

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**BRCA1 185delAG, 5382insC ve BRCA2 6174delT, V2466A  
MUTASYONLARININ MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR  
REAKSİYONU YÖNTEMİ İLE TEK ADIMDA  
BELİRLENMESİ**

**Moleküler Biyolog Merve TECER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2014**

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**BRCA1 185delAG, 5382insC ve BRCA2 6174delT, V2466A  
MUTASYONLARININ MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR  
REAKSİYONU YÖNTEMİ İLE TEK ADIMDA  
BELİRLENMESİ**

**Moleküler Biyolog Merve TECER**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Veysel Sabri HANÇER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2014**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Merve TECER



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1. ÖZET .....	1
2. SUMMARY .....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER .....	6
4.1. KANSER GENETİĞİ .....	6
4.1.1. Kanser Gelişimi.....	6
4.1.1.1. Tümör Baskılayıcı Genler.....	7
4.1.1.2. Onkogenler.....	8
4.1.2. Kalıtsal ve Sporadik Kanserlerin Genetik Farklılıkları .....	8
4.2. MEME KANSERİ .....	9
4.2.1. Meme Kanserinde Etkili Risk Faktörleri .....	11
4.2.2. Meme Kanserinde Genetik Faktörler.....	14
4.2.3. Kalıtsal ve Sporadik Meme Kanseri .....	14
4.3. YUMURTALIK KANSERİ .....	16
4.3.1. Yumurtalık Kanserinde Etkili Risk Faktörleri .....	17
4.3.2. Ailesel Yumurtalık Kanseri .....	18
4.4. BRCA GENLERİ VE MUTASYONLARI.....	21
4.4.1. BRCA1 Geni .....	24
4.4.1.1. BRCA1 Proteini .....	24
4.4.1.2. BRCA1 Gen Lokusu .....	25
4.4.1.3. BRCA1'in İşlevi .....	26
4.4.2. BRCA2 Geni .....	28
4.4.2.1. BRCA2 Proteini ve İşlevi.....	28
4.4.3. Geliştirilen Ürün Prototipi Kapsamında Taranacak Mutasyonlar .....	31
4.4.3.1. BRCA1 185delAG Mutasyonu .....	31
4.4.3.2. BRCA1 5382insC Mutasyonu .....	32
4.4.3.3. BRCA2 6174delT Mutasyonu .....	32
4.4.4. Geliştirilen Ürün Prototipi Kapsamındaki Yenilikler .....	33

5. MATERYAL VE YÖNTEM .....	35
5.1. KONTROL GRUBU .....	35
5.2. YÖNTEM.....	35
5.2.1. Primerlerin Tasarımı .....	35
5.2.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	37
5.2.2.1. PZR Bileşenleri.....	37
5.2.2.2. PZR Koşulları .....	39
5.2.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi.....	40
6. BULGULAR.....	41
6.1. SENTETİK DNA ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜ.....	41
6.2. MULTİPLEKS PZR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ ANALİZLERİ.....	41
6.2.1. Optimal PZR Koşullarının Tayininde 1. Deneme.....	42
6.2.2. Optimal PZR Koşullarının Tayininde 2. Deneme.....	44
6.2.3. Optimal PZR Koşullarının Tayininde 3. Deneme.....	46
7. TARTIŞMA.....	52
8. SONUÇ.....	55
9. TEŞEKKÜR.....	56
10. KAYNAKLAR.....	57

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ATM</b>	Ataksia Telengiectasia Geni
<b>BAP1</b>	BRCA1-Associated Protein 1
<b>BASC</b>	BRCA1 associated genom surveillance complex
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>BRCA</b>	Meme ve Yumurtalık Kanseri Yatkinlık Genleri
<b>BRCA1</b>	Meme ve Yumurtalık Kanseri Yatkinlık Geni 1
<b>BRCA2</b>	Meme ve Yumurtalık Kanseri Yatkinlık Geni 2
<b>CHEK2</b>	Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Kinaz 2
<b>C-Terminal</b>	Karboksil ucu
<b>C°</b>	Santigrat
<b>dak</b>	Dakika
<b>del</b>	Delesyon
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile Su
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleikasit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleosit trifosfat
<b>EtBr</b>	Etidiyum Bromid
<b>FOXM1</b>	Fork-head Box M1
<b>FOXP1</b>	Fork-head Box P1
<b>g</b>	Gram
<b>HBOC</b>	Kalitsal Meme-Yumurtalık Kanseri Sendromu
<b>HNKKS</b>	Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser Sendromu
<b>ins</b>	İnsersiyon
<b>kb</b>	Kilo Baz
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>M</b>	Mutant
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum klorür
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar

<b>ng</b>	Nanogram
<b>NIH</b>	Ulusal Sağlık Enstitüsü
<b>NLS</b>	Nükleer lokalizasyon sinyal bölgesi
<b>N-Terminal</b>	Amino ucu
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RB1</b>	Retinoblastoma 1
<b>Sn</b>	saniye
<b>TAE</b>	Trisasetik asit
<b>TBG</b>	Tümör Baskılayıcı Gen
<b>TP53</b>	Tümör protein 53
<b>UV</b>	Mor Ötesi Işıklar
<b>XRCC1</b>	X-ray repair cross complementing protein 1
<b>Wt</b>	Yabanıl Tip
<b>µl</b>	Mikro Litre
<b>µmol</b>	Mikromol
<b>β</b>	Beta

**Araştırma Projesi No : TBG/1082012**

**BAPKO Karar No : 2013-01-04**

## 1. ÖZET

BRCA genleri, bakıcı tipi tümör baskılayıcı genlerdir. DNA sentezinde transkripsiyonel düzenlenmeyi sağlayan multiprotein komplekslerinin sentezi ve özellikle çift sarmal kırıkları gibi, bazı DNA hasarlarının fark edilmesi ve düzeltilmesi ile ilgilidirler. BRCA geninin fonksiyonel eksikliğinde, DNA onarımı bozulur ve p53 bağımlı DNA yıkım noktası aktive olarak hücre döngüsü sırasında apoptozun durmasına neden olur.

BRCA genlerindeki işlevsel eksiklikler, BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germline mutasyonlarla ilişkilidir. DNA onarım genlerindeki mutasyonlar, DNA sentezinde bozulmalarla sonuçlanmaktadır. Bunların % 80-%90'nı çerçeve kayması ya da anlamsız mutasyonlardır, çoğunlukla nokta mutasyonları ya da küçük delesyonlar/insersiyonlar sonucunda ortaya çıkarlar.

BRCA mutasyonları, meme ve yumurtalık kanseri risk artışı ile ilişkilidir. Bunun dışında erkekte prostat ve meme kanseri ile ilişkili olduğu da saptanmıştır. Meme kanserlerinin % 5-%10'u, BRCA1, BRCA2 ya da her ikisindeki mutasyonlar nedeni ile yatkınlığı olan kadınlarda ortaya çıkan kalıtsal formdur. Bu mutasyonlar kadınlarda sadece meme kanseri değil aynı zamanda yumurtalık kanser riskini de artırmaktadır. Meme kanseri olan olgularda, BRCA1 ya da BRCA2 mutasyonu varlığı yumurtalık kanseri riskini 10 kat artırmaktadır. Erkeklerde ise, prostat ve meme kanseri riskini büyük ölçüde artırdığı bilinmektedir.

Bu tez projesi ile ülkemizde ve yakın coğrafyadaki meme ve yumurtalık kanserli vakalarda sık saptanan toplam 4 BRCA mutasyonu multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile tek adımda çalışılabilir hale getirilmiştir. Böylece bu 4 mutasyonun varlığı hızlı biçimde saptanabilen bir tarama testi prototipi elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** BRCA1, BRCA2, Mutasyon, Multipleks PZR.



## 2. SUMMARY

BRCA genes are the tumor suppressor genes which involved in multiprotein complexes, some of which to be held transcriptional synthesis of DNA and DNA damage recognition and repair of fractures especially in double helixes. In the absence of the function of the BRCA genes, DNA repair is disrupted and p53 dependent DNA degradation point is activated which causes to stop the apoptosis.

The loss of the function of BRCA genes is related to BRCA1 and BRCA2 germline mutations. Mutations in DNA repair genes, resulting in defects in DNA synthesis. Of these, 80%-90% of the frame shift nonsense mutations, mostly point mutations or small deletions/insertions appear as a results.

BRCA mutations associate with increase of the breast and ovarian cancer risc. Neighter of those, it was detected that it has relation between prostate and breast cancer in men. Five %-10% of breast cancers, BRCA1, BRCA2 or both due to mutations that ocur in women predisposed herediter form. These mutations are not only risk factors for the breast cancer but also increases the risk of ovarian cancer. In the case of breast cancer, instiction of eighter BRCA1 mutation or BRCA2 mutation increase the risc factor of ovarian cancer at ten times. They also greatly increases the risk of breast and prostate cancers in men.

With this thesis project in our country and in its hinterland frequently identified a total of 4 BRCA mutations multiplex PCR method with a single step can be worked will be made. Thus the presence of these four mutation can be determined quickly screening test prototype was obtained.

**Key Words:** BRCA1, BRCA2, Mutation, Multiplex PCR

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

BRCA1 (OMIM:113705), 1994'de tanımlanmış ve 17.kromozoma lokalize (17q21) olarak bulunmuş, 5.6 kilobaz (kb) uzunluğunda, 1863 aminoasitlik bir proteini kodlayan tümör baskılayıcı bir genidir. BRCA2 geni (OMIM:600185) ise, 10.2 kb uzunluğunda, 3418 aminoasitten oluşan bir proteini kodlayan ve 13. kromozomun uzun kolunda yer alan (13q12), 1995'te Wooster ve ark. tarafından tanımlanmış bir tümör baskılayıcı genidir (1). Her iki gen bölgesi de diğer gen bölgeleri ile karşılaştırıldığında büyük olarak tanımlanabilir. Bakıcı tipi tümör baskılayıcı genler olan BRCA genleri, DNA sentezinde transkripsiyonel düzenlenmeyi sağlayan multiprotein komplekslerinin sentezi ve bazı DNA hasarlarının özellikle çift sarmal kırıklarının fark edilmesi ve düzeltilmesi ile ilgilidirler. Normal allelin kaybı sonucu kanser gelişebilmektedir. BRCA genlerinin işlevsel eksikliklerinde DNA onarımı bozulur ve p53 bağımlı DNA yıkım noktası aktive olarak hücre döngüsü sırasında apoptozun durmasına neden olur. BRCA genlerindeki işlevsel eksiklikler, BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germline mutasyonlarla ilişkilidir. DNA tamir genleri olan bu genlerdeki mutasyonlar, DNA sentezinde bozulmalarla sonuçlanmaktadır. İşlevsiz BRCA proteinlerinin oluşumuna neden olan bu mutasyonların yaklaşık %80-%90'ını çerçeve kayması ya da anlamsız mutasyonlar oluşturmaktadır. Çoğunlukla nokta mutasyonları ya da küçük delesyonlar/insersiyonların sonucunda oluşurlar.

Günümüze kadar BRCA1 geni için 850'den fazla, BRCA2 için ise 750'den fazla mutasyon saptanmıştır (2). BRCA1 mutasyonları, meme kanserinin kalıtsal formu için karakteristiktir. Sporadik meme kanserine karşılık kalıtsal formun özellikleri daha erken yaşta tanı, hastalığın bilateral halinde daha fazla görülme oranı ve erkeklerde görülme sıklığının daha fazla olmasıdır. Meme kanserlerinin %5-%10'u, BRCA1, BRCA2 ya da her ikisindeki mutasyonlar nedeni ile ortaya çıkan kalıtsal formdur. Bu mutasyonlar kadınlarda meme kanseri ile birlikte yumurtalık kanseri riskini de artırmaktadır. Meme kanseri olan olgularda, BRCA1 ya da BRCA2 mutasyonu varlığı yumurtalık kanseri riskini 10 kat artırmaktadır. Erkeklerde ise prostat ve meme kanseri riskini büyük ölçüde artırır.

Kanser ile ilişkilendirilmiş yüzlerce BRCA1/BRCA2 mutasyonu bulunmakla birlikte, Ashkenazi Yahudi kadınlarda meme ve yumurtalık kanserinin ailesel formuna neden olduğu kanıtlanmış üç mutasyon bildirilmiştir. Aile ağacında Ashkenazi Yahudi olan kimse bulunmayan bazı kanserli olgularda da bu mutasyonlar saptanmış olmakla

birlikte, bu durum nadirdir. Bu söz edilen üç mutasyon 185delAG, 5382insC ve 6174delT'dir (3). BRCA1 185delAG mutasyonu taşıyıcısı olan bir kadın için meme kanseri riski %15-%81, yumurtalık kanseri riski %4-%54 artar. Erkeklerde sağlıklı bir veri olmamakla beraber, meme ve prostat kanseri riskinin arttığı belirtilmektedir. BRCA1 5382insC mutasyonu taşıyıcısı olan bir kadın için meme kanseri riski %13-%81, yumurtalık kanseri riski %3-%54 artar. BRCA2 6174delT mutasyonu taşıyıcısı olan bir kadın için meme kanseri riski %15-%85, yumurtalık kanseri riski %2-%23 artar (4). Aynı mutasyon ile erkeklerde de meme kanseri riski artmaktadır. Ashkenazi Yahudilerinde bu 3 mutasyonun sık görülmesinin en olası nedeni kurucu etkidir (4). Günümüzde Ashkenazi Yahudiler diğer nüfustan coğrafi ve dini olarak izole oldukları için 'kurucuları' köklerine doğru geri yönde izlenebilmektedir. Sadece bir ya da birkaç kurucu bireyde bulunan mutasyonlar nesiller boyunca yayılarak günümüz popülasyonunda yaygın hale gelmiştir. Irk ya da atasal durum ne olursa olsun, bu üç mutasyonun yokluğunda kanserin ailesel formunun olmadığını söylemek imkânsızdır.

Genel popülasyonda 800 kişiden biri BRCA1 mutasyonu taşımaktadır (Bu oran Ashkenazi Yahudilerinde her 40 kişide 1'dir). BRCA2 için bu oran bilinmemektedir. Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) destekli bir çalışmada erkekler için bu 3 mutasyondan birini taşımanın 50 yaşından önce bir risk oluşturmadığı, fakat 70 yaşında kümülatif riskin % 3,8'den % 16'ya yükseldiği bildirilmiştir. Erkeklerde meme kanseri kadınlara nazaran çok daha az görülmektedir, ancak ABD'de her yıl 2.000 erkek BRCA2 mutasyonu sebebiyle meme kanseri tanısı almaktadır (5).

Yumurtalık kanseri, kanser ölümleri arasında kadınlarda 5. sırayı almakla birlikte, en ölümcül seyirli jinekolojik kanserdir. Genellikle ileri evrelerde, intraperitoneal yayılım sonrası tanı almaktadır ve bu yüzden agresif kemoterapi ve cerrahiye karşın 5 yıllık sağ kalım oranları ancak %30 civarında kalmaktadır (6). Epitelial yumurtalık kanserlerinin % 90'ı sporadik olarak ortaya çıkmaktadır, ancak %10'u ailesel özelliktedir. Ailesel yumurtalık kanseri tanısı için en az üç kuşağı içeren aile soyağacı çıkarılmalıdır. Ailevi yumurtalık kanserlerinin bir kısmında ailesel genetik bozukluk belirlenebilmektedir. Ailesel özellikteki yumurtalık kanseri, otozomal dominant geçiş özelliği göstermektedir. Birden fazla kuşakta, pek çok aile üyesi yumurtalık kanserine yakalanmaktadır. Ailevi yumurtalık kanseri, ailede iki ve daha fazla yumurtalık kanseri birey olması olarak tanımlanabilir (Birinci derece veya birinci ve ikinci derece akrabalar arasında). Yumurtalık

kanser riski normal popülasyonda % 1.4 (1:70) olarak hesaplanırken, ailesinde yumurtalık kanserine sahip birey bulunanlarda %5-%7 olarak öngörülmektedir. Yumurtalık kanseri riski, birinci derece yakınında yumurtalık kanseri olanlarda 3.6 kat, ikinci derece yakınında yumurtalık kanseri olan olgularda 2.9 kat, annesinde yumurtalık kanseri olan olgularda 4.3 kat artmaktadır (7).

Bu proje ile meme ve yumurtalık kanser riskini büyük ölçüde artıran, ülkemizde ve yakın coğrafyada sık saptanan 4 BRCA mutasyonu multipleks PZR yöntemi ile tek adımda çalışılabilir hale getirilmiştir.

Günümüzde BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonların analizi bu iki genin tamamının dizilenmesi stratejisine dayanmaktadır. Bu tezin sonucunda genel popülasyonda da görülme sıklığı yüksek olan BRCA1 185delAG ve 5382insC ile BRCA2 6174delT ve bunlara ek olarak ülkemizdeki hastaların taranması sonucunda yeni saptanan (yayınlanmamış veri) ve sık olduğu öngörülen V2466A mutasyonunun kısa sürede tespiti mümkün kılınmıştır. DNA Dizileme yöntemine alternatif olarak tarama amaçlı bu multipleks PZR yaklaşımı uygulanabilir. Kullanıcılar bu 4 mutasyonun saptanmadığı durumda, önceki gibi DNA Dizileme yöntemi ile analize devam edebilirler. Mutasyon saptanması halinde, tüm genin DNA Dizileme yöntemi ile incelenmesi seçimine kıyasla analiz süresi yaklaşık 90 günden 2 saate inmektedir. Böylece bahsi edilen bölgelerde kanser riskinin büyük ölçüde artmasından sorumlu olan ve sık saptanan BRCA mutasyonları taranmış olacaktır.

Çalışmamızın amacı; BRCA1 185delAG ve 5382insC mutasyonları ile BRCA2 6174delT ve V2466A mutasyonlarının analizini, uzun zaman alan mevcut ürün ve yöntemlere oranla çok daha kısa sürede ve basit uygulanabilirlikle gerçekleştirecek bir ürün prototipinin geliştirilmesini sağlamaktır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. KANSER GENETİĞİ

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. Kontrolsüz çoğalma en önemli özellik olmakla beraber, kanser hücrelerinin diğer biyolojik özellikleri arasında; hücre kültüründe kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyarılara gereksinim duymama, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme sayılabilir. İlk etapta ‘normal’ bir hücrenin, yer aldığı organizmanın ölümüne sebep olabilecek bu olumsuz özellikleri sonradan nasıl kazandığı, diğer bir ifadeyle ‘onkogenez’ ya da ‘karsinogenez’ olarak isimlendirilen bu süreçte hangi mekanizmaların rol oynadığı ancak yakın zamanlarda ve kısmen anlaşılabilmiştir. Buna göre onkogenez, genetik değişiklikler; yani mutasyonlar aracılığı ile gelişen bir süreçtir. Son yıllarda, hücrenin malign özellik kazanmasında epigenetik değişikliklerin de önemli rol oynadığı anlaşılmıştır (8).

#### 4.1.1 Kanser Gelişimi

Hücrenin kanserleşmesi için, bazı özel genlerin mutasyona uğraması gereklidir. Bu genlerin işlevleri bakımından, bir proto-onkogen ya da bir tümör baskılayıcı gen olduğu tespit edilmiştir. Hücre bölünmesini, farklılaşmasını, DNA tamirini ve apoptozu kontrol altında tutan bu genlerde oluşan mutasyonlar kansere yol açabilmektedir (9). Özellikle kolon kanserinde yapılan araştırmalar onkogenez için yalnızca ‘genetik olay’ın yeterli olmadığını, tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenlerde bir dizi mutasyonun varlığının gerektiğini göstermiştir. Bu verilere dayanarak onkogenez, genetik bakımdan birden çok aşamalı bir süreç olarak ifade edilmektedir. Bu süreçte oluşan mutasyonlar kendi kendine ya da radyasyon gibi mutajenik etkenlerle bağlantılı olarak oluşabilir (10).

Normal hücrelerde DNA’da oluşan hasarların, DNA tamir enzimleriyle onarımı yapılmakta, onarılamadığı takdirde tümör baskılayıcı genler ve apoptotik genlerin ortak faaliyetleri ile hücre apoptoza yönlendirilmektedir. Bu durumlarda mutant tümör

potansiyeli olan hücrelerin yaşayabilme kapasitelerinin yetersiz olması nedeni ile organizma kanserli hücrelerden arındırılır. Fakat genetik yatkınlıklar ile beraber mutant hücrelerin yaşamını devam ettirme potansiyeli kazanmaları, hücre sinyal sistemlerinin sürekli etkin kalması sonucu tümör hücreleri dokular arasında yayılmakta ve kanserleşmektedir (11).

#### **4.1.1.1. Tümör Baskılayıcı Genler**

Tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünün kontrol noktalarını düzenleyen genler olmalarının yanı sıra apoptoz sürecini de başlatan genlerdir. Tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinler normal hücrelerde DNA hasarına veya dış çevreden kaynaklanan büyümeyi inhibe edici sinyallere yanıt olarak hücre döngüsünün tutulumunu gerçekleştirebilmektedir. Proliferasyonu direkt olarak baskılayan tümör baskılayıcı genlere ‘bekçi’ tipi genler ismi verilmiştir. Bekçi genler, hücre çevrimini kontrol altında tutarlar. Hücreyi apoptoza sevk eden genler de bu gruptadır (12). Tümör baskılayıcı genlerde rastlanan işlev yitirici mutasyonlar hücreye çoğalma bakımından bir üstünlük sağlar. Hücre çoğalmasını direkt baskılayan bekçi tipi tümör baskılayıcı genlere ek olarak, dolaylı olarak etkisini gösterenler de vardır. Bu genlere de ‘bakıcı’ tipi tümör baskılayıcı genler adı verilmiştir. Bakıcı genler, genomun bütünlüğünün korunmasında görevli olan DNA tamir genleridir ve mutasyon oluşumunu engellerler. Bu genlerde işlev kaybına yol açan bir mutasyon oluştuğunda, genom boyunca mutasyonlar ortaya çıkmaya başlar ve genomik kararsızlık gelişir. Genomik kararsızlık, bekçi tipi tümör baskılayıcı genlerin ve proto-onkogenlerin mutasyona uğraması sonucu oluşabilir (13). Tümör baskılayıcı genlerin etkisini kaybetmesi için her iki allelinin de fonksiyonunu yitirmesi gerekir. Tümör baskılayıcı bir genin her iki allelinin de aktivitesini kaybetmesi sonucunda, hücrenin büyümesi ve bölünmesi sürekli devam eder ve hücre kanserleşmeye başlar (12).

