

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**MEME VE/VEYA OVER KANSERLİ
HASTALARDA BRCA1 VE BRCA2 GENLERİNDE
İLK DEFA BELİRLENMİŞ OLAN
DEĞİŞİMLERİN POPÜLASYON TARAMASI**

Tuğba SEMERCİ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2009

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**MEME VE/VEYA OVER KANSERLİ
HASTALARDA BRCA1 VE BRCA2 GENLERİNDE
İLK DEFA BELİRLENMİŞ OLAN
DEĞİŞİMLERİN POPÜLASYON TARAMASI**

Tuğba SEMERCİ

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Güven LÜLEÇİ**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

(Proje no: 2007.02.0122.015)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir./.../ 2009

Tez Danışmanı :**Prof. Dr. Güven LÜLECI**
Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye :**Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI**
Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye :**Doç. Dr. Taner ÇOLAK**
Akdeniz Üniversitesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye :**Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM**
Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye :**Yrd. Doç. Dr. A. Esra MANGUOĞLU**
Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri
tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve
....../.... kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

BRCA1 ve/veya BRCA2 genlerinin kalıtsal mutasyonlarını taşıyan bireylerin meme ve over kanserleriyle birlikte prostat, kolon, serviks gibi diğer organ kanserlerine de yatkınlığa sahip oldukları bilinmektedir. Daha önce anabilim dalımızda yapılan bir araştırmada yüksek risk grubu 75 meme ya da over kanserli bireyde BRCA1 ve BRCA2'nin tüm kodlayıcı eksonlarında mutasyon analizi DGGE yöntemi ile yapılmıştır. Her iki gende yanlış anlamlı mutasyonlar, polimorfizmler ve intronik bölge değişimlerinin yanı sıra BRCA1 geninde H513L, H816P, S1577Y değişimleri, BRCA2'de S326R, G258P, E2903K ve N2742S değişimleri olmak üzere biyolojik açıdan tam olarak önemi bilinmeyen yedi tane ilk defa görülen mutasyon saptanmıştır. İlk defa tanımlanan bu değişimlerin polimorfizm veya işleve yönelik mutasyon olup olmadığının araştırılması gerektiğinden bu çalışmada, ailesinde herhangi bir kanser öyküsü bulunmayan ve polimorfizm amaçlı araştırmalarda kullanılmış olup saklanan 150 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu DNA'ları kullanılmıştır. Önce bu DNA'ların PCR yöntemiyle amplifikasyonları yapılmış daha sonra DHPLC yöntemiyle tüm değişiklik görülen eksonları taranmış, değişik piklerin görüldüğü örnekler dizi analizine alınmıştır. Yapılan analizlerde her iki gendeki 7 değişimin 150 kontrolün hiçbirinde bulunmadığı görülmüştür. Bunun sonucunda, önceki araştırmada bulunmuş bu mutasyonların Türk toplumunda meme ve over kanseri için yeni bir hastalık yapıcı mutasyon olabileceği varsayılmaktadır.

Yapılan bu araştırma sonucunda hasta bireylere hekimi ile birlikte mutasyon için bilgi ve genetik danışma verilmesi, daha sonra ailedeki erkek/kadın yüksek risk grubundaki bireylerin patojenik mutasyon taşıyıcısı olup olmadıklarının belirlenmesi, alınabilecek önlemler açısından önemlidir. Böylece hasta ya da incelenecek taşıyıcı bireylere yönelik genetik danışma verilebilmesi, dolayısıyla da hastalığın önlenmesine katkı sağlanabilmesi planlanmıştır. Ayrıca bu bulgular, dünyada ilk defa görülen mutasyonlar ile literatüre ve daha sonraki çalışmalara ışık tutması açısından katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: BRCA1-BRCA2 genleri, mutasyon analizi

ABSTRACT

It is known that, BRCA1 and /or BRCA2 genes' mutation carriers have predisposition to breast and ovarian cancers as well as other organ cancers such as prostate, colon, and cervix. In the previous study, which was performed in our department, all coding exons of both genes were screened by DGGE. In addition to various nonsense, missense mutations, polymorphisms, and intronic regions changes, seven novel missense mutations including H513L, H816P, S1517Y in BRCA1 and S326R, G258P, E2903K, N2742S in BRCA2 had been identified. In order to contribute to determine if these unclassified variants are pathogenic, DNA samples of 150 healthy individuals without a known cancer history in the family were screened in this study for these seven novel missense mutations. These DNA samples were recruited from archives of previous polymorphism studies. DNA amplifications were performed by PCR and mutation screenings were done by DHPLC techniques. Peak patterns suggestive of a change in DNA fragment were considered for sequencing analyses. Analyses revealed that none of the 150 DNA samples have any change in the screened seven fragments. As a result, it is assumed that these seven mutations might be novel pathogenic mutations described in Turkish population.

In conclusion, it is crucial that these carriers to be informed about the mutation and provided with appropriate genetic counseling with their physicians and genetic testing should be offered to high risk individuals (men/women) in the family. So that, it would be possible for other family members to have genetic counseling and contribute to disease prevention. On the other hand, these findings would contribute to current literature with the novel findings and shed light on future researches.

Keywords: BRCA1-BRCA2 genes, mutation analyses

TEŞEKKÜR

Teorik ve deneysel konularda yardımlarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. Güven LÜLECI'ye,

Hayatımın her dönemindeki destekçilerim olan, maddi ve manevi her sıkıntıda yardımına yetişen, bugüne gelebilmemde sağladıkları olanak, destek ve sabır, her zaman yanımda hissettiğim sevgi ve güvenleri, gösterdikleri anlayış için, hayatımın bugününü onlara borçlu olduğum sevgili babam ve anneme,

Daima yanımda olduğunu hissettiren ve bundan sonra da yanımda olmasını istediğim sevgi, sabır ve özveri için eşim Murat'a,

Gerçekleştirmiş olduğu operasyonlar sayesinde tekrar yaşama sevinci kazandıran çok değerli hocam Doç. Dr. Taner ÇOLAK'a,

Her zaman gösterdiği ilgisi, desteği, yol göstericiliği için hocam Yrd. Doç. Dr. Esra MANGUOĞLU'na,

Bu tezin gerçekleştirilmesinde ve çalışmalarımı tamamlayabilmem için gerekli olguları sağladığından dolayı hocam Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e,

Bölümdeki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Memenin anatomisi	3
2.2. Ovaryumun anatomisi	5
2.3. Memenin histopatolojik özellikleri	6
2.4. Ovaryumun histolojik yapısı ve histopatolojik özellikleri	7
2.5. Meme ve over kanserlerinin moleküler biyolojik ve genetik özellikleri	9
2.6. Meme ve over kanserlerinde tedavi	22
MATERYAL VE YÖNTEMLER	25
3.1. Stokda bulunan DNA'ların izolasyonu	25
3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar	25
3.1.2. İşlemler	26
3.2. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü	27
3.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi	27
3.3.1. PCR reaksiyon içeriği	28
3.3.2. PCR programı	29
3.4. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi	30
3.4.1. 10X TBE tamponu	30
3.4.2. % 2'lik agaroz jelin hazırlanması	30
3.4.2.1. İşlemler	30
3.5. DHPLC	31
3.5.1 DHPLC için denatürasyon işlemi	31
3.6. DNA dizi analizi ve işlemleri	32

BULGULAR	
4.1. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları	34
TARTIŞMA ve SONUÇLAR	45
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	63

SİMGELER ve KISALTMALAR

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Cdk	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör Proteini
Rb	: Retinoblastom Geni
PAK1	: p21 Aktive Kinaz 1 Geni
NF-κB	: Nüklear Faktör Kappa B
ER	: Östrojen Reseptörü
PR	: Progesteron Reseptörü
HRE	: Hormon Sorumlu Element
MMP	: Matriks Metalloproteazlar
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
BRCA1	: Meme Kanseri 1 Geni
BRCA2	: Meme Kanseri 2 Geni
ATM	: Mutant Ataksi Telenjektazi Geni
CHEK2	: Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Kinaz 2 Geni
DHPLC	: Denatüre Edici Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
ml	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
dH₂O	: Distile su
TBE	: Tris Borat EDTA
U.V.	: Ultra viyole
rpm	: Dakikada dönüş sayısı
O.D.	: Optik Dansite
S.F.	: Sulandırma Faktörü
bç	: Baz çifti
ng	: Nanogram
ü	: Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. Meme dokusunun tabakaları	4
2.2. Memede süt kanalları sistemi	5
2.3. Ovaryumun anatomik yerleşimi	6
2.4. Overin epitelyal kanserlerinin gelişmesinde üç olası yol	9
2.5. Siklinler	11
2.6. G1 ve S evresi siklin molekülleri ile büyüme faktörü	11
2.7. Hücre döngüsünün kontrolünde rol alan enzimler ve proteinler	13
4.1. 1-13 olgularına ait BRCA1 geninin 16.eksonunun amplikonlarının agaroz jel görüntüsü	34
4.2. BRCA1 geninin 11.eksonunun 05 bölgesine ait normal DHPLC grafiği	35
4.3. BRCA1 geninin 11.eksonunun 07 bölgesine ait normal DHPLC grafiği	35
4.4. BRCA1 geninin 16.eksona ait normal DHPLC grafiği	35
4.5. 1-13 olgularına ait BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesinin amplikonlarının agaroz jel görüntüsü	36
4.6. BRCA2 geninin 9.eksonuna ait normal DHPLC grafiği	36
4.7. BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait normal DHPLC grafiği	37
4.8. BRCA2 geninin 18.eksonunun B bölgesine ait normal DHPLC grafiği	37
4.9. BRCA2 geninin 21.eksonuna ait normal DHPLC grafiği	37
4.10. BRCA1geninin 11.eksonunun 05. bölgesine ait DHPLC grafiği	38

4.11.	BRCA1 geninin 16. eksonuna ait DHPLC grafiği	38
4.12.	BRCA1geninin 16. eksonuna ait DHPLC grafiği	38
4.13.	BRCA2 geninin 10. eksonunun A bölgesine ait örneğin DHPLC grafiği	39
4.14.	BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait örneğin DHPLC grafiği	39
4.15.	BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait örneğin DHPLC grafiği	39
4.16.	BRCA2 geninin 9. eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği	39
4.17.	BRCA2 geninin 9. eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği	40
4.18.	BRCA2 geninin 9. eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği	40
4.19.	BRCA2 geninin 21. eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği	40
4.20.	BRCA2 geninin 18.eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği	40
4.21.	BRCA2 geninin 9.eksonuna ait ileri primer dizini	41
4.22.	BRCA2 geninin 9.eksonuna ait geri primer dizini	42
4.23.	BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait ileri primer dizini	43
4.24.	BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait geri primer dizini	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge No</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. WHO' ya göre meme kanserinin histopatolojik sınıflaması	7
2.2. Çeşitli over neoplazımlarının türeyişi ve sıklıkları ile yaş dağılımına ilişkin veriler	8
2.3. Meme kanserinin oluşumuna ve ilerleyişine katılan faktörler ile olası çok aşamalı karsinogenez modeli	16
3.1. Önceki çalışmada bulunan mutasyonların özellikleri	27
3.2. BRCA1 geninin ekzonlarında kullanılan primerler ve dizileri	28
3.3. BRCA2 geninin ekzonlarında kullanılan primerler ve dizileri	28
3.4. PCR içeriği	28
3.5. Ekzonların PCR için Td sıcaklık dereceleri	30
3.6. DHPLC sıcaklık koşulları	31

GİRİŞ VE AMAÇ

Meme hastalıkları ile ilgili ilk yazılı kayıtlara eski mısırdaki rastlanmıştır. Teb şehrinde 1862 yılında Edwin Smith tarafından bulunup okunan bu papiruslar M.Ö. 3000 yıllarına aittir. Kırk sekiz vaka içeren bu papiruslarda apse, travma, infekte yaralar, meme ve diğer tümörler hakkında bilgiler verilmiştir. Hipokratın meme kanserinin cerrahiden yarar görmez tavsiyesi, hekimleri meme kanseri ile uğraşmaktan bir süre alıkoymuştur. İskenderiye okulunun yetiştirdiği en önemli cerrah Leonides (M.S. 100) tarihte ilk defa meme kanserini mastektomi ve aksiller küraj ile tedavi eden hekimdir (1).

Kadınlar arasında kansere bağlı ölüm sebepleri içinde meme kanseri ilk sıralarda yer almaktadır. Genetik ve genetik olmayan faktörlerin etkileşiminin neden olduğu kompleks, multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu nedenle meme kanserleri ile ilgili etyolojik ve prognostik çalışmalar önem kazanmaktadır. Over kanseri ise kadın genital kanserleri içinde önemli bir yer tutmaktadır, çünkü en çok ölüme neden olan kanser over kanseridir. Yine ölüme neden olma açısından genel kanserler içinde meme, bağırsak ve akciğer kanserinden sonra dördüncü sırayı almaktadır. Over kanseri tüm genital kanserlerin %20-25'ini oluşturur.

Genetik yatkınlık meme/over kanseri gelişimi riskini artıran faktörlerden birisidir. BRCA1 ve BRCA2 bu kanserlerin gelişiminde en sıklıkla ailesel yatkınlığı işaret eden genler olarak değerlendirilmektedir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon varlığında meme/over kanseri daha erken dönemde görülmektedir. Bu mutasyonun taşıyıcılarında tüm hayatı boyunca meme kanseri görülme riski %60-85 iken, over kanseri görülme riski %10-40 arasındadır.

Günümüzde meme ve over kanserlerinin gelişimindeki genetik ve epigenetik mekanizmalarla ilgili hala belirsizlikler bulunmakta, hangi mutasyonların kanserin ilk basamaklarını oluşturduğu konusunda oldukça yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Ayrıca ülkemizde, ilk çağlardan itibaren birçok medeniyetlerin yer alması nedeni ile genetik olarak popülasyon çeşitliliği bulunmaktadır. Bunun içindir ki, ülkemizde meme ve/veya over kanserli hastalarda yapılan BRCA1 ve BRCA2 genlerine ait mutasyon araştırmalarında, Türk toplumuna özgü sayılabilecek kurucu bir mutasyon bildirilmemiştir.

Bizde bu çalışmamızda, önceki araştırmada ilk defa tanımlanan 7 farklı değişimin polimorfizm mi veya işleve yönelik mutasyon mu olup olmadığını, ailesinde herhangi bir kanser öyküsü bulunmayan 150 sağlıklı bireyde araştırmayı amaçladık. Yapılan analizler sonucu bu 7 değişimin 150 kontrol bireyde bulunup bulunmadığına göre, bu mutasyonların Türk toplumunda ve dünyada meme ve/veya over kanserleri için yeni hastalık yapıcı mutasyonlar olup olmadığı saptanabilecektir.

GENEL BİLGİLER

Kanser, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki patolojilerden kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır (2). Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalar hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden genlerdeki mutasyonların kanserden sorumlu olduğunu göstermiştir. Kanserdeki mutasyonları diğer mutasyonlardan farklı yapan, mutasyonların güçlü bir şekilde hücresel proliferasyona ve uzun bir hücresel yaşam için pozitif bir seleksiyona yol açmasıdır. Hücre proliferasyonunu artıran mutasyonlar olduğu gibi, tüm genomun kararlılığını etkileyerek DNA ya da kromozom düzeyinde mutasyon oranını artıranlar da vardır. Bu yüzden kanserin gelişmesi birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malign şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir (2,3).

WHO ve IARC'ın (International Agency for Research on Cancer) ortak raporuna göre her yıl dünyada 1.000.000 kadında meme kanseri gelişmekte ve 370.000 kadın ise bu hastalıktan ölmektedir. Sadece Avrupa'da her yıl 340.000 yeni meme kanseri olgusu gözlenmektedir. ABD'de ise yılda 184.000 yeni meme kanseri gözlenmekte olup, akciğer kanserinden sonra tüm kanser ölümleri arasında %18 sıklıkla ikinci ölüm nedeni olarak bildirilmektedir. Dünyada meme kanseri görülme sıklığı yıllık ortalama %0,5 oranında artmaktadır. Ancak, görülme sıklığındaki bu artışa karşın, gelişmiş batı ülkelerinde mortalite oranında az da olsa gerileme gözlenmektedir (3).

Dünyada yapılan epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına göre, kanser türlerindeki farklılıkların toplumlara göre değiştiği gösterilmiştir. Örneğin, Japonya'da mide kanseri Amerika Birleşik Devletleri'ndekine göre 7-8 kat fazla, Belçika'da akciğer kanseri Japonya'dakine göre 3 kat, malign melanoma Yeni Zelanda'lı beyazlarda İzlanda'lılardan 6 kat daha sık görülmektedir (4).

Türkiye'de meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve 1980-1995 yılları arasında görülme oranı %11,5'den %14,9'a yükselmiştir ve tüm kanser türlerinin yaklaşık ¼'ünü oluşturmaktadır (5). Sağlık Bakanlığı 1999 yılı istatistiklerine göre tüm kanser türleri içinde meme kanserinin görülme oranı %24,1 dir. Meme kanserinden ölüm oranı kadınlarda %5,94'tür ve meme kanseri en fazla 55-64 yaşlar arasında ölüme neden olmaktadır (6). Diğer taraftan meme kanseri sadece kadınlara özel bir hastalık değildir. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %1'i erkeklerde görülmektedir. Meme kanseri erkeklerde görülen tüm kanser çeşitlerinin %0,2'sinden ve ölümlerin ise %0,14'ünden sorumludur. Türkiye'de en sık görülen 5 ölüm sebebinin 1965'ten başlayarak yıllar içindeki seyri incelendiğinde kanserin, 1990'a kadar kalp ve damar sistemi hastalıkları ve enfeksiyon hastalıklarından sonra en sık görülen 3. ölüm sebebi iken 1990 yılından itibaren kontrol altına alınan

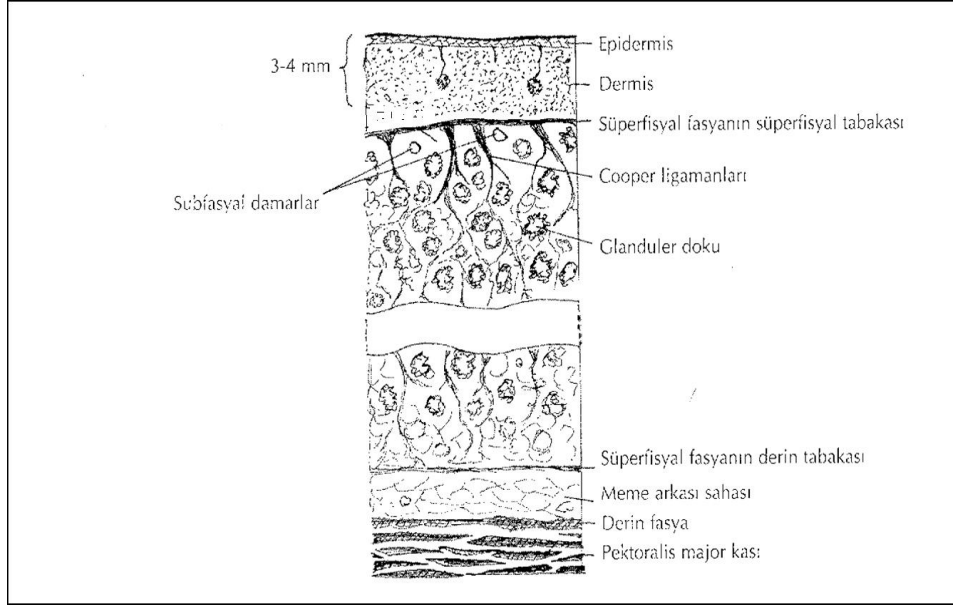
enfeksiyon hastalıkları nedeni ile en sık görülen 2. ölüm nedeni haline geldiği görülmektedir (6-10).

Over kanseri kadın genital kanserleri içinde önemli bir yer tutar, çünkü en çok ölüme neden olan kanser over kanseridir. Yine ölüme neden olma açısından genel kanserler içinde de meme, bağırsak ve akciğer kanserinden sonra dördüncü sırayı alır. Over kanseri tüm genital kanserlerin %20-25'ini oluşturur. Tüm kadınların %1-2'sinin hayatının bir döneminde over kanserine yakalanacağı hesaplanmıştır (11).

Genetik yatkınlık meme ve/veya over kanseri gelişimi riskini artıran faktörlerden birisidir. BRCA1 ve BRCA2 bu kanserlerin gelişiminde en sıklıkla ailesel yatkınlığı işaret eden genler olarak değerlendirilmektedir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon varlığında meme ve/veya over kanseri daha erken dönemde görülmektedir. Bu mutasyonun taşıyıcılarında tüm hayatı boyunca meme kanseri görülme riski %60-85 iken, over kanseri görülme riski %10-40 arasındadır (12).

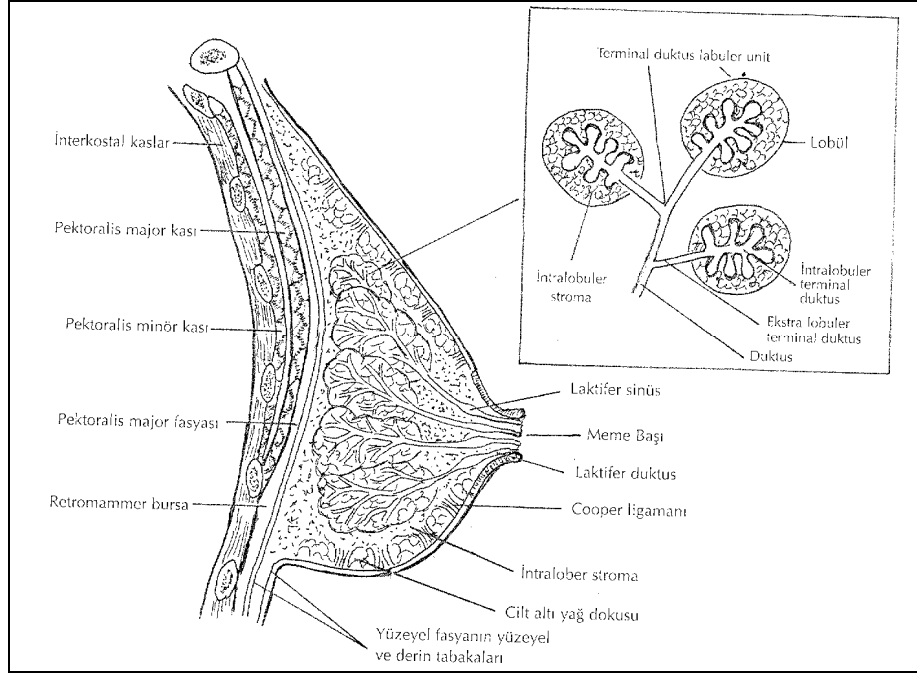
2.1. Memenin Anatomisi

Erişkin bir kadında meme glandı, genellikle ön göğüs duvarının yüzeysel pektoral fasyasının yüzeysel ve derin tabakaları arasında bulunur. Memeler 2. ile 7. kaburgalar arasında yer alırlar. Memenin üst-dış kadranı diğer kadrana nazaran çok daha fazla glandüler elaman içerdiği için bu kadranda selim ve habis meme tümörleri daha sık görülür. Meme dokusunun koltuk altına doğru bir uzantısı vardır. Buna "Spence'nin aksiller kuyruğu" denilir. Bu yapı derin fasyayı Langer deliği olarak adlandırılan bir aralıktan geçerek aksillaya kadar uzanır. Memenin yukarı aşağı çapı ortalama 10-12 cm ve santral bölgede maksimum kalınlığı 5-7 cm. dir. Memenin çapları ve sınırları kadından kadına değişebileceği gibi aynı kadında da gebelik, emzirme, şişmanlama, zayıflama ve yaşlılık nedeniyle farklılık gösterebilir. Meme başlarında gelişmiş cilt papillaları ve yağ bezleri vardır. Kıl folikülü bulunmaz. Areolada ise kıl folikülleri, yağ bezleri ve aksesuar areolar bezler bulunur. Bu bezler areolada küçük kabartılar halinde görülürler (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Meme dokusunun tabakaları (13).

Memede meme dokusundan çevreye doğru uzanan diş gibi fibröz çıkıntılar mevcuttur. İlk defa Sir Astley Cooper tarafından tarif edildiği için bu fasyal septalar Cooper ligamanları olarak isimlendirilmişlerdir. Bu ligamanlar yüzeyde yüzeysel fasyanın yüzeysel tabakası ve derinde de yüzeysel fasyanın derin tabakasına ve pektoral fasyasına yapışıktır. Meme kanserinde hastalık ilerledikçe bu fibröz ligamanlarda kısalma ve anormal bir çekilme ortaya çıkar. Bu durum özellikle meme kanserinin önemli bulgularından biridir. Gelişmiş meme; asinüsler, duktuslar ve stromal elamanlardan oluşmuştur. Asinüsler memenin salgı yapan birimidir. İçleri küboid veya silindirik epitel ile döşelidir. Dışı ise bağ dokusu, kan ve lenf damarları ile sarılıdır. Asinüsler bir araya gelerek lobülüsleri, lobülüslerde lobları oluşturur. Epitelyal parankim ise her biri ayrı bir salgı kanalı ile meme başına açılan 15-20 lobdan oluşur. Her lobda 20-40 kadar lobül içerir. Yani her duktus bir meme lobunu ve 20-40 kadar lobülü drene eder. Her bir lobülde toplayıcı duktus çevresinde gruplaşmış sayıları 10 ile 100 arasında değişen asinüsler bulunur. Lobüller meme glandının esas yapısal birimini oluştururlar. Genç kadınlarda sayıları fazla ve büyük görünümündedirler. Menapozdan sonra ise lobüllerin sayısı azalır ve her biri yalnızca birkaç asini içeren küçük üniteler şekline dönüşürler. Memede süt kanalları sistemi asinüslerin birleşerek terminal duktus adı verilen bir kanala açılmasıyla başlar (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Memede süt kanalları sistemi (13).

