

**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERLİ OLGULARDA BRCA1 VE BRCA2**  
**GENLERİNDEKİ DUPLİKASYON VE DELESYONLARIN MLPA**  
**TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TUNÇ TUNCEL**

**DANIŞMAN**

**DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU**

**TEMMUZ 2010**



### KABUL VE ONAY SAYFASI

**Tunç TUNCEL'** in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı **"Meme Kanseri Olgularda BRCA1 ve BRCA2 Genlerindeki Duplikasyon ve Delesyonların MLPA Tekniği ile İncelenmesi"** başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek **"KABUL"** edilmiştir.

23.07.2010

Üye: Prof.Dr. İrfan DEĞİRMENÇİ



Üye: Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU (Danışman)



Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS



Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **26./08/2010.** tarih ve **840/3884.** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof.Dr.Ferruh YÜCEL  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ÖZET</b> .....	viii
<b>SUMMARY</b> .....	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	x
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	xii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri.....	4
2.1.1. BRCA1 ve BRCA2 Genleri.....	4
2.1.2. BRCA1 Geni ve Yapısı.....	7
2.1.2.1. BRCA1 BRCT Domaini.....	9
2.1.2.2. BRCA1 RING Domaini.....	10
2.1.3. BRCA1 Psödogeni.....	11
2.1.4. BRCA1 Fonksiyonu ve Mekanizması.....	12
2.1.4.1. DNA Hasar Tamiri.....	12
2.1.4.2. Rekombinasyonel Onarım.....	12
2.1.5. BRCA1 ve Embryogenez.....	14
2.1.6. BRCA1 ve Meme Kanseri ( Mutasyonları ve Kanser Riski) .....	14
2.1.7. BRCA1 Mutasyonları ve Tümör Histopatolojisi.....	15
2.1.8. BRCA1 ve Epigenetik.....	16
2.2. BRCA2 Geni ve Yapısı.....	17
2.2.1. BRCA2 Fonksiyonu ve Mekanizması .....	18
2.2.2. BRCA2 Geni ve Meme Kanseri ( Mutasyonları ve Kanser Riski).....	19
2.3. Sporadik Meme Kanserinde BRCA1 BRCA2 Mutasyonları.....	21

2.3.1. Meme Kanseri .....	22
2.3.2. Kanser.....	22
2.3.3. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması.....	22
2.3.4. Meme Kanseri ve Moleküler Patolojisi.....	23
2.3.4.1. Meme Kanserinin Çok Aşamalı Gelişim Modeli.....	23
2.3.5. Meme Kanserinin Moleküler Olarak Sınıflandırılması.....	24
2.4. Meme Kanserinde Etkili Onkogenler.....	24
2.5. Meme Kanserinde Etkili Tümör Baskılayıcı Genler.....	25
2.6. Meme Kanserinde Biyomarkerlar .....	25
2.7. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA).....	26
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>29</b>
3.1. Hasta Grubu .....	29
3.2. Gereçler .....	29
3.2.1. Kullanılan Aletler.....	29
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	30
3.3. Yöntemler.....	30
3.3.1. Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi.....	30
3.3.2. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemi ile Analizi.....	31
3.3.2.1. Denatürasyon ve Hibridizasyon.....	31
3.3.2.2. Ligasyon Reaksiyonu.....	32
3.3.2.3. PCR.....	33
3.3.2.4. ABI 3130 Cihazına Yükleme.....	34
3.3.2.5. Değerlendirme.....	35
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>37</b>
4.1. BRCA1 Geninde Saptanan Bulgular .....	40
4.2. BRCA2 Geninde Saptanan Bulgular.....	44
4.2.1. Kıza Ait Bulgular.....	44
4.2.2. Anneye Ait Bulgular.....	46
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>49</b>
5.1. Çalışma grubundan elde edilen olası BRCA1 Intron 13 duplikasyonun Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması.....	50

5.2. Çalışma grubundan elde edilen olası BRCA2 Ekson 27 delesyonunun	55
Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması.....	
<b>6. SONUÇ</b> .....	57
<b>7. KAYNAKLAR DİZİNİ</b> .....	58
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	66

## ÖZET

Meme kanseri , gelişmiş ülkelerde kadınlar arasında en sık kansere bağlı ölüm nedenini oluşturmaktadır. Kanser tanı ve tedavisindeki çok önemli gelişmelere karşın meme kanseri olgularının yaklaşık dörtte biri bu hastalıktan dolayı yitilmektedir. Bu bağlamda yeni ve moleküler temelli tedavi yöntemler önümüzdeki dönemde daha fazla önem kazanacaktır. Çalışmamızda kalıtsal ve sporadik meme kanserli olgularda , BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki patolojik değişimlerin yaklaşık %10 'nundan sorumlu olan delesyon ve duplikasyonların hastalık gelişimindeki yerini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve ESOGÜ Onkoloji Bölümünde , meme kanseri tanısı almış 32 hastanın kan örnekleri ve kontrol grubu olarak meme kanseri açısından sağlıklı 4 bireyin kan örnekleri kullanılarak , hastaların BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki delesyon ve duplikasyonlar MRC Holland MLPA P002(lot 0409) , P087(lot 0609) ve P045(lot 0508) prob karışımları kullanılarak MLPA yöntemi ile incelenmiştir.

Bir hastada , BRCA1 geninin intron 13 bölgesinde olası bir duplikasyon saptanmıştır , bulunan intron 13 duplikasyonu, intron içindeki splice dizilerine etki edebilir buda hatalı protein sentezine neden olabilir. Splice mekanizmasındaki bozukluk sonucu oluşan hatalı protein kanser gelişiminde etkili olabilir. BRCA2 geninde ise , aynı aileye mensup anne ve kızda ekson 27 delesyonu saptanmıştır. BRCA2 ekson 27, rekombinaz bir protein olan RAD51 'le etkileşimden sorumlu olan bir amino asid domaini kodlar. Bu iki protein birbirleriyle etkileşim halinde olarak DNA çift dal kırıklarının homolog rekombinasyonla tamirinden sorumludur. Ekson 27 deki delesyon hatalı protein sentezlenmesine neden olabilir buda iki protein arasındaki etkileşimi bozabilir. Bu durum kanser gelişim mekanizmasını tetikleyebilir. Çalışmamız sporadik ve kalıtsal meme kanserlerinde, BRCA1 VE BRCA2 genlerindeki delesyon ve duplikasyonların, hastalık gelişimine etkileri gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler : BRCA1 , BRCA2 , Meme Kanseri , MLPA.

## SUMMARY

Breast cancer is most frequent death cause among women in world wide. Although developments in cancer diagnose and therapy, approximately one fourth of breast cancer patients deceased. In this respect , new molecular based therapy methods will gain more importance in next years . Hence the genes and biochemical pathways involved in breast cancer progression needs to be clarified. To detect importance of anomalies in genes that cause disease , thus developing personalized therapy oppornuties will decrease cancer's economical and psychological damages.The aim of our study was to detect the importance of BRCA1 and BRCA2 deletions and duplications that is responsible aproxximately %10 of pathological changes in hereditary and sporadic breast cancer cases .

In our study,deletions and duplications BRCA1, BRCA2 investigated with MLPA in 32 breast cancer diagnosed patients. As a control group 4 healthy individuals used. Breast cancer patients diagnosed in Istanbul University Medical School Surgery Department and ESOGU Oncology Department. Duplications and deletions in BRCA1 and BRCA2 genes investigated with using probe mixes MRC Holland MLPA P002 (lot 0409) , P087 lot(0609) and P045 (lot 0508) .

A possible BRCA1 intron 13 duplication was detected one of our sporadic breast cancer patients. In BRCA2 , in daughter and mother in same family exon 27 deletion detected. Intron 13 duplication in BRCA1 thought to be effect splice regulatory sequences and may result a aberrant protein synthesis and this may cause cancer progression. BRCA2 exon 27 encodes a amino acid domain that interacts RAD51 recombinase protein that plays a role in DNA double strand break repair. BRCA2 exon 27 deletion may disturp BRCA2-RAD51 interactions. This can trigger cancer progression mechanism. Our study showed that importance of duplications and deletions BRCA1/BRCA2 in sporadic and hereditary breast cancer progression.

Key words: Breast cancer, BRCA1, BRCA2, MLPA.



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

<b>Şekil 2.1 :</b> BRCA1 ve BRCA2 ' nin etkileşimde bulunduğu proteinler.BARD1, BACH1,BAP1,RAD51.	8
<b>Şekil 2.2:</b> BRCA1 proteinin fonksiyonel bölümleri ve etkileşimde bulunduğu proteinlerin lokalizasyonu.	9
<b>Şekil 2.3 :</b> BRCA1 Proteininin DNA hasarına transkripsiyonel cevabında etkileşimde bulunduğu proteinler	13
<b>Şekil 2.4 :</b> BRCA2 proteinin fonksiyonel domainleri ve etkileşimde bulunduğu proteinlerin lokalizasyonu.	17
<b>Şekil 2.5 :</b> BRC aminoasit tekrarları ve C-terminal domaini.	18
<b>Şekil 4.1.</b> Çalışmamızda kaliteli ve yeterli miktarda DNA elde edilemeyen bir örnekte gözlenen düşük ve non-spesifik pikler.....	37
<b>Şekil 4.2.</b> BRCA1 P002 Prob mikisine ait kontrol örneğine ait pik görüntüleri.....	38
<b>Şekil 4.3.</b> BRCA1 P087 Prob mikisine ait kontrol örneğine ait pik görüntüleri.....	39
<b>Şekil 4.4.</b> BRCA2 P045 Prob mikisine ait kontrol örneğine ait pik görüntüleri.....	39
<b>Şekil 4.5:</b> BRCA1 Geni İntron 13 BRCA1 Probe 11283-L12001 ile Tespit edilmiş Artmış Sinyal Saptanan Hastaya Ait Örnek MLPA Pik Görüntüleri.....	40
<b>Şekil 4.6:</b> İntron 13'te BRCA1 P002 Probe Miksi ile Artmış Sinyal Tespit Edilen Hastanın, BRCA1 P002 Probu Olan BRCA1 P087 Probu ile Elde edilen MLPA Sonucu.....	42
<b>Şekil 4.7:</b> BRCA1 P002 ve P087 Probe Mikslerinde Bulunan Ekson ve İntron 13 Probları ve Hibridizasyon Bölgeleri.....	42
<b>Şekil 4.8:</b> BRCA2 Ekson 27 Gen Bölgesinde Azalmış Prob Sinyali Saptanan Hastaya (kıza) Ait MLPA Pik Görüntüleri.....	44
<b>Şekil 4.9:</b> BRCA2 Ekson 27 Gen Bölgesinde Azalmış Prob Sinyali Saptanan hasta	

Anneye Ait MLPA Pik Görüntüleri.....	46
<b>Şekil 5.1:</b> BRCA1 İtron 13'teki Tahmini Verici ve Alıcı Bölgeleri.....	52

## TABLolar DİZİNİ

Sayfa

<b>Tablo 2.1.</b> BRCA1 ve BRCA2 genomik yeniden düzenlenmelerinin farklı populasyonlarındaki frekansı.....	20
<b>Tablo 4.1 :</b> BRCA1 P002 lotlu prob miksin BRCA1 intron 13 ‘ e özgü 11283-L12001 probu ile tespit edilmiş , artmış pik sinyalinin Ezersoftware programında örnek değerlendirme sonuçları.....	41
<b>Tablo 4.2:</b> BRCA1 P087 3890-L03337 probu ile P002 intron 13 genomik bölgesine ait pik sinyalinin Ezersoftware Programında örnek değerlendirme sonuçları.....	43
<b>Tablo 4.3 :</b> BRCA2 geni ekson 27 bölgesine ait saptana azalmış pik sinyallerinin veya olası delesyonlarını Ezersoftware programında örnek değerlendirme sonuçları.....	45
<b>Tablo 4.4:</b> Anneye ait BRCA2 geni ekson 27 bölgesine ait saptana azalmış pik sinyallerinin veya olası delesyonların Ezersoftware programında örnek değerlendirme sonuçları.....	47

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>a.a</b>	Amino asit
<b>dNTP</b>	Deoksi ribonükleik asit tri fosfat
<b>DCIS</b>	Ductal Karsinoma in situ
<b>ER</b>	Östrojen reseptörü
<b>EGFR</b>	Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 geni
<b>nt</b>	Nükleotid
<b>mg</b>	Mili gram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>MLPA</b>	Multipl Ligasyon Prob Amplifikasyonu
<b>mRNA</b>	Mesajcı ribonükleik asit
<b>NMD</b>	Non-sense mediated mRNA decay
<b>ins</b>	İnsersiyon
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>rRNA</b>	Ribozomal ribonükleik asit
<b>tRNA</b>	Taşıyıcı ribonükleik asit
<b>SNP</b>	Tek Nükleotid Polimorfizmi
<b>UTR</b>	Translasyona uğramayan bölge
<b>VUS</b>	Variants of Unknown/uncertain Significance
<b>µl</b>	Mikrolitre

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Batı toplumlarında her 9 kadından birinin meme kanseri geliştirme riski vardır. Bu kanserlerin çoğunluğu sporadik olmakla birlikte, hastaların %10' unda otozomal dominant geçişli kalıtsal bir nedene bağlıdır. Kalıtsal meme kanserlerinin önemli bir çoğunluğu BRCA1 ve BRCA2 genlerinden birini etkileyen bir mutasyona bağlıdır(35, 49). BRCA1 genindeki mutasyonlar kalıtsal meme kanserlerinin %40-60'ından, over tümörü ile beraber olan kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %80'ninden sorumludurlar. BRCA2 geni kalıtsal meme kanserlerinin %30-40' ından sorumludur. BRCA2 mutasyonu taşıyan bireylerin over tümörü geliştirme riski BRCA1 mutasyonu taşıyanlara kıyasla daha düşüktür. Ayrıca erkeklerde gelişen kalıtsal meme kanserlerin BRCA2 mutasyonlarına bağlı olarak geliştiği yayınlanmıştır(49). BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar otozomal dominant kalıtılır , bu nedenle mutasyon taşıyan bireylerin çocuklarına bunu aktarma riski %50dir. BRCA1 proteini direk olarak hasarlanmış DNA' nın tamirinden sorumludur. Çoğu çeşit normal hücrelerin nükleuslarında BRCA1 ve RAD51'in DNA çift iplik kırıklarında etkileşim halinde olduğu düşünülmektedir(4, 11, 37). Bu tür kırıklar doğal radyasyon veya diğer mutajenik ajanlara maruziyetten kaynaklanacağı gibi kromozomlardaki genetik materyal değişimlerinin olduğu esnalarda da gerçekleşebilir. Fonksiyonu BRCA1' inki benzeyen BRCA2 proteini , RAD51 ile direk etkileşime girer. DNA hasar tamirinde rol oynayan bu üç protein genomik stabilitenin devamının sağlanmasında çok önemlidirler(1, 31).

BRCA1 mutasyon taşıyan kadınların da 60 yaşına geldiklerinde meme kanseri gelişme riski yaklaşık %85, over tümörü riski ise yaklaşık %55' tir. BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınların da meme kanseri gelişme riski BRCA1 mutasyonu taşıyıcıları ile benzer düzeydedir. Ancak over kanseri gelişme riski daha düşüktür(49). BRCA1 ve BRCA2 genleri çok büyük genler olduğu için mutasyon analizi zaman alıcı ve masraflıdır. Çalışmamızda sporadik ve kalıtsal meme kanserli olgularda BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki delesyon ve duplikasyonları taramak için MLPA(Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) yöntemi kullanıldı. MLPA tekniğinin, hızlı , güvenilir ve kolay uygulanabilir olması ve tek bir reaksiyonda 37-45 bölgedeki

genomik artış ve azalmaların tespit edebilmesi nedeniyle alışmamızda MLPA Tekniği tercih edilmiştir.

Çalışmamızda kalıtsal ve sporadik meme kanserli olgularda , BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki patolojik değişimlerin yaklaşık %10 'nundan sorumlu olan delesyon ve duplikasyonların hastalık gelişimindeki yerini araştırmak amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Meme kanseri, gelişmiş ülkelerde kadınlar arasında en sık kansere bağlı ölüm nedenini oluşturmaktadır. Kanser tanı ve tedavisindeki çok önemli gelişmelere karşın meme kanseri olgularının yaklaşık dörtte biri bu hastalıktan dolayı yitilmektedir. Bu bağlamda yeni ve moleküler temelli tedavi yöntemler önümüzdeki dönemde daha fazla önem kazanacaktır. Bunun içinde meme tümörü gelişiminde yer alan genler ve biyokimyasal yolların aydınlatılması gerekmektedir. Olguların yaklaşık %90 ' nın oluşturan sporadik meme kanseri gerek klinik ve gerekse de moleküler düzeyde karmaşık ve heterojen bir hastalıktır(67, 71). Bu heterojeniteye karşın meme kanseri atipik epitelial hiperplazi , in-situ kanser , invaziv kanser ve metastatik hastalık gibi bir dizi klinik ve patolojik evrelerden geçer . Araştırmacıların karşısındaki en önemli konulardan biri , tümör gelişimini başlatan, genetik değişiklikleri , genetik instabiliteden ayırt edebilmektir. Artmış instabilite kanser gelişiminde temel noktalardan biridir. (DCSI gibi erken evre tümörlerin analizinin meme kanseri gelişimindeki kritik olayların belirlenmesinde en çok yardımcı ve aydınlatıcı yol olacağı düşünülmektedir.). Meme kanseri ve diğer maligniteler , hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir işlem sonucu ortaya çıkar(72). Çoğu genetik değişimler sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken , daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan maligniteler kalıtsal özellik taşırlar. Genomdaki bu kalıtsal veya kalıtsal olmayan genetik değişimler , belli hücresel genlerin belli özel değişimleri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar onkogenler olarak isimlendirilirler ve normal işlevlere sahip bir diğer gen grubundan (proto onkogenlerden) türevlenirler. Protoonkogenler normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı proteinlere ait kodlar içerirler. Eğer bir mutasyon sonucu protoonkogenin yapısı değişirse oluşan hasar , genin dolayısı ile gen ürününün yapısının değişmesine neden olur ve çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar ve malignite ortaya çıkar. Kanser oluşumunda , onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu kanserogeneizde birbirleriyle zıt etkilidir. Onkogenler malign transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre bölünmesinde işlev gören genleri kontrol ederek

tümör oluşumunu engellerler. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar(11, 65)

## **2.1. Ailesel meme kanseri ve yatkınlık genleri**

Meme kanserinin büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanseri ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri oluşumuna birçok gen etki eder ancak kalıtsal meme kanserlerinden sorumlu olarak, özellikle genom devamlılığının koruyuculuğunda iş gören proteinleri üreten bazı genlerin germ hücrelerindeki mutasyonları gösterilmiştir. Kalıtsal meme kanserinde nadir gözlenen yüksek penetransa sahip meme kanserine yatkınlık genleri olarak BRCA1 ve BRCA2 genleri bulunmuştur(67). Bu genlerdeki germ hücre soyu mutasyonlarını içeren kadınların yaşamlarının bir döneminde meme kanseri geliştirme riski %50-80 arasında değişmektedir BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonları, yüksek penetransa sahip ve hastalık için yüksek risk oluşturan faktörler olarak bir çok çalışmada gösterilmiştir(13,57,60,71,72). Bu iki kansere yatkınlık genlerinin germ hücrelerindeki mutasyonları ovaryum kanserlerinde %10, meme kanserlerinde %7 oranında dominant olarak kalıtım gösterir. Halen ailesel meme kanseri için en şiddetli etkiye sahip mutasyonları taşıyan bu iki gen, meme kanseri risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılmasında ön sırada yer almaktadır (60, 71, 72).

