

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

**MEME/OVER KANSERİ AİLELERİNDE BRCA1/BRCA2
DIŞI GENLERİN HASTALIK RİSKİNE ETKİSİNİN
ARAŐTIRILMASI**

Asef MOBALLEGH

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antalya, 2016

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

**MEME/OVER KANSERİ AİLELERİNDE BRCA1/BRCA2
DIŞI GENLERİN HASTALIK RİSKİNE ETKİSİNİN
ARAŐTIRILMASI**

Asef MOBALLEGH

Yüksek Lisans Tezi

**Tez DanıŐmanı
Yrd. Doç. Dr. Ayşe Esra Manguoğlu**

**Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından DesteklenmiŐtir. (Proje No: 2014.02.0122.009)**

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabılır”

Antalya, 2016

ÖZET

Meme kanseri Türkiye'de ve dünyada kadınlar arasında en sık görülen malignensidir. Meme kanseri dünya çapında kadınlar arasında her yıl 40.000 ölüme neden olur. Meme kanseri kompleks ve çok faktörlü bir hastalıktır. Meme kanserlerinin yaklaşık % 5-% 10'unu kalıtsaldır. Kalıtsal meme kanserinin %15-20'sinden *BRCA1/2* genlerinin mutasyonları sorumludur. *BRCA1/2* gen mutasyonları Türk toplumunda kalıtsal meme kanserinin %10'undan daha azını oluşturmaktadır. Bu sebeple *BRCA1/2* genleri dışında meme kanseri yatkınlık genlerinin rolünün incelenmesi gereklidir. Farklı meme kanseri yatkınlık genleri arasında *P53*, *PTEN* ve *CHEK2* genleri daha fazla ön plana çıkmaktadır. Bir çok çalışmaya göre bu genler meme kanseri riskini arttırmaktadır, hatta bazen tedavi sonuçlarını da etkileyebilmektedir.

Bu çalışmaya *BRCA1/2* mutasyonuna sahip olmayan ve aile hikayesi güçlü olan meme kanseri tanısı almış 12 birey dahil edilmiştir. Genomik DNA, periferal kandan izole edilmiştir. *P53* ve *PTEN* genlerinde hotspot bölgeleri içeren ekzonlar (*PTEN* için: 2., 3., 5., 6., 7. ve 8. Ekzonları ve *P53* için, 4., 5., 6., 7., 8. ve 9. ekzonları) amplifiye edildi. *CHEK2* geni ise bütün kodlayıcı ekzonlar (ekzon 2-ekzon 15) amplifiye edildi. PCR ile amplifiye edilmiş ekzonlar otomatik kapiler jel elektroforezi dizileme cihazı ile tüm dizileri okundu ve ya da değişim açıdan kontrol edildi.

Çalışmanın sonucunda 12 hastanın tümünün *P53* geninde c.215C > G (p.Pro72Arg) polimorfizminin 12 olgudan birinde homozigot olarak, *P53* geninde 6. ekzonunda c.638G > A (p.Arg213Gln) mutasyonu heterozigot olarak bulunmuştur. Oniki olgunun tümünde *PTEN* geninde c.802-4_802-3delTT delesyonu heterozigot olarak saptanmıştır. *CHEK2* geninde ise bir olguda c.470T (p.I157T) mutasyonu heterozigot olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak Türk popülasyonunda *P53* c.215C>G (p.Pro72Arg) ve c.638G > A (p.Arg213Gln), *PTEN* c.802-4_802-3delTT ve *CHEK2* c.470T>C (p.I157T) değişiklikleri, meme kanserin riskini etkileyebilmektedir. Ama bu değişimlerin frekansları, meme kanserinin üzerindeki etkisi ve meme kanserinin riskini ne kadar etkilediğinin bilinebilmesi için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, *P53* Gen, *PTEN* Gen, *CHEK2* Gen, PCR, DNA Dizileme, Mutasyon

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy in Turkey and worldwide. Breast cancer is a complex and multifactorial disease. Approximately 5%-10% of breast cancers are hereditary. Almost 15%-20% of the hereditary breast cancer is attributed to *BRCA1/2*, mutations. In Turkish population *BRCA1/2* mutations compose less than 10% of the hereditary breast cancer. For this reason studying the role of breast cancer susceptibility genes, in addition to *BRCA1/2* is necessary. Among different breast cancer susceptibility genes *P53*, *PTEN* and *CHEK2* are more stressed. Many studies have demonstrated that mutations in these genes are related to the breast cancer and influence therapy outcomes, in some cases.

In this study, 12 non- *BRCA1/2* Turkish patients whose pedigrees are strong and suggestive were chosen. Genomic DNA samples were isolated from peripheral blood. In *P53* and *PTEN* genes, exons containing mutation hotspots amplified by PCR, exons 2, 3, 5, 6, 7 and 8 in *PTEN* gene and exons 4, 5, 6, 7, 8 and 9 in *P53* gene. In the case of *CHEK2* gene whole coding exons (1-14) were amplified by PCR. All amplified exons were sequenced by capillary gel electrophoresis and screened for any possible mutation.

As a result all of the 12 patients harbor a c.215C>G (p.Pro72Arg) polymorphism as homozygot in their *P53* gene. In 1 out of 12 patient a c.638G>A (p.Arg213Gln) mutation as heterozygot in exon 6 of its *P53* gene was detected. All patients carry a c.802-4_802-3delTT deletion as heterozygot in their *PTEN* gene. In 1 out of the 12 patients c.470T>C (p.I157T) heterozygot mutation in the *CHEK2* gene was found.

In conclusion, in Turkish population *P53* gene c.215C>G (p.Pro72Arg) and c.638G>A (p.Arg213Gln), *PTEN* gene c.802-4_802-3delTT and *CHEK2* gene c.470T>C (p.I157T) changes may take part in increasing breast cancer risk. But specifying their frequency, their amount of influence on breast cancer in Turkish population and on therapy need more studies.

Keywords: Breast cancer, *P53* Gene, *PTEN* Gene, *CHEK2* Gene, PCR, DNA Sequencing, Mutation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, **Yr. Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU**' ya,

İnsani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, eğitimimde her konuda bana yardımcı olan değerli hocam, **Prof. Dr. Sibel Berker Karüzüm**' e

Tüm sıkıntılara rağmen bana yardım eden ve umut veren **aile** ve **eşime**

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü yöneticilerine ve çalışanlarına

sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum ve bu iyiliklerinin karşısında kendimi borçlu hissediyorum.

Asef MOBALLEGH
Antalya-2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜRLER	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZENİ	viii
ŞEKİLLER DİZENİ	x
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Kanser	2
2.2. Meme Kanseri	2
2.3. Kalıtsal Meme Kanseri	3
2.4. Meme Kanseri Yatkınlık Genleri	4
2.4.1. <i>P53</i>	4
2.4.1.1. <i>P53</i> Mutasyonları	5
2.4.2. <i>PTEN</i>	10
2.4.2.1. <i>PTEN</i> Mutasyonları	12
2.4.3. <i>CHEK2</i>	14
2.4.3.1. Meme Kanserinde <i>CHEK2</i> Mutasyonları	14
MATERYAL VE METOD	
3.1. Periferal Kandan DNA İzolasyonu	16
3.1.1. Kullanılan Maddeler	16
3.1.2. İşlemler	17
3.3. DNA Miktarının Ölçülmesi	18
3.4. PCR Amplifikasyonları	18
3.4.1. <i>CHEK2</i>	18
3.4.2. <i>PTEN</i>	22
3.4.3. <i>P53</i>	23
3.5. PCR Ürünlerinin Kontrol Etmesi	25
3.6. PCR Ürünlerinin Purifikasyonu	25

3.7.	Big Dye Reaksiyonu	25
3.8.	Bigdye İle Muamele Edilmiş Ürünlerinin Purifikasyonu	25
3.9.	Analizler	25
3.9.1.	Seqanalysis	25
3.9.2.	Chromas Lite	26
3.9.3.	Blast	26
BULGULAR		
4.1.	Olgular	27
4.2.	<i>P53</i> Gen	27
4.3.	<i>PTEN</i>	27
4.4.	<i>CHEK2</i>	27
TARTIŞMA		44
SONUÇ		47
KAYNAKLAR		48
ÖZGEÇMİŞ		59
EKLER		60
	EK-1:Aydınlatılmış Onam Formu	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AmAc	:	Amonyom Acetat
BC	:	Meme kanseri
BRCA1	:	Meme kanseri ile ilişkili gen-1
BRCA2	:	Meme kanseri ile ilişkili gen-2
BRRS	:	Bannayan-Riley-Ruvalcaba sendromu
CHEK2	:	Chek noktası kinaz 2 (Chek point kinase 2)
CS	:	Cowden sendromu
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dNTP	:	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	:	Etilen DiaminTetra asetik Asid
Era	:	Österojen reseptör alfa
EtBr	:	Etidyom Bromür
FHA	:	Çatal kafa ilişkili (Fork Head Associated)
HBC	:	Kalıtsal meme kanseri
HBOC	:	Kalıtsal Meme ve Over Kanseri
HER2	:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HPV16 E6	:	insan papiloma virus tip 16 protein E6
JNK	:	c-Jun N-terminal kinazlar
LDD	:	Lhermitte-Duclos hastalığı
LFS	:	Li-Fraumeni Sendromu
MDM2	:	Fare Doubl Minut 2 homologu (Mouse Doubl Minut Homologue)
MDR1	:	Multi- İlaç Direnci Gene1 (Multi-Drug Resistance Gene1)
MI	:	Mililitre
mTORC2	:	mTOR kompleks 2
NaCl	:	Sodyum Klorür
NH4Cl	:	Amonyum Klorür
PARP-1	:	Poli (ADP- riboz) polimeraz 1
PBD	:	PIP bağlama domain
PCR	:	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
PDGFR	:	Trombosit türevli büyüme faktörü reseptör
PDK1	:	PIP3 fosfoinositit-bağımlı protein kinaz-1
PHTS	:	PTEN Hamartoma Tümör Sendromları
PI3K	:	Fosfatidilinositol-3-kinase

Pirh2	:	P53 - indüklenmiş HALKA - H2 Protein (P53-Induced RING-Protein)
PR	:	Progesteron reseptör
PTEN	:	Fosfataz ve tensin homolog (Phosphatase And Tensin Homolog)
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SV40	:	Simian virus 40
TBE	:	Tris Borat EDTA
TP53	:	Tümör protein 53
VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WBL	:	Beyaz kand hücresi lizis tamponu
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü
WT-1	:	Wilms tümör protein1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Tp53 yapısı ve değişik bölgeleri	4
2.2. Farklı kanserlerde P53 somatik mutasyonu	6
2.3. Mutant P53 yabancı P53'ü inhibe etmektedir	7
2.4. Sporadik ve kalıtsal meme kanserinde P53 mutasyonu	8
2.5. Değişik kanserlerde P53'te germline mutasyonu	9
2.6. PI3-kinazın sinyal yolağı	11
2.7. PTEN yapısı	12
2.8. PTEN ekzonlarında germline mutasyon dağıtımı	13
4.1. 1 numaralı olgunun pedigrisi	25
4.2. 2 numaralı olgunun pedigrisi	26
4.3. 3 numaralı olgunun pedigrisi	27
4.4. 4 numaralı olgunun pedigrisi	28
4.5. 5 numaralı olgunun pedigrisi	29
4.6. 6 numaralı olgunun pedigrisi	30
4.7. 7 numaralı olgunun pedigrisi	31
4.8. 8 numaralı olgunun pedigrisi	32
4.9. 9 numaralı olgunun pedigrisi	33
4.10. 10 numaralı olgunun pedigrisi	34

4.11.	11 numaralı olgunun pedigrisi	35
4.12.	12 numaralı olgunun pedigrisi	36
4.13.	TP53 genin 4. ekzonunda g.16397C>G, c.215C>G, p.Pro72Arg değişimi	40
4.14.	TP53 genin 6. ekzonunda g.17658 G>A değişimi	41
4.15.	PTEN genin 8. intronunda g.102452_102453delTT değişimi	42
4.16.	CHEK2 genin 4. ekznonunda g.21736T>C (p.Ile157Thr) değişimi	43



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
3.1. <i>CHEK2</i> genin primerleri, ekzon 2-15	19-20
3.2. <i>CHEK2</i> genin amplifikasyonu için kullanılan malzemeler	20
3.3. <i>CHEK2</i> geni amplifiye etmek için kullanılan PCR koşulları	20
3.4. <i>PTEN</i> genin amplifikasyonunda kullanılan PCR İçerikleri	21
3.5. <i>PTEN</i> geni için PCR koşulları	21
3.6. <i>TP53</i> geni için PCR içeriği	21
3.7. <i>TP53</i> geni için PCR koşulları	22
3.8. Big dye aşamasının içeriği	22
3.9. Big dye PCR'ın koşulları	23
4.1. Olguların tanısı, tanı yaşı ve bulunan mutasyonu	37-38
4.2. Saptanan mutasyonların detayları	39

GİRİŞ VE AMAÇ

Tahminlere göre hayat boyu kanser riski kadınlar arasında yaklaşık %12.4'tür [1, 2]. Kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri ölüme neden olan kanserler arasında ikinci sırayı almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 232,670 yeni olgu ve kadınlarda yılda yaklaşık 40.000 ölüme neden olduğu bilinmektedir[3, 4]. Meme kanserinde kişisel risk faktörü hasta olan akraba sayısı arttıkça ve hastalığın başlangıç yaşı küçüldükçe artmaktadır[5]. Birinci ya da ikinci derece akrabaları arasında iki ya da daha fazla meme kanseri tanısı bulunan olgular ailesel meme kanseri olarak değerlendirilir. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %15-20 kadarı ise ailesel meme kanserini oluşturmaktadır. Meme kanserinin yaklaşık %5-10'u Mendel kalıtımını (otozomal dominant) takip etmekte ve bu oran kalıtsal meme kanserini oluşturmaktadır. Kalıtsal meme kanserinin %30'u Meme kanseri ile ilişkili gen 1 (*BRCA1*) ve Meme kanseri ile ilişkili gen 2 (*BRCA2*) genlerinde meydana gelen germline mutasyon ile ortaya çıkmaktadır[4].

Kanserde erken tanı çok önem taşımaktadır. Erken tanı sayesinde kanserden kaynaklanan ölümlerin sayısında önemli ölçüde azalma gözlenmiştir. Son yıllarda teknolojinin gelişmesi ile birlikte *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin dışında meme kanseri gelişiminde etkili olan başka genler de tanımlanmıştır. Tümör proteini 53 (Tumor Protein 53, *TP53*) ve Fosfataz ve tensin homologu (Phosphatase and Tensin Homologue, *PTEN*) gibi yüksek penetranslı genlerde nadir bulunan kalıtsal mutasyonların saptanması önemlidir. *CHEK2* (Check Point Kinase 2), ataksi - Ataxia Telangiectasia Mutated (*ATM*) geni ve *BRCA2* ortağı ve yerleştiricisi (Partner And Localizer Of *BRCA2*, *PALB2*) gibi orta penetranslı ama mutasyon oranı daha yüksek genlerin analizi de çok önem taşımaktadır [6]. Özellikle yeni dizileme teknolojileri kullanarak birkaç geni aynı zamanda incelemek mümkün olduğu için meme kanseri ile ilişkili birden fazla gen aynı anda analiz edilebilir. Bu sebeple çoklu gen testi özellikle meme kanseri için önem kazanmıştır. Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) rehberine göre, aile pedigrisinde birden fazla kalıtsal kanser sendromu şüphesi oluşursa örneğin hem Li-Fraumeni hem de Cowden sendromu bulunursa veya *BRCA1/2* geninde mutasyon taşımayan olgularda çoklu gen testi uygun görülebilmektedir. Ancak çoklu gen testi için hasta seçim kriterlerinin henüz kesinlik kazanmadığı da ifade edilmektedir[6].

Bu genlerin mutasyon frekansları farklı toplumlarda değişiklik göstermektedir. Örneğin *CHEK2* c.1100 delC mutasyonunun dünyada en sık görüldüğü bölge kuzey Avrupadır. Buna karşın bu mutasyon güney Avrupa'da bulunmamaktadır. Çin'de ise başka patojenik bir mutasyon olan p.H371Y mutasyonu bulunmaktadır [7].

Bu çalışmada Türk hastalarda *BRCA1* ve *BRCA2* genleri dizi analizi ile taranmış ve hiç mutasyon bulunmayan 12 meme kanserli olguda *PTEN*, *P53* ve *CHEK2* genlerinde dizi analizi yapılarak mutasyon durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Kanser

Kanser hücre fizyolojisinde çeşitli değişimlerle ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Bu hastalığın biyolojik sonucu hücrenin anormal şekilde büyümesidir [8, 9]. Kanser kökeni hakkında farklı görüşler ve teoriler bulunmaktadır. Bu görüşler arasında tezatlıklar ve paradokslar görülmektedir [10, 11]. Kanser gelişmesine neden olan sebepler çok çeşitlidir. Ancak, genel anlamda kanserde bazı hücreler, organizma içerisinde genetik ve epigenetik değişiklerin birikimi ile anormal olarak hiperproliferasyon göstermektedir [12].

