TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AİLESEL MEME KANSERİ HASTALARINDA KALITSAL GENLERİN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE DİZİLENMESİ VE TELOMER UZUNLUĞUYLA İLİŞKİSİ

İREM PEKER EYÜBOĞLU

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DANIŞMAN

Prof. Dr. MUSTAFA AKKİPRİK

2018-İSTANBUL

REPUBLIC OF TURKEY
MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

SEQUENCING HEREDITARY GENES WITH NEXT GENERATION SEQUENCING METHOD IN FAMILIAL BREAST CANCER PATIENTS AND THEIR RELATION WITH TELOMERE LENGTH

İREM PEKER EYÜBOĞLU

Ph.D. THESIS

MEDICAL BIOLOGY AND GENETICS

SUPERVISOR

Prof. Dr. MUSTAFA AKKİPRİK

2018-İSTANBUL

1. TEZ ONAY

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Doktora
Anabilim Dalı	: Tibbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi	: İrem Peker Eyüboğlu
Tez Başlığı	: Ailesel Meme Kanseri Hastalarında Kalıtsal Genlerin Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile Dizilenmesi ve Telomer Uzunluğuyla İlişkisi
Sınav Yeri	: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi	: 21/12/2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK	Marmara Universitesi	

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Ayşe ÖZER	Marmara Üniversitesi	
Prof. Dr. Bahadır GÜLLÜOĞLU	Marmara Üniversitesi	
Prof. Dr. Cengiz YAKICIER	Acibadem Üniversitesi	
Prof. Dr. Turgut ULUTİN	İstanbul Uni. Cerrahpaşa	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26 Aralık 2018... tarih ve 88 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

2. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

İrem Peker Eyüboğlu

İmza

3. TEŞEKKÜR

Doktora ve yüksek lisans eğitimim boyunca tez çalışmalarımdaki değerli bilimsel katkıları, öğrenciliğim süresince gösterdiği ilgi, sabır ve anlayıştan dolayı sayın danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Akkiprik'e,

Öğrenciliğim süresince eğitimime önemli katkılarda bulunan, bunun da ötesinde verdiği manevi desteği, ilgisi, alakası ve anlayışı nedeniyle sevgili hocam Prof. Dr. Ayşe Özer'e,

Marmara Üniversitesi'ne başladığım günden itibaren kıymetli bilgilerini benimle paylaşan, hayal gücümü geliştiren, bana olan destek ve güveninden ötürü sevgili Dr. Can Erzik'e,

Değerli bilgilerinden istifade ettiğim, bana her alanda destek olan sayın hocalarım Doç. Dr. İlter Güney'e ve Doç. Dr. Fatih Eren'e,

Yale Üniversitesi Genetik departmanında bana çalışma olanağı vererek gelişmiş bakış açısına sahip olmamı sağlayan sayın Dr. Kaya Bilguvar'a ve desteklerinden ötürü Yale Günel Lab. ekibine,

Tez çalışmamdaki emeklerinden ötürü sayın hocam Prof. Dr. M. Cengiz Yakıcıer ve sevgili Güven Yenmiş'e,

Tez çalışmamdaki emekleri, manevi destekleri ve kıymetli dostluklarından ötürü sevgili arkadaşlarım Gökçe Güllü Amuran'a, Pınar Gültepe'ye, Şeyma Çolakoğlu Özkaya'ya, Gözde Girgin Özgümüş'e ve desteklerinden ötürü başta Serap Sevil Şahin olmak üzere tüm Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji bölümüne,

Hayatım boyunca her alanda desteklerini, sonsuz güvenlerini ve sevgilerini hissettiğim canım anne ve babama, her Amerika serüvenimde yanımda olan sevgili teyzem Nermin ve eniştem Taner'e, eğitim hayatımın her türlü zorluğuna ortak olan sevgili aileme ve eşime sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-110117-0015 numaralı proje ile desteklenmiştir.

4. İÇİNDEKİLER

1. TEZ ONAY .....
2. BEYAN .....
3. TEŞEKKÜR i
4. İÇİNDEKİLER ii
TABLOLAR LİSTESİ iv
ŞEKİLLER LİSTESİ v
KISALTMALAR ve SİMGELER vii
5. TÜRKÇE ÖZET 1
6. SUMMARY 2
7. GİRİŞ ve AMAÇ 3
8. GENEL BİLGİLER 7
8.1. Kanser 7
8.2. Tümörgenezde Rol Alan Mekanizmalar 8
8.2.1. Onkogenler 8
8.2.2. Tümör baskılayıcı genler 10
8.3. Meme Kanseri 11
8.3.1. Meme kanseri epidemiyolojisi ve etiyolojisi 11
8.3.2. Meme kanseri histopatolojik sınıflandırması 13
8.3.3. Meme kanserinde evreleme ve derece 15
8.3.4. Meme kanseri moleküler sınıflandırması 16
8.3.5. Meme kanseri tanısı 18
8.3.6. Meme kanseri tedavisi 19
8.4. Ailesel Meme Kanseri Yatkınlık Genleri 21
8.4.1. BRCA1 geni ve yapısı 24
8.4.1.1. BRCA1 fonksiyonu ve mekanizması 26
8.4.1.2. BRCA1 ve meme kanseri 30
8.4.2. BRCA2 geni ve yapısı 33
8.4.2.1. BRCA2 fonksiyonu ve mekanizması 35
8.4.2.2. BRCA2 ve meme kanseri 38
8.5. DNA Dizileme Yöntemleri 40
8.5.1. Birinci nesil dizileme 41
8.5.2. Yeni nesil dizileme 42
8.6. Telomer 45
8.6.1. Telomer ve kanser 49
8.6.1.1. Telomer ve BRCA1/BRCA2 51
8.6.2. Telomer uzunluğu ölçüm yöntemleri 56
9. GEREÇ ve YÖNTEM 60
9.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar 60
9.2. Çalışma Grubunun Belirlenmesi 62

9.3. Kandan Genomik DNA İzolasyonu 62
9.4. PZR Yöntemiyle Telomer Uzunluğu Ölçümü 63
9.5. BRCA1 ve BRCA2 Dizilenmesi 65
9.6. Mutasyonların Belirlenmesi ve Analizleri 69
9.7. İstatistiksel Analiz 76

10. BULGULAR 77
10.1. BRCA1 ve BRCA2 Dizi Analizi Sonuçları 77
10.2. Kantitatif Telomer Uzunluğu Ölçüm Sonuçları 80
10.3. İstatistiksel Analiz 82

11. TARTIŞMA ve SONUÇ 88

12. KAYNAKLAR 93

EKLER 112

13. ÖZGEÇMİŞ 114

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Meme Tümörlerinin sınıflandırılması 14

Tablo 2: WHO TNM Sınıflandırması 16

Tablo 3: Meme Kanserinde Evreleme 16

Tablo 4: BRCA1 mutasyonları 31

Tablo 5: BRCA2 mutasyonları 39

Tablo 6: PZR reaksiyon içeriği 65

Tablo 7: Q-PZR programı 65

Tablo 8: BRCA1 geni mutasyon sonuçları 78

Tablo 9: BRCA1 geni mutasyonlarının veritabanı tahminleri 78

Tablo 10: BRCA2 geni mutasyon sonuçları 79

Tablo 11: BRCA2 geni mutasyonlarının veritabanı tahminleri 80

Tablo 12: RT-PZR sonucu elde edilen ortalama Ct değerleri ve ΔCt'leri 82

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Meme kanseri hastalarının dağılımı 22

Şekil 2: BRCA1 domainleri ve etkileşimli proteinler. 26

Şekil 3: BRCA1 ağı. 27

Şekil 4: BRCA2'nin yapısal domainleri ve etkileşimleri. 34

Şekil 5: DSB onarımında BRCA2-RAD51 etkileşimi. 36

Şekil 6: DNA replikasyonu sırasında BRCA2'nin HDR-bağımsız rolü 37

Şekil 7: Sanger dizileme akışı 42

Şekil 8: Yeni nesil dizileme kimyası genel bakış 44

Şekil 9: Telomer yapısı 46

Şekil 10: T-ilmek ve D-ilmek Yapısı 47

Şekil 11: BRCA1/2 mutasyonlarını, telomer pertürbasyonlarını ve malign transformasyonu birbirine bağlayan olası bir akış şeması 56

Şekil 12: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı NCBI/ClinVar araması 70

Şekil 13: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı NCBI/ClinVar detaylı araması 70

Şekil 14: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı ExAc veritabanı araması 71

Şekil 15: BRCA2 geni c.3751_3752insA (p.Thr1251AsnfsTer14) varyantı NCBI/ClinVar detaylı araması 71

Şekil 16: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı PolyPhen-2 72

Şekil 17: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı PolyPhen-2 sonucu 72

Şekil 18: Örnek vcf dosyası ve tüm BRCA1/2 gen mutasyonlarının ilgili veri tabanına girildiğinde elde edilen CADD skoru sonuçları 73

Şekil 19: PROVEAN algoritmasına veri yükleme 74

Şekil 20:PROVEAN tahmini skorları 74

Şekil 21: SIFT algotirmasına veri girişi 75

Şekil 22: SIFT analiz sonuçları 76

Şekil 23: RT-PZR amplifikasyon eğrisi. 81

Şekil 24: RT-PZR erime sıcaklığı eğrisi. 81

Şekil 25: Normalite Grafikleri 83

Şekil 26: Normalite Testleri 83

Şekil 27:Bağımlı örneklem t-test sonucu-1 84

Şekil 28:Bağımlı örneklem t-test sonucu-2 85

Şekil 29:Bağımlı örneklem t-test sonucu-3 86

Şekil 30:Bağımlı örneklem t-test sonucu-4 87

Şekil 31: Bağımlı örneklem t-test sonucu-5 87

KISALTMALAR ve SİMGELER

36B4	Ribosomal protein lateral stalk subunit P0
A	Adenin
ALT	Alternatif telomer uzaması
Apollo	DNA Cross-Link Repair 1B
ATM	ATM Serine/Threonine Kinaz (Ataxia Telangiectasia Mutated)
ATP	Adenozin trifosfat
ATR	ATR Serine/Threonine Kinaz (Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein)
BARD1	BRCA1 ilişkili RING domain protein 1
BASC	BRCA1 ile ilişkili genom-gözetim kompleksi
BLM	Bloom Syndrome RecQ benzeri Helikaz
BRCA1/2	Meme Kanseri 1/2
BRCT	BRCA1 C-terminali
BRIP1	BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helikaz 1
C	Sitozin
CA	Kanser Antijeni
CADD	Combined Annotation Dependent Depletion
CDH1	Kaderin 1 geni
CDK1	Siklin bağımlı kinaz 1
cDNA	Komplementer (Tamamlayıcı) DNA
CEA	Karsinoembriyonik antijen
CHEK2	Checkpoint Kinaz 2
ChIP-seq	Kromatin İmmunopresipitasyon Sekanslama
Chk1/Chk2	Checkpoint Kinaz 1/Checkpoint Kinaz 2
cKO	Koşullu nakavt
Ct	Cycle Treshold
DBD	DNA-bağlama bölgesi
ddNTP'	Dideoksinükleotit
del	Delesyon
Δ	Delta
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT-1	DNA Metiltransferaz 1
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DSBs	DNA çift iplikli kırılmaları
DSÖ / WHO	Dünya Sağlık Örgütü / World Health Organization
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	Östrojen Reseptörü
EtOH	Etanol
FANCD2	Fanconi anemia group D2 protein
G	Guanin

GATK	The Genome Analysis Toolkit
HD	Sarmal domain
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
hTERT	Telomerase Reverse Transcriptase/ Telomeraz Ters Transkriptaz
IDC	İnvaziv duktal karsinoma
IHC	İmmünohistokimya
ILC	İnvaziv Lobüler Karsinom
İndel	Ekleme-silme
ins	İnsersiyon
kDa	Kilodalton
Ku70/80	ATP-Dependent DNA Helikaz II, 70 KDa Subunit/80 KDa Subunit
LKB1	Liver kinase B1
Lys-6	Lizin 6
M1/2	Mortalite evre 1/2
methyl-seq	Tüm genom epigenetik profillemesi
µ	Mikro
MLH1	MutL Homolog 1
MLL3/4	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 3
MRE11	Mayotik Rekombinasyon 11
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MRNkompleks	Mre11-Rad50-Nbs1
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS Homolog 6
MUC 1	Müsin 1
MUTYH	MutY DNA Glycosylase
NBN	Nibrin
Nbs1	Nibrin (NBN)
NES	Nükleer çıkış sinyali
NGS	Yeni nesil dizileme
NHEJ	Homolog olmayan uç birleşimi
NIPT	İnvazif olmayan prenatal test
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
Nmi	N-Myc ve c-Myc etkileşimli protein
OB	Oligonükleotid / oligosakkarit bağlayıcı
PALB2	Partner And Localizer Of BRCA2
PARP1	Poli (ADP-riboz) polimeraz 1
PCNA	Proliferatif Hücre Çekirdek Antijeni
PINX1	PIN2 / TERF1 etkileşimli telomeraz inhibitörü 1
PML	Nükleer cisimler
PMS1	DNA Mismatch Repair Protein PMS1
PMS2	DNA Mismatch Repair Protein PMS2
PNA	Peptit nükleik asit
POT1	Protection of Telomeres 1
PR	Progesteron Reseptörü
PROVEAN	Protein Variation Effect Analyzer
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog

PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q-FISH	Kantitatif Floresan İn Situ Hibridizasyon
Q-PZR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAD50	RAD50 Double Strand Break Repair Protein
RAD51C	RAD51 Paralog C
RAD51D	RAD51 Paralog D
Rap1	Ras-Related Protein Rap-1
Rb	Retinoblastoma proteini
RecQhelikaz	RecQ Like Helikaz
RING	Really Interesting New Gene
RNA-seq	Tüm transkriptom analizi
RT-PZR	Eş (Gerçek) zamanlı PZR
SBS	Sentez yoluyla dizileme
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNP	Tek nükleotid polimorfizm
SPSS	The Statistical Package for the Social Sciences
ssDNA	Tek iplikçikli DNA
STELA	Southern Blot, Tek Telomer Uzunluğu Analizi
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
T	Timin
T/S	Telomer geni/tek kopya geni- oranı
TERC	Telomeraz RNA bileşeni
TERT	Telomeraz ters transkriptaz
TIN2	Telomeric Repeat Binding Factor 1 Interacting Nuclear Factor 2
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNM	Tümör Nod Metastaz
TP53(P53)	Tümör protein 53
TPP1	Tripeptidyl Peptidase 1
TRF	Terminal restriksiyon fragmentleri
TRF1/2	Telomerik tekrarlama faktörü 1 / 2
WES	Tüm Ekzom dizileme
WGS	Tüm genom dizileme
WRN	Werner Syndrome RecQ Like Helikaz
XPF/ERCC1	ERCC Excision Repair 1, Endonuclease Non-Catalytic Subunit
XRCC2	X-Ray Repair Cross Complementing 2
Zn^{+2}	Çinko

5. TÜRKÇE ÖZET

Ailesel Meme Kanseri Hastalarında Kalıtsal Genlerin Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile Dizilenmesi ve Telomer Uzunluğuyla İlişkisi

Öğrencinin Adı: İrem PEKER EYÜBOĞLU

Danışmanı: Prof.Dr.Mustafa AKKİPRİK

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Amaç: Kalıtsal meme kanserinin en yaygın sebebi, meme kanseri geni-1 ve 2 (BRCA1 ve BRCA2) genlerinde kalıtılan mutasyonlardır. BRCA1 ve BRCA2 genleri, meme kanserinin yaygınlığı nedeniyle, günümüzde en fazla dizilenen genler arasındadır. Bu çalışmada, erken yaşta meme kanseri gelişen hastalarda ve meme kanseri gelişme riski taşıyan bireylerde yeni nesil dizileme yöntemi ile BRCA1/2 genlerindeki mutasyonları belirlemek ve telomer uzunluğu ile arasındaki ilişkiyi değerlendirmek hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Hastalardan edinilen kan örneklerinden DNA izolasyonu sonrası yeni nesil dizileme yöntemiyle BRCA1 ve BRCA2 geni dizilemesi ve gerçek zamanlı PZR reaksiyonu ile telomer uzunluğu ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: 113 bireyden oluşan hasta ve yüksek risk grubunda, 66 örnekte (%58,4) BRCA1 ve/veya BRCA2 geninde herhangi bir mutasyon belirlenememiş, diğer 47 örnekte (%41,6), 31 BRCA2 geni mutasyonu ve 21 BRCA1 geni mutasyonu tanımlanmıştır. Hastaların telomer uzunlukları ile mutasyon varlığı karşılaştırıldığında, mutasyon taşıyan bireylerin, yaş eşlesmesi yapılan mutasyon taşımayan bireylerden istatistiksel olarak anlamlı derecede kısa olduğu bulunmuştur.

Sonuçlar: Elde ettiğimiz bulgular meme kanseri gelşme riski yüksek olan bireylerde BRCA1 ve BRCA2 genlerinin mutasyonel analizinin önemini göstermektedir. BRCA1 ve BRCA2 geninde mutasyon taşıyan kişilerin, taşımayanlara göre daha kısa telomer uzunluğuna sahip olması, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin telomer uzunluğu mekanizmasında rol aldığı yönündeki bulguları desteklemektedir.

Anahtar Sözcükler: Meme Kanseri, BRCA1, BRCA2, Telomer Uzunluğu, Yeni Nesil Dizileme

6. SUMMARY

Sequencing Hereditary Genes with Next Generation Sequencing Method in Familial Breast Cancer Patients and Their Relation with Telomere Length

Name of Student: Irem PEKER EYUBOGLU

Supervisor: Prof.Dr.Mustafa AKKIPRIK

Department: Medical Biology and Genetics

Objective: The most common cause of hereditary breast cancer is the mutations inherited in the genes of breast cancer gene-1 and 2 (BRCA1 and 2). These genes are among the most sequenced genes due to the prevalence of breast cancer. It was aimed to determine mutations in BRCA1/2 genes by the next generation sequencing method and to evaluate the relationship between telomere length in patients who develop early breast cancer and who are at risk of developing breast cancer.

Materials and Methods: After DNA isolation from the blood samples obtained by the patients, BRCA1 and BRCA2 gene sequencing by the next generation sequencing method and telomere length measurement with real-time PCR reaction were performed.

Results: No mutation was detected in the BRCA1 and/or BRCA2 gene in 66 patients (58.4%) in the patient and high-risk group consisting of 113 individuals, and in 47 other samples (41.6%), 31 BRCA2 gene mutations and 21 BRCA1 gene mutations were identified. When mutation status were compared with telomere length, it was found that the individuals carrying a mutation in either BRCA1 and/or BRCA2 gene were shorter than those who did not carry the mutation and this result was statistically significant.

Conclusion: Our findings indicate the importance of mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in individuals with high risk of developing breast cancer. The shorter telomere length of BRCA1 and BRCA2 gene mutants compared to non-mutants supports the findings that BRCA1 and BRCA2 genes play a role in the telomere length mechanism.

Key Words: Breast Cancer, BRCA1, BRCA2, Telomere Lenght, Next Generation Sequencing

7. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, uzun yıllardan beri varlığını sürdürmekte olan genetik bir hastalıktır ve dünya çapında önemli bir insan sağlığı problemidir. Onkogenik sürücüleri aktive eden mutasyonlarla başlatılan tümör hücrelerinin büyümesi ile meydana gelir (D. S. Chen ve Mellman, 2017).

Meme kanserinin etiyolojisi multifaktöriyeldir, yüksek penetransa sahip iki gen (BRCA1/2) meme kanseri riskini arttırmaktadır, bunların haricinde geç menopoz, obezite (post-menopozal kadın), östrojen replasman tedavisi, ileri yaşta hamilelik, hiç çocuk doğurmama ve doğum kontrol hapı kullanma da meme kanseri etiyolojisinde önemli rol oynar. Meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'u kalıtsaldır ve otozomal dominant olarak kalıtılır. Kalıtsal meme kanserinin en yaygın sebebi, yaklaşık %30'luk görülme sıklığıyla meme kanseri geni-1 ve 2 (BRCA1 ve BRCA2) genlerinde kalıtılan mutasyonlardır. BRCA1 geni insan kromozomunun 17q21 bölgesine lokalize ve 24 ekzonlu bir gendir, 863 amino asitlik 220 kDa büyüklüğünde protein kodlar (Banerjee, 2008). BRCA2 geni, kromozom 13'ün uzun kolunda (13q12.3) bulunur ve 3 418 amino asitlik bir protein kodlayan 27 ekzondan oluşur (Wooster ve ark., 1994). Bu genler tümör supresör genlerdir, deoksiribonükleik asit (DNA) çift zincir kırıkları onarımında işlev görürler ve kanseri önlemeye yardım ederler (Scully ve Livingston, 2000). Bu genlerle kalıtılan birden fazla tipteki mutasyonlar kişinin yaşam boyunca meme kanseri geliştirme riskini yüksek kılar. ve bu genlerde mutasyon görülmektedir. BRCA1 mutasyonuna sahip kadınlarda meme kanserine yakalanma riski ortalama %55-65 iken bazılarında bu oran %80'e kadar yükselebilmektedir. BRCA2 mutasyonları riski ise daha düşüktür (yaklaşık %45). BRCA2 kalıtımsal mutasyonlu kadınlar diğer kanserleri (özellikle ovaryum kanseri) geliştirme riskine de sahiptir. Bu mutasyonları taşıyan kişilerde ailesel risk olduğu şüphesizdir, ancak bu risk yalnızca bu mutasyonları taşımalarından kaynaklanmamaktadır. Ailesel risk bu mutasyonları taşıma ve yaşam tarzı birleştiğinde önem kazanmaktadır. Erkeklerde özellikle BRCA2 geninde

mutasyon taşımaları meme kanseri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Antoniou ve ark., 2003).

DNA dizi analizleri ya da sekanslama, DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Yeni nesil dizileme yöntemleriyle geniş kapsamlı genom ve transkriptom analizleri hızlı, yüksek doğrulukta ve ucuz bir şekilde yapılabilmektedir, aynı anda milyonlarca kısa dizileme yapılmaktadır. BRCA1 ve BRCA2 genlerinin yeni nesil dizileme yöntemleriyle daha kolay dizilenmesi için geliştirilmiş paneller vardır ve hasta DNA'sından çalışılmaktadır (Pilgrim, Pain, ve Tischkowitz, 2014).

Türk popülasyonunda BRCA1 ve BRCA2 geni ile yapılmış çalışmalar sınırlı olup yeni nesil dizileme yöntemiyle yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Aydın ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 211 hastada BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) test ile taranmış olup 4 hastada BRCA1 yeniden düzenlenmesi bulunmuş, 4 hastanın ikisinde ekzon 21 delesyonu, iki hastada da ekzon 18 ve 19 delesyonu tespit edilmiş ancak BRCA2 geninde herhangi bir yeniden düzenlenmeye rastlanmamıştır (Aydin ve ark., 2011). Yazıcı ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ailesel meme veya over kanseri hikayesi bulunan 53 hasta ve 50 yaş öncesi meme kanseri görülmüş ama aile hikayesi olmayan 52 hasta çalışmaya alınmış, protein truncation test ile BRCA2 ekzon 10 ve 11, BRCA1 ekzon 11 mutasyonları taranmış, 24 hastada da diğer ekzonlar dizilenmiş. Çalışma sonucunda meme kanserli 3, over kanserli 1 hastada BRCA1'in 11. ekzonunda (sırasıyla 1623delTTAAA, 2139delC, 3819delGTAAA, 2476delT), 2 meme kanserli hastada BRCA2 geninin 11. ekzonunda (5295 insA, 6656delC), 1 meme kanserli hastada BRCA1'in 14. ekzonunda (4508delC), başka bir meme kanserli ve başka bir over kanserli hastada BRCA1'in 20. ekzonunda (5382 insC) ve son olarak bir meme kanserli hastada BRCA1 geninin 2. ekzonunda (185insA) çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları tanımlanmıştır (Yazici ve ark., 2000).

Telomerler, 1930'larda kromozom uçlarını stabilize eden temel bileşenler olarak tanımlanmıştır. Telomer, sürekli tekrarlanan kısa DNA tekrarları ve ilgili koruyucu

proteinler ile etkileşim halinde bulunan, kromozom uçlarında oldukça düzenlenmiş ve dinamik bir komplekstir (Şekil 9). Telomerler, doğrusal kromozomların uçlarına lokalize, GT bakımından zengin nükleotid tekrar dizisinin (omurgalılarda 5' TTAGGG 3') ardışık dizilerini içerirler (Blackburn, Epel, ve Lin, 2015). Telomerler, kromozom uçlarının, çift zincirli kopma onarımına ihtiyaç duyan hasarlı DNA olarak tanınmasını önler ve sonuç olarak, kromozom-kromozom füzyonlarına ve yeniden düzenlenmelere karşı korunarak genomik bütünlüğün korunmasına yardımcı olur (Barrett, Iles, Dunning, ve Pooley, 2015).

BRCA1/2 mutasyon taşıyıcılarında telomer uzunluğu ile ilgili literatür bilgileri çelişkilidir. Killick ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada BRCA1/2 mutasyon durumu ve telomer uzunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır (Killick ve ark., 2014). Chene ve arkadaşları over ve tubal displazi hastalarında yaptıkları çalışmada telomer uzunluğunun BRCA mutasyonu durumunda önemli ölçüde değiştiğini, BRCA1 mutasyonu durumunda T/S (Telomer/tek gen) oranının 0,56, BRCA2 mutasyonu durumunda 0,80 olduğunu ve dolayısıyla telomer uzunluğunun BRCA1 alt grubunda daha kısa olduğunu bulmuştur. Bu veriler, BRCA1 mutasyonlarının hem over hem de tubal displazide BRCA2 mutasyonlarından telomer kısalması üzerinde daha fazla etkiye sahip olabileceğini ve bu bulguyu doğrulamak ve olası altta yatan mekanizmaları araştırmak için daha ileri çalışmalar gerektiğini göstermektedir (Chene, Tchirkov, Pierre-eymard, Dauplat, Raoelfils, Cayre, Watkin, Vago, ve Penault-llorca, 2013a). Thorvaldsdottir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, BRCA2 mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarında, sporadik olgulara oranla daha kısa telomer uzunluğu saptanmış, ancak düşük örnek sayısı sebebiyle istatistiksel olarak bir anlam bulunamadığı belirtilmiştir. Meme kanseri tanısı almadan elde ettikleri örnekleri kullanarak, kısa telomerlerin BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında artmış meme kanseri riski ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu saptamışlardır (Thorvaldsdottir, Aradottir, ve Stefansson, 2017). Al-Wahiby ve arkadaşları BRCA1 kusurlu hücrelerin hafif bir telomer disfonksiyon fenotipi gösterdiklerini, ancak BRCA1'in normal memeli hücrelerinde telomer veya telomer proteinleri ile ilişkili olduğuna dair kanıt olmadığını belirtmiştir (Slijepcevic ve Al-wahiby, 2005).

Bu araştırmada, erken yaşta meme kanseri gelişen hastalarda ve meme kanseri gelişme riski taşıyan bireylerde yeni nesil dizileme yöntemi ile BRCA1/2 gen

mutasyonlarının belirlenerek telomer uzunluğu arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

8. GENEL BİLGİLER

8.1. Kanser

Kanser, uzun yıllardan beri varlığını sürdürmekte olan genetik bir hastalıktır ve dünya çapında önemli bir insan sağlığı problemidir. Onkogenik sürücüleri aktive eden mutasyonlarla başlatılan tümör hücrelerinin büyümesi ile meydana gelir. Bu süreç, tümör proliferasyonunu destekleyen veya bastıran genlerin genetik veya genetik olmayan aktivasyonu veya inaktivasyonu ile birleştirilir. Birçok kanserde onkogeneze, genetik çeşitlilik derecelerini arttırarak kanser hücrelerinin popülasyonlarına seçici bir avantaj sağlayabilen mutasyonların birikmesi eşlik eder (D. S. Chen ve Mellman, 2017).

Tüm kanserlerin ortak bir patogenezi paylaştığı düşünülmektedir. Kanser gelişimi, iki sürece dayanır, her bir hücrede kalıtsal genetik varyasyonun, rastgele mutasyon ve sonuçta ortaya çıkan fenotipik çeşitlilik üzerinde etkili olan doğal seleksiyon ile sürekli olarak edinilmesidir. Seçim, zararlı mutasyonlar edinmiş olan hücreleri ayıklayabilir veya daha etkili bir şekilde çoğalma ve hayatta kalma yeteneğini kazandıran değişiklikleri taşıyan hücreleri besleyebilir. Yetişkin bir insanda, bu hücrelerden binlerce vardır ancak bunların çoğu anormal büyüme potansiyeline sahip değildir. Bununla birlikte, bazen, tek bir hücre, otonom bir şekilde çoğalmasını, dokuları istila etmesini ve metastaz yapmasını sağlayan bir dizi yeterince avantajlı mutasyon elde eder (Stratton, Campbell, ve Futreal, 2010). Kanserler, mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler yoluyla, proliferatif kendini yenileme, göç ve işgali yoluyla bölgesel genişlemeyi güçlendirmek için bileşik olan çeşitli kritik fenotip özelliklerini edinirler (Greaves ve Maley, 2012).

Hücre döngüsü kontrolüne dahil olan genler, kansere neden olan genetik değişikliklere sahip olan genler arasında önemlidir. Kanser mekanizmalarının bir yüzü, hücre sayısındaki artışı, kanser gelişimi veya karsinojenez mekanizmasında hücre proliferasyonunu düzenleyen mekanizmalardaki değişiklikleri içerir. Azalmış hücre ölümü veya apoptoz oranı da bazı kanser türlerine katkıda bulunur. Kanser,

çevredeki dokuları istila edebilmesi nedeniyle diğer tümör oluşturma işlemlerinden ayırt edilir. Tümör oluşumu, beş hız sınırlama aşamasına sahip çok aşamalı bir süreçtir. Bunlar, hücre büyümesini kontrol eden, programlanmış hücre ölümüne duyarlılığı düzenleyen ve genetik stabiliteyi koruyan genlerin aktivitelerini düzenleyen genetik mutasyonlardır (Donepudi, Kondapalli, Amos, ve Venkanteshan, 2014).

8.2. Tümörgenezde Rol Alan Mekanizmalar

Son yıllarda, kansere neden olabilen iki gen değişimine odaklanılmıştır. Biri, hücre büyümesini ve bölünmesini pozitif olarak düzenleyen ürünleri kodlayan onkogenler, diğeri hücre büyümesini ve bölünmesini negatif olarak düzenleyen ürünleri kodlayan tümör baskılayıcı genlerdir. Artan miktarda ürüne yol açan onkogenlerdeki değişiklikler, kontrolsüz hücre çoğalmasına ve tümör oluşumuna neden olabilir. Bir tümör baskılayıcı genin her iki kopyası da değiştirilirse, ürünü etkisiz veya sadece kısmen aktif hale gelebilir, daha sonra negatif kontrol kaybedilebilir ve kontrolsüz hücre büyümesi meydana gelebilir. Kansere neden olan bir diğer, üçüncü sınıf genler ise, DNA tamir genleri olarak tanımlanan, mutasyonları genomik kararsızlıkla sonuçlanan genlerdir (Alberts ve ark., 2007).

8.2.1. Onkogenler

Onkogenler, ekspresyon modelleri değiştiğinde, hücrede neoplastik değişikliklere neden olabilen normal hücresel genlerdir (Alberts ve ark., 2007). Proto-onkogenler, mutasyon geçirdiklerinde normal hücrelerin kansere dönüşmesine neden olan bir grup gendir. Onkogene dönüştürülen bir proto-onkogenin tek bir kopyasının mutasyonu, bir hücre üzerinde baskın, büyümeyi teşvik edici bir etkiye sahiptir. Çoğunlukla, proto-onkogenler hücre bölünmesini uyarmak, hücre farklılaşmasını engellemek ve hücre ölümünü durdurmak için işlev gören proteinleri kodlar. Tüm bu işlemler normal insan gelişimi ve doku ve organların bakımı için önemlidir. Bununla birlikte onkogenler, tipik olarak bu proteinlerin artan üretimini sergilerler, böylece hücre bölünmesinin artmasına, hücre farklılaşmasının azalmasına ve hücre ölümünün inhibisyonuna yol açarlar (Adamson, 1987; T. Wang, Liu, ve

Zhao, 2017; Weinstein ve Joe, 2006). Bir proto-onkogeni onkogene dönüştürebilen 3 tip durum vardır:

(1) DNA dizisinde meydana gelen bir nokta mutasyonu veya delesyonu gibi küçük bir değişiklik protein kodlayan bir sekans içinde meydana geldiğinde sürekli aktif bir protein üretebilir, ya da o gen için düzenleyici bir bölgede gerçekleştiğinde protein aşırı üretimine yol açabilir.

(2) DNA replikasyonundaki hataların neden olabileceği gen amplifikasyon olayları, ekstra gen kopyaları üretebilir ve bir proteinin aşırı üretimine yol açabilir.

(3) DNA sarmalının kırılıp yeniden birleşmesini içeren bir kromozom yeniden düzenlemesi, protein-kodlama bölgesini değiştirip sürekli aktif bir füzyon proteini ile sonuçlanabilir ya da bir gen için kontrol bölgelerini değiştirebilir, böylece normal bir protein aşırı üretilir (Alberts ve ark., 2007).

Protokogenler beş gruba ayrılabilir. İlk proto-onkogenler grubu büyüme faktörlerini kodlar. Bu büyüme faktörleri, belirli hücre tiplerinin çoğalmasını uyarabilmektedir. Aşırı ifade veya anormal bir proteinin ifadesi, gelişmiş hücre proliferasyonuna yol açar. İkinci grup, büyüme faktörü reseptörlerini içerir. Bir reseptörü aktif tutan bir mutasyon, bağımsız hücre büyümesine ve proliferasyon kontrolünün yokluğuna neden olur. Üçüncü grup, yüzey reseptörlerinden aktarılan sinyaller tarafından aktive edilen ve diğer proteinlerin modifikasyonu ile bir sinyal ileten zar ile bağlantılı proteinlerdir. Bu grubun mutasyonları, proteinin aktive edilmiş formunun aşırı ekspresyonuna veya aktivitelerini düzenleyen diğer proteinlere karşı duyarsızlığa yol açar. Dördüncü grup transkripsiyon faktörlerini içerir. Bu proto-onkogenlerin doğrudan aktivasyonu, hücre membranı boyunca ve sitoplazma yoluyla iletilen uygun sinyallerin yokluğunda anormal hücre çoğalmasına veya farklılaşmasına neden olabilir. Son grup programlanmış hücre ölüm düzenleyicileri de dahil olmak üzere diğer proteinleri içerir (Pierotti, Sozzi, ve Croce, 2003). En büyük onkogen ailesi, bir fosfat grubunun ATP'den spesifik hücresel proteinler üzerindeki tirozin amino asitlerinin transferini katalize eden tirozin kinazlardır (Katso ve ark., 1997).

8.2.2. Tümör baskılayıcı genler

Onkogenik alleller aktive edici mutasyonları barındırırken, tümör baskılayıcı genler insan kanserlerinde inaktivasyonlarıyla tanımlanır. Tümör baskılayıcı genlerin alt grubu olan deoksiribonükleik asit (DNA) onarım yolak genleri büyük önem taşır. Son zamanlarda DNA onarım yolağında bulunan gen defektleri oldukça geniş bir insan kanser yelpazesinde rol oynamaktadır. Diğer tümör baskılayıcı genler gibi, DNA tamir genleri insan kanserlerinde etkisiz hale getirilir. Birçok tümör baskılayıcı genin protein ürünlerinin doğrudan büyüme inhibisyonuna veya farklılaşmasına katkısı olurken, DNA yanlış eşleşmelerini tanımakla ilgili olan birçok DNA onarım yolu proteini, hücre büyüme regülasyonunda daha pasif bir role sahiptir (Pierotti ve ark., 2003).

Tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar genellikle çekiniktir, çünkü hücreler gendeki her iki allel silinene, etkisiz hale getiriline veya epigenetik olarak susturuluncaya kadar normal davranmaya eğilimlidir. Bu genlerin birçoğu başlangıçta nadir, kalıtsal kanser sendromlarında tanımlanmıştır, ancak bunların kaybı veya inaktivasyonu birçok sporadik kanserin ortak bir özelliğidir. Bir tümör baskılayıcı genin bir kusurlu ve bir fonksiyonel kopyasını alan bireyler, gelişmekte olan kansere karşı artan bir yatkınlığa sahiptir. Bunun nedeni, vücudun herhangi bir yerinde, işlevsel gen kopyasını ortadan kaldıran veya etkisiz hale getiren tek bir değişiğin, tümör baskılayıcı fonksiyonundan tamamen yoksun bir hücre üretmek için yeterli olmasıdır (Alberts ve ark., 2007).

Apoptozisin kontrolünde rol oynayan genlerden biri, oldukça geniş bir kanser aralığında mutasyona uğrar. Bu tümör baskılayıcı gen, bir hücrenin DNA hasarı ve düşük oksijen (hipoksi) ve büyüme faktörü yoksunluğu da dahil olmak üzere çeşitli diğer hücre streslerine tepkilerini düzenleyen ve hücre içi kontrol yolağında önemli rol oynayan bir proteini kodlar. Bu protein, Tp53 geni tarafından üretilen tümör proteini p53'tür (p53). p53 kusurlu olduğunda, genetik olarak hasar gören bölünen hücreler çoğalmakta, maligniteyi artırabilecek daha fazla genetik hasar biriktirmektedirler (Alberts ve ark., 2007).

Çoğu kalıtsal kanser sendromu, bir tümör baskılayıcı genin mutant bir kopyasının kalıtımına bağlıdır. Bu nedenle BRCA1 geninin bir tümör baskılayıcı gen olduğu ileri sürülmüştür, çünkü BRCA1'in normal kopyasının, mutasyona uğramış

bir BRCA1 geni kopyasına sahip olan kadınlarda ortaya çıkan meme ve yumurtalık kanserlerinde mutasyona uğradığı gösterilmiştir (Holt ve ark., 1996).

8.3. Meme Kanseri

Meme dokusu, süt üretiminde rol alan salgı bezleri lobüllerden, sütü meme başına ileten kanallardan (duktuslardan), yağ dokusu ve fibröz bağ dokusundan oluşur. Meme kanseri, memenin herhangi bir bileşeni içinde düzensiz bir hücre büyümesi olduğunda meydana gelir, ancak bu genellikle lobüllerde görülür. Önemli ölçüde daha az yaygın olmasına rağmen, erkekler arasında meme kanseri de oluşabilir (Winters, Martin, Murphy, ve Shokar, 2017).

Meme kanseri sık görülen, yüksek heterojeniteye sahip bir kanserdir ve kadınlarda kanser ölümünün önde gelen nedenidir, toplam kanser vakalarının %23'ünü ve dünyadaki kanser ölümlerinin %14'ünü oluşturur. Meme kanseri, genomda somatik mutasyon taşıyan diğer kanser türleriyle doğal benzerlik gösterir. Bu mutasyonlar ile beraber protoonkogenler onkogenlere dönüşüp hücreler üzerinde klonal selektif avantaj sağlayarak tümörgenezi tetikler (X. Chen, Fan, ve Song, 2017). Meme kanseri, meme epitelyal dokusunda kötü huylu hücrelerin kontrolsüz büyümesi ile karakterizedir. Daha iyi tedavi seçenekleri ve hasta bakımındaki önemli gelişmeler, mortalitede dramatik bir azalma ve uzun ömürlülükte önemli bir artışa neden olmuştur (Lukong, 2017).

8.3.1. Meme kanseri epidemiyolojisi ve etiyolojisi

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malignitedir ve akciğer ve kolon kanseri ile birlikte dünya çapında en yaygın üç kanserden biridir. Sekiz ila on kadından biri, ömürleri boyunca meme kanserine yakalanır. Dünya çapında yaklaşık 1,7 milyon meme kanseri vakası teşhis edilmekte ya da her 18 saniyede bir yeni vaka bilinmektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa Birliği'nde (AB) meme kanserinden ölümler azalmıştır ve bu azalma genellikle erken teşhis şansı ve etkin sistemik tedavi sebebiyledir. Güney Amerika, Afrika ve Asya'da meme kanseri insidansı, yaşam tarzı değişiklikleri ve tarama programı yetersizliği nedeniyle artmaktadır. Bu bölgelerdeki meme kanserinden ölüm oranı, kısmen son teknoloji tanı ve tedaviye erişim eksikliği nedeniyle artmaktadır (Harbeck ve Gnant, 2017; Winters ve ark.,

2017). Diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de meme kanseri sıklığı hızla artmaktadır. 1993 yılında yapılan bir çalışmada 24,1/100 000 olarak hesaplanan meme kanseri sıklığının, 2010 yılında 50/100 000'e ulaştığı düşünülmektedir. Bu sonuçlardan son 20 yıl içerisinde Türkiye'de meme kanseri sıklığının 2 katından daha fazla arttığı çıkatılmıştır (Özmen, 2014).

Kadınlarda meme kanserinin genel risk faktörleri yaş, infertilite, ilk tam zamanlı gebelik yaşı, menopoz yaşı, ırk, meme özellikleri, hormon kullanımı, alkol kullanımı, tütün kullanımı, diyet, fiziksel aktivite, BRCA1/BRCA2 meme kanseri genindeki veya diğer ailesel yatkınlık genlerindeki kalıtsal mutasyon ve postmenopozal dönemdeki hormonların (östrojen ve/veya progesteron) kullanımıdır (Donepudi ve ark., 2014). Meme kanseri risk faktörleri 3 ana başlıkta toplanabilir;

1) Genetik olmayan değiştirilemeyen risk faktörleri,

2) Genetik olmayan değiştirilebilir risk faktörleri,

3) Genetik risk faktörleri.

