

T.C
İSTANBUL UNİVERSİTESİ
SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK ANABİLİMDALI

DANIŞMAN

Doç.Dr.A.NUR SAYHAN

107605

AİLESEL MEME KANSERLİ OLGULARDA BRCA1 GENİNİN
MUTASYONLARININ SAPTANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog METİN BUDAK

107605

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANİZEYON MERKEZİ

İSTANBUL - 2001

İçindekiler

Teşekkür

1.Giriş ve Amaç.....	1
2.Genel Bilgiler.....	3
2.1.Kanser Nedenleri.....	4
2.1.1.Çevresel Faktörler.....	4
2.1.1.1.Kimyasal Karsinogenler.....	4
2.1.1.2.Fiziksel Karsinogenler.....	4
2.1.1.3.Kalıtsal ve Genetik Faktörler.....	4
2.1.1.4.Proto-onkogenler ve Onkogenler.....	5
2.1.1.4.1.Onkogen Aktivasyon Mekanizmaları.....	6
2.1.1.5.Tümör Baskılayıcı Genler.....	7
2.1.1.5.1.p53 geni.....	10
2.1.1.5.2.BRCA1 geni.....	11
2.1.1.5.2.1.Mutasyon Dağılımı.....	11
2.1.1.5.2.2.BRCA1 proteini ve Fonksiyonu.....	11
2.1.1.5.3.BRCA2 geni.....	12
2.2.Meme Kanseri.....	14
2.2.1.Meme Kanseri ve Risk Faktörleri.....	14
2.2.1.2.Hormonal Risk Faktörleri.....	15
2.2.1.2.Hormonal Olmayan Risk Faktörleri.....	15
2.2.1.3.Hormonal Olmayan Diğer Etkenler.....	16
3.Gereç ve Yöntem	
3.1.Gereçler.....	17
3.1.1.Materyal.....	17
3.1.2.Kimyasal Malzemeler.....	17
3.1.3.Çalışmada Kullanılan	18
3.1.4.Çözeltiler.....	18
3.1.4.1.Agoroz Gel Elektorforez Çözeltileri.....	19
3.1.4.2.DNA izolasyonunda kullanılan Çözeltiler.....	19
3.1.4.3.Denatürleyici Protein Gel Elektroforez Çözeltileri.....	20
3.2.Yöntemler.....	23
3.2.1.DNA izolasyonu.....	23
3.2.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	24

3.2.3.İn – vitro Protein Sentezi.....	26
3.2.3.1.PTT'nin Prensipleri.....	26
3.2.4. Transkripsiyon /Translasyon reaksiyonu;Uygulanan genel protokol.....	28
3.2.5.İn – vitro protein sentezi örneklerinin gel'e yüklenmesi.....	29
3.2.5.1.Elektroforetik Transfer.....	29
3.2.5.2.Kolorimetrik Belirleme.....	30
4.Bulgular.....	31
5.Tartışma.....	36
6.Özet.....	38
7.İngilizce Özet.....	39
8.Kaynaklar.....	40
Özgeçmiş	



TEŞEKKÜR

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde her türlü olanağı sağlayan Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü Başkanı **Prof. Dr. Turgut Uluntin'e** Genetik Ana Bilimdalı Başkanı **Doç. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu'na** ve tezimin gerçekleşmesinde bana en büyük desteği veren ve akademik kişiliğimin gelimesinde en büyük pay sahibi olan hocam ve aynı zamanda danışmanım olan değerli ve sevgili hocam **Doç. Dr. Nur Sayhan'a**

Deneylerim sırasında ikinci bir kişiye ihtiyacım olduğunda her zaman yanımda olan **Araş.gör. Asiye Kasapoğlu'na**

Hasta teminini sağlayan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji **Doktor ve Çalışanlarına**

Tezimi yazarken ne zaman bilgisayarımla başım derde girse, bilgisayarlar hakkındaki engin bilgisiyle beni kurtaran **Selim Yılmaz'a**

İlk yurt dışı kongre deneyimim için her türlü maddi olanağı sağlayan **İş Adamı İsmet Acar ve Artvinliler Hizmet Vakfı ve çalışanlarına**

Ve tüm hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen **Sevgili Aileme teşekkürü bir borç bilirim**

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser terimi tek bir hastalık adı olmayıp temel nedeni, kontrolsüz büyüme olan habis tümörlerin tümüne verilen addır ve kontrolsüz hücre çoğalması sonucu bir kitle haline gelen tümör kendini saran komşu hücrelere de saldırarak hastalığın ileriki evrelerinde tüm vücudu sarar(metastaz)(68)

Kanser, önemli bir sağlık problemlili olmasına karşın çocukluk döneminde sık görülen bir hastalık türü değildir(68). Buna karşılık, yapılan istatistikler kanserin her üç erişkinden birini etkilediğini, tüm ölümlerin % 20 kadarına neden olduğunu ve gelişmiş ülkelerde tedavi giderlerinin yaklaşık % 10'luk kısmını alıp götürdüğünü göstermektedir(68).

Kanserin genetik ve çevresel faktörlerin etkisi altında geliştiği bilinmekle birlikte bazı kanser türlerinin oluşmasında çevresel faktörler daha öne çıkmaktadır(29,32,68) Fakat hangi faktör etkili olursa olsun tüm kanser türlerinin somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluştuğu ve bu mutasyonların da bir seri genin ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir(68)

Kanser oluşumunda yer aldığı bilinen iki gen grubu bulunmaktadır. 1)Tümör baskılayıcı genler 2)proto-onkogenler(9,32,68) Etiyolojisinde tümör baskılayıcı genlerin yer aldığı bilinen kanser türlerinden biri de meme kanseridir.(1,2) Bu tümör baskılayıcı genler BRCA1 ve BRCA2 genleridir.(3,4,32) Bu iki genin özellikle ailesel meme kanserlerinin gelişiminde etkin olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (12,13,17).

Kalıtsal kanserlerde yer alan genlerdeki 1.mutasyon ailesel olarak kalıtılırken 2. mutasyon doğumdan sonraki dönemlerde sınırlı sayıdaki somatik hücrede meydana gelir. Bu tür kanserler ailesel olmayan kanserlere göre çok daha erken dönemde ortaya çıkar(30,63,66) Yapılan araştırmalarla iki genin; özellikle ailesel meme kanserlerinin gelişiminde etkin olduğunu göstermiştir.(12, 13, 17)

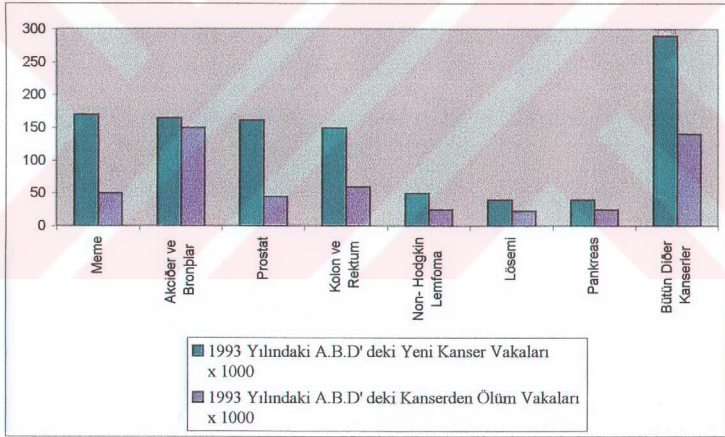
Çalışmanın amacı; ailesinde 1 den fazla meme veya over kanseri olan ve 35 yaş altında meme kanseri teşhisi konulan kadınlarda BRCA1 genindeki değişimleri belirlemek amacıyla PTT yöntemini rutinde kullanıma uyarlamaktır. Böylece meme kanseri riski taşıyan kişilerin daha önceden belirlenip gözlem altında tutulmalarını sağlamak amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmada 1998 – 1999 yılları arasında İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji polikliniğine başvuran 35-40 yaş altı , ailesinde birden fazla meme veya over kanseri olan 8 hasta ve yakınlarının, BRCA1 geni PTT testi ile incelenmiştir.

2-GENEL BİLGİLER

Kanser , kısaca kontrolsüz hücre büyümesi ve gelişmesi olarak adlandırılan , karmaşık bir seri hücresel mekanizmanın normalden farklı çalışması sonucu ortaya çıkan bir olgudur (9,32,68). Kanserın somatik hücrelerdeki mutasyonlar sonucu oluştuğu ve bu mutasyonların da bir seri genin ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir(68). Her doku grubunda yaşa , cinsiyete ve çevre faktörlerine bağlı olarak kanser gelişebilmektedir(30).

ABD’de 1991 – 1992 yılları arasında kadınlarda kansere bağlı ölümler araştırıldığında 15 yaş altı löseminin , 55 – 74 yaşları arası akciğer kanserinin , 40 – 44 yaşları arasında ise meme kanserinin birinci sırayı aldığı gösterilmiştir (32). Kanserın ABD de 1995 yılına ait yeni vaka ve ölüm oranları aşağıda verilmiştir(9)Bu konuda Türkiye’de yapılmış tam istatistiksel analiz henüz bulunmamaktadır.



Şekil.1.1993’ yılındaki ABD’de yeni kanser vakaları ve ölüm oranları(14)

2.1.KANSER NEDENLERİ

Son yıllarda kanserin etiyolojisine ait önemli bir çok bilgi elde edilmekle birlikte kanser oluşması yani normal bir hücrenin kontrolden çıkarak aşırı biçimde çoğalmasına yol açan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır(31).

Kanser gelişiminde bir çok çevresel ve kalıtsal faktörler rol oynamaktadır. Çevresel faktörler arasında bazı kimyasal ajanlar (nikotin), beslenme, radyasyon, virüsler, yaşanan çevre koşulları ve yaşam biçimi yer almaktadır(31,32).