Terminal duktusun biri lobül içinde (intralobüler segment) ve diğeri lobül dışında (ekstralobüler segment) olmak üzere iki bölümü vardır. Birkaç lobülün terminal duktuslarının birleşmesi ile laktifer duktus oluşur. Bu duktuslar birbirlerine yaklaşarak meme başına doğru ilerler ve meme başının altında laktifer sinüs olarak isimlendirilen bir genişleme gösterirler. Bu laktifer sinüsler ampulla adı verilen çok katlı yassı epitel ile örtülü son kısım ile meme başından dışarı açılırlar. Aktif olmayan bir memede ampulla dökülmüş epitelyum hücrelerinin artıklarıyla doludur ve bunlar duktus ağzlarını bir tıkaç gibi kapatırlar. Her bir lobu drene eden laktifer duktusların çapı 2-4 mm. ve sub areolar bölgedeki laktifer sinüslerin çapı da 5-8 mm. dir (13).

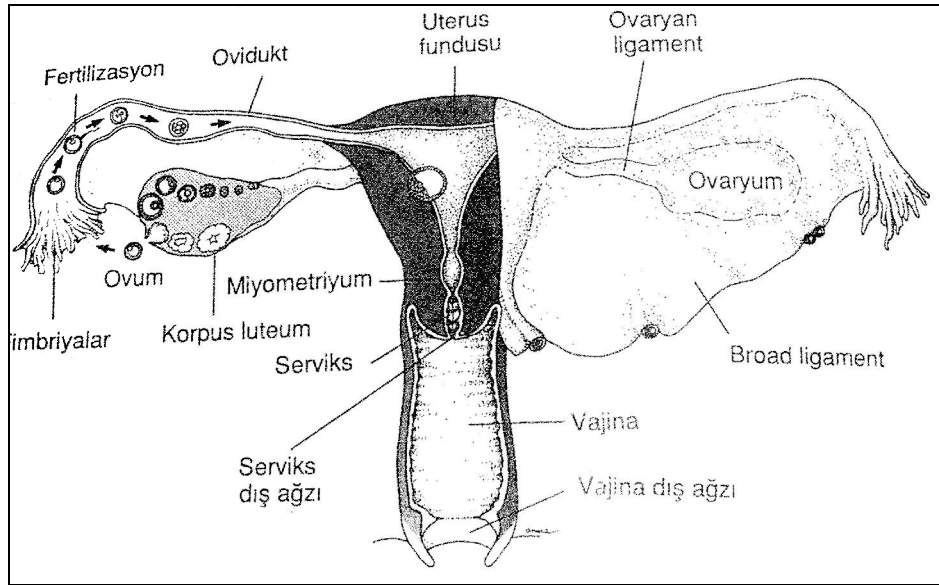
2.2. Ovaryumun Anatomisi

Her bir ovaryum 4x2 cm. boyutlarında, badem biçiminde olup, ligamentum latumun arka yaprağına mesoovaryum vasıtasıyla tutunur. Genellikle uzun eksenini vertikaldir, fakat uterus ve ligamentum latum uterusun hareketlerine uyar ve yer değiştirebilir.

Ovaryum genellikle yanbaşındaki pelvis lateral duvarında fossa ovarica olarak bilinen ufak çukurda yer alır. Bu çukuru üstten dış kalça damarları, arkadan da üreter ve iç kalça damarları sınırlar (Şekil 2.3.). Obturator sinir ise çukurun dibini çaprazlayarak seyreder. Bununla birlikte ovaryumun pozisyonu son derece değişkendir ve çoğunlukla arkadaki douglas çukuruna doğru sarkmış durumdadır. Gebelik süresince büyüyen uterus, ovaryumları yukarıya karın boşluğuna doğru iter. Doğumdan sonra gevşemiş olan ligamentum latum uteri, ovaryumun pelvis içinde çok değişik konumlarda bulunmasına imkan verir.

Tunica albuginea ovaryumları saran ince fibröz bir kapsüldür. Bu kapsül dışarıdan epitelyum germinatum denilen tek katlı kübik epitelle örtülmüştür. Epitelyum germinatum sadece peritonun değişikliğe uğramış bir alanıdır ve mesoovaryuma tutunma kenarı olan hilum ovaride genel peritona özgü yassı mezotele dönüşür (14).

Puberteden önce ovaryum yüzeyi düzdür, fakat puberteden sonra gerçekleşen corpus luteum dejenerasyonları ile hızla pürüklü bir hale gelir. Menopozdan sonra ise ovaryum küçülür ve yüzeyi skar dokusunun neden olduğu küçük çukurcuklarla dolar. Ovaryumlar yetişkin ve seksüel açıdan olgunlaşmış kadında, kadın germ hücresi olan ovumun, kadın cinsiyet hormonları olan östrojen ve progesteronun üretilmesinden sorumlu organlardır (15).



Şekil 2.3. Ovaryumun anatomik yerleşimi (15).

2.3. Memenin Histopatolojik Özellikleri

Meme kanserlerinin histopatolojisine bakıldığında; %90'ının duktus epitelinden, %10'unun lobül epitelinden köken aldığı görülmektedir. Meme kanserlerinin mamografik görüntüsü düzensiz ve belirsiz sınırlı bir kitledir. Adenokarsinomlar malign meme tümörlerinin önemli bölümünü oluşturur. Bunlar memenin terminal duktal lobuler ünitesinden köken alır. Meme kanserleri histolojik olarak in situ ve invaziv kanserler olmak üzere iki ana gruba ayrılır (16). İn situ kanserde malign epitelyal hücreler bazal membranla çevrili duktus ve asinuslar içinde sınırlı iken invaziv kanserde neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedir. Bu nedenle invaziv kanserler, lenfatik ve kan damarlarını invaze ederek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme yeteneğine sahiptirler. İnvaziv meme kanserleri morfolojik olarak birbirinden farklı fenotipik özellikler gösterebilen tümörlerdir. Bunların bazılarının klinik ve prognostik açıdan

karakteristik özellikleri vardır (17). İnvaziv meme kanserlerinin en sık görülen tipi invaziv duktal karsinomdur. %70-80 oranında görülmektedir.

Histopatolojik sınıflamada, tümör hücrelerinin sitolojik özelliklerinin yanında, oluşturdıkları yapısal oluşumlar da göz önüne alınmaktadır. İn situ komponentte değişik oranlarda invaziv karsinoma eşlik edebilir. Bu iki komponentin morfolojik özellikleri her zaman birbiri ile paralellik göstermeyeceği için invaziv komponentin tip tayini in situ komponentten bağımsız olarak yapılmalıdır. Meme kanserlerinin evrelendirilmesi, tümör büyüklüğü, bölgesel ya da uzak yayılım ve nodüler yayılım özelliklerine göre yapılır. Günümüzde evrelendirmede genellikle kullanılan TNM (Tümör-nodül-metastaz) sistemi UICC (Union International Cancer Center) ve AJCC (American Joint Committee on Cancer) tarafından biçimlendirilmiştir. Meme kanserlerinin histolojik sınıflandırılmasında en çok Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen sınıflama kullanılmaktadır (Çizelge 2.1.) (18).

Çizelge 2.1. WHO' ya göre meme kanserinin histopatolojik sınıflaması (18).

1.In situ karsinom
-In situ duktal karsinom -In situ lobuler karsinom
2.Invaziv karsinom
-Invaziv duktal karsinom -Invaziv lobuler karsinom -Tubuler karsinom -Invaziv kribriform karsinom -Meduller karsinom -Müsinöz karsinom -Invaziv papiller karsinom -Invaziv mikropapiller karsinom -Apokrin karsinom -Sekretuar (juvenil) karsinom -Adenoid kistik karsinom -Metaplastik karsinom -Nöroendokrin karsinom -Inflamatuar karsinom

2.4. Ovaryumun Histolojik Yapısı ve Histopatolojik Özellikleri

Ovaryum, gevşek bağ dokusu içinde damarlardan zengin bir yapı gösteren bir medullar bölge ile oosit içeren ovaryum folliküllerinin bol miktarda bulunduğu bir kortikal bölgeden meydana gelir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır görülmez. Embriyonik hayatın birinci ayından sonra, primordiyal germ hücreleri (oogonyumlar) vitellüs kesesi endodermi içinde ortaya çıkarlar. Bu hücreler genital kabartı bölgesine göç ederken birkaç defa mitoz bölünme geçirirler. Oogonyumlar oluşacak ovaryum korteksi içinde toplanırlar. Mitoz bölünmeler fetal hayatın beşinci ayına kadar devam eder. Bu zamanda her bir ovaryum 3 milyon üzerinde oogonyum içerir. Fetal hayatın üçüncü ayından itibaren bazı oogonyumlar birinci mayoz bölünmenin profazına girerler ve primer oositler haline dönüşürler.

İnsan fetusunda bu işlem gebelik sürecinin yedinci ayının sonuna kadar tamamlanır. Bu dönem içinde bir çok primer oosit atrezi denilen bir dejeneratif süreç sonucunda ortadan kaybolur. Korteks bölgesinin stroması karakteristik iğsi şekilli fibroblastlardan meydana gelir. Bu hücreler hormonal uyarılara karşı diğer organlardaki fibroblastlardan farklı bir yanıt oluştururlar.

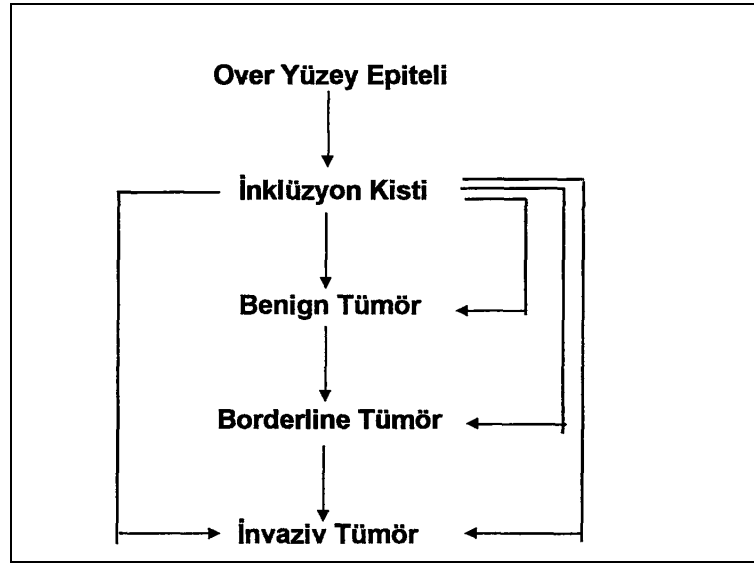
Ovaryum folikülleri korteksin stroması içinde yer alır. Bir folikül bir ya da daha fazla tabaka oluşturmuş folikül hücreleri ile çevrili bir oositten meydana gelir. Foliküler gelişimin birkaç safhası vardır. Erişkin normal bir genç kadının iki ovaryumundaki toplam folikül sayısı tahminen 400.000 kadardır. Menapozdan sonra foliküllerin sadece küçük bir kısmı kalır. Her menstrüel siklusta ovaryumlar tarafından genellikle sadece bir ovum serbest bırakılır. Bir kadının doğurganlık süreci ortalama 30-40 yıl kadar devam eder, bu süre içerisinde sadece 40 kadar yumurta hücresi serbest bırakılır. Geri kalan foliküllerin tümü oositleri ile birlikte olgunlaşmadan atreziye uğrar ve dejenere olur (19).

Over kanseri her yaşta görülebilmektedir. Ortalama görülme yaşı ise 55'dir. Hastalık 30 yaşından önce seyrek görülürken, yaşla birlikte artan bir risk söz konusudur. Hastalık en sık 75-79 yaşlarında görülmektedir. Genel anlamda over kanserlerinin % 90'ının epitel over kanseri olduğu düşünüldüğünde yaş aralığını büyük oranda epitelyal over kanserinin etkileyebileceği yorumu yapılabilmektedir. Over tümörleri şaşırtıcı derecede farklı patolojik özelliklere sahiptir. Bu farklılık normal overi oluşturan üç hücre tipine bağlanabilir: multi potansiyel yüzey örtücü epiteli, totipotansiyel germ hücreleri ve multipotansiyel seks kord stromal hücreleri. Yüzey epitelyum kökenli tümörler, tüm birincil over tümörlerinin büyük bir bölümünü ve malign tiplerin ise, hemen hemen %90'ını oluşturmaktadır. Germ hücreli ve seks kord stromal tümörleri daha az sıklıkta görülür ve tüm over tümörlerinin %15-20'sini, malign olanların ise %10'undan azını oluştururlar. Çeşitli over neoplazmlarının türeyişi ve sıklıkları ile yaş dağılımına ilişkin veriler Çizelge 2.2. de verilmiştir (20).

Çizelge 2.2. Çeşitli over neoplazmlarının türeyişi ve sıklıkları ile yaş dağılımına ilişkin veriler (20).

KÖKEN	YÜZEY EPİTEL HÜCRELERİ	GERM HÜCRE	SEKS KORD STROMA	OVERLERE METASTAZ
Overyal sıklık	%65-%70	%15-%20	%5-%10	%5
Habis over tümörlerinin bir kısmı	%90	%3-%5	%2-%3	%5
Etkilenen yaş grubu	20 yaş üzeri	0-25 yaş üzeri	Tüm yaşlar	Değişken
Tipler	<ul style="list-style-type: none"> • Seroz tümör • Müsinöz tümör • Endometrioid tümör • Berrak hücreli tümör • Brenner tümör • Kistadenofibroma 	<ul style="list-style-type: none"> • Teratom • Disgerminom • Endodermal sinüs tümör • Koryokarsinoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrom • Granüloza -teka hücreli tümör • Sertoli-leyding hücreli tümör 	

Overin epitelyal karsinomlarının, yüzey epitelinin neoplastik transformasyonu ile geliştiği ileri sürülmektedir. Histogenezin tam mekanizması bilinmemekle birlikte, devamlı ovulasyon sonucu germinal epitelin stroma içine gömülmesi ile epitelyal inklüzyon kistlerinin oluştuğu hipotezi ileri sürülmektedir. Ortaya çıkan onkojenik uyarıların etkisi ile bu epitelin malign transformasyon geçirdiği düşünülmektedir. Ancak normal epitelin doğrudan invaziv kansere mi dönüştüğü, yoksa benign ve/veya borderline neoplaziler gibi ara basamaklardan mı geçtiği bilinmemektedir. (Şekil 2.4.) (21).



Şekil 2.4. Overin epitelyal kanserlerinin gelişmesinde üç olası yol (21).

Yapılan çalışmalarda karşı overinde epitelyal tümör bulunan hastaların, diğer overlerinin yüzey epitellerinde ve inklüzyon kistlerinde %92 oranında hiperplastik ve metaplastik değişiklikler saptanmış ve bu değişikliklerin genellikle bilateral olan over kanserinin gelişiminde potansiyel rolleri olabileceği ileri sürülmüştür. Histolojik olarak yüzey epiteli ve inklüzyon kistlerindeki bu değişimlerin benign kistadenomlara benzerlik gösterdiği düşünülmektedir (22-23)

Over kanseri için tanımlanan bir kaç risk faktörü vardır. Bunlar içinde en önemlilerinden ikisi doğum yapmamış olma ve ailesel öyküdür. Evlenmemiş kadınlar ile az doğum yapmış kadınlarda yüksek bir karsinom insidansı söz konusudur. İlginç olan taraf, oral kontraseptiflerin uzun süre kullanımı riski bir dereceye kadar düşürmektedir (24).

2.5. Meme ve Over Kanserlerinin Moleküler Biyolojik ve Genetik Özellikleri

Kadınlarda, kansere bağlı ölüm sebepleri içinde meme kanseri ilk sıralarda yer alır. Bu nedenle meme kanserleri ile ilgili etyolojik ve prognostik çalışmalar önem taşımaktadır. Prognoz, tedavi sonrası tekrarlama zamanına kadar geçen hastalısız süre, hastalısız ve hastalıklı toplam sağkalım süresi ile değerlendirilmektedir.

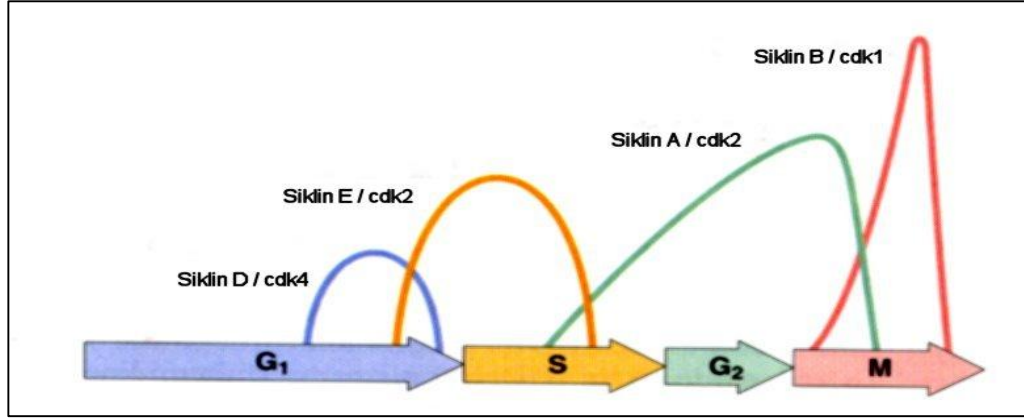
Prognozu belirleyen pek çok neden vardır. Bunların içinde en önemli olanlardan biri, hastalığa yakalandığı dönemdeki evre, yani vücuttaki yayılma derecesidir. Diğer prognostik faktörler ise, tümörün kendi özellikleridir (25).

Meme kanserlerinin yaklaşık %40'ında primer tümör çıkarıldıktan yaklaşık 10 yıl sonra hastalığın tekrar etmesi kök hücrelerin varlığını göstermektedir. İnsan meme hücrelerinin yenilenmesi ve farklılaşmasında kullanılan sinyal mekanizmaları hakkında bilinenler azdır. Meme epitel kök hücrelerinin üç farklı popülasyondan oluştuğu bilinmektedir. 1) Bütün epitel hücrelerini oluşturma kapasitesine sahip olan kök hücreler; 2) Salgılama lobüllerini oluşturan hücreler grubu; 3) Dallanan duktuslara dönüşebilen öncül hücre grubudur. Meme epitel kök hücreleri altı bölünmeden sonra hücresel yaşlanma geçirirler. Duktus ya da lobül oluşturma, duktal gelişimde artış, duktal lateral boşluklarda artış gibi kararlar kök hücre otonom mekanizmaları tarafından alınır. Premalignant hiperplastik alveolar nodüller ve meme tümörleri tek bir klonojenik öncül hücreden köken alırlar (26). Meme kök hücresinde mutasyon olduğunda, bu mutasyonu bütün oğul hücrelerine geçirebilir ve bu da normal ve mutant hücrelerden oluşan kimerik duktal ağlarla sonuçlanmaktadır (27). Memelilerde meme gelişimi gebeliğin sonuna, hatta süttten kesilmeye kadar devam ettiği için, memenin gelişimi için meme dokusuna özgül kök hücrelerine gereksinim kaçınılmazdır (28).

Hem normal hücre döngüsü hemde kanser oluşum basamaklarında önemli olan üç sistem vardır.

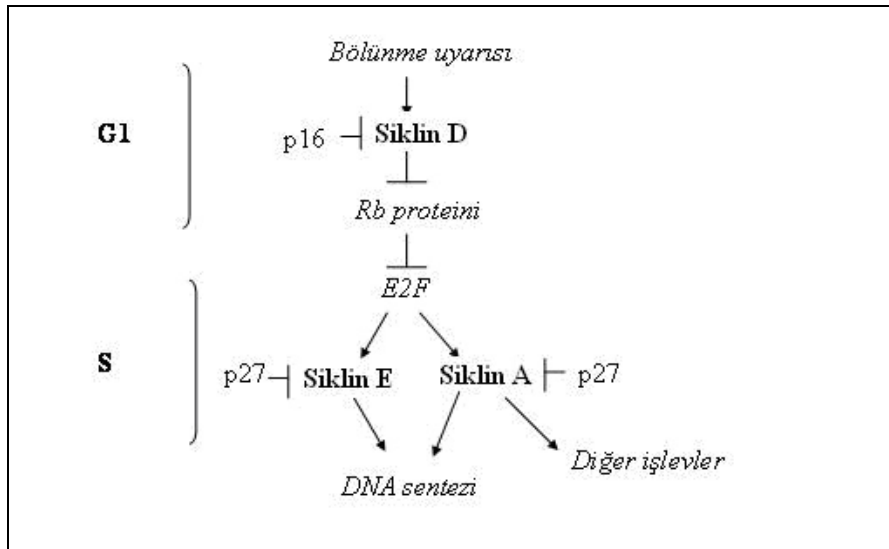
1. Hücre yüzey reseptörleri
2. Sinyal iletim sistemi
3. Transkripsiyon faktörleri

Büyüme faktörleri reseptörlerine bağlanır ve onları aktive eder, uyarı iletiminde görevli proteinler fosforile olur, kinazlar serisi aracılığı ile sinyal çekirdeğe iletilir, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu DNA sentezi başlar ve hücre S fazına girer. Hücrenin döngüye girmesi ve ilerlemesi siklinlere bağlıdır (29). Hücre döngüsünde siklinler tarafından aktive olan siklin bağımlı kinazlar (Cdk) fosforilasyonla hücre döngüsünün ilerlemesini sağlarken, Cdk-inhibitör proteinleri (CDKI) tarafından regüle edilirler. Siklinler etkilerini siklin bağımlı kinazlarla kompleks yaparak gerçekleştirir. Döngünün her fazında farklı siklinler etkilidir (Şekil 2.5.) (30).



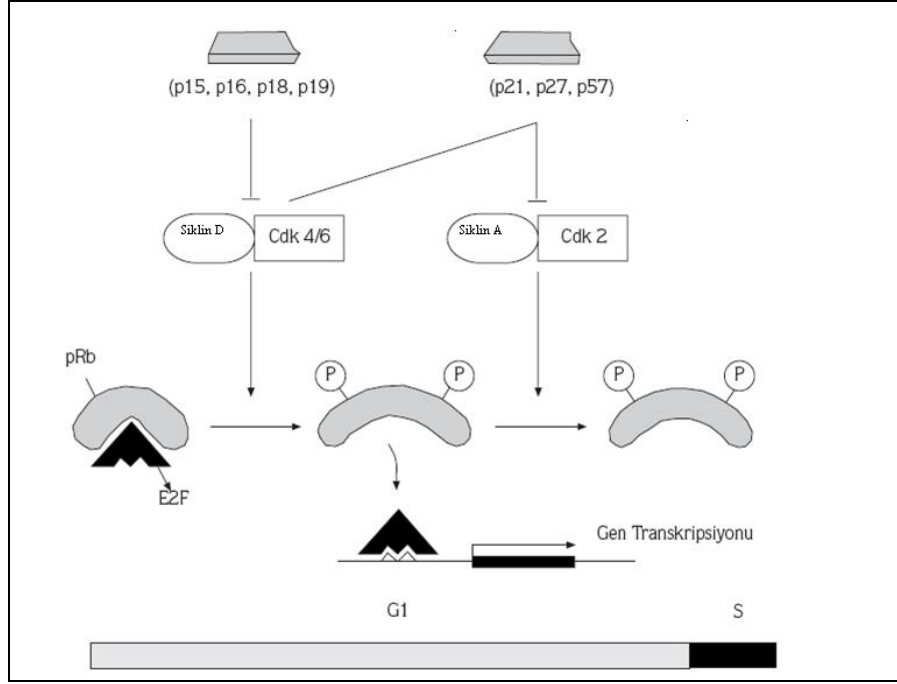
Şekil 2.5. Siklinler. Hücre döngüsünde sırasıyla D, E, A, B ortaya çıkar (30).

Hücre siklusunda G₁'den S fazına geçişte hücreye çoğalması için veya durması için uyarı gider. Bunun kontrolünü sağlayan ise tümör baskılayıcı bir gen olan Retinoblastom (Rb) genidir. G₁ ilerleme gösterirse siklin D grubu birikir. Bunlar siklin bağımlı kinazları (CDK) aktive eder. Oluşan Siklin/CDK kompleksi Rb geninin fosforile olmasını sağlar. Rb geninin aktif hali az fosfor taşıyan yapıdadır ve E2F ailesi transkripsiyon faktörlerini baskılayarak hücre bölünmesini engellemektedir. Siklin ve CDK komplekslerinden fosfor alarak hiperfosforile olan Rb geni inaktive olduğunda E2F proteinlerini serbest bırakarak hücrenin S fazına girişi için gerekli genlerin transkripsiyonunu sağlar. Böylece hücre S fazına girer ve DNA sentezi gerçekleşir. Hücre bir kez S fazına girerse büyüme faktör stimülasyonu olmasa da bölünmeye devam eder (Şekil 2.6.). M fazında ise Rb molekülünden fosfor ayrılır. Kalıtsal Rb gen delesyonlarında erken yaşta, bilateral ve multipl retinoblastomlar, daha az sayıda da osteosarkomlar oluşmaktadır. Somatik Rb mutasyonları ise, meme, mesane kanserleri, glioblastom ve akciğerin küçük hücreli kanserlerinde bildirilmiştir (31).