Genetik olmayan değiştirilemeyen risk faktörleri arasında yaş, ırk, erken menarş/geç menopoz ve meme özellikleri bulunmaktadır. Meme kanseri insidansı ve mortalitesi yaşla orantılı olarak artar. Dünya genelinde bu hastalığa yakalanma oranı 40 yaşın başından itibaren keskin bir eğimle artar ve 60 yaş civarında zirveye ulaşır. Meme kanserine bağlı ölüm ortanca yaşı 68 yıldır, ortanca yaş siyahi kadınlar için 62, İspanyol olmayan (non-Hispanic) beyaz kadınlar için 69 yıldır. Amerika Birleşik Devletleri'nde siyahi ve beyaz kadınlar arasında meme kanseri sağkalımında önemli farklılıklar vardır. Siyahi kadınlarda meme kanserinin genel görülme sıklığı beyaz kadınlara göre biraz daha düşük olmasına rağmen, siyahi kadınlar tanı anından itibaren ortalama 5 yıllık bir mortalite oranına sahiptir. Buna karşılık, Asya/Pasifik Adalı kadınlar, ABD'de Alaska toplumları, Amerikan Kızılderilileri ve Hispanik kadınlar en düşük insidans ve ölüm oranlarına sahiptir. Menarşta genç yaş ve menopozda daha büyük yaş meme kanseri riskini artırır. Meme kanseri öyküsü olan kadınlar, özellikle tanı için başlangıç yaşı 40 yaşın altındaysa, hastalığı tekrar geliştirme riski daha yüksektir. Ayrıca, daha yoğun memeler meme kanserinin mamografik tespitini bozar ve daha zor teşhis ile daha yüksek risklere neden olur (Tao, Shi, ve Lu, 2015; Winters ve ark., 2017).

Genetik olmayan değiştirilebilir risk faktörleri arasında hormon kullanımı, alkol kullanımı, tütün kullanımı, diyet, fiziksel aktivite, üreme sürecini değiştirme, gelir, eğitim ve sigorta durumu bulunmaktadır. Gecikmiş çocuk sahibi olma, azalan aile büyüklüğü, emzirme süresinin azalması ve hormonal kontraseptiflerin artmış meme kanseri riski ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Menopozal semptomları kontrol etmek için iki genel hormonal tedavi formu vardır. Biri kombine östrojen ve progesteron, diğeri ise sadece östrojen tedavisidir, kombine östrojen ve progesteron tedavisi, meme kanseri gelişme riskini arttırır. Sadece östrojen tedavisi uygulanan hastalarda yapılan diğer çalışmalar da meme kanseri riski ile pozitif bir korelasyon bulmuştur. Mevcut bilgilere göre, menopozdan önce sigaranın meme kanseri riskini artırdığını gösteren kanıtlar vardır. Alkol tüketimi de artmış meme kanseri riskine bağlanmıştır, bazı çalışmalar doza bağımlı bir ilişki bulurken, diğerleri uzun süre boyunca ortalama alkol tüketimi ile bir ilişki bulmuşlardır. Düzenli fiziksel aktivitede bulunan kadınlarda ve yüksek miktarda meyve ve sebze tüketenlerde meme kanseri riskinin azaldığı gösterilmiştir (Winters ve ark., 2017).

Genetik risk faktörleri genellikle iki meme kanseri (BRCA) duyarlılık genlerinden biri olan BRCA1 ve BRCA2'deki genetik mutasyonlardan kaynaklanır, bunlar daha detaylı anlatılacaktır (Winters ve ark., 2017).

8.3.2. Meme kanseri histopatolojik sınıflandırması

Meme kanserinin morfolojik heterojenliği, meme kanserinin histopatolojik sınıflandırılmasının temelini oluşturmaktadır. İnvaziv duktal karsinom (IDC), invaziv meme kanserleri arasında en yaygın (%40-75) görülen histolojik tiptir. IDC'ye ek olarak, WHO sınıflandırması ayırt edici morfolojik özelliklere sahip farklı özel alt türler içerir ve bunlar arasında invaziv lobüler karsinom (ILC) en sık görülen tiptir (%5-15). Meme karsinomunun diğer özel alt tipleri nadirdir ve adjuvan tedaviye prognoz ve yanıt açısından önemli ölçüde farklılık gösterir. Tübüler, müsinöz ve papiller karsinomlar genellikle IDC ve ILC'ye kıyasla mükemmel klinik sonuçlara sahiptir ve her zaman kemoterapi ile tedavi edilmez (Turashvili ve Brogi, 2017).

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, meme tümörlerinin 100'den fazla türü ve alt tipi vardır ve sekiz ana başlıkta toplanmıştır. Bunlar; epitelyal tümörler,

myoepitelyal lezyonlar, mezankimal tümörler, fibroepitelyal tümörler, meme ucu tümörleri, malign lenfoma, metastatik tümörler ve erkek meme tümörleridir. Bu sınıflandırmanın basitleştirilmiş versiyonu Tablo 1 'de gösterilmiştir (Tavassoli ve Devilee, 2003).

Tablo 1: Meme Tümörlerinin sınıflandırılması

Epitelyal tümörler	**Mezenkimal tümörler**
Aksi belirtilmedikçe invazif duktal karsinom	hemanjiyom
İnvazif lobüler karsinom	anjiomatozis
Tübüler karsinom	hemanjioperisitomlar
İnvaziv kribriform karsinom	Psödoanjiyomatöz stromal hiperplazi
Medüller karsinom	miyofibroblastik
Müsinöz karsinom ve fazla musin içeren diğer tümörler	Fibromatozis (agresif)
Nöroendokrin tümörler	Inflamatuar miyofibroblastik tümör
İnvaziv papiller karsinom	lipom
İnvazif mikropapiller karsinoması	Granüler hücre tümörü
Apokrin karsinomu	nörofibroma
Metaplastik karsinomlar	schvvannoma
Saf epitelyal metaplastik karsinomlar	anjiyosarkomu
Skuamöz hücreli karsinom	liposarkomdur
Lipit açısından zengin karsinom	Rabdomyosarkom
Sekretuar karsinom	osteosarkom
Onkositik karsinom	leyomiyom
Adenoid kistik karsinom	leiomyosarkom
Asinik hücreli karsinom	**Fibroepitelyal tümörler**
Glikojen açısından zengin şeffaf hücreli karsinom	fibroadenom
Sebase karsinom	Filloides tümörü
Inflamatuar karsinom	Periductal stromal sarkom, düşük dereceli
Lobüler neoplazi	Meme hamartomu
İntraduktal proliferatif lezyonlar	**Meme ucunun tümörleri**
Mikroinvaziv karsinom	Meme ucu adenomu
Intraduktal papiller neoplazmlar	Syringomatous adenoma
Benign epitelyal proliferasyonlar	Meme ucu Paget hastalığı
Myoepitelyal lezyonlar	**Malign lenfoma**
Myoepitheliosis	Diffüz büyük B hücreli lenfoma
Adenomyoepitelyal adenosis	Burkitt lenfoma
Adenomiyoepiteliyoma	Ekstranodal marjinal bölge B hücreli lenfoma
Malign miyoepiteliyom	Foliküler lenfoma
	Metastatik tümörler
	Erkek memenin tümörleri
	Jinekomasti Karsinomu

İnvaziv meme karsinomu, komşu dokulara invazyon ve uzak bölgelere metastaz yapma eğilimi gösteren bir grup kötü huylu epitelyal tümördür. Bu tümörlerin büyük çoğunluğu adenokarsinomlardır ve meme parankim epitelinden türediği düşünülmektedir. Myoepitelyal lezyonlar ya bir myoepitelyal (ME) hücre popülasyonundan türemiştir. İyi huylu ve kötü huylu mezenkimal tümörler, yumuşak dokularda meydana gelenlere ve aynı zamanda baskın olarak memede meydana gelenlere morfolojik olarak benzerdir. Fibroepitelyal tümörler, epitelyal bir bileşeni ve kantitatif olarak baskın olan mezenkimal bileşeni birleştiren heterojen iki-fazlı

lezyon grubudur. Her bileşen iyi huylu veya kötü huylu doğasına bağlı olarak, çeşitli kombinasyonlarda oluşabilir. Bunlar iki ana kategoride sınıflandırılır: fibroadenomlar ve filloides tümörler. Meme ucu tümörleri, meme başının toplama kanallarının etrafındaki epitelyal ve miyoepitelyal hücrelerle kaplanmış küçük tübüllerin kompakt proliferasyonudur. Meme tümörleri erkeklerde kadınlardan daha az sıklıkta görülür. En sık görülen erkek meme lezyonları jinekomasti, karsinom ve metastatik kanserlerdir. Diğer iyi huylu veya kötü huylu lezyonlar da ortaya çıkar, ancak çok daha nadiren görülür.

8.3.3. Meme kanserinde evreleme ve derece

Meme kanserinin evrelemesi için Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sınıflandırması, tümör boyutunun başlangıçta vücutta başladığı ve taşındığı yerlere dayanmaktadır. Bu kanser özellikleri, tümörün büyüklüğü (T), tümörün lenf nodlarına (N) yayılıp yayılmadığı ve tümörün metastaz yapıp yapmadığı (M) olarak tanımlanmaktadır (Tablo 2). Daha büyük boyut, nodal yayılımı ve metastaz, ileri evre ve daha kötü prognoza sahiptir (Tablo 3). Evre 0, in situ bir hastalık veya meme başının Paget hastalığıdır. Evre 0, kanser öncesi veya duktal karsinoma insitu veya lobüler karsinom insitu belirtecidir. Evre I-III, meme veya bölgesel lenf düğümleri içindeki tümörlerdir. Evre IV metastatik bir kanserdir. Metastatik meme kanseri kötü prognoza sahiptir (Edge ve ark., 2010; Tavassoli ve Devilee, 2003).

Derece 1 tümörler en iyi prognoza sahip iyi farklılaşmış tümörlerdir, derece 2 tümörler orta prognoza sahip orta derecede farklılaşmış tümörlerdir ve derece 3 tümörler kötü prognoza sahip kötü derecede farklılaşmış tümörlerdir. Düşük prognozu olan ve düşük dereceli tümörler az agresif şekilde tedavi edilebilir ve daha iyi bir sağkalım oranına sahip olabilir. Daha yüksek dereceli tümörler daha agresif tedavi edilir ve daha düşük hayatta kalma oranları vardır (Elston ve Ellis, 2002; Genestie ve ark., 1998).

Tablo 2: WHO TNM Sınıflandırması

Primer Tümör (T)		Bölgesel Lenf Nodları (pN) Patolojik Sınıflandırma	
TX	Değerlendirilemeyen primer tümör	*pNx*	Bölgesel lenf nodları saptanamıyor
T0	Primer tümör kanıtı yok	*pN0*	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
Tis	Karsinom *İn Situ*	*pN1*	1 - 3 ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz saptanmış
Tis (DCIS)	Duktal Karsinom *İn Situ*	*pN2*	4 - 9 ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz saptanmış
Tis (LCIS)	Lobuler Karsinom *İn Situ*	*pN3*	10'dan fazla ipsilateral aksiller lenf nodunda metastaz saptanmış
Tis (Paget)	Meme Başının Paget hastalığı (primer başka tümör	**Uzak Metastaz (M)**	
T1	En büyük çapı ≤2 cm tümör	*MX*	Saptanamayan uzak metastaz
T1mic	En büyük çapı ≤0,1 cm mikroenvazyon	*M0*	Uzak metastaz yok
T1a	En büyük çapı ≤0,5 cm, toplamda >0,1 cm, tümör	*M1*	Uzak metastaz var
T1b	En büyük çapı ≤1 cm, toplamda >0,5 cm, tümör	**Bölgesel Lenf Nodları(N) Klinik Sınıflandırma**	
T1c	En büyük çapı ≤2 cm, toplamda >1 cm, tümör	*Nx*	Bölgesel lenf nodları gözlenemiyor
T2	En büyük çapı ≤5 cm, toplamda >2 cm, tümör	*N0*	Bölgesel lenf nodlarına metastaz yok
T3	En büyük çapı >5 cm tümör	*N1*	İpsilateral lenf nodlarına mobil metastaz varlığı
T4	Göğüs duvarı ve/veya deriye direkt yayılımı olan herhangi bir tümör	*N2*	İpsilateral lenf nodlarına fikse metastaz varlığı
T4a	Göğüs duvarına direkt yayılımı olan herhangi bir tümör	*N3*	Aksiller lenf nodu tutulumu olan veya olmayan ipsilateral infraklaviküler lenf nodu (lar) ında metastaz.
T4b	Ödem, portakal kabuğu görünümü, cilt ülserasyonu, aynı memede satellit cilt nodülleri	*N3a*	Infraklaviküler lenf nodunda metastaz
T4c	T4a ve T4b'nin her ikisi birlikte	*N3b*	İç meme ve aksiller lenf nodunda metastaz
T4d	Enflamatuvar karsinom	*N3c*	Supraklaviküler lenf nodunda metastaz

Tablo 3: Meme Kanserinde Evreleme

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Evre IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Evre IIIC	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

8.3.4. Meme kanseri moleküler sınıflandırması

Son yıllarda tümör davranışının daha iyi tahmin edilmesi ve terapötik stratejileri geliştirmek için daha net bir değerlendirme sağlayabilen moleküler parametreler üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Meme kanserlerinin reseptör durumu, geleneksel yöntem olarak, östrojen reseptörlerinin (ER), progesteron reseptörlerinin (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) varlığına dayanarak hücreleri boyayan immünohistokimya (IHC) ile tanımlanır. ER ve PR durumlarına ilişkin mevcut öneriler, örnekte tümör çekirdeğinin en az %1'inin reaktif olması durumunda testlerin pozitif olarak kabul edilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu reseptörleri ölçmenin birincil amacı, hormon tedavisi ile tedavi edilebilen meme kanseri olan hastaları belirlemektir (Donepudi ve ark., 2014). Meme kanserleri, daha

güncel olarak mikrodizi teknolojisini kullanarak gen ekspresyon profillerindeki benzerliklere göre farklı alt gruplara ayrılır. Bazı araştırmacılar, geleneksel patolojik değerlendirmenin daha uzun süre kullanılmayacağını düşünürken, mikroarray tekniğinin geçerli olacağını öngörmüşlerdir. Gen imzası ile tanınan meme kanserlerinin ana alt tipleri şunlardır:

Luminal A: Luminal A, invaziv meme kanserlerinin %50'sini oluşturur. ER/PR pozitif veya HER2 negatiftir. İyi bir prognoza sahiptir ve tipik olarak düşük dereceli ve ER pozitiftir.

Luminal B: Bu kategori, invaziv meme kanserinin %20'sini içermektedir. ER/PR pozitif, HER2/neu ifadesi ise değişkendir (pozitif veya negatif). Proliferasyon belirteci Ki-67 ve histolojik derecelerle ifade edilen proliferasyon indeksi oranı Luminal A'dan yüksektir. Derece 2 invazif duktal karsinoma (IDC) ve mikropapiller karsinomun çoğunu içerir. Endokrin tedavisine ve kemoterapiye yanıt değişkendir ve prognozu Luminal A'dan daha kötüdür.

Her2/neu: Bu grup, tüm invaziv meme kanserlerinin %15'ini oluşturur. HER2/neu güçlü pozitif iken ER/PR genellikle negatiftir. Ki-67 ekspresyonu yüksektir ve TP53 mutasyonu yaygındır. Bu tümörlerin yüksek dereceli ve lenf nodu metastazına sahip olma olasılığı daha yüksektir. Bu grup meme kanseri, kötü prognoza işaret etmekte ve trastuzumab (herceptin) tedavisine en yüksek hassasiyeti göstermektedir.

Bazal Tip/Üçlü negatif: Tipik olarak Sitokeratin 5/6 (SK, CK 5/6) ve/veya Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) pozitif, ER/PR negatif ve HER2 negatiftir. Ki-67 ekspresyonu yüksektir ve TP53 mutasyonu yaygındır. Tüm invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. Bu grupta, yüksek dereceli invaziv kanserlerin ve iyi prognoza sahip IDC'nin diğer düşük dereceli özel alt tiplerinin çoğu yer almaktadır. Endokrin tedavisine veya trastuzumab'a karşı bir yanıtı yoktur, fakat platin bazlı kemoterapiye ve poli (adenosin difosfat-riboz) polimeraz inhibitörlerine karşı duyarlı görünmektedir. Genellikle kötü prognoza sahiptir ve gen ekspresyonu verileri, bu üçlü negatif kanserlerin moleküler alt tipleri heterojen bir topluluğundan oluştuğunu düşündürmektedir (K. N. Anderson, Schwab, ve Martinez, 2015; W. F. Anderson, Rosenberg, Prat, Perou, ve Sherman, 2014; Makki, 2015; Prat ve ark., 2015).

Reseptör durumu tüm meme kanserleri için tamoksifen/trastuzumab gibi hedeflenmiş tedavilerin kullanılmasının uygunluğunu belirlediği için kritik bir değerlendirmedir. ER + kanser hücreleri, büyümeleri için östrojene bağlıdır, bu nedenle ya östrojenin (örneğin, tamoksifen) etkisini veya mevcut östrojen seviyesini (örneğin aromataz inhibitörleri) azaltmak için ilaçlarla tedavi edilebilirler ve genellikle daha iyi bir prognoza sahiplerdir. Genel olarak, modern tedavilerden önce, HER2 (+) daha kötü bir prognoza sahipti, ancak HER2 (+) kanser hücreleri, monoklonal antikor, trastuzumab (geleneksel kemoterapi ile kombinasyon halinde) gibi ilaçlara tepki verir ve bu, prognozu iyi yönde önemli ölçüde geliştirmiştir. Aksine, hedefe yönelik tedavilerden yoksun üçlü negatif kanser, nispeten kötü bir prognoza sahiptir (Dent ve ark., 2007; Sotiriou ve Pusztai, 2009; Suman ve ark., 2005).

8.3.5. Meme kanseri tanısı

Meme kanseri, rutin kendi kendine meme muayenesi, ultrason veya mamografik tarama sırasında tespit edilebilir. Başlangıçta, meme kanseri ile ilgili hiçbir belirti veya semptom yoktur. Başlangıçtaki en yaygın fiziksel işaret ağrısız bir meme topağıdır. Metastazın erken evrelerinde aksiller bölgede şişmiş ve genişlemiş lenf nodları bulunabilir. Kanlı meme başı akıntısı, ağırlığı, kızarıklığı, şişkinliği, meme deformitesi veya retraksiyonları az sık görülen belirtilerdir, ancak meme malignitesinin önemli bir göstergesidir ve ileri evre hastalıkları ile daha belirgindir (Winters ve ark., 2017).

Her iki yılda bir yapılan mamografi taraması, 50-69 yaş grubundaki kadınlarda en yüksek mortalite azaltma faydasıyla sonuçlanmıştır ve Avrupa Birliği ve sayısız bireysel ülke tarafından tavsiye edilmektedir (Senkus ve ark., 2018). 40-49 yaş arası kadınlarda mamografi taramasının etkinliği için kanıt sınırlıdır (Gøtzsche ve Nielsen, 2011). Kanıtlanmış BRCA mutasyonları olsun veya olmasın, ailesel meme kanseri öyküsü olan kadınlarda, mamografi ile kombinasyon halinde manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile yıllık tarama, tek başına mamografi taramasına kıyasla hastalığı daha erken bir aşamada tespit edebileceğinden, önerilir (Warner, Messersmith, ve Causer, 2008).

Kanseri erken dönemde teşhis etmek ve tedaviyi belirlemek için serum belirteçleri de kullanılır. MUC-1 (Müsin 1) ailesi proteinleri (Kanser Antijeni (CA) 15-3 ve CA 27.29), CA 549, karsinoembriyonik antijen (CEA), onkoproteinler (örn. HER2/c-erbB-2) ve sitokeratinler en sık kullanılan serum belirteçleridir (Bieglmayer ve ark., 1991; Dnistrian, Schwartz, Greenberg, Smith, ve Schwartz, 1991).

8.3.6. Meme kanseri tedavisi

Erken meme kanseri, metastaz olmama durumunda oldukça iyileştirilebilir olarak kabul edilir. Terapi, geçmiş yıllarda, tedavi yoğunluğunun azaltılmasıyla, aşırı tedaviden kaçınarak, önemli ölçüde ilerlemiştir. Terapi kavramları tedavi edici bir amaç izler ve moleküler alt tip ve lokorejyonel durumu hesaba katarak multidisipliner bir ortamda karar verilmesi gerekir. Primer konvansiyonel cerrahi, artık tüm hastalar için en uygun seçim değildir. Üçlü negatif ve HER2 pozitif erken meme kanserinde neoadjuvan tedavi yaygın olarak kullanılan bir seçenek haline gelmiştir. Klinik tümör alt tipine bağlı olarak terapötik tedaviler, endokrin terapisi, anti-HER2 hedeflemesi ve kemoterapiyi içerir. Metastatik meme kanserinde tedavi hedefleri, sağkalımın uzaması ve yaşam kalitesinin sürdürülmesidir. HER2'nin hedeflenmesinin yanında endokrin tedavilerdeki ve kombinasyonlardaki ilerlemeler ve yeni hedefe yönelik tedavilerin vaat edilmesi, metastatik meme kanserinde uzun süreli hastalık kontrolünü artırma olasılığını artırmaktadır (Harbeck ve Gnant, 2017).

Tedavi stratejisinin seçimi, hasta ile kapsamlı bir şekilde tartışılmalı ve hastanın tercihleri dikkate alınmalıdır. Hastanın yaş ve genel sağlık durumunun yanı sıra tümör yükü/lokalizasyonu (primer tümörün boyutu ve yeri, lezyon sayısı, lenf nodu tutulumunun kapsamı) ve tümör biyolojisine (biyobelirteçler ve gen ekspresyonu dahil olmak üzere tümör patolojisi) dayanmalıdır. Kalıtsal kanserin olasılığı araştırılmalı ve gerekirse, uygun genetik danışmanlık ve hastanın test edilmesi sonrasında prosedürler tartışılmalıdır. Genç menopoz öncesi hastalarda, olası fertilite sorunları tartışılmalı ve tedaviye başlamadan önce doğurganlık koruma teknikleri konusunda rehberlik sağlanmalıdır (SJ Lee, Schover, Partridge, ve ve ark., 2006; Pruthi, Gostout, ve Lindor, 2010).

Genel olarak meme kanserinde tedavi lokal ve sistemik olarak iki ana başlıkta toplanabilir.

Lokal terapi, cerrahi girişimleri ve radyasyon tedavilerini içerir. Tümör boyutu (meme büyüklüğüne oranla), tümörün çok merkezli oluşu ve çoklu rezeksiyonlardan sonra negatif cerrahi sınırlara ulaşılamaması gibi durumlarda hastalarda mastektomi hala kullanılmaktadır ancak primer meme kanserinin cerrahi tedavisinde en büyük değişiklik, 30 yılı aşkın süredir başlamış olan meme koruma tedavisine doğru bir kayma olmasıdır (Senkus ve ark., 2018).

Radyasyon tedavisi - aynı zamanda radyoterapi olarak da adlandırılır - ameliyattan sonra etrafta kalabilen memedeki kanser hücrelerini yok etmek için oldukça hedefli ve etkili bir yoldur. Kısmi meme irradyasyonu veya hasta yükünü azaltan hipofraksiyone radyoterapi gibi daha az invaziv radyoterapi stratejileri oluşturulmuştur. İntraoperatif radyoterapi, hastalara yönelik yan etkileri azaltmayı amaçlayan destek veya tek başına radyasyon tedavisi olarak kullanılmıştır. Düşük riskli durumlarda meme korumasından sonra radyoterapiyi çıkarmayı amaçlayan denemeler, ikna edici sonuçlar vermemiştir (Barry, Ho, ve Morrow, 2013; Whelan, Pignol, Levine, ve ve ark., 2010).

Meme kanserini tedavi etmek için kullanılan ilaçlar, sistemik tedaviler olarak kabul edilir, çünkü vücudun hemen hemen her yerinde kanser hücrelerine ulaşabilirler. Neoadjuvan sistemik tedavi, boyutu veya tümör ve meme büyüklüğü birlikteliğinden dolayı primer meme korunmasının mümkün olmadığı tedavi durumları için standart bir bakım olarak ortaya çıkmıştır. Hastaların %50'sinden fazlasında patolojik tam yanıt sağlayan alt tiplerde bile, kalan tümörü çıkarmak veya patolojik tam yanıtı doğrulamak için cerrahi gereklidir (Schmidt, 2014; Teshome ve Hunt, 2014).

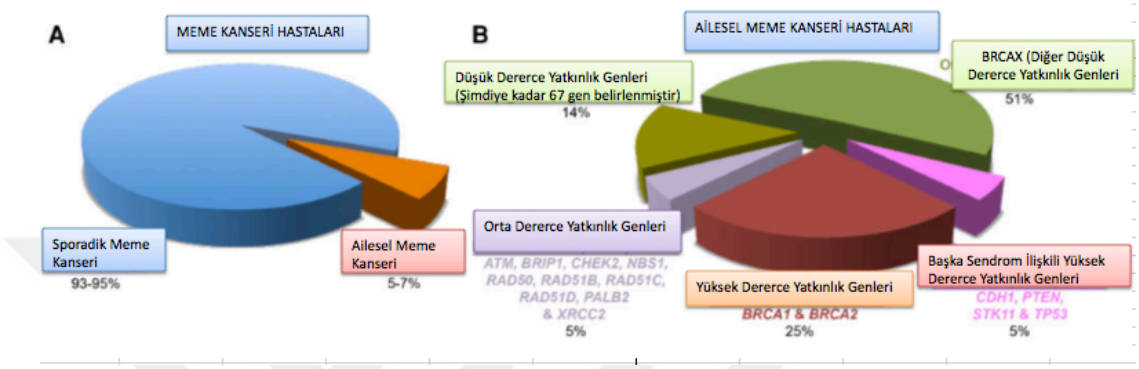
Tüm lüminal erken meme kanserinde, 5-10 yıl boyunca adjuvan endokrin tedavisi standart kabul edilir. Menapoz öncesi hastalarda günde 20 mg tamoksifen standart endokrin tedavisidir ve 5 yıllık tamoksifen tedavisinin rekürrensi azalttığı gösterilmiştir (EBCTCG, 2011). Menapoz sonrası hastalarda, tamoksifen ve aromataz inhibitörleri, ya 5 yıllık tekli terapi olarak ya da ard arda uygulanan terapötik seçeneklerdir (EBCTCG, 2015).

8.4. Ailesel Meme Kanseri Yatkınlık Genleri

Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'unun kalıtsal bir geçmişi olduğu tahmin edilmektedir. Bu aileler belirgin bir dominant kalıtım paterni gösterirler ve sıklıkla erken yaşlarda başlayan meme kanserleri ile karakterizedirler. İlk çalışmalar BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germline mutasyonlarının, kalıtsal meme kanserlerinin çoğunluğundan sorumlu olduğunu ileri sürmüş olsa da, daha yakın tarihli çalışmalarda, iki gendeki mutasyonların, aile meme kanseri riskinin sadece %25-28'ini oluşturduğu gösterilmiştir (Honrado, Benıtez, ve Palacios, 2005; Melchor ve Benıtez, 2013). TP53, CDH1, PTEN, STK11, RAD51C ve RAD51D gibi yüksek yatkınlık genlerinin, ATM, CHEK2, BRIP1, XRCC2 ve PALB2 gibi düşük/orta derede yatkınlık genlerinin meme kanseri riskini arttıran gen varyasyonları belirtilmiştir (Şekil 1). Genel olarak, bu genlerin çoğu, genomik bütünlüğün ve DNA onarım mekanizmalarının korunmasında rol oynamaktadır ve birçoğu, Li-Fraumeni sendromu (TP53), Cowden sendromu (PTEN) ve Peutz-Jeghers sendromu gibi çoklu kanser sendromları ile ilişkilidir (STK11/LKB1) (Vargas, Reis-Filho, ve Lakhani, 2011). 1990'larda BRCA1 ve BRCA2'deki patojenik varyantların kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Diğer kanserlerde de BRCA1 (melanom ve testiküler) ve BRCA2 (erkek meme kanseri, prostat kanseri ve pankreatik kanser) mutasyonlarının artmış olduğunu göstermektedir (Toland ve Andreassen, 2017).

BRCA1 ve BRCA2 taşıyıcılarında ortaya çıkan invaziv meme kanserinin çoğunluğu invazif duktal karsinomlardır (IDC) (%80). BRCA1 tümörleri sporadik tümörler ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir sıklıkta medüller karsinoma rastlanır (%9'a karşılık %2) (Marcus, Watson, Page, ve Al., 1996; Mavaddat ve ark., 2012). Medüller karsinomlar lenf nodu metastazının insidansının düşük olması sebebiyle prognozu olumlu olan ancak kötü diferansiye ve yüksek dereceli karsinomlardır. Medüller karsinomların %11'i BRCA1 germline mutasyonları taşır (Eisinger ve ark., 1998). 4 325 BRCA1 ve 2 568 BRCA2 mutasyon taşıyıcısından alınan patoloji verilerini inceleyen yeni bir çalışmada, BRCA1 taşıyıcılarında ortaya çıkan tümörlerin %78'inin ER-negatif olduğu, BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında ortaya çıkan tümörlerin sadece %23'ünün ER-negatif olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, HER2 aşırı ifadesi sadece mutasyon taşıyıcılarından tümörlerin yaklaşık %10'unda

gözlemlenmiştir. BRCA1/2 olmayan ailesel meme kanserlerinin, histopatolojik özellikler açısından çok heterojen bir kanser grubunu içerdiği gösterilmiştir. Bu kanserlerin genellikle sporadik kanserler ile karşılaştırıldığında daha düşük dereceli olduğu, fakat sporadik kanserlere benzer IHC profilleri olduğu belirlenmiştir (Larsen, Thomassen, Gerdes, ve Kruse, 2014).



Şekil 1: Meme kanseri hastalarının dağılımı

A- Ailesel meme kanseri tüm meme kanseri hastalarının küçük bir yüzdesini temsil eder. B- Yüksek, orta ve düşük penetranslı kanser genlerinde germline mutasyonlara bağlı ailesel meme kanseri hastalarının oranı. BRCA1 ve BRCA2, ailesel meme kanserinin büyük çoğunluğunu açıklamaktadır.

Kanser genetiği alanı hızla gelişmektedir. BRCA mutasyon testine ek olarak yeni nesil kanser panelleri de mevcuttur. Bu paneller, geleneksel dizilemeye kıyasla daha düşük bir maliyetle çoklu genlerin hızlı bir analizini sunar. Elbette ki kansere karışan birçok gen vardır, bu nedenle birden fazla genin aynı anda test edilmesi hem zaman hem de maliyet açısından verimlidir. Panel testleri ile BRCA1/2 mutasyonu taşımayan hastalarda diğer birçok kanser genindeki mutasyonları test etme şansı doğar. Ticari olarak temin edilebilen panellerin bazıları, meme, yumurtalık veya kolon kanseri ile ilgili çoklu genleri test eder. Bu genlerin bazıları BARD1, BRIP1, NBN, RAD50, RAD51C, ATM, PALB2, STK11, CHEK2, PTEN, p53 ve CDH1'dir. Panel testleri için uygun adaylar, BRCA1/2 için test sonucu negatif olan, aile geçmişinde meme, yumurtalık veya kalıtsal başka kanser sendromu olan bireylerdir (Stuckey ve Onstad, 2015).

TP53 bir tümör baskılayıcı gendir ve mutasyonları yetişkinlerde ve çocuklarda Li-Fraumeni sendromuna neden olur. Bu yüksek derece yatkınlık geni, sarkomlar, adrenokortikal karsinomlar, beyin kanseri ve çok erken başlangıçlı meme kanseri dahil olmak üzere geniş bir tümör yelpazesine yatkındır. TP53 mutasyon taşıyıcıları

%90'ı aşan yaşam boyu kanser riskiyle karşı karşıyadır. Li-Fraumeni sendromlu hastalar, artmış sekonder tümör riski nedeniyle terapötik bir yaklaşım olarak kaçınılması gereken düşük doz radyasyona anormal yanıt verirler. Meme kanseri, kadın TP53 mutasyon taşıyıcıları arasında en sık görülen malignite olup, bu vakaların yaklaşık %5'i 30 yaşından önce teşhis edilmektedir (Apostolou ve Fostira, 2013).

Tümör baskılayıcı PTEN genindeki genetik mutasyonlar, Cowden sendromunun nedenidir. Cowden sendromu, tiroid, meme ve endometriyumun iyi huylu ve malign tümörleri riski taşıyan çoklu hamartomlarla karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. Etkilenen bireylerin meme kanseri için %50, tiroid kanseri için %10 ve endometriyal kanser için %5 10'luk bir yaşam boyu riski vardır (Apostolou ve Fostira, 2013).

Apoptoz ve hücre döngüsü regülasyonu için önemli olan bir tümör baskılayıcı gen olan serin/treonin kinaz genindeki (STK11/LKB1) germline mutasyonları Peutz-Jeghers sendromuna neden olur. Peutz-Jeghers sendromu, mukokutanöz pigmentasyon ve hamartomatoz polipozis ile karakterize otozomal dominant kalıtsal bir sendromdur. Yüksek gastrointestinal kanser riskine ek olarak, meme, ince bağırsak, pankreas, yumurtalık, rahim, mide, serviks, akciğer ve testis gibi diğer bölgelerdeki kanser riskinin artması da tanımlanmıştır. STK11 mutasyon taşıyıcıları, herhangi bir kanser için yüksek bir kümülatif risk (%85'e kadar) taşır (Apostolou ve Fostira, 2013).

E-cadherin geni (CDH1), epitelyal hücreler arasındaki bağlantılarda eksprese edilen bir kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyon molekülüdür. CDH1 germline mutasyonları, kalıtsal gastrik karsinom ile ilişkilendirilmiştir. Germline CDH1 mutasyonları olan hastalar artmış lobüler meme kanseri ve kolorektal kanser riski taşırlar. Mutasyonu taşıyan kadınlarda lobular meme kanseri gelişme riski %40-54'dür (Apostolou ve Fostira, 2013).

ATM, DNA çift iplikli kırılmaların onarımında, TP53, BRCA1 ve CHEK2 proteinlerini içeren yolaklar dahil olmak üzere birçok karmaşık fonksiyona sahiptir. ATM mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan kadınlarda genel popülasyona göre 2 kat daha yüksek meme kanseri riskine sahip olduğu öne sürülmüştür. Bu risk 50 yaşın altındaki kadınlarda 5 kat artmıştır (Apostolou ve Fostira, 2013).

RAD51C, Fanconi anemi/BRCA yolağının bir parçasıdır ve Homolog rekombinasyon (HR) ile DNA çift zincir kırılması (DSB) onarımında önemli bir rol oynar. RAD51C'deki homozigot mutasyonlar bir FA fenotipi ile ilişkiliyken, meme ve yumurtalık kanseri ailelerinde heterozigot mutasyonlar belirlenmiştir. RAD51D de Homolog rekombinasyon (HR) ile DNA DNA çift zincir kırılması onarımında önemli bir faktördür. RAD51D proteini, tek iplikli DNA'ya bağlanan ve DNA hasarına yanıt olarak önemli bir rol oynayan RAD51C, RAD51B ve XXRC2 ile bir kompleks oluşturur (Economopoulou, Dimitriadis, ve Psyrri, 2015).

FANCN olarak da bilinen PALB2, homolog rekombinasyon ve çift zincirli kırık onarımı sırasında BRCA2 ile etkileşime giren bir proteini kodlayan bir Fanconi anemi genidir. PALB2 günümüzde üçüncü meme kanseri duyarlılık geni olarak ortaya çıkmakta ve 2006'daki keşfinden bu yana, şimdiye kadar test edilen çoğu meme kanseri popülasyonunda PALB2 mutasyonları, küçük veya çok sayıda olguya sahip ailelerde tespit edilmiştir (Poumpouridou ve Kroupis, 2012).

8.4.1. BRCA1 geni ve yapısı

BRCA1 geninin bir tane kodlanmayan (psödogen), toplamda 24 ekzon içerdiği ve yaklaşık 110 kb DNA’ya yayıldığı belirlenmiştir (Miki ve ark., 1994). BRCA1, yumurtalık, testis ve timusda en yüksek seviyede gözlenmekte olup, insanlarda her yerde ifade edilir. BRCA1 geninin 5-prime ucu, kromozom 17q21 üzerinde duplike bir bölge içinde yer alır. Bu bölge BRCA1 eksonları 1A, 1B ve 2'yi ve çevreleyen intronlarını içerir ve BRCA1 psödogeni BRCA1'in yaklaşık 30 kb upstream bölgesinde bulunur (Puget ve ark., 2002). En büyük BRCA1 ekzonu, 3,4 kb uzunluğunda bir cDNA'ya sahip ekzon 11'dir. BRCA1, kromozom 17q21 üzerinde bulunur ve N-termininde sistein açısından zengin, çinko parmak yapıda bir RING (Really Interesting New Gene) domaini, C-termininde iki BRCT (BRCA1 C Terminus) domaini ve BRCT domaininin yukarısında (upstream) coiled-coil domaini içeren 1 863 amino asitlik, 220 kDa’luk bir proteini kodlar (Şekil 2) (Takaoka ve Miki, 2017). BRCA1 dizisi memeliler arasında iyi korunmamıştır, ancak iki alan, C terminali BRCT motifleri ve N-terminali RING alanı oldukça korunmuştur.

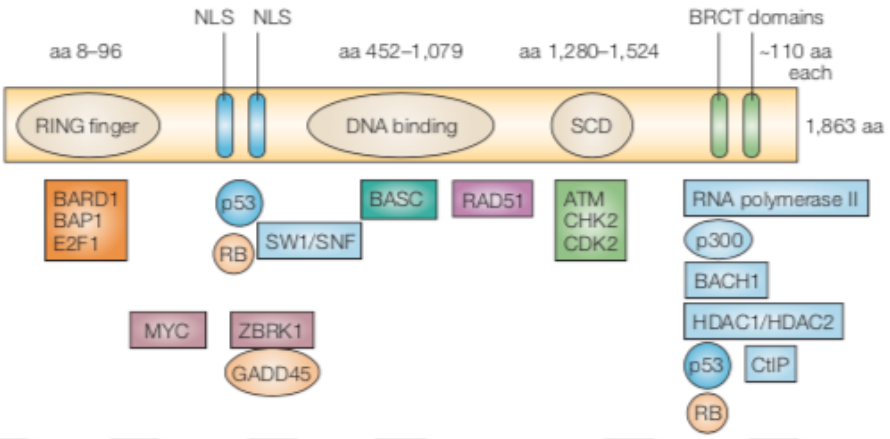
BRCA1 proteini, her biri belirli bir alan ile temsil edilen çeşitli etkileşim yüzeylerinden oluşur. BRCA1'in ilk 110 amino asidi, RING domainidir ve E3

ubikuitin ligaz aktivitesinde rol oynayan en yaygın yapısal motiftir, en az sekiz farklı E2 ubikuitin-konjugat enzimi ile etkileşir. RING domaini BRCA1 dahil olmak üzere birçok DNA onarım proteinlerinde mevcuttur. E3 ubikuitin-protein ligazları, özellikle Lys-6'ya bağlı poliübikuitin zincirlerinin oluşumuna aracılık eder ve DNA hasarına karşı oluşan hücresel tepkilerin DNA onarımında merkezi bir rol oynamasını sağlar. RING domaini bir RING parmağı ve etrafının saran 2 komşu alfa heliks bölgesi içerir. RING parmağı bir β iplikçik, merkezi bir sarmal ve iki Zn^{+2} bağlanma bölgesinden oluşur. BRCA1, BARD1'in RING alanı ile bir heterodimer oluşturur ve bu etkileşim E3 ubikuitin ligaz aktivitesinden sorumludur. BRCA1-BARD1 heterodimeri, DNA hasar onarımı, ubikuitinasyon ve genomik stabiliteyi korumak için transkripsiyonel regülasyon gibi çeşitli hücre yolaklarını koordine eder (Clark, Rodriguez, Snyder, Hankins, ve Boehning, 2012; R. A. Greenberg, 2011).

C-terminal BRCT domaini 1 650 1 863 amino asitleri arasında yer alır, peptidlerdeki bir fosfo-SxxF (S Ser, F Phe ve X değişken) motifini tanıyan fosfo-bağlama modülü içerir. ATM ve ATR gibi DNA hasarıyla aktive olan kinazların substratlarıyla etkileşimlerden sorumludur (Mohammad ve Yaffe, 2009; A. Paul ve Paul, 2015). Abraxas, Bach1 ve CtIP'nin doğrudan fosfo-SxxF motifi ile BRCT domainine bağlandığı gösterilmiştir. BRCA1'in ayrıca, BRCT domaini aracılığıyla DNA hasarına tepki veren birçok başka protein ile etkileştiği bildirilmiştir. PALB2'nin, BRCA1'in coiled-coil domainine bağlandığı ve BRCA1-BRCA2 etkileşimini esnasında köprü görevi gördüğü gösterilmiştir (R.A. Greenberg, 2011; Takaoka ve Miki, 2018). Bu gen ürünü, RNA polimeraz II ve histon deasetilaz kompleksleri ile C-terminali aracılığıyla etkileşir (Scully ve ark., 1997).

BRCA1 11 13 ekzonları, klinik olarak ilgili mutasyonların büyük bir yüzdesini içerir ve BRCA1'in tümör baskılayıcı fonksiyonu için çok önemlidir. BRCA1'in bu orta bölgesinin, transkripsiyon, DNA onarımı ve hücre döngüsü ilerlemesi gibi çok çeşitli hücresel yolaklarda yer alan çeşitli proteinler ile etkileştiği bilinmektedir ve etkileşimli partnerler arasında retinoblastoma proteini (Rb), c-Myc, RAD50 ve RAD51 bulunur. Ekzon 11, iki nükleer lokalizasyon sekansı (NLS) içerir ve BRCA1 proteininin yaklaşık %60'ını kodlar. NLS dizileri, 501-507 ve 607-614 amino asitleri arasında yer alır ve BRCA1 taşıyıcısını sitoplazmadan çekirdeğe ileten importin-alfa ile etkileşime girmeyi kolaylaştırır. NLS'lerin mutasyonları BRCA1'in sitosolik

lokalizasyonuna doğru bir kayma ile sonuçlanır (A. Paul ve Paul, 2015). BRCA1 normal hücrelerde ve meme ve yumurtalık tümör hücre hatlarında nükleer fosfoprotein olarak gözlenmişken, ilginç bir şekilde BRCA1'in baskın olarak sitoplazmik lokalizasyonu meme ve yumurtalık kanseri hücrelerinde gözlenmiştir. Bununla birlikte, diğer birkaç çalışma da BRCA1 lokalizasyonunu hem normal hem de kanser hücrelerinin çekirdeklerinde olduğunu iddia etmiştir (Y. Chen ve ark., 1995).



Şekil 2: BRCA1 domainleri ve etkileşimli proteinler.

