyonların farklılık göstermesi, etnik köken ve bölgesel farklılıklar ile açıklanabilir. Ayrıca çalışmaya dahil edilen olgu sayısı arttırıldığında, toplumumuza özgü mutasyon sıklıklarında da farklılıklar görülebilir. Literatürde *BRCA1* mutasyonu taşıyan kadınlar için yaklaşık 30-40 yaşına ve *BRCA2* mutasyonu taşıyıcıları için yaklaşık 40-50 yaşına kadar meme kanseri riski hızlı bir şekilde arttığı, bu yaşlardan sonra, meme kanseri oranının her iki mutasyon için yaklaşık 80 yaşına kadar stabil kaldığı bildirilmektedir. Cecener ve arkadaşlarının (128) çalışmasında, *BRCA1* mutasyon taşıyıcılarında tanı yaşı ortalama 46.55 ve *BRCA2* mutasyon taşıyıcılarında tanı yaşı ortalama 44.17’dir. Bizim çalışmamızda *BRCA1* mutasyonu taşıyan 17 olgunun 16’sının yaş ortalaması 42.13 bulunmuş, *BRCA1* mutasyonu taşıyan bir olgu aile öyküsü nedeniyle çalışmaya dahil edildiğinden ve kanser tanısı olmadığından bu ortalamaya dahil edilememiştir. Çalışmamızda *BRCA2* mutasyonu taşıyan olguların tanı yaşı ortalaması ise 39.83’dir. İki çalışma arasındaki bu fark, çalışmaya dahil edilme kriterleri aynı olmadığı için ve örneklem büyüklükleri arasında belirgin fark olduğu için ortaya çıkmış olabilir.

6. SONUÇ

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne başvuran/konsulte edilen kalıtsal/ailesel meme/over kanseri ön tanılı olgular ile yaptığımız çalışmada; olguların dosyaları retrospektif olarak incelenmiş ve *BRCA1/2* genleri dizi analizi sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmanın ana amacı toplumumuza özgü *BRCA1/2* mutasyonlarını ve mutasyon sıklıklarını belirlemektir.

Çalışmaya dahil edilen 157 olgunun tamamında, *BRCA1* ve *BRCA2* genleri dizi analizi yöntemi ile çalışılmıştı. 17 olguda (%11) *BRCA1*, altı olguda (%4) *BRCA2*'de olmak üzere toplam 23 olguda hastalıkla ilişkili patojenik/olası patojenik bir mutasyona rastlanmıştır. *BRCA1* ve *BRCA2*'de saptanan patojenik/olası patojenik 23 mutasyonun; sekizi küçük duplikasyon (%35), yedisi splice bölge mutasyonu (%31), dördü küçük delesyon (%17), ikisi anlamsız (nonsense) mutasyon (%9), biri yanlış anlamlı (missense) mutasyon (%4) ve biri küçük insersiyon (%4)'dur.

BRCA1'de mutasyon tespit edilen 17 olgudan sekiz tanesinin tümör histolojisi biliniyordu ve bunlardan sadece bir tanesi triple negatifti. Bu oran literatür bilgisi ile uyuşmamaktadır. Bunun nedeni olarak; tümör histolojisini bilmediğimiz olguların olması, *BRCA1* mutasyonu taşıyan yeterli sayıda olgumuzun olmaması, tümör histolojisi sonuçlarının yanlış olması ihtimalleri düşünülmelidir. Olgu sayısı arttırılarak değerlendirme yeniden yapılabilir ve tümör histolojisi sonuçları farklı bir merkezde tekrar değerlendirilebilir.

Çalışmamızda yer alan olgularda *BRCA1/2* genlerinde saptanan nokta mutasyon ve küçük delesyon/duplikasyon/insersiyon sıklığı literatürle uyumlu bulunmuştur. Ayrıca daha önce literatürde bildirilmemiş dört yeni mutasyon saptanmıştır.

Çalışmamızdaki bazı sonuçlar literatürle örtüşürken bazıları ise literatürle uyuşmamaktadır. Bu durumun farklı nedenleri vardır. Çalışmamızdaki olgu sayısı 157'dir. Literatürde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında olgu sayımız oldukça azdır. Ayrıca olguların dosya bilgilerinde eksiklikler olması da bazı parametreleri değerlendirmeyi güçleştirmiştir.

