

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**MLPA TEKNİĞİ İLE MEME KANSERLİ HASTALARDA,  
BRCA1 VE BRCA2 GENLERİNDE  
DELESYON VE DUPLİKASYONLARIN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İbrahim TURAN**

**TRABZON-2008**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BIYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**MLPA TEKNİĞİ İLE MEME KANSERLİ HASTALARDA,  
BRCA1 VE BRCA2 GENLERİNDE  
DELESYON VE DUPLİKASYONLARIN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İbrahim TURAN**

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 04.01.2008  
Sınav Tarihi : 24.01.2008  
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Orhan DEĞER  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fazıl AYDIN  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. S. Caner KARAHAN  
Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

**TRABZON-2008**

## ÖNSÖZ

Kanser terimi, zamanının önemli tıp otoritelerinden Bergamalı Galen' in (M.S. 131-203) isim verdiği ve yakaladığı zaman sıkı kıskaçları ile bırakmayan Cancer yani yengeç kelimesinden köken almıştır. Adından da anlaşılacağı gibi bu hastalık tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli sağlık problemlerinden biridir. Meme kanseri ise kadınlar arasında en sık görülen, yüzeyle bir organ olduğu için de çalışma alanı çok eskilere dayanan bir kanser tipidir.

İşte bu sebeplerden dolayı hazırlamış olduğum yüksek lisans tezimin bana kazandırdığı bilgi birikiminin yanı sıra bu konuda çalışanlara ve bu konuya ilgi duyanlara da katkısı olabileceği düşüncesindeyim.

Yüksek lisans eğitimim süresince, akademik açıdan gelişimime büyük katkısı olan, danışman hocam anabilim dalımız başkanı Sn. Prof. Dr. Orhan DEĞER ve bölümümüzde bulunan tüm hocalarıma, Dr. Kağan KILINÇ ile Arş Gör. Ayşegül UZUN başta olmak üzere bölümümüzde çalışan, eğitim gören tüm arkadaşlarıma ve eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen aileme yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

**İbrahim TURAN**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VII
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Meme Kanseri	3
2.1.1.Meme Kanseri Epidemiyolojisi	3
2.1.2.Meme Kanseri Etiyolojisi	5
2.1.2.1.Genetik Faktörler	5
2.1.2.1.1.Onkogenler	6
2.1.2.1.2.Tümör Baskılayıcı Genler	6
2.1.2.1.3.DNA Tamir Genleri	6
2.1.2.2.Çevresel Faktörler	7
2.1.2.2.1.Alkol Alımı	7
2.1.2.2.2.Sigara Kullanımı	7
2.1.2.2.3.Sosyoekonomik Durum	7
2.1.2.2.4.İyonizan Radyasyon	8
2.1.2.2.5.Fiziksel Aktivite	8
2.1.2.2.6.Beslenme	8
2.1.2.3.Endokrin Nedenler	8
2.1.2.3.1.Reproduktif Nedenler	9
2.1.2.3.2.Hormonal Nedenler	9
2.1.3.Meme Kanseri Klinik Bulgular ve Tanı	9
2.1.3.1.Meme Kanseri İnceleme Nedenleri	10
2.1.3.1.1.Kitle	10
2.1.3.1.2.Meme Başı Akıntısı	10
2.1.3.1.3.Meme Başı Değişiklikleri	10
2.1.3.1.4.Meme Ağrısı	10
2.1.4.Meme Kanseri Evrelendirilmesi	11

2.2.DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları	11
2.2.1.Direk Tamir Mekanizmaları	11
2.2.1.1.Fotoreaktivasyon	11
2.2.1.2.O <sup>6</sup> - Metilguanin Tamiri	12
2.2.1.3.Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu	12
2.2.2.Kesip-Çıkarma (Ekzizyon) Tamirleri	12
2.2.2.1.Baz Eksizyon Tamiri (BER)	12
2.2.2.2.Nükleotid Eksizyon Tamiri (NER)	13
2.2.2.3.Yanlış Eşleşme Eksizyon Tamiri (MER)	13
2.2.3.Rekombinasyonel Tamir	13
2.2.4.SOS Tamiri	13
2.2.5.Çift Zincir Kırıklarının Tamiri	14
2.2.5.1.Serbest Uçların Homolog Olmayan Şekilde Bağlanması	14
2.2.5.2.Homolog Rekombinasyon	14
2.3.BRCA1, BRCA2 Genleri ve Proteinleri	14
2.3.1.BRCA1 Geni	14
2.3.2.BRCA2 Geni	15
2.3.3.BRCA1 Proteini	16
2.3.3.1.RING Bölgesi	17
2.3.3.2.BRCT Bölgesi	17
2.3.4.BRCA2 Proteini	17
2.3.4.1.BRC Tekrarları	18
2.3.5.BRCA1 ve BRCA2 Gen Mutasyonları	18
3.MATERYAL VE METOD	
3.1.Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	20
3.1.1.DNA İzolasyon Kiti İçeriği	20
3.1.2.MLPA Kit İçeriği	20
3.1.2.1.BRCA1 Kiti (P087)	20
3.1.2.2.BRCA2 Kiti (P045)	21
3.1.3.PCR Ürünü Saflaştırma Kiti	21
3.1.4.Dizi Döngüsü Kiti İçeriği	21
3.1.5.DNA Dizi Analizi İçin Kullanılan Primerler	22

	<u>Sayfa No</u>
3.1.6.Kit Dışı Kullanılan Malzemeler	22
3.1.7.Kullanılan Cihazlar	23
3.2.Çalışmanın Planlanması ve Numunelerin Toplanması	23
3.3.DNA İzolasyonu	24
3.3.1.Kit İçindeki Çözeltilerin Kullanıma Uygun Hale Getirilmesi	24
3.3.2.DNA İzolasyon Protokolü	24
3.4.MLPA Analiz Tekniği	25
3.4.1.MLPA Analiz Protokolü	36
3.4.1.1.Denatürasyon ve Hibridizasyon	36
3.4.1.2.Ligasyon Reaksiyonu	36
3.4.1.3.PCR Reaksiyonu	37
3.4.1.4.MLPA PCR Sonrası Cihaza Yükleme	37
3.4.1.5.Sonuçların Değerlendirilmesi	38
3.5.DNA Dizi Analizi	39
3.5.1.DNA Dizi Analizi Protokolü	39
3.5.1.1.Hedef Bölgelerin PCR İle Çoğaltılması	39
3.5.1.2.PCR Ürünlerinin Elektroforezi	40
3.5.1.3.Saflaştırma	41
3.5.1.4.Saflaştırılmış Ürünlerin Elektroforezi	41
3.5.1.5.Dizi Döngüsü	41
3.5. 1.5.Dizi Döngüsü Sonrası Saflaştırma	42
3.5.1.6.Numunelerin Cihaza Yüklenmesi	42
4.BULGULAR	43
5.TARTIŞMA	60
5.1.Çalışma Grubunun Oluşturulması	60
5.2.BRCA1 ve BRCA 2 Gen Mutasyonlarının Tespiti	60
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	66
6.1.Sonuçlar	66
6.2.Öneriler	66
7.ÖZET	67
8.SUMMARY	68

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Türkiye kanser vakalarının dağılımı	4
Şekil 2. BRCA1 geni ekzonları	15
Şekil 3. BRCA2 geni ekzonları	15
Şekil 4. DNA hasarı tamirinin gerçekleşmemesi	15
Şekil 5. BRCA1 proteini	16
Şekil 6. BRCA2 proteini	17
Şekil 7. MLPA prob dizaynı	26
Şekil 8. MLPA hibridizasyon	26
Şekil 9. MLPA ligasyon	26
Şekil 10. MLPA PCR	27
Şekil 11. MLPA fragment analizi	27
Şekil 12. DQ ve DD piklerinin gösterimi	38
Şekil 13. 20 numaralı numune BRCA1 geni MLPA analiz sonucu	47
Şekil 14. Kontrol numunesi BRCA1 geni MLPA analiz sonucu	47
Şekil 15. 25 numaralı numune BRCA1 geni MLPA analiz sonucu	49
Şekil 16. Kontrol numunesi BRCA1 geni MLPA analiz sonucu	49
Şekil 17. 25 numaralı numune BRCA1 geni 18. ekzon dizi analizi sonucu	50
Şekil 18. Kontrol numunesi BRCA1 geni 18. ekzon dizi analizi sonucu	51
Şekil 19. 25 numaralı numune BRCA1 geni 19. ekzon dizi analizi sonucu	51
Şekil 20. Kontrol numunesi BRCA1 geni 19. ekzon dizi analizi sonucu	52
Şekil 21. 29 numaralı numune BRCA1 geni MLPA analiz sonucu	52
Şekil 22. Kontrol numunesi BRCA1 geni MLPA analiz sonucu	53
Şekil 23. 15 numaralı numune BRCA2 geni MLPA analiz sonucu	54
Şekil 24. Kontrol numunesi BRCA2 geni MLPA analiz sonucu	54
Şekil 25. 15 numaralı numune BRCA2 geni 14. ekzon dizi analizi sonucu	55
Şekil 26. 20 numaralı numune BRCA2 geni MLPA analiz sonucu	56
Şekil 27. Kontrol numunesi BRCA2 geni MLPA analiz sonucu	56

Şekil AdıSayfa No

Şekil 28. 22 numaralı numune BRCA2 geni MLPA analiz sonucu

57

Şekil 29. Kontrol numunesi BRCA2 geni MLPA analiz sonucu

58

Şekil 30. 22 numaralı numune BRCA2 geni 27. ekzon dizi analizi sonucu

59

Şekil 31. Kontrol numunesi BRCA2 geni 27. ekzon dizi analizi sonucu

59



## TABLULAR LİSTESİ

<u>Tablo Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Dünya kanser vakaları dağılımı	3
Tablo 2. Trabzon kanser vakaları dağılımı	5
Tablo 3. En sık görülen BRCA1 geni mutasyonları	18
Tablo 4. En sık görülen BRCA2 geni mutasyonları	19
Tablo 5. BRCA1 geni büyük genomik yeniden düzenlenmeler	28
Tablo 6. BRCA2 geni büyük genomik yeniden düzenlenmeler	30
Tablo 7. BRCA2 geni 7. ekzon A/G polimorfizmi ve MLPA probu	31
Tablo 8. BRCA2 geni 10. ekzon C/T polimorfizmi ve MLPA probu	31
Tablo 9. BRCA2 geni 11. ekzon C/G polimorfizmi ve MLPA probu	31
Tablo 10. BRCA2 geni 14. ekzon G/C polimorfizmi ve MLPA probu	32
Tablo 11. BRCA2 geni 14. ekzon C/T polimorfizmi ve MLPA probu	32
Tablo 12. BRCA2 geni 15. ekzon C/T polimorfizmi ve MLPA probu	32
Tablo 13. BRCA2 geni 18. ekzon A/G polimorfizmi ve MLPA probu	33
Tablo 14. BRCA2 geni 19. ekzon T/C polimorfizmi ve MLPA probu	33
Tablo 15. BRCA2 geni 20. ekzon A/C polimorfizmi ve MLPA probu	33
Tablo 16. BRCA1 geni MLPA probu bağlanma dizileri	34
Tablo 17. BRCA2 geni MLPA probu bağlanma dizileri	35
Tablo 18. 24. numune BRCA1 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu	45
Tablo 19. 25. numune BRCA2 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu	46
Tabo 20. 20. numune BRCA1 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu	48
Tablo 21. 25. numune BRCA1 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu	50
Tablo 22. 29. numune BRCA1 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu	53

Tablo Adı

Sayfa No

Tablo 23. 15. numune BRCA2 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu	55
Tablo 24. 20. numune BRCA2 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu	57
Tablo 25. 22. numune BRCA2 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu	58
Tablo 26. Mutasyon belirleme metodları	61

## 1.GİRİŞ

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30' unu oluşturmaktadır (1).

Bu sebeple erken tanısı ve bununla birlikte tedaviye başlanması son derece önemlidir.

Meme kanserlerinin yaklaşık % 10'luk kısmı ailesel geçişle, yani genetik olarak yatkınlıkla oluşmaktadır. Meme kanserine yatkınlıkta en önemli genler 17. kromozom da bulunan 24 ekzonlu BRCA1 (meme kanseri geni1) ve 13. kromozomda bulunan 27 ekzonlu BRCA2 (meme kanseri geni2) genleridir. Bu genlerin esas özelliği tümör baskılayıcı genler olmalarıdır. Yani bu genlerdeki bir defekt, herhangi bir nedenle oluşmuş bir tümörün engellenmeden çoğalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenlerle meme kanserine yatkınlıkta genetik bir neden olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinde herhangi bir mutasyonun varlığı kansere sebebiyet verdiği için meme kanseri tanısında bu genler önemli iki parametre haline gelmiştir. Hastalığın erken evrede, hatta oluşmadan belirlenebilmesi sağ kalım oranını arttıracığı için bu genlerdeki mutasyonların riskli hastalarda taranarak bilgilendirilmesi son derece önemlidir. Ancak mutasyonların taranmasında altın standart olan DNA dizi analizi ile bu iki büyük genin aynı anda taranması oldukça zahmetli, zor ve masraflı bir iş olduğu gibi aynı zamanda DNA dizi analizi ile büyük delesyon ve duplikasyonların taranması mümkün olamamaktadır. Bu zorluklar yüzünden farklı yöntemler geliştirilmiş olup bunlardan biri de MLPA (Multiplex Ligation depend Probe Amplification) tekniğidir. MLPA tekniği, aynı anda 45'e kadar spesifik dizinin, uygun bir multiplex pcr reaksiyonuyla tek bir çift primerle amplifiye edilmesine dayanır. Yani aynı anda BRCA1 geni için bütün ekzonlarda tarama yapılabilmektedir. BRCA genleri için mutasyona neden olan delesyon ve insersiyonlar kontrol örneği ile aynı şartlarda amplifiye edilerek karşılaştırılır ve kontrole göre farklı sinyaller tespit edilirse delesyon veya insersiyon olup olmadığı değerlendirilir. Bu yöntemle büyük delesyon ve duplikasyonlar tespit edilebildiği gibi çalışma prensibine göre sınırlı sayıda tek nokta mutasyonları da tespit

edilebilmektedir. Yöntem DNA dizi analizinden daha ucuz ve basit olması, gerekli kimyasalların kit ile birlikte sağlanabilmesi, sekansa göre ilgili bölgelerin aynı anda ve basit bir yöntemle taranabilmesi, nedeniyle seçilmiştir.

MLPA metodunda problemlerin bazı durumlarda bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar nedeniyle hedeflerine bağlanamaması yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir. Bu bölgelerin DNA dizi analizi ile taranması testin doğruluğunu teyit edecektir. Böyle bir metodolojik kombinasyon hassasiyeti arttıracaktır. Bu çalışmada, BRCA genlerinde DNA dizi analizi ile saptanamayan büyük genomik yeniden düzenlenmelerin (LGR) (büyük delesyon ve duplikasyonlar gibi) MLPA metoduyla ile taranarak ortaya çıkarılması ve DNA dizi analizi ile de MLPA problemlerinin bağlanma bölgelerinin yanlış pozitif sonuç kontrolünün yapılarak geniş gen bölgelerinin daha hassas ve hızlı biçimde mutasyon analizinin yapılması bu ölümcül hastalığın erken teşhisinde önemli bir adım olacağı için ailesel hikayesi olan hastalara rutin test olarak çalışılmasını sağlamak amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Meme Kanseri

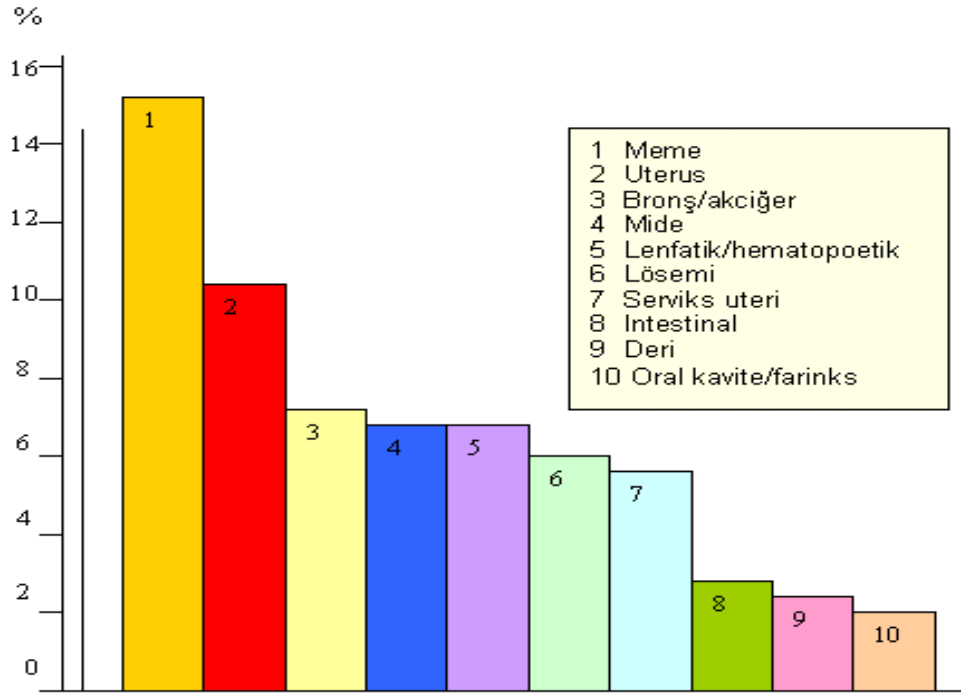
#### 2.1.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin de yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da yılda 180.000, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda 184.000 yeni olgu saptanmaktadır. Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Görülme sıklığında en büyük artış Kanada, ABD, İspanya ve İsveç'te ortaya çıkmıştır (1). Son uluslararası verilere göre 2000 yılında 10 milyon yeni kanser vakası, 6 milyon kanserden ölüm ve toplamda 22 milyon kanserli hasta bulunmaktadır. Bu kanserlerin dağılımına bakılacak olursa en sık rastlanan meme kanseridir (Tablo 1) (2).

Tablo1. Dünya kanser vakaları dağılımı(2)

İnsidans x 1000 / ölüm x 1000	ERKEK	KADIN
Toplam	5300/4700	4700/2700
Akciğer	902/810	337/293
Meme		1050/370
Kolon, rektum	499/255	446/234
Mide	558/405	318/241
Karaciğer	398/384	166/165
Prostat	543/204	
Serviks uteri		471/233
Ösofagus	279/227	133/111
Mesane	260/99	76/33
Non-Hodghin Lenfoma	167/93	121/68
Lösemi	144/109	113/86
Oral kavite	170/81	97/47
Pankreas	116/112	101/101
Böbrek	119/57	71/34
Over		192/114

Büyüyen ve yaşlanan dünya popülasyonunda, kanserden etkilenen bireylerin 2020 yılında 15 milyon yeni vaka ve 10 milyon ölüm olacağı öngörülmektedir (2). Meme kanseri tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de kadınlar arasında en sık görülen kanserler arasında bulunmaktadır ve tüm kanserlerin % 24,1 ini oluşturur (Şekil 1) (3, 4).



Şekil 1. Türkiye kanser vakaları dağılımı (4)

Trabzon’ da ki duruma bakacak olursak yine kadınlarda en yüksek kanser oranının meme kanseri olduğu açıkça görülmektedir (Tablo 2) (5).

Tablo 2. Trabzon kanser vakaları dağılımı (5)

Kanser Türü	Erkek %	Kadın %	Toplam %
Akciğer	28,5	5,2	19,1
Deri	11,1	14,3	12,3
Meme	0,3	24,2	9,9
Mide	9,3	9,7	9,5
Mesane	10,5	1,3	6,8
Prostat	8,2	0	4,9
Troid Bezi	1,2	10,2	4,8

### 2.1.2. Meme Kanseri Etiyolojisi

Kanser tanı ve tedavisindeki çok önemli gelişmelere karşın meme kanseri olgularının yaklaşık dörtte biri bu hastalıktan dolayı yitirilmektedir (6). Bu nedenle hastalığa nelerin sebep olduğunun bilinmesi ileride bu hastalıktan ölümlerin azalmasını sağlayabilir. Meme kanserinin etiyolojisinde çok çeşitli nedenler bulunsa da bunları temel olarak genetik, çevresel ve endokrin olarak üç bölümde inceleyebiliriz.

#### 2.1.2.1.Genetik Faktörler

Son yıllarda gerçekleştirilen moleküler genetik ve gen analizi çalışmaları kanserin genlerin hastalığı olduğunu göstermiştir (6). Hücrel çoğalma genetik kontrol altındadır ve çevresel mutajenler, somatik mutasyonlar ve ailesel yatkınlık kanser gelişimiyle bağlantılıdır (7).

Günümüze kadar kanser oluşumunun genetik mekanizmasını açıklamaya yönelik olarak gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar tüm kanserlerin oluşumunda üç gen sınıfının etkili olduğunu, bu genlerde meydana gelen mutasyonların kanserleşmenin esasını oluşturduğunu göstermektedir. Bu genler sırasıyla protoonkogenlerin mutasyona uğraması sonucu oluşan onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir (6).

### **2.1.2.1.1.Onkogenler**

Protoonkogenlerdeki mutasyonlar, hücre bölünmesinde hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına başka bir deyişle kansere sebep olabilir (8). Yani normal hücre büyümesi ve bölünmesinden sorumlu protoonkogenlerin mutasyona uğramış şekillerine **onkogen** denir. Meme kanserlerinin oluşumunda Her-2/neu, c-myc, c-myb, c-jun, bcl-1, H-ras, ER gibi onkogenlerin rolü bulunmaktadır (6).

### **2.1.2.1.2.Tümör Baskılayıcı Genler**

Tıpkı onkogenler gibi tümör baskılayıcı genlerde hücre çoğalmasının düzenlenmesine katılan molekülleri şifreler. Tümör baskılayıcı proteinlerin normal işlevi genel olarak, DNA(Deoksiribo Nükleik Asit) harabiyeti gibi bazı işaretlere yanıt olarak hücre büyümesini inhibe etmektir (9). Meme kanseri oluşumunda BRCA1, BRCA2, TP53, ATM, PTEN, LKB1, HRAS1, NAT1, GSTM1, GSTP1, CYP1A1, CYP1B1, PR, AR, APO E gibi gen mutasyonlarının rolü olduğu gösterilmiştir (10).

### **2.1.2.1.3.DNA Tamir Genleri**

DNA tamir genleri kanserleşmenin biyolojik mekanizmasında çok önemli yer tutmaktadır. Çünkü bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kendileri ile sınırlı kalmayıp protoonkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyon sıklığını arttırmaktadır. Bunun sonucu olarak genomda mutator bir fenotip meydana gelmekte ve zincirleme mutasyonlarla kişide kansere karşı genetik bir eğilim doğmaktadır. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda meme kanserinin oluşumunda en önemli rolü oynayan BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerin aynı zamanda DNA'nın tamirinde de rol oynadığı gösterilmiştir (6).

Bu bölümün iki kısmında bahsedilen ve meme kanserine genetik yatkınlıkta en önemli genler olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinden ayrıntılı şekilde bir bölüm olarak bahsedilecektir.



## **2.1.2.2. Çevresel Faktörler**

### **2.1.2.2.1. Alkol Alımı**

Aşırı alkol alımının meme kanseri riskini arttırdığı rapor edilmiştir (11). Günlük bir veya daha fazla alkol alımının meme kanseri riskini arttırdığı, buna karşın fazla alkol alanların yüksek folat alımıyla artan meme kanseri riskini azaltabileceği de gösterilmiştir (12).

### **2.1.2.2.2. Sigara Kullanımı**

Sigara kullanımının meme kanseri riskinde etkisinin az olduğu görülmektedir. Buna rağmen sigara kullanımından dolayı meme sıvılarında direk karsinojenik etki ihtimali olan mutajenler tespit edilmiştir. Bununla birlikte sigara kullanan kadınlarda düşük idrar östrojen seviyeleri ve erken menopoz görülmüştür (11).

Son çalışmalarda ise uzun süreli sigara kullanımının, ilk hamilelikten önce sigara kullanımının ve pasif sigara kullanımının meme kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (13).

### **2.1.2.2.3. Sosyoekonomik Durum**

Sosyoekonomik durum meme kanseri ile bağlantılı bir faktör olarak ortaya çıkmıştır. Meme kanseri gelişmiş ülkelerin ekolojik alanlarında düşük seviyede iken Avrupa ve Kuzey Amerika'da daha yüksek oranlara sahiptir. Bu oran aynı zamanda popülasyonlarında ekonomik olarak farklılık gösteren ülkelerde de açıkça görülmektedir (11).