Bazı germline tümör baskılayıcı gen mutasyonları kalıtsal kanserlerle bağlantılıdır. Bu genlerin sporadik kanserlerde de mutasyon taşıdığı tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tümör Baskılayıcı Genin Tipi (TBG)	Gen	Kalıtsal Kanser	Sporadik Kanser
Hücre bölünmesi kontrolü ( Bekçi tipi TBG )	RB1	Retinoblastoma	Birçok sporadik kanser
	VHL	Von Hippel Lindau hastalığı	Böbrek tümörü, merkezi sinir sistemi hemaniyoblastoması
	NF1	Nörofibromatozis tip 1	Malin periferik sinir kılıfı tümörü
	NF2	Nörofibromatozis tip 2	Meningiom
	APC	Familyal adenomatöz polipozis	Kolorektal kanser
DNA Tamir genleri ( bakıcı tipi TBG )	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	Hereditör non-polipozis kolon kanseri	Kolon, mide, endometriyum kanseri
	BRCA1, BRCA2	Ailesel meme/yumurtalık kanseri	Yumurtalık ve meme kanseri
Apoptoz genleri	TP53	Li - Fraumeni sendromu	Bir çok sporadik kanser
	TP16	Ailesel melanoma	Bir çok sporadik kanser

**Tablo 1:** Çeşitli Kalıtsal ve Sporadik Kanserlerde İnaktif Olan Tümör Baskılayıcı Genler (13) TBG: Tümör Baskılayıcı Gen

#### 4.1.1.2. Onkogenler

Protoonkogenler, hücrenin normal döngüsünü kontrol altında tutan sinyal yollarında, hücre çoğalmasının ve canlılığının devam ettirilmesinde denetleme görevini yaparlar (12,14). Onkogenler ise, protoonkogenlerin mutant formlarıdır. Mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan işlev değişimleri ile hücre bölünmesi ve proliferasyonun anormal artışına sebep olurlar. Onkogenler hücrel etki alanı olarak baskındır. Bu genlerin yalnızca tek bir allelindeki mutasyon, hücre fenotip değişimlerini tetikleyebilir. Hücre bölünmesini uyararak, tümör oluşumunu başlatırlar (15,16).

#### 4.1.2. Kalıtsal ve Sporadik Kanserlerin Genetik Farklılıkları

Kanser, temel olarak genetik ve çevresel birçok etkenin etkileşimiyle ortaya çıkan birden çok faktöre bağlı olarak gelişen bir hastalıktır. Bu sebepten dolayı ailesel

bağlantılara rastlansa bile mendel kalıtım paterni (otozomal dominant, otozomal resesif gibi) çoğu kez saptanmaz. Fakat tüm kanser olgularının yaklaşık %5-%10 kadarının kalıtsal olduğu tespit edilmiştir. Bunlar, büyük çoğunluğu otozomal dominant geçişli ve tümör baskılayıcı gen ya da protoonkogen mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan kanserlerdir.

Kalıtsal kanserlerin ayırt edici özellikleri şöyle sıralanabilir :

1. Erken tanı yaşı.
2. Ailede birçok kişinin aynı tip kansere yakalanmış olması
3. Değişik tipte, ancak spesifik bir patern oluşturan kanser tiplerinin görülmesi.
4. Bir organda bilateral, ya da çok odaklı tümör gelişimi.
5. Cinsiyetle uyumsuz tümör.
6. Belirli bir sendrom düşündürülen kanser dışı ek bulguların saptanması (17).

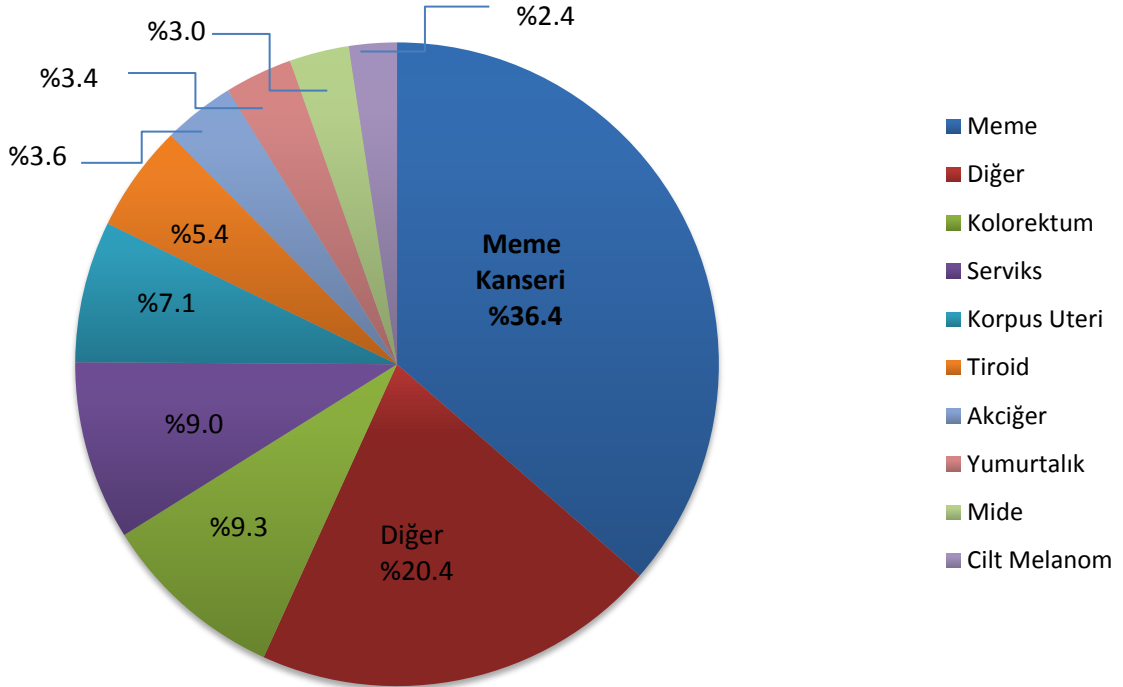
## 4.2. MEME KANSERİ

Meme kanseri, cinsiyet gözetmeksizin, akciğer kanserinden sonra dünyada ikinci en sık tanı alan kanser tipidir. Yapılan araştırmalara göre meme kanseri, 20-59 yaş arası kadınlarda kanser kaynaklı ölümlerin birinci nedeni ve tüm kadınlarda kanser nedenli ölümlerin ikinci nedeni olarak belirtilmektedir (18).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Derneği (International Agency for Research on Cancer) GLOBOCAN projesinin verilerine göre 2008 yılında dünya genelinde yaklaşık 12.7 milyon kanser tanısı koyulmuş ve 7.6 milyon kişide kanser nedenli ölüm meydana gelmiştir. En sık karşılaşılan kanserler, yaklaşık 1.35 milyon ile akciğer, 1.15 milyon ile meme ve 1 milyon ile kolorektal kanserlerdir (18). Kanser kayıtçılığı yapan 184 ülke ve 28 kanser tipi için kanser tahminlerinin değerlendirildiği GLOBOCAN 2012 verilerine göre ise, 2012 yılında dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünya'da en çok tanı konulan kanserler akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) iken, kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mideden (%8,8) gerçekleştiği bildirilmiştir. Uluslararası Kanser



Ajansının verilerinde özellikle meme kanserindeki artış dikkat çekmektedir. Kadınlarda meme kanser sıklığının bir önceki tahminlere göre %20, meme kanserinden ölümlerin ise %14 arttığı belirtilmiştir. Meme kanseri kadınlar arasında en çok görülen ve en fazla ölüme neden olan kanserdir. Dünyada kanser olan her 4 kadından biri meme kanseridir. Meme kanserinin özellikle yaşam koşullarındaki değişiminden kaynaklandığı ifade edilmiştir. Meme kanseri insidansı gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksek, meme kanserinden ölüm ise gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha düşüktür. Bu durumun az gelişmiş ülkelerde yaşayan kadınların meme kanseri teşhis, tarama ve tedavi hizmetlerine ulaşmaktaki sıkıntıdan kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu nedenle, özellikle az gelişmiş ülkelerde meme kanserinin erken teşhis, tarama ve tedavisine yönelik çabaların artırılması gerekliliği ifade edilmiştir (19). Boyle ve ark, 40 Avrupa ülkesinde kanser sıklığı ve mortalitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, kadınlardaki meme kanseri sıklığının %12.8'lik bir oranla akciğer ve kolorektal kanserden sonra üçüncü sırada olduğunu göstermişlerdir. Meme kanseri kadınlarda dünya genelinde en sık tanı alan kanser tipidir (18,20).



Şekil 1: Önümüzdeki 5 yılda kadınlarda kanserlerin öngörülen dağılımı (19)

Meme kanseri sıklığı ciddi bir coğrafi farklılık göstermektedir. Gelişmiş olan ülkeler en sık, Asya ve Afrika'daki az gelişmiş ülkeler en az meme kanseri görülen ülkelerdir. Yaşa göre standardize edildiğinde, Kuzey Amerika'daki oran 99.4/100.000 iken, Orta Afrika'da bu oran 16.5/100.000 kadardır. Bununla birlikte orta ve alt gelir düzeyindeki ülkelerde meme kanseri sıklığında belirgin artışlar görülmektedir. Dünya'daki meme kanseri sıklığı, 1990 yılından itibaren her yıl % 0.5'lik artış göstermektedir. Çin'deki yıllık artış oranı ise, %3-%4 civarındadır. Hindistan'da 15 yıl önce serviks kanseri en sık kanser iken, bugün meme kanseri en sık görülen kadın kanseri olmuştur (21).

Ülkemizde henüz düzenli bir meme kanseri kayıt programı olmamakla birlikte, mevcut verilere göre doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığın olduğu tahmin edilmektedir. Bu sıklık farkının, Türkiye'nin batısındaki yaşamın Avrupa'dakine benzerliğinden kaynaklanması sebebiyle olduğu ifade edilmektedir (21). Beyaz kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı zenci kadınlara oranla %20 daha fazla olmasına rağmen, ölüm oranlarının zenci kadınlarda daha yüksek olması da etnik farklılıkların büyük oranda yaşam tarzı ve sosyoekonomik durumdan kaynaklandığını düşündürmektedir (22).

Türkiye'de 1999 yılında meme kanserli kadın sayısı 8.879 iken, bu oran 2003 yılında 12.772'ye yükselmiştir. Meme kanserinin ülkemizde tüm kanserlerin yaklaşık %24,1'ini oluşturduğu belirtilmektedir (23).

#### **4.2.1. Meme Kanserinde Etkili Risk Faktörleri**

Meme kanserinin gelişiminde etkili olan risk faktörleri genel olarak şu şekilde sınıflandırılmaktadır (24).

##### **1. Demografik özellikler**

Kadın cinsiyeti meme kanseri gelişiminde en büyük risk faktörüdür ve 100 kat artan riski ifade etmektedir. Yaşın ilerlemesi de cinsiyetin kadın olması kadar önemli bir risk faktörüdür. Günümüzde bir kadının yaşamı boyunca invazif olmayan meme kanseri olma riski 6'da 1, invazif meme kanseri olma riski ise 8'de 1'dir. Bu riskin büyük bölümü kişinin yaşının ilerlemesi ile ortaya çıkmaktadır.

Yaşam tarzı ve sosyoekonomik durumdan kaynaklandığı düşünülen etnik farklılıkların meme kanseri gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Sağlık Bakanlığı'nın verileri ve Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu'nun veri tabanındaki olgular incelendiğinde de ülkemizin batısında meme kanseri sıklığının doğusuna oranla yaklaşık 2 kat fazla olduğu görülmektedir (25).

## **2. Endojen Hormonal Faktörler (menarş yaşı, doğum yapma ve sayısı, ilk doğum yaşı, menapoz yaşı, laktasyon, infertilite, düşük yapma)**

Östrojen hormonuna maruz kalınan sürede artış olması, meme kanseri gelişme riskinde artışla ilişkilidir (Erken menarş; 12 yaşından önce, geç menapoz; 55 yaşından sonra); östrojene maruz kalınan sürenin azalmasının ise koruyucu olduğu düşünülmektedir (26,27,28). Tam dönem gebelikle ilişkili olan meme epitelinin terminal farklılaşması da koruyucudur. Dolayısıyla ilk canlı doğumun daha ileri yaşta yapılması ve hiç doğum yapmamış olmak meme kanseri riskinde artışla ilişkilidir (29).

İnfertilitenin meme kanseri riskini azalttığı yönündeki veriler ve infertilite tedavisinin meme kanseri riskini ne yönde etkilediği ile çelişkilidir (30,31). İndüklenmiş veya spontan düşük yapmanın, meme kanseri ile bir ilişkisi gösterilememiştir (32,33).

Emzirmenin meme kanserine karşı koruyucu bir etkisi olduğu ve meme kanseri riskini azalttığı bildirilmiştir (34). Uzun süre emzirme döneminin toplam ovuluar dönem sayısını azaltarak koruyucu bir etki yaptığı düşünülmektedir (35).

## **3. Ailesel/Genetik Faktörler**

Pozitif aile öyküsü meme kanseri açısından önemli bir risk faktörüdür. Bir adet birinci derece akrabası meme kanseri olan bir kişinin, meme kanserine yakalanma riskinin 1.8 kat, iki adet birinci derece akraba varlığında ise bu riskin 2.9 kat arttığı belirtilmektedir. Meme kanserine yakalanmış olan akraba 30 yaşından önce tanı almış ise risk 2.9 kat, 60 yaşından sonra tanı konmuş ise risk 1.5 kat artmaktadır (36).

#### 4. Yaşam Tarzı ve Çevresel Faktörler

Alkol kullanan kadınlarda meme kanserine yakalanma riskinin nispeten arttığı ifade edilmektedir (37,38). Aşırı alkol tüketimi sonucu östrodiolün serumdaki seviyesinin arttığı dolayısıyla östrojen miktarının da artarak meme kanseri gelişimine katkıda bulunduğu ifade edilmektedir (39). Ağır alkol alımının hiç içmemeye göre meme kanseri riskini 1,46 oranında artırdığı gösterilmiştir (40).

Sigaranın anti-östrojenik etkiye sahip olduğu ve meme dokusunun çoğalmasını azaltarak, meme dansitesini düşürdüğü ve meme kanseri gelişim riskini azalttığı düşünülmekle birlikte (41), 53 çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analize göre; meme kanseri gelişimi ile sigara kullanımı arasında anlamlı bir ilişki bulunamadığı ifade edilmektedir (40).

Sosyoekonomik düzey farklılıkları sağlık hizmetlerine erişim ve alınan hizmetin kalitesini etkilemektedir. Sosyoekonomik düzeyi düşük kadınlarda ileri evre meme kanseri görülme sıklığı yüksek iken, yüksek sosyoekonomik düzeyi olan kadınlarla, beyazlarda erken evre meme kanseri daha sık görülmektedir. Beş yıllık sağ kalım oranları incelendiğinde siyah kadınlarda beyazlara oranla sağ kalımın daha düşük olduğu görülmüştür (siyahlarda %70, beyazlarda %86 ). Her evrede, siyah kadınlarda sağ kalım oranı, beyaz kadınlara oranla daha düşük bulunmuştur (42).

Düzenli egzersiz yapmanın anovulatuvar siklusların sayısını artırarak meme kanseri riskini azalttığı belirtilmektedir. Fiziksel aktivitede artış, özellikle premenopozal kadınlarda meme kanseri riskinde azalma ile ilişkilidir (43). Fiziksel olarak aktif kadınlarda meme kanseri riskinin %20-%40 oranında azaldığı belirtilmektedir (44).

Vücut kitle indeksi  $24\text{kg/m}^2$ 'nin üstünde olan postmenapozal kadınlarda sıklık oranı artmıştır (45). Yağ dokuları, androjenleri östrojenlere metabolize ettiklerinden dolayı, vücut yağ dokusu arttıkça endojen östrojen salınımını artmaktadır. Ek olarak, obeziteye bağlı steroid hormon bağlayan globulin düzeylerindeki azalma, serbest östrojen seviyesini artırarak, meme kanseri gelişim riskini artırmaktadır (46).

2010 yılında ülkemizde meme kanseri taraması için ilgili sağlık kurumlarına başvuran toplam 5000 kadın olgunun risk düzeylerinin tespit edilerek, risk faktörlerinin erken tanıya katkısının araştırıldığı çalışmada, altı risk faktörüne göre en yüksek ortalama risk puanları; yaşa göre 189.49 (orta risk) ile 60 yaş ve üzeri olgular, kalıtsal meme kanseri

öyküsüne göre 280.48 (orta risk) ile anne ve kız kardeşinde meme kanseri varlığı olan olgular, kişisel meme kanseri öyküsüne göre 461.33 (en yüksek risk) ile kendisinde meme kanseri olan olgular olarak sıralanmıştır (47).

#### **4.2.2. Meme Kanserinde Genetik Faktörler**

Yapılan çalışmalarda birçok onkogen, tümör baskılayıcı gen ve DNA tamir genlerinde meydana gelen genetik değişikliklerin, meme kanseri gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir. Bu genlerde meydana gelen genetik değişiklikler arasında, nokta mutasyonları, delesyonlar, insersiyonlar, epigenetik değişiklikler ve kromozomal yeniden düzenlenmeler yer almaktadır (48).

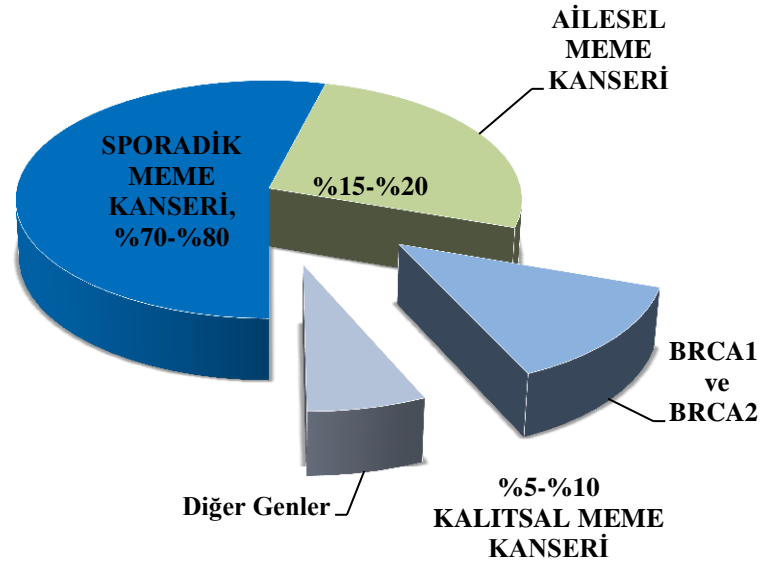
Kalıtsal meme kanserli kadınların ortalama olarak yarısında BRCA1 geninde, 1/3'ünde de BRCA2 geninde mutasyon görülmektedir (50). Ayrıca TP53 (Tümör protein 53), PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), BAP1 (BRCA1-Associated Protein 1), RB1 (Retinoblastoma 1), CHEK2 (Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Kinaz 2), ATM (Ataksia Telangiectasia geni), FOXP1 (Fork-head Box P1) gibi bazı genlerdeki mutasyonların da kalıtsal meme kanserine yol açtıkları gösterilmiştir (49).

Yapılan moleküler genetik çalışmalarda meme kanserinin oluşumunda önemli rol oynayan BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerin aynı zamanda DNA'nın tamirinde de rol oynadığı gösterilmiştir (51).

#### **4.2.3. Kalıtsal ve Sporadik Meme Kanseri**

Daha önce de belirtildiği üzere meme kanserinin büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmakla birlikte, yaklaşık %5-%10 kadarı kalıtsal meme kanseri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal meme kanseri, meme kanserine hassas olma durumu olarak da tanımlanabilir. Sporadik meme kanserleri ise, tüm meme kanserlerinin %70-%80'ini oluşturmaktadır. Sporadik meme kanserleri vakalarında, mutasyon bireyin somatik hücrelerinde meydana gelmektedir. Sporadik meme kanserlerindeki risk faktörlerinin çoğunlukla hormonal olduğu ve kadınlarda görülen sporadik meme kanserinin bilinen başlıca risk faktörlerinin, östrojen seviyesindeki artış ya da östrojene uzun süre maruz

kalma ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (52). Buna ek olarak, yüksek penetranslı kanser yatkınlık genlerindeki mutasyonların etkili olduğu kalıtsal meme kanserinin aksine, sporadik meme kanseri gelişiminde düşük penetranslı kanser yatkınlık genlerindeki mutasyonlar ve yaşamsal risk faktörlerinin de etkili olduğu gözlenmektedir. Düşük penetranslı kanser yatkınlık genlerinin sebep olduğu meme kanserinin aynı ailede birden fazla kişide görülmesi durumunda ailesel meme kanseri adı verilen üçüncü bir sınıftan bahsedilebileceği ifade edilmektedir (Şekil 2). Bu durumun gözlemlendiği ailelerde meme kanserinin, aynı çevresel ve kimyasal ajanlara maruz kalma sonucu ya da şans eseri olarak da gelişmiş olabileceği belirtilmektedir (52,53).



**Şekil 2:** Meme kanserinin sınıflandırılması ve görülme sıklıkları (54)

Kalıtsal meme kanserinde, yüksek penetransa sahip meme kanserine yatkınlık genleri olarak, genom devamlılığının sağlanmasında ve DNA tamir mekanizmalarında görevli proteinleri kodlayan, BRCA1 ve BRCA2 genleri belirtilmektedir. Bu genlerdeki germ hücre soyu mutasyonlarını içeren olguların yaşamlarının bir döneminde meme kanserine yakalanma riskinin %50-%80 arasında değiştiği belirtilmektedir. Bu iki kansere yatkınlık genlerinin germ hücrelerindeki mutasyonları yumurtalık kanserlerinde %10, meme kanserlerinde %7 oranında dominant olarak kalıtım göstermektedir. Ailesel meme kanseri

için en şiddetli etkiye sahip mutasyonları taşıyan bu iki gen, meme kanseri risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılmasında ön sırada yer almaktadır (55).