7. ÖZET

KALITSAL/AİLESEL MEME VE/VEYA OVER KANSERİ TANISI ALMIŞ OLGULARDA *BRCA1/BRCA2* GEN MUTASYONLARININ RETROSPEKTİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Kalıtsal/ailesel meme/over kanseri genetiği etyolojisinde *BRCA1/BRCA2* gen mutasyoları %5-10'luk mutasyon oranı ile en önemli yeri tutar. Genetik yatkınlık otozomal dominant kalıtılır ve hastalık yapıcı mutasyonlar, mutasyonu taşıyan bireyler için 70 yaşından önce %67, 80 yaşından önce %80 hastalığa yakalanma riski ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmada; Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne başvuran veya konsulte edilen kalıtsal/ailesel meme ve/veya over kanseri ön tanılı olguların dosyaları retrospektif olarak incelenmiş, NCCN kılavuzu versiyon 3.2019'a göre *BRCA1/2* genleri analiz endikasyonu taşıyan olgular seçilmiş ve bu olguların sekans analizi sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmanın ana amacı toplumumuza özgü *BRCA1/2* mutasyonlarını ve mutasyon sıklıklarını belirlemektir.

Çalışmaya meme ve/veya over kanseri tanısı ve aile öyküsü olan 157 olgu dahil edildi. Sanger dizi analizi sonuçları incelendiğinde; 17 olguda *BRCA1*, altı olguda *BRCA2* geninde mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonların 19'u hastalık yapıcı olduğu bilinen mutasyonlar iken, dördü daha önce literatürde yer almamış novel mutasyonlardı.

Sanger dizileme yöntemi ile *BRCA1/2* gen analizi sonuçları değerlendirildiğinde, patojenik mutasyon taşıyan olguların oranı literatürle uyumlu bulunmuştur. Ayrıca literatürde daha önce yer almayan dört yeni mutasyon tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ailesel, Hereditör, Meme Kanseri, Over Kanseri, *BRCA1*, *BRCA2*

8. SUMMARY

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF *BRCA1/BRCA2* GENE MUTATIONS IN PATIENTS WITH HEREDITARY/FAMILIAL BREAST AND/OR OVARIAN CANCER

BRCA1/BRCA2 gene mutations have the most important role in the etiology of hereditary/familial breast/ovarian cancer syndrome (HBOC) with a mutation rate of 5-10%. Genetic predisposition is inherited as autosomal dominant, and disease causing mutations are associated with a 67% risk of disease under the age of 70 and 80% risk under the age of 80. In this study; patients with hereditary/familial breast and/or ovarian cancer who were admitted or referred to the Medical Genetics Outpatient Clinic of Aydın Adnan Menderes University Faculty of Medicine were reviewed retrospectively with their *BRCA1/2* sequence analysis results. The main aim of the study was to determine specific *BRCA1/2* mutations and mutation frequencies in our society.

157 patients with breast and/or ovarian cancer and family history of HBOC were included in the study. Sequence analysis showed that 17 cases were due to *BRCA1* gene mutations and six cases were due to *BRCA2* gene mutations. 19 of these mutations were known to be causative, while four were novel.

When the results of *BRCA1/2* gene analysis by Sanger sequencing method were evaluated, the rate of cases with pathogenic mutation was found to be consistent with the literature. In addition, four new mutations that have not been previously reported in the literature and thought to be causative have also been identified.

Key Words: Familial, Hereditary, Breast Cancer, Ovarian Cancer, *BRCA1*, *BRCA2*

9. KAYNAKLAR

1. Baykara O. Current Modalities in Treatment of Cancer. *Balıkesır Heal Sci J.* 2016. doi:10.5505/bsbd.2016.93823
2. Hajdu SI. Landmarks in History of Cancer, Part 1. *Cancer.* 2011;8 (805):1097-1102. doi:10.1002/cncr.25553
3. Atici E. Tip tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkol Derg.* 2007.
4. Kushnick T. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. *JAMA J Am Med Assoc.* 1992. doi:10.1001/jama.1992.03480150121052
5. Charles J. Sherr. Cancer Cell Cycles. *Science (80-).* 1996;274 (5293):1672-1677.
6. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11 (2):85-95. doi:10.1038/nrc2981
7. Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet.* 2003. doi:10.1038/ng1107
8. Ferreira HJ, Esteller M. Non-coding RNAs, epigenetics, and cancer: tying it all together. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37 (1):55-73. doi:10.1007/s10555-017-9715-8
9. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000. doi:10.1016/S0092-8674 (00)81683-9
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
11. Gariglio P. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Mol Oncol Princ Recent Adv.* 2012:64-82. doi:10.2174/978160805016111201010064
12. Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ.* 2009;16 (1):87-93. doi:10.1038/cdd.2008.131
13. Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science (80-).* 2010;330 (6009):1340-1344. doi:10.1126/science.1193494