1863 amino asitten oluşan BRCA1, bir dizi proteinle etkileşime giren çeşitli önemli fonksiyonel alanları içerir. N-termininde bir RING alanı, C-terminindeki iki BRCT alanı ve BRCT domaininin yukarısında (upstream) coiled-coil domaini içeren 1863 amino asitlik bir proteini kodlar. RING parmak bölgesi BARD1'e bağlanır ve bu bağlanma BRCA1'in ubikuitin-ligaz fonksiyonunu arttırır. BAP1 ve E2F1'e RING-finger bağlanması in vivo çalışmalarla doğrulanmamıştır. p53, MYC, RB ve ZBRK1, nükleer lokalizasyon sinyallerini (NLSs) içeren BRCA1'in bir bölgesine bağlanır. ZBRK1, GADD45 ile etkileştiğinde transkripsiyonu baskılayan bir çinko-parmak proteindir. Çeşitli proteinler (MRE11, RAD50, NBS1, MDC1, ATM, CHK2 ve CDK2 dahil) BRCA1'in merkezi bölgesine bağlanır. SQ-dizilimi domainleri (SCD'ler) olarak bilinen SQ dizileri (serin ve treonin dizilerinin kümeleri) ATM fosforilasyonunun gerçekleştiği bölgeleridir. BRCT alanları, DNA onarım yollarında yer alan birçok proteinde bulunur ve RNA polimeraz II, p300, BACH1, histon deasetilazlar (HDAC) 1 ve 2, p53, CtIP ve RB dahil olmak üzere birçok proteine bağlanır (S. A. Narod ve Foulkes, 2004).

8.4.1.1. BRCA1 fonksiyonu ve mekanizması

BRCA1 ve BRCA2 proteinleri meme, yumurtalık, prostat ve pankreatik kanserlere özgü tümör baskılayıcıları olarak ve genomik stabiliteyi koruyan çok sayıda hücresel yolağı için önemli faktörler olarak iyi bilinmektedir (Takaoka ve Miki, 2018). BRCA1'in bilinen bazı işlevleri karsinojenezdeki rolünü açıklar, bu roller arasında DNA onarımı, hücre döngüsü kontrol noktası kontrolü, protein ubikuitinleşmesi ve kromatin yeniden modellemesi yer almaktadır (Scully ve Livingston, 2000) (Şekil 3).

Şekil 3: BRCA1 ağı.

BRCA1, DNA onarımını, hücre döngüsü ilerleyişini, ubikuilasyonu ve transkripsiyonel düzenlemeyi düzenleyen yolların önemli bir bileşenidir. DNA hasarı (şeklin üstünde gösterilmektedir) BRCA1 aktivasyonunun en önemli tetikleyicilerinden biri olarak düşünülmektedir. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) ve diğer kinazlar dahil olmak üzere birçok hasar sensörü, DNA hasarına tepki olarak aktive edilir. CHK2 de aktive edilir ve BRCA1 ve p53'ü fosforile ederek hücre bölünmesini önler. BRCA1 aktivasyonunun aşağı hedefleri arasında p53 ve retinoblastoma proteini (RB) bulunur. BRCA2 ve RAD51'in, BRCA1'e bağlanan FANCD2 ile etkileşime girdiği ve bir kompleks oluşturduğu düşünülmektedir. Bu kompleks hücre döngüsünü S-fazı veya G2-fazında durdurmaya teşvik eder. BRCA1, hedefleri bilinmemekle birlikte, BARD1'in ubikuitin-ligaz fonksiyonunu aktive etmek için BARD1 ile bir heterodimer oluşturur. Homolog rekombinasyon ile DNA onarımına BRCA1 ilişkili gözetim kompleksi aracılık eder (BLM, MSH2-MSH6 ve MRE11-RAD50-NBS1'den oluşur). Bu kompleks ayrıca transkripsiyonu düzenler. BRCA1'in X-inaktif spesifik transkripti (XIST) ile X-kromozom susturulmasına aracılık etmek için etkileştiği ve ayrıca DNA onarımı sırasında homolog olmayan uç birleşmeye aracılık ettiği gösterilmiştir. BRCA1, kromatin yeniden biçimlenmesi ve homolog rekombinasyona aracılık etmek için hem BACH1 hem de SW1/SNF ile kompleksler oluşturabilir. HDAC'ler, SW1/SNF BRCA1 kompleksinin DNA'ya erişimini düzenler. Son olarak, BRCA1, muhtemelen GADD45 yoluyla, G2/M ve G1/S kontrol noktalarını düzenlemek için CHK1 ve polo benzeri kinaz 1 (PLK1) ile etkileşir; böylece BRCA1'i apoptozun düzenlenmesine bağlar (S. A. Narod ve Foulkes, 2004).

BRCA1 homolog rekombinasyon ile DNA onarımında rol oynamaktadır ve RAD51 ile etkileşerek aktifleşir. RAD51, DNA hasarının homolog rekombinasyon ile tamir edildiği mekanizmanın temel bir bileşenidir. DNA hasar gördüğünde, hem BRCA1 hem de RAD51 hasarlı bölgeye lokalize olur ve bu süreçte BRCA1 fosforile olur ancak RAD51 ve BRCA1 arasındaki etkileşimin doğası bilinmemektedir (Scully ve ark., 1997). BRCA1'in karboksil terminalindeki BRCT motifi, DNA onarımı ve/veya hücre döngüsü kontrol noktalarında yer alan proteinlerin ortak bir özelliğidir. BRCA1, DNA çift iplikli kırılma onarımının iki yolunda rol oynamaktadır: homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ). Hücreler iyonlaştırıcı radyasyona maruz kaldığında, hem BRCA1 hem de

BRCA2 (RAD51 ile birlikte) homolog rekombinasyon ile çift zincir kırılmasını onarır. DNA hasarlı ajanlara maruz kaldığında, BRCA1 hiperfosforile olur ve Rad51 ile birlikte proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA) ile işaretlenen DNA sentezi bölgelerine hızla yerleştirilir. BRCA1 veya BRCA2 için kusurlu olan hücreler, DNA iplikçiklerini çapraz bağlayan veya cisplatin ve mitomisin C gibi çift iplikli DNA'da kopukluk oluşturan ajanlara karşı aşırı duyarlıdır. Bu hücrelerde, çift iplik kırılması, hata eğilimli bir mekanizma ile (homolog olmayan uç birleşmesi gibi) onarılır ve hatalar kromozomal yeniden düzenlemelere yol açabilir. Ortaya çıkan kromozomal instabilitenin karsinojenezin önemli bir özelliği olduğu düşünülmektedir (M. E. Moynahan, Cui, ve Jasin, 2001; S. A. Narod ve Foulkes, 2004; Tassone ve ark., 2003; Yuan ve ark., 1999). BRCA1, BRCA2 ve RAD51 ekspresyon seviyeleri, S fazına girdiğinde hücrelerde artar, bu da DNA replikasyonu sırasında veya sonrasında işlev gördüklerini gösterir. Bu nedenle, BRCA1 ve BRCA2, genomun bütünlüğünden ve kromozomal stabilitenin korunmasından sorumlu ortak bir yolla çalışır (Venkitaraman, 2002). DNA hasarı BRCA1'in nükleer translokasyonunu indükler ve ATM, ATR ve Chk1/Chk2 gibi DNA hasarıyla aktive olan kinazlar aracılığıyla fosforile olur (J. Lee, Collins, Brown, Lee, ve Chung, 2000). BRCA1'in başka bir işlevi de kontrol noktası kontrolünde rol oynamasıdır. BRCA1, BRCA1 ile ilişkili genom-gözetim kompleksinin (BASC) bir parçası olarak bulunabilir. Bu kompleks, tümör baskılayıcıları ve DNA hasar onarım proteinlerini (MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM ve RAD50-MRE11-NBS1 protein kompleksini) içerir (Y. Wang ve ark., 2000).

Ubikuitinleşme, proteinlerin proteazom tarafından yıkım için etiketlendiği süreçtir. Ubikuitinleşme fonksiyonlarına sahip birçok protein bir RING-finger motifi içerir. Hem BRCA1 hem de onun etkileşimli proteini BARD1, amino terminallerinin yakınında bir RING-parmak motifine sahiptir ve BRCA1-BARD1 kompleksinin ubikuitinleşme sürecinde işlev gördüğü gösterilmiştir. BRCA1 ve BARD1, bir E3 ubikuitin ligazı oluşturmak için biraraya gelir. DNA hasarı bölgelerinde durmuş olan RNA polimeraz II, DNA hasarını takiben bu ubikuitin ligaz aracılı yıkım için bir hedeftir, bu sayede tamir mekanizmasına erişim sağlanır. E3 ubikuitin-protein ligaz, özellikle Lys-6'ya bağlı poliubikuitin zincirlerinin oluşumuna aracılık eder ve DNA hasarına hücresel tepkileri kolaylaştırarak DNA onarımında merkezi bir rol oynar.

E3 ubikuitin-protein ligaz aktivitesi, BRCA1'in tümör baskılayıcı fonksiyonu için gereklidir (Hashizume ve ark., 2001; Horwitz, Affar el, Heine, Shi, ve Parvin, 2007).

BRCA1, fosforilasyon durumuna bağlı olarak spesifik alt hedef genlerine geçiş yoluyla DNA hasarına bağlı hücre döngüsü durdurmasını sağlar. BRCA1, G1/S kontrol noktasında sentez fazına geçişi engellemede katkıda bulunan p21cip1/WAF1'i aktive eder. BRCA1'in ATM fosforilasyonu, S fazı kontrol noktası aktivasyonundaki rolü için önemli görünmektedir. BRCA1 ayrıca, G2/M kontrol noktası ile bağlantılı siklin B, 14-3-3sigma, GADD45, wee-1 kinaz ve PLK1 gibi birkaç genin transkripsiyonel regülasyonunda da rol oynar. BRCA1 proteini, p53 tümör baskılayıcı gen ile fiziksel olarak etkileşime girebilir ve p21WAF1/CIP1 mdm2 ve promoterlerinden p53'e bağlı transkripsiyonu uyarabilir (Choudhury, Xu, ve Baer, 2004; S. A. Narod ve Foulkes, 2004).

BRCA1, p53, ER-a, c-Myc, STAT1, CtIP, ZBRK1 gibi transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II ile etkileştiği için, BRCA1'in transkripsiyonel düzenlemede kritik bir rol oynadığı açıktır. BRCA1'in C-terminusu, birçok transkripsiyon faktörünün aktivasyon alanının ortak bir özelliği olan asidik amino asitler bakımından zengindir. BRCA1, birçok transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna yol açan birçok sinyal yolunu düzenler. Bununla birlikte, BRCA1'in transkripsiyonun düzenlenmesindeki rolü değişken olabilir; bazı durumlarda transkripsiyonu aktive edebilir ve diğerlerinde baskı yapabilir. Örneğin, BRCA1'in ATM ve ATR tarafından DNA hasarına cevaben fosforilasyonu, P53 aracılı sinyallemenin aktivasyonu için çok önemlidir. Böylece, P53 aracılı p21 transkripsiyonunu arttırır. BRCA1'in ATM ve ATR tarafından DNA hasarına karşı fosforilasyonu, BRCA1 bağlayıcı proteinlerin modifikasyonunu da etkileyerek çeşitli BRCA1 promotörüne bağlı komplekslerde bulunan proteinlerin düzenlenmesini sağlar. Bunların aksine BRCA1, CDC25A promotöründe c-Myc'nin transkripsiyonel aktivitesini bastırır, bu da bu genin inhibisyonuna yol açar. Ek olarak, BRCA1 östrojen sinyal yolağını etkiler. Östrojen reseptörüne bağlanır ve tümör büyümesi ve anjiyogenez için çok önemli olan bir gen olan VEGF gibi çok sayıda endojen ERα-düzenlenmiş genin ekspresyonu üzerinde negatif etkiye sahiptir. BRCA1, histon proteinlerinin asetilasyonu ve deasetilasyonu ile kromatin yapılarının modifikasyonunu da etkileyebilir. Bununla tutarlı olarak, BRCA1'in HDAC1 ve HDAC2 gibi çoklu histon

deasetilazlarla etkileştiği bilinmektedir (Kawai, Li, Chun, Avraham, ve Avraham, 2002; Mullan, Quinn, ve Harkin, 2006; Sharma, Kaur, Raut, ve Munshi, 2018).

8.4.1.2. BRCA1 ve meme kanseri

Meme kanseri, %46 ile %87 arasında değişen yaşam boyu riskli bir germline BRCA1 patojenik varyantı olan kişilerde en sık görülen malignitedir. ABD'de yapılan bir çalışmada 676 Ashkenazi yahudi ve 1 272 başka etnik gruplardan oluşan ailelerde, 70 yaş altı germline BRCA1 patojenik varyantı olan kadınlarda kümülatif meme kanseri riski %46 olarak tahmin edilmiştir. Ashkenazi Yahudi soyunun kalıtsal meme kanseri ailelerinin çoğu, birtakım BRCA mutasyonlarından kaynaklanmaktadır, bunlardan en yaygını BRCA1 genindeki 185delAG ve 5382insC mutasyonlarıdır (S. Chen ve ark., 2006). 5382insC en sık bildirilen BRCA1 mutasyonlarından biridir ve ailelerin çoğunluğu kuzey veya doğu Avrupalı'dır (Balcı ve ark., 1999).

Kanser hastalarında, BRCA1'deki mutasyonlar en sık 2-7. eksonlar tarafından kodlanan N-terminal RING alanı (amino asitler 1-109), ekzon 11-13'ün kodlanan bölgeleri ve 16-24. eksonlar tarafından kodlanan BRCA1 C-terminali (BRCT) olarak adlandırılan (amino asitler 1650-1863) üç alanda gözlemlenir. Bu üç alan sadece protein etkileşimleri sebebiyle ile değil, aynı zamanda BRCA1 hücre içi lokalizasyonunda rol aldığı için çok önemlidir. RING ve BRCT alanlarının yapıları büyük oranda çözülmüştür, ancak bu iki alan, tam uzunlukta BRCA1 proteininin sadece küçük bir bölümünü kapsamaktadır, oysa 11 ila 13 ekzonları BRCA1 proteininin çoğunluğunu kodlamaktadır ve bu bölgenin yapısı hala bilinmemektedir. Patojenik mutasyonlar her iki alanda da ortaya çıkmakta olup, RING alanı içindeki E3 ligaz aktivitesinin ve BRCT tekrarlarındaki fosfoprotein etkileşimlerinin tümör oluşumunu engellemede katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Clark ve ark., 2012; Fabbro ve ark., 2004; R. A. Greenberg, 2011; A. Paul ve Paul, 2015).

BRCA1/2 genlerinde, otozomal dominant geçişli kodlama veya kodlama olmayan sekanslarda delesyonlar, insersiyonlar ve birçok tek nükleotit değişimleri dahil olmak üzere 2 000'den fazla farklı mutasyon bildirilmiştir. ExAC veri tabanında yer alan son verilere göre BRCA1 geninde 1 320 farklı mutasyon belirtilmiştir. Bu mutasyonlar yaygın olarak delesyon ve insersiyonlara bağlı olan

çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Ekzon 16'daki S1613G ve ekzon 11'deki P871L, Hindistan, Yunanistan, Malezya, Sri Lanka, Türkiye ve İtalya'nın meme kanseri ailelerinde sıklıkla bildirilen BRCA1 genindeki en yaygın tek nükleotid polimorfizmlerini oluşturur. S1613G, major olarak İtalyan kadınlar arasında tespit edilen bir BRCA1 mutasyonudur ve serin-glisin amino asit geçişinden sorumludur. Bu gendeki diğer polimorfizmler, E879E, S919P ve Y1137Y'dir. Çinliler ve Finliler dahil olmak üzere farklı topluluklarda da bildirilmişlerdir (Karami ve Mehdipour, 2013).

Bildirilmiş çoğu BRCA1 mutasyonu Tablo 4'te özetlenmiştir (Karami ve Mehdipour, 2013).

Tablo 4: BRCA1 mutasyonları

ÜLKE	BRCA1 Mutasyonları
Finlandiya	c.5095C>T,4216-2nt A->G, 5370C>T
İsveç	3172ins5, 2594delC, 1806C>T, 1201del11
Danimarka	3172ins5, 1201del11, 1675delA, 1135insC
Norveç	1135insA, 1675delA, 816delGT, 3203del11, 3347delAG
İzlanda	G5193A
Hollanda	Exon 13 ve 22 del, 2804delAA, 5382insC, 1411insT, 2138delA 2312del5, 2457C4T, 185insA, 185delAG, IVS2011G>A, IVS21-36del510
İsviçre	G4956A
Britanya	4184del4, 185DelAG, intron 5 splice, 5382 Ins C, C4446T, 3875del4, 2800delAA, 2080delA, 2594delC
Almanya	655A>G, 4282delAG, 300T>G, 5382insC, 4184del4bp, c.3700_3704del5, exon 17 ve 22 del, Exon 13dup
Fransa	4446C>T, 2953delGTAinsC, R1443X, 3875delGTCT, 3600del11, 4184del4, G1710X, Exons 8-13 del, Exons 3-8 ve 18-20 dup
İtalya	c.3228_3229delAG, c.3285delA, c.1377_1378insA, c.5062_5064delTGT, Exons 17, 9-19, 18-19, 1a-2, 16-20 del 4843delC
Belçika	IVS5+3A>G, E1221X, 2478–2479insG
İspanya	330A>G, c.187_188delAG, c.5385insC, c.5242C>A,c.66_68delAG, c.5123C>A, c.1961delA, c.3770_3771delAG, c.5152+5G>A, Exons 3–5 del
Portekiz	—
Polonya	4153delA, 5382insC, 300T>G, 185delAG, 3819del5, c.190T>C, 2991del5,C5370T, 3875del4
Çek	5382insC, c.3819_3823del5, 300T>G, AluSx ins (g.17686-17695), AluY ins (g.18760-18769),Exons 21–24 del,Exons 5–14 del, exons 1–17 del, c.3700_3704del5
Slovakya	5382insC, 300T>G, 185delAG, c.843_846del4, 300T>G, c.3700_3704del5, c.4243delG
Romanya	5382insC, 300T>G, 461delTC
Yunanistan	5382insC, G1738R, G5331A, 3819delGTAAA
Slovenya	c.1193C>A,c.181T>G, c.1687C>T, 5382insC, c.844_850dupTCATTAC,300T>G, 1806C>T, IVS16−2A>G,c.116G>A, c.844_850dupTCATTAC, c.1687C>T, 300T>G
Avusturya	300T>G, 2795del4, C1806T, 5382insC

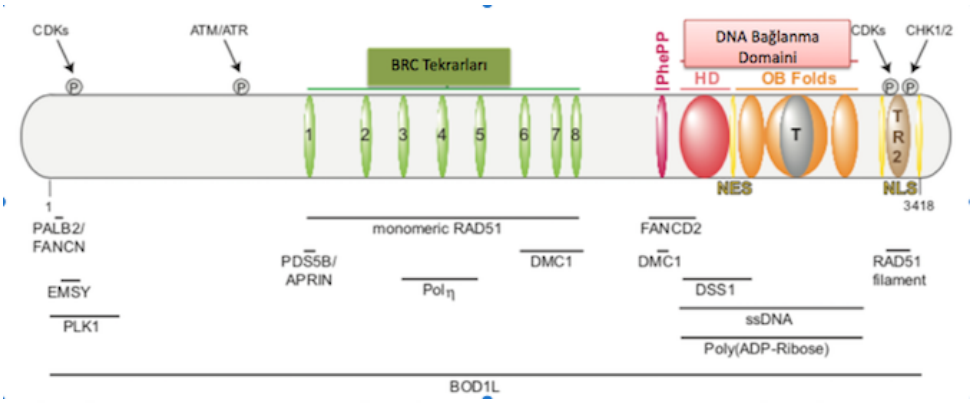
Tablo 4: BRCA1 mutasyonları (devam)	
Hırvatistan	c.3318C>A ve c.4790C>A
Letonya	4153delA, 5382insC, C61G
Macaristan	5382insC, 300T>G, 185delAG
Yugoslavya	5382insC, 185delAG, 3447del4
Belarus	4153delA, 5382insC, C61G
Kıbrıs	5429delG, 3232A.G, 4956A.G
Küba	c.5231delT
Kosta Rika	C3522T
Şili	185AGdel
Brezilya	5382insC
Kolombiya	3450delCAAG ve A1708E (polymorphism), Exons 9-12 del
Bahama	IVS13+1G>A, 4730insG, T5443G, IVS16+6T>C, 943ins10, 185delAG
Venezuela	c.951_952insA, c.1129_1135insA, c.4603G>T ve IVS20+1G>A
Porto Riko	Exons 1-2 del
Meksika	c.3124_3133delAGCAATATTA, c.2805_2808delAGAT
Türkiye	5382insC, 5622C>T
Rusya	5382insC, 4153delA, 185delAG
Japonya	c.307T>A
Kore	509C>A, c.2333delC, c.4065_4068delTCAA 3746_3747insA (c.3627_3628insA), 5199G>T (c.5080G>T)
Çin	3478del5, 5589del8, 1100delAT, 2778G>A, 3552C>T, exon 10 dup, 5,273G>A,c.470_471delCT, c.3342_3345delAGAA, c.5406+1_5406+3delGTA ve c.981_982delAT, 2845A>T, 3300delA, T320G,c.5191C>A
Singapur	Exon 13 dup, 13-15 del, c.2845insA
Malezya	c.2845insA, 4427T>C, 2846insA, 2201C>T ve 4956A>G (79%), 3668A>G, 2731C>T, 3232A.G, 3667A.G, exon 3 dup
Pakistan	4627C>A (22%), 4184del4 (15%), 185delAG ve 2080insA ve IVS14−1G>A (11%), 2041insA ve 4284delAG (8%), 3889delAG ve 2388delG (7%)
Iran	g.-1075C>G, g.-235A>G, g.-134T>C, g.442−34C>T, g.548-58delT, c.2077G>A, c.2082C>T, c.2311T>C, c.2612C>T, c.3113A>G, c.3119G>A, c.3548A>G, c.4308T>C, c.4837A>G, g.4987−68A>G, g.4987−92A>G, g.5075−53C>T, g.5152+66G>A, g.381_389del9ins29, g. 421G>T, g. 1286C>T, IVS16−92A>G, IVS16−68A>G, 4837A>G, IVS18+65G>A, Tyr978X
Lübnan	IVS17−53C>T ve g.381-389del9ins29, 5382insC,G2031T
Hindistan	185delAG, 2983C>A, 3450delCAAG, c.3548A>G, c.-26G>A, c.317-54C>G,5341T>G, 5364C>G, 5379 G>T,1014DelGT,3889DelAG,5382insC
Sri Lanka	c.3086delT, c.5404delG, c.856T>G, IVS17−2A>T
Filipin	5454delC
Viyetnam	185insA
Tayland	3300delA
İsrail	185delAG, Tyr978X, A1708E, 981delAT, C61G
Nijerya	Exon 21 del (c.5277+480_5332+672del), intron 20 (AluSg), intron 21 (AluY)
Mısır	185 del AG, 5454 del C, 4446C>T, 738C>A
Tunus	330 dupA (novel), 4160 delAG, the 2789 delG, 5385 insC , c.4041delAG, c.2551delG ve c.5266dupC, c.798_799delTT
Cezair	c.46_74del29, c.798_799delTT
Fas	c.1016dupA, c.798_799delTT, c.5095C>T, c.4942A>T, c.2805delA/2924delA
Güney Afrika	c.1504_1508del

8.4.2. BRCA2 geni ve yapısı

BRCA2 (Breast Cancer 2/Breast Cancer type 2 Susceptibility Protein) geni, kromozom 13'ün uzun kolunda (13q12.3) bulunur ve 3 418 amino asitlik bir protein kodlayan 27 ekzondan oluşur (Wooster ve ark., 1994). BRCA2 mRNA'nın ekspresyon paterni BRCA1 ile benzerdir, testis, timus ve yumurtalıklarda en yüksek seviyelerde ifade edilir (P. L. Chen ve ark., 1998). BRCA2 proteini çok alanlı bir yapı içerir ve bitkilerden mantarlara kadar çeşitli ökaryotik organizmalarda insan BRCA2'sine tam veya kısmi olarak homolog olan proteinler tanımlanmıştır, fakat maya veya bakterilerde tanımlanamamıştır. BRCA2'de son yirmi yılda önemli yapısal elemanlar tanımlanmıştır (Şekil 4): N-terminali, yaklaşık 35 amino asitlik sekiz korunmuş motiften oluşan BRC tekrarları, uzun bir sarmal domain (HD) ve üç oligonükleotid / oligosakkarit bağlayıcı (OB) katından oluşan DNA-bağlama bölgesi (DBD), ve son olarak C-terminali TR2 alanı (Fradet-turcotte, Sitz, Grapton, ve Orthwein, 2016). BRCA2, ağırlıklı olarak nükleer bir proteindir ve hücresel lokalizasyonu, iki farklı nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve nükleer çıkış sinyali (NES) tarafından kontrol edilir. BRCA2 bir merkez görevi görür ve RAD51 dahil olmak üzere birçok düzenleyici protein ile etkileşir. RAD51, BRCA2 (PALB2) / FANCN ve FANCD2'nin partneri ve lokalizörüdür. Bütün bunlar BRCA2'nin çeşitli biyolojik yollarda yer alan çok işlevli bir protein olduğu fikrini destekler (P. L. Chen ve ark., 1998; Fradet-turcotte ve ark., 2016).

BRCA2'nin N-terminusu (amino asit 10-40) BRCA1 ve BRCA2'yi fiziksel olarak birbirine bağlayan PALB2 / FANCN (Partner and Localizer of BRCA2) ile etkileşir ve bu proteinlerin DNA onarım fonksiyonunun sürdürülmesi için kritik bir bölgedir. Aynı bölge, kromatin yeniden biçimlenmesinde yer alan EMSY ve HP1 proteinlerine de bağlanmıştır. Ek olarak, ekson 3 (amino asit 24-105) tarafından kodlanan bölgenin, transkripsiyonel aktivasyonda rol oynadığı ileri sürülmüştür (Hughes-Davies ve ark., 2003; Milner, Ponder, Hughes-Davies, Seltmann, ve Kouzarides, 1997; Sy, Huen, ve Chen, 2009; Xia ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2009). BRCA2'nin merkezi bölgesi, yaklaşık 35 amino asitten oluşan sekiz BRC tekrarını içerir. Bu tekrar dizilerinin son zamanlarda, RAD51'in DNA hasarı bölgelerindeki tek iplikçikli DNA'ya (ssDNA) yönelmesini kolaylaştırmak için benzersiz fonksiyonel özellikler sergileyen iki grupta (BRC1-4 ve BRC5-8) çalıştığı

gösterilmiştir. Homolog rekombinasyon bağlamında, BRCA2'nin ana işlevi bu yüklemeye aracılık etmektir (Guidugli ve ark., 2014).



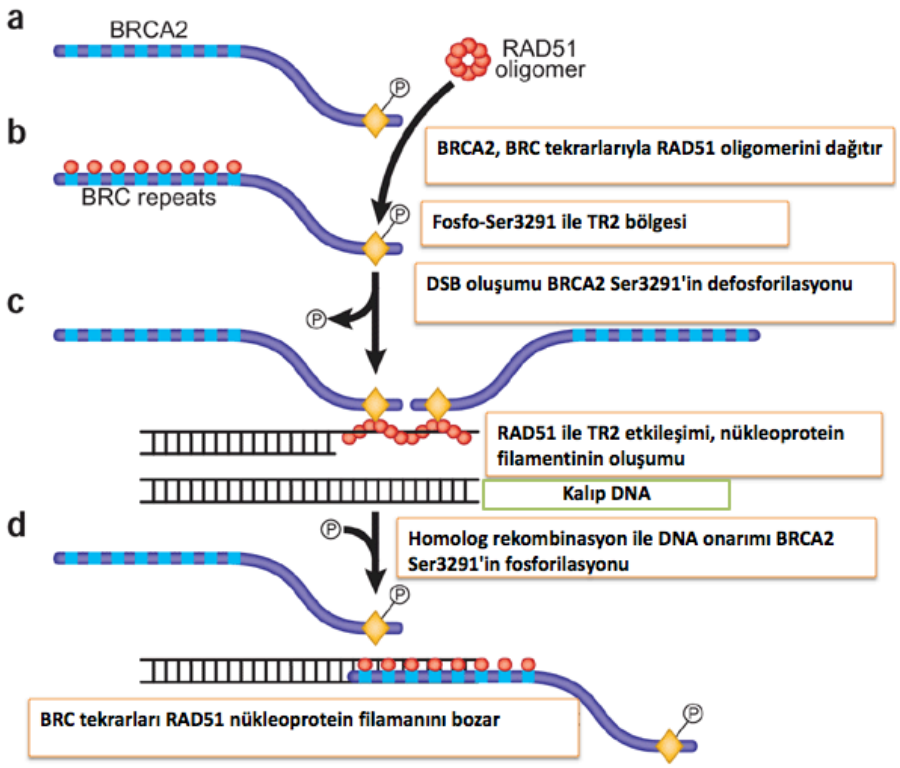
Şekil 4: BRCA2'nin yapısal domainleri ve etkileşimleri.

BRCA2'nin N-terminal alanı, PALB2 ve EMSY dahil olmak üzere çeşitli protein-protein etkileşimlerinde rol alır. BRCA2, proteinin merkezi kısmında yer alan sekiz BRC tekrarını içerir; bu bölge PDS5B / APRIN ve Polıı protein-protein etkileşimlerinin gerçekleştiği bölge olup, esas olarak RAD51'e bağlanmada rol oynarlar. BRCA2 DNA-bağlama alanı (DBD), bir sarmal bölge (HD), üç oligonükleotid / oligosakkarid bağlayıcı (OB) bölge ve bir Tower domain (T) oluşur. BRCA2'nin tek iplikli DNA'ya (ssDNA) ve poli (ADP-Ribose)'a bağlanmasını teşvik ederler. Bu alan ayrıca DSS1 ve FANCD2 ile de ilişkilendirir. BRCA2'nin C-terminusu, RAD51 nükleotidleri ile etkileşime giren TR2 alanını içerir. Ayrıca, BRCA2 nükleer lokalizasyonu için kritik olan iki ayrı nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içerir. BRCA2, siklin bağımlı (CDK, PLK1) ve DNA hasarına bağımlı (ATM/ATR, CHK1/2) kinazlar tarafından translasyon sonrası modifiye edilir (Fradet-turcotte ve ark., 2016).

BRCA2'nin C-terminal bölgesi (amino asitler 2459-3190) bir DNA bağlanma bölgesi (DBD) içerir ve metazoanlar, bitkiler ve mantar ortologları boyunca BRCA2'nin en korunan kısmıdır. Bir heliks alanı, ssDNA bağlayıcı modül olan üç oligonükleotit bağlanma kıvrımı (OB) ve dsDNA'ya bağlandığı düşünülen bir kule alanından (TD) oluşur. DBD ayrıca, ubikuitin bağımlı protein döngüsünde yer alan ve muhtemelen BRCA2'yi stabilize eden bir protein olan DSS1'e bağlanır. Son zamanlarda BRCA2'nin nükleer lokalizasyonunun, bu pozisyonda bulunan bir NES aracılığıyla BRCA2 ile DSS1 etkileşimi tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Ek olarak, BRCA2'nin C-terminusu, başka bir RAD51 bağlayıcı bölge (3265-3330 amino asit) içerir ve siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1) ile fosforile olur. CDK1, RAD51 filamanlarıyla BRCA2 etkileşimini düzenler ve mitoz başlangıcı için önemlidir (Ayoub ve ark., 2009; Funakoshi, Li, Velichutina, Hochstrasser, ve Kobayashi, 2004; Holloman, 2011; Jeyasekharan ve ark., 2013; J. Li ve ark., 2006; Sone, Saeki, Tohe, ve Yokosawa, 2004).

8.4.2.1. BRCA2 fonksiyonu ve mekanizması

BRCA2 proteininin DNA onarımı ve genom stabilitesinin korunmasındaki rolü, ilk olarak BRCA2 eksik hücrelerin DNA'ya zarar veren ajanlara karşı aşırı duyarlılığı ile gösterilmiştir. Spesifik olarak, bu hücrelerdeki DNA çift zincir kırılmalarının homolog rekombinasyon ile onarılamadığı gösterilmiştir. Homolog Rekombinasyon onarım mekanizması, hücre döngüsünün S ve G2 fazları sırasında replikasyona bağlı DSB'lerin doğru onarımı için şablon olarak kardeş kromatidleri kullanır. Homolog olmayan uç birleşimi (NHEJ) de dahil olmak üzere diğer çift zincir kırığı onarım mekanizmaları hataya eğilimlidir ve translokasyonlar ve delesyonlar ile sonuçlanırken, Homolog rekombinasyon yolu hatasızdır ve genom stabilitesinin korunmasına katkıda bulunur (M. Moynahan, Pierce, ve Jasin, 2001; Patel ve ark., 1998). BRCA2, fonksiyonel ve yapısal etki alanları aracılığıyla RAD51 aracılı HR'yi arttırır (Şekil 5). BRCA2'nin hem BRC tekrarları hem de karboksil terminalindeki bir alan aracılığıyla doğrudan RAD51 ile etkileştiği bilinmektedir. BRCA2 RAD51 ile bir kompleks oluşturur ve inaktif durumda tutar, BRCA2 olmadığı zaman, RAD51 FOCI DNA hasarından sonra oluşmaz (Fradet-turcotte ve ark., 2016; Sharan ve ark., 1997; Wong, Pero, Ormonde, Tavtigian, ve Bartel, 1997). BRC tekrarları dışında, BRCA2 C-terminali TR2 alanı ile RAD51 ile etkileşime girer. Monomerik RAD51'e bağlanmak yerine, TR2 alanı, RAD51 nükleoflamanlarını stabilize eder. Öte yandan, TR2 domaininin CDK fosforilasyonunun, BRCA2-RAD51 bağlanmasını azalttığı ve mitozun girişindeki RAD51 komplekslerinin bağlanmasını engellediği ve bu durumun, mitozda Homolog rekombinasyon aracılı çift zincir kırığı onarımını durdurduğu gösterilmiştir. Bu adımın, aktif DNA çift zincir kırılması onarımının mitozda uygun kromozom segregasyonunu tehlikeye atması nedeniyle genomik stabiliteyi korumak açısından kritik olabileceği söylenmektedir. Bazı bulgular, BRCA2'nin C-terminal bölgesinin Homolog rekombinasyon-aracılı çift zincir kırığı onarımı için kritik olduğunu göstermektedir (Fradet-turcotte ve ark., 2016).

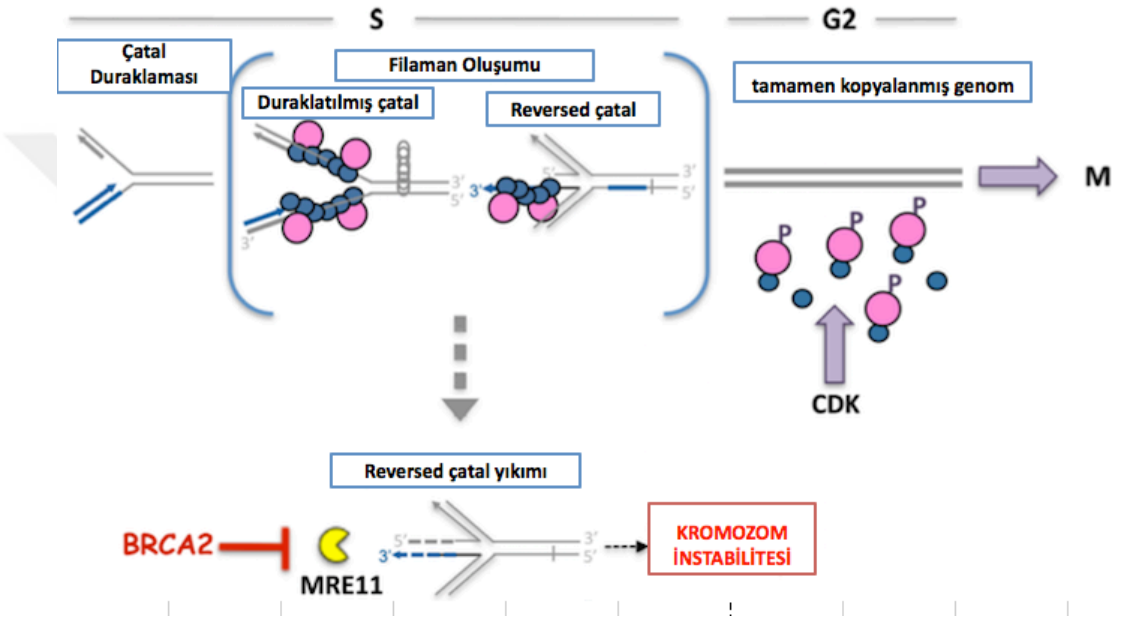


Şekil 5: DSB onarımında BRCA2-RAD51 etkileşimi.

(a, b) Nükleolazmada birkaç farklı RAD51 havuzu vardır. RAD51'in %40'ı ya kendiliğinden toplanmış oligomerlerin bir parçasıdır (a) ya da BRCA2'nin BRC tekrarlarına bağlıdır (b). (c) DNA'daki DSB'lerin saptanması DNA onarım işlemlerinin başlatılmasına yol açar. Ser3291'de BRCA2'nin fosforilasyonu kaybolur, bu da, BRCA2'nin TR2 bölgesi tarafından RAD51 bağlanmasını ve ardından bir çift zincir kırığı bölgesinde ssDNA'ya RAD51'in yüklenmesini sağlar. (d) TR2-RAD51 etkileşimi, BRC aracılı bozulmadan RAD51-ssDNA nükleoprotein filamentlerinin bütünlüğünü korur. Nükleoprotein filaman, hasar bölgesine homolog DNA'yı çeker ve DSB'deki DNA sekansını geri yüklemek için şablon olarak kullanır. Onarım tamamlandıktan sonra, Ser3291'de BRCA2'nin fosforilasyonu geri kazanılır ve TR2'nin nükleoprotein filamanını koruması engellenir ve böylece filamentin BRCA2'nin BRC tekrarları tarafından bozulmasına izin verilir (Lord ve Ashworth, 2007).

DNA replikasyon çatalı duraklaması, genomik bütünlüğün korunması için sürekli bir tehdit oluşturur. DNA replikasyonu sırasında, replikasyon çatallarının progresyonu, DNA lezyonları (baz hasarları vb.), sekonder yapılar (G-quadruplex ve R-loops), tekrarlayan elementler ve nükleotit havuzu tükenmesi gibi birçok sebeple engellenebilir. Çatalların yeniden başlatılmasını teşvik etmek için, yeni iplikçiklere sınırlı rezeksiyon yapılmalıdır. Reseksiyonun durmuş replikasyon çatallarının işlenmesinin kesin mekanizması bilinmemekle birlikte, hem inhibisyonu hem de aşırı aktivasyonu replikasyon çatalının yeniden başlatılması için zararlıdır (Şekil 6). İki temel nükleaz, mayotik rekombinasyon 11 (MRE11) ve DNA2'nin, bu adımı sürdüğü düşünülmektedir. Son çalışmalar, poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) ve histon metiltransferaz kompleksi PTIP/karışık lineage lösemi proteini 3 ve 4'ün

(MLL3/4) MRE11'in durdurulmuş çatallara alınmasını teşvik ettiğini ileri sürmektedir. Mevcut bilgiler, DNA2 ve MRE11'in yapılarına ve ortaya çıkma anlarına bağlı olarak farklı tipte duran çatallar üzerinde biriktirdiğini söylemektedir. Kanıtlar, RAD51'in replikasyon çatalına yüklenmesini desteklemede BRCA1, BRCA2 ve FANCD2'nin rolünü göstermektedir ve ipliklerin MRE11 ve DNA2 nükleazları tarafından bozulmasını engellemek için gerekli olan bir olaydır (Fradet-turcotte ve ark., 2016).



Şekil 6: DNA replikasyonu sırasında BRCA2'nin HDR-bağımsız rolü

Replikasyon çatalı, yetersiz nükleotid havuzları dahil olmak üzere çeşitli nedenlerden dolayı duraklayabilir. BRCA2 (pembe daire), RAD51 filamanlarını durdurulan replikasyon çatalları üzerinde sabitler (mavi daireler), böylece çatalın önündeki pozitif supercoiller (gri daireler) tarafından desteklenen çatal geri dönüşünü önler. Replikasyon çatalı duraklaması kaldırıldıktan sonra, genom kopyalaması tamamlanana kadar devam edebilir. Bundan sonra BRCA2, çatal koruması için artık gerekli değildir. CDK, BRCA2 C-terminalinii fosforile eder ve RAD51 filamanlarının M fazına ilerlemeyi ilerletmek için ayrışmasına izin verir. BRCA2'nin yokluğunda, durdurulmuş çatala ait sarmallar korunmasızdır ve MRE11 (sarı pacman) tarafından bozulmakta ve kromozomal instabiliteye yol açmaktadır (Schlacher ve ark., 2011).

Telomerler, yüksek oranda tekrarlanan bir G-zengin sekansın (TTAGGG) varlığından dolayı replike olan başka bir DNA yapısıdır. Telomerlerin korunması genomik dengesizliği önlemek için gerekli olduğundan, iki mekanizma bütünlüklerini korur: (1) telomer uzunluğunun bakımı ve (2) DNA onarım sinyali ile tanınmasını önleyen koruyucu bir telomer yapı, T-ilmiği veya kapak oluşumu (Doksani ve de Lange, 2014). Telomer uzunluğu, özel ters transkriptaz (telomeraz) ile korunur. Alternatif olarak uzama, alternatif telomerler uzatması (ALT) adı verilen

Homolog rekombinasyon aracılı bir işlem ile elde edilir. İlginç bir şekilde, RAD51 gibi Homolog rekombinasyon faktörleri T-halka yapılarının oluşumunu kolaylaştırır ve bu Homolog rekombinasyon aktivitelerinin silinmesi telomerazın varlığında bile telomer kısalmasına yol açmaktadır. İki rekombinasyon proteini, RAD51D ve RAD54'ün telomerlerde etki gösterdiği ve RAD51'in hücre döngüsünün geç S ve G2-fazları sırasında telomerlerle birleştiği gösterilmiştir. BRCA2'nin telomer bakımına dahil olduğu fikri, Brca2'nin koşullu nakavt (cKO) farelerde telomer kısalmasına yol açtığı gözleminden kaynaklanmaktadır. BRCA2'nin telomerlerde RAD51'i yüklemek zorunda olmasına rağmen, telomer bütünlüğünü koruduğu kesin mekanizma hala net olarak tanımlanmamıştır. Ayrıca, bu hücrelerde telomer anormalliklerinin varlığı, BRCA2'nin telomerlerde replikasyon stresini sınırlamak için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Mevcut model, BRCA2'nin telomer çoğaltmasını kolaylaştırarak telomer bütünlüğünü korumasını önermektedir (Badie ve ark., 2010).