### **2.1.1. BRCA1 ve BRCA2 genleri**

BRCA1, 17q21'e , BRCA2 ise kromozom 13q12'e lokalizedir. BRCA1 geni 1863 a.a 'lik , BRCA2 geni ise 3418 a.a ' lik bir proteini kodlar. Her iki protein de hücrenin diğer bazı proteinleri ile bağlanarak işlev görür. BRCA1 ve BRCA2 genleri genom stabilizasyonu sağlayacak proteinler kodlarlar. Dolayısıyla bu genlerdeki mutasyonlar genomik instabiliteye neden olur.BRCA1 ve BRCA2 genleri genomik stabilitenin devam ettirilmesinde rol oynayan proteinler kodlar ve tümör süpressör gen gibi davranırlar.(42)

Tümör süpressör proteinler , gatekeeper ve caretakerlar olmak üzere temel olarak iki kategoriye ayrılırlar. Gatekeeper proteinler hücre siklusu ve hücre ölümünü



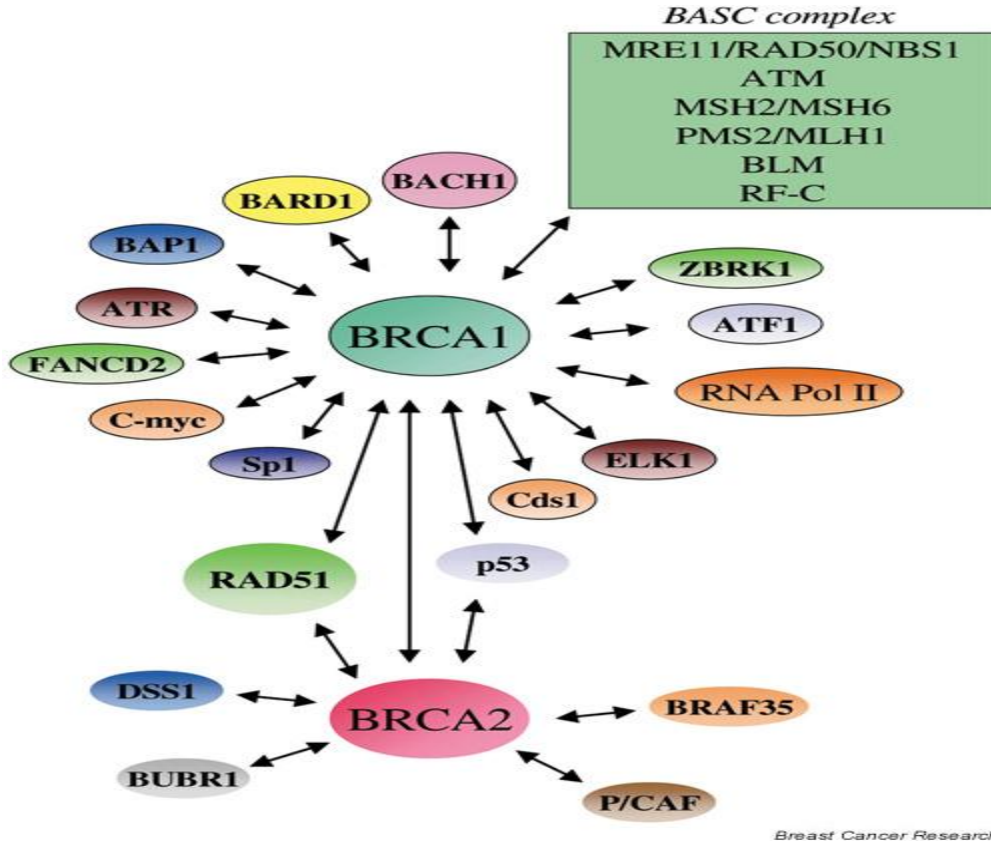
düzenlerler. Bunlardan en bilinenleri , p53 ve RB genleridir. Caretakerlar ise genom tamirinden sorumludurlar. Bunlar özellikle mismatch tamir ve nükleotid ekszisyon tamir proteinleridir. BRCA1 ve BRCA2 proteinlerini caretaker grubuna dahil edilmektedirler(32). Bunun yanında BRCA2 proteini hem DNA tamiri hemde G2/M kontrol noktasındaki görevleri sebebiyle her iki gruba dahil etmek mümkündür(22).

BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin hücre proliferasyonunun kontrolünde tümör baskılayıcı proteinler ile, DNA hasarına ve tamirine katılan proteinler ile, transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan proteinler ile, hücre siklusunun kontrol noktalarının önemli proteinleri ile ve DNA’da rekombinasyonda iş gören proteinler ile yakın ilişkileri gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2’deki mutasyonlar ve BRCA proteinlerinin inaktivasyonu tümör baskılayıcı proteinlerin ve diğer “genom koruyucu” rolü olan proteinlerinde inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürürler. Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile BRCA1 ve BRCA2 genlerinde 1000’den fazla birbirinden farklı DNA dizi değişikliğine dayanan mutasyonlar tespit edilmiştir. Çeşitli mutasyon tiplerine rağmen BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonların büyük bir çoğunluğu tek tiptir. Bazı mutasyonların topluma ve etnik gruba özel olduğu da gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2’nin güçlü bir atasal mutasyon etkisine sahip toplumlarda, aynı tip mutant aleller daha yüksek sıklıkta tayin edilmiştir. Örneğin Askenazi yahudilerde üç tane ortak BRCA1/BRCA2 atasal mutasyonları vardır. Bunlar BRCA1’deki 185delAG ve 5382insC mutasyonları, BRCA2’deki 6174delT mutasyonudur(47). Türk toplumunda yapılan çalışmalarda meme ve/veya ovaryum kanserli hastalarda yapılan BRCA1 ve BRCA2 genlerine ait mutasyon taramalarında, Türk toplumuna özgü sayılacak tekrarlayan bir mutasyon bildirilmemiştir (15). Bağlantı analizleri ile meme ve/veya ovaryum kanserlerinin çeşitli vakalarına sahip ailelerin büyük bir çoğunluğunda BRCA1 ve BRCA2 germ soyu mutasyonları bulunur. Meme ile birlikte ovaryum kanserine yatkınlık geni taşıyan ailelerde BRCA1 ile %80’e yakın ilişki vardır. Gene özgü meme kanserli ailelerde BRCA1 için bu oran %45 , BRCA2 için %35 tir. Büyük ölçekli çalışmalarda, ailesinde 60 yaşından önce meme kanseri teşhisi konan en az dört kadın bireyin veya herhangi bir yaşta meme kanserli erkek bireyin olduğu ailelerde BRCA1 (%52) ve BRCA2 (%32) mutant allellerinin meme kanseri ile yakın ilişkisi gösterilmiştir. Ailelerdeki özellikler daha alt gruplara bölündüğünde örneğin ailede hem meme hem ovaryum kanserini birarada

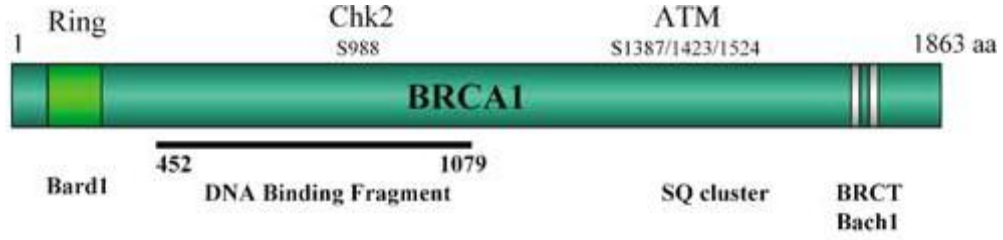
taşıyanlar olduğunda BRCA1 bu gruptan %81 oranında, hem kadın hem erkek meme kanseri taşıyan ailelerde BRCA2 nin %76 oranında sorumlu olduğu bulunmuştur . Çeşitli populasyonlarda genin penetransındaki çeşitlilik BRCA1 ve BRCA2 taşıyıcılarında kanser gelişiminde genetik veya çevresel faktörler rol oynar, keza klinik gidiş de farklılık gösterir. BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşıyan bir kadın kanser olmadan 80 yaşına kadar yaşayabilir veya 20'li yaşlarda kanser gelişebilir. Birçok çevresel faktör, beslenme tarzı, egzersiz, hormonal tedavi ve karsinojenlere maruz kalma gibi faktörler bu farklılıktan sorumlu olabilir . Meme dokusunda alveoler ve duktal epitel hücrelerinde BRCA1'in ekspresyonu gözlenir. Bu gen hamilelik ve emzirme dönemlerinde belirgin olarak aktif çalışırken , parturisyonda laktasyon sonrası ekspresyonu azalır. BRCA1 mutasyonuna sahip kadınlarda pubertedan sonra meme ve/veya ovaryum tümörlerinin gelişme riski %5-10 kat artar. BRCA1 steroide bağımlı bir hücre siklusu düzenleyicisi olarak fonksiyon görüyor olabilir(21, 65 ,67). Gerçektende BRCA1 ve BRCA2 genleri insan meme kanseri hücrelerinde östrojene duyarlıdır ve cevap olarakta her iki gene ait mRNA seviyeleri artar. BRCA1 geninin bir allelindeki mutasyon erken dönem dişi meme kanserlerinde yüksek risk oluşturur, buna karşılık kolon ve prostatta daha düşük bir risk taşır. BRCA2 genindeki mutasyonlar ise erken dönem erkek meme kanserlerinde yüksek bir risk taşır . Germ soyu mutasyonları, özellikle erken yaşta önemli morbidite ve mortaliteye sebep olanlar, populasyonlarda oldukça nadir gözlenir. Bu nedenle, kanserle ilişkili germ soyu mutasyonlarının testi genel populasyonda kullanılmaz. BRCA1 ve BRCA2 mutasyon tarama testi için uygun kadınları belirlemek için çeşitli kriterler vardır. Soy ağacına göre artan genetik risk gösteren kadınlar genetik test yapılması için seçilir. Mutasyon taraması yapılacak hastaların seçimi için, teşhis yaşına, 1.ve 2. dereceden akrabalarda etkilenenlerin sayısına ve her aile üyesinin şimdiki veya ölüm yaşına dayalı tek tip kriterler kullanılır. 40 yaşın altında meme kanseri , 50 yaşın altında tek taraf tutulumlu meme kanseri, 50 yaşın altında iki tarafı tutulumlu meme kanseri, erkek meme kanseri, herhangi bir yaşta ovaryum kanseri teşhisi konmuş veya 3 yada daha fazla sayıda 1. dereceden ve 2. dereceden akrabaları etkilenmiş olan hastalara özel dikkat gösterilir (36).

### 2.1.2 BRCA1 Geni ve Yapısı

BRCA1 geni kromozom 17'nin uzun kolunda 21. bantta lokalize olup , 1863 amino asitlik bir proteini kodlar. Çoğu çeşitli organda özellikle testis ve timusta fazla ekspresyonu gözlenir. BRCA1 geni , genomik stabilitenin devam ettirilmesinde rol oynayan nükleer bir fosfoproteini kodlar ve tümör süpressör gen gibi davranır. Kodlanan bu protein , BASC olarak bilinen , farklı tümör süpressörler proteinleri , DNA hasar sensörleri ve sinyal iletim elemanları ile beraber multi-birimli BRCA1-ilişkili genom denetim birimini oluşturur. Bu genin ürünü RNA polimeraz II ile C-terminal domaini üzerinden bağlanır ve ayrıca histon deasetilaz kompleksi ile de etkileşime girer. Bu protein böylece transkripsiyonda , DNA çift iplik kırıklarında onarımı ve rekombinasyonda önemli roller oynar. Bu gendeki mutasyonlar yaklaşık kalıtsal meme kanserlerinin %40' ından kalıtsal meme ve over kanserlerinin %80 'nin' den fazlasından sorumludur(32). Bu gendeki alternatif splicing, ürünün hücresel lokalizasyonun ve fizyolojik fonksiyonun ayarlanmasında rol oynar.(18)



Şekil 2.1 : BRCA1 ve BRCA2 ' nin etkileşimde bulunduğu proteinler. BARD1, BACH1, BAP1, RAD51 (Welsh, P., Owens, K., King, Mary-Claire., Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2 Review, 2000, TIG volume 16, no.2 69-74p)



**Şekil 2.2:** BRCA1 proteinin fonksiyonel bölümleri ve etkileşimde bulunduğu proteinlerin lokalizasyonu. (Powell S., Kachnic L., 2003, Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation, Oncogene, 5784-5791)

### 2.1.2.1. BRCA1 BRCT domaini

BRCA1'in C-terminal ucu BRCT domaini olarak bilinen ve bir çok DNA tamir proteini tarafından tanınabilen bir amino asit sekansı içerir. BRCT domaini diğer DNA tamir proteinleriyle etkileşime girdiği ve bu etkileşim sonucu geniş protein kompleksleri oluşturduğu düşünülen, protein-protein etkileşimlerinin gerçekleştiği bölge olarak kabul edilmektedir. BRCA1 C-uç bölgesi BRCT (BRCA1 C-Terminal tekrarları) yaklaşık 100 amino asit tekrarından oluşmaktadır. Bu bölge geniş bir spektrum içerisinde birçok nükleer DNA tamir proteinleri tarafından tanınabilen bir bölgedir. Ayrıca BRCT domaini ve bu bölgeye yakın sekansların transkripsiyonel aktivasyon ve kromatin düzenlenmelerinde rol oynadığı düşünülmektedir. (42, 46, 64)

Kanser oluşumuna yatkınlığa neden olan truncating mutasyonlar (eksik protein yapısı oluşumu) bu bölgelerde görülmektedir. Burada birçok missense mutasyon bulunmasına rağmen bunların çoğu sınıflandırılmamış varyantlardır. Kanser oluşumunu tetikleyen bu missense mutasyonlar BRCT tekrar peptitlerin yapısını bozmaktadır. Bu mutasyonlardan en çok bilinenleri ise A1708 ve M1775R'dir. (32, 64)

### 2.1.2.2. BRCA1 RING domaini

BRCA1 proteinin N ucu bölgesine bitişik Zn finger domaini vardır. Bu dizi sistein ve histidin rezidüleri içerir ve RING domaini olarak bilinir. Bu RING finger motifi birçok viral protein, proto onkogen ve transkripsiyon faktörlerinde de bulunur. Bu motifin iyi tanımlanmış bir fonksiyonu olmamasına rağmen bu bölgenin DNA ile etkileşimde olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu bilgi BRCA1' in transkripsiyon faktörü olabileceğini göstermektedir. Bunu destekleyen diğer bir durum ise C-terminal ucundaki amino asit rezidülerinin transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapmasıdır. Bu bölgeler GAL4 geni tarafından aktive edilmektedir. Bu bölgelerdeki mutasyonlar , genin transkripsiyonel aktivasyon mekanizmasını bozmaktadır. BRCA1' in transkripsiyonel regülasyondaki bir başka rolü ise p53 'ün gen ekspresyonunu arttırmasıdır. BRCA1, p53'ün transkripsiyon koaktivatörü olarak görev yapmaktadır. Ayrıca BRCA1 RNA polimeraz II holoenziminin bir parçası olduğu bilinmektedir. SQ cluster bölgesi ise ATM ve ATR genleri tarafından fosforilasyonun gerçekleştirildiği bölgedir. (68 .BRCA1 RING domaini , BARD1 proteininin RING domaini üzerinden heterodimerik kompleks oluşturduğu bilinmektedir. BRCA1' in birçok proteinle etkileşimle olmasının yanında , hücre içinde en çok etkileşimde olduğu ve dikkati çeken iletişimi BARD1 ile oluşturduğu kompleks olarak göze çarpmaktadır. Bu etkileşim sonucu oluşan RING proteininin ubiquitin ligaz aktivitesi olduğu bulunmuştur. Hücrede bu aktivite ubiquitini substrat proteinler için , ubiquitin konjuge enzime dönüştürülmesinde kullanılmaktadır. BRCA1 ve BARD1 heterodimerik kompleksinin ubiquitin ligaz aktivitesini başlatmasına ek olarak bir görevi daha vardır. BRCA1 ' e iletilen nükleer lokalizasyon sinyalleri BRCA1' in BARD1 ' e bağlandığı RING domainine gelir. BARD1 ' in BRCA1'in RING domainine bağlanması bu sinyallerin baskılanmasına sebep olur bunun sonucu olarak ta BRCA1 izoformları nükleusta lokalize olmaya devam eder.(64)

BRCA1 RING motifi , DNA bağlanma motifi olarak bilinen Zn finger bölgesi içerdiğinden , DNA bağlanma domaini olarak kabul edilmektedir. Fakat yapılan direk testler bu domainin DNA' ya bağlanmadığını göstermektedir. Çalışmalar bu bölgenin daha çok protein-protein etkileşimlerinin gerçekleştiğini göstermektedir. 1996 yılında

Brown ve ark. BRCA1 genomik bölgesinin detaylı yapısı belirlediler. 17. kromozomun bu bölgesinin yaklaşık 30kb 'lık tandem bir duplikasyon içerdiğini bunun sonucu olarak ta ekson 1 ve 2' nin 1 adet kopyası olduğunu gördüler. BRCA1 ' in duplike eksonlarının sekans incelemesi sonucu bu duplike bölgelerin BRCA1 geninin eksonlarıyla yüksek homoloji gösterdiğini ve bu kopya bölgelerin işlenmeyen psödögen olduğu kararına vardılar.

1996 yılında Smith ve ark. 17. kromozomun 117,143 bazlık bölgesini BRCA1 geninide içerecek şekilde sekansladılar. BRCA1 'in 24 eksonu 81 kb' lık bir alanı kapsadığını ve yüksek oranda (%41.5) Alu tekrarı içerdiğini buldular, %4.8 oranında da diğer tekrar dizileri içerdiğini belirlediler. BRCA1 intron uzunlukları 403 baz çiftinden 9.2 kb 'lık bir aralık içerisinde değiştiğini ve intron 12 , 19, ve 20' de 3 adet intragenik mikrosatellit markerı (D17S1322, D17S1323, D17S855) içerdiğini gösterdiler. Buna ek olarak BRCA1' in RHO7 ve VAT1 adlı iki geni içerdiğini buldular.(42, 64)

### **2.1.3 BRCA1 psödogeni**

17q21' de BRCA1 geninin 5' ucu sonunda duplike bir bölge bulunmaktadır. Bu bölge BRCA1 genin 1A , 1B ve 2 eksonlarını ve bunların arasındaki intronları kapsamaktadır. Puget ve ark 2002 yılında birbirleriyle peşi sıra bulunan BRCA1 ve psödögeninin aşırı bir dizi homolojisi içerdiğini göstermişlerdir. BRCA1 geninin 2. intronu ile psödögenin ikinci eksonu arasında homolog rekombinasyon sonucu 37kb'lık bir delesyon ortaya çıkmıştır. Mutant BRCA1 alellerinde promotörün bulunmadığını gözlemlemiş ve bu başlama kodunundan yoksun psödögenin 1A, 1B ve 2. eksonlarını içeren kimerik bir genin varlığına dikkat çekmişlerdir. Bu durum BRCA1 geni için yeni bir mutasyon mekanizması olarak sunulmuştur. BRCA1 genine böylesine homolog geniş bir bölgenin olması , burayı homolog rekombinasyon için bir hotspot olarak kabul etmişlerdir. Brown ve arkadaşları 2002 yılında, önceki bulgularla tutarlı BRCA1 geni ve BRCA1 psödögeni arasında rekombinasyon sonucu oluşan bir delesyonu bildirmişlerdir. Germ soyu BRCA1 mutasyon çalışmasında , Avusturya popülasyonunda ailesel meme kanserli olgularla yapılan çalışmada 60 hastanın birinde homolog rekombinasyon sonucu oluşan promotör delesyonu saptanmıştır.(44)

## **2.1.4. BRCA1 Fonksiyonu ve Mekanizması**

### **2.1.4.1. DNA Hasar Tamiri**

BRCA1 proteini direk olarak hasarlanmış DNA' nın tamirinden sorumludur.Çoğu çeşit normal hücrelerin nükleuslarında BRCA1 ve RAD51'in DNA çift iplik kırıklarında etkileşim halinde olduğu düşünülmektedir. Bu tür kırıklar doğal radyasyon veya diğer mutajenik ajanlara maruziyetten kaynaklanacağı gibi kromozomlardaki genetik materyali değişimlerinin olduğu esnalarda da (crossing over, homolog rekombinasyon) gerçekleşebilir. Fonksiyonu BRCA1' inine benzeyen BRCA2 proteini , RAD51 ile direk etkileşime girer. DNA hasar tamirinde rol oynayan bu üç protein genomik stabilitenin devamının sağlanmasında çok önemlidirler. BRCA1 direk olarak DNA' ya yüksek afinite ile bağlanır. Bu yeteneği ile DNA' ya bağlanması MRN kompleksinin nükleaz aktivitesini baskılaması ile ilişkilendirilmiştir. Bu BRCA1' in DNA tamirini NHEJ(Non-Homolog End Junction) yolu üzerinden yapma mekanizmasını açıklıyor olabilir.(3)

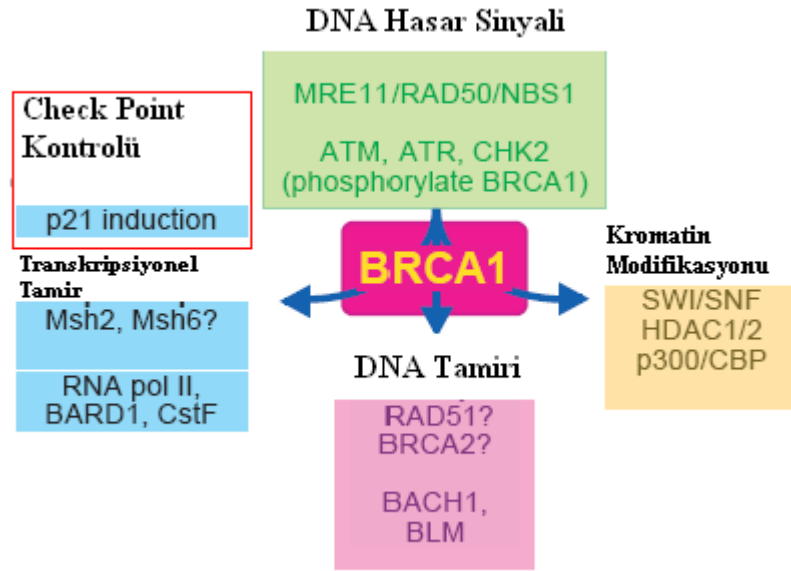
### **2.1.4.2. Rekombinasyonel Onarım**

DNA onarımının bir başka biçimi olan rekombinasyonel onarım, hasarlı DNA' nın hasarsız bir molekülle rekombinasyonu temeline dayanır. Bu mekanizma DNA replikasyonu sırasında karşılaşılan ve normal replikatif DNA polimerazlarca kopyalanamayan bir replikasyon çatalının ilerlemesini bloke eden , timin dimerlerinin veya çift DNA kırıklıklarının bulunduğu hasarların onarımında sıklıkla kullanılır. Rekombinasyonel onarım , bir atasal DNA ipliğinin onarımında kullanılacak olan normal bir yeni molekülün kopyalanmasını sağladığı durumda geçerlidir.(3)

Rekombinasyonel onarım iyonize radyasyon( X ışınları gibi ) veya bazı kimyasallar ile oluşturulan çift iplik kırıklarının onarımı için de belli başlı mekanizmadır. Bu tip hasar her iki ipliğide etkilediği için , onarımı özellikle zordur. Hasarsız kromozom üzerindeki homolog DNA dizileri ile rekombinasyon , bu tip



hasarların onarımına ve normal DNA dizisinin yerine konmasına olanak sağlar. Alternatif olarak çift iplik kırıkları basitçe tek DNA molekülündeki kırık uçların yeniden birleştirilmesiyle onarılabilir, ancak hasar bölgesinin etrafındaki bazların kaybindan dolayı hata sıklığı yükselir. Kalıtsal meme kanserinden sorumlu olan genlerin özellikle BRCA1 ve BRCA2 ‘ nin kodladığı proteinlerin homolog rekombinasyon ile çift iplik kırıkların onarımında görevli olmaları , bu DNA onarımındaki bozukluğun , kadınlarda en yaygın kanserlerden birisinin gelişimine yol açabileceğini göstermektedir.(3)



**Şekil 2.3 :** BRCA1 Proteininin DNA hasarına transkripsiyonel cevabında etkileşimde bulunduğu proteinler.( Zheng, L., Li , S., Boyer , T., Lee , W., 2000, Lessons learned from BRCA1 and BRCA2 , Oncogene , 6159-6175.)