14. Sherr CJ. Principles of Tumor Suppression. *Cell*. 2004. doi:10.1016/S0092-8674(03)01075-4
15. Gamudi D, Blundell R. Tumor suppressor genes. *Res J Med Sci*. 2010. doi:10.3923/rjmsci.2010.280.284
16. Oliveira AM, Ross JS, Fletcher JA. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol*. 2005. doi:10.1309/5XW3L8LU445QWGQR
17. Zhang J, Fackenthal JD. Searching for large genomic rearrangements of the BRCA1 gene in a Nigerian population. 2010:573-577. doi:10.1007/s10549-010-1006-9
18. Hnisz D, Weintraub AS, Day DS, et al. Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. *Science* (80-). 2016;351 (6280):1454-1458. doi:10.1126/science.aad9024
19. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008. doi:10.1056/NEJMra072367
20. Hicks K, Friedman BA, Rosner MR. Basic fibroblast-like growth factor is present in the conditioned medium of simian sarcoma virus transformed NRK cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164 (3):1323-1330. doi:10.1016/0006-291X(89)91814-7
21. Papadakis G, Gizeli E. In Silico Search of DNA Drugs Targeting Oncogenes. 2012;9 (6):1826-1830.
22. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723
23. Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları DNA Damage and Repair Mechanisms. *Türk Klin Biyokim Derg*. 2009;7 (2):61-70.
24. Teruaki I, Wilson DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 2013;12 (8):620-636. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015.
25. Kulaksız G, Sancar A. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokim Derg*. 2007;32 (3):104-111.
26. Elçin Latife K, Tekedereli İ. Dna Onarım Mekanizmaları. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi / Balıkesir Heal Sci J*. 2015:169-177.

27. Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). *Oncol Rep.* 2013. doi:10.3892/or.2013.2541
28. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019. doi:10.1002/ijc.31937
29. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer.* 2018. doi:10.1016/j.ejca.2018.07.005
30. Özmen V, Fidaner C, Aksaz E, et al. TÜRKİYE’DE MEME KANSERİ ERKEN TANI VE TARAMA PROGRAMLARININ HAZIRLANMASI "Sağlık Bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu". *J Breast Heal.* 2009;5 (3):125-134.
31. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2018, Turkey. 2018;703:2018-2019. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>.
32. Bogdanova N, Helbig S, Dörk T. Hereditary breast cancer: Ever more pieces to the polygenic puzzle. *Hered Cancer Clin Pract.* 2013. doi:10.1186/1897-4287-11-12
33. Koçak S, Çelik L, Özbaş S, Sak SD, Tükün A, Yalçın B. Meme Kanserinde Risk Faktörleri Riski Değerlendirilmesi ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu. *J Breast Heal.* 2011;7 (2):47-67.
34. Kroeger PT, Drapkin R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2017;29 (1):26-34. doi:10.1097/GCO.0000000000000340
35. Devouassoux-Shisheboran M, Genestie C. Pathobiology of ovarian carcinomas. *Chin J Cancer.* 2015;34 (1):50-55. doi:10.5732/cjc.014.10273
36. Mallen AR, Townsend MK, Tworoger SS. Risk Factors for Ovarian Carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018;32 (6):891-902. doi:10.1016/j.hoc.2018.07.002
37. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Genereviews.* September 4, 1998; Last Update: December 15, 2016.
38. Edlich RF, Catherine L, Wack CA, Chase ME, Kant Y. Breast Cancer and Ovarian Cancer Genetics : An Update. 2008;27 (4):245-256.