Kanserde etkin genler onkogenler ve tümör baskılayıcılar olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır. Onkogenlerin fonksiyon kazanması ve tümör baskılayıcıların fonksiyon kaybı kanserin nedenlerindedir [12].

Kanserde epigenetik değişimler de temel nedenlerdendir. DNA'nın hipometilasyonu, kromatinin hipoasetilasyonu ve gene özgün hipo ve hipermetilasyon gibi yaygın değişimler bulunmaktadır [13]. Yaygın DNA hipermetilasyonu, kromozom kararsızlığına ve tümör oluşma sıklığının artmasına neden olmaktadır.

Kanser Türkiye ve dünyanın birçok bölgesinde ana sağlık problemidir. Amerika'da her dört ölümden birisi kanserden kaynaklanmaktadır [14, 15].

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri genetik ve epigenetik faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan karmaşık bir hastalıktır [16, 17]. Gelişmiş ülkelerde 8 kadından biri hayatı boyunca meme kanseri olmaktadır [18]. Meme kanseri ile ilişkili çeşitli risk faktörleri saptanmıştır. Hormonal faktörler, üreme, regl geçmişi, yaş, spor yapmamak, alkol, radyasyon, iyi huylu meme hastalıkları ve şişmanlık bu risk faktörleri arasındadır [8]. Kemoterapi, radyoterapi, adjuvan hormonterapideki gelişmelere karşın meme kanseri hastalarının üçte biri kaybedilmektedir. Bu nedenle yeni tedavi yöntemleri çok önem taşımaktadır [19]. Son 50 yılda kardiyovasküler hastalıklar, beyin kanaması ve zatüre nedeni ile ölümler yeni tedavi ve önlemler sayesinde düşmeye başlamıştır. Ancak kanser nedeni ile ölüm oranlarında çok az değişim gözlenmiştir. Bu yüzden yakın zamanda kanserden ölümler, kardiyovasküler ölümlere göre daha da artabilir [20]. Meme kanseri en çok araştırılmış ve tanınan kanserdir. Buna ek olarak meme kanseri dünyada kadınların önemli ölüm nedenlerinin arasında yer almaktadır. Meme kanseri tanı konulmuş kanser olgularının %23'ünü ve kanserden ölümün %14'ünü oluşturmaktadır [21].

Meme kanseri metastaza eğilimlidir ve ikinci yer akciğer, karaciğer, kemik ve beyin olabilir. Metastaz tümör ortadan kaldırıldıktan birkaç yıl sonra gerçekleşebilir. Bu özellik hastaların hayatta kalma şansını düşürmektedir. Erken tanıda, %85 olan hayatta kalma şansı akciğer ve kemik metastazı bulunuyorsa %23'e düşmekte,

dolayısıyla metastaz meme kanseri ölümlerinde ana neden olarak sayılmaktadır [22]. Bu sebeple erken tanı çok önemlidir. Avrupa’da erken tanı konulmuş meme kanseri hastalarında ölüm oranı %25-%31 azalmıştır. 20. yüzyılın son on yılından itibaren meme kanseri taramaları daha iyi yapılmaya başlanmış ve ölüm oranı %38-%48 düzeyinde azalmıştır [23].

Klinik açıdan ve protein ekspresyon düzeyinde incelediğimizde österojen reseptör alfa (ER α), progesteron reseptör (PR), ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) meme kanserinin tedavi stratejisinin belirlenmesinde ilk biyomarker olarak değerlendirilmektedir. Bu neden ile meme kanseri üç ana gruba ayrılmaktadır: ER pozitif, HER2-pozitif ve ER, PR ve HER2 için üçlü negatif tümörler. Meme tümörlerinin %70’inde ER ve PR ifade edilmektedir [24]. Reseptör durumundaki değişiklikler tümör ilerlemesi ve tedavisini etkileyebilmektedir. Primer tümörlerin yeniden tümör oluşturma şansı ER ifadesi varlığında %70 ve PR varlığında %56’dır. Primer tümörlere göre metastatik tümörlerde HER2 ifadesi ise %20 oranında artış göstermektedir. Üçlü negatif meme kanseri meme kanserinin %15-%20’sini oluşturmaktadır [25, 26].

2.3. Kalıtsal Meme Kanseri

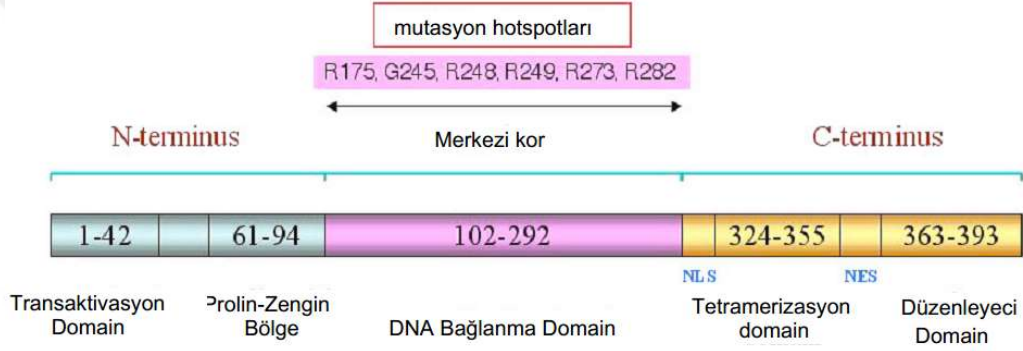
Kalıtsal meme kanseri terimi 19. yüzyılın ortalarında kullanılmaya başlanmıştır [27]. Meme kanseri olgularının yaklaşık %5-10’unda kalıtsal genetik geçmiş bulunmaktadır. Bu olgularda yüksek penetransa sahip genlerde mutasyon bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tahminlerine göre yıllık yaklaşık bir milyon kadına meme kanseri tanısı konmaktadır .Erken yaşta meme kanseri tanısı alan kadınların %30’unda kanser yatkınlığı bulunmaktadır. Kalıtsal meme kanseri için iki önemli yatkınlık sendromu tanımlanmıştır. Bunlar Kalıtsal Meme ve Over Kanser sendromu ve Li-Fraumeni Sendromudur (LFS) [28]. Kalıtsal Meme ve Over Kanser sendromu *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki germ hattı mutasyonları ile ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal meme kanserinin de yaklaşık %16’sından *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki germ hattı mutasyonları sorumludur [29]. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde mutasyon bulunan kadınların hayat boyu meme kanseri riski %80’den daha fazladır. *BRCA1* geninde mutasyon taşıyan kadınların hayat boyu yumurtalık kanseri riski ise %40’dan daha fazladır. *BRCA2* genlerinde mutasyon taşıyan kadınlarda ise hayat boyu yumurtalık riski %20’den fazladır [30]. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde kalıtsal bir mutasyon taşıyan meme kanseri tanısı almış hastaların yaklaşık %50’ sinin yakın akrabalarında meme/yumurtalık kanseri görülmeyebilir. Bu durum ailenin küçük oluşu ya da akrabaların mutasyonu taşımaması ile açıklanabilir [30]. Erkek *BRCA2* taşıyıcılarında da meme kanseri riski %6 artmaktadır [31-34].

Kanser yatkınlığına neden olan genler kanser riski ile ilişkilerine göre sınıflandırılabilir. Yüksek penetranslı genler olan *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *ATM*, *PTEN* ve *PPM1D* genleri yüksek derecede kalıtsal meme kanseri oluşumunda rol oynamaktadır [35]. Bu konu ile ilgili olarak son yıllardaki bilgiler ele alındığında meme kanserinin poligenik bir hastalık olduğu söylenebilmektedir [36, 37].

2.4. Meme Kanseri Yatkınlık Genleri

2.4.1. P53

Tümör protein p53 (Tumor Protein P53, *TP53*) İlk 1979'da transformasyon ile ilişkili bir protein olarak tanımlanmıştır [38]. P53, 20kb büyüklüğünde bir gen tarafından kodlanan bir nükleer fosfoproteindir. Bu gen 11 ekzon ve 10 intronu kapsamaktadır [39]. Normal P53 proteini 393 amino asit içermekte olup ve birkaç yapısal ve fonksiyonel bölgeden oluşmaktadır. Bunlar N-terminali (1-42 rezidüleri), proline zengin domain (61-94 rezidüleri), DNA'ya bağlanan merkezi çekirdek domaini (102-292 rezidüleri) ve C-terminali bölgeleridir (301-393rezidüleri). C-terminal bölgesi ise oligomerizasyon domaini (324-355 rezidüleri) ve kuvvetli bazik C-terminali düzenleyici domain (363-393 rezidüleri) olmak üzere iki bölgeden oluşmaktadır [40-42]. P53'ün yapısı şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. *Tp53* yapısı ve farklı bölgeleri [43]

Yabancıl p53 DNA hasarı, hipoksi ve onkogen aktivasyonu gibi hücrel stresler ile aktif olmaktadır [41]. Yabancıl p53 aktif olduktan sonra bir transkripsiyon faktörü olarak hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesinde, hücre yaşlanmasında ve programlanmış hücre ölümünde rol oynamaktadır [41, 44]. P53'ün seviye ve aktivitesini insan papilloma virus tip 16 protein E6 (Human papillomavirus type 16 E6, HPV16 E6) [45], Wilms tümör protein1 (Wilms tumor protein1, WT-1), Adenovirus E1B/E4, Simian virus 40 (SV40) T-antijen, Fare çift dakika 2 homolog (Mouse double minute 2 homolog, MDM2), c-Jun N-terminal kinazlar (c-Jun N-terminal kinases, JNK), p53 ile uyarılabilen bir HALKA-H2 Domainli protein (p53-inducible protein with RING-H2 domain, Pirh2) ve Poli (ADP- riboz) polimeraz 1 (Poly(ADP-ribosyl)ation polymerase-1, PARP-1) karmaşık bir protein ağı kontrol etmektedir. SV40 T antijen, WT1 veya E1B/E4 P53'e bağlanırsa P53'ün stabilitesini arttırmaktadır. Ancak E6 veya MDM2 P53'ün degradasyonunu hızlandırmaktadır [43]. P53 proteinin regülasyonu MDM2 ubiquitin ligaz ile sağlanmaktadır. Ubikütin ligaz P53'ü proteazoma götürerek degradasyonunu sağlamaktadır. *MDM2* P53'ün hedeflerinden biridir ve bu sebeple P53 aktivasyonundan sonra P53, *MDM2* geninin ifadesine neden olup negatif geri besleme yolu ile iki protein ilk düzeylerine geri dönmektedir [46]. *MDM4* (MDMX) diğer bir P53 regülatörüdür. Bu proteinde ubiquitinasyon özelliği yoktur ve direkt p53'e bağlanarak onu inhibe etmektedir. Bazen de *MDM4*, *MDM2*'ye bağlanıp ubiquitinasyon özelliğini kazanmaktadır [47,

48]. Normal *P53* çok düşük konsantrasyonda ve etkisiz durumda hücrelerde bulunur [49]. Normal büyüyen hücrelerde *P53*'ün yarılanma süresi çok sınırlıdır. Bu süre birkaç dakikayı kapsar ama bu süre DNA'sı hasar görmüş ya da stres altında olan hücrelerde birkaç saate kadar uzamaktadır [50].

Strese karşı fosforilasyon, asetilasyon, ADP-ribozilasyon, ubiquitinasyon ve sitoplazmik ayrılma gibi bazı post-translasyonel değişiklikler de *P53*'ün stabilitesini etkilemektedir. Genellikle bu modifikasyonlar C-terminal ve N-terminalinde gerçekleşmektedir. Fosforilasyon ve asetilasyon *P53*'ün transkripsiyonel aktivitelerini arttırmaktadır. Çünkü bu modifikasyonlar *P53*'ün stabilitesini artırıp çekirdekte birikimine neden olmaktadır. *P53* çekirdekte hedef genlerdeki bağlanma noktalarını bulup onlar ile ilişki kurmaktadır. Ayrıca post translasyonel modifikasyonlar *P53*'ü degradesyondan da korumaktadır [43].

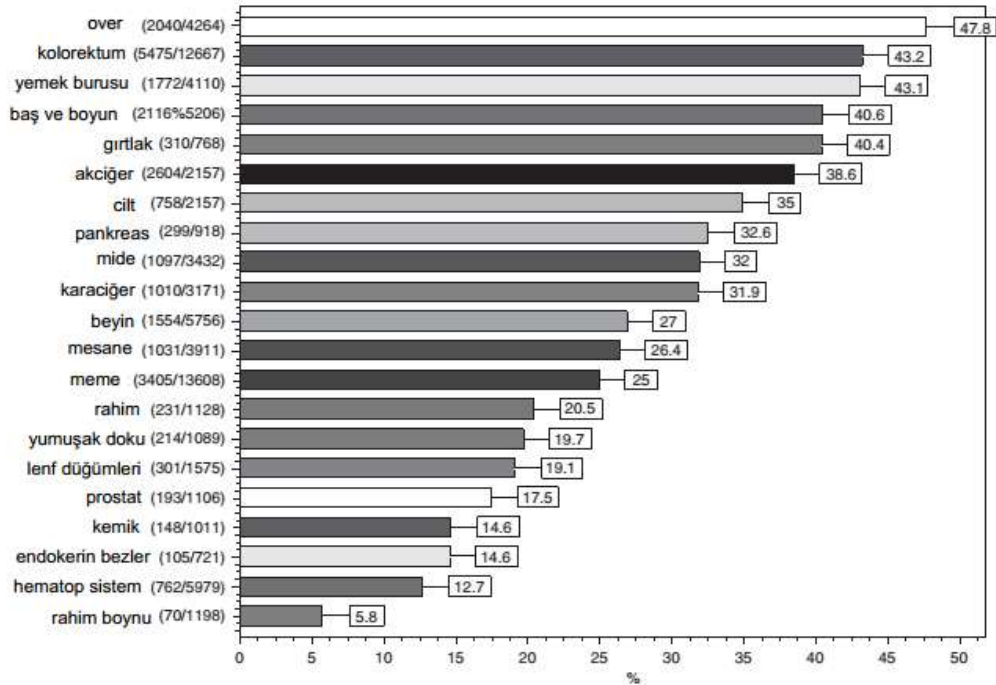
2.4.1.1 *P53* mutasyonları

P53 mutasyonu veya fonksiyonel olarak etkisizleşmesi tüm kanserlerde ortak bir özellik olarak görülmektedir. *P53* yolağı değişik hasar sinyalleri ile başlamaktadır. Bu yolak *P53*'ün stabilizasyonunu, post-translasyonel modifikasyonlarını ve *P53*'ün kromatine bağlanmasını sağlamaktadır [51]. *P53* tarafından hücre döngüsünün geri dönüşümlü durdurulması, hücre yaşlanması, farklılaşma ve apoptoz gibi farklı yanıtlar tetiklenebilir. Her yanıt birçok iç ve dış etmenlere bağlıdır [41]. İnsan tümörlerinin yaklaşık %40'ında mutant *p53* ifade edilmektedir [52]. İlk olarak 1983 yılında transforme edilmiş ve tümör hücrelerinde birikmiş mutant *p53* proteinleri gözlenmiştir [53].

P53 geninde meydana gelen bir mutasyon kanser yatkınlığı ile ilişkili olabilmektedir. Bu mutasyon somatik veya kalıtsal (germ hattı) olabilir. Germ hattı mutasyonu Li-Fraumeni sendromu (LFS)'na yol açmaktadır [54]. Bu sendromda çocukluk tümörü veya bir sarkom, beyin tümörü, ya da diğer adrenokortikal tümörler gibi çeşitli kötü huylu tümörler erken yaşta ortaya çıkabilmektedir [55]. Mutant *p53* proteinleri çeşitli kanserlerde aşırı ifade edilmektedir. Mutant *p53* proteini, normal *p53* proteininin inhibisyonuna neden olarak transformasyonda, metastazda ve ilaç dirençliğinde rol oynamaktadır [52].