2.1.1.Çevresel Faktörler;

2.1.1.1Kimyasal Karsinojenler

Bir çok karsinojen madde için eşik değer söz konusudur, bu eşik değeri aşmayan miktarlar zararsızdır. ABD ve Avrupada görülen kanserlerin üçte biri sigara ve öteki tütün ürünlerinin kullanımına bağlı olarak gelişen kanserlerdir(9,31,32). Çalışma koşulları ve meslekle ilgili bazı kimyasal maddeler de kanser oluşumuna yol açan diğer çevresel etkenler arasında yer almaktadır(9,30). Özellikle asbest ve nikotin gibi kimyasal ajanların kanser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (9,32,68).

2.1.1.2Fiziksel Karsinojenler

İyonize Radyasyon. İlkel aygıtların kullanıldığı ve korunma yöntemlerinin iyi bilinmediği dönemlerde radyologların ellerinde deri kanserleri sık görülmekteydi. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda radyasyon etkisiyle kemik, tiroid, akciğer, meme kanseri ile lösemi ve lenfoma geliştiği gösterilmiştir.(31)

Ultraviyole Işınları(U.V).U.V ışınlarının cilt kanserleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında bazal hücreli cilt kanseri, squamous (çok katlı yassı epitel)cilt kanseri ve melanoma gibi cilt kanserleri sayılabilir.(9,28).

2.1.1.3.Kalıtsal ve Genetik Faktörler

Kanser genetik bir hastalık olmasına karşılık çok az kanser vakası kalıtsal özellik gösterir(32). Bütün kanser türleri içinde kalıtsal kanserlerin oranı % 1 den daha azdır(9). Kalıtsal kanser vakalarının görüldüğü ailelerde kanser hastalığı normal popülasyona göre daha sık ortaya çıkar. Kanser kalıtsal geçiş gösterdiği ailelerde ; kanser geninin

anne yada babadan çocuğa geçme olasılığı % 50 dir(68). Bu tür ailelerdeki bireylerde kanser vakası genel popülasyonda görülen yaşlardan daha erken yaşta ortaya çıkar. Ailesel kanser vakalarının en çok görüldüğü dokular kolon, endometrium, over ve memedir. (32, 62)

Kanser oluşumunda yer alan genler;

2.1.1.4.Proto-onkogenler ve Onkogenler

Hücre büyüme ve farklılaşmasını düzenleyen proto-onkogenlerin normal hücre fizyolojisinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir(30). Bir proto - onkogen , mutasyon ya da dıştan gelen uyarının değişmesi sonucu farklılaşır yada normalden daha fazla ifade edilmeye başlarsa; bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyüme ve dolayısıyla habis oluşumlara neden olur . Proto – onkogenlerin mutasyona uğraması ile bunlar onkogen adı verilen ve sürekli hücre bölünmesini uyaran genlere dönüşmektedirler(9,68).

Proto – onkogenler ilk kez fare, kedi ve maymunlarda kansere neden olan retrovirslerin moleküler analizleri sonucu bulunmuşlardır(68). Proto – onkogenler, protein ürünlerinin biyokimyasal özelliklerine göre 4 grupta toplanabilir.

a)Büyüme Faktörleri: Büyüme faktörleri, hücre dışına salgılanan ve hedef hücrede farklılaşmayı uyaran polipeptid yapıdaki sinyal molekülleridir. Hedef hücreyi, hücre yüzeyinde bulunan özel reseptörler ile tanıyarak hücrede farklılaşmayı uyarırlar. En iyi bilinen büyüme faktörü platelet- derived büyüme faktörüdür(PDGF)(9).

b)Büyüme Faktör reseptörleri: Bazı viral onkogenlerin farklılaşmış şekilleri, tirozinkinaz aktivitesine sahip normal büyüme faktörlerini üretirler. Bu yüzden normal hücelere bağlanarak hücre bölünmesini uyarıp kanser gelişimine sebep olurlar. En çok bilinen büyüme faktörü reseptörleri erb B, erb B-2 ve fms'dir(9)

c)Transkripsiyon Faktörleri: Bir çok genin kodladığı çekirdek proteinler transkripsiyon faktörlerini oluştururlar. Transkripsiyonel kontrol bu proteinlerin zel

DNA dizileri yada DNA motiflerine bağlanması ile yapılır. Transkripsiyon faktörleri hedef geni pozitif yada negatif kontrol ile genin ekspresyonunu sağlarlar(9)

d)Programlanmış Hücre Ölümü kontrolleri:

Normal doku yapısı; farklılaşan hücreler ve ölen hücreler arasındaki denge ile sağlanır. Programlanmış hücre ölümü normal embriyogenez ve organ gelişiminde çok önemlidir. Kansere hücrelerinde programlanmış hücre ölümü mekanizmasının kaybolduğu gösterilmiştir. Bu mekanizma bcl 2 proto – onkogeni tarafından kontrol edilmektedir. Bu genin kromozomal translokasyonlar sonucu özellikle lenfomalarda aktive olabilmektedir.(9,22).

2.1.1.4.1.Onkogen aktivasyon mekanizmaları: Onkogenler üç yolla aktive olabilirler.1-Mutasyonlar 2-Gen amplifikasyonu 3-Kromozomal yeniden düzenlenmeler.

1-Mutasyonlar: Nokta mutasyonları, çerçeve kayması gibi mutasyonlar sonucu aktive olan onkogenlerin kodladığı proteinlerin yapısında değişiklikler meydana gelir. Bunlar sonucunda proteinin kritik bağlanma bölgelerinde değişiklik oluşarak protein bağlanma özelliğini kaybeder ve görevini yerine getiremeyerek kanser gelişimine neden olurlar.(9)

2-Gen Amplifikasyonu: Gen amplifikasyonu, bir genin hücre genomundaki kopya sayısının artmasıyla meydana gelmektedir. Gen kopya sayısının artması özellikle karyotip duplikasyonları ile meydana gelir. Bu oluşumlar sadece tümör dokularında görülmüştür.(9)

3-Kromozmal yeniden düzenlenmeler: Kromozomal düzenlenmeler daha çok hematolojik habis tümörlerde meydana gelen değişimlerdir. Kromozomal translokasyonlar, inversiyonlar en çok görülen düzenlenmelerdir.

İnsanda proto - onkogenlerin kromozomal yeniden düzenlenmelerine en iyi örnek (9;22) translokasyonudur . Kronik miyeloid lösemili (KML) hastaların yaklaşık %95'inde , kemik iliği hücrelerinde, 9 ile 22 nolu kromozomlar arasında bir resiprokal translokasyon meydana gelir. Bu translokasyon sonucu, normal 22 numaralı kromozomdan daha küçük olan Philadelphia kromozomu oluşur(9,24,68).

Bu translokasyon sonucunda abl proto-onkogeni normal yeri olan 9q34.1 bölgesinden 22 nolu kromozoma aktarılır. abl geni yeni yerinde ("Breakpoint cluster region") bcr adı verilen özel bir dizi ile birleşir . Bu birleşme sonucunda oluşan melez

gen , kemik iliği hücrelerinde tümör oluşumundan sorumlu olduğuna inanılan yeni bir proteinin sentezlenmesine neden olur. Bu oluşan yeni protein tirozinaz aktivitesine sahiptir ve hücre bölünmesini aktive ederek tümör oluşturmaktadır(9,24,68)

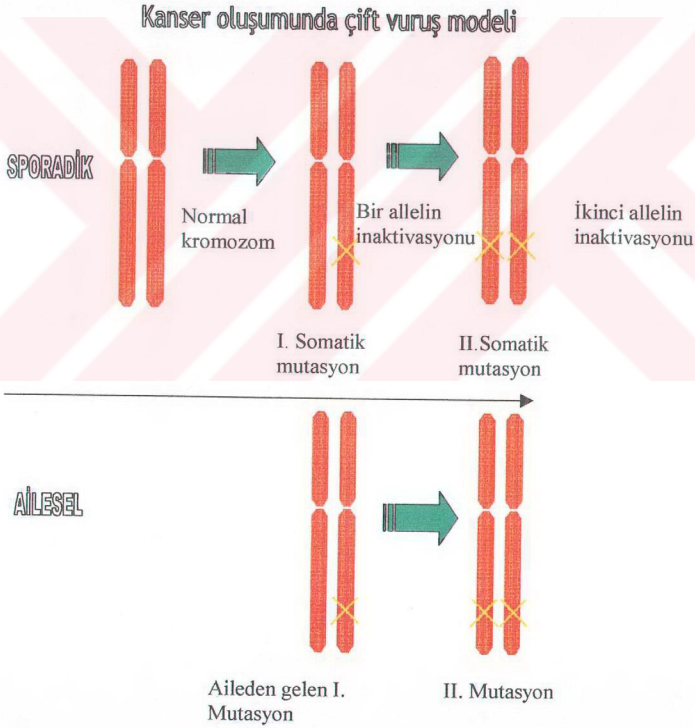
PROTO- ONKOGEN	NEOPLAZMA	LEZYON
abl	Kronik Miyoloid Lösemi	Translokasyon
erbB	Yassı Epitel Hücreli Kanseri	Amplifikasyon
neu	Memenin Adeno Karsinomu, Ovaryum ve Mide Kanseri	Amplifikasyon
gip	Over ve Sürrenal Kanseri	Nokta Mutasyonu
gsp	Tiroid Kanseri ve Hipofiz Bezi Adenomu	Nokta Mutasyonu
myc	Burkitt Lenfoması, Akciğer, Meme ve Over Kanseri	Translokasyon, Amplifikasyon
L-myc	Akciğer Kanseri	Amplifikasyon
N-myc	Nöroblastoma, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri, Kolon ve Akciğer Kanseri	Amplifikasyon
H-ras	Pankreas Kanseri ve Melanon	Nokta Mutasyonu
K-ras	Akut Miyologenüs ve Lenfoblastik Lösemi	Nokta Mutasyonu

Şekil 2. bazı proto-onkogenler ve sebep olduğu tümörler(14)