39. Hoang LN, Gilks BC. Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome; Moving Beyond BRCA1 and BRCA2. *Adv Anat Pathol* 2017;00:000–000
40. Mathews LA, Hurt EM, Cabarcas SM. DNA Repair of Cancer Stem Cells.; 2014. doi:10.1007/978-94-007-4590-2
41. Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol Cell*. 2012. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.029
42. Stoppa-Lyonnet D. The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: Where do we go from here? *Eur J Hum Genet*. 2016.
43. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovskaya A. BRCA genes: The role in genome stability, cancer stemness and therapy resistance. *J Cancer*. 2019;10 (9):2109-2127.
44. Symington LS, Gautier J. Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. *Annu Rev Genet*. 2011. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132435
45. Scully R, Chen J, Plug A, et al. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*. 1997. doi:10.1016/S0092-8674 (00)81847-4
46. Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004;9 (3):221-236.doi:10.1023/B:JOMG.0000048770.90334.3b
47. Bhaskaran SP, Chandratre K, Gupta H, et al. Germline variation in BRCA1/2 is highly ethnic-specific: Evidence from over 30,000 Chinese hereditary breast and ovarian cancer patients. *Int J Cancer*. 2019;145 (4):962-973. doi:10.1002/ijc.32176
48. Biglia N, Sgandurra P, Bounous V.E, Maggiorotto F, Piva E, Pivetta E, Ponzzone R, Pasini B. Ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers: analysis of prognostic factors and survival. *Ecancer Medical Science*. 2016, 10:639. doi: 10.3332/ecancer.2016.639
49. Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. *Biomed Res Int*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/928562
50. Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, et al. The Founder Mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 61 74delT in BRCA2 Appear in 60 % of Ovarian Cancer and 30 % of Early-Onset Breast Cancer Patients among Ashkenazi Women. 1997:505-514.

51. Levy-lahad E, Catane R, Eisenberg S, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 Mutations in Ashkenazi Jews in Israel : Frequency and Differential Penetrance in Ovarian Cancer and in Breast-Ovarian Cancer Families. 1997:1059-1067.
52. Tonin PN, Futreal PA, Morgan K, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 Mutations in French Canadian Breast and Ovarian Cancer Families. 1998:1341-1351.
53. Claes K, Machackova E, De Vos X, Poppe B, De Paepe A, Messiaen L. Mutation analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in the Belgian patient population and identification of a Belgian founder mutation BRCA1 IVS5 + 3 A > G. Dis Markers. 1999. doi:10.1155/1999/241046
54. Pääkkönen K, Sauramo S, Sarantaus L, et al. Involvement of BRCA1 and BRCA2 in Breast Cancer in a Western Finnish. 2001;246 (July 2000):239-246.
55. Byrski T, Huzarski T, Jakubowska A, et al. Founder Mutations in the BRCA1 Gene in Polish Families with Breast-Ovarian Cancer. 2000:1963-1968.
56. Hall MJ, Reid JE, Burbidge LA, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. Cancer. 2009. doi:10.1002/cncr.24200
57. Yazici H, Bitisik O, Akisik E, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish breast / ovarian families and young breast cancer patients. 2000;83:737-742.
58. Manguoglu AE, Lüleci G, Özçelik T, Çolak T, Schayek H. Germline Mutations in the BRCA1 and BRCA2 Genes in Turkish Breast/Ovarian Cancer Patients. 2003;590 (September 2002):1-7. doi:10.1002/humu.9119
59. Purcu DU, Karaca B, Kapkac M, Ozdemir N. International Journal of Hematology and Oncology High-Resolution Melting Analysis for Screening of Turkish Germline Mutations in BRCA1 and BRCA2. 2010:235-240.
60. Cancer Facts & Figures. 2013.
61. Riley BD, Culver JO, Skrzynia C, et al. Essential Elements of Genetic Cancer Risk Assessment , Counseling , and Testing : Updated Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. 2012:151-161. doi:10.1007/s10897-011-9462-x

62. Hall MJ, Forman AD, Pilarski R, Wiesner G, Giri VN. Gene Panel Testing for Inherited Cancer. 2014;12 (9):1339-1346.
63. Genetic / Familial High-Risk Assessment : Breast and Ovarian. 2019.
64. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
65. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977. doi:10.1073/pnas.74.2.560
66. Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ x174 DNA. Nature. 1977. doi:10.1038/265687a0
67. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature. 1986. doi:10.1038/321674a0
68. Marziali A, Akeson M. New DNA Sequencing Methods. Annu Rev Biomed Eng. 2001. doi:10.1146/annurev.bioeng.3.1.195
69. Huang XC, Quesada MA, Mathies RA. DNA Sequencing Using Capillary Array Electrophoresis. Anal Chem. 1992. doi:10.1021/ac00042a021
70. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 2008. doi:10.1038/nbt1486
71. Hyman ED. A new method of sequencing DNA. Anal Biochem. 1988. doi:10.1016/0003-2697 (88)90041-3
72. Nyrén P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. Anal Biochem. 1987. doi:10.1016/0003-2697 (87)90158-8
73. Nyrén P, Lundin A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. Anal Biochem. 1985. doi:10.1016/0003-2697 (85)90211-8
74. Sharon M, Nyrén P. The History of Pyrosequencing[®]. In: Pyrosequencing Protocols. 2007. doi:10.1385/1-59745-377-3:1
75. Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science (80-). 1998. doi:10.1126/science.281.5375.363

76. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem.* 1996. doi:10.1006/abio.1996.0432
77. Nordström T, Ronaghi M, Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R, Nyrén P. Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnol Appl Biochem.* 2000;31 (2):107. doi:10.1042/ba19990104
78. Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem.* 2000;280 (1):103-110.
79. Bentley JL, Sedgewick R. Fast algorithms for sorting and searching strings. In: *Proceedings of the Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms.* 1997.
80. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Derleme Yıl: 1 Cilt: 1 Sayı: 1 Sayfa: 11-Yeni Nesil DNA Dizileme New Generation DNA Sequencing. :11-18.
81. Kulski JK. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *Intech.* 2016. doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353
82. Metzker ML. Sequencing technologies the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11 (1):31-46. doi:10.1038/nrg2626
83. Budczies J, Bockmayr M, Treue D, Klauschen F, Denkert C. Semiconductor sequencing: How many flows do you need? *Bioinformatics.* 2015.
84. Magi A, Semeraro R, Mingrino A, Giusti B, D’Aurizio R. Nanopore sequencing data analysis: State of the art, applications and challenges. *Brief Bioinform.* 2017;19 (6):1256-1272. doi:10.1093/bib/bbx062
85. Wang Y, Yang Q, Wang Z. The evolution of nanopore sequencing. *Front Genet.* 2014;5 (DEC). doi:10.3389/fgene.2014.00449
86. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002. doi:10.1093/nar/gnf056
87. Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis.* 2008. doi:10.1002/elps.200800126

88. Pantano L, Armengol L, Villatoro S, Estivill X. ProSeeK: A web server for MLPA probe design. *BMC Genomics*. 2008. doi:10.1186/1471-2164-9-573
89. Tong J, Cao W, Barany F. Biochemical properties of a high fidelity DNA ligase from *Thermus* species AK16D. *Nucleic Acids Res*. 1999. doi:10.1093/nar/27.3.788
90. Housby JN, Southern EM. Fidelity of DNA ligation: A novel experimental approach based on the polymerisation of libraries of oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 1998. doi:10.1093/nar/26.18.4259
91. Hogervorst FBL, Nederlof PM, Gille JJP, et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res*. 2003.
92. Veschi S, Aceto G, Scioletti AP, et al. High prevalence of BRCA1 deletions in BRCAPRO-positive patients with high carrier probability. In: *Annals of Oncology*. 2007. doi:10.1093/annonc/mdm233
93. Vaughn CP, Lyon E, Samowitz WS. Confirmation of single exon deletions in MLH1 and MSH2 using quantitative polymerase chain reaction. *J Mol Diagnostics*. 2008.
94. Thodi G, Fostira F, Sandaltzopoulos R, et al. Screening of the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2 and MSH6 in a Greek cohort of Lynch syndrome suspected families. *BMC Cancer*. 2010. doi:10.1186/1471-2407-10-544
95. Kooper AJA, Faas BHW, Kater-Baats E, et al. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells. *Prenat Diagn*. 2008. doi:10.1002/pd.2111
96. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet*. 2005. doi:10.1007/s00439-005-1270-7
97. Zeng F, Ren ZR, Huang SZ, et al. Array-MLPA: Comprehensive detection of deletions and duplications and its application to DMD patients. *Hum Mutat*. 2008. doi:10.1002/humu.20613

98. Rooms L, Reyniers E, Van Luijk R, et al. Subtelomeric Deletions Detected in Patients with Idiopathic Mental Retardation Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). *Hum Mutat.* 2004. doi:10.1002/humu.10300
99. Stegmann APA, Jonker LMH, Engelen JJM. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet.* 2008. doi:10.1016/j.ejmg.2007.10.003
100. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet.* 2007.
101. Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB, et al. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): Simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* 2005;33 (14):1-9. doi:10.1093/nar/gni127
102. Nicholls RD, Knepper JL. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001.
103. Dikow N, Nygren AO, Schouten JP, et al. Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: Comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA. *Mol Cell Probes.* 2007;21 (3):208-215. doi:10.1016/j.mcp.2006.12.002
104. Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem.* 2006.
105. Bittel DC, Kibiryeveva N, Butler MG. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genet Test.* 2007. doi:10.1089/gte.2007.0061
106. Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA) robustly detects and distinguishes 11p15 abnormalities associated with overgrowth and growth retardation. *J Med Genet.* 2007.