Şekil 2.6. G₁ ve S evresi siklin molekülleri ile büyüme faktörü (bölünme uyarısı) ve döngü engelleyicileri arasındaki ilişkiler (31).

Siklin/CDK kompleksinin etkileri CDK inhibitörleri ile ortadan kaldırılır. Bunlar p21, p27, p16, p57, p15, p18, p19'dur (Şekil 2.7.). Siklusta bu inhibitörlerle siklusun normal dengesi sağlanmaya çalışılır. Uyarı çoğalma yönünde ise siklinler aktive olur. Durma yönünde ise inhibitörler aktive olur. Siklin aktivasyonunu bozan mutasyonlar hücre çoğalmasına uygun zemin hazırlar. Hücre siklus regülatör proteini Siklin D, meme, özofagus, karaciğer kanseri gibi, hastalıklarda aşırı salgınır. Siklin D1'in mutasyonu fosforilasyonu hızlandırdığından meme karsinogenezinde rol oynar. Diğer bir ilginç sonuç ise ER-alfa'ya direk bağlanarak anti-östrojen duyarlılığını azaltması ile ilgili çalışmalarda da elde edilmiştir (32). Deneysel çalışmalar siklin D1'in ER-alfa'nın transkripsiyonel hedefi olduğu yönündedir. p21, GTPaz aktivatörü olup hücre morfogenezi, hücre motilitesi, hücre canlılığı, anjiogenez ve mitoz gibi pek çok hücre fonksiyonunda görev alır. Hücre motilitesine ek olarak p21'in artmış aktivitesi meme kanseri hücrelerinin invazivliği ile koreledir. Bazı çalışmalarda p21 aktivasyonunun meme kanserlerinde siklin D1 ekspresyonu ile korelasyonu da bildirilmiştir. P21 aktive kinaz 1 (PAK 1) geni de 11q13 gen bölgesinde yer alan son zamanlarda tanımlanmış onkogenlerdendir. PAK 1, serin/treonin protein kinaz pak ailesinden olup normal veya trasforme meme epitelinde hücre devamlılığı, göçü ve invazyonunda görev yapmaktadır (33). PAK 1 seviyesi meme kanserinde yükselir ve artmış siklin D1 ekspresyonuna eşlik eder. Serin/treonin kinaz üyelerinden p21 aktif kinazların hücrede temel fonksiyonları vardır, örneğin hücre motilitesi, gen ekspresyonu, apoptoz, anjiogenez, mitozu aktif hale getiren kinaz protein, kinaz sinyalizasyonunda rol alırlar. PAK1, pak ailesinin ilk üyesi olup pek çok büyüme faktörü, tirozin kinaz, G protein ve östrojen tarafından aktive edilir. PAK 1 yolağı büyüme faktörlerinin hücre yüzeyinde reseptörlerini aktive etmesiyle başlar ve meme kanserinde Siklin D1'i NF-kB bağımlı yolu ile aktive edilebilir (34).



Şekil 2.7. Hücre döngüsünün kontrolünde rol alan enzimler ve proteinler. Protein kinaz enzimi herhangi bir “siklin” ve “siklin bağımlı kinaz” (cdk) kompleksinden (siklin A-cdk2) oluşur. Her bir “siklin-cdk” kompleksi, Rb proteininin (pRb) fosforilasyonuna yol açarak, transkripsiyon faktörü E2F’i pRb’den ayrılmasını sağlar. E2F, S fazına geçiş için gerekli genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Bazı proteinler (p15, p16, p18, p19, p21, p27, p57) siklin-cdk kompleksi üzerinde inhibitör etkisi gösterirler (32).

Kontrol noktalarının aktivasyonu hücre siklusunu durdurarak tamir için zaman tanır. İlk kontrol noktası S fazına girmeden öncedir. p53 geni DNA hasarında aktive olan ve siklusun inhibisyonunu sağlayarak hücreyi korumaya çalışan en önemli tümör baskılayıcı genidir. İkinci kontrol noktası ise M fazına girmeden öncedir. Bu iki kontrol noktasında hücre bölünmeden önce tamir ya da apoptoz için yönlendirilir (35).

Meme kanserleri gerek biyolojik gerekse klinik açıdan farklı özellikler göstermektedir. Meme kanserinde oluşan kontrolsüz hücre çoğalması birçok değişiklik göstermektedir. Bu yüzden meme kanseri gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların ve her hastanın tümör özelliklerinin belirlenmesi ve böylece en uygun tedaviyi belirlemek açısından oldukça önemlidir. Meme kanserinde hormonal kontrolün (Östrojen reseptörü; ER, Progesteron reseptörü; PR, östrojene bağlı diğer proteinler), metastaz ve farklılaşmada rol oynayan faktörlerin (E-kadherin, plasminojen aktivatörleri, matriks metalloproteinazlar, integrinler), nükleer onkogenlerin, büyüme faktörlerinin (Epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörleri), büyüme faktörü reseptörlerinin, tümör baskılayıcı genlerin, telomerazların da önemi büyüktür.

Hormonal kontrol açısından bakılacak olursa; Steroid hormonları, Hormon Responsive Element (HRE) olarak bilinen DNA dizilerine bağlanarak ilgili genin

transkripsiyonunu başlatırlar. Steroid etkiye duyarlı genlerin transkripsiyonu hormonun reseptörüne bağlanması ile uyarıldığı için “indüklenebilir enhancer” olarak davranırlar. Steroid hormonlar, transkripsiyonun düzenlemesi yanında transkripsiyon sonrasında mRNA stabilitesinin ve mRNA’ nın proteine dönüşme hızının düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar. Memede endokrin etkenlerin önemi büyüktür. Östrojen (E) ve progesteron (P) tümör oluşumunu ve gelişimini uymaktadır. Meme tümörlerinin % 60-70’i ER (+) olduğu halde ancak bunların yarısı hormonal girişimlere cevap verir. Buna karşılık ER (-) hastaların da bir bölümü hormon tedavisinden yararlanırlar. Bunun nedeni bilinmediği gibi normal ve malign hücrelerdeki reseptörlerin yapısı ve işlevsel açıdan aynı özellikleri taşıyıp taşımadığı da henüz bilinmemektedir. Endokrin tedaviye cevap açısından önemli rol oynayan PR ekspresyonu, E-ER etkileşimi ile düzenlenmektedir. Normal insan meme epitelinde PR’nin ER’ye bağımlı olup olmadığı ve luminal hücrelerde bu iki reseptörün birlikte bulunup bulunmadığı yine bilinmemektedir (36,37).

Meme kanserinin gelişiminde birbirinden ayrı, iki değişik eylem birlikte görülmektedir. Bu işlemlerden biri; farklılaşmanın kaybı, diğeri ise kompartmanlaşmanın yitirilmesidir. Hücreler arası tutunmanın ortadan kalkması ve hücre iskeletinde organizasyonun bozulması farklılaşma özelliklerinin giderek ortadan kalkmasına neden olur. Adezyon molekülleri arasında hücrelerarası haberleşmeyi başlatan ve sürdüren E-Kaderin molekülleri motiliteyi sınırlayarak meme epitelinin farklılaşmasını sağlar (38). E-Kaderin geni 16 nolu kromozomun 16q21 bölgesinde yer alır. Bu bölgede gözlenen delesyonların daha çok metastazla ilgili olduğu bildirilmiştir (39). E-Kaderin molekülleri membran dışında, hücrelerarası temas noktalarında yer alır. Gen üzerinde gerçekleşen mutasyonlar sentezi tamamlanmamış, eksik moleküllerin ortaya çıkmasına neden olduğundan hücre-hücre etkileşiminin en önemli bileşenlerinden biri eksilir. Lobüler kanserlerde görülen invaziv çoğalma özelliklerinin bu işlev kaybıyla uyumlu olduğu gözlenmiştir (40). Meme kanserinde plasminojen aktivatörlerinin de prognostik birer belirteç olarak kullanılabilmesi ileri sürülmüştür. Plasminojen aktivatörlerinin başlıca uPA (ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü) ve tPA (tümör doku plazminojen aktivatörü) olmak üzere iki türü vardır. uPA hücre yüzeyindeki reseptörüne (uPAR) bağlanır. Bu sinyal yolunun aktivitesi iki inhibitör molekül (PAI-1 ve PAI-2) tarafından denetlenir. Yüksek uPA ve PAI-1 düzeyleri sergileyen karsinomlarda tekrarlama olasılığının yüksek olduğu görülmüştür (41).

Metastaz ve farklılaşmada rol oynayan moleküllerden biri de Matriks metalloproteazlardır (MMP). Bunlar ekstrasellüler matriksin değişik bileşenlerini parçalayan, çinko iyonu varlığında aktifleşen enzimlerdir. En az 11 değişik türü vardır (42). Kollajenaz, jelatinaz ve stromelisinler olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Kollajenazların en önemlileri MMP-1, MMP-13, MMP-8 dir. Denatüre kollajeni parçalayan ve Tip IV kollajenaz olarak da adlandırılan jelatinazların başlıcaları MMP-2 ve MMP-9 ‘dur. Etki alanı daha geniş olan stromelisinler de stromelisin 1, 2, 3 (MMP-3, MMP-10, MMP-11) olarak adlandırılır. Ayrıca bunlar laminin ve fibronektin gibi glikoproteinleri de parçalayabilirler. Bir proteaz olan Stromelisin III’ün de invaziv tümörlerde marker olabileceği düşünülmektedir (43). İntegrinler de metastaz ve farklılaşmada rol oynayan moleküllerdir. Hücre stroma etkileşiminde

önem taşıyan integrinler α - ve β - olmak üzere iki alt birimden oluşan dimerler meydana getirirler. Bu dimer molekülleri membranın iki yanında, hücre iskeleti ile özel ekstraselüler matriks proteinleri arasında bağlantıyı sağlar. Meme kanserinde başta $\alpha 2\beta 1$ olmak üzere değişik integrin dimerlerinin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (44).

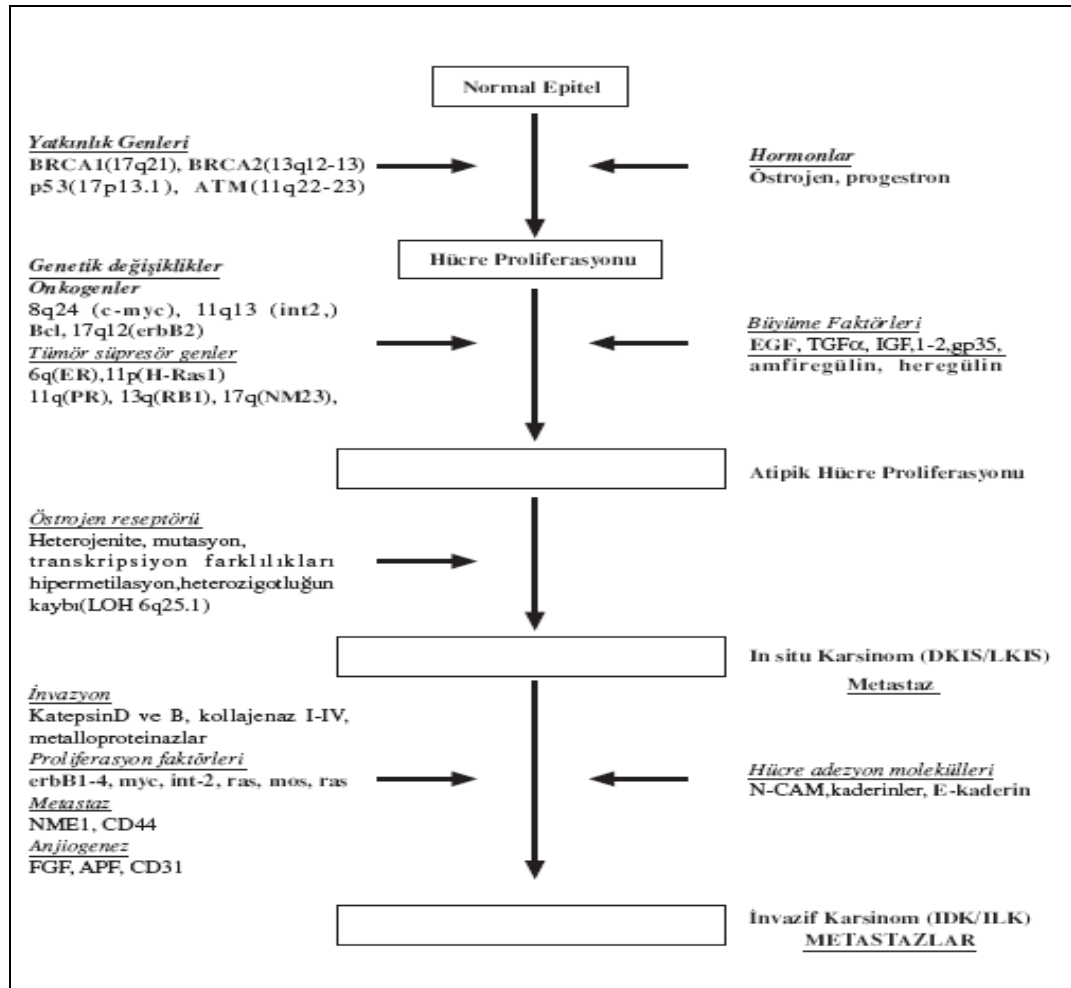
Tüm kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinde de birçok onkogene değişiklikler bildirilmiştir (45). Onkogenlerin kanser oluşumuna katılması hakkında iki hipotez vardır. Birincisi, onkogenin ekspresyon seviyelerindeki kantitatif değişiklikler, ikincisi onkogen yapısında meydana gelen değişikliklerdir. Onkogenlerdeki değişiklikler nokta mutasyonu, gen delesyonu, kromozomlarda yeni düzenlenmeler, gen amplifikasyonu ve insersiyonel mutagenез (yeni DNA katılımı) olarak sıralanabilir. DNA dizilerindeki sadece bir bazın değişmesi (nokta mutasyon) ile proto-onkogenler, onkogenlere dönüşebilirler. Bu olay somatik hücrelerde normal olmayan gen ürününün (onkoprotein) sentezine yol açar. Ayrıca bu ürün hücre bölünmesini ve gelişimini uyararak kansere neden olur. Kromozomlardaki yapısal mutasyonlar da proto-onkogenlerin aktivasyonunu etkileyen mekanizmalardan biridir. Bir kromozomun her zaman aynı yerinde bir kırık veya translokasyonun meydana gelmesi çeşitli kanser türlerinde, o kanser türü için ayırıcı bir özellik olarak gözlenir. Örneğin meme kanserinde, 1, 8, 13 ve 17. kromozomlarda anöploidiler görülebilmektedir. Gen amplifikasyonunda onkogene ait DNA parçasında çok sayıda replikasyon gözlenir. Bu olay, kanser hücrelerinde sık gözlenen bir olaydır. Proto-onkogenin amplifikasyonunun, tümör gelişimi ve ilerlemesi ile yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir. Onkogenlerin insersiyonel mekanizma ile de faaliyete geçtikleri gözlenmiştir. Bazı durumlarda retroviral genomların küçük bir parçasının, hücre onkogenlerin hemen bitişiğine kaynaştıkları gözlenir. Bu yol ile hücre onkogenlere promotör etki yaparlar (46).

Onkogenlerin, hücre proliferasyonu ve farklılaşması sırasında hücrenin çekirdeğinden plazma zarına kadar uzanan bir dizi işlemde rol oynadıkları gözlenmiştir. Örneğin hücre onkogenler büyüme faktörü ve çeşitli hormon reseptörlerine ait kodlar içerebilirler. Bu proteinler plazma membranından çekirdeğe doğru çeşitli sinyallerin iletilmesinde rol alırlar. Hücre seviyesinde onkogenler dominant bir etkiye sahiptir. Bu genler aktifleştiklerinde tek bir mutant allel bile, bir hücrenin normalden malign haline dönüşmesi için yeterlidir.

Meme kanserinin ortaya çıkışına, ilerlemesine ve metastazına katılan bir çok faktörün varlığı bilinmektedir (Çizelge 2.3.) (47-50). Memenin epitelyal hücreleri çeşitli hormon ve büyüme faktörleri tarafından da etkilenmektedir. Meme kanseri ile ilişkili birçok büyüme faktörü ailesi ve bunların hepsinin kendilerine özgü reseptörleri vardır. Gözlemler sonucunda TGF- α , FGF ve IGF gibi faktörlerin epitel hücrelerinde çoğalmayı uyardığı ancak TGF- β ve benzeri faktörlerin de çoğalmayı baskıladığı anlaşılmıştır. Ancak bugünkü bilgiler ışığında meme kanseri açısından önem taşıyan moleküller büyüme faktörlerinden çok, bunların reseptörleridir. Bunların içinde en çok çalışılmış olanlar tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörleridir. Tirozin kinaz reseptörleri hücre dışı ligand-bağlayıcı yapıları ve hücre içi kinaz yapılarına göre altgruplara ayrılırlar. Tip I büyüme faktörü reseptörleri, memede

bulunan ve meme kanseri gelişiminde rol oynayan bazı polipeptidleri içeren epidermal büyüme faktörü reseptörünü içine alır. Bu reseptörlerin hepsi temelde hücre dışında, membran içinde ve sitoplazmik bölge olmak üzere üç bölümden oluşan benzer yapıya sahiptir.

Çizelge 2.3. Meme kanserinin oluşumuna ve ilerleyişine katılan faktörler ile olası çok aşamalı karsinogenez modeli (50).



Meme kanserinde değişikliğe uğrayan genlerin başında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesinde yer alan genler (EGFR, c-erbB-2, c-erbB-3, c-erbB-4) gelir. Bu genlerin hepsi yüksek oranda homoloji gösterir ve tirozin kinaz aktivitesine sahip birer reseptör kodlar. Bu genler gen amplifikasyonu, mRNA veya proteinin aşırı ekspresyonu sonucunda hücre çoğalmasını kontrol eden sinyal ileti yollarını bozarak hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olurlar (51). EGFR, HER2, HER3 ve HER4'den oluşan EGFR ailesi, hücre membran reseptörü olarak bilinir. Meme epitelinin gelişmesi, meme hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması açısından önem taşımaktadır. Faktör, membran üzerinde yer alan reseptörüne bağlanarak etkisini gösterir. Kültür ortamında hücrelerin tutunma yeteneğini korumalarını

sağlayan en önemli faktörlerden biridir. EGFR tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Bu aileye ait üyeler transfosforilasyon sonucu bir seri etkileşimler ile heterodimerler oluşturabilirler ve farklı protein ailelerinin aktivasyonunu düzenlerler. EGF'nin reseptörüne bağlanması ile reseptör uyarılır ve EGF hücre içine alınır. Aynı zamanda EGFR'nin otofosforilasyonuna ve diğer hücre içi substratların fosforilasyonuna yol açar. Bu yol ile çekirdekte transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu artar, hücre bölünmesi uyarılır. Hücre zarından çekirdeğe doğru sinyal iletiminin aktarılmasında proto-onkogen ailesinden bazı üyeler (ras, src ailesi gibi) buna aracılık etmektedir. Bu sinyal iletiminde yer alan bir çok proto-onkogen çeşitli kanserlerde etkili bulunmuştur. Bu iletim boyunca ortaya çıkan onkojenik mutasyonlar devamlı olarak mitozu aktifleyen sinyallerin taşınmasında rol alırlar (46,47,51). Bir çok karsinomda onkogen olan EGFR amplifikasyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Meme tümörlerinde yüksek EGFR düzeyleri östrojen reseptöründen (ER) bağımsız olarak kötü prognozla ilişkisini gösterir. Hormona bağımlı olan ve olmayan meme tümör hücrelerinde östrojen reseptörü yokluğunda epidermal büyüme faktör reseptörünün aşırı eksprese olduğu görülür. Östrojen reseptörü ile EGFR arasındaki bu ters ilişki meme tümör hücre soylarında da göze çarpar. Meme kanserlerinin %40'ında EGFR ekspresyonu görülür (52,53). İnsan meme kanserinde klinik önemi kesin olarak bilinen HER-2 başlangıçta sıçan nöroblastomlarında neu adıyla tanımlanmıştır. Bu onkogen EGFR ailesinden 185 kD ağırlığında, tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir protein kodlar. HER-2/Neu, diğer adı ile cerbB-2 veya p185 olarak da isimlendirilir ve 17. kromozomda q12 bölgesinde yer alır. Meme kanseri araştırma ve tedavilerinde en yoğun çalışılan onkogenlerden biridir. Protein ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasına katılır. cerbB-2 onkoproteini plazma membranına yerleşmiş EGFR' ne benzer bir membran reseptörüdür (54). cerbB-2 molekülünün üzerinde hem düşük hem de yüksek afiniteli bağlama bölgeleri yer alır. Molekülün onkojenik potansiyeli de bu sayede değişik ligandlara bağlanabilmesinden kaynaklanır. Çalışmalar cerbB-2'nin bu ailedeki tüm ligandlar için afinitesi düşük ama özgüllüğü yüksek bir reseptör olarak davrandığını göstermiştir (55). cerbB-2'nin katılımı ile oluşan heterodimerler diğer erb B heterodimerlerine kıyasla daha kararlı ve kompleksin aktivitesi genellikle daha yüksektir. HER2 ve diğer üyeler (HER1,HER3,HER4) arasındaki liganda bağlı bir heterodimerizasyon cerbB-2 sinyal yolunu aktifler. cerbB-2'nin bir reseptör altbirimi gibi davrandığı ve liganda bağlamaksızın aktivitesini değiştirebildiği kabul edilmektedir. Bu reseptörlere ait ligand, reseptöre bağlandığında reseptör önce kendi türünden veya aynı ailedeki bir başka reseptör ile dimer kurar, bunun peşinden fosforilasyon yoluyla sinyal iletimini uyarır. Reseptörün hücre içi bölgesindeki belirli tirozin rezidüleri fosforillenir ve böylece aktifleşen reseptöre bağlı olan sinyal yolları uyarılır. Değişik ligandlar ve değişik hücre içi sinyal yolları ile etkileşim birbirinden çok farklı sinyallerin iletimini mümkün kılar. cerbB-2 aktivasyonuna bağlı olarak PLC/PI-3 kinaz, ras/MAP kinaz, JAK/STAT, src ve strese bağlı aktifleşen kinaz gibi birçok sinyal yolunun uyarıldığı, cerbB-2'nin aynı zamanda GAP ve shc gibi sinyal molekülleri ile de etkileştiği gösterilmiştir. cerbB-2 ile ras sinyal yolu arasındaki etkileşimin meme hücrelerinin çoğalma hızını değiştirdiği bildirilmiştir. cerbB-2 onkogeninin amplifikasyonu veya proteinin aşırı ekspresyonu meme kanserlerindeki neoplastik hücrelerin %10-40'ında gösterilmiştir. cerbB-2 aşırı ekspresyonunun tümör oluşturma etkisi otofosforilasyon aktivitesindeki artış ile açıklanır. Molekülün otofosforilasyonu diğer moleküllere karşı gösterdiği kinaz aktivitesini artırır. Aşırı

ekspresyon sonucu ortaya çıkan yeni cerbB-2 molekülleri hücre yüzeyinde çok sayıda homodimerler oluştururlar. Erken dönemde meme kanserinde cerbB-2 gen amplifikasyonu kötü prognoz ile yakın ilişkili bulunmuştur (54-57).

Nükleer onkogenler ya doğrudan steroidleri etkileyerek ya da MAP-kinaz, JAK/STAT kinaz veya PLC-PKC sinyal yolağı üzerinden çoğalmayı uyarırlar. Mitojen uyarısına hedef olan birçok hücrede bu sinyal yollarının sonunda c-myc, c-fos, c-jun, c-myb gibi protoonkogen ürünleri yer almaktadır. c-myc, c-fos, c-jun protoonkogenlerinin östrojen ve progesteron hormonlarıyla da aktifleştikleri gösterilmiştir (59). c-myc geni 8. kromozom (8q24) üzerinde yer alır. C-myc proteini hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen bir fosfoproteindir. c-myc geninin aşırı üretimi veya gen yapısındaki değişiklikler meme kanserine neden olmaktadır. Karsinomların %32'sinde myc proto-onkogeninin 2-15 kat amplifiye olduğu gösterilmiştir. Ancak östrojen reseptör durumu ile myc'nin tümörün histolojik tipi ve derecesi ile olan ilişkisi gösterilememiştir. c-myc gen amplifikasyonu meme kanserindeki en sık rastlanan genetik değişikliklerden biridir. Meme kanserlerinin 1/3'i bu genetik değişikliği taşır (58-60). Ras geni G-protein ailesi üyesidir ve guanozin nükleosidlerini bağlama yeteneğindedir. Ras proteinleri 21 kD' dur. Genellikle plazma membranındaki büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmik parçalarına yakın bölgeye yerleşirler. GTP ile aktifleştirilir ve protein kinazlar ile ilişkiye girerek mitozun aktifleştirilmesinde rol oynarlar. H-ras'ın artmış ekspresyonu lenf nodu metastazlarında ve ileri derecedeki histolojik tümörlerde görülmüştür. Ayrıca c-myc, H-ras, K-ras ve N-ras ekspresyon seviyelerinin karsinomlarda daha yüksek olduğu gözlenmiştir. H-ras1 allel kaybının 3.evre tümörlerde, östrojen ve/veya progesteron reseptör kaybı ve kötü klinik gelişime sahip hastalar ile önemli derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir. Böylece H-ras1 lokusunun meme kanseri riski taşıyan bireylerin belirlenmesinde genotipik belirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Ras'ın yüksek seviyeleri invaziv meme karsinomlarında daha yüksek bulunmuştur. H-ras mutasyonları nadir olmakla beraber meme kanserinde %70'lik bir risk nedenidir (61,62).