#### **2.1.2.2.4.İyonizan Radyasyon**

Epidemiyolojik çalışmalarda nükleer savaş veya tanı ve tedavi amaçlı iyonize radyasyona maruz kalanlarda meme kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir. Radyasyonun erken yaşta alınması meme kanseri riskini daha da arttırmaktadır (1,6).

#### **2.1.2.2.5.Fiziksel Aktivite**

Fiziksel aktivitenin meme kanseri riski üzerinde gençlik ve ergenlik zamanlarında çalışıp çalışmadığına göre farklı etkileri gözlenmiştir (11). Fiziksel aktivitenin önemli derecede meme kanseri riskini azaltabileceğine dair kanıtlar vardır. Atletizm yapan kızlarda meme kanseri riskinin azaldığı gösterilmiştir. Çünkü fiziksel aktivitenin endojen hormon seviyelerini etkileyebileceği bilinmektedir. Ayrıca vücut ağırlığı artışı ile menopoz sonrası meme kanseri riskinin arttığı bilinmektedir (1).

#### **2.1.2.2.6.Beslenme**

Sebze ve meyve tüketimi, vitamin alımı, süt ve süt ürünleri tüketimi ile ilgili çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Geniş serili çalışmalarda herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Soya ve soya ürünlerinin kullanımı ile meme kanseri riskinin azaldığı bildirilmiştir. Ancak soyada bulunan genisteinin hormon bağımlı tümör hücrelerinde çoğalmayı arttırdığı gösterilmiştir (6).

#### **2.1.2.3.Endokrin Nedenler**

Meme kanseri, hormonların kontrolünde olan bir bez olan meme dokusunda meydana geldiği için hormonların bu konuda etkili olduğu düşünülebilir. Türkiye’de yapılan bir çalışmada kontrollerle yapılan karşılaştırmada ilk doğum yaşının otuzun üzerinde olması, en az bir yıl çocuk emzirilmemesi, menarş yaşının onikinin altında olması, oral kontraseptif kullanımı ve hormon replasman tedavisi alınmasının meme kanseri ile bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur (14). Ayrıca

menarş yaşının düşmesi gibi menopoz yaşında yükselmesi kadınlarda meme kanseri geliştirme riskini arttırmaktadır (15).

### **2.1.2.3.1.Reprodüktif Nedenler**

Son yapılan çalışmalar endojen hormon seviyesi ve meme kanserine yakalanma riski arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Yaşam boyunca kadınlar menarşta, ilk gebelik döneminde, çok sayıdaki gebelik ve menopoz çağını içeren bazı dönemlerde endojen seks hormonlarına maruz kalmaktadır. Menarştan sonraki birkaç yıl çok yüksek düzeydeki östrojen seviyesi sonucu meme epitelinin sürekli östrojene maruz kalması ile kadınlarda meme kanserine yakalanma riski artmaktadır (15). Meme kanseri ile menopoz yaşı arasında da bir ilişki mevcuttur. 45 yaşından önce menopoza giren kadınlarda meme kanseri riski 55 yaşından sonra menopoza giren kadınların yarısı kadardır. İlk çocuğunu 30 yaşından sonra yapma 20 yaşından önce yapmaya göre meme kanseri riskini dört kat arttırmaktadır. Sürekli emzirme de meme kanseri riskini düşürmektedir. 5 yıllık bir emzirme süresinin meme kanseri riskini % 30 oranında azalttığı bildirilmiştir (1).

### **2.1.2.3.2. Hormonal Nedenler**

Hormon replasman tedavisi ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak kullanılan ilaçların dozları nedeniyle farklı sonuçlar alınmıştır. Pozitif ve negatif sonuçlanan çalışmalara rağmen meta-analiz sonucu riskin az ama anlamlı olarak arttığı şeklindedir (6). Oral kontraseptif ile meme kanseri arasındaki ilişki yaş ve kullanım süresine göre değişmektedir. Birçok çalışmada uzun süreli oral kontraseptif kullanımı riski arttırmaktadır. 35 yaşın altında kullanımı meme kanseri riskini arttırırken, 10 yıl süreyle kullanımda da risk belirgin oranda artmaktadır (1).

### **2.1.3.Meme Kanserinde Klinik Bulgular ve Tanı**

Meme kanserinde mortaliteyi azaltmanın en emin yolu erken tanı ve tedavidir. Erken tanıda amaç meme kanserinin biyolojik olarak başlamasından sonra klinik olarak bulgu vermeden önce tanınmasıdır.

Meme kanseri tanısında hastadan dikkatli bir öykü alınması çok önemlidir. Çünkü aile öyküsü olanlarda kanser yaşı daha erken ve bilateral olmaya eğilimlidir (6).

### **2.1.3.1.Meme Kanseri İnceleme Nedenleri**

Meme kanseri tanısı hasta-hekim-mamografi üçlemesinden birinin ya da kombinasyonunun bulgularına bağlı olarak düşünülür ve tanı için ileri tetkikler yapılır (6).

#### **2.1.3.1.1.Kitle**

Hastaların % 70-80'inde çok kez ağrısız ve tesadüfen bulunan kitle vardır. Yaklaşık 1 cm. çapa ulaşmış bir kitle, eğer yüzeye de yakınsa ele gelebilir (6).

#### **2.1.3.1.2.Meme Başı Akıntısı**

Meme kanserinin % 10 olguda ilk bulgusu meme başı akıntısıdır. Meme başı akıntısının 60 yaş altı kadınlarda % 7'sinde kanser saptanırken, 60 yaş üstündekilerde bu oran % 32'ye çıkmaktadır (6).

#### **2.1.3.1.3.Meme Başı Değişiklikleri**

Meme başı değişiklikleri de kanser bulgusu olabilir. Santrale yakın kitlenin meme başında içe çekilme yaratması izlenebilir (6).

#### **2.1.3.1.4.Meme Ağrısı**

Meme ağrısı, meme ünitelerine hastaların en sık başvuru sebebidir. Menstruasyonla ilgisi araştırılmalı ve olası kanseri de ekarte ettirmek için gerekli taramalar yapılmalıdır. Geçmeyen ağrıda MR çekilmeli ve muayeneler tekrarlanmalıdır. Menopozda olan kadınlarda çok nadir olsa da bu bulgularla meme kanseri tanısı konmaktadır (6).

### **2.1.4.Meme Kanseri Evrelendirilmesi**

Meme kanserli hastalar hekime başvurdıklarında hastalıklarının yayılımı bakımından birbirlerinden farklılık gösterir. Kansere evreleme, hastaları hastalıklarının yayılma derecesine göre gruplara ayırma işlemidir. Böylece gerek tedavi planının yapılmasında gerek prognoz tayininde ve gerekse tedavi için uygulanan çeşitli yöntemlerin etki farkını ortaya koymada en güvenilir yoldur. Evreleme ya radyoloji ile birlikte klinik bulgulara göre ya da ameliyatla çıkarılan dokuların histolojik durumlarına göre yapılır (1).

Günümüzde hemen her yerde UICC (Union International Centre Cancer) ve AJCC (American Joint Committee Cancer)'nin biçimlendirdiği TNM (T: primer tümör, N: bölgesel lenf bezleri, M: uzak metastazlar) sistemi kullanılmaktadır (1).

## **2.2. DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları**

Genetik bilgiyi taşıyarak nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde, sürekli olarak hasar oluşmaktadır. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne veya mutasyona neden olur. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak  $10^4$  adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir (16).

### **2.2.1. Direk Tamir Mekanizmaları**

#### **2.2.1.1.Fotoreaktivasyon**

Ultraviyole ışık ile meydana gelen mutasyonları içeren hücreler, mavi spektrum (300-500 nm) içeren görünür ışığa maruz bırakıldıklarında, geriye dönüşüm yapıp düzelir. Bu olaya fotoreaktivasyon denir (17).

### **2.2.1.2.O<sup>6</sup>- Metilguanin Tamiri**

Özellikle duyarlı bölgelerden biri, guaninin 6. pozisyonundaki karbondur. Bu grup bir metil grubu bağlayarak çok kolayca alkillenir. Ortaya çıkan ürün, O<sup>6</sup>-metilguanin sadece iki hidrojen köprüsü oluşturabildiği için, sitozin yerine timinle eşleşir. İzleyen replikasyonda, bu konumdaki sitozinin yerini timin alır (transisyon) (18). O<sup>6</sup>- Metilguanin alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O<sup>6</sup>- Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA' da yanlış metillenen bazların CH<sub>3</sub> gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal guanin oluşumunu sağlar (17).

### **2.2.1.3.Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu**

X ışını ya da peroksitler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Bir zincirde olan basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen tamir edilmektedir. DNA ligaz enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ve 3' OH grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturur (17).

### **2.2.2.Kesip-Çıkarma (Ekzisyon) Tamirleri**

Bu tip tamir 3 temel basamak içerir. Hasar tanınır ve bir nükleaz tarafından kesilip çıkarılır. DNA polimeraz oluşan boşlukları doldurur. DNA ligaz son bağı kurar ve oluşan boşluk tamamen kapanır (17).

#### **2.2.2.1.Baz Eksizyon Tamiri (BER)**

BER' de görev alan enzim DNA glikozilazdır. Spontan veya kimyasallarla olan deaminasyon veya iyonize radyasyon ve oksidatif hasar sonucu oluşan baz değişikliklerine spesifiktir. DNA glikozilaz uygun olmayan bazı tanır. Deoksiriboz şeker ve baz arasındaki N-glikozidik bağı hidrolizi ile uzaklaştırır. Abazik bölge oluşur ve bu bölgeyi endonükleaz enzimleri tanıyarak bu zincirde bir çentik açar. Endonükleaz enzimi fosfat ve şekeri ayırır. Oluşan boşluk DNA polimeraz ile doldurulur ve ligaz ile fosfodiester bağlantı sağlanır (17).

### **2.2.2.2. Nükleotid Eksizyon Tamiri (NER)**

DNA sarmal yapısında geniş bozulmalara neden olan DNA lezyonları NER sistemi ile onarılır. BER' de bazlar kesilip çıkarılırken, NER'de hasarlı bazlar oligonükleotid parçaları olarak kesip çıkarılır (17).

### **2.2.2.3. Yanlış Eşleşme Eksizyon Tamiri (MER)**

DNA polimeraz, replikasyon sırasında hata okuma (proofreading) yeteneğine sahiptir. Yanlış eşleşme tamiri, proofreading sonrası bile kalan yanlış eşleşmeleri tamir eden mekanizmadır (17).

### **2.2.3. Rekombinasyonel Tamir**

DNA hasarı, tamir sistemleri tarafından tamir edilememişse, replikasyondan sonra aktif olan mekanizmadır. Bir lezyon bulunduran DNA replike olurken, DNA polimeraz önce lezyonda duraklar. Hasarlı bölgeyi de içine alacak şekilde boşluk bırakarak atlar ve senteze devam eder. Rec A proteini, rekombinasyonel bir değiş tokuş işlemi ile hasarsız komplementer zincirde bulunan sekansı transfer eder. Komplementer zincirde oluşan boşluk DNA polimeraz – DNA ligaz enzimleri sayesinde doldurulur. Halen bulunan lezyon diğer tamir sistemleri ile onarılır (17).

### **2.2.4. SOS Tamiri**

DNA hasarının yüksek oranda olduğu ve diğer tamir mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir. DNA sentezi sırasında, bir lezyonun üzerinden atlamak yerine sistem, DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonu devam ettirmesini sağlar. Fakat replikasyonun doğruluğundan fedakârlık edilir. Bu nedenle hataya meyilli sistem de denir (17).

## **2.2.5.Çift Zincir Kırıklarının Tamiri**

### **2.2.5.1.Serbest Uçların Homolog Olmayan Şekilde Bağlanması**

Hızlı ve hataya meyilli bir sistemdir. Ku 70-Ku 80 kompleksleri DNA kırık uçlarına bağlanırlar. DNA bağımlı protein kinaz aktive olarak diğer proteinlerin hasar bölgesine gelmelerini sağlar. Bu protein komplekslerinin formasyonu DNA ligaz IV-XRCC4 kompleksinin kırık uçları bağlamasını sağlar (17).

### **2.2.5.2.Homolog Rekombinasyon**

RAD ve BRCA genleri tarafından yönlendirilir. MRE11-RAD50-NBS1 kompleksinin nükleaz aktivitesi ile kırık uçları degradesyona uğrar. RAD 52 proteini 3' uçlara bağlanır. RAD 51-BRCA 2 kompleksi, rekombinasyon oluşturmak üzere kardeş kromatid zincirinin hasar bölgesine invazyonunu sağlar. Bu zincir kalıp olarak kullanılarak sentez yapılır ve hasar onarılır (DNA polimeraz – DNA ligaz) (17).

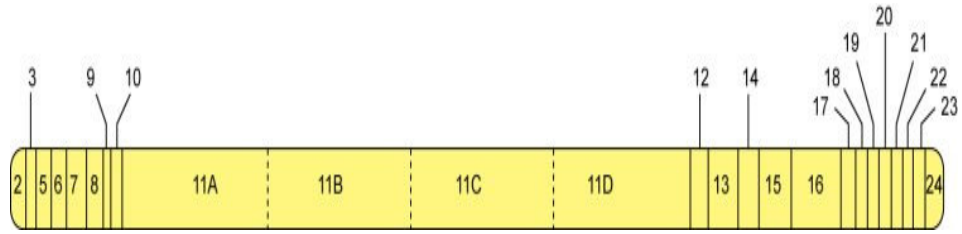
DNA hasarının tamirinde homolog rekombinasyon yoluyla rol oynayan genlerden ikisi de BRCA1 ve BRCA2 genleridir.

## **2.3.BRCA1, BRCA2 Genleri ve Proteinleri**

### **2.3.1.BRCA1 Geni**

BRCA1 geninin, 1990 yılında 17. kromozom (17q21) üzerindeki pozisyonu belirlendi (8). 1994 yılında ise Miki ve arkadaşları tarafından klonlandı. (OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) numarası: 113705) BRCA1 geni 1863 aminoasitlik büyük bir protein kodlayan 24 ekzon içerir (şekil 2) (19, 20).

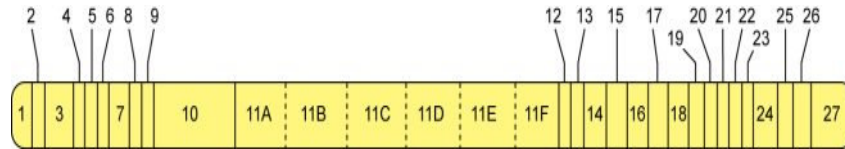




Şekil 2. BRCA1 geni ekzonları (20)

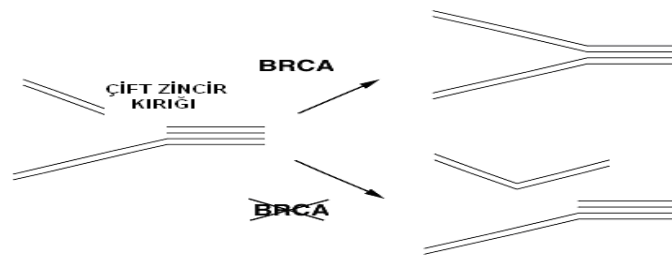
### 2.3.2. BRCA2 Geni

BRCA2 geni 1994 yılında ikinci meme kanserine yatkınlık geni olarak 13. kromozomda (13q12) tespit edilmiştir. (OMIM numarası:600185) BRCA2 geni 3418 aminoasit kodlayan 27 ekzondan meydana gelmiştir (Şekil 3) (20, 21).



Şekil 3. BRCA2 geni ekzonları (20)

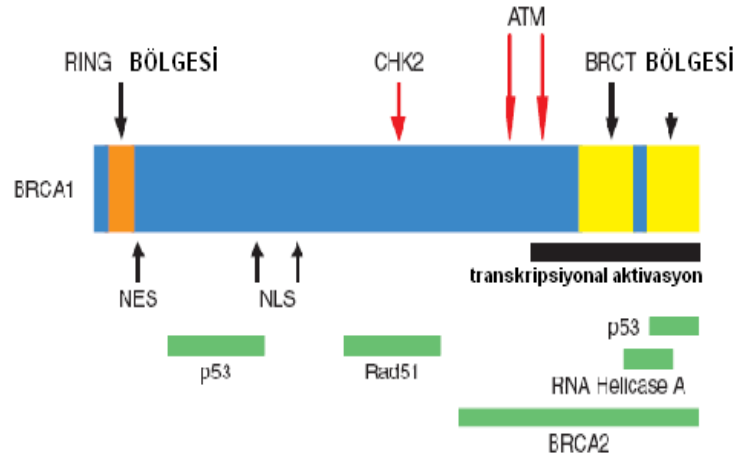
BRCA genleri DNA tamir mekanizmasında rol oynadığı için bu genlerdeki herhangi bir defektten dolayı bu genin ürünü olan BRCA proteini hatalı oluşur veya oluşamaz ve tamir mekanizmasında üstlendiği görevi yerine getiremez. Yani homolog rekombinasyon yoluyla onarılan DNA onarılamayacağı için çift zincir kırığı orada kalır ve bu hasar meme kanserine sebep olur (Şekil 4).



Şekil 4. DNA hasarı tamirinin gerçekleşmemesi (22)

### 2.3.3.BRCA1 Proteini

BRCA1 proteini, birçok fonksiyonel bölgeye sahip ve önemli biyolojik yollarda sayısız karmaşık proteinle etkileşen büyük bir proteindir (23).



Şekil 5. BRCA1 proteini (24)

BRCA1 proteini, N terminalinde yaklaşık 100 aminoasitlik özel bir RING bölgesi ve C terminalinde ise yaklaşık 90 aminoasitlik BRCT tekrar bölgeleri içermektedir. BRCA1' in tümör baskılayıcı özelliğinde bu iki fonksiyonel bölgenin önemi dikkat çekicidir (25).

BRCA1' in çekirdekte baskın olarak bulunan bir protein olduğu tanımlanmıştır. Onun çekirdekten ekspresyonu ve fosforilasyonu, hücreler hücre döngüsünün S fazına girerken artar ve mitoz esnasında en yüksek seviyede kalır. Mitozdan yaklaşık dört saat sonra tamamlanır ve hücreler G1 dinlenme fazına girer (25).

BRCA1 ekspresyonu ubiquitinyasyon yoluyla ve proteazom bağımlı yıkımla azalır (25).

BRCA1' in çekirdeksel boyanma şekli, transkripsiyonel aktivasyon, hücre döngüsü kontrolü ve DNA tamir yolu gibi farklı tiplerdeki çekirdeksel fonksiyonları ile oluşur (25).

### 2.3.3.1.RING Bölgesi

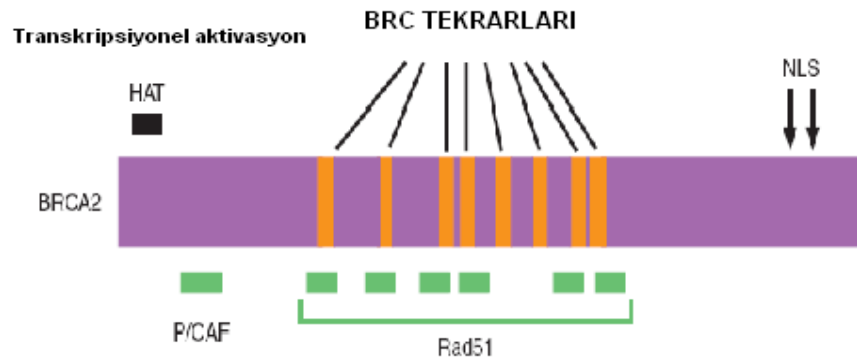
RING bölgesinin fonksiyonel önemi, ubiquitin-proteazom yolunda ubiquitin ligaz olarak rol oynamasıdır. Ubiquitin-proteazom yolu, hedef proteinlerin parçalanmasından ve böylece hücre içi proteinlerin uygun seviyelerde kalmasından sorumludur (25). BRCA1' in RING bölgesi içindeki kansere yakınlık mutasyonları BRCA1'in ubiquitin ligaz fonksiyonunun yokluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (26).

### 2.3.3.2.BRCT Bölgesi

BRCA1' in BRCT bölgesindeki kanser bağlantılı mutasyonlar ve kötü huylu polimorfizmler onun transkripsiyonel aktivasyonunu kaybetmesiyle birlikte RNA polimeraz-2 bağlama yeteneğinin yok olmasına neden olmaktadır (26).

### 2.3.4.BRCA2 Proteini

BRCA2 proteini, kromozom 13q12.3' te lokalize 27 ekzondan oluşan BRCA2 geni tarafından kodlanır. En yüksek meme ve timusta olmak üzere bir çok insan dokusu bu proteini eksprese eder. Normal hücrelerde geç-G1 / erken-S fazında eksprese edilen çekirdeksel bir proteindir (27). BRCA2 proteini, DNA tamirinde homolog rekombinasyonda gerekli olan RAD51 aktivitesini düzenleyen çok önemli bir role sahiptir (28).



Şekil 6. BRCA2 proteini (24)

### 2.3.4.1.BRC Tekrarları

Birçok BRC tekrarları, bazı memeli türlerinde biyolojik fonksiyon gösteren merkezi bağlama bölgeleri içerir. Mesela BRC tekrarları RAD51 proteininin fonksiyonu, yerleşimi ve kontrolünde büyük rol oynar. BRCA2 üzerinde RAD51' i bağlayan ve muhafaza eden BRC1, BRC2, BRC3, BRC4, BRC7, BRC8 olarak adlandırılan altı tekrar bulunur. BRC5 ve BRC6 RAD51'i bağlamaz ama bu tekrarlardaki mutasyonların kansere yatkınlıkta rolü vardır. RAD51 DNA hasarının tamirinde rol oynayan ve çift zincir kırıklarında homolog rekombinasyonu destekleyen anahtar bir proteindir (25).

### 2.3.5.BRCA1 ve BRCA2 Gen Mutasyonları

BRCA1 ve BRCA2' ye atfedilen meme kanserinin oranı farklı çalışmalar ve farklı etnik gruplara göre büyük değişikliklere sahiptir (29). Meme ve over kanserli ailelerde son teşhislere göre BRCA geninde ki mutasyon çeşitliliği artmıştır (30).

BRCA1 ve BRCA2 genlerinde en sık rastlanan mutasyonlar aşağıdaki tablolarda literatürde görülme sıklığı (kayıt sayısı) ile birlikte gösterilmiştir (Tablo 3 ve tablo 4).

Tablo 3. En sık görülen BRCA1 geni mutasyonları (20)

	Yer	Kayıt sayısı
1.	185delAG	1980
2.	5382insC	1063
3.	C61G	222
4.	R1347G	154
5.	M1008I	138
6.	4184del4	132
7.	R1443X	126
8.	3875del4	121
9.	R841W	114
10.	exon13ins6kb	108
11.	IVS5-11T>G	100
12.	E1250X	98
13.	M1628T	95
14.	Q563X	88
15.	R496H	85

Tablo 3 devam

16.	Q356R	82
17.	L246V	79
18.	2800delAA	72
19.	1675delA	69
20.	P1637L	67
	Girilen toplam veri	12014

Tablo 4. En sık görülen BRCA2 geni mutasyonları (20)

	Yer	Kayıt Tekrarı
1.	6174delT	1087
2.	K3326X	293
3.	I2490T	238
4.	D1420Y	191
5.	E2856A	185
6.	P655R	142
7.	S384F	141
8.	Y42C	141
9.	I505T	128
10.	R2108H	125
11.	I2944F	115
12.	K2950N	111
13.	A2717S	110
14.	I3412V	110
15.	3036del4	105
16.	D935N	105
17.	S326R	105
18.	R2034C	97
19.	6503delTT	93
20.	H2116R	88
	Girilen toplam veri	11330

### 3.MATERYAL VE METOD

#### 3.1.Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

##### 3.1.1.DNA İzolasyon Kiti İçeriği

(Invisorb Spin Blood Mini Kit (50) INVITEK)

- Bağlama tamponu A (15 mL(mililitre))
- Parçalama tamponu A (25 mL)
- Elüsyon tamponu D (15 mL)
- Tampon EL (50 ml)
- Proteinaz K (1 mL)
- Yıkama tamponu 1 (30 mL)
- Yıkama tamponu 2 (8 mL)
- 1,5 mL' lik toplama ependorfu (50 adet)
- 2 mL' lik toplama ependorfu (50 adet)
- DNA bağlayıcı filtre (50 adet)

##### 3.1.2.MLPA Kiti İçeriği

(MRC-Holland)

MLPA analizinde BRCA1 ve BRCA2 genleri için ayrı ayrı iki kit kullanılmıştır.