Pozitif aile öyküsüne sahip olmayan sporadik meme kanserli olgularda da BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları saptanmıştır. Yapılan analizlerde BRCA1 ve BRCA2'nin olduğu alleldeki somatik mutasyonlar ile birlikte normal allelin kaybı (heterozigozite kaybı) gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle BRCA1 geninin sporadik meme kanseri vakalarında inaktif olduğu ve BRCA1 genindeki mutasyonların sporadik meme kanseri oluşumunda rolü olduğu gösterilmiştir (56).

2005 yılında Süleyman Demirel Üniversitesinde, meme kanserli 82 olguda BRCA1 ve BRCA2 ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak tespitinin yapıldığı bir çalışmada, sporadik meme kanserli olgularda da BRCA ekspresyon kayıplarının varlığı gösterilmiş ve BRCA protein ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak tespiti ile kalıtsal ve sporadik meme kanserlerinin birbirlerinden ayırt edilemeyeceği ön görülmüştür (57).

### **4.3. YUMURTALIK KANSERİ**

Yumurtalık kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümlerde akciğer, meme, kolon-rektum ve pankreas kanserinden sonra beşinci sırada, jinekolojik malignitelerin içerisinde ise %50 görülme oranıyla mortalitesi en yüksek kanserdir. Yumurtalık kanseri nedeniyle, diğer tüm jinekolojik malignitelerin toplamından daha fazla hasta kaybedilmektedir. Bir kadının doğduğu andan itibaren hayatının herhangi bir zamanında yumurtalık kanserine yakalanma riski yaklaşık %1.4 olmakla birlikte, yumurtalık kanserinden ölme riski yaklaşık %1 civarındadır (58).

Yumurtalık kanserinin yaşa özgü sıklık hızı yaşla birlikte artmaktadır. 20'li yaşlarda 2/100.000, 40-44'lü yaşlarda 15,7/100.000; en yüksek değere ise 75-79'lu yaşlarda 54/100.000'e ulaşmaktadır (59).

Güvenilir tarama araçlarının eksikliği ve hastalığın erken evrelerinde hastalığa özgü semptomların yokluğu nedeniyle yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %68'i tanı konulduğunda ileri evrededir. Prognozları hastaya, tümör biyolojisine ve uygulanan tedavilere bağlı olmakla beraber, günümüzde istenilen düzeyde değildir. Ölümcül bir kanser olup genel 5 yıllık sağ kalım oranı %31-%53 arasında değişmektedir (60).

Yumurtalık kanseri sıklığı en fazla İskandinav ülkelerinde (14.9/100.000) ve ABD de (13.3/100.000) iken en düşük Japonya'dadır (2.7/100.000). Amerika'da yumurtalık kanseri oranları en yüksek beyaz ırk kadınlarında olup (15/100.000), Afrika kökenli Amerikalı kadınlarda (10.2/100.000) orta ve kızıl derili kökenli Amerikalı kadınlarda en düşük düzeydedir (61).

#### **4.3.1. Yumurtalık Kanserinde Etkili Risk Faktörleri**

Yumurtalık kanseri hiç doğum yapmamış kadınlarda, kuzey Amerika ve Avrupa doğumlu olan, daha önce kolon, endometrium ve meme kanseri olan ve ailesinde yumurtalık kanseri geçmişi olan kadınlarda daha sık görülmektedir. Ailede hastalığın daha önceden görülme durumu, bu risk faktörleri arasındaki en önemli parametredir. Aile öyküsünde daha önceden yumurtalık kanseri olmayan kadınlarda hastalığın yaşam boyu gelişme riski %1.4'dür. Birinci derece akrabalarında yumurtalık kanseri olan olgularda bu risk %5'e, iki veya daha fazla akrabası hasta olan olgularda ise bu risk %7'ye yükselmektedir (62).

Doğurganlığın yumurtalık kanserine karşı koruyucu etkiye sahip olduğu, infertilite ve düşük paritenin yumurtalık kanseri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. En az bir çocuk sahibi olma durumu hastalık açısından koruyucu olmakla birlikte yumurtalık kanseri gelişim riskini % 0.3 - 0.4 oranında azalttığı ifade edilmektedir (63).

Yumurtalık kanseri riskini arttıran faktörler temel olarak yaş, parite ve pozitif aile hikayesinin olmasına dayanmaktadır. Kadınlarda yumurtalık kanseri vakalarının büyük bir kısmı sporadik olarak herhangi bir risk faktörü olmaksızın ortaya çıkmaktadır. Yumurtalık kanseri gelişiminde etkili risk faktörleri relatif risk değerleriyle birlikte Tablo 2'de gösterilmiştir (64,65,66).



Yumurtalık kanseri için risk faktörleri	Relatif Risk
Birinci veya ikinci derece akrabada over yumurtalık kanseri olması	5 - 7
<b>BRCA 1 veya BRCA 2 mutasyonu taşıyıcılığı</b>	<b>5 - 35</b>
Lynch II / HNKKS	6 - 7
Nulliparite	1,5 - 2
İnfertilite ve / veya fertaite ilacı kullanımı	1,5 - 2
Kuzey Avrupa / Kuzey Amerika ırkı	1,5
Beyaz ırk	1,5
Postmenapozal hormon replasman tedavisi kullanımı	1,15
Geç menapoz	1,5 - 2
Erken menarş	1 - 1,5
Artmış Ca 125 seviyesi	1,5
Sigara kullanımı	1,5

**Tablo 2:** Yumurtalık kanserinde risk faktörleri ve relatif risk değerleri

#### 4.3.2. Ailesel Yumurtalık Kanseri

Yumurtalık kanserlerinin %90'ı sporadik, %10'u ise ailesel olarak gelişmektedir. Ailesel yumurtalık kanseri, ailede birinci veya ikinci derece akrabalar arasında iki veya daha fazla sayıda yumurtalık kanseri görülmesi olarak tanımlanabilir. Yumurtalık kanseri riski, bir birinci derece akrabasında yumurtalık kanseri olan kadınlarda 3.6 kat, bir ikinci derece akrabasında yumurtalık kanseri olan kadınlarda 2.9 kat artmaktadır. Annesinde yumurtalık kanseri olan bir olguda ise bu riskin 4.3 kat arttığı belirtilmiştir (67).

Yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %5-%10'u aile öyküsünde meme kanseri, yumurtalık kanseri veya diğer adenokarsinomlar olan hastalarda görülmektedir (68). Bu hastaların çoğunda kanser riski otozomal dominant şekilde geçiş göstermektedir. Pozitif aile öyküsü olan hastalarda meme ve yumurtalık kanserinin daha sık görülmesi, bazı ailelerde otozomal dominant kalıtıma uyacak şekilde birden fazla meme ve/veya yumurtalık malignitesi izlenmesi, bu iki hastalığın temelinde ortak genetik mekanizmaların etkili olduğu düşüncesini de birlikte getirmiştir. Bu düşünceye dayalı olarak yürütülen çalışmalarda ailesel kanser yatkınlığından sorumlu, yüksek penetrasyon gösteren birkaç mutant gen tespit edilmiştir. Genel toplumda bu mutant genler tüm meme ve yumurtalık kanserlerinin %5-%10'dan sorumludur. Ailesel meme yumurtalık kanseri ile ilişkilendirilmiş en önemli genler sırasıyla; BRCA1, BRCA2, TP53 ve PTEN olarak

belirtilmektedir. Bu genler arasında BRCA1 gen mutasyonlarının ailesel yumurtalık kanseri gelişimindeki katkısı %60 olarak belirtilmiştir. ABD’de BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarının genel görülme sıklığı ortalama 800 kadında birdir. Bu oran Askenazi Yahudilerinde ve İzlandalı kadınlarda 40 kadında 1 görülme oranıyla daha fazladır (69).

Tümör baskılayıcı genler olan BRCA genlerindeki mutasyonlar, ailesel yumurtalık kanserlerinin %90’ından, tüm yumurtalık kanserlerinin ise yaklaşık % 10’undan sorumludurlar. Epitelial yumurtalık kanserlerini inceleyen 6 çalışmada yumurtalık kanserlerinin %5.7’sinin (70/1236) BRCA1 gen mutasyonları ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Epitelial yumurtalık kanserleri üzerinde yapılan benzer 4 çalışmada ise, yumurtalık kanserlerinin %3.8.inin (28/738) BRCA2 ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Bu da yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %9.5 oranında BRCA gen mutasyonları ile bağlantılı olduğu sonucunu doğrulamaktadır (70). Bu genlerdeki mutasyonlar meme kanseri riskini de büyük ölçüde artırmaktadır. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar, heterozigot taşıyıcılar için meme ve yumurtalık kanseri açısından kuvvetli predispozan faktördürler. Penetransları oldukça fazla değişkenlik gösterir. Sporadik yumurtalık kanserlerinde ise azalmış BRCA1 ekspresyonu rapor edilmiştir (71).

Ailesel yumurtalık kanseri, üç sendrom adı altında toplanmıştır. Bu sendromlar, kalıtsal meme-yumurtalık kanseri sendromu (HBOC), bölgeye özgü ailesel yumurtalık kanseri sendromu ve Lynch II sendromu olarak isimlendirilmiştir.

HBOC, görülme sıklığı en yüksek ailesel sendrom olup, çoğunlukla birinci ve ikinci derece akrabalarında pozitif aile öyküsüne sahip kadınlarda görülmektedir. Bu sendrom daha genç yaşlarda ortaya çıkmakla birlikte, BRCA1 ve/veya BRCA2 mutasyonu taşımayan hastalara göre yaklaşık 10 yıl daha erken olarak hastalarda görülür (66). Kalıtsal meme-yumurtalık sendromu tüm ailesel yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %65-%75’ini oluşturmaktadır ve çoğunluğu BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germline mutasyonlar ile ilişkilidir.

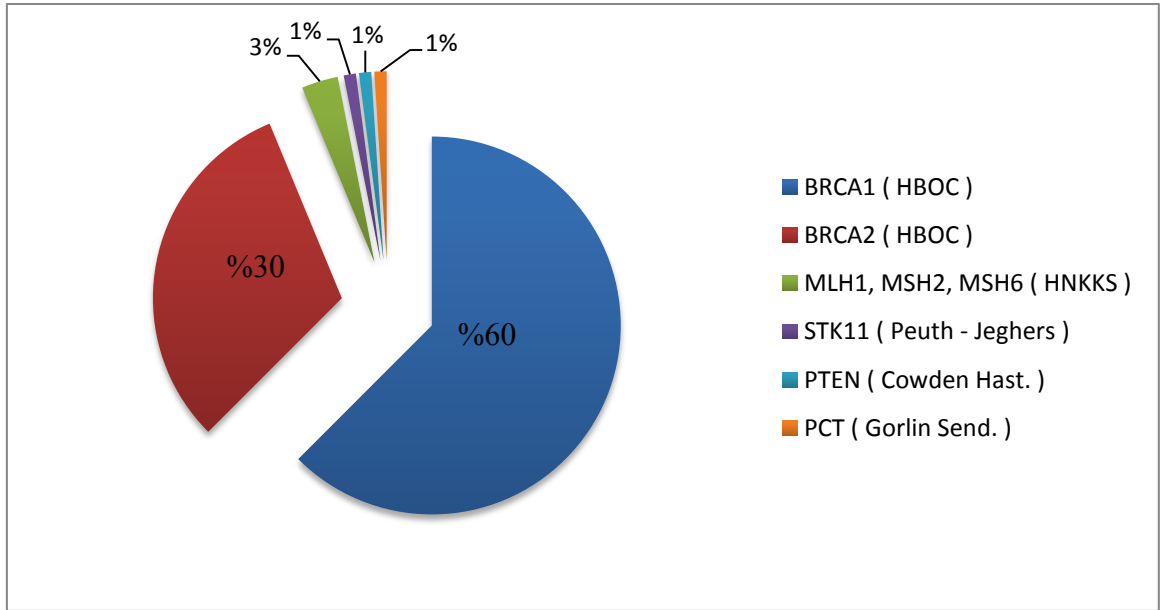
Bölge özgün yumurtalık kanseri, ailesel yumurtalık kanserlerinin %10-%15’ni oluşturmakta ve bu sendrom yalnızca erken başlangıçlı yumurtalık kanserlerinde artış olarak tanımlanmaktadır (65). Ailesel yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %90’nın bölge özgün yumurtalık kanseri ve meme-yumurtalık kanseri sendromunun bir parçası olarak BRCA gen mutasyonları ile bağlantılı olduğu ifade edilmektedir (70).

Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser sendromu (HNKKS) veya Lynch tip II olarak adlandırılan ve multiple adenokarsinomlar ile karakterize olan sendrom ise, yüksek oranda yumurtalık, endometrial ve meme kanseri, ailesel kolon kanseri, gastrointestinal sistem ve genitouriner sisteme ait malignansilerden oluşur (72). HNKKS'nun ailesel yumurtalık kanserleri içindeki payının %10-%15 oranında olduğu belirtilmektedir (65). Bu sendromun DNA yanlış eşleşme tamir enzimlerindeki (hMSH-2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 ve GTBP) mutasyonlar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (66). Bu sendromlar açısından pozitif aile öyküsüne sahip bir kadında yaşam boyu yumurtalık kanseri gelişme riski yaklaşık %12'dir ve genel popülasyona oranla 3 kat daha fazla riski ifade etmektedir (72).

Ailesel yumurtalık kanseri adı altında tanımlanan bu üç sendrom, hem maternal hem de paternal olarak otozomal dominant şekilde kalıtılmaktadır. Bu nedenle etkilenmiş bir ebeveynin çocuğunda bu genetik anormalliğin % 50 oranında görülme riski mevcuttur.

Meme Kanseri Bağlantı Konsordiyumunun raporuna göre BRCA1 mutasyonu taşıyan kadınlarda 70 yaşında kümülatif yumurtalık kanseri gelişmesi riski %44-%63 iken, BRCA2 mutasyonu kadınlarda 70 yaşında kümülatif yumurtalık kanseri gelişmesi riski % 27 olarak belirtilmektedir (73).

Ailesel yumurtalık kanseri sendromuna neden olan gen mutasyonları Şekil 3'te sunulmuştur.



**Şekil 3:** Ailesel yumurtalık kanser gelişimine neden olan gen mutasyonları (65,66,72)

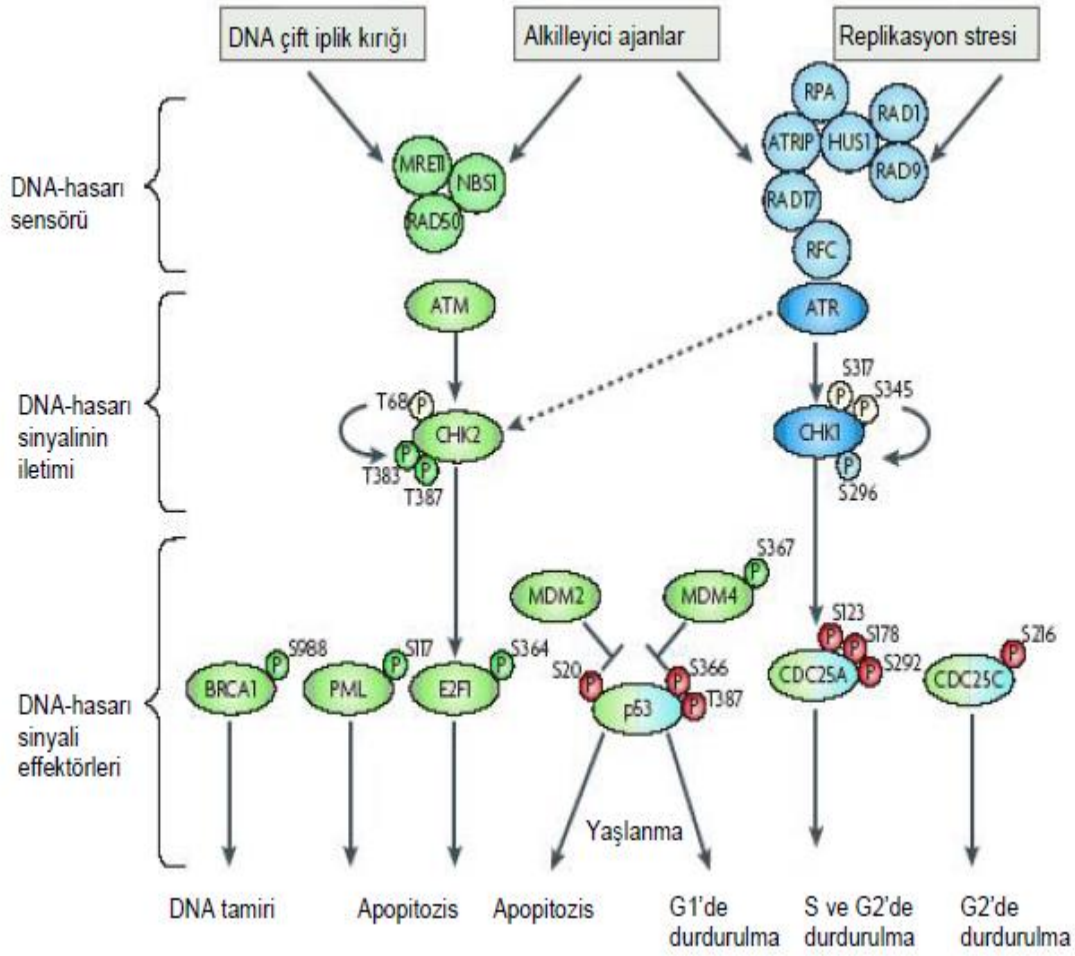
#### 4.4. BRCA GENLERİ ve MUTASYONLARI

BRCA genleri, DNA sentezinde transkripsiyonel düzenlenmeden sorumlu multiprotein komplekslerinin sentezi ve DNA'da meydana gelen, özellikle çift sarmal kırıkları ile bazı DNA hasarlarının fark edilmesi ve tamir edilmesinde görevli bakıcı tipi tümör baskılayıcı genlerdir. BRCA genlerinin işlevlerini kaybetmesi, hücrede DNA onarım mekanizmasının bozulmasına ve p53 bağımlı DNA yıkım noktasının aktive olarak hücrenin apoptozisinin durmasına neden olmaktadır. BRCA mutasyonlarının aktarımında kalıtsal ve çevresel etkenlerin rol oynadığı kabul edilmektedir.

BRCA genlerindeki işlevsel eksiklikler, BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germline mutasyonlarla ilişkilidir. DNA tamirinde görevli olan BRCA genlerindeki mutasyonlar, DNA sentezinde bozukluklarla sonuçlanmaktadır. İşlevsiz BRCA proteinleri ile sonuçlanan bu mutasyonların, %80-%90'ını anlamsız ya da çerçeve kayması mutasyonları oluşturmaktadır (74).

Kromozom 17q21'e yerleşik BRCA1 geni 1863 amino asitlik, kromozom 13q12' de lokalize BRCA2 geni ise 3418 aminoasitlik bir proteini kodlar. BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan proteinler ile hücre döngüsünün kontrol noktalarındaki önemli proteinler ve DNA rekombinasyonunda iş gören proteinlerle yakın ilişkileri gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar BRCA proteinlerinin inaktivasyonu ile birlikte diğer genom koruyucu rolü olan proteinlerinde inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürmektedirler (75,76).

HücreSEL metabolizma sonucu oluşan reaktif oksijen türevleri ve replikasyon hatalarına ek olarak, mor ötesi ışınlar (UV) , iyonize radyasyon ve genotoksik kimyasallar gibi çevresel mutajenler DNA'da hasarlara neden olmaktadır (77,78). DNA hasarları, kontrol noktalarında bulunan DNA hasarlarını algılayıcı sensör proteinler tarafından algılanarak, DNA hasarına ilişkin sinyal, aracı proteinler ile iletim proteinlerine aktarılır. İletim proteinlerinden, efektör proteinlere aktarılan DNA hasar sinyali hücrede bir dizi biyokimyasal işleme neden olur. Bu işlemler sonucunda hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamiri veya apoptozis gerçekleşir (Şekil 4) (79).



**Şekil 4:** DNA hasarı kontrol noktası yolağının şematik gösterimi (79)

CHEK2 proteini bir serin/treonin kinaz olup DNA hasarı kontrol noktası yolağında bulunan bir iletim proteinidir (78). CHEK2 proteinin, BRCA1 proteininin serin 988 (S988) aminoasitini fosforile etmesi sonucu DNA tamiri başlar (Şekil 4). CHEK2 proteini aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olan FOXM1 (forkhead box M1)'i fosforile ederek, stabilitesini artırır. FOXM1 transkripsiyon faktörü ise, homolog rekombinasyon DNA tamir mekanizmasında görevli olan BRCA2 ve baz (kesip-çıkarma) tamir mekanizmasında görev alan XRCC1 (X-ray repair cross complementing protein 1) genlerinin ekspresyonlarını artırır (80,81).

Otozomal dominant şekilde kalıtılarak ailesel meme-yumurtalık kanserine neden olan BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonların bunun yanı sıra kolon kanseri riskini, erkekte prostat kanser riskini artırdığı tespit edilmiştir. BRCA2 genindeki mutasyonların

BRCA1'den farklı olarak pankreas kanser geliştirme riskine (82) ve erkekte erken dönem meme kanseri geliştirme riskine sahip olduğu da belirtilmiştir (83).