Meme kanserinin çoğunluğunu sporadik olguların oluşturmasına karşın yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanseri ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri oluşumundan birçok gen sorumludur. Genom devamlılığının koruyuculuğunda iş gören proteinleri üreten bazı genlerin germ hücrelerindeki mutasyonları gösterilmiştir. 1990 yılında Amerikalı genetikçi Marie-Claire King kalıtsal meme kanserinde nadir gözlenen yüksek penetransa sahip meme kanserine yatkınlık genleri olarak BRCA1 ve BRCA2 genlerini tanımlamıştır (63,64). Onkogenler tarafından kodlanan proteinler, işlev kazandıran mutasyonlar yoluyla ya da genin bir allelinin artmış veya uygun olmayan ekspresyonuyla kanser oluşumunu sağlarken, genin her iki allelinin fonksiyonunu yitirmesi gibi farklı bir mekanizma ile malignansiye neden olan mutasyonların izlendiği daha pek çok gen vardır. Bu genler tümör baskılayıcı genler olarak bilinirler. Tümör baskılayıcı genler son derece heterojendirler. Tümör baskılayıcılar hücre büyümesini doğrudan düzenlediklerinden "gatekeepers" olarak bilinirler. Diğer genler, DNA hasarını tamir etmede ve genomik bütünlüğü sürdürmede görev aldıklarından "caretakers" olarak adlandırılırlar.

BRCA1 ve BRCA2 negatif hücre kültürlerinde kromozom ve kromatid kırıkları, translokasyon ve delesyonlar gözlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda BRCA genlerinin kromozom yapısının korunmasında gerekli ve genomun stabil kalmasını sağlayarak “caretaker” olarak davrandıkları sonucuna ulaşılmıştır. Biyokimyasal ve sitogenetik çalışmalar, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin çoklu fonksiyona sahip olduklarını göstermiştir. BRCA1’in DNA hasarına erken cevapta rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca BRCA1 geninin kromatin-remodelling kompleksinin bir parçası olduğu da bilinmektedir. BRCA2 geni RAD51 proteini ile etkileşime girerek DNA’daki kırıkları onarmada görev alır. Böylece genomun kararlılığını sürdürmede önemli görevinin olduğu anlaşılmıştır. Meme tümör oluşumunun temelini BRCA1 ya da BRCA2 bozukluğuna neden olan kromozomal instabilite oluşturabilir (65).

BRCA1 geni, kromozom 17q21’de, BRCA2 ise kromozom 13q12’de yer alırlar. BRCA1 geni 1863 aminoasitlik (aa), BRCA2 geni ise 3418 aa’lık bir proteini kodlar. BRCA1 24, BRCA2 27 eksondan oluşur. Her iki protein de hücrenin diğer bazı proteinleri ile bağlanarak işlev görür (66). BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin hücre proliferasyonunun kontrolünde tümör baskılayıcı rolü ile birlikte DNA hasarına ve tamirine katılan, transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan, hücre siklusunun kontrol noktalarının önemli proteinler ile ve DNA’da rekombinasyonda iş gören proteinler ile yakın ilişkileri gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2’deki mutasyonlar ve BRCA proteinlerinin inaktivasyonu tümör baskılayıcı proteinlerin ve diğer “genom koruyucu” rolü olan proteinlerin de inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürürler (67-68). Bugüne kadar yapılan çalışmaların sonucunda BRCA1 ve BRCA2 genlerinde 1000’den fazla birbirinden farklı DNA dizi değişikliğine neden olan mutasyon saptanmıştır. Bazı mutasyonların topluma ve etnik gruba özel olduğu da gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2’nin kurucu bir atasal mutasyon etkisine sahip olduğu toplumlarda, aynı tip mutant aleller daha yüksek sıklıkta tayin edilmiştir. Örneğin Ashkenazi yahudilerinde üç tane ortak BRCA1/BRCA2 atasal mutasyonları vardır. Bunlar BRCA1’deki 185delAG ve 5382insC mutasyonları, BRCA2’deki 6174delT mutasyonudur (69). Türk toplumunda yapılan çalışmalarda meme ve/veya ovaryum kanserli hastalarda yapılan BRCA1 ve BRCA2 genlerine ait mutasyon taramalarında, topluma özgü sayılabilecek kurucu bir mutasyon bildirilmemiştir (70).

Meme ve over kanserine yatkınlık geni taşıyan ailelerde BRCA1 ile %80’e yakın ilişki vardır. Büyük ölçekli çalışmalarda, ailesinde 60 yaşından önce meme kanseri tanısı konan en az dört kadın bireyin veya herhangi bir yaşta meme kanserli erkek bireyin olduğu ailelerde BRCA1 (%52) ve BRCA2 (%32) mutant allellerinin meme kanseri ile yakın ilişkisi gösterilmiştir. Ailelerdeki özellikler daha alt gruplara bölündüğünde örneğin ailede hem meme hem ovaryum kanserini birarada taşıyanlar olduğunda BRCA1 geninin bu gruptan %81 oranında, BRCA2 geninin %76 oranında sorumlu olduğu bulunmuştur (71). Çeşitli populasyonlarda genin penetransındaki çeşitlilik, BRCA1 ve BRCA2 taşıyıcılarında kanser gelişiminde genetik veya çevresel faktörlerin rol oynadığını ve klinik gidişte farklılık olduğunu göstermiştir. BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşıyan bir kadın, kanser olmadan 80 yaşına kadar yaşayabilir veya çok erken yaşlarda kansere yakalanabilir. Birçok çevresel faktör örneğin, beslenme tarzı, egzersiz, hormonal tedavi ve karsinojenlere maruz kalma

gibi, bu farklılıktan sorumlu olabilir. Meme dokusunda alveoler ve duktal epitel hücrelerinde BRCA1'in ekspresyonu gözlenir. Bu gen hamilelik ve emzirme dönemlerinde belirgin olarak aktif çalışırken, doğumda laktasyon sonrası ekspresyonu azalır. BRCA1 mutasyonuna sahip kadınlarda puberteden sonra meme ve/veya over tümörlerinin gelişme riski %5-10 kat artar. BRCA1 steroide bağımlı bir hücre siklusu düzenleyicisi olarak fonksiyon görüyor olabilir. Gerçekten de BRCA1 ve BRCA2 genleri insan meme kanseri hücrelerinde östrojene duyarlıdır ve cevap olarak da her iki gene ait m-RNA seviyeleri artar. BRCA1 geninin bir allelindeki mutasyon erken yaş kadın meme kanserlerinde yüksek risk oluşturur, buna karşılık kolon ve prostatta daha düşük bir risk taşır. BRCA2 genindeki mutasyonlar ise erken yaş erkek meme kanserlerinde yüksek bir risk taşır (70-74). BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon tarama testi için uygun hastaları belirlemede çeşitli kriterler vardır. Soy ağacına göre artan genetik risk gösteren kadınlara genetik test yapılması önerilir. Mutasyon taraması yapılacak hastaların seçimi için, tanı konma yaşına, 1.ve 2. dereceden akrabalarda etkilenenlerin sayısına, bilateral olup olmadığına, dayalı kriterler kullanılır (73-78).

Kalıtsal meme kanserinin aksine yüksek sıklıkta görülen sporadik meme kanserinde, mutasyon somatik hücrelerde meydana gelir, bu kişilerde ve ailelerinde kanser riskinin görülme olasılığı irsi değil, tıbbi, yaşamsal çevresel faktörlerin etkisi altındadır. Sporadik meme kanserlerindeki risk faktörlerinin çoğunlukla hormonal olduğu düşünülmektedir. Ayrıca endojen, yaşamsal risk faktörleriyle birlikte düşük penetranslı kanser yatkınlık genlerindeki mutasyonlar da etken olmaktadır. Kadınlarda görülen sporadik meme kanserinin bilinen başlıca risk faktörleri, östrojen seviyesindeki artış ya da östrojene uzun süre maruz kalmadır. Östrojen biyosentezinde (CYP17, CYP19, 17 β -HSD) ve östrojenin metabolitlerine ve ürünlerine dönüşümünde (COMT, CYP1A1, CYP1B1, GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1) rol alan polimorfik genlerin, meme kanserine bireysel yatkınlıkla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (76-78).

Tümör baskılayıcı bir gen olan p53 geni 17. kromozomun kısa kolunda p13.1 bölgesinde yer alır ve moleküler ağırlığı 53kD'luk nuklear bir proteini kodlar. p53 geni hücre siklusunda gereklidir ve yaşamsal öneme sahiptir. Ayrıca DNA'nın sentezi ve tamirinde, hücre farklılaşmasında ve programlanmış hücre ölümünde (apoptoz) görev almaktadır. UV, karsinojenler ve sitostatik ajanların DNA'da oluşturdukları hasarı ortadan kaldırmak üzere aktifleşir. Eğer hasar düzeltilemezse hücre apoptoza yönlendirilir. p53 geninin her iki alleldeki kaybı veya nokta mutasyonları çeşitli tümörlerde ve meme kanserlerinde gösterilmiştir (76-79). p53'ün yaklaşık %60'ının meme kanserlerinde nokta mutasyonları şeklinde bulunduğu ve bunun da birçok kanser tipinde kimyasal kanserojenlerle olduğu ileri sürülmüştür. Meme kanserlerinde p53 proteinin aşırı üretimi kötü prognoz için bir indikatördür. Dokuda mutant p53 pozitifliğinin tespiti %80-90 oranında meme kanseri tanısını doğrulamaktadır. p53 ekspresyonu ile yüksek tümör derecesi, yüksek proliferasyon indeksi, anöploidi ayrıca ER ve PR yokluğu arasında yakın ilişki olduğu meme kanserlerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Gösterilen bu parametreler kısa ömürle ilişkili olduğundan p53 pozitifliği kötü prognozla da yakından ilişkilidir. Meme kanserlerinin %20-30 unda p53 inaktivasyonu gözlenir. p53 mutasyonlarının

tesbiti in situ'dan invazif karsinomaya geçiş için bir marker olarak kullanılabilir (76). Primer meme kanseri olgularında p53, %15 oranında pozitif saptanmış, EGFR-pozitif ve ER-negatif olgularda ise anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ve böylece p53'ün meme kanserinin prognozundaki önemi belirtilmiştir (80).

Meme kanserine neden olduğu bildirilen ve tamir mekanizmasında rol oynayan ATM geni kromozom 11 üzerinde yerleşmiştir ve resesif olarak kalıtılır. ATM geni çok uzun ve kompleks bir genidir. Çok sayıda ve çeşitli mutasyonlar gözlenmektedir. İki mutant allel hastalık gelişimine neden olur ve meme kanseri için yüksek risk taşır. Bir mutant allel taşıyanlarda ise meme kanseri yatkınlığının çok yüksek olduğu gösterilmiştir. ATM taşıyıcıları oldukça yaygındır. 1/100-1/200 kadında bu mutasyon orta derecede artmış genetik risk olarak kalıtılır. Toplumdaki meme kanserinin %2-7'sinden bu gen sorumludur (81). Hücre döngüsü kontrol noktasında DNA onarımından sorumlu olan CHEK2 (CHK2 olarak da bilinir), meme kanseri riskinin artmasında rolü olan tümör baskılayıcı bir diğer genidir. 22.kromozomun uzun kolunda 12q.1 bölgesinde yer almaktadır. CHEK2 1100delC varyantının, kadınlarda meme kanser riskinin yaklaşık 2 kat, erkeklerde ise 10 kat artmasına neden olduğu gösterilmiştir (82). Yapılan araştırmalara göre prostat kanserli erkeklerin CHEK2 geninde mutasyon taşıdıkları gözlenmiştir. Ayrıca BRCA1/BRCA2 genlerindeki mutasyonların prostat kanseriyle de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle de Askhenazi Yahudi erkeklerinde yapılan çalışmalar sonucunda, Askhenazi Yahudilerinde kurucu mutasyonlar olan, BRCA1 genindeki 185delAG ve 5382insC mutasyonları ve BRCA2 genindeki 6174delT mutasyonundan birini taşıyan erkeklerin % 16'sında prostat kanseri olduğu belirlenmiştir (83).

Over kanserlerinin çoğu sporadik olarak görülürken, sadece %5-%10'u aileseldir. Ancak bu olgulardaki sorumlu genlerin saptanması ile söz konusu kanserlerin moleküler patogenezelelerine ilişkin çok fazla bilgi edinilmiştir. Kalıtsal over kanserlerinin büyük bir bölümünde BRCA genlerindeki mutasyonların gelişmeden sorumlu olduğu görülmektedir. Bunlar meme kanserleri ile de birliktedir. Gerçekten, bu genlerdeki mutasyonların varlığında over ve meme kanserlerinin her ikisi için artan bir risk söz konusudur. BRCA1 taşıyıcılarında over kanserlerinin gelişme riski değişik çalışmalarda %16-%44 arasında değişmekle birlikte ortalama %30 dur. BRCA2 taşıyıcılarında risk BRCA1 taşıyıcılarına oranla bir dereceye kadar daha düşüktür (84). BRCA genlerinde mutasyonlar ailesel over kanserli vakaların büyük bir bölümünde mevcut olmakla birlikte, bu tür mutasyonlar sporadik over kanserlerinde daha düşük oranda görülmektedir. O halde overyan neoplazi gelişiminde diğer moleküler yolların olması gerekmektedir. Örneğin over kanserlerinin %35inde cerb2'nin ekspresyon fazlalığı söz konusudur ve bu kötü prognozla birliktelik gösterir. Çoğu müsinöz kistadenokarsinom kanser olmak üzere over tümörlerinin %30undan fazlasında k-ras ekspresyon fazlalığı vardır. Ayrıca diğer kanserlerde olduğu gibi tüm over kanserlerinin ortalama %50sinde p53 mutasyonlarına rastlanılmaktadır. Over kanserlerinde özellikle sınırdaki (borderline) ve invaziv müsinöz kanserlerde k-ras mutasyonları saptanmıştır. k-ras mutasyonları sınırdaki müsinöz kanserlerin yaklaşık yarısında saptanmıştır. Bu bulgu, k-ras mutasyonlarının, müsinöz over kanseri gelişiminde erken bir olay olduğunu ve sınırdaki tiplerin de invaziv tümörlerin öncüsü olduğunu düşündürmektedir (85).

Over kanserlerinde kromozom bozuklukları ilk kez 6 no'lu kromozomun uzun kolunda delesyonla ortaya konmuştur. Sonra 14. kromozomda delesyon ve 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 15, 19. kromozomlarda yapısal anomaliler saptanmıştır. Epitelyal over kanserinde sitogenetik anomalilere ek olarak spesifik genetik değişikliklerde tanımlanmıştır. Moleküler biyolojik çalışmalar daha ziyade protoonkogen ve tümör baskılayıcı genler üzerine yoğunlaşmıştır. Over kanserlerinde tespit edilen protoonkogenler, c-mos, c-fms, c-erbB1, Her2/neu ve ras genleridir (86).

2.6. Meme ve Over Kanserlerinde Tedavi:

Son yıllarda meme kanserinin tanı ve tedavisinde yaşanan ilerlemeler hastaların sağkalımlarına, hastalısız yaşam sürelerine önemli katkılarda bulunmuştur. Yeni cerrahi yaklaşımlar, neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi, radyoterapi ve hormonoterapi gibi tedavi seçeneklerinin artması bu tedavilerin hangi hastalara uygulanacağı sorusunu da beraberinde getirmiştir. Böylece hastaların evrelendirilmesi, sağkalımla ilgili çeşitli klinik, histopatolojik ve immunohistokimyasal parametreler ile moleküler incelemeler önem kazanmıştır (87).

Meme kanseri çoğu zaman başlangıçtan itibaren lenfojen, bazen de hematogen yayılma özelliğine sahip sistemik bir hastalıktır. Bu nedenle cerrahi tedavi yanında radyoterapi kemoterapi ve hormonoterapi yapılmaktadır. Son yıllarda tarama mamografisinin ve ultrasonografinin düzenli kullanılması ve gelişmiş tanı yöntemleri ile meme kanserlerine %50 oranında erken aşamada tanı konulmaya başlanmıştır. Bunların yanında lenfangiografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (88).

Önemli fizyolojik rolleri olan östrojenler ve reseptörleri meme, endometrium ve over gibi tümörlerin başlangıcı ve gelişimi için önemlidir. Kısmi antiöstrojen olan tamoksifen kullanımının erken evre meme kanserlerinde hastalısız yaşam süresi ve genel yaşam süresinin uzamasını sağladığı gösterilmiştir. Tamoksifen her evredeki meme kanserinin hormonal tedavisinde kullanılan sentetik nonsteroid yapıda bir antiöstrojen ajandır (89). Tamoksifen daha çok tümörostatik bir ilaç olduğundan ve kısa süreli tedavi sonrası tamoksifen kesildiğinde tekrarlama olasılığı olduğundan uzun süreli tedavinin (en az 5 yıl) en iyi klinik strateji olduğu söylenebilir. Meme kanserli hastalarda özellikle p53 ve cerbB-2 moleküler biyobelirteçler olarak prognostik öneme sahiptirler ve her ikisi içinde çeşitli tedavi metodları geliştirilmektedir. cerbB-2 aşırı üretimine sahip hastalara yüksek doz antrasiklin kemoterapinin yararlı olacağı ya da lenf nodu pozitif meme kanserli hastalarda çeşitli kombine kemoterapi ajanlar ile yapılan adjuvan tedavinin yaşam süresini arttırdığı ve hastalık ilerlemesini durdurduğu gözlenmiştir (90-94). cerbB-2 geninin amplifikasyonu veya onkoproteininin aşırı ekspresyonu meme kanserlerindeki transforme hücrelerin %10-40'ında gösterilmiştir. Bu değişimler tümörün agresifliği, prognoz, hormonal ve sitotoksik ajanlara cevapsızlık ile ilişkilidir. cerbB-2 geninin amplifikasyonuna sahip hastalarda ve metastazı bulunan meme kanserli hastalarda kullanılan ve de ilk oluşturulan biyolojik düzenleyici Trastuzumabdır. Bu ilaç cerbB-2 proteinine yüksek bağlanma kapasitesine sahip, insana göre geliştirilmiş bir

rekombinant monoklonal antikordur ve cerbB-2 yi aşırı üreten meme kanser hücrelerinin büyümesini baskılar (94-96). İkincisi emodin gibi tirozin kinaz inhibitörleridir. Bu ilaç cerbB-2 nin fosforilasyonunu ve hücre içi sinyal yolağını engeller. Üçüncüsü aktif immunterapidir. Bir diğeri ise ısı şoku proteini 90 ile ilişkili sinyal inhibitörüdür. Bunlar tirozin kinaz reseptörünün (örneğin; HER2) parçalanmasını indüklerler (97). HER2 nin aşırı üretimini baskılamak amacıyla gen tedavisi yöntemleri de kullanılmıştır. Kanser hücrelerinde özellikle antisens oligonukleotidler (ODN) kullanılarak, ODN'lerin hem cerbB-2 m-RNA'sını hem de protein seviyelerini doza bağlı ve diziye özgün olarak baskıladığı ve bu baskılamamanın hücre siklusunu Go/G1 de tutarak hücreyi apoptotik ölüme götürdüğü gösterilmiştir (98). P53 gen mutasyonlarına ve p53'ün aşırı üretimine sahip meme kanserli hastalarda da adjuvan tedaviler kullanılmaktadır. Kemoterapi ajanlarının etki mekanizmalarından biri DNA hasarı oluşturmak (örneğin; FEC) ve hücreyi normal p53 yolu ile apoptoza göndermektir. Bir diğerk mekanizma ise mikrotübül stabilizasyonu (örneğin, paclitaxel) sağlamaktır. Paclitaxel'in olumlu etkisi mitoz sırasında, p53 yokluğundan dolayı G1 fazında duraksamanın olmaması ancak ilacın mikrotübül stabilizasyonunu sağlaması ile açıklanmış ve p53 eksikliğine sahip tümörlerde paclitaxelin yararlı olabileceği öne sürülmüştür (99).

Over kanseri jinekolojik maligniteler içinde en sık mortaliteye neden olan kanserdir ve epitelyal over kanserinin prognozu yüz güldürücü değildir. Jinekolojik onkoloji cerrahisindeki ve kemoterapi ajanlarındaki gelişmelere rağmen evre III ve IV over kanserinin sağ kalımı fazla değildir (100). Geçmişte sitotoksik tedavi rejimleri ampirik olarak geliştirilip maksimum tolere edilebilir dozlarda kombine edilerek ve sıklıkla rasyonel yaklaşımdan uzak bir şekilde uygulanıyordu. Epitelyal over kanserinde özellikle evre IIIC ve IV'te platinium tabanlı kemoterapi rejimlerinin hemen ardından relapslar görülmektedir. Bu yüzden en azından ilk remisyonundan sonraki relaps süresini uzatmak çok önemlidir (101).

İntrasellüler sinyal iletim mekanizmalarının anlaşılması ile overyan karsinogenez daha iyi anlaşılabilir ve over kanseri hücrelerinin çoğalması ve yayılması ile ilgili sinyal iletim mekanizmalarının hedeflenmesi sağlanabilir. Over kanseri biyolojisinin daha iyi anlaşılması ile malign hücrelerle normal hücreler arasında farklılık gösteren bir çok moleküler hedef bulunabilir. Aynı zamanda epitelyal over kanserine neden olan yolakların ortaya konulması ile kemoterapiye dirençlilik de çözümlenebilir. Bu sinyal iletim mekanizmaları genellikle çok karmaşık kaskadların ve hücre içi sinyal iletim ağının bir parçasıdır. Örnek olarak bir sinyal iki farklı hücre içi yolaktan tetiklenebilir (matriks metallo-proteinaz 9'un fibronektin-bağımlı aktivasyonu, MEK1-MAPK ve PI3K/Akt gerektirir) , ayrıca bir hücre içi yolak da aynı zamanda birden fazla onkojenik sinyali iletebilir (epitel ve endotel hücrelerinde PI3K sinyali büyümeyi ve neovaskülarizasyonu uyarır). Düşük molekül ağırlıklı inhibitörler, monoklonal antikorlar ve gen tedavi yöntemleri tek başlarına kullanılabileceği gibi sitotoksik rejimlerle kombine de edilebilir (102). G-protein kenetli reseptörler de kanser tedavisi için uygun hedeflerdir, ancak bu reseptörlerin karmaşık ve çok yönlü fonksiyonları nedeni ile bu hedefe yönelik tedaviler toksik ve spesifitesi düşük olabilir. Fosfotidilinozitol 3-kinaz (PI3-kinase) kanser ile ilişkili geniş bir yelpazede yer alan hücre içi sinyal iletimiyle ilgili haberci

bir moleküldür. PIK3CA alt formu ise, karsinogenez ve muhtemelen anjiogenezde en önemli rolü oynamaktadır. Daha az yan etkilerinin olması nedeni ile PI3K/Akt yolağı inhibitörleri epitelyal over kanseri tedavisinde umut vaad eden çözümlerdir (103). Over kanserinde yenilikçi tedavi yaklaşımlarından biri de gen tedavisidir. Gen tedavisinin farklı metodları (moleküler kemoterapi = öncül ilaçlar, immünoterapi yaklaşımları, ilaç duyarlılığında yapılan değişiklikler ve viroterapi) son zamanlarda yoğun olarak araştırılan konulardır. Birçok farklı viral vektör üzerinde çalışmalar sürmektedir (104).

MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında bulunan ve daha önce gerçekleştirilen projelerde kontrol olarak kullanılan, ailesinde kanser öyküsü bulunmayan, sağlıklı 150 bireyden aydınlatılmış onam formu imzalatıldıktan sonra elde edilen ve -20°C'de saklanan 150 DNA araştırmaya dahil edilmiştir.

Sağlıklı bireylerden daha önce elde edilen genomik DNA'larda, daha önce yapılan araştırmada ilk defa bulunan BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography =Denatüre Edici Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi) yöntemi uygulanarak tarandı.

3.1. Stokta bulunan DNA'ların İzolasyonu *

Alınan 150 bireyden 10 ml periferik kan EDTA'lı steril tüplere (venoject®EDTA(K₃)) alınmış, Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilen standart DNA izolasyon yöntemi değiştirilerek, genomik DNA'lar izole edilmiştir (110).

3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar:

Lizis Tamponu

155 mM NH₄Cl (Sigma)

10 mM KHCO₃ (Sigma)

1 mM EDTA pH 7.4-8.0 (Sigma)

Yukarıda verilen derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan lizis tamponu otoklavda sterilize edildi ve +4°C'de saklandı.

WBL (White Blood Lysis) Tamponu

0.1 M NaCl

0.025 M EDTA pH 7.4-8.0

Yukarıda verilen derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan WBL tamponu otoklavda sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

* Önceki proje ekibi tarafından yapılan izolasyon işlemleri

9.5. M Amonyum Asetat

36.613 gr amonyum asetat (CH₃COONH₄, Merck) 50 ml distile suda çözüldü. Otoklavda sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

%10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisi

1 gr SDS (Merck) 10 ml distile suda çözüldü. Filtre (Orange Scientific, GyroDisc CA) ile sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Proteinaz K

100 mg proteinaz K 5 ml steril distile suda çözüldü ve -20°C 'de saklandı.

%70' lik Etanol (C₂H₅OH)

70 ml Etanol (Reidel), 30 ml distile su ile karıştırıldı ve +4°C'de saklandı.