##### 3.1.2.1. BRCA1 Kiti (P087)

- Salsa MLPA tamponu
- P087 BRCA1 Prob Karışımı
- Ligaz-65 tampon A
- Ligaz-65 tampon B
- Salsa Ligaz-65
- Salsa PCR tamponu
- Salsa FAM PCR primer

- Salsa enzim seyreltme tamponu
- Salsa polimeraz

### **3.1.2.2. BRCA2 Kiti (P045)**

- Salsa MLPA tamponu
- P045 BRCA2 Prob Karışımı
- Ligaz-65 tampon A
- Ligaz-65 tampon B
- Salsa Ligaz-65
- Salsa PCR tamponu
- Salsa FAM PCR primer
- Salsa enzim seyreltme tamponu
- Salsa polimeraz

### **3.1.3.PCR Ürünü Saflaştırma Kiti**

(Invisorb Spin PCRapid Kit (50))

- P tamponu (20 mL)
- Yıkama tamponu (24 mL) (34 mL % 96 etanol eklenerek kullanılır)
- Elüsyon tamponu (15 mL)
- Bağlayıcı filtre (50 adet)
- 2 mL toplayıcı ependorf (50 adet)
- 1,5 mL toplayıcı ependorf (50 adet)

### **3.1.4.Dizi Döngüsü Kiti İçeriği**

(ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Perkin-Elmer Applied Biosystems,Foster City,CA, U.S.A))

- Hazır reaksiyon karışımı
- pGEM -3Zf(+) çift zincir DNA
- 21 M13 Kontrol primeri (forward)

### 3.1.5.DNA Dizi Analizi İçin Kullanılan Primerler

- BRCA1 18. Ekzon  
Forward: GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC  
Reverse: CTCAGACTCAAGCATCAGC
- BRCA1 19. Ekzon  
Forward: CTGTCAATCTTCCTGTGCTC  
Reverse: CATTGTAAAGGAAAGTGGTGC
- BRCA2 14. Ekzon  
Forward: ACCATGTAGCAAATGAGGGTGT  
Reverse: GCTTTTGTCTGTTTTCTCCAA
- BRCA2 27.Ekzon  
Forward: CTGTGTGTAATATTTGCGTGCT  
Reverse: GCAAGTTCTTCGTCAGCTATTG

### 3.1.6.Kit Dışı Kullanılan Malzemeler

- Etanol % 96'lık (LabKim)
- Agaroz (Fluka)
- Hidroksimetilaminometan (Merck)
- Borik asit
- Na<sub>2</sub>.EDTA (Carlo Erba)
- Sukroz (Sigma)
- Bromfenol mavisi (Sigma)
- Etidyum bromür (Merck)
- NaAc
- Taq polimeraz (Applied Biosystems 5 U/L)
- Formamid (Applied Biosystems 25 mL.)
- PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tüpü (Sarsted)
- Otomatik pipet takımı (Gilson)
- Muhtelif steril pipet uçları (Sarsted)
- Kapiller (47 cm.x50µm.) (Applied Biosystems)
- POP (Performans Optimize edici Polimer) 4 ) (Applied Biosystems 5 mL.)



- POP 6 (Applied Biosystems 5 mL.)
- 10X EDTA'lı Tampon (Applied Biosystems 25 mL.)
- EDTA'lı tam kan tüpü (Vacuette 2 mL.)
- 1,5 mL' lik ependorf
- 2 mL' lik ependorf

### **3.1.7.Kullanılan Cihazlar**

- Buzdolabı (Vestel)
- Buz makinesi (Scotsman AF-10)
- Deiyonize Su Cihazı (Barnstead)
- Derin Dondurucu (Thermo -86)
- Genetik Analizör (Perkin Elmer, ABI Prism Model 310 Versiyon 3.4.1)
- Mikrosantrifüj (Thermo)
- Termal saykır (Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystem)
- Isı Bloğu (Eppendorf)
- Vorteks (IKA M52 Mini shaker)
- pH metre (Hanna Instrument 8416)
- Hassas Terazi (Oertling NA 164)
- Güç Kaynağı (Thermo Electron Corporation EC 250-90)
- Transülluminatör (Wilbert Lourmat)
- Cam malzemeler

### **3.2.Çalışmanın Planlanması ve Numunelerin Toplanması**

Meme kanseri teşhisi alan hastalarda BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon aramak amacıyla planlanan bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı ve İç Hastalıkları Onkoloji Anabilim Dalı tarafından yürütüldü. Çalışmada, İç Hastalıkları Onkoloji Anabilim Dalı tarafından meme kanseri teşhisi konulmuş ve yine aynı birimler tarafından yapılacak olan bir projede kullanılmak üzere oluşturulan hasta grubundan ailesinde de meme kanseri hikayesi olanların kanları alınarak iki gün içinde DNA izolasyonu yapılarak – 80 °C' de çalışma gününe kadar saklanmıştır. Bu hastaların yaş

ortalaması  $48.3 \pm 9.2$  olarak bulunmuştur. MLPA ve dizi analizinde DNA kontrolü yapmak amacıyla, yine hastanemize başvuran gönüllü erkeklerden alınan kanlardan iki gün içinde DNA izolasyonu yapılarak elde edilen DNA lar  $-80^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuda çalışma gününe kadar saklanmıştır.

### **3.3.DNA İzolasyonu**

Invitek, Invisorb DNA izolasyon kiti kullanılarak EDTA(Etilen Daimin Tetra Asetikosit)' lı tam kandan, DNA izolasyonu yapıldı.

#### **3.3.1.Kit İçindeki Çözeltilerin Kullanıma Uygun Hale Getirilmesi**

- Proteinaz K Hazırlanması : Toz halde gelen proteinaz K şişesine 1 mL distile su eklenerek çözülür. Çözülmüş proteinaz K aligotlanarak  $-20$  saklanır.

- Yıkama Tamponu 1 Hazırlanması: Yıkama tamponu 1 şişesine 30 mL %99 saflıkta etanol eklenir.

- Yıkama Tamponu 2 Hazırlanması: Yıkama tamponu 2 şişesine 42 mL %99 saflıkta etanol eklenir.

#### **3.3.2.DNA İzolasyon Protokolü**

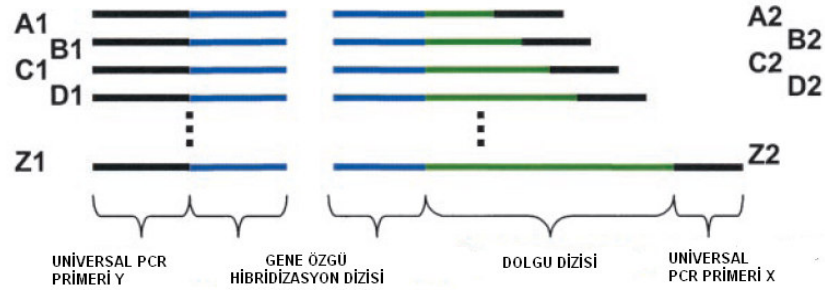
1. Numune sayısı kadar 1.5 mL'lik ependorf numaralandırıldı.
2. 200  $\mu\text{L}$ (mikrolitre) tam kan ilgili ependorfa eklendi.
3. 200  $\mu\text{L}$  parçalama tamponu ve 20  $\mu\text{L}$  proteinaz K eklendi.
4. Vorteksledi ve  $56^{\circ}\text{C}$ ' de 15 dakika çalkalanarak inkübasyona bırakıldı.
5. Bu sırada ısı bloğuna her numune için  $56^{\circ}\text{C}$ ' ye gelmesi için 200  $\mu\text{L}$  elüsyon tamponu D koyuldu. 2 mL' lik ependorflara da DNA bağlayıcı filtre koyuldu.
6. İnkübasyondan sonra ependorfa 400  $\mu\text{L}$  bağlama tamponu eklendi ve karıştırıldı.
7. Ependorftaki tüm içerik filtre konan ependorfa dikkatlice aktarıldı ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
8. 12000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi.

9. Filtre yeni bir 2 mL' lik ependorfa alındı.
10. Üzerine 500 µL yıkama tamponu A eklendi ve 1 dakika 12000 rpm' de santrifüj edildi.
11. Filtrat atıldı filtre tekrar aynı ependorfa geri kondu.
12. 800 µL yıkama tamponu B eklendi ve 12000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Filtrat tekrar atıldı ve filtrede kalan yıkama tamponunu tamamen uzaklaştırmak için ependorf boş olarak 4 dakika 13500 rpm' de santrifüj edildi.
14. Filtreler 1,5 mL' lik ependorflara alındı ve üzerine 56 °C' deki elüsyon tamponu D' den 200 µL eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
15. 10000 rpm' de 1 dakika santrifüjlendi ve filtreler atıldı.

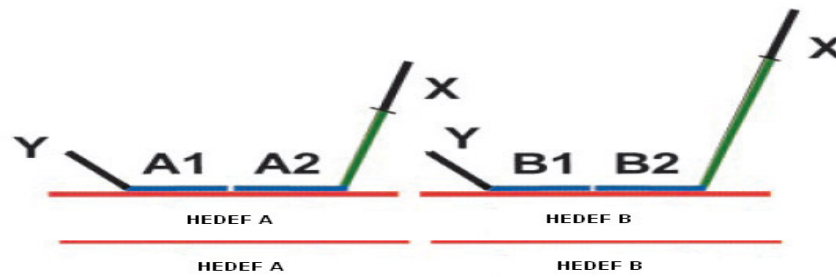
### **3.4.MLPA Analiz Tekniği**

MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification), tek bir reaksiyonla birçok nükleik asit dizisini saptayan yeni, hassas, ekonomik ve basit bir methodur. Prensipleri, standart denatüre genomik DNA izolasyonundan sonra standardize prob karışımıyla hibridize edilir. Her bir MLPA probu iki oligonükleotid içerir. Bu probun iki bölümü bitişik olan hedef diziye hibridize olur ve ısıya dirençli ligaz tarafından birleştirilir. Tüm prob ligasyon ürünleri, tek bir primerle PCR yapılarak çoğaltılır. Kapiller elektroforezle de birbirinden ayrılır. Her probun amplifikasyon ürünleri farklı uzunlukta olduğu için elektroforez sırasında ayrılabilirler. Prob amplifikasyon ürünlerinin miktarı, hedef dizilerin miktarını yansıtır (Şekil 7-11) (31, 32).

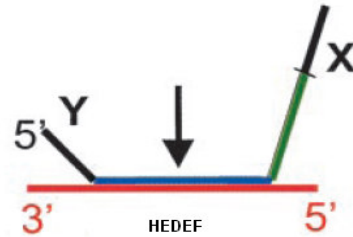
Analiz yapılan DNA' nın hedef dizisinde bir sorun varsa prob bağlanamayacağı için PCR gerçekleşmez ve ilgili ekzon çalışma sonucu tespit edilemediği için delesyon olarak saptanır veya hedef diziden iki tane varsa prob iki hedefe bağlanıp çoğalacağı için normalin iki katı sinyal verip duplikasyon olarak saptanır.



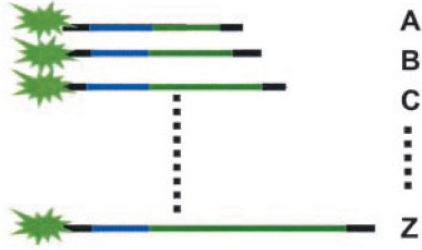
Şekil 7. MLPA Prob Dizaynı: Universal PCR primeri Y, ilgili gende istenen ekzona özel olarak 20 baz uzunluğunda hedef bölge hibridizasyon dizisi, dolgu dizisi, universal PCR primeri X içeren iki kısımdan oluşan her ekzon için bir veya daha fazla sayıda özel proplar dizayn edilir (32).



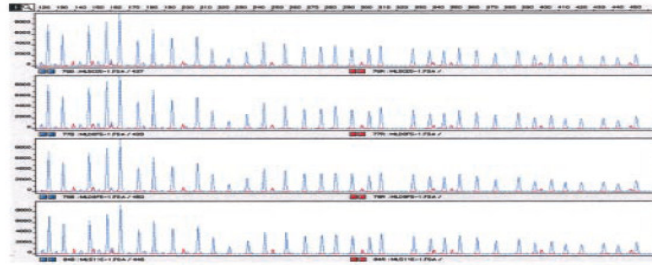
Şekil 8. MLPA Hibridizasyon: Hazırlanan prob protokolde anlatıldığı gibi hedef DNA'ya hibridize olur (32).



Şekil 9. MLPA Ligasyon: Eğer probumuzun iki kısmında hedef DNA'ya hibridize olmuşsa aradaki boşluk ligaz tarafından doldurulur ve tek parça bir prob elde edilir (32).



Şekil 10. MLPA PCR: Ligasyonu gerçekleşen prob uçlarında bulunan primerler sayesinde PCR yapılarak çoğaltılır. Bu PCR probun iki kısmı birleştirilmiş yani ligaz reaksiyonu gerçekleşmişse meydana gelir aksi takdirde oluşmaz (32).



Şekil 11. MLPA Fragment Analizi: PCR sonucu oluşan ürünler kapiller elektroforez vasıtasıyla birbirinden ayrılırlar (32).

BRCA1 gen mutasyonlarının % 10-15' ini büyük genomik yeniden düzenlenmelerin oluşturduğu tespit edilmiştir. Yaklaşık 90 tane BRCA yeniden düzenlenmesi rapor edilmiştir (Tablo 5) (33).

Tablo 5. BRCA1 Büyük genomik yeniden düzenlenmeler (33)

	BRCA1 Ekzon	Çalışılan Ülke	Yeniden Düzenlenme	Mutasyon Büyüklüğü
1	Promotor	Amerika	Delesyon	13.8 kbp
2	Int2 BRCA1-	Fransa, İngiltere İtalya, Almanya	Delesyon	36.9 kbp
3	Ekzon 1-2	İtalya, Almanya Amerika/Avrupalı Amerika	Delesyon	Tespit edilemedi
4	Ekzon 1-2	Amerika/Almanyalı	Delesyon	36.934 kbp
5	Ekzon 1-3	Amerika/Norveçli	Delesyon	23.395 kbp
6	Ekzon 1a-12	Amerika/İrlandalı	Delesyon	88.55 kbp
7	Ekzon 1a-15	Amerika/Almanyalı	Delesyon	>169.639 kbp
8	Ekzon 1-17	İngiltere	Delesyon	Tespit edilemedi
9	Ekzon 1-22	Fransa	Delesyon	161 kbp
10	Ekzon 1-23	Amerika/İrlandalı	Delesyon	86.853 kbp
11	Ekzon 1-24	İspanya	Delesyon	Tespit edilemedi
12	Ekzon 3	Avustralya/NZ	Delesyon	Tespit edilemedi
13	Ekzon 3	Amerika	Delesyon ve Ters Duplikasyon	1.029 kbp
14	Ekzon 3	Amerika/İngiltereli	Delesyon İnsersiyon	1.042 kbp
15	Ekzon 3-5	İngiltere	Duplikasyon	Tespit edilemedi
16	Ekzon 3-7	İngiltere	Delesyon	Tespit edilemedi
17	Ekzon 3-8	Fransa	Duplikasyon	17.2 kbp
18	Ekzon 3-16	Danimarka	Delesyon	Tespit edilemedi
19	Ekzon 5	Avustralya/NZ	Delesyon	Tespit edilemedi
20	Ekzon 5	Almanya	Delesyon	0.244 kbp
21	Ekzon 5	İtalya	Delesyon	Tespit edilemedi
22	Ekzon 5-7	Almanya	Delesyon	5 kbp
23	Ekzon 5-7	İtalya	Delesyon	Tespit edilemedi
24	Ekzon 5-8	İtalya	Delesyon	Tespit edilemedi
25	Ekzon 8	Hollanda	Delesyon	1.458 kbp
26	Ekzon 8-9	Amerika/Afrikalı	Delesyon	3.936 kbp
27	Ekzon 8-9	Amerika/ Kuzey Avrupalı	Delesyon	7.1 kbp
28	Ekzon 8-13	Fransa İngiltere İspanya	Delesyon	23.8 kbp Tespit edilemedi 23.76 kbp
29	Ekzon 8-24	Amerika/Almanyalı	Delesyon	65.520 kbp
30	Ekzon 9-12	İngiltere	Delesyon	Tespit edilemedi
31	Ekzon 9-19	İtalya	Delesyon	36.381 kbp
32	Ekzon 11-15	Portekiz İspanya	Delesyon	Tespit edilemedi

Tablo 5 devam

33	Ekzon 13	Amerika, Avustralya Belçika, Kanada İngiltere, Almanya Hollanda, İsveç	Duplikasyon	6 kbp
34	Ekzon 13	Hollanda, Amerika	Delesyon	3.835 kbp
35	Ekzon 13	Singapur/Çinli	Duplikasyon	8.46 kbp
36	Ekzon 13	Singapur/Çinli	Duplikasyon	Tespit edilemedi
37	Ekzon 13-15	Danimarka, Amerika/ Fransalı-Almanyalı	Delesyon	11.604 kbp
38	Ekzon 13-15	Singapur/Hindistanlı	Delesyon	10.411 kbp
39	Ekzon 13-16	Hollanda	Delesyon	14 kbp
40	Ekzon 14	İspanya	Delesyon	4.95 kbp
41	Ekzon 14-19	İtalya	Delesyon	19.886 kbp
42	Ekzon 14-20	Amerika	Delesyon	26 kbp
43	Ekzon 15	Fransa	Delesyon	3 kbp
44	Ekzon 15-16	Fransa	Delesyon	6 kbp
45	Ekzon 16-20	İtalya	Delesyon	8.342 kbp
46	Ekzon 17	Fransa Amerika/Almanyalı	Delesyon	1 kbp
47	Ekzon 17	Amerika/Almanyalı	Delesyon	2.68 kbp
48	Ekzon 17	İtalya, Amerika Almanya	Delesyon	3 kbp
49	Ekzon 17	Almanya	Delesyon	5.105 kbp
50	Ekzon 17-19	Amerika/Avrupalı	Delesyon	Tespit edilemedi
51	Ekzon 17-19	Hollanda	Triplikasyon	8.352 kbp
52	Ekzon	Amerika/Anglo Sax.	Delesyon, İnsersiyon	11.5 kbp
53	Ekzon 17-23	Hollanda	Delesyon	22 kbp
54	Ekzon 18	Fransa	Delesyon Duplikasyon	Del 6 bp İns 12 bp
55	Ekzon 18-19	İtalya	Delesyon	4.826 kbp
56	Ekzon 18-19	İngiltere	Duplikasyon	Tespit edilemedi
57	Ekzon 18-19	Amerika/Afrikalı	Duplikasyon	5.923 kbp
58	Ekzon 18-20	Fransa	Duplikasyon	8.6 kbp
59	Ekzon 19-20	İspanya	Duplikasyon	Tespit edilemedi
60	Ekzon 20	Amerika/Fransız	Delesyon	3.985 kbp
61	Ekzon 20	Kanada	Delesyon	4 kbp
62	Ekzon 20	İtalya	Delesyon	4.328 kbp
63	Ekzon 20	Yunanistan	Delesyon	3.2 kbp
64	Ekzon 20	İngiltere	Delesyon	Tespit edilemedi
65	Ekzon 20	İspanya	Duplikasyon	Tespit edilemedi
66	Ekzon 20	İtalya	Duplikasyon	8.706 kbp
67	Ekzon 20-22	Amerika/İngiliz	Delesyon	11.357 kbp
68	Ekzon 20-22	Hollanda	Delesyon	11.395 kbp
69	Ekzon 21-22	Amerika/İrlandalı	Delesyon	3.432 kbp
70	Ekzon 21-22	İspanya	Amplikasyon	Tespit edilemedi
71	Ekzon 21-23	Hollanda	Duplikasyon	7.654 kbp
72	Ekzon 21-23	Avustralya/NZ	Delesyon	Tespit edilemedi

Tablo 5 devam

73	Ekzon 21-24	Amerika/İrlandalı	Delesyon	19.245 kbp
74	Ekzon 21-24	İngiltere	Delesyon	Tespit edilemedi
75	Ekzon 22	Hollanda,Almanya, Amerika	Delesyon	510 bp
76	Ekzon 23-24	İspanya	Delesyon	Tespit edilemedi
77	Ekzon 23-24	İtalya	Delesyon	Tespit edilemedi

Tablo 6. BRCA2 Büyük genomik yeniden düzenlenmeler (33)

	BRCA2 Ekzon	Çalışılan Ülke	Yeniden Düzenlenme	Mutasyon Büyüklüğü
1	Ekzon 1-2	Fransa	Duplikasyon	Tespit edilemedi
2	Ekzon 1-2	İngiltere	Delesyon	Tespit edilemedi
3	Ekzon 1-2	Avustralya/NZ	Delesyon	Tespit edilemedi
4	Ekzon 1-2	Amerika/İngiliz	Delesyon	2.340 kbp
5	Ekzon 3	İsveç	Delesyon	5.068 kbp
6	Ekzon 4-11a	Singapur/Çinli	Duplikasyon	16.189 kbp
7	Ekzon 8-11a	İtalya	Delesyon	4.322 kbp
8	Ekzon 12-13	İsrail	Delesyon	6.2 kbp
9	Ekzon 12-13	Fransa	Delesyon	7.947 kbp
10	Ekzon 14-16	Avustralya/NZ	Delesyon	Tespit edilemedi
11	Ekzon 17-18	İtalya	Delesyon	10.838 kbp
12	Ekzon 19-20	Amerika/Hollandalı Alman	Duplikasyon	9.7 kbp
13	Ekzon 20	İtalya	Delesyon	4.953 kbp
14	Ekzon 21	Amerika/Macar	Delesyon	1.518 kbp
15	Tüm Gen	Fransa	Delesyon	298 kbp

Yukarıdaki tablolarda görülen mutasyonlar dışında, prob bağlanma bölgelerinde tek nokta mutasyonları ve polimorfizmleri varsa bunlar probun bağlanmasına engel olur ve MLPA analizi sonrası delesyon gibi sonuç verir. Prob bağlanma bölgelerinde bulunan tespit edilmiş tek nokta mutasyonları (SNP) aşağıdaki tablolarda verilmiştir.