### **2.1.5. BRCA1 ve Embryogenez**

Araştırmalar BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin diğer genlerin aktivitesini dzenlediğini ve özellikle embriyo gelişiminde kritik bir rol üstlendiklerini göstermiştir. Her iki genin de doku gelişimde yüksek seviyelerde eksprese olduğu ve BRCA1 , BRCA2 homozigot knock-out farenin genellikle gestasyonun 5. ve 13. gúnlerinde öldükleri gözlenmiştir.(28, 71 )

### **2.1.6. BRCA1 ve Meme Kanseri (Mutasyonları ve Kanser Riski)**

Otozomal dominant geçişli, BRCA1 geninde mutasyonlara bağlı olarak, meme ve over tümörlerine karşı belirgin artmış eğilim görülen kalıtsal tümör sendromudur. Ek organ tutulumları, kolon, karaciğer, endometrium, serviks, fallop tüpleri ve peritonu içerir. Yahudi popülasyonlarındaki BRCA1 mutasyon prevalansları 883’de 1 olarak tahmin edilmektedir. Bunun yanında belli popülasyonlarda bu oran daha yüksek bulunmuştur (örneğin Ashkenazi Yahudileri’nde % 1. Rekombinasyon teknikler kullanılarak, BRCA1 mutasyonlarının eski Roma zamanlarına kadar dayandığı gösterilmiştir (69). De novo mutasyonlar enderdir 3. Definitif tanı yalnızca genetik testle mümkündür. BRCA1 mutasyonları, birçok erken ortaya çıkmış meme kanserli veya bununla birlikte herhangi bir yaşta ortaya çıkan over kanserli olgulara sahip belirli popülasyonlarda ve ailelerde sıktır. Bir ailede yalnızca iki veya üç meme kanser olgusu görüldüğünde ise BRCA1 veya BRCA2’de mutasyon görülme olasılığı daha düşüktür (<% 30). BRCA1 ve BRCA2 arasındaki temel fark BRCA2 mutasyonunda artmış erkek meme kanseri riskidir. Bu kanserler prekanseröz DCIS komponenti olmaksızın direkt invaziv hastalığa ilerleme eğilimindedir. Buna bağlı olarak da mammografik görüntüleme ile erken yakalanma şansı daha düşüktür. Yaşam boyunca 35 yaşından itibaren 80 yaşlarında % 64 seviyelerine ulaşan, kontralateral meme kanseri riskinde lineer bir artış mevcuttur.Ovaryen karsinomaların yaklaşık % 7-10’u kalıtsal BRCA1 (veya BRCA2) mutasyonlarına bağlıdır, bunlar otozomlar üzerinde olduğundan, anneden veya babadan geçebilirler. Over kanseri, BRCA1 ve BRCA2 taşıyıcılarında

daha erken görülebildiği halde, daha ileri bir yaşta ortaya çıkmış bir over kanseri de altta yatan bir mutasyona işaret edebilir.(21)

### **2.1.7. BRCA1 Mutasyonları ve Tümör Histopatolojisi**

BRCA1 mutasyonlu hastalarda, epitelyal tümörler (karsinomlar) en sık verilen histolojik tanıdır. Malign transizyonel hücreli karsinom gibi çok ender görülenler de dahil olmak üzere malign epitelyal over neoplazmlarının tüm subtipleri rapor edilmiştir . Bazı çalışmalar, papiller seröz adenokarsinomanın familyal over kanseri sendromlarında predominant olarak görülen kanser tipi olduğunu göstermekte iken(6,41,71) diğerleri sporadik vakalarla BRCA1/2 mutasyon taşıyıcılarında benzer sıklıkta görüldüğünü rapor etmişlerdir. Çalışmaların çoğunda ise müsinöz karsinomların BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında sık görülmediği gösterilmiştir(69). Endometrioid ve şeffaf hücreli karsinom sıklığı ise sporadik vakalarla aynıdır. Son veriler göstermektedir ki BRCA1/2 gen mutasyonları borderline neoplazmların gelişimine predispozisyon yaratmaz. Stromal tümörler ve malign germ hücreli neoplazmlar ise BRCA1/2 mutasyonları ile ilişkisiz görünmektedir. BRCA1 ovaryan kanserlerin çoğunluğu, eğer tanı anında over dışına yayılmış iseler kötü prognoza sahip seröz kistadenokarsinomlardır(69). BRCA1 taşıyıcılarında ortaya çıkan over kanserlerinin daha iyi prognoza sahip olduğunun rapor edildiği çalışmalar da vardır. BRCA1 gen mutasyonları, klinik olarak meme kanserli ailelerin % 15-20'sinde, meme-over kanserli ailelerin ise % 40-50'sinde saptanmıştır. Mutasyonlar tüm kodlama bölgesi boyunca oluşur ve dolayısıyla mutasyon spektrumunun gen fonksiyonuna göre relatif olarak küçük olduğu düşünülür. Mutasyonların çoğunun, translasyondan sonra proteinlerin prematür kesilmesine neden olduğu tahmin edilir. Mutasyon taşıyıcılarında ortaya çıkan tümörlerde gözlenen wild-tip allel kaybıyla bağlantılı olarak, tümörigenezizde gen inaktivasyonunun önemli bir basamak olduğu sonucuna varılır. Ailelerde saptanan mutasyonların güçlü değişkenliklerine rağmen belirli jeografik ve etnik kökenlerde belirli mutasyonların çok sık saptandığı ortaya konmuştur. Sonuç olarak mutasyon spektrumu, örneklenen popülasyonun etnik kökenine göre değişebilir(Tablo 2.1). Bazı popülasyonlarda ise, konvansiyonel PCR bazlı mutasyon görüntüleme yöntemleriyle saptanması güç olan spesifik geniş interstisyel delesyon ve

insersiyonlar sık olarak gözlenmiştir ve bunlar total mutasyon spektrumunun % 10 ile 20'sini teşkil eder (21, 35, 69).

BRCA1 geninde bulunan belli başlı varyasyonlar meme kanserine yakalanma riskini artırır. Araştırmacılar , BRCA1 geninde yüzlerce mutasyon bulmuşlardır ve bunların çoğu artmış kanser riski ile ilgilidir. Anormal BRCA1 veya BRCA2 geni olan kadınlar 70 yaş itibariyle %85 meme kanseri gelişme riskindedir. Sadece anormal BRCA1 geni için over kanseri gelişme riski %55 , BRCA2 içinse %25 civarındadır(20). Bu mutasyonlar bir veya az sayıdaki DNA baz sayılarındaki değişimlerde kaynaklanabilir. Bazı durumlarda geniş DNA segmentlerinin yeniden düzenlemeleri şeklinde olabilir. Bu yeniden düzenlenmeler , gendeki birkaç eksonun delesyonu veya duplikasyonu şeklinde olabilir. Klasik mutasyon saptama metodları bu mutasyonları belirlemesi güçtür. Fakat bunun için , Q-PCR(15) , Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), Quantative Multiplex PCR of Short Fluorescents (QMPSF) veya Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (array-CGH) gibi yeni ve etkin metodlar geliştirilmiştir(22). Mutasyona uğramış BRCA1 geni genellikle olması gerektiğinden kısa , doğru olarak fonksiyon gösteremeyen bir protein ürünü oluşturur. Bozuk BRCA1 proteini diğer genlerdeki mutasyonları düzeltemez ve defektler yüzünden hücreler kontrolsüz olarak büyümeye ve bölünmeye başlarlar sonuç olarak ta tümör oluşur.Meme kanserine ek olarak BRCA1 genindeki mutasyonlar over, fallopi tüpü ve prostat kanserleri için artmış risk faktörüdür. Bunlara ek olarak ta BRCA1 'deki mutasyonlar Fallopi tüpü displazileri ile de ilişkili bulunmuştur. BRCA1 ve BRCA2 'nin de içinde bulunduğu bir yolakta gerçekleşebilecek patolojik bir mutasyonda , lenfoma ve lösemi gelişimleri için de büyük risk vardır.(35)

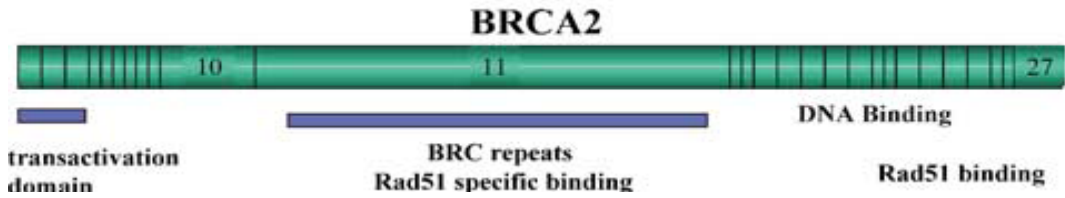
### **2.1.8. BRCA1 ve Epigenetik**

Epigenetik değişimler gen inaktivasyon mekanizmalarında önemli yere sahiptir. Özellikle bir genin normal olmayan promotor metilasyonu tümörlerin malign progresyonuna neden olduğu çeşitli çalışmalarla ispatlanmıştır. Meme ve over kanseri yatkınlık ve tümör süpressör gen olarak kabul edilen BRCA1 , genom stabilitesi ve hücre siklus düzenleyicisi olarak organizmada önemli görevlere sahiptir. Son çalışmalar göstermektedir ki , BRCA1 hipermetilasyonu , genin ekspresyonunun azalmasına veya

engellenmesine neden olarak özellikle tümör süpressör aktivitesinin kaybına neden olmakta ve hücreyi kanserleşmeye götürmektedir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda , BRCA1 geni BRCA2 geni ile kıyaslandığında epigenetik değişimler sonucu özellikle promotor hipermetilasyonu ile daha çok inaktive olduğu gözlemlenmektedir. BRCA2 geninde gözlenen epigenetik değişimler çok sık rastlanılan bir olay değildir.( 35 , 72)

## 2.2. BRCA2 Geni ve Yapısı

BRCA2 geni kromozom 13q12'de lokalize olup , 3418 amino asitlik' lik bir proteini kodlar. BRCA2 geni tümör süpressör gen ailesine dahil olarak kabul edilmektedir ve genin kodladığı protein kromozomal hasarın tamirinde ve hücre siklusunun kontrolünde görev almaktadır.(1,46)

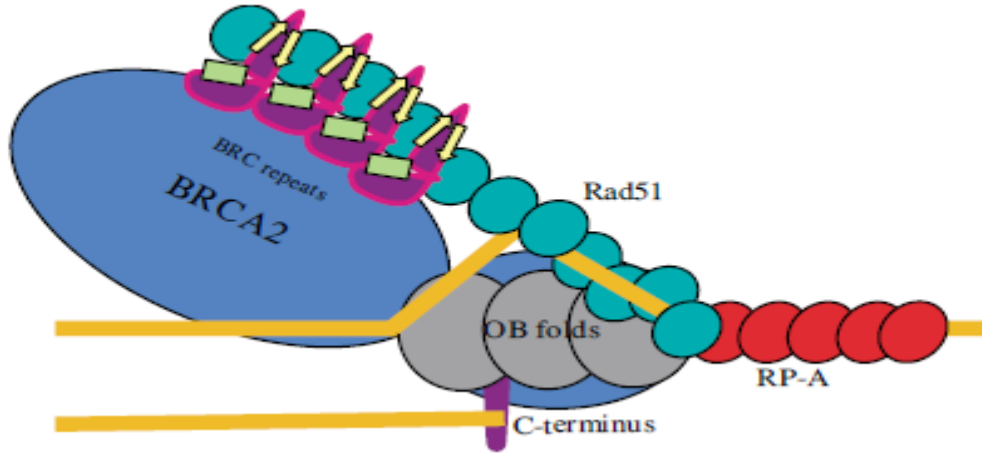


**Şekil 2.4 :** BRCA2 proteinin fonksiyonel domainleri ve etkileşimde bulunduğu proteinlerin lokalizasyonu.( Powell S., Kachnic L ., 2003 , Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation , Oncogene , 5784-5791)

BRCA2 geni çok geniş ve 8 adet BRC peptid motifi içeren 11. eksonu ile karakterizedir. BRC tekrar motifleri RAD51 ile etkileşimden sorumludurlar(51). BRCA2 ' nin C-terminal ucunda ise tek dal DNA' ya bağlanma domaini bulunmaktadır. BRCA2 geni ürünü olan protein başka bir proteinle göze çarpan bir benzerlik göstermemektedir. 11. ekson tarafından kodlanan 8 adet BRC tekrarı birçok memeli türünde evrimsel olarak korunduğu gözlenmektedir ki bu da BRC tekrarlarının önemli bir görevi olduğu anlamına gelmektedir. Gerçektende BRC tekrarları BRCA2

'nin , DNA tamiri ve genetik rekombinasyondan sorumlu bir memeli proteini olan RAD51 ' le etkileşimini ve bağlanmasını düzenler. BRCA2 proteini , RAD51 ile etkileşimini iki özel domaini üzerinden gerçekleştirir. Bu domainlerden biri , BRCA2 geninin 11 eksonu tarafından kodlanan , 8 adet BRC aminoasit tekrarlarıdır(32). Bu bölge , BRCA2 proteinin RAD51 ile bağlanmasını ve direk etkileşimini sağlayan önemli bir yapıdır. RAD51 ile etkileşimden sorumlu diğer bölge ise ekson 27 tarafından kodlanan C-terminal bölgesidir. (4 ,28,51, 67)

DNA hasarına yanıt olarak BRCA2 ve RAD51 tamir bölgesinde birbirleriyle birleşerek bir kompleks oluştururlar. BRCA2 proteinin bu işlem sırasında en önemli görevleri , RAD51 ' in tamir bölgesine lokalizasyonunu sağlamak ve RAD51 'in tamir edilecek DNA ' ya bağlanmasını sağlamaktır. BRCA2 proteininden yoksun hücreler bu tamir yanıtını gerçekleştiremezler. (37, 51)



**Şekil 2.5** : BRC aminoasit tekrarları ve C-terminal domaini. (Ayoub, N. And Rajendra,E., 2009,The Carboxyl Terminus of BRCA2 Links the Disassembly of RAD51 Complexes to Mitotic Entry, Current Biology 19, 1075-1085p)

### 2.2.1. BRCA2 Fonksiyonu ve Mekanizması

BRCA1 ve BRCA2 genlerinin yapıları birbirinden farklı olmasına rağmen , fonksiyonlar benzerdir. Bu iki genden kodlanan proteinler hasarlanmış DNA' nın tamirinde önemli rol oynarlar. BRCA2 proteini DNA kırıklarının tamir etmek için RAD51 adı verilen genin ürünü olan rekombinaz proteini ile birbirlerine bağlanırlar ve bu şekilde fonksiyon gösterirler(4). Aynı şekilde BRCA1 proteinide RAD51 proteini

ile bağlanır ve bu üç gen genomik stabilitenin devam ettirilmesinde kritik bir görevi yerine getirirler. Ayrıca BRCA1 gibi BRCA2 ‘ nin de embriyonel gelişimde diğer genlerin aktivitesinin düzenlediği düşünülmektedir.(4 ,64, 67 , 71)

### **2.2.2.BRCA2 Geni ve Meme Kanseri (Mutasyonları ve Kanseri Riski)**

Erken ortaya çıkan meme kanserine karşı belirgin artmış eğilim ve erkek meme kanseri yanı sıra daha az sıklıkla da pankreatik ve over kanser gelişimi için ek risk faktörü olan, otozomal dominant geçişli kalıtsal tümör sendromudur. Nadiren de BRCA2 gen mutasyonları, cilt melanomaları, safra kesesi ve bilier duktus tümörleri ve fallop tüp karsinomları ile ortaya çıkarlar. BRCA2 sendromuna daha az sıklıkta rastlanır fakat belirli popülasyonlarda daha sıktır, örneğin Ashkenazi topluluğunda % 1.5 oranında spesifik bir mutasyon (6174delT), Icelanders’da ise % 0.6 oranında bir başkası ( 999del5) görülür(47). BRCA2 mutasyonları sıklıkla birden fazla sayıda erken ortaya çıkışlı kadın ve erkek meme kanserli bireylere sahip ailelerde mevcuttur. Over kanser sıklığı ise BRCA1 ailelerinden daha azdır. Gerçek tanı BRCA2 gen mutasyonlarının ortaya konmasına dayanır. BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında meme kanseri genel popülasyona göre daha genç yaşta ortaya çıkmakla beraber, BRCA1 mutasyon taşıyıcılarına göre daha ileridir. BRCA2 mutasyonu over kanserleri açısından da artmış risk getirir fakat bu BRCA1’deki kadar yüksek değildir(13). BRCA2 geninde heterozigot mutasyon taşıyıcıların tek wild-tip allelinde kayıp veya mutasyonal inaktivasyon, tümörigenezisde anahtar basamaktır. BRCA2’den yoksun hücre ve tümörler karakteristik olarak kromozom yapısında hatalara sahiptirler. Bu lezyonlar, iki kardeş kromatitten birinin kırılmasını içereceği gibi Bloom sendromunda veya Fankoni anemisindeki tipik triradial ve quadri-radial kromozomları da içerebilir(21).

**Tablo 2.1.:** BRCA1 ve BRCA2 genomik yeniden düzenlenmelerinin farklı popülasyonlardaki frekansı.( Genomic Rearrangements in BRCA1 in BRCA1 and BRCA2: A literature review)

ÜLKE	ÇALIŞILAN GEN	PREVELANS	SAPTANAN YENİDEN DÜZENLENMELER	REFERANS
Avustralya	BRCA1/2	% 2	<i>BRCA1</i> :Del. ex3,ex5,ex21-23 <i>BRCA2</i> :Del . ex1-2,ex14-16	Woodward et al.(2005)
Kanada	BRCA1/2	% 0	Yok	Moisan et al.(2006)
Çek cum.	BRCA1	% 6	Del. Ex1A/1B-2, ex5-14,ex11-12, ex18-19, ex20, ex21-22	Vasickova et al(2007)
Danimarka	BRCA1/2	% 1,3	<i>BRCA1</i> : Del. ex 3-16, ex 13-15	Tomassen et al.(2006)
Finlandiya	BRCA1/2	% 0	Yok	Lahti-Domenici et al(2001)
Almanya	BRCA1/2	% 1,7 - 5,7	<i>BRCA1</i> :Del.ex1A/1B-2,ex5,ex5-7,ex17;Dupl. Exon13,ex21-23, Tripl. Ex17-19	Hofmann et al(2004) Preisler-Adams et al(2006)
İtalya	BRCA1	% 23	Del.Ex1A/1B-2,ex9-19,ex18-19,ex20	Montagna et al (2003)
İtalya	BRCA2	% 2,5	Del.ex17-18, ex8-11,ex20	Agata et al.(2005)
Hollanda	BRCA1	% 7 - 9,1	Del.ex8,ex13,ex20,ex22;Dupl.Ex13,ex21,23, Tripl. Ex 17-19	Petrij-Bosch et al.(1997),Hogervorst et al.(2003)
Polonya	BRCA1/2	% 4,7	<i>BRCA1</i> : Del. ex 1A/1B-2, ex17-19	Ratajska et al.(2008)
Portekiz	BRCA1	% 9,6	Del. ex1-22,ex 8-13 ,ex 15-16,Dupl.ex3-8,ex18-20	Casilli et al.(2002)
Portekiz	BRCA1/2	% 1,1	<i>BRCA1</i> : Del .ex 11-15	Peixoto et al.(2006)



Portekiz	BRCA2	% 8	Dupl.exon3	Machado et al.(2007)
Portekiz	BRCA1/2	% 1,1	<i>BRCA1</i> :Del ex. 11-15	Peixoto et al. (2006)
Singapur	BRCA1/2	% 3	<i>BRCA1</i> :Del. ex13-15;Dupl. ex 13 <i>BRCA2</i> :Dupl. ex 4-11	Lim et al.(2007)
İspanya	BRCA2	% 1,5	Del.ex2,ex10-12,ex15-16,Dupl. ex20	Gutierrez-Enriquez et al.(2007)
A.B.D	BRCA1	% 12,7	Del. Ex14-20,ex22,ex13,dupl. Ex 13	Hendrickson et al.(2005)
A.B.D	BRCA1/2	% 12	<i>BRCA1</i> :Del. Ex 1A/1B-2 ,ex3,ex8-9,ex17,ex20;Dupl. ex 13	Walsh et al.(2006)
A.B.D(Hispanik Topluluk)	BRCA1	% 3,8	Del. Ex9-12	Weitzel et al.(2007)

