

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NİNOVA EYALETİNDEKİ İRAKLI KADINLARDA BRCA1 VE BRCA2
GENLERİ İÇİN GENETİK VARYASYONUN TESPİTİ İLE MEME
KANSERİNİN ERKEN TEŞHİSİ**

Nada Saad Omer AL-TAEE

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI (MOLEKÜLER BİYOLOJİ)

Çankırı

2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Nada Saad Omer Al-TAEE tarafından hazırlanan “**Ninova Eyaletindeki Iraklı Kadınlarda BRCA1 ve BRCA2 Genleri İçin Genetik Varvasyonun Tespiti İle Meme Kanserinin Erken Teşhisi**” adlı tez çalışması 29/07/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : *Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR*

Eş Danışman : *Prof. Dr. Hanan Shihab AHMAD*

Jüri Üyeleri :

Başkan : *Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR*
Çankırı Karatekin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : *Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN*
Çankırı Karatekin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : *Dr. Öğr. Üyesi Ümit YIRTICI*
Kırıkkale Üniversitesi, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Anabilim Dalı

Yukarıdaki Sonucu Onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum **“Ninova Eyaletindeki Iraklı Kadınlarda BRCA1 ve BRCA2 Genleri İçin Genetik Varvasyonun Tespiti İle Meme Kanserinin Erken Teşhisi”** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programıyla tarandığımı, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (29/07/2021).

Nada Saad Omer Al-TAEE

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NİNOVA EYALETİNDEKİ IRAKLI KADINLARDA BRCA1 VE BRCA2 GENLERİ İÇİN GENETİK VARYASYONUNUN TESPİTİ İLE MEME KANSERİNİN ERKEN TEŞHİSİ

Nada Saad Omer Al-TAEE

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Eş Danışman: Prof. Dr. Hanan Shihab AHMAD

Meme Kanseri, Dünya genelinde ve Irak'ta kadınlar arasında görülen kanser türleri arasında ilk sırada gelmektedir. Meme kanserinin sıklıkla ailesel kanser öyküsüne bağlı olarak hastaneye başvuran hastalarda yapılan muayeneler ve tetkikler sonucunda tespit edildiği görülmektedir. Kalıtsal Meme kanseri, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır ve kalıtsal meme kanseri tanılarının büyük çoğunluğunda sorumlu genlerin BRCA1/2 olduğu bilinmektedir. BRCA1/2 germ hatlarında görülen mutasyonlar kalıtsal meme kanseri riskini yirmi kat daha fazla artırmaktadır. Bu nedenle, BRCA1/2 gen mutasyonlarının tespiti risk grubunda değerlendirilen hastaların ve mutasyon taşıyıcı aile bireylerinin teşhisi, tedavisi ve klinik yöntemlerin uygulanması için önemlidir. Yeni Nesil Dizileme Yaklaşımı, zaman, efor ve maliyet gibi unsurlar açısından klasik yöntemlerden daha yararlıdır. Yeni Nesil Dizileme yaklaşımı ile her bir hastaya özgü klinik tedavi akışı oluşturulabilir ve tedavi özelleştirilebilir. Böylelikle tedavi ve erken teşhiste oldukça iyi sonuçlar alınabilir. Bununla birlikte, Yeni Nesil Dizileme yaklaşımı, başta meme ve ovaryum kanseri olmak üzere diğer kanser çalışmalarında da kullanılarak, mevcut mutasyonların tanımlanmasının yanında, yeni keşiflerin de yapılmasını kolaylaştırmaktadır.

Çalışmamızda Irak'ın Ninova kentinde yaşayan ve hayatının tamamını ya da büyük kısmını Ninova kentinde geçiren, demografik açıdan özdeş niteliklere sahip 18 – 49 yaş arası kadın hastalar üzerine çalışılmıştır. Bu çalışma kapsamında Yeni Nesil Dizileme Analizi ile katılımcıların rızaları dahilinde alınan klinik numuneleri incelenmiş ve varyantlar üzerinde anlamlı ve anlamsız mutasyonlar tespit edilmiştir. Patojenik olarak değerlendirilen varyantların biyoinformatik çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca, klinik önemi bilinmeyen varyantlar saptanmış ve listelenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda, BRCA1/2 mutasyonlarının tespiti için Yeni Nesil Dizileme yaklaşımı temelinde bir anlayışın geliştirilmesi ve mutasyonların fonksiyonel rolünün değerlendirilmesi için doğrudan laboratuvar ortamında testlerin uygulanması gerektiği sonucuna varılmaktadır. Ayrıca, çalışmamız, Yeni Nesil Dizileme tekniğinin erken teşhis ve kişiselleştirilmiş, hastaya özgü tedavi yaklaşımının geliştirilmesi yönünde bir sonuca varmaktadır.

2020, 44 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: BRCA1, BRCA2, Yeni nesil dizileme, Genetik varyasyon, Kalıtsal meme kanseri

ABSTRACT

Master of Science Thesis

EARLY DIAGNOSIS OF BREAST CANCER BY DETECTION OF GENETIC VARIATION FOR BRCA1 AND BRCA2 GENES IN THE WOMEN'S OF NINEVEH PROVINCE

Nada Saad Omer Al-TAEE

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Filiz SARIKAYA PEKACAR

Co-Advisor: Prof. Dr. Hanan Shihab AHMAD

Breast Cancer ranks first among cancer types among women in the world and in Iraq. It is observed that breast cancer is often detected as a result of examinations and examinations performed in patients admitted to the hospital based on familial cancer history. Hereditary breast cancer accounts for about 10% of all breast cancer cases, and in the vast majority of hereditary breast cancer diagnoses, the responsible genes are known as BRCA1 and BRCA2. Mutations in the BRCA1 and BRCA2 germ lines increase the risk of hereditary breast cancer twenty times more. Therefore, detection of BRCA1 and BRCA2 gene mutations is important for the diagnosis, treatment and application of clinical methods of patients evaluated in the risk group and mutation carrier family members. Next Generation Sequencing Approach is more useful than classical methods in terms of time, effort and cost. With the Next Generation Sequencing approach, a patient-specific clinical treatment flow can be created and treatment can be customized. Thus, very good results can be obtained in treatment and early diagnosis. However, the Next Generation Sequencing approach also facilitates new discoveries, as well as identification of existing mutations, as well as other cancer studies, primarily breast and ovarian cancer.

In our study, we studied on female patients between the ages of 18-49, who lived in Nineveh, Iraq and spent all or part of their lives in Nineveh, having demographic identical qualities. Within the scope of this study, with the Next Generation Sequencing Analysis, the clinical samples taken within the consent of the participants were examined and significant and insignificant mutations were detected on the variants. Bioinformatics studies of variants evaluated as pathogenic were performed. In addition, variants of unknown clinical significance were identified and listed. Based on the results obtained in the study, it is concluded that tests should be applied directly in the laboratory environment to develop an understanding based on the Next Generation Sequencing approach for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations and to evaluate the functional role of the mutations. In addition, our study draws a conclusion for the early diagnosis of the New Generation Sequencing technique and the development of a personalized, patient-specific treatment approach.

2020, 44 sayfa

Keywords: BRCA1, BRCA2, Next generation sequencing, Genetic variation, Hereditary breast cancer

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

“Nineveh Eyaletindeki Kadınlarda BRCA1 ve BRCA2 Genleri İçin Genetik Varyasyonun Tespiti ile Meme Kanserinin Erken Teşhisi” adlı bu Yüksek Lisans çalışmamın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen ve inanılmaz bir anlayış gösteren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA’a, ve çalışmamın yönlendirilmesinde ve yürütülmesinde yol gösteren, kıymetli fikirlerini esirgemedi sunan, değerli eş danışman hocam sayın Prof. Dr. Hanan Shihab AHMAD’ye sonsuz teşekkür ederim.

Nada Saad Omer Al-TAEE

Çankırı, Temmuz 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER VE KAVRAMLAR	4
2.1 Kanser	4
2.2 Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	6
2.3 Kanserde Ailesel Etkiler	7
2.4 Kalıtsal Meme Kanseri	8
2.5 Risk Faktörleri	9
2.6 BRCA1 ve BRCA2 Genleri.....	12
2.6.1 BRCA 1 ve BRCA 2 genlerinin moleküler mekanizmaları	13
2.6.2 Kromozom yerleşimi.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1 Hastaların Seçimi	15
3.2 Genomik DNA İzolasyonu	16
3.3 İzole edilen gDNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Tayini.....	16
3.4 BRCA2 N273H Tek Nükleotid Polimorfizmi	17
3.5 Yeni Nesil Dizileme	18
3.5.1 gDNA ölçümü.....	18
3.5.2 gDNA için kütüphane hazırlığı.....	18
3.5.3 Parçalama	20
3.5.4 Barkodlama.....	20
3.5.5 Bağlama (ligasyon).....	20
3.5.6 Saflaştırma (pürifikasyon).....	21
3.5.7 Kütüphanenin çoğaltılması ve saflaştırılması	21
3.5.8 Kütüphanenin analizi ve dilüsyonu	22
3.5.9 Yükleme ve dizileme	22
3.5.10 Varyant analizi	23
3.5.11 Dizileme sonuçlarının değerlendirilmesi	23
3.6 BRCA1 ve BRCA2 Varyantları.....	24
3.6.1 BRCA1 varyantları.....	24
3.6.2 BRCA2 varyantları.....	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	27
4.1 Patojenitesi Kesin Olmayan (VUS) Varyantlar İle Polimorfizmler	32
KAYNAKLAR.....	37

SİMGELER DİZİNİ

ACS	Amerikan Kanser Topluluğu
ATM	Genler
BACC3	DNA Genomu
BİC	İş Tanımlayıcı Kodu
BRCA 1	Meme Kanseri Duyarlılık Geni-1
BRCA 2	Meme Kanseri Duyarlılık Geni-2
EMPCR e	Emülsiyon PCR
ER+	Östrojen Reseptör De
HEK2	Genler
N273H	Nükleotid
NBS1	Genler
PCR	Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
PTEN	Genler
STK11/LKB1/CDH1	Genler
TP53	Genler
VUS	Belirsiz Önem Varyantı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Mamografi, kanser ve diğer meme hastalıklarının erken teşhisi için memeyi incelemek için kullanılan bir röntgen görüntüleme yöntemidir. Hem teşhis hem de tarama aracı olarak kullanılır	2
Şekil 1.2 Mamografi cihazı	3
Şekil 1.3 Meme Kanserini gösteren için X-Işını grafiği	3
Şekil 2.1 BRCA1 Geninin Kromozom Yerleşimi (Hollis <i>et al.</i> 2017)	14
Şekil 2.2 BRCA 2 Geninin Kromozom Yerleşimi (Hollis <i>et al.</i> 2017)	14
Şekil 4.1 C,5237A> C patojenite analiz sonucu PolyPhen2	30
Şekil 4.2 PolyPhen-2 yazılımından türetilen çoklu dizi hizalama varyantı	31
Şekil 4.3 C,8299C > T patojenite analizi sonucu PolyPhen2	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 2018 Yılı Dünya Çapında Kanseri Türleri Yeni Vaka ve Ölüm Oranları.....	6
Çizelge 3.1 BRCA1 cDNA'daki ekleme varyantını doğrulamak için primer listesi	25
Çizelge 3.2 PfUltra amplifikasyonu protokolü	26
Çizelge 4.1 Tespit edilen BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları şu şekildedir	28
Çizelge 4.2 Tespit edilen mutasyonları	29
Çizelge 4.3 BRCA1 Polimorfizmi	32
Çizelge 4.4 BRCA1 VUS	32
Çizelge 4.5 BRCA2 Polimorfizmi	33
Çizelge 4.6 BRCA2 VUS	34

1. GİRİŞ

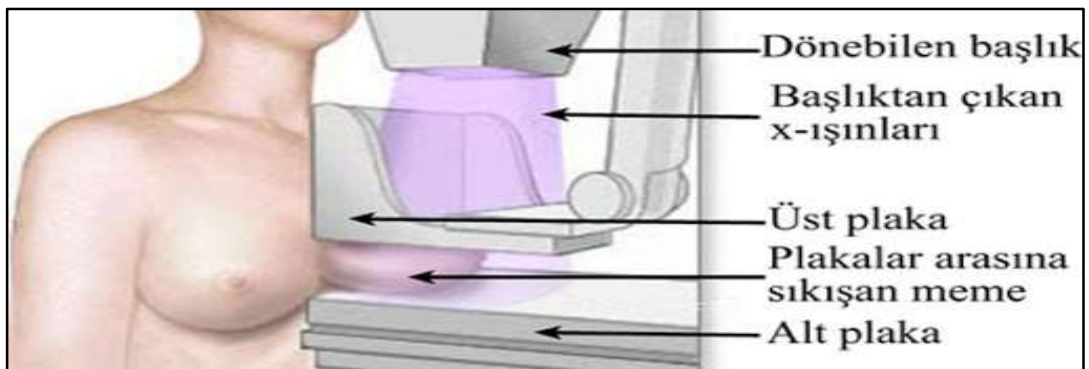
Meme Kanseri, kadınlarda en çok görülme sıklığına sahip olan kanser türüdür. Meme kanserine yol açan farklı risk türleri vardır bu risk türlerinin başında; genetik özellikler, obezite, menopoz, alkol tüketimi gibi etkenler geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte, Ninova gibi nüfus yoğunluğunun fazla olduğu ve gelişmişlik düzeyinin yüksek olduğu bölgelerde meme kanseri görülme sıklığının daha yüksek olduğu da bilinmektedir (Tavassoli 2003). 1980 yılından 2010 yılına kadar olan zaman aralığına bakıldığında Ninova’da teşhis edilen kanser türleri arasında 3563 vaka ve %15,3’lük oran ile Meme kanseri ilk sırada yer almaktadır (Al-Hashimi and Wang 2013). Bu çalışmada meme kanserini etkileyen faktörler arasında ilk sırada yer alan genetik faktörler üzerinde durulmaktadır. Öyle ki, DNA onarımında ortaya çıkan bir hata ile birlikte polimorfizm ve gen işlevindeki farklılaşma kanser oluşumunu başlatıcı etkiye sahip olabilmektedir (Maluf 2018, Nuaabaum *et al.* 2007).