Tüm meme kanseri vakalarının %3-%5'inde BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu saptandığı halde, bu oran 40 yaş altında meme kanseri tanısı alan olgularda %10, ailesel meme kanseri vakalarında ise %75'tir. BRCA1 mutasyonu yaşam boyunca %85 oranında meme kanseri geliştirme potansiyeline sahiptir. Bu risk, 40 yaşından sonra %20, 50 yaşından sonra %51, 70 yaşından sonra ise % 85 olarak belirtilmektedir. Yumurtalık kanserinde BRCA1 mutasyonu için ise bu oran 70 yaşından sonra %40-%50 arasındadır. BRCA2 mutasyonu ise daha geç yaşta da olsa yaşam boyu % 85 meme kanseri geliştirme riskine sahiptir. BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında, 50 yaşından sonra %35, 70 yaşından sonra %84 oranında meme kanseri, 50 yaşından sonra %0.4, 70 yaşından sonra ise %27 oranlarında yumurtalık kanseri gelişimi bildirilmiştir (84).

<b>Mutant Gen</b>	<b>Bölge</b>	<b>Kanser Riski</b>
<b>BRCA 1</b>	Yumurtalık	% 16-44 ( 70 yaş )
	Meme	% 56 - 87 ( 70 yaş )
		% 33 - 50 ( 50 yaş )
	Kontrolateral Meme	% 64 ( 70 yaş )
		% 25 ( 5 yıl içerisinde )
	Kolon	3.3 kat risk artışı
Prostat	3 kat risk artışı	
<b>BRCA 2</b>	Yumurtalık	% 27 ( 70 yaş )
	Meme	% 56 - 87 ( 70 yaş )
		% 33 - 50 ( 50 yaş )
	Kontrolateral Meme	% 64 ( 70 yaş )
		% 25 ( 5 yıl içerisinde )
	Prostat	3 kat risk artışı
	Erkek Meme	% 6
Pankreas	Artmış	

**Tablo 3:** BRCA mutasyon taşıyıcılarında belirli yaşlarda kanser riski öngörülere (85)

Bugüne kadar BRCA1 geni için 850, BRCA2 geni için ise 750'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyonlardaki pleomorfizm nedeniyle, belirli bir mutasyon kalıbı için risk hesaplamaları oldukça güçtür (70). Çeşitli mutasyon tiplerine rağmen bu genlerdeki germ soyu mutasyonların çoğunluğu tek tiptir ve bazı mutasyonların topluma ve etnik kökene özgü olduğu da gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2'nin güçlü bir atasal mutasyon etkisine sahip toplumlarda, aynı tip mutant alleller daha yüksek sıklıkta tayin edilmiştir. Ashkenazi Yahudilerinde, BRCA1 geninde 185delAG ile 5382insC ve BRCA2 geninde 6174delT olmak üzere üç ortak atasal mutasyon saptanmıştır (86).

#### **4.4.1. BRCA1 Geni**

BRCA1 geni (OMIM: 113705; GDB: 126611; Genbank: U14680), 17q21'e yerleşik ve 24 ekzondan oluşan (22 kodlama ekzonu, alternatif 5'UTR ekzonları, 1a ve 1b) bir tümör baskılayıcı gendir. İlk olarak 1994 yılında Miki ve ark. tarafından kalıtsal meme kanserlerinden sorumlu gen olarak tanımlanmıştır (87).

BRCA1 geni, DNA tamiri, hücre döngüsü kontrol noktaları, protein ubiquitinasyonu ve kromatin oluşumunda görev alan 1863 aminoasitlik multifonksiyonel bir proteini kodlar. Yirmi dört ekzonlu bu gen, tümör oluşumunun baskılanmasında ve DNA tamirinde görevli olmakla birlikte, genomik DNA'nın 100kb'lık bölümünü oluşturur. BRCA1 geninin ekzon 11'i (3.4 kb), 1863 aminoasitlik proteinin % 61'ini kodlar (88).

##### **4.4.1.1. BRCA1 Proteini**

BRCA1 geninin ürünü olan 220 kilodalton'luk (kDa) BRCA1 proteini, hücrenin nükleusunda fosforile durumda bulunmaktadır (87). BRCA1 proteininin ekspresyonu ve fosforilasyonu, hücre döngüsünün S fazına girerken artar ve mitoz sırasında en yüksek seviyeye ulaşır. BRCA1 ekspresyonu ubiquitinasyon yoluyla ve proteazoma bağlı yıkımla azalır.

BRCA1 proteini, N terminalinde yaklaşık 100 aminoasitlik özel bir RING bölgesi ve C terminalinde yaklaşık 90 aminoasitlik BRCT tekrar bölgesi içermektedir (Şekil 5). BRCA1 proteinin N terminal ve C terminalinde bulunan bu iki fonksiyonel bölge, tümör baskılayıcı özelliğe sahip olmaları sebebiyle oldukça öneme sahiptir (89).



**Şekil 5:** BRCA1 Proteini (90)

BRCA1 proteinin N terminal bölgesinde bulunan RING bölgesi, sistein ve histidin rezidüleri içeren çinko parmak (zinc finger) dizisinden oluşur. Bu bölgenin DNA ile etkileşimde olduğu ve heterokromatin korunması, spermatogenez ile ilgili işlevlere sahip olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (91).

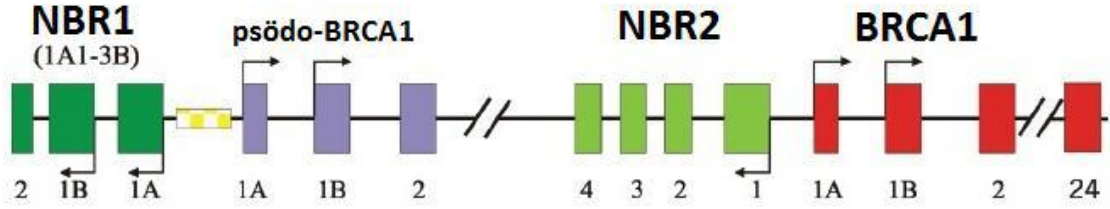
BRCA1 proteininin C terminaline bitişik bulunan BRCT bölgesi, DNA hasar cevabında integral sinyal modülüdür. BRCT bölgesinin fosfopeptid bağlanma bölgesi olmasının yanı sıra fosforilasyondan bağımsız olarak protein etkileşimleri, poli (ADP riboz) bağlanma ve DNA bağlanma görevleri mevcuttur (92).

BRCA1'in BRCT bölgesindeki mutasyonlar ve polimorfizmler, transkripsiyonel aktivasyonun yitirilerek RNA polimeraz II bağlama yeteneğinin kaybedilmesine neden olmaktadır (92,93).

#### **4.4.1.2. BRCA1 Gen Lokusu**

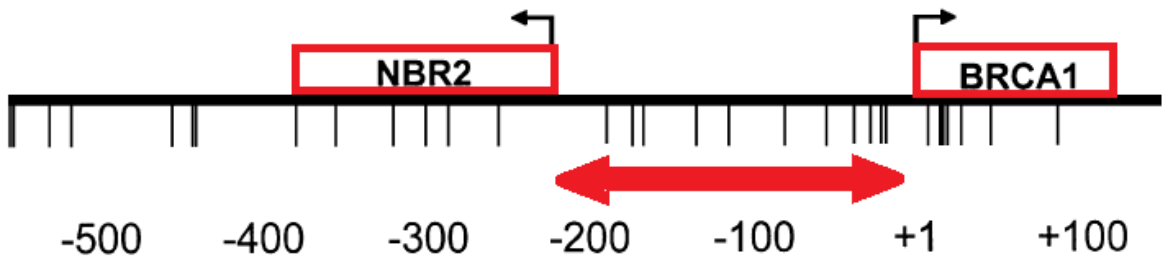
BRCA1 lokusu, bir psödo-BRCA1 geni ve iki ayrı geni (NBR1 ve NBR2) oluşturan parsiyel duplikasyonlar içermektedir (Şekil 6) (94). BRCA1 ve NBR2 genleri 200 baz çiftlik bir farkla birbirlerinden ayrılırlar. Bu bölge, majör meme-spesifik transkripsiyon başlama bölgesi için promotördür ve BRCA1'in 1A ekzonunun içinde yer alır (95). Bazı çalışmalar BRCA1 ve NBR2 genlerinin resiprokal olarak düzenlendiğini ve bazı hücre serilerinde NBR2'nin ekspresyon seviyesinin yüksekliğinin, BRCA1 seviyesinin düşüklüğü ile birlikte gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Bu durumun, bu iki promotörün RNA polimeraz II için yarış halinde olmasından kaynaklandığı ve NBR2'nin aktivasyonunun, düşük BRCA1 ekspresyonuna neden olduğu ifade edilmektedir. (94).





**Şekil 6:** BRCA1 Geni Lokusu (94)

BRCA1 promotorunde başlangıç noktasının 200 baz çifti yukarısında olası bir ‘upstream baskılayıcı element’ ve bir pozitif element tespit edilmiştir (Şekil 7) (96). Bu bölgenin hem BRCA1 hem de NBR2 yönünde direkt ekspresyon yapabilme yeteneğine sahip olduğu ve çift taraflı transkripsiyon elementi gibi işlev gösterdiği belirtilmiştir (97).



**Şekil 7:** BRCA1 Promotor Bölgesi (96)

#### 4.4.1.3. BRCA1’in İşlevi

BRCA1 proteini, embriyonik gelişme ve ergenlik gelişim döneminde gelişen organların farklılaşan epitel hücrelerinde yapılmaktadır. Birçok işlevsel bölgeye sahip olan BRCA1 proteini, çeşitli dokularda hücre büyümesinin kontrolünde ve nükleer fonksiyonlarda görevlidir (90).

BRCA1 proteini, DNA’da X-ray ışınları ve iyonize radyasyon gibi çevresel mutajenler sonucu meydana gelebilen çift zincir kırıklarının homolog tamirinde ve genotoksik homolog olmayan son birleşme (Non-Homologous End-Joining, NHEJ) tamir

yolağında rol alır. DNA'daki çift zincir kırıkları, doğal radyasyon ve diğer birçok mutajenik ajana bağlı olarak ortaya çıkabilmekle birlikte, kromozomlarda homolog rekombinasyon gibi genetik materyal değişimlerinin olduğu süreçlerde de ortaya çıkabilir.

Rekombinasyonel tamir, hasarlı DNA'nın hasarsız bir moleküle rekombinasyonu ile gerçekleşir. Bu yöntem, DNA replikasyonu sırasında karşılaşılan ve normal replikatif DNA polimerazlar ile kopyalanamayan bir replikasyon çatalının ilerlemesini bloke eden, timin dimerlerinin veya çift DNA kırıklarının bulunduğu hasarların onarımında sıklıkla kullanılır. BRCA1 proteini, diğer tümör baskılayıcı özellikteki proteinler, DNA hasarının tespitinde görev alan sensörler ve sinyal dönüştürücülerle etkileşerek BASC (BRCA1 associated genom surveillance complex) adı verilen BRCA1 ilişkili genom gözetim kompleksini oluşturur. DNA hasarı meydana geldiğinde BASC kompleksi, BRCA1 proteinin C terminaline bitişik şekilde bulunan BRCT bölgesine bağlanır ve DNA tamir edici diğer protein ve enzimler için liman görevi görür. DNA tamir işlemi gerçekleştikten sonra BASC kompleksi BRCT bölgesinden ayrılır (92,93). BRCA1 proteinine bağlı homolog tamir işlevinin eksikliğinde kromozomlarda duplikasyonlar, delesyonlar, insersiyonlar ve translokasyonlar meydana gelmektedir (90).

Kalıtsal meme ve yumurtalık kanserinden sorumlu olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinin kodladığı proteinlerin, homolog rekombinasyon tamir yöntemi ile çift iplik kırıkların onarımında görevli olmaları, bu genlerde meydana gelen mutasyonların DNA onarımındaki bozukluğa sebep olması sonucu, kadınlarda en yaygın görülen meme ve yumurtalık kanserlerinden birinin gelişimine yol açtığını göstermektedir (90,98).

BRCA1 genom bütünlüğünün korunması için gerekli olması nedeniyle 'bakıcı tipi' tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılmıştır. Aminoasit dizisinin C terminali (BRCT) transkripsiyonu aktive edebilir ve DNA hasarından sonra hücre döngüsünün durmasında görevli genlerin transkripsiyonunu düzenler (99). BRCA1'in bilinen diğer bazı fonksiyonları arasında transkripsiyon, hücre döngüsü kontrolü, protein ubiquitinasyonu ve kromatin yeniden düzenlenmesindeki rolleri yer almaktadır (100,101).

BRCA 1 geni büyük bir gen olduğu için mutasyon oluşma sıklığı oldukça yüksek bir genidir (39,102). Bu gen üzerinde klinik olarak önemli birkaç mutasyon bulunmuştur. Bu mutasyonların yaklaşık %80-%90'nını çerçeve kayması ya da anlamsız mutasyonlar oluştururken (102) geri kalanı stop kodonunda değişiklik sonucu meydana gelen mutasyonlardır (39,102,103).

#### **4.4.2.BRCA 2 Geni**

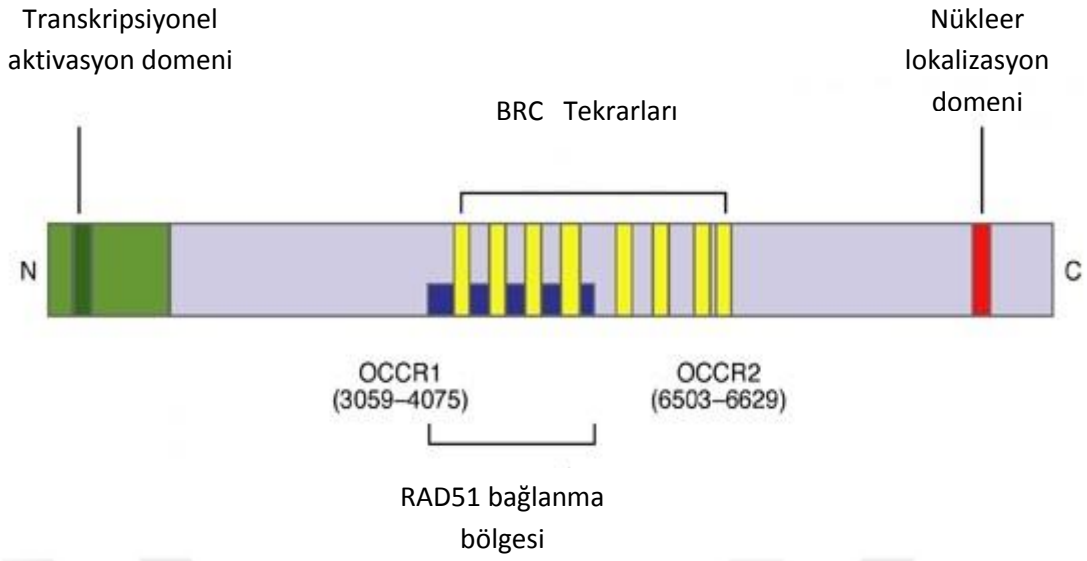
BRCA2 geni, (OMIM: 600185; GDB: 387848; Genbank: U43746), 1994 yılında Wooster ve ark. tarafından, 13. kromozomun uzun koluna lokalize (13q12.3) olarak bulunmuş DNA tamirinde görevli bir tümör baskılayıcı gendir. BRCA2 genini içeren 13q12.3 bölgesi aynı zamanda retinoblastoma genine yakın bir bölgedir. BRCA2 geni 27 ekzona sahip 10.2 kb'lık bir gen olup, genin ürünü olan BRCA2 proteini 3418 aminoasitten oluşan bir proteindir. Üç ekzonunun transkripsiyon faktörleriyle benzerlik göstermesi, bu yönde bir fonksiyonu olabileceğini göstermektedir (104,105). DNA zincir kırılmalarının onarımı, transkripsiyon düzenlenmesi, hücre döngüsünün kontrolü gibi işlevlere sahiptir (106).

BRCA2 geni de, BRCA1 gibi büyük bir 11.ekzona sahiptir ve bu ekzon BRCA2 geninin yaklaşık %58'ini oluşturmaktadır (107). BRCA2 genindeki ekzon 11, BRCA2 proteinindeki sekiz 'BRC' tekrarından oluşan yapısal bir motifi kodlamaktadır. BRC tekrarları olarak adlandırılan bu motifinde, DNA tamir yolağında rol oynayan bir rekombinaz enzim olan RAD51 fonksiyonunu kontrol ettiği bilinmektedir (108).

##### **4.4.2.1. BRCA2 Proteini ve İşlevi**

BRCA2 proteini iki işlevsel domain içeren, 3418 aminoasitten oluşan (Şekil 8) 350-380 kDa'lık bir proteindir. BRCA2'nin karboksi terminal ucu iki nükleer lokalizasyon domenini (NLS) içerir (101).

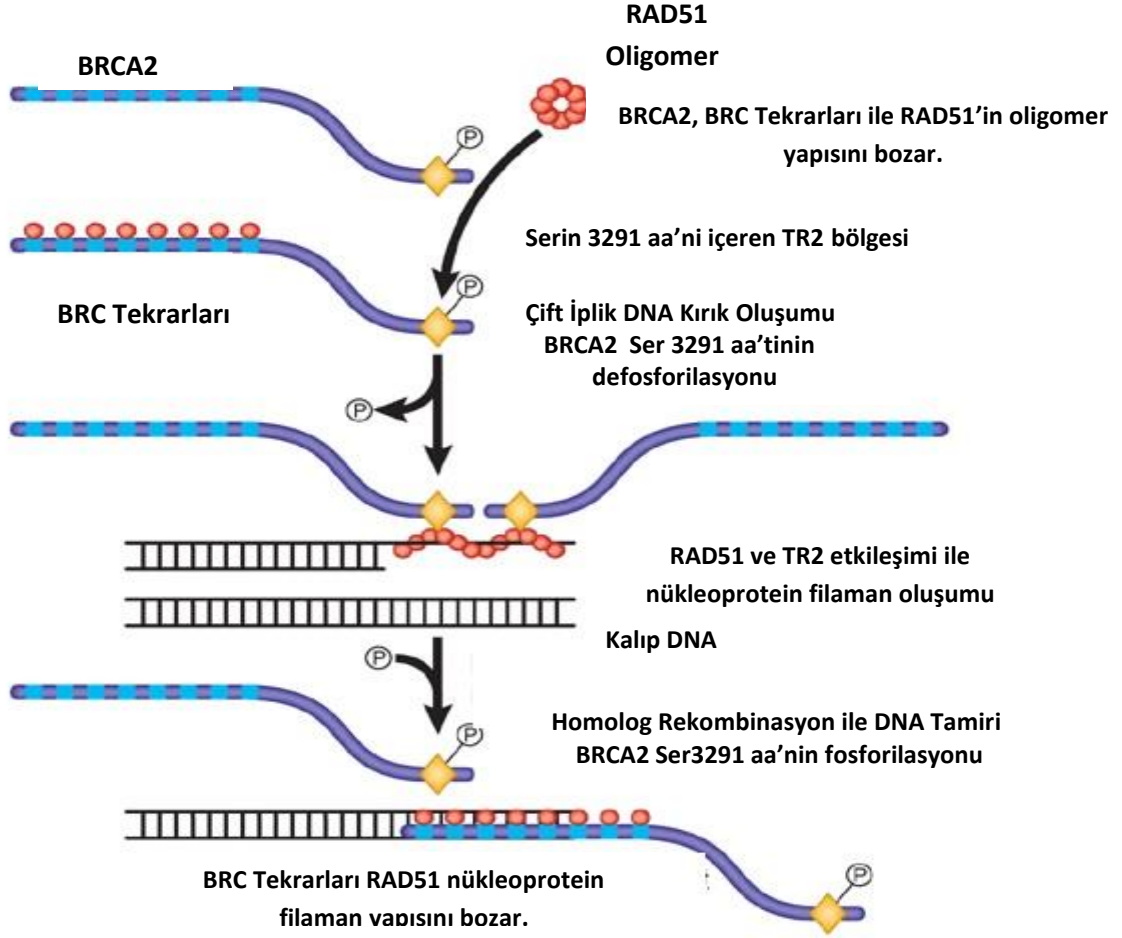
BRCA2 proteini, normal hücrelerde özellikle hücre döngüsünün geç-G1/erken-S fazında eksprese edilen nükleer bir protein (109) olmakla birlikte, yüksek oranda meme ve timusta olmak üzere geniş bir dizi insan dokusunda, daha az oranda ise akciğer, dalak ve yumurtalıkta bulunmaktadır (105).



**Şekil 8:** BRCA2 Proteini Kapsamındaki Özelleşmiş Bölgeler (110)

BRCA proteinlerinin kendileri çok kompleks olmaktan ziyade fonksiyonları karmaşık olarak bilinmektedir. BRCA2'nin en iyi bilinen işlevi, homolog rekombinasyondaki görevidir (101).

BRCA1 ve BRCA2 genlerinin ürünü olan proteinler, DNA hasarını takiben RAD51 ile beraber S fazında subnükleer fokusta birlikte bulunurlar. RAD51, çift sarmal DNA kırıklarının tamirinde ve homolog rekombinasyonunda yer alan BRCA2 ile interaksiyon halinde olan anahtar bir proteindir (111).



**Şekil 9:** BRCA2 geninin DNA tamirindeki işlevi (112)

BRCA2 gen mutasyonları BRCA1 geninde görülen mutasyonlara benzer şekilde meme ve yumurtalık kanseri riskini artırır. Ancak BRCA2 genindeki mutasyonlar, BRCA1'e göre yumurtalık kanseri gelişiminde daha düşük riske sahiptir. Erkek olgularda görülen meme kanserlerinde BRCA2 gen mutasyonlarının rolü olduğu gösterilmiştir (113).

BRCA2 gen mutasyonları yaşam boyunca % 85 meme kanseri geliştirme riskine sahiptir. BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında, 50 yaşından sonra % 28, 70 yaşından sonra % 84 oranında meme kanseri, 50 yaşından sonra % 0.4, 70 yaşından sonra ise % 27 oranlarında yumurtalık kanser gelişimi bildirilmiştir (84). Bu gende germline mutasyon taşıyanlarda meme kanseri, yumurtalık kanseri riskinden daha fazla olmakla birlikte sporadik meme ve yumurtalık kanserli hastalarda %30-40 oranında heterozigotluk kaybı görülmektedir (103).

