



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİ GELİŞİMİNDE RİSK FAKTÖRÜ OLARAK BRCA1 ve  
BRCA2 GENLERİNİN miRNA BAĞLANMA BÖLGELERİNDEKİ GENETİK  
VARYASYONLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Seyit Ali Volkan POLATKAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA – 2015**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİ GELİŞİMİNDE RİSK FAKTÖRÜ OLARAK BRCA1 ve  
BRCA2 GENLERİNİN miRNA BAĞLANMA BÖLGELERİNDEKİ GENETİK  
VARYASYONLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Seyit Ali Volkan POLATKAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Mustafa Şehsuvar GÖKGÖZ**

**BURSA - 2015**

## İÇİNDEKİLER

Özet.....	iii
Summary.....	iv
GİRİŞ.....	1
Meme Kanserinin Toplumdaki İnsidansı.....	2
Meme Kanseri Tedavisinin Geçmişi, Bugünü ve Geleceği.....	3
Meme Kanserinin Sınıflandırılması.....	4
Meme Kanserinde TNM Evrelemesi.....	5
WHO 2012'ye Göre Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması.....	10
Meme Kanserinin Oluşumunda Rol Oynayan Genetik Faktörler.....	15
Ailesel ve/veya Erken Yaş Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması.....	16
Hücre Döngüsü'nün Kontrolü, DNA Tamir MeKanızmaları.....	17
<i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genlerinin Yapısal Özellikleri ve Meme Tümörigenezi Üzerindeki Etkileri.....	19
<i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Gen İfadelerinin Düzenlenmesinde Epigenetik Faktörlerin Rolü.....	21
<i>BRCA1/2</i> Genlerinin 3'UTR' lerinin Taranması Amacıyla Kullanılan Yöntemler.....	23
Heterodupleks Analizi (HDA).....	24
DNA Dizi Analizi.....	25
GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
Gereç.....	28
Kullanılan Aletler.....	28
Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	28
Yöntem.....	29
Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri.....	29

Periferik Kan Örneklerinden Genomik DNA Elde Edilmesi.....	30
<i>BRCA1/2</i> Genlerinin 3'UTR' lerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu.....	31
Agaroz Jel Elektroforezi.....	32
Heterodupleks Analizi.....	33
DNA Dizi Analizi.....	34
İstatistiksel Analiz.....	37
BULGULAR.....	38
Hasta Grubu ve Klinik Özellikler.....	38
Periferik Kan Örneklerinden Elde Edilen Genomik DNA'ların Optik Dansiteleri.....	40
<i>BRCA1/2</i> genlerinin 3'UTR' lerindeki Genetik Varyasyonların Değerlendirilmesi.....	41
Web Tabanlı Programlar İle Gerçekleştirilen Biyoanalizler.....	44
c.*1287C>T (rs12516) ve c.*105A>C (rs15869)'nin Hastaların Klinik Özellikleri Üzerindeki Etkisi.....	45
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	52
KISALTMALAR.....	59
TEŞEKKÜR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	61

## ÖZET

*BRCA1/2* gen mutasyonlarının meme kanseri riskini arttırdığı uzun süredir bilinmekte olup, meme kanseri hastalarının rutin BRCA taramalarında bu genlerin protein kodlayan bölgeleri ve intron-ekzon sınırlarındaki genetik değişimler araştırılmaktadır. Son dönemde gerçekleştirilen çalışmalar, genlerin 3' transle olmayan bölgelerindeki (3'UTR) polimorfizmlerin mikroRNA (miRNA) bağlanma fonksiyonunu etkilediklerini ve hastalarda kanser gelişimi riskinin belirlenmesinde değerlendirilebilecek genetik belirteçler olabileceklerini ortaya koymuştur. Bu nedenle çalışmamızda, ailesel / erken yaş meme kanseri hastalarında, *BRCA1/2* genlerinin 3'UTR 'sindeki risk faktörü olabilecek genetik değişimleri belirlemeyi amaçladık.

46 *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan ve 54 *BRCA1/2* mutasyonu taşımayan toplam 100 ailesel / erken yaş meme kanseri hastası ve 47 kontrolde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin 3'UTR' leri heterodupleks ve DNA dizi analizleri ile tarandı. Hastaların % 27' sinin *BRCA1* geninde c.\*1287C>T (rs12516), ve hastaların % 24' ünün *BRCA2* geninde c.\*105A>C (rs15869) polimorfizleri belirlendi. Ayrıca, gerçekleştirilen Fisher's Exact Test' i ile hastalarda *BRCA1* mutasyonu ile 3'UTR bölgesindeki c.\*1287C>T (rs12516) polimorfizminin anlamlı bir sıklıkla birlikte görüldüğü saptandı ( $p = 0.035$ ).

Bulgularımız *BRCA1* geni 3'UTR 'sindeki c.\*1287C>T (rs12516) polimorfizminin meme kanseri gelişme riskinin belirlenmesinde genetik bir belirteç olma potansiyelini ve *BRCA1* geninin kodlanmayan bölgelerindeki genetik varyasyonların bu genin fonksiyonunu etkileyerek ailesel / erken yaş meme kanseri gelişme riskini arttırabileceğini destekler niteliktedir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri- *BRCA1* - *BRCA2* - 3'UTR - SNP – erken yaş – Türkiye

## SUMMARY

### **Evaluation of Genetic Variations In miRNA-Binding Sites Of BRCA1 And BRCA2 Genes As Risk Factors For The Development Of Early-Onset And/Or Familial Breast Cancer**

Mutations in the *BRCA1/BRCA2* gene confer a substantial increase in breast cancer risk, yet routine clinical genetic screening is limited to the coding regions and intron-exon boundaries, precluding the identification of mutations in noncoding and untranslated regions. Because 3' untranslated region (3'UTR) polymorphisms disrupting microRNA (miRNA) binding can be functional and can act as genetic markers of cancer risk, we aimed to determine genetic variation in the 3'UTR of *BRCA1/BRCA2* in familial and early-onset breast cancer patients with and without mutations in the coding regions of *BRCA1/BRCA2* and to identify specific 3'UTR variants that may be risk factors for cancer development.

The 3'UTRs of the *BRCA1* and *BRCA2* genes were screened by heteroduplex analysis and DNA sequencing in 100 patients from 46 *BRCA1/2* families, 54 non-*BRCA1/2* families, and 47 geographically matched controls. SNPs c.\*1287C>T (rs12516) (*BRCA1*) and c.\*105A>C (rs15869) (*BRCA2*) were identified in 27% and 24% of patients, respectively. These 2 variants were also identified in controls with no family history of cancer (23.4% and 23.4%, respectively). In addition, there was a statistically significant relationship between the *BRCA1* gene polymorphism c.\*1287C>T (rs12516) and *BRCA1* mutations ( $p=0.035$ ) by Fisher's Exact Test.

We suggest that, SNP c.\*1287C>T (rs12516) of the *BRCA1* gene may have potential use as a genetic marker of an increased risk of developing breast cancer and likely represents a non-coding sequence variation in *BRCA1* that impacts *BRCA1* function and leads to increased familial and/or early-onset breast cancer risk in the Turkish population.

**Key Words:** Breast cancer - *BRCA1* - *BRCA2* - 3'UTR - SNP - early onset - Turkey

## GİRİŞ

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık gözlenen kanser türü olup kadın kanser ölümlerinin başında gelmektedir (1). Günümüzde yaklaşık 8 kadından 1' i ( % 12) meme kanserine yakalanmaktadır (2). Meme kanseri vakalarının % 5 – 10' unun genetik değişimler ile ilişkili olduğuna inanılmakta ve bu vakalarda 30 yaş öncesi meme kanserine yakalanma sıklığı % 25' e ulaşmaktadır (3).

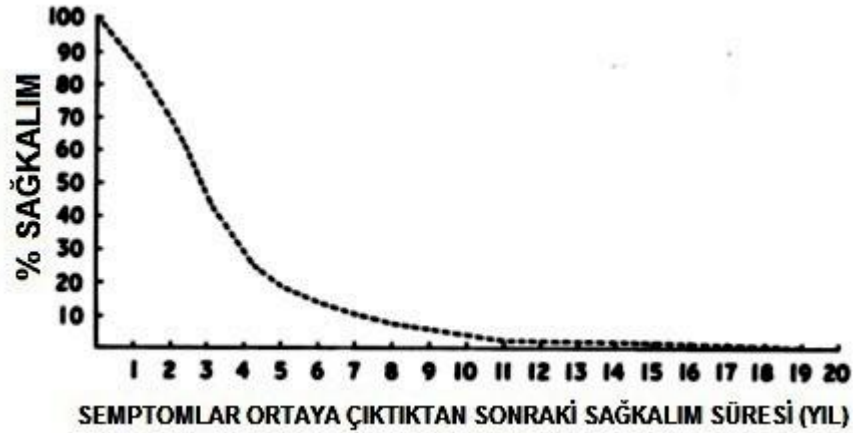
Genetik değişimlerden kaynaklanan meme kanseri vakalarının büyük bir çoğunluğu kromozom 17q12-21'da yer alan *BRCA1*(*Breast Cancer Susceptibility-meme kanseri yatkınlık-1*) ve kromozom 13q12-13'te yer alan *BRCA2*(*Breast Cancer Susceptibility-meme kanseri yatkınlık-2*) genlerindeki kalıtsal mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (4, 5). Bu genlerdeki mutasyonlar tüm meme kanserlerinin % 2 – 3' ünün ve ailesel meme kanserlerinin % 30 – 40' inin oluşumundan sorumludurlar (6, 7). Bu genlerdeki mutasyonların belirlenmesi bireylerde meme kanseri riskinin azaltılması ile ilgili stratejilerin ve uygun tedavisi yöntemlerinin geliştirilmesi için yarar sağlamaktadır (8). Ancak, bazı hastaların *BRCA1/2* mutasyonu taramalarında herhangi bir genetik değişim belirlenmemesine rağmen uygulanan tedavi yöntemlerine iyi yanıt vermedikleri bilinmektedir (9). Günümüze kadar *BRCA1/2* genlerinin genetik taramalarında yalnızca bu genlerin protein kodlayan bölgeleri araştırılmıştır. Ancak, son yıllarda genlerin 3'UTR(Untranslated region-okunmayan bölge) bölgelerine eşlenik olarak bağlanarak, mRNA ekspresyonunu post transkripsiyonel aşamada kontrol eden miRNAların, protein ifadesinin düzenlenmesindeki önemi ortaya konmuştur (10, 11). *BRCA1/2* genlerinin 3'UTR bölgelerinde meydana gelen genetik değişimler miRNA' ların bu bölgeye farklı afinitelerle bağlanmasına ve sentezlenen proteinin ifadesinin değişmesine yol açmakta böylece hastanın uygulanan tedaviden fayda sağlayamamasına sebep olmaktadır (12). Çeşitli popülasyonlarda gerçekleştirilen araştırmalarda, bu genlerin miRNA bağlanma bölgelerinde meydana gelen tek nükleotid değişimleri gösterilmiştir



(10, 13 – 17). Ancak, Türk popülasyonunda *BRCA1/2* genlerinin 3'UTR bölgelerindeki genetik değişimleri araştıran bir çalışma literatürde yer almamaktadır.

### **Meme Kanserinin Toplumdaki İnsidansı**

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nun 2012 yılındaki istatistiklerine göre kardiyovasküler hastalıklardan sonra, dünya genelinde en sık ölümlerle sonuçlanan vakalar kanser vakalarıdır (18). 2012' de yaklaşık 14.1 milyon insan kansere yakalanırken, 8.2 milyon hasta bu nedenle hayatını kaybetmiştir (18). Meme kanseri dünyada en sık görülen 2. kanser türüdür. Ancak, son yıllarda, bu kanser türünün akciğer kanserini de geçerek, yaklaşık % 25 görülme oranı ile kadınlarda en sık rastlanılan ve en sık ölüme yol açan (1700000/522000) kanser türü olduğu belirlenmiştir (18, Şekil-1).



**Şekil-1:** Tedavi edilmeyen meme kanserlerinde sağkalım süresi (250 vaka) (19).

T.C. Sağlık Bakanlığı' nın 2008 yılında gerçekleştirdiği istatistiksel analizlerde, meme kanserinin Türkiye' de de kadınlarda en sık karşılaşılan kanser türü olduğu belirlenmiştir (20). Son yıllarda meme kanseri tedavisi ile ilgili araştırmalarda ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen, 2012 yılı istatistiksel verilerine göre, 2008 yılına kıyasla meme kanserine bağlı ölümlerin % 14 oranında arttığı görülmektedir (21). Bu nedenle, meme kanseri tedavisinde başarının artırılabilmesi için bu hastalığın oluşum

mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve alternatif tanı-tarama metotlarının geliştirilmesi önem taşımaktadır.

## **Meme Kanseri Tedavisinin Geçmişi, Bugünü ve Geleceği**

Meme kanseri MÖ 16. yüzyıldan beri bilinmekte olup, bu hastalık ilk kez Edwin Smith'in cerrahi papirüsünde, erkek bir meme kanseri hastadan bahsedilerek tüm klinik özellikleri ile tarif edilmekte ancak bu hastalık için bir tedavi yönteminin bulunmadığı ifade edilmektedir. Daha ileriki yıllarda en önemli cerrahlardan biri olan Leonides (MS100) tarafından ilk meme kanseri mastektomisi gerçekleştirilmiştir. Gladyatörlerin başhekimisi ve Roma İmparatorlu saray hekimi olarak tanınan Galen (MS 129) ise, memede yengece benzer bir tümörü tanımlamış ve bu hastalık için sonraki yüzyıllar boyunca kaynak olarak kullanılan tedavi yaklaşımlarından bahsetmiştir. Ayrıca, ilk kez 1757 yılında Fransız hekim Henri François Le Dran tarafından, meme kanserinin lokal bir hastalık olarak başladığı, ilerledikçe koltuk altı lenf bezlerine ve buradan da yayılarak genel dolaşıma geçerek uzak organlara yayıldığı ifade edilmiş ve 1894' te, Amerikalı cerrah William Stewart Halsted tarafından ilk mastektomi yapılarak, 50 vakalık radikal mastektomi serisi ile meme cerrahisinin temeli atılmıştır. 1970' li yıllara gelindiğinde ise Fisher ve arkadaşlarının meme kanseri ile ilgili olarak ortaya attığı sistemik hastalık hipotezi kabul görmeye başlamıştır (22).

Günümüze kadar geçen zaman zarfında birçok kanser türü ile ilgili bilgilerimiz artmış, cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapide sağlanan başarıda önemli artış sağlanmıştır (21). Bununla birlikte, bugüne kadar meme kanserinin etiyolojisi, gelişimi, tanı ve tedavi yaklaşımları açısından sahip olunan bilgi birikimi diğer birçok kanser türü ile ilgili bilgilerimizden daha fazladır (21). Bu bilgi birikiminin klinik uygulamalara yansması 2 ana başlıkta açıklanabilmektedir.

İlk olarak son dönemde meme kanserleri de dahil olmak üzere birçok kanser türü ile ilgili olarak gerçekleştirilen araştırmalar sonucunda geliştirilen

kişiyeye özel tedavi yaklaşımları, kullanılan konvansiyonel kemoterapi ajanlarına ciddi bir alternatif oluşturmaktadır (23, 24). Güncel meme kanseri tedavisinde kullanımının yaygınlaşması ile klinik uygulama önemli yer edinen bu yaklaşım sayesinde, hastaların tedavi komplikasyonlarında azalma gözlenirken, sağkalım oranlarında artış olduğu ve uygulanan tedavi maliyetlerinin azaldığı görülmektedir (25). Bu nedenle, meme kanserinin oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan genlerin ve bu genlerin rol oynadığı moleküler sinyal yollarının aydınlatılmasına yönelik olarak gerçekleştirilen araştırmaların, bu hastalığın kişiyeye özgü tedavi yaklaşımları ile tedavisinde sağlanan başarıyı arttıracığına inanılmaktadır (25).

İkinci olarak, meme kanseri hastalarında gerçekleştirilen genetik analizler sonucunda, bu hastaların %10' luk bir kısmının kalıtsal özellik taşıdığı, %25' inin ise genç yaşta ortaya çıktığı belirlenmiştir (3). Özellikle hastalığın ailesel olarak kalıtıldığı saptanan hastalarda genetik araştırmaların yapılması hasta için uygun tedavi yaklaşımının belirlenmesi ve sonraki nesildeki bireylerin hastalık riskinin ortaya konması açısından önem taşımaktadır (26).