DNA yapısında meydana gelecek bir bozulma, DNA sarmallarının ayrılmasına neden olacaktır. Bunun neticesinde ortaya çıkan kırılma, meme kanseri duyarlılık genleri olarak bilinen BRCA1 ve BRCA2 genleri tarafından onarılmaktadır (Mägdefrau *et al.* 2019). Bununla birlikte bu iki gen, transkripsiyonel düzenleme işlevini de birlikte yürütmektedirler. BRCA1, 17q kromozomu üzerinde bulunur ve bu genin proteini 1863 aminoasit ve 24 ekzondan oluşmaktadır. BRCA2 geni ise 13q kromozomu üzerinde bulunmakla birlikte, bu genin proteini 3418 amino asit ve 27 ekzon içermektedir (Miki 1994). Ailesel olarak kalıtım yoluyla ya da germ hattında meydana gelen mutasyonlarla ortaya çıkan bu genlerden BRCA1 %5 - 10 oranında meme kanseri riski ortaya koymaktayken, BRCA 2 %20 – 40 oranında meme kanseri riski teşkil etmektedir (Kuchenbaecker 2017).

Homolog rekombinasyon mekanizması vasıtasıyla DNA sarmalında meydana gelen kırılmaları onaran bu genlerde ortaya çıkacak bir mutasyon ya da varyasyonların tespitine yönelik taramalar meme kanserinin erken teşhisi için önem arz etmektedir (Şekil 1.1 – Şekil 1.3’da gösterildiği gibi). Bununla birlikte hastanın ailesinin tıbbi

geçmişinde benzer vakanın söz konusu olması değerlendirme gerekliliğini artırmaktadır. Bu nedenle bu çalışma, Irak'ın Ninova şehrinde yaşayan, meme kanseri riski taşıyan ve belirli bir şikayet ile ya da tarama amaçlı olarak hastaneye başvuran hastalarda BRCA1 ve BRCA2 genlerinin analizi ve tahlili ile meme kanserinin erken teşhisinin değerlendirilmesini amaçlamaktadır.

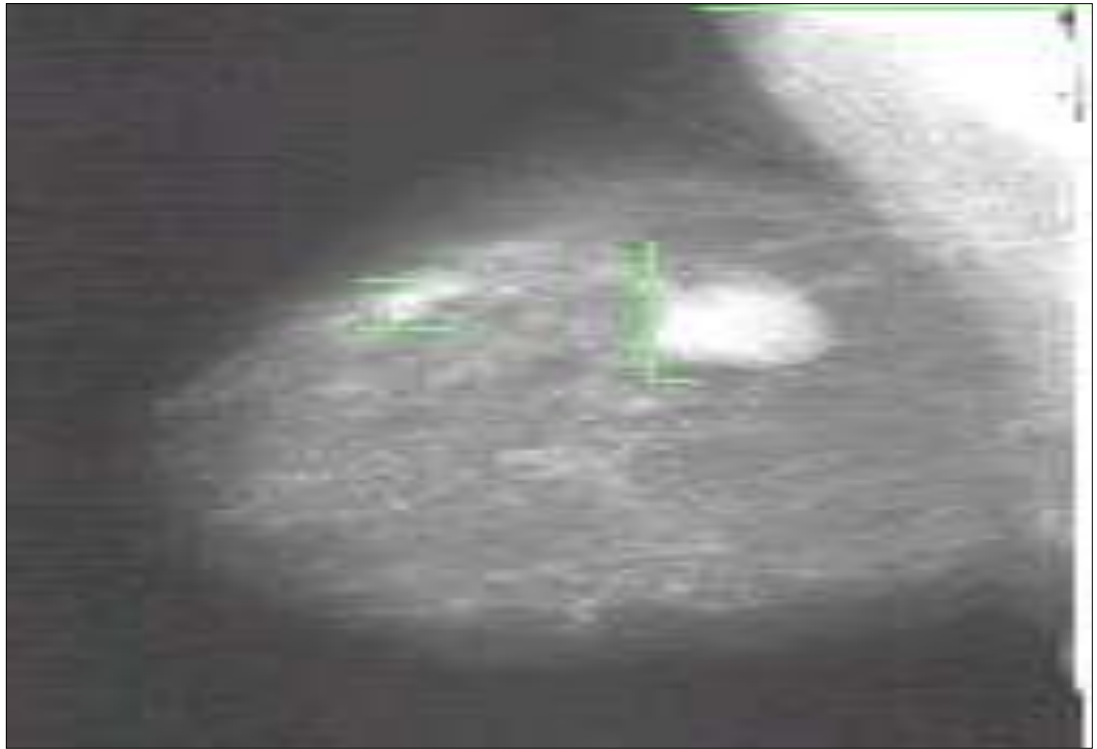
Meme kanseri Irak'ta olduğu kadar Dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Dünya'da meme kanserinin görülme sıklığı %8 - %10 olarak değerlendirilirken bu oran Irak'ın Ninova şehrinde %15'i aşmaktadır (Key *et al.* 2002). Günümüzde gerçekleştirilen meme kanseri taramalarında tercih edilen yöntemler arasında BRCA1 ve BRCA2 gibi iki gen yapısının ele alınması henüz yaygınlaşmamıştır (Poulos and McLean 2004). Bununla birlikte literatüre bakıldığında da BRCA1 ve BRCA2'nin bu bağlamdaki öneminin çok yakın bir süre önce anlaşılmaya başladığı görülmektedir. Irak'taki meme kanseri tanısı konmuş ya da meme kanseri şüphesi söz konusu olan hastalara yönelik yapılan incelemelerde BRCA1 ve BRCA2 genlerine sıklıkla bakılmamakta ve yeterli çalışma yapılmamaktadır. Bu çalışmada BRCA1 ve BRCA2 genleri üzerindeki genetik varyasyonların dikkatle ele alınması neticesinde Irak'ın Ninova kentinde yer alan kadınlardan alınacak klinik örnekler incelenerek, elde edilen sonuç literatüre bilimsel bir katkı sağlayacaktır. Bu bağlamda gerçekleştireceğimiz akademik çalışmanın literatüre ve araştırmacılara katkıda bulunması amaçlanmaktadır (Foulkes 2016).



Şekil 1.1 Mamografi, kanser ve diğer meme hastalıklarının erken teşhisi için memeyi incelemek için kullanılan bir röntgen görüntüleme yöntemidir. Hem teşhis hem de tarama aracı olarak kullanılır



Şekil 1.2 Mamografi cihazı



Şekil 1.3 Meme Kanserini gösteren için X-Işını grafiği

2. GENEL BİLGİLER VE KAVRAMLAR

2.1 Kanser

Kanser, kökeni binlerce yıl öncesine kadar uzanan, eski dönemlere ait insan iskeletlerinde dahi izlerine rastlanan bir hastalıktır. M. Ö. 6. yüzyılda Antik Yunanlılar tarafından isimlendirilen hastalık yirminci yüzyılın başlarında modern bir şekilde analiz edilmeye başlanmış ve günümüzdeki sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur (Richardson 1995).

Bilhassa 1950’li yıllardan itibaren hücresel yapı, işlev ve biyokimya alanlarında göze çarpan bir ivme ile çalışmalar hız kazanmıştır ve gelişen teknoloji ile de desteklenen bu çalışmalar ışığında kansere neden olan hücresel değişikliklerin tanımlanması kolaylaşmış, görüntüleme tekniklerindeki ilerleme ile birlikte tümörlerin tanısı noktasında büyük bir ilerleme kaydedilmiştir. Bütün bu gelişmeler kanserin tespitine yönelik etkili tarama programlarının geliştirilmesini sağlamıştır (Richardson 1997).

Kanser terimi farklı dokularda ortaya çıkan 200’den fazla hastalık çeşidini kapsayan bir genel bir terimdir. Kanseri terimi ile ifade edilen hastalıkların her birinin insidans, yayılma ve sağ kalım oranları ile ilgili özellikler hastalığın türüne özgüdür. Bununla birlikte, tek bir birinci bölgeden kontrolsüz hücre bölünmesi bütün kanser türleri için ortak bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır (Taylor 1992).

Kanser türlerinin görülme sıklığı ve mortalitesi gibi alanlarda ilgili veriler Dünya’nın her yerinde uzun yıllardan beri derlenmektedir. Bu veriler, ölüm kayıtları, hastane kayıtları, sağlık araştırma kurumları gibi resmi kayıtların tutulduğu kurumlarca sağlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) de kanser istatistiklerinin tutulması ve yayınlanması hususunda etkin bir şekilde çalışmaktadır. WHO’nun zaman zaman yaptığı açıklamalara bakıldığında, Dünya çapında bir hastalık olan kanserin türlerinin, görülme sıklığının ve nedenlerinin ülkeden ülkeye farklılık sergilediği görülmektedir.

Farklı kanser türlerinin nedenleri, kötü beslenme, sigara kullanımı, mesleki dezavantajlar gibi farklı unsurlar olabilir (Doll 1992, Heidebrecht *et al.* 2009).

Bilhassa meme kanseri ve akciğer kanseri insidansında, yaşam koşulları hayli benzer olan Avrupa ülkeleri arasında dahi farklılıklar görülmektedir. Bununla birlikte kansere yakalanma riski ve kanser insidansı, meslek ve gelir grubu gibi sosyoekonomik faktörlerle de ilişkilendirilmektedir (Richardson 1997).

Her ne kadar akut lenfoblastik lösemi gibi kanser türleri öncelikle çocuklarda görülse de kanserin görülme sıklığı genel olarak ilerleyen yaşa bağlıdır. 65 – 69 yaş aralığındaki bireylerin kansere yakalanma oranının 55 – 59 yaş aralığındaki bireylere göre iki kat fazla olduğu bilinmektedir (Boyle and Engelking 1993).

Kanser daha ziyade genetik temelli bir hastalık olarak değerlendirilmektedir. Öyle ki hücre proliferasyonunun kontrolsüz bir hale geldiği ve tümör oluşumu ile karakterize edilen çok basamaklı bir neoplaziyi tanımlayan bu hastalık bireyin genetik yatkınlığına bağlıdır (Nussbaum 2007).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan verilere göre 2018 yılında dünya çapında kanser türleri ve ölüm sıklığı şu şekilde görülmektedir (Çizelge 2.1'e bakın) (IACR 2018).