Tablo 7. BRCA2 geni 7. Ekzon A/G polimorfizmi ve MLPA probu

BRCA2, 7. Ekzon rs 28897703 numaralı A/G tek nükleotid polimorfizmi (34)
tctttcctcccagggtcgtcagacacccaaaA/Gcatatcttctgaaagtctaggagc tgaggtg
MLPA, BRCA2, 7. Ekzon probu
ACCAAA(a/g)CAT-ATTTCTGAAA

Tablo 8. BRCA2 geni 10. Ekzon C/T polimorfizmi ve MLPA probu

BRCA2 10. Ekzon rs 41293475 numaralı C/T tek nükleotid polimorfizmi (35)
agccctttgagagtggaagtgacaaaatctC/Tcaaggaagttgtaccgtctttgg cctgtga
MLPA, BRCA2, 10. Ekzon Probu
AGTGACAAAA-TCT(c/t)CAAGGA

Tablo 9. BRCA2 geni 11. Ekzon C/G polimorfizmi ve MLPA probu

BRCA2 11. Ekzon rs 28897712 numaralı C/G tek nükleotid polimorfizmi (36)
aaagctgttcacagaatgattctgaagaacaacC/Gtttgtccttaactagctctt ttgggac
MLPA, BRCA2, 11. Ekzon 1. Probu
TGAAGAACCA-A(c/g)TTTGTCTT

Tablo 10. BRCA2 geni 14. Ekzon G/C polimorfizmi ve MLPA probu

BRCA2 14. Ekzon rs 45574331 numaralı G/C tek nükleotid polimorfizmi (37)
tatattttctccccattgcagcacaactaaG/Cgaacgtcaagagatacagaatcc aaatttt
MLPA, BRCA2, 14. Ekzon Probu
CACAACCTAA(g/c)-GAACGTCAAG

Tablo 11. BRCA2 geni 14. Ekzon C/T polimorfizmi ve MLPA probu

BRCA2 14. Ekzon rs 41293505 numaralı C/T tek nükleotid polimorfizmi (38)
TtttctccccattgcagcacaactaaggaaC/Tgtcaagagatacagaatccaaat tttaccg
MLPA BRCA2, 14. Ekzon Probu
CACAACCTAAG-GAA(c/t)GTCAAG

Tablo 12. BRCA2 geni 15. Ekzon C/T polimorfizmi ve MLPA probu

BRCA2 15. Ekzon rs 28897744 numaralı C/T tek nükleotid polimorfizmi (39)
cacagccaggcagtcctgtatcttgcaaaaaC/Tatccactctgcctcgaatctctc tgaaagc
MLPA, BRCA2, 15. Ekzon Probu
GTCTGTATCT-TGCAAAAA(c/t)A

Tablo 13. BRCA2 geni 18. Ekzon A/G polimorfizmi ve MLPA probu

BRCA2 18. Ekzon rs 41293515 numaralı A/G tek nükleotid polimorfizmi (40)
taaagaatggcagactgacagttggtcagaA/Ggattattcttcatggagcagaac tggtggg
MLPA, BRCA2, 18. Ekzon Probu
AGA(a/g)GATTAT-TCTTCATGGAG

Tablo 14. BRCA2 geni 19. Ekzon T/C polimorfizmi ve MLPA probu

BRCA2 19. Ekzon rs 28897751 numaralı T/C tek nükleotid polimorfizmi (41)
gtactcggcctgctcgctggtatacctaaacT/Ctggattctttcctgaccctagac ctttcc
MLPA, BRCA2, 19. Ekzon Probu
ATACCAAAC(t/c)-TGGATTCTTT

Tablo 15. BRCA2 geni 20. Ekzon A/C polimorfizmi ve MLPA probu

BRCA2 20. Ekzon rs 11571747 numaralı A/C tek nükleotid polimorfizmi (42)
aggaagaaaaggaagcagcaaaaatgtggA/Cggcccaacaaaagagactagaag ccttatt
MLPA, BRCA2, 20 Ekzon probu
GCAGCAAAT-ATGTGG(a/c)GGC

Çalışmada, tablo 16 ve tablo 17’ de gösterilen problemleri içeren BRCA1 için (P087 BRCA1 MLPA) , BRCA2 için ise (P045 BRCA2 MLPA) kitleri kullanıldı.

Tablo 16. BRCA1 Prob Bağlanma Dizileri

Uzunluk (nükleotid)	Ekzon	Probun Ekzonda Bağlandığı Dizi
148	Ekzon1	TGCGCACTCG-TAGTTCACC
436	Ekzon 1	TGGCAACGGA-AAAGCGCGGG
166	Ekzon 2	TGGGACACTC-TAAGATTTTC
175	Ekzon 3	TACTTGCAA-AATATGTGGT
346	Ekzon 5	CAAATTATAT-ACCTTTTGGT
208	Ekzon 6	CTTTTCAGCT-TGACACAGGT
217	Ekzon 7	AGCCATACT-TTGGATGATA
226	Ekzon 8	TCTTTACCAT-ACTGTTTAGC
235	Ekzon 9	AAGTTCTCT-TTGACTCACC
355	Ekzon 10	CAGAATCCAA-ACTGATTCA
277	Ekzon 11	TACAACATCAT-GGAAGGTA
286	Ekzon 12	TTAAAATGTC-ACTCTGAGAG
244	Ekzon 13	TGGCTGAACT-AGAAGCTGTG
295	Ekzon 13	GTGACTCTTC-TGCCCTTGAG
265	Ekzon 14	TGATGTTTCT-TACCTTTCCA
328	Ekzon 15	ACAGCTGGAA-GAGTCTGGGC
337	Ekzon 16	AGAGTCAGCT-CGTGTTGGCA
406	Ekzon 17	TAAAGTTTCT-TGGTATACCT
184	Ekzon 18	AAAATGGGTA-GTTAGCTATT
364	Ekzon 19	AAAAGAGCAC-GTTCTTCTGC
388	Ekzon 20	TTCTCTTATCC-TGATGGGTTG
397	Ekzon 21	TTTGTCTTAC-ATAGTGGAGT
199	Ekzon 22	GCTTTCATCA-TTCACCCTTG
415	Ekzon 23	GCATGTACCT-GTGCTATATG
424	Ekzon 24	AATGGAAGGA-GAGTGCTTGG

Tablo 17. BRCA2 Prob Bağlanma Dizileri

Uzunluk (nükleotid)	Ekzon	Probun Ekzonda Bağlandığı Dizi
139	Exon 1	GCGCGGGCTT-GTGGCGCGAG
148	Exon 1	GTAGTGGGTT-GGGACGAGCG
166	Exon 2	CGTGTCTTAA-AAATTTCAAA
175	Exon 3	TAATATTCAA-AGAGCAAGGG
193	Exon 4	TAGTAGACAT-AAAAGTCTTC
346	Exon 6	AAACTTTGGT-GTATGAAACA
202	Exon 7	ACCAAAACAT-ATTTCTGAAA
220	Exon 8	TGACTTTCCA-ACTCATTGTG
229	Exon 9	CACAAATCAA-AGAGAAGCTG
247	Exon 10	AGTGACAAAA-TCTCCAAGGA
256	Exon 11	TGAAGAACCA-ACTTTGTCTT
274	Exon 11	TCTTTTTACA-TGTCCCGAAA
283	Exon 12	ACAGAACAAA-AATGTAATTG
301	Exon 13	ACACAGGTAA-TCGGCTCTAA
310	Exon 14	CACAACCTAAG-GAACGTCAAG
328	Exon 15	GTCTGTATCT-TGCAAAAACA
337	Exon 16	AGTTGGCTGA-TGGTGGATGG
355	Exon 17	AGGCATCTAT-TAGCAAATTC
364	Exon 18	AGAAGATTAT-TCTTCATGGAG
382	Exon 19	ATACCAAACCT-TGGATTCTTT
391	Exon 20	GCAGCAAAAT-ATGTGGAGGC
409	Exon 21	AAGACAGCAA-GTTCGTGCTT
418	Exon 22	CTGAACAAAA-GGAACAAGGT
436	Exon 24	CAGCAAATTT-TTAGATCCAG
445	Exon 25	GCTGGAGATT-TTTCTGTGTT
463	Exon 26	CTGCATGCAA-ATGATCCCAA
472	Exon 27	TTTGTACATT-TGTTTCTCCG

### 3.4.1.MLPA Analiz Protokolü

#### 3.4.1.1.Denatürasyon ve Hibridizasyon

- Her PCR tüpüne 5 µL DNA alınır. 98 °C ‘ de 5 dakika tutuldu (PCR cihazı hacmi 8 µL’ ye ayarlandı).
- Bu arada 1. karışım hazırlandı.
  - Hasta sayısı : n 1.5 µL SALSA prob karışımı . n
    - 1.5 µL MLPA tamponu . n
    - İyice pipetajlanarak karıştırıldı.
- 25 °C’ ye soğuyunca cihazda durduruldu.
- Hazırlanan 1. karışımdan her pcr tüpüne 3 µL iyice pipetajlanarak eklendi programa devam edildi.
- 95 °C’ de 1 dakika inkübe edildi.
- 60 °C’ de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

#### 3.4.1.2.Ligasyon Reaksiyonu

- 16 saat tamamlanmadan yarım saat önce 2. mix buz üzerinde hazırlandı.
  - Hasta sayısı : n 25 µL su . n
    - 3 µL Ligaz 65 tampon A . n
    - 3 µL Ligaz 65 tampon B . n
    - 1 µL Ligaz 65 . n
  - İyice pipetajlanarak karışım hazırlandı.
- Sıcaklık 54 °C’ ye düşünce her pcr tüpüne 32 µL 2. karışımdan eklendi.
- 15 dakika 54 °C’ de inkübe edildi.
- 5 dakika 98 °C’ de inkübe edildi.
- Bu arada 3. karışım buz üzerinde hazırlandı.
  - Hasta sayısı : n 26 µL su . n
    - 4 µL 10x SALSA PCR tampon . n
    - İyice pipetajlanarak karışım hazırlandı.
- 4. karışımda buz üzerinde hazırlandı.

- Hasta sayısı : n
- 5.5 µL su . n
- 2 µL SALSA pcr primer . n
- 2 µL SALSA enzim seyreltme tamponu . n
- 0.5 µL SALSA polimeraz . n
- İyice pipetajlanarak karışım hazırlandı.

### 3.4.1.3.PCR Reaksiyonu

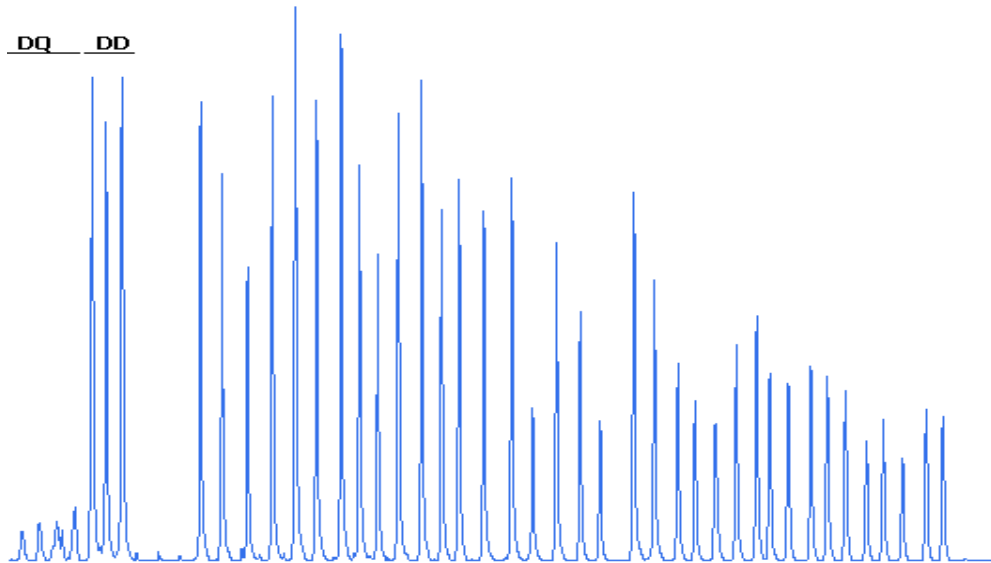
- Hasta sayısı kadar yeni pcr tüpü hazırlandı.
- Her pcr tüpüne 30 µL 3. karışımdan dağıtıldı.
- 30 µL 3. karışımdan dağıtılan tüplerin üzerine 10 µL ligasyon ürünleri eklendi.
- Ligasyon ürünleri -20' de işlem sonuna kadar saklandı.
- Tüplerin 60 °C' ye gelince ; 10 µL 4. mixten eklendi.
- PCR programı başlatıldı.
- (35 siklus: 30 saniye 95 °C ; 30 saniye 60 °C ; 60 saniye 72 °C )
- 72 °C 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Pcr ürünleri işlem sonuna kadar – 20' de saklandı.

### 3.4.1.4.MLPA PCR Sonrası Cihaza Yükleme

- Denatürasyon karışımı hazırlandı.
  - Hasta sayısı : n
  - 12 µL formamid . n
  - 0.5 µL LIZ size standart . n
- Hasta sayısı kadar cihaza yükleme tüpü çıkarılarak numaralandırıldı ve karışımdan 12,5 µL her tüpe dağıtıldı.
- İlgili tüpe 1 µL pcr ürünü ilave edildi.
- 94 °C ' de 3 dakika denatüre edildi.
- Cihaza yüklendi.

### 3.4.1.5.Sonuçların Değerlendirilmesi

- Cihazda analiz ettikten sonra oluşan size standart piklerinin uygunluğu kontrol edildi.
- Numune pikleri kontrol edildi.
- Numune için ilk 4 küçük pik DQ pikleridir. Ondan sonraki 3 büyük pik ise DD pikleridir. DD pikleri daima DQ piklerinden yüksek olmalıdır (Şekil 12).
- DD piklerinden ortada olan ligasyon kontrol pikidir. DQ piklerinden büyükse DNA yeterli demektir.
- Ligasyon pikinin sağındaki ve solundaki pikler ise denatürasyon kontrol pikleridir ve ligasyon pikine eşit olmalıdır. Daha düşükse denatürasyon olmamış demektir.
- Bu kontrollerden sonra sonuçlar windows ortamına başka bir bilgisayara alındı.
- İlgili işlemler yapılarak Coffalayser (versiyon 3) değerlendirme programı kullanılarak hastalarımız kontrol DNA'larına göre değerlendirildi ve program sayesinde tüm ekzonlara ait taranan bilgiler tablo şeklinde alındı.



Şekil 12. DQ ve DD piklerinin gösterimi



### **3.5.DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi, ilgili PCR işlemleri yapıldıktan sonra otomatize genetik analizör kullanılarak yapıldı.

Otomatik DNA dizi analiz cihazları bir bilgisayar ve buna bağlı çalışan bir kapiller elektrofez sistemidir. DNA floresan bir boya ile çeşitli işlemlerle işaretlenir ve elektroforeze tabi tutulur. Elektroforez sistemine entegre lazer bir ışık bulunur. Floresan boya ile işaretli nükleotidler elektroforezle yürütülürler ve boyutlarına göre ayrımları sağlanır. Bu boyutlarına göre ayırırda lazer ışığın önünden geçen nükleotidlerdeki floresan boya uyarılır ve hangi renk ile işaretlenmişse o dalga boyundaki ışığı yansıtır. Nükleotid tarafından yansıtılan bu ışık dedektör tarafından algılanır, kaydedilir, değerlendirilir ve sonuç olarak ekranda görülür.

#### **3.5.1.DNA Dizi Analizi Protokolü**

##### **3.5.1.1. Hedef Bölgelerin PCR İle Çoğaltılması**

Dizi analizi yapmak istediğimiz, BRCA1 için 18. ve 19. ekzonlar, BRCA2 için 14. ve 27. ekzonlarda bulunan özel bölgeleri içeren kısımlar PCR ile çoğaltıldı.

- 1X tampon
- 2 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 mM dNTP
- 0,4 pmol Forward Primer
- 0,4 pmol Reverse Primer
- 1,25 U Ampli Taq Enzim (Applied Biosystems)
- 50 ul lik hacimde hazırlandı .
- Bu karışıma 10 µL DNA eklendi.

95 °C de 5 dk                      Ön denatürasyon

95 °C de 45 sn.  
50 °C - 63 °C 45 sn.  
72 °C de 45 sn.                      } 30 Tekrar

72 °C de 7 dk.  
4 °C                                      saklama sıcaklığı

➤ Yukarıdaki şartlarda PCR yapıldı.

### 3.5.1.2. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezi yapılarak kontrol edildi.

*TBE (Tris Borik asit EDTA) Tamponu (pH:8)* : 13,75 g. Borik asit, 27 g.(gram) Tris ve 10 mL 0,5 M Na<sub>2</sub>.EDTA 200 mL deiyonize suda çözüldü ve pH 8 olacak şekilde ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra deiyonize su ile 250 mL' ye tamamlandı. 10X TBE hazırlanmış oldu. Çalışma sırasında 1X TBE olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı.

*Etidyum Bromür*: 100 mL deiyonize suya 1 mg. etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. 10 µg/mL' lik stok hazırlanmış oldu. Her 100 mL jel hazırlama da 5 µL stoktan eklendi.

*Yükleme Tamponu*: % 0,1 Bromfenol mavisi, % 50 sukroz, 50 mM Na<sub>2</sub>.EDTA olacak şekilde karıştırılarak 10 mL yükleme tamponu stok hazırlandı.

1X olacak şekilde seyreltilen 100 mL TBE içine 2 g. agaroz karıştırıldı ve kaynatılarak çözünmesi, homojenize olması sağlandı. Tam soğumadan üzerine 5 µL etidyum bromür eklendi ve kalıba dökülerek ilgili taraklar yerleştirilerek donması sağlandı. Jel donduktan sonra elektroferez tankına yerleştirildi. 5 µL PCR ürünü ile 1 µL yükleme tamponu karıştırılarak jele yüklendi. 200 watt' ta 15 dakika yürütüldü ve transillümütörde bakıldı, görünen ürünlere göre çalışmaya devam edildi.

### 3.5.1.3. Saflaştırma

Hazır saflaştırma kiti ile PCR ürünleri saflaştırıldı.

1. PCR ürünlerinin üzerine 130  $\mu$ L P tamponu eklendi ve kolona yüklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika ünkübe edildi.
2. 10000 rpm' de 30 saniye santrifüjlendi.
3. Kolonlar temiz ependorflara alındı.
4. 700  $\mu$ L yıkama tamponu eklendi.
5. 10000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi.
6. Filtrat atıldı ve kolonlar yeni ependorflara aktarılarak 30 saniye 13500 rpm' de santrifüj edildi.
7. Kolonlar steril 1,5 mL' lik ependorfa alındı.
8. 30  $\mu$ L elüsyon tamponundan eklendi.
9. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
10. 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Filtrat alındı.

### 3.5.1.4.Saflaştırılmış Ürünlerin Elektrofrez

Bölüm 3.5.1.2' de anlatılan elektrofez aynı şekilde saflaştırılmış ürünlere de uygulanıp ürün kontrolü yapıldı.

### 3.5.1.5.Dizi Döngüsü

Dizi döngüsü kitte bulunan hazır reaksiyon karışımı ile yapıldı.

- Hazır reaksiyon karışımı 8  $\mu$ L
- Primer (forward veya reverse)
- Saflaştırılmış ürün 2-6  $\mu$ L
- Deiyonize su 20  $\mu$ L' ye tamamlayacak kadar.

Bu karışım hazırlandıktan sonra PCR cihazına aşağıdaki koşullarda yüklendi.

96 °C	10 sn.	} 25 tekrar
50 °C	5 sn.	
60 °C	4 dk.	
4 °C	Saklama	

### 3.5.1.5.Dizi Döngüsü Sonrası Saflaştırma

1. Dizi döngüsü ürününün üzerine 2 µL 3 mM pH: 4,6 olan NaAc (sodyumasetat) eklendi.
2. Üzerine 50 µL % 95 etanol eklendi.
3. Karışım 1,5 mL' lik ependorfa alınarak karıştırıldı.
4. Buz üzerinde 15 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
6. Üst sıvı atıldı ve üzerine 250 µL % 70'lik etanol eklendi ve hafifçe karıştırıldı.
7. 13000 rpm' de 5 dakika sanrifüj edildi.
8. Üst sıvı tamamen atıldı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.
9. Kuruyan örnekler 20 µL formamid eklenerek karıştırıldı.

### 3.5.1.6.Numunelerin Cihaza Yüklmesi

1. Örnekler 95 °C' de 5 dakika inkübe edilerek buz üzerinde 1-2 dakika bekletildi.
2. Cihazda ilgili ayarlar yapıldıktan sonra yüklendi.

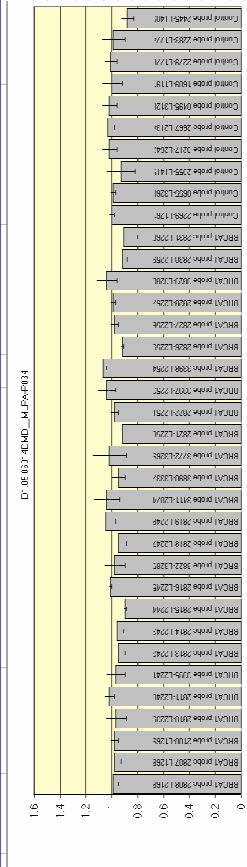
#### 4.BULGULAR

Tablo 18' de 24. numunenin BRCA1 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu görülmektedir ve tabloda gösterilen mavi sütun BRCA1 geni için bu hastada herhangi bir delesyon veya duplikasyonun olmadığını göstermektedir. Tablo 19' da ise 25. numunenin BRCA2 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu görülmekte olup aynı şekilde mavi sütun bu hasta için BRCA2 geninde herhangi bir delesyon ve duplikasyonun olmadığını göstermektedir. Şekil 13, 20 numaralı örneğin BRCA1 geni MLPA analizi sonucunu göstermekte olup 3. pik (pik alanı:24880) şekil 14' teki DNA kontrol örneğinin ilgili piki (pik alanı: 38723) ile karşılaştırıldığında bu hasta için 1. ekzonun delesyonunu işaret etmektedir. Tablo 20' ye bakıldığında 20. numunenin BRCA1 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucu görülmekte ve kırmızı ile işaretli kısım bu numunenin BRCA1 geni 1. ekzonunun delesyonunu göstermektedir. Şekil 15, 25 numaralı örneğin BRCA1 geni MLPA analizi sonucunu göstermekte olup kırmızı işaretli 7. pik (pik alanı: 20427) ve 26. pik (pik alanı:11404) şekil 16' daki DNA kontrol örneğinin ilgili pikleri (7. pik: pik alanı: 45582) ve 26. pik: pik alanı: 23557) ile karşılaştırıldığında bu örnekte 18. ve 19. ekzonların delesyonu görülmektedir. Tablo 21, 25. numunenin BRCA1 geni MLPA analizi sonrası Coffalayser değerlendirme programı sonucudur. Grafikteki kırmızı nokta ile işaretlenen kısımlar 18. ve 19. ekzonlarda delesyon olduğunu göstermektedir. Şekil 17, 25. numunenin BRCA1 geni 18. ekzon dizi analizi sonucu olup şekil 18' deki DNA kontrol numunesinin BRCA1 geni 18. ekzon dizi analizi ile karşılaştırıldığında timin bazının tek nükleotid delesyonu tespit edilmiştir. Şekil 19, yine aynı numunenin BRCA1 geni 19. ekzon dizi analizini göstermekte ve şekil 20' deki DNA kontrol örneğinin BRCA1 geni 19. ekzon dizi analizi ile karşılaştırıldığında herhangi bir fark tespit edilememektedir. Şekil 21' de 29. numunenin BRCA1 geni MLPA analiz sonucu görülmekte olup kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 8497) 22. şekildeki DNA kontrol örneğine ait BRCA1 geni MLPA analizi sonucu ile karşılaştırıldığında (ilgili pik alanı: 14509) bu örnekte 21. ekzonun delesyonunu göstermektedir. Tablo 22 ise 29 numaralı örneğin BRCA1

geni MLPA analizi Coffalayser değerlendirme programı sonucudur ve grafikteki kırmızı nokta ile gösterilen kısım 21. ekzonun delesyonunu işaret etmektedir. 15. numunenin BRCA2 geni MLPA analiz sonucu şekil 23' te gösterilmekte olup 21. pik (pik alanı: 14259) şekil 24' teki DNA kontrol numunesinin 21. piki (pik alanı: 29436) ile karşılaştırıldığında bu numunenin BRCA2 geni 14. ekzonunun delesyonu görülmektedir. Tablo 23' te 15 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi Coffalayser değerlendirme programı sonucudur ve grafikteki kırmızı nokta ile gösterilen kısım 14. ekzonun delesyonunu göstermektedir. 25. şekil 15. numunenin BRCA2 geninin 14. ekzon dizi analizini gösterirken kırmızı nokta ile işaretli nükleotidte G/T tek nükleotid polimorfizmi tespit edilmiştir. Şekil 26' da 20 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi sonucu verilirken kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 39660) 27. şekildeki DNA kontrol örneğine ait BRCA2 geni MLPA analizi sonucu ile karşılaştırıldığında (pik alanı: 28980) bu örnekte 11. ekzonun bir bölgesinin duplikasyonunu göstermektedir. Tablo 24, 20 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi Coffalayser değerlendirme programı sonucudur ve grafikte kırmızı nokta ile işaretlenen kısım 11. ekzonun duplikasyonunu göstermektedir. 28. şekilde 22. numunenin BRCA2 geni MLPA analizinde 39. pik (pik alanı: 22842) 29. şekilde verilen DNA kontrol numunesinin BRCA2 geni MLPA analizi 39. piki (pik alanı: 16247) ile karşılaştırıldığında 22. numune için BRCA2 geninde 27. ekzonun duplikasyonu saptanmıştır. Tablo 25'te 22 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi Coffalayser değerlendirme programı sonucu görülürken grafikte kırmızı nokta ile işaretlenen kısım 27. ekzonun duplikasyonunu göstermektedir. 30. ve 31. şekillerde sırasıyla 22 numaralı örneğin ve kontrol örneğinin 27. ekzonlarının dizi analizi sonuçları verilerek aralarında herhangi bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 18. 24. Numune BRCA1 geni MLPA analizi sonrası Coffalayer değerlendirme programı sonucu