Kanserlerin çoğunda somatik *p53* mutasyonları görülmektedir. *P53* mutasyonunun oranı ise kanserin tipine göre değişkenlik göstermektedir. Agresif seyreden ve erken yaşta tanısı konulan sindirim ve hava borusunun yukarısındaki kanser tiplerinde (ağız, özofagus ve bronşiyal kanserler), *P53* genindeki mutasyon oranı yaklaşık %75 olarak görülmektedir. Erken yaşta tanı almış sindirim borusunun aşağısındaki kanser tiplerinde ise (polipler ya da adenoma) *P53* mutasyonu daha az görülmektedir. Ancak adenomadan karsinomaya geçişte *TP53* mutasyonunda yüksek bir artış gözlenmektedir. Bazı kanser tiplerinde *P53* mutasyonu daha az görülmektedir. Bu kanserler; serviks, testiküler kanserler, nöroblastoma ve kötü huylu melanomalardır. Bu kanser tiplerinde *TP53* mutasyon oranı yaklaşık %5 olarak kaydedilmiştir. Ancak bu kanserlerde *TP53* inaktivasyonu viral veya hücrel onkogen aktivasyonu nedenleriyle de ortaya çıkmaktadır. Somatik *p53* mutasyonları yaklaşık olarak tüm kanserlerde görülmesine rağmen yaygınlığı değişkenlik göstermektedir. Mutasyonlar çoğunlukla erken aşamada (pre-neoplastik evrede)

görülmektedir. Kanserde *p53*'ün fonksiyonu farklı mekanizmalar ile kaybolabilmektedir. Çok çeşitli tümörlerin incelenmesi sonucunda tüm kanserlerin yaklaşık olarak yarısında *p53* geninde mutasyon görülmüştür. Bu mutasyonların %5'i regülatör bölgelerde ve %95'i merkezi bölgedeki bağlanmadan sorumlu DNA dizilerinde görülmektedir. Bu veriler genin 5. ve 8. Ekzonları arasındaki bölgenin dizilenmesi ile elde edilmiş verilerdir [41]. En son yapılan çalışmalar, merkezi bölge dışındaki mutasyonların önemli olduğunu göstermektedir [56, 57]. Tümör ile ilişkili mutasyonlar çoğunlukla (%93.6) nokta mutasyonlarıdır. *P53* somatik mutasyonlarının farklı kanserlerle ilişkisi şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Farklı kanser tiplerinde *p53* somatik mutasyon oranları [58]

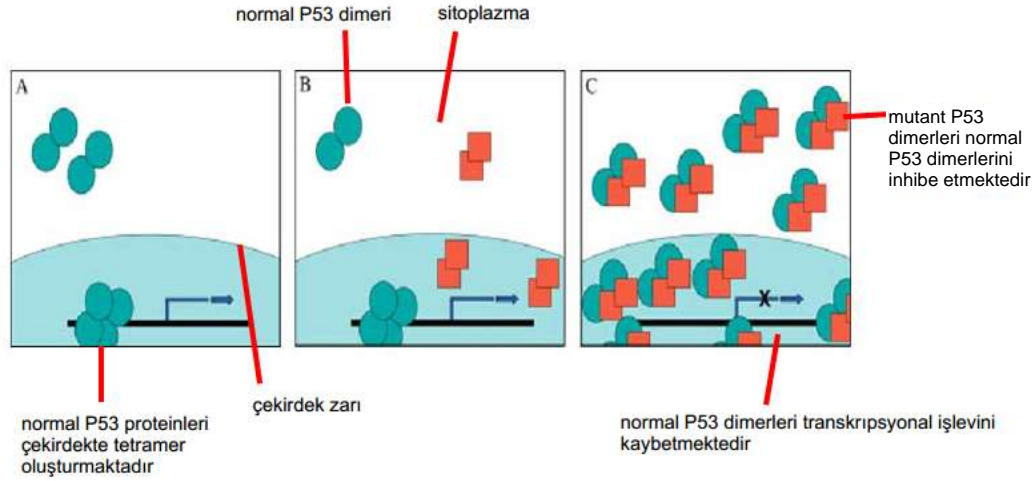
X koordinatı: Kanser yüzdesi

Y koordinatı: kanser yeri (mutant olgular/anliz edilmiş örnekler)

P53 geninde altı hot-spot mutasyon tanımlanmıştır. Altı aminoasit rezidüsünü etkileyen bu mutasyonlar, *p53* mutasyonlarının %30'unu oluşturmaktadır. Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 ve Arg282 [40] rezidüleri arasında en çok mutasyon saptanan aminoasitler ise Arg248 ve Arg273'tür. Bu iki rezidü hem DNA'ya hem de *p53*'ün apoptozunu uyaran protein p2 (Apoptosis-Stimulating Of P53 Protein 2, ASPP2)'ye bağlanmaktadır. *P53*'ün mutasyon spektrumuna bakıldığında insan tümörlerinde DNA'ya bağlanan tüm aminoasit rezidülerinde mutasyon görülmektedir. Bu durum tümörün baskılanmasında *P53*'ün DNA'ya bağlanan bölgesinin önemini göstermektedir. *P53*-DNA etkileşim bozukluğu başka aminoasit rezidülerindeki mutasyonlar ile de ortaya çıkmaktadır. Bu aminoasit rezidüleri direkt olarak DNA'ya bağlanmamaktadır. Ancak *P53*'ün yapısının korunması için önemlidir. Buna en iyi örnek R175H ve G245S mutasyonlarıdır [59].

P53, DNA'ya iki dimerden oluşan bir tetramer olarak bağlanmaktadır [60]. *P53* proteininin yabancıl ve mutant tipleri bir heterooligomer oluşturmaktadır. Bu

oligomer DNA'ya bağlanamamakta ve transkripsiyon faktörünün aktivitesinde bozukluğa neden olmaktadır [61-63]. Böylece mutant tip, yabancı tipini inhibe etmektedir (Şekil 2.3). Yapılan son araştırmalara göre DNA bağlanma bölgelerindeki herhangi bir mutasyon transkripsiyon aktivitesini engellemektedir. Ancak promotör ve diğer bölgelerdeki mutasyonlar bu etkiyi göstermemektedir. [64].



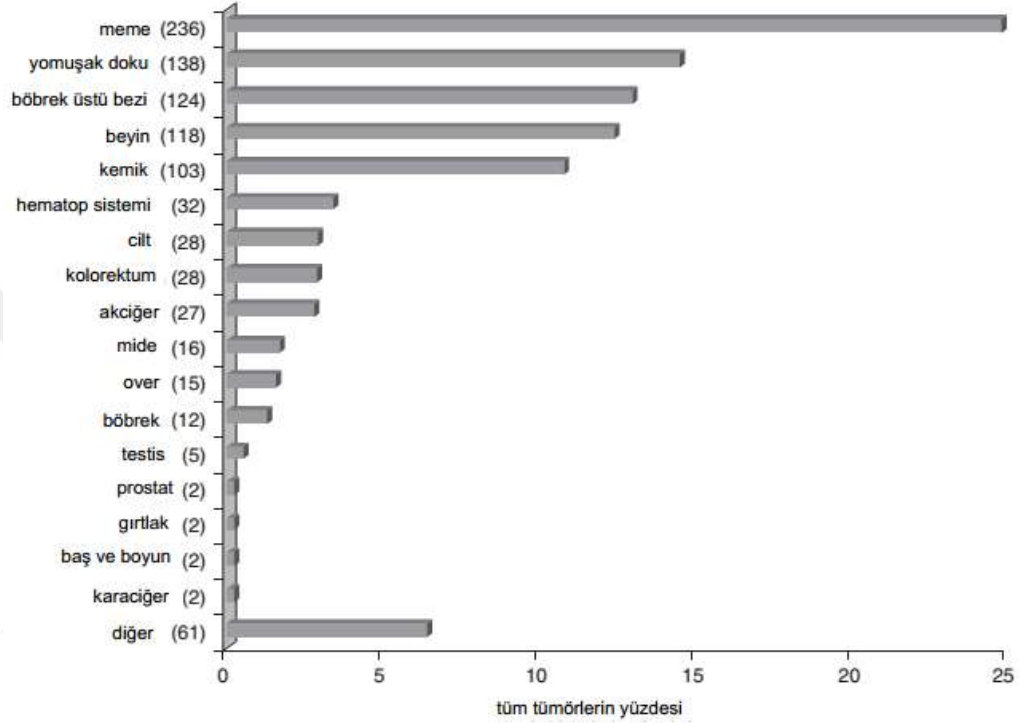
Şekil 2.3. Mutant P53 yabancı P53'ü inhibe etmektedir. A: Normal hücrelerde P53 sitoplazmada dimer olarak sentezlenmektedir ve çekirdeğe transfer edilmektedir. P53 bağlanma noktasında dimerler, tetramer oluşturmak üzere birleşerek P53'e bağlı transkripsiyonu başlatmaktadır. B: Protein miktarı az olduğunda mutant P53 dimerleri, yabancı P53 dimerlerine bağlanmaz ve transkripsiyon engellemez; ancak protein miktarı az olduğu için transkripsiyon iyi ilerlemez. C: Yabancı ve mutant P53 birikiminde ve protein konsantrasyonu arttığında mutant dimerler, yabancı dimerleri inhibe eder ve transkripsiyon gerçekleşmez [52]

Mutasyon, işlev kaybı yanında bazen dominant-negatif aktivasyona da neden olmaktadır. Bu olay 'işlev kazancı' olarak adlandırılmaktadır. Bu özellik P53 mutant proteinlerinin onkogenik aktivitesini göstermektedir. Bu durumda mutant P53 proteini yabancı proteini inhibe etmektedir [65]. Bazı mutant P53 proteinleri diğer genleri aktive etmekte bu genler normal P53 proteini tarafından aktif olamamaktadır. Bu genler bunlardır :

Çoklu ilaç direnci 1 (Multi-Drug Resistance 1, *MDR1*), epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor, *EGFR*), *c-MYC*, çoğalan hücre nükleer antijeni (Proliferating Cell Nuclear Antigen, *PCNA*), insülin benzeri büyüme faktörü 2 (Insulin-like Growth Factor 2, *IGF-II*) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, *VEGF*) gibi genleri de aktive edebilmektedir. Bunun yanı sıra yabancı proteinler böyle bir işleve sahip değildirler [66].

Meme kanserinde *P53* mutasyonları yaygın olarak görülmektedir. *P53* mutasyonları özellikle üçlü negatif meme kanserinde (en agresif alt grup) çok yaygın bir şekilde görülmektedir. Bu nedenle *P53* genindeki mutasyonların meme kanserinin ana faktörlerinden birisi olduğu tahmin edilmektedir. Bu mutasyonlar genellikle *P53*

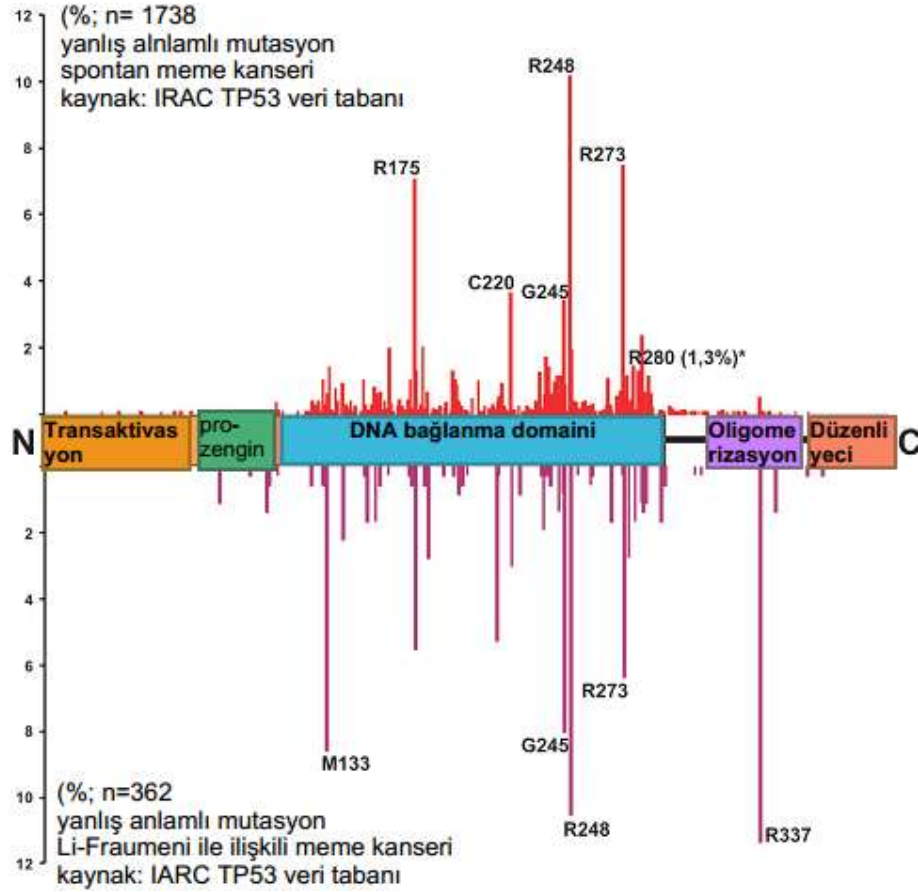
proteininin merkezi bölgesindeki amino asit değişimi ile sonuçlanmaktadır. Bazen mutant P53 proteinleri tümör baskılayıcı gen özelliğini yitirerek onkogenik özellik kazanabilmektedir [67]. Farklı alışmalarda P53 kalıtsal mutasyon sıklığı meme kanserinde yaklaşık < %1'dir [68]. Meme kanserinde P53 geninde germ hattı mutasyonları diğer dokulara göre daha yaygındır (şekil 2.4).



şekil 2.4. Farklı kanserlerde P53 geni germ hattı mutasyonlarının oranı [69].
X koordinatı: Tümör yerleri (saptanmış olgu sayısı)

Li-Fraumeni sendromunda meme kanseri olguları çok yaygındır (>%25) [70]. Bu nedenle P53 germ hattı mutasyonlarının kalıtsal meme kanserinde kesin olarak rol oynadığı düşünölmektedir. Li-Fraumeni sendromu kalıtsal bir sendromdur ve germ hattı P53 mutasyonu rol oynamaktadır [69]. Li-Fraumeni sendromunda mutasyonlar, sporadik meme kanserine benzemekle birlikte hot-spot oranları değişkenlik göstermektedir. Kodon 337 mutasyonunun oranı Li-Fraumeni sendromunda yüksektir (%16). Ayrıca bu kodonun mutasyonunun oranı Li-Fraumeni sendromuna sahip meme kanserli hastalarda %11'dir. Ancak bu oran adrenal tümörlerde % 67' dir. Bu nedenle farklı kanserlerde farklı kodonların mutasyon oranı değişebilmektedir [67].

Meme kanserinde en çok saptanan mutasyonlar, 6. ekzonda bulunan R248Q (NG_017013.2:g.18331G>A) ve 7. ekzonda bulunan R273H (NG_017013.2:g.18749G>A) mutasyonlarıdır. Bu değişimler P53'ün DNA'ya bağlanma özelliğini etkilemektedir ve bu nedenle "bağlama mutasyonları (binding mutations)" olarak adlandırılmaktadır (şekil 2.5) [67].



Şekil 2.5. Spontan ve kalıtsal meme kanserlerinde *P53* mutasyonları [67]

2.4.2. *PTEN*

Fosfataz ve tensin homologu (*PTEN*) geni, 105 kb uzunluğunda ve kromozom 10q23 bölgesinde bulunup 9 ekzondan oluşmaktadır [71]. *PTEN*, fosfataz olarak tanımlanmış ilk tümör baskılayıcısıdır [72]. *PTEN*, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz ve metastaz gibi görevleri yerine getirmektedir [73-76]. *PTEN* mutasyonu veya azalmış ekspresyonu çoğu insan kanserleri ile ilişkilendirmiştir [77]. Glioblastomalar, endometrial, prostat ve meme kanseri gibi sporadik kanserlerde *PTEN* delesyonu veya nokta mutasyonu sık olarak görülmektedir [78]. Monoalelik mutasyon oranı sporadik kanserlerde %50-%80 olarak tahmin edilmektedir. Meme, kolon ve akciğer kanserlerinde bu oran %30-%50'dir. *PTEN*'in tamamen kaybolması çok yüksek bir oranda endometrial karsinoma, glioblastoma, ileri kanserler ve metastazda görülmektedir [79]. *PTEN* kaybı, *BRCA1* eksikliğinden kaynaklanan meme kanserinde sık görülmektedir [80]. Bialelik *PTEN* mutasyonları, endometrial karsinomalarda ve glioblastomada görülmektedir.