Her ne kadar mevcut gelişmelerle meme kanserinin tedavisinde sağlanan başarıda ilerleme kaydedilmiş olsa da, günümüzde bu hastalık halen kadınlarda en sık rastlanan ve ölüm oranı yüksek olan bir kanser türüdür. Bu nedenle, bu hastalığın daha iyi anlaşılmasına ve tanı ve tedavisindeki başarıyı arttıracak yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

## **Meme Kanserinin Sınıflandırılması**

Meme kanserinin sınıflandırılması ve tedavisinde yaygın olarak kabul gören yaklaşım klinik ve patolojik evrelemedir. 1942' de Pierre Deroix tarafından tümör boyutu, lenf nodu ve uzak metastaz durumu gibi morfolojik özellikler dikkate alınarak ilk Tümör-Nod(lenf)-Metastaz (TNM) sınıflandırmasını gerçekleştirdi. Daha sonra, Pierre Deroix' in TNM

sınıflandırma yönteminden yararlanılarak, 1958 yılında, Ulusal Kanser Birliği tarafından yeni bir TNM temelli meme kanseri sınıflandırmasını oluşturuldu. 1977' de, Amerikan Kanser Birliği Komitesi (AJCC) kendi TNM temelli sınıflamasını yayınladı. 1987' de ise, Ulusal Kanser Birliği ve AJCC' nin oluşturdukları TNM sınıflandırması arasındaki farklar ortaya konularak ortak bir sınıflandırma yayınlandı. Son baskısı AJCC tarafından 2012' de yayınlanan TNM sınıflandırması, günümüzde meme kanserinin prognoz ve tedavi planının belirlenmesinde en yaygın sınıflandırma olarak kabul edilmektedir (27, Tablo-1).

## **Meme Kanserinde TNM Evrelemesi**

### Primer Tümör (T)

Patolojik ve klinik sınıflamalarda primer tümör aynı şekilde tanımlanmaktadır. Tümör boyutu ölçümü fizik muayene ile yapıldıysa, sınıflamada T1, T2 veya T3 ana grupları, mamografik veya patolojik olarak yapıldıysa T1' in alt grupları kullanılmaktadır. Primer tümöre yapılan sınıflandırma aşağıdaki gibidir.

- TX : Primer tümör saptanamamaktadır
- T0 : Primer tümör yok
- Tis : Karsinoma in situ
- Tis(DCIS) : Duktal karsinoma in situ
- Tis(LCIS) : Lobuler karsinoma in situ
- Tis (Paget): Meme başının kitlesiz Paget hastalığı (Tümör olan Paget hastalığında sınıflama, tümörün boyutuna göredir.)
- T1 : Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha az
- T1mic : En büyük boyutu 0.1 cm veya daha az olan mikroinvazyon,
- T1a : En büyük boyutu 0.1 cm.den büyük olan ancak 0.5 cm.yi geçmeyen tümör
- T1b : En büyük boyutu 0.5 cm.den büyük olan ancak 1 cm.yi geçmeyen tümör

- T1c : En büyük boyutu 1 cm.den büyük olan ancak 2 cm.yi geçmeyen tümör
- T2 : En büyük boyutu 2 cm.den büyük olan ancak 5 cm.yi geçmeyen tümör
- T3 : En büyük boyutu 5 cm.den büyük olan tümör
- T4 : Herhangi bir boyutta ancak (a) göğüs duvarına veya (b) cilde direkt yayılım mevcut
- T4a : Pektoral kasa ulaşmamış göğüs duvarı yayılımı
- T4b : Meme cildinde ödem (peau d'orange da dahil) veya ülserasyon, veya aynı memede satellit deri nodülleri T4c T4a ve T4b birlikte
- T4d : Enflamatuvar karsinom

#### Bölgesel Lenf Nodülleri (N)

##### Klinik Sınıflama:

- NX : Bölgesel lenf nodları saptanamamaktadır (örn. daha önce çıkartılmış)
- N0 : Bölgesel lenf nodu metastazı yok
- N1 : İpsilateral lenf nod(lar)ında metastaz (fikse değil)
- N2 : Fikse veya gruplaşmış ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz veya klinik olarak belirgin (aksiller lenf nodu metastazı olmadığı durumlarda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal nodlarında metastaz)
- N2a : Birbirlerine veya çevre dokulara fikse ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz
- N2b : Sadece klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı olmadığına klinik olarak belirgin (ipsilateral internal mammaryal nodlarda metastaz olduğunda)
- N3 : Aksiller lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın ipsilateral infraklavikular lenf nod(ları) metastazı veya klinik olarak belirgin

(ipsilateral internal mammaryal lenf nod(ları) metastazı ile birlikte klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı; veya aksiller ya da internal mammaryal lenf nodu metastazı olsun ya da olmasın ipsilateral supraklavikular lenf nod(ları) metastazı

- N3a : İpsilateral infraklavikular lenf nod(lar)ında metastaz
- N3b : İpsilateral internal mammaryal lenf nod(lar)ında veya aksiller lenf nod(ları)nda metastaz
- N3c : İpsilateral supraklaviküler lenf nod(ları)nda metastaz

Patolojik Sınıflama (pN)a:

Patolojik Sınıflama sentinel lenf nodu diseksiyonu uygulanan veya uygulanmayan aksiller lenf nodu diseksiyonuna göre yapılmaktadır

- pNX : Bölgesel lenf nodları saptanamamakta (örn. patolojik inceleme için daha önce çıkartılmış veya çıkartılmamış)
- pN0 : Histolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı olmayan, izole tümör hücreleri(ITH) için ek inceleme yok
- pN0(i-) : Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif IHK
- pN0(i+) : Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif IHK, 0.2 mm.den geniş IHK kümesi yok
- pN0(mol -): Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif moleküler bulgular (RT-PCR)b
- pN0(mol+): Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif moleküler bulgular (RT-PCR)b
- pN1 : 1-3 arası aksiller lenf nodlarında, ve/veya internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile saptanan mikroskopik hastalıkla birlikte metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil
- pN1mi : Mikrometastaz ( 0.2 mm.den geniş, 2.0 mm.den geniş değil)
- pN1a : 1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz

- pN1b : Sentinel lenf nodu diseksiyonu ile internal mammaryal nodlarda mikroskopik hastalık olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil
- pN1c : 1-3 adet aksiller lenf nodunda ve internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile mikroskopik olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil .
- pN2 : 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz, veya aksiller lenf nodu metastazı olmadığında internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz
- pN2a : 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm.den büyük en az bir tümör odağı)
- pN2b : Aksiller lenf nodu metastazı yokken, internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz
- pN3 : 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda, veya infraklaviküler lenf nodlarında, veya 1 ya da daha fazla aksiller lenf nodu pozitif olduğunda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarında metastaz; veya internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak negatif mikroskopik metastazla birlikte 3' ten daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz; veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz
- pN3a : 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm.den büyük en az bir tümör odağı), veya infraklaviküler lenf nodlarına metastaz
- pN3b : 1 veya daha fazla pozitif aksiller lenf nodu varlığında klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nodu metastazı; veya sentinel lenf nodu diseksiyonuyla saptanan fakat klinik olarak belirgin olmayan mikroskopik hastalıkla birlikte 3 veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya internal mammaryal lenf nodlarında metastaz.
- pN3c : İpsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

Uzak Metastaz (M):

- MX : Uzak metastaz bulunamıyor
- M0 : Uzak metastaz yok
- M1 : Uzak metastaz var (Tümörün olduğu tarafta supraklaviküler lenf nodları ve karşı memenin bölgesel lenf nodlarına metastazlar dahil)

Histopatolojik Grade(G):

Meduller karsinom dışında, invaziv lobuler ve müsinöz karsinomlar da dahil olmak üzere tüm invaziv meme kanserleri derecelendirilmektedir.

- Gx : Değerlendirilemiyor
- G1 : İyi diferansiye
- G2 : Orta derecede diferansiye
- G3 : Kötü Diferansiye
- G4 : İndiferansiye

Rezidüel Tümör (R):

Hastada küratif amaçlı tedaviden sonra kalan tümör (örn. Kür için cerrahi rezeksiyon) R sınıflaması adı altında bir sistemle sınıflanmaktadır.

- RX : Rezidü tümör varlığı gösterilememektedir
- R0 : Rezidü tümör yok
- R1 : Mikroskopik rezidü tümör
- R2 : Makroskopik rezidü tümör



**Tablo-1:** Meme kanserinde TNM Evrelemesi (AJCC Meme Kanseri Evreleme:7. Baskı)

Evre	T	N	M
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1*	N0	M0
Evre IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
Evre IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
Evre IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
Evre IIB	T3	N0	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
Evre IIIB	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Evre IIIC	T4	N2	M0
	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M<1/td>

### WHO 2012' ye Göre Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması

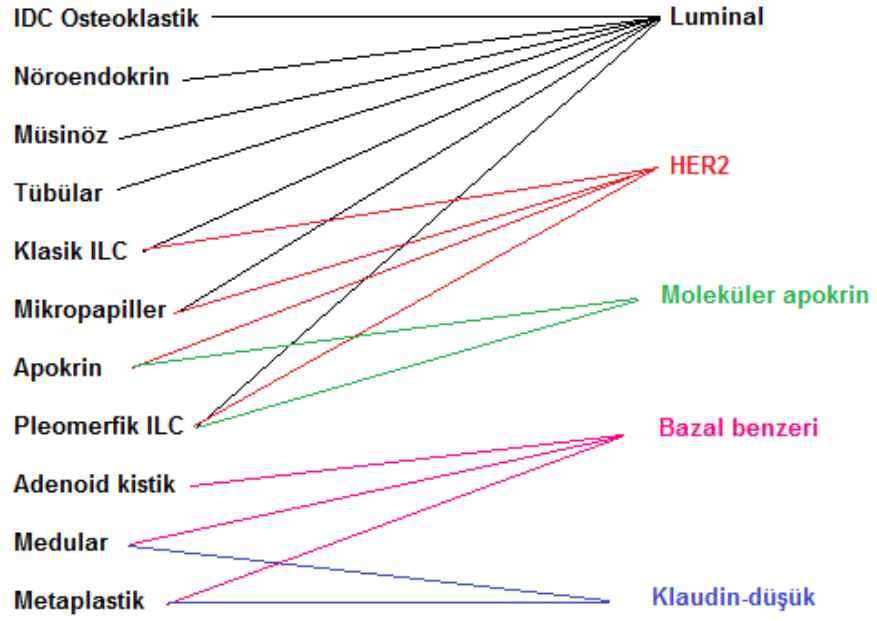
Son yıllarda, meme kanserinin biyomoleküler belirteçlerinin ve gen ekspresyon profilinin araştırıldığı çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. WHO, 2012' de yayınladığı meme kanseri sınıflandırmasında klasik morfolojik değerlendirmenin yanısıra, bu güne kadar belirlenen genetik ve moleküler meme kanseri belirteçlerinden de yararlanmıştır. WHO' nun 2012' de yayınladığı meme kanseri sınıflandırması aşağıda belirtildiği gibidir (18).

- Epitelyal Tümörler
  - o Mikroinvazif Karsinoma
- İnvazif Meme Kanseri
  - o Non-spesifik tip invazif karsinoma
    - Pleomorfik karsinom
    - Osteoklast benzeri stromal dev hücreli karsinoma
    - Koryokarsinomatöz özellikli karsinoma
    - Melanotik özellikli karsinoma
  - o İnvazif Lobüler Karsinoma
    - Klasik lobüler karsinoma

- Solid lobüler karsinoma
- Alveolar lobüler karsinoma
- Pleomorfik lobüler karsinoma
- Tubulolobüler karsinoma
- Mix lobuler karsinoma
- Tübüler karsinoma
- Kribriform Karsinoma
- Müsinöz karsinoma
- Medüller özellikli karsinoma
  - Medüller karsinoma
  - Atipik medüller karsinoma
  - Medüller özellikli Non-spesifik tip invazif karsinoma
- Apokrin diferansiasyonlu karsinoma
- Taşlı yüzük diferansiasyonlu karsinoma
- İnvazif mikropapiller karsinoma
- Non-spesifik tip metaplastik karsinoma
- Nadir tipler
- Epiteyal-myoepiteyal tümörler
  - Pleomorfik adenom
  - Adenomyoepiteyoma
  - Adenoid kistik karsinom
- Prekürsör lezyonlar
  - Duktal karsinoma in situ
  - Lobüler neoplazi
    - Lobüler karsinoma in situ
    - Atipik lobüler hiperplazi
- İntraduktal proliferatif lezyonlar
- Papiller lezyonlar
- Benign epiteyal proliferasyonlar
- Mezenkimal Tümörler
- Fibroepiteyal tümörler
- Nipple tümörleri

- Malign lenfoma
- Metastatik tümörler

Klasik histopatolojik ve klinik parametrelerle değerlendirilen hastalarda prognoz tayini ve tedavi planlamasında göreceli olarak başarı sağlanıyor olsa da, tümörlerin büyük bir çoğunluğu heterojen yapıda olduğundan, yapı ve fonksiyon açısından karmaşık özellikler göstermektedirler (28, 29). Ayrıca, tümörlerde görülen genetik ve fizyolojik farklılıklar, hastaların uygulanan tedavilerden sağlayacağı yararın öngörülmesini zorlaştırmaktadır (29). Günümüzde gerçekleştirilen çalışmalar, yakın gelecekte hastaların prognozunda ve uygun tedavi yönteminin tayininde tümörlerin genetik ve moleküler özelliklerinden etkin bir şekilde yararlanılacağını göstermektedir (30 – 34). Günümüze kadar gerçekleştirilen gen ekspresyonu analizleri, meme kanserlerinin farklı moleküler özelliklerine göre heterojen gruplara ayrılabilceğini ortaya koymuştur (30). 2000 yılında, Perou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir hiyerarşik kümeleme çalışması sonucunda, meme kanserlerinin, luminal, bazal benzeri, normal benzeri ve HER2' den(Human epidermal growth factor receptor-2) zengin olmak üzere dört temel alt tipi olduğu ifade edilmiştir (35). Daha sonraki araştırmalarda normal benzeri alt tipi normal sınıflamadan çıkarılmış ve luminal tip meme kanserinin Luminal A ve Luminal B olmak üzere prognostik öneme sahip iki farklı tipinin olduğu belirlenmiştir (34, 36, 37). Daha ileriki dönemde gerçekleştirilen çalışmalarda ise, interferon zengin, klauidin-düşük, moleküler apokrin gibi yeni alt tipler tanımlanmıştır (36, 37 – 40, Şekil-2).



**Şekil-2:** Meme kanserinin özel tipleri ve moleküler alt tipleri

(IDC:Invasive ductal carcinoma, ILC:invazive lobuler carcinoma,HER2: Human epidermal growth factor receptor-2)

Günümüzde ise, meme tümörlerinin gen ekspresyon profillerinin belirlenebilmesi ile ilgili teknolojilerdeki gelişmeler sonucunda, hiyerarşik kümelerin tümörün sınıflandırılmasında yetersiz kaldığı durumlarda, prognozda oldukça yarar sağlayan bireye özgü tümör tiplendirilmesinde önemli gelişmeler kaydedilmektedir (37). Bu konuda süregelen çalışmalar sonucunda, bugüne kadar meme kanseri üzerindeki etkisi belirlenen gen gruplarını değerlendirerek analiz yapabilen, oncotype Dx, MammaPrint, Genomic Grade Index PAM50(ROR-S), Breast Cancer Index, EndoPredict gibi testler geliştirilmiştir. Ancak, tümör tiplendirmesinde yaygın olarak kullanılan patolojik biyobelirteçlerin, immünohistokimyasal yöntemler ile belirlenen protein ekspresyon seviyeleri ile moleküler biyolojik yöntemlerle belirlenen gen ekspresyon seviyeleri birbirine benzerlik gösteriyor olmasına rağmen, zaman zaman tümörlerin protein ve gen ifade seviyeleri arasında farklılıklar olduğu da gözlenmektedir (41, 42). Moleküler biyolojik yöntemlerde gen ekspresyon profillerinin analiz edilmesi, immünohistokimyasal yöntemlere göre daha pahalı olması ve klinik uygulamalar için daha ileri araştırmalar gerektirmesi nedeniyle, günümüzde

tümörlerin sınıflandırılmasında immünohistokimyasal yöntemler kullanılmaya devam edilmektedir (43). Her ne kadar, 2011 St Gallen konsensüsünde bazı endikasyonlar dışında tümör tiplendirmesinde gen ekspresyon profillerinin değerlendirilmesine gerek duyulmadığı kararlaştırılmış olsa da, biyomoleküler ve genetik araştırmalar ile tümör tiplerine ait yeni alt sınıflar ve bu sınıfların moleküler özellikleri tanımlanmaya devam edilmektedir.