Gene	Chr pos	Length (bp)	MV26	Recommended Order	Raw Signal	Ratio	SD	95% Confidence ><	Odds: Gain - 3 copies	Odds: Deletion - 1 copy
B=CA1 E 985 2206-2213	17:21	57	7AC38.5 E=0.0 C=0 A	1	16520	0.99	0.04	0.91-1.03	0.551	52742.1
B=CA1 E 985 2207-1233	17:21	48	7AC38.5 E=0.0 C=0 S	2	19331	0.96	0.06	0.89-1.07	4431	24502.1
B=CA1 E 985 2208-1233	17:21	48	7AC38.5 E=0.0 C=0 S	3	3267	0.95	0.02	0.92-1.04	1819	12633.1
B=CA1 E 985 2209-1233	17:21	48	7AC38.5 E=0.0 C=0 S	4	19437	1.02	0.04	0.94-1.12	3251	17343.1
B=CA1 E 985 2210-2242	17:21	36	17-038.5 E=0.005	5	12119	0.97	0.07	0.83-1.11	1241	4096.1
B=CA1 E 985 2210-2242	17:21	208	17-038.5 E=0.006	7	19342	0.95	0.06	0.84-1.03	1311	3186.1
B=CA1 E 985 2211-2242	17:21	217	17-038.5 E=0.007	8	17322	0.96	0.05	0.85-1.03	2201	7206.1
B=CA1 E 985 2215-2244	17:21	226	17-038.5 E=0.005	9	11523	1.01	0.01	0.97-1.05	5211	2991.1
B=CA1 E 985 2216-2243	17:21	226	7AC38.5 E=0.0 C=0 S	10	18542	0.98	0.02	0.95-1.03	5208.1	4967.6511
B=CA1 E 985 2216-2243	17:21	227	17-038.5 E=0.0 C=0 S	11	3277	0.96	0.08	0.82-1.14	921	588.1
B=CA1 E 985 2216-2243	17:21	227	17-038.5 E=0.0 C=0 S	12	12412	0.97	0.02	0.94-1.02	261	688.1
B=CA1 E 985 2219-2248	17:21	286	17-038.5 E=0.0 C=0 S	13	32412	1.05	0.06	0.98-1.12	261	3172.1
B=CA1 E 985 2219-2248	17:21	244	17-038.5 E=0.0 C=0 S	14	73311	1.02	0.02	0.95-1.03	221	924.1
B=CA1 E 985 2219-2248	17:21	295	17-038.5 E=0.0 C=0 S	15	3906	0.95	0.06	0.85-1.03	1201	3274.1
B=CA1 E 985 2219-2248	17:21	265	17-038.5 E=0.0 C=0 S	16	3337	1.02	0.13	0.76-1.27	1311	639.1
B=CA1 E 985 2221-2252	17:21	328	17-038.5 E=0.0 C=0 S	17	10743	0.92	0	0.91-1.04	4511	10278.1
B=CA1 E 985 2222-2252	17:21	397	17-038.5 E=0.0 C=0 S	18	5464	0.96	0.03	0.93-1.04	2781	13524.1
B=CA1 E 985 2222-2252	17:21	406	17-038.5 E=0.0 C=0 S	19	3521	1.02	0.07	0.91-1.17	591	1931.1
B=CA1 E 985 2222-2252	17:21	406	17-038.5 E=0.0 C=0 S	20	3521	1.02	0.07	0.91-1.17	591	1931.1
B=CA1 E 985 2222-2252	17:21	406	17-038.5 E=0.0 C=0 S	21	3521	1.02	0.07	0.91-1.17	591	1931.1
B=CA1 E 985 2226-2234	17:21	364	17-038.5 E=0.0 C=0 S	22	12345	0.92	0.01	0.92-1.05	3291	11333.1
B=CA1 E 985 2227-2234	17:21	368	17-038.5 E=0.0020	23	10481	0.98	0.03	0.91-1.04	11731	63129.1
B=CA1 E 985 2228-2237	17:21	397	17-038.5 E=0.0021	24	3321	0.99	0.02	0.95-1.02	17921	63805.1
B=CA1 E 985 2228-2237	17:21	397	17-038.5 E=0.0021	25	13338	1.04	0.06	0.88-1.13	371	3884.1
B=CA1 E 985 2230-2252	17:21	415	17-038.5 E=0.0022	26	7401	0.92	0.04	0.84-1.03	1531	3970.1
B=CA1 E 985 2230-2252	17:21	424	17-038.5 E=0.0023	27	3295	0.91	0.11	0.77-1.2	221	326
Control probe 2253L 1 381	17:21	30	7AC38.5 E=0.0 C=0 S	28	18355	0.92	0.02	0.89-1.03	23591.1	22253.081
Control probe 2253L 2 381	17:21	30	7AC38.5 E=0.0 C=0 S	29	18355	0.92	0.02	0.89-1.03	23591.1	22253.081
Control probe 2253L 3 415	17:21	454	7AC38.5 E=0.0 C=0 S	30	1348	0.93	0.11	0.72-1.15	1431	1106.1
Control probe 32 7L2542	10:35	53		31	18359	0.92	0.06	0.91-1.13	1541	15198.1
Control probe 206 7L2134	11:23	373		32	13241	1.03	0.06	0.93-1.13	1551	15190.1
Control probe 0-45 L3128	13: 2	319		33	16138	1.02	0.06	0.91-1.12	1311	1644.1
Control probe 1609 L 191	13: 2	310		34	20738	1.01	0.06	0.85-1.12	761	4912.1
Control probe 2279 L 770	13: 2	256		35	18138	1.01	0.06	0.91-1.12	2311	15393.1
Control probe 2253 L 1 774	13: 2	381		36	19138	0.99	0.06	0.81-1.15	411	2692.1
Control probe 245 L 409	10: 3	445		36	13360	0.98	0.02	0.78-1.07	641	654



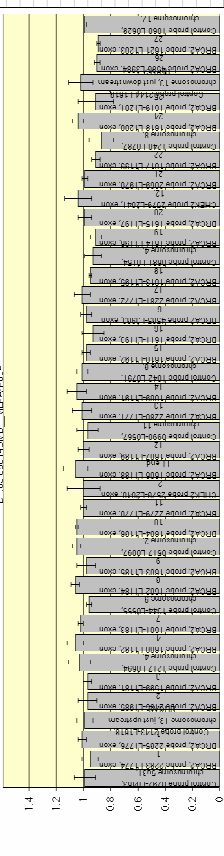
BRCA1 7-24  
 -7:0.0007 14:53  
 Population regression analysis  
 Population regression analysis on Falcid  
 49:543 8:61  
 Use 25:579 in reg  
 Use 25:579 in reg  
 Number of Control probes 36  
 IC  
 Regression Method  
 -CG Linear: Regression  
 -0.0002967-5  
 regression coefficient  
 13.740041725  
 SE  
 0.4  
 Lower limit for control probes 0.82  
 Upper limit for control probes 1.18  
 Times slides C probes for each dataset 10  
 No C-probes found

Tablo 19. 25. Numune BRCA2 geni MLPA Analizi Coffalayer değerlendirme programı sonucu

Gen	Chr pos	Scale	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	Delta	
Control probe 429413433 chr10:115,811,764	10	130	35.132.0	34	2,0852	0.99	0.83	0.82	-1.15	50	2910.1											
BRCA2, probe 2385-1772, exon 10	131	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	4181.1											
BRCA2, probe 2385-1776, exon 11	132	2.3	13,031,819,917.3	2	2.227	1.0	0.63	0.95	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1835-1839, exon 12	133	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1839-1881, exon 13	134	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1886-1888, exon 14	135	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1888-1889, exon 15	136	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1889-1938, exon 16	137	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1938-1944, exon 17	138	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1944-1954, exon 18	139	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1954-1964, exon 19	140	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1964-1974, exon 20	141	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1974-1984, exon 21	142	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1984-1994, exon 22	143	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 1994-2004, exon 23	144	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 2004-2014, exon 24	145	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 2014-2024, exon 25	146	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 2024-2034, exon 26	147	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
BRCA2, probe 2034-2044, exon 27	148	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											
Control probe 129913228 chr10:115,811,764	148	2.3	13,031,819,917.3	2	2.093	0.95	0.64	0.83	-0.7	124.1	1296.51											

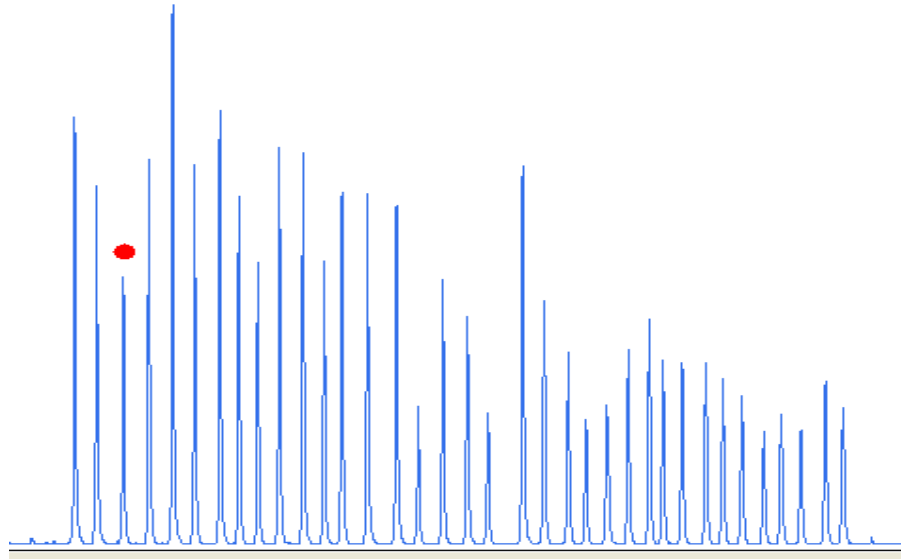
RESULTS P045 MLPA probemix no. 490 probe list 0905

Sample Name	BRCA2 7-24
Control probe 429413433 chr10:115,811,764	35.132.0
BRCA2, probe 2385-1772, exon 10	131.2.3
BRCA2, probe 2385-1776, exon 11	132.2.3
BRCA2, probe 1835-1839, exon 12	133.2.3
BRCA2, probe 1839-1881, exon 13	134.2.3
BRCA2, probe 1886-1888, exon 14	135.2.3
BRCA2, probe 1888-1889, exon 15	136.2.3
BRCA2, probe 1889-1938, exon 16	137.2.3
BRCA2, probe 1938-1944, exon 17	138.2.3
BRCA2, probe 1944-1954, exon 18	139.2.3
BRCA2, probe 1954-1964, exon 19	140.2.3
BRCA2, probe 1964-1974, exon 20	141.2.3
BRCA2, probe 1974-1984, exon 21	142.2.3
BRCA2, probe 1984-1994, exon 22	143.2.3
BRCA2, probe 1994-2004, exon 23	144.2.3
BRCA2, probe 2004-2014, exon 24	145.2.3
BRCA2, probe 2014-2024, exon 25	146.2.3
BRCA2, probe 2024-2034, exon 26	147.2.3
BRCA2, probe 2034-2044, exon 27	148.2.3
Control probe 129913228 chr10:115,811,764	148.2.3

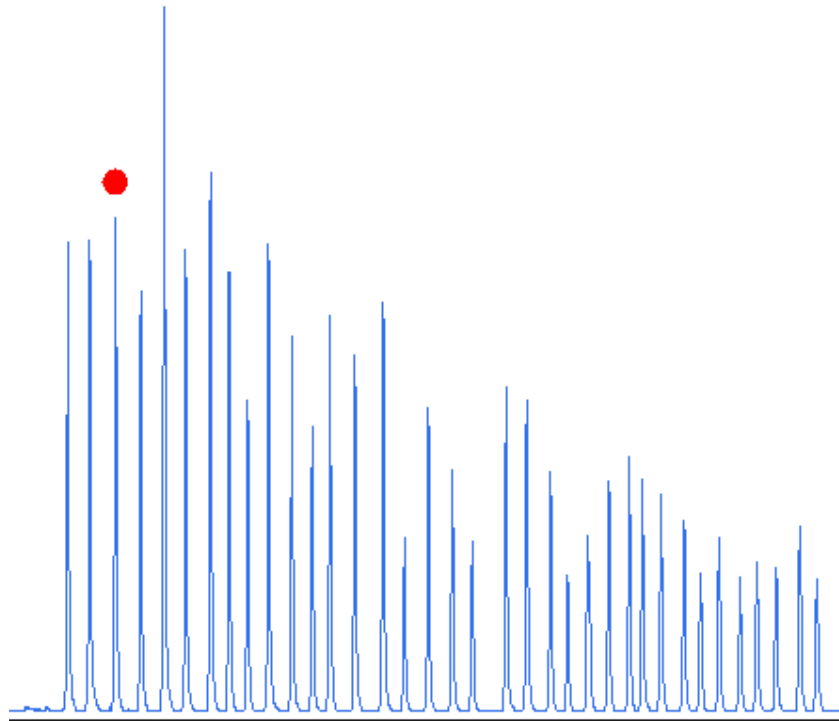


Probe Name	Ratio	Reference Ratio
Control probe 429413433 chr10:115,811,764	35.132.0	1.0
BRCA2, probe 2385-1772, exon 10	131.2.3	1.0
BRCA2, probe 2385-1776, exon 11	132.2.3	1.0
BRCA2, probe 1835-1839, exon 12	133.2.3	1.0
BRCA2, probe 1839-1881, exon 13	134.2.3	1.0
BRCA2, probe 1886-1888, exon 14	135.2.3	1.0
BRCA2, probe 1888-1889, exon 15	136.2.3	1.0
BRCA2, probe 1889-1938, exon 16	137.2.3	1.0
BRCA2, probe 1938-1944, exon 17	138.2.3	1.0
BRCA2, probe 1944-1954, exon 18	139.2.3	1.0
BRCA2, probe 1954-1964, exon 19	140.2.3	1.0
BRCA2, probe 1964-1974, exon 20	141.2.3	1.0
BRCA2, probe 1974-1984, exon 21	142.2.3	1.0
BRCA2, probe 1984-1994, exon 22	143.2.3	0.37
BRCA2, probe 1994-2004, exon 23	144.2.3	1.0
BRCA2, probe 2004-2014, exon 24	145.2.3	1.0
BRCA2, probe 2014-2024, exon 25	146.2.3	1.0
BRCA2, probe 2024-2034, exon 26	147.2.3	1.0
BRCA2, probe 2034-2044, exon 27	148.2.3	1.0
Control probe 129913228 chr10:115,811,764	148.2.3	1.0



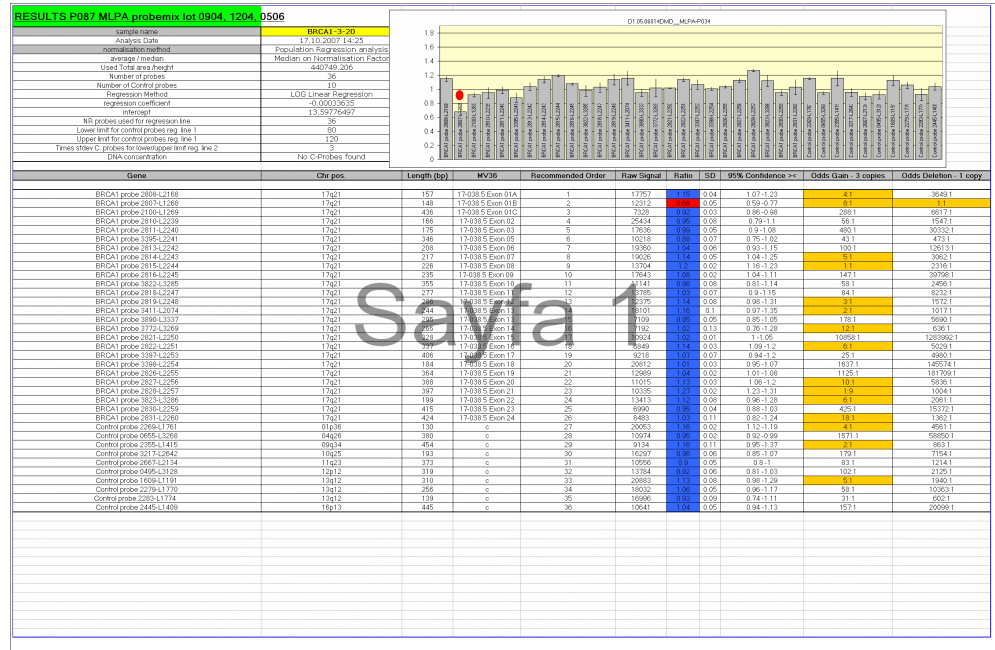


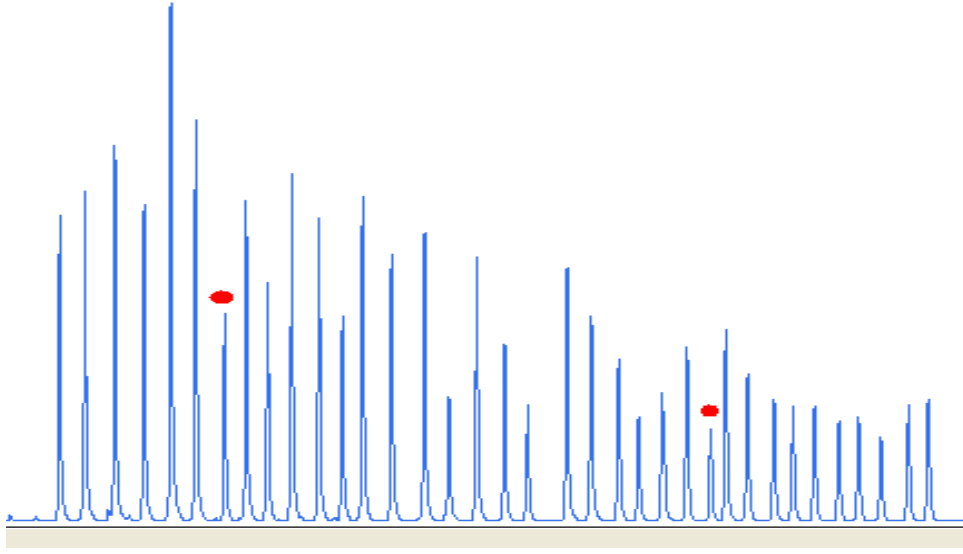
Şekil 13. 20 numaralı örneğin BRCA1 geni MLPA analizi sonucu . Kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 24880) DNA kontrol ile karşılaştırıldığında 1.ekzondaki delesyonu göstermektedir.



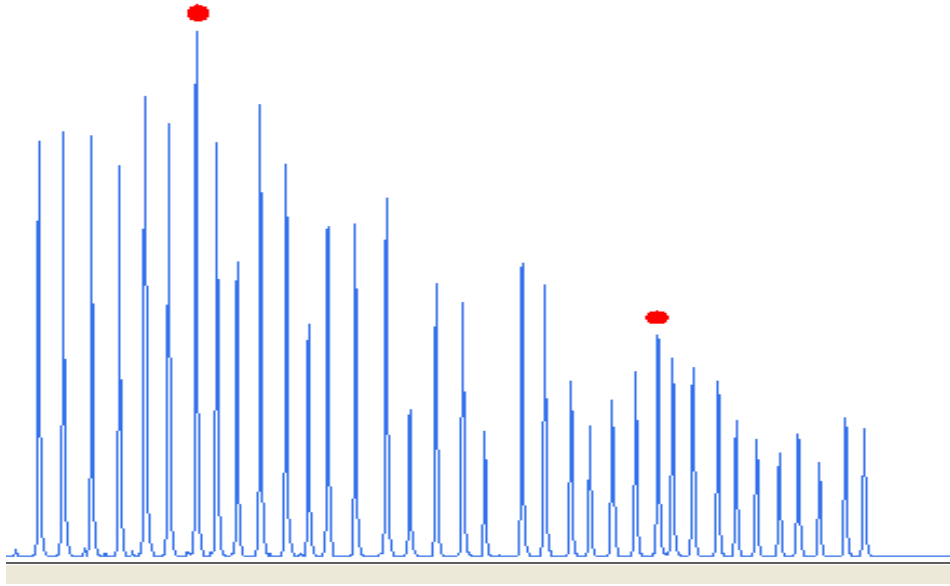
Şekil 14. DNA kontrol numunesinin BRCA1 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pik normal 1.ekzon (pik alanı: 38723) pikidir.

Tablo 20. 20. Numune BRCA1 geni MLPA analizi Coffalayer değerlendirme programı sonucu



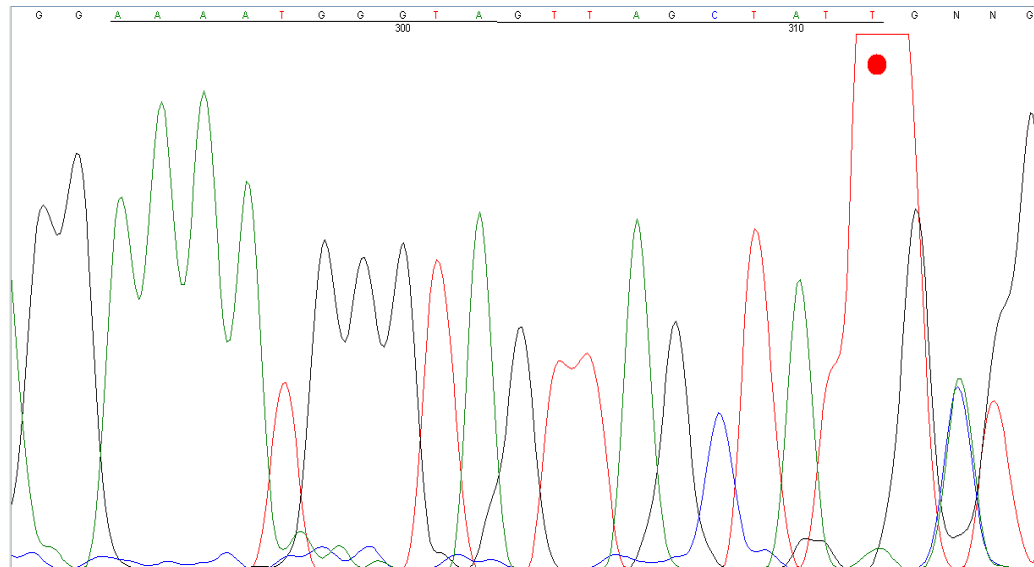
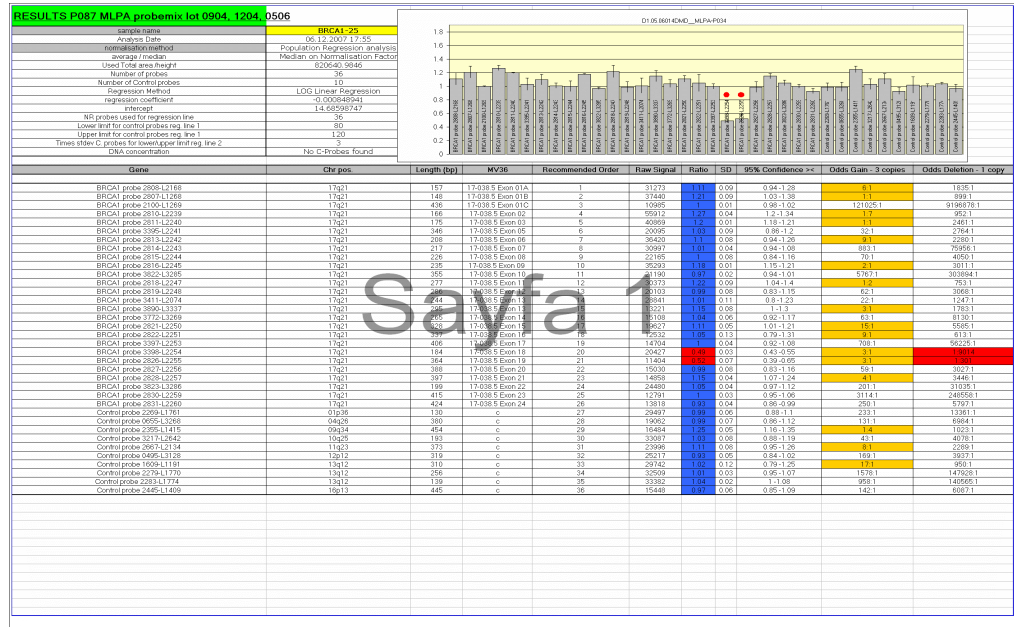


Şekil 15. 25 numaralı örneğin BRCA1 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pikler DNA kontrol ile karşılaştırıldığında 18. (pik alanı: 20427) ve 19. (pik alanı: 11404) ekzonlardaki delesyonu göstermektedir.