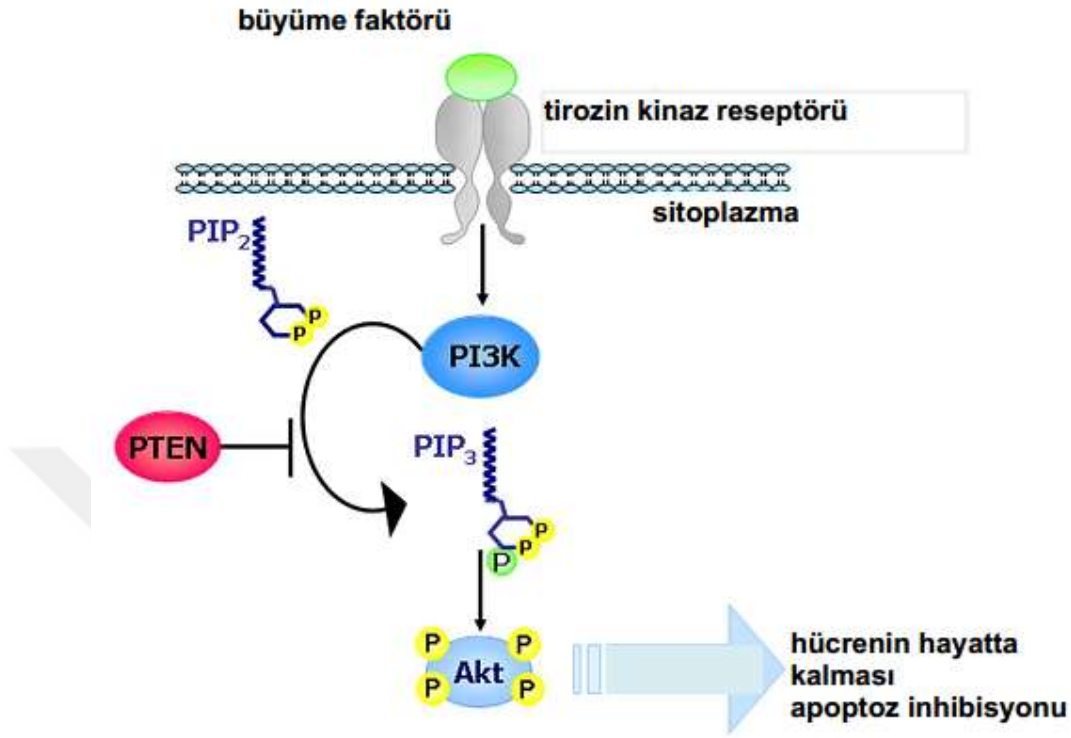
PTEN germ hattı mutasyonları bazı otozomal dominant sendromlarda görülmektedir. Bu hastalıklarda büyüme problemleri, nörolojik bozukluklar, çoklu hamartomalar ve artmış meme kanseri, tiroid kanseri ve endometrial kansere

rastlanmaktadır. Bu hastalıklara PTEN hamartoma tümör sendromları (PTEN Hamartoma Tumor Syndrome, PHTS) denilmektedir ve bunlar Cowden sendromu (Cowden Syndrome, CS), Lhermitte-Duclos hastalığı (Lhermitte-Duclos Deasis, LDD), Bannayan-Riley-Ruvalcaba sendromu(Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome, BRRS), Proteus Sendromu (Proteus Syndrome, PS) ve Proteus-benzeri sendromu (Proteus Like Syndrome, PLS) sendromlardır [81-84]. Bunlardan en önemlisi olan Cowden sendromu (MIM 158350) yetişkinlerde, Bannayan–Riley–Ruvalcaba sendromu (BRRS) (MIM 153480; ref. 3) ise çocuklarda görülmektedir [85]. Cowden sendromu (CS) otozomal dominant bir hastalık olup mukokutenöz lezyonlar, sistemik hamartomlar ve çok sayıda meme-tiroid, genito-urineri ve endodermal kanserler görülmektedir [86]. Hayat boyunca meme kanseri olma olasılığının Cowden sendromlu bir kadın için %25-%50 olduğu tahmin edilmektedir [87]. *PTEN* mutasyonlarının insan kanserlerinde ön plana çıkarak *P53* mutasyonlarından dahi daha etkili olabileceği bildirilmiştir [88]. Homolog kromozomlarda bulunan her iki allelin de işlev kaybı kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açmaktadır [89]. Meme kanserlerinin %10’unda aktif olmayan *PTEN* bulunmuştur [90]. Germ hattı mutasyonları tüm *PTEN* geni boyunca görülse de, mutasyonların büyük çoğunluğunun ekson 5, 7 ve 8’de görüldüğü bildirilmiştir [91].

PTEN bir fosfoinosit 3 (PI3) fosfatazdır ve hücre proliferasyonunu, hücre sağ kalımını ve hücre büyümesini inhibe etmektedir. *PTEN* bu işlevleri fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)’a bağlı yolağın inhibisyonu ile gerçekleştirmektedir [92]. *PTEN*’in önemli hedefi PI3 kinaz (PI3K)’ın ürünü olan fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat [PtdIns(3,4,5) P3]’tır [93-95]. *PTEN* fonksiyonunun kaybolması hem embriyonik kök hücrelerde hem de insan kanser hücre hatlarında PtdIns(3,4,5)P3’ün birikimine ve onun altındaki yolakların ve Akt/PKB molekülünün aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu yolağın aktivasyonu hücre döngüsünün aktivasyonunu ve hücre sağ kalımını sağlamaktadır [96].

Bu yolak tümör başlangıcında, ilerlemesinde ve sonuçlarında önemli rol oynamaktadır. *PTEN*’in çeşitli fonksiyonları vardır. Bu fonksiyonların başında hücre büyümesi, çoğalması, metabolizması, hareketi, göçü, sağ kalımı, anjiyogenez ve otofaji inhibisyonu gelmektedir. Bu yolağın işlevinin bozulması hem meme kanser tümör oluşumunda hem de tedaviye karşı dirençte oldukça önemlidir.

Fosfatidilinositol-4,5- bifosfat -3-kinaz alt ünite alfa (PIK3CA) geni fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)’in 110 α -katalitik alt ünitesini kodlamaktadır. Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) heterodimer yapıda bir lipit kinazdır ve epitelyal hücrelerin sinyalleşmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Çünkü bu kinaz sinyali direkt olarak reseptör tirozin kinazlar [EGFR, HER2, IGFR, trombosit derive büyüme faktörü reseptör (PDGFR), integrinler] ve G protein eşlikli reseptörler üzerinden dağıtmaktadır. Fosfatidilinositol (4, 5) bifosfat (PIP2)’a ek bir fosfat eklenip ve ikincil haberci olan fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfat (PIP3)’ı oluşturmaktadır. PIP3, fosfoinosit-bağımlı protein kinaz-1 (PDK1) ve AKT’yi hücre memberanına çağırır ve orada PDK1 ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) , AKT’yi fosforile ederek aktif hale getirir [4,5,7,8,15-17,19-21]. PI3K’in sinyalleşme yolağı şekil 2.6’da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. PI3-kinazın sinyalleşme yolağı [97]

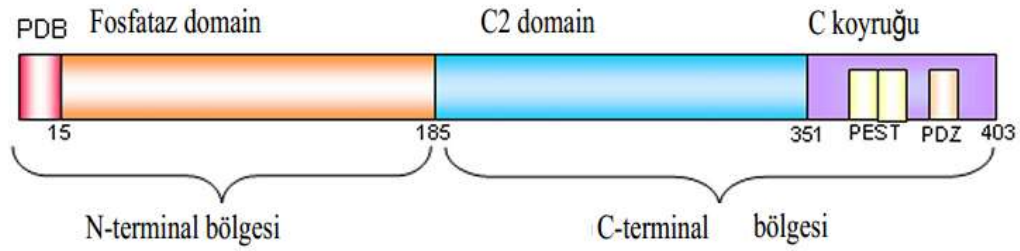
PTEN farklı mekanizmalar ile inaktif olmaktadır. Bunlar mutasyon ve heterozigosite kaybı [98], promotör metilasyonu [99], mikro RNA interferansı [100], fosforilasyon [101], plazma zarında yer değişme [102], C-jun, NF-κB ve HES-1'in *PTEN* transkripsiyonunu inhibe etmesi gibi transkripsiyonel düzenlemelerdir [103-106]. Diğer taraftan, *PTEN* transkripsiyonunu aktive eden EGR1 tümörlü dokularda çekirdekte dışarıya atılarak *PTEN* ekspresyonunu azaltır. Somatik hücrelerde *PTEN* mutasyonu görülmektedir ve bu nedenle *PTEN*, P53'ten sonra ikinci önemli mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır.

Hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurduğu için *PTEN* ekspresyonu anlamlı bir şekilde hücre proliferasyonunun azalmasına neden olmaktadır. *PTEN*, P27kip1 seviyesini artırır ve böylece siklin D seviyesi azalır. Sonuçta hücre döngüsü durur. Ayrıca, *PTEN* hücre göçünün de azalmasına neden olmaktadır ve bu görevi Rac ve cdc42 aracılığı ile gerçekleştirmektedir [102].

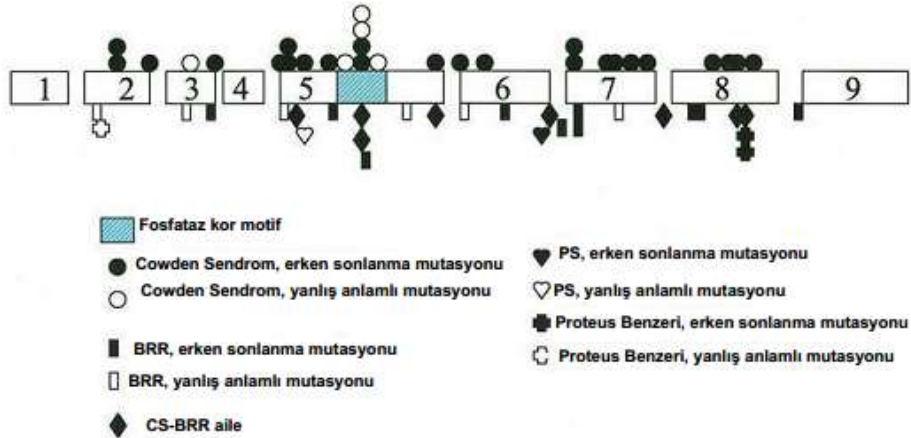
2.4.2.1 *PTEN* Mutasyonları

PTEN'in katalitik aktivitesi çok önemlidir ve bu sebeple herhangi bir neden ile aktivitesi kaybolursa tümör oluşumuna yol açacaktır. Katalitik özelliğini bozan nedenlerden biri de katalitik bölge içindeki mutasyonlardır. Örnek olarak Cys124 mutasyonu *PTEN*'in oksidasyonunu ve lizin (Lys 128 , Lys 125) mutasyonu *PTEN*'in asetilasyonuna ve aktivite kaybına neden olmaktadır[107]. *PTEN* yıkımı ise kaspaz ile bölünme ve ubiquitinasyon olmak üzere iki mekanizma ile gerçekleşmektedir. Leu345Gln gibi bazı mutasyonlar *PTEN*'in degradasyonuna sebep olmaktadır [108].

PTEN 403 amino asitten oluşmakta ve iki bölgeyi içermektedir: N-terminal bölgesi (1–185) PIP bağlama domain (PBD) ve fosfataz domainden oluşmaktadır. C-terminal ise C2 domainden ve C-kuyruğundan oluşmaktadır. PEST (proline, glutamik asit,serin, treonin) dizilerinden ve PDZ- interaksiyon motifi C kuyruğunu oluşturur. C2 ve fosfolipide bağlanan domainler bir birleri ile ilişkilidir. Bu domainlerin PTEN'in fosfolipid zara yerleşmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Fosfataz bölgesinde mutasyon birikimi yanlış katlanmaya neden olur ve bu PTEN'in yarı ömrünü ve enzimatik aktivitesini azaltıcı etki göstermektedir. C2 ve PDB bölgelerindeki herhangi bir mutasyon PTEN'in membran fosfolidlerine bağlanmasını bozar ve böylece tümör baskılayıcı özelliğini engeller. Kuyruğun fosforilasyonu PTEN'in stabilitesini artırır ancak fosfataz aktivitesini de azaltır. Bu sebeple bazı kinazların fazla ekspresyonu sonucu bazı tümörlerde PTEN inaktif hale gelecektir. C-terminalinin PDZ-bağlanma motifi de mutasyon ve delesyon hedefi olarak tanımlanmıştır. Bu bölgenin rolü hücre göçünün inhibisyonunda oldukça önemlidir. Ayrıca bu bölge protein sentezinin engellenmesinde ve PTEN'in plazma zarında stabilizasyonunda rol oynar [109-112]. PTEN proteininin yapısı ve değişik bölgeleri şekil 2.7'de gösterilmiştir. PTEN ekzonlarında germ hattı mutasyonlarının dağılımı şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. PTEN yapısı [97]



Şekil 2.8. PTEN ekzonlarında germ hattı mutasyon dağılımı [75]

2.4.3. CHEK2

CHEK2 proteini *CHEK2* genin ürünüdür. Bu gen insan kromozomunun 22q12.1 bölgesinde bulunmaktadır [113]. CHEK2, G2 kontrol noktası kinazını kodlar. CHEK2 proteini DNA tamirinde önemli rol oynamaktadır. DNA hasarında, CHEK2 proteinin aktivasyonu sonucunda hücrenin mitozaya girişi engellenir. Aktif olmuş CHEK2 hücre siklusunun önemli proteinleri; p53 (MIM 191170), Cdc25C (MIM 157680), Cdc25A (MIM 116947) ve BRCA1'i (MIM 113705) fosforile ederek hücre döngüsünü durdurup, DNA tamirini sağlar [114-116].

CHEK2 geni genomik DNA'da 50kb'lık bir bölgede bulunmakta ve 15 ekzondan oluşmaktadır. CHEK2 proteini 3 domainden oluşur: N-terminal SQ/TQ küme domaini (20–75 amino-asit rezidüleri), Çatal kafa ilişkili(Fork Head Associated , FHA) domain (112–175 rezidüleri) ve serin/threonin kinaz domain (225–490 rezidüleri). Bununla birlikte SQ/TQ regülatör bir domaindir [113]. SQ/TQ kümesi olarak da adlandırılan bu regülatör bölge, 7 serin ya da treonin içerir. Bu 7 serin ya da treonin devamında glutamin içeriği ile takip edilmektedir (SQ/ TQ)) [117]. Fosforilasyon yerleri ataxia telangiectasia-mutated (ATM) proteini tarafından tanınmaktadır. Bu protein gerekli zamanda *CHEK2* aktivasyonunda rol oynamaktadır. İyonize edici radyasyonlar ve başka genotoksik durumlarda bu aktivasyon gerçekleşmektedir [117]. FHA bölgesi başka fosforile edilmiş proteinlere de bağlanabilmektedir, özellikle bu bölge fosfotreonin rezidülerini tanıyıp işlev görmektedir.

2.4.3.1 Meme Kanserinde *CHEK2* Mutasyonları

CHEK2 meme kanserinin orta penetranslı aday geni olarak gösterilmektedir. Ancak kalıtsal mutasyon bu gende çok nadir ve popülasyona özgüdür. *CHEK2*'de , bir erken sonlanma mutasyonu (delesyon sonucu) olan 1100delC (ekzon 10'da), meme kanseri riskini iki kat arttırmaktadır, bu oran birinci derece akrabalarda meme kanseri tanısı var ise daha da fazladır. Proteinin kritik bölgesinde olan bu mutasyon proteinin kinaz işlevini kaybetmesine yol açmaktadır [118]. Bu mutasyonun sıklığı popülasyona bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [118-120]. Bu mutasyon kuzey-batı Avrupa kökenli kadınlarda bulunmaktadır, bazı popülasyonlarda heterozigot allel sıklığı %1.5 olarak tahmin edilmiş olup başka toplumlarda bu mutasyon çok nadir veya hiç yoktur [121]. *CHEK2* geninin kinaz aktivitesinin bozulması olasılıkla meme kanserine sadece neden olmakla kalmaz aynı zamanda meme kanseri sağkalımını ve adjuvant terapisini de etkilediği düşünülmektedir [122]. Bu mutasyon bir erken dur kodon oluşturmakta ve heterozigot taşıyıcılarda daha az *CHEK2* mRNA ifadesine neden olmaktadır. *BRCA1/2* patojenik mutasyonu taşıyanlarda 1100delC mutasyonu varlığı meme kanser riskini değiştirmemektedir [121].

CHEK2 c.1111C > T (p. H371Y) mutasyonu CHEK2 kinaz domaininin aktivasyon bölgesinde gerçekleşmekte ve bu sebeple *CHEK2* aktivitesini çok azaltmaktadır [123]. Çin'li kadınlarda bu mutasyon meme kanseri riskini 2.43 kat arttırmaktadır[122].

p.S428F yanlış anlamlı mutasyonu sadece Ashkenazi popülasyonunda görülmektedir ve sıklığının %2.88 olduğu tahmin edilmiştir [124].

p. Ile157Thr (c.470T>C) varyantı FHA domainde ve ekzon 3'te lokalizedir. Bu mutasyon da meme kanseri ile ilişkilidir ancak oluşan risk, 1100delC allelinin oluşturduğu riske göre daha azdır [117]. Bu mutasyon sonucu ile p53, BRCA1 ve Cdc25A'ya CHEK2 bağlanması ciddi bir şekilde hasar görmektedir. Ile157Thr stabilitesi yüksektir ve yabancı tip ile dimer oluşturmaktadır. CHEK2 geninin iyonizasyona karşı yanıt oluşturmaya engel olmaktadır [125].

IVS2+1 G>A ekleme kırma mutasyonudur ve Polonya toplumunda meme kanseri riskini iki kat arttırmaktadır, sıklığının %1.1 olduğu tahmin edilmiştir. Almanya'da ise sıklığı daha azdır [126].

*CHEK2*del5395 ekzon 9 ve 10'un kaybına neden olan mutasyonunun Çek, Slovak ve Polonya toplumlarında sıklığı %0.9-1.3 olarak bildirilmiş olup meme kanseri riskini iki kat attığı belirtilmiştir. Bu mutasyon Hollanda toplumunda çok yaygındır [124, 127].

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada ailesel hastalık öyküsü göz önüne alınarak yüksek risk grubu birey olarak değerlendirilen meme ya da over kanseri tanısı almış ve *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tüm gen dizi analizi yapılmış ancak herhangi bir patojenik mutasyon saptanamamış olan olgulardan birbiri ile akrabalık durumu olmayan 12 olgu çalışmaya dahil edildi.

Birinci ya da ikinci derece akrabaları arasında kendisi dışında en az iki ya da daha fazla kişide meme, over, prostat yada diğer kanser tanısı almış bireyler yüksek risk grubu olarak değerlendirildi.