Çizelge 2.1 2018 Yılı Dünya Çapında Kanseri Türleri Yeni Vaka ve Ölüm Oranları

Kanser Türü	Yıllık Yeni Vaka Sayısı ve Oranı	Yıllık Ölüm Sayısı ve Oranı
Akciğer	2.093.876 (%11,6)	1.761.007 (%18,4)
Meme	2.088.849 (%11,6)	626.679 (%6,6)
Kolorektum	1.849.518 (%10,2)	880.792 (%9,2)
Prostat	1.276.106 (%7,1)	358.989 (%3,8)
Mide	1.033.701 (%5,7)	782.685 (%8,2)
Karaciğer	841.080 (%4,7)	781.631 (%8,2)
Özofagus	572.034 (%3,2)	508.585 (%5,3)
Diğer	7.753.946 (%42,9)	3.422.417 (%35,8)

2.2 Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri her yıl dünyada 1 milyonun üzerinde yeni vaka görülme sıklığı ile kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür ve kadınlar arasında görülen tüm kanser türleri arasında %18'lik bir orana sahiptir (McPherson *et al.* 2000). Bununla birlikte bir önceki başlık altında yer verilen verilere göre 2018 yılında bu rakam 2.088.849 yeni vaka şeklinde bildirilmiştir ve tüm kanser türleri arasında 2018 yılında mortalite oranı %6,6 olmuştur (IACR 2018). Meme kanseri hastalığı 40 – 50 yaş aralığındaki kadınlarda en sık görülen ölüm nedenidir. Bu yaş grubundaki kadınların beşte birinin ölüm nedeninin meme kanseri olduğu bilinmektedir. Meme kanserinin insidansının ve mortalite oranının en yüksek olduğu ülke Birleşik Krallıktır ve yukarıda belirtilen yaş grubundaki kadınlarda insidansı %0,02 olarak bildirilmektedir (McPherson *et al.* 2000, Mocci *et al.* 2013).

Meme kanseri farklı klinik bulgularla seyreden ve farklı özellikler sergileyen homojen olmayan bir kanser türüdür. Bu hastalık, histolojik, biyolojik ve klinik olarak farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır (Weigelt *et al.* 2010).

Tümörün büyüme şeklinin esas alındığı histolojik değerlendirme bağlamında en sık görülen meme kanseri türü %59 oranlar invaziv duktal karsinomadır. Bunu %8 oranı ile medüler karsinoma izlerken, üçüncü sırada %7 oranla müsinöz karsinoma, dördüncü sırada %5 oranla intrasistik karsinoma, beşinci sırada %4 oranla tübüler karsinoma ve invaziv lobüler karsinoma yer alırken diğer meme kanseri türleri toplam vakalar içerisinde %13 orana sahiptir (Tavasolli 2003).

Meme kanseri, yaş, coğrafi özellikler, genetik yapı, radyasyon, yaşam şekli, beslenme, alkol kullanımı, vücut kitle endeksi, sigara kullanımı gibi unsurlara da bağlıdır (McPherson *et al.* 2000). Bu faktörler ve etkileri bu çalışmada ayrı bir başlık altında detaylı bir şekilde ele alınmaktadır.

2.3 Kanserde Ailesel Etkiler

Daha önce yapılan çok sayıda araştırmanın da gösterdiği üzere birinci derece akrabalarda görülen kanser öyküsünün, kansere yakalanma riski ile doğru orantılı seyreden bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Kanser tanısının konulmasında aile öyküsü genetik, moleküler ve klinik tanı çalışmalarını destekleyici bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır (Claus *et al.* 1991). Öyle ki, kanserde ailesel etkilerin ve genetik yatkınlığın tespitine yönelik araştırmalar ve çalışmalar duyarlılık genleri ile kanser risk oranı arasındaki ilişkiye yönelik değerlendirmeler yapmaktadır. Bununla birlikte aile öyküsü ele alındığında birden fazla nesil boyunca kanser öyküsü görülen ailelerde duyarlılık genlerinin klonlanması yönünde de yararlı çalışmalar yapıldığı görülmektedir (Miki *et al.* 1994).

Yukarıda da belirtildiği üzere, kanser türlerinin tamamı için ailede kanser öyküsünün bulunması bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Aile öyküsüne dayalı bilimsel

çalışmalar, kanserin ailesel agregasyonunun tanımlanmasında yol gösterici olmaktadır. Bununla birlikte, kalıtsal kanser riski içeren lokuslar da genom bazlı çalışmalar ile tanımlanmaktadır. Ayrıca, çalışmalar sonucunda tespit edilen ve bilinen lokusların kanser insidansındaki değişkenliğin yalnızca küçük bir kısmını açıkladığına da dikkat çekmek yerinde olacaktır (Goldgar *et al.* 1994).

American Cancer Society'nin 2012 yılında yaptığı araştırmaya göre kanserin ailesel etkilere bağlı olduğu gösteren bir dizi tıbbi özellikler mevcuttur. ACS'ye göre, ailede birden fazla kişide kanser türünün gözlemlenmesi, kanserin erken yaşlarda görülmesi, bir bireyde birden fazla kanser türünün görülmesi, kanserin bilateral organların her ikisinde de görülmesi, kardeşlerde çocukluk çağında aynı kanser türlerinin görülmesi, cinsiyete bağlı kanserlerin nadir görülen cinsten tespit edilmesi gibi unsurlar kanserin ailesel etkilere bağlı olduğu gösterir niteliktedir (Loren *et al.* 2013, Rebbeck 1999, Richarson 1997).

2.4 Kalıtsal Meme Kanseri

Meme kanserinin kalıtsal olduğuna dair araştırmaların kökeni, kanser araştırmaları arasında oldukça eskilere uzanmaktadır. 1866 yılında Paul Borca'nın meme kanserinin ailesel özellikleri hakkında bir çalışma yaptığı bilinmektedir. O tarihten günümüze kadar meme kanseri pozitif aile öyküsü ile ilişkilendirilen meme kanseri risklerini değerlendirmek adına çok sayıda epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır ve bu çalışmaların neticesinde meme kanseri hastalarının birinci dereceden akrabaları arasında kadın olanlar için de risk değerinin nispeten yüksek olduğu tespit edilmiştir. Meme kanseri riski aile içerisinde kalıtsal özelliklerle birlikte etkilenen akrabaların yakınlık derecesi, yaşı, etkilenen akraba sayısı gibi unsurlara da bağlıdır (Kelsey and Gammon 1990).

Ailede görülen meme kanseri öyküsü, bir kadının meme kanseri geliştirme riskini iki ila üç kat daha fazla artırmaktadır. Ailede meme kanseri öyküsü görülen kadınlar arasında, 40 yaşından küçük, bilateral ya da premenopozal meme kanseri tanısı

konmuş birinci derece akrabaları olanların özellikle yüksek risk grubunda olduğunu belirtmek mümkündür (Macklin 1959). Ailede meme kanseri öyküsü, hastalığın gelişimi için yerleşik bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Meme kanseri ile nedensel bir ilişki taşıdığı kanıtlanan değişkenler arasında yaştan sonra en yüksek risk ailede meme kanseri pozitif bir öykünün varlığıdır (Claus *et al.* 1998).

Toplam görülen meme kanserlerinin yalnızca %5'inde hastalığın yüksek penetrasyona duyarlılık genlerindeki mutasyonların neden olduğu kalıtsal bir kanser duyarlılık sendromunun parçası olduğu bilinmektedir. Kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %16'lık bir kısmı BRCA1 ve BRCA2 genlerinden herhangi birindeki germ hattı mutasyonları ile ilişkilendirilmektedir (Peto *et al.* 1999, Nelson *et al.* 2014).

BRCA1 ve BRCA2 genlerinin yanı sıra kalıtsal meme kanseri riski artıran diğer genlerin varlığından da söz etmek mümkündür. Bu genler, HEK2, PTEN, TP53, ATM, STK11/LKB1, CDH1, NBS1, RAD50, BRIP1 ve PALB2 genleri olarak sıralanabilir. Ayrıca, bu genlerin bazıları Li-Fraumeni (TP53), Peutz-Jeghers (STK11 / LKB1) ve Cowden sendromu (PTEN) gibi çoklu kanser sendromlarında da rol oynar (Gasco *et al.* 2003, Nelen *et al.* 1996, Malkin *et al.* 1990).

2.5 Risk Faktörleri

Meme kanseri oluşumuna etki eden risk faktörlerinin farklı kategorilere göre gruplandırılması mümkündür. Bu risk faktörlerini iç ve dış faktörler olarak ayırmak mümkündür. Ayrıca, endokrinolojik etkenleri de ayrı bir risk faktör grubu olarak ele almak mümkündür (Dennis-Sykes *et al.* 1985).

Bu bağlamda, meme kanserinin ortaya çıkmasına neden olan iç faktörleri yani doğrudan hastanın kendi bedeninden kaynaklanan unsurlardan başlamak yerinde olacaktır. Bu gruptaki ilk temel faktör hastanın meme kanseri tanısı aldığı yaştır. Meme kanseri sıklıkla menopoz dönemindeki kadınlarda görülür (Levy-Lahad and Friedman 2007). Buna karşın meme kanseri 45 yaş altındaki kadınlarda göreceli olarak

daha az görülmektedir. Hastalık tanısının konulduğu yaş ile tümör dokusunda bulunan östrojen reseptörü arasında bir korelasyon gözlenmektedir. Östrojen reseptörünün aşırı ekspresyonunun görüldüğü (ER+) neoplazmalar ER- tümörlerinin aksine yaşla birlikte doğru orantılı olarak bir artış sıklığı göstermektedir. ER+ gösteren neoplazmalar menopoz dönemindeki kadınlarda meme kanseri riskinin artış gösterdiğini kanıtlamaktadır (Ban and Godellas 2014). Bu kapsamda bir diğer risk faktörü de cinsiyettir. Meme kanseri oluşumunun cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde, neoplazmanın ağırlıklı olarak kadınlarda görüldüğü ve tanı konulan toplam meme kanseri vakalarının yalnızca %1'inden daha az bir kısmının erkeklerde sporadik olarak teşhis edildiğini söylemek mümkündür (Gnerlich *et al.* 2011). Erkeklerde bu tip neoplazmin rastlantısal olmasına rağmen, epidemiyolojik veri analizi son otuz yılda erkeklerde meme kanseri oluşumunda belirgin bir artış göstermektedir (Speirs 2009).

Meme kanseri riskini artıran önemli bir iç faktörün de ırk olduğu bilinmektedir. Beyaz ırka mensup kadınlarda meme kanseri görülme sıklığının 100.000'de 127,4 olduğu ve diğer ırklara mensup kadınlara göre beyaz ırk mensubu kadınların meme kanserine yakalanma sıklığının daha fazla olduğunu söylemek mümkündür. Beyaz ırka mensup kadınlarda mortalite ve 5 yıllık sağkalım göstergeleri sırasıyla %12,3 ve %90,4'tür. Siyah ırka bakıldığında ise 100.000 bireyde neoplazmin görülme sıklığı yaklaşık 121,4'tür ve mortalite ve 5 yıllık sağkalım göstergeleri sırasıyla %18,2 ve %78,6'dır (Ban and Godellas 2014).

Meme kanseri oluşumuna yol açan bir başka iç risk faktörü ailesel özelliklerdir. Meme kanseri oluşumunda, bir hücrede tümör baskılayıcı genler olan BRCA1 ve BRCA2 genleri önem arz etmektedir. Epidemiyolojik ve popülasyon çalışmalarının korelasyonu, ailesel meme kanseri vakalarının sayısının tahmin edilmesine imkan tanımaktadır. Meme kanseri, yeni teşhis edilen neoplazmaların yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Francken *et al.* 2013). BRCA1 ve BRCA2 genlerinin etkisi ayrı bir başlık altında ele alınmaktadır.

Meme kanserinin oluşumuna yol açan dışsal risk faktörlerinin başında ise bilhassa obeziteye neden olan hatalı diyet alışkanlıkları gelmektedir. Yağ açısından zengin, aşırı kiloya ve obeziteye yol açan gıdaların yanı sıra gıdaların lezzetini artırmak veya yiyecekleri korumak amacıyla kullanılan bir dizi kimyasal madde içeren işlenmiş ürünlerin meme bezi hücrelerinde neoplastik transformasyon sürecini destekleyen önemli faktörler olduğu değerlendirilmektedir. Bu korelasyon, bilhassa menopoza sonrası dönemde bulunan kadınlar ele alındığında, östrojen, progesteron ve HER2 reseptörlerinin aşırı ekspresyonu olmaksızın meme kanserinin ortaya çıkma riski ile ilişkilidir (Thiébaud *et al.* 2007).

Bu bağlamda yapılan araştırmalar neticesinde neoplasti nedeniyle tedavi edilen bir grup kadında düşük yağlı diyet tercih edilmesinin, birincil cerrahi prosedüründen sonra neoplazm nüks riskinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Ayrıca, haftada 3 - 5 beş kez yapılan düzenli egzersiz ve fiziksel aktivitenin meme kanseri oluşum riskini %20 - %40 oranında düşürdüğü ortaya konulmuştur (Lynch *et al.* 2011). Ayrıca beslenme alışkanlıkları kapsamında bir diğer değerlendirme de antioksidan bakımından zengin olan gıdaların ve D vitamini içeren besinlerin tüketilmesinin meme kanseri riskini %20 azalttığı yönündedir (Saxe *et al.* 1999). Alkol tüketimi ise büyük bir risk unsuru teşkil etmektedir. Öyle ki karaciğerdeki östrojen metabolizmasını etkilediği için az miktarda olsa dahi alkol kullanımının meme kanseri riskini artırdığı bilinmektedir (Bagnardi *et al.* 2013).