### 4.4.3. Geliştirilen Ürün Prototipi Kapsamında Taranacak Mutasyonlar

#### 4.4.3.1. BRCA1 185delAG Mutasyonu

185delAG mutasyonu (rs80357713) (c.66\_67delAG), BRCA1 geninin ekzon 2 bölgesi 185. pozisyonundaki adenin guanin (AG) dizisindeki delesyonları ifade eder. AG dizisindeki mutasyonların çok fazla görülmesi bu bölgenin 'Hotspot' bölge olarak adlandırılmasına neden olmuştur. Tüm kadınlarda germline mutasyon araştırmalarında 185delAG taşıyıcılarında 40 yaşından önce meme kanseri görülme sıklığı %20 olarak bulunmuştur (39).

BRCA1 geninde en sık görülen mutasyonlar, 185delAG ve 5382insC mutasyonlarıdır. Bu iki mutasyon BRCA1 geninde görülen tüm mutasyonların %10'nunu oluşturmaktadır. Bu mutasyonlar Ashkenazi ve Ashkenazi olmayan yahudilerde yaklaşık % 10 sıklıkta görülmektedir. Bu mutasyonların aynı gruptaki taşıyıcılık oranı ise %1'dir. 185delAG ve 5382insC mutasyonlarının Faslı ve Yahudi olmayan ailelerde de bulunduğu gösterilmiştir (39).

Mısırdaki meme kanserli kadınlarda yapılan bir çalışmada, BRCA1 185delAG mutasyonunun frekansı, hastalar arasında %10 olarak saptanmıştır. 40 yaş altındaki erken başlangıç gösteren hastaların % 8'i ve 40 yaş üzerindeki hastaların %13,5'u mutasyon bakımından heterozigottur. Tek taraflı meme kanserli hastaların %3'ü, çift taraflı meme kanserli hastaların %40'ı ve ailesel meme/yumurtalık kanserli hastaların %50'sinin mutasyonu taşıdığı belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında, ailesel meme/yumurtalık kanserli ve çift taraflı meme kanserli hastaların, tek taraflı meme kanserli hastalara göre BRCA1 185delAG mutasyonu bulundurmaya daha yatkın oldukları ön görülmüştür (114).

Amerika'daki İspanyol kökenli kadınlarda BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon taramasının yapıldığı bir çalışmada, 14'ünün kalıtsal meme kanseri olduğu ve toplam vakaların %18'i olan 78 kadında mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlar arasında en sık görülen mutasyon 4 farklı ailede görülme penetransıyla BRCA1 genindeki 185delAG mutasyonu olarak ifade edilmiştir (115).

Kuzey Kaliforniya da John ve arkadaşlarının 393 meme kanserli İspanyol kadın ile yaptığı bir başka çalışmada, 65 yaş öncesi 21 kadında (%5.3), BRCA1 mutasyonu

bulunduğu saptanmıştır. 21 vakanın 5'inde görülen BRCA1 mutasyonunun 185delAG olduğu belirtilmiştir (116).

Wietzel ve arkadaşları, Los Angeles' da 34'ü mutasyon taşıyıcı olan 110 Latin kadın ile çalışmışlardır. 34'ü mutasyon taşıyıcı kadınların 18'inin Meksika kökenli olduğu ve bu Meksika kökenli kadınlarda 4 mutasyonun birden çok görüldüğü tespit edilmiştir. BRCA1 185delAG ( 4 kez ), BRCA1 R1443X ( 3 kez ), 2552delC ( 2 kez ), 3492insT ( 2 kez ) saptanmış ve bu 4 mutasyon daha sonra Meksika kökenli mutasyonlar olarak rapor edilmiştir (117).

#### **4.4.3.2. BRCA1 5382insC Mutasyonu**

BRCA1 5382insC mutasyonu (rs80357906) ( c.5263\_5264insC ), dünyada en sık rastlanan mutasyon olup, Askhenazi müsevilerinde ve Slav kökenli bayanlarda bulunmaktadır. Haplotip analizleri de bu mutasyonun yaygın Avrupa kökenli bir mutasyon olduğunu onaylamaktadır (118).

Türkiye'nin batısındaki populasyonda, kuvvetli aile öyküsü olan olgularda BRCA1 ve BRCA2 germline mutasyonlarını saptamaya yönelik yapılan bir çalışmada, BRCA1 5382insC mutasyonunun Türk hasta populasyonu için dominant bir penetrans gösterdiği belirtilmiştir (119). 2000 yılında Türkiye'de meme ve yumurtalık kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada, 5382insC mutasyonunun Türk toplumu için kurucu mutasyon olarak değerlendirilebileceği ifade edilmiştir (120).

Brezilya popülasyonunda birbirinden bağımsız 402 meme kanserli hastada BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taraması yapılan çalışmada, 6'sı BRCA1 geninde ve 3'ü BRCA2 geninde olmak üzere toplam 9 mutasyon, %2.3 oranında saptanmıştır. BRCA1 5382insC mutasyonunun populasyonda en sık görülen mutasyon olduğu ve saptanan tüm mutasyonların %56'sını oluşturduğu ifade edilmiştir (118).

#### **4.4.3.3. BRCA2 6174delT Mutasyonu**

Yüksek riskli aile ağaçlarında, BRCA mutasyonlarını bulunduran kadınlar hayatları boyunca %80-90 meme kanseri ve %40-%50 yumurtalık kanseri riski taşımaktadır (121). Meme kanseri ve yumurtalık kanseri vakalarını barındıran bir kaç Askhenazi Yahudi ailede

BRCA1 185delAG çerçeve kayması mutasyonun bulunmasını takiben, bu mutasyonun frekansının %0.9 olduğu bulunmuştur (122). BRCA2 6174delT mutasyonu (rs80359550) (c.5946delT) ise, Askanezi Yahudilerinde %1 sıklığa sahiptir (123).

Antoniou ve arkadaşlarının 22 popülasyonu baz alarak BRCA1 185delAG, 5382insC ve BRCA2 6174delT mutasyon taşıyıcılığının, meme ve yumurtalık kanseri gelişim riskine etkisini değerlendirdikleri sonuçlar Tablo 5'te gösterilmiştir. Bu çalışmada BRCA1 185delAG, 5382insC ve BRCA2 6174delT mutasyon taşıyıcılığının 70 yaşında ön görülen meme kanseri gelişim risk oranları sırasıyla; %64 (34-80) , %67 ( 36-83) , %43 ( 14-62) olarak ifade edilirken, bu oranlar yumurtalık kanseri için sırasıyla %14 ( 2- 24) , %33 ( 8-50) ve %20 ( 2-35) olarak belirtilmektedir (124).

Yaş	185delAG		5382insC		6174delT	
	Meme Kanseri	Yumurtalık Kanseri	Meme Kanseri	Yumurtalık Kanseri	Meme Kanseri	Yumurtalık Kanseri
40	% 10 (3 - 18)	% 3 (0-7)	% 14 (5-23)	% 2 (0-5)	%7 (0-14)	0
50	% 27 (13-38)	% 11 (2-19)	% 46 (29-59)	% 17 (4-28)	% 8 (0-16)	% 2 (0-7)
60	% 47 (26-62)	% 14 (2-24)	% 57 (35-72)	% 32 (8-50)	% 16 (1-28)	% 15 (1-28)
70	% 64 (34-80)	% 14 (2-24)	% 67 (36-83)	% 33 (8-50)	% 43 (14-62)	% 20 (2-35)

**Tablo 5:** 185delAG, 5382insC ve 6174delT mutasyon taşıyıcılarının yaş aralıklarına göre ön görülen meme ve yumurtalık kanseri kümülatif risk değerleri (124)

#### 4.4.4. Geliştirilen Ürün Prototipi Kapsamındaki Yenilikler

Günümüzde meme ve yumurtalık kanser riskini büyük ölçüde artırdığı bilinen BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonların analizi, çoğunlukla bu iki genin tamamının dizilenmesi stratejisine dayanmaktadır. Ülkemizde hastaneler ve özel laboratuvarlarda, meme ve yumurtalık kanseri taramalarında öncelikle BRCA1 ve BRCA2 genleri olmak üzere beraberinde PTEN, CHEK, PALB2, BRIP1, BARD1, CDH1, ATM, RAD50, MRE11A, NBN, RAD51C, TP53, STK11 gen analizleri de yapılmaktadır. Bu kapsamda özel hastaneler ve laboratuvarlarda tüm gen analiz hizmetleri 2-4 ay arası bir süre zarfında gerçekleştirilmektedir.

Ürün prototipinin geliştirilmesi ile hastalar dışında genel popülasyonda da görülme sıklığı yüksek olan BRCA1 185delAG ve 5382insC ile BRCA2 6174delT ve ülkemizdeki



hastaların taranması sonucunda sık olduğu bildirilen V2466A mutasyonunun kısa sürede tespiti mümkün kılınmıştır. Bu prototipten oluşacak ürün, tarama amaçlı kullanılabilir. Kullanıcılar bu 4 mutasyonun saptanmadığı durumda, önceki gibi DNA Dizileme yöntemi ile analize devam edebilirler. Mutasyon saptanması halinde, tüm genin DNA Dizileme yöntemi ile incelenmesi yöntemine kıyasla analiz süresi yaklaşık 90 günden 2 saate inmektedir. Böylece bahsi edilen bölgelerde meme ve yumurtalık kanser riskinin büyük ölçüde artmasından sorumlu olan ve sık saptanan BRCA mutasyonları taranmış olacaktır.



## **5. MATERİYAL ve YÖNTEM**

### **5.1. KONTROL GRUBU**

Bu çalışmada, BRCA1 185delAG ve 5382insC mutasyonları ile BRCA2 6174delT ve V2466A mutasyonlarının pozitif kontrolleri olarak yabancı tip ve mutant alleller için homozigot genotipe sahip sentetik DNA'lar tasarlandı. Bu amaçla, belirtilen mutasyonlara ait primerler tasarlanarak, bu primerlerin oluşturduğu PZR ürünleri NCBI veri tabanından kontrol edildi. Mutasyonlara özgü ileri ve geri primerlerin nonspesifik amplifikasyon oluşturmadığı NCBI veri tabanından kontrol edildikten sonra, mutasyonlar için homozigot genotipteki 8 adet sentetik DNA'yı içeren plazmidler, GENEWIZ, Inc firmasına sipariş edilerek temin edildi.

Çalışmada kullanılacak, her mutasyona özgü heterozigot genotipteki DNA'lar, yabancı tip ve mutant alleller için tasarlanan homozigot genotipteki sentetik DNA'ların 1/1 oranında karıştırılmasıyla elde edildi.

### **5.2. YÖNTEM**

#### **5.2.1. Primerlerin Tasarımı**

BRCA1 185delAG ve 5382insC mutasyonları ile BRCA2 6174delT ve V2466A mutasyonlarına özgü ileri ve geri primerler gerekli literatür taramaları yapıldıktan sonra Primer Express2.0 programı kullanılarak tasarlandı. Her bir mutasyon için yabancı tip ve mutant allele özgü olmak üzere toplamda 12 primer hazırlandı.

Liyofilize halde ve 0.04 µmol (mikromol) sentez skalasında ticari olarak satın alınan primerler (TAG Copenhagen A/S) 100 pmol (pikomol) /µl hacimde olacak şekilde konsantrasyon miktarlarına göre, PZR için uygun saflıktaki steril bidistile su eklenerek çözüldü. Elde edilen stok primerlerden 10pmol olacak şekilde primerler tekrar sulandırılarak, - 20 °C' de PZR uygulanıncaya dek muhafaza edildi.

BRCA1 ekzon 2 185delAG ve ekzon 20 5382insC mutasyonları ile BRCA2 ekzon 11 6174delT ve ekzon 14 V2466A mutasyonları için kullanılan primerler Tablo 6 'da gösterilmiştir.

<b>PRİMER ADI</b>	<b>PRİMER DİZİSİ</b>	<b>ÇOĞALTILAN GEN BÖLGESİNİN UZUNLUĞU (bç)</b>	<b>PRİMERİN BAZ SAYISI</b>
185delAG İleri Primeri (GENEL)	5'-GAT TTA TCT GCT CTT CC-3'	80/80bç	18
185delAG Yabancı Tip Geri Primeri	5'- CAG ATG GGA CAC TCA-3'	80bç	15
185delAG Mutant Geri Primeri	5'-CAG ATG GGA CAC TAT-3'	80bç	15
5382insC Yabancı Tip İleri Primeri	5'-GCG AGC AAG AGA ATG GCT-3'	430bç	18
5382insC Mutant İleri Primeri	5'- GCG AGC AAG AGA ATC AGC T-3'	430bç	19
5382insC Geri Primeri (GENEL)	5'-CCA TGG AGT GAG ACT CCC-3'	430/430bç	18
6174delT Yabancı Tip İleri Primeri	5'- TGG GAT TTT TAG CAC AGC GGG A-3'	200bç	22

6174delT Geri Primeri (GENEL)	5'- TTT GGG ATA TTA AAT GTT CTG GAG A-3'	200/200 bç	26
V2466A Yabanıl Tip İleri Primeri	5'- AAA ACA ACT CCA ATC AAG GCG A-3'	245 bç	22
V2466A Mutant İleri Primeri	5'- AAA ACA AGT CCA ATC AAG GCG G-3'	245 bç	22
V2466A Geri Primeri (GENEL)	5'- CTG CTG CTT TCA GAG AGA TTG-3'	245 /245 bç	21

**Tablo 6:** Multipleks PZR'da Kullanılan Primerler

### 5.2.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multipleks PZR)

Mutasyonlara özgü pozitif kontrol olarak tasarlanan homozigot genotipteki sentetik DNA'ların belirtilen oranlarda karıştırılmasıyla elde edilen heterozigot genotipteki DNA'ların, yabanıl tip ve mutant alleller için farklı PZR tüplerinde olmak üzere, tasarlanan tüm primerlerle bir arada olacak şekilde GeneAmp<sup>R</sup> PCR System 9700 (ABI, Applied Biosystems, ABD) cihazında multipleks PZR'ı gerçekleştirildi.

#### 5.2.2.1. PZR Bileşenleri

Homozigot ve heterozigot DNA'ların tümünün ayrı ayrı kalıp olarak kullanıldığı, yabanıl tip ve mutant allellere özgü primerleri ayrı ayrı içeren standart 20µl'lik PZR karışımları, 0.2 ml'lik PZR tüplerinde Tablo 7 'de belirtildiği gibi hazırlandı. PZR bileşenlerinin optimal miktarları çeşitli denemeler sonucunda elde edildi.

Bu çalışmada PZR reaksiyonunda belirtilen konsantrasyonlarda 0.25U/µl Taq polimeraz, 2X PCR Buffer, 0.4 milimolar (mM) dNTPs (Deoksiribonükleosid trifosfat),

3.2mM MgCl<sub>2</sub> (Magnezyum Klorür) ve %0.02 bromofenol mavisi içeren Hibrigen 2X Taq Master Mix (İstanbul,Türkiye) kullanılmıştır.

<b>PZR BİLEŞENLERİ</b>	<b>YABANIL TİP (wt) TÜP PZR KARIŞIMLARI</b>	<b>MUTANT (M) TÜP PZR KARIŞIMLARI</b>
2X Taq Master Mix	10µl	10µl
185delAG İleri Primer (Genel)	2 µl	2 µl
185delAG Geri Primer wt/M	0.4 µl	2 µl
5382insC İleri Primer wt/M	0.12 µl	0.12 µl
5382insC Geri Primer (Genel)	0.12 µl	0.12 µl
6174delT İleri Primer wt/M	0.24 µl	0.31 µl
6174delT Geri Primer (Genel)	0.31 µl	0.31 µl
V2466A İleri Primer wt/M	0.31 µl	0.31 µl
V2466A Geri Primer (Genel)	0.31 µl	0.31 µl
Kalıp DNA	1 µl (50ng/ µl)	1 µl (50ng/ µl)
Steril bidistile su	5.2 µl	3.52 µl
<b>TOPLAM HACİM</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 7:** Yabanıl tip ve Mutant tüplere özgü PZR bileşenleri.

### 5.2.2.2. PZR Koşulları

Örneklerimiz için uygun amplifikasyon koşullarının saptanması çeşitli denemelerle belirlendi. Her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutularak, optimal amplifikasyon koşulları sağlanana kadar, PZR programının farklı ısı döngüleri ve döngü sayıları denendi.

Optimizasyonun sağlanmasıyla birlikte, BRCA1 geninin ekzon 2 bölgesindeki 185delAG ve ekzon 20 bölgesindeki 5382insC mutasyonları ile BRCA 2 geninin ekzon 11'ndeki 6174delT ve ekzon 14'teki V2466A mutasyonlarını göstermek amacıyla uygulanan PZR programı Tablo 8 ' de belirtilmektedir.

<b>PROGRAM TÜRÜ</b>	<b>DERECE</b>	<b>SÜRE</b>	<b>DÖNGÜ SAYISI</b>
<b>İlk Denatürasyon</b>	94 °C	4dak	–
<b>Denatürasyon</b>	94 °C	15sn	34
<b>Bağlanma</b>	59 °C	15sn	
<b>Uzatma</b>	72 °C	30sn	
<b>Son Uzatma</b>	72 °C	10dk	–

**Tablo 8:** PZR koşulları

### 5.2.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

PZR işlemi sonrası ürünlerin görüntülenmesi amacıyla %2,5'lük agaroz jel hazırlandı. 2 gram (g) agaroz (Hibrogen/İstanbul,Türkiye), 50X ana stoktan 1/50 oranında sulandırılmış, 80 mililitre (ml) 1X TAE (Trisasetik asit) (Hibrogen) elektroforez yürütme tamponu içerisinde kaynatılarak çözündürüldü ve elle tutulabilecek sıcaklığa geldiğinde içerisine 2µl etidyum bromid (EtBr) (10mg/ml) eklenerek iyice karıştırıldı. Kuyucukları oluşturacak taraklar kasete yerleştirildi ve sıvı haldeki jel, kasete dökülerek donmaya bırakıldı. Donma işleminin ardından taraklar çıkarıldı. Tüm örnekler 8 µl olacak şekilde jele yüklendi. Jele yüklenen örnekler, 1X TAE tamponu içerisinde 90V'da 45 dakika yürütüldükten sonra jel, UV ışığı altında jel görüntüleme sistemi (Uvitec/BTS-20.MS ve DOC-PRINT.VX2) ile incelenmiş ve BRCA1/BRCA2 genlerinin belirtilen ekzon bölgelerinde mutasyon içeren noktalarda DNA biriminin beklenen ürün boylarında çoğalıp çoğalmadığına bakıldı. PZR ürünlerinin büyüklükleri 100bp moleküler ağırlık standardı (Hibrogen/İstanbul,Türkiye) ile karşılaştırılarak belirlendi.

## **6. BULGULAR**

### **6.1. SENTETİK DNA ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜ**

Çalışmamızda, BRCA1 185delAG ve 5382insC mutasyonları ile BRCA2 6174delT ve V2466A mutasyonlarının pozitif kontrolleri olarak kullanılmak üzere tasarlanan homozigot genotipteki plazmid DNA'larının kontrolü, agaroz jel elektroforeziyle gerçekleştirildi. Firmadan temin edilen her bir mutasyona özgü 5µl plazmid DNA, yaklaşık 2µl yükleme tamponu (HibriGen) ile karıştırılarak hazırlanan %2.5'lük agaroz jelde 90V gerilimde 20 dak. yürütüldü. Pozitif kontrol amaçlı tasarlanan plazmid DNA ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kontrolü sağlandı.

### **6.2. MULTİPLEKS PZR ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ ANALİZİ**

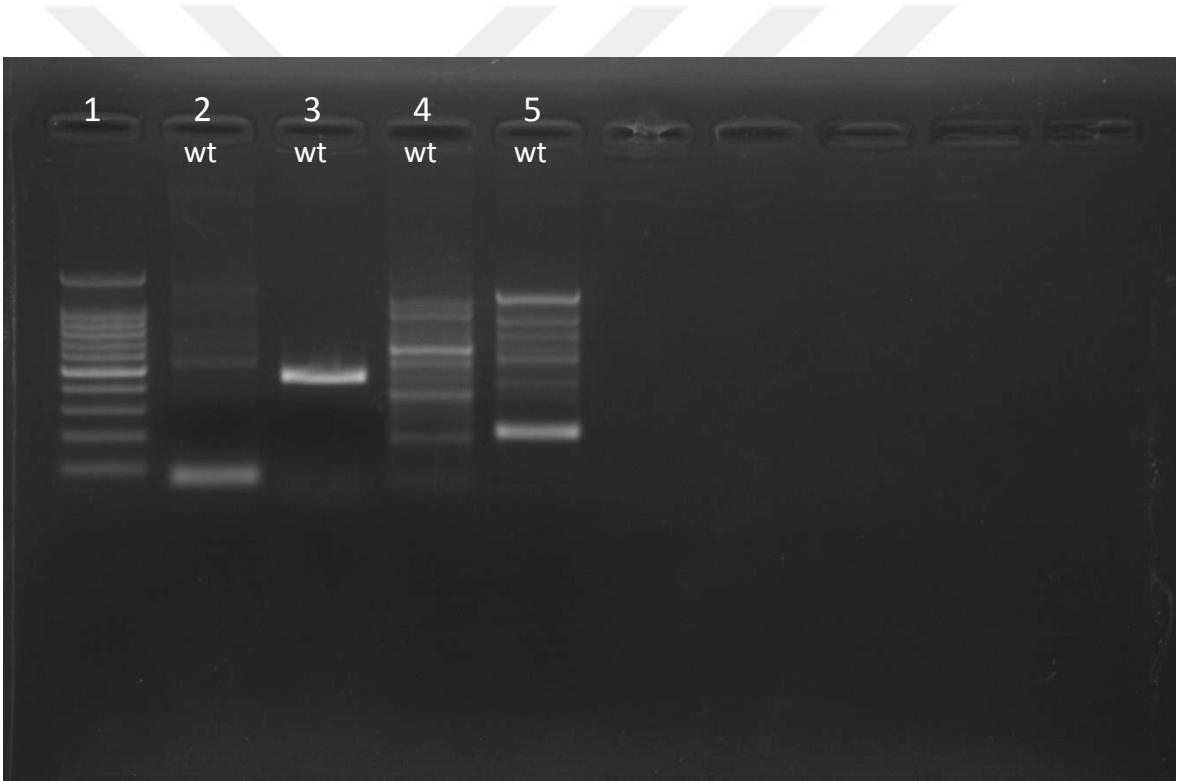
Çalışmamızda, BRCA1 185delAG ve 5382insC mutasyonları ile BRCA2 6174delT ve V2466A mutasyonlarını yabancı tip ve mutant alleller için çalışmak üzere, homozigot ve heterozigot genotipteki DNA'ların ayrı ayrı kalıp olarak kullanıldığı yabancı tip ve mutant tüp PZR karışımları hazırlanarak gerçekleştirilen multipleks PZR işlemi, optimal amplifikasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla toplamda 3 kez tekrarlandı. Her denemede farklı döngü sayıları ve bağlanma sıcaklıkları denenerek multipleks PZR için optimal koşullar belirlendi. Optimal PZR koşullarının belirlenmesinde yapılan multipleks PZR'lar sonucu elde edilen ürünlerin kalitatif tayinleri agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Her iki allelde de mutasyonlara özgü pozitif örnekler, BRCA1 185delAG mutasyonu için 80bç, BRCA1 5382insC mutasyonu için 430bç, BRCA2 6174delT mutasyonu için 200bç ve BRCA2 V2466A mutasyonu için 245bç uzunluğunda PZR ürünleri oluşturmaktadır.