BRCA1 ve *BRCA2* dizi analizi ile mutasyon taraması çalışmaları anabilim dalımızda rutin olarak yapılmaktadır. Sonucu negatif çıkan ve araştırma kriterlerini sağlayan olgulardan araştırmaya katılmak isteyen bireylerden yazılı ve imzalı izin alınan, olgularda Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PZR) ve DNA dizi analizi temelli çalışma gerçekleştirildi. Araştırma kapsamında *PTEN* geni ekson 2,3,5,6,7,8 bölgeleri, *p53* geni ekson 4,5,6,7,8,9 bölgeleri, *CHEK2* geninin ise tüm kodlayıcı ekson bölgeleri (2-15. eksonlar) DNA dizi analizi yöntemi ile tarandı. DNA dizi analizi için özgül primerler ile ilgili gen bölgeleri amplifiye edilip, floresan işaretli boya sonlandırıcısı ile Sanger yöntemi temelli çalışma gerçekleştirildi, Otomatik kapiler elektroforezi ile örnekler yürütüldü. Sonuçlar NCBI veritabanına göre analiz edildi.

3.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen hastaların periferik kan örnekleri K3EDTA'lı tüplere alınarak tuzla çöktürme (salting-out) yöntemiyle DNA izolasyonları gerçekleştirildi.

3.1.1 Kullanılan Maddeler

Eritrosit Lizis Tamponu

155 mM NH₄Cl (Sigma)

10 mM KHCO₃ (Sigma)

0.5 M EDTA (Sigma)

500 ml lizis tamponu hazırlamak için 4.14 g NH₄Cl (Sigma), 0.5 g KHCO₃ (sigma) ve 2 ml EDTA (sigma) 500 ml bidistile suda çözüldü. Solüsyonlar otoklavda steril edildi ve +4°C'de saklandı.

EDTA (0.5M, PH=7.4): 18.61 g EDTA (sigma) 100 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Solüsyonun pH'sını ayarlamak için NaOH çözetisi kullanıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

Lökosit Lizis (WBL) Tamponu

10M NaCl (Merck)

0.5M EDTA (Sigma)

0.1 M NaCl solüsyonu hazırlamak için, 23.4 g NaCl, 100 ml bidistile suda çözüldü ve otoklavlandı. 100 ml WBC tamponu hazırlamak için 0.1M NaCl'den 2.5 ml, 0.5 M EDTA'dan 5 ml alındı ve steril bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Solüsyonu (%10'luk)

10 g SDS (Boehringer Mannheim) tartılarak, 100 ml bidistile suda çözüldükten sonra 0.22 µm'lik filtereden (costar) geçirildi ve steril edildi.

Proteinaz K Solüsyonu

100 mg proteinaz K (Boehringer Mannheim) 10 ml Tris-HCl (1 mM, pH7.5)'de çözüldü.

Amonyum Asetat (AmAc) Solüsyonu (9.5 M)

36.613 g AmAc (sigma) tartılarak, 15 ml steril bidistile suda çözüldü. Tamamen çözüldükten sonra son hacim 50 ml'ye tamamlandı.

3.1.2. İşlemler

1. K3EDTA içeren (Venoject) tüpler 10 ml periferel kan örneği alındı.
2. Tüp alt-üst edilip içerisindeki kan homejeneze edildikten sonra 50 ml'lik steril santrifüj tüpüne (Cellstore) aktarıldı.
3. Üzerine 30 ml (1:3 oranında) lizis tamponu eklenerek vorteks (Nüve) yardımı ile homojeneze edildi.
4. 20 dk -20°C'de bekletildi.
5. 1500 rpm'de, +4°C'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde (sigma) santrifüj edildi.
6. Dökelti atıldı, çökelti önce el yardımı ile vurarak sonra santrifüj ile homojenize edildi.
7. Üzerine 20 ml seviyesine kadar tekrar lizis tamponu eklendi vorteks ile homojenize edildi.
8. 5 dakika -20°C'de inkübe edildi
9. 1500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi
10. Dökelti atıldı, elle vurarak kaldırıldı.Vorteks ile homojinize edildikten sonra üzerine 9,4 ml WBL tamponu eklendi.
11. Karışıma 500µl %10'luk SDS ve 100µl proteinaz K eklendi.

12. Kapağı kapatılan ve karışımı içeren 50 ml'lik tüp, 37°C'de gece boyu inkübe edildi.

13. İnkübasyon sonrası her 1 ml için 370 µl 9.5 M AmAc eklendive vorteks yardımı ile iyice homojinize edildi.

14. 5000 rpm'de 25°C'de 30 dakika santrifüj edildi.

15. Üst faz yeni bir steril 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak, üzerine 1:2 oranında %96 soğuk etanol eklendi. Tüp alt üst edilerek DNA'nın çöktürülerek görünür hale gelmesi sağlandı.

16. Çöken DNA, pipet ucu ile alındı ve içinde 500 µl, %70'lik etanol bulunan ependorf tüpüne bırakılarak yıkandı.

17. 13000 rpm'de 25°C'de 10 dakika santrifüj edildi.

18. Dökelti boşaltılıp, ependorf tüpün kapağı açık bırakılarak, 37°C'de etüve konularak alkol kurutuldu.

19. DNA 150 µl steril bidistile suda çözülerek, çalışıncaya kadar +4°C'de saklandı

3.3. DNA Miktarının Ölçülmesi

Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik bölümüne ait olan nano drop 1000 (V.3.7) spektrofotometre ile tüm hastalara ait DNA miktarları ve saflıkları ölçüldü.

3.4. PCR Amplifikasyonu

3.4.1. CHEK2

CHEK2 geninde tüm kodlama yapan ekzonlar (ekzon2-ekzon15) incelendi. Bu amaçla ekzon 2-11-12-15 için önceki çalışmalarda kullanılan primerler [128] kullanıldı ve kalan ekzonlar için (ekzon 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13,14) uygun bir çift primer tasarlandı. Primer tasarımı için NCBI sitesinde online primer tasarlama programı kullanıldı (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?ORGANISM=9606&INP_UT_SEQUENCE=NG_008150.1&LINK_LOC=nucore&PRIMER5_START=5001&PRIMER3_END=59092).

CHEK2 için tasarlanmış ve kullanılmış primer dizileri çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. CHEK2 geninin ekzonlarının primerleri, ekzon 2-15

Ekzon 2 F-primer R-primer Tm	Dizi (5'->3') GAACTATAGGTCTGGGCTGTTAGG TCCACCTGGTAATACAACCTTCTG 57
Ekzon 3 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') ACTGCCATTTGTAAACTCATTGGT CGCCCAGCAACTTACTCATC 60
Ekzon 4 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') ACTGGTTTGGGAGGGACAAAA CAATGCAACTAGGACGGCAAA 60
Ekzon 5 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') CTGTTGTAAATCTGCATGGGCA ATTAGTTGTGCATGGTGCTGC 60
Ekzon 6 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') TGCTGGGCTCAGAAATGGAA GCAGGGGGTTATTCCCTGAGTT 60
Ekzon 7 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') TGTGGAGACTAGGGCAAGTG AGCTAGGCATGTGTGTGAATG 60
Ekzon 8 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') TGCTCTGGGGTAGTGAGGAA ACCCACAGTTATGGTGAGCC 60
Ekzon 9 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') GCCTCCAATGCCCAATCCTT TTTCTCTTAAGCTACACAGTGAGAG 58
Ekzon10 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') TCTGCTGTGTGAAGAGTTGT TCGTCCATTTAGACCCCTCCT 60
Ekzon11 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') TTAATTTAAGCAAAATTAATGTCC GGCATGGTGGTGTGCATC 54
Ekzon 12 F primer R primer Tm	Dizi (5'->3') GCTGGGATTACAAGCCTAAGG GAAGAACTCCCACCACAGC 69

Ekzon 13	Dizi (5'→3')
F primer	AGCAACAAGAGAGGGGAACAGG
R primer	GTTGTAACCCATCCTCCAAGATAC
Tm	60
Ekzon 14	Dizi (5'→3')
F-primer	TGGTCCGGGAAGGATTTGAG
R-primer	GATGACAATCCCTAGCTGTGCT
Tm	60
Ekzon 15	Dizi (5'→3')
F primer	CCCCCACTTTACTGGAAGC
R primer	GCAAAACCCTGTCTCTACAAAAT
Tm	64

CHEK2 geni amplifikasyonunda kullanılan PCR içerikleri çizelge 3.2.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. *CHEK2* genin amplifikasyonu için kullanılmış malzemeler

İçeriği	Miktar µl
Buffer (10x)	2.5
Mgcl2 (mM)	2-3.5
dNTP (10mM)	0.5
İleri primer (10 pM)	0.5
Geri primer (10 pM)	0.5
Taq polimeraz (5U/ µl)	0.15
dH2O	farklı
DNA (20 ng/µl-30 ng/µl)	2.5

CHEK2 geninin ekzonlarını amplifiye etmek için kullanılan PCR koşulları çizelge 3.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. *CHEK2* geninin ekzonlarını amplifiye etmek için kullanılan PCR koşulları

Aşama	Açıklama	Sıcaklık	Zaman
1	Denaturasyon	94°C	5dk
2	Amplifikasyon 35-42 döngü	94 °C	45 s
		58-69°C	45 s
		72 °C	1 dk
		72 °C	7 dk
3	Bekleme	4 °C	Sonsuz

3.4.2. *PTEN*

PTEN amplifikasyonu GML (Altendorf, Switzerland) Seqfinder Sequencing System *PTEN* KIT (REF: 149010D) kullanıldı. Üritici firmının önerisine göre kullanılan PCR içerikleri çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.4 *PTEN* geninin ekzonlarını amplifikasyonunda kullanılan PCR içerikleri

İçeriği	µl
GML PCR miks	7.5
GML taq pol.	0.2
PTEN primer miks	2.0
GML enhancing tampon	2.0
Distile su	2.0
Genomik DNA (20-60 ng/ µl)	2.0
Toplam	15

PTEN genin amplifikasyonunda kullanılan PCR koşulları çizelge 3.4. te sunulmuştur.

Çizelge 3.5. *PTEN* geni için PCR koşulları

Aşama	Açıklama	Sıcaklık	Zaman
1	Aktivasyon	96°C	5 dk
2	Amplifikasyon 40 döngü	95 °C	45 s
		60 °C	1dk
		72 °C	1dk
3	Son uzama	72 °C	7 dk
4	Bekleme	4 °C	Sonsuz

3.4.3. *TP53*

Amplifikasyon için GML (Altendorf, Switzerland) Seqfinder Sequencing System P53 KIT (REF: 148022 ve 148025) kullanıldı. PCR içerikleri çizelge 3.5. te sunulmuştur.

Çizelge 3.6. *TP53* geni için PCR içerikler

İçeriği	Miktar (µl)
GML PCR miks	7.5
GML taq pol.	0.2
TP53 primer miks	2.0
GML enhancing tampon	2.0
Distile su	2.0
Genomik DNA (20-60 ng/ µl)	2.0
Toplam	15

TP53 geni için PCR koşulları çizelge 3.6. da verilmiştir.

Çizelge 3.7. TP53 geni için PCR koşulları

Aşama	Açıklama	Sıcaklık	Zaman
1	Aktivasyon	96°C	5 dk
2	Amplifikasyon 40 döngü	95 °C	45 s
		60 °C	1dk
		72 °C	1dk
3	Son uzama	72 °C	7 dk
4	Bekletme	4 °C	Sonsuz

3.5 PCR Ürünlerinin Kontrol Edilmesi

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Jel hazırlamak için agaroz (Applichem lot: 0D002474) ve TBE kullanıldı. 10x TBE hazırlamak için 216 gr Tris, 110 gr Borik Asit, 18.6 gr EDTA ve bidistile su ile 2 litreye tamamlanarak çözüldü. Kullanım için 10x TBE 1x olacak şekilde bidistile su kullanarak seyreltildi.

3.6 PCR Ürünlerinin Purifikasyonu

PCR ürünlerinin saflaştırması purifikasyonu için exosap kullanıldı. Her 5µl PCR ürünü için 2µl exosap kullanıldı ve exosap PCR protokolü uygulandı. Protokole göre enzim inkubasyonu için 37°C'ta, 30 dakika, enzim inaktivasyonu için 80°C'ta, 15 dakika tutuldu.

3.7 Big Dye Reaksiyonu

Boya sonlandırıcısı olarak "Big dye" kullanıldı. Amplifikasyon protokolü çizelge 3.8'de amplifikasyon koşulları çizelge 3.9'da sunulmuştur.

Çizelge 3.8. Big dye aşamasının içeriği.

İçeriği	Miktar (µl)
Big dye	2
Dizileme Tamponu	2
F/R-primer	2
Distile Su	2
PCR ürünü	2

Çizelge 3.9. Big dye PCR'ın koşulları.

Aşama	Açıklama	Sıcaklık	Zaman
1	Aktivasyon	96°C	1 dk
2	Amplifikasyon 40 döngü	96 °C	10 s
		50 °C	5 s
3	Son uzama	60 °C	4dk
4	Bekletmek	4 °C	Sonsuz

3.8 Bigdye İle Muamele Edilmiş Ürünlerinin Purifikasyonu

Bu aşamada sephadex (GML, Altendorf, Switzerland) kullanıldı. Her örnek için 700 µl hazırlanmış sephadex filter kolona eklendi. Sonra 4500 rpm’de 3 dk santrifüj yapıldı, sonra supernatan atıldı ve elde edilen sephadex kolona örnekler yüklendi. Sonra yine 4500 rpm’de 3dk santrifüj yapıldı. Kolondan geçen örnekler otomatik kapiler eletroforezi cihazına yüklendi. Sephadex hazırlaması için 1gr sephadex tuzu 14ml distile suya eklendi ve yaklaşık 30 dk yavaşça çalkalandı.

3.9. Analizler

Dizilerin analizi için özel programlar kullanıldı.

3.9.1. Seqanalysis

Ham verilerin analizinde elektroforogramın incelemesinde Seqanalysis (v.3.1) programı kullanıldı.

3.9.2. Chromas Lite

Elektroforogramın ve fasta formatında verilerin incelemesi Chromas Lite (v. 2.1.1) kullanarak gerçekleştirildi.

3.9.3. Blast

Fasta formatında incelediğimiz dizi ile referans dizilerin karşılaştırılmasında “blast” programı kullanıldı. Bu programın web adresi aşağıda sunulmuştur.

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq

TP53 için NCBI referans dizi: NG_017013.2’dir. *PTEN* için NCBI referans dizi: NG_007466.2’dir. *CHEK2* için NCBI referans dizi: NG_008150.1’dir.