3.1.2. İşlemler

1. 10 ml'lik EDTA'lı steril tüplere alınan kan alt üst edilip homojenize edildikten sonra 50 ml'lik konik santrifüj tüplere aktarıldı.
2. Üzerine 30 ml lizis tamponu eklenip vortekste iyice karıştırıldı.
3. Buzda 15-20 dakika bekletildikten sonra (bu süre içinde 1 ya da 2 kez vorteksle karıştırıldı) +4°C'de 1500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Dökelti atılıp, çökelti elle vurularak homojenize edildikten sonra üzerine 20 ml lizis tamponu eklendi.
5. +4°C' de 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra dökelti atılıp çökelti homojenize edildi.
6. Çökelti üzerine 9.4 ml WBL tamponu, 500 µl %10'luk SDS, 50µl Proteinaz K (20mg/ml) eklendi. Alt üst edildikten sonra 37°C'lik etüvde bir gece bekletildi.
7. Ertesi gün üzerine 3.7 ml 9.5 M amonyum asetat çözeltisi eklendi.
8. Beyazımsı bir renk oluşuncaya kadar elle vurularak iyice karıştırılması sağlandı.
9. Oda ısısında 30 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Dökelti yeni bir steril falkon tüpe alınıp, üzerine 1:2 oranında saf etanol ya da izopropanol eklendi.
10. Alt üst edilerek DNA'nın toplanması sağlandı. Gözle görülebilir bir şekilde çökelti oluşturan DNA'lar toplanıp,%70'lik etanol bulunduran 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
11. Oda ısısında 13000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldıktan sonra, çökelti 37C'lik etüvde ağzı açık olarak kurutuldu. Kurutulan DNA steril suda çözüldü.
12. Elde edilen DNA örnekleri uzun süre saklanacaksa -20°C'de, kısa sürede kullanılacaksa +4C'de saklandı.

3.2. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

Bu çalışma için arşivden alınıp kullanılan DNA örneklerinin miktar ve saflık derecelerini belirlemek için spektrofotometre (Nanodrop 1000) ile ölçümler yapıldı. Örneklerin optik dansite ölçümlerini belirlemek amacıyla 1/200 oranında sulandırıldı. 5 µl DNA örneği 995 µl dH₂O ile sulandırılarak miktar 1000 µl'ye tamamlandı. Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında örneklerin ölçümü yapılarak DNA miktarları,

$$\text{DNA miktarı} = \text{Optik Dansite (O.D.)} \times \text{Sulandırma Faktörü (S.F.)} \times 50$$

Formülü yardımıyla hesaplandı. DNA miktarı çalışılmayacak kadar az olan örnekler, arşivdeki diğer DNA'lar ile değiştirildi. Ölçümleri yapılarak DNA miktarları hesaplandı.

3.3. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) Yöntemi

PCR reaksiyonu, PCR System 9700 (Gene Amp®) marka thermal cycler cihazında gerçekleştirildi. PCR protokolleri aşağıda verildiği gibi uygulandı. Amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için jel elektroforezinde kontrol edildi. Amplifikasyonları gerçekleşmeyen kontroller için sulandırılma oranları değiştirilerek protokol tekrar edildi. Önceki çalışmada ilk defa saptanan değişimler özellikleri çizelge 3.1.'de, BRCA1 ve BRCA2 genlerine ait primer adları ve dizileri çizelge 3.2. ve çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Önceki çalışmada bulunan mutasyonların özellikleri.

Kanser Tipi	Gen	Ekson	Dizi değişimi (cDNA dizisine göre)	Protein düzeyinde tahmini etkisi	Mutasyon tipi
Meme	BRCA1	11	c.1657 A-T	H513L	Yanlış anlamlı(missense)
Meme	BRCA1	11	c.2566 A-C	H816P	Yanlış anlamlı(missense)
Meme	BRCA1	16	c.4849 C-A	S1577Y	Yanlış anlamlı(missense)
Over	BRCA2	9	c.1001 A-C	G258P	Yanlış anlamlı(missense)
Meme	BRCA2	10	c.1204 A-C	S326R	Yanlış anlamlı(missense)
Over	BRCA2	18	c.8453 A-G	N2742S	Yanlış anlamlı(missense)
Over	BRCA2	21	c.8935 G-A	E2903K	Yanlış anlamlı(missense)

Çizelge 3.2. BRCA1 geninin eksonlarında kullanılan primerler ve dizileri.

Primer adı	Primer diziler (5'→3'yönünde)	PCR ürün büyüklüğü (baz çifti cinsinden verilmiştir)
1105F	AGGAGCATT TGTTACTGAT	346
1105R	AGACTTCCTCCTCAGCCTATT	
1107F	CTAAGTGTTCAAATACCAGT	372
1107R	ATTTCTATGCTTGTTTCCCG	
16F	AATTCTTAACAGAGACCAGAAC	252
16R	AAACTCTTTCCAGAATGTTGT	

Çizelge 3.3. BRCA2 geninin eksonlarında kullanılan primerler ve dizileri.

Primer adı	Primer diziler (5'→3'yönünde)	PCR ürün büyüklüğü (baz çifti cinsinden verilmiştir)
BRCA2-9F	CAGATAACTGAAATCACCAAAAGTG	278
BRCA2-9R	ACAACAACAAAAAACCTGTAGTTC	
BRCA2-10AF	TATAAAATATTAATGTGCTTCTGTT	328
BRCA2-10AR	AAAGGGCTTCTGATTTGCTAC	
BRCA2-18BF	TGTTTCTGACATAATTTTCATTGAGC	245
BRCA2-18BR	AAACTTTAACTGTCTGAAGAATATGC	
BRCA2-21F	GGGTGTTTTATGCTTGTTCT	177
BRCA2-21R	CATTTCAACATATTCCTTCCTG	

3.3.1.PCR Reaksiyonun İçeriği :

Çizelge 3.4. PCR içeriği.

dNTP karışımı (10Mm)	0.4 µl
10X Tampon	2.5 µl
İleri primer (10µmol/µl)	1 µl
Geri primer (10µmol/µl)	1 µl
MgCl ₂ (50Mm)	*
Taq polimeraz (5u/µl)	0.2 µl
H ₂ O	Toplam hacim 25 µl olacak şekilde eklendi.
DNA (100-500ng/µl)	1.2 µl

* BRCA1 geninde 11. eksonun 05. bölgesi için 1 µl, 11.eksonun 07. bölgesi için 1.5 µl, 16. ekson için 2 µl, BRCA2 geninde 9. ekson için 3 µl, 10. eksonun A bölgesi için 1 µl, 18. eksonun B bölgesi için 1.5 µl, 21. ekson için 1,5 µl MgCl₂ kullanılmıştır.

3.3.2. PCR Programı

PCR işlemi için eksonların Td sıcaklık değerlerine göre 4 farklı program uygulandı. BRCA1 geninde 11. eksonun 05. ve 07. bölgeleri için program 1, 16. ekson için program 2, BRCA2 geninde 9. ekson için program 1, 10. eksonun A bölgesi için program 4, 18. eksonun B bölgesi ve 21. ekson için program 3 kullanılmıştır. Programlar aşağıda verilmiştir.

Program 1

95 °C	30 saniye	}	15 döngü
61-54 °C*	30 saniye		
72 °C	50 saniye	}	30 döngü
95 °C	30 saniye		
54 °C	40 saniye		
72 °C	50 saniye		
72 °C	5 dakika		
15 °C	∞		

* 61 °C'den 54 °C' ye kadar her döngüde sıcaklık 0.5 °C düşmektedir.

Program 2

95 °C	30 saniye	}	15 döngü
65-58 °C*	30 saniye		
72 °C	50 saniye	}	30 döngü
95 °C	30 saniye		
58 °C	40 saniye		
72 °C	50 saniye		
72 °C	5 dakika		
15 °C	∞		

* 65 °C'den 58 °C' ye kadar her döngüde sıcaklık 0.5 °C düşmektedir.

Program 3

95 °C	30 saniye	}	15 döngü
55-48 °C*	30 saniye		
72 °C	50 saniye	}	30 döngü
95 °C	30 saniye		
48 °C	40 saniye		
72 °C	50 saniye		
72 °C	5 dakika		
15 °C	∞		

* 55 °C'den 48 °C' ye kadar her döngüde sıcaklık 0.5 °C düşmektedir.

Program 4

95 °C	30 saniye	}	15 döngü
60-53 °C*	30 saniye		
72 °C	50 saniye	}	30 döngü
95 °C	30 saniye		
53 °C	40 saniye		
72 °C	50 saniye		
72 °C	5 dakika		
15 °C	∞		

* 60 °C'den 53 °C' ye kadar her döngüde sıcaklık 0.5 °C düşmektedir

Çizelge 3.5. Ekzonların PCR için Td sıcaklık dereceleri.

Primer adı	PCR Td Sıcaklık (°C)
BRCA1-1105	61-54°C
BRCA1-1107	61-54°C
BRCA1-16	65-58°C
BRCA2-9	61-54°C
BRCA2-10A	55-48°C
BRCA2-18B	60-53°C
BRCA2-21	60-53°C

3.4. Agaroz Jel Elektrofrez ve Görüntüleme Sistemi

3.4.1. 10X TBE Tamponu

Tris-baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃ , Sigma)	216.8 gr
Borik asit (H ₃ BO ₃ , Merck)	110 gr
EDTA (Sigma)	14.8 gr

3.4.2. %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

1 gram agaroz (Generose) tartılarak 50 ml 1XTBE' de (Tris-Borat-EDTA) çözüldü. 50-55° C'ye gelene kadar soğutuldu. 0.5µg/ml etidium bromür ilave edildi. Elektrofrez küvetine taraklar yerleştirilerek sıvı agaroz jel elektrofrez küvetine döküldü. Oda sıcaklığında 15-20 dakika polimerize edilmesi için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden alındı ve agaroz jel, elektrofrez tankına yerleştirildi.

3.4.2.1. İşlemler

%1'lik agaroz jel, içerisinde 1XTBE bulunan elektrofrez tankına yerleştirildi. PCR ürünü ve 50 bç'lik marker yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektrofrez tankına bağlı güç kaynağı ile 120 voltta 20 dakika yürütüldü. Süre sonunda yürütülen örnekler UV ışık veren transilluminatör yardımıyla incelendi. Syngene (İngenius) transilluminatör aletine bağlı olan monitörlü sistem kullanılarak fotoğraflar alındı.

Kontrol gruplarının tümünde BRCA1 geninin 11. eksonunun 05. ve 07. bölgeleri ile 16. eksonda ve BRCA2 geninin 10. eksonunun A bölgesi, 9, 21, 18. eksonun B bölgesinde mutasyon taraması için DHPLC yöntemi kullanıldı.

3.5. DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography = Denatüre Edici Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)

Amplifiye edilen ve agaroz jelde kontrol edilen örneklerin BRCA1 geninin 1105, 1107 ve 16 kodlayıcı bölgeleri ile BRCA2 geninin 9, 10A, 21, 18B kodlayıcı bölgelerinde genetik varyasyonları belirlemek amacıyla WAVE Maker Sistemi (Transgenomic Inc., San Jose, CA) ile DHPLC analizi gerçekleştirildi. Bu analiz için öncelikle çalışma kapsamına alınan bireylerin PCR ürününden 10 µl ve sağlıklı birey DNA' larının amplifikasyon ürünlerinden 10 µl alınıp hibridizasyona tabi tutuldu. Ardından PCR System (Mycycler)'de denatürasyon aşamaları gerçekleştirildi. Denatürasyon aşaması aşağıda görülmektedir.

3.5.1. DHPLC için denatürasyon işlemi

95 °C	20 dakika (ön denatürasyon)
94.9 °C	5 saniye* 99 döngü
74.9 °C	6 saniye** 99 döngü
64.9 °C	6 saniye** 99 döngü
54.9 °C	5 saniye** 99 döngü
44.9 °C	4 saniye** 99 döngü
34.9 °C	4 saniye** 99 döngü
24.9 °C	4 saniye** 99 döngü

* Her döngüde sıcaklık 0.2 °C düşmektedir.

** Her döngüde sıcaklık 0.1 °C düşmektedir.

Daha sonra denatüre ve sonrasında hibridize olan ampikonlar cihaza yüklenip programları ayarlandı. Daha sonra analizleri gerçekleştirildi. Reaksiyon protokolü aşağıdaki gibi belirlendi. DHPLC koşulları çizelge 3.6.'da belirtildiği şekilde uygulandı.

Çizelge 3.6. DHPLC sıcaklık koşulları.

Primer adı	DHPLC Sıcaklık (°C)
BRCA1-1105	56.7°C
BRCA1-1107	57°C
BRCA1-16	54-61°C
BRCA2-9	54.3°C
BRCA2-10A	55.3-59°C
BRCA2-18B	55.5-59.5°C
BRCA2-21	55-58.5°C

DHPLC analizi sonucunda, görülen değişik piklere sahip bireylerin amplikonları DHPLC cihazında tekrar analize alındı. Tekrarlayan analiz sonucunda aynı değişikliklerin görüldüğü bireylerin amplikonları DNA dizi analizine alındı. DNA dizi analizinin aşamaları aşağıda açıklanmıştır.

3.6.DNA Dizi Analizi ve İşlemleri

Öncelikle amplikonların temizlenmesi işlemleri gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünlerinin temizlenmesi, Roche marka (Katalog no:11 732 668 001) PCR ürün pürifikasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. İşlemler şu şekilde yapıldı:

PCR ürünü steril distile su eklenerek 100 µl'ye tamamlandı. Üzerine 500 µl bağlanma tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. Karışım pürifikasyon filtresinin üzerine boşaltıldı. Oda sıcaklığında 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Tüpün dibine biriken dökelti atıldı. Pürifikasyon filtresinin üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 13000rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. İkinci yıkama 200 µl yıkama solüsyonu ile yapıldı. Tekrar oda sıcaklığında 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve dökelti atıldı. Pürifikasyon filtresi temiz 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 50 µl elüsyon solüsyonu ilave edildi. Oda sıcaklığında 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA agaroz jelde kontrol edildi.

Dizi analizi için kalıp olarak temizlenen amplikonlar kullanıldı. Dizi analizi reaksiyonları aşağıdaki programa göre yapıldı. Tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi.

Reaksiyon içeriği final hacmi 10µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı ve programlandı.

5X Tampon	1 µl
Big Dye v3.1	1 µl
Primer (10Mm)	1 µl
Kalıp DNA	2 µl
H ₂ O	5 µl

94°C	4 dakika	} 25 döngü
96°C	10 saniye	
50°C	5 saniye	
60°C	4 dakika	

Dizi analizi yapılacak amplikonların temizlenmesi şu şekilde gerçekleştirildi:

Hazırlanan yeni 1.5 ml'lik ependorf tüplere 2µl sodyum asetat (Mallinckrodt) (Ph:4.6) konuldu. Üzerine 30µl %99 soğuk etanol ilave edildi. Bu karışımın üzerine amplifikasyon ürününün tamamı eklendi ve vorteksle karıştırıldı. 20 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda oda sıcaklığında 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Pipetle dökelti alınarak atıldı. Çökelti üzerine 250µl %70 etanol ilave edildi.

Oda sıcaklığında 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tekrar dökelti pipetle alınarak atıldı. Tüplerin 10-15 dakika karanlıkta kuruması beklendi. Tüpler kurduktan sonra üzerine 25µl formamid ilave edildi. Tüpler hafifçe vurularak karıştırıldı ve dizi analizi tüplerine aktarıldı. ABI 310 dizileme cihazına konulmadan önce örnekler 94°C'de 5 dakika denatüre edildi ve daha sonra cihaza yüklendi. Dizileme cihazına hemen yüklenmeyen örnekler -20°C'de saklandı.

Denatüre edilen PCR ürünleri 5 dakika -20°C'de bekletilerek ABI 310 dizileme cihazına yüklendi. Alınan sonuçlarda sekans pikleri ABI sequence analysis yazılım programında değerlendirildi. Bu sonuçlarda Adenin yeşil, Guanin siyah, Sitozin mavi ve Timin kırmızı renkli pikler ile gösterilmektedir. Bu piklerin değerlendirilmesi ile DNA dizi analizi gerçekleştirildi.

BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında bulunan ve daha önce gerçekleştirilen projelerde kontrol olarak kullanılan, ailesinde kanser öyküsü bulunmayan, sağlıklı 150 bireyden aydınlatılmış onam formu alınarak elde edilen DNA'lar bu araştırmada kullanıldı.

4.1. Moleküler genetik analiz sonuçları

Anabilim dalımızda daha önce yüksek risk grubu 75 meme ve/veya over kanserli bireyde BRCA1 ve BRCA2'nin tüm kodlayıcı eksonlarında mutasyon analizi DGGE yöntemi ile yapılmıştır. Her iki gende daha önce literatürde belirlenen değişimlerin yanı sıra BRCA1 geninde H513L, H816P, S1577Y değişimleri, BRCA2 geninde S326R, G258P, E2903K ve N2742S değişimleri olmak üzere biyolojik açıdan tam olarak önemi bilinmeyen yedi tane ilk defa görülen mutasyon saptanmıştır. Bu araştırmada ilk defa tanımlanan bu mutasyonlar, ailesinde herhangi bir kanser öyküsü bulunmayan, sağlıklı bireylerden oluşan 150 bireyin DNA'sında her iki gene özgül eksonlarda araştırılmıştır. BRCA1 geninde; H513L değişimi için 11. eksonun 05. bölgesi, H816P değişimi için 11. eksonun 07. bölgesi ve S1577Y değişimi için 16. ekson bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak amplifiye edilmiştir. Bu eksonik bölgelerin amplikonları %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bu eksonik bölgelerin jel görüntüsüne örnek Şekil 4.1.'de görülmektedir. PCR ile amplifiye edilen BRCA1 geninin eksonlarının amplikon büyüklükleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

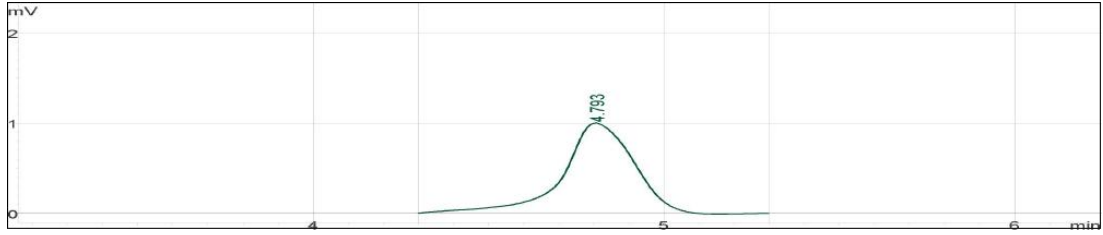


M; Markır, (-); Negatif kontrol

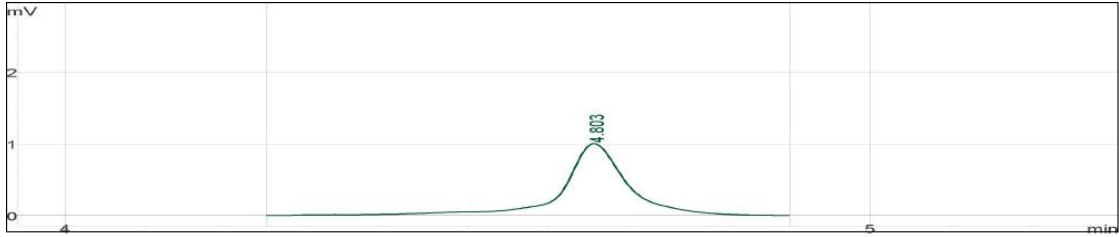
Şekil 4.1. 1-13 olgularına ait BRCA1 geninin 16.eksonunun amplikonlarının agaroz jel görüntüsü.

150 birey DNA'sının BRCA1 geninde 11. eksonun 05. ve 07. bölgeleri ve 16. eksonik bölgelerinin amplifikasyon sonrası ampliconları DHPLC analizine alınmıştır.

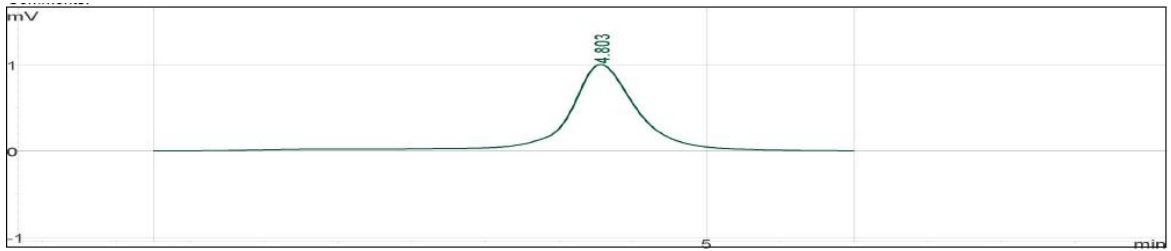
Tüm kontrol olgularının içinden BRCA1 geni için gelişigüzel seçilmiş üç olgunun 11. ve 16. eksonlarına ait normal DHPLC grafikleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.2. BRCA1 geninin 11.eksonunun 05 bölgesine ait normal DHPLC grafiği.



Şekil 4.3. BRCA1 geninin 11.eksonunun 07 bölgesine ait normal DHPLC grafiği.



Şekil 4.4. BRCA1 geninin 16.eksona ait normal DHPLC grafiği.

BRCA2 geninde G258P değişimi için 9, S326R değişimi için 10. eksonun A bölgesi, N2742S değişimi için 18. eksonun B bölgesi ve E2903K değişimi için 21. ekson bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak amplifiye edilmiştir. Bu eksonik bölgelerin ampliconları %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bu eksonik bölgelerin jel görüntüsüne örnek Şekil 4.5.'de görülmektedir. PCR ile amplifiye edilen BRCA2 genlerinin eksonlarının amplicon büyüklükleri Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

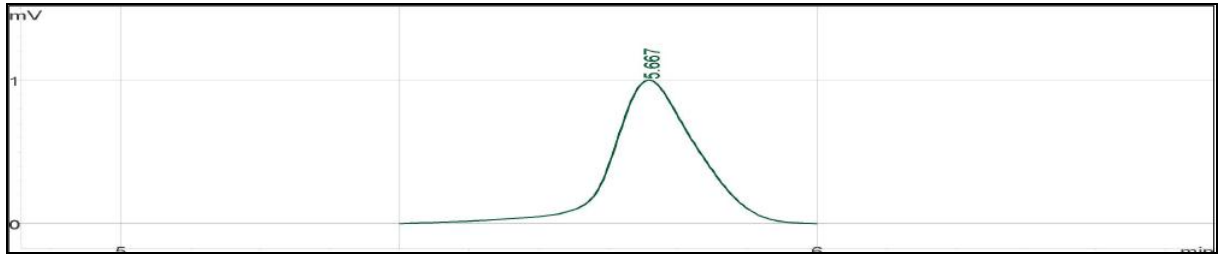


M; Markır, (-); Negatif kontrol

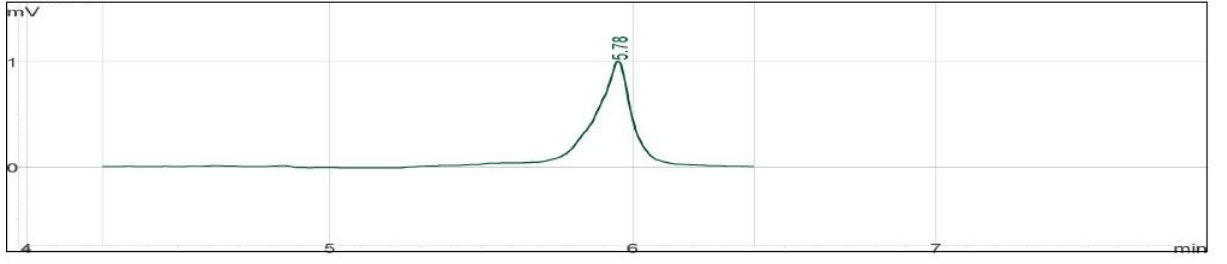
Şekil 4.5. 1-13 olgularına ait BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesinin amplikonlarının agaroz jel görüntüsü.

150 birey DNA'sının BRCA2 geninde 9, 10. eksonun A bölgesi, 18. eksonun B bölgesi ve 21.ekson bölgelerinin amplifikasyon sonrası amplikonları DHPLC analizine alınmıştır.

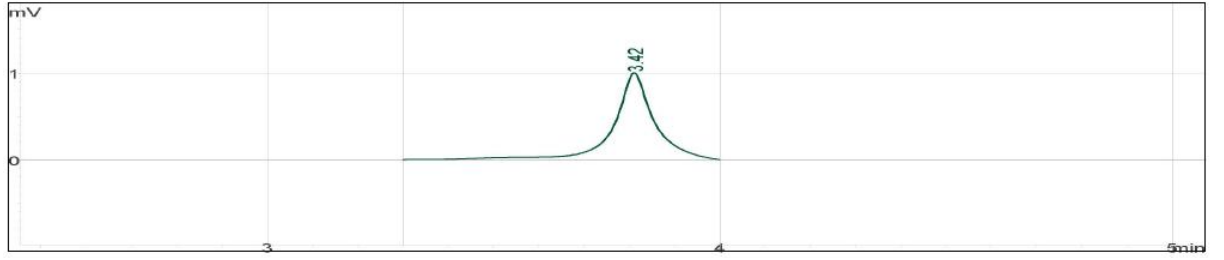
Tüm kontrol olgularının içinden BRCA2 geni için gelişigüzel seçilmiş dört olgunun, 9, 10. eksonunun A bölgesi, 18. eksonunun B bölgesi ve 21. eksona ait normal DHPLC grafikleri aşağıda verilmiştir.