### 2.3. Sporadik Meme Kanserlerinde BRCA1 BRCA2 Mutasyonları

BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonlar kalıtsal meme ve over kanserlerinin büyük kısmından sorumludurlar. Germ soyu mutasyonların yanında , tümör gelişimi BRCA genlerinin wild tip alel kaybına bağlıdır . Son yıllarda yapılan çalışmalarda , özellikle BRCA1 geninin sporadik meme kanseri vakalarında inaktive olduğu ve bu mutasyonların meme kanseri tümörigenezisinde rolü olduğu gösterilmiştir. Hastalık oluşturan somatik BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları sporadik meme kanserlerinde seyrek görülmelerine rağmen , BRCA1 ve BRCA2' nin allelik kayıpları sporadik meme tümörlerinde de gözlenmiş ve kalıtsal olmayan meme kanserlerin gelişiminden de sorumlu tutulduğu çalışmalar vardır. Janatova ve arkadaşlarının 2005 yılında sporadik meme kanseri tümörlerinde yaptıkları çalışmalarında , çalıştıkları 40 olgunun 2 ' sinde patolojik BRCA1 mutasyonu saptamışlar ve bu mutasyonların meme kanseri gelişmesine neden olduğunu belirtmişlerdir(24). Cooke ve arkadaşları 2003 yılında BRCA1 geninin inaktive olma mekanizmalarının sporadik meme

kanserlerindeki önemini araştıran bir çalışma yapmışlar. Bu çalışmada , sporadik meme kanserlerinden elde edilen hücrelerin wild BRCA1 aleli retroviral olarak enfekte edilerek inaktive edilmiş ve bu mutant BRCA1' in meme kanserli hücrelerin gelişimini engelleyemediğini görmüştür. Böylece sporadik orjinli meme neoplazmalarının kontrolünde BRCA1' in önemli bir rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir.(27)

### **2.3.1. Meme Kanseri**

### **2.3.2. Kanser**

Kanser hücrenin normal döngüsünü kaybederek, kontrol sistemlerinden kaçıp uygunsuz şekilde bölünmesidir. Hücre bölünmesi genetik kontrol altındadır. Hücreler davranışlarını düzenlemek için kontrol olarak görev yapan ve nasıl davranmaları gerektiğini anlatan karmaşık sinyaller alır, gönderir ve yorumlarlar. Bunun sonucunda her hücre sosyal sorumluluk sahibi bir şekilde organizmanın iyiliği için gerekli zamanda bölünür, farklılaşır, durur veya ölür. Herhangi bir mutasyon daha hızlı bölünebilen bir hücre çeşidi ortaya çıkardığında bu klon üstünlüğü ele geçirir. Fakat bir hücrenin kanserli hücreye dönüşmesi için tek bir mutasyon yeterli değildir. Normal bir hücrenin invaziv bir kanser hücreğine dönüşmesi için en az 6 -7 mutasyon gereklidir .(3, 55)

### **2.3.3 .Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması**

Histolojik olarak meme karsinomları iki ana gruba ayrılır: in situ karsinom ve invaziv karsinom. In situ karsinomda epitelyal hücreler bazal membranla çevrilidir, invaziv(infiltratif) karsinomda ise neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya geçerler. Meme kanserinin Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre histolojik olarak sınıflandırılması aşağıda görülmektedir .(23)

1. In situ karsinom
  - In situ duktal karsinom
  - In situ lobuler karsinom
2. İnvaziv karsinom
  - İnvaziv duktal karsinom

- İnvaziv lobuler karsinom
- Tubuler karsinom
- İnvaziv kribriform karsinom
- Medülller karsinom
- Müsinöz karsinom
- İnvaziv papiller karsinom
- İnvaziv mikropapiller karsinom
- Apokrin karsinom
- Sekretuar (juvenil) karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Metaplastik karsinom
- Nöroendokrin karsinom
- İnflamatuar karsinom

### **2.3.4. Meme Kanseri Moleküler Patolojisi**

#### **2.3.4.1. Meme Kanserinin Çok Aşamalı Gelişim Modeli**

Meme kanseri başlangıcının ilk işareti duktal hiperplazidir. Bu aşamada değişik şekil ve kromatin yapıdaki çekirdekler içeren, düzgün dağılım göstermeyen epitel hücrelerinin çoğalmasa görülür. Bu hücreler beningdir fakat hiperplaziden atipik hiperplaziye dönüşüm kanser riskinin artmasıyla bağlantılıdır. Sonraki aşama duktal veya lobular olarak karsinoma in situ gelişimidir. Bu aşamada malign özellikteki hücrelerin artışı görülür fakat henüz bazal membrandan stromaya invazyon gerçekleşmemiştir. Son aşamada hücreler bazal membrandan ayrılır invaziv hale gelir. İnvaziv karsinomların çoğu (%85 -95) duktaldır, kalanı infiltrating lobulardır. Bu çok aşamalı modelin her aşamasında hücreye büyüme yönünde belli bir avantaj sağlayan bir genetik değişimin gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu genetik değişiklikler kolorektal kanser modelinde biliniyorken, meme kanseri modelinde genetik değişiklikler bilinmesine rağmen bunların tam olarak hangi aşamada ve hangi sırayla meydana geldiği bilinmemektedir (27).

### 2.3.6. Meme Kanserinin Moleküler Olarak Sınıflandırılması

Sorlie ve arkadaşları meme kanserlerini moleküler özelliklerine göre beş gruba ayırmışlardır. Bu gruplandırma gen ekspresyon paternlerine dayanarak yapılmıştır (53, 54). Buna göre meme kanseri moleküler alt tipleri şunlardır:

**1. Bazal-benzeri:** En homojen alt gruptur. Normal meme bezlerinin bazal epital hücrelerine benzer bir gen ekspresyon paternleri olduğu için bu adı almışlardır. TP53 geni mutasyonları görülür ve östrojen reseptör negatiftir Kalıtsal BRCA1 mutasyonları taşıyan bireylerde bazal benzeri meme kanseri olduğu bildirilmiştir. Bu tip, kısa relaps dönemi ve uzak metastazlarla karakterizedir.(19,53)

**2. Luminal A:** Luminal B alt tipi ile birlikte luminal epital hücrelere benzer bir gen ekspresyon paternleri olduğu için bu ismi almışlardır. Bu alt tipte TP53 geni yabancıl durumdadır ve östrojen reseptör pozitifdir . Toplam yaşam süresi bu hastalarda daha uzundur ve prognozları iyidir (53). BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında Luminal A tip kanser gelişir(54).

**3. Luminal B:** Luminal B alt tipi Luminal A tipe benzemekle birlikte prognostik olarak orta grupta sınıflandırılmaktadır.(53)

**4. HER2: ERBB2(HER2/NEU)** geninin aşırı ekspresyonu ile karakterizedir. Prognozu kötüdür. Yaşam süreleri daha kısadır ve metastazları yaygındır (54).

**5. Normal-benzeri** (53)

### 2.4. Meme kanserinde etkili onkogenler

Meme kanserinde etkili olduğu düşünülen onkogenler: C-MYC, INT2, EMS1, CCND1, RAS ve ERBB2'dir (5,39). c-myc proteini hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir fosfoproteindir. Meme kansinomlarının %32'sinde MYC-protoonkogeninin amplifiye olduğu veya yapısal değişikliğe uğradığı bildirilmiştir. C-MYC'in östrojen ve progesteron tarafından aktive edildiği düşünüldüğü için bu genin hormonal tedaviye yanıt vermeme ve kemoterapiye dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ancak histolojik grade ve tip ile ilişkisi bilinmemektedir (39).

## **2.5. Meme Kanserinde Etkili Tümör Baskılayıcı Genler**

Germ-line mutasyonları meme kanseri için yatkınlık oluşturan iki gen vardır. Bunlardan BRCA1 genomik stabilitenin korunmasında görev alır. Sporadik meme kanserinde mutasyonları görülmez fakat işlevsiz durumdadır. BRCA2 DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü ve transkripsiyonda görev alır. Sporadik meme kanserinde nadiren inaktif durumdadır (39). TP53 sporadik meme kanserinde en sık mutasyona uğrayan genidir fakat meme kanseri oluşumunun geç safhalarında mutasyona uğradığı bildirilmektedir. Ailesel olmayan meme kanserlerinin üçte birinde mutasyona uğramıştır. Mutasyonlar genelde p53 proteininin DNA'ya bağlanarak p53'le transkripsiyonu uyarılan genleri aktive etmesini önler (39). PTEN genindeki germ-line mutasyonlar meme kanserine sebep olur. Sporadik meme kanserinde somatik mutasyonları çok nadirdir fakat genelde ekspresyonunda azalma görülmektedir (12,39).

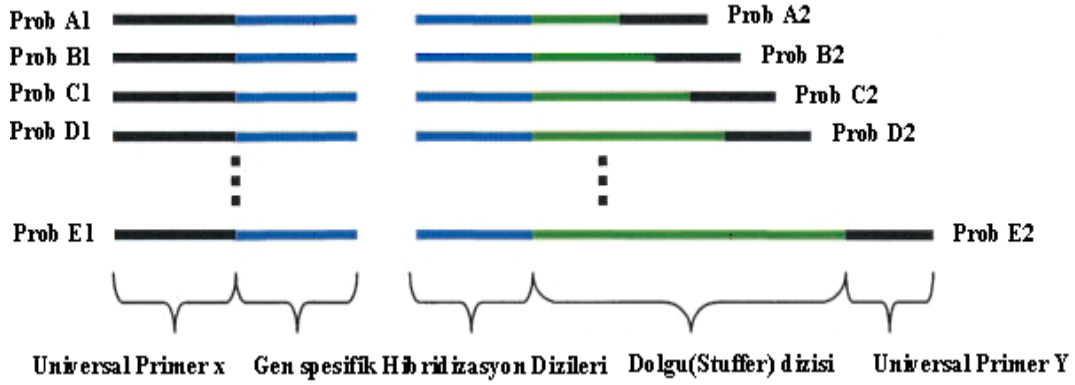
## **2.6. Meme Kanserinde Biyomarkerlar**

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanserdir. Bu nedenle yeni biyomarkerlar bulmak, bu biyomarkerların klinik önemini belirlemek ve yeni tedaviler geliştirmek çok önemlidir. Meme kanserinde bilinen prognostik faktörlerin en önemlisi östrojen reseptör (ER) ve projesteron reseptördür (PgR). Düşük gradeli tümörler ER ve PgR pozitifdir ve 16q bölgesinin kaybı ile birlikte görülür. Yüksek gradeli tümörler ise her iki reseptör için de negatiftir. ER pozitif tümörler ER'a ligandı olan östrojenin bağlanmasını engelleyen ajanlarla tedavi edilebilir. Ancak tümör bu ajanlara karşı direnç geliştirebilir. Genelde bu direnç gelişimini takiben EGFR ve ErbB-2(Her2/neu) tarafından kinaz yollarının uyarılması görülür. HER2/NEU gen amplifikasyonu veya protein artışı görülen tümörler histolojik olarak yüksek grade'lidir, kötü prognostiktir, lenf nodu metastazı olabilir. Protein kinaz B/AKT(PKB/AKT) yolağı ER tarafından aktive edilen bir yoldur. Birincil invaziv meme tümörlerinin % 80'inde PKB/AKT 473'üncü serin pozisyonunda fosforiledir. MAPK yolağı da ER tarafından aktive edilen diğer bir kinaz yolağıdır. Fosforile MAPK endokrin tedaviye kısa süreli cevap ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir. 17 Fra-1, Fos-ilişkili antijen-1'dir. Fos, ER'ün

transkripsiyonu uyarması sırasında kofaktör olarak görev yapar. Fra-1 tümör gelişiminde etkili proteinlerin ekspresyonunu etkilediği için meme kanserinde agresif fenotipin göstergesidir . E-kaderin,  $\beta$ -katenin ile birlikte Ca-bağlı hücreyel adhezyondan sorumludur. E-kaderin genelde tümör dediferensiyasyonu ve kanser metastazıyla ilişkili olan epitalyel mejanimal dönüşümde görev alır. E-kaderini kodlayan gen CDH1 invaziv duktal meme karsinomlarının %50'sinde mutasyona uğramıştır ve infiltrating lobular meme karsinomunda da ekspresyonu hiç görülmemektedir (9, 12 ,39 ,40, 63)

### **2.7. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)**

Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tanımlamışlar ve son haliyle relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tariflemişlerdir (58). MLPA; 45 taneye kadar spesifik dizinin, bir multiplex PCR'dan sonra eş zamanlı olarak değerlendirilebildiği yeni bir metottur. Amplifikasyon ürünleri bir dizileme cihazı ile ayrıştırılır. Sadece bir tek primer çifti kullanılır. Oluşan fragment uzunlukları 130 - 490 bp arasında olduğundan jel paternine uygundur. Elde edilen sonuçların kontrol örneğiyle karşılaştırılması sonucunda hangi dizinin delesyon / insersiyon taşıdığı tespit edilir. MLPA reaksiyonunda 45 dizinin amplifikasyonu için sadece 20 ng insan DNA'sı yeterli olmakta ve tek nükleotid değişimleri (bağlanma bölgesindeki) görülebilmektedir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MLPA reaksiyonu daha hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Gerekli ekipmanlar ise çoğu moleküler laboratuvarında bulunabilmektedir . Tekniğe; kolay uygulanabilir, hassas olması ve doğru multipleks analiz sonucu verebilmesi için birçok modifikasyon yapılmıştır.



**Şekil 2.5.** MLPA Probu'nun Şekli ve İşlevsel Bölümleri (Large Genomic Deletions and Duplications in the *BRCA1* Gene Identified by a Novel Quantitative Method Frans B. L. Hogervorst,)

Her bir MLPA probu hedef diziye hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bütün bağlanmış probalar 5' ve 3' uçlarında PCR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob uzunlukları 130 ve 480 baz çifti arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PCR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe spesifik olan dizi bulunur. Probu'nun diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 80-440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından kimyasal olarak sentezlenmiştir.

Bu oligonükleotidlerinin sentezi için M13 klonlarının tek zincirli DNA sı kullanılmıştır. M13 DNA sı komplementer oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmen çift zincirli hale getirilmiştir ve iki restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. Bu enzimlerden bir tanesi DNA yı kendi tanıma bölgesinden, hedef diziye mükemmel bir komplementer olacak şekilde fosforile 5' ucundan kesmektedir. 35-42 prob içeren kitler genellikle problar arasında 6 yada 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde dizayn

edilmiştir. Spesifik bir MLPA prob kitinde kullanılan bütün problar farklı M13 kaynaklı vektörlerden elde edilmişlerdir ve farklı dolgu , hibridizasyon dizileri içerirler. Farklı problemlerin birbirleri ile heterodubleks formasyonunu önlemek için problemlerin sadece uç kısımları ortak dizi içerir. Bunun için 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren M13 kaynaklı MLPA vektörü hazırlanmıştır. Hedef diziye spesifik sentetik oligonükleotitler, gerekli dizi uzunluğunu sağlayacak esneklikte bu vektörlere kolayca eklenebilirler. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren 94-124 baz çifti uzunluğundaki problemler amplifikasyonda başarılı şekilde kullanılmıştır. M13 kaynaklı oligonükleotid problemlerinin hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları bize amplifikasyon ürünlerinin farklı özellikleri sayesinde avantaj sağlamıştır. Hibridize olan hedefe spesifik kısa diziler ise mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde de hedef diziye yarışmalı şekilde bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamıştır.(50)



### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Hasta Grubu**

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında meme kanseri tanısı almış 28 hastanın kan örnekleri dâhil edilmiştir.. Kan örnekleri EDTA'lı tüp içinde ve soğuk zincir ile laboratuvarımıza gelmiştir. Meme kanseri açısından sağlıklı 4 kontrol bireyinin kanı da çalışmamızda kullanılmıştır. Çalışmamız Şubat 2009-Aralık 2009 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Meme kanserli olguların kan örnekleri ve kontrol bireylerinin kan örnekleri BRCA1 ve BRCA2 genlerinin ekzonlarının belirli bölgelerindeki delesyon ve duplikasyonlar bakımından MLPA yöntemiyle incelenmiştir.

#### **3.2. Gereçler**

##### **3.2.1. Kullanılan Aletler**

Pipet takımı (Gilson)  
PCR aleti (Thermal cycler) (PE GenAmp PCR System 9700)  
Su banyosu (Nüve)  
Vorteks (Heidolph)  
Deri Dondurucu (Arçelik)  
Buzdolabı (Arçelik)  
Genetik analizör (ABI 3130)  
Spektrofotometre (Eppendorf)  
Kapiller Elektforez Cihazı (ABI 3130)  
Manga Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)  
Mikrosantrifüj (Eppendorf)  
Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)  
Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)  
Elektforez aleti (Consort E844)

Su banyosu (Nüve)

ABI 3130 47 cm Kapiller (ABI)

### **3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler:**

DNA Ekstraksiyon Kiti (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I)

Salsa MLPA Lung Probe Mix 1-2 ( Salsa P126/127- MRC Holland)

Performans Optimize Edici Polimer 7 (POP7 TM) (ABI)

10X EDTA lı Buffer (ABI)

Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)

Hi-Di Formamide (ABI)

Mineral Yağ (Roche)

Ksilol ( Merk-1.08685.2500)

Doku Parçalayıcı Tampon (MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer)

Etanol (95%) (Tekel)

6X Jel yükleme tamponu (Sigma)

Agoroz ( Sigma-Lot: 072K0059)

Etidyum Bromid (Sigma)

Proteinaz K (QIAGEN)

Distile Su

### **3.3.Yöntemler**

#### **3.3.1. Kan örneklerinden DNA elde edilmesi**

Kan örneklerinden DNA elde edilmesinde robotik DNA izolasyon sistemi kullanılmıştır. Kan örnekleri ise doğrudan robotik DNA izolasyon sistemine yüklenmiştir. Örnek hacmi 200 µl, elution volume 100 µl ve “ DNA isolation blood” protokolü seçilmiştir.

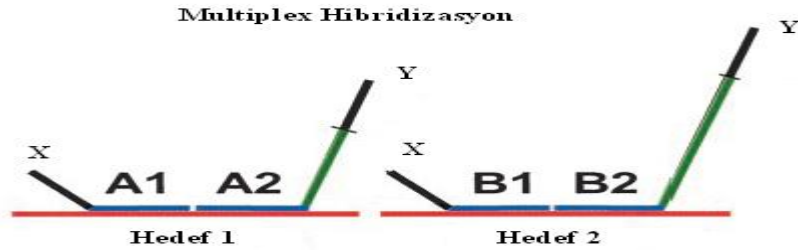
Robotik sistemde proteinaz K, yıkama solüsyonları ve DNA'yı tutmak için manyetik parçacıkların ve pipetaj için boş kuyucukların bulunduğu bir kartuş sistemi, pipet uçlarının yerleştirilmesi için tip trayler ve örnek ve elüsyon tüpleri için bir rak

bulunmaktadır. Robotik sisteme kartuş ve tip trayler yerleştirilip örnek ve elüsyon tüpleri koyulduktan sonra bütün işlemleri otomatik gerçekleştirmektedir. İşlem yaklaşık 25 dakika sürmekte ve elde edilen DNA örnekleri -20 C’de saklanmaktadır.

### 3.3.2 İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi

#### 3.3.2.1. Denatürasyon ve Hibridizasyon

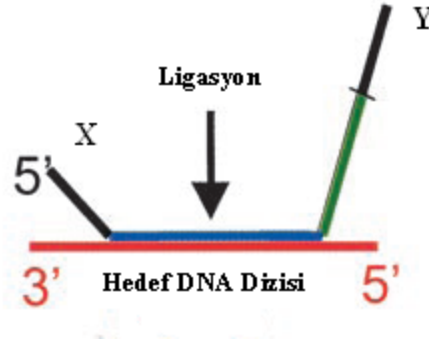
- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA dan 5 µl (20-250 ng DNA) alındı.
- Alınan örnekler 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- 98 °C de 5 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA nın denatürasyonu sağlandı.
- Sonrasında örnekler 25 °C’ye soğutuldu.
- 25 °C’deki DNA örneğinin üzerine 1.5 µl SALSA Probe Mix (P002/ P087/P045) ve 1.5 µl MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi.
- Sonraki aşamada buharlaşmayı önlemek için PCR strip tüplerinin üzerine 5 µl mineral yağ eklendi.
- Daha sonra 95 °C de 1 dk. inkübe edilen örnekler 60 °C de 16 saat hibridizasyona bırakıldı.



**Şekil 3.1.** MLPA probunun hedef diziyeye hibridizasyonu (Large Genomic Deletions and Duplications in the *BRCA1* Gene Identified by a Novel Quantitative Method Frans B. L. Hogervorst,)

### 3.3.2.2 Ligasyon Reaksiyonu:

- Hibridizasyon süresi bitiminde termal cycler cihazının ısısı 54 °C ye indirildi.
- Örnekler 54 °C ye geldikten sonra strip tüplerden mineral yağ dikkatli şekilde pipet ile alındı.
- Hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 karışım ilave edildi.
- 54 °C de 15 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 98 °C de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.