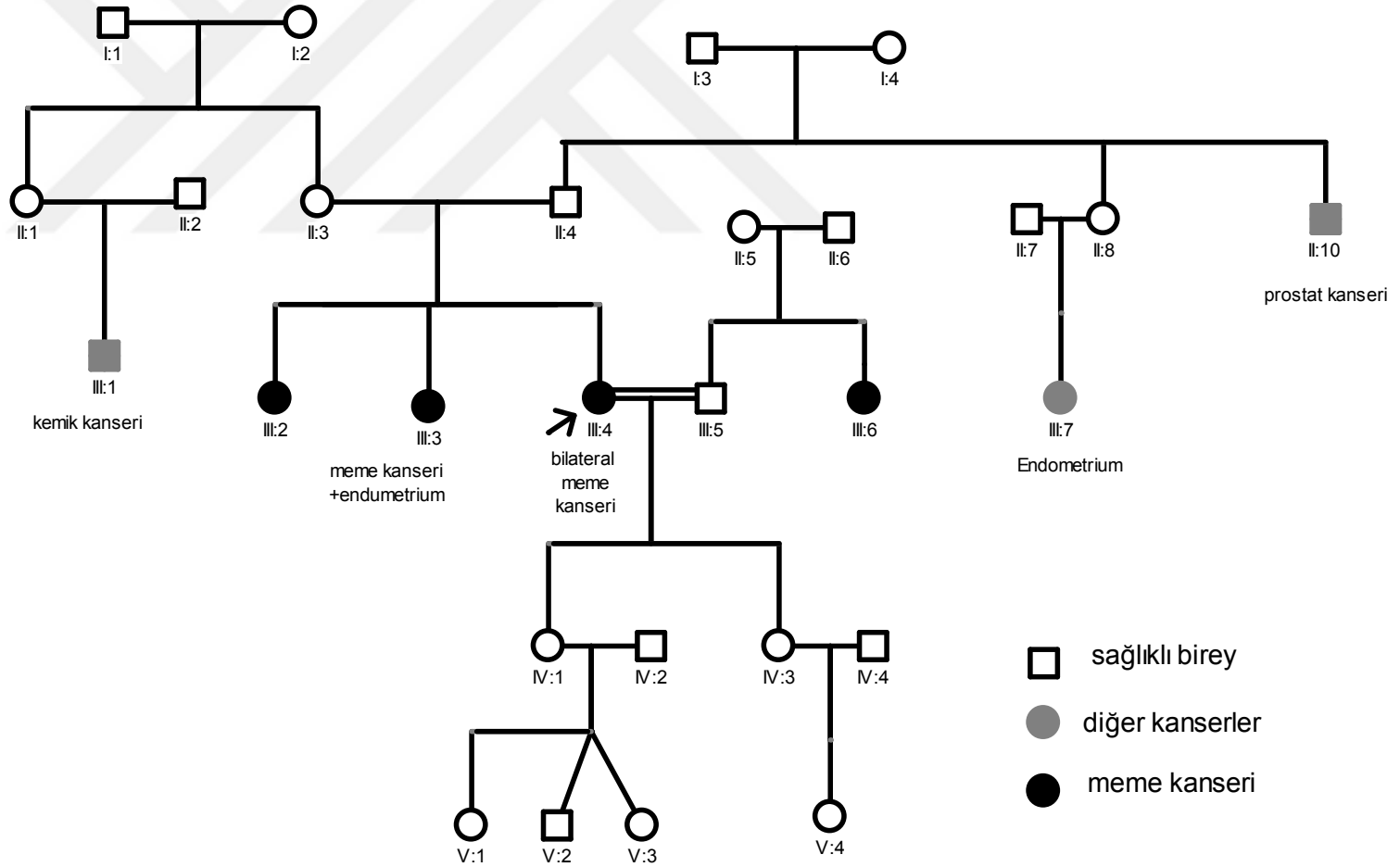
BULGULAR

4.1 Olgular

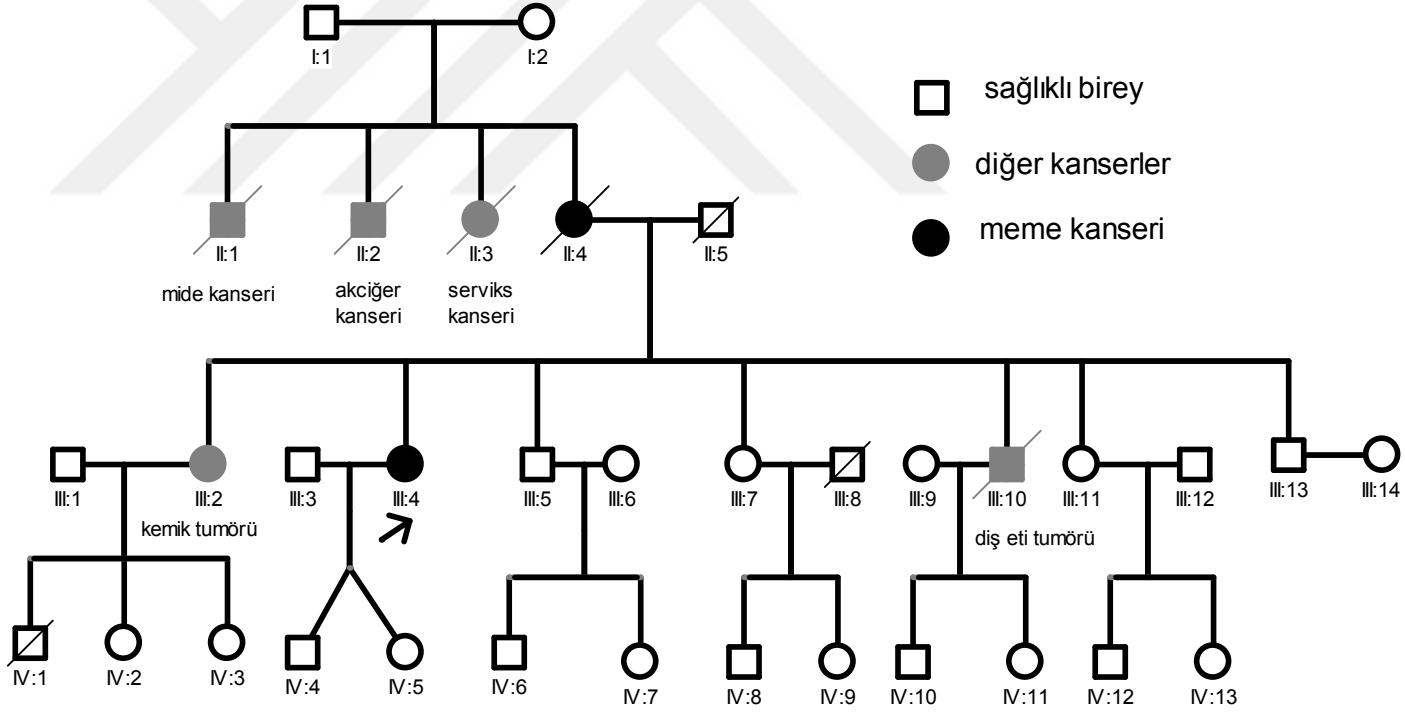
Çalışmaya dahil edilen 12 hastaya ait pedigriler şekil 4.1-4.12 sunulmuştur. Olguların tanısı, tamı yaşı ve bulunan mutasyonları tablo 4.1’de sunulmuştur.

4.2 Saptanan Mutasyonlar

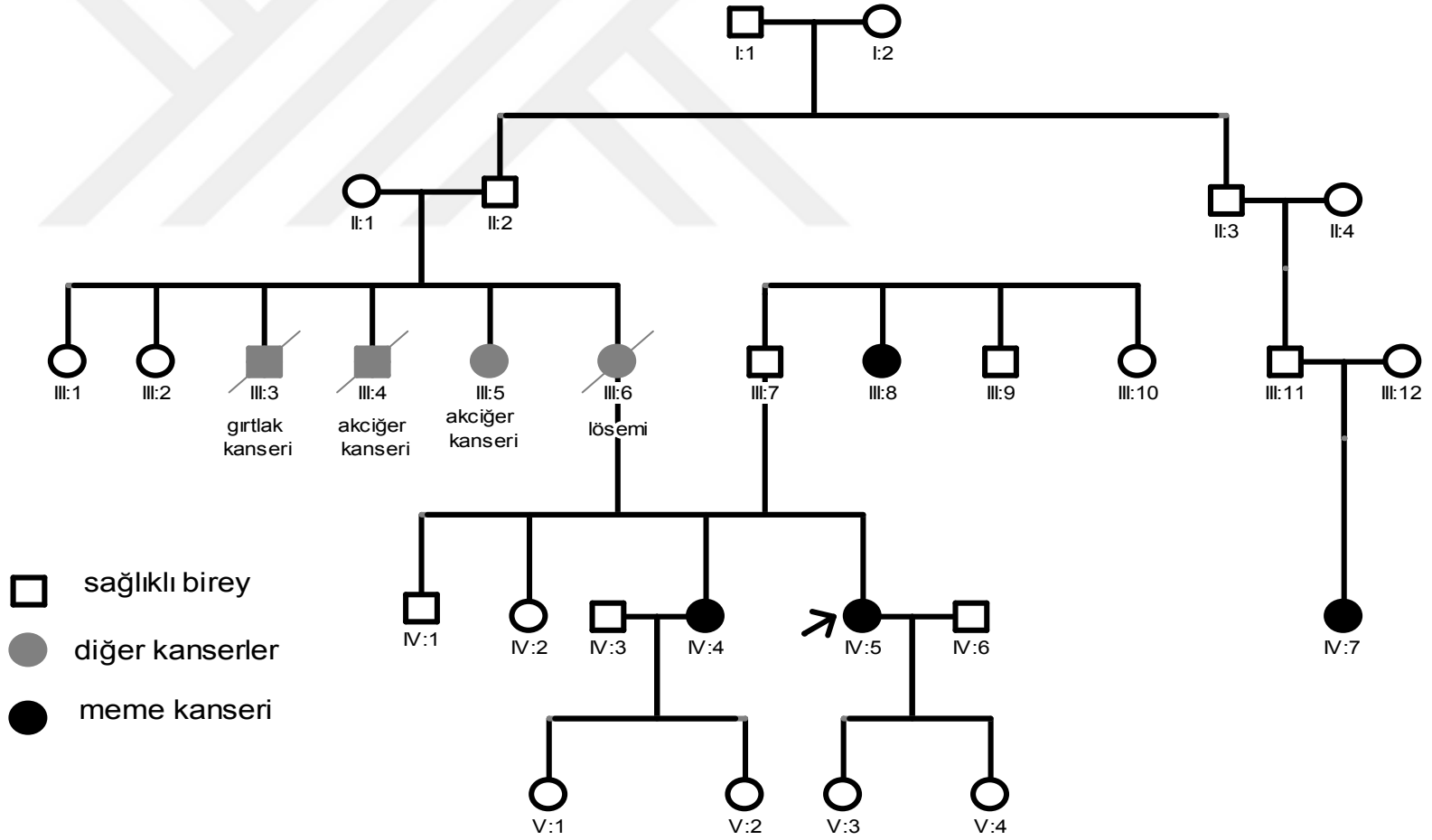
Tüm olgularında *TP53*, *PTEN* ve *CHEK2* genlerinin incelenmesi sonucunda saptanan mutasyonları daha detaylı tablo 4.2’de sunulmuştur. Ayrıca saptanan mutasyonların elektroforegramı da şekil 4.13-4.16’da sunulmuştur.



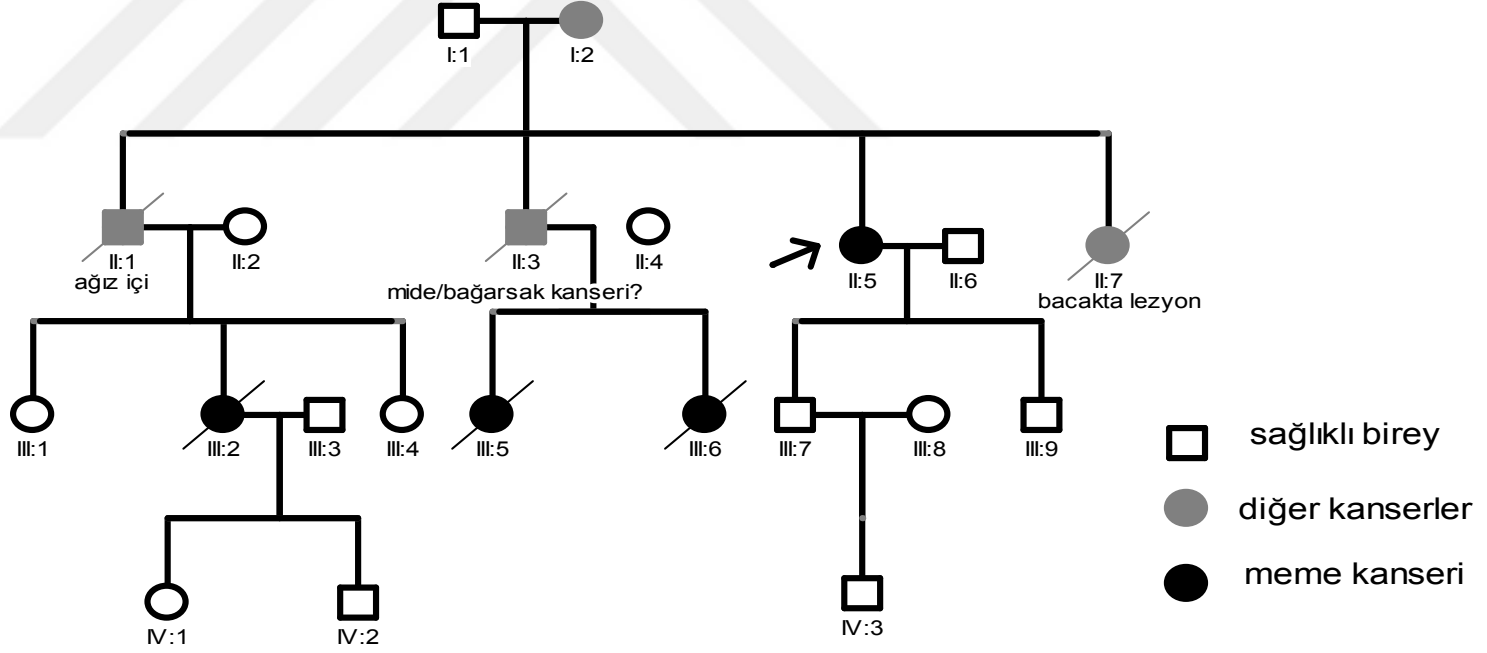
Şekil 4.1. 1. numaralı olgunun pedigrisi.



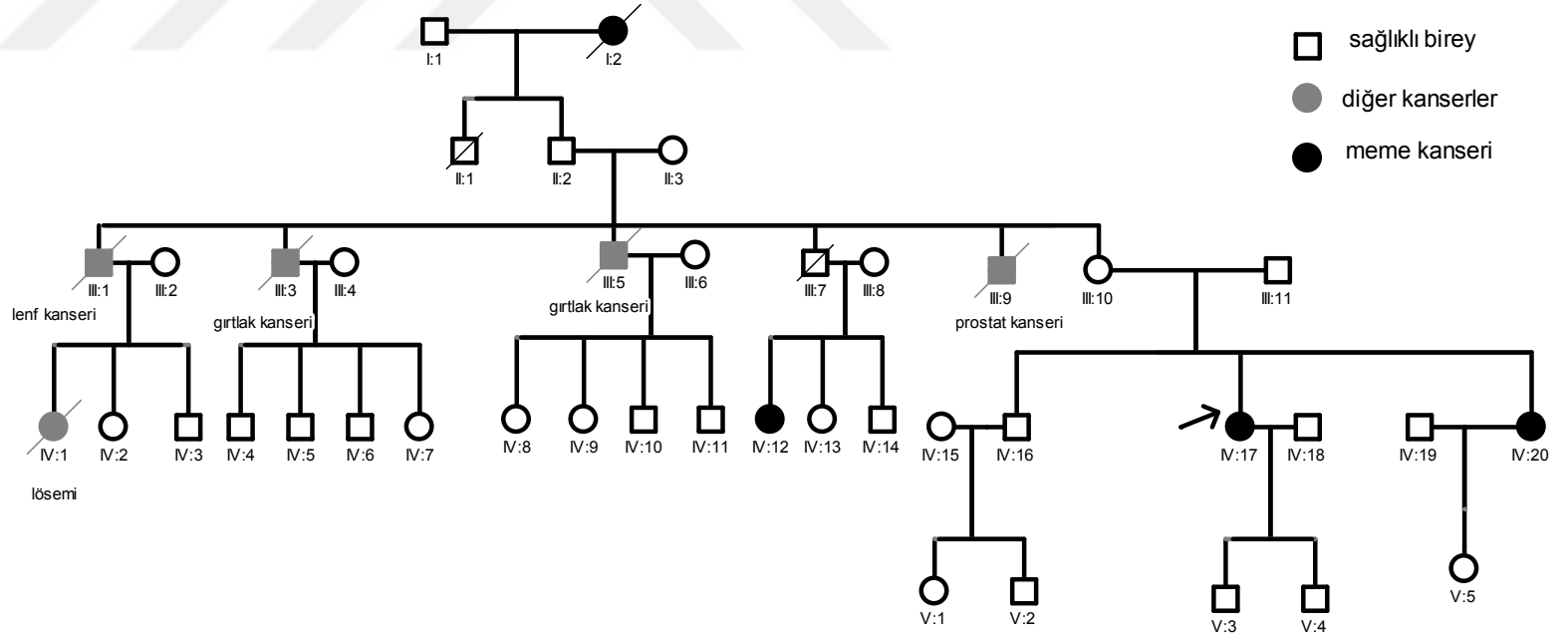
Şekil 4.2. 2 numaralı olgunun pedigrisi.



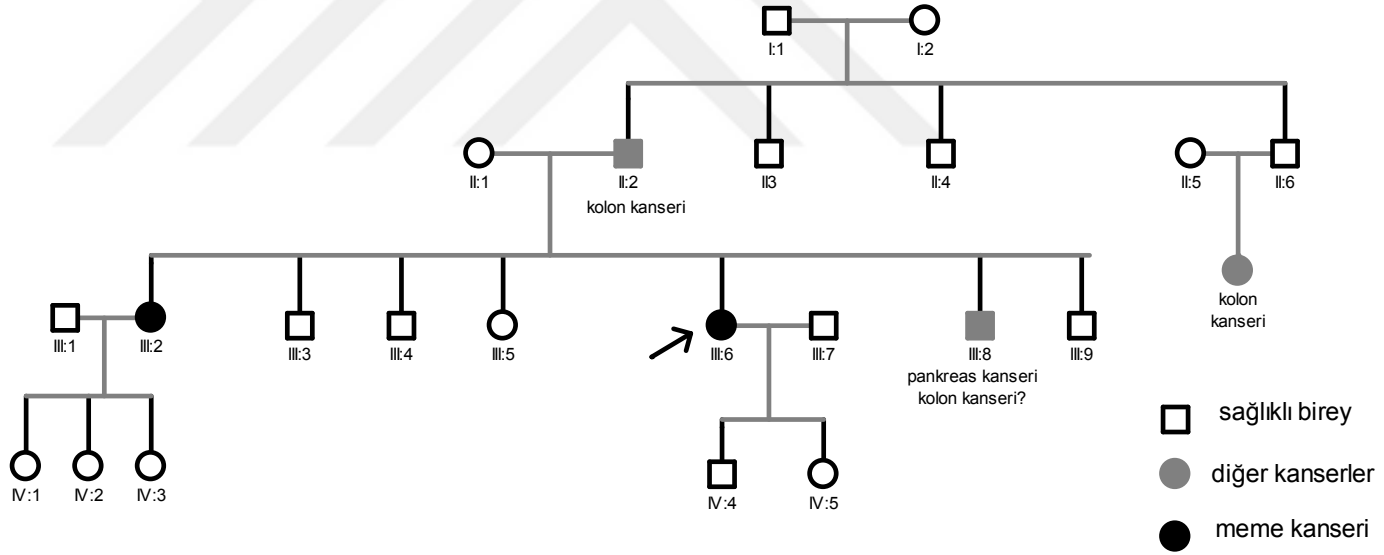
Şekil 4.3. 3 numaralı olgunun pedigrisi.



