

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**BRCA1 VE BRCA2 MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASINDA
YENİ NESİL MOLEKÜLER YÖNTEM SONUÇLARININ
KONVANSİYONEL DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. TAHA BAHSİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. E. FERDA PERÇİN**

**ANKARA
NİSAN 2014**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**BRCA1 VE BRCA2 MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASINDA
YENİ NESİL MOLEKÜLER YÖNTEM SONUÇLARININ
KONVANSİYONEL DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. TAHA BAHSİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. E. FERDA PERÇİN**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2012-75 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
NİSAN 2014**

KABUL VE ONAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Savunma Sınav Tutanağı

28/04/2014

Adı ve Soyadı	Taha Bahsi
Baba Adı	Mehmet Bahsi
Doğum Yeri/Tarihi	Niğde / 10.09.1979
Diploma Tarihi/Diploma No	01.07.2005 / 2119
Mezun Olduğu Fakülte	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 3 Ay: 10
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: "BRCA1 ve BRCA2 Mutasyonlarının
Araştırılmasında Yeni Nesil Moleküler Yöntem Sonuçlarının Konvansiyonel Dizi
Analizi Yöntemi ile Karşılaştırılması"

JÜRİ KARARI: Başarılı

JÜRİ ÜYELERİ:

BAŞKAN

Prof.Dr.E.Ferda Perçin

Prof.Dr.Meral Yirmibeş Karaoğuz

Prof.Dr.Mehmet Ali Ergün

Doç.Dr.Esra Tuğ

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik asistanlığımda burada olmamda büyük hakları olan ve beni yetiştiren değerli hocalarıma en başta sonsuz teşekkür ederim.

Tıp Fakültesi öğrenciliğimde öğrencisi olmaktan, Tıbbi Genetik asistanlığımda da asistanı olmaktan onur duyduğum, mesleki, ahlaki ve sosyal anlamda bizleri en iyi şekilde yetiştirmek için büyük emek harcayan, doğruluğu, dürüstlüğü ve çalışkanlığı ile bizlere örnek olan ve tezimde büyük emekleri olan, tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız çok değerli hocam sayın Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e, çalışkanlığı, bilimselliği, sıkıntılı anlarımızda bizlerden esirgemediği yardımları ve bizlere her zaman göstermiş olduğu sevgi ve şefkatli yaklaşımlarıyla, her zaman derdimizi anlattığımız çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'a, asistanlığımız boyunca bizlere bazen hocalık, bazen ağabeylik, bazen de arkadaşlık yapan, bizlerden hiçbir şeyini esirgemeyen, maddi-manevi her an yanımızda olan ve tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e, bizlere ablalık yapan, yol gösteren ve her zaman danışmaktan çekinmediğimiz çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Esra Tuğ'a çok teşekkür ederim.

Tezime katkılarından dolayı İstanbul Acıbadem Hastanesi Genetik Tanı Merkezi'nden Prof. Dr. M. Cengiz Yakıcıer ve Şirin Demir'e teşekkür ederim.

Asistanlık hayatım boyunca birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum değerli çalışma arkadaşlarım; Uzm. Dr. Abdullatif Bakır, Dr. Fatma Nihal Dilek, Dr. Gülsüm Kayhan, Dr. Bayram Taşkın, Uzm. Dr. Ayşegül Öztürk Kaymak, Uzm. Dr. Büşranur Çavdarlı, Uzm. Dr. Guyem Kolbaşlı Özgen, Dr.

Hanife oban, Dr. Pelin zyavuz ubuk, Dr. Aysel Tekmenuray, Dr. Serdar Mermer ile Bio. Işıl Kn Kiraz, Uzm. Bio. Derya Karaer, Uzm. Bio. Sezen Güntekin Ergün, Uzm. Bio. Ebru Aytekin, Uzm. Bio. Halide Gl Akyar, Selma Karakılıç, Esra Küçük ve sekreterimiz Mehtap Tırpan’a çok teşekkür ederim.

Beni dünyaya getiren, yetiştiren, hayat boyu bana ve kardeşlerime emek harcayan ve destek olan anne ve babama çok teşekkür ederim.

Beraber büyüyüp birçok şeyi paylaştığım ablalarım ve kardeşime çok teşekkür ederim.

Hayatı paylaştığım, hep yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili eşim Seda’ya çok teşekkür ederim.

Oğlum FURKAN'A

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	1
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser.....	2
2.1.1. Kanserin Tarihçesi	2
2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	2
2.1.3. Kanser ve Genetik.....	3
2.2. Meme Kanseri	6
2.2.1. Meme Kanserinin Etyolojisi ve Risk Faktörleri	8
2.2.2. Meme Kanserinin Sınıflandırılması.....	10
2.2.3. Meme Kanseri ve Genetik	13
2.2.4. Meme Kanserinden Sorumlu Genler	14
2.2.5. Ailesel Meme Kanseri.....	24
2.3. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genleri	25
2.3.1. <i>BRCA1</i> Geninin Yapısı	26
2.3.2. <i>BRCA1</i> -BRCT Domaini.....	27
2.3.3. <i>BRCA1</i> RING Domaini.....	28
2.3.4. <i>BRCA2</i> Geninin Yapısı	29
2.3.5. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Mutasyonları	30
2.3.6. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Gen Mutasyonlarının Toplumlara Göre İnsidansları.....	31
2.4. Meme Kanserinde Etik ve Genetik Danışma	34
2.4.1. Genetik Bilgilendirme.....	35

2.4.2.	Genetik Ayrımcılık ve Yasal Düzenlemeler	36
2.4.3.	Genetik Danışma.....	37
2.5.	<i>BRCA1/BRCA2</i> Mutasyon Analizinde Kullanılan Tanı Yöntemleri.....	38
2.5.1.	MLPA	39
2.5.2.	Konvansiyonel Dizi Analizi.....	39
2.5.3.	Mikroarray ile Yeniden Dizileme	40
2.5.4.	Next Generation Sequencing	41
3.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	46
3.1.	Hasta Grubu.....	46
3.2.	DNA Eldesi İçin Gerekli Malzemeler	46
3.3.	Yüksek Tuz Konsantrasyonlu DNA İzolasyon Yöntemi	47
3.4.	GeneChip <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Dizileme Protokolü (Affymetrix)	48
3.3.1.	Genomik DNA Hazırlanması.....	48
3.3.2.	Long-Range PZR Protokolü	48
3.3.3.	PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu	50
3.3.4.	PZR Ürünlerinin Miktar Tayini ve Birleştirilmesi.....	51
3.3.5.	Fragmentasyon.....	52
3.3.6.	İşaretleme	53
3.3.7.	Hibridizasyon.....	54
3.3.8.	Yıkama-Boyama-Tarama.....	57
3.4.	GS Junior 454 Sequencing Çalışma Protokolü	59
3.4.1.	PZR Hazırlanması.....	59
3.4.1.5.	Multipleks PZR'den Havuz Oluşturma	62
3.4.1.6.	Amplikon Kütüphanesi'nin Pürifikasyonu	62
3.4.2.	Boncukların Saflaştırılması.....	65
3.4.3.	Boncuk Zenginleştirme ve Boncuk Sayımı	66
3.4.3.1.	DNA Boncuk Zenginleştirme	67
3.4.3.2.	Zenginleştirilmiş Boncukların Toplanması	68
3.4.3.3.	Boncuk Sayımı.....	69
3.4.3.4.	Dizileme İşlemi.....	69

4. BULGULAR.....	72
4.1. Olgu 1	72
4.2. Olgu 2	73
4.3. Olgu 3	74
4.4. Olgu 4	74
4.5. Olgu 5	75
4.6. Olgu 6	77
4.7. Olgu 7	78
4.8. Olgu 8	80
4.9. Kontrol Grubu Analiz Bulguları.....	82
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇ	98
7. KAYNAKLAR	100
8. ÖZET	110
9. SUMMARY	111
10. ÖZGEÇMİŞ	112
11. EKLER.....	114
EK 1.	114
EK 2.	116

KISALTMALAR

<i>ADPRT</i>	: ADP-ribosyltransferase
<i>AKT1</i>	: V-akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1
<i>APEX1</i>	: Apex nuclease
<i>AR</i>	: Androgen reseptor
<i>ATM</i>	: Ataxia Telangiectasia Mutated
<i>BACH1</i>	: BTB and CNC homology 1 basic leucine zipper transcription factor
<i>BARD1</i>	: <i>BRCA1</i> associated RING domain 1
<i>BASC</i>	: <i>BRCA1</i> -associated genome surveillance complex
<i>BB2</i>	: Prepare Bead Buffer 2
<i>B.Ç</i>	: Baz Çifti
<i>BRCA1</i>	: Breast cancer 1, early onset (Erken başlangıçlı meme kanseri 1)
<i>BRCA2</i>	: Breast cancer 2, early onset (Erken başlangıçlı meme kanseri 2)
<i>CCD</i>	: Charge-Coupled Device
<i>CCND1</i>	: Cyclin-D1
<i>CCNE1</i>	: Cyclin-E1
<i>CDH1</i>	: Cadherin1
<i>CHEK2</i>	: Checkpointkinase2
<i>CNV</i>	: Copy Number Variation (Kopya Sayısı Değişikliği)
<i>ddATP</i>	: Dideoksiadenozin trifosfat
<i>ddCTP</i>	: Dideoksisitozin trifosfat
<i>ddGTP</i>	: Dideoksiguanozin trifosfat
<i>ddNTP</i>	: Dideoksinükleotid trifosfat
<i>ddTTP</i>	: Dideoksitimin trifosfat
<i>dH₂O</i>	: Distile su
<i>DIRAS3</i>	: GTP-binding RAS-like3
<i>DNA</i>	: Deoksiribo nükleik asit

dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
dsDNA	: Double stranded DNA (Çift Zincir DNA)
<i>EIF4-E</i>	: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
FHL2	: Four And A Half LIM Domains 2
GINA	: Genetic Information Nondiscrimination Act (Genetik Bilgi Ayrımcılık Yasası)
HCl	: Hidroklorik asit
HDACI	: RNA Polimeraz II, P300, histone deacetylase 1
HDACII	: RNA Polimeraz II, P300, histone deacetylase 2
<i>HER2/neu</i>	: V-erb-b2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
HsDNA	: High sensivity DNA (Yüksek Duyarlıklı DNA)
IARC	: International Agency on Cancer for Research (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)
KCl	: Potasyum klorür
<i>LIG3</i>	: Ligase III, DNA ATP Dependent
MgCl ⁺²	: Magnezyum klorür
MLPA	: Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification
MPC	: Magnetic Particle Collector (Manyetik Partikül Toplayıcı)
<i>MUTYH</i>	: MutY homologue
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Na ₂ EDTA	: Di-Sodyum-EDTA
NCCN	: The National Comprehensive Cancer Network
NGS	: Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)
<i>NBN</i>	: Nibrin
OCCR	: Overian Cancer Cluster Region
<i>OGG1</i>	: 8-Oxoguanine DNA Glycosylase
<i>PALB2</i>	: Partner and Localizer of <i>BRCA2</i>
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

<i>RAD51</i>	: RAD51 recombinase
<i>RAD52</i>	: RAD52 homologue
RNA	: Ribonükleik asit
SDS	: Sodium Dodesil Sulfate
<i>SMUG1</i>	: Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Değişikliği)
ssDNA	: Single stranded DNA (Tek Zincir DNA)
SSPE	: Saline Sodium Phosphate EDTA
<i>STK11</i>	: Serine/threonine kinase 11
TBE	: Tris Borik asit EDTA
<i>TDG</i>	: Thymine-DNA Glycosylase
TdT	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TE	: Tris-EDTA
TMACl	: Tetramethylammonium Chloride
TP53	: Tumor Protein 53
TRAP220	: Triiodothyronine Receptor Auxiliary Protein
<i>XRCC1</i>	: X-Ray Repair Cross-Complementing Protein
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1.	Meme Kanseri Risk Faktörleri Sınıflandırılması	8
Tablo 2.	Meme Kanseri Risk Faktörü Skorlaması	9
Tablo 3.	Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması	10
Tablo 4.	Meme Kanserinden Sorumlu Onkogenler ve Sorumlu Olduğu Hastalıklar	16
Tablo 5.	Meme Kanserinden Sorumlu Tümör Süpresör Genler ve Neden Olduğu Hastalıklar	23
Tablo 6.	Etnik Gruplara Göre %2'den Fazla Prevelansa Sahip Tekrarlayan Mutasyonların Dağılımı	33
Tablo 7.	PZR Bileşenleri	49
Tablo 8.	Thermal Cycler Programı	50
Tablo 9.	Amplikonların Miktarına Göre Kullanılması Gereken Enzim Miktarı	52
Tablo 10.	Thermal Cycler Programı	53
Tablo 11.	İşaretleme İçin Reaksiyon Karışımı	54
Tablo 12.	Thermal Cycler Programı	54
Tablo 13.	Pre-Hibridizasyon Karışımı	55
Tablo 14.	Hibridizasyon Karışımı	56
Tablo 15.	Thermal Cycler Programı (Hibridizasyon)	56
Tablo 16.	12X MES Stok Solüsyonu	57
Tablo 17.	WASH-A Buffer-WASH-B Buffer	58
Tablo 18.	1XArray Holding Buffer (Stok)	58

Tablo 19.	Boyama Solüsyonu.....	58
Tablo 20.	Olgulara Ait Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması	73
Tablo 21.	Olgu 5'e Ait NGS'de Saptanan Değişikliklerin Sanger Yöntemiyle Karşılaştırılması.....	76
Tablo 22.	Olgu 6'ya ait NGS'de Saptanan Değişikliklerin Sanger Yöntemiyle Karşılaştırılması.....	77
Tablo 23.	Olgu 7'ye Ait NGS'de Saptanan Değişikliklerin Sanger Yöntemiyle Karşılaştırılması.....	79
Tablo 24.	Olgu 8'e Ait NGS'de Saptanan Değişikliklerin Sanger Yöntemiyle Karşılaştırılması.....	81
Tablo 25.	NGS ve Sanger Yönteminde Ortak Bulunan Polimorfik Bölgeler	92
Tablo 26.	NGS Yönteminde Saptanan Yanlış Pozitif Sonuçlar	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1.	Hücre Siklusu.....	5
Şekil 2.	Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırması ve Alt Tipleri.....	11
Şekil 3.	Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması ve Tiplerin Görülme Sıklığı.....	12
Şekil 4.	<i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genlerinin Sitogenetik Lokalizasyonları	26
Şekil 5.	<i>BRCA1</i> Geninin BRCT ve RING Domainlerinin Karşılıklı Konumu ve Bilinen Fonksiyonları.....	29
Şekil 6.	<i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genlerinde Sık Görülen Mutasyonların Ekzonlara Göre Dağılımı	31

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 1. Olgu 5'e Ait <i>BRCA1</i> geni c.2019delA Mutasyon Bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu.....	76
Resim 2. Olgu 5'e Ait NGS Analiz Sonucu.....	76
Resim 3. Olgu 6'ya Ait <i>BRCA1</i> geni c.843_846delCTCA/Normal bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu.....	78
Resim 4. Olgu 6'ya Ait <i>BRCA1</i> geni c.2612C>T Polimorfizm Bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu.....	78
Resim 5. Olgu 6'ya Ait NGS Analiz Sonucu.....	78
Resim 6. Olgu 7'ye Ait <i>BRCA1</i> geni c.2082C>T Polimorfizm Bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu.....	80
Resim 7. Olgu 7'ye Ait NGS Analiz Sonucu.....	80
Resim 8. Olgu 8'e Ait <i>BRCA2</i> geni c.3396A>G Polimorfizm Bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu.....	82
Resim 9. Olgu 8'e Ait NGS Analiz Sonucu.....	82

1. GİRİŞ

Meme kanseri genel olarak, gelişmiş ülkelerde daha yüksek bir insidansa sahip olup, kadınlarda kanser nedenli ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Türkiye’de de meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olup, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde birinci sırada yer almaktadır. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri ailesel meme kanserinden sorumlu olmakla beraber, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5’inden sorumlu tutulmaktadır. Bugüne kadar *BRCA1* geni için 1600’den fazla, *BRCA2* geni için ise 1800’den fazla mutasyon bildirilmiştir.

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinin mutasyon analizi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en sık olarak MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) ve Konvansiyonel Dizi Analizi kullanılmaktadır. Günümüzde teknolojinin gelişmesi ile bunlara ek olarak; Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi ve Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing) Yöntemi’de, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin mutasyonlarını belirlemede kullanılmaya başlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, önceden konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile *BRCA1/BRCA2* genlerinde mutasyon saptanmış sekiz hasta ve iki kontrole ait toplam on DNA örneğine mikrarray ile yeniden dizileme ve yeni nesil dizileme yöntemleri uygulanarak, yöntemlerin sonuçlarının doğruluk açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Kanserin Tarihçesi

Malign tümörlerle ilgili tanımlara ilk olarak Mısır Papirüsleri, Babil çivi yazısı tabletleri ve eski Hint yazmalarında rastlanılmaktadır. Ebers Papirüsü'nde (M.Ö.15. yüzyıl), tümör tedavisinin öldürücü olabileceği belirtilmektedir. Kanser teriminin ilk defa Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları için kullanıldığı görülmektedir. Bu yeni yapılanmalara; Hipokrat “karkinos” ya da “karkinoma”, Galen (M.S. II. yüzyıl) ise yengece benzettiği görünümü nedeniyle “kanser” adını vermiştir (1). Türk tıp tarihinde ise, kansere ilk olarak “seretan” adının verildiği bilinmektedir. Tarsuslu Osman Hayri Efendi'nin “Kenzüsıhhatül Ebdaniye” (1298) adlı eserinde seretan, fındık ya da küçük yumru büyüklüğünde, ağırlı, etrafı damarlı bir oluşum olarak tanımlanmaktadır (1). Bu bilgiler ışığında görüldüğü gibi, kanserin tarihi oldukça eskidir ve ilk tanımlandığı zamanlardan günümüze kadar, oldukça ağır, tedavisi zor ve ölümcül bir hastalık olarak ciddiyetini korumaya devam etmektedir.

2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser, en genel tanımlamayla, kontrolsüz hücre çoğalmasdır. Hücrenin, iç ve dış çevresiyle haberleşmesini sağlayan sinyalleşmeler, normal hücrelerde sınırlı ve kontrollü bölünmeyi sağlarken, kanser hücrelerinde kontrolsüz bölünme ve büyüme sinyali oluşturmaktadır (2). Kanser hücreleri sadece kazandığı

kontROLSÜZ büyüme özelliği ile değil, aynı zamanda da normal hücrelerden farklı bazı özellikler kazandıkları için organizmaya zarar verebilirler. Kanseri hücrelerini normal hücrelerden farklı kılan özellikler şunlardır;

- I- Bölünme sinyallerinin üretimi: Normal hücrelerin hücre siklusunun G₀ evresinde bölünmeleri durdurulur, oysa otokrin uyarım kazanmış olan kanser hücreleri için böyle bir sınırlama söz konusu değildir ve sürekli bölünürler (2).
- II- Kontakt inhibisyon yokluğu: Kanseri hücrelerinde, hücre adezyon genlerinin normal hücrelere nazaran daha az ifade edilmesinden kaynaklanan, daha az hücre-hücre ve hücre-matrix etkileşimi bulunur. Kanseri hücrelerinin adezyon yapısındaki bu farklılıklar, hücre morfolojisi ve hücre iskelet yapısının bozulmasına neden olarak temas (kontakt) inhibisyonun kaybıyla sonuçlanır. Büyümede bir sınırlama basamağı olan, kontakt inhibisyonun yokluğu ya da azlığı kanseri hücrelerinin kontROLSÜZ çoğalmasına katkıda bulunur. Kontakt inhibisyon yokluğu, özellikle kanseri metastazında çok önemli role sahiptir (2).
- III- Sınırsız Bölünme Potansiyeli: Özellikle lösemi konusunda yapılan çalışmalarda, kanseri hücrelerinin genellikle farklılaşmanın erken evresinde bloke oldukları (diferansiasyon ve maturasyona gidemeyerek) ve kendi aktif bölünmelerine istikrarlı bir şekilde devam ettikleri anlaşılmıştır (2).
- IV. Apoptozisten Kaçış: Kanseri hücrelerinin apoptoza karşı dirençli olmaları nedeniyle yaşam uzunluğu normal hücrelere göre artmıştır (2).

2.1.3. Kanseri ve Genetik

Hücrelerin kanserleşmesinde, hücre bölünmesi (Şekil 1) ve apoptozisi kontrol eden genlerdeki mutasyonlar rol almaktadır. Kanseri kalıtsal ya da

kalıtılmasının genetik bir hastalıktır. Kanserin başlangıcında farklı yollarda işlev gören genlerin varlığı bilinmektedir (3). Bu grupta:

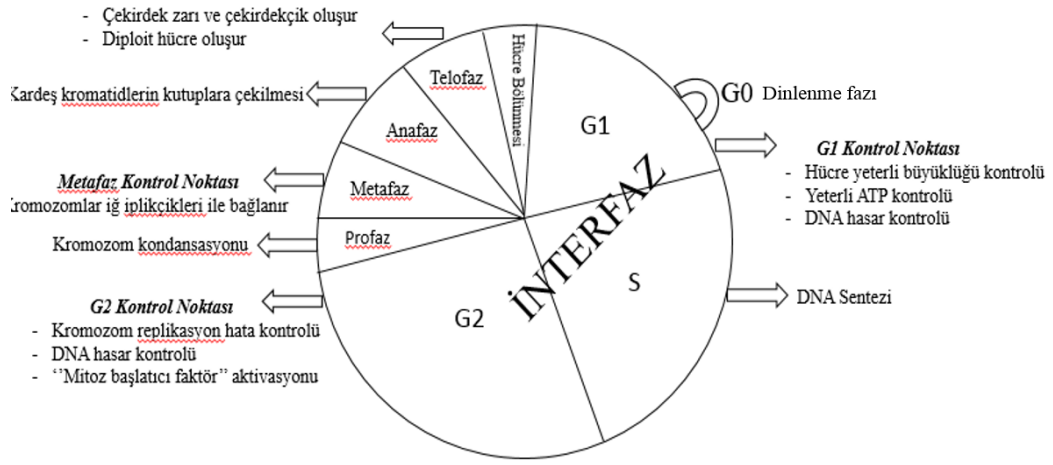
- Hücre proliferasyonunda sinyal iletiminde yer alan proteinleri kodlayan genler,
- Kontakt inhibisyonun oluşumunda yer alan hücre komponentleri,
- Mitotik siklus regülatörleri,
- Programlanmış hücre ölüm komponentleri,
- Mutasyonların tanımlanması ve tamirinden sorumlu olan proteinleri kodlayan genler yer almaktadır (3).

Kanserleşme çok basamaklı bir süreçtir ve kanserin meydana gelmesi için farklı fonksiyonları olan birçok genin mutasyona uğraması gerekmektedir (2, 3). Kanser oluşumundan sorumlu olan başlıca üç tür genetik mekanizma vardır.

- Bir proto-onkogenin mutasyona uğrayarak onkogene dönüşmesi
- Bir tümör süpresör genin mutasyona uğraması
- Kimerik genlerin oluşumuna neden olan kromozomal translokasyonlar

Onkogenler, çoğunlukla proto-onkogenler adı verilen normal hücre genlerinin mutant allelleri olmakla birlikte, telomerazı kodlayan veya apoptozisi bloke eden genler de olabilirler. Onkogenler genellikle fonksiyon kazandıran (gain of function) mutasyonlar ile; proliferasyonu stimüle etme, tümörün kanlanması artırma ve apoptozisi engelleme gibi mekanizmalarla malign transformasyonu gerçekleştirmektedir.

Tümör süpresör genler ise, hücre siklusu (Şekil 1) kontrolü ve DNA'da oluşan hasarı onarmak yoluyla kanseri baskılamaya çalışmaktadırlar (3).



Şekil 1. Hücre Siklusu

Tümör süpresör genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı (loss of function); kontrolsüz hücre bölünmesine, anormal hücre büyümesine ve hatalı apoptozise neden olmaktadır (3). Tümör süpresör genler; Gatekeeper (Bekçi tipi) ve Caretaker (Bakıcı tipi) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gatekeeper tümör süpresör genler, hücre siklusunu kontrol etmektedirler ve anormal hücre proliferasyonunda hücreyi apoptozise sürüklemektedirler. Caretaker tümör süpresör genler ise DNA'da meydana gelen hasarları onarmak yoluyla hücreyi malign transformasyondan kurtarmaya çalışmaktadırlar. Caretaker tümör süpresör genler DNA hasarında onarımı iki şekilde gerçekleştirmektedirler. Bir grup caretaker tümör süpresör gen DNA çift zincir kırıklarının onarımında görev alarak kanser gelişmesini önlemeye çalışırlar. Bu şekilde görev yapan genlere; Ataxia Telangiectasia Mutated (*ATM*), Nibrin (*NBN*), Erken başlangıçlı meme kanseri 1 (Breast cancer 1, early onset=*BRCA1*), Erken başlangıçlı meme kanseri 2 (Breast cancer 2, early onset=*BRCA2*), RAD51 recombinase (*RAD51*),

RAD52 homologe (*RAD52*), Bloom Syndrome, RecQ helicase-like (*BLM*) genleri örnek verilebilir. Bu gruptaki genler, ultraviyole (U.V) ve iyonize radyasyon gibi mutajen ajanlara karşı oldukça duyarlıdırlar. Bir diğer Careteker Tümör Süpresör gen grubu ise, yanlış baz eşleşmesinin düzeltilmesinde (baz eksizyon tamiri) görev alarak oluşan hatayı düzeltmeye çalışırlar. Bu genlere; X-Ray Repair Cross-Complementing Protein (*XRCC1*), ADP-ribosyltransferase (*ADPRT*), Apex nuclease (*APEX1*), 8-Oxoguanine DNA Glycosylase (*OGG1*), Ligase III, DNA ATP Dependent (*LIG3*), Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase (*SMUG1*), MutY homologe (*MUTYH*), Thymine-DNA Glycosylase (*TDG*) genleri örnek olarak verilebilir.

Kromozomal translokasyonlar sonucu oluşan kimerik genler; yeni oluşan bir füzyon genidir ve anormal gen fonksiyonu ile mutasyon oluşturmaktadır. Bazende kromozomal translokasyonlar sonucu translokasyon bölgelerinde gen kaybı olması, hücreyi kanserleşmeye doğru sürükleyebilmektedir. Sonuç olarak; kanser birçok genin ve iç içe geçmiş mekanizmanın aynı ya da farklı zamanda, aynı ya da farklı mutajen ajanlarla karşılaşması sonucu, hücre siklusundaki birçok basamağın normal dışı şekilde işlemesiyle oluşan bir süreçtir (3).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, memenin duktus ve/veya lobüllerini örten epitelyal hücrelerin malign proliferasyonu sonucu oluşan bir hastalıktır (4). Meme kanseri genel olarak, gelişmiş ülkelerde daha yüksek bir insidansa sahiptir ve bu ülkelerde, kadınlarda kanser nedeni ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci

sırada yer almaktadır. Meme kanserinin dünyada ortalama insidansı 38-40/100.000 olup, Avrupa’da bu oran 66-67/100.000, Türkiye’de ise 40/100.000 civarındadır (5, 6).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 1990 yılı içerisinde 796.000 yeni meme kanserli olgu ve 314.000 meme kanserinden ölüm saptanmışken, yine WHO’ya bağlı ‘‘International Agency on Cancer for Research’ün’’ (IARC) 2002 yılında ki değerlendirmesinde; bir yıl içerisinde 1.152.000 yeni meme kanserli olgu ve 411.000 meme kanserinden ölüm hesaplanmıştır (5). 2012 yılı verilerine göre; dünya genelinde 1.677.000 yeni meme kanseri tanısı bildirilmiş olup, 508.000 kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir (7, 8).