8.4.2.2. BRCA2 ve meme kanseri

BRCA2 genindeki mutasyonların heterozigot taşıyıcılarında tek bir yabanıl tip alelin kaybı veya mutasyonal inaktivasyonu, tümör büyümesinde önemli rol oynar. Kodlanmış proteinin hastalık progresyonuna katkıda bulunduğu mekanizma henüz tam olarak anlaşılmamıştır, fakat en azından kısmen zarar görmüş DNA'nın onarımında BRCA2'nin önerilen rolü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Belirli coğrafi veya etnik kökenler, popülasyonlarında bazı mutasyonların çok yaygın olmasına neden olmuştur. Örneğin, İzlandalı bireylerin yaklaşık %0,6'sında 999del5 mutasyonu, Ashkenazi Yahudilerinde %1,4 ordanda 6174delT mutasyonu gözlenmektedir (WHO, 2012). BRCA2'nin bir allelindeki germline mutasyonları, meme ve yumurtalık kanserlerine karşı yüksek duyarlılıkla ilişkilidir. Bir mutant BRCA2 allelinin dişi taşıyıcıları, meme ve yumurtalık tümörleri geliştirmede yaşamları boyunca %80 ve %20 oranında kümülatif bir olasılığa sahiptir (S. A. Narod ve Foulkes, 2004). Hem BRCA1 hem de BRCA2'deki mutasyonlar meme kanseri riskini artırsa da, farklı kanser türlerine neden olurlar. BRCA1 mutasyonları tipik olarak, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü veya insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2'nin aşırı ekspresyonu olmadığı üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ile sonuçlanır. Aksine, BRCA2 mutasyonları, daha yavaş büyüyen

ve ER üzerinden sinyallemeyi inhibe etme tedavisi seçeneğine sahip düşük dereceli ER + lüminal tümörlerle sonuçlanır (Romero-laorden ve Castro, 2017).

BRCA2 geninde, mutasyonların çoğu, ekson 10 ve 11'de meydana gelir ve genellikle kesilmiş veya fonksiyonel olmayan protein ile sonlanan erken stop kodonu meydana getiren insersiyon veya delesyonlardan oluşur. ExAC veri tabanında yer alan son verilere göre BRCA2 geninde 2 371 farklı mutasyon belirtilmiştir. Bildirilmiş çoğu BRCA2 mutasyonu Tablo 5'te özetlenmiştir (Karami ve Mehdipour, 2013).

Tablo 5: BRCA2 mutasyonları

ÜLKE	BRCA2 Mutasyonları
Finlandiya	4088insA,c.68-80insT,c.793+34T>G, 999del5, 6503delTT
İsveç	4486delG
Danimarka	2594delC, 5382insC, 3829delT, Q563X, 3438G>T, 1675delA,999del5
Norveç	—
İzlanda	999del5
Hollanda	6503delTT, 8295T4A,9900insA, 5579insA, 7647delTG
İsviçre	7253delAA
Britanya	6503delTT, 9303ins31
Almanya	3034del4bp, 5910C3G, 6676insTA
Fransa	French-Canadian: 6085G>T, 8765delAG, 3398delAAAAG, 6503delTT
İtalya	1499insA, 7525_7526insT, 6174delT, c.289G>T, c.2950G>T, c.7963C>T ve c.8878C>T
Belçika	IVS6þ1G4A, 6503-6504delTT, 9132delC
İspanya	9254del5, c.9254_9258delATCAT, c.3492_3493insT, 9475A>G, c.9026_9030delATCAT, c.3264insT, c.8978_8991del14
Portekiz	c.156_157insAlu
Polonya	6238ins2del21, 10323delCins11, 8876delC
Çek	8138_8142del5, c.8765_8766delAG, exons 21–24 del
Slovakya	c.6589delA
Romanya	4817A>G, 8477delAGA
Yunanistan	8984delG, G4X ve 3783del10
Slovenya	c.5101C>T, c.5433_5436delGGAA,c.7806−2A>G, c.5291C>G, c.3975_3978dupTGCT,IVS16−2A>G
Avusturya	—
Hırvatistan	c.3318C>A, c.4790C>A
Letonya	—
Macaristan	9326insA ve 6174delT
Yugoslavya	—
Belarus	—
Kıbrıs	8984delG, 1913T>A, 1342C>A, 3199A>G, 1093A>C
Küba	c.3394C>T, c.7697T>C
Kosta Rika	5531delTT, C5507G ve 6174delT

Tablo 5: BRCA2 mutasyonları (devam)	
Şili	c.5373_5376 del GTAT, c.373G>T
Brezilya	S2219X, C1290Y, 6633del5
Kolombiya	3034delACAA
Bahama	818delA, exons 8-9 del
Venezuela	c.3036_3039delACAA, c.6024_6025_delTA, c.2732_2733insA ve c.3870_3873delG
Porto Riko	4150G>T, 6027del4
Meksika	c.5114_5117delTAAA, c.2639_2640delTG
Türkiye	6880 insG ve 3034 del AAAC
Rusya	695insT, 1528del4, 9318del4, S1099X
Japonya	5802delAATT, 8732C>A, c.2835C>A
Kore	c.7480C>T, 1627A.T, 3972delTGAG, 7708C.T
Çin	7883delTTAA, c.2808_2811delACAA, c.3109C>T, c.7436_7805del370,2670delC, 3073delT, ve 6696-7delTC ve c.9097_9098insA
Singapur	Exons 4–11 dup
Malezya	4859delA, 4265delCT, 1342C.A, 490 delCT
Pakistan	3337C>T (50%), 5057delTG (50%)
Iran	g.-1235G>A, g.-26G>A, g.681+56C>T, c.865A>C,c.1114A>C, c.1365A>G,c.2229T>C, c.2971A>G,c.3396A>G, c.3516G>A,c.3807T>C, c.4415_4418delAGAA,c.5529A>C, c.6033_6034insGT,c.7242A>G, g.7435+53C>T,g.7806−14T>C,g.8755−66T>C,c.4415-4418delAGAA,c.5576_5579delTTAA,c.6033insGT,c.9485−1G>A
Lübnan	—
Hindistan	—
Sri Lanka	—
Filipin	4265delCT, 4859delA
Endonezya	6775G>T, p.Glu2183X, c.2699_2704delTAAATG
Viyetnam	4706delAAAG
Tayland	—
İsrail	R2336P, IVS2+1G>A, 8765delAG
Nijerya	—
Mısır	999 del 5
Tunus	1537 del4 ve 5909 insA, c.211dupA
Cezair	—
Fas	c.3381delT/3609delT, c.7110delA/7338delA, c.7235insG/7463insG
Güney Afrika	c.2826_2829del, c.6447_6448dup, c.5771_5774del, 5999del4

8.5. DNA Dizileme Yöntemleri

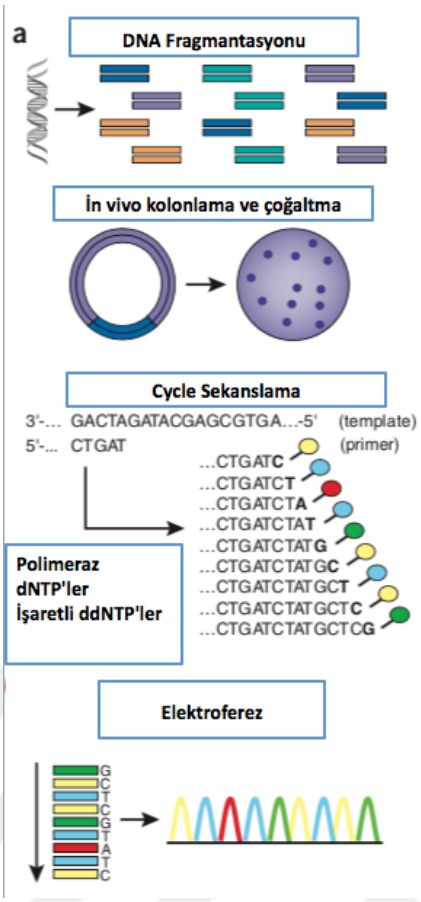
Biyolojik örneklerde nükleik asitlerin sırasının belirlenmesi, çok çeşitli araştırma uygulamalarının ayrılmaz bir bileşenidir. Son yıllarda çok sayıda araştırmacı, DNA ve RNA moleküllerini dizilemek için sınırsız araştırmalar yaptı (Heather ve Chain, 2016). Nükleik asit dizileme, 1970'lerin sonlarında moleküler sistemlerin

çalışmalarında yaygın hale gelmiş, uzunlukları sadece 15-20 baz çifti olan DNA dizileri dizilenmiştir. Nükleik asit dizilenmesindeki atılımlar hemen hemen aynı anda Maxam ve Gilbert ve Sanger ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir (Maxam ve Gilbert, 1977; Sanger ve Nicklen, 1977). Son zamanlardaki dizileme teknolojilerindeki hızlı ilerlemeyle, bir organizmanın genomunun DNA dizilimini belirlemek, düşük verimli Sanger dizilemesinden daha yüksek verimli yeni nesil dizileme (NGS) platformlarına kaymıştır. Otomatik Sanger yöntemi, "birinci nesil" teknoloji olarak kabul edilir ve yeni yöntemler, yeni nesil dizileme (NGS) olarak adlandırılır. NGS tarafından sunulan en büyük ilerleme, çok büyük miktarda veriyi ucuza üretme kabiliyetidir. Birçok ilgili organizmanın tüm genomunu sıralayabilme yeteneği, birkaç yıl önce hayal edilemeyen büyük ölçekli karşılaştırmalı ve evrimsel çalışmalara olanak sağlamıştır.

8.5.1. Birinci nesil dizileme

Şimdiye kadar, DNA dizisini belirlemek için farklı kimyasal teknikleri kullanan çeşitli yaklaşımlar olmuştur. Gilbert ve Sanger, insan genomunu sıralamak için iki benzer yöntemi ilk tanıtanlardır. Daha yaygın hale gelen Sanger yöntemi, *in vitro* DNA replikasyonu sırasında dideoksinükleotitler (ddNTP'ler) ile zincir sonlandırmasına dayanmaktadır. 3'-OH grubundan yoksun olan ddNTP'ler, DNA polimeraz ile katalize edilen DNA uzamasını sona erdirirler. PZR ürünleri kapiller sistemde ilerlerken floresan etiketine bağlı olarak, nükleotidler tespit edilir (Şekil 7). Bu yöntem, ilk nesil sıralama olarak kabul edilir.

Bu yöntem, aşırı maliyet ve zaman gerekliliklerine rağmen yüksek doğruluk ve çok düşük hata oranı nedeniyle insan referans genomunu dizmek için kullanılmıştır. Sanger yöntemi daha sonra otomatikleştirerek ve çok daha hızlı hale getirerek geliştirilmiştir. Sanger sekansı biyolojik araştırmalarda devrim yaratmış ve bu tekniğin etkileri, 2005'te yeni nesil sıralama (NGS) yöntemlerinin kullanılmaya başlanmasıyla daha da ileriye gitmiştir. Genomlar tipik olarak daha hızlı ve daha ucuz olan diğer yöntemler kullanılarak dizilense de, Sanger sekanslama, DNA klonlamada kullanılan veya polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yoluyla çoğaltılan parçalar gibi, DNA'nın tek tek parçalarının dizilenmesi için sıklıkla kullanılır (Mardis, 2017).



Şekil 7: Sanger dizileme akışı

(1) Bir primer bir hedef diziye eşlenir, bu dizilere DNA fragmentasyonu ve hedef diziyi in vivo çoğaltarak ulaşılır (2) DNA polimeraz, dNTP'ler ve işaretlenmiş dört dideoksinükleotitin (ddNTP) bir miktarı primer ve dizi'ye eklenir. Primer uzama sırasında dNTP yerine bir ddNTP'nin rastgele eklenmesi, zincirin sentezini sonlandırır çünkü DNA polimerazı eksik hidroksil ile reaksiyona giremez. Bu, olası tüm zincir uzunluklarını üretir. (3) Ürünler, elde edilen bantların bir görüntüleme sistemi tarafından okunduğu tek şeritli bir kapiller üzerinde ayrılır (Shendure ve Ji, 2008).

8.5.2. Yeni nesil dizileme

Yeni nesil dizileme teknolojileri, genel olarak şablon hazırlama, sıralama/görüntüleme ve veri analizi olarak gruplandırılablecek birkaç yöntemi içerir. NGS teknolojilerinin birinci nesil dizilemeden en büyük farkı multiplex olmasıdır. Reaksiyon başına bir tüp yerine, DNA şablonlarının karma bir kütüphanesi oluşturulur ve şablonlar iki boyutlu bir yüzeye yoğun olarak hareketsiz hale getirilir. Bu teknikte, milyonlarca DNA fragmanı aynı zamanda sıralanır ve bu nedenle büyük paralel dizileme olarak adlandırılır. Sanger yönteminden farklı olarak, nükleotidler zincir sonlandırmadan ziyade tamamlayıcı iplikçiğe eklenmesiyle birlikte tespit edilir. NGS teknolojisi, bütün genom dizileme (WGS), tüm ekzom dizileme (WES), tüm transkriptome analizi (RNA-seq), genom boyu epigenetik

profillemesi (methyl-seq) ve kromatin yapısı (ChIP-seq) gibi çeşitli uygulamaların yapılmasına izin verir (Morozova ve Marra, 2008). Sanger sekanslama ile karşılaştırıldığında NGS yöntemlerinde önemli bir prosedür farkı da dizilim kütüphanesinin yapımıdır. Sanger sekanslama kütüphaneleri, bir bakteri plazmidi veya faj vektöründe bir dizi alt klon olarak ilgilenilen DNA örneğini temsil etmek için mikrobiyolojik kültür ile moleküler biyolojiyi birleştiren çok sayıda adım gerektirir. Bu alt klonlar daha sonra dizilemeden önce kültürde büyümeyi gerektirir. Bu çok adımlı işlem yaklaşık bir hafta içinde tamamlanabilir, bu noktada saflaştırılmış DNA'lar dizileme için hazırdır. Aksine, NGS kütüphane yapısının sadeliği ve hızı dikkat çekicidir. Yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA'dan PZR ürünleri havuzuna kadar çeşitli DNA kaynaklarından başlayarak, sadece birkaç adım gerçekleştirilir ve fragmaentlerin uçlarına eklenen sentetik adaptörler kütüphane oluşturmak için fragman uçlarına bağlanır (Mardis, 2017).

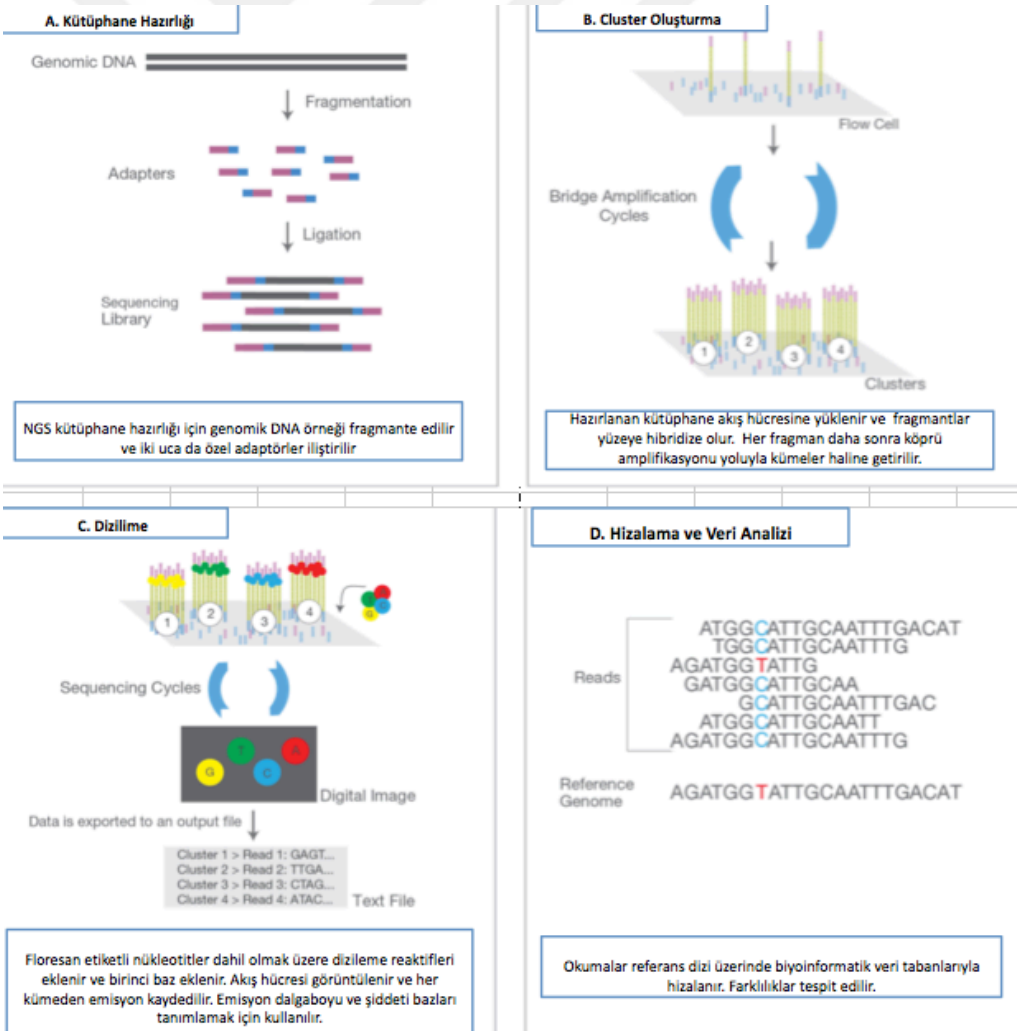
NGS mantığında DNA polimeraz, DNA sentezinin ardışık döngüleri sırasında floresan etiketli deoksiribonükleotid trifosfatların (dNTP'ler) bir DNA şablon zincirine dahil edilmesini katalize eder. Her döngü sırasında, eklenme noktasında, nükleotitler, fluorofor uyarımı ile tanımlanır. Birinci nesillere göre en kritik fark, tek bir DNA fragmanının dizilmesi yerine, NGS'nin bu işlemi milyonlarca parçaya büyük ölçüde paralel bir şekilde uzatmasıdır (Nakazato, Ohta, ve Bono, 2013; M. G. Ross ve ark., 2013; M. T. Ross ve ark., 2008). Günümüzde, Illumina en çok kullanılan platformdur ve yüksek verim, doğruluk, hızlı ve kolay numune hazırlama prosedürü nedeniyle son kullanıcılar tarafından tercih edilir. Illumina NGS dört temel adımı içerir:

1. Kütüphane Hazırlığı: Dizileme kütüphanesi, DNA veya cDNA numunesinin rastgele parçalanması, ardından 5′ ve 3 ′ adaptör ligasyonu (Şekil 8A) ile hazırlanır. Adaptör-ligasyonlu fragmanlar daha sonra PZR amplifiye edilir ve saflaştırılır.

2. Cluster Oluşturma: Küme oluşturmak için, hazırlanan kütüphane, kütüphane adaptörlerine tamamlayıcı bir yüzey-bağlı oligo üzerinde parçaların yakalandığı bir akış hücresine yüklenir. Her fragman daha sonra köprü amplifikasyonu yoluyla farklı, klonal kümelere yükseltilir (Şekil 8B). Küme üretimi tamamlandığında, şablonlar dizileme için hazırdır.

3. Dizileme: Illumina teknolojisi, DNA şablon ipliklerine (Şekil 8C) dahil edildiğinde tek bazı algılayan, geri çevrilebilir terminatör tabanlı bir yöntem kullanır. Her bir dizileme döngüsünde dört tersine çevrilebilir terminatöre bağlı dNTP'ler mevcut olduğundan, doğal rekabet birleşme yanlılığını en aza indirir ve diğer teknolojilere kıyasla ham hata oranlarını büyük ölçüde azaltır. Sonuç, tekrarlayan dizi bölgeleri ve homopolimerler dahil olmak üzere, dizi bağlamına özgü hataları fiilen ortadan kaldıran yüksek oranda bazik baz dizileme yöntemidir.

4. Veri Analizi: Veri analizi ve hizalama sırasında, yeni tanımlanmış dizi okumaları bir referans genomuna hizalanır (Şekil 8D). Hizalamayı takiben, tek nükleotid polimorfizm (SNP) veya ekleme-silme (indel) tanımlama gibi birçok analiz varyasyonu mümkündür ("Illumina:An introduction to Next-Generation Sequencing Technology," 2017).

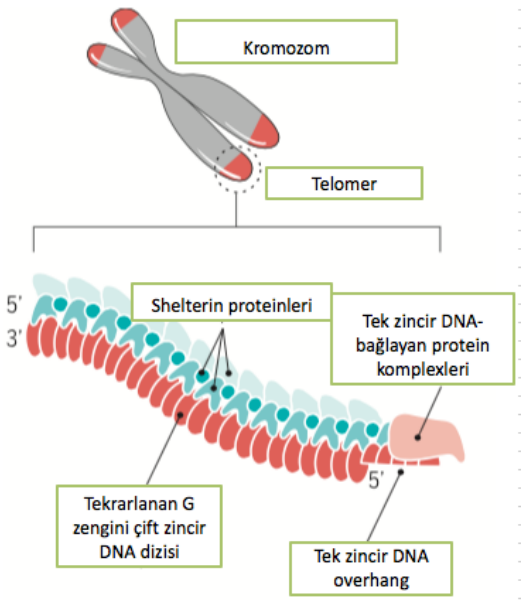


Şekil 8: Yeni nesil dizileme kimyası genel bakış

Kanser anlayışımız yavaş yavaş DNA dizilemesi ile gelişmektedir. Büyük ölçekli sekanslama, kanserlerin olağanüstü genetik heterojenitesini ortaya koymaya yardımcı olmuştur. DNA dizilemesi klinik kanser bakımını etkilemektedir: (1) tek bir kanserde mevcut mutasyonlara dayanan hedef tedaviler önermek; (2) dolaşımda serbest bulunan sirküle tümör hücrelerin veya hücresiz DNA'nın dizilenmesi ile invazif olmayan tanı veya izlemenin sağlanması; (3) "kişisel aşılar" için neoantijenler olarak görev yapabilecek kansere özgü, protein değiştiren mutasyonları tanımlamak. Her ne kadar bu alanlardaki başarı hikayeleri hala az ve çok uzak olsa da, kanserin genel yüküne göre ilerleme kaydedilmektedir. DNA dizilemesinin klinik etkisinin en beklenmedik alanı, invazif olmayan prenatal testtir (NIPT). Hamilelik sırasında bir fetüsün anne dolaşımına salınan DNA parçalarının basit sayımının kromozomal anöploidileri saptadığını göstermiştir. Bu stratejiye dayanan tarama testleri, tarihteki herhangi bir moleküler testten daha hızlı olarak benimsenmiştir ve dünya çapında birkaç milyon hamile kadın, NIPT için düşük geçişli WGS'den zaten faydalanmıştır (Shendure ve ark., 2017).

8.6. Telomer

Telomerler, 1930'larda kromozom uçlarını stabilize eden temel bileşenler olarak tanımlanmıştır. Telomer, sürekli tekrarlanan kısa DNA tekrarları ve ilgili koruyucu proteinler ile etkileşim halinde bulunan, kromozom uçlarında oldukça düzenlenmiş ve dinamik bir komplekstir (Şekil 9). Telomerler, doğrusal kromozomların uçlarına lokalize, GT bakımından zengin nükleotid tekrar dizisinin (omurgalılarda 5' TTAGGG 3') ardışık dizilerini içerirler (Blackburn ve ark., 2015). Telomerler, kromozom uçlarının, çift zincirli kopma onarımına ihtiyaç duyan hasarlı DNA olarak tanınmasını önler ve sonuç olarak, kromozom-kromozom füzyonlarına ve yeniden düzenlenmelere karşı korunarak genomik bütünlüğün korunmasına yardımcı olur (Barrett ve ark., 2015).

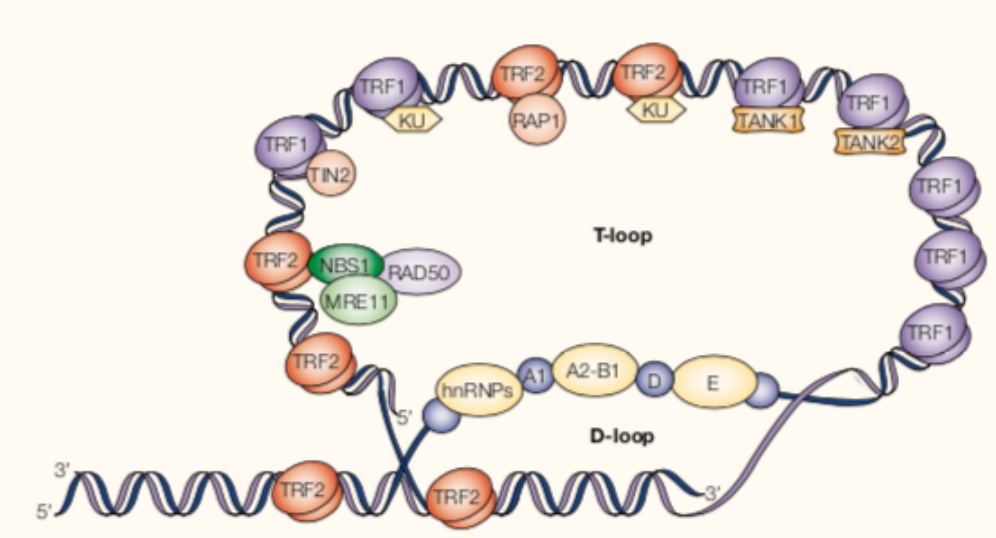


Şekil 9: Telomer yapısı

İnsan telomer kompleksi, telomer DNA'sının tekrarlanan tek sarmallı uç bölgesinde ek koruyucu proteinler ile koruyucu Barınak proteinleri tarafından bağlanmış, ardışık olarak tekrarlanan bir DNA dizisinden oluşur (Blackburn ve ark., 2015).

İnsan telomerleri 5-15 kb uzunluğundadır ve ağırlıklı olarak çift ipliklidir; bununla birlikte, 30-200 nükleotid uzunluğunda tek iplikli GT zengin 3′ çıkıntı (overhang) ile biter. Bu 3′ çıkıntının, telomer DNA'sının çift iplikli bölgesine kıvrılarak bir T-ilmek yapısını oluşturduğu gösterilmiştir. Bu yapı telomer ipliklerinden birinin yerine geçerek, yerdeğişim ilmek (D-loop) adı verilen diğer bir ilmeği oluşturur (Şekil 10). T-ilmik oluşumu termodinamik olarak elverişsizdir ve bu nedenle, korunan telomer bileşenlerden başka protein faktörlerinin T-ilmek düzeneğinde yer alması şaşırtıcı değildir. T-loop yapısının oluşturulmasında ve stabilitesinde rol alan 6 telomer spesifik protein, Shelterin (barınak) kompleksini meydana getirir. barınak, DNA modelleme aktivitesine sahip, telomer DNA'nın yapısını modifiye etmek için çeşitli ilişkili DNA onarım faktörleriyle birlikte hareket eden ve böylece kromozom uçlarını koruyan dinamik bir multi-protein kompleksidir. barınak kompleksine ek olarak, insan telomerleri, Ku70 / 80, XPF / ERCC1, Apollo, MRN kompleksi, RecQ helisazlar, Tankiraz ve PINX1 dahil olmak üzere çok sayıda başka protein içerir. Hücre döngüsü boyunca telomerlerde bulunan barınak kompleksinden farklı olarak, bu barınak dışı proteinler sadece kromozom uçlarıyla geçici olarak birleşir. Bu proteinler, esas olarak TRF1 ve TRF2 ile ilişkilendirilerek barınak kompleksiyle etkileşime girer. Tüm barınak dışı telomer ilişkili faktörler,

kromozom stabilitesinde telomer işlevine aracılık eder ve telomer uzunluk düzenlemesine katkıda bulunur. Üç barınak (Shelterin) alt birimi, TRF1, TRF2 ve POT1 doğrudan TTAGGG tekrarlarını tanır. Bunlar, üç ilave barınak proteini, TIN2, TPP1 ve Rap1 ile birbirine bağlanır, hücrelerin telomerleri DNA hasarı bölgelerinden ayırmasına olanak veren bir kompleks oluşturur. Barınak ilişkili proteinler kromozom uçlarında bol miktarda bulunur fakat başka yerde birikmez; hücre döngüsü boyunca telomerlerde bulunur ve bilinen işlevi telomerlerle sınırlıdır. T-loop yapısı, ATM ve ATR aktivasyonunu bloke ederek DNA hasar cevabını ve homolog olmayan uç birleştirme ve Homolog rekombinasyon aracılı DNA onarım faaliyetlerini önler. Telomerlerin uçlarında oluşturulan bir başka özel yapı, G-tetrads veya G4-DNA olarak da bilinen G-quadruplex DNA'dır. Bu yapı, Hoogsteen baz eşleşmesi ile hidrojenle bağlanan dört guaninin (Gs) kare düzlemsel dizileri olan G-kuartetlerinden (guanin tetrads olarak da bilinir) oluşmaktadır. G-quadruplex oluşturmak için iki veya daha fazla G-dörtlüsü birbirinin üzerine yığılabilir. İntramoleküler G-kuadrupleksler kendiliğinden *in vitro* meydana gelir, çünkü telomer DNA sekansları, sadece uygun iyonik koşullar mevcut olduğunda G-quadruplex yapısını oluşturan en az dört Gs blokunu içerir. G-quadruplex formasyonu bir termodinamik önkoşul gerektirir, bu nedenle, bazı telomer proteinler G-quadruplex katlanmasını ve açılmasının katalize edilmesine yardımcı olur (Giardini, Segatto, da Silva, Nunes, ve Cano, 2014; T. D. Lange, 2005).



Şekil 10: T-ilmek ve D-ilmek Yapısı

1970'lerin başlarında, DNA polimerazlarının lineer DNA moleküllerinin uçlarını kopyalayamayacağı "replikasyon sonu problemi" olarak adlandırılmıştır. Yeni DNA'nın sentezinde 5'-3' ipliği başarılı bir şekilde sentezlenir, ancak 3'-5' ipliği (lagging strand) sentezi kesintili gerçekleştiği için daha karmaşıktır ve tam kopyalanamaması yılda ortalama 15-66 baz çifti azalmaya sebep olur. Çoğu normal insan hücresinde, telomerler her hücre bölünmesi ile kısalır ve bu, hücrelerin çoğalabileceği sayıları sınırlar. Bu kademeli telomer tekrarı kaybı, kritik kısa telomerlerin bulunduğu hücrelerin yaşlanmaya başlaması nedeniyle hücrelerin ömrünü sınırlar. Telomerler, germ hücrelerinde, birçok ölümsüzleştirilmiş hücrede ve kanserde, ters transkriptaz katalitik alt-birimi tarafından telomer DNA'nın sentezi için şablon olarak bir RNA alt birimi kullanan telomeraz holoenzim ile korunur. Telomeraz bir östrojene duyarlı ters transkriptaz bileşeni (TERT) ve bir RNA alt birimi (TERC) içerir, telomerazın enzimatik kısmı, bir RNA şablonu kullanılarak DNA'yı sentezleyen enzimler olan diğer ters transkriptazlara benzemektedir. Telomeraz, mevcut bir telomer DNA tekrar dizisinin ucunu tanır ve tekrarın yeni kopyalarını sentezlemek için enzimin kendisinin bir bileşeni olan bir RNA şablonunu kullanarak onu 5'-3' yönünde uzatır. Telomeraz etkisi sıkı bir şekilde düzenlenir ve sadece S-fazı sırasında telomerlerde etki gösterir. Telomeraz, tercihen kısa telomerlerde aktivasyon gösterir ve sadece S-fazı sırasında telomerlerde etki eder. TPP1 fiziksel olarak telomeraz ile etkileşir ve TIN2 ile birlikte telomeraz için gereklidir. Telomeraz-telomer bağlantısında POT1-TPP1'in rol oynadığı öne sürülmüştür (Alberts ve ark., 2007; Barrett ve ark., 2015; Bernal ve Tusell, 2018).

İnsan tümörlerinin yaklaşık %10'u telomerlerini korumak için telomerazdan bağımsız bir yöntem kullanır. Alternatif telomerler uzaması (ALT) olarak adlandırılan bu yöntem, telomerlerin arasındaki rekombinasyona dayanan bir mekanizmaya sahiptir. Tümörlerde ALT'nin tam moleküler mekanizması anlaşılmamıştır ancak, ön bulgular altta yatan neden olarak anormal Homolog rekombinasyona işaret etmektedir. ALT hücrelerin ana özelliklerinden biri, telomer DNA'yı, telomer proteinleri ve DNA rekombinasyonu ve onarımında rol oynayan faktörleri içeren alt nükleer yapılar olan promyelositik lösemi (PML) cisimlerinin varlığıdır. ALT hücreleri, kritik kısa telomerlerden 100 kb uzunluğunda telomere kadar değişen heterojen telomer uzunluklarına sahiptir. ALT hücreleri, kardeş

kromatit değişiminin artan oranını göstermektedir ve bu Homolog rekombinasyon yolağının dahil olduğunu düşündürmektedir. ALT'de bir telomer başka bir telomerde tamamlayıcı sekanslarla hizalanır ve telomer DNA'sı değiştirilir (Verdun ve Karlseder, 2007).

8.6.1. Telomer ve kanser

Telomeraz aktivitesi çoğu normal insan somatik hücrelerinde saptanamaz. Bununla birlikte, erken gelişim sırasında ifade edilir ve spesifik germ hattı / embriyonik kök hücreler ve kanser hücrelerinde tamamen aktif kalır (Kim ve ark., 1994). Ek olarak, telomeraz aktivitesi, kemik iliği, deri, gastrointestinal sistem ve testis gibi yüksek yenileme potansiyeline sahip proliferatif dokularda gözlenir (K. Liu ve ark., 1999; Yui, Chiu, ve Lansdorp, 1998). Normal insan somatik hücrelerinin sınırlı bir replikatif potansiyeli vardır ve hücre 50-70 bölünmeden sonra yaşlanır (senesens), bu Hayflick sınırı olarak bilinir (Hayflick ve Moorhead, 1961). Tüm mekanizma henüz anlaşılmamış olsa da, hücresel çoğalma kapasitesinin ana belirleyicilerinden birinin her hücre bölünmesinde ilerleyen telomer tekrarı kaybı olduğu düşünülmektedir. Hayflick sınırında olan bir veya birden fazla hücre, kromozom uçlarını koruma yetisini kaybeder ve DNA hasar kontrol noktalarını aktive edip, Mortalite evre 1 (M1) olarak bilinen geri dönülemez bir büyüme blokajını tetikler. Senesens p53 ve pRb yollaklarını içerir ve hücre proliferasyonunun sonlandırılmasına yol açar, bu nedenle bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak kabul edilebilir. Önemli hücre döngüsü kontrol noktası genlerinin (örn., P53) inaktivasyonu ile bu replikatif senesensi (yaşlanmayı) geçebilen hücreler, kriz eşiğine veya Mortalite evre 2'ye (M2) ulaşana kadar telomerlerini bölmeye ve kaybetmeye devam eder. Telomeraz enzimlerini yeniden aktive edebilen / düzenleyen hücreler, krizden kaçabilir ve ölümsüzleşebilir, ki bunun genellikle kanser ilerlemesinde kritik bir aşama olduğuna inanılır. Çoğu kanser hücresi (%80-90) yüksek düzeyde bir telomeraz aktivitesi ifade etmesine rağmen, kalanlar ölümsüzlüklerini korumak için telomerlerin (ALT) rekombinasyon ile alternatif uzamasını kullanır (Allsopp ve ark., 1992; Bryan ve Reddel, 1997; Campisi, 2005; Shay ve Bacchetti, 1997; Shay ve Wright, 2010; W. E. Wright, Pereira-Smith, ve Shay, 1989).

Telomer ve telomeraz biyolojisinin kanserdeki en önemli rolü hücresel ve hayvan modelleriyle belgelenmiştir. 1994 yılında yapılan bir çalışmada telomerazın incelenen tüm insan tümörlerinin yaklaşık %90'ında saptanabileceği gösterilmiştir (Kim ve ark., 1994). Bu tarihten sonra telomer, telomeraz ve kanser ile ilgili makale sayısı muazzam bir şekilde artmıştır. Tüm çalışmalar telomeraz aktivitesinin neredeyse evrensel olarak hücresel immortalizasyon ve kanser hücrelerinin sınırsız proliferatif özelliği için temel bir gereklilik olduğunu göstermiştir. Birçok birincil insan kanser türünde artmış veya up-regüle telomeraz aktivitesi bildirilmiş ve artmış telomeraz aktivitesinin kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Telomeraz reaktivasyonu, normal bir hücreyi kanserojen bir hücreye dönüştürmek için yeterli değildir, ancak hücrelerin sınırsız büyüme kapasitesine ve ölümsüzlüğe sahip olması için hücrelerin etkili telomer uzunluklarını muhafaza etmesi gereklidir. Çalışmalar benign tümörlerde telomeraz aktivitesi olmadığını ve bu tümör hücrelerinin telomerlerinin kısalmasıyla erken evreye döndüğünü göstermektedir. İnvaziv metastatik tümörlerde yüksek telomeraz aktivitesi gözlenmesi nedeniyle son zamanlarda yapılan çalışmalar telomerazın kanser teşhisi, prognostik ve terapötik mekanizmalarının gelişmesi için bir hedef olarak ya da potansiyel bir biyobelirteç olarak ön plana çıkmasını sağlamıştır (Artandi ve DePinho, 2000; Artandi ve Depinho, 2010; Bodnar ve ark., 1998; Counter ve ark., 1998; Donate ve Blasco, 2011; Granger, Wright, ve Shay, 2002).

Fare ve insan sistemlerinden elde edilen veriler, bozulmamış telomer fonksiyonunun, hücre proliferasyonu ve hayatta kalması için çok önemli olduğunu ve telomer kısalmasının rejeneratif dokuları derinden etkileyebileceğini göstermektedir. P53'ün yokluğunda (disfonksiyonel telomerlere yanıtın anahtar mediyatörü) progenitör hücrelerde hücre ölümü ve hücre döngüsü durdurma tepkileri azalır ve bu kontrol noktası defekti, devam eden telomer kısalması karşısında hayatta kalmayı mümkün kılmakta ve artan miktarda kromozomal instabiliteye yol açmaktadır. Fare ve insan kanserlerinden elde edilen veriler, disfonksiyonel telomerlerin, epitelyal tümörlerde fokal gen amplifikasyonu ve delesyonunun önemli bir sebebi olduğu hipotezini desteklemektedir. Southern blot analizine dayanan deneyler, meme ve kolon kanserlerinde bitişik normal doku örnekleri ile karşılaştırıldığında belirgin olarak daha kısa telomer olduğunu göstermiştir. Telomer uzunluk analizi için

floresan in situ hibridizasyon temelli tekniklerin geliştirilmesi, bu alanda önemli bir teknik ilerleme olmuştur ve bu da bir kanser içindeki hücre popülasyonlarının ayrı ayrı analizine olanak sağlamıştır. Telomer floresan in situ hibridizasyon analizi, aynı örnek içindeki patolojik olarak normal epitelyum veya stromal hücre bölmeleriyle karşılaştırıldığında telomerlerin kanserli epitelyumda belirgin şekilde daha kısa olduğunu doğrulamıştır. Bu in situ teknikle telomerlerin, meme, prostat ve pankreasın invaziv kanserlerinde daha kısa olduğu gösterilmiştir. Mesane, serviks, kolon, özofagus ve ağız boşluğunun ön-invaziv kanserlerinin de çalışılan vakaların %89'unda çok kısa telomerlere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu veriler telomerlerin insanlarda epitelyal kanser gelişimi sırasında kısaldığını ve kısa telomerlerin insan karsinogenezinin en erken safhalarında ortaya çıktığını göstermektedir. Kanser erken evrelerinde telomer kısalması ile birlikte, insan tümör oluşumu sırasında telomerlerin işlevsiz hale geldiğini gösteren kanıtlar vardır. Fonksiyonel telomerlerin ayırt edici özelliği olan anafaz köprüler, adenomlarda düşüktür, ancak adenom-karsinoma geçişinde önemli ölçüde artmaktadır. İnsan meme kanserinde, kromozomal instabilite oranları duktal karsinoma in situ evresinde zirveye çıkmıştır ve pre-invaziv evrelerde anafaz köprüler görülmüş ve bu durum telomer kısalması sırasında kromozomal instabilite sebebiyle ortaya çıkmıştır (Artandi ve Depinho, 2010; K. Chin ve ark., 2004; Meeker ve ark., 2004).

8.6.1.1. Telomer ve BRCA1/BRCA2

BRCA proteinleri genomik bütünlüğün korunmasında rol alır ve DNA onarımının koruyucu proteinleri olarak görev yapar. BRCA genleri, gametogenez ve erken embriyojenez sırasında aktive edilir ve telomerlerin tamir ve bakımına katılır. Dahası, BRCA proteinlerinin, iyonize radyasyonun neden olduğu DNA kırılmalarının onarılmasında önemli rol oynayan RAD50/Mre11 ve RAD51 gibi diğer proteinler ile birlikte işlev gördüğü bilinmektedir (Pal, Keefe, Sun, Ph, ve Narod, 2010; Starita ve Parvin, 2013). Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) kompleksi, DNA çift zincir kırıklarının tespiti ve sinyallemesinde ve aynı zamanda Homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleşme (NHEJ) onarım yollarında önemli rol oynar. Eğer onarılmadan bırakılırsa, DNA çift zincir kırılması kromozomal translokasyonlar, anöploidi ve malignite insidansı artış potansiyeli olan

en zararlı DNA lezyonları arasındadır ve Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) kompleksi, ökaryotik DNA çift zincir kırılması yanıt mekanizmasının merkezindedir. MRN kompleksinin ayrıca, lineer kromozomların uçlarındaki telomerlerle ilişkilendirildiği ve bakımlarına katkıda bulunduğu bulunmuştur. MRN, DNA uçlarının algılanmasını ve onarılmasını teşvik ettiğinden, kromozom ucundakı varlığı paradoksal görünür. MRN kompleksinin insanlarda telomer korunumuna katkıda bulunabileceğinin ilk göstergesi, mayotik insan fibroblastlarında telomerlerde tutulan Nbs1 ve Mre11'in tanımlanması olmuştur. MRN'nin barınak kompleksinin TRF2 bileşeni ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lajud, Nagda, Yamashita, Zheng, ve Tanaka, 2014; Lamarche, Orazio, ve Weitzman, 2011). MRN kompleksinin işlevinde kusurları olan mutantların, DNA hasarı duyarlılığı ve kısaltılmış telomer varlığı ile sonuçlandığı ve bu kısalmanın telomeraz enzimi üzerinden sağlandığı gösterilmiştir (Eno, 2010).