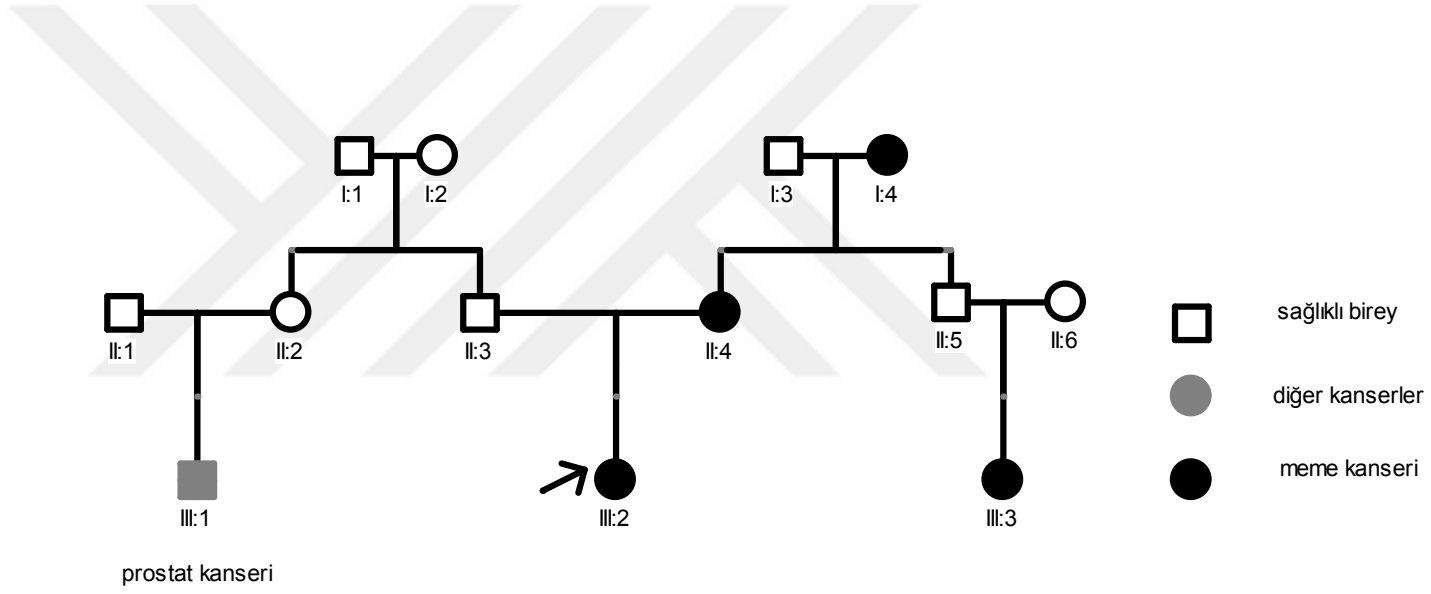
Şekil 4.4. 4 numaralı olgunun pedigrisi.



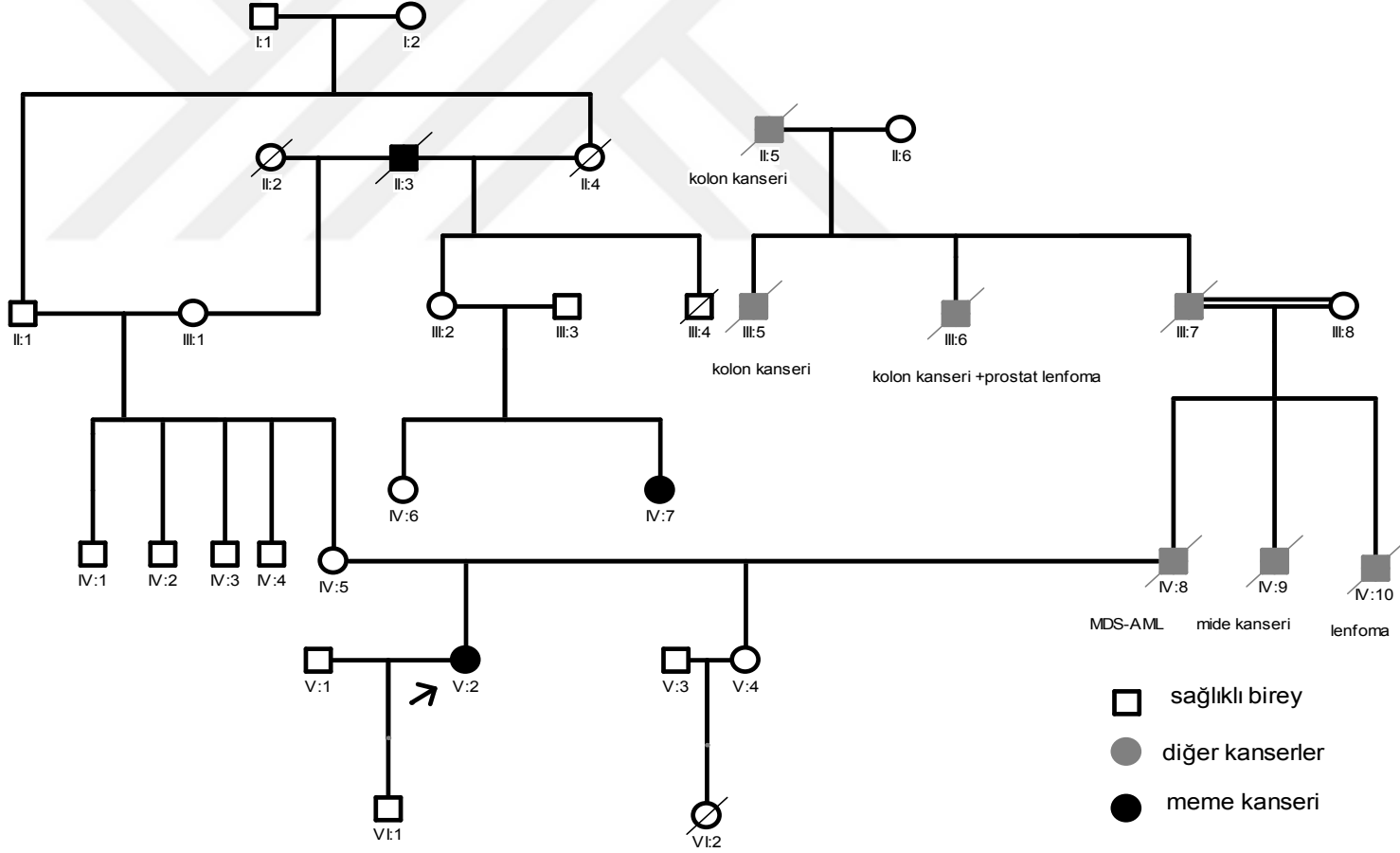
Şekil 4.5. 5 numaralı olgunun pedigrisi.



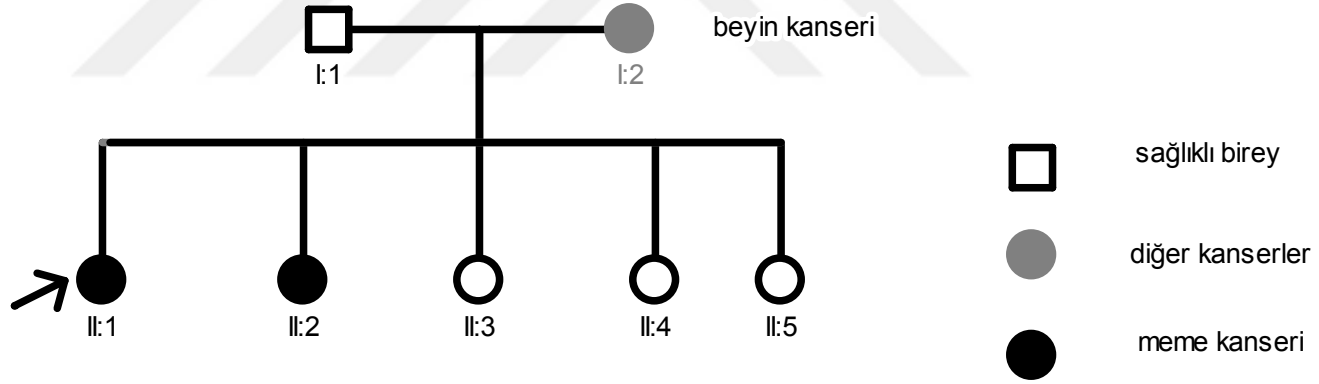
Şekil 4.6. Altı numaralı olgunun pedigrisi.



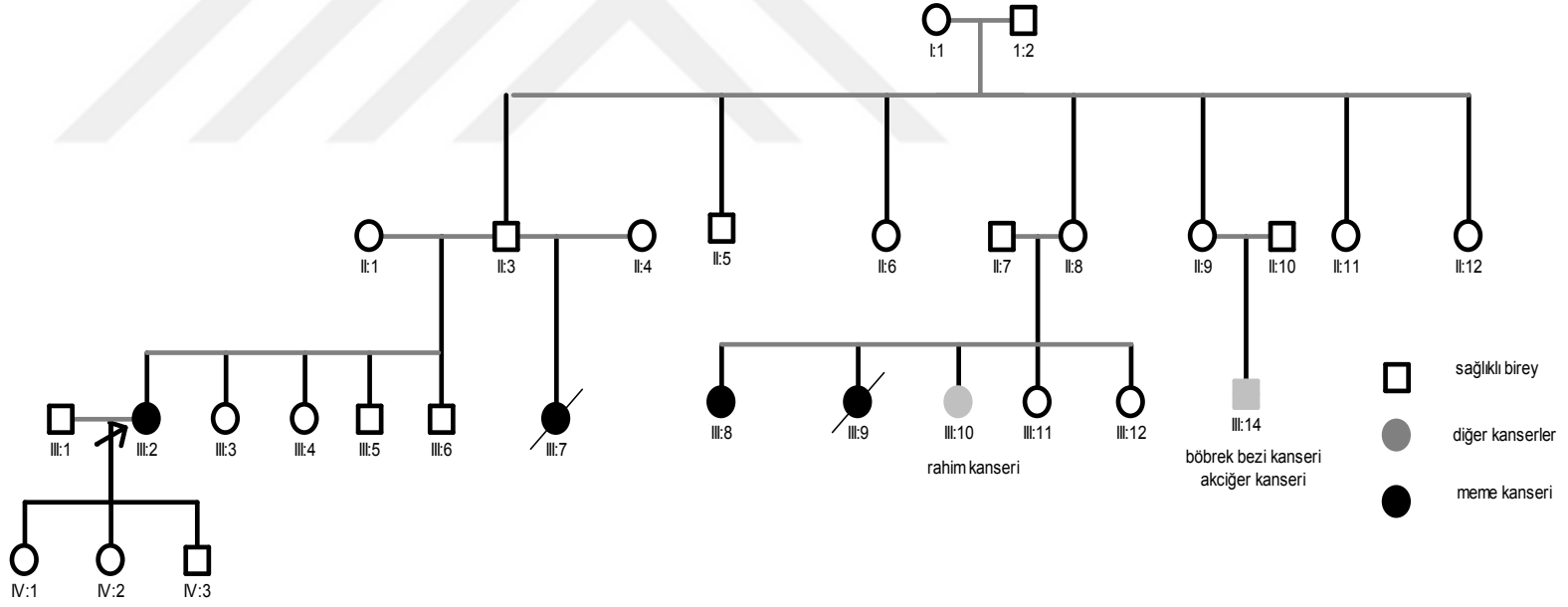
Şekil 4.7. 7 numaralı olgunun pedigrisi.



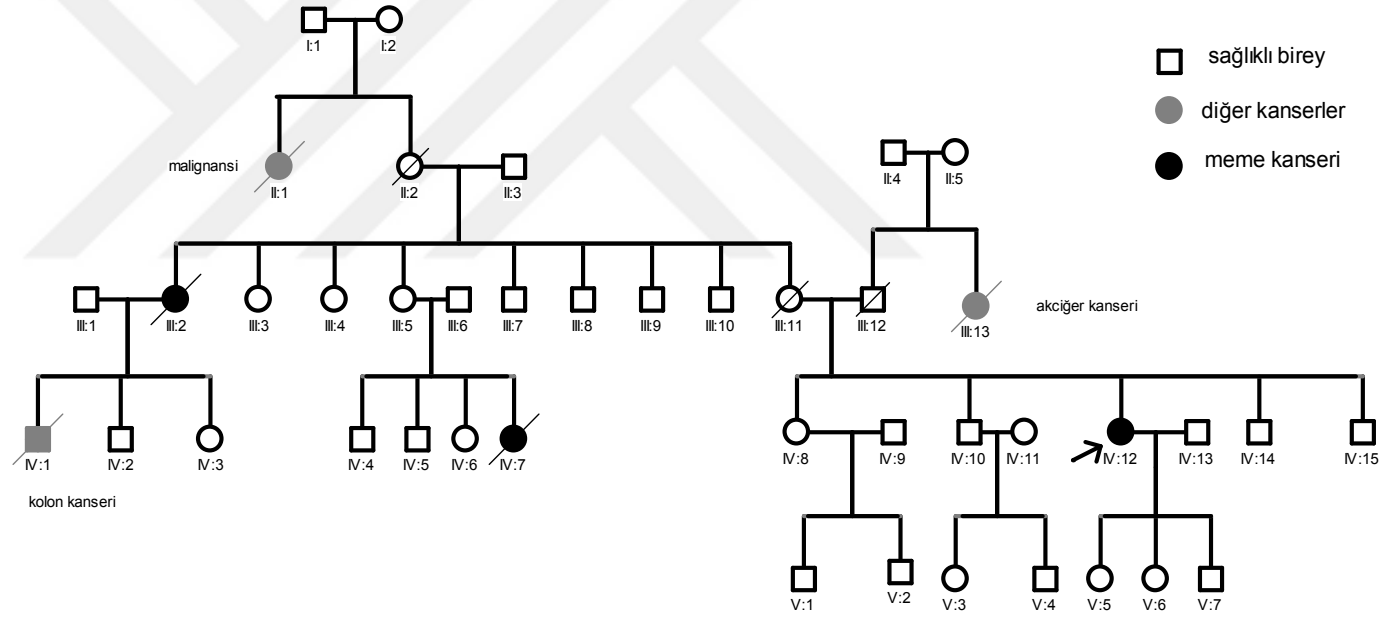
Şekil 4.8. 8 numaralı olgunun pedigrisi.



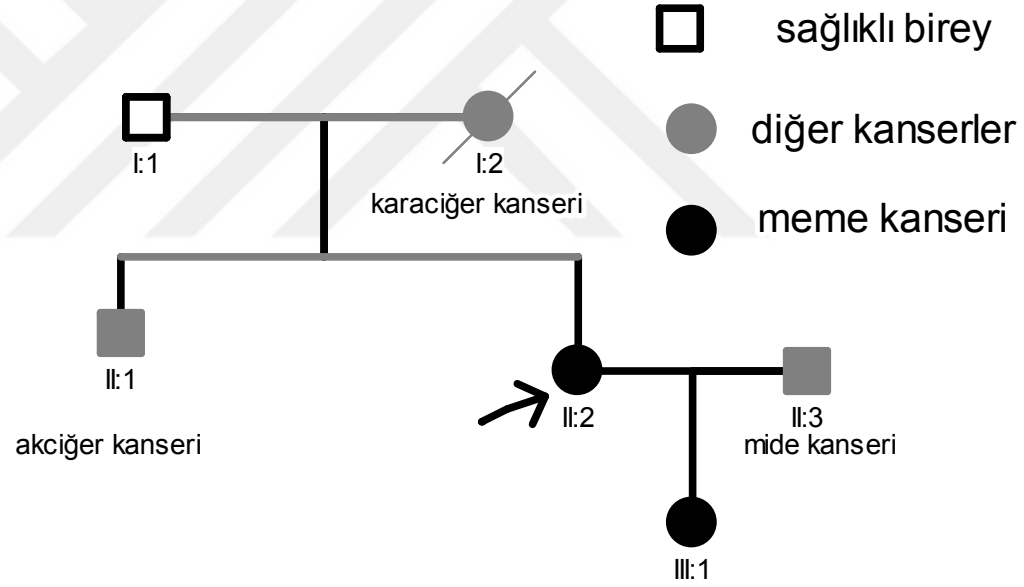
Şekil 4.9. 9 numaralı olgunun pedigrisi.



Şekil 4.10. 10 numaralı olgunun pedigrisi



Şekil 4.11. 11 numaralı olgunun pedigrisi.



Şekil 4.12. 12 numaralı olgunun pedegrisi.