2.1.1.5. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler ilk kez çok nadir görülen kalıtsal kanser türlerinden biri olan retinoblastom üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bulunmuştur.(68) Retinoblastoma çocukluk dönemi göz kanserleri içerisinde en sık rastlanan kanser türü olup olguların % 20-30 unda bilateral olarak ortaya çıkar.(9,68) Bilateral olguların

tamamı ile unilateral olguların % 15'i otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Bu hastalıktan sorumlu gen 13 nolu kromozomun uzun kolunun proksimaline yerleşmiş bulunan Rb1 genidir(9,68). Kromozomal değişimler yada nokta mutasyonları sonucu tümör dokusundaki hücrelerde bu gene ilişkin fonksiyonel protein ya bulunmamaktadır yada işlevini yapamamaktadır(9,68). Bu tür olgularda kalıtsal mutasyon ; gen çiftlerinin yalnızca birinde bulunur ve bundan dolayı da heterozigot durumdadır. Mutant geni taşıyan kişide tümör gelişebilmesi için retina hücresindeki mutant genin normal eşinde de yeni bir mutasyonun oluşması gerekmektedir(9). İkinci bir mutasyon sonucu sağlam olan diğer allelinde değişime uğraması yada kaybolmasıyla tümör oluşmaktadır buna **heterozigotluk kaybı** denir.(9).(şekil 1)



Şekil 3; Kanser oluşum modeli

Kalıtsal retinoblastoma kanserlerinde ilk mutasyon kişide ya germ – line mutasyonlar sonucu meydana gelmiştir yada ebeveynlerden birinden kalıtılmıştır. Bu geni taşıyan kişilerde retinoblastoma çok erken yaşlarda meydana gelir.(68)

Kromozom 13 için heterozigotluk kaybı gösteren pek çok tümör tipi ile diğer tümör baskılayıcı genlerin lokalizasyonuna ilişkin çalışmalar sonucunda 20 nin üzerinde tümör baskılayıcı gen bölgesi saptanmış olup bunlardan bazıları da (p 53 , retinoblastoma ,BRCA 1,BRCA 2) klonlanmıştır(9,13,32,68).

Gen	Kanser Tipi	Ürün Yerleşimi	Fonksiyonu	Kalıtsal Sendrom
APC	Kolon Kanseri	Sitoplazma	?	Ailesel adenomatoz poliplozis
DCC	Kolon Kanseri	Hücre zarı	Hücre adezyon molekülü	—
NF1	Nörofibromas	Sitoplazma	GTPaz aktivatörü	Nörofibromatozis Tip 1
NF2	Schwannomas ve Meningiom	Hücre Zarı	Hücre zarı	Nörofibromatozis Tip 2
p53	Kolon kanseri ve diğer pek çok kanser	Çekirdek	Transkripsiyon faktörü	Li-Fraumeni sendromu
RB	Retinoblastoma	Çekirdek	Transkripsiyon Faktörü	Retinoblastoma
RET	Tiroid kanseri Feokromastoma	Hücre zarı	Tirozin kinaz reseptörü	Multiple endokrin neoplazma Tip 2
VHL	Böbrek kanseri	Hücre zarı	?	Von Hippel- Lindau hastalığı
WT-1	Nefroblastoma	Çekirdek	Transkripsiyon Faktörü	Wilms tümörü
BRCA1	Meme kanseri	Meme dokusu	?	Ailesel meme kanserleri
BRCA2	Meme kanseri	Meme dokusu epiteli	?	Ailesel meme kanserleri

Şekil 4: Bazı tümör baskılayıcı genler ve neden oldukları kanser türleri(14)

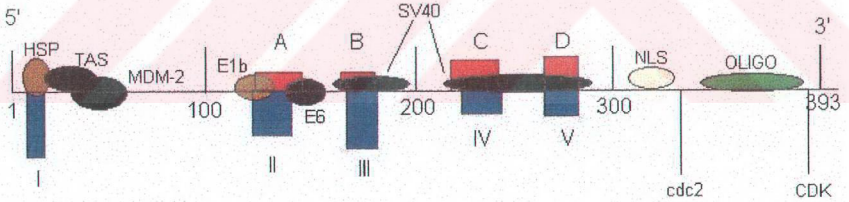
2.1.1.5.1.p53 geni

p53 geni, insan 17. kromozomunun kısa kolunun 13.bandına yerleşmiştir.Yaklaşık 20 kb uzunluğunda olan bu gen; 2.8 kb'lık bir mRNA kodlar ve ürünü 53 kD'luk 393 aminoasitlik bir çekirdek fosfoproteinidir. (10)

Nükleotid ve aminoasit dizi analizleri göstermiştirki ; P53 geni evolüsyon sürecinde neopustan insana kadar korunmuş 5 bölge içermektedir. Bu bölge 1,4,5,7 ve 8 nolu eksonları kapsar. Bu korunmuş bölgelerin p53 yaban tip protein için temel bölgeler olduğu düşünülmektedir. p53 geninin özellikle DNA bağlama bölgesi , 2 adet SV40 tümör

antijen bağlanma (T-ag) , bir nükleer lokalizasyon sinyali ve birden fazla fosforilasyon bölgesi içerir.(şekil 2) (9)

p53 proteinini, hücre döngüsünü G1 fazında durdurup özel dizilere ve transkripsiyon faktörlerine bağlanarak, gen ekspresyonunu pozitif yada negatif yönde kontrol eder.(8) Normal p53 proteinini hücre döngüsünü durdurarak, ortamda uygun farklılaşma yada proliferasyon faktörlerinin olmadığı durumlarda hücreyi programlanmış hücre ölümüne götürür(63).



Şekil 5:p53 geninin şematik yapısı; TAS:Transkripsiyon aktivasyon bölgesi , Protein bağlanma bölgesi (HSP) ,SV40 geni T-antijen bölgesi ,adenovirüs E1b ve papilloma virüs E6 bağlanma bölgesi, Hücresel Mdm2 bağlama bölgesi ,nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ,oligomerizasyon bölgesi (OLİGO) ve fosforilasyon bölgesi (cdc2 ve CDK). Evolüsyonda korunmuş 5 bölge I ,II, III,IV ve V ile ve hot spot bölgeler da A, B, C, D harfleri ile gösterilmiştir.

2.1.1.5.2.BRCA 1 geni

BRCA 1 geninin kromozomal yerleşimi (Breast cancer susceptibility gene – meme kanserine yatkınlık geni) ilk olarak 1990 yılında tanımlanmış ve 1994 yılında da klonlanmıştır(5,7).

BRCA1 geni 17 nolu kromozomun q12-21 bölgesine yerleşmiş 4cM' lık yer kaplayan, yaklaşık 100 000 baz çifti içeren(20), 24 ekzona sahip ;tümör baskılayıcı protein kodlayan bir gendir. BRCA1 geninin çok büyük olan 11.ekzonu tüm genin %61'ini oluşturmaktadır(28). BRCA1 geni kanser oluşumunu negatif yönde etkileyen, DNA'ya bağlanma özelliği olan tümör – baskılayıcı bir protein kodlar(29). Son zamanlardaki çalışmalar BRCA1 geninin ürününün; amino ucunda bir çinko bağlama bölgesi bulunan bir zing – finger protein olduğu gösterilmiştir.(29)

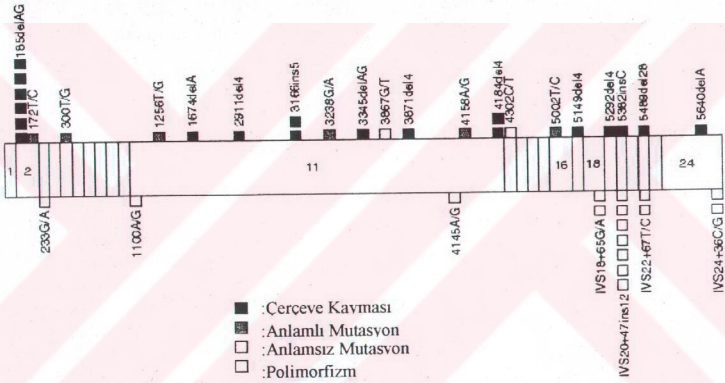
2.1.1.5.2.1.Mutasyon dağılımı:

Meme tümörleri 17q'daki BRCA1 geni yaban tip allelinin her ikisinde kaybolmasıyla meydana gelmektedir (29)

500 farklı tipi bulunan ve BRCA 1 geni büyük bir gen olduğu için mutasyon oluşma sıklığı oldukça yüksek olan bir gendir.(28,29). Bu gen üzerinde klinik olarak önemli birkaç mutasyon bulunmuştur. Bu mutasyonların yaklaşık % 90'ını çerçeve kayması yada anlamsız mutasyonlar iken (28,41) geri kalanı stop kodonunda değişiklik meydana getirerek translasyon aşamasında olgunlaşmamış protein yapılmasına neden olan mutasyonlardır.(22,28,29,32,41). BRCA 1 mutasyonlarını saptamak suretiyle ailesel kanser riskini belirleyebilecek bir testin geliştirilebilmesi için çalışmalar genin klonlanmasından bu yana sürdürülmektedir. Ancak gen üzerinde tespit edilen birçok mutasyonun genin tüm eksonlarına yayılmış olması, tek bir DNA testinin geliştirilebilmesini zorlaştırmaktadır(32). (Şekil 2). Bu mutasyonların bir bölümü normalden daha kısa bir protein oluşumuna neden olduğu için, bu oluşan kısa yeni proteinin tespitini sağlayan 'Protein Truncation Test'(PTT) leri geliştirilmiştir.(20,32)

BRCA1 geninde görülen en sık görülen ikinci grup bazı özel mutasyonlar 185delAG ve 5382insG mutasyonlarıdır. Bunlar BRCA1 geninde görülen bütün mutasyonların %10 nunu oluşturmaktadır. Bu iki mutasyon Ashkenazi ve Ashkenazi olmayan yahudilerde yaklaşık %10 sıklıkta görülmektedir. Bu mutasyonların aynı guruptaki

taşıyıcılık oranı ise %1 dir. 185delAG ve 5382insG mutasyonları Faslı ve yahudi olmayan ailelerde de bulunduğu gösterilmiştir. BRCA1'in 185. pozisyonundaki AG dizisindeki delesyonların çok fazla görülmesi bu bölgenin 'Hotspot' bölge olarak adlandırılmasına neden olmuştur. Tüm kadınlarda germ - line mutasyon araştırmalarında 185delAG taşıyıcılarında 40 yaşından önce meme kanseri görülme sıklığı %20 olarak bulunmuştur.(29) 5832insC mutasyonu en çok Ruslarda ve Avrupa kökenli yahudilerde görülürken israil yahudilerinde oldukça düşüktür(29) Rus toplumunda en çok görülen mutasyon ise 4153delAA' dır. Bu mutasyon sadece Rus toplumuna özgü olup diğer toplumlarda görülmemektedir. Türkiye'de bu gende görülen mutasyonlarla ilgili henüz bir çalışma bulunmamaktadır. (29) (şekil 3)



Şekil 6; BRCA1 genindeki mutasyon dağılımı

2.1.1.5.2.2. BRCA1'in fonksiyonu ;

BRCA 1 proteini 1863' aminoasitlik bir ring-finger proteindir(45,46,47). BRCA 1 embriyonik gelişme ve ergenlik gelişim sürecinde gelişen organların farklılaşan epitel hücrelerinde yapılır. Kanser olmayan kadınlarda hamilelik esnasında meme epitel hücrelerinde BRCA 1'in mRNA seviyesinde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. İnsanda BRCA 1 ekspresyonu östrojen tarafından uyarılmakta ve doğum sonrasında

azalmaktadır(38,48). BRCA 1 in ekspresyonunun baskılanması, hem normal hücrelerde hemde habis meme epitel hücrelerinde büyümeyi arttırmaktadır.(48).