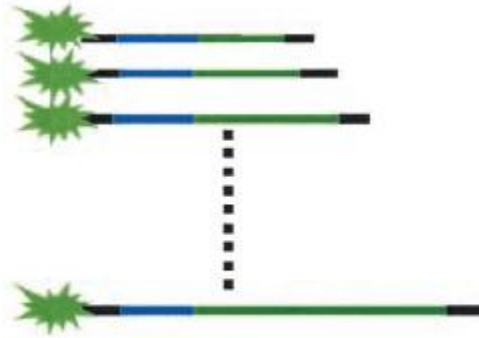


**Şekil 3.2.** İki parçalı MLPA probunun hedef diziye hibridizasyonundan sonra Ligase 65 enzimi ile birleştirilmeleri (Large Genomic Deletions and Duplications in the *BRCA1* Gene Identified by a Novel Quantitative Method Frans B. L. Hogervorst,

### 3.3.2.3 PCR:

- Ligasyon reaksiyonu ürününden 10 µl alınarak ayrı PCR strip tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra ligasyon ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla:
  - 4 µl 10XSALSA PCR Buffer
  - 26 µl distile su
  - 10 µl Polimeraz miks,konularak PCR başlatıldı.
- PCR şartları:

Denatürasyon	30 sn	95 °C	} 38 döngü
Annealing	30 sn	60 °C	
Ekstansiyon	60 sn	72 °C	
Final Ekstansiyon	20 dk	72 °C	

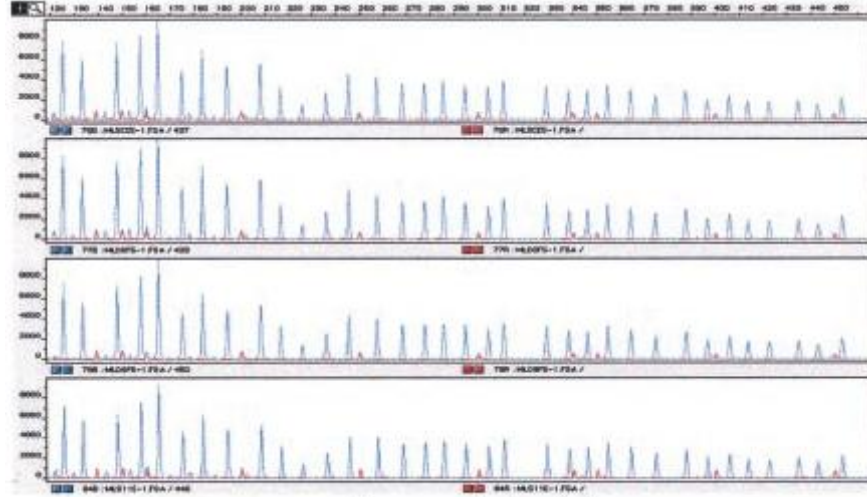


**PCR Amplifikasyonu**

**Şekil 3.3.** : MLPA problemlerinin PCR reaksiyonu ile çoğaltılması (Large Genomic Deletions and Duplications in the *BRCA1* Gene Identified by a Novel Quantitative Method Frans B. L. Hogervorst,)

### 3.3.2.4 ABI 3130 Cihazına Yükleme

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 3 µl alınarak ABI 3130 cihazı yükleme tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra üzerlerine:
  - 0.5 µl internal size standart (Rox 500)
  - 8,5 µl deiyonize formamid konularak pipetajla homojenize edildi.
  - Örnekler 94 °C de 4 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı.
  - Devamında örnekler buz üzerine alındı.
  - ABI 3130 cihazında; 15 kV de 5 saniye injeksiyon zamanı, 60 °C ve 15 kV de 25 dakika yürütme zamanı, filtre C şartları sağlandı.
  - Daha sonrasında ABI cihazına yüklenilerek, Gene Mapper 4.0 programında okutulmaya başlandı.
  - Her örneğe ait pik görüntüleri ve pik alanları elde edildi.



Fragment Analizi

**Şekil 3.4.** Çoğaltılan MLPA problemlerinin capiller elektroforez ile fragment analiz(Large Genomic Deletions and Duplications in the *BRCA1* Gene Identified by a Novel Quantitative Method Frans B. L. Hogervorst,)

### 3.3.2.5 Değerlendirme

Okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları excel dosyası formatında kaydedildi. Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldırıldığında problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları Ezersoftware programına aktarıldı. Normal örnekler eksternal kontroller olarak kaydedildi. Ezersoftware programı tarafından test örneğinin bütün pik alanları, her bir pik alanının (internal kontrol pikleri) o çizgideki bütün piklerin toplam pik alanına bölünmesiyle birbirlerine göre oranları tayin edildi. Bu oranlar, pik alanları normal karyotipe sahip olduğu bilinen ve test örneklerle aynı testte çalışılmış 3 örneğin kanlarından elde edilen pik alanlarının (eksternal kontrol pikleri) ortalama sonuçları ile kıyaslandı ve doz tayinine gidildi.

Kontrol olarak kromozomal açıdan normal olduğu bilinen vakaların pikleri eksternal kontrol olarak kullanıldı. Her testte 3 eksternal kontrol test örnekleri ile birlikte çalışıldı. Relatif kantitatif PCR yöntemi olan MLPA ile değerlendirme yapılırken Ezersoftware programı otomatik olarak internal kontrol ve eksternal kontrol pik değerleri ile aşağıdaki formülü kullanarak her bir prob spesifik bölge için doz tayini yapmaktadır:

$$\text{Doz Oranı} = \frac{\text{Hasta T. P. A. D.}}{\text{Hasta P. A. T. D. (İ.P.A.)}} = \frac{\frac{1. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{1. \text{ Kontrol P. A. T. D.}} + \frac{2. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{2. \text{ Kontrol P. A. T. D.}} + \frac{3. \text{ Kontrol T. P. A. D.}}{3. \text{ Kontrol P. A. T. D. (E.P.A.)}}}{3}$$

T. P. A.D.: Test Piki Alan Değeri  
P. A. T.D.: Pik Alanları Toplam Değeri  
İ. P. A.: İnternal Pik Alanları  
E. P. A.: Eksternal Pik Alanları

Yöntem gereği olarak, program tarafından test edilen prob bölgesi için, doz oranı 0.7 ve 1.3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda

olduğu, 0.5 ile 0.7 değerleri arası gri alan, 0.5'den küçük değerlerde delesyon yani doz eksiği olduğu, 1.3 ile 1.8 arası değerler gri alan, 1.8'den büyük değerler ise amplifikasyon yani doz fazlası olduğu belirlenmektedir.

Gri alan olarak belirlenmiş değer aralıklarındaki bölgeler, Ezersoftware programında yer alan doğrulama bölümünde gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı yönünde tekrar incelenmişlerdir. Burada elde edilen pik değerlerinin gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı, bu pik değerinin elde edildiği hastanın sentetik prob büyüklüğü ile kontrollerin sentetik prob büyüklükleri karşılaştırılarak doğrulanmaktadır. Gri alan formülü řu şekilde tanımlanabilir:

Hasta Spesifik Prob Alanı

-----

Hasta Mutasyonlu Prob Alanı

Gri Alan Formülü: -----

Kontrollerin Ortalama Spesifik Prob Alanı

-----

Kontrollerin Ortalama Hasta Mutasyonlu Alana  
Karşılık Gelen Bölge Alanı

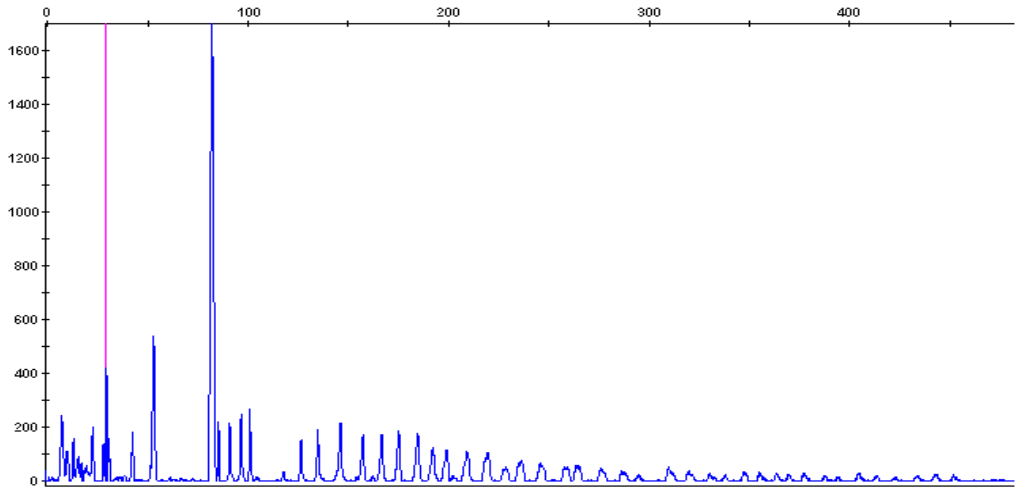
Gri alan formülü uygulanmış bölgenin sonuçları, doz oranı 0.7 ve 1.3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu,  $\leq 0.7$  değerlerinde bölgede kesin delesyon yani doz eksiği olduğu,  $\geq 1,3$  değerlerinde ise kesin amplifikasyon 1,3 ile yani doz fazlası olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.



#### 4. BULGULAR

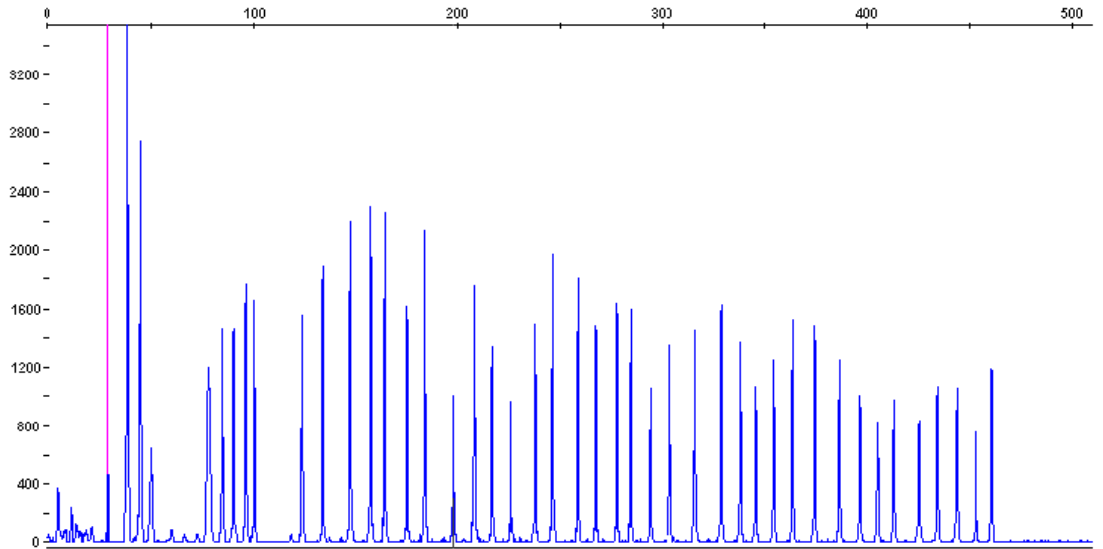
Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında meme kanseri tanısı almış 28 hastanın kan örneklerinin yanı sıra Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Onkoloji Anabilim Dalından bölümümüze yönlendirilen aynı aileye mensub 4 birey ve kontrol grubu olarak meme kanseri açısından sağlıklı 4 bireyin kan örneklerinde BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki delesyon ve duplikasyonlar, MRC Holland MLPA P002(lot 0409) , P087(lot 0609) ve P045(lot 0508) prob mikserleri kullanılarak MLPA yöntemi ile incelenmiştir. Hastalarımızın yaş ortalaması 52,92 'dir. Kontrol örneklerinin yaş ortalaması 53,27 ' dir.

Çalışma grubuna alınan hastaların kanlarından elde edilen DNA örneklerinde P002(BRCA1) , P087(BRCA1 Konfirmasyon), P045(BRCA2) meme kanseri kiti kullanılarak MLPA yöntemi çalışıldı. Çalışmada ABI 3130 cihazına yüklenen örnekler, Genemapper versiyon 4 programı kullanılarak incelendi. Bu programda elde edilen piklerin büyüklükleri kontrol hastaları ile karşılaştırılmak üzere Excel tabanlı Ezersoftware programına aktarıldı. Genemapper programında elde edilen piklerin boyutu öncelikli olarak DNA miktarıyla orantılıdır. Kaliteli ve yeterli miktarda (50- 500 ng) DNA elde edilemeyen örneklerde pikler düşük ve non-spesifik olabilmektedir.

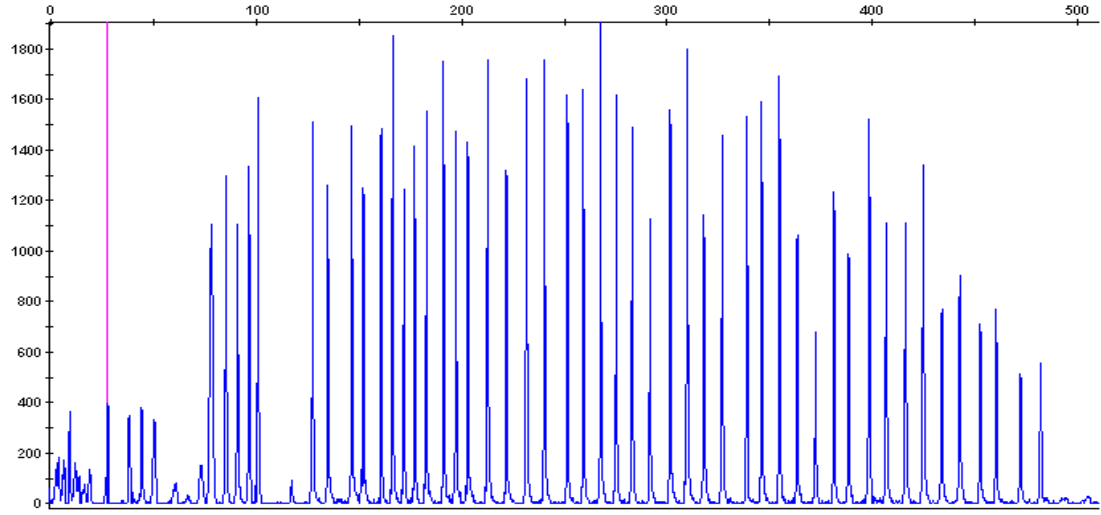


**Şekil 4.1.** Çalışmamızda kaliteli ve yeterli miktarda DNA elde edilemeyen bir örnekte gözlenen düşük ve non-spesifik pikler.

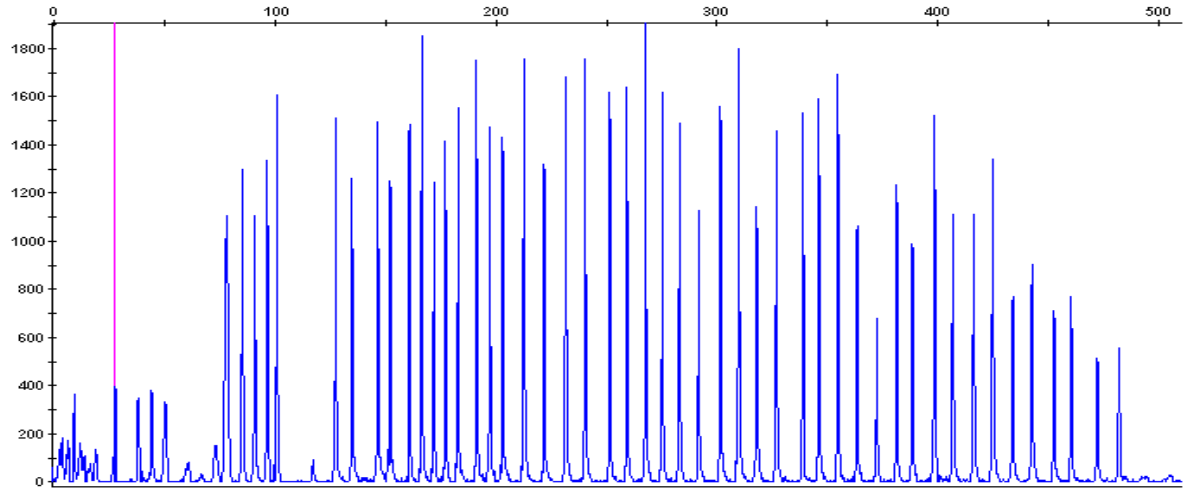
MLPA yönteminde kullanılan DNA miktarının düzeyini, prob piklerinin başlangıcında yer alan DQ ( DNA Quantity) fragmentlerine göre yapıldı. Bu pikler 64, 70, 76, 82 bp uzunluğunda, ligasyon olmasa bile görülen piklerdir. Elde edilen prob piklerine göre bu kontrol piklerini karşılaştırarak DNA miktarı belirlenebilmektedir. Buna göre bu kontrol pikleri elde edilen prob piklerine göre büyükse DNA miktarının yeterli olmadığını göstermekte, eğer bu kontrol pikleri prob piklerinden küçük veya görünmüyor ise DNA miktarının yeterli olduğunu göstermektedir. Her çalışmada sağlıklı olduğu bilinen , ailesinde meme ve over kanser öyküsü olmayan 4 bireyin periferik kanından elde edilen DNA örnekleri internal kontrol olarak çalışmaya dahil edildi. Bu kontrol sayısı MLPA yönteminin önerdiği sayıdır (70). Çalışmada kullandığımız kontrollere ait pik görüntüleri şekil 4.2. , şekil 4.3. ve 4.4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** BRCA1 P002 Prob miksinde ait kontrol örneğine ait pik görüntüleri.



**Şekil 4.3.** BRCA1 P087 Prob miksine ait kontrol örneğine ait pik görüntüleri.

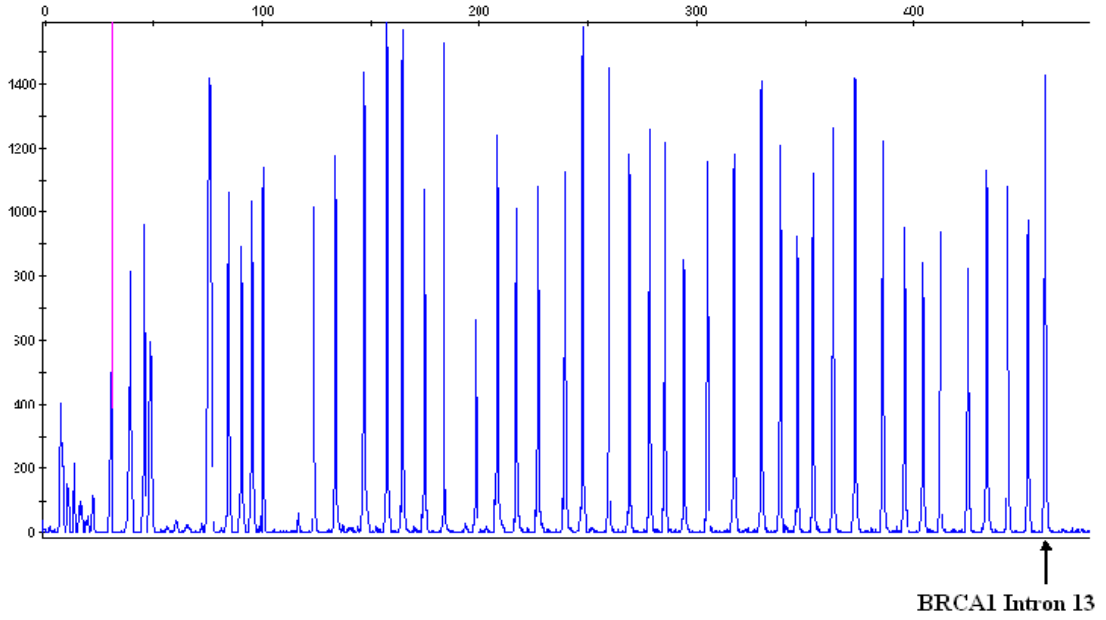


**Şekil 4.4.** BRCA2 P045 Prob miksine ait kontrol örneğine ait pik görüntüleri

Elde edilen piklerin fragmen uzunlukları Genemapper programında görülebilir. Bu pik alanları daha sonra Excel programına aktarılarak, varsa non-spesifik pikler silinerek kaydedilir. Daha sonra Excel formatına alınan pik alanları, yine Excel tabanlı çalışan Ezersoftware programında değerlendirmeye alınır. Bu programda kontrol pikleri ile hasta

pikleri karşılaştırılarak bir ortalama değeri elde edilir. Bu değeri 0.5'in altında ise delesyon yönünde, 1.8'in üstünde ise ampifikasyon yönünde değerlendirilir.

#### 4.1. BRCA1 Geninde Saptanan Bulgular

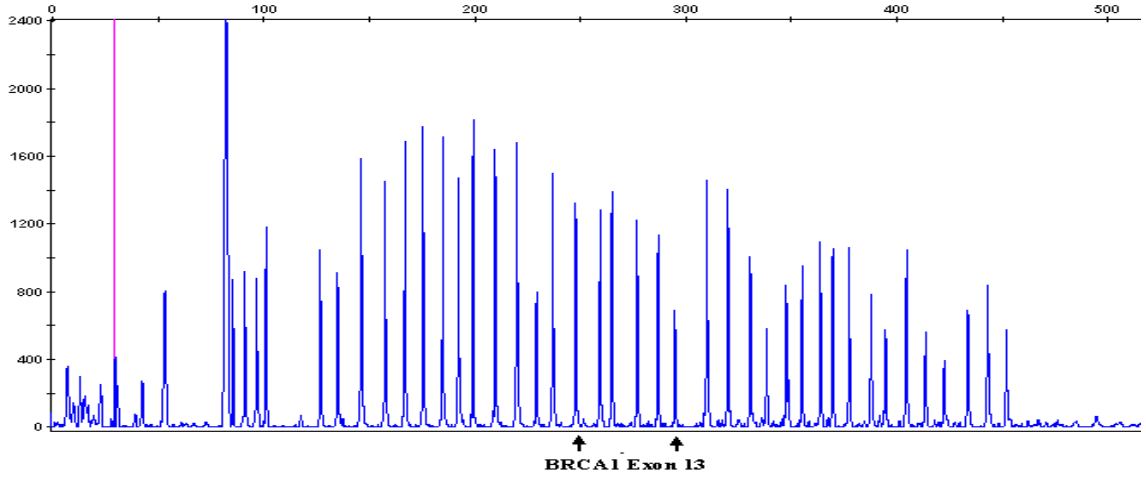


**Şekil 4.5.** BRCA1 geni Intron 13 BRCA1 probe 11283-L12001 ile tespit edilmiş artmış sinyal saptanan hastaya ait örnek MLPA pik görüntüleri.