Bir çalışmada insan meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı olarak işlev gören BRCA1 geninin aşırı ekspresyonunun, çeşitli hücre tiplerinde TERT ekspresyonunu ve telomeraz enzim aktivitesini inhibe ettiği ve telomer kısalmasına neden oluduğu ileri sürülmüştür. BRCA1'deki mutasyonların doğrudan tümör oluşumuyla sonuçlanmadığı, bunun yerine genetik dengesizliğe neden olarak hücrelerin yüksek bir malign transformasyon riskine maruz kaldıkları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. BRCA1'in Nmi (N-Myc ve c-Myc etkileşimli protein) ile *in vitro* ve in vivo olarak ilişkili olduğu, bunun yanısıra BRCA1 ve Nmi'nin, c-Myc ile *in vitro* ve in vivo olarak bir kompleks oluşturduğu gösterilmiştir. Bu üçlü kompleks'in, meme kanseri hücrelerinde c-Myc-indüklü hTERT promoter aktivitesinin inhibisyonuna sebep olduğu bulunmuştur. Mutasyona uğramış BRCA1'in (A1708E ve Y1853X), Nmi ve c-Myc ile etkileştiği, ancak c-Myc-indüklü hTERT promoter aktivitesini baskılamakta başarısız olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada bilim insanları BRCA1'in Nmi ve c-Myc içeren bir transkripsiyon faktörü kompleksinin bir bileşeni olarak yeni bir rol oynayabileceğini ve bu kompleksin c-Myc-indüklü hTERT promoter aktivitesini düzenleyerek bir tümör süpresör olarak işlev görebileceğini savunmaktadır. Onkogen c-myc, tümörlerin önemli bir bölümünde telomeraz aktivitesini uyarabilmesine rağmen, telomeraz, transformasyona katkıda bulunan diğer yollar tarafından da düzenlenebilir. İlginç bir şekilde, mutasyona uğramış BRCA1 tek başına veya Nmi

varlığında, c-Myc-indüklü hTERT promoter aktivitesi üzerinde hiçbir etki göstermemiştir. Kalıtsal meme kanseri ile ilişkili BRCA1'deki mutasyonlar, c-Myc-indüklü hTERT promoter aktivitesinin bastırılmasına müdahale ederek, karsinojenezde bir ön koşul olan telomerazın sürekli aktivasyonuna yol açtığı görülmüştür (Huchun Li, Lee, ve Avraham, 2002; Xiong ve ark., 2003).

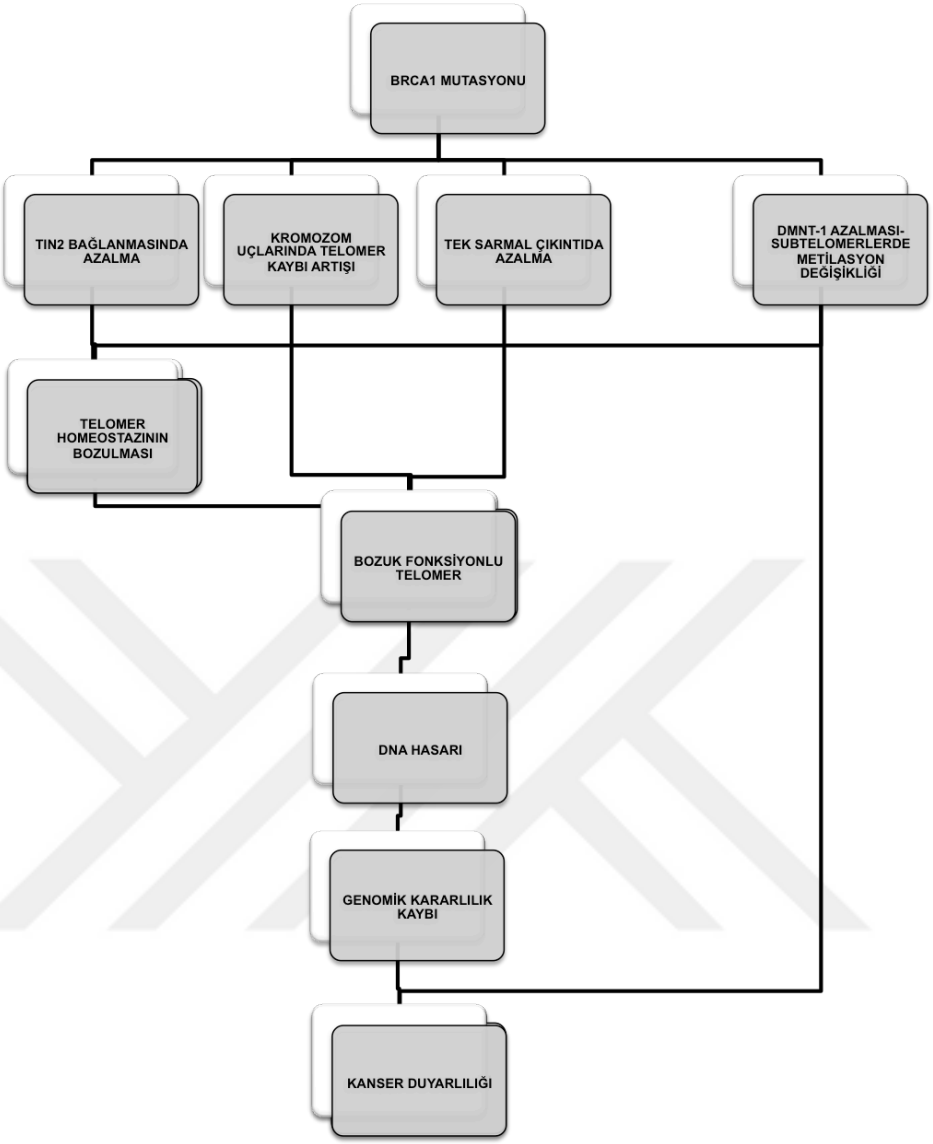
Yapılan bir çalışmada, kan lökositlerinde ölçülen ortalama telomer uzunluğu ile BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcıları arasında kanser durumu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu, genel popülasyonda telomer uzunluğu ve sporadik kanser riski ile ilgili son çalışmalarla uyumludur. Beklenmedik bir şekilde, BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonların taşıyıcıları ve taşıyıcı olmayanlar arasında ortalama telomer uzunluğunda önemli bir fark olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada mutasyon taşıyıcılarının (kanserden etkilenip etkilenmediklerine bakılmaksızın) mutasyon olmayan aynı ailelerden daha uzun telomerlere sahip oldukları bulunmuştur. BRCA1 veya BRCA2 mutasyonunun TERT ifadesini, telomeraz aktivitesini ve telomer uzunluğunu arttırdığını, aynı zamanda telomerlerin yapısal stabilitesini azaltıp genomik yeniden düzenlemeyi arttırdığını belirten çalışmalar vardır. BRCA1'in aşırı ekspresyonunun, TERT ifadesini inhibe ettiği ve insan kanser hücre dizilerinde telomer kısalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Tersine, diğer çalışmalarda azalmış BRCA1 ekspresyonunun, telomeraz aktivitesini içermeyen hücrelerde bile telomer ekspresyonunu ve telomer uzunluğunu artırarak ortalama telomer uzunluğunu düzenleyebildiğini bildirmektedir. Telomer, barınak kompleksinin proteinlere bağlanmasına ek olarak, üçüncül mimarisi ve 3’ telomer ucunda G-zengin tek-sarmallı çıkıntı kullanılarak oluşturulan T-halkası tarafından da korunmaktadır. Bu çıkıntının uzunluğu ve dolayısıyla telomerlerin stabilitesi BRCA1 ve RAD50 tarafından düzenlenir. Her iki proteinin aşırı ekspresyonu, T-ilmek uzunluğunu arttırır. BRCA2 (RAD51 ile birlikte) hücre döngüsünün S fazı sırasında telomer ile etkileşir ve BRCA2'deki mutasyonlar (BRCA1'den çok daha fazla) telomer frajilitesini ve kısalmasını indükleyebilir, bu da BRCA2' nin kromozom ve telomer stabilitesinde önemli bir rol oynadığını gösterir. Bu gözlemlere dayanarak, BRCA1 ve/veya BRCA2 taşıyıcı statüsünün, telomer uzunluğu üzerinde, kanser riski ile herhangi bir ilişkiden bağımsız olarak, pleiotropik bir etkiye sahip olması şaşırtıcı

değildir (Pavanello, Varesco, Gismondi, Bruzzi, ve Bolognesi, 2018; Pooley ve ark., 2014).

BRCA1/2 mutasyon taşıyıcılarında telomer uzunluğu ile ilgili literatür bilgileri çelişkilidir. Emma Killick ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada BRCA1/2 mutasyon durumu ve telomer uzunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır (Killick ve ark., 2014). Chene ve arkadaşları over ve tubal displazi hastalarında yaptıkları çalışmada telomer uzunluğunun BRCA mutasyonu durumunda önemli ölçüde değiştiğini, BRCA1 mutasyonu durumunda T/S oranının 0.56, BRCA2 mutasyonu durumunda 0.80 olduğunu ve dolayısıyla telomer uzunluğunun BRCA1 alt grubunda daha kısa olduğunu bulmuştur. Bu veriler, BRCA1 mutasyonlarının hem over hem de tubal displazide BRCA2 mutasyonlarından telomer kısalması üzerinde daha fazla etkiye sahip olabileceğini ve bu bulguyu doğrulamak ve olası altta yatan mekanizmaları araştırmak için daha ileri çalışmalar gerektiğini göstermektedir (Chene, Tchirkov, Pierre-eymard, Dauplat, Raoelfils, Cayre, Watkin, Vago, ve Penault-llorca, 2013a). Birna ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, BRCA2 mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarında, sporadik olgulara oranla daha kısa telomer uzunluğu saptanmış, ancak düşük örnek sayısı sebebiyle istatistiksel olarak bir anlam bulamadıklarını belirtmişlerdir. Meme kanseri tanısı almadan elde ettikleri örnekleri kullanarak, kısa telomerlerin BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında artmış meme kanseri riski ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu saptamışlardır (Thorvaldsdottir ve ark., 2017). Al-Wahiby ve arkadaşları BRCA1 kusurlu hücrelerin hafif bir telomer disfonksiyon fenotipi gösterdiklerini, ancak BRCA1'in normal memeli hücrelerinde telomer veya telomer proteinleri ile ilişkili olduğuna dair kanıt olmadığını belirtmiştir (Slijepcevic ve Al-wahiby, 2005). Tanaka ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada yapılan lökosit telomer uzunluğu analizine göre, BRCA1/2 taşıyıcılarının, sağlıklı kontrollere göre daha kısa telomerlere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (H. Tanaka ve ark., 2018).

Bir başka çalışmada BRCA1/2 mutasyonlarının telomer yapısı ve dinamiklerinde geniş çaplı pertürbasyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Bu pertübasyonların, *in vitro* sistemde olduğu gibi kanserli olmayan BRCA1/2 mutasyon taşıyıcı hücrelerinde DNA hasar tepkisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcıları arasında telomer uzunluklarında fark bulunmamış ve

sonuçların BRCA1 susturulmuş hücrelerde de benzer olduğu gösterilmiştir. *In vitro* veriler BRCA disfonksiyonunun telomer uzunluk homeostazisini ortadan kaldırdığını kanıtlamaktadır. Telomer uzunluğunun, homeostatik mekanizmalarla bağlanmış aktif telomeraz nedeniyle sabit olduğu normal hücre kültürlerinin aksine, BRCA1 susturulmuş hücrelerinde telomer uzunluğunun, telomer uzunluğu homeostaz kaybı kaybına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. BRCA1/2 mutasyonu telomer uzunluğu homeostazında pertürbasyona neden olan çeşitli değişikliklere neden olur. Bunlar, DNMT-1 seviyelerinde bir azalma ve subtelomerik bölgelerin metilasyonundaki değişiklikler veya telomerlere TIN2 bağlanmasının azalması olabilir. TIN2, dolaylı olarak TRF-1 aracılığıyla telomerlere bağlanır ve bir telomer uzunluk düzenleyicisi olarak görev yapar. Ek olarak, BRCA1/2 mutasyonu, tek sarmal çıkıntının kısalmasına, telomer uzunluklarının heterojenliğine ve kromozomal uçlarda telomer kaybının artmasına neden olur. Bu karışıklıklar ve telomer homeostazının kaybı, telomerlerin, hücrelerde kalıcı DNA hasarı ile sonuçlanacak şekilde işlevsiz kalmasına neden olur. DNA hasar durumu ve metilasyondaki değişikliklerle birlikte genomik stabilite kaybı, malign transformasyona yatkınlığa katkıda bulunur (Şekil 11) (Uziel ve ark., 2015).



Şekil 11: BRCA1/2 mutasyonlarını, telomer pertürbasyonlarını ve malign transformasyonu birbirine bağlayan olası bir akış şeması

8.6.2. Telomer uzunluğu ölçüm yöntemleri

Telomer ve telomer biyolojisi çalışmaları genellikle tek hücrelerde veya hücre popülasyonlarında telomer tekrarlarının uzunluğunun ölçümlerine dayanır. Telomer uzunluk ölçümü telomeropatilerin tanısında önemli bir rol oynar. Telomerler germ hattı içerisindeki telomerlerin somatik hücrelerden daha uzun bulunması ve telomer kaybının hücre yaşlanmasına neden olabileceği önerisinden beri çalışılmıştır. Telomer tekrarlarının kademeli olarak kısalması yaşlanmaya veya apoptoza katkıda bulunur ve telomerlerin kaybı, genomik instabilite ve neoplastik transformasyonun

yanı sıra birçok yaşla ilişkili hastalığa da neden olur (Aubert, Hills, ve Lansdorp, 2012). Telomer uzunluğu ölçümü için çeşitli yöntemler mevcuttur: Southern Blot, Tek Telomer Uzunluğu Analizi (STELA), Kantitatif Floresan İn Situ Hibridizasyon (Q-FISH), Flow-FISH ve Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q-PZR). Her telomer uzunluk ölçüm yönteminin, kullanılan malzeme, yöntemin ve diğer parametrelerin karmaşıklığı ve uygulanabilirliği ile ilgili avantajları ve dezavantajları vardır (Lisa ve ark., 2017).

TRF (terminal restriksiyon fragmentleri) Southern Blot yöntemi telomer uzunluğunu belirlemek için geliştirilen özgün bir tekniktir ve bu nedenle "altın standart" yöntem olarak tanımlanmaktadır. TRF analizi, bir hücre popülasyonu içindeki ortalama telomer uzunluğu tahminini olarak verir ve insanlarda genomik DNA'dan çalışılır. Kan lökositleri telomer analizleri için yeterli olan yüksek kaliteli DNA eldesi için uygun bir doku olduğundan tercih edilmektedir. Bu yöntemde DNA, telomerik ve sub-telomerik bölgeleri tanımayan kesim enzimleriyle fragmanlara ayrılır (bunlara TRF adı verilir) ve kısa genomik fragmanlar ve daha uzun kesilmemiş telomerler elde edilir. Fragmente edilmiş DNA, agaroz jel elektroforezi ile boyutuna göre ayrılır ve telomerik fragmanlar, telomerik DNA için spesifik etiketli prob kullanılarak Southern blot ya da jel hibridizasyon yoluyla saptanır. Elde edilen sonuçlar bilinen bir standart ile karşılaştırılarak ortalama genomik telomer uzunluğunu tahmin etmek için kullanılır (Aubert ve ark., 2012; Kimura ve ark., 2010; Lisa ve ark., 2017; A. J. Montpetit ve ark., 2014).

Diğer bir yöntem olan tek telomer uzunluğu analizi (STELA), sınırlı başlangıç materyalinden son derece hassas telomer ölçümleri üretmek için tek moleküllü PZR yöntemini içerir. Tüm telomerlerin tek sarmallı 3′ G bakımından zengin bir uzantı ile sona ermesi gerçeğinden yararlanan STELA yöntemi, telomerin 5′ ucuna bir oligonükleotid bağlayıcıyı bağlamayı ve uzamatmayı içerir. Bir bağlayıcı-spesifik primer ile alt-telomerik diziye özgü bir primer, tek bir telomer için bireysel amplikon oluşturmak üzere küçük bir havuz PZR reaksiyonu oluşturur. STELA özel bir ekipman gerektirmezken, tek moleküllü PZR tekniklerinde önemli ölçüde başlangıç optimizasyonu ve deneyimi gerektirir. STELA ile en büyük avantaj, sınırlayıcı başlangıç materyali ile oldukça hassas telomer uzunluk ölçümleri üretme kabiliyetidir. Bunun yanı sıra, pikogram aralığında veya 50 hücre kadar az DNA

güvenilir uzunluk ölçümleri sağlamak için yeterlidir ve bu bağlamda, STELA nadir hücre tiplerinin analizine uygundur. TRF analizindeki kesim yeri telomer başlangıcından bilinmeyen bir mesafe olmakla birlikte, STELA'da kullanılan subtelomerik primerin yerleri, hücreler, örnekler ve bireyler arasında bilinir ve sabittir ve bu nedenle telomer uzunluğunun en doğru şekilde ölçüldüğü söylenir. Küçük telomer uzunluğu değişikliklerinin karşılaştırılmasında bu yöntem avantajlı olmakla birlikte, belirli bir kromozom ucunun tüm hücre içindeki telomer uzunluğu durumunu temsil edemeyeceği için, tek bir kromozom ucunun analizi kısıtlayıcıdır. Ayrıca STELA'nın çok uzun telomerlerin analizinde sınırlı olduğu gösterilmiştir (Aubert ve ark., 2012; M Hills, Lucke, Chavez, Eaves, ve Lansdorp, 2009).

Kantitatif Floresan İn Situ Hibridizasyon (Q-FISH) ve Flow-FISH yöntemleri kantitasyon yapılacak şekilde modifiye edilmiş geleneksel FISH methodudur. Görüntü sitometrisi ve interfaz veya metafaz kromozomları kullanan Q-FISH yöntemi, denatüre edilmiş telomer DNA tekrar dizilerine spesifik olarak yüksek afinite ile hibritlenen doğrudan floresan etiketli (CCCTAA) 3 peptit nükleik asit (PNA) problarını kullanır. Floresan sinyal daha sonra Q-FISH görüntü analizi için özel yazılımlar ile bilinen telomer uzunluğu standartlarına göre tespit edilip ve ölçülebilir. Q-FISH, belirli kromozom uçlarında (ve tüm kromozomlarda) yüksek çözünürlüklü telomer uzunluğu ölçümleri için tercih edilen yöntemdir, çünkü eş zamanlı karyotipleme sağlar. TRF ve PZR-bazlı analizlerden farklı olarak, Q-FISH için substrat DNA yerine hücrelerdir. Q-FISH yöntemleriyle değerlendirme için kullanılan hücreler taze (kromozoma özgü analizler için gereklidir), donmuş, formalinle sabitlenmiş veya parafine gömülü olabilir. Metafaz Q-FISH'in gerçekleştirilmesinin temel dezavantajı, yaşlı hücrelerdeki, yüksek derecede anormal hücrelerdeki veya genellikle bölünemeyen hücrelerdedeki telomerlerin ölçülmesinin mümkün olmamasıdır. Bunu önlemek için yüksek verimli Q-FISH seçenekleri geliştirilmeye başlamıştır. Flow-FISH, Q-FISH ile aynı yönteme dayanır, tek tek hücrelerdeki telomerlerin ölçülmesi için akış sitometrisini kullanır ve çoklu hücre tiplerinin telomerleri ölçülüp karşılaştırılabilir (Aubert ve ark., 2012; P. Lansdorp ve ark., 1996; A. J. Montpetit ve ark., 2014).

2002 yılında Cawthon ve arkadaşları tarafından ortalama telomer uzunluğunu ölçmek için kantitatif PZR (Q-PZR) analizleri geliştirilmiştir. Q-PZR analizlerini

basit ve hızlı olmasının yanı sıra az miktarda DNA gerektirmesi yöntemi avantajlı kılar (örnek başına <100 ng) (R. M. Cawthon, 2002). Telomer uzunluğu sigara, obezite ve diyet faktörleri, stres, genel fiziksel sağlık, oksidatif hasar ve kanser riski açısından incelemek için bugüne kadar on binlerce örnekte bu yöntemle çalışılmıştır. Q-PZR ile belirlenen telomer uzunluğu ile önemli ölçüde ilişkili olan genetik varyantların keşfi, bu yöntemin geçerli ve hassas bir ölçüm aracı olduğunu kanıtlamıştır. Bu yöntemde spesifik olarak tasarlanan primerler kullanılarak, 20-40 döngü boyunca, her bir döngü ile ikiye katlanan PZR ürünü (amplikon) meydana gelir. Tipik olarak qPZR'de, ilgilenilen DNA sekansının miktarı, çift şeritli DNA ile araya giren bir floroforun (örneğin SYBR GREEN) bir floresan sinyali yayması sonucu ölçülür. Her döngüden sonra, yayılan floresan miktarı ölçülür, bu da başlangıç materyalinin miktarının belirlenmesine izin verir. Cawthon'un ilk qPZR tekniği (2002) araştırmacılar tarafından en sık kullanılan yöntemdir. Telomer uzunluğu, telomer amplifikasyon ürünü (T) miktarının, tek-kopya genin (S) miktarının karşılaştırılması ile ölçülmüştür (R. Cawthon, 2009; R. M. Cawthon, 2002; A. J. Montpetit ve ark., 2014). Ancak laboratuvarlar arası varyasyon katsayılarının Q-PZR için diğer yöntemlere göre daha yüksek olması bu yöntemin bir dezavantajı olarak kabul edilmektedir (Barrett ve ark., 2015).

9. GEREÇ ve YÖNTEM

9.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuarında kullanılacak mevcut olanaklar ve kimyasallar aşağıda listelenmiştir;

LightCycler 480, Roche (Almanya)
Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
Agaroz Jel Elektroforez Güç Kaynağı, ATTO (Japonya)
Agaroz Jel Tankı ve Düzeneği (Mini), Biometra (A.B.D)
Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu -20 ºC, Philco (Türkiye)
Derin Dondurucu -80 ºC, Thermo 702 (A.B.D.)
Etüv, Heraeus (Almanya)
Hassas Terazi, Metler AT 261 (İsviçre)
Hassas Terazi, Metler PJ6000 (İsviçre)
Isı Döngü Cihazı, Biometra (A.B.D)
Jel-kaseti, invitrogen (A.B.D)
Kamera, Polaroid MP-4 (ABD)
Kırık Buz Makinesi, Scotsman (ABD)
Laminar Flow, Özge A.T. (Türkiye)
Laminar Flow, Heraus (Almanya)
Manyetik Karıştırıcı, Eletro-Mag (Türkiye)
Manyetik Karıştırıcı, IKA (ABD)
Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (ABD)
Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)
Otoklav, All American (ABD)
Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)
pH Metre, WTW (Almanya)
UV Kaynağı, Vilber Lourtmat (Fransa)
Jel Dokümantasyon Sistemi, Synergene Genius (İngiltere)

Spektrofotometre, Ultraspec 3300 pro Biochrom Ltd. (İngiltere)
Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)
Vorteks, IKA (A.B.D)
Thermo-Isısal Döngü Cihazı (A.B.D)
EtOH, Merck (Almanya)
SDS, Sigma (A.B.D.)
DEPC, Sigma (A.B.D.)
LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Almanya)
LightCycler 480 Multiwell Plaka 96 ROCHE (Almanya)
HP PZR Template Preparation Kit ROCHE (Almanya)
200 ul DNase, RNase, Pyrogen Free Pipet Ucu, 1000 ad/pk AXYGEN
50 mL, DNase, RNase, Pyrogen Free, Falkon Tüp, 25 ad/pk AXYGEN
0.2 mL, DNase, RNase, Pyrogen Free, PZR Tüpü, 1000 ad/pk AXYGEN
2 mL DNase, RNase, Pyrogen Free Mikrotüp, 500 ad/kt AXYGEN
HP PZR Product Purification Kit, 250 pcs. ROCHE
HPLC İşaretli Oligonükleotid PRIMER100 NMOL 500bp
AmpliSeq™ for Illumina BRCA Panel
AmpliSeq™ Library PLUS for Illumina®
AmpliSeq™ CD Indexes Set A for Illumina®
EXPAND LONG TEMPL.PZR SYST. 150 U
E.Z.N.A.® Blood DNA Midi Kit
PerfectPure RNA Purification Kit
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit
Nextera DNA Sample Preparation Kit
Nextera XT Index kit
MasterAmp™ Extra-Long PZR Kit
FastStart SYBR Green Master (Roche)
EDTA, Sigma (ABD)
Etanol, Carlo Erba (İtalya)
Etidyum bromid, sigma (ABD)
Fenol, Sigma (ABD)
İzoamil alkol, Merck (Almanya)
Kloroform, Carlo Erba (İtalya)
Ultra Low Range, DNA belirteç, MBI Fermentas (Litvanya)
50 bp Step Ladder, DNA belirteç, MBI Fermentas (Litvanya)
100 bp Step Ladder, DNA belirteç, MBI Fermentas (Litvanya)

9.2. Çalışma Grubunun Belirlenmesi

Bu çalışma Marmara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi ve Patoloji bölümleri ile Acıbadem Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü ortaklaşa katkılarıyla yürütülmüştür. 50 yaşından önce meme kanseri tanısı almış hastalardan, her iki memede kanser saptanan yaş bağımsız hastalardan, ailesel kanser geçmişi bulunan ve meme kanseri olan veya riski taşıyan hastalardan ve bu hastaların gönüllü 1. derece akrabalarından toplamda 113 hastadan mor kapaklı EDTA'lı tüplere 3 mL kan örneği alınmıştır. Bu kanlardan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında DNA izolasyonu yapılmış, DNA ve kalan kan örnekleri -80 derecede saklanmıştır. Tez çalışmasının etik açıdan uygunluğu, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonu'nun 09.01.2015 tarihli Etik Komisyonunda incelenmiş ve oy birliğiyle onaylanmıştır.

9.3. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden ticari kit (Roche) ile kandan DNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Periferik kan örneklerinden 200 µL alınarak steril 1.5 mL'lik mikro tüpe aktarıldı.

2. Tüp içindeki örneğin üzerine 25 µL Proteinaz K eklenerek 10 sn. kadar vortekslendi.

3. Vorteksleme işleminin ardından örneğe liziz çözeltisi eklenip 15 sn. vortekslenerek iyice karışması sağlandı.

4. 55 ^{o}C'de 10 dakika inkübe edildi ve inkübasyon sırasında kısaca vortekslendi.

5. 250 µL ethanol, inkübe edilmiş lizata eklenip vortekslenerek karıştırıldı.

6. Tüm örnek 2 mL'lik kolonlu tüplere aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.

7. Kolon yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µL DNA yıkama tampon solüsyonu ilave edilerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.

8. Kolon yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µL DNA elüsyon solüsyonu ilave edilerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.

9. Tüpün içinde kalan materyal tüm çalışmalar için uygun hale getirilmiş DNA'dır ve diğer deneylerde kullanılana kadar -80 ^{o}C'de saklanmıştır.

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir (Genellikle 260/280 oranı 1.8 – 2.0 aralığında olan ve herhangi bir degredasyon içermeyen örnekler saf kabul edilmektedir). Spektrofotometrik olarak DNA'nın saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

9.4. PZR Yöntemiyle Telomer Uzunluğu Ölçümü

Çalışmamızda kullandığımız primerler bu yöntemin öncüsü olan Cawthon'ın makalesinden alınmıştır ve aşağıda görülmektedir (R. Cawthon, 2009; R. M. Cawthon, 2002). Çalışmada tercih edilen tek kopya gen, 12. kromozomda bulunan asidik ribozomal fosfoprotein PO'yu kodlayan 36B4'tür.

<u>Telomer Primerleri;</u>

Telomer-F: CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT,

Telomer-R: GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT

<u>Tek kopya gen (36B4) Primerleri;</u>

36B4-F: CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

36B4-R: CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC

Her bir primer, DNA polimerazın telomer heksamer tekrarlarına hibridize edildiğinde 3′ ucundan uzamasına izin verecek şekilde tasarlanmıştır. İki primerin benzer baz tekrarlarından oluşması nedeniyle primer dimeri oluşması ihtimali oldukça yüksektir. Her bir primerin 5′ ucundaki son altı bazı telomer dizisi ile komplementer değildir ancak 3' ucundaki son 5 baz tam olarak eşleşir ve DNA polimeraz yeni bazları eklemeye başlar.

Eş zamanlı PZR (RT-PZR) reaksiyonu, DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı takibine olanak sağlar. SYBR Green bu amaçla sıklıkla kullanılan boyalardan biridir ve çift iplikli DNA molekülüne bağlanır. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı artış gösterir ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarı da artar. SYBR Green boyasından alınan ışımanın

sınır değeri aştığı noktaya Ct değeri adı verilmektedir. Işımanın sınır değeri aştığı anda amplifikasyondan emin olunur ancak doğru amplikonun takibinin yapıldığının belirlenebilmesi için erime eğrisinin incelenmesi gerekmektedir.

Çift iplikli bir DNA molekülünün erime sıcaklığı molekülün uzunluğuna ve baz içeriğine bağlıdır ve molekülün yarısının denatüre olabilmesi için gerekli sıcaklık değeridir. Böylelikle, belirli bir primer kullanılarak amplifiye edilmiş dizilerin, diziye özgün bir erime sıcaklığı olacaktır. RT-PZR ile amplifiye edilen DNA moleküllerinin erime sıcaklıkları cihaz tarafından görüntülenir ve amplikonlar için benzer ısı aralığında pik alınması PZR reaksiyonunun özgünlüğünün göstergesidir.

Eş zamanlı kantitatif PZR reaksiyonu ile kantitasyon yapılmasına yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan sıklıkla kullanılanı göreceli kantitasyon yöntemidir. Yöntem, değişik şartlar altında ekspresyonu değişmeyen, her doku veya hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden eksprese edilen bir referans gen ekspresyonunun hedef gen ekspresyonu ile kıyaslanmasına dayanır, bizim çalışmamızda referans gen olarak 36B4 geni kullanılmıştır. Bu yönteme delta Ct adı verilmektedir ancak bu çalışmada T/S -telomer geni/tek kopya geni- oranı olarak da isimlendirilecektir. ΔC_T hesabı için, her örneğin telomer primeriyle çalışılan kuyulardan elde edilen ortalama C_T değerlerinden, 36B4 primeriyle çalışılan kuyulardan elde edilen ortalama C_T değerleri çıkarılmıştır ($C_T^{\ hedef}$ - $C_T^{\ referans}$).

Q-PZR reaksiyonuna eklenecek DNA miktarı, karışık bir örnek DNA havuzunun seyreltme serisinden elde edilen standart eğriden hesaplandı ve her reaksiyonda 10 ng DNA kullanılmasına karar verildi. LightCycler 480 SYBR Green I Master kiti kullanılarak, biri Telomer primer çifti, diğeri tek kopya gen 36B4 primer çifti ile iki ana PZR reaksiyon karışımı Tablo 6'ya göre hazırlandı. Çalışmada 96 kuyulu plaka'lar kullanıldı ve her bir örnek iki ayrı gen için duplike çalışıldı.

Deneyler gerçek zamanlı PZR cihazında (lightCycler 480, Roche) gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PZR cihazında girilen program Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 6: PZR reaksiyon içeriği

	Reaksiyon için gerekli son konsantrasyon ve kuyu başına gereken miktar
Distile su	1X (4.6 µL)
Primer F (10pmol/µL)	0.1 µM (0.2 µL)
Primer R (10pmol/µL)	0.1 µM (0.2 µL)
Master mix (2X)	1X (10 µL)
Genomik DNA (4ng/µL)	10 ng (2.5 µL)
	Son Hacim: 20µL

Tablo 7: Q-PZR programı

Tespit Formatı SYBR Green	**Blok Tipi** 96	**Reaksiyon Hacmi** 20 µL
Programlar		
Program İsmi Ön İnkübasyon Amplifikasyon Erime Eğrisi Soğutma	**Döngü** 1 40 1 1	**Analiz Modu** Yok Kantifikasyon Erime Eğrileri Yok
Sıcaklıkların Ayarlanması		
Ön-İnkübasyon 95°C 10 dakika Amplifikasyon 95°C 15 saniye Primer Bağlanması 60°C 1 dakika Uzatma 72°C 30 saniye		
Erime Eğrisi		
95°C 40°C 97°C	5 saniye 1dakika -	
Soğutma 40°C	10 saniye	

9.5. BRCA1 ve BRCA2 Dizilenmesi

AmpliSeq Illumina BRCA Paneli, BRCA1 ve BRCA2'nin tüm ekzonik ve komşu intronik bölgeleri boyunca somatik ve germline mutasyonlarını saptamak için tasarlanmış bir hedef dizi analizidir. BRCA1 ve BRCA2 içinde genomik varyasyonun hızlı ve doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. BRCA paneli, PZR tabanlı kütüphane hazırlığı, Illumina sentez yoluyla dizileme (SBS) kimyası, yeni nesil sekanslama (NGS) teknolojisi ve otomatik analiz içeren iş akışının bir parçasıdır. Kütüphane hazırlığı, 5 saat gibi kısa bir sürede tamamlanabilen, basit,

PZR tabanlı bir protokol izler. Ortaya çıkan kütüphaneler normalize edilebilir, bir araya getirilebilir ve daha sonra dizilim için bir akış hücresine yüklenebilir. Hazırlanan kütüphaneler, herhangi bir uyumlu Illumina dizileme sisteminde kanıtlanmış SBS kimyası kullanılarak dizilenir. AmpliSeq Illumina BRCA Paneli protokolü aşağıdaki başlıklar altında toplanabilir.

1. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA'nın konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre Nanodrop ND-1000 kullanılmıştır ve AmpliSeq Illumina BRCA protokolü, yüksek kaliteli numuneden insan DNA'sının havuz başına 1−100 ng'ını desteklemektedir. Önerilen, havuz başına 10 ng yüksek kaliteli DNA'dır ve DNA'larımız 20 ng kullanılmak üzere 5 ng/µL olacak şekilde seyreltilmiştir.

2. Hedef bölge amplifikasyonu

4.5 µL 5X AmpliSeq HiFi Mix, 4 µL DNA ve 9.5 µL dH_2O 1.5 mL'lik tüpte karıştırılmış ve 8 µL, plaka'da 2 kuyuya aktarılmıştır. İlk kuyuya 2 µL 5X AmpliSeq Panel Havuz 1, ikinci kuyuya 2 µL 5X AmpliSeq Panel Havuz 2 eklenmiştir. Plaka'nın üzeri kapatılıp hafifçe santrifüj edilmiş ve ısı döngü cihazına yerleştirilmiştir. Kapak 105 °C'ye ayarlıyken 2 dakika 99 °C'de, sonra toplamda 18 döngü olacak şekilde 15 saniye 99 °C ve ardından 4 dakika 60 °C'de reaksiyon başlatılmıştır.

3. Amplikonların kısmi parçalanması

Bir önceki aşamadan sonra plaka hafifçe santrifüj edilmiş ve 2. havuzdaki 10 µL, 1.havuzun olduğa kuyuya eklenmiş ve 1 örnek için tek kuyuda 20 µL'lik reaksiyon hacmi elde edilmiştir. 20 µL hedef amplifikasyon reaksiyonuna 2 µL FuPa Reaktifi eklenip 22 µL son hacime ulaşılmıştır. Plaka'nın üzeri kapatılıp hafifçe vortekslenip ardından hafifçe santrifüj edilmiş ve ısı döngü cihazına yerleştirilmiştir. Kapak 105 °C'ye ayarlıyken 10 dakika 50 °C'de, sonra 10 dakika 55 °C'de ve ardından 20 dakika 62 °C'de reaksiyon başlatılmıştır.

4. İndexlerin bağlanması

Bu adımda, her bir örneğe Index 1 (i7) ve Index 2 (i5) adaptörleri bağlanır. Benzersiz kombinasyonlar sağlamak için endeksler tek kullanımlık bir plakada önceden karıştırılır. Her kütüphane çift indeksli sıralama için benzersiz bir indeks kombinasyonuna sahip olmalıdır. Bir önceki aşamadan sonra plaka hafifçe santrifüj

edilmiş ve kapağı açılmıştır. Kuyulara 4 µL Switch Solüsyonu, 2 µL AmpliSeq CD Indexleri ve 2 µL DNA Ligaz eklenip plaka'nın üzeri kapatılıp hafifçe vortekslenip ardından hafifçe santrifüj edilmiş ve ısı döngü cihazına yerleştirilmiştir. Kapak 105 °C'ye ayarlıyken 30 dakika 22 °C'de, sonra 5 dakika 68 °C'de ve ardından 5 dakika 78 °C'de reaksiyon başlatılmıştır.

5. Kütüphane temizliği

Bir önceki aşamadan sonra plaka hafifçe santrifüj edilip kuyulara 30 µL AMPure XP boncuk eklenip plaka tekrar kapatılmıştır. Plaka hafifçe vortekslenip, hafifçe santrifüj edilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Plaka manyetik bir stand üzerine yerleştirilmiş ve karışım temizlenene kadar beklenmiştir (~ 2 dakika). Her bir kuyucuktan tüm süpernatant boncuklara dokunmadan çekilmiş ve atılmıştır. Her kuyucuğa 150 µL taze hazırlanmış %70 EtOH eklenip oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (~ 30 saniye). Peleti bozmadan, süpernatan çekilmiş ve atılmıştır. EtOH yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Plaka'nın üzeri kapatılıp manyetik stand'dan alınmış ve kısaca santrifüjlenmiştir. Ardından plaka tekrar manyetik stand'a yerleştirilip pipetle kalan EtOH çekilmiştir. Plaka, ağzı açık şekilde manyetik stand üzerinde 10 dakika boyunca kurutulmuş ve EtOH tamamen buharlaştırılmıştır.

6. Kütüphane amplifikasyonu

Bu ikinci amplifikasyon adımı, Illumina sistemlerinde dizileme için yeterli miktarın temin edilmesi için kütüphaneleri güçlendirir. Amplifikasyon reaksiyonu, bir önceki adımdan taşınan boncukları içerir. Plaka manyetik stand'dan alınıp kuyulara 45 µL 1X Lib Amp Mix ve 5 µL 10X Library Amp Primers eklenip pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Plaka'nın üzeri kapatılıp hafifçe vortekslenip ardından hafifçe santrifüj edilmiş ve ısı döngü cihazına yerleştirilmiştir. Kapak 105 °C'ye ayarlıyken 2 dakika 98 °C'de, sonra toplamda 7 döngü olacak şekilde 15 saniye 98 °C ve ardından 1 dakika 64 °C'de reaksiyon başlatılmıştır.

7. İkinci kütüphane temizliği

Bir önceki aşamadan sonra plaka hafifçe santrifüj edilmiş ~ 50 µL kütüphane içeren her kuyuya 25 µL AMPure XP boncuk eklenmiş, plaka tekrar kapatılmıştır. Bu aşama, reaksiyonda bulunan boncuklara boncuklar ekler. Plaka hafifçe vortekslenip, hafifçe santrifüj edilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Plaka manyetik bir stand üzerine yerleştirilmiş ve karışım temizlenene kadar beklenmiştir

(~5 dakika). Her bir kuyucuktan istenen amplikon kütüphanesini içeren tüm süpernatant (~75 µL) yeni bir plaka'ya aktarılmıştır (Küçük miktarlarda boncuk taşınması performansı etkilemez). Aktarılan süpernatantı içeren her bir kuyucuğa 60 µL AMPure XP boncuk eklenmiş ve ardından plaka tekrar kapatılmıştır. Plaka hafifçe vortekslenip, hafifçe santrifüj edilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Plaka manyetik bir stand üzerine yerleştirilmiş ve karışım temizlenene kadar beklenmiştir (~5 dakika). Tüm süpernatant boncuklara dokunmadan çekilmiş ve atılmıştır. Her kuyucuğa 150 µL taze hazırlanmış %70 EtOH eklenip oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (~ 30 saniye). Peleti bozmadan, süpernatan çekilmiş ve atılmıştır. EtOH yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Kuyulardan pipetle kalan EtOH çekilmiştir ve plaka, ağzı açık şekilde manyetik stand üzerinde 5 dakika boyunca kurutulmuş ve EtOH tamamen buharlaştırılmıştır. Plaka manyetik stanttan çıkartılmış her kuyuya 30 µL TE eklenip plaka kapatılmıştır. Plaka hafifçe vortekslenip, hafifçe santrifüj edilmiştir. Plaka manyetik bir stand üzerine yerleştirilmiş ve karışım temizlenene kadar beklenmiştir (~5 dakika). Yeni bir PZR plakasına 27 µL süpernatan aktarılmıştır (süpernatan, amplikon kütüphanesini içerir).

8. Kütüphane kontrolu, normalizasyonu ve havuzda toplanması

Tipik kütüphane fragmanları 201-274 bç boyutlarındadır, önerilen boyut dağılımı 200–340 bç'dir. Kontrol, Agilent DNA1000 Kiti ile Agilent 2100 Bioanalyzer cihazında gerçekleştirilmiştir. Kütüphane miktarlarının belirlenmesi için de Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) kullanılmıştır. Nanodrop ND-1000 ile ölçülen numuneler eşit hacimlerde karıştırılarak bir örnek havuzu oluşturulmuş ve bu DNA havuzu hibridizasyon tampon çözeltisi ile 20 pM'e seyreltilmiştir. Oluşturulan havuzdaki DNA dizileri ısı ile denature edilerek tek zincirli hale getirilmiş ve akış hücresine (flow cell) yüklenmiştir. DNA dizileri akış hücresi üzerindeki sabit primer dizilerine bağlanacaktır (bu primer dizileri kütüphane oluşturma aşamasında kullanılan adaptor (index) dizilerine tamamlayıcı dizilerdir).