2011 St Gallen konsensüsünde, güncel klinik uygulama ile uyumlu olarak ER(estrogen receptor), PR(progesterone receptor),HER2 ve Ki67 protein seviyeleri de değerlendirilerek, Luminal A Luminal B, basal benzeri ve Erb-B2 overeksprese olmak üzere 4 ana alt tip belirlenmiştir. Ayrıca, 2011 St Gallen konsensüsünde belirlenen 4 ana alt tip, yakın zamanda gerçekleştirilen en önemli multidisipliner çalışmalardan birisi olan “The Cancer Genome Atlas”ta da onaylanmıştır (44). 2011 St Gallen konsensüsünde belirlenen immünohistokimyasal sınıflandırma aşağıdaki gibidir;

- Luminal A : ER ve/veya PR (+) olup HER2 (-) tir. Ki67 de düşüktür (<%14)
- Luminal B :
  - o Luminal B (HER2 negatif): ER ve/veya PR (+) olup HER2 (-) tir. Ki67 düzeyi yüksektir.
  - o Luminal B (HER2 pozitif): ER ve/veya PR (+), herhangi bir Ki67 düzeyi, HER2 düzeyi yüksek
- Erb B2 overeksprese olan (HER2 (+) –luminal olmayan-) : HER2 yüksek, ER ve PR yok.
- Bazal benzeri : ER,PR,HER2 (-)

Tüm alt gruplar arasında en yaygın görülen ve nihai/hastaliksız sağkalımın en iyi olduğu grup Luminal A grubudur (45). Bu grupta sıklıkla *PIK3CA* mutasyonu ve yüksek seviyede *RB1* ve *cmy-B* ekspresyonu görülmektedir (44). Luminal B grubu ise, Luminal A grubuna göre daha kötü prognozlu bir alt grup olup bu tümörlerde *PIK3CA*'da mutasyon görülme oranı düşük, *TP53*'te mutasyon görülme oranı ise yüksektir. Ayrıca Luminal B'nin

alt tipleri arasında *FOXM1*, *cMYC* ve *RPPA* ekspresyonlarının da yüksek görüldüğü belirtilmektedir (44). En kötü prognozlu olan alt tip Bazal benzeri alt tipidir. Bu tümörler, erken tanı yaşı, tanı anındaki tümör boyutunun büyük olması ve yüksek histolojik evre ile karakterizedirler. *TP53* mutasyonlarının en sık, *PIK3CA* mutasyonlarının ise en az görüldüğü tümörler bazal benzeri tümörlerdir (44). Ayrıca, kötü prognozlu bazal benzeri tümörlerde *BRCA1* geni mutasyonları ve düşük *ER* ekspresyon seviyesi de görülebilmektedir (37). ErbB2 (HER2) overeksprese grupta bazal benzeri gruba benzer şekilde kötü prognoza sahiptir (45). Bu tümörlerde HER1 ve HER2 protein/fosforprotein ekspresyonu seviyesi karakteristik olarak yüksektir. Bununla birlikte *TP53* ve *PIK3CA* mutasyonlarının görülme oranı fazladır. En kısa nihai/hastaliksız sağkalım oranı, Bazal benzeri ve ErbB2 overeksprese gruplarda görülmektedir (34 , 37, 45, 46). Buna karşın ErbB2 ve bazal benzeri grupların KT' den sağladıkları yarar luminal tiplerin sağladıkları yarardan belirgin şekilde yüksektir (47). Bazal benzeri gruptaki hastaların uzak metastaz potansiyeli en yüksek, Luminal B grubundaki hastaların orta düzeyde, Luniman A grubundaki hastaların ise düşük düzeydedir (34, 37).

### **Meme Kanserinin Oluşumunda Rol Oynayan Genetik Faktörler**

Meme kanseri, hücre çoğalması ve gelişiminde rol oynayan sinyal yollarında çok adımlı olarak gerçekleşen genetik değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri oluşumunda rol oynadığı belirlenen en önemli genetik değişimler, Ras-Raf-MAP Kinaz, PI3K-Akt ve JAK-STAT sinyal yollarında iş gören proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşmesi, steroid hormon reseptörlerinin aşırı ekspresyonu ve *TP53*, *PTEN*, *FHIT* ve *RB1* gibi tümör baskılayıcı genlerin sessizleşmesidir (48). Bu genetik değişimler sporadik olarak tümör dokusundaki kanser hücrelerinde gözlemlenebildiği gibi, yaklaşık % 5- 10 oranında gözlenen ailesel meme kanserlerinde, germ hücrelerinde de gözlenebilmektedir (48). Bununla birlikte ailesel meme kanserlerinin büyük bir çoğunluğu DNA tamir mekanizmasında rol oynayan genlerin ifadesinde meydana gelen değişikliklerden

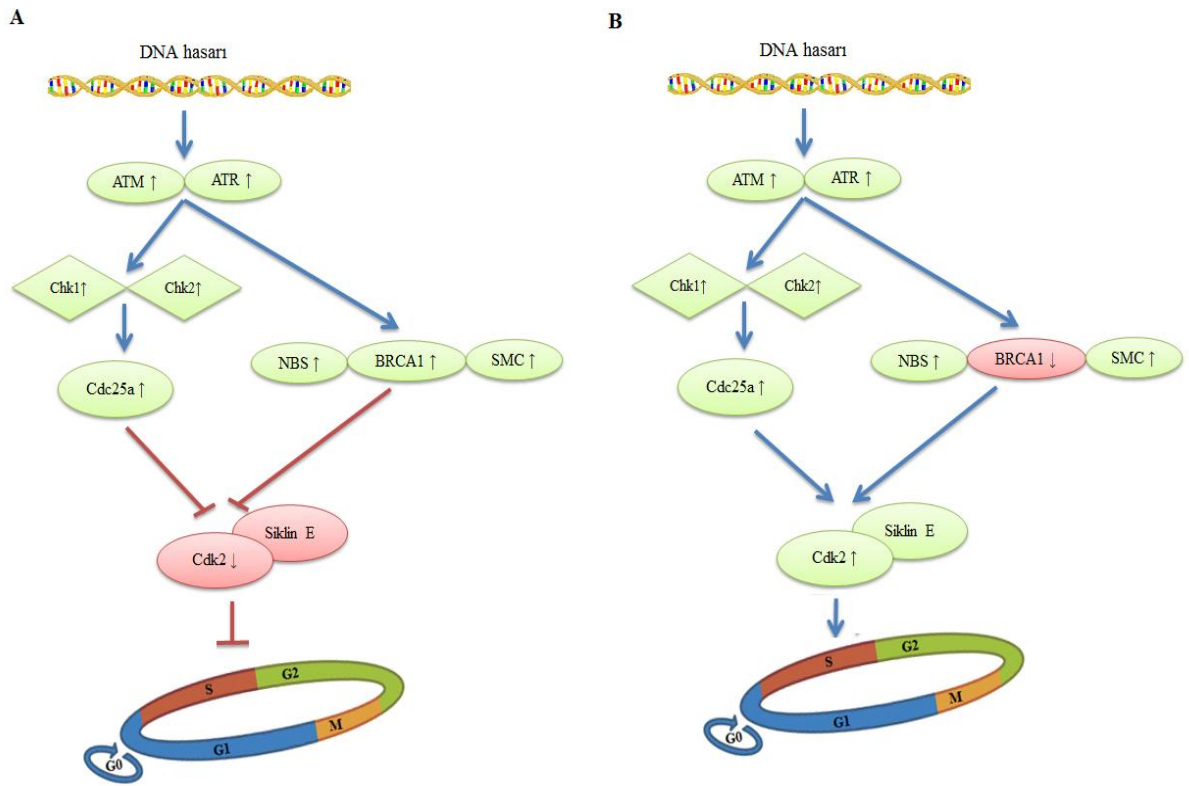
kaynaklanmakta olup sporadik meme kanserinden morfolojik, immünofenotipik ve moleküler özellikleri açısından farklılıklar göstermektedirler (49, 50).

## **Ailesel ve/veya Erken Yaş Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması**

### **Hücre Döngüsü'nün Kontrolü, DNA Tamir MeKanızmaları**

Hücre bölünmesi sırasında DNA' nın yavru hücrelere hasarsız olarak aktarılabilmesi için, hücreler, DNA' da oluşan hasarları tanıyıp onarımını sağlayan enzim sistemlerine sahiptirler. Hücre döngüsünün sağlıklı bir şekilde ilerlemesi, bir basamağın başlamasından önce, bir önceki basamağın tamamlandığını kontrol eden denetim noktaları tarafından denetlenerek sağlanmaktadır. Hücre döngüsü kontrol noktalarının herhangi birinde DNA' da bir hasar saptanırsa hücre döngüsü durdurulmakta, böylece DNA tamiri için gerekli süre sağlanmakta ve DNA onarım enzimlerinin sentezi arttırılmaktadır. Hücre döngüsü kontrol noktalarında, DNA hasarını tanımaktan sorumlu olan enzimler, Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) ve Atm and Rad-3 Related (ATR) proteinleridir. ATM özellikle iyonize radyasyona maruziyet sonucu oluşan çift zincir kırıklarını tanıırken, ATR, çift zincir kırıklarının tanınmasında destekleyici rol üstlenmenin yanı sıra UV hasarları sonucunda DNA tıpkıyapımının durmasına yol açan hasarları tanımaktadır. Hücrelerin büyük bir kısmı birisi geç G1' de ve diğeri geç G2' de olmak üzere en az 2 denetim noktasına sahiptir. Geç G1' de bulunan denetim noktası hücrenin S evresine girişini durdururken, geç G2' de bulunan denetim noktası hücrenin mitozu girişini önlemektedir (51). Ayrıca, daha az araştırılmış olmakla birlikte hücreler, kızılötesi ışınlar (IR) tarafından indüklenen DNA hasarları tarafından S evresi kontrol noktasında da durdurulabilmektedir. S evresi kontrol noktası ATM proteini tarafından aktiflenen 2 farklı sinyal yolağı tarafından susturulabilmektedir. İlk yolda ATM Chk2'nin aktiflenmesini sağlamak ve Cdc25a aracılığı ile Cdk2/Cyclin E kompleksinin susturulmasını ve hücre döngüsünün S evresinde

durdurulmasını sağlamaktadır (52). İkinci yolakta ise, ATM, Cdc25A' dan bağımsız olarak Nibrin (NBS1), Breast Cancer 1 (BRCA1) ve Structural Maintenance of Chromosomes 1A (SMC1) proteinlerini aktifleyerek hücre döngüsünü S evresinde durdurmaktadır. Bu proteinleri kodlayan genlerin herhangi birinde meydana gelen mutasyonlar, S evresi kontrol noktasının etkisi hale gelmesine yol açarak kanserleşmeye sebep olmaktadır (53, Şekil-3).



**Şekil-3:** *BRCA1*'in hücre döngüsü kontrolündeki rolü. **A:** *BRCA1*'in hücre döngüsünü S evresinde durdurması **B:** *BRCA1* mutasyonu sonucu hücre döngüsü kontrolünün önlenmesi.

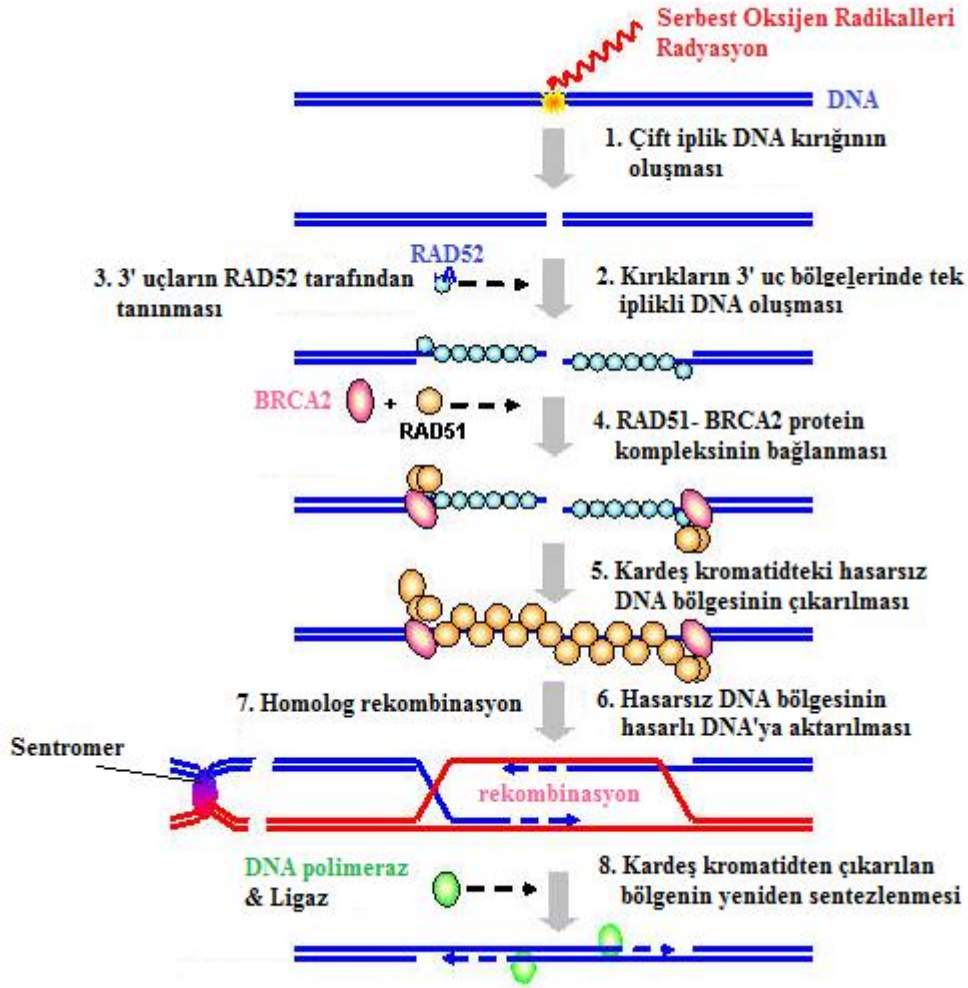
Genetik kararlılığın sürdürülebilmesi için, DNA' yı yüksek doğrulukta kopyalamayı sağlayan mekanizmaların yanı sıra DNA' da spontan olarak oluşabilen hasarların onarımını sağlayan DNA tamir mekanizmaları bulunmaktadır. Isı, metabolik kazalar, çeşitli türde radyasyon ve çevresel maddelere maruz kalınması sonucunda hücre DNA' sında sıklıkla gelişigüzel değişimler oluşmakta ancak DNA tamir mekanizmalarının etkinliği sonucunda



bu değişimler nadiren kalıcı mutasyon olarak sonuçlanmaktadır. Bu nedenle insanlarda DNA onarım kapasitesinin azalması hücrelerde kalıcı mutasyonların oluşma riskinin artmasına, genomik kararsızlığa ve kanser oluşumuna sebep olmaktadır.

DNA hasarlarının en yıkıcı şekli, DNA çift zincir kırıklarındır. Bu hasarların onarımında gerçekleşen hatalar kromozom translokasyonlarına ve kanser oluşumuna yol açmaktadır. Çift zincir kırıklarının oluşmasına neden olan en önemli ekzojen ajan iyonize radyasyondur. Ayrıca, oksidatif metabolizma da hücrede serbest radikallerin oluşumuna sebep olarak DNA' da çift zincir kırıklarının oluşmasına yol açabilmektedir (54). DNA çift zincir kırıklarının onarımında iş gören tamir mekanizmalarından birisi olan homolog rekombinasyon tamir yolağında rol oynayan genler, ailesel ve/veya erken yaş meme kanseri vakalarında sıklıkla değişime uğramaktadır (54).

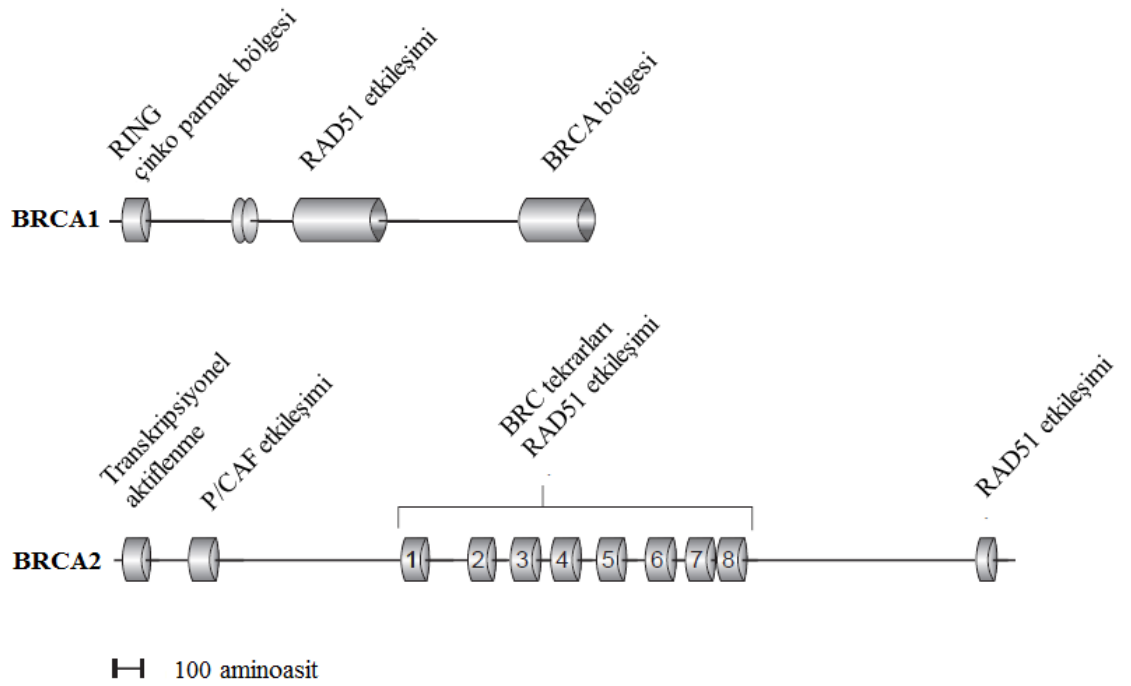
Homolog rekombinasyon yolu ile DNA çift iplik kırıklarının tamirinde, hasarlı olan kromozoma genetik bilginin aktarılabilmesi için hasarsız kromozom kalıp olarak kullanılmakta ve DNA dizisinde hiçbir değişim oluşturmaksızın hasarlı kromozom onarılmaktadır. DNA' da çift iplik kırığı oluştuğunda, her iki iplikte, kırıkların olduğu bölgede 3' ucu açık tek iplikli DNA' lar oluşmaktadır. RAD52 proteini bu tek iplikli bölgeleri tanımaktadır. Daha sonra, RAD51 proteini BRCA1 ve BRCA2 gibi aksesuar proteinler ile kompleks oluşturarak, RAD52'nin tanıdığı, DNA kırıklarının olduğu bölgeye bağlanmaktadır. RAD51 proteini kardeş kromatidte hasarsız DNA bölgesini tespit ederek çıkartmakta ve diğer kardeş kromatidteki hasarlı bölgeye aktarmaktadır. Çıkartılan bölge ise DNA polimeraz tarafından yeniden sentezlenmektedir (54, Şekil-4).