Çalışılan hasta gruplarında BRCA1 intron 13 genomik bölgesinde ait saptanan artmış prob sinyalinin pik görüntüleri Şekil. 4.5' te verilmiştir. Kontrol örneklerine göre kıyaslandığında, BRCA1 intron 13 bölgesinde pik artışı rahatlıkla fark edilmektedir. Buradaki pik artışının kesin olarak duplikasyon olduğunun söylenebilmesi için probun hibridize olduğu intron 13 bölgesinin diğer bir moleküler yöntemle çalışılıp doğrulanması gerekmektedir. Hastalardan elde edilen piklerin area'ları kontrollerin area'ları ile karşılaştırılmak üzere Ezersoftware programına aktarılmış ve değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler Tablo 4.1 'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** BRCA1 P002 lotlu prob miksin ,BRCA1 intron 13’ e özgü 11283-L12001 probu ile tespit edilmiş , artmış pik sinyalinin Ezersoftware programında örnek değerlendirme sonuçları.

Prob uzunluğu(nt)	Salsa MLPA Probu	Kromozomal Pozisyon	Sonuç	Doğrulama
92	Synthetic Control probe		0,82	
127	Control probe 0797-L0093	5q31	0,79	
136	Control probe 0662-L0158	6p22	0,82	
148	BRCA1 probe 0763-L0268	exon 1A	0,87	
157	BRCA1 probe 0764-L0269	exon 1B	0,85	
166	BRCA1 probe 0765-L0270	exon 2	0,88	
175	BRCA1 probe 0826-L0341	exon 3	0,85	
184	BRCA1 probe 0767-L0272	exon 5	0,93	
198	Control probe 2946-L3265	7q31	0,85	
208	BRCA1 probe 0827-L0342	exon 6	0,84	
217	BRCA1 probe 0769-L0274	exon 7	0,89	
226	BRCA1 probe 1004-L0569	exon 8	0,89	
235	BRCA1 probe 1005-L0581	exon 9	0,90	
244	BRCA1 probe 0772-L0277	exon 10	0,99	
256	Control probe 0518-L0098	2q13	0,99	
268	BRCA1 probe 0830-L0345	exon 11	0,94	
277	BRCA1 probe 0774-L0279	exon 11	0,95	
286	BRCA1 probe 0775-L0280	exon 12	0,95	
295	BRCA1 probe 2603-L2074	exon 13	1,03	
304	BRCA1 probe 0833-L0349	exon 14	1,07	
316	Control probe 0495-L0303	12p12	0,99	
328	BRCA1 probe 0778-L0347	exon 15	1,06	
337	BRCA1 probe 0779-L0003	exon 16	1,10	
346	BRCA1 probe 0780-L0283	exon 17	1,08	
355	BRCA1 probe 0781-L0284	exon 18	1,05	
364	BRCA1 probe 0782-L0285	exon 19	1,05	
376	Control probe 0655-L0304	4q26	1,12	
388	BRCA1 probe 0783-L0356	exon 20	1,18	
398	BRCA1 probe 0783-L0356	exon 21	1,17	
406	BRCA1 probe 0785-L0288	exon 22	1,20	
418	BRCA1 probe 0786-L0289	exon 23	1,17	
427	BRCA1 probe 2831-L2260	exon 24	1,09	
436	Control probe 0596-L0083	11p13	1,23	
445	Control probe 0678-L0124	17q11.2	1,16	
454	Control probe 0673-L0117	3p21	1,26	
463	BRCA1 probe 11283-L12001	exon 13	1,32	Duplication Grey Zone 1,6100



**Şekil 4.6.** Intron 13 ‘ te BRCA1 P002 prob miksiyle artmış sinyal tespit edilen hastanın , BRCA1 P002 probunun confirmasyon probu olan BRCA1 P087 probu ile elde edilen MLPA sonucu.

BRCA1 P087 prob miksinin içinde bulunan ekson 13 ‘ e özgü problemlerin hepsi kodlanan bölge içine hibridize olmaktadır. P002 prob miksinde 11283-L12001 probu ile yakalanan artmış sinyal ise kodlanan bölge dışındadır. Bu prob dışındaki diğer bütün ekson 13 problemleri ekson 13 ‘ ün kodlanan bölgesine hibridize olmaktadır. Dolayısıyla P002 ekson 13 11283-L12001 probuyla elde edilen artmış pik sinyalinin confirmasyonu P087 prob miksiyle yapılamamıştır .

```

GCCTTAATTATTTTTCACTCCCTAGCTTTAAAAAGAAAATAACCAACTTCAAAAAGGACAT
CACAATAACATCAAGTCTATTTGGGGGAATTTGAGGATTTTTCCCTCACTAACATCATT
TGGAAATAAATTCATGGGCATTAATTCATGAATGTGTTAGATIAAAAAGGTGTTGAGCT
AGAACTTGTAGTTCCATACTAGGTGATTTCAATTCTGTGCTAAAATTAATTTGTATGAT
ATATTTTCATTTAATGGAAAGCTTCTCAAAGTATTTCAATTTCTTGGTGCCATTTATCGT
TTTTGAAGCAGGGGRTACCRTGCACCTAACCTGATAAAGCTCCAGCAGGAATGGCTG
AACTAGAGCTCTCTTAGAACAGCATGGGAGCCAGCCTTCTAACAGCTACCCCTCCATCA
TAACTGCTCTCTTCTGCCCTTGAGAGCCTGCGAATCCAGAACAAAGCCTATCGAARRAG
GTGTGATTTGTGGCCAAAACACTGATATCTTAAAGCAAAATTCCTTTCCTTCCCCTTTATCT
CCTTCTGAAGAGTAAGGACCTAGCTCCAAATTTTATGATCCTTGCTCAGCACATGGGTA
ATTATGGAGCCTTGGTTCTTGTCCCTGCTCACAACTAATATACCACTCAGAGGGACCCAA
GGCAGTCATTCATGTTGTGATCTGAGTACCTACAACAAGTAGATGCTATGGGGAGCCCAT
GGAAGATACATGGTATACAACATAGCTCTTGTCTTATTGGAAAGCTAAGTGGAAATGGGAGA
AATTGGTGACAGGCCAACCCCATAAATTTCAAAAAGCTATGAAAAAGTACTCAGACATATTC

```

**Kırmızı:** Sinyal artışı saptanan P002 Ekson 13 11283-L12001 probunun hibridizasyon bölgesi

**Turuncu:** P087 ekson 13 BRCA1 probe 3890–L03337

**Mavi ve Pembe:** P002 Ekson 13 BRCA1 probe 2603-L02074 ve P087 Ekson 13 BRCA1 probe 3411–L02074 problemleri hemen hemen aynı yere hibridize olmaktadır.

**Şekil 4.7.** BRCA1 P002 ve P087 prob mikslerinde bulunan ekson 13 ve intron 13 problemleri ve hibridizasyon bölgeleri.(Dizi [www.ensembl.com](http://www.ensembl.com))

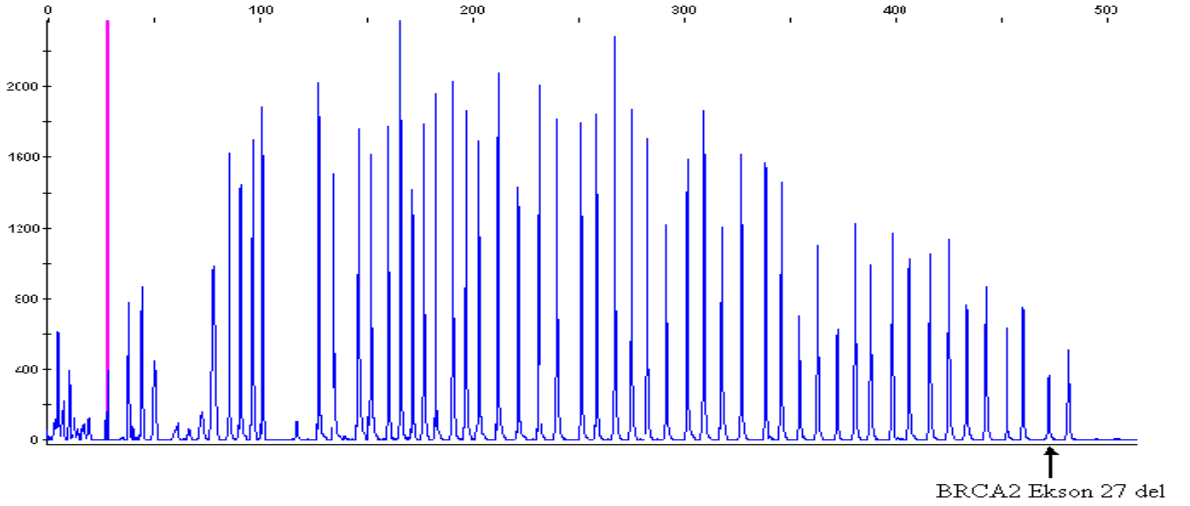
**Tablo 4.2.** BRCA1 P087 3890–L03337 probu ile P002 Ekson 13 genomik bölgesine ait pik sinyallerinin Ezersoftware programında örnek değerlendirme sonuçları

Prob uzunluğu(nt)	Salsa MLPA Probu	Kromozomal Pozisyon	Sonuç	Doğrulama
92	DD-control fragments		0,83	
130	Control probe 2269–L1761	01p36	0,80	
139	Control probe 2283–L1774	13q12 (BRCA2,	0,82	
148	BRCA1 probe 2807–L1268	Exon 1	0,82	
157	BRCA1 probe 2808–L2168	Exon 1	0,88	
166	BRCA1 probe 2810–L2239	Exon 2	0,87	
175	BRCA1 probe 2811–L2240	Exon 3	0,87	
184	BRCA1 probe 3398–L2254	Exon 18	0,86	
193	Control probe 3217–L2642	10q25	0,88	
199	BRCA1 probe 3823–L3286	Exon 22	0,97	
208	BRCA1 probe 2813–L2242	Exon 6	0,94	
217	BRCA1 probe 2814–L2243	Exon 7	1,03	
226	BRCA1 probe 2815–L2244	Exon 8	0,95	
235	BRCA1 probe 2816–L2245	Exon 9	0,93	
244	BRCA1 probe 3411–L2074	Exon 13	0,89	
256	Control probe 2279–L1770	13q12 (BRCA2,	1,01	
265	BRCA1 probe 3772–L3269	Exon 14	1,01	
277	BRCA1 probe 2818–L2247	Exon 11	0,94	
286	BRCA1 probe 2819–L2248	Exon 12	1,10	
295	BRCA1 probe 3890–L3337	Exon 13	1,07	
310	Control probe 1609–L1191	13q12 (BRCA2	1,11	
319	Control probe 0495–L3128	12p12	1,01	
328	BRCA1 probe 2821–L2250	Exon 15	1,07	
337	BRCA1 probe 2822–L2251	Exon 16	1,12	
346	BRCA1 probe 3395–L2241	Exon 5	1,13	
355	BRCA1 probe 3822–L3285	Exon 10	1,15	
364	BRCA1 probe 2826–L2255	Exon 19	1,09	
373	Control probe 2667–L2134	11q23	1,27	
380	Control probe 0655–L3268	4q26	1,11	
388	BRCA1 probe 2827–L2256	Exon 20	1,20	
397	BRCA1 probe 2828–L2257	Exon 21	1,15	
406	BRCA1 probe 3397–L2253	Exon 17	1,28	
415	BRCA1 probe 2830–L2259	Exon 23	1,23	
424	BRCA1 probe 2831–L2260	Exon 24	1,23	
436	BRCA1 probe 2100–L1269	Exon 1	1,22	
445	Control probe 2445–L1409	16p13	1,21	
454	Control probe 2355–L1415	9q34	1,16	

## 4.2. BRCA2 Geninde Saptanan Bulgular

Çalışılan örneklerde , BRCA2 geni için iki örnekte olası delesyona rastlanılmıştır. Aynı aileden anne ve kızda aynı mutasyonlar saptanmıştır. Saptanan delesyonun , doğruluğunun kesinleşmesi için farklı bir moleküler yöntemle konfirme edilmeleri gerekmektedir.Aşağıda ki bulgularda sırasıyla kız (Şekil 4.8) , (Tablo 4,3 ) ve anneye (Şekil 4,9) , ( Tablo 4,3 ) ait MLPA sonuçları verilmiştir. Her ikisinde de olası BRCA2 ekson 27 delesyonu saptanmıştır.

### 4.2.1. Kıza ait bulgular



**Şekil 4.8.** BRCA2 Ekson27 gen bölgesinde azalmış prob sinyali saptanan hastaya (kıza) ait örnek MLPA pik görüntüleri.

Çalışılan hasta gruplarında BRCA2 ekson 27 bölgesine ait olası delesyon saptanan hastanın pik görüntüleri Şekil. 4.8'de verilmiştir. Bu görüntülerde olası delesyon prob bölgelerinin karşılık geldiği pikler belirtilmiştir. Bu piklere göre olası delesyonlu bölgelerdeki düşmeler rahatlıkla görülebilmektedir. Yine hastalardan elde edilen piklerin alanları , kontrollerin alanları ile karşılaştırılmak üzere Ezersoftware programına aktarılmış ve değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler Tablo 4.3. 'te verilmiştir

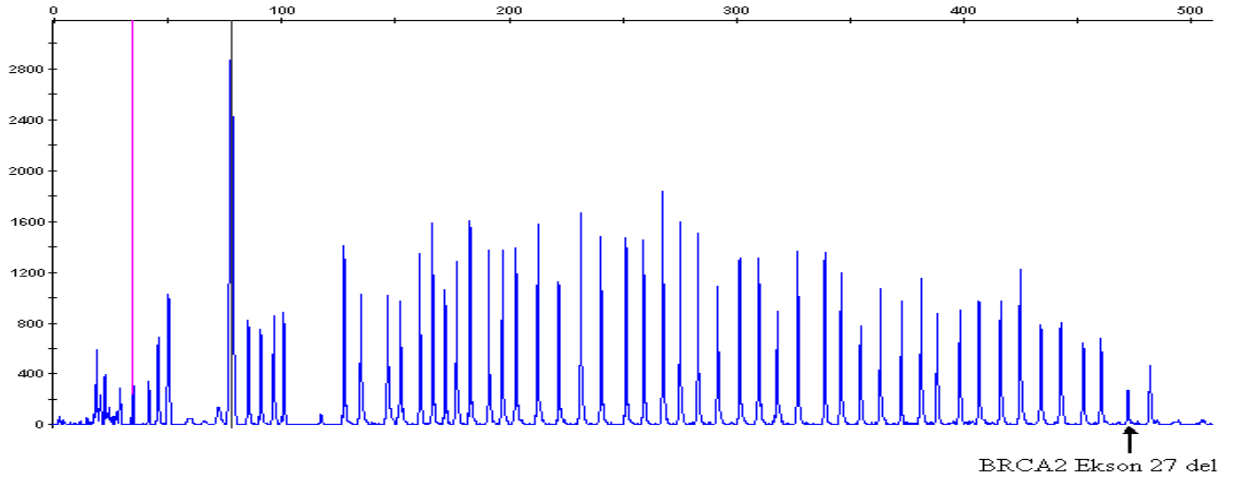


**Tablo 4.3.** BRCA2 geni ekson 27 bölgesine ait saptanan azalmış pik sinyallerin veya olası delesyonların Ezersoftware programında örnek değerlendirme sonuçları.

Prob uzunluğu(nt)	Salsa MLPA Probu	Kromozomal Pozisyon	Sonuç	Doğrulama
92	Synthetic Control probe		1,19	
130	Control probe 0797-L0463	5q31	1,27	
136	BRCA2 probe 2283-L1774	exon 1	1,11	
148	BRCA2 probe 2285-L1776	exon 1	1,07	
154	Control probe 2143-L1618	Exon 14	1,17	
161	BRCA2 probe 2486-L1985	20 Kb before B	1,18	
166	BRCA2 probe 02486-L01985	Exon 2	1,16	
170	BRCA2 probe 08898-L09587	exon 3	1,02	
17	BRCA2 probe 1599-L1181	exon 3	1,21	
184	Control probe 1217-L0694	4q35	1,22	
191	BRCA2 probe 09812-L10643	Exon 23	1,06	
198	BRCA2 probe 01600-L04671	exon 4	1,13	
202	BRCA2 probe 1601-L1183	exon 7	1,10	
211	Control probe 1344-L0555	12q23	1,13	
220	BRCA2 probe 1602-L1184	exon 8	0,97	
229	BRCA2 probe 1603-L1185	exon 9	1,08	
238	Control probe 0517-L0097	2q13	0,97	
247	BRCA2 probe 1604-L1186	exon 10	1,08	
256	BRCA2 probe 2279-L1770	exon 11	0,95	
265	CHEK2 probe 2578-L2040	CHEK2promotor	1,11	
274	BRCA2 probe 1606-L1188	exon 11 sonu	1,05	
283	BRCA2 probe 1607-L1189	exon 12	1,05	
292	Control probe 0990-L0567	12q13	1,03	
302	BRCA2 probe 2280-L1771	exon 13	0,99	
310	BRCA2 probe 1609-L1191	Exon 5	0,93	
318	BRCA2 probe 09296-L11090	Exon 27	0,95	
328	BRCA2 probe 1610-L1192	exon 15	1,00	
337	BRCA2 probe 1611-L1193	exon 16	0,93	
346	BRCA2 probe 4585-L3983	exon 6	0,90	
355	BRCA2 probe 2281-L1772	exon 17	0,97	
364	BRCA2 probe 1613-L1195	exon 18	0,82	
373	Control probe 0681-L0154	11q23	0,89	
382	BRCA2 probe 1614-L1196	exon 19	0,93	
391	BRCA2 probe 1615-L1197	exon 20	0,97	
401	CHEK2 probe 2579-L2041	exon 9	0,67	
409	BRCA2 probe 2069-L1970	exon 21	0,91	
418	BRCA2 probe 1617-L1199	exon 22	0,89	
427	Control probe 1240-L0787	11q12	0,81	
436	BRCA2 probe 1618-L1200	exon 24	0,90	
445	BRCA2 probe 5090-L4508	exon 25	0,89	
454	Control probe 2144-L1619	9 Kb after BRCA2	0,86	
463	BRCA2 probe 4586-L3984	exon 26	0,96	
475	BRCA2 probe 1621-L1203	exon 27	0,68	Delesion Grey Zone 0,5700
486	Control probe 1060-L0628	2q32	0,84	

Ezersoftware programından elde edilen bu Tablo 4.3'te, örneğe ait pik alanlarının değerlendirme sonuçları yer almaktadır. Bu tabloya göre son sütunda yer alan değerler, hasta ile kontrollerin karşılaştırılması sonucu elde edilen oranları göstermektedir. Bu oranlar değerlendirilirken 0.5'in altı kesin delesyon ve 1.8'in üstünde yer alan değerlerde kesin amplifikasyon yönünde değerlendirilir. Yine Ezersoftware programında yer alan bir özelliğe göre de 0.5- 0.7, 1.3- 1.8 arasındaki değerler gri zon olarak tanımlanmakta ve doğrulama işlemiyle yeniden incelenmektedir. Bu tabloda BRCA2 geninin eksonlarına karşılık gelen problardaki olası delesyon gösterilmiştir.

#### 4.2.2. Anneye ait bulgular



**Şekil 4.9.** BRCA2 Ekson27 gen bölgesinde azalmış prob sinyali saptanan hasta anneye ait örnek MLPA pik görüntüleri.

**Tablo 4.4.** Anneye ait BRCA2 geni 27 bölgesine ait saptanan azalmış pik sinyallerin veya olası delesyonların Ezersoftware programında örnek değerlendirme sonuçları.