BRCA1 geni izole edildiğinden bu yana fonksiyonlarının transkripsiyonda rol oynadığı, hücre döngüsünü kontrol ettiği ve DNA onarım mekanizmalarıyla ilişkili bir gen olduğu düşünülmüştür. Temel transkripsiyonel mekanizmalarla (RNA polimeraz II , Transkripsiyon faktörleri TFIID , ve TFIIE ve RNA helikaz A ile) ve birlikte etkileşimli olarak DNA onarım mekanizmalarına katılan bir genidir. BRCA1 ve BRCA2 proteinleri , birlikte mitotik hücrelerde DNA çift zincir yapısındaki kırıkların onarımını sağlamaktadır.(29)

BRCA1 proteini mitoz esnasında sentrozomun gamma – tubulin alt birimleriyle etkileşerek hücre döngüsünü durdurup DNA’ da hasar kontrolünü sağlamaktadır(29).

Rao ve meslektaşları ; BRCA1’in fare fibroblast hücre kültürlerinde ve meme tümörü hücre kültürlerinde apoptotik hücre ölümü kontrolünde rol oynadığını göstermişlerdir. Başka bir çalışmada da BRCA1’ den yoksun fare embriyonik kök hücrelerinin iyonizan radyasyona ve oksidatif hasarlara karşı hassas olduğu gösterilmiştir. Bu da BRCA1’ in DNA hasarlarında doğrudan yada dolaylı olarak DNA onarımına katıldığını göstermektedir. (29)

2.1.1.5.3.BRCA2 geni

BRCA 2 tümör baskılayıcı diğer bir gen olup 1994’de Wooster ve çalışma arkadaşları tarafından 13. kromozomun uzun koluna haritalanmıştır(7). BRCA 2’yi içeren 13q12-13 bölgesi aynı zamanda retinoblastoma genine yakın bir bölgedir(36,39). BRCA 2 geni 27 eksona sahip 70 kb’lık bir gen olup 6 cM’lık yer kaplar ve genin ürünü 3418 aminoasitten oluşan bir proteindir(36). Bu proteinin fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemekle (33) birlikte 3 eksonunun transkripsiyon faktörleriyle benzerlik göstermesi, bu yönde bir fonksiyonu olabileceğine işaret etmektedir(33,). BRCA 2 tıpkı

BRCA 1 gibi büyük bir 11.eksone sahiptir(50). Bu ekson bütün genin yaklaşık % 58'ini oluşturur(23,26,34).

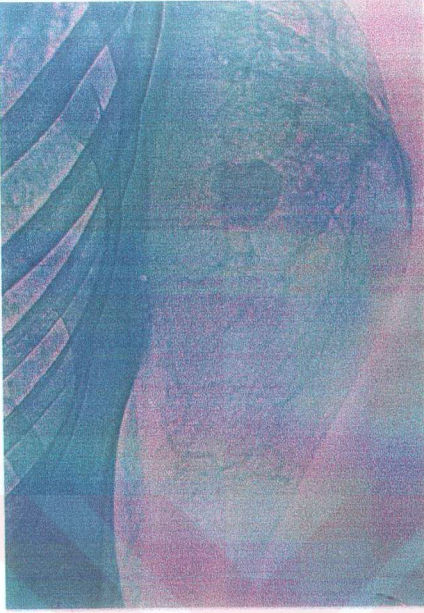
Bu gende germline mutasyon taşıyanlarda meme kanseri, ovaryum kanseri riskinden daha fazla olmakla birlikte sporadik meme ve ovaryum kanserli hastalarda %30-40 oranında heterozigotluk kaybı görülmektedir.(16,19,22)

2.2.MEME KANSERİ

Ciddi bir toplumsal sağlık sorunu olan meme kanserine genetik ve çevresel etkenlerin etkisi ortaya çıkarıldıkça önlenmesine yönelik gelişmeler artmaktadır. Meme kanseri multifaktöriyel ve bundan dolayı karmaşık bir hastalıktır. Günümüzde Birleşik devletlerde her yıl yaklaşık olarak 180 bin kişiye meme kanseri teşhisi konmaktadır.(29)

Meme kanseri dünyada tüm kadınlar arasında en sık görülen habis tümör olup, Avrupa'da yılda 180 bin , Amerika Birleşik Devletleri'nde de yılda 182 bin yeni olgu saptanmaktadır(32). Ülkemizde ise meme kanseri görülme sıklığı 1994 yılı için 100 000'de 6.14 dür. Gene aynı yıl için meme kanserinin diğer kanserler içindeki oranı % 23.04 olarak bildirilmiştir(30).

Meme kanseri meme dokusundaki kontrolsüz yada düzensiz hücre bölünmesi sonucu yakındaki doku yada organlara saldıran ve zarar veren bir hastalık türüdür. Ayrıca hücreler orjinal tümör dokusundan ayrılıp kan yoluyla yada lenfatik sistemle yayılıp vücudun diğer bölümlerinde ikincil tümörler meydana getirebilmektedirler(metastaz). Meme tümörleri en çok meme dokusundaki lobüllerden yada duktuslardan köken almaktadırlar(32).



Şekil 7: bir meme tümörünün özel bir teknikle çekilmiş mamografik resmi

2.2.1.Meme kanseri ve risk faktörleri

Kalıtsal meme kanserinin gelişmesinde kabul edilen en önemli risk faktörü aile hikayesidir. Eğer bir aile hikayesi var ise bu ailedeki kadınlar için normal popülasyona göre dahada artmıştır. Bununla birlikte pek çok genetik olmayan risk faktörleri hastalığın etiyojisine

katkıda bulunmaktadır. (29) Bu risk faktörleri genel olarak hormonal olan ve hormonal olmayan risk faktörleri olmak üzere iki alt gruba ayrılabilir. (29)

2.2.2.Hormonal risk Faktörleri:

Çalışmalar göstermiştir ki östrojen hormonuna maruz kalma meme kanseri gelişmesi için bir risk faktörüdür (29). Diğer artırıcı faktörler menstural döngünün artması, erken menarş yaşı ve geç menapoz olarak bildirilmiştir.. Ayrıca ovulasyon döngüsünün düşürülmesi ve uzamış emzirme süreleri meme kanseri gelişmesini azaltıcı faktörlerdir. Menopoz sonrası hormon tedavisinde meme kanseri riskini artırıcı bir etki yaptığına dair çalışmalar da bildirilmiştir. (29)

2.2.3.Hormonal Olmayan Risk Faktörleri:

Hormonal olmayan risk faktörleri de meme kanseri gelişmesinde etkilidirler. Diğer bir risk faktörü de çevreden alınan iyonize radyasyondur. 2. Dünya savaşı sırasında Japonya'ya atılan atom bombasından sonra açığa çıkan radyasyonun somatik

mutasyonlara sebep olmasından dolayı sağ kalan kadınlarda hem meme kanseri görülme sıklığı artmış ve ortaya çıkma yaşı erken döneme kaymıştır.(29)

Diğer bir hormonal olmayan faktör ise aşırı alkol kullanımıdır. Aşırı alkol tüketimi östrodiolün serumdaki seviyesini ve dolaylı olarak östrojenin miktarını artırarak meme kanserinin gelişmesine katkıda bulunmaktadır. (29)

Bulunan bazı genler ve onların mutasyona uğramış türleride meme kanseri gelişiminde etkili faktörlerden biridir. Bu genlerden en önemlileri BRCA1 ve BRCA2 genleridir. Meme kanseri genetik faktörler ile çevresel faktörlerin birlikte etkimesi sonucunda ortaya çıkan bir kanser türüdür.(27,28, 29)

Hormonal olmayan diğer etkenler ise;

Yaş; Kadınlarda yaşı artması meme kanseri riskini artırmaktadır. Meme kanseri 50 yaş üstü kadınlarda çok daha fazla görülmekle birlikte ailesel meme kanseri olan kadınlarda 35 yaş altında oldukça sık ortaya çıkar.(29)

Aile hikayesi; Aile hikayesi olan hastaların kızkardeşi ,kızları ve annelerinde özellikle menopoz öncesi meme kanseri gelişme riski artmıştır. Ailesel meme kaseri ; genetik faktörlerle birlikte gelişir. Bu genetik faktörlerin en başında BRCA1 ve BRCA2 genleri mevcuttur. BRCA1 ailesel meme kanserlerinin % 45 'inden ; meme ve over kanserlerinin ise % 80 ninden sorumlu bir gendir. Bir BRCA1 mutasyonu taşıyıcısı kadında hayatı boyunca meme kanseri gelişme riski % 60 ile 80 arasında over kanseri gelişme riski ise % 20 ile 40 arasında değişmektedir.(29,65.)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇLER

3.1.1.MATERYAL

Çalışmamızda 1998-1999 yılları arasında İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Medikal Onkoloji Poliklinlerine başvuran yada tedavi gören, ailesinde birden fazla meme ve over kanseri öyküsü bulunan 35 yaş altındaki 8 meme kanserli kadın hasta ve yakınlarının kanlarından izole edilen DNA lar kullanılmıştır.