Şekil-4: Homolog rekombinasyon yolu ile DNA çift iplik kırıklarının tamiri.

## **BRCA1 ve BRCA2 Genlerinin Yapısal Özellikleri ve Meme Tümörigenezi Üzerindeki Etkileri**

*BRCA1* geni 17q21' te yer almakta, 23 ekzondan oluşmakta ve 1863 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır (55). Bu gen tarafından kodlanan proteinin N-ucunda bir RING çinko parmak bölgesi ve C-ucunda iki 'BRCT' tekrar bölgesi bulunmaktadır (56, Şekil-5). 13q12-13' te yer alan *BRCA2* geni ise, 27 ekzondan oluşmakta ve 3418 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır (56, 57). *BRCA2* proteininin en belirgin özelliği 11. ekzonda yer alan, 30 – 80 aminoasit büyüklüğündeki BRC tekrar bölgelerine sahip olmasıdır (58, 59, Şekil-5). *BRCA2* proteini bu tekrar bölgeleri sayesinde RAD51 proteini ile kompleks oluşturarak rekombinasyonel DNA tamirinde katılmaktadır (60, 61).



**Şekil-5:** BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin yapısal özellikleri ve diğer proteinlerle etkileşimleri (62).

Hücre döngüsünün kontrolünde ve çift iplik DNA kırıklarının tamirinde rol oynayan *BRCA1* ve *BRCA2* genleri ailesel ve/veya erken yaş meme kanserinin etiolojisinde önemli rol oynamaktadırlar (62). Bu güne kadar meme kanseri oluşumu ile ilişkili olarak *BRCA1* geninde 650' den, *BRCA2* geninde 500' den fazla sayıda genetik değişim tanımlanmıştır (63). Bu değişimlerin büyük bir bölümü işlevsiz proteinlerin oluşumuna neden olan çerçeve kayması tipindeki mutasyonlardır (64). Son dönemde gerçekleştirilen çalışmalarda Doğu Avrupa ve Türk popülasyonuna ait meme kanseri hastalarında *BRCA1* geninde 5382insC mutasyonunun diğer toplumlara göre daha sık gözleendiği belirlenmiştir (64–66). Sporadik vakalarla kıyaslandığında, ailesel *BRCA1* öyküsü olan meme kanserli hastalarda “bazal benzeri” alt tipe daha çok benzeyen bir gen ekspresyon profili gözlenmektedir (37). *BRCA2* öyküsü olan hastalarda ise, sporadik vakalara göre, *TP53* mutasyonlarının iki kat daha fazla, *MYB* ve *MYC*

ekspresyonlarının daha yüksek ve *HER2* ekspresyonunun daha düşük olduğu belirlenmiştir (67). Ayrıca, araştırmalar, *BRCA1/2* genlerinde mutasyon belirlenen hastaların Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitörleri ile gerçekleştirilen tedavilerden yarar sağlayabildiklerini ortaya koymuştur (68). Bununla birlikte, *BRCA1/2* gen taramalarında hiçbir patolojik değişim belirlenemeyen bazı hastaların ise uygulanan standart tedavi yöntemlerine cevap vermedikleri de gözlenebilmektedir (9). Günümüzde ailesel ve/veya erken yaş meme kanseri hastalarında, ailesel risk oranının belirlenmesi ve bireye özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi amacıyla, *BRCA1/2* gen mutasyonu taramaları bir çok sağlık kuruluşunda rutin hasta hizmeti kapsamında gerçekleştiriliyor olmasına rağmen, bu taramalar yalnızca *BRCA1/2* genlerinin protein kodlayan bölgelerini kapsamaktadır (8).

### ***BRCA1* ve *BRCA2* Gen İfadelerinin Düzenlenmesinde Epigenetik Faktörlerin Rolü**

Epigenetik mekanizmalar, DNA dizisinde bir değişime yol açmadan gen ifadesini değiştirebilen, geri dönüşümlü ve kalıtsal kontrol mekanizmalarıdır (69, 70). Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi kanser oluşumunda önemli rol oynayabilmektedir (71, 72). Bu nedenle, DNA'nın epigenetik modifikasyonları kanserin erken tanısında, prognoz ve tedavide belirleyici olabilme potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca, bu değişimlerin geri dönüşümlü olması, bu değişimleri hedef alan terapötik ajanların ve tedavi yöntemlerinin araştırılmasına da olanak sağlamaktadır (73).

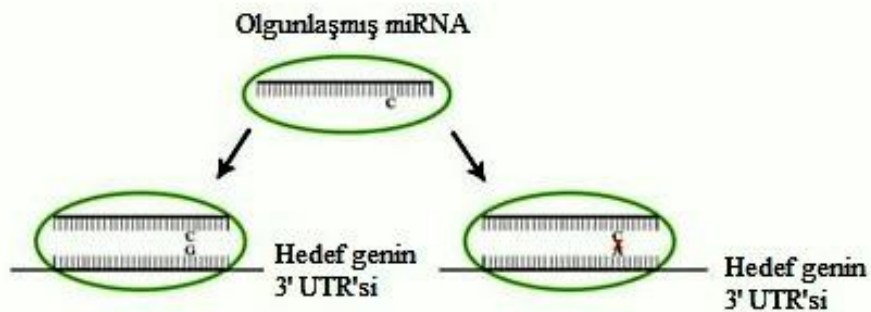
Son dönemde gerçekleştirilen çalışmalarda, protein kodlamadığı halde, genin protein kodlayan bölgesi ile birlikte yazılan, mRNA'nın başlama kodonundan evvel ve bitiş kodonundan sonra gelen, çevrilmeyen bölgeler (UTR)' in de gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları anlaşılmıştır (74, Şekil-6). Gen ifadesinin epigenetik olarak düzenlenmesinde rol oynayan mikroRNA (miRNA)' lar 5'UTR ve 3'UTR' ye farklı afinitelerle bağlanarak mRNA' nın kararlılığını etkilemektedirler (74).



**Şekil-6:** Olgunlaşmış mRNA' nın yapısı

miRNA' lar 18-25 nükleotid uzunluğunda, kodlanmayan tek iplikçikli RNA molekülleridir. Bu RNA'lar hedef genin transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde rol almaktadırlar (74). Günümüze kadar (Temmuz 2013) 6000' den fazla insan miRNA' sı tanımlanmıştır (75) ve insan genomunun %60' ının bu miRNA' lar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (76). MiRNA' lar; hücre döngüsü, hücre proliferasyonu, hücre yaşlanması, hücre ölümü, hücre gelişim ve farklılaşma, adhezyon ve anjiogenez gibi önemli biyolojik fonksiyonlarda düzenleyici rol oynamaktadırlar (77). Bu nedenle miRNA ekspresyonunun düzenlenmesinde gerçekleşen bozukluklar başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir (78).

Son dönemde gerçekleştirilen çalışmalarda, meme kanseri oluşumunda miRNA' ların anormal ekspresyonunun önemli rol oynadığı ortaya konmuştur (10, 11). miR -146a, miR -15, miR-16, miR-17 ve miR182 gibi bazı miRNA' ların *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin 3'UTR' sine bağlandıkları belirlenmiştir (10, 79). Bu nedenle, *BRCA1/2* genlerinin protein kodlayan bölgelerinin yanı sıra, 3'UTR' lerinde meydana gelecek genetik değişimlerin de, bu bölgeye miRNA' ların bağlanma afinitelerinin değişmesine yol açacağından hastaların *BRCA1/2* protein ifadesinin değişmesine ve uygulanan tedavilerden yarar sağlayamamasına sebep olabileceğine inanılmaktadır (12, Şekil-7).



**Şekil-7:** 3'UTR' de meydana gelen nükleotid değişiminin miRNA bağlanma afinitesi üzerindeki etkisi (80).

## **BRCA1/2 Genlerinin 3'UTR' lerinin Taranması Amacıyla Kullanılan Yöntemler**

Gamet hücrelerinde ya da somatik hücrelerde, DNA' da meydana gelen genetik değişikliklere mutasyon adı verilmektedir. Gamet hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarıldığı için, somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar ise, kansere neden olabildiği için önem taşımaktadırlar (81). Meme kanseri vakalarında *BRCA1/2* genlerinde çoğunlukla nokta mutasyonlar gözlenmektedir (64). Bunlar bir pürin bazının başka bir pürin bazıyla ya da bir pirimidin bazının başka bir pirimidin bazıyla yer değiştirme sonucu oluşan transisyonlar, bir pürin bazının bir pirimidin bazı ile yer değişmesi sonucu oluşan transversiyonlar veya genin yazılıma katılan bölgesine, bir ya da daha fazla sayıda nükleotid girişi veya çıkışı sonucu oluşan ve okuma esnasında üçlü kodonların kaymasıyla sonuçlanan çerçeve kayması mutasyonlarıdır (64, 81).

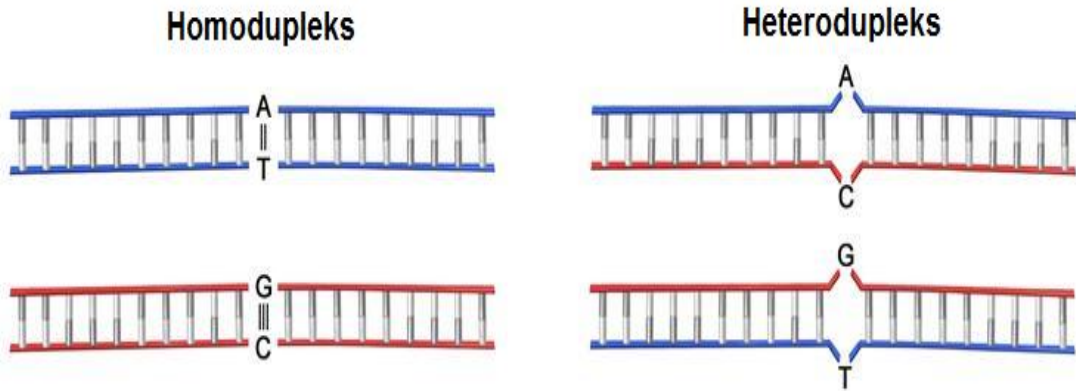
Popülasyonda %1' den daha yüksek sıklıkla gözlenen, genlerde genetik çeşitliliğe yol açan değişiklikler ise polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. Polimorfizmler genomda çoğunlukla tek nükleotid düzeyinde bulunmakla birlikte ikili, üçlü nükleotid tekrarları şeklinde de bulunabilmektedirler (82). DNA onarımında görev alan *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51* vb genlerin polimorfizmleri, proteinlerin işlevini ve bireylerin hasarlı DNA'yı onarma kapasitesini değiştirebilmektedir. Eksik onarım kapasitesi de genetik kararsızlığa ve dolayısıyla kanser oluşumuna neden olabilmektedir (82, 83). Polimorfizmler hastaların kansere yatkınlığını arttırabilmekle birlikte, her zaman tek başlarına kanser riskini ortaya koymak için yeterli olmayabilirler (84). Son dönemde, çeşitli araştırma grupları tarafından, farklı popülasyonlara ait meme kanseri hastalarının *BRCA1/2* genlerinin 3'UTR bölgelerinde yer alan polimorfizmlerin araştırıldığı birkaç çalışma bulunmaktadır (10,13-17). Ancak bu polimorfizmlerin miRNA bağlanma

afinitesi, *BRCA1/2* gen fonksiyonları ve kanserleşme süreci üzerindeki etkisi yeterince bilinmemektedir.

*BRCA1/2* genleri 3'UTR' sinde yer alan mutasyon ve polimorfizmlerin araştırılabilmesi için heterodupleks analizi ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılmaktadır.

### Heterodupleks Analizi (HDA)

DNA' da bir mutasyon olduğunda, hatalı eşleşmiş olan DNA iplikleri, normal bir DNA' nın sahip olduğu homodupleks yapısından farklı olarak, heterodupleks bir yapı oluşturmaktadır (Şekil-8). Heterodupleks analizi, jel matriksinde heterodupleks DNA moleküllerinin homodupleks yapıdaki DNA moleküllerinden daha farklı göç etmesi esasına dayanmaktadır. Yöntem, DNA örneklerinin yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten hemen sonra renatüre edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Renatürasyon sırasında mutant DNA ipliği ile yabancı DNA ipliklerinin hibridize olması sonucunda, mutasyon noktasında yanlış eşleşme yapmış bir baz çifti bulunmakta ve bu da heterodupleks yapının oluşmasına sebep olmaktadır. Bu teknik ile, delesyon, insersiyon tipi mutasyonların tespitinde %100' e yakın başarı sağlanabilirken, nokta mutasyonların tespitinin % 80 – 85 hassasiyetle gerçekleştiği bildirilmiştir (85).



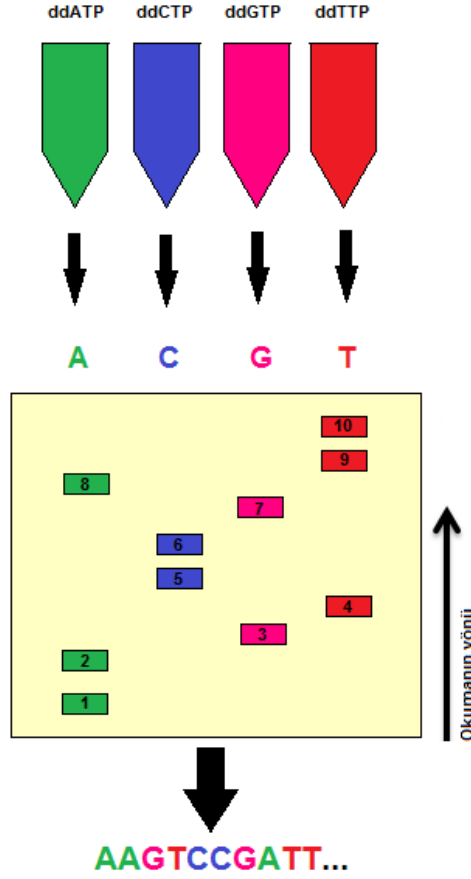
**Şekil-8:** DNA' nın poliakrilamid jel elektroforezindeki homodupleks yapısı ve mutasyon varlığında oluşan heterodupleks yapısı.

## DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi yöntemi ilk kez 1970' li yıllarda Maxam ve Gilbert tarafından, DNA' nın kimyasal modifikasyonu ve ardından spesifik bazlardan kesilmesi esasına dayalı olarak geliştirilmiştir. 1977 yılında ise Sanger ve arkadaşları, günümüzde halen kullanılmakta olan enzimatik DNA dizi analiz yöntemini geliştirmişlerdir (86). Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılmakta ve Taq DNA polimeraz vb bir enzim ile DNA sentezi gerçekleştirilmektedir. Ancak polimeraz zincir reaksiyonunda gerçekleştirilen DNA sentezinden farklı olarak, bu reaksiyonda Taq DNA polimeraz, yeni ipliğin uzamasını gerçekleştirirken, reaksiyon ortamında serbest halde bulunan deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP)' lerin yanısıra, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan dedideoksiribonükleozit trifosfat (ddNTP)' ları da eşlenik ipliğe eklemektedir. ddNTP' lerin 3' pozisyonunda OH grubu bulunmadığından, Taq DNA polimeraz, sentez sırasında ipliğe bağlanan bir ddNTP' nin arkasına başka bir dNTP' yi bağlayamamakta ve bu nedenle eşlenik ipliğin sentezi bu noktada durmaktadır. Sanger' in yöntemi ile DNA dizi analizi gerçekleştirilirken, dedioksiadenin, dedioksiguanin, dedioksisitozin ve dedioksitimin'in her biri farklı bir tüpte olacak şekilde, dört ayrı tüpte reaksiyon gerçekleştirilmektedir. Bu dört tüpün her biri ortak olarak sekanslanacak gen bölgesine ait bir primeri, dört dNTP' nin her birini ve analizin gerçekleştirileceği kalıp DNA' yı da içermektedir. Reaksiyon tüplerinin her birinde, DNA sentezinin her bir tekrarında, reaksiyon rastgele bir ddNTP'de sonlanmakta ve farklı uzunluklarda, tek iplikli DNA fragmentleri oluşmaktadır (87). Reaksiyon tamamlandığında dört tüpün her birinde oluşan DNA fragmentleri poliakrilamid jele yan yana yüklenerek elektroforez gerçekleştirilmekte ve uygulanan elektiriksel alanın etkisi ile DNA fragmentleri kısıdan uzuna doğru jel üzerinde sıralanmaktadır. Fragmentler,



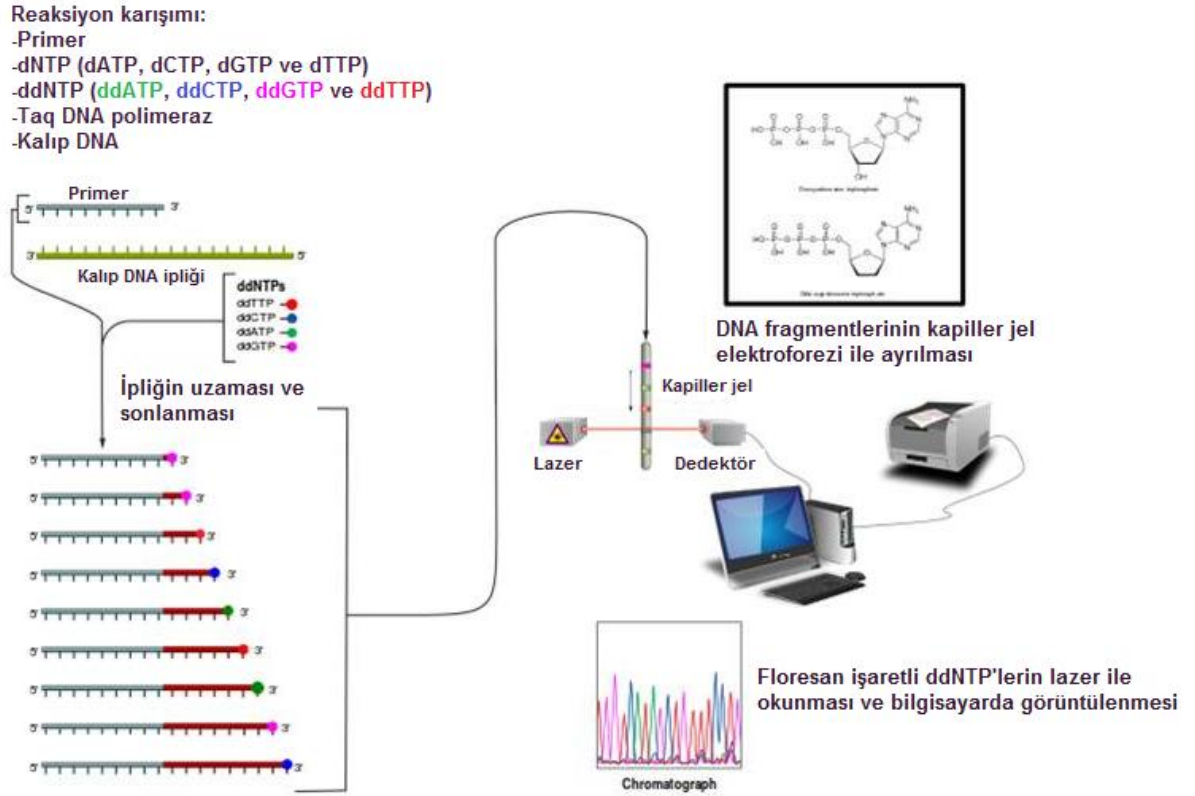
sonlandıkları ddNTP' nin çeşidine göre aşağıdan yukarıya doğru takip edilerek DNA dizisi elde edilmektedir (87, Şekil-9).



Şekil-9: Sanger' in DNA Dizi Analizi Yöntemi

Otomatik DNA dizi analizde de Sanger' in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmaktadır. Bu cihazlar, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği bir elektroforez sistemini içermektedirler. Bu sistemde, DNA dizi analizi reaksiyonu tek bir deney tüpünde gerçekleştirilmekte ve ddNTP' lerin her biri, farklı renklere floresan boyalarla işaretlenmiş olarak aynı deney tüpüne konmaktadır. Reaksiyon sonunda, her bir nükleotidi farklı renklere floresan boyalarla işaretlenmiş olan DNA fragmentlerinin yüklendiği jel, elektroforez süresince, lazer ışık kaynağı ile oluşturulan monokromatik ışık ile taranmakta ve floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılmaktadır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtmakta ve

yansıyan ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilmektedir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılmaktadır (88, Şekil-10).



Şekil-10: Otomatik DNA Dizi Analizi akış şeması (89).

Gerçekleştirilen çalışmada, *BRCA1/2* genlerinin 3'UTR bölgelerindeki tek nükleotid değişimlerinin miRNA'ların bağlanma özellikleri üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için, Türk popülasyonuna ait, *BRCA1/2* genlerinin protein kodlayan bölgelerinde mutasyona sahip olan ve mutasyon taşımayan ailesel / erken yaş meme kanseri hastalarının *BRCA1/2* genlerinde 3'UTR bölgesinde tek nükleotid değişimlerinin HDA ve DNA dizi analizi yöntemleri ile araştırılması amaçlandı.

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

### **Gereç**

#### **Kullanılan Aletler**

- CEQ-8000 Otomatik DNA Dizi Analizi Sistemi (BECKMAN COULTER)
- Gene Amp PCR 9700 Thermocycler (APPLIED BIOSYSTEMS)
- Dikey Elektroforez Sistemi (THERMO)
- Yatay Elektroforez Sistemi (BIO-RAD)
- Isıtıcı blok (DB-2A) (TECHNE)
- Su banyosu (BM 302) (NÜVE)
- Santrifüj (22R) (BECKMAN COULTER)
- Manyetik Karıştırıcı (VELP SCIENTIFICA).
- + 4°C buzdolabı (ALASKA)
- - 20°C derin dondurucu (BOSCH)
- UV kabini (BIOSAN)
- Nanodrop (THERMO)
- Otomatik Pipet, (0.5-10 µl) (EPPENDORF)
- Otomatik Pipet, (10-100 µl) (EPPENDORF)
- Otomatik Pipet, (20-200 µl) (EPPENDORF)
- Otomatik Pipet, (100-1000 µl) (THERMO)

#### **Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

- Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega-A1125, USA
- Fenol (SIGMA)
- Kloroform (SIGMA)
- dNTP (PROMEGA)

- MgCl<sub>2</sub> (PROMEGA)
- Primerler (PROMEGA)
- Taq Polimeraz (PROMEGA)
- DTCS, Quick Start Mix (PROMEGA)
- Agaroz (VIVANTIS)
- Bromofenol blue (BIOLOGICAL INDUSTRIES)
- Etidium bromür (SIGMA)
- 10XTBE (VIVANTIS)
- Formamide (MERCK)
- 1× MDE gels (BMA)
- Gümüş Nitrat (SIGMA)
- Asetik Asit (SIGMA)
- EDTA (SIGMA)
- Xylene cyanol (SIGMA)
- RBC (ROCHE)

## **Yöntem**

### **Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri**

Tez çalışmasına Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Meme Birimi' ne başvuran ve genetik çalışmalar ile ilgili açıklamaları içeren gönüllü olur formu ile bilgilendirilerek onayları alınmış, erken yaş (45 yaş altı) sporadik ve/veya aile öyküsüne sahip 100 meme kanserli vakaya ve 47 sağlıklı kontrole ait periferik kan örnekleri dahil edildi. (Hastaların projeye dahil edilebilmesi için gerekli olan etik kurul onayı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 2012-5/11 nolu kararı ile alındı).

## **Periferik Kan Örneklerinden Genomik DNA Elde Edilmesi**

Hastaların periferik kanlarından genomik DNA eldesi, daha önce Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Laboratuvarı'nda, rutin hasta hizmeti kapsamında *BRCA1/2* gen mutasyon taraması gerçekleştirilmek amacıyla fenol-kloroform yöntemi ile gerçekleştirildi ve elde edilen DNA'lar -20°C' derin dondurucuda muhafaza edildi.

### Fenol-Kloroform ile DNA Ekstraksiyon Yöntemi

#### Solüsyonlar

##### Lysis Buffer

- %10 SDS:..... 80 µl
- 10 mg/ml Proteinaz K:.....5 µl
- NaCl:.....90 µl
- TE Buffer:.....325 µl

- EDTA'lı tüpe alınan periferik kan örnekleri en az 1 saat dik olarak bekletildi.
- 500 µl kan örneği, 1.5ml hacmindeki mikrofüj tüpüne alındı ve üzerine 1000 µl RBC solüsyonu eklendi.
- Tüpler 10 dk ters yüz edilerek karıştırıldı ve 12.000 rpm. de 1dk santrifüj edildi.
- Supernatant atılarak, pelletin üzerine TE tamponu eklendi ve 12.000 rpm. de 1dk santrifüj edildi.
- TE ile yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, pelletin üzerine 20 µl Proteinaz K ve 500 µl Lysis Buffer eklendi.
- Karışım buz blok üzerine alınarak, 56°C'de 90dk inkübasyona bırakıldı.
- Tüplere, karışım hacmi kadar fenol eklendi ve 2500 rpm. de 2dk santrifüj edildi.

- Üst faz temiz bir tüpe alınarak eşit hacimde kloroform ilave edildi ve 2500 rpm. de 2dk santrifüj gerçekleştirildi.
- Oluşan pelletin üzerine 1000 µl etanol eklendi ve 13.000 rpm. de 3dk santrifüj edildi.
- 500µl %70' lik etanol ile yıkama işlemi tekrarlandı.
- Alkol uçurularak, oluşan DNA pelletinin üzerine 150-400µl steril H<sub>2</sub>O ilave edildi.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği göstermektedirler. Bu nedenle 260 nm' de ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/µL veya µg/mL düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. DNA'nın konsantrasyonunun saptanmasında aşağıdaki formül kullanılmaktadır:

$$\text{Total DNA (ng/µl)} = 260 \text{ nm' deki absorpsiyon} \times 50 \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

Proteinler ise 280 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle, 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. İzole edilen total DNA örneklerinin saflığından bahsetmek için bu oran 1.8-2.00 arasında olmalıdır. İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve kalitesinin gerçekleştirilecek analizler için uygunluğu nanodrop cihazında ölçülerek değerlendirilmiştir.

### **BRCA1/2 Genlerinin 3'UTR' lerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu**

*BRCA1* geninin 1383 bç uzunluğundaki 3'UTR' sinin amplifikasyonu için 4 çift primer seti; *BRCA2* geninin 902 bç uzunluğundaki 3'UTR' sinin amplifikasyonu için ise 2 çift primer seti dizayn edilerek kullanıldı (Tablo-2).

**Tablo-2:** BRCA1 ve BRCA2 Genlerinin 3'UTR Bölge Primerleri

Gen	Segment	Primer Dizisi	Bağlanma ısısı (°C)	Baz Çifti (bç)
BRCA1 3' UTR	1	Forward 5'- AGCACTCTACCAGTGCCAG- 3'	60	645
		Reverse 5'- AGGTTTCAAGTTTCCTTTTCA- 3'	56	
	2	Forward 5'- GAGTGCTTGGGATCGATTATGTGACTT- 3'	78	522
		Reverse 5'- ACCGGTTCTTGAAAATCTTCTGCTG- 3'	72	
	3	Forward 5'- GCAGGAGAATCACTTCAGCCCGGA- 3'	70	368
		Reverse 5'- GCAACAGCTTCCTCCTGGTGGG- 3'	74	
	4	Forward 5'- GGAAAATGAACTAGAAGAGATTT- 3'	62	560
		Reverse 5'- AGGCTCTGAGAAAGTCGGCT- 3'	62	
BRCA2 3'UTR	1	Forward 5'- GTTCAGAAGATTATCTCAGACT- 3'	60	338
		Reverse 5'- CTATTTTCATAGTGAGTTACCTC- 3'	60	
	2	Forward 5'- TAGTTTCAAATTTACCTCAGCG- 3'	60	472
		Reverse 5'- AGATATGCAACTGAAGCAAAAG- 3'	60	

PCR karışımı, toplam 15 µl' lik reaksiyon hacminde, 1.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM dNTP (her bir nükleotid için), 10 pmol primer (F ve R), 5 U/µl Taq Polimeraz ve 150 ng genomik DNA içeren tampon çözeltide hazırlandı. Uygulanan reaksiyon koşulları aşağıda belirtildiği gibidir;

- 94°C de 3 dk öndenatürasyon
- 35 döngü:
  - o 94°C' de 2 dk denatürasyon,
  - o 55°C' de 30 sn bağlanma
  - o 72°C' de 30 sn uzama
- 72°C' de 3sn sonlanma

### Agaroz Jel Elektroforezi

PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen PCR ürününün doğruluğunun kontrol edilebilmesi amacıyla agaroz jel elektroforezi gerçekleştirildi. Bu amaçla, 2 gr agaroz tartılarak erlene kondu ve üzerine 100 mL 1X Tris- Borik Asit- EDTA (TBE) eklenerek mikrodalga fırında kaynatıldı. Kaynayan agaroz çözeltisinin üzerine 5 µl EtBr eklendi ve sıvı haldeki agaroz, elektroforez

tabağına dökülerek jelin donması beklendi. Agaroz jel donduktan sonra içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Agaroz jelin ilk kuyusuna, PCR ürünlerimizin büyüklüğünü ölçebilmemiz amacıyla DNA markırı yüklendi. Daha sonra, PCR örnekleri, yükleme tampon olan bromofenol mavisi ile karıştırılarak agaroz jelin diğer kuyularına yüklendi.

## **Heterodupleks Analizi**

### Solüsyonlar

#### Stop solüsyonu

- 9.5 ml % 95 formamide
- 0.004 gr NaOH
- 0.005 gr % 0.05 bromophenol blue
- 0.005 gr % 0.05 xylene cyanol hassas terazide ölçüldü ve birbiri ile karıştırıldı.

#### Poliakrilamid Jel

- 17.3 ml dH<sub>2</sub>O
- 14 ml MDE
- 2.8 ml Gliserol
- 2.25 ml 10x TBE
- 200 µl % 10 APS
- 20 µl TEMED

#### Gümüş Nitrat Çözeltisi

- 3 gr Gümüş Nitrat
- 4 ml Formaldehit
- 2 lt dH<sub>2</sub>O

#### Sodyum Karbonat Çözeltisi

- 68 gr NaCO<sub>3</sub>
- NaSCN
- 4 ml Formaldehit
- 2 lt dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü.



Her PCR ürününün 11µl' si 96°C de 6 dakika ısı ile denatüre edildikten sonra, sırasıyla 50°C' de 10 dk, 37°C' de 15 dk ve 20°C' de 30 dk' dan oluşan HDA rekasiyonuna tabii tutuldu ve ardından 2µl stop solüsyon eklenerek analiz edilene kadar buz üzerinde saklandı. Daha sonra HDA ürünleri poliakrilamid jele yüklenerek 0.5 X TBE içeren yürütme tamponunda 600V' da 9-16 saat boyunca elektroforez gerçekleştirildi. Elektroforez sonunda poliakrilamid jelde oluşan bantlar gümüş boyama ile görüntülendi.

### Gümüş boyama

- Jel % 10' luk asetik asit içine alındı ve 35 dk. çalkalandı.
- 6 defa H<sub>2</sub>O ile yıkama gerçekleştirildi.
- Jel 40 dk karanlıkta Gümüş Nitrat çözeltisinde bekletildi.
- 1 defa H<sub>2</sub>O ile yıkama gerçekleştirildi.
- Jel Sodyum Karbonat çözeltisi ile 3 defa yıkandı.
- 1 dk süreyle % 10' luk asetik asit çözeltisi içerisinde çalkalama yapıldı.
- 1 dk süreyle H<sub>2</sub>O ile duruluma işlemi gerçekleştirildi.

Poliakrilamid jelde normal bant görüntüsünden farklı olarak, heterodupleks bant özelliği gösteren örnekler mutasyon/ polimorfizm varlığı açısından pozitif olarak değerlendirildi ve bu örnekler için DNA dizi analizi gerçekleştirildi.

### **DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizine alınan örnekler sırasıyla PCR saflaştırma, sekans reaksiyonu ve alkolle çötürme işlemlerine tabii tutuldu.

### PCR Saflaştırma Analizi

PCR ürünlerin saflaştırılması amacıyla "Wizard Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA" kiti kullanıldı. Bu doğrultuda;

- PCR ürünlerinin üzerine 11 µl *membran binding solution* eklendi. Oluşturulan karışım SV minicolumn tüplerin yerleştirildiği koleksiyon tüplerine konarak 1 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 16.000 xg' de 1 dk santrifüj gerçekleştirilerek alt kısım atıldı.
- Minicolumn tüplere 700 µl etanol eklenmiş *membran wash solution* eklendi.
- 16.000 xg' de 1 dk santrifüj gerçekleştirilerek alt kısım atıldı.
- 500 µl *membran wash solution* eklendi ve 16.000 xg' de 5 dk santrifüj edildi.
- Alt kısım atılarak, kapaklar açık olarak 16.000 xg' de 1 dk santrifüj edilerek kalan alkol uzaklaştırıldı.
- Minicolumnlar 1.5 ml' lik ependorfa aktarıldı ve üzerine 50 µl dH<sub>2</sub>O eklendi.
- 16.000 xg' de 1 dk santrifüj gerçekleştirildi.
- Alt kısımda kalan saflaştırılmış PCR ürünü -20°C' de saklandı.