Prob uzunluğu(nt)	Salsa MLPA Probu	Kromozomal Pozisyon	Sonuç	Doğrulama
92	Synthetic Control probe		0,77	
136	BRCA2 probe 2283-L1774	exon 1	0,97	
148	BRCA2 probe 2285-L1776	exon 1	0,77	
154	Control probe 2143-L1618	Exon 14	0,87	
161	BRCA2 probe 2486-L1985	20 Kb before B	1,12	
166	BRCA2 probe 02486-L01985	Exon 2	0,97	
170	BRCA2 probe 08898-L09587	exon 3	0,96	
177	BRCA2 probe 1599-L1181	exon 3	1,07	
184	Control probe 1217-L0694	4q35	1,21	
191	BRCA2 probe 09812-L10643	Exon 23	0,88	
198	BRCA2 probe 01600-L04671	exon 4	1,06	
202	BRCA2 probe 1601-L1183	exon 7	1,14	
211	Control probe 1344-L0555	12q23	1,07	
220	BRCA2 probe 1602-L1184	exon 8	0,94	
229	BRCA2 probe 1603-L1185	exon 9	1,08	
238	Control probe 0517-L0097	2q13	1,07	
247	BRCA2 probe 1604-L1186	exon 10	1,10	
256	BRCA2 probe 2279-L1770	exon 11	1,00	
265	CHEK2 probe 2578-L2040	CHEK2promotor	1,09	
274	BRCA2 probe 1606-L1188	exon 11 sonu	1,12	
283	BRCA2 probe 1607-L1189	exon 12	1,14	
292	Control probe 0990-L0567	12q13	1,17	
302	BRCA2 probe 2280-L1771	exon 13	1,09	
310	BRCA2 probe 1609-L1191	Exon 5	0,84	
318	BRCA2 probe 09296-L11090	Exon 27	0,76	
328	BRCA2 probe 1610-L1192	exon 15	1,14	
337	BRCA2 probe 1611-L1193	exon 16	1,01	
346	BRCA2 probe 4585-L3983	exon 6	0,97	
355	BRCA2 probe 2281-L1772	exon 17	0,62	
364	BRCA2 probe 1613-L1195	exon 18	1,09	
373	Control probe 0681-L0154	11q23	0,94	
382	BRCA2 probe 1614-L1196	exon 19	1,14	
391	BRCA2 probe 1615-L1197	exon 20	0,97	
401	CHEK2 probe 2579-L2041	exon 9	0,62	
409	BRCA2 probe 2069-L1970	exon 21	1,05	
418	BRCA2 probe 1617-L1199	exon 22	1,01	
427	Control probe 1240-L0787	11q12	1,09	
436	BRCA2 probe 1618-L1200	exon 24	1,19	
445	BRCA2 probe 5090-L4508	exon 25	1,05	
454	Control probe 2144-L1619	9 Kb after BRCA2	1,13	
463	BRCA2 probe 1621-L1203	exon 26	1,08	
475	BRCA2 probe 1621-L1203	exon 27	0,60	Kesin Delesion 0,7800
486	Control probe 1060-L0628	2q32	0,92	

Ezersoftware programından elde edilen bu Tablo 4.4'te, örneğe ait pik alanlarının değerlendirme sonuçları yer almaktadır. Oranlar değerlendirildiğinde , doğrulama hesabı sonucunda , ekson 27 için oran 0.8' in altında olduğu için kesin delesyon bulunmuştur. Bu sonuçlar incelendiğinde, meme kanserli hastaların kan örneklerinde BRCA1 geni için sadece bir hastada intron 13 bölgesine ait olası bir duplikasyon ve BRCA2 geni içinde olası ekson 27 delesyonu bulunmuştur. Bulunan BRCA2 delesyonu iki hastada saptanmıştır. Bu hastalar anne ve kız olmak üzere birinci dereceden akrabadırlar. Bulunan delesyonlar ve duplikasyonlar farklı bir moleküler yöntemle ,doğrulanmaları gerekmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Meme kanserinin büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanseri ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal meme kanserinde nadir gözlenen yüksek penetransa sahip meme kanserine yatkınlık genleri olarak BRCA1 ve BRCA2 genleri bulunmuştur. Bu genlerdeki germ hücre soyu mutasyonlarını içeren kadınların yaşamlarının bir döneminde meme kanseri geliştirme riski %50-80 arasında değişmektedir(34). BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonları, yüksek penetransa sahip ve hastalık için yüksek risk oluşturan faktörler olarak bir çok çalışmada gösterilmiştir(35,39 ,45 ). Bu iki kansere yatkınlık genlerinin germ hücrelerindeki mutasyonları ovaryum kanserlerinde %10, meme kanserlerinde %7 oranında dominant olarak kalıtım gösterir(45). Halen ailesel meme kanseri için en şiddetli etkiye sahip mutasyonları taşıyan bu iki gen, meme kanseri risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılmasında ön sırada yer almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda , özellikle BRCA1 geninin sporadik meme kanseri vakalarında inaktive olduğu ve bu mutasyonların meme kanseri tümörigenezisinde rolü olduğu gösterilmiştir. Hastalık oluşturan somatik BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları sporadik meme kanserlerinde seyrek görülmelerine rağmen , BRCA1 ve BRCA2' nin allelik kayıpları sporadik meme tümörlerinde de gözlenmiş ve kalıtsal olmayan meme kanserlerin gelişiminden de sorumlu tutulduğu çalışmalar vardır(8 , 24 , 27 ). Çalışmamızda kalıtsal ve sporadik meme kanserli olgularda , BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki patolojik değişimlerin yaklaşık %10 'undan sorumlu olan delesyon ve duplikasyonların hastalık gelişimindeki yerini araştırmak amaçlanmıştır(8).

Araştırma grubuna , İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında meme kanseri tanısı almış 28 hastanın kan örnekleri dâhil edilmiştir. Ayrıca meme kanseri açısından sağlıklı 4 kontrol bireyinin kan örnekleri de çalışmamızda kullanılmıştır. Meme kanserli olguların ve kontrol bireylerinin kan örneklerinde BRCA1 ve BRCA2 genlerinin eksonlarının ve intronların belirli bölgelerindeki delesyon ve duplikasyonlar MLPA yöntemiyle incelenmiştir. Çalışmamız sonucu BRCA1 geninin 13. intronunda , kodlanan bölgeden 159 nükleotid uzaklıkta bir bölgede olası bir duplikasyona rastlanmıştır. BRCA2 geninde ise meme kanseri tanısı konulmuş aynı aileden anne ve kızında olası ekson 27 delesyonuna rastlanmıştır.

### 5.1. Çalışma grubundan elde edilen olası BRCA1 Intron 13 duplikasyonun Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması

Puget ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada, ilk kez BRCA1 geninin 13. eksonunda 6 kb'lık bir duplikasyon saptamışlardır. Buldukları bu mutasyon (ins6kbEx13) kodlanan bölgede bir frameshift mutasyona neden olmakta ve mutasyon sonucu oluşan stop kodonu nedeniyle de prematür bir protein sentezlenmektedir. Bu duplikasyon ilk kez birbirleri arasında akrabalık bulunmayan, orijinleri Avrupaya dayanan 3 Amerikan ailede ve 1 portekizli ailede bulunmuştur. Haplotip verileri bu ailelerin, muhtemelen ortak atadan geldiğini göstermektedir. Sekans ve Long Range PCR analizleri sonucu bulunan kırık noktalarının denk geldiği noktalarda iki adet *Alu* sekansı bulunmuştur. Puget ve arkadaşları, söz konusu duplikasyonun bu *Alu* dizileri arasındaki olası bir homolog rekombinasyon olayı sonucu gerçekleştiği yorumunu getirmişlerdir(43). 2000 yılında BRCA1 Ekson 13 duplikasyonunun kurucu etkisinin olup olmadığını inceleme amacıyla arasında Türkiye' ninde bulunduğu 19 ülke ve 3.580 hastanın çalışıldığı ortak bir çalışma grubu kurulmuştur. Yapılan haplotip analizleri sonucu Belçika 'daki bir hasta dışında, anadili İngilizce olan ülkelerde bu mutasyona rastlanılmamıştır. Söz konusu mutasyon bulunan Belçikalı hastanın İngiltere köken aldığı bildirilmiştir. Bunun yanında çalışmaya dahil edilen ve ana dili İngilizce olan ülkelerde ve özellikle İngiltere' de bu mutasyona sık rastlanılmıştır. İngiltere 'de 6, Avustralya 'da 1, Amerika 'da ise 2 hastada bu mutasyona rastlanılmıştır. Araştırmacılar bu bulguları göz önünde bulundurduklarında, mutasyon saptanan hastaların ortak bir atadan köken aldıklarını ve BRCA1 ekson 13 duplikasyonunun (ins6kbEx13) kurucu bir mutasyon olduğu kararına varmışlardır (58).

2005 yılında Kremeyer ve arkadaşları ekson 13 duplikasyonunu (ins6kbEx13) İsveç popülasyonunda araştırmışlardır. Çalışmalarına 9 meme ve over kanserli aile dahil edilmiştir. Bütün örnekler, BRCA1 lokusunda bulunan 7 polimorfik mikrosatellit markır kullanılarak linkage analizi ile incelenmiştir. Linkage analizi sonucu bir ailede ekson 13 duplikasyonuna rastlanılmıştır. Bu aileye MLPA analizinde yapılmış ve aynı duplikasyon burada da gösterilmiştir(30). Dizileme yöntemi ile de duplikasyonun kırık noktalarını belirlemişlerdir. Belirlenen bu kırık noktaları, 1999 'da Puget ve arkadaşlarının buldukları ekson 13 duplikasyonuyla aynı kırık noktalarını olduğunu göstermişlerdir(30). Bu çalışmalarda bulunan ve İngiltere' den köken aldığı gösterilen

ekson 13 duplikasyonu (ins6kbEx13) BRCA1 geninin intron 12 , ekson 13 ve intron 13 bölgelerini kapsamaktadır (30 , 43 , 58 ) . Bizim çalışmamızda intron 13 probuna ait saptanan olası duplikasyon sadece kodlanan bölge dışında bulunmaktadır. Saptadığımız olası duplikasyon BRCA1 intron 13 bölgesinde bulunmaktadır ve sadece probun hibridize olduğu 40 nükleotidlik bir bölgede gözlenmiştir. Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda , saptadığımız olası duplikasyon Puget ve arkadaşlarının ilk kez 1999'da bulduğu ins6kbEx13 duplikasyonu değildir. Çalışmamızda olası duplikasyonun sadece intron bölgesinde yakalanması , bu bölgede olası splice noktalarını etkileyebileceği ve sonuç olarak hatalı protein yapımına neden olabilecek bir mekanizmayı akla getirmektedir. Çalışmamızda BRCA1 geninde olası duplikasyon bulunan bölgeye yakın dizilerde aday acceptor ve donör bölgeler bulunmaktadır. Bu bölgede oluşabilecek bir dizi değişikliği , alıcı ve verici bölgelerini de etkileyebilir. Son yıllarda yapılan meme kanseri çalışmalarında birçok BRCA1 patolojik splice varyantları saptanmıştır. Araştırmacılar bu varyantların , meme kanseri tümörigeneğinde önemli role sahip olabileceğini belirtmişlerdir. ( 17, 33, 63). Çalışmamızda elde edilen olası intronik duplikasyon verisi , splice varyantlarının meme kanseri gelişimine etkisinin araştırılması açısından ve diğer farklı yöntemlerle yapılacak çalışmalar için yol gösterici olabilir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki delesyonlar , duplikasyonlar , nonsense ve missense mutasyonlar gibi sekans varyasyonlarının çoğu hastalıkla ilişkili olarak kabul edilmiştir. Fakat bu tarz mutasyonlara oranla intronik varyantlar hakkında daha az bilgi bulunmaktadır(17, 33). Intronik varyantların hastalık üzerine etkileri ve klinik önemleri hakkında daha az çalışma yapılmıştır. Bu tür genetik değişimler genel olarak Variants of Unknown/uncertain Significance (VUS) olarak tanımlanmaktadır (10). Intron-ekson sınırlarındaki VUS' lar splicing dizilerini değiştirebilmekte ve splice doğruluğunu etkilemektedirler(10). Çalışmamızda intron 13 duplikasyonun görüldüğü bölgede splicing için gerekli olan verici ve alıcı dizileri olup olmadığı internet tabanlı splice site predictor adlı programla incelenmiştir. **Şekil 5.1** . Çalışmamızda saptadığımız duplikasyon , intron 13'teki acceptor ve donor dizilerinin yerlerini değiştirmesi sonucu bir splice hatasını tetikleyebilir. Hatalı splicing' te BRCA1 proteinin fonksiyonunu etkileyebilir böylece hastalık gelişimine neden olabilir. Çalışmamızda BRCA1 intron 13' te saptanan duplikasyonun splice bölgelerine etki edip etmediği veya herhangi bir

frameshift mutasyona neden olup olmadığı, dizileme veya protein çalışmalarıyla desteklenip , meme kanseri patogenezinin rolü farklı çalışmalarla araştırılabilir.

### Verici Bölge Tahminleri

[http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq\\_tools/splice.pl](http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/splice.pl)  
<http://www.cbs.dtu.dk/biolinks/pserve2.php>

Baş.	Son	Skor	Ekson	Intron
534		0.99	gaaaaag	tgtgtat
605	619	0.89	ctgaaga	taaggac
651	665	0.94	cacatgg	taattat

### Alıcı Bölge Tahminleri

Baş.	Son	Skor	Intron	Ekson
66			aattat	ctttaaagaaaataaccaa
590	630	0.66	cccctttatctccttctga	agtaaggacctagctccaac
936	976	0.97	taatgtgcttctgatttat	gggagagacatcctatacttc

```

CCCATATAAATAAAATGTTAACAGATTCATGCTAATTTTAAATATCGATAGTGTTTAAAT
GCCTTAATTATTTTTTCACTCCCTAGCTTTAAAGAAAATAACCAACTTCAAAAGGACAT
CACAATAACATCAAGTCTATTTGGGGGAATTTGAGGATTTTTTCCCTCACTAACATCATT
TGGAATAAATTCATGGGCATTAATTGCATGAATGTGGTTAGATTAAAAGGTGTTTCAGCT
AGAACTTGTAGTTCATACTAGGTGATTTCAATTCCTGTGCTAAAATTAATTTGTATGAT
ATATTTTCATTTAATGGAAAGCTTCTCAAAGTATTTCAATTTTCTGGTGCCATTTATCGT
TTTTGAAGCAGAGGGATACCATGCAACATAACCTGATAAAGCTCCAGCAGGAAATGGCTG
AACTAGAAGCTGTGTTAGAACAGCATGGGAGCCAGCCTTCTAACAGCTACCCTTCCATCA
TAAGTGACTCTTCTGCCCTTGAGGACCTGCGAAATCCAGAACAAGCACATCAGAAAAAG
GTGTGTATTGTTGGCCAAACACTGATATCTTAAGCAAATTCCTTTCCTTCCCCTTTATCT
CCTTCTGAAGAGTAAGGACCTAGCTCCAACATTTTATGATCCTTGCTCAGCACATGGGTA
ATTATGGAGCCTTGTTCTTGTCCCTGBTCACAATAATATACCAGTCAGAGGGACCCAA
GGCAGTCATTCATGTTGTCATCTGAGTACCTACAACAAGTAGATGCTATGGGGAGCCCAT
GGAAGATACATGGTATACAACATAGCTCTTGCTCTATTGGAAGCTAAGTGGAAATGGGAGA
AATTGGTGACAGGCAACCCATAATTTAGAAAAGCTATGAAAAAGTACTCAGACATATTC
CTTATAACACTGGTGTACATCACAAAGACCTATTTTAATGTGCTTCTGATTTATAGGGAG
AGACATCCTATACTTCAGGAACTGCACTTTGATCCACAGAAAGCCTAGTGATGTAGAG

```

**Şekil .5.1.** BRCA1 intron 13 'teki tahmini verici ve alıcı bölgeler . Sarı ile işaretlenen program aracılığıyla saptanan (score 0.99) alıcı dizileri. Kırmızı ile işaretlenenler ise olası verici bölgeler. Çalışmamızda bulunan olası duplikasyonun saptandığı dizi ise mavi ile işaretlenmiştir.



Krawczak ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada splice bölgelerinde gerçekleşen varyasyonların , bütün genetik hastalıkların yaklaşık %15' inden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Tüm BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının yaklaşık % 5'i splice bölgesi mutasyonlarıdır. Fakat bu mutasyonlardan sadece birkaçı mRNA işlenmesine etkisi açısından araştırılmıştır. BRCA1 ve BRCA2 splicing bölgelerindeki varyasyonlar , sentezlenen mRNA stabilitesine de etki etmektedir. Hatalı splicing sonucu bir prematur terminasyon kodonu oluşabilir. Oluşan premature mRNA , NMD (non-sense mediated mRNA decay) adı verilen ve mRNA'lardaki premature stop kodonunu tanıyan ve bu sayede mRNA' yı degrade eden yolağı aktive edebilir(29). Çalışmamızda intronik bölgede saptanan duplikasyonunun kontrolü farklı bir moleküler yöntemle doğrulandıktan sonra , hastalık gelişimine etkisinin olup olmadığı anlaşılması amacıyla protein ( ör: western blot) düzeyinde bir çalışma planlanabilir.

Chen ve arkadaşları 375 meme kanseri hastasında BRCA1 ve BRCA2 geninde , intron-ekson sınırına lokalize altışar intronik varyant saptamışlardır. Bulunan varyantların mRNA splicing 'ine ve ekspresyonuna etkisi araştırılmıştır. BRCA1 geni için aberran olarak splice olmuş , c.301-2delA , C.441+1G>A/IVS7+1G>A ve c.4986+6T>G olmak üzere 3 varyant , BRCA2 geni için ise 2 varyant saptamışlardır(10). BRCA1 ' de rastlanan bu varyantlar erken sonlandırma kodonu oluşmasına neden olmuşlardır. Bu yolla oluşan hatalı transkriptler NMD yolağı ile degrade edilmektedir(10, 29) , dolayısıyla BRCA1 ekspresyonu azalmaktadır. BRCA1 ekspresyonundaki azalma , meme kanseri patogenezinde etken bir rol oynadığı daha önceki çalışmalarla da gösterilmiştir.(39 ,57 , 60, 65). Çalışmamızda saptanan intronik duplikasyon sadece , MLPA probunun 40 nükleotidlik hibridize olduğu bölgede gözlenmiştir. Ayrıca MLPA yönteminin BRCA1 BRCA2 genleri için hazırladığı prob mikşlerinde nokta mutasyonlarına yönelik problemler yoktur. Dolayısıyla çalışmamızda kullanılan yöntem BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki nokta mutasyonlarını taranması açısından uygun değildir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki splice varyasyonlarının önemli bir kısmı , meme kanseri oluşumundan sorumlu tutulmuştur. Dolayısıyla BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taramalarına kanser spesifik splice varyasyonlarının dahil edilmesi hastalık tanı ve tedavisinde kolaylık sağlayacaktır. Yapılacak çalışmalarla saptanacak hotspot BRCA1 ve BRCA2 spesifik splice varyant problemleri , MLPA prob karışımının içine eklenebilir.

Lixia ve arkadaşları meme kanserli hücre hatlarından izole ettikleri BRCA1 geninde, dizileme yöntemi kullanarak 9 adet farklı splice varyantı bulmuşlardır. Ayrıca farklı dokularda farklı splice formlarına rastlanılmıştır. Bu sonuçlar ve önceki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda BRCA1 geninin, birçok splice varyantına sahip olduğu belirtilmiştir. BRCA1 geninin alternatif splicing mekanizmasının meme ve over kanserleri tümörigenezinde etkili bir rolü olabileceği hipotezini öne sürmüşlerdir(33). Çalışmamızda saptanan intronik varyantın splice mekanizmasına etkisi olup olmadığı, farklı metodlarla önce konfirme edilip daha sonra hatalı protein yapımına etkisi olup olmadığının anlaşılabilmesi için protein çalışmaları yapılabilir. Diğer doku veya kanser örneklerinde elde edilen proteinlerle karşılaştırılıp, kanser spesifik splice varyantı olup olmadığı ileri çalışmalarda araştırılabilir. Kanser spesifik splice varyantlarının saptanması sayesinde, moleküler temelli tedavi seçenekleri düşünülebilir(61,71). Araştırmacılar, BRCA1 geninde kanser spesifik splice varyantlarının bulunması sayesinde hastalığın tanısında, prognozunda ve tedavi esnasında tümör antijeni olarak kullanabileceğini düşünmüşlerdir.

Fortin ve arkadaşları BRCA1 intron 13 bölgesinde 66 nükleotidlik bir insersiyonun tahmini splice dizilerinde değişime neden olması sonucu oluşan alternatif BRCA1 transkriptini meme kanserli ve diğer kanser hücre hatlarında incelemişlerdir. Bu insersiyon sonucu oluşan alternatif BRCA1 transkripti, BRCA1 proteinin C-ucu bölgesindeki, BRCA2, MSH2, AR1 gibi proteinlerle etkileşimlerin gerçekleştiği AD1 (Trans aktivasyon domaini) bölgesine ekstra 22 amino asit eklemektedir. Ayrıca bu bölgeye yakın olan BRCA1 ve JunB etkileşim bölgesi de bu aminoasit değişiminden etkilenebileceğini düşünmüşlerdir. Bu veriler altında araştırmacılar, BRCA1 proteinin diğer hücre siklus ve DNA tamir proteinleriyle etkileşimin sağlandığı fonksiyonel bölgesinin değişime uğramasının, hastalığa neden olan veya hastalığa yatkınlık yaratabilecek sonuçlar doğurabileceğini belirtmişlerdir(18). BRCA1 proteini, çeşitli DNA tamir ve hücre siklus düzenlenmesinde görevli birçok proteinle etkileşim halinde olup, bunlarla kompleks oluşturduğu bilinmektedir(18, 32, 42, 64, 65). Saptadığımız olası duplikasyon ve Fortin ve ark. bulduğu 66 nükleotidlik duplikasyon farklı bölgelerde lokalizedir. Çalışmamızda saptanan intronik duplikasyon sonucu oluşabilecek hatalı protein, hücre için hayati öneme sahip bu komplekslerin

oluşmasına engel olabilir. Sonuç olarak bu durum hücre için kanserleşme gibi kritik sonuç doğurabilir.