Risk faktörlerine yönelik yaptığımız gruplandırmanın üçüncü ve son grubu ise endojen seks hormonu kan konsantrasyonu, hormonal tedavi ve meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi ele almaktadır. Bu bağlamda, kandaki yüksek endojen östrojen seviyesinin, meme kanseri insidansının artışına yol açan bir risk faktörü olduğu kanıtlanmıştır. Prospektif çalışmaların analizi, menopoza sonrası dönemdeki kadınlarda artan seks hormonları konsantrasyonlarının meme kanseri riskini artırdığı doğrulanmaktadır (Key *et al.* 2002). Ayrıca serum hormon düzeylerinin reseptör durumuna göre farklı meme kanseri alt tiplerinin gelişim riskini artırdığı da bilinmektedir (Farhat *et al.* 2011).

2.6 BRCA1 ve BRCA2 Genleri

Meme kanseri oluşumunu koştullandıran iç faktörlerden birinin bu tür neoplazmaya yönelik ailevi bir duyarlılığın olduğuna yukarıda yer verilmiştir. Bu bağlamda en hücrede tümör baskılayıcı gen işlevini yerine getiren BRCA1 ve BRCA2 genlerinin büyük önem arz ettiği bilinmektedir (Ford *et al.* 1998). Bu genlerin kodlama dizisindeki değişikliklerin ortaya çıkması, kendilerini göğüs ve / veya yumurtalık kanseri şeklinde gösteren HBC-SS (Kalıtsal Meme Kanseri Bölgesine Özgü) veya HBOC (Kalıtsal Meme Yumurtalık Kanseri) sendromu olarak adlandırılan kalıtsal sendromların gelişmesine yol açabilir. BRCA1 veya BRCA2 genlerindeki mutasyonların belirlenmesi, mutasyon tipine bağlı olarak sırasıyla mutasyon taşıyıcılarının %65 veya %45'inde meme ve / veya yumurtalık kanseri görülme riskinde artış ile ilişkilidir (Antoniou *et al.* 2003).

BRCA1 veya BRCA2 gen mutasyonlarının neden olduğu kalıtsal sendromlar, hastada karmaşık bir moleküler analiz gerektirebilecek çeşitli klinik semptomlarla ilişkilidir. İlk temel kriter, genellikle 45yaşın altındaki nispeten genç insanlarda, meme ve / veya yumurtalık kanseri oluşumunun erken yaşta görülmesidir. Dikkate alınan ikinci kriter, bir soyağacı üzerindeki birinci ve ikinci derece akrabalarda meme ve / veya yumurtalık kanseri vakalarının ailesel bağlamda tanımlanmasıdır (Mohamad *et al.* 2008). Ancak, belirtmek gerekir ki, meme kanseri hastalarının büyük bir kısmı üzerinde yapılan moleküler taramalar, BRCA mutasyonunun görüldüğü hastaların yaklaşık %50'sinde aile öyküsünün bulunmadığını göstermektedir (Ban and Godellas 2014).

35 yaş ve altında meme kanseri tanısı konulan kadın hastalarda BRCA1 ve BRCA2 genleri üzerinde gerçekleşen mutasyonların varlığının değerlendirilmesi için genetik testlerin yapılması gerekli bir koşuldur. Bununla birlikte, muayene ayrıca tümörün östrojen, progesteron ve HER2 reseptörü aşırı ekspresyonu ile karakterize edilen ve üçlü negatif hastalar olarak adlandırılan 40 yaş altı kadınların tamamına uygulanmalıdır (Mavaddat *et al.* 2013). Bilateral meme kanseri ve ailesinde meme ve yumurtalık kanseri öyküsü olan hastalarda ve özellikle 50 yaş altında tümör

oluşumunun görüldüğü hallerde meme ve ayrıca meme kanseri tanısı konulmuş erkek hastalar için de genetik konsültasyon kesinlikle önerilmektedir (Ahmad 2009).

2.6.1 BRCA 1 ve BRCA 2 genlerinin moleküler mekanizmaları

Tümör baskılayıcı genler BRCA1/2 üzerindeki germline mutasyonlarının meme ve yumurtalık kanserine neden olduğu bilinmekle birlikte, bu kanser türlerinin otozomal dominant şekilde kalıtsal olduğu ortaya konulmuştur (Hu *et al.* 2018).

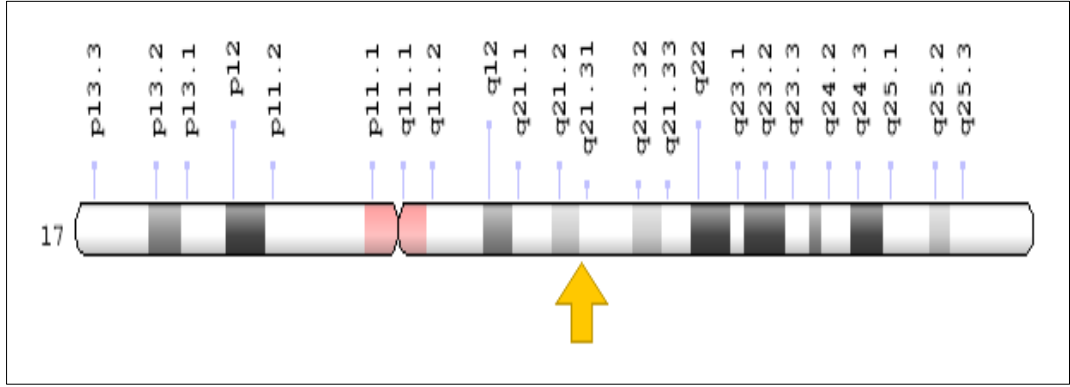
Hücre bölünmesi sırasında genotoksik stres nedeniyle DNA çift ipliklerinde kopma meydana gelebilir ve hücre döngüsü kontrol noktaları S ve G2, BRCA1 ve BRCA2 genleri aracılığıyla yetersiz genetik bilgi riskini azaltabilir. Hücre döngüsü, G2/M fazında, CHEK1'in aktivasyonu aracılığıyla BRCA1-RBBP8 kompleksi tarafından kontrol edilir (Mussil *et al.* 2019, Simhadri *et al.* 2019, Takaoka *et al.* 2018).

BRCA1 ve BRCA2 genlerinden elde edilen protein transkripsiyonu, bu kopmaların homolog rekombinasyonla onarılmasından sorumludur. Homolog rekombinasyon, kardeş kromatitler arasında nükleotit sekansının değiştiği bir tiptir. DNA hasarına yanıt olarak BRCA1, lokalizasyonu ve fonksiyonu homolog rekombinasyon sırasında BRCA2 tarafından kontrol edilen RAD51'i düzenler (Zhao *et al.* 2019, Petermann 2018).

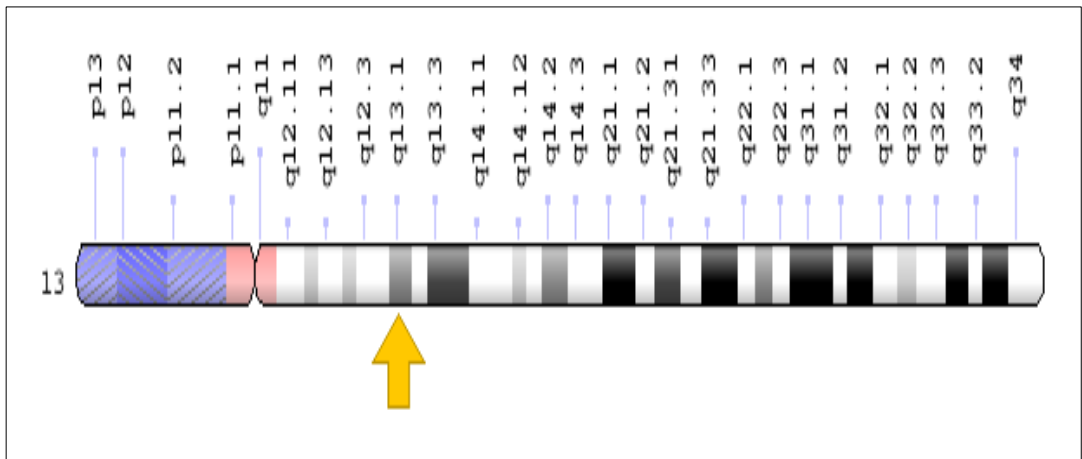
Bu genin protein transkripti, hasarlı DNA, diğer tümör baskılayıcılar ve sinyal transdüserleri için sensörler yoluyla BASC'yi oluşturur. RNA polimeraz II ve HDAC kompleksleri BASC ile birleşir. DNA onarımı, hücrenin, E3 ubiquitin-protein ligazı tarafından etkilenen poliubikitin zincirleri yoluyla tepkisinin aktive edilmesiyle etkinleştirilmektedir. Bu ligaz ayrıca BRCA1'in tümör baskılamasından da sorumludur. Genomik stabilite, transkripsiyonel düzenleme, DNA onarımı ve ubiquitinasyon gibi çeşitli yollarla BRCA1-BARD1 kompleksi tarafından sağlanır

2.6.2 Kromozom yerleşimi

Kromozom 17'nin q kısmı, 17q21 olarak BRCA1 içerir. Genin protein ürünü, 1863 amino asit, 24 ekzon v r (Magdefrau *et al.* 2019, Stewart *et al.* 2017, Shimada 2018).e iki alandan oluşur: Çinko parmak ve C terminali. Aynı zamanda nükleer yerelleştirme ve ihracat kalıplarına sahiptir. Diğer yandan, kromozom 13'ün q kısmı 13q12,3 olarak BRCA2 içerir (Şekil 2.1'da gösterildiği gibi). 3418 amino asidi kodlayan 10,254bp kodlamadan sorumlu 27 ekzon vardır (Şekil 2.2'da gösterildiği gibi). Hücre altı lokalizasyonunun düzenlenmesi ve genin fizyolojik rolü alternatif ekleme ile kontrol edilir (Baugh *et al.* 2019, Yang 2017).



Şekil 2.1 BRCA1 Geninin Kromozom Yerleşimi (Hollis *et al.* 2017)



Şekil 2.2 BRCA 2 Geninin Kromozom Yerleşimi (Hollis *et al.* 2017)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, meme kanseri tanısı konmuş ve meme kanseri riski bulunan kadın hastalardan elde edilen klinik örnekler tahlil edilmiştir. Yakın zamanda geliştirilmiş olan yeni nesil dizileme teknolojisi ile ailesel yani genetik faktörlere dayalı meme kanserine yol açan genlerin teşhis ve tespiti için çoklu gen paneli oluşturulmuş olup bu paneller daha ziyade DNA onarımlarında etkili olan BRCA 1/2 gibi genlerin incelenmesini sağlamıştır.

3.1 Hastaların Seçimi

Bu çalışma çerçevesinde yürütülen deneysel çalışmalar, Irak'ın Ninova şehrinde yer alan araştırma ve uygulama hastanesinin jinekolojik onkoloji biriminin laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Deneylere dahil edilen hastalar, etik kurul onayı ve rıza beyannameleri alınarak bilgilendirilmiş ve gönüllülük esasına dayalı olarak çalışma kapsamına alınmışlardır. Hastaların aydınlanmış onam formları EK1 de yer almaktadır.

Hastaların seçiminde bir takım kriterler göz önünde bulundurulmuştur. Katılımcıların bu kriterlerden en az ikisine uyduğu bilinmektedir. Bu kriterlere aşağıda yer verilmektedir:

BRCA1/2 taraması için kaydolun hastaların aşağıdaki özel seçim kriterlerinden en az birine sahip olması gerekir:

- Meme Kanseri tanısının en fazla 40 yaşında konmuş olması.
- İnvaziv ve/veya bilateral meme kanseri ve/veya çoklu organ kanserlerinin herhangi bir yaşta konmuş olması.
- Ailesinde meme kanseri öyküsü bulunması.
- 40 yaş ve altında meme kanseri tanısı konmuş birinci derece kadın akraba.

- 50 yaşından önce ilk primer meme kanseri tanısı konmuş birinci derece kadın akraba.
- Herhangi bir yaşta meme kanseri tanısı konmuş iki birinci derece akraba ya da bir birinci derece bir ikinci derece akraba.
- Herhangi bir yaşta meme kanseri tanısı konmuş üç birinci derece ya da ikinci derece akraba (ailenin aynı tarafından).
- Ailenin aynı tarafında (anne tarafı ya da baba tarafı) kanser tanısı konmuş bir ya da birden fazla akraba.
- Hastaların Irak ülkesinin Ninova ilinde yerleşik olmaları ve hayatının tamamını ya da büyük bölümünü (yaşam süresinin yarısından fazlasını) bu şehirde geçirmiş olması.