3.1.2.KİMYASAL MALZEMELER

“Coomasie” Parlak mavisi (Merck)
2 Merkaptotanol (Merck)
667 Polaroid Film
Agoroz (Sigma)
Agoroz(Sigma)
Akrilamit (Sigma)
Bisakrilamit (Sigma)
Borik Asit (Sigma)
Bovin Serum Albumin (Promega)
Colorimetric Translation Detection System(Promega)
Etanol %100(Promega)
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)
Glesial Asetik asit(Merck)
Gliserol(Sigma)
Magnezyumklorür(Sigma)
Metanol (Sigma)
Nitro seluloz membran
Poloroid 667 film
Ponso – S (Sigma)
Proteinaz K(Oncor)

Sodyum Dodesil Sülfat SDS (Sigma)
Taq Polimeraz(Promega)
TnT® T7 Quick System (Promega)
Trisma Base (Sigma)
Tween 20 (Promega)

3.1.3.Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Agoroz Elektroforez Tankı(Bio-Metra)
- Su Banyosu
- Derin Dondurucu (Vestel)
- Distile Su Cihazı(Nüve)
- Fotoğraf Makinası(Polaroid)
- Güç Kaynağı (Bio-Metra)
- Manyetik Karıştırıcı (Nüve)
- Otoklav(Nüve)
- Otomatik Mikro Pipetler(Socorex)
- PH metre (Schott)
- Poliakrilamit Dikey Mini Elektroforez tankı(Bio-Metra)
- Santrifüj(Hettich)
- Spektrofotometre(Biotech)
- Terazi(Scaltec)
- Vorteks(Nüve)
- Western-Blot transfer tankı (Bio-Metra)

3.1.4. ÇÖZELTİLER

3.1.4.1.Agoroz Gel Elektroforezi çözeltisi

- 10 x Yükleme çözeltisi
- 4 gr Sukroz
- 25 mg BPB (Bromofenolmavisi)
- dH₂O ile 10 ml'ye tamamlanır.

10 x TEB (Tris – Borat Elektroforez Çözeltisi) (1 litre için) pH 7.4

54 gr Tris bazı

3.32 gr EDTA

27.5 gr Borik Asit

3.14.2.DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Hücre Parçalama Çözeltisi

155 mM NH_4Cl

10 mM KHCO_3

0.1 mM EDTA

Çekirdek Parçalama Çözeltisi (pH; 8.2)

10 mM Tris-HCL

400 mM NaCl

2 mM EDTA

SDS (*SodyumDodesilSülfat*)

: %10

Proteinaz K

20 mg /ml

3.1.4.3. Denatürleyici Protein Gel Elektroforez Çözeltileri

%30'luk akrilamit çözeltisi (100 ml)

30 gr akrilamit

0.8 gr bisakrilamit

Fiksatif Çözeltisi

%50 metanol

%10 asetik asit

%40 dH₂O

4 x Stacking Gel Çözeltisi

6.06 g Tris- Baz

100 ml (pH:6.8 HCL ile)

4 ml %10 SDS

Yükleme Çözeltisi (10 ml)

2 ml gliserol

2 ml %10 SDS

0.25mg bromofenolmavisi

2.5 ml 4x stacking gel tamponu

0.5 ml β -merkaptoetanol

10 x SDS Poliakrilamit Elektforez Çözeltisi (1 litre için)

30 gr Tris bazi

144 gr glisin

100 ml % 10 SDS

4 x Ayırma Gel Çözeltisi (100 ml için)

18.17 gr Tris bazi

4 ml % 10 SDS

Transfer Çözeltisi pH :8.3

: 25 mM Tris bazi

192 mM Glisin

% 20 Metanol

Tris –Tuz Çözeltisi (TBS)

: 37 mM NaCl

3 mM KCl

35 mM Tris bazi

Gel Boyama Çözeltisi

: %0.2 “Comomassie” Mavisi

% 50 Metanol

% 10 asetik asit

Gelden boya çıkartma çözeltisi : %25 izopropil alkol

%10 asetik asit

Gel saklama çözeltisi : % 5 Asetik asit

Ponso-S boyama çözeltisi (50 ml) : 2.5 ml Glasiyel Asetik asit

0.05 gr Ponso-S

PAGE ayırışım geli (% 12.5)

3.13 ml akrilamit (% 30'luk Akrilamit çözeltisi)

1.9 ml 4 x Ayırma geli çözeltisi

112 µl Amonyum persulfat (APS) (%10'luk)

5 µ TEMED

2.37 ml dH₂O

3.2.YÖNTEMLER

3.2.1.DNA İZOLASYONU

Hastalardan EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinden tablo –1'de verilen yöntem ile DNA izole edildi. İzole edilen DNA distile su içinde çözöldü ve konsantrasyonları 260 nm dalga boyunda okunan optik yoğunlukları DNA ($\mu\text{g/ml}$)=260 nm deki OD x sulandırma oranı x katsayı(50) formölüne uygulanarak belirlendi.

DNA nın saflığı ise 260 nm ile 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk değeriinin oranıyla belirlendi. DNA'ların kalitesi agaroz jellere yüklenerek kontrol edildi.

Tablo 1:

10 ml EDTA'lı kan + 30 ml parçalama çözeltisi

↓ 15 0°C , 3000 g , 10'

Çökelti + 10 ml parçalama çözeltisi

↓ 3000 g, 10'

Çökelti + 3 ml çekirdek parçalayıcı çözeltisi

+

50 μl %10' SDS

30 µl proteinaz K (20 mg/ml)
400 µl dH₂O

↓ 37°C gece boyu

5 ml dH₂O + 5 ml 9 M Na-asetat

↓ 10 000 g, 20'

Üst sıvı + 2 x hacim etanol eklenir

↓

DNA pipet ucu ile alınarak 500 µl dH₂O içerisinde çözüldü

3.2.2.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

BRCA1 geninin 11.ekzonunu çoğaltmak için çalışmada kullanılan dizileri Tablo 2'de verilmiştir.

BRCA1 11. Ekzon	Kullanılan Primer Dizileri	Ürün Uzunluğu	Bölge	Nükleotid bölgesi
11.I	PTT1F: GGATCCTAATACGACTTCACTATAGGAA CAGACCACCATGGCTGCTTGTGAATTTT CTGAGACGG PTT1R: CAGAGTGGGCAGAGAATGTT	1998 bç	11.I	789 – 813 2768 - 278
11.II	PTT2F: GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAAC AGACCACCATGGATACTTTCCAGAGCT GAAG PTT2R: GTTTGAATCCATGCTTTGCTC	2000 bç	11.II	2202-2222 4191-4211

Tablo 2: BRCA1' in 11. Ekzonuna ait primer tablosu

İlgili gen bölgeleri yukarıda verilen primer dizileri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. Reaksiyon toplam 25 µl'lik hacimde gerçekleştirildi. Daha sonra PCR'ürünleri % 2'lik agarozda yürütülerek, beklenen ürünün oluşup oluşmadığına bakıldı.

Elde edilen PZR ürünleri TNT-Quik (promega) master kiti ile *invitro* protein sentezine tabii tutuldu.

PZR koşulları

Reaksiyon ortamı : 1 x PCR tamponu

1.5 mM MgCl₂

0.2 mM dNTP karışım

0.75 U Taq polimeraz

0.16 µM her bir primer

.....µl dH₂O

Toplam hacim : 25 µl

Döngü:

Başlangıç 93°C , 5 dakika

93°C , 30 saniye

58°C , 30 saniye

72°C , 30 saniye

Sonlanma 72°C , 5 dakika

34 Döngü

3.2.3.İN – VİTRO PROTEİN SENTEZİ

Klinik araştırmalarda mutasyonların belirlenmesi ve hastalık ile ilişkisinin saptanması araştırmacılar için çok önemli bir konudur. Bu konudaki teknikler daha çok DNA seviyesindeki mutasyon tespitine dayanan yöntemlerdir. En sık kullanılan yöntemler PZR, SSCP, dizi analizleri, DNA'nın enzim kesim noktalarındaki değişimleri ;temel olan yöntemlerdir. Pek çok yöntem DNA'daki belli bölgelerin analizlerine dayanırken Protein Truncation Test (PTT); DNA'daki mutasyonun protein ürünün boyundaki değişime neden olup olmadığının incelenmesine olanak sağlayan ve bakılmasına dayanan bir yöntemdir.

Translasyon sonlanma noktasında değişimlere neden olan mutasyonlar özellikle meme ,over ve kolon kanserleriyle ilişkili olup birden fazla mutasyon aynı sonuca neden olmaktadır. Bununla birlikte PTT testi ile translasyonda erken sonlanmaya neden olan mutasyonlar tespit edilebilmektedir.

PTT testi ile meme kanseri, kolon kanseri ve DMD'ye neden olan mutasyonları saptamak mümkündür.