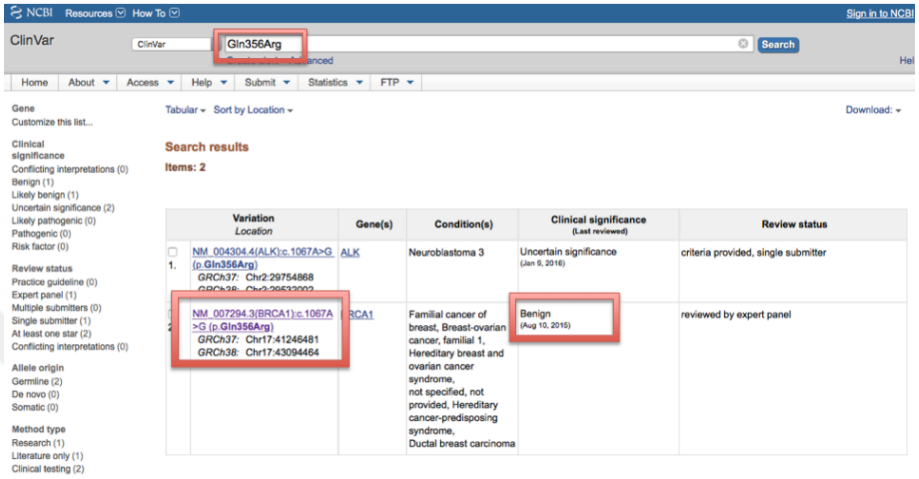
Bu aşamadan sonra, Illumina Miseq cihazında, cihaz protokolüne uygun biçimde, sentezleyerek dizileme aşamasına geçilmiştir. Burada floresan olarak işaretlenmiş dört nükleotid ile milyonlarca kümenin okunabilmesi sağlanmaktadır. Elde edilen DNA dizileri kalite skoru (Q score) filtresinden geçirilerek, genel kalite skor değeri 30'un altında olan diziler elenmiştir. Diziler kullanılan DNA etiketlerine göre

ayrıştırılmış ve bu sayede her örnek için farklı bir DNA dizi dosyası oluşturulmuştur. DNA dizileri, her örnek için ayrı ayrı olacak şekilde, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin referans DNA dizileri'ne göre hizalanmıştır. DNA örneklerindeki hedef varyasyon bölgeleri, varyasyon çağırma (variant calling) Burrows-Wheeler Aligner ve GATK (The Genome Analysis Toolkit) yazılımları ile standartlara uygun olarak yapılmış ve varyasyon yüzdeleri, biyoinformatik programlar ve veritabanları kullanılarak belirlenip ve listelenmiştir.

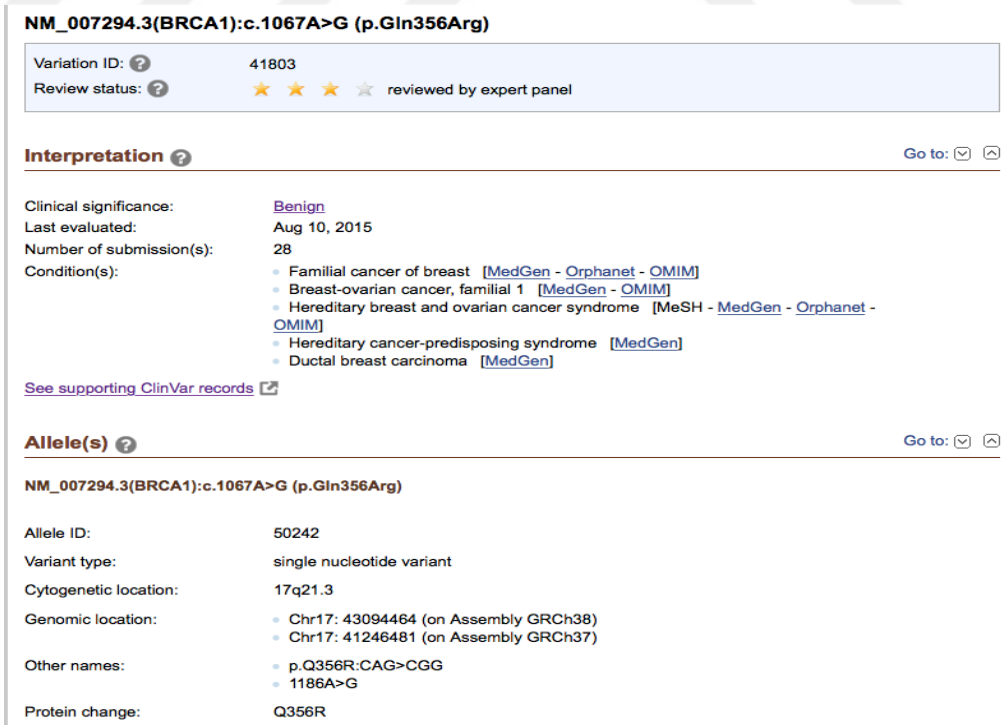
9.6. Mutasyonların Belirlenmesi ve Analizleri

Dizileme sonucu elde edilen veriler, mutasyonları değerlendirmek amacıyla teker teker NCBI (National Center for Biotechnology Information) ve ExAc (Exome Aggregation Consortium) veritabanlarında taratılmıştır. NCBI, biyoteknoloji ve biyomedikal ilişkili bir dizi veritabanına ev sahipliği yapar ve biyoinformatik araçlar ve hizmetler için önemli bir kaynaktır. Ekzon Toplama Konsorsiyumu (ExAC), çok çeşitli ve büyük ölçekli dizileme projelerinden, ekzon dizileme verilerini toplamak ve harmonize etmek isteyen araştırmacıların bir koalisyonudur ve geniş bir bilimsel topluluk için bizim erişebileceğimiz özet veriler hazırlar. Örneğin, 3 numaralı hastanın dizileme sonucu bulunan BRCA1 geni Gln356Arg varyantı için öncelikle https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar web adresine girilip "Gln356Arg" yazılmış ve Şekil 12'deki veriye ulaşılmıştır. BRCA1 geni içerisindeki varyantı gösteren linke tıklanıp, o variant için var olan bilgilere ulaşılmıştır (Şekil 13). Şekil 12 ve 13'te görüldüğü üzere, bu mutasyonun tek nükleotid varyantı ve iyi huylu olduğu belirtilmiştir (benign). Ayrıca bu veritabanından mutasyon ile ilişkilendirilmiş hastalıklara da erişim sağlanmaktadır. Şekil 13'te ayrıca bu mutasyonun lokasyonunun ve diğer veritabanlarına erişim link'lerin de olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed web adresinden "Gln356Arg ve BRCA1" araması yapılıp, bu mutasyonu içeren makalelere erişim sağlanmıştır. Belirlenmiş mutasyonun alel frekansını kontrol etmek için ExAc veritabanı kullanılmıştır. Şekil 14'te ExAc veritabanı sonucu gösterilmektedir ve bu mutasyonun alel frekansının 0.044 olduğu gösterilmiştir, aynı zamanda bu mutasyonun bir missense (kayıp) mutasyon olduğu da belirtilmiştir. ExAc veritabanında farklı BRCA1 transkriptlerinde bu mutasyonun patojenik olabileceği

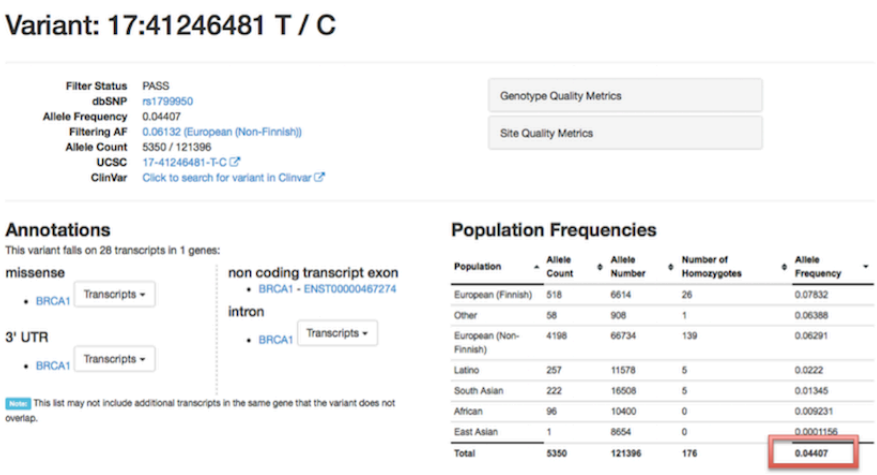
de belirtilmiştir, bunlar kontrol edilmelidir. Alel frakansını 1000 Genomes veritabanında incelemek için www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes web adresine erişilmelidir. Diğer bir örnek olarak, 30 numaralı hastanın dizileme sonucu bulunan BRCA2 geni c.3751_3752insA (p.Thr1251AsnfsTer14) varyantı, ClinVar veritabanında belirtildiği üzere patojenik bir varyanttır (Şekil 15).



Şekil 12: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı NCBI/ClinVar araması



Şekil 13: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı NCBI/ClinVar detaylı araması



Variant: 17:41246481 T / C

Filter Status PASS
dbSNP rs1799950
Allele Frequency 0.04407
Filtering AF 0.06132 (European (Non-Finnish))
Allele Count 5350 / 121396
UCSC 17-41246481-T-C
ClinVar Click to search for variant in Clinvar

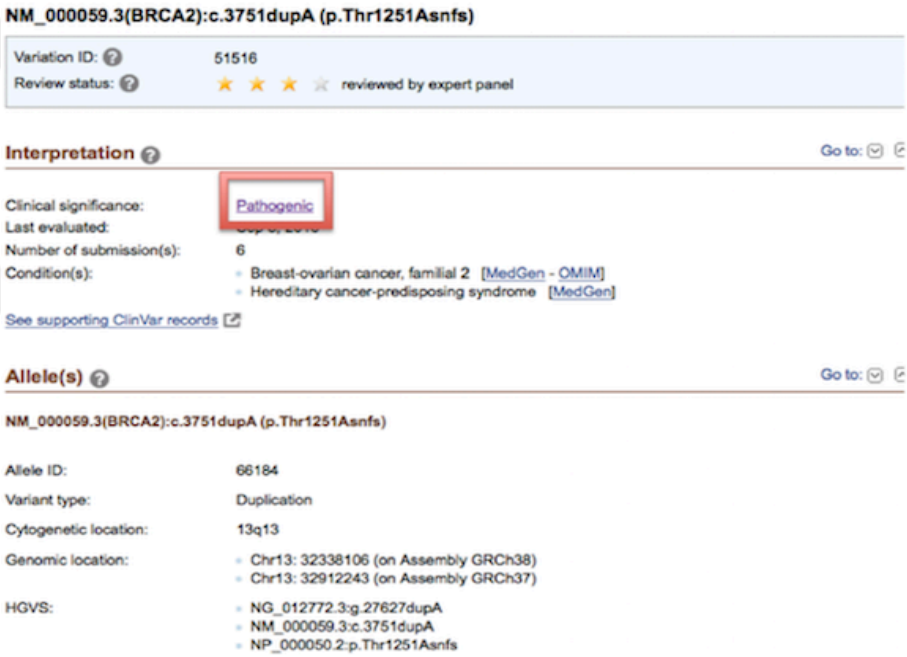
Genotype Quality Metrics
Site Quality Metrics

Annotations
This variant falls on 28 transcripts in 1 genes:
missense
• BRCA1 Transcripts
3' UTR
• BRCA1 Transcripts
non coding transcript exon
• BRCA1 - ENST00000467274
intron
• BRCA1 Transcripts
Note This list may not include additional transcripts in the same gene that the variant does not overlap.

Population Frequencies

Population	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency
European (Finnish)	518	6614	26	0.07832
Other	58	908	1	0.06388
European (Non-Finnish)	4198	66734	139	0.06291
Latino	257	11578	5	0.0222
South Asian	222	16508	5	0.01345
African	96	10400	0	0.009231
East Asian	1	8654	0	0.0001156
Total	5350	121396	176	0.04407

Şekil 14: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı ExAc veritabanı araması



NM_000059.3(BRCA2):c.3751dupA (p.Thr1251Asnfs)

Variation ID: 51516
Review status: ★★★☆ reviewed by expert panel

Interpretation Go to:

Clinical significance: Pathogenic
Last evaluated:
Number of submission(s): 6
Condition(s):
- Breast-ovarian cancer, familial 2 [MedGen - OMIM]
- Hereditary cancer-predisposing syndrome [MedGen]

See supporting ClinVar records

Allele(s) Go to:

NM_000059.3(BRCA2):c.3751dupA (p.Thr1251Asnfs)

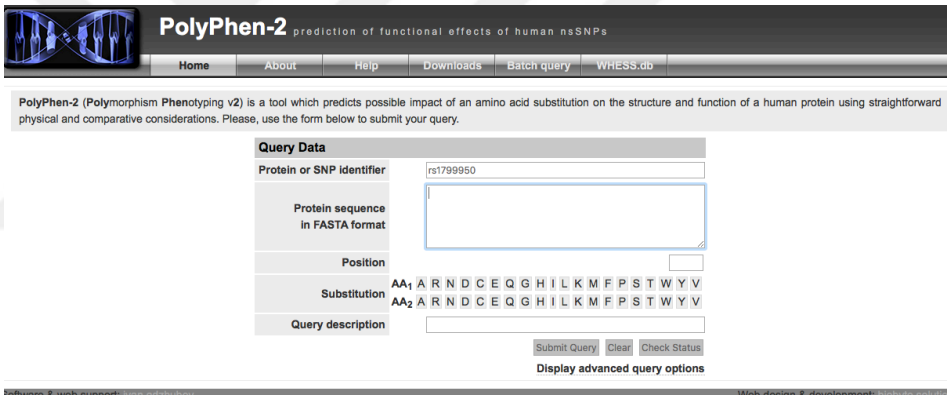
Allele ID: 66184
Variant type: Duplication
Cytogenetic location: 13q13
Genomic location:
- Chr13: 32338106 (on Assembly GRCh38)
- Chr13: 32912243 (on Assembly GRCh37)

HGVS:
- NG_012772.3:g.27627dupA
- NM_000059.3:c.3751dupA
- NP_000050.2:p.Thr1251Asnfs

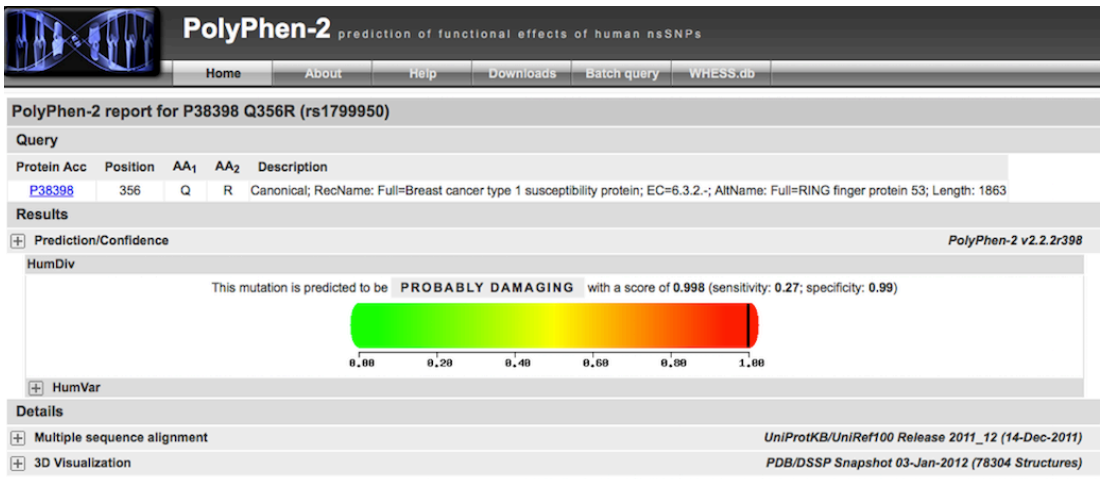
Şekil 15: BRCA2 geni c.3751_3752insA (p.Thr1251AsnfsTer14) varyantı NCBI/ClinVar detaylı araması

Varyantların, proteinler üzerinde potansiyel fonksiyonel önemleri ek olarak PolyPhen (Polymorphism Phenotyping v2), SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) ve CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) algoritmaları ile öngörülmüştür. Varyantlar, bu algoritmalar tarafından zarar verici, muhtemelen zarar verici veya zararsız (tolere) olarak tanımlanır ve CADD skoru için algoritma 99'a kadar bir değer verir ve skoru 15 üzeri varyantlar zararlı sınıfında değerlendirilir (Itan ve ark., 2016).

Bir Web sunucusu aracılığıyla temin edilebilen PolyPhen-2 (Polimorfizm Fenotipleme v2) yazılımı, amino asit sübstitüsyonlarının yapısal ve karşılaştırmalı evrimsel değerlendirmeler yaparak, insan proteinlerinin kararlılığı ve işlevi üzerindeki olası etkisini tahmin eder. Bu tahmin, varyasyonu karakterize eden bir dizi sekans, filogenetik ve yapısal özelliklere dayanır. Bir proteindeki belirli bir amino asit sübstitüsyonu için, PolyPhen-2 sübstitüsyon yerinin çeşitli sekanslarını ve yapı temelli özelliklerini çıkarır ve bunları bir olasılıksal sınıflandırıcıya sokar (Adzhubei, Jordan, ve Sunyaev, 2013). PolyPhen-2 veritabanını kullanmak için belirlenen rs numaraları sisteme girilir, örneğin 3 numaralı bireyin ExAc veritabanı sonucunda eriştiğimiz rs1799950 numarasını http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2 adresinden PolyPhen-2 veritabanına yükleyince, bu SNP'nin muhtemelen zarar verici bir SNP olduğu sonucu elde edilir (Şekil 16 ve Şekil 17).



Şekil 16: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı PolyPhen-2



Şekil 17: BRCA1 geni Gln356Arg varyantı PolyPhen-2 sonucu

CADD skorlaması işlevsel, zararlı ve patojenik varyantları birçok fonksiyonel kategoriye ve etki boyutlarına göre önceliklendirir. CADD, hem moleküler işlevsellik hem de patojenisite ile güçlü bir şekilde ilişkili olan bir özelliği olan zararlılığı ölçer ve göreceli patojenliğini tahmin etmeye yardımcı olur. CADD skoru, tek tek genomlar içinde bilinen patojenik varyantları sıralar, allelik çeşitlilik, işlevsellik, patojenite, hastalık şiddeti, deneysel olarak ölçülen düzenleyici etkileriyele ilişkilidir (Kircher ve ark., 2014; H. Nakagomi ve ark., 2018). SNP'lerin CADD skorlamasını almak için Şekil 18'deki gibi SNP'nin bulunduğu genomik lokasyonu, referans ve gözlenen nükleotid bilgilerini içeren bir vcf (variant call format) dosyası hazırlanıp https://cadd.gs.washington.edu/score web adresine yüklenir ve belirli bir zaman sonra indirilmeye hazır hale gelen sonuçlarda CADD skorlamasına erişebilir (Şekil 18).

vcfi.txt

#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	SAMPLE
17	41246481.		T	C	.	.	.	GT:AD:DP:GQ:PL	.

GRCh37-v1.4_77f8d8da88f3ddf16a423ce22683039a.tsv

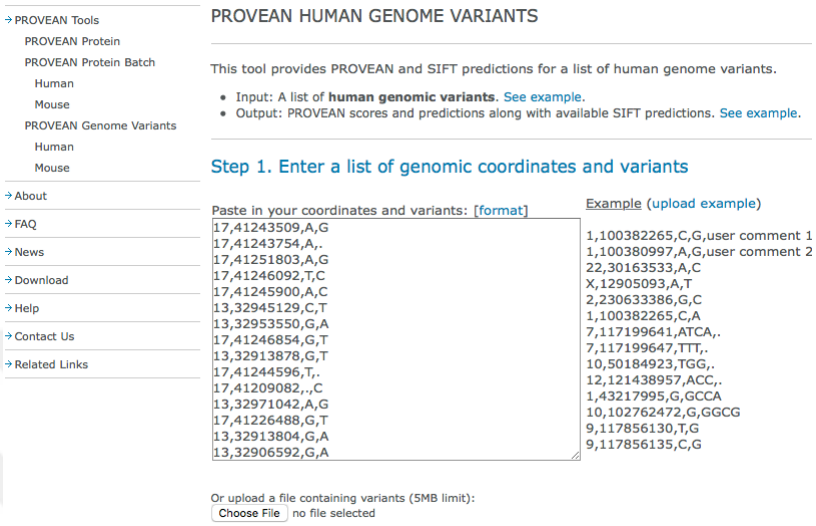
##CADD GRCh37-v1.4 (c) University of Washington, Hudson-Alpha Institu
and Berlin Institute of Health 2013-2018. All rights reserved.

#CHROM	POS	REF	ALT	RawScore	PHRED
11	108138003	T	C	1.035103	13.50
13	32906592	G	A	-0.558954	0.057
13	32906766	C	T	2.722760	23.0
13	32906874	A	G	2.006683	19.27
13	32907407	A	G	0.050948	3.444
13	32911375	G	A	0.007320	2.735
13	32911547	C	G	0.993842	13.24
13	32911802	A	C	3.695721	25.9
13	32911889	C	T	2.876952	23.4
13	32913091	A	C	0.908313	12.66
13	32913617	G	T	0.535847	9.709
13	32913804	G	A	0.422831	8.629
13	32913878	G	T	1.861822	17.94
13	32937456	A	G	-0.207353	0.681
13	32945099	G	C	3.999080	28.0
13	32945129	C	T	4.458800	33
13	32953550	G	A	3.768038	26.2
13	32971042	A	G	1.871247	18.02
13	32972626	A	T	6.470102	36
15	91304245	C	T	5.363452	35
17	41209082	C	CC	5.727827	35
17	41243924	A	AA	4.788107	34
5	131915022	G	A	3.223739	24.2

Şekil 18: Örnek vcf dosyası ve tüm BRCA1/2 gen mutasyonlarının ilgili veri tabanına girildiğinde elde edilen CADD skoru sonuçları

PROVEAN (Protein Varyasyon Etkisi Analizörü) bir amino asit sübstitüsyonu veya indelinin bir proteinin biyolojik işlevi üzerinde bir etkisi olup olmadığını tahmin eden bir yazılım aracıdır (Choi, 2012; Choi, Chan, ve Craig, 2015). PROVEAN skorlamasına erişmek için http://provean.jcvi.org/ web adresinden Şekil 19'da görüldüğü gibi bir yükleme yapılır. İlk olarak mutasyonun olduğu kromozom

numarası, ardından lokasyonu, ardından referans bazı ve son olarak belirlenen bazı aralarında virgül koyularak sisteme yüklenir ve bir excel dosyası olarak skorlamalar alınabilir (Şekil 20).

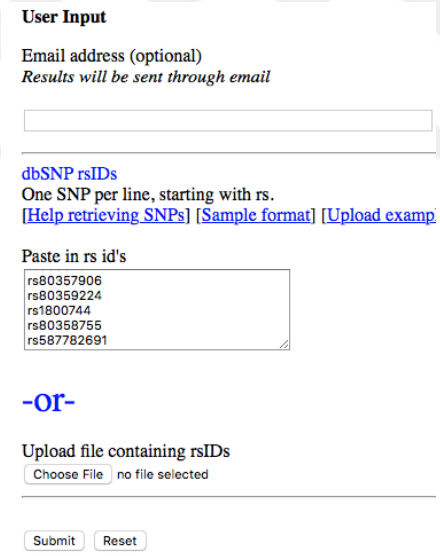


Şekil 19: PROVEAN algoritmasına veri yükleme

#ROW_NO.	GENE_NAME	CODON_CHAN	TYPE	SCORE	PREDICTION	SCORE	PREDICTION	dbSNP_ID
1								
2								
3								
4	BRCA2	AAG CA[G/A]	Synonymous	0.00	Neutral	1.000	Tolerated	rs11571655
5	BRCA1		Frameshift	NA	NA	NA	NA	
6	BRCA2		Frameshift	NA	NA	NA	NA	
7	BRCA2	ATG [G/C]AG	Single AA Cha	-0.89	Neutral	0.000	Damaging	
8	BRCA2	TTT [A/T]AA A	Nonsense	NA	NA	NA	NA	rs11571833
9	BRCA1		Frameshift	NA	NA	NA	NA	
10								
11	BRCA2	TTT [A/T]AA A	Nonsense	NA	NA	NA	NA	rs11571833
12								
13	BRCA1		Frameshift	NA	NA	NA	NA	
14	RAD50	AAG [G/A]TC	Single AA Cha	-0.82	Neutral	0.025	Damaging	rs28903086
15	BLM	ACC [C/T]AA	Nonsense	NA	NA	NA	NA	
16	BRCA2	TGT G[A/G]C	Single AA Cha	-1.21	Neutral	0.316	Tolerated	
17	BRCA1		Frameshift	NA	NA	NA	NA	
18								
19	BRCA2	GAA [A/G]CA	Single AA Cha	-0.12	Neutral	0.798	Tolerated	rs28897710
20	BRCA2	AAG [C/G]TC	Single AA Cha	-1.73	Neutral	0.141	Tolerated	rs55638633
21	BRCA2	AGC A[A/G]T	Single AA Cha	-0.45	Neutral	0.681	Tolerated	rs80359055
22	BRCA2	TTA [A/C]CA	Single AA Cha	-5.73	Deleterious	0.000	Damaging	rs80358577
23	BRCA2	AAA [C/T]CA	Single AA Cha	-5.76	Deleterious	0.018	Damaging	
24	ATM	CTA [T/C]TT A	Single AA Cha	-2.57	Deleterious	0.088	Tolerated	rs1800056
25	BRCA2	GTT AA[A/C]	Single AA Cha	-3.14	Deleterious	0.122	Tolerated	rs80358694
26	BRCA2	GTT AA[A/C]	Single AA Cha	-3.14	Deleterious	0.122	Tolerated	rs80358694
27	BRCA2		Frameshift	NA	NA	NA	NA	rs80359388
28	BRCA2	TTA [A/C]CA	Single AA Cha	-5.73	Deleterious	0.000	Damaging	rs80358577
29	BRCA2	ATC T[C/T]C A	Single AA Cha	-1.15	Neutral	0.012	Damaging	rs41293475
30	BRCA2	GCA [G/T]AT	Single AA Cha	-5.03	Deleterious	0.004	Damaging	
31	BRCA2	AAG [C/G]TC	Single AA Cha	-1.73	Neutral	0.141	Tolerated	rs55638633
32	BRCA2	TTT [A/T]AA A	Nonsense	NA	NA	NA	NA	rs11571833
33								
34	BRCA1		Frameshift	NA	NA	NA	NA	
35								
36								
37								
38	BRCA2	TTT [C/T]GC A	Single AA Cha	-2.38	Neutral	0.000	Damaging	rs80359104
39	BRCA2	AAG [G/A]CC	Single AA Cha	-1.19	Neutral	0.000	Damaging	rs11571769
40								
41	BRCA2	AAA [G/T]AT	Single AA Cha	-4.07	Deleterious	0.001	Damaging	
42	BRCA1		Frameshift	NA	NA	NA	NA	
43								
44	BRCA2	ATT G[A/G]C	Single AA Cha	-1.60	Neutral	0.124	Tolerated	rs80359224
45								
46	BRCA2	TCT G[G/A]T	Single AA Cha	-2.60	Deleterious	0.426	Tolerated	rs80358755
47	BRCA2	ACT A[G/A]C	Single AA Cha	-0.30	Neutral	0.343	Tolerated	

Şekil 20:PROVEAN tahmini skorları

SIFT (toleranssız ve toleranslı olarak sınıflandırmak) algoritması, bir amino asit sübstitüsyonunun zararlı olup olmadığını tahmin ederek mutasyonlar ve fenotipik varyasyonlar arasında köprü kurmaya yardımcı olur, homolog sekanslar ve amino asit değişiminin şiddeti ile protein korunmasını dikkate alır. Bir protein, bir amino asit değişikliğini tolere edebilir ve hala normal olarak işlev görebilir veya amino asit değişikliğine karşı toleranssız olabilir. SIFT, protein fonksiyonuna toleranslı veya zararlı olan bir amino asit değişikliğini sınıflandırır. SIFT, protein ailesinde önemli amino asitlerin korunduğunu varsayar ve bu nedenle iyi korunmuş pozisyonlardaki değişiklikler zararlı olarak tahmin edilir (Vaser, Adusumalli, Leng, Sikic, ve Ng, 2015). SIFT skorlamalarına web üzerinden erişebilmek için http://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_dbSNP.html web adresine mutasyonların belirlenmiş olan SNP rs numaraları Şekil 21'de görüldüğü gibi yazılıp yüklenir. Belirli bir zaman sonra Şekil 22'de görülen sonuçlar elde edilir.



Şekil 21: SIFT algotirmasına veri girişi

SNP		COORDINAT	REF_ALLELE	ALT_ALLELE	AMINO_ACI	GENE_NAM	SIFT_PREDICTION
rs1799950	17	41246481	T	C	Q356R	BRCA1	DELETERIOUS
rs1799950	17	41246481	T	C	Q60R	BRCA1	DELETERIOUS
rs1799950	17	41246481	T	C	Q356R	BRCA1	DELETERIOUS
rs1799950	17	41246481	T	C	Q356R	BRCA1	DELETERIOUS
rs1799950	17	41246481	T	C	Q309R	BRCA1	DELETERIOUS
rs1799950	17	41246481	T	C	Q356R	BRCA1	DELETERIOUS
rs1799950	17	41246481	T	C	Q60R	BRCA1	DELETERIOUS
rs1799950	17	41246481	T	C	Q356R	BRCA1	TOLERATED
rs1799950	17	41246481	T	C	Q356R	BRCA1	TOLERATED
rs11571655	13	32911375	G	A	Q961Q	BRCA2	TOLERATED
rs11571655	13	32911375	G	A	Q961Q	BRCA2	TOLERATED
rs144848	13	32906729	A	C	N372H	BRCA2	TOLERATED
rs144848	13	32906729	A	C	N372H	BRCA2	TOLERATED
rs11571833	13	32972626	A	T	K3326*	BRCA2	
rs11571833	13	32972626	A	T	K3326*	BRCA2	
rs1799967	17	41222975	C	T	M548I	BRCA1	TOLERATED
rs1799967	17	41222975	C	T	M502I	BRCA1	TOLERATED
rs1799967	17	41222975	C	T	M548I	BRCA1	TOLERATED
rs1799967	17	41222975	C	T	M510I	BRCA1	TOLERATED
rs1799967	17	41222975	C	T	M469I	BRCA1	TOLERATED
rs1799967	17	41222975	C	T	M1356I	BRCA1	TOLERATED
rs1799967	17	41222975	C	T	M1673I	BRCA1	TOLERATED
rs1799967	17	41222975	C	T	M1652I	BRCA1	TOLERATED
rs1799967	17	41222975	C	T	M1605I	BRCA1	TOLERATED
rs1799967	17	41222975	C	T	M143I	BRCA1	TOLERATED
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs143160357	17	41277354	G	A		BRCA1	
rs28897710	13	32907407	A	G	T598A	BRCA2	TOLERATED
rs28897710	13	32907407	A	G	T598A	BRCA2	TOLERATED
rs55638633	13	32911547	C	G	L1019V	BRCA2	TOLERATED
rs55638633	13	32911547	C	G	L1019V	BRCA2	TOLERATED
rs80359055	13	32937456	A	G	N2706S	BRCA2	TOLERATED
rs80359055	13	32937456	A	G	N2706S	BRCA2	TOLERATED
rs80358577	13	32911802	A	C	T1104P	BRCA2	DELETERIOUS
rs80358577	13	32911802	A	C	T1104P	BRCA2	DELETERIOUS

Şekil 22: SIFT analiz sonuçları

9.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ile örneklerde BRCA1/BRCA2 mutasyon durumu ile telomer uzunluğu arasındaki ilişki istatiksel olarak incelenmiş, anlamlı bir farklılık olup olmadığı analiz edilmiştir. Eşleşmeli (bağımlı örneklem) parametrik ve non-parametrik istatistiksel testler uygulanmış ve istatistiksel çözümlemelerde $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edilerek, 0,95 güven aralığında değerlendirme yapılmıştır.

10. BULGULAR

10.1. BRCA1 ve BRCA2 Dizi Analizi Sonuçları

BRCA1, BRCA2 genleri dizilenen 113 hastanın 66 (%58,4)'inde herhangi bir mutasyon belirlenememiş, diğer 47 hastada (%41,6) BRCA2 geninde 31 (5'UTR(-26), c.2883G>A, c.1114A>C, c.9976A>T, c.3055C>G, c.8117A>G, c.3397C>T, c.4599A>C, c.3545_3546delTT, c.3310A>C, c.1151C>T, c.5125G>T, c.10078A>G, c.8524C>T, c.8851G>A, c.5386G>T, c.536_537insT, c.9509A>G, c.5312G>A, c.977G>A, c.8474C>T, c.8494G>C, c.1259A>G, c.8680C>G, c.1792A>G, c.3751dupA) ve BRCA1 geninde 21 (c.5265_5266insC, c.1067A>G, c.3624dupA, c.4956G>A, c.4039A>G, c.3794delA, c.1456T>C, c.1648A>C, c.536A>G, c.694G>T, c.2952delT, c.4535G>T, 18 ve 19 ekzon delesyonu, c.-86C>T) mutasyon bulunmuştur. BRCA1 geninde bununan mutasyonlar Tablo 8'de gösterilmiştir. 10 BRCA1 mutasyonu missense (kayıp) (%47,6), 8 tanesi çerçeve kayması (%38) mutasyondur. Veritabanlarını kullanarak elde ettiğimiz SIFT tahminleri, CADD skorlaması, PROVEAN tahminleri, NCBI veri tabanından alınan bilgiler ve ExAc alel frekansları Tablo 9'da özetlenmiştir. Bu mutasyonların 9'u NCBI verilerine göre benign (%42,8), 10'u patolojik (%47,6), ikisi bilinmeyen tip (%2,5) olarak değerlendirilmiştir. SIFT skorlamasına göre 3 mutasyon tolere edilebilir (%14,3), 7 tanesi de zararlı (%33,3) olarak bulunmuştur. CADD skorlama sonucu alınabilen 4 BRCA1 mutasyonunun dördü de 15'in üzerindedir. PROVEAN algoritması bu mutasyonlar için sonuç verememiştir. PolyPhen algoritması bu mutasyonların beşine tahmin verebilmiştir, tabloya eklenmemiştir.

Tablo 8: BRCA1 geni mutasyon sonuçları

Hasta No	Yaş	Kromozom	Genomdaki yeri	Bulunduğu Gen	Protein değişimi	Baz değişimi	AA değişimi	SNP (rs) Numarası	Referans baz	Belirlenen baz	Mutasyon tipi
1	42	17	41209079	BRCA1	p.Gln1756ProfsTer74	c.5265_5266insC	-	rs80357906	-	-	Çerçeve Kayması
3	60	17	41246481	BRCA1	p.Gln356Arg	c.1067A>G	Q356R	rs1799950	T	C	Kayıp
4	74	17	41246481	BRCA1	p.Gln356Arg	c.1067A>G	Q356R	rs1799950	T	C	Kayıp
10	33	17	41243923	BRCA1	p.Leu1209IlefsTer10	c.3624dupA	-	rs80357512	-	-	Çerçeve Kayması
15	41	17	41209079	BRCA1	p.Gln1756ProfsTer74	c.5265_5266insC	-	rs80357906	-	-	Çerçeve Kayması
16	28	17	41246481	BRCA1	p.Gln356Arg	c.1067A>G	Q356R	rs1799950	T	C	Kayıp
16	28	17	-	BRCA1	-	18 & 19 ekzon delesyonu	-	-	-	-	-
17	31	17	-	BRCA1	-	18 & 19 ekzon delesyonu	-	-	-	-	-
19	44	17	41222975	BRCA1	p.Met1652Ile	c.4956G>A	M548I	rs1799967	C	T	Kayıp
20	56	17	41209079	BRCA1	p.Gln1756ProfsTer74	c.5265_5266insC	-	rs80357906	-	-	Çerçeve Kayması
23	81	17	41209079	BRCA1	p.Gln1756ProfsTer74	c.5265_5266insC	-	rs80357906	-	-	Çerçeve Kayması
29	28	17	41277354	BRCA1	-	c.-86C>T		rs143160357	G	A	5'UTR
75	35	17	41243509	BRCA1	p.Arg1347Gly	c.4039A>G	R1347G	rs28897689	T	C	Kayıp
81	34	17	41243754	BRCA1	p.Asn1265IlefsTer3	c.3794delA	-	rs80357767	-	-	Çerçeve Kayması
83	42	17	41246092	BRCA1	p.Phe486Leu	c.1456T>C	F486L	rs55906931	A	G	Kayıp
83	42	17	41245900	BRCA1	p.Asn550His	c.1648A>C	N254H	rs56012641	T	G	Kayıp
83	42	17	41251803	BRCA1	p.Tyr179Cys	c.536A>G	Y179C	rs56187033	T	C	Kayıp
95	40	17	41246854	BRCA1	p.Asp232Tyr	c.694G>T	D232N	rs55975699	C	T	Kayıp
101	42	17	41244596	BRCA1	p.Ile986SerfsTer14	c.2952delT	-	rs80357627	-	-	Çerçeve Kayması
108	29	17	41209079	BRCA1	p.Gln1756ProfsTer74	c.5265_5266insC		rs80357906			Çerçeve Kayması
111	55	17	41226488	BRCA1	p.Ser1512Ile	c.4535G>T	S1533I	rs1800744	C	A	Kayıp

Tablo 9: BRCA1 geni mutasyonlarının veritabanı tahminleri

Hasta No	Bulunduğu Gen	SNP (rs) Numarası	CADD skoru	SIFT tahmini	PROVEAN	NCBI	ExAc Alel frekansı
1	BRCA1	rs80357906	35	-	-	Patojenik	0.0001565
3	BRCA1	rs1799950	-	Zararlı	-	Benign	0.04407
4	BRCA1	rs1799950	-	Zararlı	-	Benign	0.04407
10	BRCA1	rs80357512	34	-	-	Patojenik	
15	BRCA1	rs80357906	-	-	-	Patojenik	0.0001565
16	BRCA1	rs1799950	-	Zararlı	-	Benign	0.04407
16	BRCA1	-	-	-	-	Patojenik	-
17	BRCA1	-	-	-	-	Patojenik	-
19	BRCA1	rs1799967	-	Tolere	-	Benin	0.01762
20	BRCA1	rs80357906	35	-	-	Patojenik	0.0001565
23	BRCA1	rs80357906	35	-	-	Patojenik	0.0001565
29	BRCA1	rs143160357	-	-	-	Bilinmeyen	0.0004769
75	BRCA1	rs28897689	-	Zararlı	-	Benign	0.00398
81	BRCA1	rs80357767	-	-	-	Patojenik	-
83	BRCA1	rs55906931	-	Tolere	-	Benin	0.0002966
83	BRCA1	rs56012641	-	Zararlı	-	Benign	0.0002727
83	BRCA1	rs56187033	-	Zararlı	-	Benign	0.0002718
95	BRCA1	rs55975699	-	Tolere	-	Bilinmeyen	0.000009924
101	BRCA1	rs80357627	-	-	-	Patojenik	-
108	BRCA1	rs80357906	35	-	-	Patojenik	0.0001565
111	BRCA1	rs1800744	-	Zararlı	-	Benign	0.002151

BRCA2 geninde bununan mutasyonlar Tablo 10'da gösterilmiştir. 21 BRCA2 mutasyonu missense (kayıp) (% 67,7), 3 tanesi çerçeve kayması (%9,7), 3 tanesi nonsense (%9,7), ve 1 tanesi (%3,2) sessiz mutasyondur. Veritabanlarını kullanarak elde ettiğimiz SIFT tahminleri, CADD skorlaması, PROVEAN tahminleri, NCBI veri tabanından alınan bilgiler ve ExAc alel frekansları Tablo 11'de özetlenmiştir. Bu mutasyonların 11'i NCBI verilerine göre benign (%35,5), 1'i patolojik (%3,2), diğerler 14 tanesi bilinmeyen tip (%45,2) olarak değerlendirilmiştir. SIFT skorlamasına göre 11 mutasyon (%35,5) tolere edilebilir, 4 tanesi de zararlı (%12,9) olarak bulunmuştur. PROVEAN sonucuna göre de 11 mutasyon tolere edilebilir (%35,5), 9 tanesi de zararlı (%29) olarak bulunmuştur. Veritabanına tüm

mutasyonlar girilmiştir, 25 mutasyonun CADD skorlaması belirlenmiştir, bu skorlamalara göre 10 BRCA2 mutasyonunun CADD skoru 15'in üzerindedir. PolyPhen sonucuna göre, 3. ve 4. hastaların BRCA1 geni c.1067A>G mutasyonu muhtemel hasar verici, 11. hastanın BRCA2 geni c.1067A>G mutasyonu, 19. hastanın BRCA1 c.4956G>A mutasyonu ve 111. hastanın BRCA1 c.4535G>T mutasyonu benign olarak sonuç vermiştir.

107. hastanın BRCA2 geni c.536_537insT mutasyonu, 80. hastanın BRCA2 geni c.10078A>G mutasyonu daha önceden belirtilmemiş mutasyonlardır.