Amerikan Kanser Derneği’nin (The American Cancer Society) 2013 yılı tahminlerine göre; yaklaşık 232.340 yeni invaziv kanser ve 64.640 yeni karsinoma insitu tanısı konulduğu ve 39.620 kadının ise meme kanseri nedeniyle hayatını kaybedeceği öngörülmektedir.

Türkiye’de de meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde birinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde henüz düzenli bir meme kanseri kayıt programı olmadığından, kesin sıklığının belirlenmesi zordur. Ancak mevcut verilere göre, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığın olduğu tahmin edilmektedir. Bu sıklık farkının, ülkemizin batısındaki yaşam tarzının Avrupa’dakine benzerliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir (5).

2.2.1. Meme Kanserinin Etyolojisi ve Risk Faktörleri

Meme kanserinin etyolojisi ve risk faktörleri tam olarak bilinmemekle beraber; değiştirilebilir risk faktörleri, değiştirilemez risk faktörleri ile bazı belirsiz ve tartışmalı risk faktörlerinin meme kanserinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (9-11) (Tablo 1).

Kadın olmak ve ileri yaş belirgin bir risk faktörü olmakla beraber, birçok kadında; risk faktörlerinin bir veya daha fazlası varken meme kanseri gelişmemekte, bazı kadınlarda ise hiçbir risk faktörü yokken meme kanseri gelişebilmektedir.

Tablo 1. Meme Kanseri Risk Faktörleri Sınıflandırılması

Değiştirilemez Risk Faktörleri	Değiştirilebilir Risk Faktörleri	Belirsiz Faktörler	Tartışmalı Faktörler
Cinsiyet	Az çocuk doğurma	Beslenme ve vitamin	Antipersipitant
Yaş	**OKS kullanımı	alımı	kullanımı
Genetik risk faktörleri	Postmenopozal	Çevresel kimyasallar	Sütyen kullanımı
Ailede meme kanseri hikayesi	hormon kullanımı	Tütün-sigara kullanımı	Küretaj
Kişide meme kanseri hikayesi	Az emzirme ya da emzirmeme	Gece çalışma	Meme protezi
İrk ve etnisite	Alkol kullanımı		
Yoğun meme dokusu	Fazla kilo ya da obezite		
Bazı iyi huylu meme lezyonları	Azalmış fiziksel aktivite		
Erken menstrual periyod			
Göğüse radyasyon maruziyeti			
*Diethylstilbestrol maruziyeti			

* Diethylstilbestrol 1940-1960 yılları arasında bazı kadınlar tarafından kullanılan bir kontraseptif ajanıdır, kullanan kadınlar ve bebeklerinde meme kanseri riski artmıştır.

** OKS: Oral kontraseptif (Ağızdan alınan doğum kontrol ilaçları) kullanımı ile meme kanseri riskinin artabileceği bildirilmiştir.

Bu risk faktörlerinden bazılarını değiştirmek mümkün olmamakla beraber, bazı risk faktörleri ise yaşam tarzının modifiye edilmesiyle değiştirilebilir (9, 10, 12-15).

Meme kanserinden sorumlu olduğu düşünülen risk faktörleri kullanılarak rölatif risk faktör skorlaması geliştirilmiştir. Bu skorlama sistemi Gail ve Claus tarafından düzenlenen risk faktörlerinin modifiye edilmesiyle “The National Comprehensive Cancer Network (NCCN)” tarafından oluşturulmuştur. Rölatif risk skorlamasına göre; 1.1-2.0 puan arası: düşük risk, 2.1-4.0 puan arası: orta risk, 4 puan üzeri ise: yüksek risk olarak değerlendirilmektedir (16, 17, 18).

Meme kanserinden sorumlu olduğu düşünülen rölatif risk faktörlerine ait skorlama Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Meme Kanseri Risk Faktörü Skorlaması*

Meme kanseri için artmış risk faktörleri	
Rölatif risk >4.0	Yaş (65 yaş üzeri) Biyopside atipik hiperplazi Kalıtsal genetik mutasyonlar (<i>BRCA1</i> ve/veya <i>BRCA2</i>) Mamografide dansite artışı
Rölatif risk 2.1-4.0	Yüksek endojen östrojen ve testosteron seviyesi Postmenopozal yüksek kemik dansitesi Göğüs bölgesine yüksek doz radyasyon hikayesi Birinci derece yakınlarında meme kanseri öyküsü
Rölatif risk 1.1-2.0	Alkol tüketimi Askenazi Yahudi popülasyonu Erken menarş (<12 yaş) Uzun boy Yüksek sosyoekonomik seviye İlk doğurma yaşının geç olması (>30 yaş) Geç menopoz (>55 yaş) Hiç çocuk doğurmamak Çocuğunun hiç anne sütü almamış olması Postmenopozal obezite Bireyde endometrium, over ya da kolon kanseri öyküsü Uzun süre postmenopozal hormon replasman tedavisi ve oral kontraseptif kullanımı

* Bu tablo 16 numaralı kaynaktan alınmıştır

2.2.2. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanseri temel olarak, histopatolojik özelliklerine ve moleküler temeline göre iki ayrı kategoride sınıflandırılmıştır.

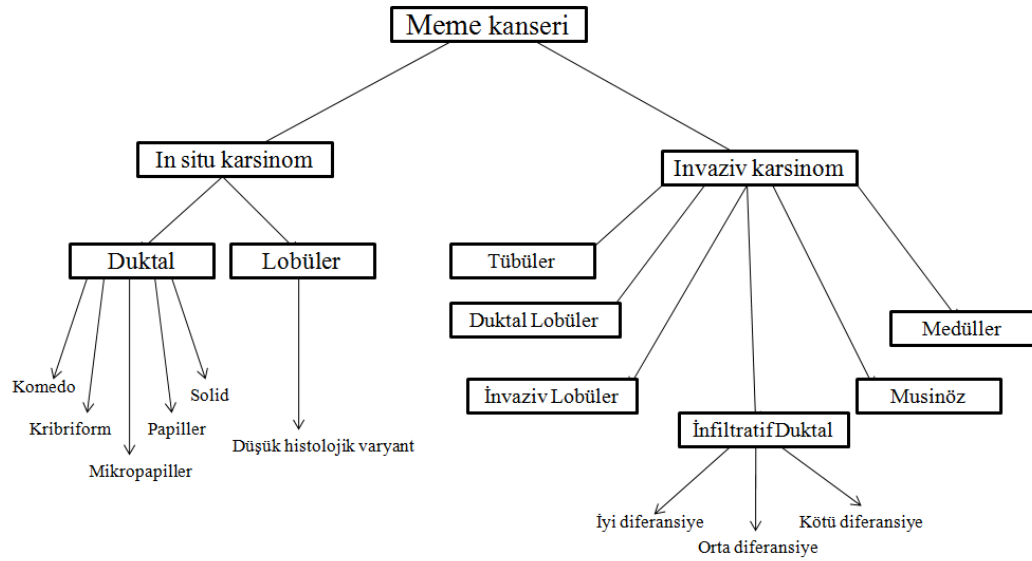
2.2.2.1. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması

Meme kanseri, in situ karsinom ve invaziv karsinom olmak üzere histopatolojik olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. İn situ karsinomda epitelyal hücreler bazal membranla çevrilidir, invaziv (infiltratif) karsinomda ise neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya geçmiştir. WHO, meme kanserini histopatolojik olarak Tablo 3'deki gibi sınıflandırmaktadır (19, 20).

Tablo 3. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması*

İn Situ Karsinom	İnvazivlobüler Karsinom	Nadir Görülen
-İn situ duktal karsinom	- İnvaziv duktal karsinom	- Lipidden zengin
-İn situ lobüler karsinom	- İnvaziv lobuler karsinom	karsinom
	- Tubuler karsinom	- Onkositik karsinom
	-İnvazivribriiform karsinom	- Small cell karsinom
	- Medülller karsinom	- Nöroendokrin karsinom
	- Müsinöz karsinom	
	- İnvaziv papiller karsinom	
	- İnvaziv mikropapiller karsinom	
	- Apokrin karsinom	
	-Sekretuar (juvenil) karsinom	
	- Adenoid kistik karsinom	
	- Metaplastik karsinom	
	- İnflamatuar karsinom	

*Bu tablo 19 ve 20 numaralı kaynaklardan uyarlanarak oluşturulmuştur



Şekil 2. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırması ve Alt Tipleri

2.2.2.2. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması

Meme kanseri 2006 yılında moleküler özelliklerine göre beş ana gruba ayrılmıştır, 2010 yılında ise ‘‘Claudin-low’’ adı verilen yeni bir grup eklenmiştir. Bu sınıflandırma gen ekspresyon paternlerine göre yapılmıştır (19, 21, 22).

1. Bazal-benzeri: Kanserli hücrelerde, normal meme dokusundaki bazal epitel hücrelerine benzeyen gen ekspresyonu mevcuttur. ‘‘Tumor protein 53 (TP53)’’ geninde mutasyonlar görülür. Östrojen reseptörü negatiftir. *BRCA1* mutasyonu taşıyan bireylerde de bazal benzeri meme kanseri olduğu görülmüştür. Bu grup meme kanserinde; kısa dönem relaps ve uzak metastazlar görülür (19, 21, 22).

2. Luminal A: Kanserli hücrelerde, Luminal epitel hücreleri ile benzer gen ekspresyonları olduğu için bu şekilde adlandırılmışlardır. *TP53* geninde mutasyon yoktur ve östrojen reseptörü pozitifdir. Bu gruptaki hastaların hem yaşam süreleri

daha uzundur hem de prognozları daha iyidir (21). *BRCA2* mutasyonu taşıyan bireylerde Luminal A tipinde kanser gelişir (19, 21, 22).

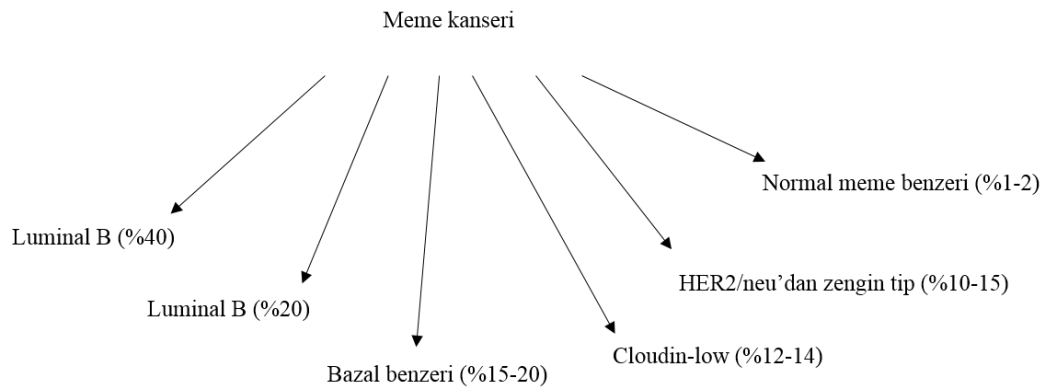
3. Luminal B: Luminal A ile benzerdir, prognoz olarak orta grupta sınıflandırılır (19, 21, 22).

4. HER2/neu (ERBB2): Kanserli hücrelerde *HER2/neu* geninin aşırı ekspresyonu ile karakterizedir. Bu gruptaki hastaların prognozu kötüdür, yaşam süreleri diğer gruptakilere göre daha kısadır ve daha çok metastaz görülür (19, 21, 22).

5. Normal meme dokusu benzeri: Kanserli hücrelerdeki gen ekspresyonu normal meme dokusundaki hücrelerin gen ekspresyonlarına benzemektedir (19).

6. Claudin-Low: Bu grup kalsiyum bağımlı hücre adezyonunda görev alan Claudin 3-4-7 ve E-cadherin proteinlerinin azalmış ekspresyonları ile karakterizedir (23).

Moleküler sınıflandırmadaki grupların görülme yüzdesi Şekil 3’de gösterilmiştir (21).



Şekil 3. Meme Kanserin Moleküler Sınıflandırması ve Tiplerin Görülme Sıklığı

2.2.3. Meme Kanseri ve Genetik

Diğer bütün kanserlerde olduğu gibi, meme kanseri de genetik bir hastalıktır ve meme kanserinin moleküler patogeneğinde birçok gen rol oynamaktadır. Hücre siklusunun kontrol noktalarında ve DNA onarımında görevli genlerde meydana gelen mutasyonların birikmesiyle meme kanserinin tetiği çekilmektedir.

Bu mutasyonlar genellikle sporadik olarak, yaşamın herhangi bir zamanında gelişmektedir. Daha nadir olarak ise, ebeveynlerden ‘’germ-line mutasyonlar’’ olarak aktarılmaktadır. Özellikle aile bireylerinde de meme kanseri öyküsü olması ve erken yaşta ortaya çıkması (50 yaşından önce) herediter kanser ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Herediter meme kanserinde bilinen en önemli genler *BRCA1* ve *BRCA2*’dir. Bu genlerinde mutasyon bulunan kadınlarda; hayatları boyunca meme kanseri, over kanseri ve diğer bazı kanserlere yakalanma ihtimali artmıştır. Ayrıca *BRCA2* geninde meydana gelen mutasyonlar erkekte de meme kanseri ve prostat kanseri ile ilişkilidir. Ayrıca Cadherin 1(*CDH1*), Serine/threonine kinase 11 (*STK11*) ve *P53* genlerindeki değişikliklerin de meme kanserine yakalanma riskini artırdığı tespit edilmiştir. Bazı araştırmalarda ise *ATM*, *BRCA1* associated RING domain 1 (*BARD1*), *BRCA1* interacting protein C-terminal helicase (*BRIP1*), Checkpointkinase2 (*CHEK2*), *NBN*, Partner and Localizer of *BRCA2* (*PALB2*), *RAD50*, *RAD51* ve Androgen reseptor (*AR*) genlerinin de meme kanseri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bunlar arasında özellikle *ATM* ve *CHEK2* genlerindeki mutasyonların meme kanseri ile arasında güçlü ilişki olduğu gösterilmiştir (24).

2.2.4. Meme Kanserinden Sorumlu Genler

Meme kanserinin etyolojisinde hem onkogen ve hem de tümör süpresör genlerdeki mutasyonlar sorumlu olmakla birlikte, çoğunlukla tümör süpresör genlerde meydana gelen mutasyonların sorumlu olduğu görülmektedir.

2.2.4.1. Meme kanserinden sorumlu onkogenler

Meme kanserine yol açtığı bilinen onkogenler; *HER-2/neu*, *RAS*, *AKT1*, *EIF-4E*, *Cyclin-D1 (CCND1)*, *Cyclin-E (CCNE1)*, *c-MYC*, *c-FOS* genleridir. Meme kanserinden sorumlu onkogenlerin kromozomal lokalizasyonları, fonksiyonları ve neden oldukları diğer hastalıklar Tablo 4’de özetlenmiştir.

HER-2/neu (V-erb-b2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2=ERBB2) Geni: Hücre büyümesinde görev alan büyüme faktörlerinin kodlanmasında ve regülasyonunda görev alan *HER-2/neu* geninde oluşan somatik mutasyon meme kanserine neden olmakta ve çok agresif seyretmektedir. Ayrıca metastaz yapma olasılığının diğer gruptakilere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. *HER-2/neu* geninde oluşan mutasyonlar ile beyin, over, mide ve akciğer kanserleri de oluşabildiği gibi nöroblastom birlikteliğinin de sık olduğu gösterilmiştir (24-26).

RAS Geni: *RAS* gen süper ailesinde; *H-RAS*, *K-RAS*, *N-RAS* genleri ve bunların alt gruplarına ait birçok gen bulunmaktadır. *RAS* proteinleri; hücrelerin büyümesinde, hayatta kalmasında ve farklılaşmasında görev alan hücre dışı sinyallerin iletilmesinde görevlidirler (27). *RAS* gen süper ailesine ait mutasyonlarda, başta gastrointestinal sisteme ait kanserler görülmekle birlikte;

meme kanseri, tiroid kanseri ve yumuşak doku kanserleri de görülmektedir (28). Bu kanserlerin dışında, *RAS* gen ailesine ait mutasyonlar; Noonan Sendromu, Kardiyofasiyokutanöz Sendrom ve Costello Sendromundan da sorumludur (28).

V-akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1 (AKT1) Geni:

Hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında görev alan *AKT1* kinaz adı verilen proteinin yapımından sorumludur. *AKT1* geninde meydana gelen mutasyonlarda; Proteus sendromu, timoma ve meme kanseri görülebilmektedir (24).

Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (EIF4-E) Geni:

Eukaryotic translation initiation factor 4F complex protein yapısını kodlar. Bu protein kompleksi, mRNA'nın 5' ucundaki "7-methylguanosine cap" yapısını tanımakla görevlidir. *EIF4-E* gen mutasyonlarında; hipofarinks kanseri ve meme kanseri meydana gelmektedir (29).

Cyclin D1 (CCND1) Geni: Siklin kinaz mediatörüdür. Hücre siklusunda G1'den S fazına geçişte uyarıcı olarak görev almaktadır. Mutasyonlarında; mantle cell lenfoma, B-cell lenfoma ve meme kanseri görülmektedir (29).

Cyclin E1 (CCNE1) Geni: *CCND1* geni gibi siklin kinaz mediatörüdür ve yine hücre siklusunda G1'den S fazına geçişte uyarıcı olarak rol alır. *CCNE1* geninde oluşan mutasyonlarda; kronik endoftalmitis, fasial dermatozis ve meme kanseri oluşmaktadır (29).

V-myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (c-MYC)

Geni: Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptozisten sorumlu olan fosfoprotein yapıdasında ki bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Mutasyonunda;

Burkitt lenfoma, endometrium kanseri ve meme kanseri görülebilmektedir (29, 30).

FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog (*c-FOS*) Geni:

Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve çok nadiren de olsa apoptozisin indüklenmesinden sorumlu transkripsiyon faktörleri olan FOS proteinlerinin kodlanmasından sorumludur. *c-FOS* geninde meydana gelen mutasyonlar; odyojenik epilepsi, meme kanseri ve Coffin-Lowry Sendromundan sorumludur (29, 30).

Tablo 4. Meme Kanserinden Sorumlu Onkogenler ve Sorumlu Olduğu Hastalıklar*

Gen	Sitogenetik Lokalizasyon	Fonksiyon	Sorumlu Olduğu Hastalıklar
<i>HER-2/neu (ERBB2)</i>	17q12	Tirozin kinaz reseptörü	Meme kanseri, nöroblastom
<i>RAS</i>	3, 16, 19. kromozom ve diğer kromozomlarda birçok variant	GTPaz süper ailesi	Meme kanseri, GİS kanserleri, Noonan sendromu, Costello sendromu
<i>AKT1</i>	14q32.32-32.33	Kinaz reseptörü	Meme kanseri, Proteus sendromu, timoma
<i>EIF-4E</i>	4q21-25	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör	Meme kanseri, farinks kanseri, larinks kanseri
<i>CCND1</i>	11q13	Hücre siklus mediatörü	Meme kanseri, mantle cell lenfoma, B-cell lenfoma
<i>CCNE1</i>	19q12	Hücre siklus mediatörü	Meme kanseri, fasial dermatozis, kronik endoftalmitis
<i>c-MYC</i>	8q24.21	Transkripsiyon faktörü	Meme kanseri, Burkitt Lenfoma, Endometrium kanseri
<i>c-FOS</i>	14q24.3	Transkripsiyon faktör kompleks, çok nadiren apoptozis indüklenmesi	Meme kanseri, odyojenik epilepsi, Coffin Lowry Sendromu

*Bu tablo 30, 31, 32 numaralı kaynaklardan uyarlanarak oluşturulmuştur

2.2.4.2. Meme kanserinden sorumlu tümör süpresör genler

BRCA1 ve *BRCA2* genleri, ailesel meme kanserinden sorumlu olmakla beraber tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5'inden sorumlu tutulmaktadır (*BRCA1* ve *BRCA2* genleri bölüm 2.3'de detaylı olarak anlatılmıştır). *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin dışında, meme kanserinden sorumlu olduğu bilinen diğer bazı önemli tümör süpresör genler; *AR*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *DIRAS3*, *ERBB2*, *NBN*, *PALB2*, *RAD50*, *STK11*, *P53* ve *PTEN* genleridir (24,32). Bu genlerin kromozomal lokalizasyonları, fonksiyonel görevleri ve sorumlu olduğu hastalıklar Tablo 5'de özetlenmiştir.

Androgen Reseptor (AR) Geni: Androjen üretiminde görev alan bir proteini kodlar. *AR* geninin sebep olduğu androjen duyarsızlık sendromunda, *AR* geninde tek nükleotid değişimi, delesyon ve insersiyon olmak üzere 600 farklı mutasyon bildirilmiştir. *AR* geninde 10-36 arasında tekrar sayısı olan CAG tekrar dizisi bulunmaktadır. Bu CAG tekrar dizi sayısındaki artışların (38-60 CAG tekrarı); Spinal ve Bulbar Musküler Atrofi, Androjenik Alopesi, prostat kanseri, endometrium kanseri ve meme kanseri riskinde artışa neden olabileceği bildirilmiştir (24-26).

Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Geni: *ATM* geni başta sinir sistemi ve immün sistem olmak üzere, hücrelerin normal gelişim ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde çok önemli bir role sahiptir. Ayrıca DNA çift zincir kırıklarının onarımında görev alan proteinlerin koordinasyonunda önemli bir role sahip olması nedeniyle kanser araştırmacılarının en çok ilgi duyduğu genlerden birisi olmuştur. *ATM* genindeki mutasyon sonucu oluşan hastalıklar

arasında en iyi bilineni Ataksia Telanjektazidir. *ATM* geninin ayrıca meme, mide, pankreas, mesane, akciğer ve ovaryum kanserlerinden de sorumlu olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (24-26).

***BRCA1* associated RING domain 1 (*BARD1*) Geni:** *BRCA1* geni, RING Domainler aracılığıyla hücre içerisinde en çok *BARD1* geni ile etkileşim halindedir. *BARD1* ve *BRCA1* geni, DNA onarımında beraber görev almaktadır. *BARD1* geni mutasyonu da, *BRCA1* geni gibi meme kanseri için önemli bir genetik risk faktörüdür (24-26, 33).

Tumor protein p53 (*TP53*) Geni: *TP53* geni; ürettiği protein ile kontrolsüz ve çok hızlı büyüyen hücrelerdeki hücre siklusunu regüle ederek, meydana gelebilecek kanserleşmeyi önleyen bir tümör süpresör gendir. Hücre, çeşitli mutajenlerle karşılaştığı zaman, eğer hasar onarılabilir düzeyde ise *TP53* geni DNA tamir genlerini harekete geçirmekte, eğer onarılamaz düzeyde ise bu durumda *TP53* geni, hücreyi apoptozise yönlendirmekte ve tümör gelişimini önlemeye yardımcı olmaktadır. Sahip olduğu bu görevlerden dolayı *TP53* genine “genomun koruyucusu” adı verilmiştir. *TP53* genindeki mutasyonlar sonucu birçok dokuda kanser gelişebilmektedir. Ayrıca *TP53* mutasyonları; meme kanseri, mesane kanseri ve özellikle Li Fraumeni sendromundan sorumlu tutulmaktadır (24-26).

***BRCA1* Interacting Protein C- terminal Helicase (*BRIP1*) Geni:** Hasarlı DNA'nın onarımında görev alan birçok proteinin kontrolünü sağlamaktadır. Aynı zamanda kontrolsüz hücre bölünmesine karşı koruyucu etkisi olan bir tümör süpresör gendir. Hücre çekirdeğinde *BRIP1* proteini ile *BRCA1*

proteini etkileşime girerek, DNA çift zincir kırık onarımında beraber görev alırlar. *BRIP1* genindeki mutasyonlar meme kanseri için önemli bir risk faktörüdür. *BRIP1* genindeki bazı mutasyonların Fankoni anemisinden sorumlu olduğu da bilinmektedir (24-26).

Cadherin 1 (*CDH1*) Geni: En iyi bilinen cadherin proteini olan Epiteyal E-cadherin proteinini kodlar. E-cadherin proteini, hücre içerisinde kimyasal sinyaller aracılığıyla oluşan hücre hareketini kontrol etmekte ve bu olayda görev alan bazı genlerin aktivitesini düzenlemektedir. Aynı zamanda tümör süpresör gen olarak da hareket ettiğine inanılmaktadır. Bazı araştırmalarda *CDH1* genindeki mutasyonların lobüler meme kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca *CDH1* geninde meydana gelen 50’den fazla mutasyon “ herediter diffüz gastrik” kansere de yol açmaktadır (24-26).

Checkpointkinase2 (*CHEK2*) Geni: Tümör süpresör gen gibi davranmaktadır. DNA hasarında veya DNA zincir kırıklarında *CHEK2* geni aktive olmaktadır. DNA hasarı olduğu zaman *CHEK2* proteini, başta *TP53* proteini olmak üzere birçok protein ile etkileşime girmekte ve hasarı onarmak yoluyla ya da apoptozisi indükleyerek hücreyi kanserden korumaya çalışmaktadır. *CHEK2* geninde meydana gelen mutasyonlar ile meme kanseri, Li-Freumani sendromu, birçok herediter ve sporadik kanser türü meydana gelebilmektedir (24-26).

GTP-binding RAS-like3 (*DIRAS3*) Geni: *DIRAS* gen ailesine ait genler, hücre büyümesi ve matürasyonunda görev alan proteinleri kodlamaktadır. *DIRAS3* proteini de *DIRAS* ailesindeki diğer proteinler gibi, hücre büyümesi ve

matürasyonunu baskılamaktadır. *DIRAS3* geni bu fonksiyonu ile tümör süpresör gen görevi yapmaktadır. *DIRAS3* geni, meme ve over hücrelerinde hücre süklusu, hücre hareketi ve anjiyogenezisde görev alan proteinlerin yapımını kontrol etmektedir. *DIRAS3* geninin bir diğer önemli özelliği de sadece paternal kopyasının fonksiyonel olmasıdır. *DIRAS3* geninin paternal kopyasının kaybı ya da inaktivasyonunda meme kanserinin yanı sıra, over kanseri, pankreas kanseri, akciğer kanseri ve folliküler tiroid kanseri görülebilmektedir (24-26).