### 6.2.1. Optimal PZR Koşullarının Tayininde 1.Deneme

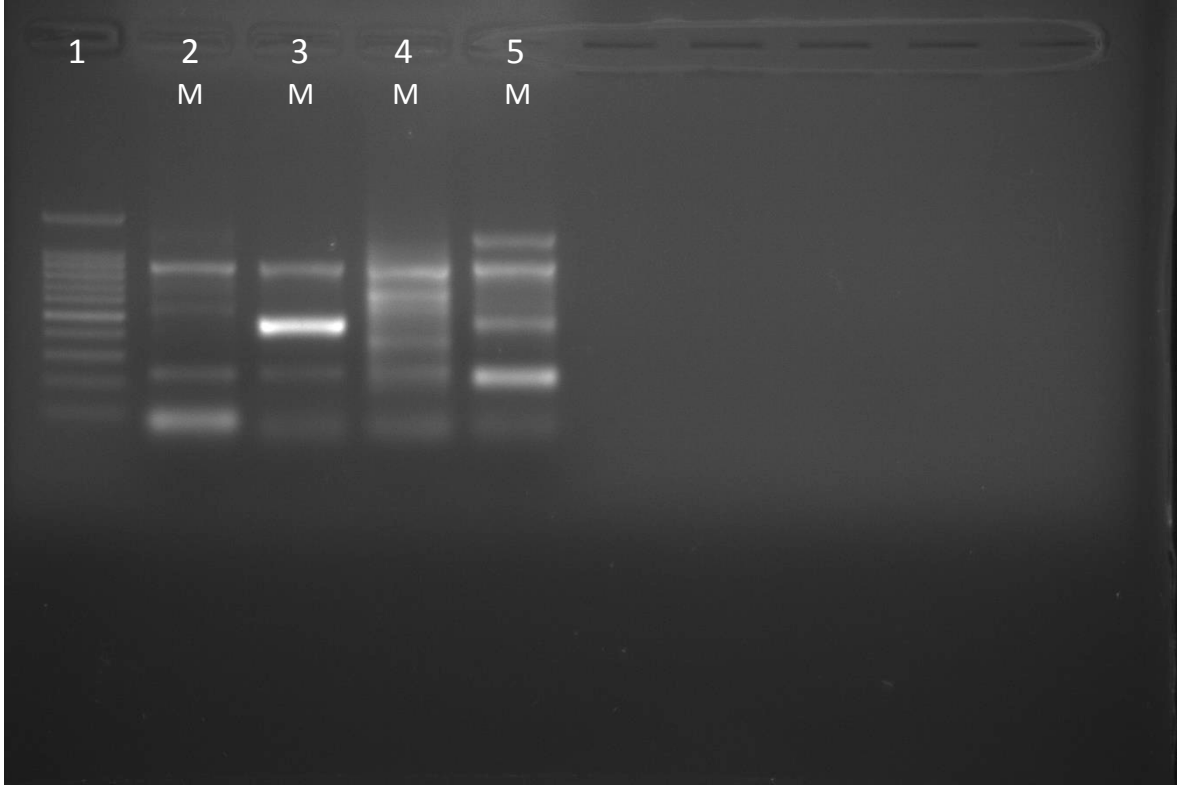
Bağlanma sıcaklığının 56°C ve döngü sayısının 37 olarak belirlendiği PZR koşulları ile gerçekleştirilen ilk multipleks PZR işleminin ardından PZR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Yabani tip ve mutant allele özgü primerleri içeren PZR karışımları için yalnızca heterozigot genotipteki kontrol DNA'ları ile gerçekleştirilen multipleks PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi analiz görüntüleri sırasıyla Şekil 10 ve Şekil 11'de gösterilmektedir.

Multipleks PZR sonucu, mutasyonlara özgü beklenen ürün boyları 100bp moleküler ağırlık standardı kullanılarak karşılaştırıldı.



**Şekil 10:** Mutasyonlar için heterozigot genotipteki kontrol DNA'ları kullanılarak yabani tip allele özgü primerleri içeren karışımlar ile gerçekleştirilen multipleks PZR ürünlerinin %2.5'lük agaroz jel elektroforez analiz görüntüleri. 1.Kuyu: 100bp'lik moleküler ağırlık standardı. 2.Kuyu: BRCA1 185delAG mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 3.Kuyu: BRCA1 5382insC mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 4.Kuyu: BRCA2 6174delT mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 5.Kuyu: BRCA2 V2466A mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü.

Yabanıl tip allele özgü primerleri içeren karışımlar için uygulanan multipleks PZR koşullarının, BRCA1 185delAG, BRCA2 6174delT ve BRCA2 V2466A mutasyonları için beklenen ürünlerin dışında nonspesifik ürünler oluşturduğu tespit edildi (Şekil 10).

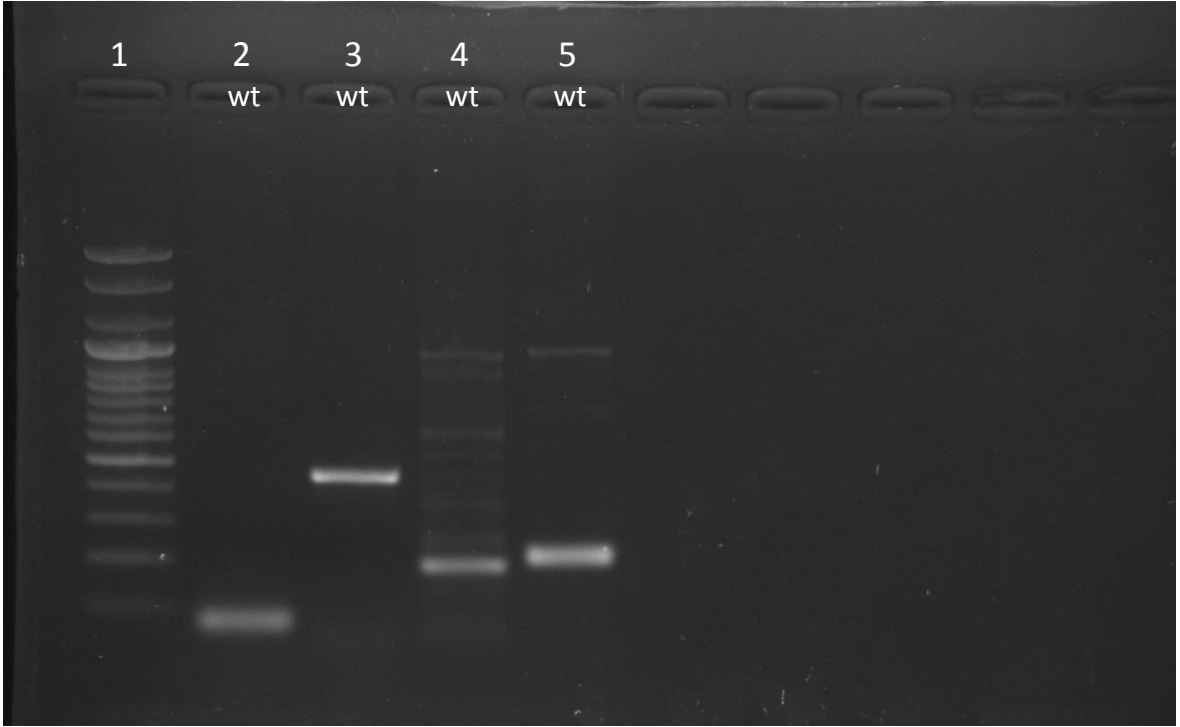


**Şekil 11:** Mutasyonlar için heterozigot genotipteki kontrol DNA'ları kullanılarak mutant allele özgü primerleri içeren karışımlar ile gerçekleştirilen multipleks PZR ürünlerinin %2.5'luk agaroz jel elektroforez analiz görüntüleri. 1.Kuyu: 100bç'lik moleküler ağırlık standardı. 2.Kuyu: BRCA1 185delAG mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 3.Kuyu: BRCA1 5382insC mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 4.Kuyu: BRCA2 6174delT mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 5.Kuyu: BRCA2 V2466A mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü.

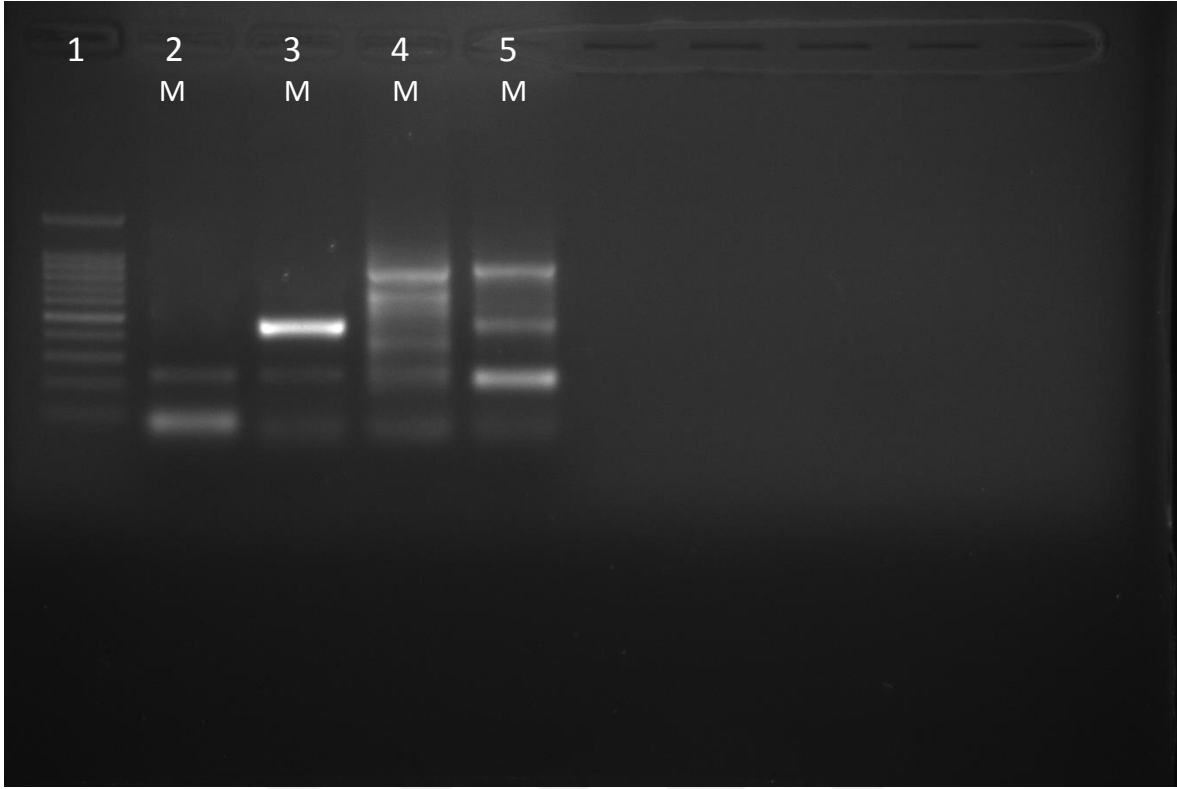
Mutant allele özgü primerleri içeren karışımlar ile gerçekleştirilen multipleks PZR sonucu, BRCA1 185delAG, 5382insC ve BRCA2 6174delT ile V2466A mutasyonları için beklenen ürünlerin dışında nonspesifik ürünler olduğu tespit edildi (Şekil 11).

### 6.2.2. Optimal PZR Koşullarının Tayininde 2.Deneme

Bağlanma sıcaklığının 56°C ve döngü sayısının 37 olarak belirlendiği PZR koşulları ile gerçekleştirilen ilk multipleks PZR denemesi sonucu elde edilen PZR ürünlerindeki nonspesifik oluşumların giderilmesi amacıyla, diğer tüm parametreler sabit kalacak şekilde ikinci bir PZR protokolü oluşturuldu. Bu protokolde, bağlanma sıcaklığı 57.5 °C ve döngü sayısı 36 olarak belirlendi. Bu kapsamda multipleks PZR işlemi, yabancı tip ve mutant allele özgü primerleri içeren karışımlar için 1.denemede de olduğu gibi yalnızca heterozigot genotipteki DNA'lar için uygulandı. İkinci PZR protokolü kapsamında gerçekleştirilen multipleks PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez analizleri Şekil 12 ve Şekil 13'te gösterilmektedir.



**Şekil 12:** Oluşturulan ikinci PZR protokolü kapsamında yabancı tip allele özgü primerleri içeren karışımlar için heterozigot genotipteki kontrol DNA'ları ile gerçekleştirilen multipleks PZR ürünlerinin %2.5'lük agaroz jel elektroforez analiz görüntüleri. 1.Kuyu: 100bç plus moleküler ağırlık standartı. 2.Kuyu: BRCA1 185delAG mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 3.Kuyu: BRCA1 5382insC mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 4.Kuyu: BRCA2 6174delT mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 5.Kuyu: BRCA2 V2466A mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü.

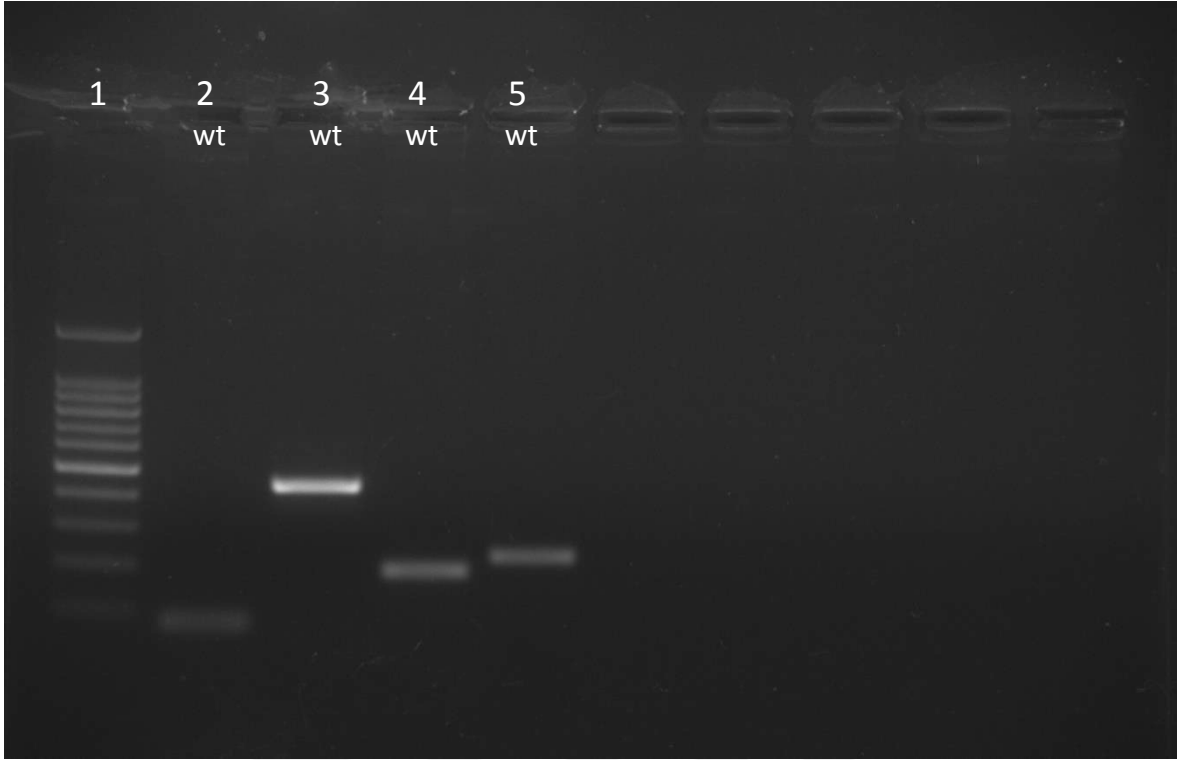


**Şekil 13:** Oluşturulan ikinci PZR protokolü kapsamında mutant allele özgü primerleri içeren karışımlar için heterozigot genotipteki kontrol DNA'ları ile gerçekleştirilen multipleks PZR ürünlerinin %2.5'lük agaroz jel elektroforez analiz görüntüleri. 1.Kuyu: 100bç moleküler ağırlık standartı. 2.Kuyu: BRCA1 185delAG mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 3.Kuyu: BRCA1 5382insC mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 4.Kuyu: BRCA2 6174delT mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 5.Kuyu: BRCA2 V2466A mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü.

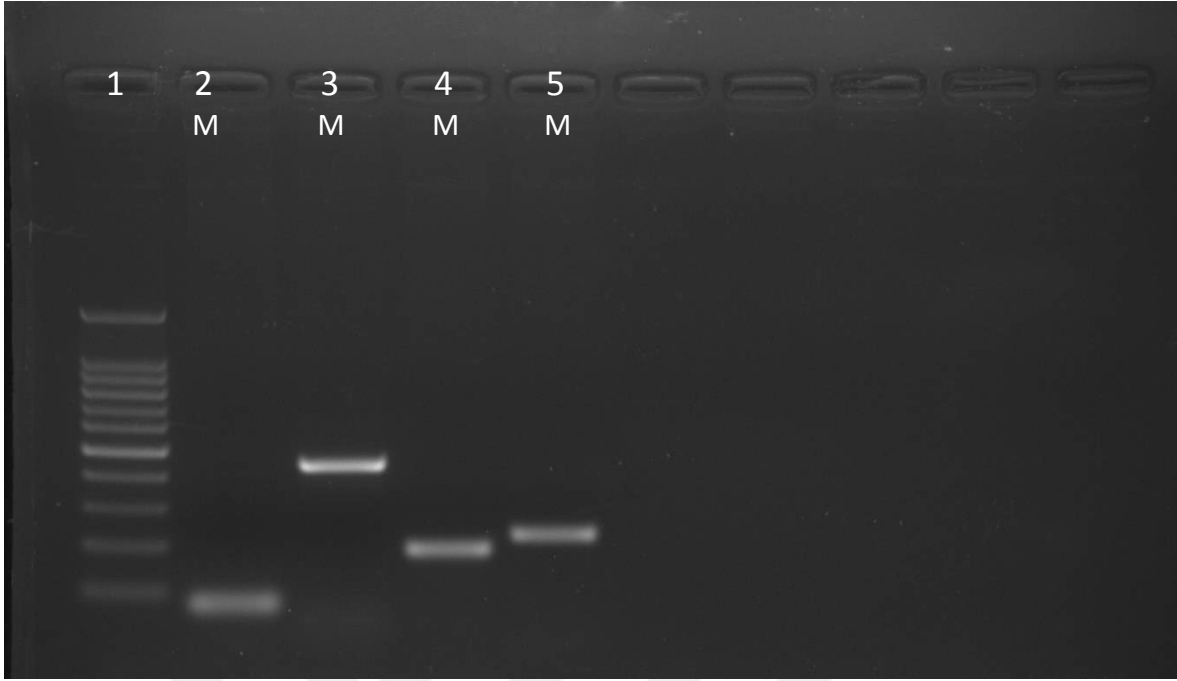
İkinci PZR protokolü kapsamında gerçekleştirilen multipleks PZR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez analizlerinde, var olan nonspesifik ürünlerin miktarlarında ve parlaklıklarında azalma tespit edildi. Yabanıl tip allele özgü primerleri içeren karışımlar ile yapılan PZR'da BRCA1 185delAG mutasyonu için çalışılan örnekteki (Şekil12, 2.kuyu) nonspesifik oluşumlar giderildi. Mutant allele özgü primerleri içeren karışımlar ile gerçekleştirilen PZR'da ise 185delAG mutasyonu için çalışılan örnekteki (Şekil 13, 2.kuyu) nonspesifik ürünlerin çoğunluğu giderildi. Yabanıl tip ve mutant alleller için BRCA2 V2466A mutasyonuna özgü pozitif kontrolün çalışıldığı örneklerdeki (Şekil 12, 5.Kuyu) (Şekil 13, 5.Kuyu) nonspesifik oluşumlarda da beklenen azalma kaydedildi.