### Sekans Reaksiyonu

Saflaştırma işleminden geçirilen PCR ürünleri ile DTCS, Quick Start Mix, PROMEGA kiti kullanılarak sekans reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde 8 µl DTCS, 0.5 µl primer, 1 – 5 µl saflaştırılan PCR ürünü ve dH<sub>2</sub>O' dan oluşan reaksiyon karışımı hazırlandı. Sekans reaksiyonu için uygulanan reaksiyon koşulları aşağıda belirtildiği gibidir;

- 94°C de 3 dk öndenatürasyon
- 30 döngü:
  - o 96°C' de 30 sn denatürasyon,
  - o 50°C' de 20 sn bağlanma
  - o 60°C' de 4 dk uzama

## Alkolle Çöktürme

Sekans reaksiyonu sonunda PCR ürünleri aşağıda belirtildiği şekilde alkolle çöktürme işlemine tabii tutuldu.

- Her bir PCR ürünü için 1.5 ml'lik bir ependorf tüpüne 60 ml % 96' lık etanol kondu.
- PCR ürünlerinin üzerine 2 ml Na asetat, 2ml Na EDTA ve 1 ml Glikojen konarak oluşturulan karışım ependorf tüplerin üzerine ilave edildi.
- 18.000 xg' de 15 dk + 4°C' de santrifüj gerçekleştirildi.
- Üst kısımdaki alkol, oluşan pellete dokunulmadan ortandan uzaklaştırıldı.
- Pelletin üzerine 200 ml % 70' lik etanol eklendi.
- 18.000 xg' de 3 dk + 4°C' de santrifüj gerçekleştirildi.
- Üst kısım atılarak, pellet 2 – 3 saat 37°C deki kuru etüvde bekletilerek dipte kalan alkolün uçması sağlandı.

## Sekans Analizi

Alkolle çöktürme işleminden sonra, kuruyan pelletlerin her biri 40 µl SLS içerisinde çözdürüldü ve 96 kuyulu sekans tabağının üzerindeki kuyucuklara yüklendi. Örnek yüklenen kuyulara birer damla mineral oil eklenerek, otomatik DNA dizi analizi cihazında (CEQ-8000, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) değerlendirildi.

Sekans analizi sonucunda hastalara ait örneklerden elde edilen veriler, sağlıklı kontrol örnekler ile karşılaştırıldı ve saptanan varyasyonlar ile meme kanseri riski arasındaki ilişki; Ensemble Genome Browser (Ensemble; <http://www.ensembl.org/>), the human gene mutation database (HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>), Leiden Open Variation Database (LOVD; (<http://www.lovd.nl/3.0/home>) ve Human Genome Variation Society (HGVS; <http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html>) veritabanlarından yararlanılarak belirlendi.

## **İstatistiksel Analiz**

Hastaların *BRCA1/2* genelerine ait 3'UTR' lerinde belirlenen değişimlerin, klinik özellikler üzerindeki potansiyel etkisini incelemek için, çalışmadan elde edilen bulgular, SPSS 16.00 (SPSS, Chicago, IL, USA) programı kullanılarak istatistiksel olarak [% 95'lik güven aralığında, anlamlılık  $p<0.05$  düzeyinde] değerlendirildi. Klinik-histopatolojik tümör özellikleri ile mutasyon durumu ve de belirlenen SNP' lerin ilişkisi Fisher's Exact Test ve Independent Sample T Test kullanılarak belirlendi.

## BULGULAR

### Hasta Grubu ve Klinik Özellikler

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması  $41.67 \pm 1.17$  (21 – 65) olarak belirlendi. Hastalara ait histopatolojik (tümör lokalizasyonu, tümör evresi, tümör tipi, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER-2), proliferasyon indeksi (Kİ67), sentinel lenf nodu biyopsisi (SLNB), benign reaktif hiperplazi (BRH), metastaz durumu, in situ komponent, extrakapsüler yayılım, lenfatik invazyon ve perinoral invazyon) ve onkolojik özellikler (first-line neoadjuvan tedavi, first-line adjuvant tedavi, herceptin tedavisi, hormon tedavisi ve radyoterapi) Genel Cerrahi ve Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinden elde edildi. Değerlendirilen hastalara ait klinik ve histolojik özellikler sırası ile Tablo-3 ve Tablo-4’ te belirtildi.

**Tablo-3:** Değerlendirilen Hastalara Ait Klinik Özellikler

Değerlendirilen Parametreler		Hasta Sayısı (%)
Yaş ortalaması	$42.13 \pm 1.169$ (21-65)	
İlk mensturasyon yaşı	$12.99 \pm 0.170$ ( 11-17)	
İlk doğum yaşı	$23.56 \pm 0.677$ (16-39)	
1.derece aile hikayesi		
	+	46 (46)
	-	54 (54)
Neoadjuvan tedavi		
	+	39 (39)
	-	61 (61)
Adjuvan tedavi		
	+	44 (44)
	-	56 (56)
Herceptin tedavisi		
	+	19 (19)
	-	81 (81)
Hormon tedavisi		
	+	65 (65)
	-	35 (35)
Radyoterapi		
	+	94 (94)
	-	6 (6)

**Tablo-4:** Değerlendirilen Hastalara Ait Patolojik ve Histolojik Özellikler

Tümörlerin Özellikleri		Hasta Sayısı (%)
<b>Patolojik Özellikler</b>		
Tip		
	invaziv duktal karsinoma	85 (85)
	diğer	15 (15)
Lokalizasyon		
	sol	38 (38)
	sağ	62 (62)
Histolojik evre		
	evre 1	30 (30)
	evre 2	40 (40)
	evre 3	27 (27)
	evre 4	3 (3)
In situ komponent		
	<%25	60 (60)
	>%25	35 (35)
	bilinmiyor	5 (5)
SLNB		
	+	71 (71)
	-	29 (29)
BRH		
	+	83 (83)
	-	17 (27)
Metastaz		
	+	44 (44)
	-	56 (56)
Ekstrakapsüler yayılım		
	+	15 (15)
	-	85 (85)
Lenfatik invazyon		
	+	21 (21)
	-	79 (79)
Perinoral invazyon		
	+	11 (11)
	-	89 (89)
<b>Histolojik Özellikler</b>		
ER		
	+	64 (64)
	-	36 (36)
PR		
	+	49 (49)
	-	51 (51)
HER-2		
	+	31 (31)
	-	69 (69)

(SLNB:Sentinel Lenf Nodu Biyopsisi, BRH: Benign Reaktif Hiperplazi, ER: Estrogen Receptor, PR: Progesterone Receptor HER2:Human Epidermal Growth Factor Receptor)

## Periferik Kan Örneklerinden Elde Edilen Genomik DNA' ların Optik Dansiteleri

Hastalara ve kontrol grubuna ait periferik kan örneklerinden elde edilen DNA' ların 260/280 nm dalga boyundaki optik dansiteleri ve konsantrasyonları Tablo-5 ve Tablo-6' da belirtilmektedir.

**Tablo-5:** Hastaların periferik kanından elde edilen DNA' ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları

Hasta No	260/280 ratio	konsantrasyon ng/ul	Hasta No	260/280 ratio	konsantrasyon ng/ul	Hasta No	260/280 ratio	konsantrasyon ng/ul	Hasta No	260/280 ratio	konsantrasyon ng/ul
1	1.8	457.50	31	1.84	157.08	61	1.89	147.85	91	1.92	123.59
2	1.8	245.60	32	1.92	78.46	62	1.98	72.80	92	1.93	532.00
3	1.85	258.60	33	1.74	354.93	63	1.95	137.28	93	1.82	286.30
4	1.81	119.60	34	1.89	88.02	64	1.8	105.82	94	1.87	118.60
5	1.79	138.50	35	1.83	103.97	65	1.76	155.79	95	1.96	635.12
6	1.8	343.20	36	1.95	71.25	66	2.06	125.62	96	1.74	152.30
7	1.81	142.00	37	1.89	101.70	67	1.87	147.30	97	1.99	175.86
8	1.85	109.60	38	1.88	95.60	68	2.07	258.10	98	2.05	152.20
9	1.91	116.00	39	1.75	189.70	69	1.86	90.42	99	1.79	115.89
10	1.73	98.50	40	1.94	133.00	70	1.79	110.60	100	1.96	160.00
11	1.75	96.50	41	1.77	365.00	71	1.81	254.60			
12	1.8	116.30	42	2.2	129.80	72	1.77	96.50			
13	1.75	69.30	43	1.8	136.00	73	1.74	125.80			
14	1.78	88.70	44	1.79	175.00	74	1.9	74.60			
15	1.77	73.40	45	1.81	172.00	75	1.81	81.65			
16	1.87	64.98	46	1.87	166.50	76	1.84	81.82			
17	1.94	146.60	47	1.92	367.41	77	1.87	84.36			
18	1.71	123.50	48	1.78	112.34	78	1.76	257.95			
19	1.82	245.60	49	1.84	79.75	79	1.75	68.15			
20	1.77	289.10	50	1.88	86.32	80	1.78	479.36			
21	1.75	154.60	51	1.78	128.79	81	1.82	254.70			
22	1.79	124.70	52	1.87	152.00	82	1.82	365.80			
23	1.82	156.70	53	1.91	100.20	83	1.75	124.80			
24	1.85	146.80	54	1.95	141.00	84	1.74	120.35			
25	1.83	89.60	55	1.82	152.00	85	1.94	105.01			
26	1.95	288.00	56	1.94	202.00	86	1.83	304.36			
27	1.88	143.80	57	1.78	166.87	87	1.86	80.06			
28	2	81.26	58	1.91	287.02	88	1.88	88.92			
29	2.01	157.82	59	1.83	116.58	89	1.75	35.56			
30	1.78	109.63	60	1.77	123.65	90	1.78	121.90			

**Tablo-6:** Kontrol grubunun periferik kanından elde edilen DNA' ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları

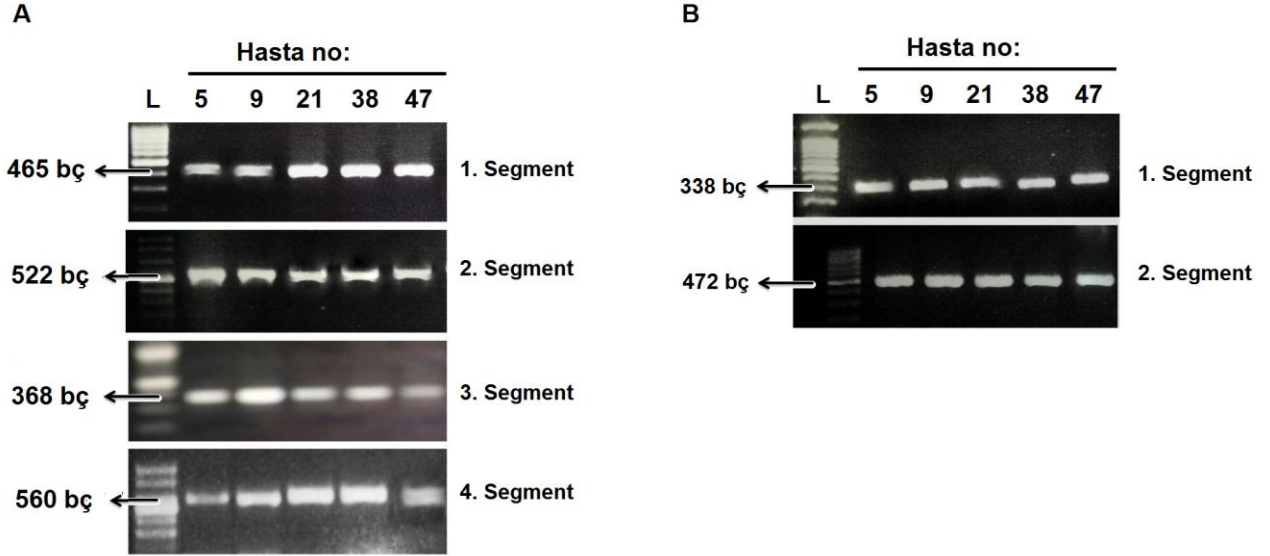
<b>Kontrol No</b>	<b>260/280 ratio</b>	<b>konsanstrasyon ng/ul</b>	<b>Kontrol No</b>	<b>260/280 ratio</b>	<b>konsanstrasyon ng/ul</b>
1	1.81	236.50	26	1.87	80.04
2	1.84	124.50	27	1.72	106.80
3	1.79	120.00	28	1.73	135.60
4	1.81	140.00	29	1.8	84.05
5	1.86	136.60	30	1.76	146.80
6	2.07	83.81	31	1.95	98.73
7	1.86	88.02	32	1.99	104.53
8	1.86	89.60	33	1.71	106.65
9	1.79	108.00	34	1.76	120.35
10	1.83	136.42	35	1.85	62.45
11	1.7	103.70	36	1.89	456.20
12	2.04	71.25	37	1.82	73.40
13	1.87	87.29	38	1.95	81.90
14	1.77	96.32	39	1.96	92.70
15	1.83	73.23	40	1.81	119.20
16	1.74	189.90	41	1.78	71.95
17	1.71	101.70	42	1.86	103.85
18	1.85	90.50	43	1.92	79.82
19	1.82	95.60	44	1.93	214.30
20	1.92	78.90	45	1.98	86.96
21	1.95	228.60	46	1.86	265.40
22	1.87	245.60	47	1.92	421.30
23	1.8	214.60			
24	1.74	254.90			
25	2.06	325.60			

### **BRCA1/2 genlerinin 3'UTR' lerindeki Genetik Varyasyonların Değerlendirilmesi**

*BRCA1* geninin 3'UTR' si 4 parça olarak, *BRCA2* geninin 3'UTR' si ise 2 parça olarak PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Reaksiyon sonucunda elde edilen *BRCA1* geni 3'UTR' si için elde edilen 465, 522, 368 ve 560bç' lik ve *BRCA2* geni 3'UTR' si için elde edilen 338 ve 472 bç' lik PCR ürünlerinin doğruluğu ve kalitesi, %2' lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. *BRCA1* ve *BRCA2*



genlerinin 3'UTR' lerine ait agaroz jel elektroforezinde gözlenen bant görüntüleri Şekil-11' de gösterilmektedir.



**Şekil-11:** Agaroz jel elektroforezinde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin 3'UTR' lerine ait bant görüntüleri. **A:** *BRCA1* geni 3'UTR' si, **B:** *BRCA2* geni 3'UTR' si. L: Leader

Gerçekleştirilen HDA ve DNA dizi analizi sonucunda, hastaların % 27 (27/100)' sinin *BRCA1* geninin 3'UTR' sinde c.\*1287C>T (rs12516) ve hastaların % 24 (24/100)' ünün *BRCA2* geninin 3'UTR' sinde c.\*105A>C (rs15869) polimorfizmleri saptandı (Tablo-7).