Nibrin (*NBN*) Geni: Genin kodladığı Nibrin proteini başta hasarlı DNA onarımında olmak üzere birçok önemli hücresel olayda fonksiyon görmektedir. *NBN* geni; *MRE11A* ve *RAD50* genleriyle etkileşime girerek *MRE11A/RAD50/NBN* kompleksini oluşturmaktadır ve oluşan bu kompleks yapı *ATM* geni ile etkileşime girerek özellikle DNA çift zincir kırıklarının onarımında görev almaktadır. *NBN* geninde meydana gelen mutasyonlar ile; büyüme geriliği, tekrarlayan enfeksiyonlar ve bazı kanserlere yatkınlık ile karakterize ‘Nijmegen kırık sendromu’ oluşmaktadır. *NBN* genindeki c.657661del5 heterozigot mutasyonunun meme kanseri riskini üç kat arttırdığı düşünülmektedir. Yine *NBN* geninde mutasyon taşıyan bireylerde; lösemi, prostat kanseri, over kanseri ve malign melanom gelişme olasılığının arttığı bilinmektedir (24-26).

Partner and localizer of *BRCA2* (*PALB2*) Geni: *BRCA2* geni ile etkileşime girerek, DNA hasarının onarımında ve kontrolsüz hücre bölünmesinin kontrolünde tümör süpresör gen olarak görev yapmaktadır. *PALB2* geni, FANC (Fanconi anemia complementation groups) gen ailesinin üyesidir. *PALB2* geninde oluşan on farklı mutasyon meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur. Mutasyon

sonucu oluşan kusurlu protein, *BRCA2* proteini ile etkileşime girememekte ve böylece kanser oluşumu için zemin hazırlanmaktadır. *PALB2* geninin, iki mutant kopyası ile Fankoni anemisi tip N (FA-N) oluşmaktadır. Fankoni anemisi olan bireylerin; başta Willms tümörü ve medullablastoma olmak üzere çeşitli kanser türlerine yatkın oldukları bilinmektedir (24-26).

RAD50 homolog (*S. cerevisiae*) (*RAD50*) Geni: *MRE11A* ve *NBN* geni ile kompleks oluşturarak, özellikle DNA ift zincir kırıklarının onarımında görev almaktadır. *RAD50* geni mutasyonları ile meme kanseri arasındaki ilişki açısından çelişkili araştırma sonuçları bulunmaktadır. Bazı araştırma sonuçlarında; *RAD50* mutasyonları ile meme kanseri riskinde artış olduğu bildirilmekle birlikte, bazı araştırma sonuçlarında bu ilişki bulunamamış ve bunun meme kanseri için genetik bir risk olmadığına inanılmıştır (24-26).

RAD51 recombinase (*RAD51*) Geni: Hücre siklusunun dinlenme fazında DNA'ya bağlanarak hasarlı DNA onarımında görev almaktadır. DNA onarımında *RAD51*'in bağlanması çok önemli bir adımdır. *RAD51*, *BRCA1* ve *BRCA2* proteinleri ile aynı yolda görev almakta, ancak asıl olarak *BRCA2* ile etkileşime girmektedir. *RAD51* geninde oluşan bazı değişiklikler meme kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur. Bu değişikliklerin, özellikle *BRCA1* ve *BRCA2* geninde mutasyon taşıyan kadınlarda riski artırmak adına anlamlı olduğu düşünülmektedir (24-26).

Serine/threonine kinase 11 (*STK11*) Geni: Aynı zamanda *LKB1* olarak da bilinen bu gen, serin/treonin kinaz 11 adı verilen bir enzimin yapımından sorumludur. Bu enzimin hücreleri apoptozise teşvik edici özelliğinin yanı sıra,

hücrelerde enerji kullanımının düzenlenmesinde de önemli görevleri vardır. Bu enzimin, özellikle gastrointestinal sistem, endometrium, over ve meme dokusu hücrelerinde önemli görevleri vardır. Araştırmacılar, kansere yatkınlık riskini önemli oranda artıran hamartomatöz poliplerle karakterize olan ve meme kanserinin de bir parçası olabildiği, “Peutz-Jeghers sendromuna” *STK11* genindeki 200’den fazla mutasyonun neden olduğunu belirlemişlerdir (24).

STK11 genindeki kalıtsal mutasyonlar, tüm meme kanseri vakalarının sadece küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Ayrıca *STK11* genindeki mutasyonlar; pankreas kanseri, akciğer kanseri ve malign melanoma da neden olabilmektedir (24-26).

Tablo 5. Meme Kanserinden Sorumlu Tümör Süpresör Genler ve Neden Olduğu Hastalıklar

Gen	Sitogenetik Lokalizasyonu	Fonksiyonel Görevi	Sorumlu olduğu hastalıklar
<i>BRCA1</i>	17q21	Tümör süpresör	Meme kanseri, over kanseri, prostat kanseri
<i>BRCA2</i>	13q12.3	Tümör süpresör	Meme kanseri, erkekte meme kanseri, prostat kanseri, pankreas kanseri, Fankoni anemisi tip D1
<i>AR</i>	Xq12	Androjen üretimi	Meme kanseri, prostat kanseri, endometrium kanseri, Androjen duyarsızlık sendromu, androjenik alopesi, spinal-bulber müsküler atrofi,
<i>ATM</i>	11q22-q23	DNA çift zincir kırık onarımı, sinir sistemi ve immün sistem normal gelişimi	Meme kanseri, Ataksia telenjektazi
<i>BARD1</i>	2q34-q35	DNA tamir mekanizması	Meme kanseri
<i>BRIP1</i>	17q22.2	DNA çift zincir kırık onarımı, tümör süpresör	Meme kanseri, Fankoni anemisi
<i>CDH1</i>	16q22.1	Tümör süpresör, hücre hareket kontrolü	Meme kanseri, herediter diffüz gastrik kanser
<i>CHEK2</i>	22q12.1	Tümör süpresör	Meme kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri, böbrek kanseri, Li-Fraumeni sendromu
<i>DRAS3</i>	1p31	Tümör süpresör	Meme kanseri, over kanseri
<i>ERBB2</i>	17q12	Büyüme faktörlerinin düzenlenimi	Meme kanseri, over kanseri, mide kanseri, akciğer kanseri, nöroblastom,
<i>NBN</i>	8q21	DNA çift zincir kırık onarımı	Meme kanseri, over kanseri, prostat kanseri, malign melanom, lösemi, Nijmegen kırık sendromu
<i>PALB2</i>	16p12.2	DNA tamir mekanizması, tümör süpresör	Meme kanseri, Fanconi anemisi, Willms tümörü, medullablastom
<i>RAD50</i>	5q31	DNA çift zincir kırık onarımı	Meme kanseri?
<i>RAD51</i>	15q15.1	DNA tamir mekanizması	Meme kanseri
<i>STK11</i>	19p13.3	Tümör süpresör, hücrede enerji kullanımını düzenleme	Meme kanseri, pankreas kanseri, malign melanom, Peutz-Jeghers sendromu
<i>TP53</i>	17p13.1	Tümör süpresör	Meme kanseri, mesane kanseri, osteosarkom, adrenal karsinom, rabdomyosarkom, Li-Fraumeni sendromu

2.2.5. Ailesel Meme Kanseri

Meme kanserleri, büyük oranda sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10 oranında ailesel meme kanserleri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Birinci derece yakınları arasında meme kanseri bulunan bir kadında, hayat boyu meme kanseri gelişme riski üç kata kadar, birden fazla birinci derece yakınında meme kanseri bulunan bir kadında ise bu risk on kata kadar, kırk yaşından önce meme kanseri olan bir kadının, birinci derece akrabalarında ise bu risk daha da artmaktadır (3). Özellikle erken başlangıçlı ailevi meme kanserli olgularda yapılan bağlantı analizi çalışmalarının sonucunda, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin keşfedilmesi sağlanmıştır. *BRCA1* geni, otozomal dominant ailevi meme kanserlerinin yaklaşık yarısından, *BRCA2* geni ise üçte birinden sorumludur. Bu genlerinin herhangi birisinde mutasyon taşıyan kadınların, yaşamlarının herhangi bir döneminde meme kanserine yakalanma riski %50 ile %80 arasında değişmektedir. Sonuç olarak; *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonların, kalıtsal meme kanseri için yüksek bir risk oluşturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (3, 34-36).

2.2.5.1. *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyon analiz endikasyonları

Ailenin diğer bireyleri ya da risk altındaki kişiler için olası erken tanı ve proflaktik tedavinin zamanında uygulanabilmesi için; bütün kanserlerde olduğu gibi, meme kanserinin de, sporadik mi yoksa ailesel mi olup olmadığının ayırt edilmeye çalışılması çok önemlidir. Bunun için NCCN tarafından, ailesel meme kanserini düşündürecek bazı kriterler belirlenmiştir. Bu kriterlerden en az bir

tanesine sahip bireylerde, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine yönelik mutasyon analizi yapıp, genetik danışma verilmesi önerilmektedir.

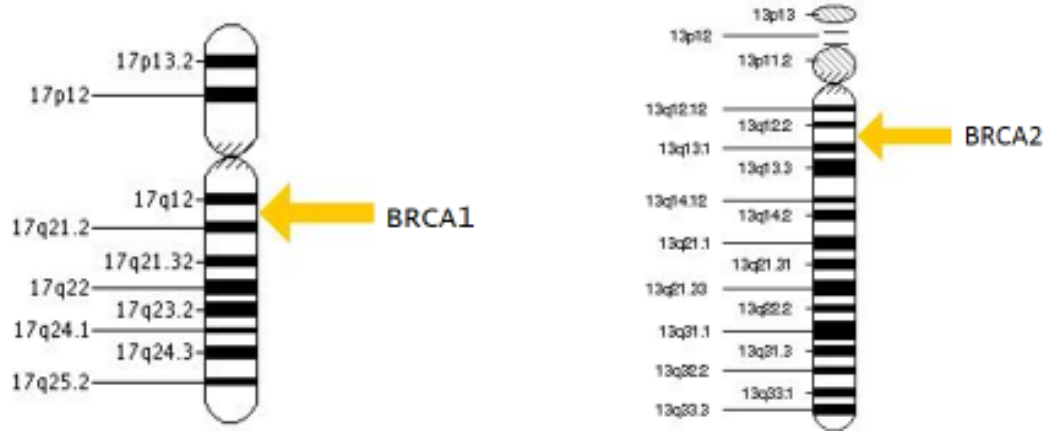
NCCN tarafından hazırlanan kılavuza göre belirlenen kriterler şunlardır;

- Kendisinde meme ya da over kanseri olan kadınlar
- Kendisinde over kanseri olan ve birinci ile ikinci derece akrabalarında meme ya da over kanseri öyküsü olan kadınlar
- Kendisinde 50 yaş öncesi meme kanseri ortaya çıkan kadınlar ve birinci ile ikinci derece akrabalarında over kanseri öyküsü olan kadınlar ya da erkek bir akrabasında meme kanseri olanlar
- Birinci ile ikinci derece akrabalarında *BRCA1/BRCA2* geninde mutasyon saptanmış olan kadınlar (10).

Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı'nın 18.10.2011/B.10.0.THG.0.83.02.00-010.05 tarih/sayılı komisyon toplantısında alınan kararla, NCCN tarafından belirlenen kriterlere uyularak, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine yönelik mutasyon analiz endikasyon şartları belirlenmiştir.

2.3. *BRCA1* ve *BRCA2* Genleri

BRCA1 ve *BRCA2* genleri asıl olarak, DNA çift zincir kırıklarının onarımında görev alan DNA tamir genleridir. *BRCA1* geni, 17. kromozomun q21 bölgesinde lokalize bir tümör süpresör gendir (Şekil 4). *BRCA1* geninde oluşan mutasyonlar; kalıtsal meme kanserlerinin %40'ından, kalıtsal meme ve over kanserlerinin ise %80'inden sorumludur. *BRCA2* geni ise 13. kromozomun q12.3 bölgesinde lokalize bir tümör süpresör gendir (Şekil 4). *BRCA2* geninde meydana gelen mutasyonlar ise kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık 1/3'ünden sorumludur (37).



Şekil 4. *BRCA1* ve *BRCA2* Genlerinin Sitogenetik Lokalizasyonları

BRCA1 geninde mutasyon taşıyan bir kadında, yaşam boyu meme kanseri gelişme riski ortalama %57 oranındadır. *BRCA2* geni için ise bu oran yaklaşık %49'dur. Ayrıca, *BRCA1* mutasyonları kadınlarda yaşam boyu over kanseri gelişme riskini %40 artırırken, *BRCA2* gen mutasyonları bu riski %18 oranında artırmaktadır. *BRCA2* geninde mutasyon taşıyan erkeklerin %7'sinde meme kanseri ortaya çıkmakla birlikte, prostat kanseri riski de artmıştır (37).

BRCA1 ve *BRCA2* genleri susturulmuş fare modellerinde (gene knockout mouse), DNA'da hasar oluşturan ajanlara karşı aşırı artmış bir hassasiyet olduğu gösterilmiştir (38).

2.3.1. *BRCA1* Geninin Yapısı

BRCA1 geni, tümör süpresör genlerin caretaker (bakıcı) alt grubuna dahildir. *BRCA1* geni, bir tanesi kodlanmayan (non-coding), 22 tanesi kodlanan, (coding) toplam 23 ekzondan oluşur. *BRCA1* geninden eksprese olan proteinlerin %60'ından sorumlu olan 10. ekzon en büyük ekzondur (39). *BRCA1* geni bir

tümör süpressör gen görevi yaparak, genomik stabilitenin devamlılığında görevlidir ve iyonize radyasyona oldukça duyarlıdır (40-42). *BRCA1* geni, hücre çekirdeğinde bulunan 1863 a.a'lık 220 kDa ağırlığında bir fosfoproteini kodlamaktadır. Bu fosfoprotein; diğer bazı tümör süpresör proteinler, DNA hasarında görev alan ve sensör vazifesi gören moleküller ve bazı sinyal iletim proteinleri ile beraber BASC (*BRCA1*-associated genome surveillance complex) olarak adlandırılan, *BRCA1* ile ilişkili genom denetim birimi denilen yapıyı oluşturmaktadır (40-42). *BRCA1* geninden eksprese edilen protein, histon deasetilaz kompleksi ile etkileşime girerek ve RNA polimeraz II enzimi ile, C-terminal domaini aracılığıyla bağlanarak, transkripsiyon sırasında oluşabilecek DNA çift zincir kırıklarının onarımında ve rekombinasyonel değişikliklerde görev almaktadır (40-41). *BRCA1* geninin, C-terminal ve N-terminal uç bölgelerinde, birçok proteinin bağlandığı ve etkileşime girdiği, BRCT ve RING domaini adı verilen iki önemli bölge bulunmaktadır (36) (Şekil 5).

2.3.2. *BRCA1*-BRCT Domaini

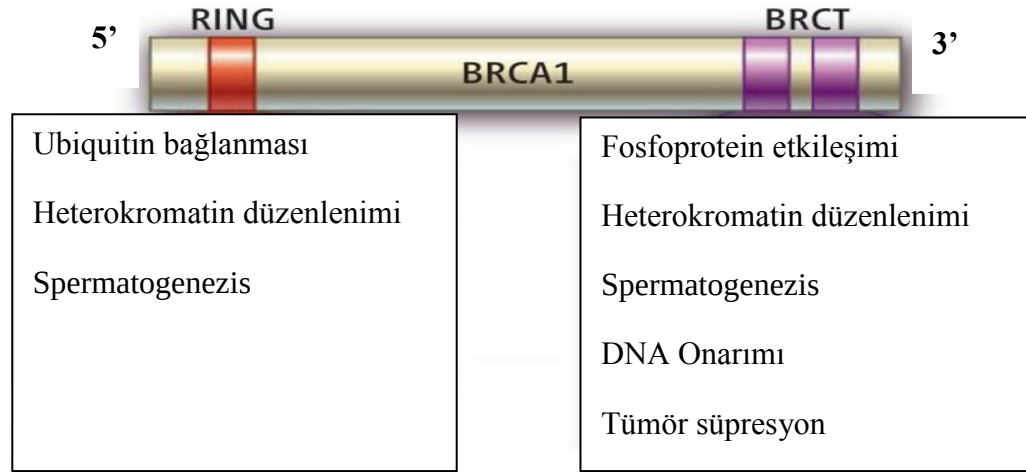
BRCA1 geninin C-terminal ucunda, BRCT domaini olarak adlandırılan bölgeye, hücre döngüsü kontrol noktasında görev alan birçok protein ve aminoasit dizileri bağlanmaktadır (33-36). *BRCA1*-BRCT domaini başta transkripsiyonel aktivasyon ve kromatin düzenlenmesi olmak üzere, birçok hücresel işlevde görev almaktadır. Ancak *BRCA1*-BRCT domaini esas olarak; Abraxas, BTB and CNC homology 1 basic leucine zipper transcription factor 1 (BACH1), CTIP, RNA Polimeraz II, P300, histone deacetylase 1/histone deacetylase 2

(HDACI/HDACII), COBRA1, Triiodothyronine Receptor Auxiliary Protein (TRAP220), Four And A Half LIM Domains 2 (FHL2), P53 proteinlerinin etkileşimi için yüzey oluşturmaktadır (36,43). BRCT domainine bağlanarak etki gösteren en önemli moleküllerin başında ise; RNA Helikaz A, CTIP ve Histone deasetilaz enzimi gelmektedir (36). BRCT domainini önemli hale getiren en önemli olay ise; kanser yatkınlığına neden olan truncated mutasyonların (protein sentezinin erken sonlanarak, kısa bir proteinin oluşması) bu bölgede görülmesidir (33-40).

2.3.3. *BRCA1* RING Domaini

BRCA1 proteinin N-terminal ucunun hemen yakınında çinko parmak dizileri vardır ve bunlar *BRCA1* RING Domaini olarak adlandırılmaktadır (44). Çinko parmak yapısı, Cys3HisCys4 aminoasit motifini içermektedir. Çinko parmak içeren tüm proteinler, E3 ubiquitin ligaz gibi ubiquitinasyon yollarında rol almaktadır. Bu yapı korunmuş, sağlam bir yapıdır ve aminoasit kompozisyonundaki her değişim, *BRCA1* proteininin bağlanma özelliklerini değiştirmektedir (42, 45, 46). Bu bölgenin, tam olarak tanımlanmış bir fonksiyonu olmamasına rağmen, heterokromatin korunması ve spermatogenezde görev aldığına dair çalışmalar mevcuttur (44). Asıl önemli olan ise bu bölgenin BRCT domain bölgesi gibi, iyonize radyasyona ve diğer mutajen ajanlara duyarlı olmasıdır. Her iki motifin yapısı filogenetik süreçte korunmuştur. Bu bölgelerdeki missense (yanlış anlamlı) mutasyonlar, erken başlangıçlı meme kanseri için predispozan faktör oluşturmaktadır. Bu bölgeler, *BRCA1* tarafından

gerçekleştirilen tümör süpresyonunda kritik bölgeler olarak kabul edilmektedir (47). BRCT ve RING domainlerinin *BRCA1* geni üzerindeki konumları ve fonksiyonları Şekil 5’de özetlenmiştir.



Şekil 5. *BRCA1* Geninin BRCT ve RING Domainlerinin Karşılıklı Konumu ve Bilinen Fonksiyonları (44 numaralı kaynaktan alınmıştır)

2.3.4. *BRCA2* Geninin Yapısı

Kromozom 13q12.3 bölgesinde lokalize olan *BRCA2* geni de *BRCA1* geni gibi oldukça büyük bir gendir. *BRCA2* geni 27 ekzonlu olup, 3418 aminoasitten oluşan 384 kDa ağırlığında bir proteini kodlar (48). *BRCA2* geni, DNA hasarlarının onarımında ve hücre siklusunun kontrol noktalarında görev alarak, hem gatekeeper hem de caretaker grubu tümör süpresör gen görevi yapmaktadır (48-50). *BRCA2* geninin 11. ekzonunda, 30-80 aminoasitten oluşan “BRC tekrar dizileri” adı verilen sekiz tekrar dizi kopyası mevcuttur (48-51). Deneysel çalışmalar, BRC tekrar dizilerinin, (özellikle de BRC1 ve BRC4 dizilerinin) *RAD51* geninin nükleer bağlanma bölgesi olduğunu göstermektedir (52).

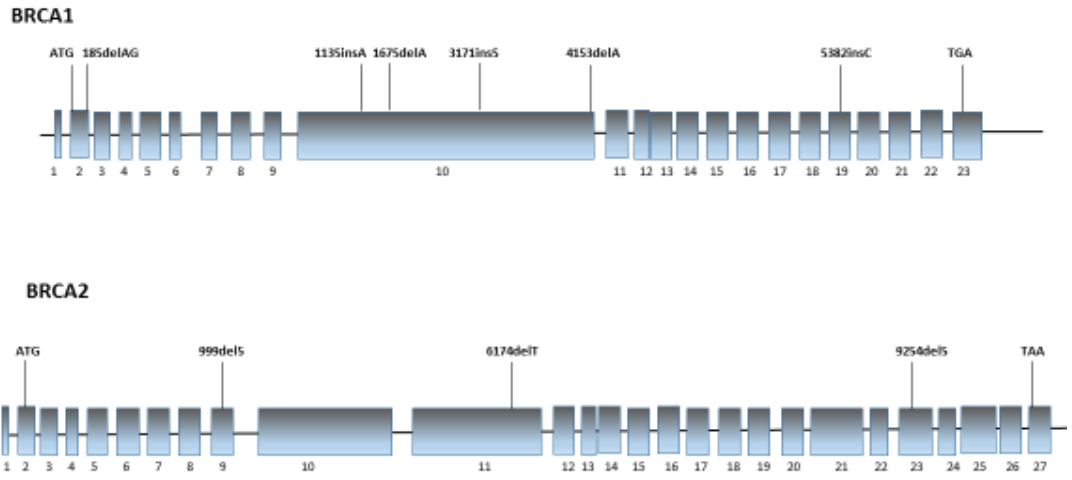
BRCA2 proteini, en çok *RAD51* proteini ile etkileşim halindedir. Bu proteinlerin etkileşimi homolog rekombinasyon, DNA onarımı ve genomik stabilitenin devamı açısından önemlidir (53). *BRCA2* geninde meydana gelen mutasyonlar, genin herhangi bir ekzonunda olabilir ve çoğunlukla truncated mutasyona neden olarak, protein sentezinin prematüre sonlanması ile sonuçlanmaktadır (48).

2.3.5. *BRCA1* ve *BRCA2* Mutasyonları

BRCA1 geni için 1600'den fazla, *BRCA2* geni için ise 1800'den fazla mutasyon bildirilmiştir (31). Bu mutasyonların büyük çoğunluğu; küçük insersiyon ve delesyonlarla oluşan “frameshift” (çerçeve kayması) mutasyonlar, “truncated” mutasyonlar ve splicing bölgesinde oluşan mutasyonlardır (42). Alu dizilerinin varlığı nedeni ile *BRCA2* genine oranla, *BRCA1* geninde delesyon ve duplikasyonlar daha fazladır (42, 54). *BRCA1* genindeki mutasyonların büyük çoğunluğu 10. ekzonda yer almaktadır. *BRCA1* genindeki mutasyonların yaklaşık 1/3'ünü oluşturan büyük genomik yeniden düzenlenmeler *BRCA1* geni ile *BRCA1* pseudogeni arasındaki homolog rekombinasyonların sonucudur (42, 55).

BRCA2 geninde görülen mutasyonlar ise en çok 10. ve 11. ekzonda görülüp, bu mutasyonlar insersiyon ve delesyonlar sonucu oluşan “missense” ve “truncated” mutasyonlardır. Bu ekzonlardaki mutasyonların sık görüldüğü bu bölgeler; çift zincir kırık onarım domaini, hücre içi sinyal bölgeleri ve *RAD51*'in bağlandığı, C-terminal bölgesindeki bağlanma motifini oluşturduğu için, kritik öneme sahiptir (42, 56). Ayrıca *BRCA2* geninin 11. ekzonunda yeralan “overian

cancer cluster region (OCCR)’’ bölgesi mutasyona uğradığında over kanseri riskinin arttığı düşünülmektedir (42). Bu bölgedeki mutasyonlarda over kanseri riskinin %19.5, bu bölge dışındaki mutasyonlarda ise %10.5 artabileceği bildirilmiştir (57). *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde sık görülen mutasyonların ekzonlara göre dağılımı Şekil 6’da özetlenmiştir.



Şekil 6. *BRCA1* ve *BRCA2* Genlerinde Sık Görülen Mutasyonların Ekzonlara Göre Dağılımı

2.3.6. *BRCA1* ve *BRCA2* Gen Mutasyonlarının Toplumlara Göre İnsidansları

Farklı popülasyonlar ve farklı etnik gruplarda, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde meydana gelen mutasyon sıklığı değişiklik göstermekle birlikte, *BRCA1* geninde en sık görülen mutasyonlar 5382insC ve 185delAG iken; *BRCA2* geninde en sık görülen mutasyon 6174delT’dir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde oluşan mutasyonlara bağlı herediter meme kanserinin en sık görüldüğü toplum olan Askenazi Yahudileri’nde yapılan mutasyon sıklık çalışmasında *BRCA1* geninde en sık olarak 185delAG (%1.09) ve 5382insC (%0.13); *BRCA2* geninde

ise 6174delT (%1.52) mutasyonları saptanmıştır (50). Ailesel meme kanseri olan İzlandalı kadınların % 0.6'sında *BRCA2* geninde 999del5 mutasyonu saptanmıştır (58).

Türk toplumuna yönelik ailesel meme kanseri hikayesi pozitif hastalarda yapılan mutasyon analiz çalışmaları arasında, ilki Yazıcı ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada 53 hasta değerlendirilmiştir ve Türk toplumuna ait *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde insidansın fazla olduğu spesifik bir mutasyon saptanmamıştır (59). Manguoğlu ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları bir başka çalışmaya; meme ve over kanseri açısından yüksek risk taşıyan 106 hasta ve prostat kanseri açısından yüksek risk taşıyan 50 hasta dahil edilmiştir. Bu çalışmada da *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde belirgin insidans artışı gösteren bir mutasyon saptanmamıştır (60). Purcu ve arkadaşlarının 2013 yılında aile hikayesi pozitif olan, 25 kadın hastada yaptığı çalışmada ise; 4'ü aynı aileden olmak üzere 5 hastada *BRCA1* geninde 5382insC mutasyonu saptanmış, diğer hastalarda ise farklı bölgelerde mutasyonlar saptanmıştır (61).

Bu durum, Türk popülasyonunda insidans artışı gösteren mutasyon/mutasyonlar olmadığını göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Myriad Genetic Laboratories'te 1996-2006 yılları arasında, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde mutasyon belirlenmiş, 5840 bireyde yapılan bir çalışmadan elde edilen verilere göre farklı etnik gruplarda görülen mutasyonların dağılım yüzdesi Tablo 6'da özetlenmiştir (62).