### 6.2.3. Optimal PZR Koşullarının Tayininde 3.Deneme

İkinci PZR protokolü kapsamında gerçekleştirilen multipleks PZR ürünlerindeki non-spesifik oluşumların tamamen giderilmesi amacıyla, üçüncü bir PZR protokolü oluşturuldu. Bu kapsamda, ikinci protokolde belirlenen bağlanma sıcaklığı 59 °C 'ye çıkarılarak döngü sayısı 34'e indirildi. Buna ek olarak ürün miktarını artırmak amacıyla BRCA2 6174delT mutasyonu için mutant allele özgü kullanılan ileri ve geri primerlerin örnek başına miktarı 0.24 µl'den 0.31µl'ye çıkarıldı. Oluşturulan yeni PZR protokolü, diğer uygulamalarda da olduğu gibi ilk olarak heterozigot genotipteki örnekler için denendi. Üçüncü PZR protokolü ile uygulanan multipleks PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez analizleri yabancıl tip ve mutant tüp karışımları için sırasıyla Şekil 14 ve Şekil 15'te gösterilmektedir.



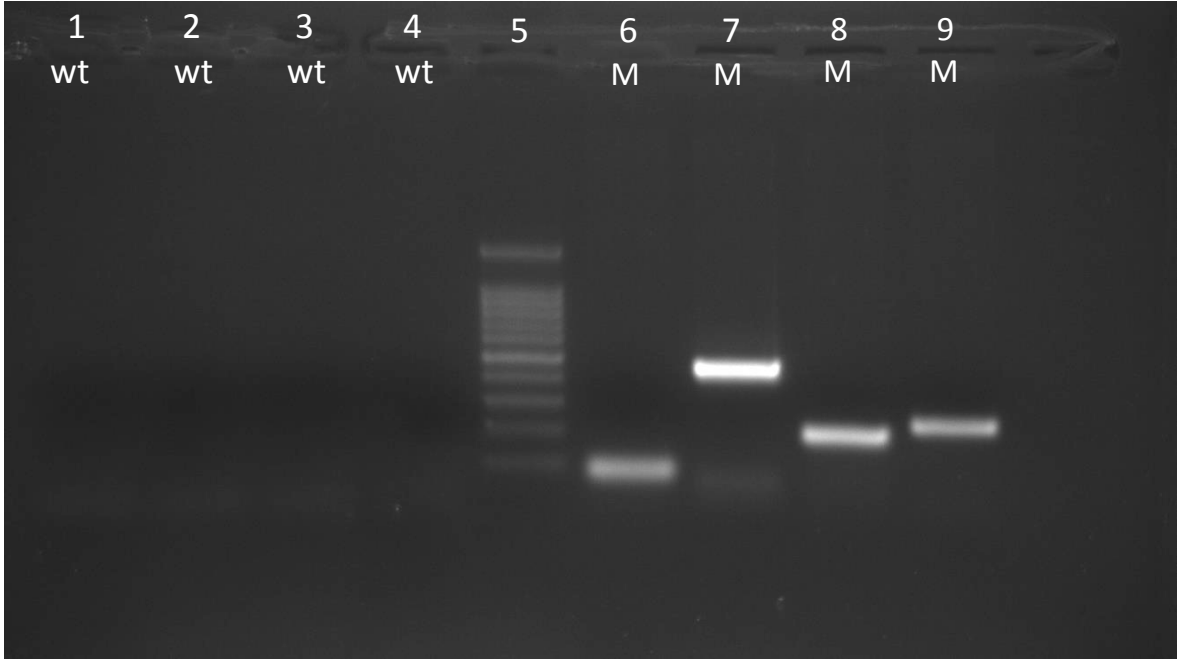
**Şekil 14:** Üçüncü PZR protokolü kapsamında yabancı tip allele özgü primerleri içeren karışımlar ile heterozigot genotipteki kontrol DNA'ları kullanılarak gerçekleştirilen multipleks PZR ürünlerinin %2.5'luk agaroz jel elektroforez analiz görüntüleri. 1.Kuyu: 100bç moleküler ağırlık standardı. 2.Kuyu: BRCA1 185delAG mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 3.Kuyu: BRCA1 5382insC mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 4.Kuyu: BRCA2 6174delT mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 5.Kuyu: BRCA2 V2466A mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü.



**Şekil 15:** Üçüncü PZR protokolü kapsamında mutant allele özgü primerleri içeren karışımlar ile heterozigot genotipteki kontrol DNA'ları kullanılarak gerçekleştirilen multipleks PZR ürünlerinin %2.5'lük agaroz jel elektroforez analiz görüntüleri. 1.Kuyu: 100bç moleküler ağırlık standartı. 2.Kuyu: BRCA1 185delAG mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 3.Kuyu: BRCA1 5382insC mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 4.Kuyu: BRCA2 6174delT mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü. 5.Kuyu: BRCA2 V2466A mutasyonu için pozitif örneği içeren PZR ürünü.

Şekil 14 ve Şekil 15'de, oluşturulan son PZR protokolü ile agaroz jel elektroforez görüntüleri görülen multipleks PZR ürünlerinde, daha önceden tespit edilen nonspesifik ürün oluşumlarının tamamen giderildiği gösterilmektedir. Mutant allele özgü primerleri içeren PZR karışımı ile BRCA2 6174delT mutasyonuna özgü pozitif örneğin çalışıldığı örnekteki (Şekil 14, 4.Kuyu) non-spesifik oluşumlar tamamen giderilmekle birlikte, primer miktarında yapılan değişiklik beklenen ürünün miktarını artırmayı sağlamıştır. Görsellerde yer alan örnekler, yabancı tip ve mutant allele özgü hazırlanan PZR karışımları için her bir mutasyonu ayrı ayrı taşıyan heterozigot mutant genotipteki 4 farklı sentetik DNA örneğinin analiz görüntüsünü temsil etmektedir. Bu kapsamda homozigot mutant genotipe sahip sentetik DNA örnekleri için ön görülen agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 16'da gösterilmektedir.

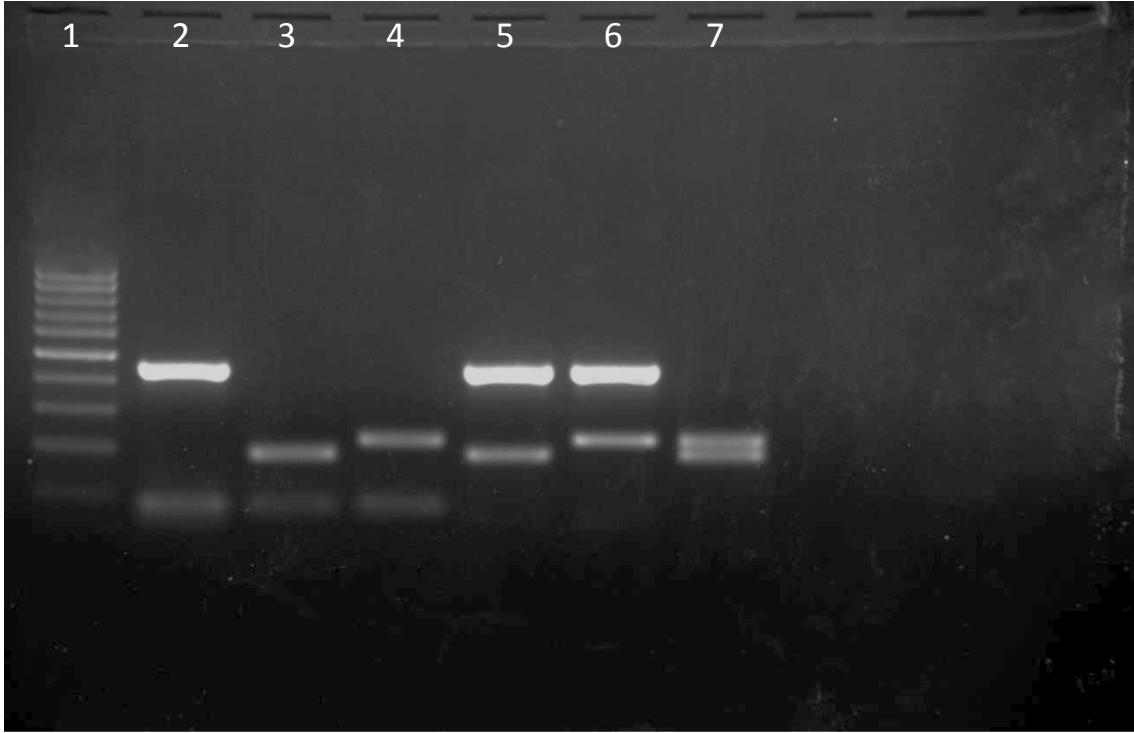
Her mutasyon için homozigot mutant genotipte olan 4 ayrı sentetik DNA örneğinin agaroz jel elektroforez analizlerinde, beklenildiği üzere yabancı tip allele özgü primerleri içeren karışımlar ile yapılan multipleks PZR işlemi sonucu amplifikasyon gözlenmemiştir. Mutant allele özgü primerleri içeren karışım ile yapılan multipleks PZR işlemi sonucu ise, her mutasyon için beklenen ürünler tek bir bant şeklinde görüntülenmiştir (Şekil 16).



**Şekil 16:** 1,2,3,4. Kuyular: 4 mutasyon açısından da homozigot mutant genotipte olduğu bilinen 4 farklı sentetik DNA örneğinin yabancı tip allele özgü primerler ile gerçekleştirilen multipleks PZR ürünleri. 5.Kuyu: 100bç moleküler ağırlık standardı. 6,7,8,9. Kuyular: Mutant primerler ile gerçekleştirilmiş multipleks PZR ürünleri. Dört örneğin hepsi bu 4 mutasyonu homozigot mutant formda taşıdığı için, beklenildiği biçimde 1-4 numaralı kuyularda (yabancı tip) amplifikasyon gözlenmez iken, 6-9 numaralı kuyuların (M) hepsinde beklenen ürün boyutlarında amplifikasyon gözlenmiştir.

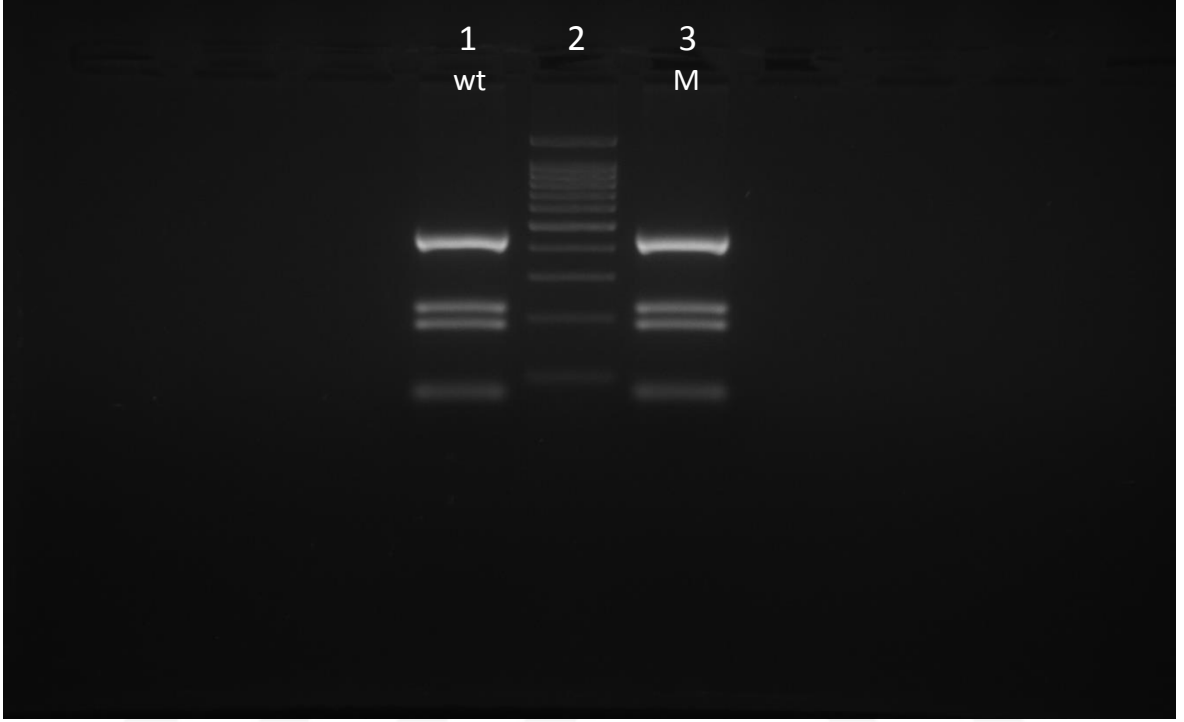


Mutant allele özgü primerler ile hazırlanan PZR karışımlarında BRCA1 185delAG ile 5382insC ve BRCA2 6174delT ile V2466A mutasyonlarını ikili kombinasyonlar halinde taşıyan sentetik DNA karışımları ile geliştirilen ürün prototipi kapsamında yapılan multipleks PZR sonucu gerçekleştirilen agaroz jel elektroforez analizleri Şekil 17’de gösterilmektedir.



**Şekil 17:** Mutant allele özgü primerleri içeren karışımlarda belirtilen 4 mutasyonu ikili kombinasyonlar halinde taşıyan sentetik DNA’lar ile gerçekleştirilen multipleks PZR’nin agaroz jel elektroforez analiz görüntüleri. 1.Kuyu: 100bç moleküler ağırlık standartı. 2.Kuyu: 185delAG (80bç) ve 5382insC (430bç), 3.Kuyu: 185delAG (80bç) ve 6174delT (200bç), 4.Kuyu: 185delAG (80bç) ve V2466A (245bç), 5.Kuyu: 5382insC (430bç) ve 6174delT (200bç), 6.Kuyu: 5382insC (430bç) ve V2466A (245bç), 7.Kuyu: 6174delT (200bç) ve V2466A (245bç) mutasyonlarını taşıyan örnekler.

Hedeflenen mutasyonları heterozigot formda taşıyan sentetik DNA örneğinin agaroz jel elektroforez analiz görüntüsü Şekil 18’de gösterilmektedir.



**Şekil 18:** Belirtilen 4 mutasyonu da heterozigot formda taşıma ihtimali olan bir birey düşünülerek sentetik DNA karışımı ile gerçekleştirilen multipleks PZR işleminin ardından yapılan agaroz jel elektroforezi analiz görüntüsü. 1.Kuyu: Yabanıl tip allele özgü primerler kullanılarak çoğaltılmış multipleks PZR ürünleri. Aşağıdan yukarı doğru sırası ile 80bç, 200bç, 245bç, 430bç. 2.Kuyu: 100bp moleküler ağırlık standardı. 3.Kuyu: Mutant allellere özgü primerler kullanılarak çoğaltılmış multipleks PZR ürünleri. Aşağıdan yukarı doğru sırası ile 80bç, 200bç, 245bç, 430bç.

## 7. TARTIŞMA

Dünya genelinde meme kanseri, akciğer kanserinden sonra en sık tanı koyulan kanser tipi olmakla beraber, kansere bağlı ölümlerin ikinci nedeni olarak belirtilmektedir (18). Meme kanseri sıklığı, ciddi bir coğrafi farklılık göstermekle birlikte, dünya'daki meme kanseri sıklığı, 1990 yılından itibaren her yıl ortalama %0.5'lik artış göstermektedir. ABD'de her yıl yaklaşık 200.000 yeni meme kanseri teşhisi koyulmakta ve yaklaşık 40.000 kişi meme kanseri nedeniyle yaşamını yitirmektedir (125). Ülkemizde ise, Sağlık Bakanlığı tarafından en son 2008 yılında yayınlanan kanser verilerine göre, meme kanseri kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün içinde birinci sırada yer almaktadır. 2008 yılında kadınlarda meme kanseri sıklığının yaşa göre standardize hızı 100.000'de 40.7 olarak belirtilirken, 2011 yılında kadınlardaki meme kanseri sıklığı bu veri üzerinden tahmini olarak 45.1 olarak hesaplanmıştır 2008 yılındaki verilerde erkeklerdeki meme kanseri sıklığı ise 0.8 olarak belirtilmiştir (126).

Yumurtalık kanseri ise, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde akciğer, meme, kolon-rektum ve pankreas kanserinden sonra beşinci sırada, jinekolojik malignitelerin içerisinde ise %50 görülme oranıyla mortalitesi en yüksek kanser olarak yer almaktadır (65). Amerikada yılda yaklaşık 22.000 yeni teşhis koyulmakta, yaklaşık 15.000 kişi bu nedenle hayatını kaybetmektedir (125). Ülkemizde ise 2008 yılı kanser verilerine göre kadınlarda yumurtalık kanseri sıklığının yaşa göre standardize hızı 100.000'de 6.9 iken, 2011 yılı raporlarına göre bu oran 7.5 olarak belirtilmiştir (126).

Meme kanserinin %3-%5 ve yumurtalık kanserinin %10 kadarı BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki kalıtsal mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bunun dışında BRCA mutasyonlarının erkekte prostat kanseri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. BRCA genleri, bakıcı tipi tümör baskılayıcı genlerdir. Kalıtsal meme ve yumurtalık kanserinden sorumlu olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinin kodladığı proteinlerin, homolog rekombinasyon tamir yöntemi ile çift iplik DNA kırıklarının onarımında görevli olmaları, bu genlerde meydana gelen mutasyonların DNA onarımındaki bozukluğa sebep olması sonucu, kadınlarda en yaygın görülen meme ve yumurtalık kanserlerinden birinin gelişimine yol açtığını göstermektedir (90,98). BRCA1/BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında yaşam boyu meme kanseri gelişme riski %85 olarak ifade edilirken, yumurtalık kanserinde bu oran, BRCA1 mutasyon taşıyıcıları için %40, BRCA2 mutasyon taşıyıcıları için %20 olarak

belirtilmektedir. Bu genlerdeki mutasyonların yaklaşık %80-%90'ını anlamsız ya da çerçeve kayması mutasyonları oluşturmaktadır ve çoğunlukla nokta mutasyonları ya da küçük delesyonlar/insersiyonlar sonucunda ortaya çıktıkları belirtilmektedir. Mutasyonlardaki pleomorfizm nedeniyle, belirli bir mutasyon kalıbı için risk hesaplamaları oldukça güçtür (70). Çeşitli mutasyon tiplerine rağmen bu genlerdeki germ soyu mutasyonların çoğunluğu tek tiptir ve bazı mutasyonların topluma ve etnik kökene özgü olduğu da gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2'nin güçlü bir atasal mutasyon etkisine sahip toplumlarda, aynı tip mutant alleller daha yüksek sıklıkta tayin edilmiştir. Ashkenazi Yahudilerinde, BRCA1 geninde 185delAG ile 5382insC ve BRCA2 geninde 6174delT olmak üzere üç ortak atasal mutasyon saptanmıştır (86).

BRCA1 geninde en sık görülen mutasyonlar, 185delAG ve 5382insC mutasyonlarıdır. Bu iki mutasyon BRCA1 geninde görülen tüm mutasyonların %10'nunu oluşturmaktadır (39). BRCA1 5382insC mutasyonu, bu gen için dünyada en sık rastlanan mutasyon olup, Ashkenazi müslümanlarında ve Slav kökenli kadınlarda bulunmaktadır. Haplotip analizleri de bu mutasyonun yaygın Avrupa kökenli bir mutasyon olduğunu desteklemektedir (118). Türkiye'nin batısında kuvvetli aile öyküsü olan olgularda BRCA1 ve BRCA2 germline mutasyonlarını saptamaya yönelik yapılan bir çalışmada, BRCA1 5382insC mutasyonunun Türk hasta popülasyonu için dominant bir penetrans gösterdiği belirtilmiştir (119). 2003 yılında meme ve yumurtalık kanseri bir grup Türk hastada BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının araştırıldığı çalışmanın sonucunda ise, yüksek risk taşıyan Türk bireyler için BRCA1/BRCA2 tüm gen analizleri yapılmadan önce, ilk olarak BRCA1 5382insC varlığının araştırılması gerektiği bildirilmiştir (127). Türk popülasyonunda BRCA1 185delAG, BRCA2 6174delT mutasyonları ile BRCA2 V2466A mutasyonu da genetik merkezlerinde yüksek saptanma oranına sahiptir. 2012 yılında BRCA1 185delAG mutasyonunun doğu Avrupalılar dahil birçok popülasyonda en sık görülen mutasyon olduğu ifade edilerek, bu mutasyonun kolaylıkla tespitini sağlayacak allel-spesifik PZR temelli bir ürün geliştirilmiştir (128).

BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taramalarında intro-ekzonik DNA dizileme yöntemi ülkemizde ve dünyada sıklıkla tercih edilen yöntemdir. Bunun dışında çeşitli elektroforetik temelli çok sayıda yöntem vardır. Bunlar arasında PTT olarak adlandırılan protein trunkusyon testi, tek zincir konformasyon polimorfizmi yöntemi (SSCP), iki boyutlu gen tarama sistemi (TDGS) ve yapıya duyarlı jel elektroforez (CSBE) sistemleri sayılabilir

(129,130). Elektroforetik temelli yöntemlere benzer olarak yüksek performanslı denatüre edici sıvı kromatografisi (DHPLC) yöntemi de normal ve mutant DNA heterodublekslerinin tespitinde kullanılan son derece hassas bir yöntemdir. Bunların dışında DNA mikroarray ve reverse transkriptaz PZR gibi yüksek verimli ve multipleks mutasyon spesifik tarama yöntemleri de mevcuttur. BRCA1/2 mutasyon saptama yöntemleri ile ilgili son yapılan çalışmalarda, mevcut yöntemlerin çoğunun özgünlüğünün %100 olduğu, ancak duyarlılıklarının önemli ölçüde değişkenlik gösterdikleri belirtilmiştir. Bahsedilen elektroforetik temelli yöntemlerin duyarlılıklarının %50-%100 arasında değişkenlik gösterdiği ifade edilirken, BRCA1/2 mutasyon taramalarında DHLPC yönteminin %100 duyarlılıkla en güvenilir metod olduğu bildirilmiştir (129). Ancak ülkemizde ve dünyada BRCA1/2 mutasyon taramalarında sıklıkla tercih edilen DNA dizileme, DHPLC ve DNA Mikroarray gibi yöntemlerin maliyetleri çok yüksek olmakla birlikte, bu yöntemler beraberinde özel ve pahalı ekipmanlarda gerektirmektedir. BRCA1/2 mutasyon taramalarında altın standart olarak ifade edilen DNA dizileme yönteminin, BRCA1/2 genlerindeki mutasyon sayısının fazlalığı, uzun zaman alması, pahalı ve her laboratuarda uygulanabilirliği sağlanamayacak kadar çeşitli ekipmanlar gerektirmesi nedeniyle rutinde ekonomik ve kolay uygulanabilir alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (129,130).