Hastaların rıza beyannamesini okuyup, anlayıp, onaylamasını müteakiben en fazla 5 mL olacak şekilde kan plazma örnekleri alınmış ve EDTA tüpleri +4°C’de muhafaza altına alınmıştır.

3.2 Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA’nın izolasyonu, hastalardan rızaları dahilinde alınan 5 – 10mL periferik kan numunesinden, Nucleon BACC3 Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (GE Healthcare, Life Sciences) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamayı takiben, numunelerin niceliksel incelemesi ve miktar ölçümü için NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılmıştır. DNA İzolasyon işleminde kit üreticisinin kullanım talimatları adım adım takip edilmiş ve uygulanmıştır.

3.3 İzole edilen gDNA’nın Kalitatif ve Kantitatif Tayini

Rızaları dahilinde, hastalardan edinilen klinik numunelerden izole edilen DNA örneklerinin tıbbi kalitesinin tespiti için Beer-Lambert denklemi esas alınarak, Nano Drop 200 markalı ve Thermo Scientific Inc. Adlı şirket tarafından üretilen spektrofotometri cihazı ile ölçüm yapılmıştır. 1µL Numunelerin derişimini ve saflık

oranını tespit etmek için öncelikle saf su ölçümü yapılacak ve cihaz kalibre edilmiştir. 260nm – 280nm aralığında optik yoğunluk değeri numunenin saflık düzeyini belirlemek için optimal değer olarak alınmıştır. 260nm – 280nm optik yoğunlukların ölçümünde 1,7 – 1,9 aralığında elde edilen sonuç hastalardan edinilen klinik numunelerin istenen saflık düzeyinde olduğunu göstermiştir.

3.4 BRCA2 N273H Tek Nükleotid Polimorfizmi

Yeni nesil dizileme işleminin yapılmasından önce, BRCA2 geninin niteliğinin anlaşılması ve yeni nesil dizileme aşamasına hazırlık ve numune kaynağı teşkil etmesi adına BRCA2 geni için N273H tek nükleotid polimorfizmi çalışılarak sonuç not edilmiştir.

Tek nükleotid varyasyonunun saptanması amacıyla, genotipleme gerçek zamanlı PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR'de, yüksek sıcaklıklara dirençli bir DNA polimeraz enzimi, in vitro DNA miktarını artırmıştır.. Amplifikasyon reaksiyonlarının eşzamanlı olarak nicelendirilmesi için kantitatif PCR tercih edilmiştir. BRCA2 geninin 10 ekzonundaki c,1114 pozisyonunda, adenin nükleotidinin yerini sitozin nükleotit almaktadır, bu da asparaginden histidine dönüşen bir amino asit değişikliğine yol açmaktadır.

BRCA2 transversiyonunun saptanması için bir TaqMan testi (C___807154_20) kullanılmıştır. Sekansta VIC, nükleotit A'yı belirtirken FAM, N [AAT]> H [CAT] enversiyonunda nükleotit C'yi belirttiği not edilmiştir.

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonunun uygulanması koşulunda bu işlem 7500 devirli Applied Biosystem marka PCR cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Plakaları söz konusu içerikleri muhteva eden karışımla doldurulmuştur. Plakalar ışıktan korunarak cihaza konulmuştur. Gerekli termal koşullara dikkat edilmiştir.

3.5 Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak BRCA1/2 genlerinde genetik varyasyonun tespit edilmesi amacıyla Irak'ın Ninova kentinde yaşayan 50 kadın hasta üzerinde yapılan araştırmada aşağıdaki adımlar uygulanmıştır.

3.5.1 gDNA ölçümü

Hastaların klinik numunelerinden izole edilen gDNA'ların yeni nesil dizileme panelinde kullanılması için, ölçümden önce uygunluk kontrol gerçekleştirilmiştir. Uygunluk kontrolü, ABD menşeli Invitrogen firması tarafından üretilen Qubit dsDNA HS marka ve modeline sahip deney çalışma kiti ile gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin Qubit ile ölçülmesinden önce vorteksleme işlemi tatbik edilmiştir. Deneyde kullanılacak her bir numune için 1µL Qubit reaktifi ile 199µL Qubit Tampon çözeltisi karıştırılarak çalışma çözeltisi oluşturulmuştur. Elde edilen çözeltinin 198µL hacmine karşılık 2µL izole edilmiş DNA eklenerek vorteksleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ölçüm neticesinde her bir DNA numunesi seyreltilerek 10ng/µL yoğunluğu ayarlanmıştır.

3.5.2 gDNA için kütüphane hazırlığı

gDNA için kütüphane hazırlığında ABD menşeli Thermo Fisher Scientific isimli firman tarafından üretilen ION Ampliseq Library Kit 2,0 kütüphane kiti kullanılmıştır. 386 amplikon ve 2 havuz içeren paneldeki iki havuz ayrı ayrı işleme tabi tutulmuştur. Katılımcılardan her biri için kullanılan miktarlar şu şekildedir:

- 5X Ion Ampliseq Hifi Karışım - 2µL.
- 2X Ion Ampliseq Primer Havuzdan - 5µL.
- 10 ng/µL yoğunluklu gDNA numunesi – 1µL.

- Saf Su – 2µL.
- Primer – 5µL.

PCR cihaz için parametreler şu şekildedir:

- 99 °C - 120 saniye
- 99 °C – 15 saniye
- 60 °C – 240 saniye
- Döngü Sayısı: 18.
- Tek bir hasta için sonuç klinik numunenin birleştirilmesi Eppendorf 96 kuyucuklu plaka.

Amplikonların DNA kütüphanesini oluşturulmasında BRCA MASTR V 2,1 test kiti (Multiplicom) kullanılmış ve üreticinin kullanım talimatları adım adım takip edilmiş ve uygulanmıştır.

Bu aşamada her bir hasta için ekzonları kapsayan beş reaksiyonlu bir mütipleks PCR ve intronik genetik bölgelerin komşu bölgelerinin yaklaşık 50 baz çifti üzerinde işlem gerçekleştirmek için 50 ng'lık bir gDNA şablonu kullanılmıştır. Amplifikasyon işleminden sonra, saflaştırılmış mütipleks PCR ürünlerinin 1:1000 oranında seyreltilmesi gerçekleştirilmiş ve her hasta için spesifik moleküler tanımlama adaptörleri (Multiplicom MID) kullanılarak yeniden amplifiye gerçekleştirilmiştir. İkinci PCR'daki amplikonlar, Agencourt AMPure XP (BeckmanCoulter) kullanılarak teizlendi ve saflaştırıldı. Bu adımın ardından, uzunluğu 350 ile 500 baz çifti aralığında değişen amplikonlar Bio -Rad Analiz kiti kullanılarak kalite ve miktar kontrollerine tabi tutulmuştur. Beş PCR çıktısının ekimolar konsantrasyon solüsyonları, sekanslama ana kütüphanesini oluşturmak üzere her numuneye özel olarak bir BRCA amplikon kütüphanesi oluşturmak için bir araya toplanmıştır. Elde edilen kütüphanelerin müteakip klonal amplifikasyonu, üreticinin talimatlarına göre GS FLX Titanyum emPCR kitLibA MV (Roche) kullanılarak emülsiyon PCR (emPCR) ile gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra toplam 60 hastaya ait numune, bir PTP kuyucuğunun 2 bölgesinde bir araya toplandı ve sekanslama işlemi gerçekleştirilerek dizileme yapıldı. Kütüphanenin dizileme işleminde 454 GS FLX (Roche) kullanılmıştır.

3.5.3 Parçalama

Eppendorf 96 kuyucuklu plaka üzerinde birleştirilen numunelerin parçalanması işlemi için plaka buz üzerine alınmış ve işlem boyunca buz üzerinde çalışılmıştır. Eppendorf 96 kuyucuklu plaka üzerindeki PCR son ürünlerinin üzerine FuPa Reaktifinden 2 μ L – 2.5 μ L eklenmesini müteakiben vorteksleme işlemi gerçekleştirilmiştir ve çökelti elde edilmiştir.

PCR için cihaz parametreleri şu şekildedir:

- 50°C – 600 saniye.
- 55°C – 600 saniye.
- 60°C – 1200 saniye.
- 4°C – 3600 saniye.

3.5.4 Barkodlama

Bağlama için barkodların oluşturulmasında ABD Menşeli Thermo Fisher Scientific adlı firma tarafından üretilen IonXpress kit kullanılmıştır. Barkod içeriği şu şekildedir: Ion P1 – 2 μ L, IonXpress Barkod değişken, 4 μ L saf su.

3.5.5 Bağlama (ligasyon)

Barkodların bağlanma işlemi buz üzerinde gerçekleştirilmiş olup, her bir hasta için ayrı ayrı olmak üzere son numune üzerine aşağıdaki reaktifler eklenerek ligaz enzimi varlığında bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir: Switch Çözelti – 2 μ L, Barkod Karışımı

- 2µL. Eppendorf 96 kuyucuklu plaka üzerindeki izole DNA numunesi üzerine enzim ilave edilerek vorteksleme yapılarak çökelti yapılmıştır.

PCR için cihaz parametreleri şu şekildedir:

- 22°C – 1800 saniye.
- 72°C – 600 saniye.

3.5.6 Saflaştırma (pürifikasyon)

Numuneler, ABD menşeli bir firma olan Beckman Coulter tarafından üretilen Agencourt AMPure XP reaktifi ve Eppendorf 96 kuyucuklu plaka kullanılarak saflaştırılma işlemine tabi tutulmuştur. Reaktif 25°C sıcaklık altında vortekslelendikten sonra, hazırlığında ABD menşeli Thermo Fisher Scientific isimli firman tarafından üretilen ION Ampliseq Library Kit 2,0 içerisindeki PCR karışımı ve Amplification Primer Karışımı buz üzerine alınmıştır. Bu adımdan sonra %70'lik etil alkol çözeltisi hazırlanmış ve Eppendorf 96 kuyucuklu plaka üzerindeki numuneler için her bir kuyucuk'a eşit hacimde AMPure XP reaktifi yavaşça eklenmiş ve kuyucuklar ışıktan ve havadan korunacak şekilde muhafaza altına alınmıştır. Bu adımın ardından dakikada 1500 dönüş hızı ile 15 saniye vorteksleme yapılarak oda sıcaklığında beklemeye alınmıştır. Eppendorf 96 kuyucuklu plaka manyetik stantta bekletilerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa daha önce hazırlanan etil alkol çözeltisi eklenmiştir. Yıkama aşamasını müteakiben süpernatant kısmı ayrıştırılmıştır. Etil alkol tatbiki tekrarlandıktan sonra bir kez daha yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve Eppendorf 96 kuyucuklu plaka tekrar oda sıcaklığında ve manyetik stant üzerinde bekletilmiştir.

3.5.7 Kütüphanenin çoğaltılması ve saflaştırılması

Kütüphanenin çoğaltılması aşamasında ABD menşeli Thermo Fisher Scientific isimli firman tarafından üretilen ION Ampliseq Library Kit 2,0 kullanılmış olup, her bir numune için ION Ampliseq Library Kit 2,0 içerisindeki PCR karışımı ve Amplification Primer Karışımı buz üzerine karıştırılarak bir solüsyon elde edilmiştir.

Eppendorf 96 kuyucuklu plakada yer alan her bir numuneye eklenmek üzere oluşturulan solüsyonun derişimi 25:1 olarak kaydedilmiştir. Oluşturulan solüsyon vorteksenerek, süpernatant boş kuyucuklara alınmış ve PCR cihazına yüklenmiştir. PCR için cihaz parametreleri şu şekildedir:

- 98°C – 120 saniye.
- 98°C – 15 saniye.
- 64°C – 60 saniye.
- 10°C.

Kütüphanenin saflaştırılması aşamasına ise yine Beckman Coulter tarafından üretilen Agencourt AMPure XP reaktifi ve Eppendorf 96 kuyucuklu plaka kullanılmış ve yine %70'lik etil alkol çözeltisi hazırlanmıştır. Saflaştırma başlığı altında belirtilen standart protokol uygulanarak kütüphanenin saflaştırma işlemi sağlanmıştır. Saflaştırma işlemi sonunda elde edilen süpernatantlar tüplere konularak muhafaza altına alınmıştır.