Tablo 6. Etnik Gruplara Göre %2'den Fazla Prevelansa Sahip Tekrarlayan Mutasyonların Dağılımı*

Etnisite	BRCA1	BRCA2	Mutasyon yüzdesi
Batı Avrupa (N=4389)	5385insC 187delAG C61G 6kb exon13ins IVS5-11T>G 4184del4		228(5.2) 128(2.9) 101(2.3) 95(2.1) 90(2.1) 89(2.0)
Afrika (N=279)	943ins10 M1775R 5296del4 IVS13+1G>A IVS16+6T>C		28(10.0) 22(7.9) 16(5.7) 12(4.3) 10(3.6)
Orta Avrupa (N=550)	5385insC C61G	6174delT	82(14.9) 36(6.4) 25(4.5)
Kızılderili (N=105)	187delAG Q563X		23(4.2) 15(2.7)
Asya (N=184)	187delAG 5385insC		7(6.7) 4(3.8)
	L63X	R2494X Q1037X	6(3.3) 5(2.7) 4(2.2)
Latin Amerika (N=287)	187delAG		4(2.2)
	187delAG A1708E R71G 3492insT 2552delC E1308X 3148delCT		35(12.2) 14(4.9) 13(4.5) 12(4.2) 11(3.8) 10(3.5) 10(3.5)
Ortadoğu (N=46)	187delAG C44F Y978X L63X		7(15.2) 5(10.9) 3(6.5) 6(7.6)

N: Çalışmaya katılan hasta sayısı

*Bu tablo 62 numaralı kaynaktan alınmıştır

2.4. Meme Kanserinde Etik ve Genetik Danışma

BRCA1/BRCA2 genlerinde mutasyon taşıyan kadınlara, doğru ve anlaşılır genetik danışma verilmesi çok önemlidir. *BRCA1/BRCA2* mutasyon analizi sonuçlarına göre, genetik uzmanları tarafından verilen genetik danışma ile testin uygulandığı bireyin ve yakınlarının sahip oldukları risk anlatılmaktadır. Hastalar tarafından, kansere yatkınlığı belirleyen genlerin araştırılması ve bununla ilgili danışmanlık almak üzere genetik tanı merkezlerine başvurular giderek artmaktadır. Bunlar arasında özellikle *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine bağlı ailesel meme kanserinde, genetik analiz ve danışmanlığın ayrı bir mediko-sosyal önemi bulunmaktadır. Bireyin kendisinin ve yakın akrabalarının kansere yatkınlık genlerinin araştırılması çok tartışılan bir konudur. Örneğin riske sahip olan kişilerin akrabalarının hekim tarafından uyarılması, hasta-hekim ilişkisinin bir anahtarı olan gizlilik ilkesi açısından değerlendiriliğinde çelişkili bir durum oluşmaktadır (63). Özellikle meme kanserinde daha belirgin olmak üzere, mutasyon taşıyıcısı bireyler, farklı şekil ve derecelerde genetik ayrımcılığa maruz kalabilmektedir. Risk altındaki bazı kişiler ise bu ayrımcılığa maruz kalmamak için *BRCA1/BRCA2* genlerine yönelik mutasyon analiz testlerinden vazgeçebilmektedir. Tıp dünyası, hastalar ve genel toplum bu ayrımcılıkta değişik derecelerde aktif olarak rol almaktadır. Bu nedenle, birçok gelişmiş ülkede hastalar ya da risk altındaki bireyler sigorta şirketleri ve işverenler tarafından uygulanabilecek genetik ayrımcılığa karşı korunmaktadır. Ayrımcılığın ortadan kalkması ya da en aza inmesi için, yasalar nihai çözüm olmamakla birlikte, derin kültürel değişimler gerekmektedir (63).

BRCA1/BRCA2 genlerinde mutasyon taşıyan kadınlara uygulanabilecek erken tanı, takip, ilaçla koruma ve cerrahi profilaksi imkanı sağlamaktadır. Bu nedenle; bireye ve yakınlarına sahip oldukları riski anlatırken morbidite ve mortaliteyi azaltmak için önleyici ve/veya risk azaltma stratejilerine kadınların ilgisini artırmak amacıyla biyopsikososyal faktörleri de ele alarak, hasta ya da taşıyıcı bireylerin maruz kalabileceği genetik ayrımcılığı en aza indirmeye çalışmak gerekmektedir (63). *BRCA1/BRCA2* gen analiz sonucu hastaya anlatılırken; olası sonuçlarla ilgili öngörü gücünün sınırlı olduğunun, penetrans artışının ve azalışının ne anlama geldiğinin, henüz etkisi tanımlanamamış yeni bir mutasyon saptanma olasılığının önemi belirtilmelidir. Bunların yanı sıra kansere yol açan çevresel etkenlerin öneminin de anlaşılır bir şekilde belirtilmesi gerekmektedir (63).

Kansere yol açan mutasyonların saptanması ve tüm genom analizlerindeki ilerlemeler, doğrudan tüketiciye yönelik tarzda testlerin gelişmesine olanak sağlamaktadır (63).

2.4.1. Genetik Bilgilendirme

Genetik bilgilendirme, hastanın kendisine ve/veya dördüncü dereceden akrabalarına kadar uygulanan; genetik test ve bunun sonrasında genetik danışmayı kapsamaktadır. Bu nedenle genetik bilginin, diğer tıbbi bilgilere göre çok özel bir yönü vardır ve testin uyulandığı bireyler dışında, aile bireyleri içinde ayrıca önemi bulunmaktadır. Genetik bilgi bu özelliklerinin dışında; genetik ayrımcılığa yol açabilmesi nedeniyle, genetik testlerin sonuçlarının, etik ve yasal etkilerine bağlı

olarak ayrı bir düzenlemeye tabii bulunmaktadır. Genetik ayrımcılık, risk altındaki bir kişinin toplumsal ayırımına yol açabilecek kadar önemli bir konudur (63).

2.4.2. Genetik Ayrımcılık ve Yasal Düzenlemeler

BRCA1/BRCA2 genlerinde mutasyon taşıyan kadınlar için genetik ayrımcılık sonucu, aileleri ve toplum tarafından daha az ideal eş ve/veya ebeveyn sayılarak yabancılaşıma ve reddedilme durumu ortaya çıkabilmektedir. *BRCA1/BRCA2* genlerinde mutasyon bulundurma açısından yüksek riske sahip birçok kadın; sağlık sigortası veya işverenler ile aileleri ve toplum tarafından ayrımcılığa uğrama korkusu nedeniyle test yaptırmaktan kaçınmaktadır. Sigorta şirketleri, işverenler, aile ve toplum tarafından ayrımcılığa uğrama korkusu nedeniyle test yaptırmaktan kaçınan kişiler; koruyucu önlemler, izleme ve/veya test sonrası takip ve diğer müdahalelerden kaçınmaları nedeniyle zarar görebilecektir (63). Genetik ayrımcılığın önlenmesi amacıyla, ABD’de ve diğer bazı gelişmiş ülkelerde ayrımcılık karşıtı mevzuatın kanunlaşması gerçekleşmiştir (63-64). ABD Kongresi 2008 yılında genetik bilgiye bağlı olarak sağlık sigortası şirketleri ve işverenler tarafından ayrımcılığa karşı bireyleri korumak için Genetik Bilgi Ayrımcılık Yasasını (GINA) yürürlüğe koymuştur (63). GINA, sigorta şirketlerinin risk analizi yaparken genetik bilgiyi ve aile öyküsünü dikkate almasını yasaklamaktadır. Böylece, mutasyon taşıyıcılarının, daha yüksek sigorta primi ödemelerinin veya sağlık sigortası kapsamından çıkarılmalarının önüne geçilmiştir. Genetik Ayrımcılık Mevzuat’ı, bireylerin genleri üzerinde hiçbir

kontrollerinin olmadığı gerçeğine dayanmaktadır. Ancak Avrupa’da genetik test ve genetik bilginin yasalar içerisinde net bir tanımının ve sınırının olmamasından dolayı, Genetik Ayrımcılıkla ilgili yasaların etkinliği tam olamamaktadır (63,65). Bu nedenle genetik hastalığa sahip olanlar, hastalık taşıyıcıları, genetik olmayan hastalığa sahip olanlar ve engelliler açısından ayrımcılığa son vermek için düzenleyici yasal yaptırımların ötesinde, derin kültürel değişimler gerekmektedir (63).

2.4.3. Genetik Danışma

Bütün genetik hastalıklarda ve kanserlerde olduğu gibi, meme kanserinde de genetik danışmanlık hastalığın tanısında ve risk altındaki bireylerin, olası durumlar hakkında, doğru bilgi sahibi olmasında çok önemlidir. Danışmanlık sırasında klinisyenin yetersiz bilgisi ya da hastanın yetersiz algısı, testin yanlış yorumlanması hasta ve ailesine gereksiz proflaktik cerrahi uygulanması gibi gereksiz yollara başvurulmasına neden olabileceği gibi, BRCA mutasyonu taşımayan ancak meme kanseri açısından başka riskler taşıyan kadınların takipten çıkarılmasına yol açabilir. Bu nedenle, genetik danışmanlık, bu konuda mutlaka özel eğitim almış profesyonel kişiler tarafından verilmelidir. Ancak son zamanlarda, özellikle başta ABD ve Avrupa’da olmak üzere, doğrudan tüketiciye (hastaya) yönelik genetik testler yapılmakta ve bu kişiler çoğu zaman profesyonel bir genetik danışmadan mahrum kalmaktadır. Doğrudan hastaya yönelik tarzdaki genetik testlerde önemli noktalardan bir tanesi meme kanseri gibi multifaktöriyel hastalıklardan sorumlu genlerde tek nükleotid değişikliği (SNP= Single nucleotide

polymorphism) gibi etkisi kanıtlanmamış varyasyonların görülebilmesidir. SNP'lerin hastalık-etnisite arasındaki ilişkisi mutlaka profesyonel bir genetik danışma içerisinde hastaya ya da risk altındaki bireye anlatılmalıdır (63). Ayrıca,

- Kimlere genom dizi analizi yapılmalı?
- Kimlerden genetik test istenmeli?
- Kimlere genetik test öncesi ve sonrası genetik danışma verilmeli?
- Kimlerin bir bireyin genetik bilgilerine erişim hakkı olmalı?

gibi soruların cevabı yasal düzenlemelerle belirlenmelidir.

Bütün bu bilgiler bağlamında biz hekimlere düşen, kansere yatkınlık mutasyonlarını taşıyanların bireysel ve ailesel gizliliklerini gözeterek ahlaki anlayış içerisinde davranmaktır. Genomik profillemeye dayalı tıp çağına girerken, doğru zamanda ve doğru endikasyonla test yapılmalı ve eksiksiz, profesyonel bir şekilde genetik danışmanlık vermenin yanı sıra, genetik testlerin etik yansımaları açısından hastalar, aileler, risk altındaki bireyler ve toplum olabildiğince korunmalıdır (63).

2.5. *BRCA1/BRCA2* Mutasyon Analizinde Kullanılan Tanı Yöntemleri

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinin mutasyon analizinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en sık olarak; Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA), Konvansiyonel Dizi Analizi (Sanger yöntemi) ve Next Generation Sequencing (NGS) yöntemleri sayılabilir. Ayrıca Mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde yine *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin mutasyonlarını belirlemede nadiren ve sınırlı olarak kullanılmaktadır.

2.5.1. MLPA

MLPA tekniği; özellikle genleri etkileyen büyük delesyonları ve duplikasyonları saptamak için kullanılan bir yöntemdir. MLPA tekniği; 45-50 nükleotide kadar spesifik dizinin, Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonrası eş zamanlı olarak değ erlendirilebildiğ i bir yöntemdir (66). Bir diğ er ifadeyle, 50 kadar farklı genomik DNA veya RNA dizisindeki normal olmayan kopya sayısının tespitini sağ layan bir multipleks PZR yöntemidir (67). Amplifiye edilecek ürünlerin, herhangi bir dizileme cihazı kullanılarak ayrıştırılmaları sağ lanır. Bu yöntemde sadece bir tek primer çifti kullanılır. Oluş an fragmanların uzunlukları 130-490 baz çifti (bç) arasında olduğu için, jel paternine uygun uzunluktadır. Analiz sonrası ortaya çıkan sonuçlar, kontrol örneğ iyle karşılaştırılır ve bu karşılaştırma sonucunda, delesyon/insersiyon taşıyan diziler tespit edilir. MLPA yöntemi için gerekli ekipmanlar birçok moleküler genetik laboratuvarında bulunabilmektedir (66, 67). MLPA yöntemi bazı mikrolelesyon sendromlarının tanısında kullanılmakla beraber, meme kanserinde *BRCA1/BRCA2* genlerindeki özellikle birkaç ekzonu kapsayabilen, büyük delesyon ve duplikasyonların belirlenmesinde kullanılmaktadır (66).

2.5.2. Konvansiyonel Dizi Analizi

Gerek meme kanseri, gerekse birçok hastalığın moleküler tanısında DNA dizi analizi yöntemlerinden en sık kullanılanı Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen, zincir sonlanma esasına dayanan Konvansiyonel dizi analizi yöntemidir. Bu yöntemde; bir DNA kalıbından, tek zincirli, uzunluğu her

seferinde bir öncekinden bir nükleotid fazla olacak şekilde artan, sistem tarafından okunabilen bir dizi fragman oluşturulur. Bu yöntemde, bir DNA kalıbı (bu genellikle saflaştırılmış bir PZR ürünüdür), ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz, bir tekli oligonükleotid primer ve dört çeşit dNTP (deoksinükleotid trifosfat) substrattan oluşan kimyasal reaksiyon ortamı oluşturulur. Ayrıca, her biri farklı bir dalga boyunda veya farklı renkte ışıma yapan floresan boyalarla işaretlenmiş, az miktarda dideoksi nükleotid trifosfatlar da (ddNTP'ler; ddATP, ddCTP, ddGTP ve ddTTP) aynı test tüpünde bir araya getirilir. DNA polimerize olurken dATP, dCTP, dGTP ve dTTP yapıya katılarak, DNA zincirinin tamamlayıcısı olan yeni bir DNA zinciri sentezlenir. Bu işlem sürerken bazı nükleotidler için dNTP yerine, ddNTP zincire dahil olur. Bu noktada zincir uzaması durur, çünkü ddNTP'nin deoksiriboz şekerinde, bir sonraki nükleotidin eklenebilmesi için gerekli olan 3'OH grubu yoktur. Daha sonra otomatik bir dizileme cihazında, bu moleküler ürünler, jel elektroforezi ile (çok uzun bir kapiller tüp içindeki) jel boyunca yürütülerek uzunluklarına göre ayrılabilir ve yaydığı ışıma göre tanımlanabilir. Hedef bölgenin iki zinciri, ya ileri ya da geri oligonükleotid primerler kullanılarak kaydedilir. Oluşan iki tamamlayıcı dizi bilgisayar tarafından eşleştirilir ve böylece mutasyonun var olup olmadığı kontrol edilir (6, 68).

2.5.3. Mikroarray ile Yeniden Dizileme

Mikroarray yöntemi temel olarak; DNA parçacıklarından oluşan bir matriks üzerine, hasta DNA'sının hibridize edilmesi esasına dayanmaktadır. Günümüzde tüm genomu taramak, submikroskopik değişimleri (delesyon ve

duplikasyonlar) saptamak, gen ekspresyon analizi, gen fonksiyon araştırması ve yeniden dizilemede array tabanlı sistemler sık olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu sistem; hastalıklara yatkınlık oluşturan genlerin tespitinde, mutasyon analizlerinde, meme, kolorektal kanserler ve lenfomalar başta olmak üzere kanser araştırmalarında, yapısal kromozom anomalilerinde etkilenen lokusun tespitinde, telomerik anomali tespitinde, SNP ve kopya sayısı değişikliği (Copy Number Variation=CNV) taramalarında, genotiplendirmede ve posttranslasyonel modifikasyonların tayininde kullanılabilmektedir (69-71). Mikroarray ile yeniden dizileme tekniği, *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarının taranması ve çeşitli kanser serilerinde *TP53* geninin dizilenmesi gibi araştırmalarda kullanılmıştır (70, 71). Mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde; Longe Range PZR yöntemi ile amplifikasyon işleminin gerçekleştirilmesinden sonra, amplikon, DNAaseI enzimi kullanılarak 20-200 bp aralığında fragmanlara olacak şekilde küçük fragmanlara ayrılır. İndirgenmiş olan fragmanlar enzim yardımıyla biotinle işaretlenir. Daha sonra PZR ürünleri çipe yerleştirilir ve hibridizasyon sağlanır. Son aşamada ise biotinize antikor, hibridize olmuş DNA'lara bağlanır ve eklenen boya vasıtasıyla lazer tarayıcıda görünmesi sağlanır ve dizileme işlemi gerçekleşir. Elde edilen veriler bilgisayar analiz program yardımıyla değerlendirilir (69-71).

2.5.4. Next Generation Sequencing

Konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile; uzun DNA bölgelerinin dizilenmesi için, dizileme öncesi uygulanması gereken klonlama ve koloni seçimi işlemlerinin çok uzun süre alan zahmetli işlemler olması, bilim adamlarını

alternatif dizileme yöntemleri arayışına sokmuştur. Son yıllarda, kayda değer teknolojik yenilikler, karmaşık örneklerin daha önce görülmemiş hızda ve ölçekte dizilenmesine olanak sağlamıştır. Bu yöntemle elde edilen genom dizisi, diğer yöntemlerle elde edilemeyecek kadar zengin (daha uzun dizileri, çok daha fazla sayıda okuyabilmesi nedeniyle) ve özgün bilgi sağlamaktadır. Yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak genom, transkriptom, mRNA profili, snRNA profili, transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin genom karakterizasyonu, kromatin yapısı ve metilasyon paterni, atasal DNA araştırması ve metagenomik araştırmalar yapılabilmektedir. Günümüzde yeni nesil dizileme yöntemleri ile *BRCA1/BRCA2* genleri de dahil olmak üzere, birçok kanser ve hastalığa ait mutasyonların belirlenmesi sağlanmakta ve hızla diğer yöntemlerin yerini almaktadır. Yeni nesil dizileme için ilk önce Pirodizileme metodu (Pyrosequencing), ardından farklı metodlara dayanan ligasyon yoluyla dizileme, ion semikondüktör dizileme ve nano dizileme gibi yeni nesil dizileme yöntemleri geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır (72).

2.5.4.1. Pirodizileme metodu (Pyrosequencing)

Pirodizilemenin temeli DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespitine dayanmaktadır. Dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın tek sarmalı (ssDNA) üzerinde tamamlayıcı sarmalının (complementary DNA/cDNA) sentezlenmesi şeklindedir. Öncelikle çift zincirli DNA'nın nebulizasyonu (400-800 bp'lık küçük fragmanlara ayrılması) gerçekleştirilir. Bu fragmanlara, dizileme primerlerini taşıyan adaptörler eklenir. Adaptörleri taşıyan

DNA fragmanlarının, mikroreaktörler içerisinde emülsiyon bazlı, klonal amplifikasyonu (em-PZR) gerçekleştirilir. Bu aşama sonucunda yaklaşık olarak 10 milyon kopyaya çıkarılmış DNA fragmanları sentez yoluyla dizileme yöntemiyle, yaklaşık 3.6 milyon kuyu içeren bir plate'de dizilenir. Dizileme primeriyle sabitlenen tek sarmallı kalıp DNA üzerine, ardışık olarak akan A, C, G, T nükleotidlerinin kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olması durumunda ortamda bir ışık oluşur. Bu ışığı oluşturan kemilüminesan sinyalin hangi nükleotidin bağlanması sırasında oluştuğu tespit edilir. Sabitlenen ssDNA; DNA polimeraz, ATP sülfirilaz, lusiferaz, apiraz, APS ve lusiferin ile inkübe edilir. Nükleotid akışı sırasında, tamamlayıcı nükleotidin gelmesi durumunda, DNA polimeraz pirofosfat (PPi) açığa çıkar. ATP sülfirilaz enzimi, bu PPi'ı kantitatif olarak ATP'ye dönüştürür. ATP, lusiferaz enzimi aracılığıyla, lusiferinin oksilusiferine dönüşmesini sağlar. Oksilusiferin, görülebilir bir ışık oluşturur. Bu ışığın şiddeti ATP miktarıyla doğru orantılıdır ve bu sayede aynı dizi üzerindeki üçten fazla tek nükleotid tekrarları (homopolimer) tespit edilir (72). Ortaya çıkan bu ışık Charge-Coupled Device (CCD) kamera tarafından kaydedilir ve bilgisayar programı yardımıyla dizi verilerine dönüştürülür (72).

2.5.4.2. Siklik geriye dönüşümlü sonlandırma (cyclic reversible termination) ile dizileme

DNA molekülleri, öncelikle slide üzerindeki primerlere bağlanıp amplifiye edilir (bridge amplification). Dört tip ddNTP eklenir ve yeni sentezlenen zincirin yapısına girmeyen ddNTP'ler yıkanarak uzaklaştırılır. Pirodizilemeden farklı

olarak, DNA her yıkamadan sonra bir nükleotid uzar. Floresan işaretli nükleotidler, kamera aracılığı ile tespit edildikten sonra 3' ucundaki sonlandırıcı kimyasal olarak çıkartılır ve sonraki sıklusa geçerek döngü devam eder ve daha sonra bilgisayar programı yardımıyla dizi verisine dönüştürülerek veriler analiz edilir (72).

2.5.4.3. Ligasyon yoluyla dizileme

Bu yöntemde de pirodizilemedeki gibi, emülsiyon PZR yapılır. Primerler adaptör diziler yardımıyla kalıp zincire hibridize olur. Bu yöntemde diğerlerinden farklı olarak DNA polimeraz yerine DNA ligaz enzimi kullanılır. Floresan işaretli oligonükleotid problemler kalıp DNA'ya hibridize olur ve primerle ligasyona girer. Floresan deteksiyonundan sonra oligonükleotid problemlerin işaretleri, 5' fosfat ucu kesilerek yeni bir ligasyon siklusuna geçilir. Ligasyon, deteksiyon ve ayrılma siklusları tekrarlanarak DNA dizisi belirlenir (72).

2.5.4.4. İyon semikondüktör dizileme

Bu yöntem, DNA'nın polimerizasyonu sırasında ortaya çıkan, hidrojen iyonlarının saptanmasına dayanır. Tek bir kalıp DNA dizisini içeren mikrokuyuya, tek tip nükleotid akışı uygulanır. Verilen nükleotid, kalıp zincire komplementer olduğu durumda yeni oluşan zincirin yapısına katılır ve hidrojen iyonu salınımı olur. Hidrojen iyonları hipersensitif iyon sensörleri tarafından algılanır. Kalıp DNA'da homopolimer tekrarlarının varlığı durumunda, tek sıklusta birden fazla nükleotid, yeni zincirin yapısına girecek ve salınan hidrojen

iyonlarının sayısına göre daha fazla elektronik sinyal elde edilmesiyle DNA dizisi belirlenir (72).

2.5.4.5. Nano dizileme

Bu yöntem de, sentez yoluyla dizileme esasına dayanır ve prensip olarak polimeraz aktivitesi ve elektriksel alan oluşumuyla işlev görmektedir. Direkt moleküler sensör olarak, biyo-mühendislikle üretilmiş, farklı bir polimeraz ve dNTP'ler kullanılır (72). DNA zinciri, nano tüplerdeki nano porlardan geçerken, porların yanlarına yerleştirilmiş elektrotlar aracılığıyla elektrik akımı kaydedilir. Dört farklı nükleotide karşılık gelen akım değişiklikleri belirlenerek, nano porlardan geçen DNA dizisi belirlenir. Ayrıca bu yöntemde analiz eş zamanlı olarak izlenebilmektedir (73).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Çalışmada kullanılan sekiz hasta ve bir kontrol örneğine ait DNA'lar, İstanbul Acıbadem Hastanesi Genetik Tanı Merkezi'nde daha önce konvansiyonel dizi analizi ve/veya MLPA yöntemi ile *BRCA1/BRCA2* genlerine yönelik mutasyon analizi yapılmış hastalardır. Çalışmada kullanılan diğer kontrol hastasına ait DNA örneği ise, daha önce Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yapılan bir proje kapsamında, *BRCA1/BRCA2* genlerine yönelik konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile mutasyon analizi yapılmış ve mutasyon saptanmamış bir bireye aittir.

Çalışma için Etik Kurul onayı, 13.06.2012 tarihli Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (Girişimsel Olmayan) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 221 karar numarasıyla alınmıştır.

3.2. DNA Eldesi İçin Gerekli Malzemeler

- Otoklavlanmış bidistile su (Applichem)
- Proteinaz K (20 mg/ml) (Applichem)
- Lysis buffer (10 mM TrisHCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA pH: 8.2) (Applichem)
- SDS (sodyum dodesil sülfat) (Merck)
- Amonyum asetat (Merck)
- Absolü etanol (Riedel-De-Haen)

- TE Buffer (Tris EDTA: 10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂EDTA pH:7.5)
(Appllichem)

3.3. Yüksek Tuz Konsantrasyonlu DNA İzolasyon Yöntemi

1. 5 ml kan 15 ml'lik steril tüpe alındı ve üzerine 15 ml'ye tamamlayacak şekilde önceden hazırlanmış otoklavlanmış soğuk bidistile su eklendi.
2. 2-3 dk hızlı olarak karıştırıldı (aşağı yukarı çalkalayarak).
3. 2200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
4. Süpernatant atıldıktan sonra pelletin üzerine tekrar soğuk su ilave edilip santrifüj yapıldı.
5. Yıkama işlemi üç kez daha tekrarlandı. Son yıkamada tüpler bir kağıt havlunun üzerine ters çevrilerek süzülmesi sağlandı.
6. Süzüldükten sonra tekrar çevrilerek üzerine 35µl Proteinaz K (20 mg/ml), 1500 µl lysis buffer, 100 µl SDS konup hafif hafif köpürtmeden alt üst edilerek çalkalandı.
7. Bir gece 37 °C'de bekletildi veya 55 °C'de 3.5 saat tutuldu.
8. 1000 µl amonyum asetat eklenip, 20 kez aşağı yukarı hızla karıştırıldı ve 10 dakika oda ısısında bırakıldı.
9. 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
10. Üzerindeki süpernatant bir başka 15 ml'lik tüpe aktarıldı.
11. Tüpün içeriğinin iki katı kadar absolü etanol konuldu.
12. Hafifçe karıştırılıp, belirginleşen DNA alınarak önceden içerisine 250µl TE eklenen ependorflara pipet ucuyla konuldu.
13. Oda sıcaklığında 1 gün bekletilip çözünmesi sağlanan DNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.4. GeneChip *BRCA1* ve *BRCA2* Dizileme Protokolü (Affymetrix)

Protokol aşağıdaki aşamalardan oluşur:

- 1- Genomik DNA (gDNA) hazırlanması
- 2- Long-Range PZR Protokolü
- 3- PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu
- 4- PZR Ürünlerinin Miktar Tayini ve Birleştirilmesi
- 5- Fragmentasyon
- 6- İşaretleme
- 7- Hibridizasyon
- 8- Yıkama-Boyama-Tarama

3.3.1. Genomik DNA Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan gDNA'nın yüksek kalitede olması gerekliliği nedeniyle, tüm PZR inhibitörlerinden ya da proteinlerden uzaklaştırılmış ve bütünlüğünün korunmuş olup olmadığını anlamak için %1'lik Tris Borik asit EDTA (TBE) agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. Konsantrasyonu ve temizliği ise spektrofotometrik analiz ile ölçülmüştür. Tüm kontrolleri yapılan örnek, çalışma öncesinde son konsantrasyonu 10 ng/μL olacak şekilde nuclease-free su ile sulandırılmıştır.