**Tablo-7:** Belirlenen *BRCA1/2* 3'UTR polimorfizmleri

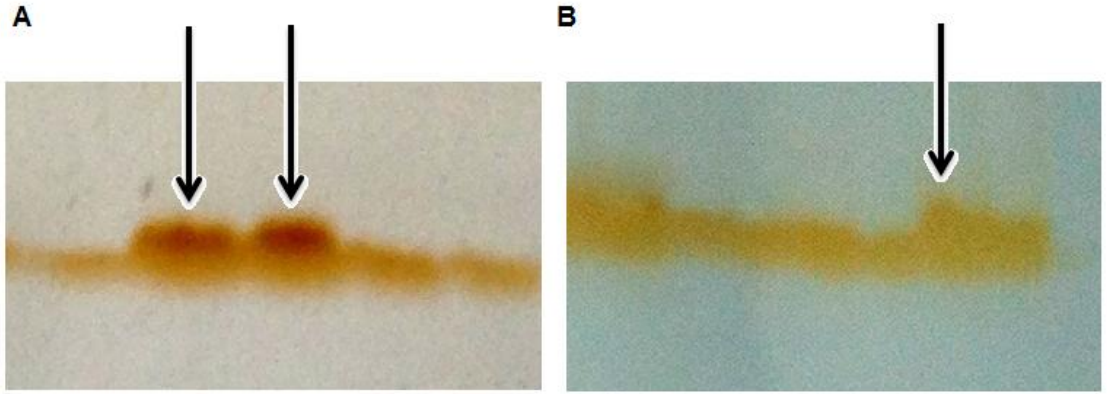
İsim	Gen	Varyant Tipi	Genomik Lokasyon	Tercih İsmi	Aleller	Atasal Alel	Sınıf	MAF
rs12516	<i>BRCA1</i>	3'UTR	Chr17:4304439 1	<i>BRCA1</i> :c.*1287C>T	C/T	C	SNP	A=0.3118/67 9
rs15869	<i>BRCA2</i>	3'UTR	Chr13:3297301 2	<i>BRCA2</i> :c.*105A>C	A/C	A	SNP	C=0.1556/33 8

\* MAF Küresel minör alel frekansı (dbSNP) (SNP:Single Nucleotide Polimorphism)

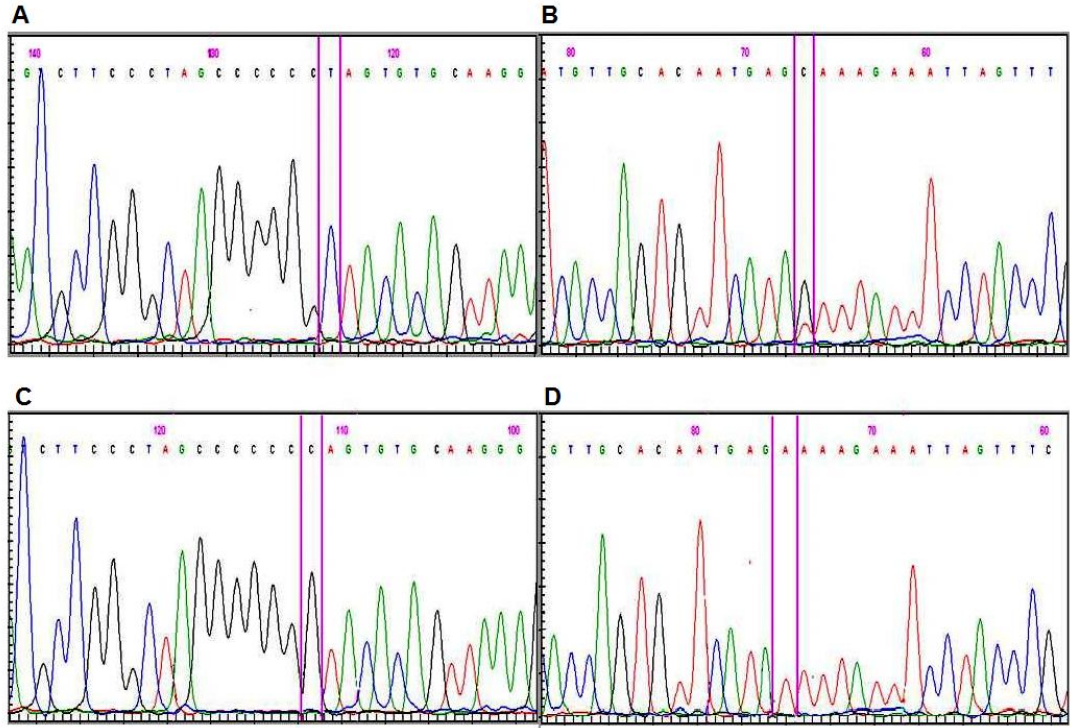
*BRCA1*' in 3'UTR' sinde c.\*1287C>T (rs12516) polimorfizmini taşıyan hastaların %10' unun ve *BRCA2*' nin 3'UTR' sinde c.\*105A>C (rs15869) polimorfizmini taşıyan hastaların % 8' inin *BRCA1/BRCA2* genlerinin protein kodlayan bölgelerinde daha önce rutin hasta hizmeti kapsamında mutasyon belirlenmiş olduğu tespit edildi.

*BRCA1*' in 3'UTR' sinde bulunan c.\*1287C>T (rs12516) ve *BRCA2*' nin 3'UTR' sinde bulunan c.\*105A>C (rs15869) polimorfizmleri sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda araştırıldığında, bu değişimlerin sırasıyla % 23.4 (11/47) ve % 23.4 (11/47) oranında kontrol grubunda da gözlemlendiği saptandı.

*BRCA1*' in 3'UTR' sinde gözlenen c.\*1287C>T (rs12516), *BRCA2*' nin 3'UTR' sinde gözlenen c.\*105A>C (rs15869) polimorfizmlerine ait HDA ve sekans görüntüleri Şekil-12 ve Şekil-13' te gösterildi.



**Şekil-12:** HDA' da *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin 3'UTR' lerinde gözlenen heredupleks yapısı. **A:** *BRCA1* geni 3'UTR' si **B:** *BRCA2* geni 3'UTR' si



**Şekil-13:** Hasta ve Kontrol grubuna ait DNA dizi analizi görüntüleri  
**A:** *BRCA1* rs12516 C→T, **B:** *BRCA2* rs15869 A→C, **C:** Normal (wt) *BRCA1* rs12516 C→T,  
**D:** Normal (wt) *BRCA2* rs15869 A→C

## Web Tabanlı Programlar İle Gerçekleştirilen Biyoanalizler

*BRCA1/2* genlerinin 3'UTR bölgeleri [microRNA.org](http://www.microrna.org) (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), [microinspector](http://www.imbb.forth.gr/microinspector) (<http://www.imbb.forth.gr/microinspector>) ve [microRNA database](http://www.mirbase.org/) (<http://www.mirbase.org/>) veritabanları kullanılarak analiz edildi. Ayrıca, Database of single nucleotide polymorphisms (dbSNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) veritabanı kullanılarak, bu bölgelerde belirlenen genetik varyasyonların anlamlılığı araştırıldı. miRNA - mRNA bağlanma bölgelerindeki SNPs'lerin tahmini [mirSNP](http://cmbi.bjmu.edu.cn/mirsnp) (<http://cmbi.bjmu.edu.cn/mirsnp>) veritabanı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu analizlere göre, c.\*105A>C (*BRCA2*) varyantının, herhangi bir miRNA'nın *BRCA2*'nin 3'UTR' sine bağlanma özelliğini değiştirdiğine ilişkin bir bilgiye rastlanmazken, c.\*1287C>T (*BRCA1*) varyantının miR-1264, miR-4278,

miR-4704 ve miR-637'nin BRCA1' in 3'UTR' sine bağlanma afinitesini arttırdığı tespit edildi (Tablo-8).

**Tablo-8:** Web tabanlı tahmin programlarına göre c.\*1287C>T (rs12516)' nin BRCA1' in 3'UTR' sine bağlanma afinitesini değiştirdiği miRNA' lar

Gen	miRNA	SNP	mirSVR	Etki	Allel	Skor	Enerji	Korunum
BRCA1	hsa-miR-1264	rs12516	-0.494	azalma	C	147	-22.42	0.256
					T	146	-18.06	0.256
BRCA1	hsa-miR-4278	rs12516		oluşma	C			
					T	144	-18.54	0.046
BRCA1	hsa-miR-4704-5p	rs12516		oluşma	C			
					T	156	-13.37	0.119
BRCA1	hsa-miR-637	rs12516	-0.12	kırılma	C	152	-24.19	0.059
					T			

\*mirSVR: Bağlanma bölgesinin mirSVR skoru Etki: Farklı allellerin etkisi, Alleler: Değişen alleller, Skor: miRanda veritabanına göre miRNA – mRNA bağlanma bölgesinin tahmin edilen skoru. En yüksek skor, en yüksek bağlanma enerjisi, Enerji: miRNA – mRNA dupleksinin serbest enerjisi, Korunum: UCSC' ye göre omurgalılarda phastCons 46 yolunun korunumu ile ilgili vary (SNP:Single Nucleotide Polimorphism)

### **c.\*1287C>T (rs12516) ve c.\*105A>C (rs15869)' nin Hastaların Klinik Özellikleri Üzerindeki Etkisi**

Gerçekleştirilen Fisher's Exact Test' e göre, hastalar ve kontrol grubu arasında BRCA1 c.\*1287C>T (rs12516) ve BRCA2 c.\*105A>C (rs15869) polimorfizmlerinin görülme sıklığı açısından anlamlı bir farklılık belirlenmedi ( $p>0.05$ ). Bununla birlikte, Fisher's Exact Test' e göre, BRCA2 geninin protein kodlayan bölgesinde mutasyon taşıyıcılığı ile, bu genin 3'UTR bölgesinde c.\*105A>C (rs15869) polimorfizmi taşıyıcılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamış ( $p = 0.443$ ) olmasına rağmen, BRCA1 geninin protein kodlayan bölgesinde mutasyon taşıyan hastalarda, istatistiksel olarak anlamlı sıklıkta aynı genin 3'UTR bölgesinde c.\*1287C>T (rs12516) varyantının da görüldüğü ortaya kondu ( $p = 0.035$ ). Ancak, Independent sample T testi sonucunda bu polimorfizmler ile hastaların klinik

özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenemedi ( $p>0.05$ ) (Tablo-9).

**Tablo-9:** BRCA1 mutasyonu ve 3'UTR c.\*1287C>T (rs12516) polimorfizmi taşıyıcılığının hastaların klinik özellikleri üzerindeki etkisi

	$p$ değeri*	Ortalama farklılık	Standart hata	% 95 güven aralığı	
				En düşük	En yüksek
Yaş	0.405	3.833	4.405	-5.982	13.649
Tümör çapı	0.584	12.992	22.989	-38.232	64.215
Tümör Evresi	0.207	0.667	0.494	-0.435	1.768
Ki67	0.752	-39.833	122.708	-313.245	233.578

\* $p$  değerleri Independent Sample T Testi ile belirlendi

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri gelişiminde en önemli genetik risk faktörleri, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* ve *ATM* gibi DNA tamirinde rol oynayan genlerde yer alan mutasyonlardır. Ailesel meme kanserlerinin % 30- %40' ının gelişiminden *BRCA1* ve *BRCA2* gen mutasyonlarının sorumlu olduğu bilinmektedir (55, 57, 90 – 93). Günümüze kadar meme kanseri ile ilişkili *BRCA1/2* mutasyonları, ilgili genlerinin protein kodlayan bölgelerindeki nükleotid dizilerinde araştırılmıştır. Bu değişimler *BRCA1/2* proteinlerinin yapısını ve çeşitli biyolojik fonksiyonlarını doğrudan etkilemektedirler (94, 95). Ancak, son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda genlerin protein kodlamayan bölgelerindeki nükleotid değişimlerinin de çeşitli hastalıklara yol açabildiği ortaya konmuştur (96). mRNA' nın kararlılığı, genin protein kodlamayan bölgesinde yer alan 3'UTR' deki cis-etkili elementlerin trans-etkili faktörler ile etkileşimi yoluyla gerçekleşmekte ve mRNA' nın 3'UTR' si gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Goto ve arkadaşları (97), insan dehidrofolat gen ifadesinin 3'UTR' sinden yer alan değişimler nedeniyle değiştiğini ifade etmişlerdir. Genlerin 3'UTR bölgesinde yer alan değişimler, bu bölgelere farklı affinitelerle bağlanarak ilgili proteinin inhibisyonuna ve/veya mRNA' nın yıkımında rol oynayan miRNA' ların bu bölgelere bağlanma özelliklerini etkileyerek protein ifadesinin epigenetik kontrolünün bozulmasına yol açmaktadırlar.

miRNA' lar hücre metabolizması, ölümü, çoğalması, farklılaşması ve gelişimi gibi birçok hücresel süreçte düzenleyici rol oynamaktadırlar (98 – 101). Gerçekleştirilen çalışmalar, miRNA ekspresyonlarının düzenlenmesinde gerçekleşen bozuklukların kanser oluşum sürecini tetiklediğini ortaya koymuştur (102 – 105). Egeli ve arkadaşlarının (65) 2006 yılında, Çeçener ve arkadaşlarının da (64) 2014 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında Türk popülasyonuna ait ailesel ve erken yaş meme kanserlerinin yaklaşık 1/3' ünün *BRCA1* veya *BRCA2* genlerinde mutasyon

taşıdıkları belirlenmiştir. Son dönemde meme kanseri oluşumu ile ilişkili miRNA ekspresyon profilleri ve sinyal yollarının ortaya konmasını hedefleyen çok sayıda çalışma olmasına rağmen, bu miRNA'ların meme kanseri oluşumu ile ilişkili genlere bağlanma afinitelerini etkileyen faktörler yeterince araştırılmamıştır (106 – 109). Bu nedenle, mevcut çalışmada *BRCA1/2* genlerinin kodlanan bölgelerinin dışında kalan genetik değişimlerin ailesel ve/veya erken yaş meme kanseri ile ilişkisinin araştırılabilmesi için bu genlerin 3'UTR bölgelerindeki tek nükleotid değişimleri (SNP), bu değişimlerin Türk populasyonunda görülme sıklıkları ve fonksiyonel önemleri araştırılmıştır.

Türk populasyonunda gerçekleştirilen mevcut çalışmada, ailesel ve/veya erken yaş meme kanseri hastalarında *BRCA1* geni 3'UTR bölgesindeki c.\*1287C>T (rs12516) ve *BRCA2* geni 3'UTR bölgesindeki c.\*105A>C (rs15869) olmak üzere iki SNP değerlendirilmiştir. Bu SNP'ler, *BRCA1/2* genlerinin protein kodlayan bölgelerinde mutasyon bulunmayan hastalarda ailesel ve/veya erken yaş meme/over kanseri riskini arttırdığı daha önceki çalışmalarla ortaya konmuştur (14, 16). Sehl ve arkadaşlarının (10) gerçekleştirdiği çalışmada çift iplik DNA tamir yolağı ile ilişkili 17 gende 104 tane SNP araştırılmış ve özellikle *RAD21* geni intron bölgesinde bulunan rs16888927, rs16888997 ve rs16889040'ın, *BRCA1* geni intron bölgesinde bulunan rs12516'nın ve *BRCA2* geni intron bölgesinde bulunan rs15869 SNP'lerinin meme ve over kanserleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı araştırma ekibi tarafından çift iplik DNA tamir yolağı ile ilişkili genlerde ya da yakınında SNP bulunan hastaların meme kanseri açısından yüksek risk altında oldukları ifade edilmiştir (10). Bununla birlikte, Pelletier ve arkadaşları (11) 221 sporodik Avrupa ve Afrika kökenli Amerikalı meme kanseri hastasında *BRCA1* geni 3'UTR bölgesindeki SNP'leri araştırmışlar ve bu bölgede yer alan rs12516, rs8176318 ve rs3092995 değişimlerinin her iki hasta populasyonu için de risk faktörü oluşturduğunu saptamışlar ve özellikle Afrika kökenli Amerikalı ve triple- negatif (Hormon Reseptör ve Her-2 negatif) hastalarda rs8176318 polimorfizminin meme kanseri riskini ortaya koyan bir belirteç olduğunu belirtmişlerdir. Brewster ve arkadaşları (110) ise,

*BRCA1* geni 3'UTR bölgesinde, rs8176318 (c.\*421G>T) ve rs12516 (c.\*1287C>T) polimorfizmlerinin yaygın olarak bulunduğunu göstermişlerdir. Fox Chase Cancer Center' da gerçekleştirilen bu araştırmada *BRCA1* geni 3'UTR bölgesindeki c.\*421G>T ve c.\*1287C>T (421T/1287T) değişimlerinin *BRCA1* gen ifadesinin düzenlenmesini etkilediği ortaya konmuştur (110). Bu SNP' lerin her ikisini birlikte taşıyan hastaların *BRCA1* gen ekspresyon seviyesi yaklaşık % 67 oranında azalırken, c.\*1287C>T (1287T) değişimini tek başına taşıyan hastalarda bu genin ifadesinin % 185 arttığı, c.\*421G>T (421T) değişiminin ise tek başına bir etkiye yol açmadığı belirlenmiştir (110). Mevcut çalışmada ise, hastaların % 27 (27/100)' inde *BRCA1* geni 3'UTR bölgesinde c.\*1287C>T (rs12516) ve % 24 (24/100)' ünde *BRCA2* geni 3'UTR bölgesinde c.\*105A>C (rs15869) değişimleri olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra, *BRCA1* geni 3'UTR bölgesinde c.\*1287C>T (rs12516) varyantı taşıyan hastaların %10' unun ve *BRCA2* geni 3'UTR bölgesinde c.\*105A>C (rs15869) polimorfizmi taşıyan hastaların %8' inin aynı zamanda *BRCA1/2* genlerinde de mutasyon taşıdıkları saptanmıştır. Ayrıca, kontrol grubunun % 23.4 (11/47)' ünde *BRCA1* c.\*1287C>T (rs12516) ve % 23.4 (11/47)' ünde *BRCA2* c.\*105A>C (rs15869) varyantları bulunduğu belirlenmiştir. Bugularımıza göre, *BRCA2* geninin protein kodlayan bölgesinde mutasyon taşıyıcılığı ile, bu genin 3'UTR bölgesinde c.\*105A>C (rs15869) polimorfizmi taşıyıcılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamış ( $p = 0.443$ ) olmasına rağmen, *BRCA1* geninin protein kodlayan bölgesinde mutasyon taşıyan hastalarda, istatistiksel olarak anlamlı sıklıkta aynı genin 3'UTR bölgesinde c.\*1287C>T (rs12516) varyantının da görüldüğü belirlenmiştir ( $p = 0.035$ ). Ancak, gerçekleştirilen bağımsız T testi verilerine göre, her iki değişimin birlikte görülmesi ile hastaların klinik özellikleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. *BRCA1* gen mutasyonları ile c.\*1287C>T (rs12516) polimorfizminin birlikte görülmesinin hastaların prognostik özellikleri ile ilişkisinin ortaya konabilmesi için değerlendirilen vaka sayısının arttırılması ve hasta takip süresinin uzatılması gerekmele birlikte, bulgularımız bu genin aynı anda hem kodlanan ve hem de kodlanmayan bölgelerinde genetik değişim



bulunmasının ailesel/ erken yaş meme kanseri gelişimde rol oynuyor olabileceğini desteklemektedir.