107. Priolo M, Sparago A, Mammi C, Cerrato F, Laganà C, Riccio A. MS-MLPA is a specific and sensitive technique for detecting all chromosome 11p15.5 imprinting defects of BWS and SRS in a single-tube experiment. *Eur J Hum Genet*. 2008.
108. Eldering E, Spek CA, Aberson HL, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res*. 2003. doi:10.1093/nar/gng153
109. Lok CAR, Böing AN, Reitsma PH, et al. Expression of inflammation-related genes in endothelial cells is not directly affected by microparticles from preeclamptic patients. *J Lab Clin Med*. 2006. doi:10.1016/j.lab.2006.02.004
110. Hess CJ, Denkers F, Ossenkoppele GJ, et al. Gene expression profiling of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia by novel multiplex-PCR-based method. *Leukemia*. 2004. doi:10.1038/sj.leu.2403520
111. Rooms L, Vandeweyer G, Reyniers E, et al. Array-based MLPA to detect recurrent copy number variations in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet Part A*. 2011. doi:10.1002/ajmg.a.33810
112. Okamoto OK. DNA microarrays in cancer diagnosis and prognosis *Microarranjos de DNA no diagnóstico e prognóstico do câncer*. Einstein. 2014; (March 2005).
113. Min S, Choi JH, Lee SY, Yoo NC. Applications of DNA Microarray in Disease Diagnostics. 2009;19 (October 2008):635-646. doi:10.4014/jmb.0803.226
114. Bumgarner R. DNA microarrays: Types, Applications and their future. 2014;6137 (206):1-17. doi:10.1002/0471142727.mb2201s101.DNA
115. Ensenauer RE, Michels V V., Reinke SS. Genetic testing: Practical, ethical, and counseling considerations. *Mayo Clin Proc*. 2005;80 (1):63-73. doi:10.4065/80.1.63
116. d'Agincourt-Canning L, Baird P. Genetic testing for hereditary cancers: The impact of gender on interest, uptake and ethical considerations. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;58 (2):114-123. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.03.001
117. Lessick M. Genetic testing for breast and ovarian cancer: ethical, legal, and psychosocial considerations. *Nurs Womens Health*. 2007. doi:10.1111/j.1751-486X.2007.00204.x

118. Surbone A. Social and ethical implications of BRCA testing. *Ann Oncol.* 2011. doi:10.1093/annonc/mdq668
119. Kass NE, Medley AM, Natowicz MR, et al. Access to health insurance: Experiences and attitudes of those with genetic versus non-genetic medical conditions. *Am J Med Genet Part A.* 2007. doi:10.1002/ajmg.a.31576
120. Godard B, Raeburn S, Pembrey M, Bobrow M, Farndon P, Aymé S. Genetic information and testing in insurance and employment: Technical, social and ethical issues. *Eur J Hum Genet.* 2003. doi:10.1038/sj.ejhg.5201117
121. Forbes Shepherd R, Browne TK, Warwick L. A Relational Approach to Genetic Counseling for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *J Genet Couns.* 2017;26 (2):283-299. doi:10.1007/s10897-016-0022-2
122. Bujassoum SM, Bugrein HA, Sulaiman R Al. Genotype and Phenotype Correlation of Breast Cancer in BRCA Mutation Carriers and Non-Carriers. *J Cancer Sci Ther.* 2017;09 (03):358-362. doi:10.4172/1948-5956.1000442
123. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018. doi:10.3322/caac.21456
124. Alemar B, Gregório C, Herzog J, et al. BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? *PLoS One.* 2017;12 (11):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0187630
125. Apeossos A, Agiannitopoulos K, Pepe G, et al. Comprehensive BRCA mutation analysis in the Greek population. Experience from a single clinical diagnostic center. *Cancer Genet.* 2018;220:1-12. doi:10.1016/j.cancergen.2017.10.002
126. Konecny M, Milly M, Zavodna K, et al. Comprehensive genetic characterization of hereditary breast/ovarian cancer families from Slovakia. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;126 (1):119-130. doi:10.1007/s10549-010-1325-x
127. Solano AR, Cardoso FC, Romano V, et al. Spectrum of BRCA1/2 variants in 940 patients from Argentina including novel, deleterious and recurrent germline mutations: Impact on healthcare and clinical practice. *Oncotarget.* 2017;8 (36):60487-60495. doi:10.18632/oncotarget.10814