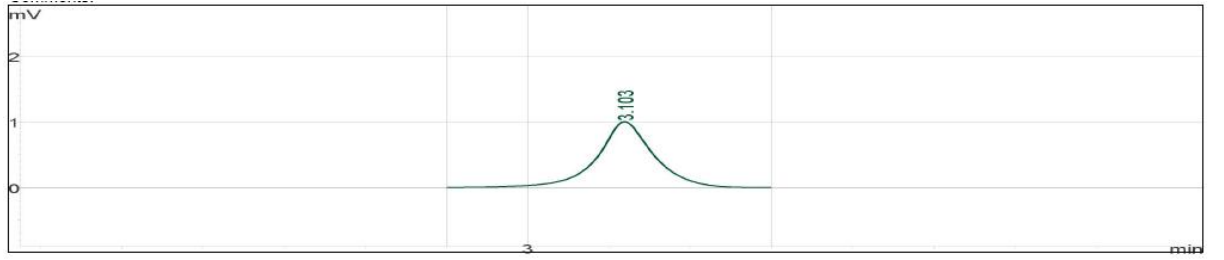
Şekil 4.6. BRCA2 geninin 9.eksonuna ait normal DHPLC grafiği.



Şekil 4.7. BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait normal DHPLC grafiği.



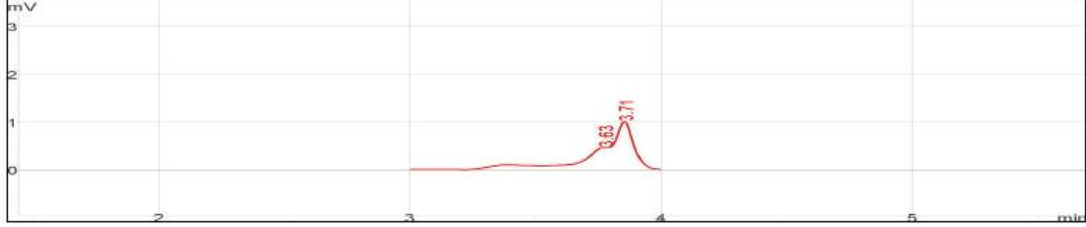
Şekil 4.8. BRCA2 geninin 18.eksonunun B bölgesine ait normal DHPLC grafiği.



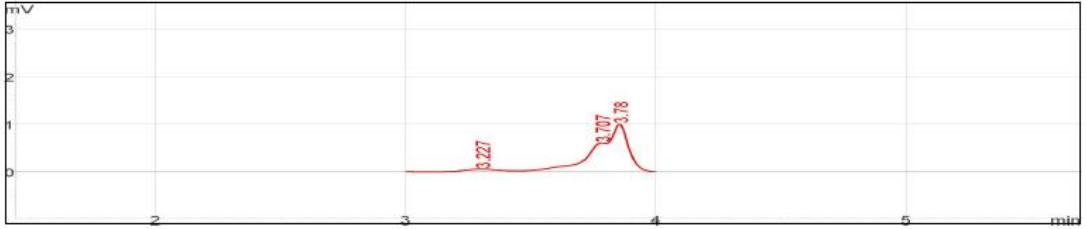
Şekil 4.9. BRCA2 geninin 21.eksonuna ait normal DHPLC grafiği.

DHPLC analizi sonucunda, BRCA1 geninde; 11. eksonunun 05. bölgesi için 55.7°C'lik çalışma koşulunda 5 bireyde, 16. ekson için 55.8°C'lik çalışma koşulunda 8 bireyde, 59.3°C'lik çalışma koşulunda 34 bireyde değişik pikler görülmüştür. Bu piklere sahip bireylerin amplikonları DHPLC cihazında aynı deney koşullarında tekrar analize alınmıştır. Tekrarlanan analiz sonucunda bireylerde değişiklik gözlenmemiş ve yanlış negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

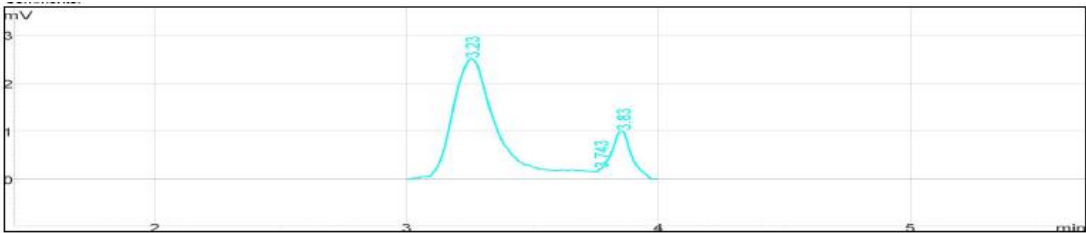
BRCA1 geninde 11.eksonunun 05. bölgesi ve 16. eksonda değişik pikler görülen olguların içinden gelişigüzel seçilmiş üç olgunun DHPLC grafikleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.10. BRCA1geninin 11.eksonunun 05. bölgesine ait DHPLC grafiği.



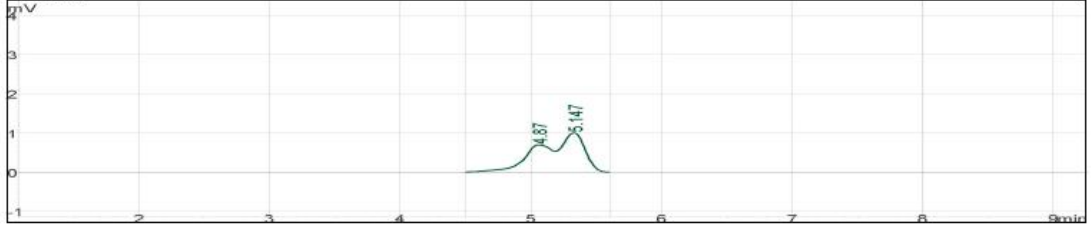
Şekil 4.11. BRCA1 geninin 16. eksonuna ait DHPLC grafiği.



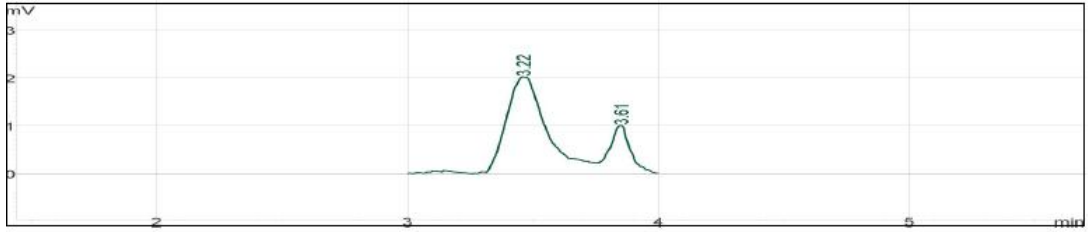
Şekil 4.12. BRCA1geninin 16. eksonuna ait DHPLC grafiği.

BRCA2 geninde 9. ekson için 55°C'lik çalışma koşulunda 2 bireyde, 57°C'lik çalışma koşulunda 15 bireyde, 10. eksonun A bölgesi için 53.7°C'lik çalışma koşulunda 15 bireyde, 18. eksonun B bölgesi için 55 °C'lik çalışma koşulunda 10 bireyde, 59.5°C'lik çalışma koşulunda 20 bireyde, 21. eksonda 55.5°C'lik çalışma koşulunda 5 bireyde, 59.5°C'lik çalışma koşulunda 47 bireyde değişik pikler görülmüştür. Değişik pikler görülen bireyler için yeniden PCR ve sonrasında denatürasyon işlemleri yapılmıştır. Daha sonra bireylerin ampliconları 1-1 oranında yeniden hibridize edildikten sonra DHPLC cihazında tekrar analize alınmıştır. Bu işlemin sonucunda BRCA2 geninde 9.ekson için 57 °C'lik çalışma koşulunda 5 olgu, 10. eksonun A bölgesi için 54.7 °C'lik çalışma koşulunda 5 olgunun ampliconlarında yine aynı değişiklik görülmüş ve bireylerin ampliconları DNA dizi analizine alınmıştır. Bu tekrarlar sonucunda değişiklik gözlenmeyen diğer olgular yanlış negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

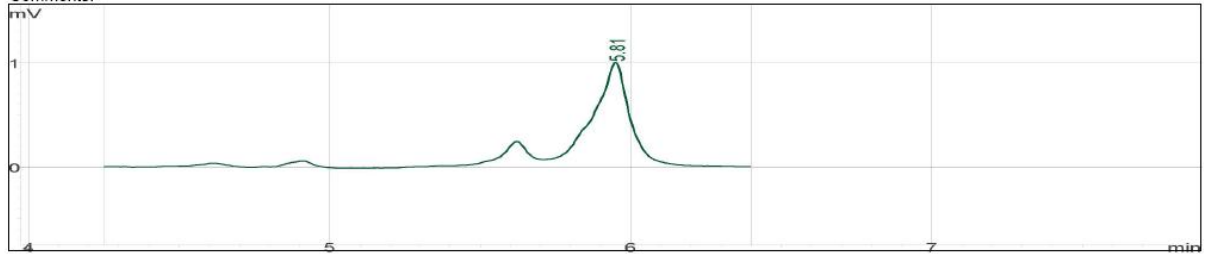
BRCA2 geninde 9, 10, 18 ve 21.eksonlar için değişik pikler görülen olguların içinden gelişigüzel seçilmiş sekiz olgunun DHPLC grafikleri Şekil 4.13.-4.20.'de verilmiştir.



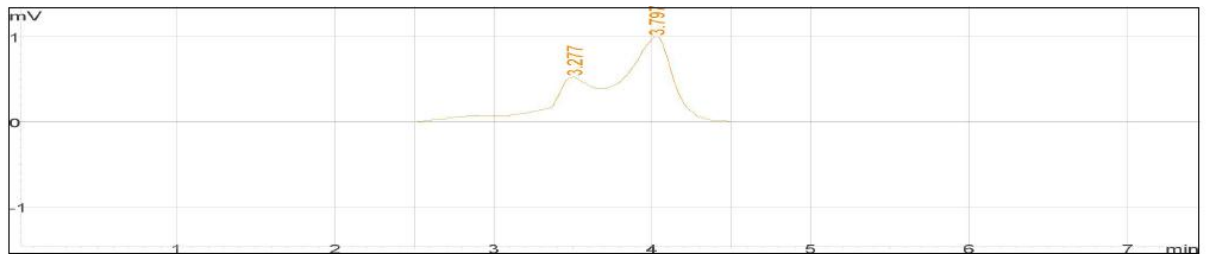
Şekil 4.13. BRCA2 geninin 10. eksonunun A bölgesine ait örneğin DHPLC grafiği.



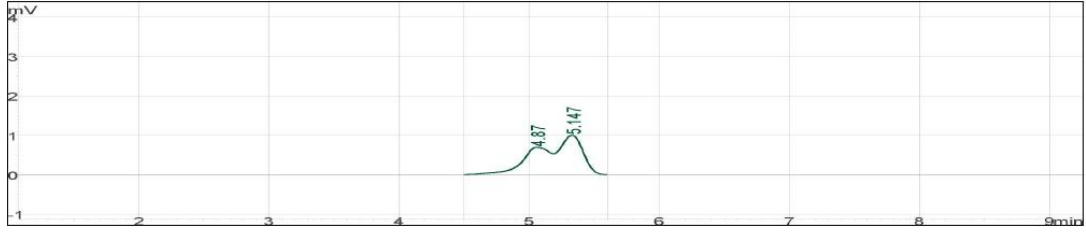
Şekil 4.14. BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait örneğin DHPLC grafiği.



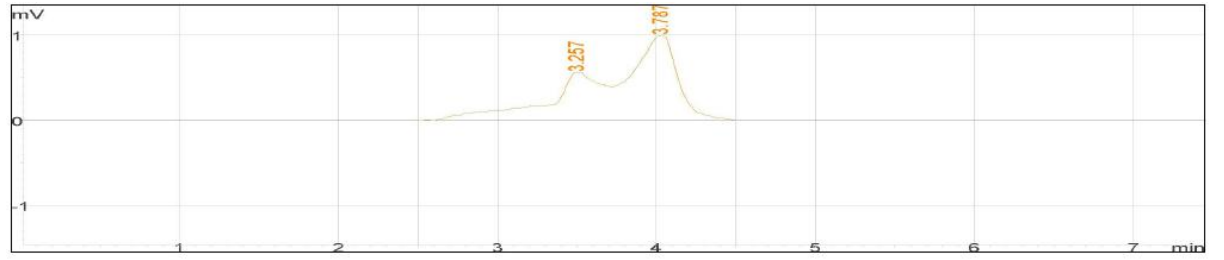
Şekil 4.15. BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait örneğin DHPLC grafiği.



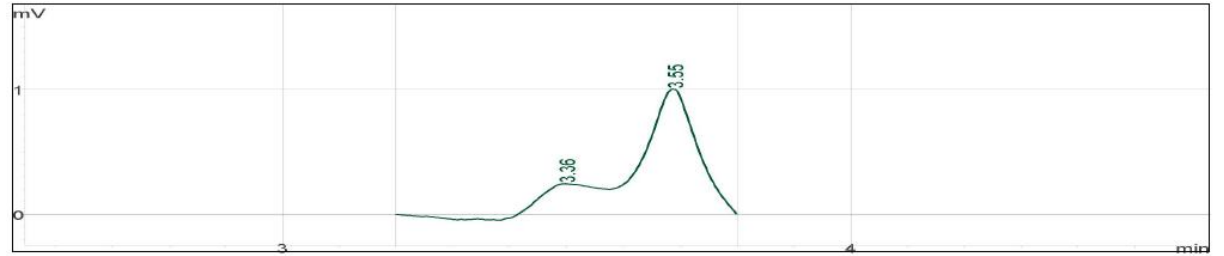
Şekil 4.16. BRCA2 geninin 9. eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği.



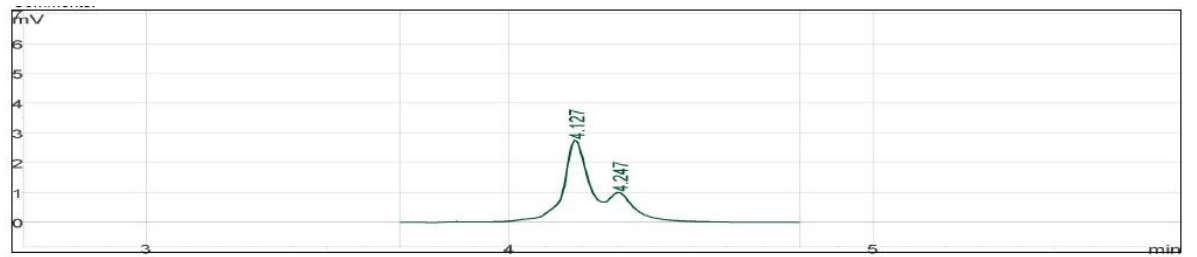
Şekil 4.17. BRCA2 geninin 9. eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği.



Şekil 4.18. BRCA2 geninin 9. eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği.



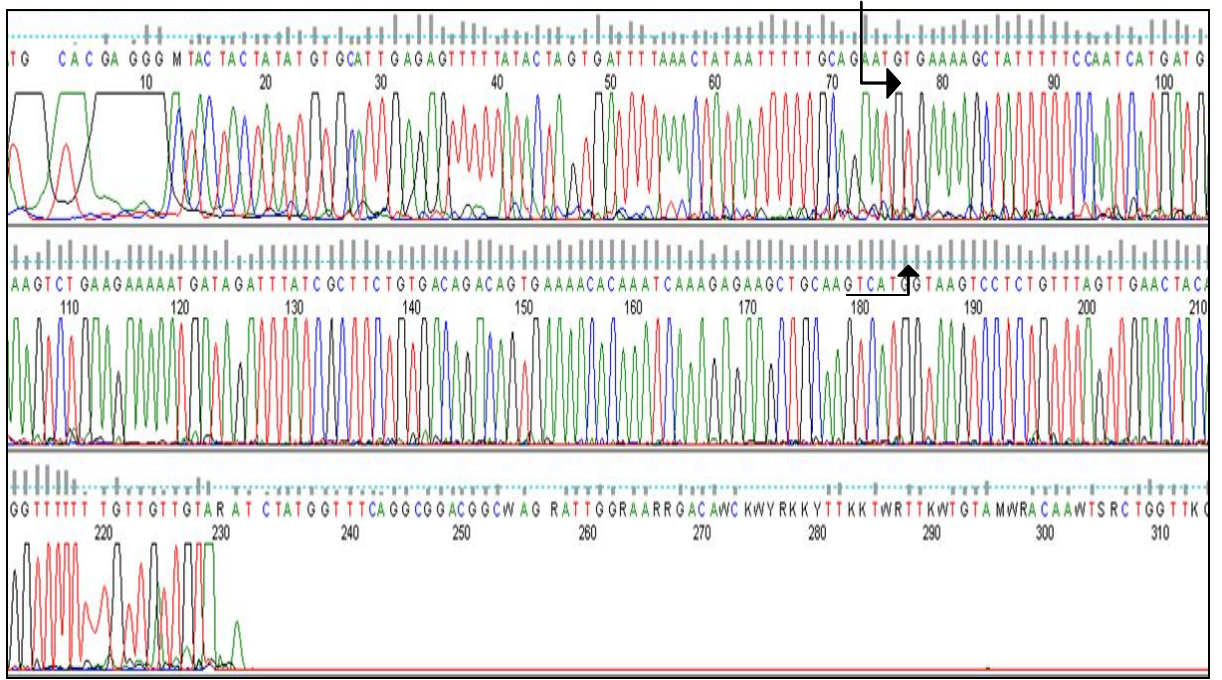
Şekil 4.19. BRCA2 geninin 21. eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği.



Şekil 4.20. BRCA2 geninin 18.eksonuna ait örneğin DHPLC grafiği.

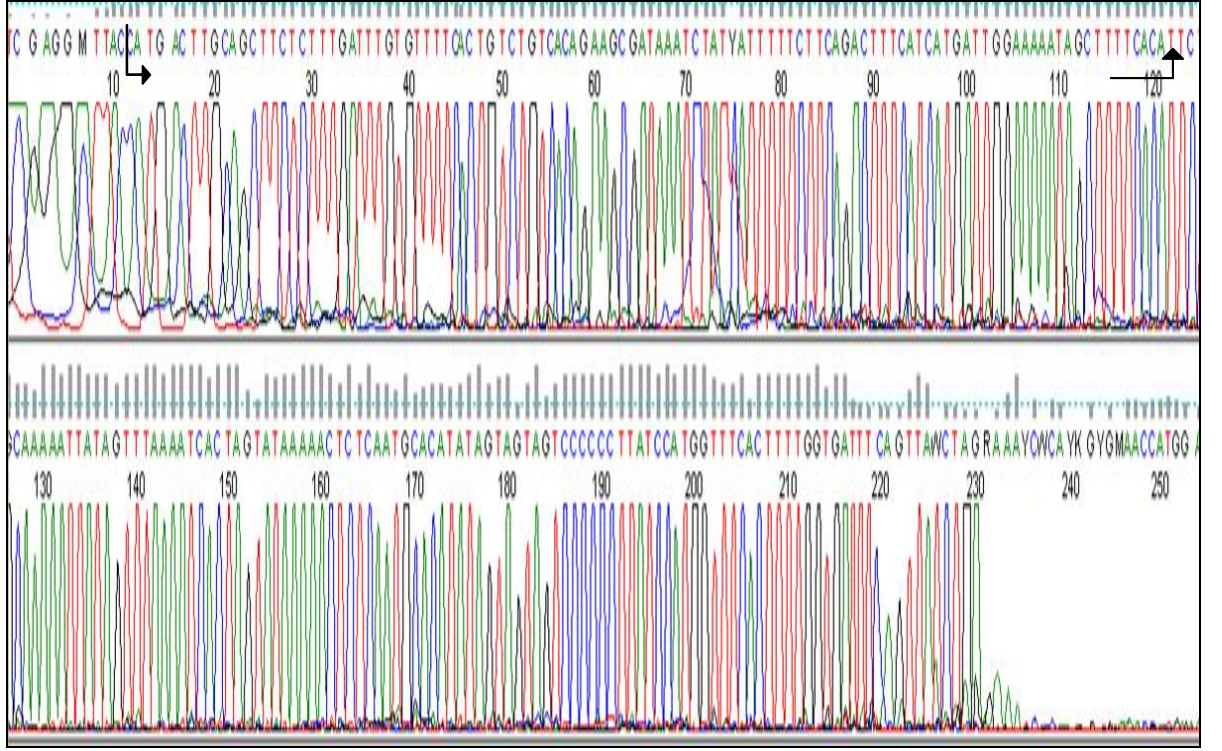
Tekrarlayan analiz sonucu yine değişiklik görülen BRCA2 geninde 9.ekson için 57°C'lik çalışma koşulunda 5 olgu, 10. eksonun A bölgesi için 54.7°C'lik çalışma koşulunda 5 olgu dizi analizine alınmıştır.

DHPLC analizi sonucunda BRCA1 genine ait eksonlarda herhangi bir değişim görülmediğinden dizi analizine alınmamıştır. BRCA2 geninin 9. eksonu ve 10. eksonunun A bölgesinde yapılan dizi analizi sonuçlarında da herhangi bir değişim gözlenmemiştir. BRCA2 genine ait gelişigüzel seçilmiş iki olgunun dizileme sonucu görüntüleri aşağıda verilmiştir.



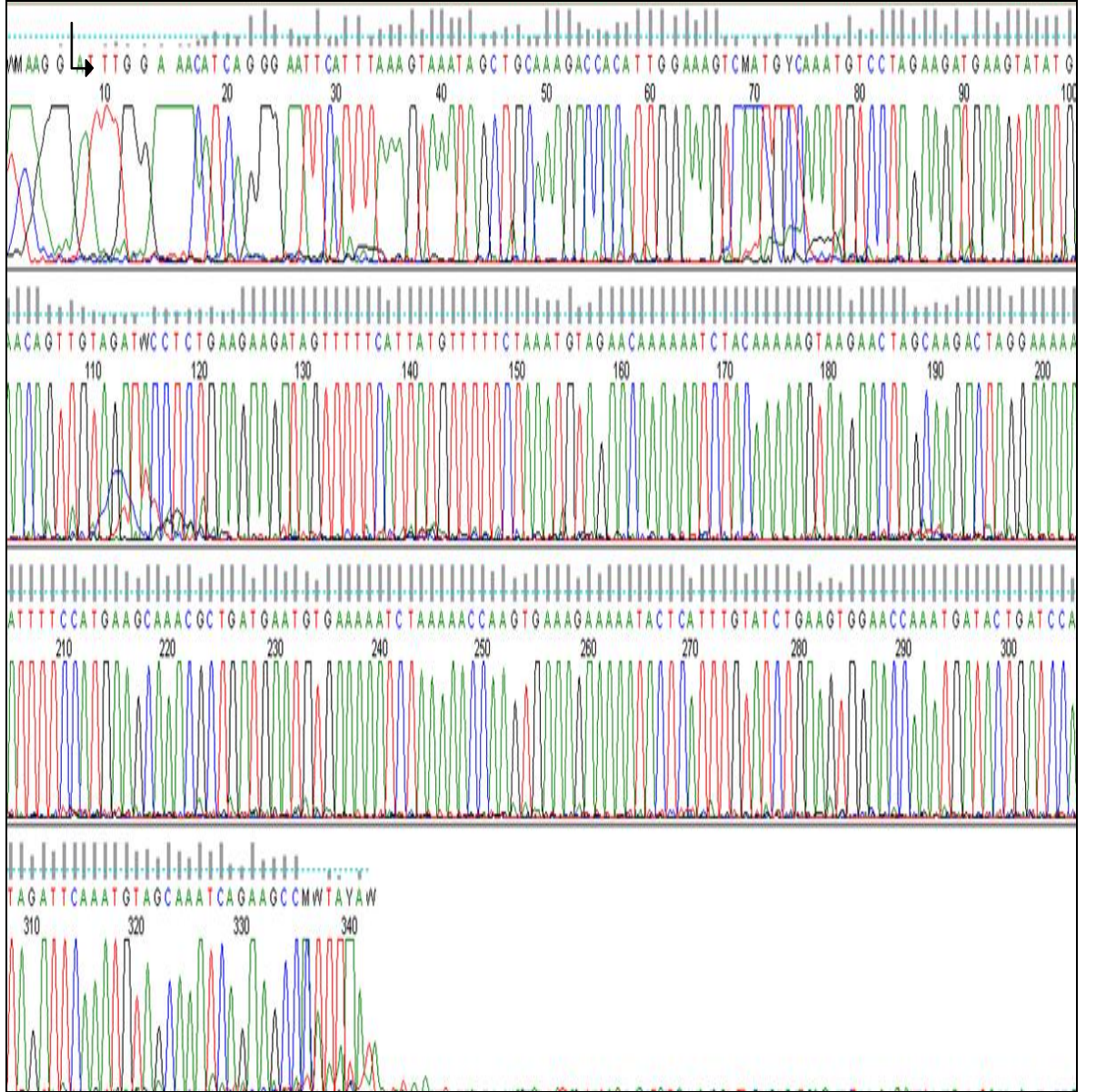
└─ Kodlayıcı bölgenin okuma başlangıcını, ──┬─ kodlayıcı bölgenin okuma bitişini gösterir.

Şekil 4.21. BRCA2 geninin 9.eksonuna ait ileri primer dizini.