Gerçekleştirilen çalışma aynı zamanda *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin 3'UTR bölgelerine eşlenik olarak bağlanabilen miRNA' ların araştırılabilmesi için de ön bilgi oluşturmaktadır. miRNA' ların hedef mRNA' ların 3'UTR bölgelerine bağlanmaları, bu mRNA' ların ve protein ürününün ekspresyon seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hedef mRNA' nın 3'UTR bölgesinde yer alan SNP' ler miRNA' ların bu bölgelere bağlanma kapasitesi etkilemektedir. Mevcut çalışmanın bulguları, daha önce farklı popülasyonlarda gerçekleştirilen çalışmaları destekler nitelikte olup, *BRCA1/2* genlerinin 3'UTR bölgesinde bulunan SNP' lerin meme kanseri riskinin belirlenmesinde potansiyel genetik belirteçler olabileceğini ortaya koymaktadır (11, 14). İleri miRNA transfeksiyon çalışmaları ile araştırılması gerektiğine inanmakla birlikte, mevcut çalışmada Türk popülasyonunda meme kanseri hastalarında anlamlı sıklıkta belirlenen *BRCA1* geni c.\*1287C>T (rs12516) polimorfizminin, bazı miRNA' ların *BRCA1* geni 3'UTR bölgesine bağlanma afinitesinin azalmasına yol açıyor ya da farklı fonksiyonlara sahip miRNA' lar için yeni bağlanma bölgeleri oluşturuyor olabileceğini düşünmekteyiz. Mevcut çalışmada, microRNA.org, microinspector ve microRNA database'den yararlanılarak hsa-miR-1264, hsa-miR-4278, hsa-miR-4704-5p and hsa-miR-637'nin *BRCA1* geni 3'UTR bölgesine eşlenik olarak bağlanabilme potansiyelinde olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, *BRCA1* geni 3'UTR bölgesine miRNA bağlanma afinitesinin artmasının meme kanseri riskinde artışa yol açabileceğini düşünmekteyiz. *BRCA2* geni 3'UTR bölgesinin meme kanseri oluşumundaki rolünün anlaşılması için ileri araştırmalar yapılması gerektiğine inanmakla birlikte, elde ettiğimiz mevcut veriler ile bu hastalığın başlangıcının moleküler mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlanmıştır.

Özet olarak, bulgularımız *BRCA1* geni 3'UTR bölgesinde yer alan c.\*1287C>T (rs12516) polimorfizminin meme kanseri gelişimi riskinin belirlenmesinde genetik bir belirteç olma potansiyeli ile ilgili verileri destekler niteliktedir. Ayrıca, bu polimorfizmin Türk popülasyonunda *BRCA1* geni

fonksiyonunu etkileyerek ailesel ve/veya erken yaş meme kanseri riskini arttırıyor olabileceği mevcut çalışma ile ilk kez gösterilmiştir.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen çalışma ile Türk populasyonunda *BRCA1/2* genlerinin 3'UTR bölgelerindeki SNP tipleri ve sıklığı ilk kez araştırılmıştır. Ayrıca, klinik öneminin ortaya konabilmesi için çalışılan vaka sayısının arttırılarak ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir, *BRCA1* gen mutasyonu taşıyan hastaların anlamlı bir sıklıkla c.\*1287C>T (rs12516) değişimini de taşıdıkları belirlenmiştir. Çalışmamızın, *BRCA1/2* genlerinin 3'UTR bölgelerindeki polimorfizmlerin miRNA' ların bağlanma özelliklerini üzerindeki etkisini araştırmayı ve bireye özgü miRNA temelli tedavi modellerinin oluşturulmasını hedefleyen ileri alışmalar için yol gsterici olabileceğini dşnmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61: 69-90.
2. Downs-Holmes C, Silverman P. Breast cancer: overview and updates. *The Nurse Practitioner*. 2011; 36: 20-6.
3. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet*. 1991; 48: 232-42.
4. Szabo CI, King MC. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet*. 1997; 60:1013-20.
5. Ferla R, Calò V. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. *Ann Oncol*. 2007; 18: 93-8.
6. Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RH. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*. 2004; 49: 34-43.
7. Kooshyar MM, Nassiri M, Mahdavi M, et al. Identification of germline BRCA1 mutations among breast cancer families in Northeastern Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14: 4339-45.
8. Hennessy BT, Timms KM, Carey MS, et al. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 3570-6.
9. 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.
10. Sehl ME, Langer LR, Papp JC, et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in double-stranded DNA repair pathway genes and familial breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 2192-203.
11. Pelletier C, Speed WC, Paranjape T, et al. Rare BRCA1 haplotypes including 3'UTR SNPs associated with breast cancer risk. *Cell Cycle*. 2011; 10: 90-9.
12. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 2007; 23: 243-9.
13. Barroso E, Pita G, Arias JI, et al. The Fanconi anemia family of genes and its correlation with breast cancer susceptibility and breast cancer features. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 118: 655-60.
14. Pongsavee M, Yamkamon V, Dakeng S, et al. The BRCA1 3'-UTR: 5711?421T/T\_5711?1286T/T genotype is a possible breast and ovarian cancer risk factor. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009; 13: 307-17.

15. Kontorovich T, Levy A, Korostishevsky M, Nir U, Friedman E. Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women. *Int J Cancer*. 2010; 127: 589-97.
16. Nicoloso MS, Sun H, Spizzo R, et al. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility. *Cancer Res*. 2010; 70: 2789-98.
17. Joseph S, Sellappa S, Prathyumnan S, Keyan KS. A novel polymorphism in BRCA2 exon 8 and breast cancer risk in South India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12: 309-11.
18. World Health Organisation Statistics 2012 ([http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2012/en/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/))
19. Handley RS, Gordon-Taylor, Breast cancer and the Middlesex Hospital. *Ann R Coll Surg Engl*. 1971; 49(3):151-64.
20. Sağlık Bakanlığı, Sağlık istatistikleri yılı -2008 (<http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-10064/saglik-istatistikleri-yilligi-2008.html>)
21. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 1;136(5):E359-86.
22. Aydın S, Akça T. Tüm yönleri ile meme kanseri. Adana: Nobel Kitabevi Ltd.Şti; 2011.
23. Nwabo Kamdje AH, Etet PF, Vecchio L, et al. A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers. *World J Clin Cases*. 2014;16;2(12):769-86.
24. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 2009; 9;361(2):123-34.
25. Nwabo Kamdje AH, Etet PF, Vecchio L et al. New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers. *World J Clin Cases*. 2014; 16;2(12):769-86.
26. Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes AM, et al. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast Cancer (Auckl)*. 2014; 15;8:145-55.
27. American Joint Committee on Cancer (<https://cancerstaging.org/Pages/default.aspx>).
28. Bertos NR, Park M. Breast cancer - one term, many entities? *J Clin Invest*. 2011;121(10):3789-96.
29. Rew DA. Heterogeneity, biodiversity and bioperversity in solid neoplasms. *Eur J Surg Oncol*. 1996; 22(5):469-73.
30. Glinsky GV, Higashiyama T, Glinskii AB. Classification of human breast cancer using gene expression profiling as a component of the survival predictor algorithm. *Clin Cancer Res*. 2004; 1;10(7):2272-83.
31. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 19;347(25):1999-2009.

32. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 31;415(6871):530-6.
33. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 2005; 19-25;365(9460):671-9.
34. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 11;98(19):10869-74.
35. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 17;406(6797):747-52.
36. Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006; 27;7:96.
37. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 8;100(14):8418-23.
38. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;10;27(8):1160-7.
39. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005; 7;24(29):4660-71.
40. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68.
41. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011; 5(1):5-23.
42. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009; 10;27(8):1160-7.
43. Sotiriou C, Piccart MJ. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(7):545-53.
44. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012; 4;490(7418):61-70.
45. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):R65.
46. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 2;100(18):10393-8.
47. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;15;11(16):5678-85.

48. Barh D, Parida S, Parida BP, et al. Let-7d, mir-125, mir-205 and mir-296 are prospective therapeutic agents in breast cancer molecular medicine, *Gene Therapy and Molecular Biology*. 2008, 12: 189-206.
49. Honrado E, Benítez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol*. 2005;18(10):1305-20.
50. Agnarsson BA, Jonasson JG, Björnsdóttir IB, et al. Inherited BRCA2 mutation associated with high grade breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;47(2):121-7.
51. Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(2):225-31.
52. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994 16;266(5192):1821-8.
53. Xu B, Kim St, Kastan MB. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(10):3445-50
54. Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, et al. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol*. 2001; 11(11):S52-9.
55. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994; 266:66–71.
56. Bertwistle D, Ashworth A: Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8:14–20.
57. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995; 378:789–791.
58. Bork P, Blomberg N, Nilges M: Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nature Genet*. 1996; 13:22–23.
59. Bignell G, Micklem G, Stratton MR, et al. The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum Mol Genet*. 1997; 6:53–58.
60. Chen PL, Chen CF, Chen Y, et al. The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:5287–5292.
61. Wong AKC, Pero R, Ormonde PA, et al. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene BRC. *J Biol Chem*. 1997; 272:31941–31944.
62. Bertwistle D1, Ashworth A. The pathology of familial breast cancer: How do the functions of BRCA1 and BRCA2 relate to breast tumour pathology? *Breast Cancer Res*. 1999;1(1):41-7.
63. Wang F, Fang Q, Ge Z, et al. Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families: a meta-analysis from systematic review. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(3):2109-18.
64. Cecener G, Egeli U, Tunca B, et al. BRCA1/2 germline mutations and their clinical importance in Turkish breast cancer patients. *Cancer Invest*. 2014; 32(8):375-87.

65. Egeli U, Cecener G, Tunca B, et al. Novel germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish women with breast and/or ovarian cancer and their relatives. *Cancer Invest.* 2006;24: 484–491.
66. Hamel N, Feng BJ, Foretova L, et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:300–306.
67. Honrado E, Benítez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol.* 2005;18(10):1305-20.
68. Naipal KA, Verkaik NS, Ameziane N, et al. Functional ex vivo assay to select homologous recombination-deficient breast tumors for PARP inhibitor treatment. *Clin Cancer Res.* 2014;15;20(18):4816-26.
69. Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19(3):266-272.
70. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics.* 2006; 1(2):76-80.
71. Feinberg AP. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA.* 2008;299:1345–1350.
72. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:1148–1159.
73. Selaru FM, David S, Meltzer SJ, Hamilton JP. Epigenetic events in gastrointestinal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:1910–1912.
74. Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136: 215–233.
75. miRBase: the microRNA database. release 17; April 2011 [cited 2011 Sept 15]. Available from: <http://www.mirbase.org>
76. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev.* 2011; 91:827–87.
77. Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene.* 2006; 9;25(46):6170-5.
78. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med.* 2012; 4(3):143-59.
79. Pal M, Pal P. BRCA1 and miRNAs: An Emerging Therapeutic Target and Intervention Tool in Breast Cancer. *Journal of PharmaSciTech.* 2013; 3: 9-19.
80. Palmero EI, de Campos SG, Campos M, et al. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genet Mol Biol.* 2011; 34(3): 363-70.
81. Debeleş-Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon , DNA hasarı ,onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2006; 35 (2):149 – 170.
82. Ekmekçi A, Konaç E, İlke Önen H. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal.* 2008; 21(3): 282-295.
83. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11:1513- 1530.

84. Imyanitov E, Hanson K, Zhivotovsky B. Polymorphic variations in apoptotic genes and cancer predisposition. *Cell Death Differ.* 2005; 12: 1004–1007.
85. Kozlowski P, Olejniczak M, Krzyzosiak WJ. Rapid heteroduplex analysis by capillary electrophoresis. *Clin Chim Acta.* 2005; 353(1-2): 209-14.
86. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1977; 74: 5463-7.
87. Klug SW, Cummings WR. *Concept of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey. 2000; 745p
88. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory Press New York. 1989.
89. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986; 321 (6071): 674–9.
90. Chen Y, Lee W, Chew HK. Emerging roles of BRCA1 in transcriptional regulation and DNA repair. *J Cell Physiol.* 1999; 181: 385-92.
91. Peto I, Collins N, Barfoot R, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 943-9.
92. Khana KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001; 27: 247-54.
93. Keen JC, Davidson NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer.* 2003; 97: 825-33.
94. Scully R, Livingston DM. In search of the tumoursuppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature.* 2000; 408: 429-32.
95. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell.* 2002; 108: 171-82.
96. Cazzola M, Skoda RC. Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood.* 2000; 95: 3280-88.
97. Goto Y, Yue L, Yokoi A, et al. A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 1952-6.
98. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005; 65: 9628-32.
99. Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene.* 2006; 25: 6176-87.
100. Zhang B, Pan X, Anderson TA. MicroRNA: a new player in stem cells. *J Cell Physiol.* 2006; 209: 266-9.
101. Kayani Mu, Kayani MA, Malik FA, Faryal R. Role of miRNAs in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011; 12: 3175-80.
102. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005; 435: 828-33.
103. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005; 435: 834-8.



104. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-MYC regulated microRNAs modulate E2F-1 expression. *Nature*. 2005; 435: 839-43.
105. Li JY, Jia S, Zhang WH, et al. Differential distribution of microRNAs in breast cancer grouped by clinicopathological subtypes. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14: 3197-203.
106. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 259-69.
107. Wu W, Sun M, Zou GM, Chen J. MicroRNA and cancer: current status and prospective. *Int J Cancer*. 2007; 120: 953-60.
108. Hafez MM, Hassan ZK, Zekri AR, et al. MicroRNAs and metastasis-related gene expression in Egyptian breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13: 591-8.
109. Erturk E, Cecener G, Egeli U, et al. Expression status of let-7a and miR-335 among breast tumors in patients with and without germ-line BRCA mutations. *Mol Cell Biochem*. 2014; 395(1-2):77-88.
110. Brewster BL, Rossiello F, French JD, et al. Identification of fifteen novel germline variants in the BRCA1 3'UTR reveals a variant in a breast cancer case that introduces a functional miR-103 target site. *Hum Mutat*. 2012; 33: 1665-75.

## **KISALTMALAR**

RB1(retinoblastoma protein)

Myb: avian myeloblastosis viral oncogene homolog

RPPA: reverse phase protein array

FOXM1: forkhead box M1

JAK:janus kinase

STAT: Signal Transducer and Activator of transcription

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

FHIT: Fragile histidine triad

Cdk2: cyclin dependent kinase 2

Chk2: checkpoint kinase 2

PIK3CA(phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)

## TEŞEKKÜR

Bana yalnızca ömrüm boyunca yaşamımı kazanacağım mesleği edindirerek değil, tüm mucizesi bir yana günden güne teknik bir işe dönüşen tıp alanında halen “sanat” sıfatını hakeden Genel Cerrahi’de, mesleğimi bu sanat yönüyle tanıtan ve sevdiren, rehberim, ustam ve hocam olan değerli Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı öğretim üyelerine,

Gerek eğitim hayatımda, gerekse tezimi oluşturma aşamasından başlayarak bu güne kadar ki tüm yolum boyunca ilgisini ve yardımını esirgemeyen tez danışmanı hocam Prof Dr Mustafa Şehsuvar Gökgöz’e,

Tezimin her aşamasında cömert katkı ve yardımları olan Tıbbi Biyoloji A.D. başkanı Prof Dr Ünal Egeli , Prof Dr Gülşah Çeçener ve tüm öğretim üyelerine,

Tezimin tanışmama vesile olmasını şans saydığım ve bu süreçte büyük yardımlarını gördüğüm dostlarım Elif Ertürk ve Gülçin Tezcan’a,

İşimin tüm yüküne rağmen kendimi aralarında her zaman mutlu hissettiğim çalışma arkadaşlarıma,

Annem, babam, kardeşlerime,

Her birinin üzerimde, -ödemek için bir ömrün yetmeyeceği kadar- hakkı olan tüm meslek büyüklerim, ustalarım içerisinde hem dost hem de meslektaş olarak müstesna bir yeri olan Halit Ziya DüNDAR’a,

Burada tek tek anamadığım tüm çalışma arkadaşlarım dostlarım ve aile fertlerine teşekkür ediyorum.

## **ÖZGEÇMİŞ**

9 Temmuz 1980 yılında Ankara'da doğdum.İlkokulu Ankara Namık Kemal İlkokulu ve Diyarbakır Ergani İnkılap İlkokulu'nda, ortaokulu Artvin Yusufeli'nde Yusufeli Lisesi ve Halil Rıfat Paşa İlköğretim Okulu ile Ankara Ayaş'ta Ayaş Lisesi'nde tamamladım. Lise öğrenimimi Sivas Fen Lisesi'nde tamamladıktan sonra tıp eğitimimi Erciyes Üniversitesi'nde aldım. Genel cerrahi uzmanlık eğitimime 2008 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinde başladım.