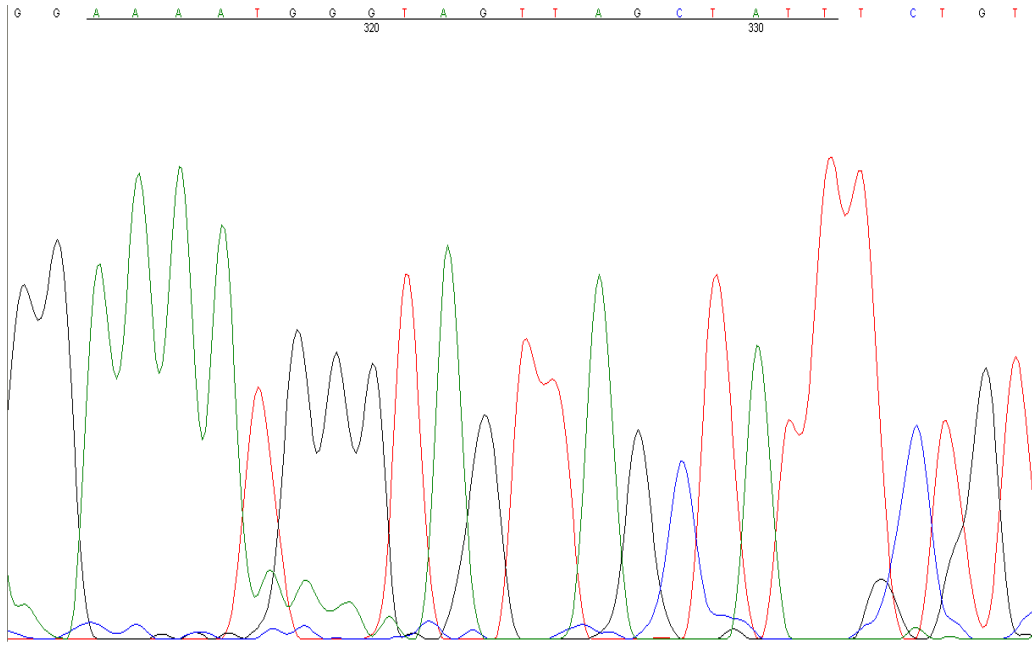


Şekil 16. DNA kontrol örneğinin BRCA1 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pikler normal 18. (pik alanı: 45582) ve 19. (pik alanı: 23557) ekzon pikleridir.

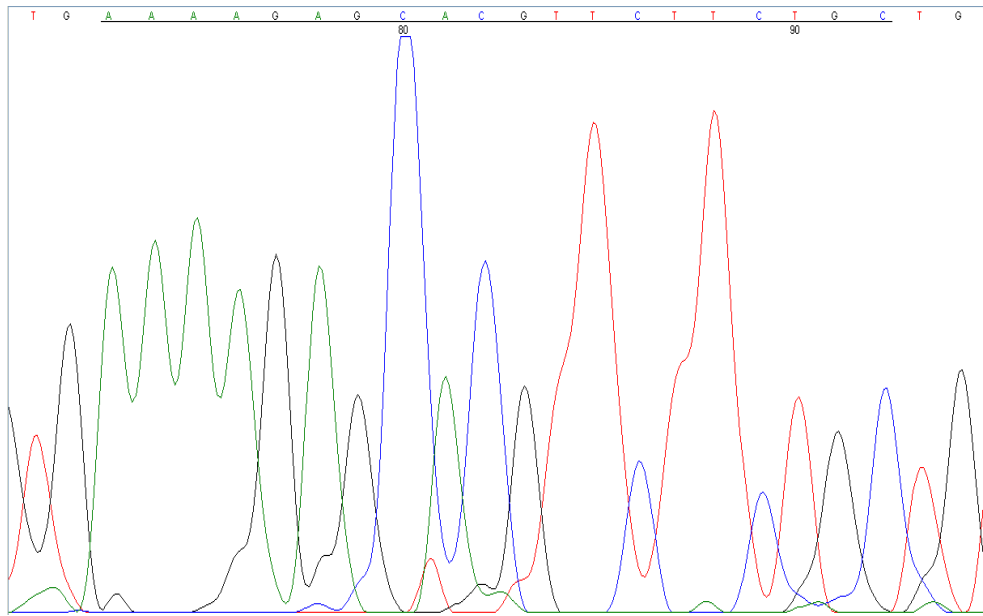
Tablo 21. 25 numaralı örneğin BRCA1 geni MLPA analizi Coffalaysen değerlendirme programı sonucu. Grafikteki kırmızı nokta ile işaretlenen kısımlar 18. ve 19. ekzonlarda delesyon olduğunu göstermektedir.



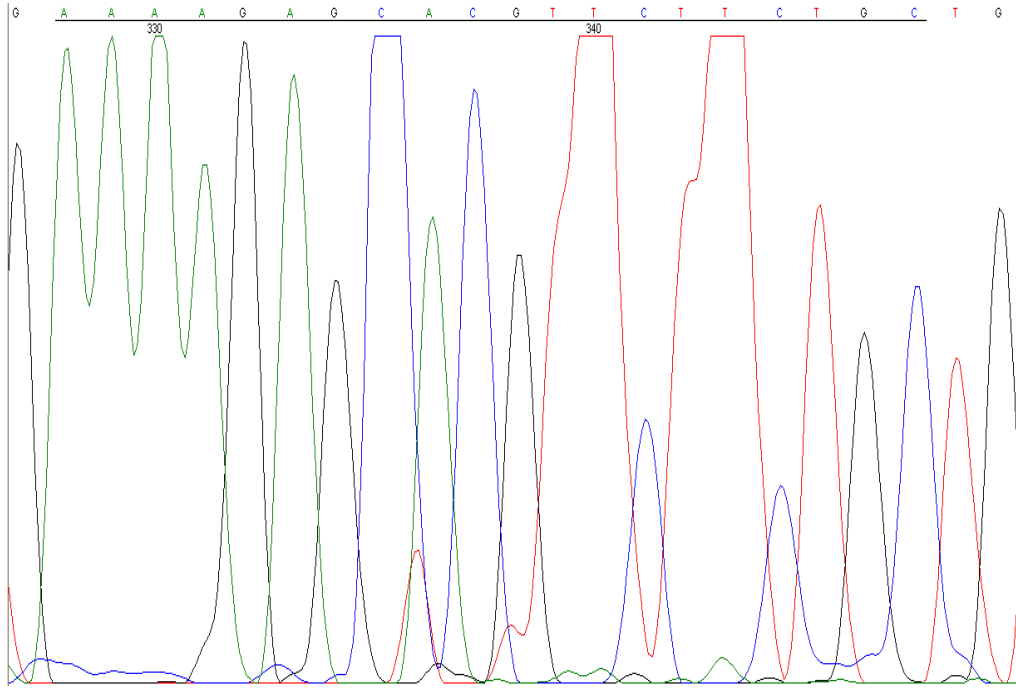
Şekil 17. 25 numaralı örneğin BRCA1 geni 18. ekzon dizi analizi sonucu. Prob bağlanma bölgesinin son bazı olan Timin'in heterozigot delesyonu sonucu prob bağlanamamıştır. Bu bazdan sonraki bazlar delesyondan dolayı çerçeve kaymasına uğramıştır.



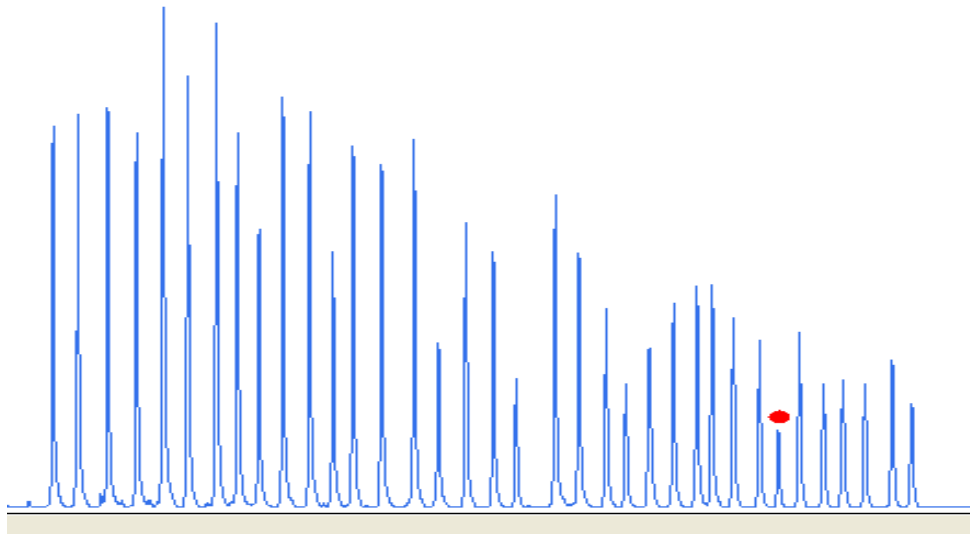
Şekil 18. DNA kontrol örneği BRCA1 geni 18. ekzon dizi analizi sonucu. Prob bağlanma bölgesinde herhangi bir sorun görünmemektedir.



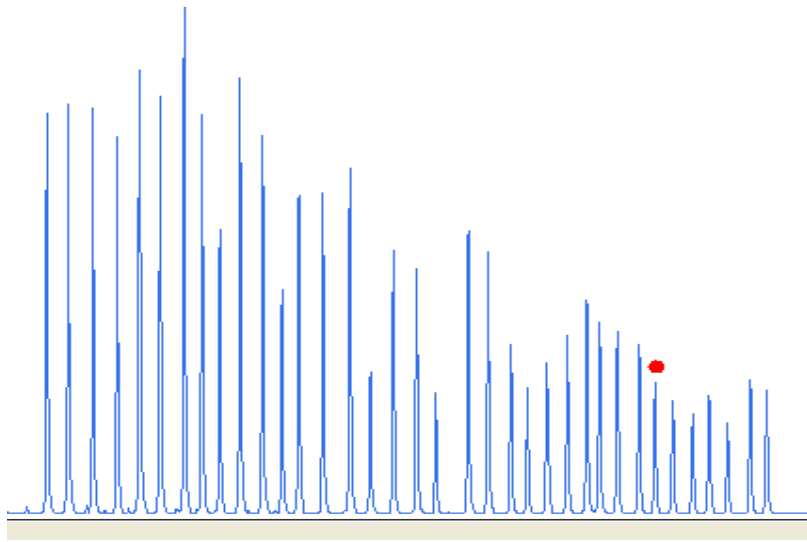
Şekil 19. 25 numaralı örneğin BRCA1 geni 19. ekzon dizi analizi sonucu. Prob bağlanma bölgesinde herhangi bir sorun görünmemektedir.



Şekil 20. DNA kontrol örneği BRCA1 geni 19. ekzon dizi analizi sonucu.



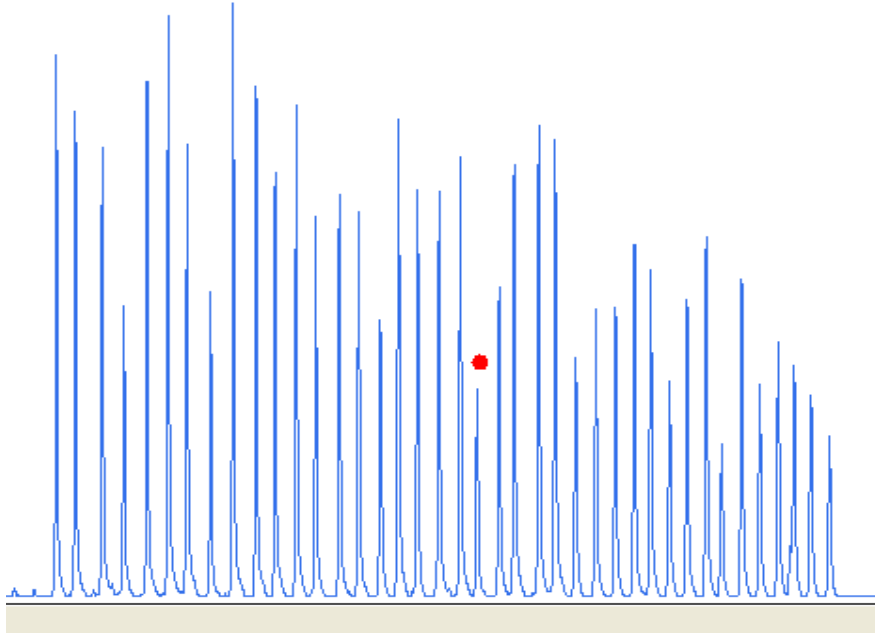
Şekil 21. 29 numaralı örneğin BRCA1 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 8497) 21. ekzonun delesyonunu göstermektedir.



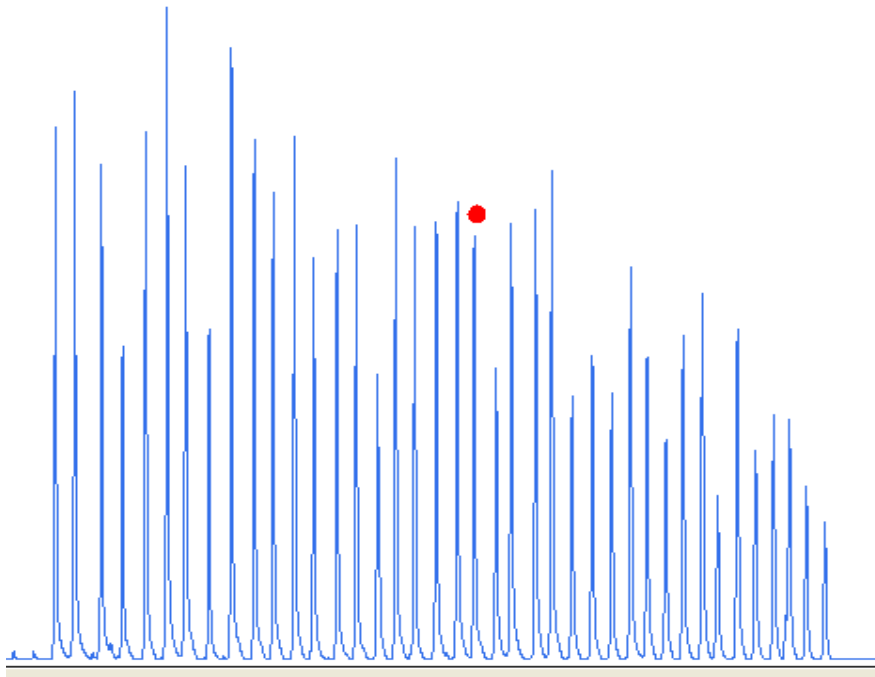
Şekil 22. DNA kontrol örneğine ait BRCA1 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 14509) normal 21. ekzon pikidir.

Tablo 22. 29 numaralı örneğin BRCA1 geni MLPA analizi Coffalaysen değerlendirme programı sonucu. Grafikteki kırmızı nokta ile gösterilen kısım 21. ekzonun delesyonunu göstermektedir.

RESULTS P087 MLPA probemix lot 0904_1204_0506		D1:R6181CMD_MPA6P04									
sample name		BRCA1-29									
Analysis Date		06.12.2007 17:30									
normalization method		Population Regression analysis									
average / median		Median on Normalization Factor									
Used total area height		90000x 50x									
Number of probes		36									
Number of Control probes		10									
Regression Method		LOG Linear Regression									
Regression coefficient		-0.000962015									
intercept		14.93047237									
NI probes used for regression line		36									
Lower limit for control probes reg. line 1		60									
Upper limit for control probes reg. line 1		120									
Times older C. probes for lower upper limit reg. line 2		3									
Data concentration		cbk									
Gene	Chr pos	Length (bp)	MV36	Recommended Order	Raw Signal	Ratio	SD	95% Confidence >>	Odds Gain - 3 copies	Odds Deletion - 1 copy	
BRCA1 probe 2908-L1168	17q21	157	17-038.5 Exon 01A	1	3548	1.09	0.09	0.93-1.26	1.01	2006.1	
BRCA1 probe 2907-L1269	17q21	148	17-038.5 Exon 01B	2	37217	1.04	0.09	0.88-1.21	291	2700.1	
BRCA1 probe 2104-L1069	17q21	436	17-038.5 Exon 01C	3	14665	1.18	0.01	1.16-1.2	335.1	335.1	
BRCA1 probe 2910-L2239	17q21	166	17-038.5 Exon 02	4	8548	1.09	0.04	1.02-1.16	411	12709.1	
BRCA1 probe 2911-L1430	17q21	179	17-038.5 Exon 03	5	6911	1.09	0.01	1.02-1.04	352.1	1011271.1	
BRCA1 probe 3395-L2241	17q21	346	17-038.5 Exon 05	6	22339	1.1	0.09	0.83-1.18	483.1	2524.1	
BRCA1 probe 2913-L2242	17q21	288	17-038.5 Exon 06	7	8761	1.04	0.08	0.88-1.2	311	236.1	
BRCA1 probe 2914-L2243	17q21	217	17-038.5 Exon 07	8	38285	1.04	0.04	1.01-1.16	521	14851.1	
BRCA1 probe 2915-L2244	17q21	226	17-038.5 Exon 08	9	29580	1.1	0.08	0.84-1.16	681	4157.1	
BRCA1 probe 2916-L2485	17q21	295	17-038.5 Exon 09	10	3721	1.04	0.01	1.01-1.07	355.1	242595.1	
BRCA1 probe 3602-L1395	17q21	395	17-038.5 Exon 10	11	81181	0.94	0.02	0.9-0.97	789.1	22984.1	
BRCA1 probe 2918-L2471	17q21	777	17-038.5 Exon 11	12	8644	1.04	0.09	0.88-1.22	221	521.1	
BRCA1 probe 2919-L2481	17q21	251	17-038.5 Exon 12	13	8205	1.13	0.08	0.86-1.26	81	1937.1	
BRCA1 probe 2920-L1396	17q21	474	17-038.5 Exon 13	14	8615	1.06	0.11	0.84-1.27	313	1188.1	
BRCA1 probe 3890-L1337	17q21	206	17-038.5 Exon 13	15	13115	1.1	0.08	0.85-1.14	68.1	5211.1	
BRCA1 probe 3772-L1369	17q21	205	17-038.5 Exon 14	16	8017	1.06	0.06	0.86-1.21	201	4978.1	
BRCA1 probe 2921-L1350	17q21	176	17-038.5 Exon 15	17	2626	1.05	0.06	1-1.2	161	4128.1	
BRCA1 probe 2922-L2251	17q21	337	17-038.5 Exon 16	18	49678	1.1	0.13	0.74-1.26	141	591.1	
BRCA1 probe 3392-L1263	17q21	449	17-038.5 Exon 17	19	20037	1.02	0.04	1.14-1.13	14	1442.1	
BRCA1 probe 3398-L2254	17q21	184	17-038.5 Exon 18	20	48139	0.98	0.03	0.9-1.02	945.1	40793.1	
BRCA1 probe 2924-L2255	17q21	364	17-038.5 Exon 19	21	25338	1.03	0.07	0.88-1.14	101	995.1	
BRCA1 probe 2927-L2256	17q21	333	17-038.5 Exon 20	22	18988	1.1	0.08	0.93-1.26	163	2198.1	
BRCA1 probe 2928-L2257	17q21	397	17-038.5 Exon 21	23	4467	0.98	0.04	0.75-0.95	44	44	
BRCA1 probe 3823-L1380	17q21	199	17-038.5 Exon 22	24	26333	1.1	0.04	0.92-1.07	928.1	64836.1	
BRCA1 probe 2930-L2259	17q21	415	17-038.5 Exon 23	25	14016	0.91	0.03	0.81-1.02	14181	67229.1	
BRCA1 probe 2931-L1060	17q21	424	17-038.5 Exon 24	26	19318	0.93	0.04	0.86-1.1	292.1	7071.1	
Control probe 2269-L1761	01p36	130	c	27	35058	1.01	0.05	0.9-1.12	190.1	16117.1	
Control probe 0950-L1368	04q26	380	c	28	20001	1.1	0.07	0.87-1.13	144.1	9060.1	
Control probe 2295-L1415	09q14	454	c	29	12814	0.96	0.05	0.77-0.96	481	397.1	
Control probe 3211-L1442	19p13	193	c	30	35993	0.93	0.05	0.81-1.12	651	2321.1	
Control probe 2693-L2134	11q23	373	c	31	25534	1.04	0.08	0.88-1.19	471	3762.1	
Control probe 4493-L1236	11q14	314	c	32	19993	1.05	0.05	0.84-1.02	416.1	416.1	
Control probe 1609-L1191	12q12	310	c	33	44236	1.04	0.12	0.81-1.28	184	844.1	
Control probe 2279-L1770	13q12	296	c	34	38182	1.04	0.03	0.85-1.1	2620.1	2620.1	
Control probe 2253-L1774	13q12	139	c	35	37091	1.02	0.02	0.95-1.04	8134.1	8134.1	
Control probe 2445-L1409	16q13	445	c	36	17720	0.99	0.06	0.88-1.11	160.1	8626.1	



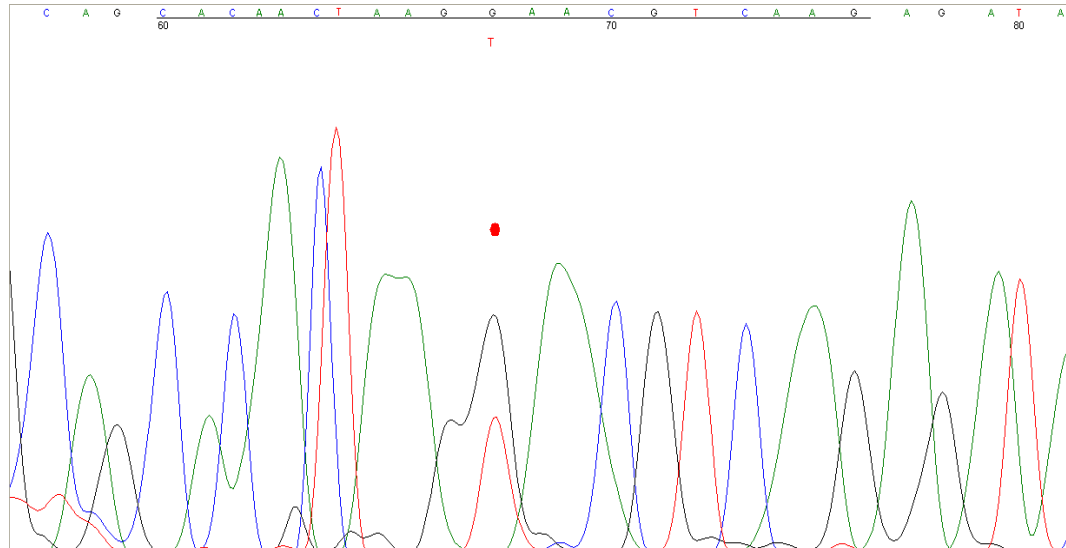
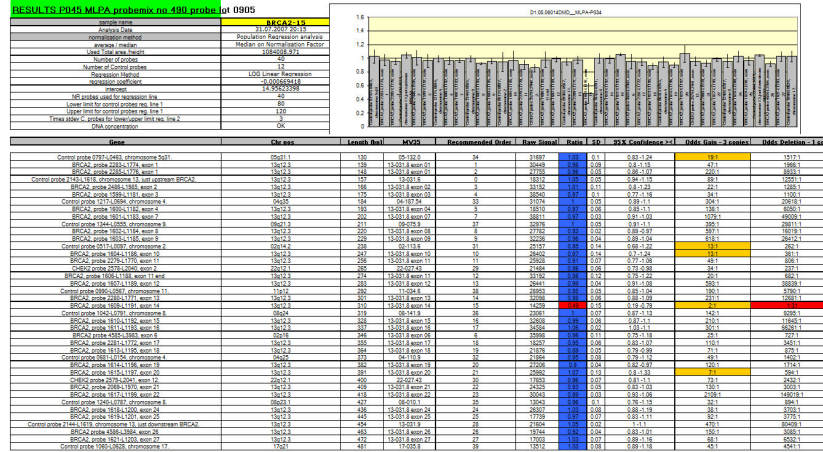
Şekil 23. 15 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pik DNA kontrol ile karşılaştırıldığında (pik alanı: 14259) 14. ekzon delesyonu görülmektedir.