3.2.3.1.PTT (Protein Truncatin Test)'in prensipleri;

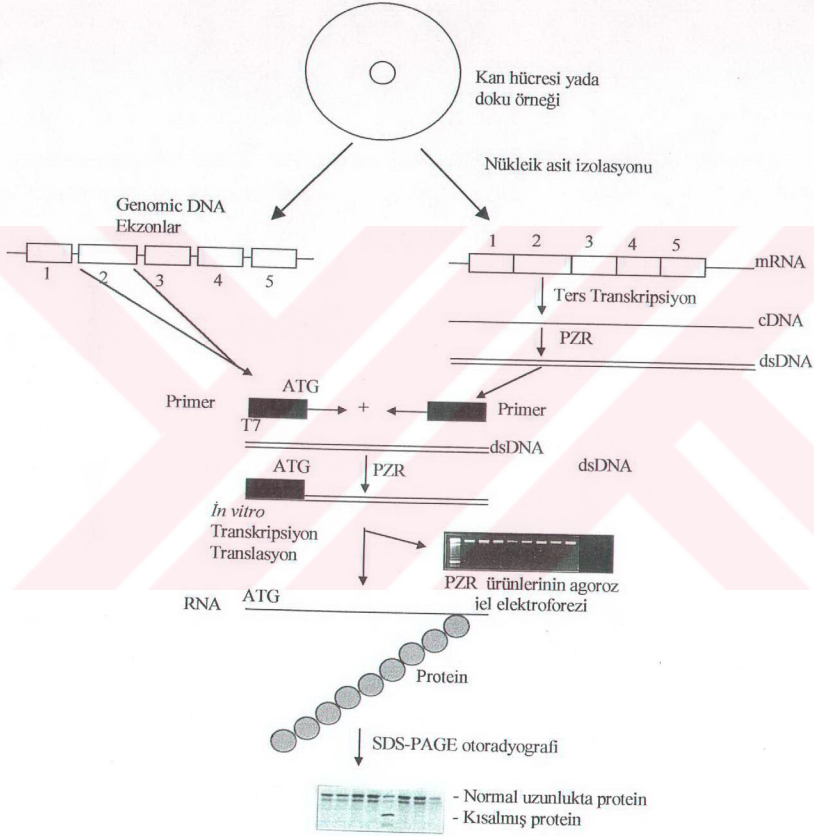
PTT yönteminin iki önemli avantajı olan bir yöntemdir.Bunlar ;

- I- PTT reaksiyonu ile 2 – 3 kb'lık uzun gen dizilerinin analizine olanak sağlar.
- II- PTT patolojik durumlara neden olan mutasyonların tespit edilmesine olanak sağlar.

PTT yöntemi dört basamakta gerçekleşir;

- I- Kandan yada dokudan nükleik asit izolasyonu
- II- PZR ile gen dizisinin çoğaltılması
- III- PZR ürünlerinin Transkripsiyon/Translasyon sistemi ile *in – vitro* ortamda bu aşamalarının tek tüp içinde gerçekleştirilmesi

IV- SDS- Gel Elektroföresi ile translyasyon sonlanma mutasyonu ile oluşan mutant proteinlerin normal proteinlerden ayrılması (şekil 8)



şekil 8 ;PTT yönteminin şematik gösterimi

3.2.4.. TNT® Quik Mix ile Transkripsiyon / Translasyon reaksiyonu için uygulanan genel protokol;

Gerekli materyal;

- Nükleazdan yoksun su
- Transced™ tRNA ve Transced™ renk tespit sistemi

PTT Uygulama Prosedürü;

1- -70° C'de muhafaza edilen TNT® T4 Quick master mix'in bulunduğu tüpler buz üzerinde çözüldükten sonra reaksiyon bileşenleri 0.5 ml yada 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde yavaşça karıştırılır.

TNT® Quik reaksiyon ortamı

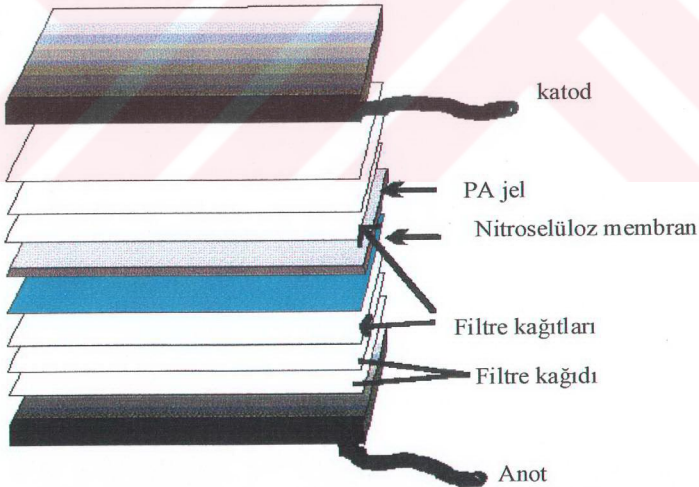
TNT Quik Master mix	40 µl
Metionin 1mM	1 µ
PCR ürünü (0.5 µg/µl)	2 µl
Transced™ Biotin-Lysyl-tRNA	1 µl
Nükleazdan yoksun su	6 µl
Son hacim	50 µl

olacak şekilde hazırlandı.

- 2- Her hasta örneği için reaksiyon ortamı yukarıda belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra örnek tüpleri 30°C'su banyosunda 2 saat inkübe edildi.
- 3- İnkübasyon sonucunda elde edilen transkripsiyon ürünleri SDS-PAGE ile analiz edildi.
- 3.2.5.İnvitro protein sentezi örneklerinin akrilamit jelle yüklenmesi (SDS-PAGE)**

Hasta ve yakınlarının BRCA1 geninin 11.ekzonu iki ayrı parça halinde çoğaltıldıktan sonra PTT testine tabi tutularak %12,5'lik akrilamit jelle yüklendi ve 100 volt'da 1 saat yürütüldü.

3.2.5.1.Elektroforetik Transfer *İn-vitro* ortamda sentezlenen proteinler elektroforetik olarak jel'de ayrıldıktan sonra jeller çıkarıldı ve jel transfer tamponuna alınarak 15 dak.bekletildi. Jel boyutunda nitroselüloz membran ve filtre kağıdı kesilerek transfer tamponu içinde 15-20 dak.bekletildi. jel kasetindeki gri panelin üzerine sırasıyla sünger ,filtre kağıdı, jel, nitroselüloz membran, filtre kağıdı ve sünger konduktan sonra kaset dikkatlice kapatıldı. Daha sonra kaset tanka yerleştirildi ve tank transfer tamponu ile dolduruldu. Transfer tankı manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilip güç kaynağına bağlandıktan sonra transfer işlemi 100 volt'da 1 saat içerisinde gerçekleştirildi.(şekil 9)



Şekil 9; Şemetic olarak Elektroforetik transfer

Ponso – S ile boyanmış
Protein bantları



Şekil 10; Ponso S ile boyanmış transfer membranı

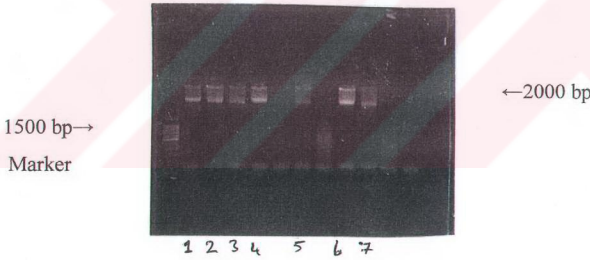
5-2-3-4-Kolorimetrik Belirleme-Western Blot (Alkalın Fosfotaz Sistemi)

Transfer işlemi sonucu elde edilen membranlar ilk önce TBS ile kısaca yıkandıktan sonra 15 ml TBS + % 0.5 Tween @20'de 60 dak. Oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Bu çözelti dökülerek ;15 ml TBS + % 0.5 Tween@20 içinde çözünmüş 6 µl streptavidin-AP hazırlanıp membranın üzerine döküldü ve oda sıcaklığında 60 dak. yavaş şekilde çalkalandı. Bu sürenin sonunda Streptavidin-AP'li çözelti dökülerek membranlar 2 kere 30 ml TBS + %0.5 Tween@20 ile 1 dak. TBS ile 2 kere yıkandı. Membranlar 5 ml Wester Blue® Stabilized Substrate ile işleme tabi tutularak renk gelişimi sağlandı. Membranda bantlar 1 ile 15 dak içinde görünmeye başladı. Bantlar görünmeye başlar başlamaz çözelti döküldü ve reaksiyonu sonlandırmak için membran distile su ile yıkandı.(bu aşamada membran kuvvetli ışıktan korundu.)

4-BULGULAR

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Onkoloji Bilim Dalına başvuran; ailesinde birden fazla meme kanseri vakası bulunan 35 yaş altı 10 meme kanserli bayan hasta ve bunların birinci derece akrabaları (kız kardeşleri, kızları ve anneleri) olmak üzere toplam 22 kişi araştırıldı. Her hastadan 10 cc EDTA'lı kan alınarak DNA izolasyonu yapıldı.

Öncelikle hastalardan alınan kanların DNA'ları tablo 3 de bahsedildiği gibi izole edildikten sonra, BRCA 1 geninin 11.eksonu iki bölge halinde PZR ile çoğaltıldı. Daha sonra PZR ile elde edilen 11.eksonun karşılığı olan protein ürününü elde etmek için *in vitro* protein sentezi işlemi yapıldı. PTT ile incelenen hastalarda ve birinci derece akrabalarında BRCA1 in 11.ekzonunun stop kodonunda değişikliğe sebep olan bir mutasyonun varlığı saptanamadı.



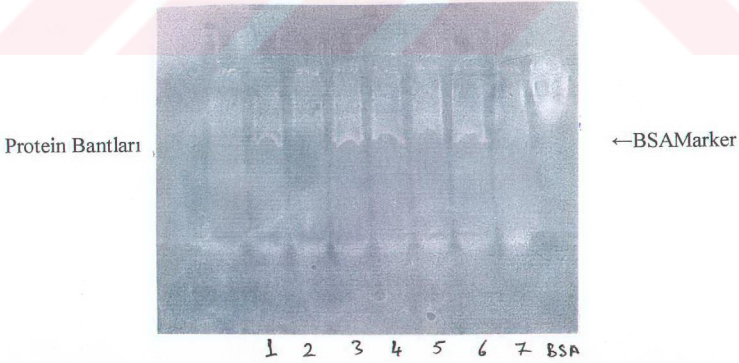
Fotoğraf 1 : BRCA 1 geni , 11.ekson 1.kısımının PZR ile çoğaltılması



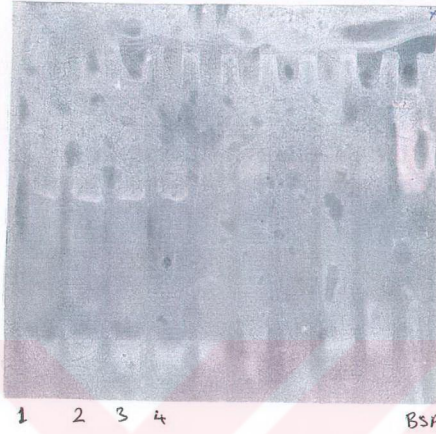
Fotoğraf 2 : BRCA 1 geninin 11.eksonun 5' ucunun PZR ile

çoğaltılması

Daha sonra elde edilen DNA'ya ait protein SDS – PAGE de yürütüldükten sonra Nitro selüloz filtreye aktarıldı. Ve aktarılan proteinler biotininle işaretlenerek alkalın fosfotaz ile tespit edildi.