BRCA1 185delAG ve 5382insC ile BRCA2 6174delT ve ülkemizde rutin tarama panellerinde yeni saptanan V2466A mutasyonlarının multipleks PZR ile tek adımda belirlenmesini sağlamak üzere geliştirdiğimiz ürün prototipi ile ülkemizde ve yakın coğrafyada sık saptanan ve kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri gelişiminde rolü büyük olan bu mutasyonların analizleri, rutin taramalarda sıklıkla kullanılan DNA Dizileme yöntemine kıyasla çok kısa sürede tespit edilebileceklerdir. Bu 4 mutasyonun saptanmadığı durumlarda, eskisi gibi hastaların DNA dizileme yöntemi ile tüm gen dizi analizleri yapılabilir. Mutasyon saptanması halinde ise, tüm genin DNA dizileme yöntemi ile incelenmesi yöntemine kıyasla, analiz süresi yaklaşık 90 günden yaklaşık 2 saate inmektedir. Böylece 2 saat içerisinde bahsi edilen bölgelerde meme ve yumurtalık kanser riskinin büyük ölçüde artmasından sorumlu olan ve sık saptanan BRCA mutasyonları taranmış olacaktır.

## 8. SONUÇ

Sonuç olarak, çalışmamız ile BRCA1 185delAG, 5382insC mutasyonları ile BRCA2 6174delT ve V2466A mutasyonlarının multipleks PZR ile tek adımda belirlenmesini sağlayan bir ürünün prototipi geliştirilmiş, kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri gelişiminde büyük öneme sahip bu mutasyonların çok kısa sürede ve düşük maliyet ile tespiti mümkün kılınmıştır. Geliştirilen ürün prototipinin, mutasyon saptama duyarlılığı pozitif kontrollerle sağlanmıştır ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız sonucunda ortaya çıkan ürün prototipi ile ülkemizde ve yakın coğrafyada sık saptanan 185delAG, 5382insC ve 6174delT ve yeni tanımlı V2466A mutasyonlarının ön analizinin gerçekleştirilmesi, özellikle BRCA gen mutasyonlarının tanısında çoğunlukla kullanılan DNA dizileme yöntemi için gerekli zaman ve maliyetin minimuma indirgenmesi sağlanmıştır.

Bu protitipe, iki tüpte taranan 4 mutasyona ek olarak  $\beta$ -aktin genine ait bir internal kontrol bölgesi de eklenmesi, hastalara ait genomik DNA'lar ile deneylerin tekrarlanması ve bir dış validasyon sürecinden geçerek kullanıma hazır hale getirilmesi planlanmaktadır.

## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi birikimini ve anlayışını benden hiç esirgemeyen, verdiği tüm destek ve emeklerinden dolayı çok değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Volkan BALTACI, Yard.Doç.Dr. Şule BEYHAN ÖZDAŞ ve Doç.Dr.Yalçın SEYHUN'a emekleri için,

Dostlukları ve yardımları için Yüksek Lisans arkadaşlarım Reyhan YAŞAR ve Gülçin KUNAÇAF'a,

Her koşulda yanımda olduğunu içtenlikle hissettiren ve ihtiyacım olan desteği benden esirgemeyen Sevgili Gökten KUŞPINAR'a,

Son olarak haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bilgi birikimlerini ve hayat görüşlerini her daim benimle paylaşan, tüm eğitim hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayan canım annem, babam ve ablama,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER.

## 10. KAYNAKLAR

1. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q-12-13. *Science*. 1994; 30(265): 2088-90.
2. Ford D, Easton DF, Stratton M. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA-1 and BRCA-2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 676-689.
3. Roa BB, Boyd AA, Volcik K. Askenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA-1 and BRCA-2. *Nat Genet*. 1996; 14: 185-187.
4. Smigal C, Jemal A, Ward E et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006; 56: 168-183.
5. Perkins GH. Breast cancer in men. *BMJ* 2003; 327: 239-240.
6. New directions in the ovarian cancer research: report of the Strategic planning conference, Dec 8-9, 1997, Bethesda, NCI, 1998.
7. Kerlikowske K, Brown JS, Grady DG. Should women with familial ovarian cancer undergo prophylactic oophorectomy? *Obstet Gynecol*. 1992; 80: 700-707.
8. Weaver RF, Hedrick PW;eds. Genes and Cancer. In: Genetics. 3rd ed. Wm. Dubuque, Brown Publishers, 1997.
9. Nussbaum RL, Mcinnes RR, Willard H.F. Thompson&Thompson Genetics in Medicine. Ankara, Güneş Kitabevi, 2005.
10. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61: 759-767.
11. Demirelli F.H. Kanserin moleküler genetik temelleri. *Güncel Klinik Onkoloji Sempozyum Dizisi*. 2003; 37;9-15.
12. William SK, Cummings MR. Genetik Kavramlar. Ankara, Palme Yayıncılık, 2000.
13. Newsham IF, Hadjistilianou T, Cavenee WK. Retinoblastoma. In: The genetic basis of human cancer. Eds: Vogelstein B, Kinzler WK. New York, McGraw-Hill, 1998.
14. Peter T, Sian E. Emery's Elements of Medical Genetics. Twelfth Edition, 2005.
15. Geoffey MC, Hausman ER. Hücre: Moleküler Yaklaşım. İzmir, İzmir Tıp Kitabevi, 2006.



16. Strachan T, Andrew P. Human Molecular Genetics 2. New York, Garland Science, 1999.
17. Liaw D, Marsh DJ, Li J. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature Genet.* 1997; 16:64–67.
18. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 69–90.
19. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Erişim tarihi: 07.01.2014
20. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe. *Annals of Oncology.* 2005;16: 481-488.
21. The journal of breast health, Prof Dr. Vahit.
22. Koçak S, Çelik L, Özbaş S, Dizbay S, Tükün A, Yalçın B. Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: İstanbul 2010 konsensus raporu. *J Breast Health.* 2011; 7(2): 47-67.
23. Haydaroğlu A, Dubova S, Özarsan Z, Bölükbaşı Y, Yılmaz R, Kapkaç M, Özdedeli E. Ege Üniversitesinde Meme Kanseri: 3897 Olgunun Değerlendirilmesi. *Meme Sağığı Dergisi.* 2005;1(1): 6-11.
24. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer, 2009.
25. Ozmen V, Fidaner C, Aksaz E. *Meme Sağığı Dergisi.* 2009; 5: 125-134.
26. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer.* 1990; 46: 796-800.
27. Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 2000; 152:950-964.
28. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet.* 1997; 350: 1047-1059.
29. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 1994; 139: 819-835.
30. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE, Self SG. Risk of breast cancer in a cohort of infertile women. *Gynecol Oncol.* 1996; 60: 3-7.

31. Modan B, Ron E, Lerner-Geva L, Blumstein T, Menczer J, Rabinovici J, Oelsner G, Freedman L, Mashiach S, Lunenfeld B. Cancer incidence in a cohort of infertile women. *Am J Epidemiol.*1998; 147: 1038-1042.
32. Melbye M, Wohlfahrt J, Olsen JH, Frisch M, Westergaard T, Helweg-Larsen K, Andersen PK. Induced abortion and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 1997; 336: 81-85.
33. Michels KB, Xue F, Colditz GA, Willett WC. Induced and Spontaneous Abortion and Incidence of Breast Cancer Among Young Women: A Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med.* 2007; 167: 814-820.
34. Stuebe AM, Willett WC, Xue F, Michels KB. Lactation and incidence of premenopausal breast cancer: a longitudinal study. *Arch Intern Med.* 2009; 169: 1364-1371.
35. Musev VC, Collins DC, Musey FI et al: Long – term effect of a first pregnancy on the secretion of prolactin. *N Engl J Med.* 1987; 316:229-232.
36. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet.* 2001; 358:1389.
37. Clavel-Chapelon F, Gerber M. Reproductive Factors and Breast Cancer Risk. Do They Differ According to Age At Diagnosis? *Breast Cancer Res Treat.* 2002 ;72:107-115.
38. Salih AK, Fentiman IS. Breast Cancer Prevention: Present and Future. *Cancer Treat Rev.* 2001;27:261-273.
39. Anne-Maria Martin. Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *Journal the National Cancer Institute.* 2000;92(14) :1126-1135.
40. Hamajima N, Hirase K, Tajima K. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58.515 women with breast cancer and 95.067 women without the disease. *Br J Cancer.* 2000;87(11):1234-45.
41. MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J, Andersen AP, Cole P, deWaard F, Kauraniemi T, Polychronopoulou A, Ravnihar B, Stormby N, Westlund K. Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 1982;30(4):427-31.
42. Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Harras A, Edwards BK. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1994. *National Cancer Institute.* 1997; 97-2789.

43. Mahoney MC, Bevers T, Linos E, Willett WC. Opportunities and strategies for breast cancer prevention through risk reduction. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58: 347-371.
44. Vogel PM, Georgiade NG. The correlation of histologic changes in human breast with the menstrual cycle. *Am J Pathol.* 1981; 104:23-24.
45. Tavasolli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, IARC Press, 2003;9-113.
46. Newcomb PA, Longnecker MP, Storer BE, Mittendorf R, Baron J, Clapp RW, Trentham-Dietz A, Willett WC. Recent oral contraceptive use and risk of breast cancer (United States). *Cancer Causes Control.* 1996;7(5):525-32.
47. Eroglu C, Eryilmaz MA, Cıvıçık S, Gurbuz Z. Meme Kanseri Risk Değerlendirmesi: 5000 Olgu. *UHOD.* 2010, 20: 27-33.
48. Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol.* 2009;625:131-142.
49. Iau PT, Macmillan RD, Blamey RW. Germ line mutations associated with breast cancer susceptibility. *Eur J Cancer.* 2001;37 (3): 300-321.
50. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348 (23): 2339-2347.
51. Borg A, Isola J, Chen J, Rubio C, Johansson U, Werelius B. Germline BRCA1 and HMLH1 mutations in a family with male and female breast carcinoma, *Int J Cancer.* 2000; 796-800.
52. Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas.* 2004; 49:34-43.
53. Mitrunen K, Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res.* 2003;544: 9-41.
54. <http://www.uccc.info/cancercenter/content/breast/default.asp?index=BreastCancer>
55. Yoshida K, Mik, Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004;95(11): 866-871.
56. Xu X, Gammon MD, Zhang Y, Bestor TH, Zeisel SH, Wetmur JG, Wallenstein S, Bradshaw PT, Garbowski G, Teitelbaum SL, Neugut AI, Santella RM, Chen J. BRCA1

promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 115:397–404.

57. Çandır Ö, Karahan N, Bülbül M, Kılınç F, Başpınar Ş. Ispartada meme kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 Ekspresyonu. *S.D.U Tıp Fak. Derg.* 2005;12(2):50-54.
58. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2001;51:15-36.
59. Karlan BY, Raffel LJ, Crvenkovic G. A multidisciplinary approach to the early detection of ovarian carcinoma: rationale, protocol design and early results. *Am J Obstet Gynecol* 1993:560-567.
60. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59(4):225-249.
61. Rock, John A.; Jones, Howard W. Ovarian cancer: Etiology, Screening and Surgery. *Te Linde's Operative Gynecology, 10th Edition.* Lippincott Williams & Wilkins. 2008;1307-1339.
62. Kopuz E, Saip E, Salihoglu Y. Jinekolojik tümörler, Klinik Onkoloji 2000;289-290.
63. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC, Rosen B, Bradley L, Kwan E. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet.* 2001;68: 700-10.
64. Whittemore AS, Balise RR, Pharoah PD, Dicioccio RA, Oakley-Girvan I, Ramus SJ. Oral contraceptive use and ovarian cancer risk among carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Br J Cancer.* 2004;91(11):1911-1915.
65. Çiçek N, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. Epitelyal Over Kanseri. Kadın hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Güneş Kitabevi, 2004.
66. Abraham, Jame; Allegra, Carmen J. Ovarian Cancer, Bethesda Handbook of Clinical Oncology. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
67. Kerlikowske K, Brown JS, Grady DG. Should women with familial ovarian cancer undergo prophylactic oophorectomy? *Obstet Gynecol.* 1992; 80: 700-707.
68. Schildkraut JM, Risch N, Thompson WD. Evaluating genetic association among ovarian, breast, and endometrial cancer: evidence for a breast/ovarian cancer relationship. *Am J Hum Genet.* 1989; 45: 521–529.

69. Cornelis R, Neuhausen SL, Johansson O, Arason A, Kelsell D, Ponder BA, Tonin P, Hamann U, Lindblom A, Lalle P. Breast Cancer Linkage Consortium. High allele loss rates at 17q12-q21 in breast and ovarian tumors from BRCA1-linked families. *Genes Chrom. Cancer* 1995;13:203-210.
70. Boyd J. Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know. *Gynecol Oncol.* 2003;88(2):8-10.
71. Wang C, Horiuchi A, Imai T. Ekspresion of BRCA1 protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *J Pathol.* 2004;202:215-223.
72. Lynch HT, Cavalieri RJ, Lynch JF, et al. Gynecologic cancer clues to Lynch Syndrome II diagnosis: a family report. *Gynecol Oncol.* 1992;44:198-203.
73. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 676–89.
74. Phelan CM, Rebbeck TR, Weber BL, Devilee P, Ruttledge MH, Lynch HT, Lenoir GM, Stratton MR, Easton DF, Ponder BA, Cannon-Albright L, Larsson C, Goldgar DE, Narod SA. Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus. *Nat Genet.* 1996 ;12:309-11.
75. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q-12-13. *Science.* 1994;30(265)5181: 2088-90.
76. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harsman K. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994; 266: 66-71.
77. Antonı L, Sodha N, Collins I. and Garrett MD. CHEK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy-two side of the same coin? *Nat. Rev. Cancer.* 2007; 7:925-936.
78. Bartek J, Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2001; 19(2):238-45.
79. Nıda H, Nakanıshi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis.* 2006; 21(1):3-9.

80. Tan Y, Raychaudhuri P, Costa RH. Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes. *Mol. Cell Biol*, 2007; 27:1007–1016. t40
81. Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell Biol*. 2004; 24:708–718.
82. Lynch HT, Silva E, Snyder C, Lynch JF. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *Breast J*. 2008; 14:3-13.
83. Manguoglu AE, Lüleci G, Özçelik T, Çolak T, Schayek, Akaydın M, Freidman E. Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. *Hum Mutat*. 2003; 21(4):444-445.
84. Baldeep Wirk, MD. The Role of Ovarian Ablation in the Management of Breast Cancer. *Breast J*. 2005;11:416-424.
85. Arvas M, Gezer A. Ailevi Over Kanseri, BRCA Genleri ve Over Kanseri Tarama Programları. *Türk Jinekolojik Onkoloji Derg*. 2004; 7(2): 53-58.
86. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richard CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutation in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet*. 1996;14:185-187.
87. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Than T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994; 266: 66-71.
88. Matros, E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Research Treat*. 2005; 91: 179–186.
89. Lixia M, Zhijian C, Chao S, Chaojiang G, Congyi Z. Alternative splicing of breast cancer associated gene BRCA1 from Breast Cancer Cell Line. *J Biochem Mol Biol*. 2007; 40(1): 15- 21.
90. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*. 2004;95(11): 866-871.

91. Greenberg RA. BRCA1, Everything but the RING? *Science*. 2011;334 (6055): 459-460.
92. Chung C, Leung YL, Glover JNM. BRCT domains, Easy as one, two, three, Cell Cycle 10. *Landes Bioscience*. 2011; 2461-2470.
93. Yi W, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin, J. BASC, A Super Complex of BRCA1-Associated Proteins involved in the Recognition and Repair Of Aberrant DNA Structures. *Genes&Development*. 2000; 14: 927-936.
94. Mueller CR, Roskelley CD. Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2003; 5: 45-52.
95. Niwa Y, Oyama T, Nakajima T. BRCA1 expression status in relation to DNA methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast cancers, *Jpn. J. Cancer Res*. 2000; 91, 519–526.
96. Rice JC, Ozçelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis*. 2000;21(9): 1761-1765.
97. Suen TC, Goss PE. Transcription of BRCA1 is dependent on the formation of a specific protein-DNA complex on the minimal BRCA1 Bidirectional promoter. *J Biol Chem*. 1999; 274:31297-31304.
98. Zheng L, Li S, Boyer T, Lee W. Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene*. 2000; 6159-6175.
99. Catteau A, Morris JR. BRCA1 methylation: a significant role in tumour development? *Semin Cancer Biol*. 2002; 12: 359–371.
100. Somasundaram K. Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair perhaps through transcription. *J Cell Biochem*. 2003; 88:1084–1091 .
101. Narod SA, Foulkes WD BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:665–676.
102. Jonnathan M. Detection of BRCA 1 mutations in women with early-onset ovarian cancer by use of the protein truncation test. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88(8): 552-553.
103. Matsushima M. Mutation analysis of the BRCA1 gene in 76 Japanese ovarian cancer patients: four germline mutations, but no evidence of somatic mutation. *Hum Mol Genet*. 1995;4(10): 1953-1956.

104. Wooster R. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995; 378 : 21-28.
105. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat gener*. 1996;12: 333-337.
106. Fruscaizo A, Damante G, Calcagno A, Di Loreta C, Marchesoni D. Four primary malignancies successively occurred in a BRCA2 mutatin carrier: A case report. *Cancer Invest*. 2006; 24: 611-614.
107. Johnathen M. Transcriptional Activation functions in BRCA2. *Nature*. 1997;386:772-773.
108. Fattaneh A. Tavassoli PD. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, IARC Pres. 2003.
109. Chodosh LA. Ekspression of BRCA1 and BRCA2 in normal and neoplastic cells. *J Mammary Gland Biol Neoplsia*, 1998;3: 389-402.
110. [http://fpbmonitor.com/fulltextcontent/ERM/ERM3\\_14/S146239940100309Xsup007.gif](http://fpbmonitor.com/fulltextcontent/ERM/ERM3_14/S146239940100309Xsup007.gif) Erişim: 14.12.2013
111. Patel KJ, Yu VP, Lee H. Involvement of BRCA2 in DNA repair. *Mol Cell*. 1998;1: 347-357.
112. [http://www.nature.com/nsmb/journal/v14/n6/fig\\_tab/nsmb0607-461\\_F1.html](http://www.nature.com/nsmb/journal/v14/n6/fig_tab/nsmb0607-461_F1.html) Erişim: 21.08.2013.
113. Bane A, O'Malley FP. Familial Breast Cancer. In: Breast Pathology. A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology. Ed: O'Malley FP, Pinder SE. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2006.
114. Gezeery AE, Mahmoud N, Moustafa A, Mahrous H, Mahmoud H, El-Menam N. BRCA1 Gene Mutation in Familial Breast Cancer. *Turk J Cancer*. 2008; 38(4):167-174.
115. Vogel KJ, Atchley DP, Erlichman J, Broglio KR, Ready KJ, Valero V. BRCA1 and BRCA2 genetic testing in Hispanic patients: mutation prevalence and evaluation of the BRCAPRO risk assessment model. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 4635-4641.
116. John EM, Miron A, Gong G, Phipps AI, Felberg A, Li FP *et al*. Prevalence of pathogenic BRCA1 mutation carriers in 5 US racial groups. *JAMA* 2007; 298; 2869-2876.



117. Weitzel JN, Lagos V, Blazer KR, Nelson R, Ricker C, Herzog J. Prevalence of BRCA mutations and founder effect in high-risk Hispanic families. *Cancer Epi Biomarkers Prev.* 2005;14: 1666-1671.
118. Narod SA. Screening for BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Mexico: The public health perspective. *Salud Publica Mex.* 2009;51(2):191-196.
119. Purcu DU, Karaca B, Kapkac M, Ozdemir N, Uzunoglu S, Uslu R. High-Resolution Melting Analysis for Screening of Turkish Germline Mutations in BRCA1 and BRCA2. *UHOD.* 2010;20(4):235-240.
120. Yazici H, Bitisik O, Akisik E, Cabioglu N, Saip P, Muslumanoglu M, Glendon G, Bengisu E, Ozbilen S, Dincer M, Turkmen S, Andrulis IL, Dalay N, Ozcelik H. BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish breast/ovarian families and young breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2000;83: 737-742.
121. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA and Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1 mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet.* 1994; 343:692-695.
122. Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T, Avishai N, Kaback MM, Collins FS, Brody LC. The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nature Genet.* 1995;11: 198-200.
123. Oddoux C, Struewing JP, Clayton CM, Neuhausen S, Brody LC, Kaback M, Haas B, Norton L, Borgon P, Jhanwar S, Goldgar D, Ostrer H, Offit K. The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nature Genet.* 1996;14: 188-190.
124. Antoniou AC, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies. *J Med Genet.* 2005;42:602–603.
125. Worman HJ, Courvalin JC. Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev.* 2003;2:211-217.
126. <http://www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-87578/h/istaturk2012.pdf> Erişim: 22.12.2013

127. Manguoglu AE, Lüleci G, Özçelik T, Çolak T, Schayek H, Akaydin M, Friedman E. Germline Mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* Genes in Turkish Breast/Ovarian Cancer Patients. *Hum Mutat.* 2003;21(4):444-445.
128. Negură A, Negură L. *BRCA1* 185delAG mutation can be easily detected by an adapted allele-specific PCR. *Annals University Alexandru, Section of Genetics and Molecular Biology.* TOM XIII, 2012.
129. Gerhardus A, Schleberger H, Schlegelberger B, Gadzicki D. Diagnostic accuracy of methods for the detection of *BRCA1* and *BRCA2* mutations: a systematic review. *Eur J Hum Genet.* 2007;15: 619-627.
130. Kumaravel Somasundaram. *BRCA1* and *BRCA2* Genes and Inherited Breast and/or Ovarian Cancer: Benefits of Genetic Testing. *Indian J Surg Oncol.* 2010;1(3):245–249.