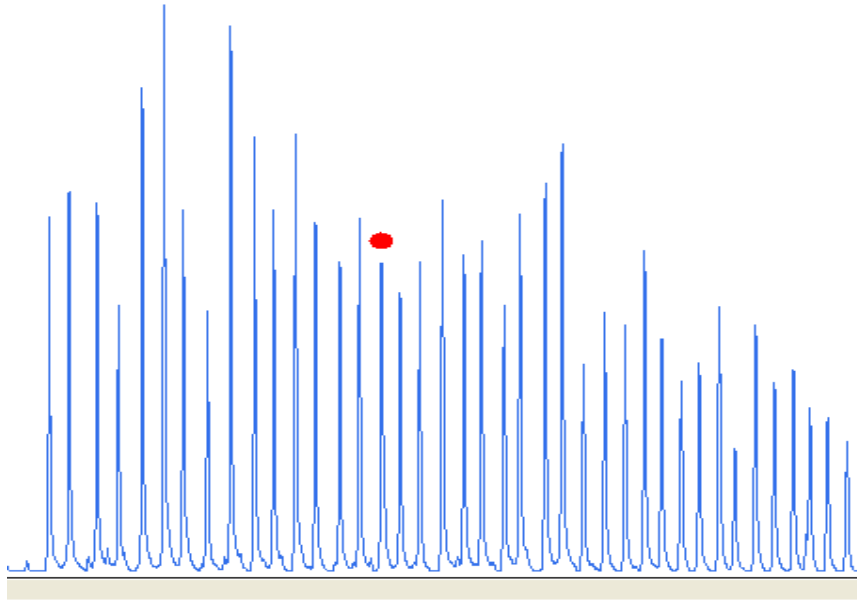
Şekil 24. DNA kontrol örneğinin BRCA2 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 29436)



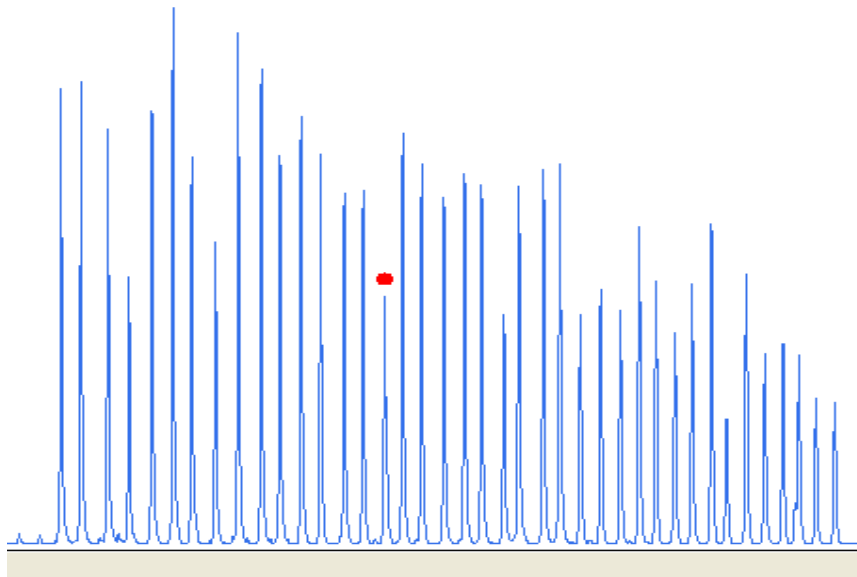
Tablo 23. 15 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi Coffalaysen değerlendirme programı sonucu. Grafikteki kırmızı nokta ile gösterilen kısım 14. ekzonun delesyonunu göstermektedir.



Şekil 25. 15 numaralı örneğin BRCA2 geni 14. ekzon dizi analizi. Kırmızı nokta ile gösterilen nükleotidde G/T tek nükleotid polimorfizmi görülmektedir.

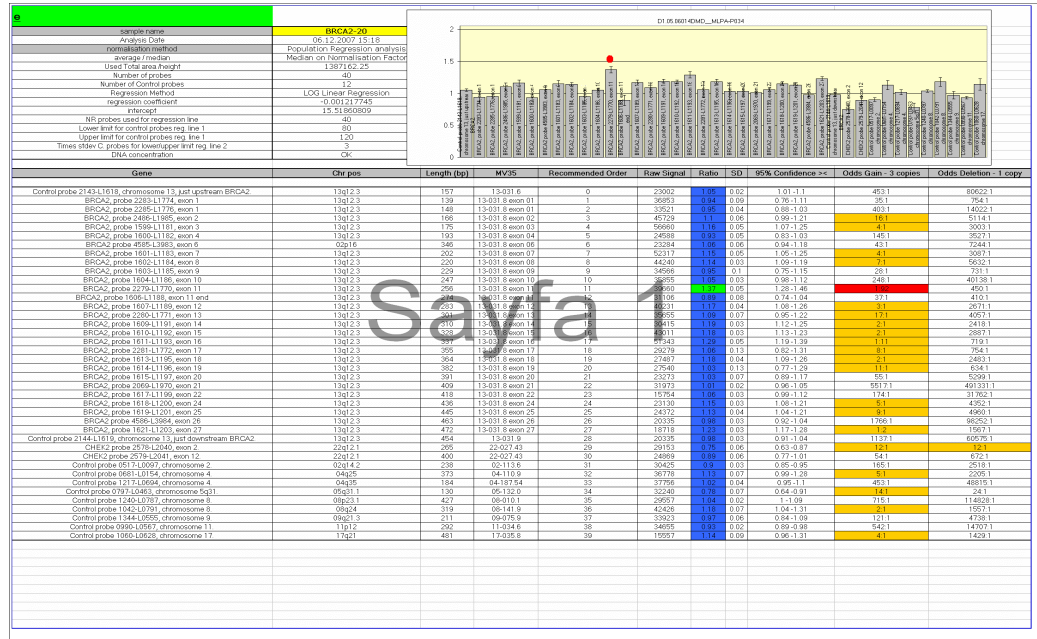


Şekil 26. 20 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 39660) 11. ekzonun bir bölgesinin duplikasyonunu göstermektedir.

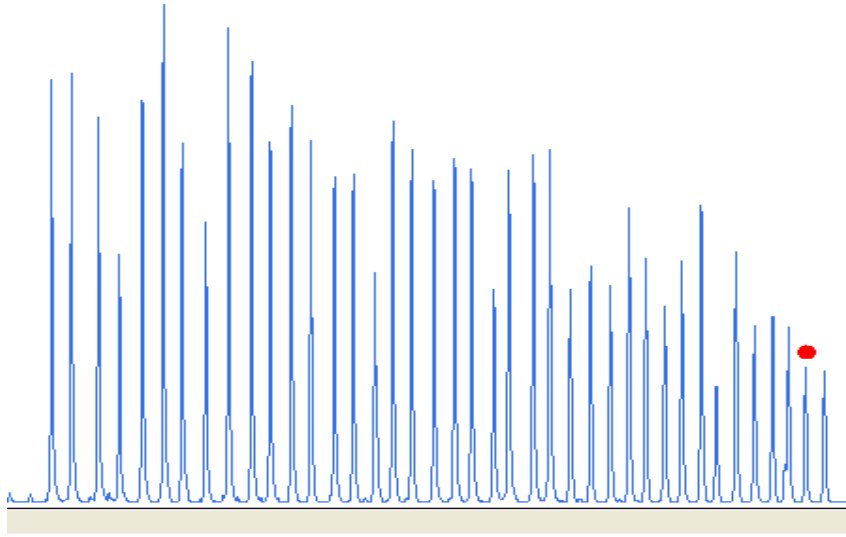


Şekil 27. DNA kontrol örneğine ait BRCA2 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 28980) normal 11. ekzon pikidir.

Tablo 24. 20 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi Coffalayer değerlendirmeye programı sonucu. Grafikte kırmızı nokta ile işaretlenen kısım 11. ekzonun duplikasyonunu göstermektedir.



Şekil 28. 22 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 22842) 27. ekzonun duplikasyonunu göstermektedir.



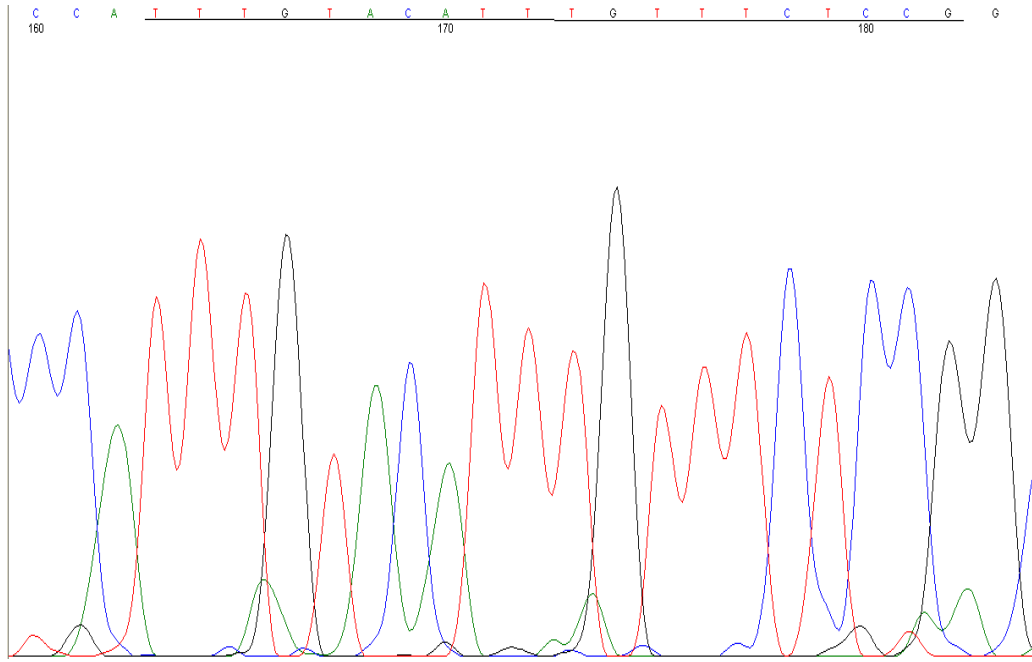
Şekil 29. DNA kontrol örneğine ait BRCA2 geni MLPA sonucu. Kırmızı nokta ile işaretlenen pik (pik alanı: 16247) normal 27. ekzon pikidir.

Tablo 25. 22 numaralı örneğin BRCA2 geni MLPA analizi Coffalayer değerlendirme programı sonucu. Grafikte kırmızı nokta ile işaretlenen kısım 27. ekzonun duplikasyonunu göstermektedir.

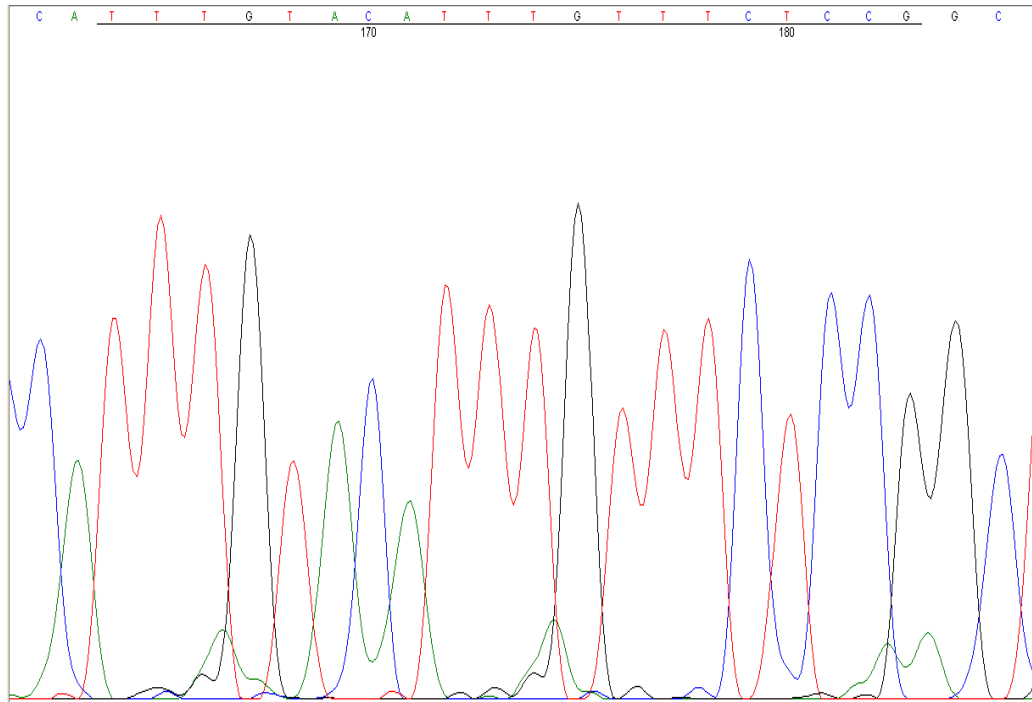
B		BRCA2-22									
sample name	BRCA2-22										
analysis date	06.12.2007 15:10										
normalisation method	Population Regression analysis										
average median	Median on Normalisation Factor										
Used Total area Weight	4.92635_783										
Number of probes	40										
Number of Control probes	12										
Regression Method	LOG Linear Regression										
regression coefficient	< -0.001735073										
#abscept	15_3035448										
NR probes used for regression line	0										
Lower limit for control probes reg. line 1	0										
Upper limit for control probes reg. line 1	1.20										
Times side/c. probes for sweepstep (not reg. line 2)	3										
DNA concentration	OK										

Gene	Chr	pos	Length (bp)	MV35	Recommended Order	Raw Signal	Ratio	SD	95% Confidence >=	Odds Gain - 3 copies	Odds Deletion - 1 copy
Control probe 2143.L1618, chromosome 13, just upstream BRCA2	13q22.3	157	134318	0	23342	1.00	0.02	1.01-1.1	0.99-1.01	349.1	68019.1
BRCA2 probe 2263.L1774, exon 1	13q22.3	139	130331	exon 01	1	37293	0.94	0.09	0.75-1.12	36.1	809.1
BRCA2 probe 2265.L1776, exon 1	13q22.3	149	130331	exon 01	2	34261	0.92	0.04	0.9-1.05	65.0	30593.1
BRCA2 probe 2486.L1985, exon 2	13q22.3	166	130331	exon 02	3	42388	1.01	0.06	0.9-1.12	198.1	16424.1
BRCA2 probe 1504.L1811, exon 3	13q22.3	179	130331	exon 03	4	51715	1.04	0.05	0.95-1.13	142.1	20501.1
BRCA2 probe 1600.L1182, exon 4	13q22.3	193	130331	exon 04	5	24429	0.91	0.05	0.82-1.03	111.1	20717.1
BRCA2 probe 458.L1363, exon 6	13q22.3	240	130331	exon 06	6	4268	1.11	0.06	0.99-1.23	11.1	289.1
BRCA2 probe 1601.L1181, exon 7	13q22.3	202	130331	exon 07	7	53263	1.05	0.05	1.06-1.26	11.1	2495.1
BRCA2 probe 1602.L1184, exon 8	13q22.3	220	130331	exon 08	8	43040	1.07	0.02	1.02-1.12	152.1	36399.1
BRCA2 probe 1603.L1185, exon 9	13q22.3	229	130331	exon 09	9	33316	0.9	0.1	0.7-1.01	22.1	281.1
BRCA2 probe 1604.L1186, exon 10	13q22.3	247	130331	exon 10	10	44209	0.99	0.03	0.92-1.05	1268.1	79714.1
BRCA2 probe 37281.L170, exon 11	13q22.3	269	130331	exon 10	11	69309	0.96	0.05	1.13-1.35	198.1	961.1
BRCA2 probe 1606.L1188, exon 11 and	13q22.3	274	130331	exon 10	12	88238	1.1	0.08	0.85-1.15	81.1	5338.1
BRCA2 probe 1601.L1188, exon 11	13q22.3	231	130331	exon 11	13	86495	1.03	0.04	0.9-1.1	426.1	34444.1
BRCA2 probe 2266.L1771, exon 13	13q22.3	233	130331	exon 13	14	45238	1.03	0.07	0.9-1.16	70.1	3051.1
BRCA2 probe 1609.L1181, exon 14	13q22.3	210	130331	exon 14	15	11101	1.19	0.03	1.12-1.26	171.1	2269.1
BRCA2 probe 1610.L1182, exon 15	13q22.3	249	130331	exon 15	16	89269	1.02	0.03	1.02-1.12	171.1	38376.1
BRCA2 probe 1611.L1183, exon 16	13q22.3	387	130331	exon 16	17	88776	1.15	0.05	1.05-1.25	41.1	2845.1
BRCA2 probe 2261.L1702, exon 17	13q22.3	262	130331	exon 17	18	29663	1.03	0.13	0.79-1.26	12.1	720.1
BRCA2 probe 1613.L1185, exon 18	13q22.3	384	130331	exon 18	19	30067	1.26	0.04	1.18-1.34	1.6	96.0
BRCA2 probe 1614.L1186, exon 18	13q22.3	382	130331	exon 18	20	30557	1.11	0.13	0.85-1.01	4.1	281.1
BRCA2 probe 1615.L1187, exon 20	13q22.3	391	130331	exon 20	21	23348	1.01	0.07	0.87-1.15	8.0	585.0
BRCA2 probe 2099.L1910, exon 21	13q22.3	409	130331	exon 21	22	13466	1.03	0.02	0.99-1.07	166.0	21567.0
BRCA2 probe 1617.L1186, exon 22	13q22.3	418	130331	exon 22	23	17402	1.15	0.03	1.05-1.19	145.0	7162.0
BRCA2 probe 1618.L1200, exon 24	13q22.3	436	130331	exon 24	24	20761	1.1	0.03	0.94-1.07	146.0	12139.0
BRCA2 probe 1619.L1201, exon 25	13q22.3	446	130331	exon 25	25	44407	1.06	0.04	0.99-1.14	90.1	18484.1
BRCA2 probe 4586.L1364, exon 26	13q22.3	463	130331	exon 26	26	21343	1.03	0.03	0.94-1.05	309.0	24903.0
BRCA2 probe 1621.L1203, exon 27	13q22.3	472	130331	exon 27	27	22642	1.05	0.03	1.01-1.15	201.0	16411.0
Control probe 2144.L1618, chromosome 13, just downstream BRCA2	13q22.3	464	130313	3	21343	1.1	0.03	0.94-1.06	1919.1	145639.1	
CH12 probe 1246.L246, exon 1	22q21.21	205	220400	20	296	0.9	0.03	0.81-1.02	63.1	261.1	
CH12 probe 2573.L2041, exon 12	22q21.21	400	220400	43	296	0.95	0.06	0.81-1.09	152.1	5271.1	
Control probe 051.L0097, chromosome 2	02q14.2	239	021135	31	13394	0.97	0.03	0.92-1.02	1992.1	9198.1	
Control probe 0611.L0174, chromosome 4	04q25	373	041104	32	33011	1.01	0.07	0.87-1.16	79.1	978.1	
Control probe 1211.L0094, chromosome 4	04q35	184	0418754	33	37902	1.02	0.04	0.94-1.09	601.1	58607.1	
Control probe 0270.L0461, chromosome 5p31	05p31.1	139	051320	34	36209	0.96	0.07	0.73-0.99	33.1	213.1	
Control probe 1246.L0287, chromosome 8	08q21.31	427	080101	35	28299	1.1	0.02	0.96-1.04	1102.0	87955.0	
Control probe 1342.L0289, chromosome 8	08q24	319	081418	36	42062	1.08	0.07	0.96-1.21	194.0	1567.0	
Control probe 1344.L0285, chromosome 8	08q21.31	211	080763	37	33203	0.95	0.06	0.83-1.08	109.1	354.1	
Control probe 0990.L0287, chromosome 11	11p12	282	110348	38	36284	0.96	0.02	0.82-1.01	1734.1	73301.1	
Control probe 1060.L0626, chromosome 11	11q21	461	1104358	39	14288	1.02	0.09	0.84-1.19	30.1	2264.1	



Şekil 30. 22 nolu örnek BRCA2 geni 27. ekzon dizi analizi



Şekil 31. DNA kontrol örneği BRCA2 geni 27. ekzon dizi analizi

## 5.TARTIŞMA

### 5.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması:

Çalışma grubumuz Ocak 2007 - Aralık 2007 tarihleri arasında Karadeniz Teknik üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Dahiliye Anabilim dalı Onkoloji bölümüne başvuran meme kanseri teşhisi konmuş, aile hikayesi pozitif olan 30 kadın hastadan oluşturulmuştur. Aile hikayesi pozitif hastaların seçilmesiyle kalıtsal geçişli BRCA gen mutasyonlarını yakalama şansını arttırmak ve büyük delesyon ve duplikasyonlar dışındaki küçük varyasyonların da mevcut olduğu vakalarda MLPA analizinin nasıl sonuç verdiğini saptamak amaçlanmıştır. DNA dizi analizi yöntemi ile küçük varyasyonların taraması yapılarak MLPA metodunun mutasyonları belirleme yeteneği ortaya çıkarıldı.

### 5. 2. BRCA1 ve BRCA 2 Gen Mutasyonlarının Tespiti

Meme kanseri, genetik ve çevresel faktörlerin kompleks bir kombinasyonu sonucu ortaya çıkan yaygın bir hastalıktır. Bu kanserin oluşumunda BRCA1 ve BRCA2 genlerinin rolü büyük olmakla beraber ATM, CHEK2, PTEN, TP53 gibi diğer genlerin de etkili olduğu bilinmektedir (43). BRCA genlerinin tümör baskılayıcı gen olmaları nedeniyle bu genler üzerindeki oluşan defektlerin etkileri daha yıkıcı olabilmektedir Bununla beraber meme kanseriyle ilişkisi henüz tam olarak aydınlatılmamış diğer genetik faktörlerle ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. BRCA 1 ve BRCA2 genlerinin etkisinin, hastalığın insidansında yaklaşık % 5'lik bir orana sahip olduğu ifade edilmektedir. Kalıtsal kökenli meme kanserinin tüm meme kanserleri vakalarının %10'nu teşkil ettiği düşünüldüğünde bu iki genin hastalıktaki rolü daha iyi anlaşılmaktadır. Bununla birlikte BRCA1 ve BRCA2'ye atfedilen meme kanseri oranı farklı çalışmalara ve farklı etnik gruplara göre büyük değişiklikler göstermektedir (29). Meme ve over kanserli ailelerde son bulgulara göre BRCA geninde ki mutasyon çeşitliliği artmıştır (30).

BRCA 1 ve BRCA 2 genleri çok sayıda ekzon içeren büyük genlerdir (sırasıyla 24 ve 27 ekzon). Her iki gende de bütün ekzonlarda çok sayıda mutasyona rastlanmıştır.

BRCA1 ve BRCA2 genlerinde en sık rastlanan mutasyonlar literatürde görülme sıklığı (kayıt sayısı) ile birlikte tablo 3 ve tablo 4' te gösterilmiştir. Araştırmacılar BRCA1 geninde 600 den fazla mutasyon tespit etmişlerdir. Bu mutasyonların meme kanseri ile ilişkisi tamamen ortaya konmuş değildir. Literatür verilerinde üzerinde çalışılan mutasyonların büyük çoğunluğunun meme kanseri açısından klinik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber bir kısmının da hastalıkla ilişkisi henüz aydınlatılamamıştır (20).

BRCA1 gen mutasyonlarının % 10-15'lik kısmını büyük genomik yeniden düzenlenmelerin (Large Genomic Rearrangement, LRG) oluşturduğu görülmüştür. Yaklaşık 90 tane BRCA yeniden düzenlenmesi rapor edilmiştir (tablo 5,6)(33). LGR'ler kalıtsal meme ve over kanserli ailelerde tanımlanmış BRCA gen varyasyonlarının temel özelliğidir (45). Meme kanserine duyarlı olduğu bilinen genler üzerindeki mutasyonları tespit edebilen pek çok metod mevcut olup (Tablo 26) bu tespit yöntemleri içinde BRCA genlerindeki yeniden düzenlenmeleri (geniş duplikasyonlar, delesyonlar ya da diğer LGR'ler) belirleyebilen metodlar sınırlıdır. Bu mutasyonları tespitiye yönelik tek bir mükemmel metodun olmadığı düşünülmektedir (25,45).