Fotoğraf 3 : BRCA 1 geni 11.eksonunun 5' ucu PTT nitro – selüloz filtre görüntüsü



← Hasta Protein Bandı
ve marker BSA

Fotoğraf 4 : BRCA 1 geni 11.eksonun II. 5' kısmın PTT (nitro-selüloz) filtre görüntüsü



normal protein→

← BSA marker

Fotoğraf 5 : BRCA 1 geninin II. 5' ucunun hasta PTT proteinlerinin nitro –selüloz filtre görüntüleri

Daha önceki bölümlerde belirtilen özellikteki 8 hasta ve 14 yakınıyla birlikte 10 kontrol grubunun PZR'larından elde edilen protein moleküllerinin nitro – selüloz membrana aktarılması ile PTT analizi için BSA ile karşılaştırılmaları sonucu incelenen 22 hasta ve hasta yakınında BRCA 1 geninin 5' ucunun ilk 2000 nükleotidlik kısmının ürünü olan protein dizisinde herhangi bir değişimin olmadığı ayrıca , BRCA1 geninin 11.ekzonunun ikinci kısmını oluşturan 1998 nükleotidlik bölümünde yapılan PTT testinde yaban tip protein dışında bir protein varlığı saptanmadı. 8 hasta ve 14 yakınının BRCA 1 geninin ve proteininin büyük bir kısmını kodlayan 11.ekzonunun dizisinin stop kodonunda bir değişimin olmadığı ve translasyonun yaban tip BRCA1 geninin stop kodonunun bulunduğu yerde sonlandığını göstermektedir. Fakat bu elde ettiğimiz sonuç BRCA1 genini oluşturan diğer eksonlarında bir mutasyon meydana gelmemiş olacağını göstermemektedir.

Hasta	Yaş	Kanser Türü	BRCA1 - I	BRCA1 -II
Hasta 1	36	Meme	-	-
Abla	40	-	-	-
Kızkardeş	30	-	-	-
Hasta 2	36	Meme	-	-
Ablası	39	-	-	-
Annesi	58	-	-	-
Hasta 3	35	Meme	-	-
Kızı	18	-	-	-
Annesi	63	-	-	-
Kardeş	33	-	-	-
Hasta 4	31	Meme	-	-
Ablası	36	-	-	-
Hasta 5	37	Meme	-	-
Kızkardeşi	28	-	-	-
Hasta 6	38	Meme	-	-
Annesi	63	Meme	-	-
Kızkardeşi	34	Larinks	-	-
Hasta 7	35	Meme	-	-
Kızkardeşi	30	-	-	-
Hasta 8	34	Meme	-	-
Annesi	58	-	-	-
Kızkardeş	32	-	-	-

Tablo 3; Çalışılan hasta profili ve PTT sonuçları

5-TARTIşMA

Çok önemli bir toplum sorunu olan meme kanserinin gelişmesinde etkili çevre ve genetik faktörlerin ortaya çıkarılmasıyla ,meme kanserini engellemeye yönelik çalışmalarda umut kazanmaktadır(29)

Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Hawai , Kaliforniya ve Kanada da yılda , yüzbinde 80 – 90 arasında görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken , aynı değer Japonya’da yüzbinde sadece 12 – 15 arasındadır. Bu değer ülkemizde ise 1994 yılı için yüzbinde 6,14 dır.(7)

Meme kanserlerinin büyük bir kısmı sporadik vakalar olmakla birlikte bütün vakaların %5 ile 10’ nu kalıtsal özellik gösterir.(29)

Meme kanserinin gelişmesinde etkili olduğu bilinen iki gen bulunmuştur. Bu genler BRCA1 ve BRCA2 genleridir.(29, 39,).

BRCA1 geni bütün meme kanserlerinin %4 - 5’inden kalıtsal meme kanserlerinin % 45’inden sorumlu olduğu düşünülmektedir.(39) BRCA1 geni taşıyıcılarında 70 yaşına kadar meme kanseri gelişme riski % 94 dır(51) 30 yaşından önce ortaya çıkan meme kanseri olgularındaki oranı ise % 25 ‘dir (2). BRCA 1 geni bütün ailesel meme kanseri vakalarının yarısından ve multiple göğüs ve ovaryum kanser vakalarının % 80 ile 90 sından sorumlu bir genidir.(6, 12, 13, 16, 23, 70)

Bu çalışmada PTT testi kullanarak 8 meme kanseri hastasından alınan kan örneklerinde BRCA1 geninin 11.ekzonunda mutasyon araştırması yaptık. 8 hastanın tamamında teşhis 35 yaş öncesinde konmuş ve 1 tanesinde ailesinde ikinci bir meme ve larinks kanseri vakası olduğu saptanmıştır. Hasta örneklerinin hiç birisinde BRCA1 geninin 11.ekzonunda bir mutasyon varlığına rastlanmadı. Mutasyon varlığı hastalığın erken yaşta ortaya çıkması veya aile öyküsünde meme veya over kanseri hikayesine bağlı olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Ülkemizde daha önce yapılan bir çalışmada aile hikayesi olan 53 hasta ve 50 yaş altında teşhis konulan 52 hasta ile çalışılmış ve bu örneklerin tümünde hem BRCA1 hemde BRCA2 genleri mutasyon açısından PTT testi ile incelenmiştir(7). Bu çalışma sonucunda 105 hastanın 4 tanesinin

BRCA1 geninin 11. Ekzonunda mutasyon bulunduğu saptanmıştır. 8 hastanın hişbirisinde mutasyon bulamamızın nedeni hem hasta sayısının azlığından hemde bu hastalardan sadece 1 tanesinin ailesinde ikinci bir meme kanseri vakası bulunmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca bu hasta örneklerinin sadece BRCA1 geninin 11.ekzonu PTT testi ile incelenmiştir. Oysa daha önceki çalışmada aynı hasta gurubunun 11.ekzonu dışındaki bölgeler başka yöntemler ile incelendiğinden iki mutasyon daha saptanmıştır. Bu da gösteriyorki BRCA1 geninin meme kanseri etiyolojisinde yer alıp almadığını söyleyebilmek için bu hasta örneklerinin hem BRCA1 hemde BRCA2 genlerinin diğer yöntemler ve dizi analizi ile incelenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmanın amacı ailesinde birden fazla meme kanseri veya over kanseri olan veya erken yaşta meme kanseri teşhisi konulan hasta ve ailelerin meme kanseri etiyolojisinde yer aldığı öne sürölen BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarını saptamak için hızlı ve güvenilir bir yöntemi rutine uygulanabilir hale getirmektir.

6-ÖZET

Göğüs kanseri kadınları etkileyen en önemli ve yaygın bir hastalıktır. Kalıtsal göğüs ve ovaryum kanser geni olan BRCA 1 geni 17q 12 – q21 bölgesine yerleşmiştir. BRCA 1 genindeki germ – line mutasyonlar ailesel göğüs ve ovaryum kanserlerinin bir çoğundan sorumludur. BRCA 1 taşıyıcısı kadınlarda 70 yaşına kadar göğüs kanseri riski % 80 ve ovaryum kanseri olma riski % 40 dır. Biz ailesel meme kanserli hastalarda BRCA1 geni mutasyon taşıyıcıları tespit etmek için PTT testini uygulamak Türk hastalarda 35 yaş altı 8 meme kanserli hastada ve yakınlarında PTT testi ile BRCA 1 geninin 11. eksonunun mutasyonlarını araştırdık. Araştırma sonucunda bu hastalarda BRCA 1 geninin 11. Eksonunda mutasyon bulamadık.



7-SUMMARY

Breast cancer is one of the most common and important diseases affecting women. A gene for hereditary breast and ovarian cancer ,BRCA 1 has been mapped to chromosome 17q12 – q21 .Women who carry a mutation in the BRCA 1 gene have an 80 % risk of breast cancer and a 40 % risk of ovarian cancer by the age of 70 .Germline mutations in BRCA1 responsible for most casses of inherited breast and ovarian cancer. We investigated the presence exon 11 of the BRCA 1 gene mutations in 30 person by the family history of breast cancer , before 35 age of women with PTT test in the Turkish population. We could not found in 10 patients with family history and their relative to carry exon 11 of the BRCA 1 gene mutations.