3.5.8 Kütüphanenin analizi ve dilüsyonu

Elde edilen numuneler Qubit ile analiz edilmiştir. Bu analiz adımı, DNA'ların Qubit ile Analizi ile aynı adımlar ve standart protokoller izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Qubit analizi sonuçlarının aralığı 350– 700ng/ml aralığında ölçülmüştür. Ölçüm sonrası örnekler sulandırılarak EDTA tüpüne aktarılmıştır.

3.5.9 Yükleme ve dizileme

Yükleme işleminden önce her bir örnek için ayrı çip tanımı yapılmış ve 4°C'de saklanan çipler 25°C sıcaklığa getirilmiştir. Yükleme için Hi-Q Chef Supplies Kit ve Ion PGM Hi-Q Chef Reaktifler kullanılmıştır. Ion Chef ile çip yüklemesi yapılmış olup Ion Torrent ile dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.10 Varyant analizi

Varyant Analizi kapsamında ABD Menşeli Thermo Fisher Scientific adlı firma tarafından üretilen yazılımlardan yararlanılmıştır. Yazılım isimlerine aşağıda yer verilmektedir.

Varyant analizinin ilk aşamasında 14 gen ve 386 ampikon içeren gen paneli için Torrent Suite Software adlı yazılımda format dosyaları oluşturulmuş ve aynı zamanda veri dizilimleri için oluşturulan dosyalar Ion Reporter'a yüklenmiştir. Deney grubundaki hastalardan alınan numunelerin her biri için ampikonlar kontrol edilmiş ve 14 gen için kodlayıcı gen alanının dizilmesi gerçekleştirilmiştir. Format dosyalarındaki varyantlar referanslarla karşılaştırılmıştır.

3.5.10.1 Kullanılan veri tabanları

Varyant analizinde Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) verileri esas alınmıştır. NCBI bünyesinde Clinvar, ExAc, DbSNP, EVS, Insight ve Ensembl veri tabanları kullanılmıştır. Bu veri tabanlarının erişim bilgilerine kaynakçada yer verilmektedir.

3.5.11 Dizileme sonuçlarının değerlendirilmesi

Dizileme sonuçlarının değerlendirilmesinde SeqNext SeqPilot yazılımından istifade edilmiştir. Ayrıca NCBO veritabanından ve JSI veritabanından yararlanılmıştır. Kullanılan referans dizileri BRCA1 için NG_005905,2; izoform NM_007294,3 ve BRCA2 için NG_012772,1; izoform NM_000059,3 olarak belirlenmiştir.

Genetik analizde sadece her iki sekanslama yönünde mevcut olan ve homopolimerler hariç minimum %10 varsayılan kapsama sahip farklı mutasyonlar dikkate alınmıştır. Sekans varyantlarının analizinde ve adlandırılmasında HGVS önerilerinden

yararlanılmıştır. Bununla birlikte, tespit edilen var üzerinde çalışılan varyantların tanımlanmasında BIC ve HGM veritabanlarından yararlanılmıştır.

BRCA1/2 tarafından tanımlanan varyantlar, siliko gen fonksiyon tahminleri ve biyolojik önemi bakımından kendi aralarında sınıflandırılmıştır. Sonuçlar katılımcı hastaların DNA'sının Sanger dizimi ile doğrulanmıştır. BRCA ekzonları PCR primer amplifikasyonu, karşılık gelen ekzonu kuşatan intron sekanslarını hazırlamak için tasarlanmıştır; bu şekilde, tüm kodlama dizisi değişiklikleri tespit edilebilir haldedir. Sanger sekanslaması, hastanın DNA'sında bulunan varyasyonların varlığını olanak tanımakta ve risk altındaki akrabalar için de basitleştirilmiş bir testin temelini teşkil etmiştir.

3.6 BRCA1 ve BRCA2 Varyantları

3.6.1 BRCA1 varyantları

cDNA'lar spesifik olarak tasarlanan farklı primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmıştır. (Primer çiftleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir).

Hedef BRCA1 cDNA'nın varlığını göstermek ve gDNA kontaminasyonunun çoğalmasını önlemek için, cDNA ekzonlarını kuşatan bir çift primer tasarlanmıştır. Bir başka çift primer de tutulan intronun yaklaşık 400 baz çiftlik alanını kapsayacak şekilde tasarlanmış ve ayrıca bir cDNA bölgesini tamamlayıcı bir ileri primer ve tutulan intronik bölgeye bir ters primer kullanılarak başka bir PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları PfuUltra HF DNA Polimeraz (Agilent) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2). PCR amplifikasyonlarının sonuçları Sanger dizilemesi ile analiz edilmiştir.

Ek olarak, tutulan intronun sekansı üzerinde bir kısıtlama haritası gerçekleştirildi ve cDNA sekansının NEBcutter V2,0 ve Sekans Manipülasyon Paketi biyoinformatik

araçları kullanılarak tarif edilen tasarlanmış primerler tarafından amplifiye edilen kısmı üzerinde bir başka haritalama yapılmıştır.

Hastaların çoğaltılmış cDNA'larının ve enzim işlevselleğinin kontrolü için kullanılan gDNA'nın enzimatik sindirimini gerçekleştiren NcoI enzimi kullanılmıştır.

Reaksiyonda 1µL DNA için 0,5µl NcoI enzimi kullanılmış ve BSA olmadan 5µL enzim tamponuna ilave edilmiştir. Daha sonra DNA fragmanları DNA Chip 1 K (BioRad) ile analiz edilmiştir.

Çizelge 3.1 BRCA1 cDNA'daki ekleme varyantını doğrulamak için primer listesi

	Primer Dizlemesi	Uzunluk (Baz Çifti)
BRCA1_cDNA_fw	CAACATGCCCACAGATCAAC	885
BRCA1_cDNA_rw	AATTTCTCCCAATGTTCC	885
BRCA1_intr21_fw	CCCACCCCTGTAATCACAAC	472
BRCA1_intr21_rw	GATCCCCAGGAAGGAAAGAG	472
BRCA1_intr21_ctr_rw	TCCCTCCCCCTCCTCTCTGT	1417

Çizelge 3.2 PfuUltra amplifikasyonu protokolü

Sıcaklık	Döngü
95°C x 5'	1
95°C x 30'' 55°C x 60'' – 0,5°/döngü 72°C x 65''	14
95°C x 5'	1
95°C x 30'' 55°C x 60'' 72°C x 65''	25
72°C x 5'	1
4°C	∞

3.6.2 BRCA2 varyantları

BRCA2-10921bp-cDNA konumunda 2500 baz dizisinden oluşan alanın klonlanarak, T4 DNA Ligaz enzimi ile fragmanların bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

BRCA1 ve BRCA2 genlerinde, delesyon, insersiyon, kodlayıcı sekanslarda tekli nükleotid değişimleri de dahil olmak üzere iki binden fazla mutasyon tespit edilmiştir. En yaygın mutasyonların, ufak insersiyonlar ve delesyonlar ile işlevsiz BRCA proteinlerinin oluşması olduğu bilinmektedir. Mutasyonların nedeni farklılık göstermektedir, kapalı bir çevrede dahi farklı mutasyonların görüldüğü bildirilmektedir (Karami *et al.* 2013).

Çalışma kapsamında numunleri üzerinde çalışılan Ninovalı kadın hastaların 1/8'inde nedensel olduğu bilinen BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları görülmüştür (Çizelge 4.1) BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon tespit edilen katılımcı hastaların ailesinde en az bir kanser öyküsü olduğu bilinmektedir.

Çizelge 4.1 Tespit edilen BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları şu şekildedir

Gene	Exon	HGVS ¹ cDNA	BIC Designation	HGVS ¹ Protein	Mutation Type	Clinically Important (BIC)	Ref. number NCBI	Allelic frequency on 600 alleles
BRCA1	5	c.181T>G	C61G	p.Cys61Gly	Missense	Deleterious	rs28897672	0.16%
	11	c.2761C>T	Q921X	p.Gln921Ter	Nonsense	Deleterious	rs80357377	0.3%
	11	c.3351_3352insT	3470insT (Q1118SfsX*4)	p.Val1117_Gln1118?fs	Frameshift	Deleterious	rs80357785	0.16%
	11	c.3403C>T	Q1135X	p.Gln1135Ter	Nonsense	Deleterious	rs80357136	0.16%
	11	c.3419G>T	S1164I	p.Ser1164Ile	Nonsense	Deleterious	n.r. ²	0.16%
	14	c.4484G>T	R1495M	p.Arg1495Met	Missense	Deleterious	rs80357389	0.16%
	16	c.4964_4982del	5083del19 (S1655Yfs*16)	p.Ser1655_Glu1661?fs	Frameshift	Deleterious	rs80359876	0.16%
	18	c.5123C>A	A1708E	p.Ala1708Glu	Missense	Deleterious	rs28897696	0.16%
	18	c.5153-1G>C	IVS18-1G>C	-	Intervening Sequence	Deleterious	rs80358137	0.16%
	19	c.5153G>A	W1718X	p.Trp1718Ter	Nonsense	Deleterious	rs41293461	0.16%
20	c.5263_5264insC	5382insC (Q1756fs*74)	p.Ser1755?fs	Frameshift	Deleterious	rs80357906	0.5%	
BRCA2	6	c.1238delT	1466delT (L413Hfs*16)	p.Leu413Hisfs	Frameshift	Deleterious	rs80359271	0.16%
	7	c.631G>A	V211I	p.Val211Ile	Missense	Deleterious	rs80358871	0.16%
	10	c.1496_1497delAG	1724delAG (Q499Rfs*14)	p.Gln499Argfs	Frameshift	Deleterious	rs80359285	0.16%
	11	c.2808_2811delACAA	3036delACAA (K936Qfs*21)	p.Lys936_Gln937fs	Frameshift	Deleterious	rs80359552	0.16%
	11	c.4131_4132insTGAGA	1377insXG	p.Asn1377_Thr1378?	In Frame Insertion	Deleterious	rs80359429	0.16%
	11	c.5722_5723delCT	5950delCT (L1908RfsX*2)	p.Leu1908Argfs	Frameshift	Deleterious	rs80359531	0.16%
	11	c.6037A>T	K2013X	p.Lys2013Ter	Nonsense	Deleterious	rs80358840	0.3%

1. HGVS Veritabanında yer alan
2. NCBI Veritabanında yer alan
3. Tespit Edilen

Bununla birlikte, tespit edilen mutasyonları; sessiz (sinonim) mutasyonlar, yanlış anlamlı mutasyonlar (missense), ikili ve üçlü mutasyon olarak detaylandırma durumu da söz konusu olmaktadır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Tespit edilen mutasyonları

Sessiz (Sinonim) Varyant	C,6567C> T N2189N
Sessiz (Sinonim) Varyant	C,2811G> A K937K
Yanlış Anlamalı (Missense) Varyant	C,4481A> G E1494G

SIFT Dizileme aracı ile bu varyantların iyi huylu olduğu ve herhangi bir klinik öneme sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Meme kanserinin erken teşhis olarak değerlendirildiği katılımcı hastaların yalnızca birinde zararlı olmayan bir varyant olduğu tespit edilmiştir. Ancak, ilk tahminlerde zararsız olduğu düşünülse de bu varyantların sağlıklı alellerde bulunmadığı göz önüne alındığında bu varyantların hastalığındaki rollerini ve etkilerini anlamak için daha kapsamlı ve farklı çalışmalara ve yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

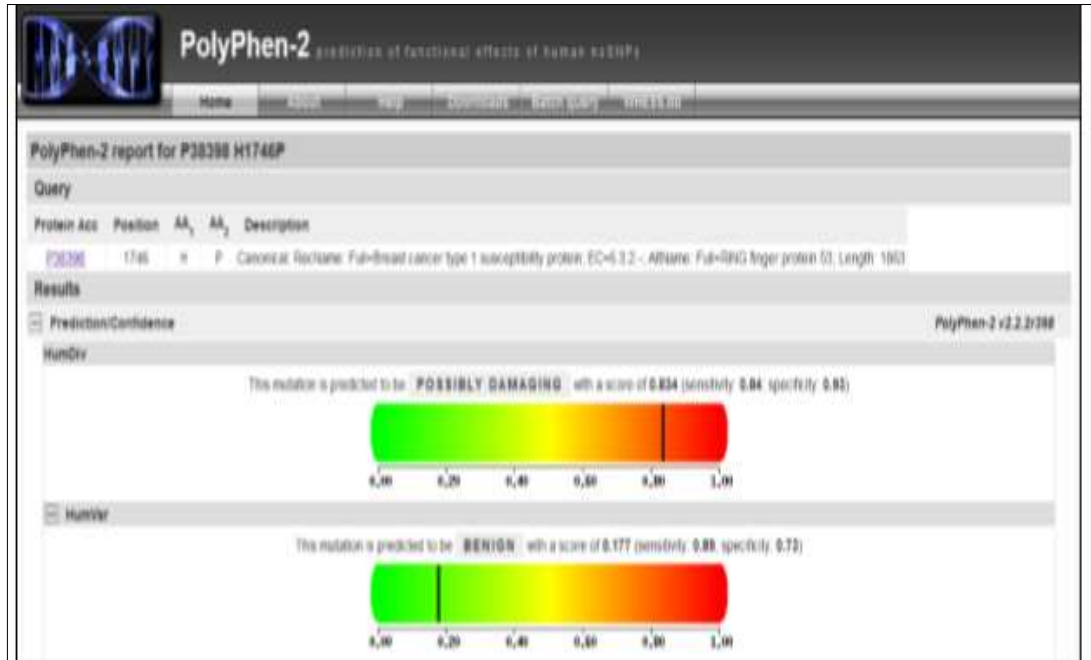
Ayrıca, BRCA2 geni üzerinde C,9976A>T konumunda bir muhtemel mutasyonun protein işlevini etkilediği tahmin edilmektedir.