3.3.2. Long-Range PZR Protokolü

Gerekli Malzemeler:

-TaKaRaLA PZR Kit İçeriği

*TaKaRaLA Taq polimeraz (5 units/μl)

*dNTP karışımı (2.5mM)

*10XLA PZR Buffer II (25mM Mg²⁺) (Plus)

- Nuclease-Free Water

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikrosantrifüj

- Mikropipet

- Vortex

- Thermal cyclers

PZR Primerlerinin Hazırlanması:

1. Liyoflize haldeki primerler 100 pmol stok solüsyon halinde uygun miktarlarda nuclease-free water kullanılarak sulandırıldı.
2. Her bir PZR reaksiyonu için sulandırılan örnekten 5µL alındı.
3. Buz üzerinde her bir PZR reaksiyonu için dNTP karışımı, 10X LA PZR BufferII ve TaKaRa LA Taq polimeraz kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Primer çifti ve gDNA ile birlikte toplam reaksiyon hacmi 25 µL olacak şekilde hazırlandı (Tablo 7).

Tablo 7. PZR Bileşenleri

BİLEŞENLER	Miktar (1rxn)
dNTP karışımı	2 µL
10X LA PZR Buffer	2.5 µL
Taq polimeraz	0.25 µL
Primer F	0.6 µL
Primer R	0.6 µL
gDNA	5 µL (50ng)
dH ₂ O	14.05 µL
Toplam hacim	25 µL

4. Amplikon uzunluğuna uygun olarak thermal cyclers programı hazırlandı ve reaksiyon başlatıldı (Tablo 8).

Tablo 8. Thermal Cycler Programı

94°C	2 dk	1X
94°C	15 sn	} 30X
68°C	kb / dk	
68°C	5 dk + kb/dk	1X
4°C	Bekleme	

5. Reaksiyon sonunda elde edilen iki ayrı amplikon, %1'lik TBE Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi.

6. Bir sonraki aşamaya geçilmeyecek olduğunda amplikonlar –20°C’de saklandı.

3.3.3. PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Gerekli Malzemeler:

- 96-well PZR Clean-Up Plate
- Nuclease-Free Water

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikropipet
- Manifold-QIA vac multiwell unit
- Vakum Regülatör
- Vakum

1. Amplikonların pürifikasyonu için 96-well PZR Clean-Up Plate kullanıldı. Her bir örnek için iki kuyucuk kullanıldı.
2. Vakum Manifold'un vakum pompası ile bağlantısı ayarlandı.
3. Yıkama ve elüsyon için nuclease-free water kullanıldı.
4. Yaklaşık 22 µL amplikon, filtre içine çektirildikten sonra iki kez 50 µL nuclease-free water ile yıkama işlemi yapıldı.
5. Son olarak yine 50 µL su eklendi ve 1000 rpm'de çalkalayıcı içerisinde elüsyonu sağlandı.
6. Her işlem 600-800 mbar vakum kuvvetinde 15 dk yapıldı.
7. Bir sonraki aşamaya geçilmeyecek olduğunda amplikonlar -20°C de saklandı.

3.3.4. PZR Ürünlerinin Miktar Tayini ve Birleştirilmesi

Gerekli Ekipmanlar:

- Nanofotometre

1. Pürifiye edilen amplikonların konsantrasyonları nanofotometre ile ölçüldü.
2. Son hacim 40 µL olacak şekilde nuclease-free water ile tamamlandı ya da konsantre edildi.
3. Bir sonraki aşamaya geçilmeyecek olduğunda -20°C'de saklandı.

3.3.5. Fragmantasyon

Gerekli Malzemeler:

- GeneChip Resequencing Assay Kit (Affymetrix)

*Fragmantasyon Belirteci

*10X Fragmantasyon Buffer

- Nuclease Free Water

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikrosantrifüj

- Mikropipet

- Vorteks

- Thermal cycler

Fragmantasyon, enzimatik bir reaksiyon olup zamana ve sıcaklığa duyarlı olduğu için tüm çalışma buz üzerinde yapıldı.

1. Birleştirilen tüm ampikonların miktarına göre, kullanılması gereken enzim miktarı ayarlandı (Tablo 9).

Tablo 9. Ampikonların Miktarına Göre Kullanılması Gereken Enzim Miktarı

BİLEŞENLER	Miktar (1rxn)
Örnek	40.0 µl
Fragmantasyon Buffer (Affymetrix)	4.7 µL
Fragmantasyon seyreltme belirteci (Affymetrix)	3.3 µL
Toplam hacim	48 µL

2. Thermal cyclers programında reaksiyon gerçekleştirildi (Tablo 10).

Tablo 10. Thermal Cycler Programı

37°C	5 dk
95°C	15 dk
4°C	Bekleme

3. İşaretleme basamağına geçilmeden, fragmanlara ayrılmış olan örnekten 4 µl (20-200 bp) alınarak %4'lük TBE Agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

4. Örnek bekletilmeden diğer basamağa geçildi.

3.3.6. İşaretleme

Gerekli Malzemeler

- Gene Chip Resequencing Assay Kit (Affymetrix)

*DNA Labeling Reagent

*5X Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) Buffer

*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (30U/µL)

- Nuclease Free Water

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikrosantrifüj

- Mikropipet

- Vorteks

- Thermal cycler

1. Uygun miktarlarda Labeling Reagent (İşaretleyici belirteç), TdT Buffer ve TdT kullanılarak reaksiyon için bir karışım hazırlandı. Örnek üzerine eklendi (Tablo 11).

Tablo 11. İşaretleme İçin Reaksiyon Karışımı

BİLEŞENLER	Miktar (1rxn)
TdT Buffer	12 µL
Labeling Reagent	2 µL
TdT Buffer	3.4 µL
Toplam hacim	17.4 µL

2. Thermal cycler programında reaksiyon gerçekleştirildi (Tablo 12).

Tablo 12. Thermal Cycler Programı

37°C	2 saat
95°C	15 dk
4°C	Bekleme

3. Bir sonraki aşamaya geçilmeyecek olduğunda –20°C de saklandı.

3.3.7. Hibridizasyon

Gerekli Malzemeler:

- Gene Chip Resequencing Assay Kit (Affymetrix)

* Oligonucleotide Control Reagent

- Bovine Serum Albumin (BSA) Solüsyonu (Invitrogen)

- Tetramethylammonium Chloride (TMACl) Solüsyonu (SIGMA)

- Herring Sperm DNA (Promega)

- Tris-HCl (1M, pH:7,) (SIGMA)
- Tween-20 (SIGMA)
- Nuclease-Free Water

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikrosantrifüj
- Mikropipet
- Vorteks
- Thermal cyclers
- GeneChip Hybridization Oven 645

1. Analiz örnekleri oda sıcaklığına gelirken, gerekli malzemelerden uygun miktarlarda kullanılarak Pre-Hibridizasyon ve Hibridizasyon karışımı hazırlandı (Tablo 13 ve 14).

Tablo 13. Pre-Hibridizasyon Karışımı

BİLEŞENLER	Miktar (1rxn)
Tris-HCl (1M, pH:7,8) (SIGMA)	2 µL
Tween-20 (SIGMA)	2 µL
Nuclease-free water	196 µL
Toplam hacim	200 µL

Tablo 14. Hibridizasyon Karışımı

BİLEŞENLER	Miktar (1rxn)
TMACl (5M) (SIGMA)	132 µL
Tris-HCl (1M,pH:7,8) (SIGMA)	2.2 µL
Tween-20 (SIGMA)	2.2 µL
BSA (50mg/mL) (Invitrogen)	2.2 µL
HS DNA (High Sensivity DNA) (10mg/mL)	2.2 µL
OCR	1.69 µL
Nuclease-free water	17.5 µL
Toplam hacim	160 µL

2. İşaretlenmiş örnek üzerine hibridizasyon karışımı eklendi ve thermal cycler programında inkübasyona bırakıldı (Tablo 15).

Tablo 15. Thermal Cycler Programı (Hibridizasyon)

95°C	5 dk
49°C	5 dk
49°C	Saklama

3. Thermal cycler programı bitinceye kadar analiz örnekleri içine, hazırlanan Pre-Hibridizasyon karışımı enjekte edildi ve fırında tutuldu. (49°C’de - 60RPM -15dk)

4. Hibridizasyon reaksiyonu bittiğinde analiz örnekleri içinden Pre-Hibridizasyon karışımı boşaltılıp yerine denatürasyonu tamamlanmış örnek enjekte edildi ve 16-18 saat 49°C sıcaklıkta 60 rpm rotasyonla inkübasyona bırakıldı.

3.3.8. Yıkama-Boyama-Tarama

Gerekli Malzemeler:

- * 20XSSPE (Saline Sodium Phosphate EDTA) (SIGMA)
- * Anti-streptavidin antibody biotinylated (SIGMA)
- * R-Phycoerythrin Streptavidin (SIGMA)
- * Tween-20 (SIGMA)
- * Denhardt's Solüsyonu (SIGMA)
- * MES (2-N-morpholino-ethanesulfonic acid) hydrate (SIGMA)
- * MES NaCl (SIGMA)
- * NaCl
- * Nuclease-Free Water

Gerekli Ekipmanlar:

- * GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix)
- * GeneChip 3000 Scanner 7G (Affymetrix)

1. Hibridizasyon tamamlanmadan önce, gerekli malzemelerden uygun miktarlarda alınarak yıkama ve boyama solüsyonları hazırlandı (Tablo 16-19).

Tablo 16. 12X MES Stok Solüsyonu

BİLEŞENLER	500 mL için
MES hydrate (SIGMA)	35.2 g
MES NaCl (SIGMA)	96.65 g
dH ₂ O (distile su)	400 mL
Toplam hacim	500 mL

Tablo 17. WASH-A Buffer-WASH-B Buffer

BİLEŞENLER		BİLEŞENLER	
dH ₂ O	699 mL	dH ₂ O	969 mL
20X SSPE (SIGMA)	300 mL	20X SSPE (SIGMA)	30 mL
Tween-20 (%10) (SIGMA)	1 mL	Tween-20 (%3) (SIGMA)	1 mL
Toplam hacim	1 L	Toplam hacim	1 L

Tablo 18. 1XArray Holding Buffer (Stok)

BİLEŞENLER	100 mL için
12X MES Stok (SIGMA)	8.3 Ml
5M NaCl (SIGMA)	18.5 mL
Tween-20 (%10) (SIGMA)	0.1 mL
dH ₂ O	73.1 mL
Toplam hacim	100 mL

Tablo 19. Boyama Solüsyonu

BİLEŞENLER	Miktar(1rxn)
dH ₂ O	666.7 µL
20X SSPE (SIGMA)	300 µL
Tween-20 (%3) (SIGMA)	3.3 µL
50X Denhardt's Solüsyonu (SIGMA)	20 µL
Toplam hacim	990 Ml

2. Yıkama istasyonunda birinci ve ikinci boyama solüsyonları için hazırlanan boyama solüsyonundan ilk tüpe 495µL ve ikinci tüpe 495µL konuldu. 5µL SAPE ve 5 µL Antibody eklendi. Son tüpe de 1XArray Saklama solüsyonundan 800 µL konuldu.

3. Yıkama İstasyonunun uygun yerlerine bu solüsyonlar ve array yerleştirililerek bilgisayar kontrolündeki yıkama-boyama protokolü başlatıldı.

4. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, bilgisayar kontrolünde tarama işlemi yapıldı ve veriler elde edildi.

5. Elde edilen veriler GSEQ 4.1 veri analiz programıyla analiz edildi.

3.4. GS Junior 454 Sequencing Çalışma Protokolü

3.4.1. PZR Hazırlanması

Çalışmaya dahil edilecek hasta grubunun DNA'ları stoktan 25 ng/ml olacak şekilde hazırlandı.

3.4.1.1. *BRCA1* ve *BRCA2* primerleri ile amplifikasyon reaksiyonları

BRCA MASTR DX kiti (Multiplicom), *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde bulunan, tüm kodlanan ekzonları beş multipleks primer karışımı ile amplifiye etmektedir. Her bir multipleks reaksiyonu için 20-50 ng kalıp DNA; 454 MID DX kitleri kullanılarak barkodlandıktan sonra, elde edilen ürünlerden bir havuz oluşturuldu ve protokole göre dizilemeye hazırlandı. Elde edilen dizileme okumalarında tespit edilen varyant pozisyonları, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin referans genomu ile karşılaştırıldı.

BRCA MASTR DX protokolünün çalışma prensibi iki yönetime dayanmaktadır;

- 1- Multipleks PZR Amplifikasyonu
- 2- Massive Paralel Dizileme

Tüm kodlanan ekzonlar beş ayrı multipleks PZR amplifikasyon reaksiyonu ile hot-start DNA polimeraz kullanılarak amplifiye edildi. Her bir multipleks

PZR'den elde edilen ampikonlar 1/100 oranında sulandırıldı. İkinci PZR'de sulandırılan örnekler kalıp DNA olarak kullanıldı. Bu PZR'de örneklere MIDs (moleküler barkodlar), A ve B adaptörleri bağlandı.

3.4.1.2. Kit içeriği (Multiplicom)

- Tricin solüsyonu içerisinde (pH:8) spesifik oligonükleotid primerler
- dNTP'ler
- BSA
- KCL (Potasyum klorür)
- $MgCl^{+2}$ (Magnezyum klorür)
- Amplification reagent 1 (Amplifikasyon belirteci 1:AR1)
- Tris solüsyonu içerisinde (pH:8) Taq DNA Polimeraz

3.4.1.3. Çalışma protokolü

1. Beş PZR karışımı -20°C'den alındı ve buz üzerine koyuldu. Eridikten sonra, kullanmadan önce vortekslendi ve 12.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi.
2. Taq DNA Polimeraz -20°C'den alındı ve buz üzerine koyuldu. Kullanmadan önce 12.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi.
3. PZR tüplerinin içlerine; PZR karışımı ve Taq DNA Polimeraz içeren karışımlar hazırlandı.
4. Hazırlanan karışımlar 23 saniye vortekslendi ve 12.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi.

5. Her bir karışıma 20-50 ng gDNA'dan 5 µl eklendi.
6. Karışım vortekslendi ve 12.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi.

98 °C'de 10 dakika

95°C'de 45 saniye	}	20 siklus
60°C'de 45 saniye		
68°C'de 2 dakika		

72°C'de 10 dakika

4°C'de 1 saat

olacak şekilde PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplikonların 1 saatten daha fazla +4°C'de bekletilmemesine dikkat edildi. Bu aşamadan hemen sonra universal PZR'ye geçildi, (eğer hemen universal PZR aşamasına geçilmeyecekse örnekler -15°C/-25°C'de saklandı). Daha sonra Multipleks PZR ürünleri 0.1 µl/ml etidium bromür içeren %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.4.1.4. MID PZR reaksiyonun yapılması

MID PZR örnekleri için final konsantrasyonu 1/1000 olmalıdır. Bu nedenle aşama aşama (sırasıyla 1/10, 1/100, 1/1000 oranlarında) dilüe edildi. MID PZR için 1/1000 olarak hazırlanan PZR örnekleri kalıp DNA olarak kullanıldı. MID PZR'si için MID primer karışımından 4 µl, universal PZR karışımından 10 µl, amplifikasyon solüsyonundan 10 µl ve Taq DNA polimeraz enziminden 0,125 µl olacak şekilde bir karışım hazırlandı.

98 °C’de 10 dakika

95°C’de 45 saniye
64°C’de 45 saniye
68°C’de 2 dakika

} 20 siklus

72°C’de 10 dakika

4°C’de maksimum 12 saat olacak şekilde PZR reaksiyonu gerçekleştirildi.

3.4.1.5. Multipleks PZR’den Havuz Oluşturma

PZR için havuz oluşturulurken kullanılan karışımların (Multiplicom) içeriği firma tarafından belirlenmiştir. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri; her bir örnek için tek bir reaksiyon karışımı;

1. karışımdan 8 µl

2. karışımdan 11 µl

3. karışımdan 13 µl

4. karışımdan 8 µl

5. karışımdan 10 µl

Toplamda 50 µl olacak şekilde tek bir tüpte birleştirildi

3.4.1.6. Amplikon kütüphanesi’nin pürifikasyonu

Bu şekilde oluşturulan havuzdan elde edilen amplikon kütüphanesinden, küçük kalıntı halindeki DNA fragmanlarının uzaklaştırılması için manyetik boncuklar kullanılmaktadır.

Pürifikasyon için *Agencourt Ampure XP* boncuklar kullanıldı. Stok Ampure Boncuklar içeriğinde 1000 µl olacak şekilde 1.5 ml’lik ependorflara bölündü. (Bölerken mutlaka çalkalamak gerekir, aksi takdirde boncuklar çökecek ve çalışma solüsyonlarına eşit miktarda boncuk gitmeyecektir). Pürifikasyon çalışmasına başlamadan önce Ampure Boncuklar vortekslendi ve daha sonra aşağıdaki adımlar takip edildi;

1. 34 µl Agencourt Ampure XP ile amplikon kütüphanesinden elde edilen 40 µl karışım karıştırıldı ve 10-12 kez pipetaj yapılarak, 5 dakika oda ısısında bekletildi.
2. Spin yapma ve tüpleri aşağıya doğru silkeleme hareketiyle boncukların ependorfların diplerine inmesi sağlandı.
3. Solüsyonla boncukların ayrılması için 1.5 ml’lik ependorflar manyetik boncuk seperatörüne koyuldu ve 2 dakika beklendi.
4. Berraklaşan kısım atıldı.
5. Taze hazırlanmış %70’lik etanolden 200 µl her bir tüpe koyuldu. Seperatörle beraber ters-yüz edildi ve berraklaşmaya kadar beklendi. Berraklaşan kısım atıldı.
6. Bir önceki basamak bir kez daha tekrarlandı.
7. Daha sonra ependorfların diplerinde kalan kısım alındı.
8. Tüpler kapatılıp spin yapıldı ve spinden sonra tekrar seperatöre yerleştirilerek bir kez daha spin yapıldı ve pipetle kalan kısım alındı.
9. Oda ısısında 1 dk kuruması beklendi.

10. Mat görünüm oluşana kadar beklendi, daha sonra fazla kurummasını önlemek için 20 µl “molecular biology grade water” eklendi ve aşağı-yukarı çalkalanarak ıslanmaları sağlandı. Vorteksleme yaparak 1-2 dk oda ısısında bekletildi.
 11. Daha sonra tekrar seperatöre alındı.
 12. Ependorfların içeriği alınarak yeni tüplere aktarıldı.
- Böylece pürifiye edilmiş amplikon library elde edildi.

3.4.1.7. Emülsiyon PZR

Multipleks PZR ve Universal PZR işlemlerinden sonra pürifiye edilen amplikonlar, daha sonra emülsiyon PZR çalışmasına alındı. Emülsiyon PZR’si Titanium em PCR Kit Lib-A (Multiplicom) karışımıyla yapıldı.

Belirteç ve Emülsiyon Dilüsyonunun Hazırlanması:

1. Enzim karışımları ve Ppiase tüpleri dışındaki kimyasallar oda sıcaklığında bekletildi.
2. Additive maddesi (Multiplicom) 55°C’de kuru ısıtıcı blokta 5 dakika bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı.
3. Emülsiyon yağı (4 ml) maksimum hızda 10 saniye yüksek devirde vortekslendi ve karıştırıcı tüpe (Turrax) boşaltıldı.
4. 1xmock karışımı hazırlamak için 1720 µl molecular biology grade su, 430 µl mock karışıma eklendi.
5. Kapsül oluşturmak için emülsiyon yağını içeren Turrax karıştırıcı tüp içine, hazırladığımız 1xmock karışımdan 2 ml koyuldu.

6. IKA-Turrax cihazının üzerine koyulan Turrax Stirring tüp 4.000 rpm’de 5 dakika çevrildi.

PZR aşamaları bitirildikten sonra dizileme ile ilgili aşamalara geçildi.

3.4.2. Boncukların Saflaştırılması

Emülsiyon PZR’ı sonrası, DNA boncuklarının yıkanması ve emülsiyon yağından uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlem için aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulandı. Emülsiyonlar sekiz kanallı pipet ve vakum pompası yardımı ile plate’in kuyularından çekilerek 50 ml falkon tüp içerisinde toplandı.

1. Boncukların üzerine toplam hacim 35 ml olacak şekilde izopropanol eklendi ve 950 rpm’de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant serolojik pipetle çekilerek atıldı.
2. Pellet üzerine 10 ml Enhance Fluid (zenginleştirici solüsyon) eklendi, iyice vortekslenerek pellet çözüldü. Üzerine 40 ml olacak şekilde izopropanol eklendi ve 950 rpm’de beş dakika santrifüj edildi. İşlem bittikten sonra süpernatant atıldı.
3. Pellet üzerine 35 ml izopropanol eklendi, 950 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
4. Bir önceki basamak tekrarlandı.
5. Pellet üzerine 35 ml zenginleştirici solüsyon eklendi, 950 g’de 5 dk santrifüj edildi, süpernatant tüp içerisinde 2-3 ml sıvı kalana kadar atıldı.

6. Boncuklar tekrar süspanse edilerek 1.5 ml ependorf tüp içerisine transfer edildi.
7. 125 ul sıvı Sodyum hidroksit (NaOH), 9.875 ml su ile karıştırılarak Melt solüsyonu hazırlandı.
8. İkinci zinciri eriterek dsDNA'yı ssDNA'ya dönüştürmek için 1 ml Melt solüsyonu yıkanma işlemi biten DNA boncukları üzerine eklenerek iki dakika oda ısısında inkübe edildi.
9. Melt solüsyonu ile inkübasyon bir kez daha tekrarlandıktan sonra örnekler 1 ml bağlanma solüsyonu ile yıkanarak NaOH etkisi uzaklaştırıldı.
10. DNA Boncuk Zenginleştirme basamağı için 15 µl Enrich Primer A (Zenginleştirilmiş Primer A) ve Enrich Primer B (Zenginleştirilmiş Primer B) örnekler üzerine eklendi, 65°C'lik kuru ısı bloğunda 5 dk, ardından 2 dk buz üzerinde bekletildi.
11. Zenginleştirilmiş primer bağlanması sonrası bağlanamayanları uzaklaştırmak için zenginleştirici solüsyon ile üç kez yıkama işlemi yapıldı. Son olarak örnekler 1 ml zenginleştirici solüsyon ile çözüldü.

3.4.3. Boncuk Zenginleştirme ve Boncuk Sayımı

Bu aşamada öncelikli olarak boncuklar zenginleştirildi ve daha sonra boncuk sayımı yapıldı.

3.4.3.1. DNA Boncuk Zenginleştirme

1. Hazırlanan DNA boncukları üzerine, yıkanarak hazırlanan zenginleştirilmiş boncuklardan 80 µl eklendi ve vortekslendi.
2. Tüpler beş dakika rotatorda inkübe edildi.
3. Rotatordan alınan tüpler, Magnetic Particle Collector (Manyetik Partikül Toplayıcı (MPC)) üzerine yerleştirildi, zenginleştirilmiş boncuklar toplanana kadar beş dakika beklendi.
4. Bekleme süresinde MPC birkaç kez öne ve arkaya doğru eğilerek çevrildi.
5. Süpernatant, zenginleştirilmiş boncukları çekmeden dikkatlice toplandı. (Toplanan süpernatant zenginleşmemiş (anti-enrichment) boncukları içerdiği için herhangi bir trouble-shooting (sorun çözme) durumu için saklanabilir)
6. Zenginleştirilmiş boncuklar üzerine, 1 ml zenginleştirici solüyon eklendi, tüpler MPC'den çıkartıldı ve vortekslendi.
7. Tüpler tekrar MPC'ye yerleştirildi ve boncukların toplanması beklendi, bekleme süresinde MPC birkaç kez öne ve arkaya doğru eğilerek çevirildi.
8. Süpernatant, zenginleştirilmiş boncuklara dokunmadan çekildi.
9. Bu yıkama işlemi en az 6, en fazla 10 kez, süpernatant içerisindeki beyaz boncuklar tamamen temizlenene kadar tekrarlandı.

10. Altıncı yıkamadan sonra toplanan süpernatant spin edilip beyaz boncukların çöküp çökmediği kontrol edildi, beyaz boncuklar mevcut ise zenginleştirici solüsyon ile yıkamaya devam edildi.

3.4.3.2. Zenginleştirilmiş Boncukların Toplanması

1. Zenginleştirilmiş DNA boncuklarını içeren tüpler MPC'den çıkartıldı, 500 µl Melt solüsyonu ile tekrar süspanse edildi.
2. Daha sonra 5 saniye vortekslendi ve tekrar MPC üzerine yerleştirildi. Zenginleştirilmiş boncuklar toplanırken, serbest kalan zenginleştirilmiş DNA boncuklarının oluşturduğu süpernatant toplanarak (zenginleştirilmiş boncuklar ile DNA boncukları birbirinden ayırdığı için) ependorf tüpe transfer edildi.
3. Zenginleştirilmiş boncuklar üzerine tekrar 500 µl Melt solüsyon eklendi.
4. Daha sonra beş saniye vortekslendi, tekrar MPC üzerine yerleştirildi.
5. Toplanan süpernatant, bir basamak önce toplanan süpernatantın üzerine eklenip, zenginleştirilmiş boncuklar atıldı.
6. Tüpler 14.000 rpm'de 10 saniye kadar spin edildi, rotate edildi, tekrar spin edildi ve süpernatant atıldı.
7. Boncuklar üzerine 1000 µl bağlanma solüsyonu eklenip, vortekslendi.
8. Spin-rotate-spin aşamaları tekrarlandı ve süpernatant atıldı.
9. İki kez 1000 µl bağlayıcı solüsyon ile yıkama tekrarlandı.

10. Son olarak boncuklar 100 µl bağlayıcı solüsyon ile tekrar süspanse edildi.
11. 15 µl sequence primer A, 15 µl sequence primer B eklendi ve vortekslendi.
12. Ependorf tüp, kuru ısı bloğu üzerinde 65°C’de 5 dk ve hemen ardından buz üzerinde 2 dk bekletildi.
13. 1000 µl Annealing Buffer ile spin-rotate-spin yapılarak üç kez yıkama işlemi yapıldı.
14. Son olarak 1000 µl bağlayıcı solüsyon ile çözüldü.