Tablo 26. Mutasyon Belirleme Metodları

Konformasyonel polimorfizm tespit metodları	
SSCP	Tek İplik Konformasyonel Polimorfizm
CE-SSCP	Kapiller Elektroforez SSCP
Heterodupleks Metodlar	
DGGE	Denatüre Gradyent Jel Elektforezi
TDGS	İki Boyutlu Gen Tarama
TTGE	Temporal Sıcaklık Gradyent Elektforezi
TGCE	Sıcaklık Gradyent Kapiller Elektforezi
CSGE	Konformasyona Duyarlı Kapiller Elektforez
HA	Heterodupleks Analiz
F-MD	Floresans Mutasyon Tespiti
DHPLC	Denatüre Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
CCM	Kimyasal Kesim Metodu

Tablo 26 devam

FAMA	Floresans Destekli Uyum Analizi
HRM veya MCA	Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi Analizi
RNA'nın Proteine Mutasyon Tespiti	Translasyonu Yoluyla
PTT	Protein Trunkasyon Testi
Dizi Analizi Metodları	
	Maxam and Gilbert Dizi Analizi
	Sanger Dizi Analizi
	Radyoaktif Döngü Dizileme
	Dye-Terminator Dizileme
	Dye-Primer Dizileme
SBH	Hibridizasyon yoluyla Dizi Analizi
APEX	Primer Büyütme Dizisi
Büyük Gen Düzenlenmelerini Tespit	
	Southern Blot
QMPSF	Kısa Floresan Fragmentlerinin Kantitatif Multipleks PCR'ı
MLPA	Multipleks Ligasyon Bağımlı Prob Çoğaltılması

1990'larda, konformasyonel polimorfizmleri tespit eden SSCP (Single strand conformation polymorphism) ve bu metodun türevleri ucuz olmasının yanı sıra teknik olarak ta açık olmaları nedeniyle oldukça popülerdi. Ancak bu metotların hassasiyeti, tek bir nükleotidin yer değiştirmesinin her zaman konformasyonel bir değişikliğe sebep olmaması yüzünden oldukça sınırlıydı (25). Bunun yanında SSCP mutasyon tipi ve bölgeleri hakkında da bilgi vermemektedir (45).

İkinci olarak, bazı gruplar BRCA 1 ve BRCA 2'nin 11. ekzonunu görüntüleyen protein trunkasyon testini (PTT) kullanmaya devam etmektedir, ancak PTT missense değişimleri (substitutions) tespit etmede maalesef yetersiz kalmaktadır. Bu genlerde olan zararlı missense değişimleri belirlemeye yönelik ilgi arttıkça yöntem önemini kaybedebilir (25).

Heterodupleks metodlar çok iyi hassasiyete sahip olmakla beraber son birkaç yılda FMD, TGCE ve MCA/HRM gibi hassasiyeti oldukça iyi, işlem hacmi yüksek ve pahalı olmayan metotların gelişimini sağlamışlardır (tablo 26). Bu teknikleri hassasiyet, özgüllük ve ekonomi yönünden kıyaslamamız oldukça zor olduğu ifade edilmektedir (25).

Yukarıda adı geçen tüm metodlar mutasyon hakkında kalitatif olarak bilgi vermekle beraber hedef bölgede bilinmeyen diğer muhtemel mutasyonların varlığı, tipi ya da miktarı (kantitatif) hakkında belirleyici olmayabilir. Bu nedenle



çoğunlukla mutasyon tarama testlerini takiben dizi analizi işlemi yapılmalıdır. Çünkü bulunan sekans varyantlarının aydınlatılması ve sınıflandırılması gerekmektedir. Sekanslamanın diğer ölçüm tekniklerine göre altın standart olduğu ifade edilse de tek iplikçik dizi analizlerinde kromatogramda diziye spesifik pik yüksekliği varyasyonları yalancı negatif sonuçlar verebildiğinden double-stranded (iki iplikli) dye-primer sekanslama işleminin altın standart olduğunu söylemek daha doğru olacaktır (25).

Etkili olmasına rağmen southern blot teknikleri mutasyonları bulmada oldukça zahmetli yöntemlerdir.

Özellikle heterozigot vakalarda doğal tip alleller amplifikasyonda kullanılan primerler ile uygunluk göstererek çoğaldığından klasik PCR metodlarına dayanan mutasyon tarama yöntemleri yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir (33). Bu hatalı sonuçlara tek iplikçik dizi analizleri gibi gelişmiş mutasyon tarama yöntemlerinde rastlanabilmektedir. Üstelik klasik PCR metodlarında her bir hedef bölge için genellikle ayrı PCR protokolü veya işlemi yapmak gerekmektedir. Mutasyon tespit yöntemlerindeki bu olumsuzluklar verimli ve hassas bir şekilde bu mutasyonları tespiti edebilen kantitatif multipleks PCR ve MLPA tekniğinin geliştirilmesi ile giderilmiştir (25). MLPA tekniği ile hem bu yalancı negatiflik ortadan kaldırılmakta hem de aynı anda çok sayıda bölge taranabilmektedir. Örneğin BRCA1 geni için 24 ekzon BRCA2 geni için ise 27 ekzon aynı anda taranabilmektedir. Zaman ve maliyet açısından bakıldığında MLPA tekniğinin oldukça üstün olduğu görülmektedir (25). Bununla beraber bu yöntemin en önemli sorunu prob bağlanma bölgesinde tek nükleotid değişimlerinin varlığında bile probun hedef bölgeye bağlanamaması sonucu yalancı pozitif sonuçların görülmesidir. Bu olumsuz durumu ortadan kaldırmak için prob bağlanma bölgelerinde genetik bir bozukluk olup olmadığı tespit edilip daha sonra MLPA analizi uygulanması uygun olabilir.

*25. numune BRCA1 geni 18. ekzon delesyonu:* MLPA analizi yapılan bu örnekte BRCA1 geni 18. ekzonunda delesyon tespit edildi. Daha sonra aynı örneğe 18. ekzonun MLPA probu bağlanma bölgesini içeren DNA dizi analizi uygulandı. Burada alınan sonuç, 20 bazlık MLPA probunun son bazı olan timinin delesyon sonucu kaybolması sebebiyle probun hedef bölgeye bağlanamadığı ve bu sebepten delesyon gösterdiği tespit edildi. Bu durum MLPA'nın zayıf bir noktasıdır. Bu nedenle MLPA bulgularının pozitif gösterdiği hedef bölgelerinin ilgili prob bağlanma yerlerinin nokta mutasyon analizlerinin yapılması gerekmektedir.

*25. numune BRCA1 geni 19. ekzon delesyonu:* MLPA analiz sonrası bu örneğin 19. ekzonunda da delesyon tespit edildi ve DNA dizi analizine karar verildi. Dizi analizinden alınan sonuca göre probun bağlandığı 19. ekzonun ilgili bölgesinde herhangi bir mutasyona rastlanmadı. Bu durumun iki açıklaması olabilir. Birincisi, DNA dizi analizi ile saptamaya çalıştığımız bölgede kullandığımız forward ve reverse primerleri de içeren, dolayısıyla çoğalttığımız bölgeyi kapsayan büyük bir delesyonun bu genin herhangi bir alelelinde mevcut olmasıdır. Yani anneden ve babadan gelen allellerin herhangi birinde BRCA1 geni için 19. ekzonun tamamen silinmiş olması mümkündür. Bunun sonucu olarak sadece mevcut olan allelin ilgili bölgesi dizi analizi olacağı için sorunsuz bir DNA dizi analizi sonucu görülür. Eğer iki allelde de 19. ekzonda bir delesyon görülseydi dizi analizi hiç gerçekleşmeyeceği gibi MLPA analizinde de bu ekzonla ilgili herhangi bir sinyal alınamayacağı için tam delesyon görülecekti. İkincisi ise iki kere çalışılmış bir örnek için düşük bir ihtimal olarak MLPA probunun herhangi bir sebeple çalışma sırasında hedef diziyeye bağlanamamasıdır. Bu örnek için daha ileri tekniklerle tarama yapılması oluşan merakları giderebilecektir.

*15. numune BRCA2 geni 14. ekzon delesyonu:* MLPA analizi sonrası bu örnekte 14. ekzonda delesyona raslandı ve bu ekzonun dizi analizi yapıldı. MLPA prob bağlanma bölgesini içeren bu dizi analizinde G/T tek nükleotid polimorfizminin prob bağlanma bölgesinde mevcut olduğu tespit edildi. Yani bu tek nükleotid değişimi probumuzun bir kolunun hedef diziyeye bağlanamamasına sebep olduğu için PCR gerçekleşmemiş ve işaretli prob çoğaltılamamıştır ve bu yüzden de MLPA analizi bize delesyon sonucu vermiştir.

22. numune *BRCA2* geni 27. ekzon duplikasyonu: MLPA analizi yapılan bu örnekte ise 27. ekzonda duplikasyona rastlandı. Dizi analizi yapılan bu örnekte beklendiği gibi prob bağlanma bölgesinde herhangi bir mutasyona rastlanmadı. Çünkü hedef bölge mevcuttu veya herhangi bir hata içermediği için MLPA probu bağlanıp analiz yapabildi. DNA dizi analizinde de hedef bölgeden iki veya daha fazla olması, oluşacak pikleri karşılaştıracağı için dizi analizi mevcut duplikasyonu tespit edemedi. Bu noktada MLPA dizi analizine göre daha hassas davranarak duplikasyonu tespit etmiştir.

20. numune *BRCA1* geni 1. ekzon delesyonu: MLPA sonuç tablosuna bakıldığında bu hasta için *BRCA1* geninin birinci ekzonunun bir kısmında MLPA probu bağlanmadığı için delesyon gibi sonuç verdiği görülmektedir. Aynı örneğin *BRCA2* geni MLPA analizinde ise 11. ekzon duplikasyonu olduğu tespit edildi. Bu sonuçlarla imkanlar dahilinde DNA dizi analizi ile analiz edilemediği için probun niçin bağlanmadığı veya birden fazla bağlandığı konusunda fikir sahibi olunamadı. İleriki çalışmalarda bu örneklerin teyidi için ileri çalışmalar yapılması planlanmaktadır.

*BRCA* genlerindeki defektleri tespite yönelik pek çok yöntem mevcut olmakla beraber elde edilen veriler ve yapılan literatür çalışmaları sonucunda tek bir yöntemle güvenilir sonuçların elde edilmeyeceğine karar verildi. Bununla birlikte MLPA ve DNA dizi analizinin kombinasyonunun bu mutasyonların belirlenmesinde diğer yöntemlere göre daha avantajlı olduğu görüldü.

Bugüne kadar *BRCA* genlerinde tespit edilmiş LGR'ler içinde Türkiye'ye ait veri yoktur (Tablo 5) Yaptığımız çalışma bu konuda ülkemizde yapılacak diğer çalışmalara öncülük edecektir. *BRCA* genlerinin büyük olması ve çok sayıda mutasyon içermesi nedeniyle oluşturulacak çalışma gruplarının ve çalışılacak hedef gen bölgelerinin geniş tutulması gerekmektedir. Bu nedenle MLPA tekniği içerdiği avantajlar nedeniyle tercih edilebilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

- 1- BRCA1 ve BRCA 2 genlerinde MLPA ve DNA dizi analizi teknikleri kullanılarak mutasyon taraması yapıldı.
- 2- MLPA analiziyle toplamda 5 ekzon delesyonu ve 2 ekzon duplikasyonu tespit edildi. Bu sonuçlara göre yapılan DNA dizi analizinde ise MLPA prob bağlanma bölgelerinde bir ekzonda tek nükleotid delesyonu, bir ekzonda tek nükleotid polimorfizmi ve iki ekzonda da normal dizi analizi sonucu elde edildi.
- 3- BRCA genlerinin mutasyon analizinde ne MLPA'nın ne de DNA dizi analizinin tek başına yeterli olamayacağına karar verildi.
- 4- Bir örneğin BRCA1 geninin 19. ekzonunda LGR tespit edilmiştir.

### 6.2. Öneriler

- 1- Bu çalışmada aile hikayesi pozitif olan meme kanserli hastalar çalışıldı. Aile hikayesi pozitif olmayanların da dahil olduğu daha büyük bir çalışma yapılması Türk popülasyonuna yönelik LGR tespiti için önemli olacaktır.
- 2- BRCA genlerindeki mutasyonları tespit etmeye yönelik tek bir mükemmel metod yoktur. Tek başına MLPA tekniği BRCA geni mutasyonlarını büyük bir güvenilirlikle saptayamayabilir. DNA dizi analizi ile kombine olarak çalışılabilirse daha verimli olacağı düşünülmektedir.
- 3- Yukarıda sözü edilen 19. ekzon delesyonunun tüm ekzonu kapsayan bir LGR olması muhtemel olup daha ileri tekniklerle bu örneğin tekrar çalışılması ve ilgili LGR' nin doğrulanarak literatüre kazandırılması yerinde bir yaklaşım olacaktır.

## 7.ÖZET

### MLPA TEKNİĞİ İLE MEME KANSERLİ HASTALARDA, BRCA1 VE BRCA2 GENLERİNDE DELESYON VE DUPLİKASYONLARIN BELİRLENMESİ

İBRAHİM TURAN

Meme kanseri ülkemizde ve batı toplumlarında, kadınlarda görülen en yaygın kanser tipidir ve gelişiminde pek çok genetik ve çevresel faktör rol oynamaktadır. Kalıtsal meme kanserleri tüm kanser vakalarının yaklaşık % 10'unu oluşturmaktadır. Kanser genetiğinde BRCA1 ve BRCA2 genlerinin rolü büyüktür. Çok sayıda ekzon içeren bu genlerde meydana gelen mutasyonların çoğu meme kanserine yol açmaktadır. BRCA genleri mutasyonlarının % 10-15'ini büyük genomik yeniden düzenlenmeler (Large Genomic Rearrangement, LGR) oluşturmaktadır. Bu çalışmada LGR'lerin tespiti için yeni bir metod olan MLPA tekniği ile DNA dizi analizi kombinasyonu kullanıldı.

Çalışma grubu meme kanseri teşhisi konmuş ve aile hikayesi pozitif olan 30 kadın hastadan oluşturulmuştur. Bu hastalarda BRCA1 ve BRCA2 genlerinde Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) ve DNA dizi analizi ile mutasyon analizi yapıldı.

MLPA analizi ile 2 hastanın BRCA1 geninde farklı ekzonlarda delesyon tespit edildi. 2 hastanın BRCA2 geninde farklı ekzonlarda delesyon ve duplikasyonlar tespit edildi. 1 hastada ise MLPA analizi sonrası BRCA1 geninde delesyon BRCA2 geninde ise duplikasyon tespit edildi. Bu sonuçlar DNA dizi analizi ile kontrol edildi ve BRCA1 geninde 18. ekzonda bir adet tek nükleotid delesyonu bulundu. 19. ekzonda ise herhangi bir mutasyona rastlanmadı. BRCA2 geninde 14. ekzonda bir adet tek nükleotid polimorfizmi bulundu. 27. ekzonun dizi analizinde ise herhangi bir mutasyona rastlanmadı.

Bütün bu verilere dayanarak BRCA genlerinde ki LGR'lerin tespitinde MLPA tekniğinin tek başına kullanılması yeterli görülmemektedir. MLPA' daki pozitif sonuçların DNA dizi analizi ile teyit edilerek bu sonuçların LGR'lerden mi yoksa küçük mutasyonlardan mı kaynaklandığının gösterilmesi gerekmektedir.

**8.SUMMARY**  
**DETERMINATION OF BRCA1 AND BRCA2 MUTATIONS FOR PATIENTS WITH**  
**BREAST CANCER**  
**BY MLPA (MULTIPLEX LIGATION DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION) TECHNIQUE**

**İBRAHİM TURAN**

Breast cancer is one of the most seen cancers in women in western society and also in our country. Many genetic and environmental factors act in its progress. Hereditary breast cancer consists of 10 % of whole breast cancer cases. BRCA1 and BRCA2 genes play a major role in cancer genetics. Mutations in these genes which have a lot of exons cause breast cancer. The 10-15% of mutations in BRCA genes are constituted of large genomic rearrangements. In this study DNA sequence analysis combined with MLPA technique, a new method for determination of LGR's, was used.

The patients were women with breast cancer diagnosis and have positive family history. The mutations in BRCA1 and BRCA2 genes were investigated with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) combined DNA sequence analysis.

Deletion was detected in different exons of BRCA1 genes of two patients with MLPA. Deletions and duplications were obtained in different exons of two individuals. A deletion in BRCA1 and a duplication in BRCA2 gene were determined in one subject with MLPA analysis. These results were controlled with DNA sequence analysis and a nucleotide deletion was found in the 18<sup>th</sup> exon of the BRCA1. No duplication was in the 19<sup>th</sup> exon of the gene. A single nucleotide polymorphism was detected in the 14<sup>th</sup> exon of BRCA2 gene. Any mutation was not obtained in sequence analysis of the 27<sup>th</sup> exon.

It was concluded that MLPA is not efficient enough to determine the mutations in BRCA genes. The positive results obtained with MLPA should be confirmed by DNA sequence analysis if those are arisen from LGRs or other small mutations.

## 9.KAYNAKLAR

1. Topuz, E.:Meme Kanseri. Birinci baskı. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları. 1997. s.16, 21, 23, 29, 129, 130.
2. Parkin, D. M.:Global cancer statistics in the year 2000. The Lancet Oncology, 2: 533-543, 2001.
3. Erci, B., Karabulut N.:Appraising the self-assessed support needs of Turkish women with breast cancer. European Journal of Cancer Care, 16:137-143, 2007
4. [http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser\\_epidemiyojisi.htm](http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser_epidemiyojisi.htm) (27.12.2007)
5. Çolak, E.,Yomralıoğlu, T.:Kanser Vakalarının Coğrafi Bilgi Sistemleri ile İrdelenmesi:Trabzon Örneği, Jeodezi, Jeoinformasyon ve Arazi Yönetimi Dergisi, 96: 39-47, 2007.
6. Engin, K.:Meme Kanseri.Nobel Tıp Kitabevleri. 2005. s.1, 55-57, 87-90, 625-626.
7. Kingston, H.,M.:ABC of Clinical Genetics.Third edition.BMJ Books.2002. p. 56
8. Zimmerman, B.,T.:Breast Cancer Genetics. University Press of Missisipi. 2004. p. 45
9. Colleen, S.,Marks, A., D., Lieberman, M.:Mark's Temel Tıbbi Biyokimyası. (Çev. İnal, M.,E., Atik, U., Aksoy, N., Haşimi, A.) İkinci baskı. Güneş Tıp Kitabevleri. 2007. s. 325
10. Jong, M.M., Nolte, I.M., Meerman, G.J., Graaf W.T.A., Oosterwijk, J.C., Kleibeuker, J.H., Schaapveld, M., Vries, E.G.E.:Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. 2002. Journal Of Medical Genetic. 39:225-242
11. Hulka, B.S., Moorman, P.G.:Breast cancer: hormones and other risk factors. 2001 Maturitas. 38: 103-116
12. Ruddon, R.W.: Cancer Biology. Fourth edition. Oxford University Pres.2007.p. 83

13. Nkondjock, A., Ghadirian, P.:Epidemiology of breast cancer among BRCA mutation carriers: an overview. 2004. *Cancer Letters* 205: 1-8
14. Beji, N.K., Reis, N.:Risk factors for breast cancer Turkish women: a hospital-based case-control study.2007. *European Journal of Cancer Care*, 16:178-184
15. Eras, N.: Manganez süperoksid dismutaz geninin ala-9val polimorfizmiyle meme kanseri riski arasındaki ilişkinin araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Mersin Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü., Mersin 2006
16. Dinçer, Y., Akçay, T.:DNA Hasarı.2000.*Türk Biyokimya Dergisi*, 25,2: 73-79
17. 17.12.2007. [http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA\\_tamiri](http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA_tamiri)
18. [http://www.genetiklab.com/index.php?pageNum\\_ana\\_icerkler=9&pagenum\\_ana\\_icerkler=17&sayfa=dersane](http://www.genetiklab.com/index.php?pageNum_ana_icerkler=9&pagenum_ana_icerkler=17&sayfa=dersane) (18.12.2007)
19. Deng, C.X.:Roles of BRCA1 in centrosome duplication.2002.*Oncogene*.21: 6222-6227.
20. <http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/index.shtml> (07.01.2008)
21. Yang, X., Lippman, M.E.:BRCA1 and BRCA2 in breast cancer.1999. *Breast Cancer Research and Treatment*. 54: 1-10
22. Soto, J.A., Deng, C.X.:PARP-1 inhibitors: are they the long-sought genetically specific drugs for BRCA1/2-associated breast cancers?.2006. *International Journal Of Medical Science*. 3(4): 117-123
23. Deng, C.X.:BRCA1:cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution.2006.*Nucleic Acids Research*.34(5): 1416-1426
24. Yoshida, K., Miki, Y.:Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage.2004.*Cancer Science*. 95(11): 866-871.
25. Isaacs, C., Rebbeck, T.,R.:Hereditary Breast Cancer.*Informa Health Care*.2007. p.146-147
26. Sankaran, S., Starita, L.M., Simons, A.M., Parvin, J.D.:Identification of Domains of BRCA1 Critical for Ubiquitin-Dependent Inhibition of Centrosome Function.2006.*Cancer Res*. 66(8):4100-4107
27. Güveloğlu, E.:Meme, Over ve Tuba karsinomlarında BRCA1 ve BRCA2 protein ekspresyonlarının Prognostik önemi: İmmünohistokimyasal ve



klınkopatolojik alışma. Uzmanlık tezi, ukurova niv., Tıp Fakltesi, Adana 2006

28. Tutt, A., Ashworth, A.:The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition.2002.Trends in Molecular Medicine. 8(12):571-576
29. Nanda, R., Schumm, L.P., Cummings, S., Fackenthal, J.D., Sveen, L., Ademuyiva, F., Cobleigh, M., Esserman, L., Lindor, N.M., Neuhausen, S.L., Olopade, O.I.: Genetic Testing in an Ethnically Diverse Cohort of High-Risk Women.2005. JAMA.94(15): 1925-1933
30. Montagna, M., Palma, M.D., Menin, C., Agata, S., Nicolo, A., Chieco-Bianchi, L., D'Andrea, E.:Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families.2003. Human Molecular Genetics.12(9): 1055-1061
31. Lam, A.C.F., Lam, S.T.S., Lai, K.K.S., Tong, T.M.F., Chau, T.C.:High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation.2006. Clinical Biochemistry 39:196-202
32. Hogervorst, F.B.L., Nederlof, P.M., Gille, J.J.P., McElgunn, C.J., Grippeling, M., Pruntel, R., Regnerus, R., Welsem, T., Spaendonk, R., Menko, F.H., Kluijt, I., Dommering, C., Verhoef, S., Schouten, J.P., Veer, L.J., Pals, G.:Large Genomic Deletions and Duplications in the BRCA1 Gene Identified by a Novel Quantitative Method.2003.Cancer Research.63:1449-1453.
33. Lim, Y.K., PTC, L., AB, A., SC, L., JE-L, W., TC, P., J-H, S.:Identification of novel BRCA large genomic rearrangements in Singapore Asian breast and ovarian patients with cancer.2007.Clinical Genetics.71:331-342
34. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=28897703](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=28897703) (03.01.2008)
35. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=41293475](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=41293475) (03.01.2008)
36. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=28897712](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=28897712) (03.01.2008)
37. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=45574331](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=45574331) (03.01.2008)
38. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=41293505](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=41293505) (03.01.2008)

39. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=28897744](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=28897744)  
(03.01.2008)
40. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=41293515](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=41293515)  
(03.01.2008)
41. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=28897751](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=28897751)  
(03.01.2008)
42. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11571747](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=11571747)  
(03.01.2008)
43. Dapic, V., Carvalho, M., Monteiro, A.:Breast cancer susceptibility and the DNA damage response.2005.Journal Of The Moffitt Cancer Center.12 (2): 127-136

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Ankara’da doğdu. İlköğrenimini Batıkent İlköğretim Okulu, ortaöğrenimini ise M. Rüştü UZEL Kimya Meslek Lisesi’nde tamaladıktan sonra 1999 yılında Ankara Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Önlisans programına yerleşti. Bu programdan mezun olduğu 2001 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü’ne dikey geçiş hakkı kazandı. 2004 yılında Biyoloji bölümünü bitirdikten sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Bölümü’nde yüksek lisansa başladı. Hala aynı programda eğitimine devam etmektedir.