Bir başka hastanın numunelerinin çalışılmasından elde edilen sonuç ise C,536A > G konumundaki mutasyonun etkili olduğu yönündedir. Aynı hatada BRCA2 üzerinde C,1075G > A konumundaki mutasyon da dikkate alındığında söz konusu mutasyonların daha önceden veri tabanına kayıtlı olduğu görülmüş ve bu durumun hastalık oluşumunda etkili olduğu düşünülmüştür.

Ailesinde birinci, ikinci ve üçüncü derece akrabalarında diğer katılımcılara göre daha fazla kanser öyküsü olan iki katılımcıda çoklu mutasyon tespit edilmiştir. Bu durumun sağlanması için aile bireylerinin de Sagner dizilemesi ile teste tabi tutulması gerekmektedir.

C,5237A> C konumundaki yanlış anlamlı varyant ailesinde çok sayıda kanser vakası olan ve erken teşhis/kanser şüphesi tanısı ile gözetim altına alınan bir hastada tanımlanmıştır. Varyantın BRCA1 üzerinde yer aldığı ancak BRCA2 ve BRIP1 proteinlerinin bağlanmasında etkili olacağını değerlendirilmektedir. Dolayısıyla varyantın neden olduğu protein değişikliklerinin BRCA genlerinin her ikisinin de fonksiyonunu etkilediği düşünülmektedir.

PolyPhen ile yapılan analizde varyant zararlı olarak tanımlanmaktadır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

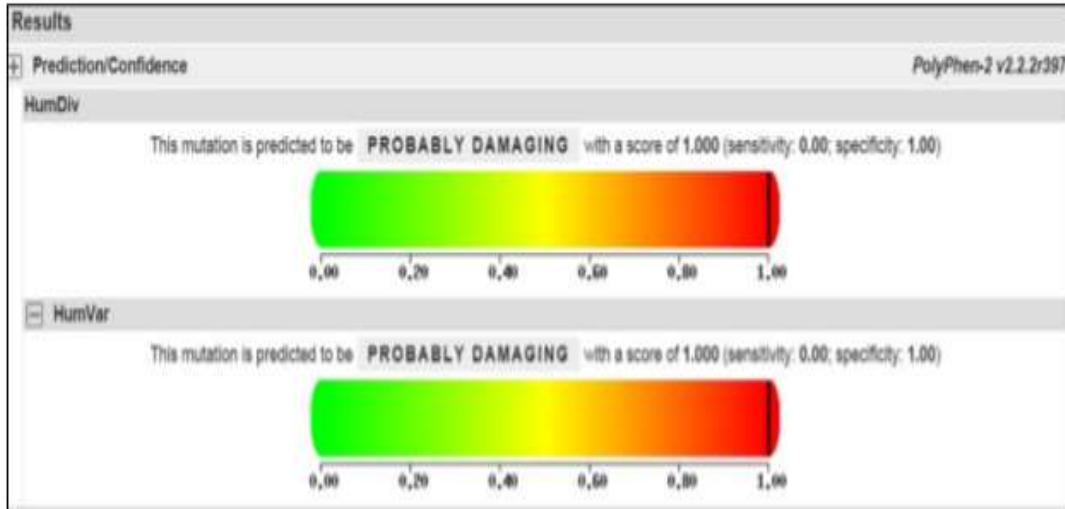


Şekil 4.1 C,5237A> C patojenite analiz sonucu PolyPhen2

QUERY	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp P6FQM4#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp Q6J619#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp P7BPF5#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp F7GKA1#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp F7H7J2#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp P6SQ43#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp F7BQ30#1	-----GVTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp F7BG37#1	GGKWVS-		-----
sp G3TDF5#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp UPI0002234F72#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp P1MXX8#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp Q6401#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp P6PQ88#1	-----		-----
sp P7Z254#1	-----		-----
sp A3A751#1	GGKWVSYFVWTQSIKERKMLNEHDFEVRGDVVNGRNM	H	QGPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV
sp C46498#1	-----		-----
sp G1SRM1#1	RNHQPKRARESQRKIFRGLIECCYGPPTNMPTDQLEWV	E	NMVQLCGASVVRLELSSPTRGTGVHPFVVVQPDAMTEG

Şekil 4.2 PolyPhen-2 yazılımından türetilen çoklu dizi hizalama varyantı

BRCA2geninin 18,ekzonunda C,8299C> T üzerinde yer alan yanlış anlamlı bir varyant tespit edilmiştir. Hasta 30 yaşın altında ve erken teşhis ile gözetim altındadır. Ailesinde herhangi bir kanser öyküsü bulunmamaktadır. Varyant, OB₂ alanında lokalizedir. PolyPhen2 analizi neticesinde, varyantın patojen olacağı değerlendirilmektedir (Şekil 4.3'de gösterildiği gibi).



Şekil 4.3 C,8299C > T patojenite analizi sonucu PolyPhen2

4.1 Patojenitesi Kesin Olmayan (VUS) Varyantlar Ile Polimorfizmler

Çalışmamız kapsamında, patojenitesi kesin olmayan ya da bir başka ifade ile klinik önem bilinmeyen (VUS) varyantlar ve polimorfizmler saptanmıştır. Bu polimorfizmlerin detayları şu şekildedir (Çizelge 4.3 - 4.6'e bakın).

Çizelge 4.3 BRCA1 Polimorfizmi

Gene	Exon	HGVS ¹ cDNA	BIC Designation	HGVS ¹ Protein	Mutation Type	Clinically important (BIC)	Reference number NCBI
BRCA1	11	c.2077G>A	D693N	p.Asp693Asn	Missense	No	rs4986850
	11	c.3113A>G	E1038G	p.Glu1038Gly	Missense	No	rs16941
	11	c.3548A>G	K1183R	p.Lys1183Arg	Missense	No	rs16942
	16	c.4837A>G	S1613G	p.Ser1613Gly	Missense	No	rs1799966

Çizelge 4.4 BRCA1 VUS

Gene	Exon	HGVS ¹ cDNA	BIC Designation	HGVS ¹ Protein	Mutation Type	Clinically important (BIC)	Reference number NCBI
BRCA1	8	c.442-3_442-3delT	IVS7-3delT	-	Intervening Sequence	Unknown	n.r. ¹
	9	c.591C>T	C197C	p.Cys197Cys	Synonymous	Unknown	rs1799965
	10	c.671-12_671+12delT	IVS10+12delT	-	Intervening Sequence	Unknown	n.r. ¹
	11	c.1067A>G	Q356R	p.Gln356Arg	Missense	Unknown	rs1799950
	11	c.2082C>T	S694S	p.Ser694Ser	Synonymous	Unknown	rs1799949
	11	c.2311T>C	L771L	p.Leu771Leu	Synonymous	Unknown	rs1694011
	11	c.2612C>A	P871L	p.Pro871Gln	Missense		rs799917
	11	c.3119G>A	S1040N	p.Ser1040Asn	Missense	Unknown	rs4986852
	11	c.1911T>C	T637T	p.Thr637Thr	Synonymous	Unknown	n.r. ¹
	11	c.3418A>G	S1140G	p.Ser1140Gly	Missense	Unknown	rs2227945
	11	c.3711A>G	I1237M	p.Ile1237Met	Missense	Unknown	rs80357388
	13	c.4308T>C	S1436S	p.Ser1436Ser	Synonymous	Unknown	rs1060915
	16	c.4837A>T	S1613C	p.Ser1613Cys	Missense	Unknown	rs1799966

Çizelge 4.5 BRCA2 Polimorfizmi

Gene	Exon	HGVS ¹ cDNA	BIC Designation	HGVS ¹ Protein	Mutation Type	Clinically important (BIC)	Reference number NCBI
BRCA2	10	c.1114C>A	H372N	p.Asn372Asn	Synonymous	No	n.r. ¹
	10	c.1365A>G	S455S	p.Ser455Ser	Synonymous	No	rs1801439
	10	c.1151C>T	S384F	p.Ser384Phe	Missense	No	rs41293475
	10	c.865A>C	N289H	p.Asn289His	Missense	No	rs766173
	11	c.3396A>G	K1132K	p.Lys1132Lys	Synonymous	No	rs1801406
	11	c.4563G>A	L1521L	p.Lys1521Lys	Synonymous	No	n.r. ¹
	11	c.3807T>C	V1269V	p.Val1269Val	Synonymous	No	rs543304
	11	c.5199C>T	S1733S	p.Ser1733Ser	Synonymous	No	rs28897734
	11	c.4585G>A	G1529R	p.Gly1529Arg	Missense	No	rs28897728
	11	c.5312G>A	G1771D	p.Gly1771Asp	Missense	No	rs80358755
	11	c.6513C>G	V2171V	p.Val2171Val	Synonymous	No	n.r. ¹
	14	c.7242A>G	S2414S	p.Ser2414Ser	Synonymous	No	rs1799955
	27	c.9976A>T	K3326X	p.Lys3326Ter	Nonsense	No	rs11571833

Çizelge 4.6 BRCA2 VUS

Gene	Exon	HGVS ¹ cDNA	BIC Designation	HGVS ¹ Protein	Mutation Type	Clinically important (BIC)	Reference number NCBI
BRCA2	10	c.865A>G	N289D	p.Asn289Asp	Missense	Unknown	rs766173
	10	c.1124C>T	P375L	p.Pro375Leu	Missense	Unknown	rs80358409
	10	c.1909+12_1909+12delT	IVS10+12delT	-	Intervening Sequence	Unknown	n.r. ¹
	11	c.2229T>C	H743H	p.His743His	Synonymous	Unknown	rs1801499
	11	c.2971A>G	N991D	p.Asn991Asp	Missense	Unknown	rs1799944
	11	c.3515C>G	S1172W	p.Ser1172Trp	Missense	Unknown	rs80358600
	11	c.3824T>C	I1275T	p.Ile1275Thr	Missense	Unknown	rs80358625
	11	c.5744C>T	T1915M	p.Thr1915Met	Missense	Unknown	n.r. ¹
	14	c.7008-20A>G	IVS13-20A>G		Intervening Sequence	Unknown	rs81002903
	16	c.7397C>T	A2466V	p.Ala2466Val	Missense	Unknown	rs169547
	16	c.7806-14T>C	IVS16-14 T>C	-	Intervening Sequence	Unknown	rs9534262

Yeni Nesil Dizileme yöntemi ile gerçekleştirilen genetik testler, meme kanseri tanısı konmuş hastaların tedavileri için büyük ölçüde yararlı ve tedavi sürecini etkileyecek kadar ciddi öneme sahiptir. Bununla birlikte, henüz meme kanseri tanısı konmamış ancak şüphe edilen kişiler ile sağlıklı bireylerde gelecekte hastalığın görülme riskinin değerlendirilmesi açısından nedensel mutasyonların açıklanması bağlamında önemli ve yararlıdır.

Bu doğrultuda, bilhassa meme kanserinin erken teşhis edilmesi hususunda bilhassa genç kadın hastaların ne tür bir tedavi altına alınacağı sorusunun yanıtı Yeni Nesil Dizileme yaklaşımı ile ortaya konulan sonuçlarda bulunabilmektedir.

Yapılan çalışmalar, günümüzde kansere bağlı genlerin tanımlanmasını kolaylaştırdığı gibi çeşitliliğinin de ne derece fazla olduğunu göstermektedir. Yeni Nesil Dizileme yaklaşımı, tüm genomdan ekzon dizilemesine kadar oldukça geniş bir analiz imkanı sunmaktadır. Bu yaklaşım yalnızca Meme Kanseri için değil, diğer kanser türleri için de duyarlılık genleri üzerinde yapılacak çalışmaları hızlandırıp kolaylaştırabilir ve hatta yeni duyarlılık genlerinin keşfedilmesine de imkan tanıyabilir.