3.4.3.3. Boncuk sayımı

Ependrof tüp GS Junior Bead Counter üzerine yerleştirilerek kalitatif bir sayım yapıldı. GS Junior Bead Counter sisteminin ölçüm penceresinin alt sınırı 500.000, üst sınırı 2.000.000 boncuk arasındadır. Dizileme işlemi için elimizde 500.000 adet boncuk olması gerekli olduğundan, elde ettiğimiz boncuk miktarı bu aralık içinde olmalıdır, 500.000 boncuktan az ise protokolün başına, örneklerin PZR işlemlerine geri dönülmelidir. 2.000.000 boncuk üzerinde ise emülsiyon PZR protokolüne geri dönüp DNA hacmi azaltılarak çalışma tekrarlanmalıdır.

3.4.3.4. Dizileme işlemi

1. GS Junior Sequencing Reagents&Enzymes kiti (Multiplicom) saklanmış olduğu -20°C’den çıkartıldı ve enzim tüpleri buz üzerine

alınarak diğer reaktiflerin bulunduğu kap içerisine normal çeşme suyu eklenerek, karanlık ortamda çözünmeye bırakıldı.

2. GS Junior Bead and Wash Buffer Kit (Multiplicom) içeriğindeki yıkama solüsyonları ile cihaza otomatik ön yıkama işlemi yaptırıldı.
3. Cihazın CDD kamerası, kamera lens temizleyici ile Picotiter Plate yerleştirilen bölümü %50 etanol ve Tween 20 ile silinerek temizlendi.
4. Picotiter Plate'e yüklemek için Packing boncukları, DNA fragmanlarını taşıyan boncuklar, enzim boncukları ve Ppiase boncukları olmak üzere dört farklı yapıda boncuk hazırlandı.
5. BB2 (Prepare Bead Buffer 2) solüsyonu ile boncuklar yıkandı.
6. Dizilim için hazırlanan amplifiye olmuş fragmanları taşıyan DNA boncukları üzerine 6 µl kontrol DNA boncukları eklendi, 500 µl BB2 içerisinde, 20 dakika rotator üzerinde inkübe edildi.
7. Yirmi dakika sonunda DNA boncukları üzerine polimeraz, polimeraz kofaktör ve BB2 eklenerek on dakika daha rotator üzerinde inkübe edildi.
8. Packing boncukları, BB2 ile üç kez spin-rotate-spin yöntemi ile yıkandı (Packing boncukları, Picotiter Plate kuyucukları içerisinde DNA boncuklarını sarmalayıp stabil kalmalarını sağlamaktadır). Yıkanan Packing boncukları son olarak 200 µl BB2 içerisinde çözüldü.
9. Hazırlanan Packing boncukları DNA boncukları ile birleştirilerek beş dakika rotator üzerinde inkübe edildi.
10. Dizileme reaksiyonunda, ışımaları sağlayan enzimleri içeren enzim boncukları, 1 ml BB2 ile MPC üzerinde yıkandı. Son olarak 400 µl

BB2 içerisinde çözündü. Hazırlanan enzim boncukları “enzim alt tabaka” ve “enzim üst tabaka” olarak ikiye ayrıldı.

11. En üst tabaka olan Ppiase boncukları, 1 ml BB2 ile MPC üzerinde yıkandı. Son olarak 410 µl BB2 içerisinde çözündü.
12. Önce Picotiter Plate, daha sonra plate için uygun olan gasget boncuk, yükleme aparatı üzerine uygun şekilde yerleştirildi, aparatın üst kapağı kilitlendi.
13. Picotiter Plate’i ıslatmak amaçlı BB2 pipetlendi ve plate santrifüj edildi.
14. “Enzim alt tabaka” Picotiter Plate’e yüklendi ve santrifüj edildi.
15. DNA ve packing boncuk karışımı Picotiter Plate içerisine gerekli hacimde pipetlendi, santrifüj edilerek boncukların kuyulara inmesi sağlandı.
16. “Enzim üst tabaka” plate’e pipetlendi ve santrifüj edilerek boncukların kuyulara inmesi sağlandı.
17. Son olarak Ppiase boncukları pipetlendi ve santrifüj edildi.
18. Karanlığa bırakılarak çözünmesi beklenen Sequencing reaktifleri cihazın reaktif bölmesine yüklendi. Picotiter Plate aparat içerisinden çıkartılarak cihaza yüklendi.
19. Cihazda istenen siklus sayısı ve istenen analiz şekli seçildikten sonra dizileme çalışması başlatıldı.
20. Dizileme ve analiz işlemi dokuz saat sürdü.

4. BULGULAR

Çalışmadaki 8 hasta örneğinin tamamı ve 2 kontrol örneği ‘‘Mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi (Affymetrix)’’ ile analiz edilerek, GSEQ 4.1 veri analiz programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Projenin talep edilen ek bütçesi dahilinde, elimizde yeterli DNA örneği bulunan 4 hastaya ait örnek ayrıca Next Generation Sequencing (NGS) yöntemi ile analiz edilmiş, GS Amplicon Variant Analyzer veri analiz programı kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar her bir örnek için ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

4.1. Olgu 1

Bu olguya ait örneğe, örneğin temin edildiği merkezde Sanger yöntemi ile *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tüm ekzonlarına mutasyon analizi yapılmıştır. Hastada *BRCA1* geninde c.2863_2867delTCATC/Normal, heterozigot mutasyonu saptanmıştır. Aynı hastaya ait örneğe tarafımızdan *BRCA1*ve *BRCA2* genlerine mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi uygulanmış, ancak mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde, Sanger yöntemi ile saptanan bölgedeki mutasyon ve polimorfizmler ile *BRCA1/BRCA2* genlerinin diğer bölgelerinde mutasyon ve polimorfizm saptanmamıştır (Tablo 20). Olgu 1’deki hastaya NGS yöntemi uygulanmamıştır.

Tablo 20. Olgulara Ait Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması

	Konvansiyonel Dizi Analizi Yöntem ile analiz edilen ekzonlar	Konvansiyonel Dizi Analizi yöntemi ile saptanan mutasyon ve mutasyonun saptandığı ekzon	Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi	Next Generation Sequencing Yöntemi
Olgu 1	<i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinin tüm ekzonları	c.2863_2867delTCATC/N <i>BRCA1</i> geni 10. ekzon	Mutasyon saptanmadı	Yöntem uygulanmadı
Olgu 2	<i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinin tüm ekzonları	c.4987_4990delGTCA/N <i>BRCA2</i> geni 11. ekzon	Mutasyon saptanmadı	Yöntem uygulanmadı
Olgu 3	<i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinin tüm ekzonları	c.788_789insG/N <i>BRCA1</i> geni 10. ekzon	Mutasyon saptanmadı	Yöntem uygulanmadı
Olgu 4	Yöntem uygulanmadı*	<i>BRCA1</i> ekzon 13-22del/N	Mutasyon saptanmadı	Yöntem uygulanmadı
Olgu 5	<i>BRCA1</i> geni 10. ekzon	c.2019delA/N <i>BRCA1</i> geni 10. ekzon	Mutasyon saptanmadı	c.2019delA/N
Olgu 6	<i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinin tüm ekzonları	c.843_846delCTCA/N <i>BRCA1</i> geni 10. ekzon	Mutasyon saptanmadı	c.843_846delCTCA/N
Olgu 7	<i>BRCA1</i> geni 10. ekzon	c.3794delA/N <i>BRCA1</i> geni 10. ekzon	Mutasyon saptanmadı	c.3794delA/N
Olgu 8	<i>BRCA1</i> geni; 3, 5, 6, 7, 9-22, 24. ekzonlar <i>BRCA2</i> geni; 1-9, 11, 13-17, 20-26. ekzonlar	c.5266insC/Normal <i>BRCA1</i> geni 20. ekzon	Mutasyon saptanmadı	c.5266insC/N

*Olgu 4'e dış merkezde MLPA yöntemi uygulanmış ve 13-22. ekzonların delesyona uğradığı belirlenmiştir

4.2. Olgu 2

Bu olguya ait örneğe, örneğin temin edildiği merkez tarafından Sanger yöntemi ile *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tüm ekzonlarına mutasyon analizi

yapılmıştır. *BRCA2* geninde; c.4987_4990delGTCA/Normal heterozigot mutasyonu saptanmıştır. Aynı hastaya ait örneğe tarafımızdan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi uygulanmış, ancak mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde, Sanger yöntemi ile saptanan bölgedeki mutasyon ve polimorfizmler ile *BRCA1/BRCA2* genlerinin diğer bölgelerinde mutasyon ve polimorfizm saptanmamıştır (Tablo 20). Olgu 2'deki hastaya NGS yöntemi uygulanmamıştır.

4.3. Olgu 3

Bu olguya ait örneğe, örneğin temin edildiği merkez tarafından Sanger yöntemi ile *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tüm ekzonlarına mutasyon analizi yapılmıştır. *BRCA1* geninde, c.788_789insG/Normal (stop at 264) heterozigot mutasyonu saptanmıştır. Aynı hastaya ait örneğe *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi uygulanmış, ancak mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde, Sanger yöntemi ile saptanan bölgedeki mutasyon ve polimorfizmler ile *BRCA1/BRCA2* genlerinin diğer bölgelerinde mutasyon ve polimorfizm saptanmamıştır (Tablo 20). Olgu 3'deki hastaya NGS yöntemi uygulanmamıştır.

4.4. Olgu 4

Bu olguya ait örneğe, örneğin temin edildiği merkez tarafından MLPA yöntemi ile *BRCA1* genine mutasyon analizi yapılmıştır. *BRCA1* geninde; heterozigot *BRCA1* del 13-22 mutasyonu saptanmıştır. Aynı hastaya ait örneğe

tarafımızdan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine yönelik, mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi uygulanmış, ancak mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde, MLPA yönteminde saptanan mutasyon ve *BRCA1/BRCA2* genlerinin diğer bölgelerinde mutasyon ve polimorfizm saptanmamıştır (Tablo 20). Olgu 4'deki hastaya NGS yöntemi uygulanmamıştır.

4.5. Olgu 5

Bu olguya ait örneğe, örneğin temin edildiği merkez tarafından Sanger yöntemi ile; *BRCA1* geninde meme kanserine yol açan mutasyonların en sık görüldüğü 10. ekzona mutasyon analizi yapılmış ve mutasyon tespit edilince ekzonlara analiz yapılmamıştır. Analiz sonrasında; 10. ekzonda c.2019delA/Normal, heterozigot mutasyonu saptanmıştır. Aynı hastaya ait örnekte *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine tarafımızca hem mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi ve hemde NGS yöntemi uygulanmıştır. Mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde, Sanger yöntemi ile saptanan bölgedeki mutasyon ve polimorfizmler ile *BRCA1/BRCA2* genlerinin diğer bölgelerinde mutasyon ve polimorfizm saptanmamıştır (Resim 1) (Tablo 20). NGS yönteminde ise Sanger yönteminde belirlenen mutasyon saptanmıştır (Resim 2). Hastalığa neden olan mutasyon dışında hem Sanger hem de NGS yöntemi ile saptanan diğer değişiklikler Tablo 21'de verilmiştir. Olgu 5'e konvansiyonel dizi analizi yöntemi sadece *BRCA1* geninin 10. ekzonuna uygulandığı için bu yöntemle bulunan diğer değişiklikte sadece bu ekzona sınırlıdır.

Tablo 21. Olgu 5'e Ait NGS'de Saptanan Değişikliklerin Sanger Yöntemiyle Karşılaştırılması

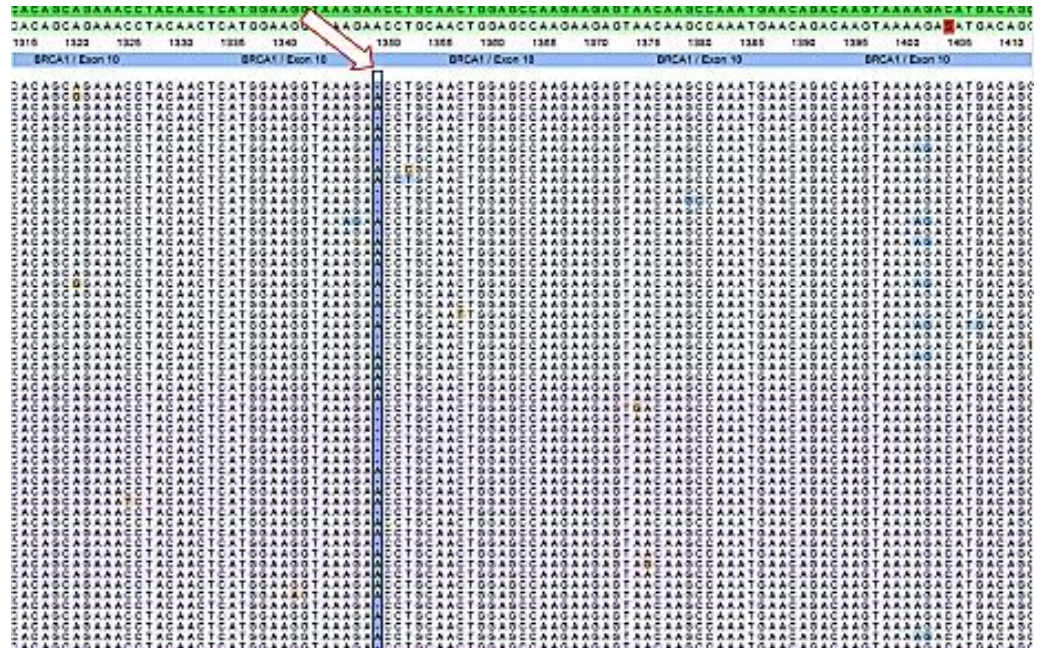
Next Generation Sequencing		Konvansiyonel Dizi Analizi		Mikroarray ile Yeniden Dizileme
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCA1*</i>	<i>BRCA2**</i>	<i>BRCA1-BRCA2</i>
c.779delC (10. ekzon)	c.994delA (10. ekzon)	c.3119G>A (10. ekzon)		Değişiklikler saptanmadı
c.961delA (10. ekzon)	c.1114A>C (10. ekzon)			
c.3119G>A (10. ekzon)	c.3807T>C (11. ekzon)			
	c.4593delA (11. ekzon)			
	c.6551G>A (11. ekzon)			
	c.6566delA (11.ekzon)			
	c.7173G>A (14. ekzon)			
	c.8936delA (22. ekzon)			

*Bu olguya *BRCA1* geninde Sanger yöntemi ile sadece 10. ekzona mutasyon analizi yapılmıştır

**Bu olguya Sanger yöntemi ile *BRCA2* geni mutasyon analizi yapılmamıştır

Seq Pos	1817	1825	1850
Reference	acctgcaactggagccaagaagagtaacaagccaaatgaacagacaagtaaa;		
Gazi_5_(T)	acctgcaactggagccaagaagagtaacaagccaaatgaacag	n	caagtaaa;

Resim 1. Olgu 5'e Ait *BRCA1* geni c.2019delA Mutasyon Bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu



Resim 2. Olgu 5'e Ait NGS Analiz Sonucu

4.6. Olgu 6

Bu olguya ait örneğe, örneğin temin edildiği merkez tarafından Sanger yöntemi ile *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tüm ekzonlarına mutasyon analizi yapılmıştır. Analiz sonrasında *BRCA1* geninde; c.843_846delCTCA/Normal, heterozigot mutasyonu saptanmıştır. Aynı hastanın *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine tarafımızca mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi ve NGS yöntemi uygulanmıştır. Mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde, Sanger yöntemi ile saptanan bölgedeki mutasyon ve polimorfizmler ile *BRCA1/BRCA2* genlerinin diğer bölgelerinde mutasyon ve polimorfizm saptanmamıştır (Resim 3-4) (Tablo 20). NGS yönteminde ise Sanger yönteminde belirlenen mutasyon saptanmıştır (Resim 5). Ayrıca hastada NGS ve Sanger yöntemlerinin her ikisinde de *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde hastalığa sebep olan mutasyon dışındaki değişiklikler Tablo 22 'de gösterilmiştir.

Tablo 22. Olgu 6'ya ait NGS'de Saptanan Değişikliklerin Sanger Yöntemiyle Karşılaştırılması

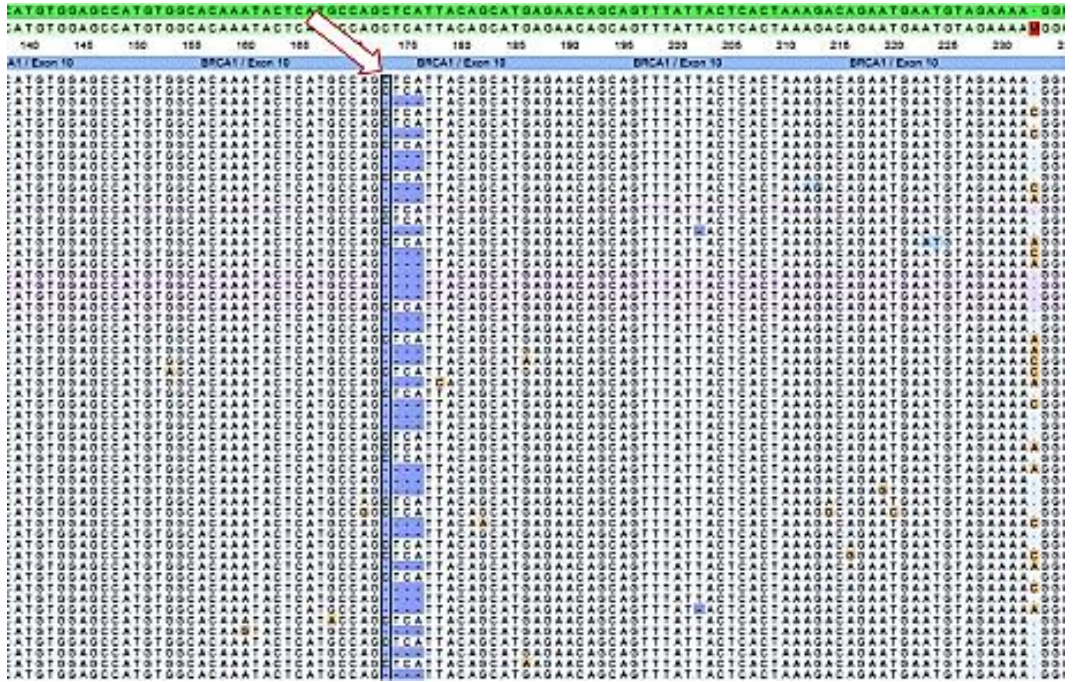
Next Generation Sequencing		Konvansiyonel Dizi Analizi		Mikroarray ile Yeniden Dizileme
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCA1-BRCA2</i>
c.779insC (10. ekzon)	c.36delT (2. ekzon)	c.2612C>T (10. ekzon)	c.3396A>G (11. ekzon)	Değişiklikler saptanmadı
c.2612C>T (10. ekzon)	c.3396A>G (11. ekzon)	c.3114A>G (10. ekzon)	c.3807T>C (11. ekzon)	
c.4837A>G (13. ekzon)	c.3807T>C (11. ekzon)	c.4837A>G (13. ekzon)	c.6513G>C (11. ekzon)	
	c.6513G>C (11. ekzon)		c.7242A>G (14. ekzon)	
	c.6566delA (11. ekzon)			
	c.7242A>G (14. ekzon)			

Seq Pos	640	645	670	695
Reference	ggtcatttacagcatgagaacagcagttttattactcactaaagacagaatgaatgtagaaaaggc			
Gazi_6_(T)	ggtcatttacagcatgagaacagcagttttattactcactaaagacagaatgaatgtagaaaaggc			

Resim 3. Olgu 6'ya Ait *BRCA1* geni c.843_846delCTCA/Normal bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu

Seq Pos	2410	2415	2440	2465
Reference	cgtttttcaaattccaggaaatgcagaagagggaatgtgcaacattctctgcccactctgggtcc			
Gazi_6_(T)	cgtttttcaaattccaggaaatgcagaagagggaatgtgcaacattctctgcccactctgggtcc			

Resim 4. Olgu 6'ya Ait *BRCA1* geni c.2612C>T Polimorfizm Bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu



Resim 5. Olgu 6'ya Ait NGS Analiz Sonucu

4.7. Olgu 7

Bu olguya ait örneğe, örneğin temin edildiği merkez tarafından Sanger yöntemi ile, *BRCA1* geninde meme kanserine yol açan mutasyonların en sık 10. ekzonda bulunmasından dolayı, ilk önce 10. ekzona yönelik mutasyon analizi yapılmış ve 10. ekzonda mutasyon tespit edildiği için diğer ekzonlara analiz

yapılmamıştır. Analiz sonrasında; *BRCA1* geninde; c.3794delA/Normal, heterozigot mutasyonu saptanmıştır. Aynı hastaya ait örneğe tarafımızdan, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi ve NGS yöntemi uygulanmıştır. Mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde, Sanger yöntemi ile saptanan bölgedeki mutasyon ve polimorfizmler ile *BRCA1/BRCA2* genlerinin diğer bölgelerinde mutasyon ve polimorfizm saptanmamıştır (Resim 6) (Tablo 20). NGS yöntemiyle yapılan analiz sonrasında ise Sanger yönteminde belirlenen mutasyon saptanmıştır (Resim 7). NGS yönteminde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde, Sanger yönteminde ise *BRCA1* geninde hastalığa sebep olan mutasyon dışındaki değişiklikler Tablo 23’de gösterilmiştir.

Tablo 23. Olgu 7’ye Ait NGS’de Saptanan Değişikliklerin Sanger Yöntemiyle Karşılaştırılması

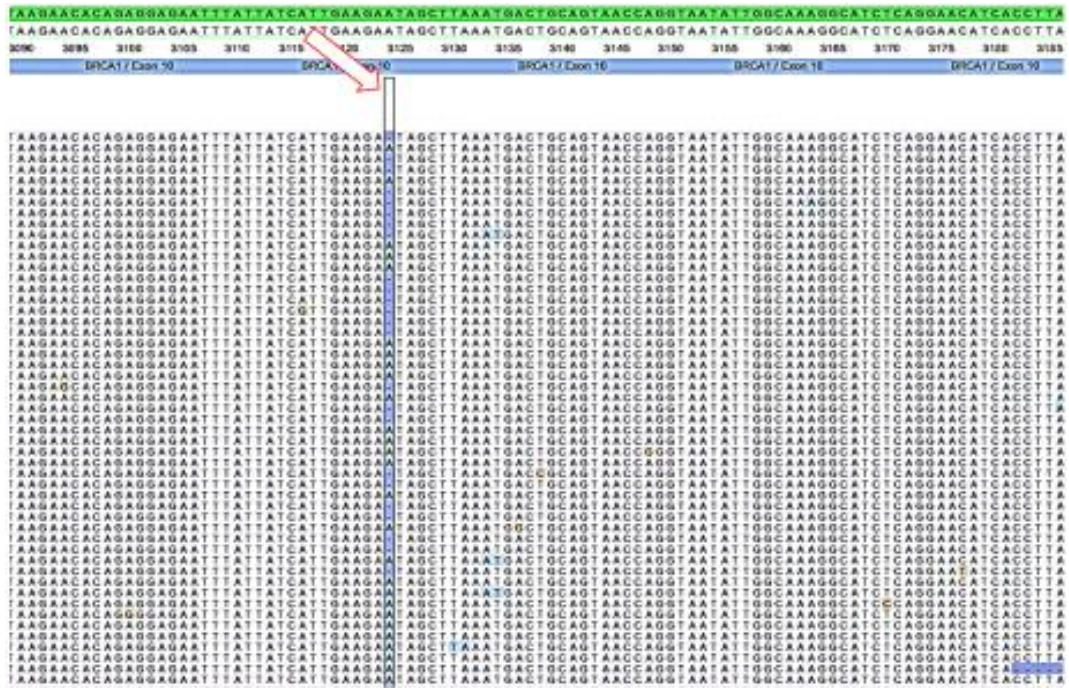
Next Generation Sequencing		Konvansiyonel Dizi Analizi		Mikroarray ile Yeniden Dizileme
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCA1</i> *	<i>BRCA2</i> **	<i>BRCA1-BRCA2</i>
c.779insC (10. ekzon)	c.36delT (2. ekzon)	c.2082C>T (10.ekzon)		Değişiklikler saptanmadı
c.2082C>T (10.ekzon)	c.1593delA (10. ekzon)	c.2311T>C (10.ekzon)		
c.2311T>C (10.ekzon)	c.3396A>G (10. ekzon)	c.2612C>T (10.ekzon)		
c.2612C>T (10.ekzon)	c.3807T>C (10. ekzon)	c.3548A>G (10.ekzon)		
c.3548A>G (10.ekzon)	c.4563A>G (10. ekzon)			
c.4837A>G (13. ekzon)	c.4593delA (10. ekzon)			
	c.6513G>C (10. ekzon)			
	c.6566delA (10. ekzon)			
	c.7242A>G (14. ekzon)			
	c.8936delA (22. ekzon)			

*Bu olguya *BRCA1* geninde Sanger yöntemi ile sadece 10. ekzona mutasyon analizi yapılmıştır

**Bu olguya Sanger yöntemi ile *BRCA2* geni mutasyon analizi yapılmamıştır

Seq Pos	1878	1885	1910
Reference	agcgatacttttcccagagctgaagttaacaaatgcacctgggttctttt:		
Gazi_7_(T	agcgatacttttcccagagctgaagttaacaaatgcacctgggttctttt:		

Resim 6. Olgu 7'ye Ait *BRCA1* geni c.2082C>T Polimorfizm Bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu



Resim 7. Olgu 7'ye Ait NGS Analiz Sonucu

4.8. Olgu 8

Bu olguya ait örneğe, örneğin temin edildiği merkez tarafından Sanger yöntemi ile ilk önce *BRCA1* geninin 10. ekzonuna analiz yapılmış, mutasyon tespit edilmeyince *BRCA2* geninin 10. ekzonu analiz edilmiştir. Bu ekzonda da mutasyon tespit edilmeyince PZR koşullarının aynı olmasından dolayı *BRCA1* geninde; 3, 5, 6, 7, 9-22, ve 24. ekzonlara, *BRCA2* geninde ise; 1-9, 11, 13-17, 20-26. ekzonlara analiz yapılmıştır. Analiz sonrasında *BRCA1* geninde 20. ekzonda c.5266insC/Normal, heterozigot mutasyonu saptanmıştır. Aynı hastaya ait örneğe

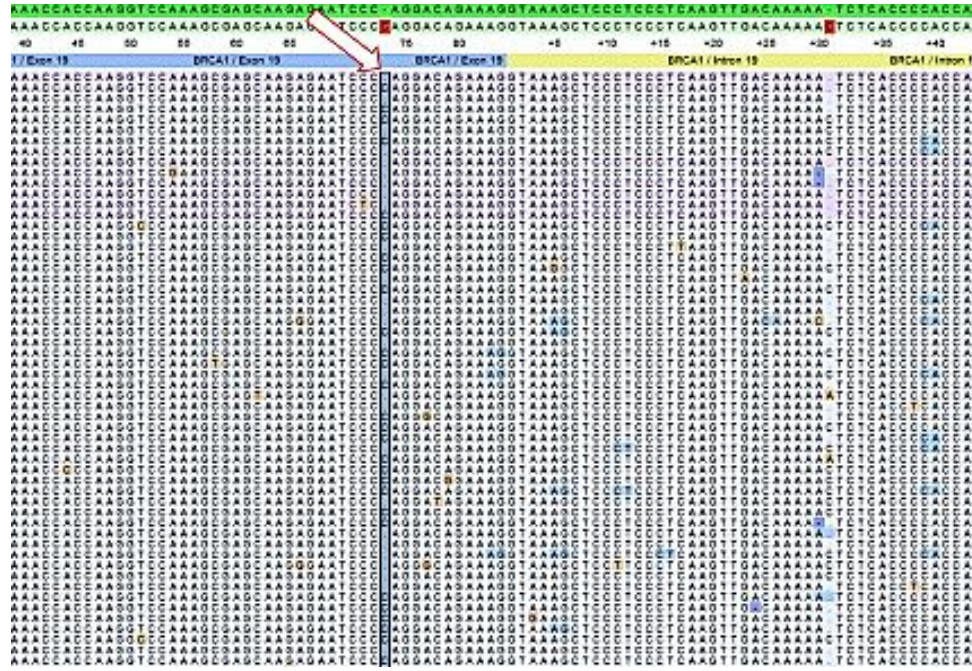
tarafımızdan, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi ve NGS yöntemi uygulanmıştır. Mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde, Sanger yöntemi ile saptanan bölgedeki mutasyon ve polimorfizmler ile *BRCA1/BRCA2* genlerinin diğer bölgelerinde mutasyon ve polimorfizm saptanmamıştır (Tablo 20) (Resim 8). NGS yönteminde ise; Sanger yönteminde belirlenen mutasyon saptanmıştır (Resim 9). Ayrıca NGS yönteminde; *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde, Sanger yönteminde ise; *BRCA2* geninde hastalığa sebep olan mutasyon dışında değişiklikler görülmüş ve Tablo 24’de gösterilmiştir.