Tablo 10: BRCA2 geni mutasyon sonuçları

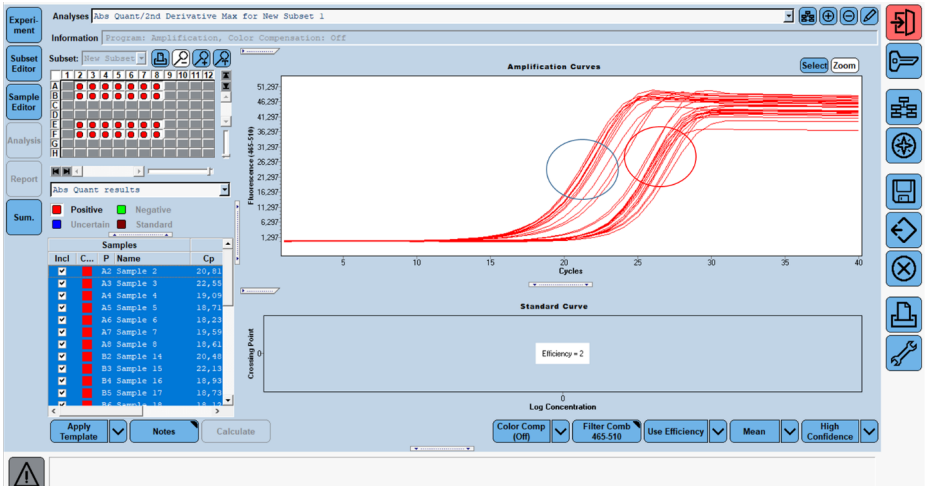
Hasta No	Yaş	Kromozom	Genomdaki yeri	Bulunduğu Gen	Protein değişimi	Baz değişimi	AA değişimi	SNP (rs) Numarası	Referans baz	Belirlenen baz	Mutasyon tipi
4	74	13	-	BRCA2	-	5'UTR(-26)	-	-	-	-	-
8	50	13	32911375	BRCA2	p.Gln961Gln	c.2883G>A	Q961Q	rs11571655	G	A	Sessiz
11	67	13	32906729	BRCA2	p.Asn372His	c.1114A>C	N372H	rs144848	A	C	Kayıp
12	37	13	32945099	BRCA2	p.Glu2832Gln	c.8494G>C	-	rs876658951	-	-	Kayıp
13	58	13	32972626	BRCA2	p.Lys3326Ter	c.9976A>T	K3326*	rs11571833	A	T	Nonsense
18	40	13	32972626	BRCA2	p.Lys3326Ter	c.9976A>T	K3326*	rs11571833	A	T	Nonsense
21	54	13	32906874	BRCA2	p.Asp420Gly	c.1259A>G	-	rs786201654	-	-	Kayıp
27	29	13	-	BRCA2	p.Gln2894Glu	c.8680C>G	-	-	-	-	-
30	55	13	32907407	BRCA2	p.Thr598Ala	c.1792A>G	T598A	rs28897710	A	G	Kayıp
30	55	13	-	BRCA2	p.Thr1251AsnfsTer14	c.3751_3752insA	-	-	-	-	Çerçeve Kayması
32	59	13	32911547	BRCA2	p.Leu1019Val	c.3055C>G	L1019V	rs55638633	C	G	Kayıp
37	48	13	32937456	BRCA2	p.Asn2706Ser	c.8117A>G	N2706S	rs80359055	A	G	Kayıp
40	34	13	32911802	BRCA2	p.Thr1104Pro	c.3310A>C	T1104P	rs80358577	A	C	Kayıp
44	37	13	32911889	BRCA2	p.Pro1133Ser	c.3397C>T		rs786202430			Kayıp
51	72	13	32913091	BRCA2	p.Lys1533Asn	c.4599A>C	K1533N	rs80358694	A	C	Kayıp
52	47	13	32913091	BRCA2	p.Lys1533Asn	c.4599A>C	K1533N	rs80358694	A	C	Kayıp
53	61	13	32912035	BRCA2	p.Phe1182Ter	c.3545_3546delTT		rs80359388	ATT	A	Çerçeve Kayması
57	38	13	32911802	BRCA2	p.Thr1104Pro	c.3310A>C	T1104P	rs80358577	A	C	Kayıp
60	44	13	32906766	BRCA2	p.Ser384Phe	c.1151C>T	S384F	rs41293475	C	T	Kayıp
63	38	13	32913617	BRCA2	p.Asp1709Tyr	c.5125G>T	-	rs398122792	-	-	Kayıp
64	37	13	32911547	BRCA2	p.Leu1019Val	c.3055C>G	L1019V	rs55638633	C	G	Kayıp
74	39	13	32972626	BRCA2	p.Lys3326Ter	c.9976A>T	K3326*	rs11571833	A	T	Nonsense
80	45	13	-	BRCA2	p.Lys3360Glu	c.10078A>G	-	-	-	-	-
92	39	13	32945129	BRCA2	p.Arg2842Cys	c.8524C>T	R2842C	rs80359104	C	T	Kayıp
93	33	13	32953550	BRCA2	p.Ala2951Thr	c.8851G>A	A2951T	rs11571769	G	A	Kayıp
96	42	13	32913878	BRCA2	p.Asp1796Tyr	c.5386G>T		rs106479371			Kayıp
107	37	13	-	BRCA2	p.Ile180TyrfsTer3	c.536_537insT	-	-	-	-	Çerçeve Kayması
110	41	13	32971042	BRCA2	p.Asp3170Gly	c.9509A>G	D3170G	rs80359224	A	G	Kayıp
114	51	13	32913804	BRCA2	p.Gly1771Asp	c.5312G>A	G1771D	rs80358755	G	A	Kayıp
115	53	13	32906592	BRCA2	p.Ser326Asn	c.977G>A		rs587782691			Kayıp
117	59	13	32945175	BRCA2	p.Ala2825Val	c.8474C>T		rs748143090	C	T	Kayıp

Tablo 11: BRCA2 geni mutasyonlarının veritabanı tahminleri

Hasta No	Bulunduğu Gen	SNP (rs) Numarası	CADD skoru	SIFT tahmini	PROVEAN	NCBI	ExAc Alel frekansı
4	BRCA2	-	-	-	-	-	-
8	BRCA2	rs11571655	2.735	Tolere	Tolere	Benign	0.0007878
11	BRCA2	rs144848	-	Tolere		Benign	0.2779
12	BRCA2	rs876658951	-	-	Zararlı	Bilinmeyen	-
13	BRCA2	rs11571833	36	-	-	Benign	0.007017
18	BRCA2	rs11571833	36	-	-	Benign	0.007017
21	BRCA2	rs786201654	-	-	Tolere	Bilinmeyen	-
27	BRCA2	-	-	-	-	-	-
30	BRCA2	-	-	-	-	-	-
30	BRCA2	rs28897710	-	Tolere	Tolere	Bilinmeyen	0.002309
32	BRCA2	rs55638633	13.24	Tolere	Tolere	Benign	0.0001663
37	BRCA2	rs80359055	0.681	Tolere	Tolere	Bilinmeyen	0.00009886
40	BRCA2	rs80358577	25.9	Zararlı	Zararlı	Bilinmeyen	0.0000008485
44	BRCA2	rs786202430	23.4	-	Zararlı	Bilinmeyen	-
51	BRCA2	rs80358694	12.66	Tolere	Tolere	Bilinmeyen	0.00007472
52	BRCA2	rs80358694	12.66	Tolere	Tolere	Bilinmeyen	0.00007472
53	BRCA2	rs80359388	-	-		Patojenik	0.00003299
57	BRCA2	rs80358577	25.9	Zararlı	Zararlı	Bilinmeyen	0.000008485
60	BRCA2	rs41293475	23	Tolere	Zararlı	Benign	0.0006789
63	BRCA2	rs398122792	9.709	-	Zararlı	Bilinmeyen	
64	BRCA2	rs55638633	13.24	Tolere	Tolere	Benign	0.0001663
74	BRCA2	rs11571833	36	-	-	Benign	0.007017
80	BRCA2	-	-	-	-	-	-
92	BRCA2	rs80359104	33	Zararlı	Zararlı	Bilinmeyen	-
93	BRCA2	rs11571769	26.2	Zararlı	Zararlı	Benign	0.007853
96	BRCA2	rs106479371	17.94	-	Zararlı	Bilinmeyen	-
107	BRCA2	-	-	-	-	-	-
110	BRCA2	rs80359224	18.02	Tolere	Tolere	Benign	0.000008243
114	BRCA2	rs80358755	8.629	Tolere	Tolere	Benign	0.000307
115	BRCA2	rs587782691	0.057	-	Tolere	Bilinmeyen	-
117	BRCA2	rs748143090		-	-	Bilinmeyen	0.000008244

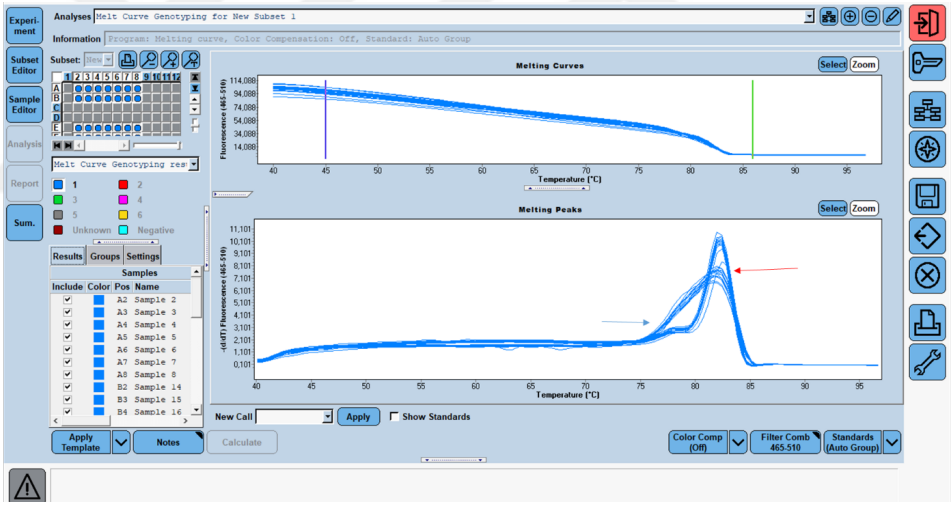
10.2. Kantitatif Telomer Uzunluğu Ölçüm Sonuçları

Periferik kan örneklerinden elde edilen DNA'lar telomer ve 36B4 primerleriyle RT-PZR yöntemi ile analiz edilmiştir. Basit olarak ele alacak olursak, telomer uzunluğu ölçümünde, telomerler ne kadar uzunsa, primerler daha fazla bağlanacak dizi bulacak ve ürün sayısı dolayısıyla fazla olacaktır (düşük Ct). Bu yöntemde ekspresyon, relatif kantitasyon ile değerlendirilmektedir. Telomer ve 36B4 bölgeleri için örnek RT-PZR amplifikasyon eğrisi Şekil 23'de gösterilmiştir. Şekil 24'de görüldüğü gibi, tüm örneklerin erime sıcaklığı eğrileri tek bir noktada pik vermiştir, bu durum gerçekleşen RT-PZR reaksiyonunun başarılı ve spesifik olduğunu gösterir. Bu veri ile birlikte, elde edilen sonuçların telomer ve 36B4 ekspresyonunlarına ait olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 23: RT-PZR amplifikasyon eğrisi.

Kullandığımız LightCycler 480 sisteminde telomer ve referans gen olarak kullanılan 36B4 ekspresyonu çift iplikli DNA molekülüne bağlanan floresan boya SYBR Green ile tayin edilmektedir. Sistem floresan ışımayı her reaksiyonda ölçerek amplifiye olan örneğin belirlenmesini sağlamaktadır. Hedef DNA örnekte ne kadar fazla temsil ediliyorsa o kadar erken ışıma verecektir. Cp değeri kullanılarak kantitasyon yapılmıştır. Mavi çemberin içinde telomer primeriyle amplifiye olmuş örnekler yoğunlaşmışken, kırmızı çemberin içinde 36B4 primeriyle amplifiye olmuş örnekler yoğunlaşmıştır.



Şekil 24: RT-PZR erime sıcaklığı eğrisi.

Şekilde, örneklerin erime sıcaklığı eğrileri tek bir noktada pik vermiştir. Bu durum RT-PZR reaksiyonunun başarılı ve spesifik olduğunu gösterir. Kırmızı okun gösterdiği pik 36B4'ün, mavi okun gösterdiği pik telomer'in erime sıcaklığı eğrisini gösterir.

113 örnek, Telomer ve 36B4 için duplike olarak çalışılmış ve her örnek için elde edilen Ct değerlerinin ortalaması ve hesaplanan ΔCt değerleri Tablo 12'de gösterilmiştir. ΔCt değerini hesaplamak için, her örneğin ortalama hedef gen, telomer, Ct sonuçlarından ortalama referans gen, 36B4, Ct sonuçları çıkarılmıştır.

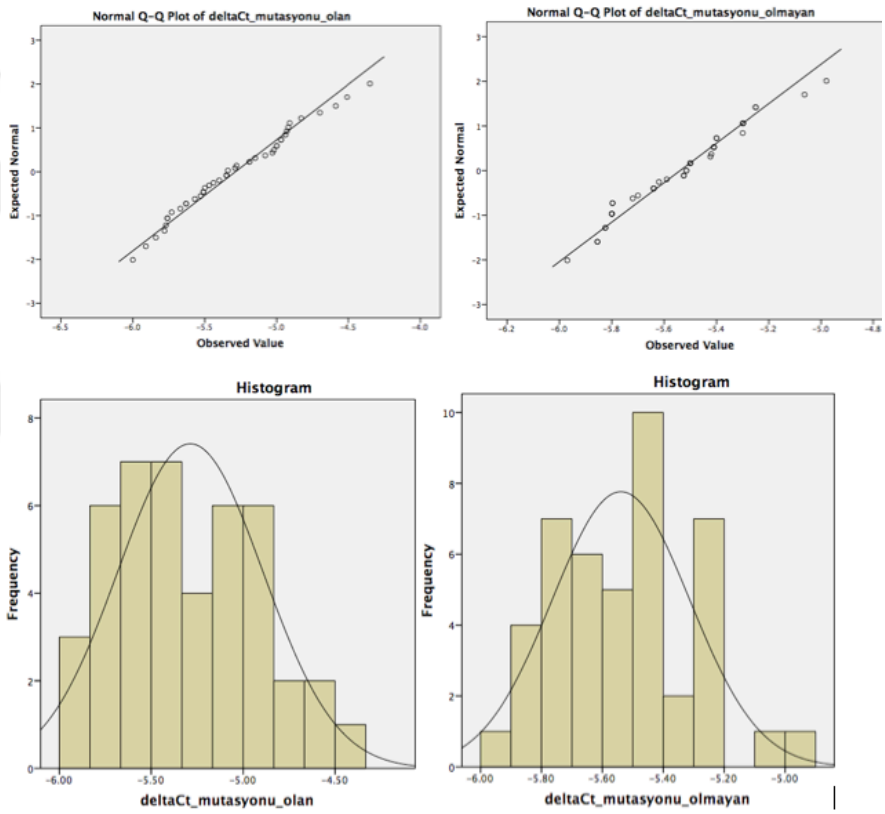
Tablo 12: RT-PZR sonucu elde edilen ortalama Ct değerleri ve ΔCt'leri

örnek ismi	*referans gen*	*Ct*	*hedef gen*	*Ct*	*ΔCt=(Telomer Ct) - (36B4 Ct)*	*örnek ismi*	*referans gen*	*Ct*	*hedef gen*	*Ct*	*ΔCt=(Telomer Ct) - (36B4 Ct)*
a1	36b4	19,93	telomer	14,17	-5,76	a59	36b4	22,64	telomer	16,7	-5,94
a2	36b4	20,13	telomer	14,26	-5,87	a60	36b4	21,81	telomer	16,9	-4,91
a3	36b4	19,39	telomer	13,76	-5,63	a61	36b4	22,47	telomer	18,45	-4,02
a4	36b4	20,61	telomer	14,8	-5,81	a62	36b4	22,93	telomer	17,93	-5
a5	36b4	21,21	telomer	15,86	-5,35	a63	36b4	23,56	telomer	18,21	-5,35
a6	36b4	21,83	telomer	16,49	-5,34	a64	36b4	23,97	telomer	18,06	-5,91
a7	36b4	21,71	telomer	16,73	-4,98	a65	36b4	22,7	telomer	17	-5,7
a8	36b4	21,52	telomer	16,69	-4,83	a66	36b4	22,83	telomer	16,94	-5,89
a9	36b4	21,76	telomer	17,26	-4,5	a67	36b4	22,73	telomer	17,32	-5,41
a10	36b4	21,21	telomer	16,29	-4,92	a68	36b4	22,72	telomer	17,08	-5,64
a11	36b4	21,67	telomer	16,7	-4,97	a69	36b4	23,23	telomer	17,8	-5,43
a12	36b4	21,77	telomer	17,07	-4,7	a70	36b4	22,98	telomer	17,17	-5,81
a13	36b4	21,67	telomer	16,67	-5	a71	36b4	22,91	telomer	17,3	-5,61
a14	36b4	21,64	telomer	17,07	-4,57	a72	36b4	22,86	telomer	16,99	-5,87
a15	36b4	22,08	telomer	16,35	-5,73	a74	36b4	21,22	telomer	15,55	-5,67
a16	36b4	20,98	telomer	16,39	-4,59	a75	36b4	23,87	telomer	18,47	-5,4
a17	36b4	21,33	telomer	16,98	-4,35	a76	36b4	22,31	telomer	17,14	-5,17
a18	36b4	20,76	telomer	15,61	-5,15	a77	36b4	22,62	telomer	17,42	-5,2
a19	36b4	20,95	telomer	15,11	-5,84	a78	36b4	22,3	telomer	17,12	-5,18
a20	36b4	20,87	telomer	15,3	-5,57	a79	36b4	23,15	telomer	17,99	-5,16
a21	36b4	21,95	telomer	17,02	-4,93	a80	36b4	22,23	telomer	16,47	-5,76
a22	36b4	21,56	telomer	16,05	-5,51	a81	36b4	23,1	telomer	17,59	-5,51
a23	36b4	21,44	telomer	16,15	-5,29	a82	36b4	22,16	telomer	17,04	-5,12
a24	36b4	21,17	telomer	16,07	-5,1	a83	36b4	22,45	telomer	16,45	-6
a25	36b4	20,7	telomer	15,24	-5,46	a84	36b4	23,62	telomer	17,79	-5,83
a26	36b4	21,87	telomer	16,91	-4,96	a87	36b4	22,59	telomer	16,71	-5,88
a27	36b4	22,2	telomer	16,92	-5,28	a88	36b4	21,8	telomer	16,06	-5,74
a28	36b4	22,65	telomer	17,24	-5,41	a89	36b4	22,4	telomer	17,17	-5,23
a29	36b4	23,33	telomer	18,14	-5,19	a90	36b4	22,9	telomer	17,01	-5,89
a30	36b4	24,43	telomer	19,09	-5,34	a91	36b4	22,78	telomer	17,14	-5,64
a31	36b4	25,31	telomer	20,14	-5,17	a92	36b4	22,66	telomer	17,13	-5,53
a32	36b4	25,61	telomer	20,14	-5,47	a93	36b4	22,36	telomer	17,34	-5,02
a33	36b4	23,3	telomer	17,3	-6	a94	36b4	23,56	telomer	17,97	-5,59
a34	36b4	21,87	telomer	16,37	-5,5	a95	36b4	22,36	telomer	17,42	-4,94
a35	36b4	23,1	telomer	17,5	-5,6	a96	36b4	21,96	telomer	16,61	-5,35
a36	36b4	22,78	telomer	17,08	-5,7	a97	36b4	22,78	telomer	17,45	-5,33
a37	36b4	22,59	telomer	17,09	-5,5	a98	36b4	23,12	telomer	17,87	-5,25
a38	36b4	23,9	telomer	18,81	-5,09	a99	36b4	22,72	telomer	17,93	-4,79
a39	36b4	23,35	telomer	17,89	-5,46	a100	36b4	22,05	telomer	17,87	-4,18
a40	36b4	21,35	telomer	16,84	-4,51	a101	36b4	22,5	telomer	17,42	-5,08
a41	36b4	23,73	telomer	16,96	-6,77	a102	36b4	22,32	telomer	17,35	-4,97
a42	36b4	21,61	telomer	15,99	-5,62	a103	36b4	22,58	telomer	17	-5,58
a43	36b4	22,76	telomer	17,04	-5,72	a104	36b4	23,59	telomer	18,34	-5,25
a44	36b4	22,54	telomer	17,51	-5,03	a105	36b4	22,57	telomer	17,26	-5,31
a45	36b4	24,62	telomer	18,78	-5,84	a107	36b4	23,2	telomer	18,23	-4,97
a46	36b4	22,63	telomer	17,2	-5,43	a108	36b4	22,29	telomer	17,1	-5,19
a47	36b4	24,21	telomer	18,83	-5,38	a109	36b4	22,86	telomer	16,91	-5,95
a48	36b4	23,03	telomer	18,02	-5,01	a110	36b4	21,79	telomer	16,28	-5,51
a49	36b4	23,88	telomer	18,58	-5,3	a111	36b4	21,92	telomer	16,15	-5,77
a50	36b4	22,67	telomer	17,69	-4,98	a112	36b4	22,08	telomer	16,75	-5,33
a51	36b4	22,72	telomer	17,28	-5,44	a113	36b4	22,5	telomer	17,11	-5,39
a52	36b4	23,07	telomer	17,44	-5,63	a114	36b4	22,69	telomer	15,86	-6,83
a53	36b4	23,87	telomer	18,41	-5,46	a115	36b4	22,52	telomer	17,52	-5
a54	36b4	22,02	telomer	16,24	-5,78	a116	36b4	23,17	telomer	16,96	-6,21
a55	36b4	23,82	telomer	18,61	-5,21	a117	36b4	22,74	telomer	16,96	-5,78
a56	36b4	22,5	telomer	17,84	-4,66						
a57	36b4	22,82	telomer	17,47	-5,35						
a58	36b4	24,5	telomer	18,3	-6,2						

10.3. İstatistiksel Analiz

BRCA1 ve/veya BRCA2 geninde mutasyon taşıyan hastaların telomer uzunluklarıyla, herhangi bir BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşımayan hastaların telomer uzunlukları arasındaki farklılığı incelemek için SPSS16.0 programı kullanılmıştır ve istatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. Öncelikle, karşılaştıracağımız ΔCt değerlerinin normal dağılıma uygun olup olmadığı kontrol edilmiştir, çünkü istatistiksel testler kabaca iki tipe

ayrılır; parametrik testler ve parametrik olmayan testler, normal dağılıma uyan verileri parametrik testler, normal dağılıma uymayan verileri parametrik olmayan testler ile analiz etmek doğrudur (Vickers, 2005). Bizim verilerimizin normallik testini yapmak için, Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri yapılmış, histogramları ve dal yaprak grafikleri çizilmiştir (Şekil 25 ve 26). Grafiklerden de açıkça görüldüğü gibi verilerimiz normal dağılıma uymaktadır, Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testlerinin p değerlerinin 0,05'ten büyük olması da bunu istatistiksel olarak kanıtlamaktadır.



Şekil 25: Normalite Grafikleri

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
deltaCt_mutasyonu_olmayan	.124	44	.090	.965	44	.199
deltaCt_mutasyonu_olan	.084	44	.200*	.976	44	.489

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Şekil 26: Normalite Testleri

Verilerimizin normal dağılıma uyduğunu gösterdikten sonra, parametrik test olan t-test ile BRCA1 ve/veya BRCA2 geninde mutasyon taşıyan örneklerin telomer uzunluklarıyla, taşımayan örneklerin telomer uzunlukları karşılaştırılmıştır. Mutasyon taşıyan örneklerin ΔCt değerleri ile, aynı yaştaki mutasyon taşımayan örneklerin ΔCt değerleri karşılıklı değerlendirilmiştir ve böylelikle yaşa bağlı telomer uzunluğu farklılığı anlamı manipüle etmemiştir. Bu analizi yapmak için bağımlı örneklem t-test kullanılmış ve BRCA1/2 mutasyonlu örnekler ile mutasyonsuz örnekler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,000391). Şekil 27'de görüldüğü üzere, 47 BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu olan örneklerin, 44'ü yaş eşleşmeli şekilde karşılaştırılmıştır. Mutasyon taşımayan örneklerin ortalama ΔCt değeri -5,539 iken, mutasyon taşıyan örneklerin ortalama ΔCt değeri -5,2875'tir ve bu değerlerin birbirleriyle korelasyon göstermediği istatistiksel olarak belirlenmiştir (p=0,495). Eşleşmiş 44 örneğin bağımlı örneklem t-test sonucuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunan hipotez, BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşıyan örneklerin telomer uzunluklarının, taşımayan örneklere göre daha kısa olduğudur.

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.5390	44	.22609	.03408
	deltaCt_mutasyonu_olan	-5.2875	44	.39479	.05952

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan & deltaCt_mutasyonu_olan	44	.106	.495

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan - deltaCt_mutasyonu_olan	-.25152	.43373	.06539	-.38338	-.11965	-3.847	43	.000

Şekil 27: Bağımlı örneklem t-test sonucu-1

Hedef gen (telomer) Ct değerinden referans gen (36B4) Ct değeri çıkarılıp hesaplanan ΔCt değerleri, hem mutasyon taşıyan hem de mutasyon taşımayan örnekler için hesaplanmıştır. Yaşları eşleştirerek ΔΔCt hesaplamak için, mutasyon taşıyan örneğin ΔCt'sinden aynı yaşta mutasyon taşımayan örneğin ΔCt değeri

çıkarılmış ve ΔΔCt hesaplanmıştır. Ardından $2^{\wedge\Delta\Delta Ct}$ hesaplanarak, mutasyon taşımayan örneğin mutasyon taşıyan örneğe göre kaç kat daha uzun telomere sahip olduğu belirlenmiştir. Ortalama $2^{\wedge\Delta\Delta Ct}$ hesabına göre, istatistiksel olarak anlamlı bulunan telomer uzunluğu farkı, mutasyon taşımayan örneğin mutasyon taşıyan örneğe göre 1.24 kat daha uzun telomere sahip olduğu belirlenmiştir.

BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının etkilediği örneklerin yaş eşleşmeli ayrı ayrı telomer uzunlukları değerlendirilmiştir. BRCA1 mutasyonu taşıyan 17 örnek, mutasyon taşımayan 17 örnekle yaşlarına göre eşleştirilmiş, bağımlı örneklem t-test yapılmış ve istatistiksel olarak anlam bulunmamıştır (p=0.107) (Şekil 28). BRCA2 mutasyonu taşıyan 27 örnek, mutasyon taşımayan 27 örnekle yaşlarına göre eşleştirilmiş, bağımlı örneklem t-test yapılmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0,000457) (Şekil 28).

Paired Samples Statistics

mutasyonun_oldugu_gen			Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
BRCA1	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.5716	17	.23229	.05634
		deltaCt_mutasyonu_olan	-5.3388	17	.45843	.11119
BRCA2	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.5185	27	.22406	.04312
		deltaCt_mutasyonu_olan	-5.2552	27	.35444	.06821

Paired Samples Test[a]

mutasyonun_oldugu_gen			Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
			Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
						Lower	Upper			
BRCA1	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan - deltaCt_mutasyonu_olan	-.23275	.56178	.13625	-.52158	.05609	-1.708	16	.107
BRCA2	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan - deltaCt_mutasyonu_olan	-.26333	.34137	.06570	-.39838	-.12829	-4.008	26	.000

a. No statistics are computed for one or more split files

Şekil 28: Bağımlı örneklem t-test sonucu-2

Mutasyonların patojenik ve benign olma durumlarına göre de bağımlı örneklem t-test yapılmış, Şekil 29'da da görüldüğü üzere, patojenik BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşıyan örneklerde (n=20) telomer uzunluklarında mutasyon taşımayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0,008). Ancak aynı fark benign mutasyonlarda gözlenmemiştir (n=14) (p=0,239). Mutasyonların CADD skorlamalarına göre de bir bağımlı örneklem t-test yapılmış ve CADD skoru 15'in altı ve 15'in üzeri olacak şekilde iki grup olarak değerlendirilmiştir. Şekil 30'da da görüldüğü üzere, CADD skoru 15'in üzerinde belirlenmiş olan

mutasyonları taşıyan örneklerde (n=19), yaşları eşleştirilmiş mutasyon taşımayan örneklere göre telomer uzunluğu istatistiksel olarak anlamlı olarak daha kısa bulunmuştur (p=0.001). CADD skoru 15'in altında belirlenmiş örneklerde ise (n=9) istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenememiştir (p=0.126). CADD skoru 15'in üzerinde olan veriler ile elde edilen istatistiksel veriler, patojenik olarak belirlenen mutasyonlarla elden edilen verilere benzerdir.

Örneklerin 73 tanesi meme kanseri tanılı hastalardır ve bu hastaların 27 tanesinde BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu saptanmıştır. Şimdiye kadar telomer uzunlukları arasındaki fark, meme kanseri durumu bağımsız değerlendirilmiştir, meme kanserli hastalarda ve diğer örneklerde bu fark değerlendirildiğinde, her iki grupta da telomer uzunlukları arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0.003 ve p=0.044) (Şekil 31).

Paired Samples Statistics

Mutasyon_Tipi			Mean	N
.	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olan	-5.1490	10
		deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.4382	10
Benin	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olan	-5.4029	14
		deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.5158	14
Patojenik	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olan	-5.2760	20
		deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.6056	20

Paired Samples Test

Mutasyon_Tipi			Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
			Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
						Lower	Upper			
.	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olan - deltaCt_mutasyonu_olmayan	.28925	.40839	.12914	-.00290	.58140	2.240	9	.052
Benin	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olan - deltaCt_mutasyonu_olmayan	.11295	.34249	.09153	-.08480	.31069	1.234	13	.239
Patojenik	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olan - deltaCt_mutasyonu_olmayan	.32965	.49514	.11072	.09791	.56138	2.977	19	.008

Şekil 29: Bağımlı örneklem t-test sonucu-3

Paired Samples Statistics

CADDskor15			Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
.	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.5001	16	.24298	.06074
		deltaCt_mutasyonu_olan	-5.3162	16	.47737	.11934
CADD<15	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.5893	9	.19723	.06574
		deltaCt_mutasyonu_olan	-5.3856	9	.31989	.10663
CADD>15	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.5479	19	.23007	.05278
		deltaCt_mutasyonu_olan	-5.2168	19	.35515	.08148

Paired Samples Test

CADDskor15			Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
			Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
						Lower	Upper			
.	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan - deltaCt_mutasyonu_olan	-.18388	.54264	.13566	-.47303	.10527	-1.355	15	.195
CADD<15	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan - deltaCt_mutasyonu_olan	-.20375	.35813	.11938	-.47904	.07154	-1.707	8	.126
CADD>15	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan - deltaCt_mutasyonu_olan	-.33110	.36759	.08433	-.50827	-.15392	-3.926	18	.001

Şekil 30: Bağımlı örneklem t-test sonucu-4

Paired Samples Statistics

endikasyon			Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Diger	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.5016	17	.25319	.06141
		deltaCt_mutasyonu_olan	-5.1206	17	.38797	.09410
Meme CA	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan	-5.5626	27	.20880	.04018
		deltaCt_mutasyonu_olan	-5.3926	27	.36804	.07083

Paired Samples Correlations

endikasyon			N	Correlation	Sig.
Diger	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan & deltaCt_mutasyonu_olan	17	.107	.684
Meme CA	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan & deltaCt_mutasyonu_olan	27	.032	.873

Paired Samples Test

endikasyon			Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
			Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
						Lower	Upper			
Diger	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan - deltaCt_mutasyonu_olan	-.38103	.44007	.10673	-.60729	-.15477	-3.6	16	.003
Meme CA	Pair 1	deltaCt_mutasyonu_olmayan - deltaCt_mutasyonu_olan	-.16997	.41722	.08029	-.33502	-.00492	-2.1	26	.044

Şekil 31: Bağımlı örneklem t-test sonucu-5

11. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri sık görülen, yüksek heterojeniteye sahip bir kanserdir ve kadınlarda kanser ölümünün önde gelen nedenidir, toplam kanser vakalarının %23'ünü ve dünyadaki kanser ölümlerinin %14'ünü oluşturur. Meme kanseri, genomda somatik mutasyon taşıyan diğer kanser türleriyle doğal benzerlik gösterir. Bu mutasyonlar ile beraber protoonkogenler onkogenlere dönüşüp hücreler üzerinde klonal selektif avantaj sağlayarak tümörgenezi tetikler (X. Chen ve ark., 2017). Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'unun kalıtsal bir geçmişi olduğu tahmin edilmektedir. Bu aileler belirgin bir dominant kalıtım paterni gösterirler ve sıklıkla erken yaşlarda başlayan meme kanserleri ile karakterizedirler. İlk çalışmalar BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerdeki germline mutasyonlarının, kalıtsal meme kanserlerinin çoğunluğundan sorumlu olduğunu ileri sürmüş olsa da, daha yakın tarihli çalışmalarda, iki gendeki mutasyonların, aile meme kanseri riskinin sadece %25-28'ini oluşturduğu gösterilmiştir (Honrado ve ark., 2005; Melchor ve Benıtez, 2013). BRCA1 ve BRCA2, DNA hasarına yanıt olarak DNA çift iplikli kırılmaların tespit ve onarımında görev alır. BRCA1 ve BRCA2 penetransı, hem BRCA1 hem de BRCA2 mutasyon taşıyıcı aileleri arasında son derece değişkendir. Bu tür varyasyonlar BRCA mutasyonları ile ilişkili kanser riskinin yaşam tarzı, çevresel ve/veya genetik faktörler tarafından modifiye edilebileceğini göstermektedir (D. J. Hughes ve ark., 2005).

Telomer, heksamerik TTAGGG tekrarlarından oluşan lineer kromozomların uçlarında bulunan ve bir T-halka yapısı oluşturan tek şeritli çıkıntıda sonlanan DNA elementleridir. Telomerler, barınak (TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 ve RAP1) olarak adlandırılan altı proteinden oluşan bir kompleks tarafından çift zincir kırığı olarak tanınmasına karşı korunur, bu da telomerde bir başlık oluşturan T-ilmek oluşumuna katkıda bulunur, böylece homolog olmayan uç birleştirme ve Homolog rekombinasyon aktivitesini inhibe eder. Telomerler kritik bir uzunluğa ulaşıldığında, hücreler bölünmeyi keser ve yaşlanmaya girer. Telomerlerin bu fizyolojik kısalması,

hücrenin replikatif potansiyelini sınırladığı için bir kanser karşıtı mekanizma olarak kabul edilir. Telomer uzunluğu, telomeraz aktivitesi, barınak kompleksi ve subtelomerik bölgenin metilasyon durumunu içeren karmaşık bir homeostatik mekanizma ile sıkı bir şekilde düzenlenir (Uziel ve ark., 2015). Telomer uzunluğu temel olarak telomerleri sentezleyen bir multisubunit enzim olan telomeraz tarafından korunur. Telomeraz aktivitesi normal somatik hücrelerde genellikle yoktur, ancak kök hücrelerde bulunur. İnsan kanser hücre dizilerinin yaklaşık %75'i telomeraz aktivitesini gösterir (Ballal, Saha, Fan, Haddad, ve Rosen, 2009).

Telomer uzunluğu ile kanser arasındaki ilişki mesane, baş ve boyun, akciğer ve mide kanserleri için belirlenmiş, meme kanseri ile ilgili çalışmalarda ise günümüze kadar tutarsız sonuçlar bulunmuştur. Telomeraz, telomer sentezleyen bir ribonükleoprotein enzimidir ve BRCA1'in, telomerazın katalitik alt birimi olan hTERT'in ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. BRCA1 geninin aşırı ekspresyonunun çeşitli hücre tiplerinde TERT (telomeraz ters transkriptaz geni) ifadesini ve telomeraz enzim aktivitesini inhibe etmesi, genin aşırı ekspresyonunun telomer kısalmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Telomeraz inhibisyonu, BRCA1'in telomer kısalmasına neden olabileceği tek mekanizma değildir, BRCA1 aşırı ekspresyonunun, telomeraz aktivitesinden bağımsız olarak birkaç kanser hücresi dizisinde de telomerlerin kısalmasına neden olduğu bulunmuştur (Xiong ve ark., 2003). BRCA1'in, çift zincir telomer DNA'yı bağlayan ve telomer uzunluğunu düzenleyen hem telomerik tekrarlama faktörü 1 (TRF1) hem de TRF2 ile etkileştiği bulunmuş, ve bu sonuçlara göre, BRCA1'in telomer korunmasında rol oynayabilme olasılığı artmıştır. Telomerlerin kritik kısalması veya korumasının kaldırılması, genetik instabiliteyi provoke edebilen, homolog olmayan uç birleştirme aracılı kromozom uçları ligasyonunu indükleyebilir. BRCA1'in, TERT'in myc-indüklü ekspresyonunu inhibe ettiği, bunun da telomerazın azaltılmış aktivitesine ve bir prostat kanseri ve bir meme kanseri hücre hattında azaltılmış uzunluktaki telomerlere neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, telomer korumasının düzenlenmesinde BRCA1 yolağının potansiyel bir rol oynadığını ve BRCA1'in bozulmasının telomer fonksiyonunun yanı sıra telomer uzunluğundaki bozukluklara neden olabileceğini ima etmektedir (French, Dunn, Smart, Manning, ve Brown, 2006). Yine aynı şekilde başka bir çalışmada meme ve prostat karsinom hücre hattında BRCA1'in

susturulmasının, telomeraz aktivitesi ve telomer uzunluğundaki artışlara bağlanan hTERT ekspresyonunun artmasına neden olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, Rad50'nin telomerde BRCA1 ile beraber gözlenmesi, BRCA1'i lokalize etmek için RAD50'nin gerekli olduğunu ve BRCA1'in telomerdeki mevcudiyetiyle telomer uzunluğu ve stabilitesini düzenleyebileceği düşünülmüştür (Ballal ve ark., 2009). BRCA1'in aşırı ifadesinin telomeraz aktivitesini azalttığı ve telomerleri kısalttığı, BRCA1'in bozulmasının telomer uzunluğunu arttırdığı başka bir çalışmada yine gözlenmiştir (French ve ark., 2006). Yabanıl tip BRCA1'in aşırı ekspresyonunun insan meme kanseri hücrelerinde telomer kısalması ile sonuçlandığı gösterilmiş ve bu işlevin bazı meme kanseri ilişkili yanlış anlamlı mutasyonları taşıyan hücre hatlarında kaybolduğu gösterilmiştir (Lovelock ve ark., 2007). BRCA1 nakavt bazı telomeraz-pozitif hücrelerde telomer uzunluğunun arttığı gösterilmiştir, BRCA1'in telomer bakımına aracılık ettiği biyokimyasal mekanizmalar tanımlanmamıştır. Ölümsüzleştirilen insan hücrelerindeki bir çalışma, BLM ve BRCA1'in telomerleri korumak için, ALT aracılığıyla, hücre döngüsünün S ve G2 fazları sırasında telomerlerde RAD50 ile birlikte lokalize olduğunu göstermiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar BRCA1'in ALT'ye RAD50 ve BLM ile etkileşimleri aracılığıyla katıldığını göstermektedir (Acharya ve ark., 2014).

BRCA1 ve BRCA2'nin telomer uzunluğu üzerindeki olası etkilerinden yola çıkılarak yeni nesil dizileme yöntemiyle BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar belirlenmiş, ardından gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kan lökositlerindeki telomer uzunlukları relatif bir şekilde hesaplanmıştır. Çalışmamızda, telomer uzunluğu analiz edilen örnekler, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu taşımaları ve taşımamaları durumuna göre iki gruba ayrılmıştır. BRCA1 ve/veya BRCA2 geninde mutasyon taşıyan örneklerin ΔCt değerleri ile, aynı yaştaki mutasyon taşımayan örneklerin ΔCt değerleri karşılıklı değerlendirilmiştir ve BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşıyan örneklerin telomer uzunluklarının, taşımayan örneklere göre daha 0.8 kat daha kısa olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir (p=0,000391), ve bu fark hastalık bağımsız değerlendirilmiştir. Patojenik BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşıyan ve zararlılığı CADD skoru ile kategorize edilmiş örneklerde, CADD skoru 15'in üzerinde belirlenmiş olan mutasyonları taşıyan örneklerin ΔCt değerleri, mutasyon taşımayan örneklerin ΔCt değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

gözlenmiştir (p=0,008 ve p=0.001). Daha önce yapılan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, telomer uzunlukları belirlenen BRCA1 ve/veya BRCA2 mutasyon taşıyan sağlıklı bireylerde kontrole göre herhangi bir anlamlılık gözlenmemiş ancak meme kanseri hastası olan BRCA1 ve/veya BRCA2 mutasyon taşıyan bireylerde telomer uzunluğu kontrole göre anlamlı olarak kısa bulunmuştur (Benitez-Buelga ve ark., 2015). Bir çalışma BRCA1 ve BRCA2 ailelerinden etkilenen kadınların telomerlerinin, normal kontrollere göre anlamlı olarak daha kısa olduğunu göstererek, bu genlerin telomer düzenlemesinde yer alabileceğini göstermektedir. BRCA1/2'deki mutasyonların yaşam süresi boyunca daha hızlı telomer aşınmasına neden olduğunu ve genomik instabilite olasılığını ve meme kanseri gelişme riskini artırdığı hipotezini sunmuşlardır (Martinez-delgado ve ark., 2011, 2012). Yine aynı şekilde Mercedes ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, BRCA1 ve BRCA2'de mutasyon taşıyan ailesel meme kanseri olgularının, sporadik olgulara oranla daha düşük ortalama telomer yoğunluğu gösterdiği, bunun da genel kalıtsal meme tümörlerinin, ailesel olmayan meme tümörlerine kıyasla kısalmış telomerlerle karakterize olduğu belirtilmiştir. Bir germ hattı mutasyonunun taşınması, hücrelerde telomer kısalmasının daha hızlı bir şekilde indüklenmesine yol açabilir ve farklı genetik mutasyonların birikmesiyle somatik hücrelerde sporadik olarak ortaya çıkanlara göre daha kısa telomerlere sahip olan tümörlerin geliştirilmesine öncülük edebilir (Mercedes ve ark., 2013). Başka bir çalışmada yine lökosit telomer uzunluğu analizi sonucu BRCA1/2 taşıyıcılarının, sağlıklı kontrollerden nispeten daha kısa telomerlere sahip olduğu bulunmuştur (H. Tanaka ve ark., 2017). Bu çalışmalarda bulunan sonuçların aksine, Killick ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, telomer uzunluğunun (TL) BRCA1/2 mutasyon durumu veya kanser riski ile ilişkili olmadığı bulunmuştur (Killick ve ark., 2014).

Çalışmamızda hesaplanan telomer uzunluğu BRCA2 alt grubunda daha kısa bulunmuştur ve BRCA2 mutasyonu taşıyan örneklerin ΔCt değerleri, aynı yaştaki mutasyon taşımayan örneklerin ΔCt değerleri ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0,000457). Bir çalışmada, fare embriyonik fibroblastlarında şartlı Brca2 delesyonu ve Rad51 inhibisyonu telomer kısalmasına ve parçalanmış telomer sinyallerinin birikmesine yol açmıştır, ancak benzer bulgular Brca1 inhibisyonu sonrası gözlenmemiştir. Bu sonuç, BRCA2 aracılı

homolog rekombinasyon reaksiyonlarının telomer replikasyonunu kolaylaştırarak telomer uzunluğu bakımına katkıda bulunduğunu ve hücre proliferasyonu sırasında telomer bütünlüğünde BRCA2 için önemli bir rol oynadığını düşündürmüştür. BRCA2 geni mutasyona uğramış insan meme tümörleri, BRCA1 geni mutasyona uğramış olanlardan daha kısa telomerlere sahip olduğu bulunmuş, bu da BRCA2 eksikliği olan tümörlerde gözlemlenen genomik instabilitenin kısmen telomer disfonksiyonuna bağlı olduğunu düşündürmektedir (Badie ve ark., 2010; X. Wang, Liu, Montagna, Ried, ve Deng, 2007). Ayrıca, BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında meme tümörlerinin, taşıyıcı olmayanlara kıyasla belirgin şekilde daha fazla sayıda karmaşık kromozomal değişime sahip olduğu bildirilmiştir. BRCA2 (RAD51 ile birlikte) hücre döngüsünün S fazı sırasında telomer ile etkileşir ve BRCA2'deki mutasyonlar (BRCA1'den çok daha fazla) telomer frajilitesini ve kısalmasını indükleyebilir, bu da BRCA2'nin kromozom ve telomer stabilitesinde önemli bir rol oynadığını gösterir (Pooley ve ark., 2014). Ancak, Chene ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada telomer uzunluğu BRCA1 alt grubunda daha kısa bulunmuştur, olası altta yatan mekanizmaları araştırmak için daha ileri çalışmalar gerektiğini gösterilmiştir (Chene, Tchirkov, Pierre-eymard, Dauplat, Raoelfils, Cayre, Watkin, Vago, ve Penault-llorca, 2013b). Bulunan sonuçların tersine, bir çalışmada BRCA1 veya BRCA2 mutasyon taşıyıcılarının (kanser durumuna bakılmaksızın), özellikle BRCA2 geninde mutasyonları olan ailelerde, taşıyıcı olmayan akrabalarından daha uzun telomer uzunluğuna sahip olduklarını bulunmuştur (Pooley ve ark., 2014).