Meme Kanseri ve buna yakın bir şekilde Ovaryum Kanseri ile ilgili çalışmalarda BRCA1 ve BRCA2 duyarlılık genleri üzerine yapılan Yeni Nesil Dizileme analizi ile kanser geliştirme riski söz konusu olan kişiler ve bu kişilerin ailelerinde erken teşhis ya da önleyici tedaviler bağlamında olumlu sonuçların alınması mümkündür. Yeni Nesil Dizileme yaklaşımı, zaman, efor ve maliyet açısından klinik çalışmalara olumlu katkılarda bulunmaktadır.

Risk grubu kapsamında değerlendirilen ailelerde kansere yol açan ya da kanser riski doğuran genetik yatkınlıktan sorumlu kusurların tespiti, her hastaya ayrı ve özel bir tedavi şeması oluşturulmasını sağlamaktadır. BRCA1 ve BRCA2 genleri üzerinde mutasyonlar ne kadar iyi anlaşılırsa, hastanın tedavi süreci ve hekimin tedavi yaklaşımı da o derece kolaylaşmaktadır. Hastalığın tedavisine yönelik karar alma süresinde yeni nesil dizileme tekniğinin anlamı ve önemi büyüktür.

BRCA1 ve BRCA 2 genleri üzerindeki mutasyonları Yeni Nesil Dizileme yöntemi ile belirlenmesi ile çalışma grubumuzdaki kadın hastaların tedavi süreçlerinin de ilgili hekimler tarafından hastaya özel hale getirildiği ve kimi zaman kimyasal ve cerrahi müdahalelerin gereksiz yere tercih edilmesinin önüne geçtiği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, H. 2021. Early Diagnosis of Breast Cancer by Detection of Genetic Variation for BRCA1 and BRCA2 Genes in the Women's of Nineveh Province. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 8, 2021.
- Al-Hashimi, M.M.Y., & Wang, X. 2013. Comparing the cancer in Ninawa during three periods (1980-1990, 1991-2000, 2001-2010) using Poisson regression. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 18, 1026.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., & Easton, D.F. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*, 72, 1117-1130.
- Bagnardi, V., Rota, M., Botteri, E., Tramacere, I., Islami, F., Fedirko, V., La Vecchia, C. 2013. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Annals of oncology*, 24, 301-308.
- Ban, K.A., & Godellas, C.V. 2014. Epidemiology of breast cancer. *Surgical oncology clinics*, 23, 409-422.
- Baugh, J., Crockett, C., Savoy, K., & Nagra, A. 2019. Exploring the Structural Link Between BRCA1 and Carcinogenesis. *The FASEB Journal*, 33, 790-1.
- Boyle, D.M., & Engelking, C. 1993. Cancer in the elderly: the forgotten priority. *European journal of cancer care*, 2, 101-107.
- Claus, E.B., Risch, N., & Thompson, W.D. 1991. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *American journal of human genetics*, 48, 232.
- Claus, E.B., Schildkraut, J., Iversen Jr, E.S., Berry, D., & Parmigiani, G. 1998. Effect of BRCA1 and BRCA2 on the association between breast cancer risk and family history. *Journal of the National Cancer Institute*, 90, 1824-1829.

- Dennis-Sykes, C.A., Miller, W.J., & McAleer, W.J. 1985. A quantitative Western Blot method for protein measurement. *Journal of biological standardization*, 13, 309-314.
- Doll, R. 1992. Are we winning the war against cancer? A review in memory of Keith Durrant. *Clinical oncology*, 4, 257-266.
- Farhat, G.N., Cummings, S.R., Chlebowski, R.T., Parimi, N., Cauley, J.A., Rohan, T.E., & Lee, J.S. 2011. Sex hormone levels and risks of estrogen receptor–negative and estrogen receptor–positive breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 103, 562-570.
- Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., & Breast Cancer Linkage Consortium. 1998. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *The American Journal of Human Genetics*, 62, 676-689.
- Francken, A.B., Schouten, P.C., Bleiker, E.M., Linn, S.C., & Emiel, J.T. 2013. Breast cancer in women at high risk: the role of rapid genetic testing for BRCA1 and-2 mutations and the consequences for treatment strategies. *The Breast*, 22, 561-568.
- Gasco, M., Yulug, I.G., & Crook, T. 2003. TP53 mutations in familial breast cancer: functional aspects. *Human mutation*, 21, 301-306.
- Gnerlich, J.L., Deshpande, A.D., Jeffe, D.B., Seelam, S., Kimbuende, E., & Margenthaler, J.A. 2011. Poorer survival outcomes for male breast cancer compared with female breast cancer may be attributable to in-stage migration. *Annals of surgical oncology*, 18, 1837-1844.
- Goldgar, D.E., Easton, D.F., Cannon-Albright, L.A., & Skolnick, M.H. 1994. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 86, 1600-1608.
- Heidebrecht, F., Heidebrecht, A., Schulz, I., Behrens, S.E., & Bader, A. 2009. Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range. *Journal of immunological methods*, 345, 40-48.

- Hollis, R.L., Churchman, M., & Gourley, C. 2017. Distinct implications of different BRCA mutations: efficacy of cytotoxic chemotherapy, PARP inhibition and clinical outcome in ovarian cancer. *OncoTargets and therapy*, 10, 2539.
- Hu, C., Hart, S.N., Polley, E.C., Gnanaolivu, R., Shimelis, H., Lee, K.Y., & Couch, F.J. 2018. Association between inherited germline mutations in cancer predisposition genes and risk of pancreatic cancer. *Jama*, 319, 2401-2409.
- Kelsey, J.L., & Gammon, M.D. 1990. Epidemiology of breast cancer. *Epidemiologic reviews*, 12, 228-240.
- Key, T., Appleby, P., Barnes, I., & Reeves, G. 2002. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst*, 94, 606-616.
- Kuchenbaecker, K.B., Hopper, J.L., Barnes, D.R., Phillips, K.A., Mooij, T.M., Roos-Blom, M.J., & BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium. 2017. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Jama*, 317, 2402-2416.
- Levy-Lahad, E., & Friedman, E. 2007. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *British journal of cancer*, 96, 11-15.
- Loren, A.W., Mangu, P.B., Beck, L.N., Brennan, L., Magdalinski, A.J., Partridge, A.H., Oktay, K. 2013. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology*, 31, 2500.
- Lynch, B.M., Neilson, H.K., Friedenreich, C.M., 2011. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*; 186: 13-42.
- Macklin, M.T. 1959. Comparison of the number of breast-cancer deaths observed in relatives of breast-cancer patients, and the number expected on the basis of mortality rates. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 22, 927-951.

- Mägdefrau, A.S., Ludwig, K., Weigel, C., Köse, N., Guerra, G.M., Dakhovnik, A., & Kosan, C. 2019. DNA-damage-induced hormetic responses. In *The Science of Hormesis in Health and Longevity* (pp. 149-159). Academic Press.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel J, Gryka M.A., Bischoff, F.Z., Friend, S.H. & Tainsky, M.A. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250, 1233-1238.
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., & EMBRACE. 2013. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 105, 812-822.
- McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M., 2000. ABC of Breast Diseases Breast Cancer- Epidemiology, Risk Factors, and Genetics, *BMJ*, Vol.321, 9 September 2000: 624 – 628.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., & Ding, W. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266, 66-71.
- Mocci, E., Milne, R.L., Méndez-Villamil, E.Y., Hopper, J.L., John, E.M., Andrulis, I.L., & Goldgar, D.E. 2013. Risk of pancreatic cancer in breast cancer families from the breast cancer family registry. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 22, 803-811.
- Mohamad, H.B., & Apffelstaedt, J.P. 2008. Counseling for male BRCA mutation carriers—a review. *The Breast*, 17, 441-450.
- Mussil, B., Suspène, R., Caval, V., Durandy, A., Wain-Hobson, S., & Vartanian, J.P. 2019. Genotoxic stress increases cytoplasmic mitochondrial DNA editing by human APOBEC3 mutator enzymes at a single cell level. *Scientific reports*, 9, 1-11.
- Nelen, M.R., Padberg, G.W., Peeters, E.A.J., Lin, A.Y., Van den Helm, B., Frants, R.R., Coulon, V., Goldstein, A.M., van Reen M.M., Easton, D.F., Eeles, R.A.,

- Hodgson, S., Mulvihill, J.J., Murday, V.A., Tucker, M.A., Mariman, E.C., Starink, T.M., Ponder, B.A., Ropers, H.H., Kremer, H., Longy, M. & Eng, C. 1996. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22–23. *Nature genetics*, 13, 114-116.
- Nelson, H.D., Pappas, M., Zakher, B., Mitchell, J.P., Okinaka-Hu, L., & Fu, R. 2014. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: a systematic review to update the US Preventive Services Task Force recommendation. *Annals of internal medicine*, 160, 255-266.
- Nuaabaum, R.L., McInnes, R.R., & Willard, H.F. 2007. *Thompson & Thompson genetics in medicine*. Philadelphia: Saunders.
- Petermann, E. 2018. Homologous Recombination at Replication Forks. *DNA Repair and Replication: Mechanisms and Clinical Significance*, 93-112.
- Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., & Stratton, M.R. 1999. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91, 943-949.
- Poulos, A., & McLean, D. 2004. The application of breast compression in mammography: a new perspective. *Radiography*, 10, 131-137.
- Rebbeck, T.R. 1999. Inherited genetic predisposition in breast cancer: A population-based perspective. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 86, 2493-2501.
- Richardson, P. 1995. What is cancer?. In *David J Cancer Care Prevention, Treatment and Palliation*. Chapman and Hall, London: 1–2
- Richardson, P. 1997. What is cancer? *Practice Nursing Vol.8*, 27 – 29.
- Saxe, G.A., Rock, C.L., Wicha, M.S., & Schottenfeld, D. 1999. Diet and risk for breast cancer recurrence and survival. *Breast cancer research and treatment*, 53, 241-253.

- Shimada, M. 2018. Maintenance of Genome Stability by Ubiquitination of DNA Repair Proteins in Mammalian Development and Ubiquitination Governing DNA Repair: Implications in Health and Disease, 135.
- Simhadri, S., Vincelli, G., Huo, Y., Misenko, S., Foo, T.K., Ahlskog, J., & Xia, B. 2019. PALB2 connects BRCA1 and BRCA2 in the G2/M checkpoint response. *Oncogene*, 38, 1585-1596.
- Speirs, V., & Shaaban, A.M. 2009. The rising incidence of male breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 115, 429-430.
- Stewart, M.D., Duncan, E.D., Coronado, E., DaRosa, P.A., Pruneda, J.N., Brzovic, P.S., & Klevit, R.E. 2017. Tuning BRCA1 and BARD1 activity to investigate RING ubiquitin ligase mechanisms. *Protein Science*, 26, 475-483.
- Takaoka, M., & Miki, Y. 2018. BRCA1 gene: function and deficiency. *International journal of clinical oncology*, 23, 36-44.
- Tavassoli, F.A. 2003. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. *World Health Organization Classification of Tumours*.
- Taylor, M. 1992. A simplified biology of cancers. In: Heller T, Bailey L, Pattison S eds. *Preventing Cancers*. Open University Press, Milton Keynes.
- Thiébaud, A.C., Kipnis, V., Chang, S.C., Subar, A.F., Thompson, F.E., Rosenberg, P.S., & Schatzkin, A. 2007. Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in the National Institutes of Health–AARP Diet and Health Study cohort. *Journal of the National Cancer Institute*, 99, 451-462.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., & Reis-Filho, J.S. 2010. Histological types of breast cancer: how special are they?. *Molecular oncology*, 4, 192-208.
- Yang, X.R., Devi, B.C., Sung, H., Guida, J., Mucaki, E.J., Xiao, Y., & Dean, M. 2017. Prevalence and spectrum of germline rare variants in BRCA1/2 and PALB2 among breast cancer cases in Sarawak, Malaysia. *Breast cancer research and treatment*, 165, 687-697.

Zhao, W., Wiese, C., Kwon, Y., Hromas, R., & Sung, P. 2019. The BRCA tumor suppressor network in chromosome damage repair by homologous recombination. *Annual review of biochemistry*, 88, 221-245.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Nada Saad Omer Al-TAEE
Yabancı dili: Arapça / İngilizce / Türkçe

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Al-Talaa'a (1995 – 1996)

Lisans : AL Mosul Üniversitesi (1998 – 1999)

Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi (2019 – 2021)