128. Cecener G, Takanlou LB, Takanlou MS, et al. Clinicopathologic Features and Genetic Characteristics of the BRCA1/2 Mutation in Turkish Breast Cancer Patients. *Journal Pre-proof*. S2210-7762 (19)30335-7. doi: 10.1016/j.cancergen.2019.10.004



10. EKLER

10.1. Kabul ve Onay

Evrak Tarih ve Sayısı: 27/09/2019-E.59401



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 53043469-050.04.04
Konu : Kararlar

Sayın Prof.Dr. Gökay BOZKURT
Anabilim Dalı Başkanı

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 26.09.2019 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 15 nolu karar aşağıda sunulmuştur.
Bilgilerinize sunarım.

e-**imzalıdır**
Prof.Dr. Hatice ERTABAKLAR
Kurul Başkanı

KARAR:15

Protokol No : 2019/136
Sorumlu Yürütücü: Prof.Dr. Gökay BOZKURT
Tıbbi Genetik AD

Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Gökay BOZKURT'un "Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne 2013-2019 yılları arasında başvuran meme/over kanseri olgularında *BRCA1/BRCA2* gen mutasyonlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi" başlıklı klinik araştırmasının 12.09.2019 tarihli kurul kararında eksiklikler saptanmıştı. 10.09.2019 tarihli gelen dilekçesi ve ekleri görüldü.

Sonuçta, klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde (kurum izninin alınıp, izin belgesinin dosyaya konulmak üzere gelmesi şartıyla) gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 14.1.ün son bölümünde taahhüt edilen çalışma bittikten sonra nihai raporun, [Sonuç Raporu (web'te) ve ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] gönderilmesi gerektiğinin hatırlanmasına ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektiğinin bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir..



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 53043469-050.04.04
Konu : Kararlar

Sayın Prof.Dr. Gökay BOZKURT
Anabilim Dalı Başkanı

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 21.11.2019 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmamızla ilgili alınan 12 nolu karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize sunarım.

e-İmzalıdır

Prof.Dr. Hatice ERTABAKLAR
Kurul Başkanı

KARAR 12

Protokol No : 2019/136
Sorumlu Yürütücü : Prof.Dr. Gökay BOZKURT
Tıbbi Genetik AD

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na 26.09.2019 tarihinde şartlı (Kurum izni) onay verilen; Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Gökay BOZKURT'un "Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne 2013-2019 yılları arasında bağışlanan meme/over kanseri olgularında *BRCAl/BRCA2* gen mutasyonlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi" konulu klinik araştırmasının 20.11.2019 tarihli *önemli değişiklik formu* ve ekleri görülmüştür.

Önemli değişiklik formunda; çalışmanın yapılacağı ikinci merkez olan SBU İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesinden izin başvuru talebinde yaşanan sıkıntılar nedeniyle merkezin çıkarıldığı ve o merkezde çalışmada yardımcı araştırmacı olan Uzm.Dr.T. Raşit ÖZDEMİR ile Uzm.Dr. Özgü ÖZER KAYA'nın çalışmadan kendi istek ve onaylarıyla ayrış dilekçeleri görülmüştür. Dolayısıyla sadece ADÜ Uyg. ve Araş. Hastanesinde tek merkez olarak çalışmanın yeni tasarımı göre yapılacağı bildirilmiş olup, böylelikle çalışmanın kurum izin şartı da ortadan kaldırılmıştır.

Sonuçta konu hakkında bilgi edinilmiş olup, çalışmanın bu haliyle yürütülmesi uygun bulunmuştur.

Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 14.1.'in son bölümünde **taahhüt edilen çalışma bitince sonra nihai raporunu** [Sonuç Raporu (web'te) ve ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] **gönderilmesi gerektiğinin hatırlanmasına** ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa önem göstermesi gerektüğünün bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.