## **5.2. Çalışma grubundan elde edilen olası BRCA2 Ekson 27 delesyonunun Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması**

BRCA2 proteini DNA çift kırıklarının , homolog rekombinasyon yoluyla tamirinde görev aldığı bilinmektedir(1, 25, 31, 38, 42). BRCA2 proteini , bu fonksiyonunu RAD51 adı verilen rekombinaz protein ile birbirlerine bağlanarak yerine getirir(4,11, 37). BRCA2 proteini , RAD51 ile etkileşimini iki özel domaini üzerinden gerçekleştirir. Bu domainlerden biri , BRCA2 geninin 11. eksonu tarafından kodlanan , 8 adet BRC aminoasit tekrarlarıdır(11, 38 ,51). Bu bölge , BRCA2 proteinin RAD51 ile bağlanmasını ve direk etkileşimini sağlayan önemli bir yapıdır. RAD51 ile etkileşimden sorumlu diğer bölge ise ekson 27 tarafından kodlanan C-terminal bölgesidir(11, 16, 37). DNA hasarına yanıt olarak BRCA2 ve RAD51 tamir bölgesinde birbirleriyle birleşerek bir kompleks oluştururlar. BRCA2 proteinin bu işlem sırasında en önemli görevleri , RAD51 ' in tamir bölgesine lokalizasyonunu sağlayarak ve RAD51 'in tamir edilecek DNA ' ya bağlanmasını sağlamaktır. BRCA2 proteininden yoksun hücreler bu tamir yanıtını gerçekleştiremezler. BRCA2 ' den yoksun hücrelerde , BRCA2-RAD51 protein kompleksinin eksikliğinden kaynaklanan homolog rekombinasyon defektlerine bağlı olarak artmış genom instabilitesi gözlenir(37, 38). Özellikle iki protein arasındaki etkileşimden sorumlu BRC domaini ve C-terminal bölgelerini kodlayan ekson 11 ve 27 ' deki gerçekleşebilecek mutasyonlar , BRCA2-RAD51 tamir kompleksinin oluşamamasına ve tamir sürecinin doğru bir şekilde gerçekleşememesine sebep olabilir(25). Bu DNA kırıklarının tamir edilememesi veya yanlış bir şekilde tamir edilmesi kanserin ortaya çıkmasına neden olabilir(11, 16, 27). Çalışmamızda saptanan olası ekson 27 delesyonu sonucu hatalı bir şekilde sentezlenen veya sentezlenemeyen C-terminal domaini RAD51 ve BRCA2 proteinin birbirlerine bağlanmalarını engelleyebilir(14). DNA çift kırıklarının rekombinasyonel tamirinden meydana gelen hatalar , genom instabilitesini artırarak kromozomal bozukluklara neden olur ve bu durum tümörigenesisi tetikleyebilir (48).

Davies ve arkadaşları BRCA2 ekson 27 tarafından kodlanan C-terminal domaini ve RAD51 proteinin etkileşimini inceleme amaçlı bir çalışma yaptılar. Yaptıkları protein analizlerinde BRCA2 ekson 27 tarafından kodlanan peptidlerin

spesifik olarak RAD51 nükleoprotein filamentleri tanıyıp , direk etkileşimde bulduklarını bildirmişlerdir. Bu verilere ek olarak BRCA2 C-terminal domaini , RAD51 nükleoprotein filamentlerinin tek iplikli DNA' ya bağlanmasını düzenlediğini , BRC motiflerinin fonksiyonlarını düzenlediğini ortaya koymuşlardır (11, 31, 38, 51). BRCA2 C-terminal domaninin , G2-M geçişinde fosforile olması sonucu , yani RAD51 bağlantısının engellenmesiyle rekombinasyonun sonlandırıldığını öne sürmüşlerdir.(11,16). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda saptanan olası ekson 27 delesyonu , BRCA2 ve RAD51 proteinlerinin etkileşimlerinin gerçekleştiği C-terminal peptidlerinin sentezinde hatalara neden olabilir. Oluşacak bu hatalar , BRCA2 ve RAD51 kompleksinin oluşmasını engelleyebilir ve DNA çift kırık tamirlerinde hatalara neden olabilir. Bu sayede artan genomik instabilite sonucu hücre kanserleşmeye gidebilir( 4,25).

Esashi ve arkadaşları , BRCA2 proteinin RAD51 ile direk etkileşiminden sorumlu C-terminal bölgesinin siklin-bağımlı kinazlarla fosforile edildiğini göstermişlerdir. Bu fosforilasyon rekombinasyon olayının gerçekleştiği S fazında düşük seviyelerde olduğu ve mitozun ilerleyen safhalarında yani rekombinasyonun gerçekleşmediği veya az seviyede olduğu durumlarda arttığını gözlemlemişlerdir. Bu modifikasyonun BRCA2 C-terminal ve RAD51 etkileşimini engellediğini belirtmişlerdir. Bu sayede rekombinasyonun sonlandırıldığı belirtilmiştir(16, 72). Çalışmamızda saptanan ekson 27 delesyonu C-ucu peptid yapısını değiştirebileceğinden, bu bölgenin rekombinasyon düzenleyici rolünü de etkileyebilir ve bu durum kanserde hücre bölünme kontrolünün kayboluşuna katkıda bulunan farklı bir mekanizma olabilir.

## SONUÇ

Çalışmamızda 32 meme kanserli vakanın kan örneklerinde ve 4 meme kanseri açısından sağlıklı bireyin kan örneklerinde, BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki delesyon ve duplikasyonlar , MLPA yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Meme kanserli bireylerin kan örneklerinde BRCA1 ve BRCA2 genlerinin belirli ekson ve intron bölgeleri herhangi bir delesyon veya duplikasyon olup olmadığını saptamak ve bu genlerin , meme kanseri moleküler patolojisi ile ilişkisini ortaya koymak amaçlanmıştır. Çalışmamız sonucunda; bir hastanın BRCA1 geninin 13 ' üncü intronunda olası bir duplikasyona, aynı aileye mensub , meme kanseri tanısı almış anne ve kızın her ikisinde de BRCA2 geni ekson 27 delesyonuna rastlanılmıştır.

Başarılı bir MLPA çalışması için kullanılacak DNA miktarının ve kalitesinin önemli olduğu çalışmamızda da gösterilmiştir. Özellikle MLPA reaksiyonuna girilen DNA örneklerinin eşit oranda olması , sonuçların güvenilirliği ve doğruluğu açısından çok önemlidir. Saptanan olası delesyon ve duplikasyonlar diğer bir moleküler yöntemle(ör : sekanslama ) çalışılıp doğrulanması gerekmektedir.

MLPA'yı multiplex gen dosaj analizi yapabilen, PCR temelli, tek reaksiyonda 50'ye yakın gen bölgesi inceleyebilen kolay bir yöntem olarak tanımlayabiliriz. Yöntemin kısa sürede bu kadar çok gen bölgesini inceleyebilmesi çalışmamızda da süre ve incelenen bölgeler açısından büyük kolaylık sağlamıştır.

Sonuç olarak MLPA yönteminin meme kanseri taramasında kullanılacak ucuz, hızlı ve güvenilir sonuçlar verebilecek bir teknik olduğu görülmüştür. MLPA tekniği son dönemlerde geliştirilen en önemli moleküler tekniklerden birisidir ve kanser taramalarında da rahatlıkla kullanılacak bir yöntemdir.

## 7.KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abaji , C., Cousineau , I., and Belmaaza , A., 2005 , BRCA2 Regulates homologous recombination in response to DNA damage : Implications for genome stability and carcinogenesis , *Cancer Res* 65 4117-4125.
2. Agata , S . , Dalla Palma , M., Callegaro , M ., Scaini , M.C ., Menin , C ., Ghitto , C ., Nicoletto ., Zavagno , G ., Chieco-Bianchi , L., D'Andrea , E ., Montagna , M., 2005 , Large Genomic deletions inactivate the BRCA2 gene in breast cancer families , *J. Med. Genet* , 1-5.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.,2002, *Molecular Biology Of The Cell*, Fourth Edition.
4. Ayoub, N. And Rajendra,E., 2009,The Carboxyl Terminus of BRCA2 Links the Disassembly of RAD51 Complexes to Mitotic Entry, *Current Biology* 19, 1075-1085p
5. Badache, A. and Gonçalves, A., 2006, The ERBB2 signalling network as a target for breast cancer therapy, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 11, 13–25 p.
6. Berchuck A, Heron KA, Carney ME, et.al., 1998 , Frequency of germline and somatic BRCA1 mutations in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.*;4: 2433-2437.
7. Bertwistle , D ., and Ashworth , A ., 1999 , The pathology of familial breast cancer , How do the functions of BRCA1 and BRCA2 relate to breast tumour pathology ? , *Breast Cancer Research* 4 .
8. Breast Cancer Linkage Consortium , 1997 , Pathology of Familial breast cancer : differencews between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases , *The Lancet* vol 349 ;1505-1509
9. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K , Califano J et al. , 1995 ,Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary breast carcinoma. *Nature Genet* 11:210-212,.
10. Chen, X., N. Truong, Weaver, J., Bove, B., Cattie, K., A. Armstrong, B., Daly, M and K. Godwin , A., 2006 , Intronic Alterations in BRCA1 and

### **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- BRCA2: Effect on mRNA Splicing Fidelity and Expression , Human Mutation 27(5),427-435,
11. Davies , O. and Pellegrini, L., 2007, Interaction with the BRCA2 C-Terminus Protects RAD51-DNA Filaments from Disassembly by BRC Repeats, Nat Struct Mol Biol. ,475-483p.
  12. Dickson RB, Lipman ME, Oncogenes and Suppressor Genes In: Disease of the Breast Ed.Harris JR, Morrow M, Lippman ME, Hellman S., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-NewYork 1996,p:221-235.).
  13. Domchek , S.M ., Simon , M.S ., Burbidge , L.A ., T. Trost , J ., Deffenbaugh , A.M ., Roa , B.B , 2007 , Pathologic predictors of BRCA1/BRCA2 mutations in African-American women with early-onset breast cancer. Journal of Clinical Oncology Vol.25 ,No.18s.
  14. Donoho, G., Brenneman, Cui ,T., Donoviel., D , Vogel.,H, Goodwin., E , Chen., D , Hasty ., P , 2003, Deletion of BRCA2 Exon 27 causes Hypersensitivity to DNA crosslinks, chromosomal instability , and reduced life span in mice , Genes, Chromosomes & Cancer 36: 317-331.
  15. Egeli , U., Cecener G., Tunca , B., and Tasdelen , I., 2006 , Novel Germline BRCA1 and BRCA2 Mutations in Turkish Women with Breast and/or Ovarian Cancer and Their Relatives , Cancer Investigation 24: 484- 491.
  16. Esashi, F. And Christ, N., 2005, CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair, Nature vol434 , 599-604.
  17. Fattaneh A.Tavassoli, Peter Devilee. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, Lyon, IARC Pres,2003.
  18. Fortin J, Moisan AM, Dumont M, Leblanc G, Labrie Y, Durocher F, Bessette P, Bridge P, Chiquette J, Laframboise R, Lépine J, Lespérance B, Pichette R, Plante M, Provencher L, Voyer P, Simard J., 2005 , A new alternative splice variant of BRCA1 containing an additional in-frame exon., Biochim Biophys Acta. 15;1731(1):57-65.
- Foulkes , D., Ingunn , M., Pierre , O ., Begin , L., Goffin , J., Wong , N., Trudel , M., Akslen , L., 2003 ,Germline BRCA1 Mutations and a Basal Epithelial

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Phenotype in Breast Cancer , Journal of the National Cancer Institute ,Vol. 95 ,No.19 ,1482.
19. Gad S, Caux-Moncoutier V, Pages-Berhouet S, 2002, Significant contribution of large BRCA1 gene rearrangements in 120 French breast and ovarian cancer families. *Oncogene*, 2002;21:6841-6847.
  20. Güveloğlu, E ., Meme, Over Ve Tuba Karsinomlarında BRCA1 ve BRCA2 Protein Ekspresyonlarının Prognostik Önemi: İmmünohistokimyasal Ve Klinokopatolojik Çalışma, 2006 , U. Tez
  21. Hogervorst , F ., Nederlof , P ., Gille , J ., McElgunn , C ., Grippeling , M ., Pruntel , R ., Regnerus , R ., van Spaendonk , R ., Menko , F ., Kluijt , I ., Domering , C ., Verhoef , S ., P. Scouten , J ., van't Veer , L ., and Pals , G ., 2003 , Large Genomic Deletions and Duplications in the BRCA1 Gene Identified by a Novel Quantitative Method , *Cancer Research* 63 : 1449-1453 .
  22. İlvan, (36)Ş., 2006, Meme patolojisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 54, 65-71 p.
  23. Janatova , M., Zikan , M., Dunder , P., Matous , B., and Pohlreich , P., 2005 , Novel Somatic Mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumours , *Human Mutation Brief* 1-7.
  24. Jasin , M ., 2002 , Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis:the BRCA connection , *Oncogene* 21 , 8981-8993.
  25. Kemomarsi K, Conte D.J, Toyofuku W, Fox MP, Scambia G. Deregulation of cyclin-E in breast cancer. *Oncogene*:11:941-950, 1995.
  26. Kenemans , P ., Vertsraeten , R.A ., Verheijen , R.H.M ., 2004 , Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer , *Maturitas , The European Menopause Journal* 49: 34-43.
  27. Kerr, P., Ashworth , A., , 2001 New complexities for BRCA1 and BRCA2., *Current Biology* 668-676.
  28. Krawczak , M, Reiss J., Cooper, DN., 1992 , The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41–54.



## KAYNAKLAR DİZİNİ ( devam ediyor)

29. Kremeyer , B., Soller , M., Lagerstedt , K., Maguire , P., Mazoyer , S., Nordling , M ., Wahlström , J., and Lindblom , A ., 2005 , The BRCA1 Exon 13 duplication in the Swedish population , Familial Cancer 4 : 191-194.
30. Larminat ,F., Germanier , M., Papouli ,E., Defais , M., 2002, Deficiency in BRCA2 leads to increase in non-conservative homologous recombination , Oncogene 21,5188-5192p
31. Liu , Y ., West , S., 2002, Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair , Breast Cancer Res 9-13.
32. Lixia, M., Zhijian, C., Chao, S., Chaojiang ,G and Congyi Z., Alternative splicing of breast cancer associated gene BRCA1 from Breast Cancer Cell Line , 2007 Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 40, No. 1, , pp. 15-21
33. Marcus , JN ., Watson , P ., Page , DL ., Narod , SA ., Lenoir , GM ., Tonin , P ., Linder-Stephenson , L ., Salerno , G ., Conway , TA ., Lynch , HT ., 2003 , Hereditary breast cancer : pathobiology , prognosis , and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. Abstract
34. Mazoyer , S ., 2005 , Genomic Rearrangement in the BRCA1 and BRCA2 genes , Human Mutation 25 : 415-422.
35. Miao , L., Cao , Z., Shen ., Gu , M., Liu , W., Li , Hua ., and Zheng , C., 2008 , Cloning and Functional Identification of two novel BRCA1 splicing variants, Biochemistry On-line Papers in Press , Vol 73 , No. 11 , 1513-1523.
36. Ochiai, K., Morimatsu , M., Yokshikawa , Y., Syuto .,Bunei.,and Hashizume K., 2004 , BRCA2 C-Terminus interacts with RAD51 and contributes ., Biomedical Research 25 269-275p.
37. Orelli , B., Bishop , D., 2001 , BRCA2 and homologous recombination , Breast Cancer Res : 294-298.
38. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenic and tumorsupressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapetic applications. Oncologist. 9:361-77,2004).

## KAYNAKLAR DİZİNİ ( devam ediyor)

39. Perren TJ. CerbB2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 63:328-332,1991 ) Kurebayashi JJ. Biological and clinical significance of her2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 8(1):45-51,2001).
40. Chappiuis , Nethercot , V ., Foulkes , WD ., 2000 , Clinico-pathological characteristics of BRCA1 and BRCA2 -related breast cancer , Wiles -Liss , Inc. 301-305
41. Powell S., Kachnic L ., 2003 , Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation , *Oncogene* , 5784-5791
42. Puget , N., Sinilkova , O., Stoppa-Lyonnet , Audouinaud , C., Pages , S., Lynch , H ., Goldgar , D ., Lenoir , G., and Mazoyer , S., 1999 , An Alu-Mediated 6-kb Duplication in the BRCA1 Gene: A new founder mutation? , *Am. J. Genet.* 64: 1999.
43. Puget N., Gad, S., Laure Perrin-Vidoz<sup>1</sup>, Olga M. Sinilnikova, Dominique Stoppa-Lyonnet, Gilbert M. Lenoir and Sylvie Mazoyer , 2002, Distinct BRCA1 Rearrangements Involving the BRCA1 Pseudogene Suggest the Existence of a Recombination Hot Spot, April Pages 858-865.
44. Rebeck , T., Couch J., Kant , J., Calzone , K., Deshano , M., Peng , Y., Chen , K., Garber J.,and Weber , B., 1996 , Genetic Heterogeneity in hereditary breast cancer: Role of BRCA1 and BRCA2 ., *Am . J. Hum. Genet.* 59 : 547-553.
45. Ripperger , T., Gadzicki , D ., Meindl , A ., and Schlegelberger , B., 2009 , Breast Cancer susceptibility: Current knowledge and implications for genetic counselling , *European Journal of Human Genetics* 17 , 722-731.
46. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat.Genet.*, 1996;14:185-187.
47. Saeki ,H., Siaud ,N., Christ ,N., Wiegant ,W., van Buul, Paul , Han, Mingguang., Zdzienicka ,Malgorzata ., Stark , Jeremy.,and Jasin ,M., Supression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions , *PNAS* vol .103 8768-8773p
48. Santarosa , M ., Dolcetti , R., Magri , Magri , M ., Crivellari , D., Tibiletti , M ., Gallo , A ., Tumolo , S ., Puppa , L., Furlan , D ., Boiocchi , M ., and Viel

### **KAYNAKLAR DİZİNİ ( devam ediyor)**

- 1999 , BRCA1 and BRCA2 Genes : Role in Hereditary Breast and Ovarian Cancer in Italy , Int. J. Cancer :83 5-9 .
49. Schouten, J.P., McElgunn, C.J, Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G., 2002, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Research*, 30-57 p.
  50. Shivji , M., Davies , O., Savill , Jane ., Bates ,D., Pellegrini , L., and Venkitaraman , 2006 , A region of human BRCA2 containing multiple BRC repeats promotes RAD51-mediated strand Exchange , *Nucleic Acids Research* Vol.34, No.14 , 4000-4011
  51. Smith D, Toft D. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11,1993)
  52. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Maron, J.S., Nobel, A., Shibin,D., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lonning, P.E.,Brown, P.O., Borresen-Dale, A. and Botstein, D., 2003, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *PNAS*,100,8418-8423 p.
  53. Sorlie, T., Wang, Y., Xiao, C., Johnsen, H., Naume, B., Samaha, R. and Borresen –Dale, A., 2006, Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms, *BMC genomics*, 7, 1-15 p.
  54. Strachan, T. and Read, A. P., 1999, *Human Molecular Genetics* 2, 2nd Edition, Garland Science, BIOS Scientific Publishers,USA.
  55. Stratton JF, Gayther SA, Russell P, et.al. Contribution of BRCA1 mutations to ovarian cancer. *N Engl J Med*, 1997;336:1125-1130.
  56. Teng , L., Zheng , Y., Wang , H., 2008, BRCA1/2 associated hereditary breast cancer , *Journal of Zhejiang University* , 1862-1783
  57. The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group , The exon 13 Duplication in the BRCA1 gene is a founder mutation , *Am. J. Hum. Genet.* 67:207–212, 2000
  58. Thorlacius S, Struewing JP, Hartge P, et. al. Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. *Lancet*, 1998;352:1337-1339.

### **KAYNAKLAR DİZİNİ ( devam ediyor)**

59. Turnbull , C., and Rahman , N., 2008 ,Genetic Predisposition to Breast Cancer : Past , Present , Future , Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 9: 321-345
60. Turner, N., Tutt , A., and Ashworth, A., 2005 , Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours , Current opinion Pharmacology 388-393 .
61. van de Vijver , Marc ., 1999 , The pathology of familial breast cancer The pre- BRCA1/BRCA2 era: historical perspectives , Breast Cancer Research vol1 no : 27-30
62. van Der Burg B, De Groot RB ,Isbruk L, Kruijer W, DeLaat SWJ. Oestrogen directly stimulates growth factor signal transduction pathways in human breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol 43:111-115,1992)
63. Venkitaraman , A., 2001 , Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage , Journal of Cell Science , 3591-3598
64. Venkitaraman , A., 2002 , Cancer Susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2 ,Cell , Vol 108 , 171-182
65. Vreeswijk , M., Kraan , J., van der Klift H., Vink ,Geraldine ., Cornelisse Cees ., Wijnen ,J ., Bakker , E., Asperen ., and Devilee ,2008, Intronic Variants in BRCA1 and BRCA2 that affect RNA splicing can be reliably selected by splice-site prediction programs , Human genom variation society , 107-114p
66. Welch ,P., Owens , K., King , Mary-Claire ., Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2 Review , 2000 , TIG volume 16 , no.2 69-74p .
67. Wenstrup , R ., Judkins , T ., Eliason , K ., Schoenberger , J ., Rajamani , S ., Frye , C.A ., Genetic testing for large genomic deletion and duplication mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes for hereditary breast and ovarian cancer , Tumor Biology and Human Genetics vol. 25 no 18
68. Werness BA, Ramus SJ, Whittemore AS, Garlinghouse-Jones K, et.al. Histopathology of familial ovarian tumors in women from families with and without germline BRCA1 mutations. Hum Pathol., 2000;31:1420-1424.
69. [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)
70. Yang , X., and Lippman , M., 1999, BRCA1 and BRCA2 in breast cancer, Breast Cancer and treatment 54, 1-10 .

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

71. Zheng, L., Li , S., Boyer , T., Lee , W., 2000, Lessons learned from BRCA1 and BRCA2 , Oncogene , 6159-6175.

**Tunç TUNCEL**

**Kişisel Bilgi**

**Uyruk:** T.C

**Doğum Yeri ve yılı:** Ankara/1983

**Adres:** Yenibağlar Mah. Akarlı Sokak Atıcı Apt. 11/3

**e-mail:** [tunctnel@gmail.com](mailto:tunctnel@gmail.com)

**Eğitimi**

**Lise:** Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi , Ankara

**Lisans:** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü  
Eskişehir

**Yüksek Lisans:** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik  
Anabilimdalı, Eskişehir

**Bildiği diller**

**İngilizce:** Çok iyi seviyede