8-Kaynaklar

1-Simon A.Gayther : Rapid Detection of Regionally Clustered Germ – line BRCA 1 Mutations by Multiplex Heteroduplex Analysis : Am . J.Hum.Genet.58:451-456 ,1996

2-O. Johannsson . Fonuding BRCA1 Mutations in Hereditary Bresat and Ovarian Cancer in Southern Sweden . Am . J . Hum . Genet . 58 : 441 – 450 , 1996

3-Sтивен A.Narod, att all :An Evaluation of Genetic Heterogeneity in 145 Breast-Ovarion Cancer Families : Am.J.Hum.Genet.56:254-264,1995

4-The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group,(report),The Exon 13 Duplikation in the BRCA1 Gene is a Founder mutation Present in Geographically Diverse Populations, Am.J.Hum.Genetics ,67:207-212,2000

5-Lori S.Fridmen at all: Novel Inherited Mutations and Variable Expressivity of BRCA 1 Alleles,Including the Founder Mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish Famillies : Am.Jun.Hum.Genet.57:1284-1297 ,1995

6-Malkin David, Germline p53 Mutations And Heritable Cancer. Annu.Rev.Genetics.28,443 – 465, 1994

7-H Yazici,O Bitisik,BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish breast/ovarian families and young breast cancer patients. British Journal of Cancer 83 (6),737-742,2000

8-Joseph N. Marcus. Hereditary Breast Cancer. Cancer ,77 (4),697-707,1996

9-Holland Frei, 4th Edition ,Vol,1, Cancer Medicine

10-Steinunn Thorlacius, Somatic p53 Mutations in Human Breast Carcinomas in an Icelandic Population: A prognostic Factor,Cancer Research 53,1637-1647,1993

11-Inheritance of Abnormal Expression of SOS-like Response in Xeroderma Pigmentosum and Hereditary Cancer-prone Syndromes, Cancer Research ,56 ;2621-2625,1996

12-François Eisinger.Germ Line Mutation at BRCA 1 Affects the Histoprognostic Grade in Hereditary Breast Cancer.:Cancer Research .56, 471-474:1996

13-Diane M . Identification of Three Regions on Chromosome 17q in Primary Human Breast Carcinomas Which Are Frequently Deleted. Cancer Research ,53 , 5617 – 5619 , 1993

14- Gerald Karp, Cell and Molecular Biology, 1999

15-Symonds Holly, P53 Dependant Apoptosis Supresses Tumor Growth and Progression In Vivo ,Cell, 78:703 – 711, 1994

16-Yazıcı Hülya , Non – Hodgkin Lenfomalarda Gen Düzenlenmelerinin Araştırması ,İ .Ü,Onkoloji Enstitüsü ,Doktora Tezi

17-Fergus J.Couch,Characterization of 10 New Polimorphic Dinukleotide Repeats and Generation of a High-Density Microsatellite – Based Physical Map of the BRCA 1 Region of Chromosome 17q21,Genomics ;24, 419-424, 1994

18-Lee A.Anderson.High-Density Genetic Map of the BRCA 1 Region of Chromosome 17q12-q21,Genomics, 17, 618-623,1993

19-Patricia Tonin.The gen for hereditary breast-ovarian Cancer,BRCA 1,maps distal to EDH17B2 in chromosome region 17q12-21,Human Molecular Genetics, 3 (9) 1679-1682, 1994

20-Chun-Fang Xu Distinct transcription start sites generate two forms of BRCA1 mRNA,Human Molecular Genetics 4 (12)2259-2264 ,1995

21-Sarah J Plummer ,Detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test,Human Molecular Genetics 4 (10) 1989-1991;1995

22-Mieko Matsushima ,Mutation analysis of the BRCA1 gene in 76 Japanese ovarian cancer patients:four germline mutations ,but no evidence of somatic mutation,Human Molecular Genetics,4 (10) 1953-1956 ;1995

23-Keith Harshman ,Comparison of the positional cloning methods used to isolate the BRCA1 gene,Human Molecular Genetics,4 (8) 1259-1266;1995

24-Editorials ,Testing for Inherited Cancer Susceptibility , JAMA 275 (24) ,1928-1929 ,1996

25-Donna Shattuck – Eidsens . A Collaborative Survey of 80 Mutations in the BRCA 1 Breast and Ovarian Cancer susceptibilty Gene . JAWA . 273 (7) ,535 – 541 ,1995

26-Kenneth Offit,Statement of the American Society of Clinical Oncolgy : Genetic Testing for Cancer Susceptibility , Journal of Clinical Oncology .14 (5),1730-1736; 1996

28-Johnathan M.Lancaster.:Detection of BRCA 1 Mutations in Women With Early – Onset Ovarian Cancer by Use of the Protein Truncation Test.:Journal of National Cancer Institute, 88 (8) ,552-553,1996

29-Anne – Marie Martin. Genetic and Hormonal Risk Factors in Bresat Cancer , Journal the National Cancer İnstitute, 92 (14), 1126 – 1135 ;2000

30-Alican Fikri, M.D. Kanser

31-Sherman C.D, Klinik Onkoloji, 1990

- 32-Topuz Erkan , Meme Kanseri , 1997
- 33-Richard Wooster,Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 ,Nature ,378,21-28,1995
- 34-Johnathen Miller. Transcriptional Activation functions in BRCA 2,Nature,386,772-773;1997
- 35-Shyam K.Sharan, Embriyonik lethality and radiation Hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking BRCA2; Nature,386, 804 – 810,1997
- 36-S.V.Tavtigian, The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds,Nature genetics 12 ,333-337,1996
- 37-Fergus J.Couch ve arkadaşları.:BRCA 2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families, Nature Genetic, 13:123-125,1996
- 38-Jeffrey T.Holt ve arkadaşları :Growth reterdation and tumour inhibition by BRCA1,Nature genetics ,12;298-302,1996
- 39-Lucio H.Castilla ve arkadaşları,Mutations in the BRCA1 gene in families with early – onset breast and ovarian cancer.Nature genetics,8,387-391,1994
- 40-Steinunn Thorlacius,A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes,Nature genetics ,13;117-119.1996
- 41-Susan Neuhausen ,Recurrent BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer,Nature genetics,13;126-128,1996
- 42-Leeju C.Wu, Identification of RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product.Nature genetics 14 ,430-440:1996

43-Johnathan M . Lancaster.BRCA 2 mutations in primary breast and ovarian cancers ,
Nature Genetics , 13 , 238 – 240 , 1996

44-Yoshio Miki . Mutation analysis in the BRCA 2 gene in primary breast cancers .
Nature Genetics , 13 , 245 – 247 ,1996

45-David H. Low incidence of BRCA2 mutations in breast carcinoma and other
cancers . Nature Genetics 13 , 241 – 244 , 1996

46-Lauri Goodman,Box BRCA1 tumour inhibition,Nature genetics,12,224,1996

47-Patricia S.Steeg :Granin expectations in breast cancer?: Nature Genetics :12:223-
224,1996

48-Jeffrey T.Holt, ve arkadaslari.Growth retardion and tumour inhibition by BRCA
1:Nature genetics ,12:298-302,1996

49-Catherina M.Phelan ve arkadaslari.:Ovarion cancer risk in BRCA 1 carriers is
modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) olcus.Nature
genetics 12:309-311,1996

50-Benjamin B.Roa ve arkadaslari:Ashkenazi Jewish population frequencies in BRCA
1 and BRCA 2 .Nature genetics ,14:185-187,1996

51-Carole Oddoux ve arkadaslari ,The carrier frequency of the BRCA2 6174delT
mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately ,Nature genetics
14:188-190,1996

52-Sylvie Mazoyer ve arkadaslari,A polymorphic stop codon in BRCA2 ,Nature
genetics ,14:253-254,1996

- 53-Peer Bork ,Niklas Blomberg,Michale Nilges ,Internal repeats in the BRCA2 protein sequence,Nature genetics 13 ,22-23 ;1996
- 54-Catherina M.Phelan ve arkadaşları .Mutation analysis of the BRCA2 gene in 49 site specific breast cancer families .Nature genetics 13 :120-122,1996
- 55-Editorial,Behold BRCA2 .Nature genetics 12,222.1995
- 56-Roy A.Jansen ve arkadaşları :BRCA 1 is secreted and exhibits properties of a granin.Nature Genetics .12:303-308,1996
- 57-Johnathan M.Lancaster.An Inevitable Dilemma:Prenatal Testing for Mutations in the BRCA 1 Breast – Ovarian Cancer:Obstetrics & Gynecology :87,(2),306-309,1996
- 58-Peter T Rowley ,Attitudes of Obstetrician – Gynecologist Toward DNA Testing for a Genetic Susceptibility to Breast Cancer , Obstetrics & Gynecology ,88 (4) ,1996
- 59-Van Meir, Single Cell Monitoring for Growth Arrest and Morphological Changes Induced by Transfer of Wild – Type p53 Alleles to Glioblastoma Cells.Proc.Natl.Acad.Sci. 92, 1008 – 1012, 1995
- 60-Theodore D. Human Papillomavirus 16 E6 Expression Disrupts the p53 – mediated cellular response to DNA Damage.Proc.Natl.Acad.Sci.90:3998 – 3992, 1993
- 61-Sun Yi, Progression Toward Tumor Cell Phenotype is Enhanced By Overexpression of a Mutant p53 Tumor – Supressor Gene Isolated From Nasopharyngeal Carcinoma, Proc.Natl.Acad.Sci.
- 62-Catrina Lundberg ve arkadaşları ,Loss of heterozygosity in human ductal breast tumors indicates a recessive mutation on chromosome 13 ,Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,84 ,pp2372-2376,1987

63-Yoshio Miki ve arkadaşları,A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1 ,Science,266;66-71,1994

64-Richerd Wooster ,Localization of Breast Cancer Susceptibility Gene,BRCA2 ,Chromosome 13q12-13,Science 265 ,2088-2090,1994

65-Diane M. Radford, Inherited Breast Cancer; Surgical Clinics of the North Amerika, 76 (2), 205 – 217, 1996

66-Kenneth Offit .Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer . The Lancet .347 ,1643 – 1646 ,1996

67-Michael G. Germ – line BRCA 1 Mutations in Jewish and Non – Jewish women with Early – Onset Breast Cancer .The New England Journal of Medicine .334 (3),143 – 149 , 1996

68-Başaran Nurettin , Tıbbi Genetik , 357 –368 , 1996

69-Bahire Küçükaya , K562 ve Mel Hücre Modeline G Proteinlerinin Farklılaşma Üzerindeki Rolü , Yüksek Lisans Tezi ,Marmara Üniversitesi , 1992

Metin Budak

Eğitim:

1990 – 1993 Şişli Lisesi

1993 – 1997 İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

1997 – 2001 İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genetik Ana
Bilim Dalı, Genetik Yüksek Lisans

Doğum Yeri:

15, 6, 1976 Hatay

Katıldığım Seminer ve Kongreler

24 Aralık 1999 Infection Control Seminar, 3M İstanbul

23 – 24 Mart 2000 Oncology 2000 from Molecules to Mengement, Hong
Kong

Yayın :

**-P53 Codon 72 Genotypes In Colon Cancer, Association With Human
Papilloma Virus Infection ,**
Nur Sayhan, Hülya Yazıcı, **Metin Budak**, Ozlem Bitişik, Nejat Dalay
109,(1,2) .25 – 33, 2001

İstanbul
Tıp Fakültesi
Genetik Anabilim Dalı