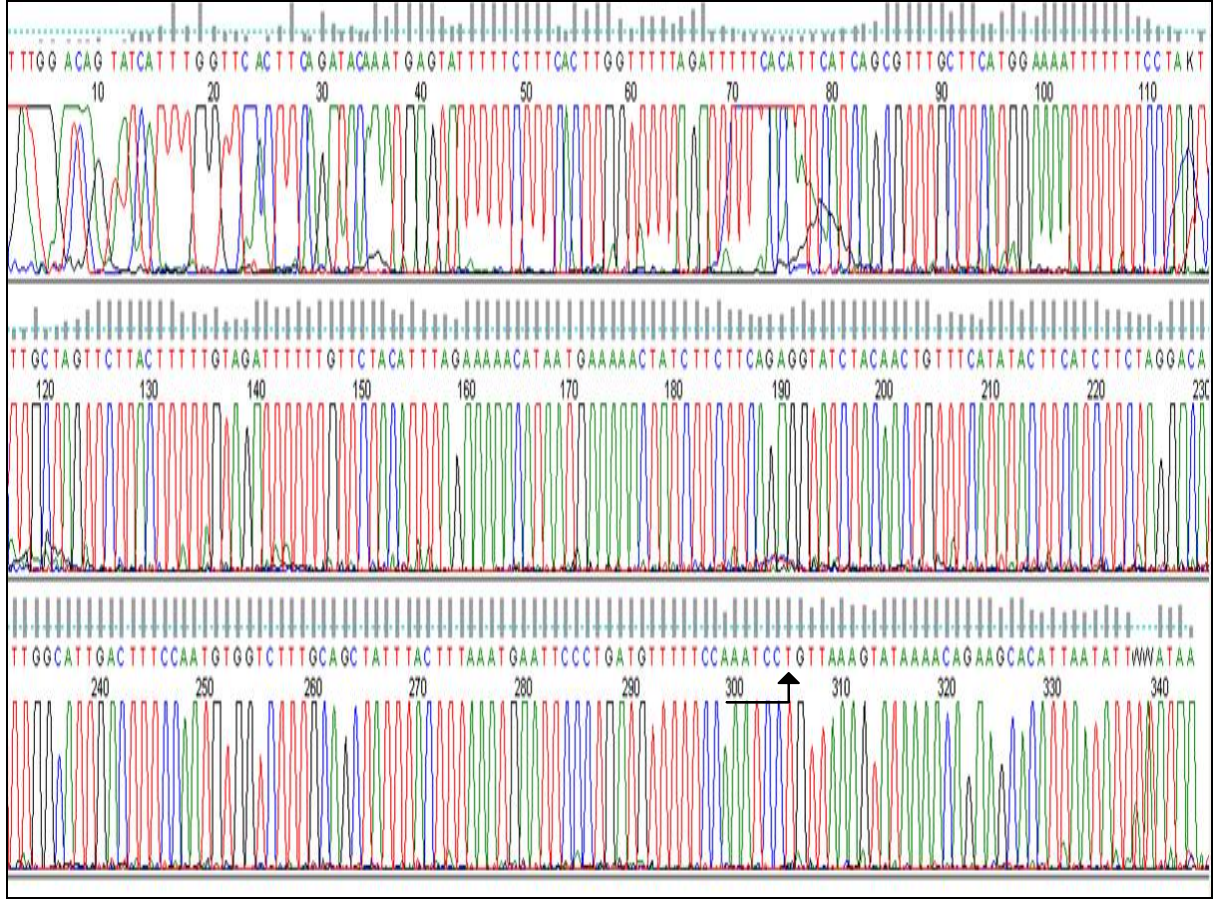
↳ Kodlayıcı bölgenin okuma başlangıcını, ↗ kodlayıcı bölgenin okuma bitişini göstermektedir.

Şekil 4.22. BRCA2 geninin 9.eksonuna ait geri primer dizini.



↳ Kodlayıcı bölgenin okuma başlangıcını göstermektedir.

Şekil 4.23. BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait ileri primer dizini.



↑ Kodlayıcı bölgenin okuma başlangıcını göstermektedir.

Şekil 4.24. BRCA2 geninin 10.eksonunun A bölgesine ait geri primer dizini.

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Kanser çağımızın en korkulan hastalıklarından birisidir. Toplumda her beş kişiden birinin yaşantısının bir döneminde kanser ile karşılaşabileceği bu hastalığın önemini daha da artırmaktadır. Tüm yeni tedavi yaklaşımlarına karşın, halen kanserden ölümler gelişmiş toplumlarda ikinci sırada yer almaktadır (105,106). Kadınlar arasında kansere bağlı ölüm sebepleri içinde meme kanseri ise ilk sıralarda bulunmaktadır. Kanser genetik ve genetik olmayan faktörlerin etkileşiminin neden olduğu kompleks, multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu nedenle meme kanserleri ile ilgili etyolojik ve prognostik çalışmalar önem kazanmaktadır (107). 50 yıldan fazla bir süredir, meme kanseri için pozitif aile öyküsü olan kadınlarda bu hastalığın gelişme riskinin yüksek olduğu bilinmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda meme, over, prostat, kolon ve diğer bazı kanserlerde genetik yatkınlığın önemi gösterilmiştir (108).

Meme kanserli çoğu olgularda erken tanı gerçekleştirilebilmesine rağmen, over kanserlerinin sadece %25'inde evre 1'de tanı konulabilmektedir. Jinekolojik malignensilerin içinde en fazla over kanserinin görülme nedeni, hala biyolojisinin tam anlaşılammış olması ve erken tanıda kullanılabilecek biyobelirteçlerin yetersizliğinden kaynaklanmaktadır (109). Kalıtsal meme/over kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerindeki mutasyonların tanımlanması, ayrıca Lynch sendromunda MSH2 ve MLH1 gibi DNA yanlış eşleşme tamir genlerindeki mutasyonların belirlenmesiyle ailesel over kanserlerinin etiyojisine ait bilgiler de artmıştır. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonların, ailesel over kanseri olan kadınların %90'ından sorumlu olduğu ve bu mutasyonları taşıyan kadınların hayatı boyunca over kanseri geliştirme riskinin %60-70 kadar yüksek olduğu bildirilmiştir (110).

Evrimsel süreçte tüm türlerin farklılaşmasından ve bir türün üyeleri arasındaki farklılıklardan genetik çeşitlilik sorumludur. Genlerde, genetik çeşitliliğe yol açan bu değişikliklerden biri polimorfizmdir. Dünyada bir çok bireyin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA dizileri birbirine benzerlik gösterir. Popülasyonda iki farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 baz çifti uzunluğundaki herhangi bir bölgesi ortalama sadece bir baz çifti değişimi içerir. Alleller yaygın olduğu zaman genel popülasyonda kromozomlarda %1'den daha fazla bulunur, bunlar da genetik polimorfizm olarak bilinir. Tersine alleller %1'den daha az sıklıkta ise, nadir değişimler olarak isimlendirilirler. İntronlarda ve genler arasında lokalize olmuş DNA dizilerinde değişim gösteren bazı alleller vardır. Bunlar herhangi bir genin işlevi için önemsizdir ve sadece doğrudan DNA analizleri ile belirlenir. Genlerin kodlanan dizi değişimleri farklı protein çeşitliliğine, bu durum da farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olur. Genetik hastalığa neden olan zararlı mutasyonların birçoğu nadir değişimlerdir. Ağır genetik hastalığa neden olan mutant alleller genetik çeşitliliğin bir sonucudur. Bu tür polimorfizmler, DNA dizilerindeki farklılıkların bir

sonucudur. DNA analizlerinden çok, değişik proteinler üzerindeki çalışmalar, daha fazla bilgi verici olmaktadır. DNA dizilerinin değişimlerinden daha çok polimorfik allellerin ürünü olan bu proteinler, farklı fenotiplerden sorumludur. Bu nedenle, çevre ile birey arasındaki ilişkiyi, genetik çeşitliliğin nasıl etkilediğini açıklayan bu değişik proteinlerdir. Regülatör bölgede polimorfik alleller, genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotiplerin belirlenmesinde önemli rol oynayabilir. Herhangi bir bireyin, tüm lokusların yaklaşık %20'sinde, allellerin yapısal olarak farklı polipeptidler için heterozigot olabildiği gösterilmiş, farklı etnik gruplardan bireyler kıyaslandığında, proteinlerin büyük bir kısmının tesbit edilebilen polimorfizmi gösterdiği saptanmıştır. Böylece, kendi enzimlerinin sentezi ve diğer gen ürünlerini içeren insan türleri içinde, önemli derecede biyokimyasal bireysellik vardır. Buradan, sağlık durumu her ne olursa olsun, her bir bireyin genetik olarak kendi kimyasal oluşumuna sahip olduğu ve bu nedenle çevreye, beslenmeye ve farmakolojik etkilere kendine özgül cevap vereceği sonucu ortaya çıkmaktadır (111).

Genetik polimorfizmler, tıpta bazı hastalıklara karşı duyarlılıkta kişisel farklılıkları belirlememizi sağlar. Bazı gen polimorfizmleri bir hastalık riskini arttırırken bazıları azaltabilmekte (koruyucu allel), bazı polimorfik alleller ise yalnızca çevresel bir faktörün etkisi altındayken riski etkileyebilmektedir. Örneğin, kalıtsal kanserlerde bazı genetik faktörler riski arttırırken, kalıtsal olmayan (sporadik) kanserlerde çevresel faktörler daha belirleyici olabilmektedir. Çünkü çevredeki bir risk faktörü bir ya da daha fazla genin ifade edilmesini etkileyerek, ya da bir polimorfik gen ürünü bir çevresel faktörün etkisini değiştirerek kansere neden olabilmektedir (31). Polimorfizm ve mutasyon arasındaki eşik değeri, %1 olarak alındığında, popülasyonda %1 veya daha fazla sıklıkta görülen DNA dizi alternatifleri polimorfizm olarak, %1 den daha az sıklıkta görülenler ise mutasyon olarak sınıflandırılır. Dolayısıyla 150 kontrol grubunda yapmış olduğumuz bu çalışmada, daha önce yapılan araştırmada BRCA1 geninde bulunan H513L, H816P, S1577Y değişimleri ve BRCA2 geninde belirlenen S326R, G258P, E2903K ve N2742S değişimleri hiç görülmediğinden ve < % 1 oranında olduğundan ayrıca literatürde de yer almadığından, ilk defa görülen yeni mutasyonlardır diyebiliriz.

Mutasyon taraması için bilinen pek çok yöntem vardır. Mutasyon taraması için doğrudan DNA dizi analizinin kullanılması hem maliyeti çok yüksek hem de uzun süren bir yöntemdir. Bu nedenle bu araştırmada geniş ölçekli mutasyon taramalarında özellikle genomik yapısı büyük genler için bir ön tarama yöntemi olan ve bilinmeyen mutasyonların taramasında kullanılan DHPLC yöntemi tercih edilmiştir. DNA molekülünün en temel özelliklerinden birisi, ısı veya denatüre edici ajanlara karşı, çift sarmal yapısını koruyamayarak öncelikle çift hidrojen bağlarıyla tutunmuş A=T bölgelerinden açılmaya başlayıp bunu üç bağ bulunan GC çiftlerinin izleyerek denatüre olmasındır. Diğer bir ifadeyle, A-T oranı G-C oranından daha fazla olan DNA'nın erime ısısı (T_m), diğerine göre daha düşüktür. DHPLC'nin temel özelliği, DNA denatürasyonuna dayanır. Gelişmiş bir kromatografi yöntemi olan DHPLC tekniğinde, hasta ya da şüpheli olguya ait ilgilenilen DNA bölgesinin yanında, ortama polimorfizm veya mutasyon içermeyen referans homodubleks (wildtype) DNA konulur. Bu şüpheli ve referans DNA'nın ısı ile denatüre edilmesi sağlandıktan sonra yavaşça soğutulurak kendi aralarında komplementerizm esasına

göre hibridizasyonu sağlanır. Bireyde heterozigotluk veya homozigotluk olup olmamasına göre iki DNA'nın kendi aralarında birleşmesi sağlanır. İşlemin iki fazı vardır: 1) durağan faz, 2) mobil faz. Durağan fazda Trietilamonyumsülfat (TEAA) iyonları kullanılarak DNA'nın polistren divinil benzenden oluşmuş kolona bağlanmaları sağlanır. Mobil fazda Asetonitril (ACN) solüsyonu kullanılarak kolon matriksine yapışmış DNA'ların gevşetilip bırakılması sağlanır. İlk aşamada heterodubleks DNA'lar yüzeye tutunur ve arkasından da homodubleks DNA'lar gelir. Çünkü homodubleksler heterodublekslere göre matrikse daha sıkı bağlanmışlardır. Bu yöntem kullanılarak bir ön taramadan geçirilen hastaların incelenen DNA dizilerinde bir fark gözleendiğinde DNA dizi analizi yapılarak meydana gelen baz değişiklikleri saptanmaktadır. Mutasyon ön taramalarında kullanılan bu teknik hızlı, kolay, etkin, oldukça verimli bir yöntemdir ve optimize edilmiş DHPLC'nin heterozigot sekans değişimlerini saptama oranı değişen laboratuvar ve teknik koşullara bağlı olarak %94-100 civarındadır (112). Hasta sayısının fazla olması, incelenen gen ya da genlerin uzun bir genomik DNA dizisine sahip olması, bulunan farklı mutasyon ve polimorfizmlerin her seferinde kontrol grubunda yeniden çalışılması gerektiği için bir ön tarama yöntemi olarak bu yöntem tercih edilmektedir. İsveçli meme-over kanserli 350 aile, ailesel ve kişisel meme-over kanseri olmayan 70 kontrol grubunda BRCA1/BRCA2 genlerindeki değişimler hızlı ve etkili bir yöntem olduğundan DHPLC yöntemiyle incelenmiştir. Sonuçta bu iki gene ait 80 önceden tanımlanmış mutasyon (BRCA1 geninde 51, BRCA2 geninde 29), 61 klinik önemi bilinmeyen değişim (BRCA1 geninde 36, BRCA2 geninde 25) ve 23 yeni mutasyon (2 anlamsız, 12 yanlış anlamlı, 3 çerçeve kayması, 6 intronik değişim) gözlenmiştir. Bulunan yeni değişimlerden ikisi kontrol grubunda > %1 oranında olduğundan polimorfizm olarak değerlendirilmiştir (113). Koreli 1020 meme kanserli birey, ailesel ve kişisel meme kanseri olmayan 167 kontrol grubu, BRCA1/BRCA2 genlerindeki mutasyonlar incelenen birey sayısının fazlalığından ve sağladığı kolaylıklar açısından DHPLC yöntemiyle incelenmiştir. Sonuçta 78 mutasyon gözlenmiştir. Bunlar, 14 delesyon, 38 yanlış anlamlı, 26 polimorfizmdir. 14 delesyon mutasyonunun 3 tanesi BRCA1'de, 3 tanesi de BRCA2'de yeni mutasyon olarak tanımlanmıştır. Bulunan yeni değişimlerden ikisi kontrol grubunda > %1 oranında olduğundan polimorfizm olarak değerlendirilmiştir (114). Yine Koreli 793 sporadik meme kanserli birey, mamografi analizi yapılmış, kendisinde ve ailesinde meme kanseri olmayan 167 normal birey DHPLC yöntemiyle incelenmiştir. 793 bireyde BRCA1/BRCA2 genlerinde toplam 79 değişim gözlenmiştir. Bunlar, 38 yanlış anlamlı, 26 polimorfizm ve 15 delesyon (11 çerçeve kayması 4 anlamsız) mutasyonlarıdır. Bu 79 değişimden 34 tanesi yeni değişim olarak açıklanmıştır. 34 yeni değişim kontrol grubunda gözlenmemiştir. (115).

Bizim araştırmamızda da avantajlarının daha fazla olması nedeniyle bu yöntem tercih edilmiştir. Ancak çalışılan grupta, BRCA1 geninde 16, BRCA2 geninde 9, 10. eksonun A bölgesi, 18. eksonun B bölgesi, 21. eksonun her birinin iki adet sıcaklık derecesi olduğundan arka arkaya çoğu örnekte değişik pikler görülmüştür. Eksonların DHPLC için çalışma sıcaklıkları Çizelge 3.6.'da verilmiştir. BRCA1 geninde 16. ekson için 55.8°C'lik çalışma koşulunda 8 birey, 59.3°C'lik çalışma koşulunda 34 birey; BRCA2 geninde, 9. ekson için 55°C'lik çalışma koşulunda 2 birey, 57°C'lik çalışma koşulunda 15 birey, 10. eksonun A bölgesi için 53.7°C'lik çalışma koşulunda 15 birey, 18. eksonun B bölgesi için 55°C'lik çalışma koşulunda

10 birey, 59.5°C'lik çalışma koşulunda 20 birey, 21. eksonda 55,5°C'lik çalışma koşulunda 5 birey, 59.5°C'lik çalışma koşulunda 47 bireyde değişik pikler görülmüştür. Değişik pikler görülen bireyler için yeniden PCR ve sonrasında denatürasyon işlemleri yapılmıştır. Daha sonra bireylerin amplikonları 1:1 oranında yeniden hibridize edildikten sonra DHPLC cihazında tekrar analize alınmıştır. Bu işlemin sonucunda sadece BRCA2 geninde 9.ekson için 57 °C'lik çalışma koşulunda 5 olgu, 10. eksonun A bölgesi için 54.7 °C'lik çalışma koşulunda 5 olgunun amplikonlarında yine aynı değişiklik görülmüş ve bireylerin amplikonları DNA dizi analizine alınmıştır. Bu tekrarlar sonucunda değişiklik gözlenmeyen diğer olgular yanlış negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir. 350 meme ve/veya over kanserli İsveçli ailede aynı yöntemle yapılan çalışmada da benzer sorunlar olduğu görülmüştür. Bu da bize cihazın o anda çalışırken karşılaştığı bir sorun olabileceğini düşündürmüştür. DHPLC cihazı hassas bir cihazdır. Bulunduğu mekanın sıcaklığı, 20°C'den yüksek olduğu takdirde, cihazın stabilitesinin bozulduğu ve değişik pikler verdiği gözlenmiştir. Diğer bir neden de, analizlerden önce test edilen ve referans olguların DNA'larının 1:1 oranından farklı miktarlarda karıştırılmasıdır. PCR protokolü optimize edilmediği zaman da değişik pikler görülmüştür. Araştırmamızda da değişik pikler görülen örnekler önce aynı deney koşullarında tekrar analize alınmıştır. İkinci analiz sonucunda da değişik pikler görülen örneklerin PCR, denatürasyon ve hibridizasyon işlemleri bir kez daha tekrarlanarak DHPLC cihazında çalışılmıştır. Aynı zamanda cihazın bulunduğu odanın sıcaklığı düşürülmüştür. Bu işlemler sonucunda da hala değişik pikler gördüğümüz BRCA2 geninde 9. eksona ve 10. eksonun A bölgesine ait toplam 10 bireyin örnekleri DNA dizi analizine alınmış ve değişim saptanmamıştır. 150 bireyde toplam 7 bölge çalışıldığından ve sonuçta 10 birey için dizi analizi yapıldığından yöntemin hata payı % 0.95 olarak hesaplanmıştır. DHPLC yönteminin bu genlerin mutasyon taramalarında optimum koşullar sağladığında, literatürde olduğu gibi güvenilir bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Ülkemizde kalıtsal meme/over kanserli olgularda BRCA1/BRCA2 genleri ile ilgili yapılan sadece belli eksonların çalışıldığı çalışmalardan birinde 53 ailesel meme ve/veya over kanseri, 52 erken yaş meme kanseri olmak üzere toplam 105 Türk olgu bulunmaktadır. Bu çalışmada BRCA1'in 2, 11, 14, 20. BRCA2'nin 11. eksonu PTT ya da heterodubleks analizleri ile taranmış, biri meme diğeri over kanseri olmak üzere iki hastada BRCA1 5382insC ve her biri farklı olguda bulunmak üzere BRCA1 1623delTTAAA, 2139delC, 3819delGTAAA, 247delT, 4508delC, IVS-14+1delG ve BRCA2 5295insC, 6656delC mutasyonları saptanmıştır (116). Başka bir çalışmada 6 kalıtsal, 7 ailesel, 27 erken yaş ve 10 erkek olmak üzere yüksek risk grubu meme ve/veya over kanserli 50 Türk olguda BRCA1 geninin 2, 5, 11, 13, 20, 24. eksonları ve BRCA2 geninin 11. eksonları taranmış, 23 hastada belirlenen 5 farklı polimorfizme ek olarak iki bireyin BRCA2 geninde 3034delAAAC ve 6880insG; farklı iki bireyin BRCA1 geninde de 1201insA ve 2080A-->G mutasyonlarından biri saptanmıştır (117). Her iki gene ait tüm eksonların tarandığı çalışmalar ise çok azdır. Bu yayınlardan birinde, yüksek risk grubu meme ve/veya over kanseri olan 15 olguda, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin tüm eksonları PTT ya da CSGE (konformasyona duyarlı jel elektroforezi) yöntemleri kullanılarak taranmış BRCA2 3414delTCAG, BRCA1 5622C-->T ve BRCA1 5382insC mutasyonlarından biri saptanmıştır (118). Yine başka çalışmada 15 ailesel, 87 ailesel

olmayan over kanserli olguda her iki gende PTT yöntemi ile mutasyon tarama çalışması sonucunda 17 hastada mutasyon gösterilmiştir (119). Yine başka bir çalışmada 87 ailesel meme ve /veya over kanserli olgu DNA dizi analizi yöntemi ile iki grup halinde çalışılmıştır. BRCA1 geninde 5382insC mutasyonu ve yeni bir polimorfizm (3663C-->A), ve BRCA2 geninde iki yeni mutasyon (9329insC ve 9934insG), bir yeni intronik polimorfizm 7069+41(TTTT-->AAAG), ve önceden rapor edilen genel bir polimorfizm (1093A-->C) bulunmuştur (120).

Anabilim dalımızda daha önce yapılan çalışmada, 26 ailesel meme ve/veya over kanser hastası, 6 bilateral meme kanseri hastası, 3 hem meme hem over kanseri hastası, 32 erken yaş grubu meme kanseri hastası, 5 erken yaş grubu over kanseri hastası ve 3 erkek meme kanseri hastası olmak üzere toplam 75 hasta DNA'larında her iki genin tüm eksonları PTT ve DGGE yöntemleri ile taranmıştır. Bu genlere ait biyolojik açıdan önemi tam olarak bilinmeyen yanlış anlamlı mutasyonlar, polimorfizmler ve intronik bölge değişimleri ve ilk olarak saptanan değişimler bulunmuştur (110).

Literatürde ilk olarak saptanan bu değişimlerden birincisi, 39 yaşında meme kanseri olan hastada BRCA1 geninin 11. eksonunun 05 bölgesinde saptanan cDNA'da 1657. pozisyonda A-T değişimi sonucu protein düzeyinde H513L değişimine neden olan yanlış anlamlı mutasyondur. BRCA1 proteininin 513'üncü amino asitinin işlevsel görevinin tam önemi bilinmemekte ancak proteinin 341 ve 748'inci kodonları arasındaki bölgenin, RAD50 ile etkileşime giren bölge olduğu ve çift zincir kırıklarının tamirinde RAD50'nin rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca yapılan araştırmalar beta-tabakası oluşturucu Histidin'in alfa-heliks oluşturucu Lösin'e dönüşümünün negatif bir değere sahip olduğunu ve bununda non-konservatif bir mutasyon olduğunun göstergesi olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (110). Bu mutasyon 150 sağlıklı kontrol grubunda taranmış ve hiçbir kontrol bireyde görülmemiştir. Böylece H513L mutasyonunun protein işlevini etkileyen bir mutasyon olabileceği sonucu ortaya çıkmıştır.

Literatürde ilk olarak saptanan ikinci değişim, 70 yaşında bilateral meme kanseri tanısı almış hastanın BRCA1 geninin 11. eksonunun 07 bölgesinde H816P değişimidir. cDNA'da 2566. noktada A-C değişimi nedeniyle oluşan yanlış anlamlı mutasyondur. Yapılan araştırmalar BRCA1'in, 758 ve 1064. kodonları arasında kalan bölgesinin, DNA çift zincir kırıklarının tamirinde rol oynayan RAD51, proteini ile etkileşime giren bölge olduğunu göstermiştir (110). Bu mutasyon 150 sağlıklı kontrol grubunda taranmış ve yine hiçbir kontrol birey DNA'sında gözlenmemiştir. BRCA1'in 11. eksonu tarafından kodlanan amino asitlerle RAD51 geni arasındaki etkileşimin nasıl olduğu henüz bilinmemektedir. Ancak DNA tamirine karşı oluşturulacak cevap için oldukça önemli olduğu ve evrimsel süreçte çeşitlenme ile ilgili olduğundan işlevsel olarak önemli olduğu düşünülmektedir.

Literatürde ilk olarak saptanan üçüncü değişim 36 yaşında tanı almış meme kanseri hastasında BRCA1 geninde 16. eksonda c.4849 C-A dönüşümü nedeniyle oluşan S1577Y yanlış anlamlı mutasyondur. Yapılan araştırmalara göre, BRCA1'in

C-terminal bölgesinde 16-24'üncü eksonları kapsayan bölgenin GAL4 DNA bağlayıcı domain ile birleşerek maya ve memeli hücrelerinde transkripsiyonu aktive edebileceğini ve Serin-Tirozin değişiminin oldukça düşük bir frekansa sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Serin'in hidroksilik gruplar içeren bir yan zinciri varken, Tirozinin aromatik halka içerdiği göz önüne alındığında; S1577Y mutasyonunun non-konservatif bir mutasyon olarak değerlendirilebileceği ve hastalık yapıcı etkisinin olabileceği düşünülmüştür (110). Bu mutasyon da 150 sağlıklı kontrol grubunda görülmemiştir.