Tablo 24. Olgu 8'e Ait NGS'de Saptanan Değişikliklerin Sanger Yöntemiyle Karşılaştırılması

Next Generation Sequencing		Konvansiyonel Dizi Analizi		Mikroarray ile Yeniden Dizileme
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCA1-BRCA2</i>
c.779insC (10. ekzon)	c.4563A>G (10. ekzon)	c.4563A>G (10. ekzon)		Değişiklikler saptanmadı
	c.4593delA (10. ekzon)	c.3396A>G (10. ekzon)		
	c.5758insG (10. ekzon)	c.6513G>C (10. ekzon)		
	c.5785insG (10. ekzon)	c.7242A>G (14. ekzon)		
	c.3396A>G (10. ekzon)			
	c.6513G>C (10. ekzon)			
	c.5763insT (10. ekzon)			
	c.7242A>G (14. ekzon.)			

Seq Pos 2856 2860 2885
Reference accaagctacatattgcagaagagtacattttgaagtgcctgaaaaccagatgac
Gazi_8 (T accaagctacatattgcagaagagtacattttgaagtgcctgaaaaccagatgac

Resim 8. Olgu 8'e Ait *BRCA2* geni c.3396A>G Polimorfizm Bölgesinin Mikroarray ile Yeniden Dizileme Yöntemi Analiz Sonucu



Resim 9. Olgu 8'e Ait NGS Analiz Sonucu

4.9. Kontrol Grubu Analiz Bulguları

Kontrol grubu olarak; daha önce meme kanseri tanısı konulmuş, ancak Sanger yöntemi ile *BRCA1/BRCA2* genlerine mutasyon analizi yapılan ve mutasyon saptanmayan iki hasta örneği kullanılmıştır. Kontrol grubundaki hasta örnekleri; mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi ile analiz edilmiş ve mutasyon saptanmamıştır (Tablo 20). Bu örneklerle NGS yöntemi uygulanmamıştır.

6. TARTIŞMA

Günümüzde kanser giderek sıklığı artan bir halk sağlığı problemidir ve bilindiği üzere, kanser genetik bir hastalıktır. Meme kanseri de, etyolojisinde genetik faktörlerin yanısıra birçok faktörün rol aldığı bir hastalıktır. Meme kanseri, kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %77'sini oluşturarak kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Meme kanserinin dünyadaki ortalama insidansı yüzbinde 38-40, Avrupa'da yüzbinde 66-67 iken, Türkiye'de ki insidansı yüzbinde 40 civarındadır (6). Meme kanseri vakalarının çok büyük bir kısmı sporadik olmakla birlikte, %5-10 arasında değişen bir oranda ailesel meme kanseri olarak görülmektedir (74). *BRCA1* ve *BRCA2* genleri, otozomal dominant ailesel meme kanserinden sorumlu olduğu bilinen genlerdir. Genel popülasyonda *BRCA1* veya *BRCA2* genlerinin herhangi birisinde germ-line mutasyon taşıdığı tahmin edilen kadınların oranı 1/600'dür (74). *BRCA1* ve/veya *BRCA2* genlerinde mutasyona sahip bir kadının, artan yaşla beraber meme kanserine yakalanma riski artmakla birlikte, 70 yaşına kadar hayat boyu meme kanserine yakalanma riski %80'e, over kanserine yakalanma riski ise %50'ye kadar çıkmaktadır (75, 76).

Meme kanserli hastaların tanı, tedavi ve izleminde genetik testlerin yapılması gerekmektedir. Konvansiyonel dizi analizi yöntemi kanser genomunun tanımlanmasında halen altın standart genetik tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntem, teknik zorlukların ve maliyetinin fazla olmasının yanı sıra, oldukça zaman alıcı bir yöntemdir (77, 78). Bu nedenle meme kanseri tanısında daha az zaman alıcı, daha az maliyetli, teknik zorlukları daha az olan ve duyarlılığı bu yönetime en yakın olan yeni genetik tanı yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Genetik biliminde yeni teknolojiler olan Mikroarray ile yeniden dizileme ve NGS yöntemleri son zamanlarda kullanılmaya başlanan, kanser genomunu tanımlamada ve kanserin moleküler sebeplerini belirlemede önemli metodlar olarak göze çarpmaktadır (77). Bu yöntemlerin Sanger yöntemine göre hasta başına maliyeti daha azdır. Ancak, bu yöntemlerin doğruluğu ve güvenilirliği hakkında yeteri kadar bilgi bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasına, İstanbul Acıbadem Hastanesi Genetik Tanı Merkezi tarafından meme kanseri tanısı konulmuş, Sanger ve/veya MLPA yöntemi ile *BRCA1* veya *BRCA2* genlerinde mutasyon saptanmış olan hastalar dahil edilmiştir. Sanger yöntemiyle mutasyon belirlenmiş yedi hasta ve MLPA yöntemiyle mutasyon belirlenmiş bir hasta ile meme kanseri tanısı alan, ancak Sanger ve MLPA yöntemleriyle mutasyon saptanmamış iki kontrol hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalara ait örneklerle, Mikroarray ile yeniden dizileme ve NGS yöntemleri uygulanmıştır. Elde edilen sonuçların doğruluğu, konvansiyonel dizi analizi sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi, kanser genomunu anlamada ve kanserin moleküler düzeyde etyolojisini aydınlatmada, önemli bir yöntem olarak kullanılmaktadır (77). Bu yöntem; mitokondriyal mutasyon analizi, kardiyomiyopati, intrahepatik kolestaz ve retinal dejenerasyonun moleküler temellerinin aydınlatılması gibi farklı amaçlar içinde kullanılmıştır.

Wen ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada *TP53* geninde mutasyon analizi için bu yöntem tercih edilmiştir. Çalışmalarında konvansiyonel dizi analizini baz alarak, mikroarray ile yeniden dizileme yönteminin

özgüllüğünü, duyarlılığını ve sonuçların doğruluğunu tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışmalarında, 108 kanser dokusuna ait örneğin 88'inde (%81), konvansiyonel dizi analizi yöntemiyle aynı sonucu bulmuşlardır. Tek nükleotid değişikliklerini (SNV), DNA dizi analizi yöntemiyle aynı oranda bulurken (%100), delesyon ve insersiyonları konvansiyonel dizi analizi yöntemine göre daha düşük oranda saptamışlardır (%33). Wen ve ark. çalışmalarındaki sonuçlara göre, *TP53* genindeki mutasyonların belirlenmesinde, konvansiyonel dizi analizi yönteminin mikroarray ile dizileme yöntemine göre daha hassas bir yöntem olduğunu, ancak daha fazla emek isteyen ve daha fazla zaman alan bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanısıra delesyonel ve insersiyonel mutasyonların gösterilmesinde, mikroarray ile yeniden dizileme yönteminde ayrıca özel problemler tasarlanıp çiplere eklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir (79).

Schroder ve ark. (2010), 33 ailesel meme ve over kanserli hastada yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi, mikroarray ile yeniden dizileme yöntemiyle *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonları analiz etmişlerdir. Elde ettikleri analiz sonuçlarını, konvansiyonel dizi analiz yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. Mikroarray yönteminin, SNV'leri saptamadaki başarı oranını %100 olarak hesaplamışlardır ve hesapladıkları bu oranın önceki çalışmalarla uyumlu olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında veri analizi için SeqC programını kullanmışlardır. Bu programda doğruluk oranının %97 olduğunu, GSeq veri analiz programı kullanıldığında ise, bu oranın %99'a çıktığını ve her iki analiz programında tek nükleotid değişikliklerini belirlemede mutasyonların tam olarak saptandığını belirtmişlerdir. Yöntemin tek nükleotid

değişikliklerini saptamada başarılı olduğunu, ancak 50 baz çiftinden daha küçük delesyonları saptamada yetersiz olduğunu belirtmişlerdir. Schroder ve ark. da yaptıkları çalışmada 50 bp'den küçük delesyon ve insersiyonlar için mikroarray çipine özel oligonükleotid problemleri eklenmesi gerektiğini ayrıca büyük heterozigot delesyonları saptamak için, mikroarray ile yeniden dizileme öncesi MLPA yönteminin kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da GSeq 4.1 veri analiz programı kullanılmıştır ancak çalışmamıza dahil edilen hiçbir hastada mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi ile, konvansiyonel dizi analizi ve MLPA yönteminde saptanan mutasyonlar belirlenememiştir. Konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile kıyaslandığında, Oligonükleotid mikroarray yönteminin, hasta başına maliyetinin %70 daha az olduğunu hesaplamışlardır. Bununla birlikte rutin kullanımda ikinci bir yöntem ile doğrulama gerektiği için maliyetin artabileceğini belirtmişlerdir. Konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile büyük delesyon, duplikasyon ve insersiyonların saptanamama olasılığı nedeniyle, rutin uygulamada konvansiyonel dizi analiziyle birlikte MLPA yöntemi de uygulanmaktadır. Sonuç olarak, meme kanserinde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine, *TP53*, *PTEN*, *STK11* ve *CDH1* gibi genlerin de eklenerek hastaların tarama ve profilaktik tedavileri için bu yöntemin güvenilir, hızlı ve ekonomik bir yöntem olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda “*Affymetrix Gene Chip BRCA1 ve BRCA2 Dizileme Kiti*” kullanılmış ve GSeq 4.1 analiz programıyla veriler analiz edilmiştir. Mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi uygulanan çalışmamıza dahil edilen sekiz hastanın tümünde sonuçlar normal olarak değerlendirilmiş, konvansiyonel dizi analizi yönteminde saptanan mutasyonların

hiçbiri belirlenememiştir. Bunun sebebinin; 6 hastada en büyüğü 10 bç, en küçüğü 1 bç olacak şekilde delesyonel mutasyon olması, 2 hastada ise 1 bç büyüklüğünde insersiyonel mutasyon olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Wen ve ark. (79) ile Schroder ve ark. (77) yaptıkları çalışmalar da bizimle aynı şekilde Mikroarray ile dizileme yönteminde, delesyon ve insersiyonlar için ayrıca özel probler çipe eklenmediği zaman, bu türdeki mutasyonları saptamada duyarlılığının konvansiyonel dizi analizi yöntemine göre düşük olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışmamızın mikroarray ile yapılan kısmında olgularda var olan delesyon ve insersiyonel mutasyonlar gösterilememiş olmakla birlikte, konvansiyonel dizi analizi yöntemiyle karşılaştırıldığında, polimorfizmlerde belirlenememiş, yanlış negatif ve/veya pozitif sonuçlar da görülmemiştir. Bu tüm sonuçlar değerlendirildiğinde mevcut durumu ile mikroarray ile dizileme yönteminin *BRCA1/BRCA2* genlerinin mutasyon analizi için kullanılmasına uygun görünmemektedir.

Sanger tarafından 1977 yılında geliştirilen ve halen de sık olarak birçok hastalığın genetik tanısında kullanılan konvansiyonel dizi analizi yöntemi yıllar içerisinde geliştirilmiştir. Günümüzde farklı çalışma prensiplerinin uygulandığı çeşitli yeni nesil DNA dizileme yöntemleri kullanılmaktadır. NGS yönteminin, konvansiyonel dizi analizi yöntemine göre önemli bazı avantajları vardır. Bunlardan en belirgin olanlar, çok daha uzun DNA dizilerini daha kısa zamanda ve daha az maliyetle analiz edebilmeleridir (80, 81). NGS yöntemi; tüm genom dizilenmesinde, mutasyon ve polimorfizmlerin tanımlanmasında, kromozomal inversiyonların, dengeli translokasyonların ve kopya sayısı değişikliklerini içeren

yapısal yeniden düzenlenmelerin haritalanmasında, RNA dizilerinin analizinde, mRNA ve snRNA kütüphaneleri oluşturulmasında, DNA metilasyonlarının büyük ölçekli analizlerinde, DNA-protein etkileşimlerinin haritalanması gibi araştırmalarda yaygın şekilde kullanılmakta, bunların yanısıra kanser genetiğinde, özellikle kanser genomunun ve spesifik kanser allellerinin tanımlanmasında da kullanılmaktadır (80).

De Leneer ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, Genome Sequencer FLX (GS FLEX) (Roche) sistemiyle, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonları duyarlılık, özgüllük ve güvenilirlik açısından değerlendirmişlerdir. Bu sistemi tercih etmelerinin nedeni olarak ise diğer NGS yöntemlerine göre, daha düşük maliyetli ve iş akışının daha kolay olması olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında 30 hastaya ait örneği analiz etmişler ve VIP Software 1.3 analiz programıyla değerlendirmişlerdir. Analiz sonucunda, okumaların en az %10'unda 5513 varyasyon bulmuşlardır. Bu varyasyonlardan 443 tanesini doğru varyant, 5070 tanesini ise yanlış pozitif sonuç olarak değerlendirmekle birlikte, özgüllüğü %10'un altında hesaplamışlardır. Daha sonra hataları ayıklamak amacı ile programa ait tanı ayarlarını kendi tanımladıkları bir filtreye göre değiştirip özgüllüğü %92 olarak hesaplamışlardır. Software Nextgene version 2.0 analiz programıyla veriler tekrar değerlendirildiğinde özgüllüğü %84 olarak hesaplamışlardır. Yanlış pozitif sonuçların büyük kısmının homopolimer bölgelerinden kaynaklandığını saptamışlardır. Ancak özgüllüğün yüksek oranda gerçekleşmesi için kullanılan filtre programları sayesinde, yanlış pozitif sonuçların büyük oranda azaldığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda bu uygulama il

altı nükleotidden daha uzun homopolimer bölgelerinden kaynaklanan, yanlış pozitif sonuçların da ortadan kalktığını belirlemişlerdir (82).

Çalışmamızda Olgu 5’de, *BRCA1* geninin 10. ekzonunda NGS yöntemi ile 3 bölgede, konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile de bir bölgede değişiklik bulunmuştur. Bu değişikliklerden birisi (c.3119G>A) her iki yöntemde ortak olup, mutasyon veri tabanlarına göre polimorfizm olarak değerlendirilmiştir (83,84). NGS yönteminde saptanan diğer iki değişikliğin ise (c.779delC, c.961delA) homopolimer dizisi olduğu görülmüştür. Aynı olguda NGS yöntemiyle; *BRCA2* geninde; 10. ekzonda 2 bölgede, 11. ekzonda 4 bölgede, 14. ve 22. ekzonlarda ise birer bölgede değişiklik saptanmıştır. Bu bölgeler incelendiğinde, bunlardan 5 bölgenin (c.994delA, c.4593delA, c.6566delA, c.7173delA, c.8936delA) homopolimer dizisi olduğu, üç bölgenin ise (c.1114A>C, c.3807G>A c.6551G>A) mutasyon veri tabanlarına göre polimorfizm olduğu görülmüştür (83,84) (Tablo 25). Bu olguda *BRCA2* geninin konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile analizi yapılmadığı için bu değişiklikler her iki yöntem arasında karşılaştırılamamıştır.

Olgu 6’da, NGS yöntemi ile *BRCA1* geninin 10. ekzonunda 3 bölgede, 13. ekzonunda ise bir bölgede değişiklik bulunmuştur. Bu değişikliklerden, 10. ekzondaki 2 değişiklik (c.2612C>T, c.3114A>G) ve 13. ekzondaki değişiklik (c.4837A>G) konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile de bulunmuştur. Her iki yöntemde ortak bulunan bölgeler mutasyon veri tabanlarına göre polimorfizm olarak değerlendirilmiştir (83, 84). Sadece NGS yönteminde belirlenen c.779insC’nin ise homopolimer dizisi olduğu görülmüştür. Aynı olguda NGS

yöntemi ile *BRCA2* geninin 2. ekzonunda bir bölgede, 11. ekzonunda 4 bölgede ve 14. ekzonunda bir bölgede değişiklik bulunmuştur. Bu değişikliklerden, 11. ekzondaki 3 değişiklik (c.3396A>G, c.3807T>C, c.6513G>C) ve 14. ekzondaki değişiklik (c.7242A>G) konvansiyonel dizi analizi yönteminde de belirlenmiştir. Bu bölgelerin mutasyon veri tabanlarına göre polimorfizm olduğu görülmüştür (83,84). Konvansiyonel dizi analizi yönteminde görülmeyen 2. ekzondaki (c.36delT) ve 11. ekzondaki (c.6566delA) değişikliklerin ise homopolimer dizileri olduğu görülmüştür (Tablo 26).

Olgu 7’de, NGS yöntemi ile *BRCA1* geninde 10. ekzonda 5 bölgede ve 13. ekzonda bir bölgede değişiklik saptanmıştır. Bu değişikliklerden 10. ekzondaki 4 bölge (c.2082C>T, c.2311T>C, c.2612C>T, c.3548A>G) konvansiyonel dizi analizi yönteminde de bulunmuştur ve bölgelerin mutasyon veri tabanlarına göre polimorfizm olduğu görülmüştür (31, 83). Ekzon 10’da konvansiyonel dizi analizi yönteminde görülmeyen bir değişikliğin (c.779insC) ise homopolimer dizisi olduğu görülmüştür. NGS yönteminde 13. ekzonda saptanan değişikliğinde (c.4837A>G) mutasyon veri tabanlarına göre polimorfizm olduğu görülmüştür (83, 84). Bu olguda konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile *BRCA1* geninin sadece 10. ekzonu analiz edildiğinden, bu bölgenin her iki yöntem arasında karşılaştırılması yapılamamıştır. Aynı olguda, NGS yöntemi ile *BRCA2* geninde 2. ekzonda bir bölgede (c.36delT), 10. ekzonda 7 bölgede (c.1593delA, c.3396A>G, c.3807T>C, c.4563A>G, c.4593delA, c.6513G>C, c.6566delA), 13. (c.4837A>G), 14. (c.7242A>G) ve 22. (c.8936delA) ekzonlarda ise birer bölgede değişiklik görülmüştür. Bu bölgelerden 2. ekzondaki değişiklik ve 10. ekzondaki

2 değişikliğin (c.1593delA, c.4593delA) homopolimer dizisi olduğu görülmüştür. Gende bulunan diğer değişiklikler ise mutasyon veri tabanlarına göre polimorfizm olarak değerlendirilmiştir (83, 84). Bu olguda *BRCA2* geninin konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile analizi yapılmadığı için bu değişiklikler her iki yöntem arasında karşılaştırılamamıştır.

Olgu 8‘de, NGS yöntemi ile *BRCA1* geninde 10. ekzonda bir bölgede değişiklik (c.779insC) belirlenmiş ve bu değişikliğin homopolimer dizisi olduğu görülmüştür. Aynı olguda, NGS yöntemi ile *BRCA2* geninin 11. ekzonunda 7 bölgede ve 14. ekzonunda bir bölgede değişiklik belirlenmiştir. Bu değişikliklerden 11. ekzondaki 3 değişiklik (c.3396A>G, c.4563A>G, c.6513G>C) ve 14. ekzondaki değişiklik (c.7242A>G) konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile ortak olarak bulunmuştur. Her iki yöntemle ortak bulunan bölgeler mutasyon veri tabanlarına göre polimorfizm olarak değerlendirilmiştir (83, 84). Sadece NGS yönteminde bulunan değişikliklerin (c.4593delA, c.5758insG, c.5763insT, c.5785insG) ise homopolimer dizisi olduğu görülmüştür.

Tablo 25. NGS ve Sanger Yönteminde Ortak Bulunan Polimorfik Bölgeler

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i> *
Olgu 5	c.3319G>A (NGS ve Sanger)	c.1114A>C (NGS)
Olgu 6	c.2612C>T (NGS ve Sanger)	c.3396A>G (NGS ve Sanger)
	c.3114A>G (NGS ve Sanger)	c.3807T>C (NGS ve Sanger)
	c.4837A>G (NGS ve Sanger)	c.6513G>C (NGS ve Sanger)
		c.7242A>G (NGS ve Sanger)
Olgu 7	c.2082C>T (NGS ve Sanger)	c.3396A>G (NGS)
	c.2311T>C (NGS ve Sanger)	c.3807T>C (NGS)
	c.2612C>T (NGS ve Sanger)	c.4563A>G (NGS)
	c.3548A>G (NGS ve Sanger)	c.6513G>C (NGS)
	c.4837A>G (NGS)**	c.7242A>G (NGS)
Olgu 8		c.3396A>G (NGS ve Sanger)
		c.4563A>G (NGS ve Sanger)
		c.6513G>C (NGS ve Sanger)
		c.7242A>G (NGS ve Sanger)

*Olgu 5 ve Olgu 7’de *BRCA2* geni Sanger yöntemi ile analiz edilmemiştir.

**Olgu 7’de Sanger yöntemiyle *BRCA1* geninin sadece 10. ekzonu analiz edilmiştir ve c.4837A>G bölgesi, 14. ekzonda yer almaktadır.

De Leneer ve ark. (2010) GS FLEX next generation sequencing sistemiyle yaptıkları çalışmalarında, yöntemin nokta mutasyonlarını belirlemede yüksek duyarlılığa sahip olduğunu, ancak büyük delesyonlarda güvenilir olmadığını bildirmişlerdir (82). Bu yöntemle *BRCA1/BRCA2* genlerini dizilemede verimli bir çalışma yaptıklarını, yöntemin özgüllük ve duyarlılığının yüksek olması, maliyet ve zaman açısından diğer tüm yöntemleri geride bırakması açısından risk altındaki bireylere uygulanabilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Ancak, bütün bu avantajlarına karşın homopolimerik bölgeler için ek analizlere gereksinim

olduğunu da bildirmişlerdir. Son olarak da bu yöntemle saptanan ve şüpheli görülen varyasyonların, konvansiyonel dizi analizi yöntemiyle doğrulanmasının gerektiğini belirtmişlerdir (82). Çalışmamızda ise önceden konvansiyonel dizi analizi ile mutasyonları bilinen örnekler çalışılmıştır ve bu mutasyonlar NGS yöntemi ile %100 oranında doğrulanmıştır. Ancak bizim çalışmamızda olgulara ait konvansiyonel dizi analizi sonuçlarının önceden biliniyor olması, homopolimer bölgelerindeki yanıltıcı sonuçların değerlendirilmesinde avantaj oluşturmuştur.

Tablo 26. NGS Yönteminde Saptanan Yanlış Pozitif Sonuçlar

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
Olgu 5	c.779delC (AAAA HP* dizisi)	c.994delA (AAAAAAA HP dizisi)
	c.961delA (GGGG HP dizisi)	c.4593delA (AAAAAAA HP dizisi)
		c.6566delA (AAAAA HP dizisi)
		c.7173delA (AAAAAAA HP dizisi)
		c.8936delA (AAAA HP dizisi)
Olgu 6	c.779insC (AAAA HP dizisi)	c.36delT (TTTTTT HP dizisi)
		c.6566delA (AAAAAAA dizisi)
Olgu 7	c.779insC (AAAA HP dizisi)	
Olgu 8		c.4593delA (AAAAAAA HP dizisi)
		c.5763insT (TTTTT HP dizisi)
		c.5758insG (TTTTTT HP dizisi)
		c.5785insG (TTTT dizisi)

* HP: Homopolimer

Walsh ve ark. tarafından (2010) yapılan başka bir çalışmada, ailesel meme ve over kanserinde, NGS yöntemi ile mutasyon araştırması yapılmıştır. Araştırmacılar daha önceden konvansiyonel dizi analizi yöntemi ve MLPA

yöntemi ile mutasyon belirlenmiş olan 20 meme kanserli kadın hastaya ait DNA örneği ile Illumina pipeline v1.6 NGS sistemini kullanarak, bizim çalışmamıza benzer şekilde, mutasyonu bilinen hastalarda NGS yönteminin güvenilirliğini belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmalarında, *BRCA1/BRCA2* genlerine ek olarak başka genleri de (*BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2*, *PALB2*, *STK11*) eklemişlerdir. Yaptıkları çalışmada, konvansiyonel dizi analizi yöntemiyle tespit edilememiş 6 büyük delesyonun NGS yöntemiyle tespit edildiğini bildirmişlerdir. NGS yöntemi ile mutasyon analizi yaklaşımının, konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile tespit edilemeyecek gen yeniden düzenlenimlerinin saptanması için avantajlı olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak *BRCA1/BRCA2* genlerine yönelik mutasyon analizinde, altın standart yöntem olan konvansiyonel dizi analizi ile büyük delesyon ve duplikasyonları yakalamak için gerekli olan MLPA yönteminin birlikte kullanımında 2010 yılı için ABD’de hasta başına maliyetin 3340 ABD doları olduğunu bildirmişlerdir. Bu yüksek maliyetten dolayı yeni nesil dizileme yöntemlerinin gerekliliğini belirtmişlerdir. Yeni nesil dizilemenin düşük maliyeti sayesinde, meme ve over kanserinin sadece aile hikayesi olan kişilerde ortaya çıkmadığı da göz önünde bulundurulduğunda, meme kanseri açısından yüksek riskli popülasyon dışında, tüm meme ve over kanserli hastalara mutasyon analizine imkan vereceğini belirtmişlerdir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde mutasyon olan hastalarda, Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) enzim inhibitörü ajanlarına hastalar tarafından güçlü cevap verildiği göz önünde bulundurulduğunda, tüm meme ve over kanserlerinde *BRCA1/BRCA2* mutasyonu bakılmasının teşvik edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Giderek artan NGS

teknolojileri sayesinde, duyarlılık ve özgüllüğün istenilen düzeye ulaşacağını belirtmişlerdir. Aynı zamanda NGS ile tespit edilen mutasyonun, konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile teyit edilip, hastaya verilecek rapora yansıtılması gerektiğini de vurgulamışlardır (76).