Telomer disfonksiyonu ve buna bağlı oluşan genomik instabilitenin kanser gelişimini desteklediğini gösteren pek çok çalışma yapılmıştır ve çoğu durumda, kısa telomer uzunluğu artmış hastalık riski ve ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur. Telomer bakımı ve DNA onarım mekanizmaları arasında işlevsel bir etkileşim olduğu için telomer uzunluk regülasyonunda rol oynayan genlerin, BRCA1 ve BRCA2 genleri gibi, meme kanseri yatkınlığı için iyi bir aday olabileceği düşünülmektedir. Elde ettiğimiz bulgular meme kanseri gelşme riski yüksek olan bireylerde BRCA1 ve BRCA2 genlerinin mutasyonel analizinin önemini göstermektedir. BRCA1 ve BRCA2 geninde mutasyon taşıyan kişilerin, taşımayanlara göre daha kısa telomer uzunluğuna sahip olması, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin telomer uzunluğu mekanizmasında rol aldığı yönündeki bulguları desteklemektedir.

12. KAYNAKLAR

Acharya, S., Kaul, Z., Gocha, A. S., Martinez, A. R., Harris, J., Parvin, J. D., & Groden, J. (2014). Association of BLM and BRCA1 during Telomere Maintenance in ALT Cells, *9*(8), 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0103819

Adamson, E. D. (1987). Oncogenes in development. *Review Literature And Arts Of The Americas*, *471*, 449-471.

Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.*, *2*. doi:10.1002/0471142905.hg0720s76.Predicting

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed., p. 1392). Garland Science.

Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., ve ark. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*, 10114-10118.

Anderson, K. N., Schwab, R. B., ve Martinez, M. E. (2015). Reproductive Risk Factors and Breast Cancer Subtypes: A Review of the Literature. *Breast Cancer Research*, *144*(1), 1-10. doi:10.1007/s10549-014-2852-7.Reproductive

Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., Prat, A., Perou, C. M., ve Sherman, M. E. (2014). How many etiological Subtypes of Breast Cancer : two , three , Four , or more ? *Commentary*, (21), 1-11. doi:10.1093/jnci/dju165

Antoniou, A., Pharoah, P., Narod, S., Risch, H., Eyfjord, J., Hopper, J., ve ve ark. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unse- lected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, *72*, 1117–30.

Apostolou, P., ve Fostira, F. (2013). Hereditary Breast Cancer : The Era of New Susceptibility Genes, *2013*.

Artandi, S. E., ve DePinho, R. A. (2000). Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nature Medicine*, *6*, 852-855.

Artandi, S. E., ve Depinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, *31*, 9-18.

Aubert, G., Hills, M., ve Lansdorp, P. M. (2012). Telomere Length Measurement - caveats and a critical assessment of the available technologies and tools, *730*(604), 59-67. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.04.003.Telomere

Aydin, F., Akagun, T., Yildiz, B., Fidan, E., Ozdemir, F., ve Kavgaci, H. (2011). Clinicopathologic characteristics and BRCA-1/BRCA-2 mutations of Turkish patients with breast cancer. *Bratisl Lek Listy.*, *112*, 521-3.

Ayoub, N., Rajendra, E., Su, X., Jeyasekharan, A., Mahen, R., ve Venkitaraman, A. (2009). The carboxyl terminus of Brca2 links the disassembly of Rad51 complexes to mitotic entry. *Curr Biol.*, *19*, 1075– 1085.

Badie, S., Escandell, J. M., Bouwman, P., Carlos, A. R., Thanasoula, M., Gallardo, M. M., Suram, A., ve ark. (2010). BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping. *Nature Publishing Group*, *17*(12), 1461-1469. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nsmb.1943

Balcı, A., Huusko, P., Paakkonen, K., Launonen, V., Uner, A., Ekmekci, A., ve Winkwist, R. (1999). Mutation Analysis of BRCA1 and BRCA2 in Turkish Cancer Families : a Novel Mutation BRCA2 3414del4 Found in Male Breast Cancer. *European Journal of Cancer*, *35*(5).

Ballal, R. D., Saha, T., Fan, S., Haddad, B. R., ve Rosen, E. M. (2009). BRCA1 Localization to the Telomere and Its Loss from the Telomere in Response to DNA Damage * □. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(52), 36083-36098. doi:10.1074/jbc.M109.025825

Banerjee, S. (2008). BRCA1 (breast cancer 1, early onset). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*, *12*, 197-200.

Barrett, J. H., Iles, M. M., Dunning, A. M., ve Pooley, K. A. (2015). Telomere length and common disease : study design and analytical challenges. *Human Genetics*, *134*(7), 679-689. Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/s00439-015-1563-4

Barry, M., Ho, A., ve Morrow, M. (2013). The evolving role of partial breast irradiation in early-stage breast cancer. *Ann Surg Oncol*, *20*, 2534–40.

Benitez-Buelga, C., Sanchez-Barroso, L., Gallardo, M., Apellániz-Ruiz, M., Inglada-Pérez, L., Yanowski, K., Carrillo, J., ve ark. (2015). Impact of chemotherapy on telomere length in sporadic and familial breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*, *149*(2), 385-394. doi:10.1007/s10549-014-3246-6

Bernal, A., ve Tusell, L. (2018). Telomeres : Implications for Cancer Development, *2*, 1-21. doi:10.3390/ijms19010294

Bieglmayer, C., Szepesi, T., Kopp, B., Hoffmann, G., Petrik, W., ve Guettuoche, K. (1991). CA15.3, MCA, CAM26, CAM29 are members of a polymorphic family of mucin-like glycoproteins. *Tumour Biol*, *12*, 138-48.

Blackburn, E. H., Epel, E. S., ve Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, *350*(6265).

Bodnar, A. G. ., Ouellette, M. ., Frolkis, M. ., Holt, S. E. ., Chiu, C. P. ., Morin, G. B. ., Harley, C. B. ., ve ark. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, *279*, 349-352.

Bryan, T. M., ve Reddel, R. R. (1997). Telomere dynamics and telomerase activity in *in vitro* immortalised human cells. *European Journal of Cancer*, *33*, 767-773.

Campisi, J. (2005). Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science*, *309*, 886-887.

Cawthon, R. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic acids research*.

Cawthon, R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Measurement*, *30*(10), 1-6.

Chen, D. S., ve Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer – immune set point. *Nature*, *541*, 321-330. doi:10.1038/nature21349

Chen, P. L., Chen, C. F., Chen, Y., Xiao, J., Sharpp, Z. D., ve Lee, A.-H. (1998). The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, *95*(April), 5287-5292.

Chen, S., Iversen, E., Friebel, T., Finkelstein, D., Weber, B., Eisen, A., Peterson, L., ve ark. (2006). Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. *J Clin Oncol.*, *24*, 863–71.

Chen, X., Fan, S., ve Song, E. (2017). *Translational Research in Breast Cancer: Biomarker Diagnosis, Targeted Therapies and Approaches to Precision Medicine*. (E. Song ve H. Hu, Eds.)*Medicine*.

Chene, G., Tchirkov, A., Pierre-eymard, E., Dauplat, J., Raoelfils, I., Cayre, A., Watkin, E., Vago, P., ve Penault-llorca, F. (2013a). Early Telomere Shortening and Genomic Instability in Tubo-Ovarian Preneoplastic Lesions. *Cancer*, (14), 1-11. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3947

Chene, G., Tchirkov, A., Pierre-eymard, E., Dauplat, J., Raoelfils, I., Cayre, A., Watkin, E., Vago, P., ve Penault-llorca, F. (2013b). Early Telomere Shortening and Genomic Instability in Tubo-Ovarian Preneoplastic Lesions. *Clinical Cancer Research*, (14), 2873-2883. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3947

Chin, K., de Solorzano, C. O., Knowles, D., Jones, A., Chou, W., Rodriguez, E. G., Kuo, W.-L., ve ark. (2004). In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nature Genetics*, *36*, 984. Nature Publishing Group. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/ng1409

Choi, Y. (2012). A Fast Computation of Pairwise Sequence Alignment Scores Between a Protein and a Set of Single-Locus Variants of Another Protein. *Delta*, 414-417.

Choi, Y., Chan, A. P., ve Craig, T. J. (2015). PROVEAN web server : a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Conflict*, *31*(April), 2745-2747. doi:10.1093/bioinformatics/btv195

Choudhury, A., Xu, H., ve Baer, R. (2004). Ubiquitination and proteasomal degradation of the BRCA1 tumor suppressor is regulated during cell cycle progression. *J Biol Chem.*, *279*, 33909–18.

Clark, S. L., Rodriguez, A. M., Snyder, R. R., Hankins, G. D. V., ve Boehning, D. (2012). Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Cancer*, (April).

Counter, C. M. ., Hahn, W. C. ., Wei, W. ., Caddle, S. D. ., Beijersbergen, R. L. ., Lansdorp, P. M. ., Sedivy, J. M., ve ark. (1998). Dissociation among *in vitro* telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*, 14723-14728.

Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., ve ark. (2007). riple-Negative Breast Cancer : Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, *13*(15), 4429-4435. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045

Dnistrian, A., Schwartz, M., Greenberg, E., Smith, C., ve Schwartz, D. (1991). Evaluation of CA M26, CA M29, CA 15-3 and CEA as circulating tumor markers in breast cancer patients. *Tumour Biol*, *12*, 82-90.

Doksani, Y., ve de Lange, T. (2014). The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.

Donate, L. E., ve Blasco, M. A. (2011). Telomeres in cancer and aging. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. *Series B, Biological Sciences*, *366*, 76-84.

Donepudi, M. S., Kondapalli, K., Amos, S. J., ve Venkanteshan, P. (2014). Breast cancer statistics and markers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *10*(3). doi:10.4103/0973-1482.137927

EBCTCG, E. B. C. T. C. G. (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, *378*, 771–84.

EBCTCG, E. B. C. T. C. G. (2015). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet*, *386*, 1341–52.

Economopoulou, P., Dimitriadis, G., ve Psyrri, A. (2015). Beyond BRCA : New hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treatment Reviews*, *41*(1), 1-8. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.ctrv.2014.10.008

Edge, S. B., Byrd, D. R., Compton, C. C., Fritz, A. G., Greene, F. L., ve Trotti, A. (Eds.). (2010). *AJCC Cancer Staging Manual* (7th ed.). Springer, New York.

Eisinger, F., Jacquemier, J., Charpin, C., Stoppa-lyonnet, D., Paillerets, B. B.-de, Peyrat, J.-philippe, Longy, M., ve ark. (1998). Mutations at BRCAJ : The Medullary Breast Carcinoma Revisited1. *Cancer*, (8), 1588-1593.

Elston, C. W., ve Ellis, I. O. (2002). Pathological prognostic factors in breast cancer . I . The value of histological grade in breast cancer : experience from a large. *Histopathology*, 151-153.

Eno, M. U. (2010). Roles of DNA Repair Proteins in Telomere Maintenance I . The Roles of Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Online*, *74*(1), 1-6. doi:10.1271/bbb.90682

Fabbro, M., Savage, K., Hobson, K., Deans, A. J., Powell, S. N., Mcarthur, G. A., ve Khanna, K. K. (2004). BRCA1-BARD1 Complexes Are Required for p53 Ser-15 Phosphorylation and a G 1 / S Arrest following Ionizing Radiation-induced DNA Damage *. *Biochemistry*, *279*(30), 31251-31258. doi:10.1074/jbc.M405372200

Fradet-turcotte, A., Sitz, J., Grapton, D., ve Orthwein, A. (2016). BRCA2 functions : from DNA repair to replication fork stabilization. *DNA Repair*, 1-17. doi:10.1530/ERC-16-0297

French, J. D., Dunn, J., Smart, C. E., Manning, N., ve Brown, M. A. (2006). Disruption of BRCA1 Function Results in Telomere Lengthening and Increased Anaphase Bridge Formation in Immortalized Cell Lines. *Cancer*, *289*(October 2005), 277-289. doi:10.1002/gcc

Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M., ve Kobayashi, H. (2004). Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *J Cell Sci.*, *117*, 6447–6454.

Genestie, C., Zafrani, B., Asselain, B., Fourquet, A., Rozan, S., Validire, P., Vincent-Salomon, A., ve ark. (1998). *Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: Major importance of the mitotic count as a component of both grading systems*. *Anticancer research* (Vol. 18, pp. 571-576).

Giardini, M. A., Segatto, M., da Silva, M. S., Nunes, V. S., ve Cano, M. I. N. (2014). Chapter One - Telomere and Telomerase Biology. In R. T. B. T.-P. in M. B. and T. S. Calado (Ed.), *Telomeres in Health and Disease* (Vol. 125, pp. 1-40). Academic Press. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3

Granger, M. P. ., Wright, W. E., ve Shay, J. W. (2002). Telomerase in cancer and aging. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, *41*, 29-40.

Greaves, M., ve Maley, C. C. (2012). Clonal Evolution In Cancer. *Nature*, *481*(7381), 306-313. doi:10.1038/nature10762.CLONAL

Greenberg, R. A. (2011). BRCA1, Everything But the RING? *Science*, *334*(6055), 2011-2014. doi:10.1126/science.1214057.CANCER

Guidugli, L., Carreira, A., Caputo, S. M., Ehlen, A., Galli, A., Monteiro, A. N. A., Neuhausen, S. L., ve ark. (2014). Functional assays for analysis of variants of uncertain significance in BRCA2. *Human Mutation*, *35*(2), 151-164. doi:10.1002/humu.22478.Functional

Gøtzsche, P., ve Nielsen, M. (2011). Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev*.

Harbeck, N., ve Gnant, M. (2017). Seminar Breast cancer. *The Lancet*, *389*(10074), 1134-1150. Elsevier Ltd. doi:10.1016/S0140-6736(16)31891-8

Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H., ve ark. (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *The Journal of biological chemistry*, *276*, 14537-14540.

Hayflick, L., ve Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Resesearch*, *25*, 585-621.

Heather, J. M., ve Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, *107*, 1-8.

Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L.-Y., ve Greider, C. W. (2001). The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability. *Cell*, *107*(1), 67-77. doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00504-9

Hills, M, Lucke, K., Chavez, E., Eaves, C., ve Lansdorp, P. (2009). Probing the mitotic history and developmental stage of hematopoietic cells using single telomere length analysis (STELA). *Blood*.

Holloman, W. (2011). Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol.*, *18*, 748–754.

Holt, J. T., Thompson, M. E., Szabo, C., Robinson-Benion, C., Arteaga, C. L., King, M.-C., ve Jensen, R. A. (1996). Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nature Genetics*, *12*, 298. Nature Publishing Group. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/ng0396-298

Honrado, E., Benıtez, J., ve Palacios, J. (2005). The molecular pathology of hereditary breast cancer : genetic testing and therapeutic implications. *Modern Pathology*, 1305-1320. doi:10.1038/modpathol.3800453

Horwitz, A., Affar el, B., Heine, G., Shi, Y., ve Parvin, J. (2007). A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 6614-6619.

Hughes, D. J., Ginolhac, S. M., Coupier, I., Corbex, M., Bignon, Y.-jean, Uhrhammer, N., Bressac-de-paillerets, B., ve ark. (2005). Common BRCA2 Variants and Modification of Breast and Ovarian Cancer Risk in BRCA1 Mutation Carriers. *October*, *14*(January), 2-5.

Hughes-Davies, L., Huntsman, D., Ruas, M., Fuks, F., Bye, J., Chin, S., Milner, J., ve ark. (2003). EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. *Cell*, *115*, 523–535.

Illumina:An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. (2017). Retrieved from

Itan, Y., Shang, L., Boisson, B., Ciancanelli, M., Markle, J., Martinez-Barricarte, R., Scott, E., ve ark. (2016). The mutation significance cutoff (MSC): gene-level thresholds for variant-level predictions. *Nature methods*, *13*(2), 109-110. doi:10.1038/nmeth.3739

Jeyasekharan, A., Liu, Y., Hattori, H., Pisupati, V., Jonsdottir, A., Rajendra, E., Lee, M., ve ark. (2013). A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nat Struct Mol Biol.*, *20*, 1191–1198.

Karami, F., ve Mehdipour, P. (2013). A Comprehensive Focus on Global Spectrum of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast Cancer, *2013*.

Katso, R. M. T., Manek, S., O'Byrne, K., Playford, M. P., Meuth, V., ve Ganesan, T. (1997). Molecular Approaches To Diagnosis. *Cancer and Metastasis Reviews*.

Kawai, H., Li, H., Chun, P., Avraham, S., ve Avraham, H. (2002). Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. *Oncogene*, *21*, 7730.

Killick, E., Tymrakiewicz, M., Cieza-borrella, C., Smith, P., Thompson, D. J., Pooley, K. A., Easton, D. F., ve ark. (2014). Telomere Length Shows No Association with BRCA1 and BRCA2 Mutation Status. *Screening*, *9*(1), 1-6. doi:10.1371/journal.pone.0086659

Kim, N. W. ., Piatyszek, M. A. ., Prowse, K. R. ., Harley, C. B. ., West, M. D. ., Ho, P. L. ., Coviello, G. M. ., ve ark. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, *266*, 2011-2015.

Kimura, M., Stone, R. C., Hunt, S. C., Skurnick, J., Lu, X., Cao, X., Harley, C. B., ve ark. (2010). Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nature Protocols*, *5*, 1596. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.124

Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O'Roak, B. J., Cooper, G. M., ve Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature genetics*, *46*(3), 310-315. doi:10.1038/ng.2892

Lajud, S. A., Nagda, D. A., Yamashita, T., Zheng, J., ve Tanaka, N. (2014). Dual Disruption of DNA Repair and Telomere Maintenance for the Treatment of Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research*, (6), 6465-6479. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0176

Lamarche, B. J., Orazio, N. I., ve Weitzman, M. D. (2011). The MRN complex in Double-Strand Break Repair and Telomere Maintenance. *FEBS Letters*, *584*(17), 3682-3695. doi:10.1016/j.febslet.2010.07.029.The

Lange, T. D. (2005). Shelterin : the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes ve Development*, 2100-2110. doi:10.1101/gad.1346005.quence

Lansdorp, P., Verwoerd, N., van de Rijke, F., Dragowska, V., Little, M.-T., Dirks, R., ve Tanke, H. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Human Molecular Genetics*, *5*, 685–691.

Lee, J., Collins, K., Brown, A., Lee, C., ve Chung, J. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*, *404*, 201-4.

Lee, SJ, Schover, L., Partridge, A., ve ve ark. (2006). American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol*, *24*, 2917–2931.

Li, Huchun, Lee, T.-hee, ve Avraham, H. (2002). A Novel Tricomplex of BRCA1 , Nmi , and c-Myc Inhibits c-Myc-induced Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene (hTERT) Promoter Activity in Breast Cancer *. *Biochemistry*, *277*(23), 20965-20973. doi:10.1074/jbc.M112231200

Li, J., Zou, C., Bai, Y., Wazer, D., Band, V., ve Gao, Q. (2006). DSS1 is required for the stability of BRCA2. *Oncogene*, *25*, 1186-1194.

Lisa, Y., Kathrin, B., Maike, T., Ebersold, J., Henrich, L., Nustede, R., ve Schlegelberger, B. (2017). Comparison of different methods for telomere length measurement in whole blood and blood cell subsets : Recommendations for telomere length measurement in hematological diseases. *Young*, (January), 700-708. doi:10.1002/gcc.22475

Liu, K., Schoonmaker, M. M., Levine, B. L., June, C. H., Hodes, R. J., ve Weng, N, P. (1999). Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5147–5152.

Lord, C. J., ve Ashworth, A. (2007). RAD51, BRCA2 and DNA repair: a partial resolution. *Nature Structural veAmp; Molecular Biology*, *14*, 461. Nature Publishing Group. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/nsmb0607-461

Lovelock, P. K., Ming, Æ. E., Carl, W. Æ., Anna, N. S. Æ., Hobson, K., French, Æ. J. D., Southey, Æ. M., ve ark. (2007). Prediction of BRCA1 and BRCA2 mutation status using post-irradiation assays of lymphoblastoid cell lines is compromised by inter-cell-line phenotypic variability. *Breast Cancer Research*, 257-266. doi:10.1007/s10549-006-9415-5

Lukong, K. E. (2017). Understanding breast cancer – The long and winding road. *BBA Clinical*, *7*, 64-77. The Author. doi:10.1016/j.bbacli.2017.01.001

Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma : Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine*, 23-31. doi:10.4137/CPath.s31563.tYPE

Marcus, J., Watson, P., Page, D., ve Al., E. (1996). Hereditary breast cancer: Pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer*, *77*, 697–709.

Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies : 2006 – 2016. *Perspective*, *12*(2), 213-218. doi:10.1038/nprot.2016.182

Martinez-delgado, B., Yanowsky, K., Inglada-perez, L., Domingo, S., Urioste, M., Osorio, A., ve Benitez, J. (2011). Genetic Anticipation Is Associated with Telomere Shortening in Hereditary Breast Cancer. *PLoS Genetics*, *7*(7). doi:10.1371/journal.pgen.1002182

Martinez-delgado, B., Yanowsky, K., Inglada-perez, L., Hoya, M. D., Caldes, T., Vega, A., Blanco, A., ve ark. (2012). Shorter telomere length is associated with increased ovarian cancer risk in both familial and sporadic cases. *Journal of Medical Genetics*, 10-13. doi:10.1136/jmedgenet-2012-100807

Mavaddat, N., Barrowdale, D., Andrulis, I. L., Domchek, S. M., Nevanlinna, H., Ramus, S. J., Spurdle, A., ve ark. (2012). Europe PMC Funders Group Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers : results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 / 2 (CIMBA). *Biomarkers*, *21*(1), 134-147. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0775.Pathology

Maxam, A. M., ve Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, *74*, 560-564.

Meeker, A. K., Hicks, J. L., Gabrielson, E., Strauss, W. M., De Marzo, A. M., ve Argani, P. (2004). Telomere Shortening Occurs in Subsets of Normal Breast Epithelium as well as in Situ and Invasive Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, *164*(3), 925-935. American Society for Investigative Pathology. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1614707/

Melchor, L., ve Benıtez, J. (2013). The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Human Genetics*, *1*, 845-863. doi:10.1007/s00439-013-1299-y

Mercedes, B. M.-delgado, Miljana, G., Kira, T., Alicia, L. I.-perez, Maria, B., Can, R.-pinilla M., Blasco, M. A., ve ark. (2013). Short telomeres are frequent in

hereditary breast tumors and are associated with high tumor grade. *Breast Cancer Research*, 231-242. doi:10.1007/s10549-013-2696-6

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-eidens, D., Futreal, P. A., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., ve ark. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1-7.

Milner, J., Ponder, B., Hughes-Davies, L., Seltmann, M., ve Kouzarides, T. (1997). Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature*, *386*, 772-773.

Mohammad, D., ve Yaffe, M. (2009). 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, *8*, 1009–17.

Montpetit, A. J., Alhareeri, A. A., Montpetit, M., Starkweather, A. R., Elmore, L. W., Filler, K., Mohanraj, L., ve ark. (2014). Telomere Length: A Review of Methods for Measurement. *Nursing research*, *63*(4), 289-299. doi:10.1097/NNR.0000000000000037

Morozova, O., ve Marra, M. A. (2008). Applications of Next-Generation Sequencing Technologies in Functional Genomics. *Genomics*, *92*, 255-264.

Moynahan, M. E., Cui, T. Y., ve Jasin, M. (2001). Homology-directed DNA repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res.*, *61*, 4842–4850.

Moynahan, M., Pierce, A., ve Jasin, M. (2001). BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell.*, *7*, 263–272.

Mullan, P., Quinn, J., ve Harkin, D. (2006). The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene*, *25*, 5854–5863.

Nakagomi, H., Mochizuki, H., Inoue, M., Hirotsu, Y., Amemiya, K., Sakamoto, I., Nakagomi, S., ve ark. (2018). Combined annotation-dependent depletion score for BRCA1/2 variants in patients with breast and/or ovarian cancer. *Cancer science*, *109*(2), 453-461. John Wiley and Sons Inc. doi:10.1111/cas.13464

Nakazato, T., Ohta, T., ve Bono, H. (2013). Experimental Design-Based Functional Mining and Characterization of High-Throughput Sequencing Data in the Sequence Read Archive. *October*, *8*(10). doi:10.1371/journal.pone.0077910

Narod, S. A., ve Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 AND BRCA2 : 1994 AND BEYOND. *Nature*, *4*(September). doi:10.1038/nrc1431

Pal, T., Keefe, D., Sun, P., Ph, D., ve Narod, S. A. (2010). Fertility in women with BRCA mutations : a case-control study. *Fertility and Sterility*, *93*(6), 1805-1808. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.052

Patel, K., Yu, V., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F., Evans, M., Colledge, W., ve ark. (1998). Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell.*, *1*, 347– 357.

Paul, A., ve Paul, S. (2015). The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Frontiers in Bioscience*, (6), 605-618.

Pavanello, S., Varesco, L., Gismondi, V., Bruzzi, P., ve Bolognesi, C. (2018). Leucocytes telomere length and breast cancer risk / susceptibility : A case-control study. *Methods*, 1-13.

Pierotti, M. A., Sozzi, G., ve Croce, C. M. (2003). *Cancer Medicine* (6th ed.).

Pilgrim, S. M., Pain, S. J., ve Tischkowitz, M. D. (2014). Opportunities and challenges of next-generation DNA. *Society*, 889-898. doi:10.1002/bjs.9458

Pooley, K. A., McGuffog, L., Barrowdale, D., Frost, D., Ellis, S. D., Fineberg, E., Platte, R., ve ark. (2014). Lymphocyte Telomere Length Is Long in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers Regardless of Cancer-Affected Status. *Cancer Epidemiology Biomarkers veamp;amp; Prevention*, *23*(6), 1018 LP - 1024. Retrieved from http://cebp.aacrjournals.org/content/23/6/1018.abstract

Poumpouridou, N., ve Kroupis, C. (2012). Hereditary breast cancer : beyond BRCA genetic analysis ; PALB2 emerges. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *50*(3), 423-434. doi:10.1515/cclm-2011-0840

Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galv, P., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., ve ark. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Biomedical Research*, *24*, 26-35. doi:10.1016/j.breast.2015.07.008

Pruthi, S., Gostout, B., ve Lindor, N. (2010). Identification and management of women with BRCA mutations or hereditary predisposition for breast and ovarian cancer. *Mayo Clin Proc*, *85*, 1111–1120.

Puget, N., Gad, S., Perrin-vidoz, L., Sinilnikova, O. M., Stoppa-lyonnet, D., Lenoir, G. M., ve Mazoyer, S. (2002). Distinct BRCA1 Rearrangements Involving the BRCA1 Pseudogene Suggest the Existence of a Recombination Hot Spot. *Gene*, *2*, 858-865.

Ross, M. G., Russ, C., Costello, M., Hollinger, A., Lennon, N. J., Hegarty, R., Nusbaum, C., ve ark. (2013). Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biology*, *14*(5), R51. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/gb-2013-14-5-r51

Ross, M. T., Sabot, A., Sankar, S. V., Scally, A., Schroth, G. P., ve ve ark. (2008). Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature*, *456*(7218), 53-59. doi:10.1038/nature07517.Accurate

SCULLY, R., ANDERSON, S. F., CHAO, D. M., WEI, W., YE, L., YOUNG, R. A., LIVINGSTON, D. M., ve ark. (1997). BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Biochemistry*, *94*(May), 5605-5610.

Sanger, F., ve Nicklen, S. (1977). DNA sequencing with chain-terminating. *Biochemistry*, *74*(12), 5463-5467.

Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., ve Jasin, M. (2011). Double-Strand Break Repair Independent Role For BRCA2 In Blocking Stalled Replication Fork Degradation By MRE11. *Cell*, *145*, 529-542.

Schmidt, M. (2014). Chemotherapy in early breast cancer: when, how and which one? *Breast Care (Basel)*, *9*, 154–60.

Scully, R., ve Livingston, D. M. (2000). In search of the tumour- suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*, *408*, 429-432.

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., ve ark. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*, *88*, 265-75.

Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., Zackrisson, S., ve ark. (2018). clinical practice guidelines Primary breast cancer : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis , treatment and follow-up clinical practice guidelines. *Annals of Oncology*, *26*(July). doi:10.1093/annonc/mdv298

Sharan, S., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., ve ark. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*, *386*, 804-10.

Sharma, B., Kaur, R. P., Raut, S., ve Munshi, A. (2018). BRCA1 mutation spectrum , functions , and therapeutic strategies : The story so far. *Current Problems in Cancer*, *42*(2), 189-207. Elsevier. doi:10.1016/j.currproblcancer.2018.01.001

Shay, J. W., ve Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*, *33*, 787-791.

Shay, J. W., ve Wright, W. E. (2010). Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Letters*, *584*, 3819–3825.

Shendure, J., ve Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *DNA Sequence*, *26*(10), 1135-1145. doi:10.1038/nbt1486

Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., ve Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature Publishing Group*, *550*(7676), 345-353. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nature24286

Slijepcevic, P., ve Al-wahiby, S. (2005). Telomere biology : integrating chromosomal end protection with DNA damage response. *Journal of Experimental Medicine*, 275-285. doi:10.1007/s00412-005-0338-4

Sone, T., Saeki, Y., Tohe, A., ve Yokosawa, H. (2004). Sem1p is a novel subunit of the 26 S proteasome from Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*, *279*, 28807–28816.

Sotiriou, C., ve Pusztai, L. (2009). Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, *360*(8), 790-800. Massachusetts Medical Society. doi:10.1056/NEJMra0801289

Starita, L., ve Parvin, J. (2013). The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol*, *15*, 345-350.

Stratton, M. R., Campbell, P. J., ve Futreal, P. A. (2010). The Cancer Genome. *Nature*, *458*(7239), 719-724. doi:10.1038/nature07943.The

Stuckey, A. R., ve Onstad, M. A. (2015). Hereditary breast cancer: an update on risk assessment and genetic testing in 2015. *The American Journal of Obstetrics ve Gynecology*, *213*(2), 161-165. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.ajog.2015.03.003

Suman, V. J., Ph, D., Geyer, C. E., Davidson, N. E., Tan-chiu, E., Martino, S., Paik, S., ve ark. (2005). Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *Trial*, 1673-1684.

Sy, S., Huen, M., ve Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, *106*, 7155–7160.

Takaoka, M., ve Miki, Y. (2017). BRCA1 gene: function and deficiency. *International Journal of Clinical Oncology*, (0123456789), 3-10. Springer Japan. doi:10.1007/s10147-017-1182-2

Takaoka, M., ve Miki, Y. (2018). BRCA1 gene: function and deficiency. *International Journal of Clinical Oncology*, *23*(1), 36-44. Springer Japan. doi:10.1007/s10147-017-1182-2

Tanaka, H., Phipps, E. A., Wei, T., Wu, X., Goswami, C., Liu, Y., Sledge, G. W., ve ark. (2017). Altered expression of telomere-associated genes in leukocytes among BRCA1 and BRCA2 carriers. *Cancer*, (November), 1-9. doi:10.1002/mc.22773

Tanaka, H., Phipps, E. A., Wei, T., Wu, X., Goswami, C., Liu, Y., Sledge, G. W., ve ark. (2018). Altered expression of telomere-associated genes in leukocytes among BRCA1 and BRCA2 carriers. *Cancer*, (November 2017), 567-575. doi:10.1002/mc.22773

Tao, Z., Shi, A., ve Lu, C. (2015). Breast Cancer : Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 333-338. Springer US. doi:10.1007/s12013-014-0459-6

Tassone, P., Tagliaferri, P., Perricelli, A., Blotta, S., Quaresima, B., Martelli, M. L., Goel, A., ve ark. (2003). BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells. *Br. J. Cancer*, *88*, 1285–1291.

Tavassoli, F. A., ve Devilee, P. (Eds.). (2003). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press: Lyon.

Teshome, M., ve Hunt, K. (2014). Neoadjuvant therapy in the treatment of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, *23*, 505–23.

Thorvaldsdottir, B., Aradottir, M., ve Stefansson, O. A. (2017). Telomere Length Is Predictive of Breast Cancer Risk in BRCA2 Mutation Carriers. *Biomarkers*, *26*(August), 1248-1255. doi:10.1158/1055-9965.EPI-16-0946

Toland, A., ve Andreassen, P. R. (2017). DNA repair-related functional assays for the classification of BRCA1 and BRCA2 variants : a critical review and needs assessment. *Journal of Medical Genetics*, 721-731. doi:10.1136/jmedgenet-2017-104707

Turashvili, G., ve Brogi, E. (2017). Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Review Literature And Arts Of The Americas*, *4*(December). doi:10.3389/fmed.2017.00227

Uziel, O., Yerushalmi, R., Zuriano, L., Naser, S., Beery, E., Nordenberg, J., Lubin, I., ve ark. (2015). BRCA1 / 2 mutations perturb telomere biology : characterization of structural and functional abnormalities *in vitro* and in vivo. *Oncotarget*, *7*(3).

Vargas, A., Reis-Filho, J., ve Lakhani, S. (2011). Phenotype-genotype correlation in familial breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *16*, 27–40.

Vaser, R., Adusumalli, S., Leng, S. N., Sikic, M., ve Ng, P. C. (2015). SIFT missense predictions for genomes. *Nature Protocols*, *11*(1), 1-9. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nprot.2015-123

Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, *108*, 171-182.

Verdun, R. E., ve Karlseder, J. (2007). Replication and protection of telomeres. *Nature*, *447*(June). doi:10.1038/nature05976

Vickers, A. J. (2005). Parametric versus non-parametric statistics in the analysis of randomized trials with non-normally distributed data. *BMC Medical Research Methodology*, *5*(1), 35. doi:10.1186/1471-2288-5-35

WHO. (2012). Fact Sheet No. 297: Cancer. *World Health Organization*. Retrieved April 16, 2012, from http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900

Wang, T., Liu, Y., ve Zhao, M. (2017). Mutational analysis of driver genes with tumor suppressive and oncogenic roles in gastric cancer, 1-17. doi:10.7717/peerj.3585

Wang, X., Liu, L., Montagna, C., Ried, T., ve Deng, C.-x. (2007). Haploinsufficiency of Parp1 accelerates Brca1- associated centrosome amplification , telomere shortening , genetic instability , apoptosis , and

embryonic lethality. *Cell Death and Differentiation*, 924-931. doi:10.1038/sj.cdd.4402105

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., ve Qin, J. (2000). BASC , a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes ve Development*, 927-939.

Warner, E., Messersmith, H., ve Causer, P. (2008). Systematic review: using magnetic resonance imaging to screen women at high risk for breast cancer. *Ann Intern Med*, *148*, 671–679.

Weinstein, I. B., ve Joe, A. K. (2006). Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology*, *3*, 448. Nature Publishing Group. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/ncponc0558

Whelan, T., Pignol, J., Levine, M., ve ve ark. (2010). Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *N Engl J Med*, *362*, 513–20.

Winters, S., Martin, C., Murphy, D., ve Shokar, N. K. (2017). *Breast Cancer Epidemiology , Prevention , and Screening*. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 151, pp. 1-32). Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.07.002

Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V., ve Bartel, P. L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J. Biol. Chem.*, *272*, 31941–31944.

Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., ve ark. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, *265*, 2088-90.

Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., ve Shay, J. W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, *9*, 3088-3092.

Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., ve ark. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell*, *22*, 719-729.

Xiong, J., Fan, S., Meng, Q., Schramm, L., Wang, C., Bouzahza, B., Zhou, J., ve ark. (2003). BRCA1 Inhibition of Telomerase Activity in Cultured Cells. *Molecular and cellular biology*, *23*(23), 8668-8690. doi:10.1128/MCB.23.23.8668

Yazici, H., Bitisik, O., Akisik, E., Cabioglu, N., Saip, P., Muslumanoglu, M., Glendon, G., ve ark. (2000). BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish breast / ovarian families and young breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, *83*, 737-742.

Yuan, S., Lee, S., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G., ve Lee, E. (1999). BRCA2 is required for ionizing radiation- induced assembly of rad51 complex in vivo. *Cancer Res.*, *59*, 3547–3551.

Yui, J., Chiu, C. P., ve Lansdorp, P. M. (1998). Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood*, *91*, 3255–3262.

Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., ve Yu, X. (2009). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA- damage response. *Curr Biol.*, *19*, 524–529.

Özmen, V. (2014). Breast Cancer in Turkey : Clinical and Histopathological Characteristics (Analysis of 13.240 Patients). *J Breast Health*, 98-105. doi:10.5152/tjbh.2014.1988

EKLER

ETİK KURUL ONAYI

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2014.0339	70737436-050.06.04-
	PROJE ADI	Ailesel meme kanseri hastalarında kalıtsal genlerin yeni nesil dizileme yöntemi ile dizilenmesi ve telomer uzunluğuyla ilişkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Doç.Dr. Mustafa AKKİPRİK	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih 09.01.2015 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Atila KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Elif AYDINER KARAKOÇ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkoloğisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Tolga GÜVEN	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	Var Yok	Evet Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Av.Ümit ERDEM	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var Yok	Evet Hayır	

13. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İrem	**Soyadı**	PEKER EYÜBOĞLU
Doğum Yeri	Fatih/Istanbul	**Doğum Tarihi**	15.11.1987
Uyruğu	T.C	**Tel**	05354858295
E-mail	pekerirem@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi-Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Planlanan 2018
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi-Tıbbi Biyoloji ve Genetik	2012
Lisans	Michigan State Universitesi- Biyokimya ve Moleküler Biyoloji / yandal Kimya	2009
Lise	İzmir Amerikan Lisesi	2005

İş Deneyimi

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Lab. Teknisyeni	ACIBADEM LABMED	2009-2010
2.	Stajyer	Hacettepe Universitesi Biyokimya ABD	Haziran-Agustos 2007
3.	Stajyer	Hacettepe Universitesi Biyokimya ABD	Haziran-Agustos 2008
4.	Stajyer	Yale Üniversitesi Genetik Departmanı	Ocak-Haziran 2018

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Mesleki Katılımlar

5 Mart 2010	I. Kök Hücre Sempozyumu, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, İstanbul
18-21 Ocak 2011	Boğaziçi Üniversitesi, From Genetic Models to Therapies Conference + Workshop
15-17 Nisan 2011	Boğaziçi Üniversitesi, Advances in Immunology and Cancer Biology Conference + Workshop
24-26 Nisan 2011	Universal Declaration on Bioethics and Human Rights Social Responsibility and Health, UNESCO Turkish National Commission, İstanbul
28-31 Mayıs 2011	European Human Genetics Conference, Amsterdam

27-30 Ekim 2011	XII.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya
23 Aralık 2011	II. Kök Hücre Sempozyumu, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, İstanbul
30 Kasım-1 Aralık 2012	III. Kök Hücre Sempozyumu, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, İstanbul
13-16 Aralık 2012	Uludağ Üniversitesi, IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, **Sözlü Bildiri**
8-11 Haziran 2013	European Human Genetics Conference, Paris, **Poster**
27-30 Ekim 2013	XIII.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kuşadası, **Poster**
23-27 Nisan 2014	Bodrum, V. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, **Sözlü Bildiri 1.lik Ödülü**
7-10 Mayıs 2014	Course in Next Generation Sequencing, Baltalimanı, İstanbul
18-19 Mayıs 2015	3rd Anticancer Agent Development Congress, İzmir, **Poster**
6-9 Haziran 2015	European Human Genetics Conference, Glasgow
5-8 Eylül 2016	TFBD 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Düzce, **Poster**
7-10 Eylül 2017	TFBD 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Denizli, **Sözlü Bildiri**

Bilimsel Yayınlar

G Gökçe Güllü**, İrem Peker**, Aptullah Haholu, Fatih Eren, Zafer Küçükodacı, Bülent Güleç, Hüseyin Baloğlu, Can Erzik, Ayşe Özer, Mustafa Akkiprik. "Clinical significance of miR-140-5p and miR-193b expression in patients with breast cancer and relationship between IGFBP5". Genet Mol Biol. 2014

Ebubekir Dirican, Zehra Kaya, Gokce Gullu, **Irem Peker**, Tolga Ozmen, Bahadir M Gulluoglu, Handan Kaya, Ayse Ozer, Mustafa Akkiprik. "Detection of PIK3CA Gene Mutations with HRM Analysis and Association with IGFBP-5 Expression Levels in Breast Cancer". Asian Pac J Cancer Prev 2015

Akkiprik M, **Peker İ,** Özmen T, Amuran GG, Güllüoğlu BM, Kaya H, Özer A. "Identification of Differentially Expressed IGFBP5-Related Genes in Breast Cancer Tumor Tissues Using cDNA Microarray Experiments" Genes (Basel). 2015

Karabulut S, Kaya Z, Gullu G, **Peker I**, Özmen T, Gulluoglu BM, Kaya H, Erzik C, Ozer A, Akkiprik M. "Correlation between the DNA methylation and gene expression of IGFBP5 in breast cancer" Breast Dis. 2016

Kaya Z, Akkiprik M, Karabulut S, **Peker I**, Gullu Amuran G, Ozmen T, Gulluoglu BM, Kaya H, Ozer A. "Comparison of telomere length and insulin-like growth factor-binding protein 7 promoter methylation between breast cancer tissues and adjacent normal tissues in Turkish women" J Clin Lab Anal. 2016

Agirbasli M, Göktay F, **Peker I**, Gunes P, Aker F, Akkiprik M. "Enhanced mRNA expression of plasminogen activator inhibitor-1 in livedoid vasculopathy lesions" Cardiovasc Ther. 2017

Laboratuar Uygulamaları

•Gen ekspresyon kantitasyonu
•Elisa uygulamaları
•DNA,RNA,Protein izolasyonu, analizi ve blotting yöntemleri.
•Parafin blok DNA, RNA, miRNA ekstraksiyonu, Immunohistokimyasal analizi
•PCR, Primer dizaynı
•Light Cycler 480
•Sanger Dizileme
•Yeni Nesil Dizileme
•SYNERGY HT ELISA READER
•TANDEM MS OPERATOR
•HPLC
•MODULAR PPEE
•AVL 9180
•COBAS INTEGRA 400 PLUS, COBAS E 411