Literatürde ilk olarak saptanan dördüncü değişim, 59 yaşında over kanseri tanısı almış ve kızkardeşinin kızında da 40 yaşında over kanseri hikayesi olan bir olguda BRCA2 geninde 9. bölgede G258P yanlış anlamlı mutasyondur. c.1001 A-C değişimi sonucu oluşmuştur (110). Bu mutasyon da 150 sağlıklı kontrol grubunda görülmemiştir. Mutasyonla BRCA2'nin 1001'inci pozisyonunda, alifatik yan zincirli ve polar yapıdaki Glisin, non-polar yapıdaki Prolin'e dönüşmüştür. Ayrıca yapılan araştırmalara göre Glisin ile Prolin arasındaki benzerlik indeksi düşük olduğundan non-konservatif bir mutasyon olabileceği düşünülmüştür.

Literatürde ilk olarak saptanan beşinci değişim, 37 yaşında meme kanseri tanısı almış bir olguda BRCA2 geninin 10. eksonunun A bölgesinde oluşan S326R yanlış anlamlı mutasyondur. c.1204 A-C dönüşümü ile gerçekleşmiştir (110). Bu mutasyon 150 sağlıklı kontrol grubunda taranmış ve sonuçta hiçbir kontrol bireyin DNA'sında görülmemiştir. Yapılan araştırmalara göre Serin amino asidi hidroksilik gruplar içeren bir yan zincire sahipken, Arjinin amino asidinin bazik grup içeren bir yan zincire sahip olması ve bu iki amino asitin polar yapıda olması nedeniyle, mutasyonun protein yapı ve fonksiyonuna fazla etki göstermeyebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde ilk olarak saptanan altıncı değişim, 50 yaşında over kanseri tanısı almış bir olguda BRCA2 geninin 21'inci bölgesindeki E2903K yanlış anlamlı mutasyondur. Bu mutasyon c.8935 G-A dönüşümü sonucu oluşmuştur. Bu mutasyon da 150 sağlıklı kontrol grubunda görülmemiştir. Yapılan araştırmalar, BRCA2'nin 2479'uncu ve 3152'inci kodonları arasındaki geniş karboksil bölgesinin, insanla kemirgenler arasında %86 benzerliğe sahip olduğunu göstermiştir (110). Ayrıca Glutamik asitin Lösin'e dönüşümü, konservatif olarak kabul edilmekte olup, iki amino asit de polar yapıdadır. Ancak, Glutamik asit, asidik bir yan zincire sahipken, Lösin alifatik yan zincire sahiptir. Bu nedenlerle bu mutasyonun da hastalık yapıcı bir mutasyon olduğu düşünülmektedir.

Literatürde saptanan son değişim de BRCA2 geninin 18. eksonunun B bölgesindeki N2742S mutasyonudur. cDNA'da 8453. pozisyonda G-A dönüşümü ile gerçekleşmiştir. Asparajin amino asidi serine dönüşmüştür. Asparajin amino asiti asidik grup içeren yan zincire sahip ve polar yapıdadır. Serin amino asiti hidroksilik grup içeren yan zincire sahip ve polar yapıdadır (121). Bu son mutasyon da 150 sağlıklı kontrol grubunda taranmış ve sonuçta hiçbir kontrol DNA'sında gözlenmemiştir. Mutasyonun biyolojik açıdan tam önemi bilinmemekle birlikte, bu

iki amino asitin de polar yapıda olması nedeniyle bu mutasyonun protein yapı ve işlevine fazla etki göstermeyebileceği tahmin edilmektedir.

Bulunan ilk mutasyonlarla ilgili olarak bu bilgiler bulunmasına rağmen yine de sadece Türk toplumuna özgü bir polimorfizm mi yoksa patolojik bir mutasyon mu olduğunu belirleyebilmek için sağlıklı bireylerde bu mutasyonların araştırılması gerekmekte idi. Bu nedenle bizde bu çalışmamızda, bulunan mutasyonların Türk toplumu için polimorfizm mi yoksa yeni bir mutasyon mu olup olmadığını saptayabilmek için, ailesinde herhangi bir kanser öyküsü bulunmayan, sağlıklı bireylerden oluşan 150 bireyin DNA'sını DHPLC yöntemiyle analiz edip, değişik pikler görülen örnekleri dizi analizine aldık. Yaptığımız analizlerde 150 kontrolde değişiklik saptanmadı. Bu çalışmamızdan sonra, önceki araştırmada literatürde ilk defa bulunmuş olan bu mutasyonların, Türk toplumunda meme/over kanserleri için yeni bir hastalık yapıcı mutasyon olabileceğini söyleyebiliriz. Biyolojik olarak önemi bilinmeyen bu yanlış anlamlı mutasyonlar için bu aşamadan sonra, işleve yönelik araştırmaların yapılması gerekmektedir. Örneğin, mutasyonların proteinin hangi kısmına denk geldiği protein fonksiyonlarının bilinmesi açısından önemli olduğu için, konformasyonel protein çalışmaları yapılabilir.

Sonuç olarak günümüzde yapılan genetik araştırmalar sonucunda BRCA1 ve BRCA2 ile ilişkili olarak saptanan de novo mutasyonların gün geçtikçe arttığı düşünülürse hastalıkla ilişkili olarak moleküler tarama stratejisinin doğru tanımlanması önem kazanmaktadır. Mutasyon bulunan diğer ailelerin fertlerinde de gerekli çalışmalar yapılmalıdır. Bu çalışmaların ışığında hekime bilgi verilmeli ve bireylere doğru bir şekilde genetik danışma ile riskler tam açıklanmalıdır. Ülkemizin konumu nedeni ile diğer kalıtsal hastalıklarda olduğu gibi kurucu mutasyonların bulunmaması nedeni ile meme, over, prostat kanserli risk grubunda bu genlerdeki değişimlerin güvenilir bir yöntem olan DHPLC ile taranması ve risk belirlendikten sonra danışma verilmesi erken tanı ve tedavi için son derece önemlidir. Heterojen bir toplum olan popülasyonumuzda, bu genlerle ilgili ilk defa görülen yeni mutasyonların bulunmaya devam edileceği göz önüne alındığında, araştırmalar yapılırken kontrol gruplarının da çalışmaya dahil edilmesinin yararlı olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Gregl A. Conservative therapy of mastopathy. Med Welt. 1982. 33:1643.
2. Robbins Temel Patoloji. 7. Edisyon. Nobel Tıp Kitabevleri. ISBN 975-420-044-0: 710-713. 2004.
3. Goldberg JI, Borgen JI, Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. Expert Rev Anticancer Ther 6(8):1205–1214, 2006.
4. Saxena S, Chakraborty A, Kaushal M, Kotwal S, Bhatanager D, Mohil RS, Chintamani C, Aggarwal AK, Sharma VK, Sharma PC, Lenoir G, Goldgar DE, Szabo CI. Contribution of germline BRCA1 and BRCA2 sequence alterations to breast cancer in Northern India. BMC Med Genet. 2006 Oct 4;7:75.
5. Tuncer İ. Önsöz. Türkiye’de Kanser Sıklığı. Adana 1994; 1-2.
6. Fırat D. Türkiye'de Kanser İstatistikleri. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu. Ankara. 1982.
7. A. Goldhirsch, J. H. Glick, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thurlimann, H.-J. Senn. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. Annals of Oncology 16: 1569–1583.
8. Topuz E, Aydın A, Dinçer M. Meme Kanseri. Nobel Tıp Kitabevleri. 2003.
9. Gazioğlu E. Essentials in the Management of Breast Disease. Celcius Medical Publications. 2005.
10. Jatoi I, Anderson WF. Cancer screening. Curr Probl Surg. 2005. Sep;42(9):620-82.
11. Welchs PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. Hum Mol Genet. 2001. 10(7):705-13.
12. Berek JS. Practical Gynecological Oncology. Baltimore. 1994. 327.

13. Çalıkapan M. Meme kanserinde prognostik faktörlerin hastanemiz olgu serisindeki sağkalıma etkisi. Uzmanlık tezi. 2004. İstanbul.
14. Yıldırım M. Klinik anatomi. Nobel tıp kitapevleri. 1998. ISBN 975 -411-120-0:320.
15. Kişnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürgen T, Onderoğlu LS. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ankara Güneş Kitapevi. 1996. ISBN975-7467-46-4:981-984.
16. Lester SC. The Breast. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Sixth edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005:1119-1154.
17. Schnitt SJ, Milis RR, Hanby AM, Oberman HA. The Breast. In: Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology. Mills SE. Fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2004:323-395.
18. Gonzales MA, Pinder SE. invasive carcinoma: other histologic prognostic factors-size, vascular invasion and prognostic index. In: Breast Pathology. O'Malley FP, Pinder SE. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2006; 235-240.
19. Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B. Temel histoloji. Barış kitapçılık. 1998. ISBN 975-95331-2-x: 423-424.
20. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. Pathologic Basis of Disease. WB Saunders Comp. 6th ed. 1999; 695-696.
21. Gallion H, Pieretti M, DePriest P, Van Nagell JR. The molecular basis of ovarian cancer. Cancer 1995:1992-7.
22. Kurman R J. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. 5th.Ed. New York.Springer-Verlag. 2002.
23. Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. Ovarian cancer in:Berek JS. 12 th ed. Novak's gynecology. Baltimore. Williams & Wilkins. 1996;1155-230.
24. http://www.cancer.org/docrot/CRI/CRI_2x.asp?sitearea=&dt=33.
25. Welm B, Behbod F, Goodell MA, Rosen JM. Isolation and Characterization of functional mammary gland stem cells. Cell Prolif. 2003;36 (Suppl.1) :17-32.

26. Tsai YC, Lu Y, Nichols PW, Zlotkinov G, Jones PA, Smith HS. Contiguous patches of normal human mammary epithelium derived from a single stem cell: implications for breast carcinogenesis. *Cancer Res.* 1996; 56:402-12.
27. Clarke RB, Anderson E, Howell A, Potten CS. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif.* 2003; 36 (Suppl. 1): 45-58.
28. Fung TK, Poon RY. "A roller coaster ride with the mitotic cyclins". *Semin. Cell Dev. Biol.* 2005; 16 (3): 335–42.
29. Bishop J.M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell.* 1991; 64: 235-248.
30. http://www.ctf.edu.tr.anabilimdallari/pdf/219/Hucenin_Cogalması_ve_Farklılilasiminin_Biyofiziği.pdf.
31. Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal.* 2008;21(3);282-295.
32. Güneş H. Sitokinlerin hücre döngüsü üzerinde etkileri. *Tr. J. of Biology.* 1999:283–292.
33. Zwijsen RM, Wientjens E, Klompaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):405-15.
34. Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L, Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2000 Dec;7(4):257-69.
35. Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, Kumar R. Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett.* 2004 Jun 4;567(2-3):243-7.
36. Kardinal CG, Veith R. Prevention of breast cancer in high-risk women. *J La State Med Soc.* 1999 Apr;151(4):198-201.
37. Rajakariar R, Walker RA. Pathological and biological features of mammographically detected invasive breast carcinomas. *Br J Cancer.* 1995 Jan;71(1):150-4.

38. Henry JA, Piggott NH, Mallick UK, Nicholson S, Farndon JR, Westley BR, May FE. pNR-2/pS2 immunohistochemical staining in breast cancer: correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br J Cancer*. 1991 Apr;63(4):615-22.
39. Strange R, Li F, Friis RR, Reichmann E, Haenni B, Burri PH. Mammary epithelial differentiation in vitro: minimum requirements for a functional response to hormonal stimulation. *Cell Growth Differ*. 1991 Nov;2(11):549-59.
40. Rasbridge SA, Gillett CE, Sampson SA, Walsh FS, Millis RR. Epithelial (E) and placental (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma. *J Pathol*. 1993 Feb;169(2):245-50.
41. Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res*. 2001;3(5):289-93.
42. Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res*. 1993 Jun 1;53(11):2513-21.
43. Powell WC, Matrisian LM. Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;213 (Pt 1):1-21.
44. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*. 1990 Dec 20-27; 348(6303):699-704.
45. Pignatelli M, Hanby AM, Stamp GW. Low expression of beta 1, alpha 2 and alpha 3 subunits of VLA integrins in malignant mammary tumours. *J Pathol*. 1991 Sep;165(1): 25-32.
46. Chiappetta C, Kirkland JL, Loose-Mitchell DS, Murthy L, Stancel GM. Estrogen regulates expression of the jun family of protooncogenes in the uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992 Feb;41(2):113-23.

47. Winchester DJ, Chang HR, Graves TA, Menck HR, Bland KI, Winchester DP. A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *J Am Coll Surg.* 1998 Apr;186(4):416-22.
48. Hynes N, Dickson RB. Molecular aspects of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1996 Apr;1(2):137-8.
49. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenic and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist.*2004. 9:361-77.
50. Ünal G, Ünal H. Meme Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri. 2001.
51. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med.* 1997. 75(6):429-39.
52. Carvalho MA, Couch FJ, Monteiro AN. Functional assays for BRCA1 and BRCA2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(2):298-310.
53. Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmits PLM, Foekens JA. The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev.* 1992.13:3-17.
54. Dalay N. Meme kanserinin biyolojik özellikleri. Nobel Tıp Kitabevleri. s. 34-71.2003.
55. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. Similarity of protein encoded by the human *cerbB2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature.* 1986. 319:230-234.
56. Zhou NN, Lin XB, Liu DG, Teng XY, Zhong JT, Jiang WQ. Efficacy and toxicity of trastuzumab combined with docetaxel for her-2/neu overexpressing metastatic breast cancer *Ai Zheng.* 2008 Sep;27(9):947-50.
57. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1992 Jul;10(7): 1049-56.

58. Van Der Burg B, De Groot RB, Isbruk L, Kruijer W, DeLaat SWJ. Oestrogen directly stimulates growth factor signal transduction pathways in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992. 43: 111-115.
59. King CR, Swain SM, Porter L, Steinberg SM, Lippman ME, Gelmann EP. Heterogeneous expression of erbB-2 messenger RNA in human breast cancer. *Cancer Res.* 1989 Aug 1;49(15):4185-91.
60. Osborne CS, Chakalova L, Mitchell JA, Horton A, Wood AL, Bolland DJ, Corcoran AE, Fraser P. Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh.. *PLoS Biol.* 2007 Aug;5(8):e192.
61. Liao DJ, Dickson RB. C-Myc in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer.* 2000. 7(3):143-164.
62. Von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000. 62(1):51-62.
63. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene.* 2006 25;25(43):5906-11.
64. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science.* 1990 Dec 21;250(4988):1684-9.
65. Veenkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108:171-82.
66. Welch PL, King MC BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 2001 10(7):705-13.
67. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harsman K et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994. 266:66-71.
68. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q-12-13. *Science.* 1994. 30(265)5181: 2088-90.
69. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richard CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutation in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet.* 1996. 14:185-7.

70. Shattuck-Eidens D, Oliphant A, Mc Clure M, Mc Bride C, Gupte J, Rubano T, Pruss D, Tavtigian SV, Teng DH, Adey N, Staebell M, Gumpfer K, Lundstrom R, Hulick M, Kelly M, Holmen J, Lingenfelter B, Manley S, Fujimura F, Luce M, Ward B, Cannon-Albright L, Steele L, Offit K, Thomas A. *BRCA1* sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations: risk factor analysis and implications for genetic testing. *JAMA* 1997;278:1242–50.
71. Lynch HT, Lynch JF. Hereditary cancer: family history, diagnosis, molecular genetics, ecogenetics, and management strategies. *Biochimie*. 2002. 84: 3-17.
72. Rebbeck TR. The contribution of inherited genotype to breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002. 4: 85-89.
73. Meijers-Heijboer EJ, Verhoog LC, Brekelmans CTM, Seynaeve C, Tilanus-Linthorst MMA. Presymptomatic DNA testing and prophylactic surgery in families with a *BRCA1* or *BRCA2* mutation. *The Lancet*. 2000. 355: 2015-2020.
74. Neuhausen SL, Marshall CJ. Loss of heterozygosity in familial tumors from three *BRCA1*-linked kindreds. *Cancer Res*. 1994. 54: 6069-6072.
75. Polyak K. Breast cancer gene discovery. *Expert Rev Mol Med*. 2002 Aug 15;4(18): 1-18.
76. Sirvent JJ, Fortuño-Mar A, Olona M, Orti A. Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients *Histol Histopathol*. 2001. 16 (1):99-106.
77. Norberg T, Jansson T, Sjogren S, Martensson C, Adereasson I, et al. Overview on human breast cancer with focus on prognostic and predictive factors with special attention on the tumour suppressor gene p53. *Acta Oncologica*. 1996. 35 (suppl 5):96-102.
78. Lane DP, p53; guardian of the genome. *Nature*. 1992. 358:15-16.
79. Cattoretti G, Rilke F, Andreda S, Mato LDA, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer*. 1998. 41:178-183.

80. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF. p53 mutation in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science*. 1990. 250:1233-1238.
81. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 2006; 25;25(43):5906-11.
82. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet*. 2002; 31: 55-59.
83. <http://www.genome.gov/10000939>.
84. Wang C, Horiuchi A, Imai T. Expression of BRCA1 protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *Journal of Pathology*, 2004;202:215-223.
85. Lux MP, Ackermann S, Nestle-Kramling C et.al. Use of intensified early cancer detection in high-risk patients with familial breast and ovarian cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 2005;14:399-411.
86. Schildkraut JM, Thompson WD. Familial ovarian cancer:a population-based case control study. *Am J Epidemiol*, 1988; 128: 456-466.
87. Stewart T. Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. *Lancet* 1995; 346: 796-8.
88. Piccart MJ, Valeriola C, Arrigo C, Cantraine F, Heuson JC. Six-Year Results of a Multimodality Treatment Strategy for Locally Advanced Breast Cancer, *Cancer*. 1998; 62:250.
89. Caleffi M, Teague MW, Jensen RA, Vnencak-Jones CL, Dupont, p53 gene mutations and steroid receptor status in breast cancer. Clinicopathologic correlations and prognostic assessment. *Cancer*. 1994; 73(8):2147-2156.
90. Sierra A, Castellsague X, Escobedo A, Lloveras B, Garcia-Ramirez M, et al. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alteration: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2000; 89 (2):142-147.
91. Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2001; 3(3):146-9.

92. Di Modugno F, Buglioni S, Mottolese M, Del Bello D, Cascioli S, et al. Polyclonal antibodies against gp 185 HER2 peptides: Their putative role in the identification of a particular HER2 status in patients with breast cancer. *J Immunother.* 2001; 24(3):221-231.
93. Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, et al. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6(1):50-56.
94. Fornier M, Esteva FJ, Seidman AD. Trastuzumab in combination with of metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* 2000; 27(6 Suppl 11):38-45.
95. Leitzel K, Tramato Y, Konrad K, Chinchilli VM, Volas G, et al. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol.* 1995; 13:1129-1135.
96. Nabholz JM, Slamon D. New adjuvant strategies for breast cancer: Meeting the challenge of integrating chemotherapy and trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol.* 2001; 28(1 Suppl 3):1-12.
97. Erensoy N, Ssleyici B, Ozturk M, Yilmazer S, Kaner G, Unal H. Amplification and overexpression of c-erbB-2 gene in breast carcinomas. *Breast.* 1998; 4(Suppl 1):55.
98. Roh H, Pippin JA, Green DW, Boswell CB, Hirose CT, et al. HER2/neu antisense targeting of human breast carcinoma. *Oncogene.* 2000; 19(53):6138-6143.
99. Clahsen PC, van deVelde VJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, et al. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16(29):470-479.
100. Sharma S, Odunsi K. Targeted therapy for epithelial ovarian cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2005 Jun;9(3):501-13.
101. Czyz M, Jakubowska J. [STI571: a summary of targeted therapy] *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2006;60:677-96.
102. Chon HS, Hu W, Kavanagh JJ. Targeted therapies in gynecologic cancers. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006 Jun;6(4):333-63.

103. See HT, Kavanagh JJ, Hu W, Bast RC. Targeted therapy for epithelial ovarian cancer: current status and future prospects. *Int J Gynecol Cancer*. 2003 Nov-Dec;13(6):701-34.
104. Vaidya AP, Parnes AD, Seiden MV. Rationale and clinical experience with epidermal growth factor receptor inhibitors in gynecologic malignancies. *Curr Treat Options Oncol*. 2005 Mar;6(2):103-14.
105. Harris JR, Morrow M, Banadonna G. Cancer of the breast. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1993: 1264-1332.
106. Dowsett M. New hurdles for translational research. *Breast Cancer Res*. 2000; 2:241-3.
107. Goldberg JI, Borgen JI. Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006; 6(8):1205–1214.
108. Reynolds T. Study clarifies risk of breast, ovarian cancer among mutation carriers. *Journal of National Cancer institute*. 2003; 95(24):1816-1818.
109. Cvetkovic D. Early events in ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003; 68.
110. Manguoglu AE. Meme ve/veya over kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarının taranması. Doktora tezi. 2004. Antalya.
111. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Thompson & Thompson *Genetics in Medicine*. Sixth Edition. W.B. Saunders Company. ISBN 0-7216-6902-6: 311-313. 2005.
112. Luleyap UH. Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel Tıp Kitabevleri. 2008; ISBN:978-605-397-005-7: 112-113.
113. Maillet P, Chappuis PO, Khoshbeen-Boudal M, Sciretta V, Sappino AP; SIAK Network for Cancer Predisposition Testing and Counseling. Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence variations identified in a cohort of Swiss breast and ovarian cancer families. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006 Aug;169(1):62-8.

114. Kim BY, Lee DG, Lee KR, Han SH, Surendran S, Han CW, Chung N. Identification of BRCA1 and BRCA2 mutations from Korean breast cancer patients using denaturing HPLC. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 20;349(2):604-10. Epub 2006 Aug 24.
115. Han SH, Lee KR, Lee DG, Kim BY, Lee KE, Chung WS. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 from 793 Korean patients with sporadic breast cancer. *Clin Genet.* 2006 Dec;70(6):496-501.
116. Yazici H, Bitisik O, Akisik E, Cabioglu N, Saip P, Muslumanoglu M, Glendon G, Bengisu E, Ozbilen S, Dincer M, Turkmen S, Andrulis IL, Dalay N, Ozcelik H. BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish breast/ovarian families and young breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2000; 83(6):737-42.
117. Ozdag H, Tez M, Sayek I, Muslumanoglu M, Tarcan O, Icli F, Ozturk M, Ozcelik T. Germ line BRCA1 and BRCA2 gene mutations in Turkish breast cancer patients. *Eur J Cancer.* 2000; 36(16):2076-82.
118. Balci A, Huusko P, Paakkonen K, Launonen V, Uner A, Ekmekci A, Winqvist R. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in Turkish cancer families: a novel mutation BRCA2 3414del4 found in male breast cancer. *Eur J Cancer.* 1999; 35(5):707-10.
119. Yazici H, Glendon G, Yazici H, Burnie SJ, Saip P, Buyru F, Bengisu E, Andrulis IL, Dalay N, Ozcelik H. BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish familial and non-familial ovarian cancer patients: a high incidence of mutations in non-familial cases. *Hum Mutat.* 2002; 20(1):28-34.
120. Egeli U, Cecener G, Tunca B, Tasdelen I. Novel germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish women with breast and/or ovarian cancer and their relatives. *Cancer Invest.* 2006 Sep; 24(5):484-91.
121. Manguoglu AE, Lüleci G, Özçelik T, Çolak T, Schayek H, Akaydın M, Freidman E. Germ line mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish Breast/ovarian cancer patients. *Hum Mutat.* 2003 Apr;21(4): 444-5.

ÖZGEÇMİŞ

10.11.1983 tarihinde Eskişehir’de doğan Tuğba SEMERCİ, ilköğretimini 1989-1997 yılları arasında Adana Cumhuriyet İlköğretim Okulu’nda ve Adana Necdet KAHRAMAN Ortaokulu’nda, lise eğitimini ise 1997-2001 yılları arasında Antalya Aldemir Atilla KONUK Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. 2001 yılında girmiş olduğu Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Öğretim Programı’ndan 2005 yılında mezun olmuştur. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Yüksek Lisans programına başlamıştır. Tuğba SEMERCİ İngilizce bilmektedir. Yurt içi katıldığı bilimsel toplantılar şunlardır: I.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu 16-19 Şubat 2004 İstanbul, II..Uluslararası Katılımlı Moleküler Tanı ve Uygulamaları Sempozyumu 10-14 Mayıs 2004 İzmir, Biyoinformatik-1 Lisansüstü Yaz Okulu 20-26 Haziran 2004 Antalya, Biyoinformatik-2 Lisansüstü Yaz Okulu 5-21 Ağustos 2004 İstanbul, Hücre Kültürü Teknolojisinde Temel Prensipler ve Yapay Organlar 24-26 Kasım 2004 İzmir, Adli Bilimlerde Güncel Gelişmeler 25 Mart 2005 İzmir, TS-EN ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi 14-15 Mayıs 2005 İzmir, II.Kök Hücre Biyolojisinde Güncel Kavramlar ve Klinik Uygulamalar Sempozyumu 7 Eylül 2006 İstanbul, III.Kök Hücre Biyolojisinde Güncel Kavramlar ve Klinik Uygulamalar Sempozyumu 5 Ekim 2007 Ankara, Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu 24-27 Şubat 2008 Bursa, IV. Ege Genetik Sempozyumu 21 Kasım 2008 Aydın, Korkut YALTKAYA III. Nörofizyoloji Sempozyumu 21-23 Aralık 2008 Antalya.