Yeo ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada ise, NGS yöntemlerinde homopolimer dizilerinden kaynaklanan hatalı okumalar nedeniyle, yanlış pozitif sonuçların oluştuğunu ve bunu azaltmak için çözüm geliştirmeye çalıştıklarını belirtmişlerdir. Çalışmalarında, Ion Torrent PGM Benchtop Sequencing NGS sistemini kullandıklarını ve bu sistemde de Roche GS Junior 454 Sequencing sistemindekine benzer şekilde homopolimer bölgelerinden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçların görüldüğünü belirtmişlerdir (85). Yeo ve ark., homopolimer bölgelerinden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları azaltmak için De Leener ve ark.(82) yaptıklarına benzer bir şekilde, homopolimer bölgelerine yönelik homopolimer analiz kitleri ya da homopolimer okuma filtreleri geliştirmişler ve bu sayede, özgüllük ve duyarlılığın arttığını belirtmişlerdir (85).

Feliubadalo ve ark. ise (2012) (*BRCA1/BRCA2* genlerine yönelik) NGS yöntemi ile yaptıkları mutasyon analiz çalışmasında, daha önceden Sanger yöntemi ve Roche GS FLEX ile analizleri yapılan ve mutasyonları bilinen materyalleri kullanarak, Roche GS Junior Pyrosequencing NGS sisteminin diğer NGS sistemlerine ve Sanger yöntemine göre özgüllük, duyarlılık, avantaj ve dezavantajlarını karşılaştırmışlardır. Analiz sonuçlarını değerlendirdiklerinde, Sanger yöntemine göre özgüllüğünün %100, duyarlılığının ise %97.5'den fazla olduğunu belirtmişlerdir. NGS yönteminin en önemli dezavantajının ise

homopolimerik bölgelerde yanlış pozitif sonuçların saptanması olduğunu bildirmişlerdir (86).

Araştırmamızda NGS sistemi olarak “Roche GS Junior 454 Sequencing sistemi” kullanılmıştır. Elde edilen veriler; yöntemin hasta başı düşük maliyetli olması, uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç alma avantajları nedeniyle, meme ve over kanserli hastalarda *BRCA1/BRCA2* genlerinin mutasyonlarının araştırılmasında güvenilir olduğunu göstermektedir. PARP enzim inhibitörlerinin, *BRCA1/BRCA2* mutasyonu taşıyan kanserli hücrelerde, etkin bir ortadan kaldırma özelliği olduğu göz önünde bulundurulduğunda, genetik mutasyonun gösterilmesinin sadece tanının konulmasında ve risk altındaki popülasyonun taranmasında değil, aynı zamanda tedavi planlamasında da son derece önemli bir hale geldiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında meme kanserinin moleküler genetik tanısında yeni nesil teknolojilerin kullanılmasının, altın standart olarak kabul edilen ancak maliyet, zaman ve uygulanma zorluğu yanı sıra, büyük delesyon ve duplikasyonları göstermek için MLPA gibi bir yöntemle ihtiyaç duyulan konvansiyonel dizi analizi yöntemine göre, avantaj ve dezavantajları karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda Mikroarray ile yeniden dizileme yöntemi ile yapılan değerlendirmede, konvansiyonel dizi analizi sonuçlarıyla uyumlu sonuçlar elde edilemezken, NGS sisteminde elde ettiğimiz sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak NGS ile elde edilen sonuçların, homopolimer dizilerinin varlığı nedeni ile, yanlış pozitif sonuçları da verebiliyor olması, bulunan değişikliklerin mutlaka konvansiyonel bir yöntemle doğrulanmasını

gerektirmektedir. Bunun yanı sıra, NGS sistemi ile analizlerin kısa sürede ve daha ucuza yapılabilmesinin, konvansiyonel dizi analizi ile büyük delesyon ve insersiyonların tespit edilememesine karşın, NGS sisteminin bu değişiklikleri gösterebiliyor olmasının da konvansiyonel dizi analizine göre bir avantaj olduğu unutulmamalıdır.

6. SONUÇ

Mikroarray ile yeniden dizileme yönteminin en büyük dezavantajı delesyonel ve insersiyonel mutasyonları saptamada yetersiz olmasıdır ve çalışmamızda bu gerçeği bir kez daha ortaya koymuştur. Literatürde bu sorunun mikroarray çiplerine özel problemler eklenerek aşılabileceği bildirilmiştir. Ancak, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin büyüklüğü ve bu genlerde çok sayıda delesyon ve insersiyon türünde mutasyon olduğu göz önüne alındığında, çok sayıda problem eklenmesinin maliyeti oldukça artıracaktır. Bu nedenle *BRCA1/BRCA2* genlerinin mutasyonlarının belirlenmesinde söz konusu tekniğin kullanılabilmesi için analiz programlarının geliştirilerek dezavantajlarının ortadan kalkması ve bunun yeterli sayıda çalışma ile doğruluğunun kanıtlanmasıyla mümkün olabileceği açıktır.

NGS yönteminin ise, konvansiyonel dizi analizi yöntemiyle belirlenen mutasyonları doğru saptadığı için duyarlılığının %100 olduğu ancak bu yöntemde de homopolimer dizilerinde yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkması nedeniyle özgüllüğün düşük olduğu görülmüştür. Bu konuda yapılan farklı çalışmalarda, homopolimer sorununun, homopolimer analiz kitleri ile azaltıldığı belirtilmiştir.

Bütün bu bulgulara dayanarak mikroarray ile yeniden dizileme yönteminin mevcut haliyle, *BRCA1/BRCA2* genlerinin mutasyon analizlerinde tanısal amaçlı kullanıma uygun olmadığını düşünmekteyiz. Benzer araştırmaları yapan bilim insanları gibi NGS yönteminin homopolimer kitleri ile kullanılabilir bir yöntem olduğunu, ancak elde edilecek sonuçların (özellikle homopolimer bölgelerindeki yanlış pozitif sonuçların) mutlaka konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile teyit

edilmesi gerektiği grşnede katılıyoruz. Bu yöntemin ayrıca konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile saptanamayan büyük delesyon ve insersiyonları saptayabilmesi üstünlüğünü de göz önünde bulundurmak gerektiğini belirtmeliyiz. Konvansiyonel dizi analizi yöntemi hala altın standart yöntem olarak yerini korumakla birlikte, hızla gelişen NGS teknolojileri ile yakın zamanda *BRCA1/BRCA2* genleri ve kanserlerden sorumlu diğer tüm genler için hızlı, ekonomik ve doğru sonuçlar veren bu analiz sistemlerinin konvansiyonel dizi analizi yerine kullanılabileceğini mit etmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Atıcı E. Cancer and leukemia in the history of medicine. Türk Onk Derg 2007; 22: 197 - 204.
2. Lüleyp Ü. Moleküler Genetiğin Esasları. Adana: Nobel Kitabevi; 2008.
3. Robert L, Nusbaum MD, Roderick R, McInnes MD, Huntington F, Willard Phd. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik. (6. Baskı). Ankara: Güneş Kitabevi; 2005.
4. Rosen PP, Paul P. Rosens Breast Pathology. Third Edition. Lippincott Williams &Wilkins; 2008.
5. Özmen V, Fidaner C, Aksaz E, Bayol Ü, Dede İ, Göker E,et al. Türkiye’de meme kanseri erken tanı ve tarama programlarının hazırlanması “Sağlık Bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu”. J Breast Health 2009; 5: 125 - 134.
6. Elektronik veritabanı: [http:// www.kanser.gov.tr](http://www.kanser.gov.tr) (Temmuz 2013)
7. Elektronikveritabanı: <http://www.wcrf.org> (Temmuz 2013)
8. Elektronikveritabanı: <http://www.who.int> (Temmuz 2013)
9. Meme Kanseri Abant Konensusu. Meme Kanseri Tanı-Tedavi-Takip. İstanbul: 2010.
10. Hamilton R. Genetics: Breast Cancer as an Exemplar. Nurs Clin North Am 2009; 44: 327 - 338.
11. Devita VTJr, Lawrence TS, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 8'th edition.

Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins (LWW) a Wolters Kluver; 2008.

12. Ewertz M, Duffy SW, Adam HO. Ege at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of studies from Nordic countries. *Int J Cancer* 1990; 4: 597- 603.
13. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breastcancer. *Lancet Oncol* 2001; 3: 133 - 140.
14. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO. Cohort studies of fat in take and the risk of breast cancer apooled analysis. *N Engl J Med* 1996; 334: 356 - 361.
15. Hislop TG, Band PR. Dietandhistologictypes of benign Breast disease defined by subsequent risk of breast cancer. *American Journal of Epidemiology* 1990; 2: 263 - 270.
16. American Cancer Society Surveillance Research. Breast Cancer Facts & Figures. Atlanta: 2011 - 2012.
17. Singletary SE. Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Ann Surg* 2003; 237: 474 – 482.
18. Güllüoğlu BM. Meme hastalıklarına yaklaşım “Meme kanseri için risk değerlendirmesi ve tarama stratejileri”. *Türk Aile Hek. Derg.* 2008; 12: 9 - 17.
19. Malhotra GK, Zhao X, Band HBV. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 955 - 960.
20. Aydın A, Topuz E. Meme Kanseri Tanı-Tedavi-Takip. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006.

21. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha R, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC genomics* 2006; 7: 1 - 15.
22. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 2010; 2: 60 – 64.
23. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Jason I, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12: 68.
24. Elektronik veritabanı: <http://ghr.nlm.nih.gov> (Eylül 2013)
25. Oliveira A, Ross JS, Fletcher JA. Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer, The Gatekeepers and the Caretakers. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 6 - 28.
26. M de Jong M, Nolte IM, J te Meerman G, Graaf van der W T A, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, et al. Genes other than *BRCA1* and *BRCA2* involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* 2002; 39: 225 – 242.
27. Bar-Sagi D. Minireview A Ras by Any Other Name. *Mol Cel Biol* 2001; 21: 1441 – 1443.
28. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer* 2011;2: 344 – 358.
29. Elektronik veritabanı: <http://www.genecards.org> (Aralık 2013).
30. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004; 9: 361 - 377.

31. Elektronik veritabanı: <http://www.ensemble.org> (Şubat 2014).
32. Erişim tarihi: <http://www.breastcancer.org> (Şubat 2014).
33. Venkitaraman A. Cancer Susceptibility and the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Cell* 2002; 108: 171 - 182.
34. Domchek SM, Simon MS, Burbidge LA Trost TJ, Deffenbaugh AM, Roa BB. Pathologic predictors of *BRCA1/BRCA2* mutations in African-American women with early-onset breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:10549.
35. Petrij B, et al. The *BRCA1* Exon 13 Duplication Screening Group, The exon 13 Duplication in the *BRCA1* gene is a founder mutation. *Am J Hum Genet* 2000; 1: 207 - 212.
36. Lei Zheng, Shang Li, Boyer TG, Lee WH. Lessons learned from *BRCA1* and *BRCA2*. *Oncogene* 2000;19: 6159 - 6175.
37. Elektronik veritabanı: <http://omim.org> (Şubat 2014).
38. Liu Y, West SC. Distinct functions of *BRCA1* and *BRCA2* in double-strand break repair. *Breast Cancer Res* 2002; 4: 9 - 13.
39. Rosen EM. *BRCA1* in the DNA damage response and at telomeres. *Front Genet* 2013; 4: 85.
40. Lixia M, Zhijian C, Chao S, Chaojiang G, Congyi Z. Alternative Splicing of Breast Cancer Associated Gene *BRCA1* from Breast Cancer Cell Line. *J Biochem Mol Biol* 2007; 40: 15 - 21.
41. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of *BRCA1* and *BRCA2* and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 2006; 25: 5864 – 5874.

42. Karami F, Mehdipour P. A Comprehensive Focus on Global Spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* Mutations in Breast Cancer. *BioMed Research International* 2013; 2013:
43. Wang B. *BRCA1* tumor suppressor network: focusing on its tail. *Cell & Biosci* 2012; 2: 6.
44. Greenberg RA. Cancer *BRCA1*, Everything But the RING?. *Science* 2011; 334: 459 - 460.
45. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, et al. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene *BRCA1*. *Genom Res* 1996; 6: 1029 - 1049.
46. Murphy CG, Moynahan ME. BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective. *The Cancer J* 2010; 16: 39 - 47.
47. Thai TH, Du F, Tsan JT, Jin Y, Phung A, Spillman MA, et al. Mutations in the *BRCA1*-associated RING domain (*BARD1*) gene in primary breast, ovarian and uterine cancers. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 195 – 202.
48. Hedenfalk IA, Ringner M, Trent JM, Borg A. Gene Expression in Inherited Breast Cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 1 - 34.
49. Abaji C, Cousineau I, Belmaaza A. *BRCA2* Regulates Homologous Recombination in Response to DNA Damage: Implications for Genome Stability and Carcinogenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 4117 - 4125.
50. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Nat Genet* 1996; 14: 185 – 187.

51. Bignell G, Micklem G, Stratton MR, Ashworth A, Wooster R. The BRC repeats are conserved in mammalian *BRCA2* proteins. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 53 – 58.
52. Carreira A, Kowalczykowski SC. Two classes of BRC repeats in *BRCA2* promote RAD51 nucleoprotein filament function by distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 10448 - 10453.
53. Galkin VE, Esashi F, Yu X, Yang S, West SC, Egelman EH. *BRCA2* BRC motifs bind RAD51–DNA filaments. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 8537 – 8542.
54. Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol and Neoplasia* 2004; 9: 221 – 236.
55. Zhang J, Fackenthal JD, Huo D, Zheng Y, Olopade OI. Searching for large genomic rearrangements of the *BRCA1* gene in a Nigerian population. *Breast Cancer Res* 2010; 124: 573 - 577.
56. Pisano M, Mezzolla V, Galante MM, Alemanno G, Manca C, Lorusso V, Malvasi A, Tinelli A. A new mutation of *BRCA2* gene in an Italian healthy woman with familial breast cancer history. *Fam Cancer* 2011; 10: 65 - 71.
57. Arvas M, Gezer A. Ailevi Over Kanseri, BRCA Genleri ve Over Kanseri Tarama Programları. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi* 2004; 7: 53 - 58.
58. Johannesdottir G, Gudmundsson J, Bergthorsson JT. High prevalence of the 999del5 mutation in icelandic breast and ovarian cancer patients. *Cancer Res* 1996; 56: 3663 - 3665.

59. Yazici H, Bitisik O, Akisik E. *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Turkish breast/ovarian families and young breast cancer patients. *Br J Cancer* 2000; 83: 737 -742.
60. Manguoglu AE, Luleci G, Ozcelik T, Colak T, Schayek H, Akaydin M, et al. Germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. *Hum Mutat* 2003; 21: 444 - 445.
61. Purcu DU, Karaca B, Kapkaç M, Özdemir N, Uzunoğlu S, Uslu R. High-Resolution Melting Analysis for Screening of Turkish Germline Mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Br J Cancer* 2000; 83: 737 – 742.
62. Hall MJ, Reid JE, Burbidge LA, Pruss D, Deffenbaugh AM, Frye C, et al. *BRCA1* and *BRCA2* mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer* 2009; 115: 2222 – 2233.
63. Surbone A. Social and ethical implications of BRCA testing. *Ann Oncol* 2011; 22: 60 – 66.
64. Kass NE, Medley AM, Natowicz MR. Access to health insurance: experiences and attitudes of those with genetic versus non-genetic medical conditions. *Am J Med Genet* 2007; 143: 707 – 717.
65. Godard B, Raeburn S, Pembrey M, Bobrow M, Farndon P, Ayme S. Genetic information and testing in insurance and employment: technical, social and ethical issues. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 123 – 142.
66. Toblas ES, Connor M, Ferguso-Smith M. *Tıbbi Genetiğin Esasları* (6. Baskı). İstanbul: Medikal Yayıncılık; 2014.

67. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 3245 - 3276.
68. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463 - 5467.
69. Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 221 - 226.
70. Yoo SM, Choi JH, Lee SY, Yoo NC. Applications of DNA Microarray in Disease Diagnostics. *J Microbiol Biotechnol* 2009; 19: 635 - 646.
71. Özgen GK. Mitokondriyal DNA mutasyonları. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, 2012
72. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni Nesil DNA Dizileme. *İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Derg* 2011; 1: 11 - 18.
73. Schneider GF, Dekker C. DNA sequencing with nanopores. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 4.
74. Chompret A. Hereditary Breast-Ovarian Cancer. *Orphanet Encyclopedia* 2004;9.
75. Seal S. Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK) Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 2006; 38: 1239 – 1241.
76. Walsh T, Lee MK, Casadei S, Thornton AM, Stray SM, Pennil C, et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *PNAS* 2010; 107: 12629 – 12633.

77. Schroeder C, Stutzmann F, Weber BHF. High-throughput resequencing in the diagnosis of *BRCA1/2* mutations using oligonucleotide resequencing microarrays. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122: 287 – 297.
78. Sevilla C, Moatti JP, Julian-Reynier C, Eisinger F, Stoppa-Lyonnet D, et al. Testing for *BRCA1* mutations: a cost-effectiveness analysis. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 599 – 606.
79. Wen W, Bernstein L, Lescallett J, Beazar- Barclay Y, Sullian- Halley J, White M, et al. Comparison of TP53 Mutations Identified by Oligonucleotide Microarray and Conventional DNA Sequence Analysis. *Cancer Res* 2000; 60: 2716 - 2722.
80. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 10.
81. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Method* 2008; 5: 1.
82. Leeneer KD, Hellemans J, Schrijver JD, Baetens M, Poppe B, Crieckinge WV, et al. Massive Parallel Amplicon Sequencing of the Breast Cancer Genes *BRCA1* and *BRCA2*: Opportunities, Challenges, and Limitations. *Hum Mutat* 2010; 1: 12.
83. Lindor NM, Friedman S, Guidugli L, Tavgigian S, Goldgar D, Couch F. Progress in clinical interpretation of DNA variants of uncertain significance in *BRCA1* and *BRCA2*. *Mayo Clinic Database* 2012.
84. Elektronik veritabanı: www.ensembl.org (18.04.2014).

85. Yeo ZX, Chan M, Yap YS, Ang P, Rozen S, Ann Siew Gek Lee ASG. Improving Indel Detection Specificity of the Ion Torrent PGM Benchtop Sequencer. PLOS ONE 2012; 7: 9.
86. Feliubadalo L, Lopez-Doriga A, Castellsague E, Valle J, Mene'ndez M, Tornero E, et al. Next-generation sequencing meets genetic diagnostics: development of a comprehensive workflow for the analysis of *BRCA1* and *BRCA2* genes. Eur J Hum Genet 2012; 19: 270.

8. ÖZET

Bu tez çalışmasında, ailesel meme kanserinden sorumlu olan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin mutasyonlarının gösterilmesinde altın standart genetik tanı yöntemi olan konvansiyonel dizi analizi yönteminin sonuçları ile, mikroarray ile yeniden dizileme ve yeni nesil dizileme (next generation sequencing) yöntemlerinin sonuçları karşılaştırılmıştır. Çalışmaya, konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile *BRCA1* geninde mutasyon saptanmış altı hasta ile, *BRCA2* geninde mutasyon saptanmış bir hasta, MLPA yöntemiyle *BRCA1* geninde mutasyon saptanmış bir hasta ve *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde mutasyon saptanmamış iki kontrol örneği dahil edilmiştir. Bu hasta ve kontrol örneklerine önce, mikroarray ile yeniden dizileme yöntemiyle analiz yapılmış ancak hastaların hiçbirinde önceden saptanmış olan mutasyonlar tespit edilememiştir. Bu olgulardan dördüne yeni nesil dizileme yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemle, hastaların tümünde daha önce saptanmış olan mutasyonlar tespit edilmiştir. Sonuç olarak; *BRCA1/BRCA2* genlerindeki mutasyonların araştırılmasında, next generation sequencing yönteminin, konvansiyonel dizi analizi yöntemi gibi güvenilir bir yöntem olduğu, ancak homopolimer dizilerinin neden olabildiği yanlış pozitif sonuçlara karşı bulunan mutasyonların konvansiyonel bir yöntemle doğrulanması gerektiği görüşüne varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Ailesel meme kanseri, *BRCA1*, *BRCA2*, mutasyon, mikroarray, yeni nesil dizileme

9. SUMMARY

In this thesis, we compared the “gold standard” conventional DNA sequencing with microarray re-sequencing and next generation sequencing methods in terms of accuracy for detecting *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in familial breast cancer. Totally ten patients suffering from breast cancer; seven with *BRCA1* mutations and one with *BRCA2* mutation (confirmed by using conventional DNA sequencing and MLPA technique) and two with no mutations were enrolled in this study. In the first step, both of them were resequenced by the usage of microarray technique and no mutation was found. Secondly via the next generation sequencing technique the confirmation of the previously known mutations of the four patients were performed. The present study confirmed that, the next generation sequencing is a reliable technique similar with conventional DNA sequencing for detecting the *BRCA1/BRCA2* gene mutations regardless from the disadvantages of the homopolymer sequences which may cause false positive result. As a conclusion next generation sequencing can be use for screening these mutation by the help of the confirmation of conventional DNA sequencing.

Key words: Familial breast cancer, *BRCA1*, *BRCA2*, mutation, microarray, next generation sequencing

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı : Taha

Soyadı : BAHSİ

Doğum Tarihi ve Yeri : 10.09.1979, Niğde

Eğitimi :

210-2104 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD’de Araş. Gör. Dr.

2009-2010 Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD’de Araş. Gör.

1998-2005 Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi

1994-1997 Aksaray Fen Lisesi

1990-1994 Niğde Anadolu Lisesi

1987-1990 Niğde Hazımtepeyan İlkokulu

1986-1987 Niğde Dumlupınar İlkokulu

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel kuruluşlar: Tıbbi Genetik Derneği

Bilimsel Etkinlikleri

Tamamlanmış Projeler:

2012-2014 ‘‘BRCA1 ve BRCA2 Mutasyonlarının Araştırılmasında Yeni Nesil Moleküler Yöntem Sonuçlarının Konvansiyonel Dizi Analizi Yöntemi ile Karşılaştırılması’’ Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi. Araştırmacı

Ulusal bilimsel toplantılarda bildiri kitaplarında basılan sözlü sunumlar:

1. Bahsi T., Karaer K., Percin E.F. Three Cases with Related Cardiofaciocutaneuse Syndromes. V. Dysmorphology Days, Taksim, 2011, İstanbul.
2. Bahsi T, Percin E.F. A case with KBG Syndrome. VI. Dysmorphology Days, Galata, 2013, İstanbul.

Katıldığı Kongre-Sempozyum-Seminerler:

1. Erciyes Klinik Günleri, 2010, Kayseri
2. 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 2010, İstanbul
3. V. Dysmorphology Days, Taksim, 2011, İstanbul
4. VI. Dysmorphology Days, Galata, 2013, İstanbul
5. Ankara Genetik Günleri, Gazi Üniversitesi, 2013, Ankara
6. Ankara Genetik Günleri, Başkent Üniversitesi, 2013, Ankara

Katıldığı Kurslar:

Fetal-Prenatal Tanı Kursu, 2010, Ankara

11. EKLER

EK 1.



GAZİ ÜNİVERSİTESİ (GİRİŞİMSSEL OLMAYAN) KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Meme kanserli olgularda BRCA1 ve BRCA2 genlerinin Mikroarray yöntemi ile tekrar dizilenmesi ve sonuçların Konvansiyonel Dizi Analizi yöntemi sonuçları ile karşılaştırılması		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.E.Ferda Perçin		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
		DİĞER ☐	☐ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL ☒ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL OLMAYAN 6.Tanımlamaya yönelik olarak genetik materyalde yapılacak araştırmalar(gen tedavisi klinik araştırmaları dışında kalan)	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	SIGORTA	☐		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 221	Toplantı tarihi: 13.06.2012
	Üniversitemiz Tıp Fakültesinde Prof.Dr.E.Ferda Perçin'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, <i>Uzmanlık Tezi olan</i> klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve "bütçesi dışında" uygun olduğuna G.Ü.T.F. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI ÜNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Alerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Füsun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F Anest.ve Rea. A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F (Ecz.Mes.Bil.) Farmasötik Kimya A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Öznur L.BOYUNAGA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun-Boğaz Hast. A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Huk.Müş.Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

EK 2.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU									
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu							
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara							
	TELEFON	0312 202 69 58							
	FAKS	0312 202 46 73							
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr							
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Meme kanserli olgularda BRCA1 ve BRCA2 genlerinin Mikroarray yöntemi ile tekrar dizilenmesi ve sonuçların Konvansiyonel Dizi Analizi yöntemi sonuçları ile karşılaştırılması							
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.E.Ferda PERÇİN							
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI/UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Tıbbi Genetik AD. / G.Ü.T.F.							
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)								
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Tanımlama yönelik olarak genetik materyalde yapılacak araştırmalar (gen tedavisi klinik araştırmaları dışında kalan)- Uzmanlık Tezi							
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili					
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	24.03.2014	0.3	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐			
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	24.03.2014	0.3	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐			
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı				Açıklama				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒							
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐							
	DİĞER	☐							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:	154							
	Toplantı tarihi:	24.03.2014							
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım, yöntemleri dikkate alınarak 13.06.2012 tarih ve 221 sayılı ile onaylanmıştır. Çalışmanın konu başlığının araştırma içeriğini daha iyi yansıtaacağı belirtilerek "BRCA1 ve BRCA2 Mutasyonlarının Araştırılmasında Yeni Nesil Moleküler Yöntem Sonuçlarının Konvansiyonel Dizi Analizi Yöntemi ile Karşılaştırılması" (versiyon no:3) olarak değiştirilmesinin uygun olduğuna, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Ekler (İncelenen evraklar) 1- Etik Kurul Düzeltme/Değişiklik Formu (24.03.2014 tarih ve imzalı) 2- Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'na konu ile ilgili dilekçesi ve yeniden düzenlenmiş formlar (Başvuru Formu, BGOF - ver no:3) (24.03.2014 tarih ve imzalı)									
GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik (13.04.2013), İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI/ ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Canan ULUOĞLU							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza	
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.Ü.T.F.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	