Çizelge 4.1 olguların tanısı, tanı yaşı ve bulunan mutasyonu

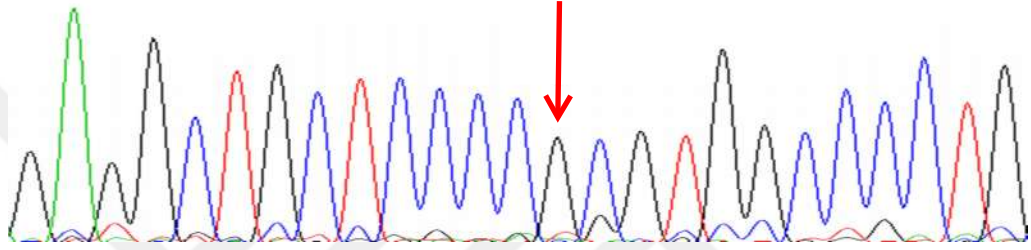
Hasta No	Tanısı	Tanı Yaşı	Bulunan Mutasyon		
			<i>TP53</i>	<i>PTEN</i>	<i>CHEK2</i>
1	Bilateral Meme Kanseri	43 Yaş-47 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Homozigot)	_____
2	Meme Kanseri	53 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____
3	Meme Kanseri	55 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____
4	Mame Kanseri	52 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____
5	Bilateral Meme Kanseri	42 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____
6	Meme Kanseri	39 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____
			NG_017013.2:g.17658G>A, NM_000546.5:c.638G>A NP_001119584.1:p.Arg213Gln (Heterozigot)		

7	Meme Kanseri	47 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	NG_008150.1:g.21736T>C NM_001257387.1:c.-308T>C NP_009125.1:p.Ile157Thr (Heterozigot)
8	Meme Kanseri	40 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____
9	Meme Kanseri	40 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____
10	Bilateral Meme Kanseri	45 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____
11	Meme Kanseri	55 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____
12	Meme Kanseri	54 Yaş	NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg (Homozigot)	NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT (Heterozigot)	_____

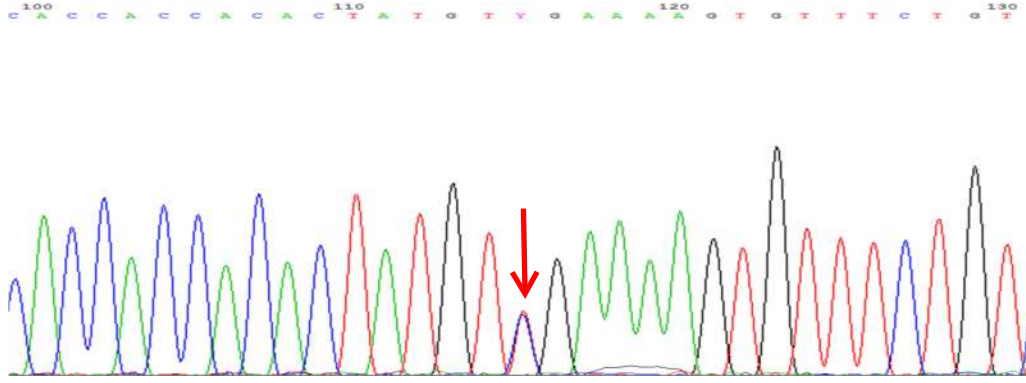
Çizelge 4.2. Saptanan mutasyonların detayları

Saptanan Mutasyon	Gen	Ekzon/İntron	Saptanan Olgu	Heterozigot/Homozigot
NG_017013.2:g.16397C>G NM_000546.5:c.215C>G NP_000537.3:p.Pro72Arg	<i>TP53</i>	4. Ekzon	Tüm Olgular	Homozigot
NG_017013.2:g.17658G>A NM_000546.5:c.638G>A NP_001119584.1:p.Arg213Gln	<i>TP53</i>	6. Ekzon	6. Olgu	Heterozigot
NG_007466.2:g.102452_102453delTT NM_000314.6:c.802-4_802-3delTT	<i>PTEN</i>	8. İntron	Tüm Olgular	Heterozigot
NG_008150.1:g.21736T>C NM_001257387.1:c.-308T>C NP_009125.1:p.Ile157Thr	<i>CHEK2</i>	4. Ekzon	7. Olgu	Heterozigot

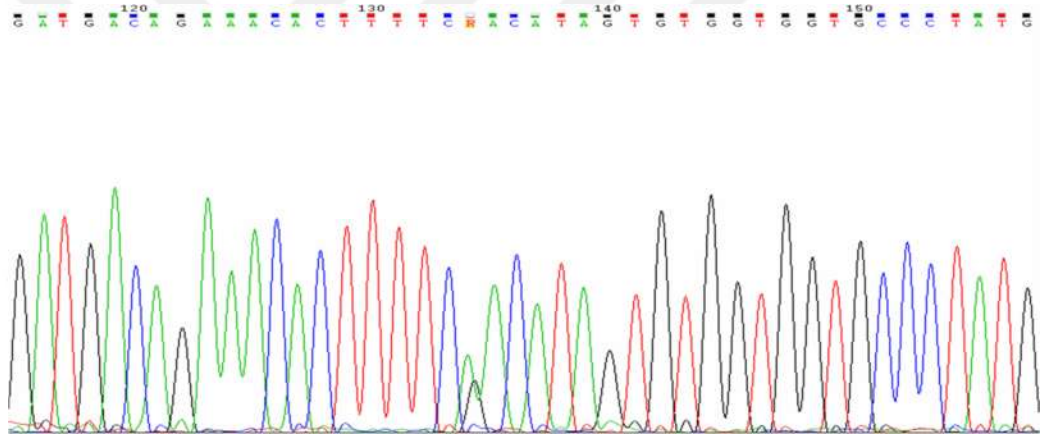
190 G A G G C T G C T C 200 C C C G C G T G G C 210 C C C T G



Şekil 4.13. TP53 genin 4. ekzonunda g.16397C>G, c.215C>G, p.Pro72Arg, homozigot değişimi. İleri dizi

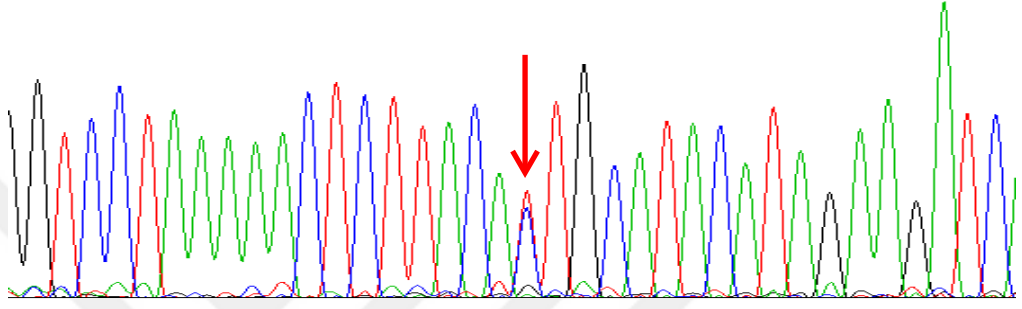


Şekil 4.14. TP53 genin 6. ekzonunda, NG_017013.2:g.17658G>A, NM_000546.5:c.638G>A NP_001119584.1:p.Arg213Gln, heterozigot değişimi. Geri dizi



Şekil 4.15. TP53 genin 6. ekzonunda, NG_017013.2:g.17658G>A, NM_000546.5:c.638G>A NP_001119584.1:p.Arg213Gln, heterozigot değişimi. İleri dizi

5' G T C C T A A A A C T C T T A C A T G C A T A C A T A G A A G A T C 3'



Şekil 4.18. CHEK2 genin 4. ekzon g.21736T>C (p.Ile157Thr), heterozigot değişimi, ileri dizi.

TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya çapında ve Türkiye’de kadınlar arasında en sık gözlenen malignansidir (1). Znaor ve ark., tarafından yapılan çalışmada, Türkiye'nin de aralarında olduğu sekiz farklı güneydoğu Avrupa ülkesinin kanser kayıtları incelenmiş olup, kadınlarda en sık gözlenen kanser türünün %25 sıklıkla meme kanseri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada, kadınlarda kanser nedeni ile ölümlerinin %16,9'unun meme kanseri nedeni ile olduğu belirtilmiştir [119]. Meme ve over kanserlerinde kalıtsal yatkınlıkta bilinen en önemli nedenlerin başında *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin mutasyonları gelmektedir. Ancak, *BRCA1* ve *BRCA2* gen mutasyonları tüm ailesel meme kanserli olguların yarısından daha azında saptanmaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'u kalıtsaldır. *BRCA1/2* kalıtsal meme kanserlerinin sadece %15-%20'sinden sorumludur [113]. Meme kanserinin genetiği karmaşık ve çok faktörlü olup, gelişiminde birçok genin rol oynadığı belirlenmiştir [129]. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri dışında ailesel meme kanserleri ile ilişkili çok sayıda gen bildirilmiştir. Bunların içerisinde *p53*, *pTEN*, *CHEK2*, *ATM*, *MLH1*, *MSH2* gibi genler öne çıkmaktadır [130]. Daha önce Türk grupların yaptığı çalışmalarda toplumumuzda yüksek risk grubu meme/over kanseri hastalarında *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde mutasyon saptanma oranının ortalaması %10'dan daha azdır [32, 126, 131-133]. Bu nedenle, toplumumuzdaki kalıtsal meme kanseri olan ailelerin %90'ından daha fazlasında *BRCA* dışı diğer genlerin rol oynadığı düşünülmektedir. TP53 mutasyonu Li-Fraumeni sendromu ile ilişkilidir, *PTEN* geni de *PTEN* hamartuma sendromu (Cowden sendromu da dahil olmak üzere) ile ilişkilidir ve *CHEK2* de Li-Fraumeni ve Li-Fraumeni'ye benzer (LFL) sendromla ilişkili olduğu için üç önemli aday gen olarak belirlenmektedir.

Meme kanserine yol açan bu genlerden biri olan *TP53* geninin kalıtsal mutasyonlarına meme kanserinde çok sıklıkla rastlanmaktadır, özellikle üçlü negatif (triple negatif) meme kanserinde *TP53* mutasyonları çok yaygındır. *P53* geni mutasyonları, çoğunlukla meme kanserleri ve yumuşak doku sarkomalarının gözlemlendiği ailelerde belirlenen Li-Fraumeni sendromuna yol açmaktadır. Li-Fraumeni sendromunda gözlenen diğer tümörler arasında osteosarkoma, lösemi, beyin tümörleri, adrenokortikal tümörler, akciğer, pankreas ve cilt kanserleri de yer almaktadır. Bireylerde, kanserin ortaya çıkma yaşı çoğunlukla erken yaşlar olup, çoklu primer tümörlere de rastlanmaktadır[134]. Çoğu mutasyonlar DNA'yı tanıyan ve bağlayan aminoasitlerin olduğu bölgeleri etkilemektedir. Mutasyonlar özellikle ekson 5-8 de bulunmakta olup, genellikle nokta mutasyonlarıdır, tümörlerde mutasyon oranı %93,6 dır [41]. *P53*'ün germline mutasyonlarının sebep olduğu Li-Fraumeni sendromu (LFS) nadir, kalıtsal kanser sendromudur [55, 135]. *P53* geninde germline mutasyon taşıyan bir kadında 60 yaşına kadar meme kanseri olma riski %49 olarak bildirilmiştir [136]. Hem kadınlar için hem de erkekler için kanser olma riski ise 40 yaşa kadar %52, 50 yaşa kadar %80 olarak tahmin edilmiş olmakla birlikte, kadınlar için bu riskin %100 olarak bildirildiği bir çalışma da bulunmaktadır [69, 137, 138].

Türkiye’de *p53* ile ilişkili çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Erdener ve ark. nın yaptığı çalışmada *P53* abnormaliteleri bilateral meme kanserli hastaların parafine gömülü dokularında araştırılmış ve *p53* abnormalitelerinin proliferasyon ve çekirdek hacmi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [139]. Türk olgularda germ hattı mutasyonların araştırıldığı bir çalışmada ise 68 aile incelenmiş, *p53* ve *BRCAl/2* genlerinde mutasyon analizi yapılmış ve sonuç olarak, 3 Li-Fraumeni sendromlu ailede germline *P53* mutasyonları (Lys292Ile, Pro278Ser vePro278Thr) bulunmuştur [140]. Başka bir çalışmada ALL ve adenokortikal karsinoma tanısı olan bir çocuğa sahip ailede *p53* geninde p. Arg337pro mutasyonu varlığı bildirilmiştir [141].

Bu çalışmada birbiri ile akraba olmayan meme kanseri tanısı almış ve *BRCAl/ BRCA2* genlerinde kalıtsal mutasyon bulunmayan 12 hastada kalıtsal *P53* mutasyonları incelendi. *P53* genin mutasyonel hotspot bölgeleri olan ekzon 4-9 bölgeleri analiz edildi, tüm olgularda NG_017013.2:g.16397C>G, NM_000546.5:c.215C>G, NP_000537.3:p.Pro72Arg homozigot olarak saptandı ve 6. olguda NG_017013.2:g.17658G>A, NM_000546.5:c.638G>A, NP_001119584.1:p.Arg213Gln değişimi heterozigot olarak belirlendi.

Olgularımızda bulunan c.215C>G (p.Pro72Arg) polimorfizmi *p53* geninin 4. ekzonunda bulunmaktadır. Bu polimorfizmin meme kanserini etkilediğine ilişkin değişik çalışmalar vardır. Kiruthiga Perumal Vijayaraman ve ark. Hindistan’da 50 meme kanserli kadın ve 50 sağlıklı kadın (kontrol grubu) incelemeleri sonucunda bu polimorfizmin meme kanserin riskine her hangi bir etki göstermediğini savunmuştur, bu çalışmaya göre allel frekansları şu şekilde gösterilmiştir : Arg/Arg sıklığı hastalarda %28 ve kontrollerde %18, Arg/Pro frekansı %56 kontrollerde ve %66 hastalarda, Pro/Pro %8 kontrollerde ve %8 hastalarda [133]. Başka bir çalışmada 204 primer meme kanserli Türk hasta ve 192 sağlıklı kontrol grubu seçilmiştir. Bu çalışmaya göre Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro frekansları sırasıyla hastalarda 51.7%, 41.4%, ve 6.9% ve kontrollerde 42.6%, 47.3%, ve 10.1% olarak saptanmış ve yine bu polimorfizm ve meme kanseri riski arasında anlamlı bir bağlantı bulunmamıştır [142]. Ancak bizim çalışmamızda 12 hastada Arg/Arg alleli bulunmaktadır (%100). Bizim hastalarımızın yaş aralığı 39-55 yaş olup kanser aşaması açısından da ilerlemiş aşamayı kapsar.

6 numaralı olgumuzda NG_017013.2:g.17658G>A, NM_000546.5:c.638G>A NP_001119584.1:p.Arg213Gln değişimi bulunmaktadır. Bu mutasyon meme kanseri ile ilişkilidir. Bu mutasyon *invitro*’da *P53*’ün inaktivasyonuna neden olmaktadır. Marie’lle W.G. Ruijs ve ark. tarafından (2006)15 LF ve LFL sendromundan etkilenen aileyi incelenmiş ve 12 ailede p.Arg213Gln mutasyonu bulunmuştur, bu ailelerin hiç birisinde erken yaşlarda kanser vakası bulunmamıştır. Bu sebeple bu mutasyonun kanserin geç ortaya çıkması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [145]. Bu mutasyon Türk populasyonunda önemli bir patojenik değişim olabilir bu nedenle sıklığını belirtmek için daha fazla araştırma yapılmasına gerek vardır. PolyPhen tahminlerine göre bu mutasyon işlev bozucu bir mutasyondur.

Meme kanseri ile ilişkili bir diğer gen ise “Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin homoloğu” ya da “*PTEN*” olarak adlandırılmış olan gendir. Glioblastoma, meme ve prostat kanserlerinde tümör baskılayıcı olarak rol oynar [143]. Kalıtsal *PTEN*

mutasyonları ise PTEN hamartom tümör sendromu (PHTS) ile ilişkilidir. PHTS genel bir terimdir ve bir kaç hastalığı kapsar bunlardan en önemlisi Cowden sendromudur (MIM 158350), bu hastalık yetişkinlerde görülür, Bannayan–Riley–Ruvalcaba sendromu ise [BRRS (MIM 153480; ref. 3)] çocuklarda görülür [85]. Cowden sendromu (CS) otozomal dominant bir hastalık olup mukokutenöz lezyonlar, sistemik hamartomalar ve çok sayıda meme-tiroid, genito-urinary, ve endodermal kanser olguları ile görülmektedir[86]. Hayat boyunca meme kanseri olma ihtimali Cowden sendromlu bir kadın için %25-%50 olarak tahmin edilmektedir [144]. *PTEN* mutasyonlarının insan kanserlerinde ön plana geçerek *P53*'ten daha etkili olabileceği bildirilmiştir [88]. Homolog kromozomlarda bulunan her iki allelinde işlev kaybı kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açmaktadır (35). Meme kanserlerinin %10 unda aktif olmayan *PTEN* bulunmuştur [145]. Germline mutasyonlar bütün *PTEN* geni boyunca görülebilse de, mutasyonların büyük çoğunluğu ekzon 5, 7, ve 8 bölgelerinde bildirilmiştir [91].

Türkiye'de yapılan bir araştırmada prostat tümörlerinin %49'unda *PTEN* kaybı bulunduğu gösterilmiştir [146]. Bir diğer araştırmada ise *PTEN* IVS4 polimorfizmleri ve gastrik kanser riski ilişkisi incelenmiş ve gastrik kanser riski ile bağlantı bulunmuştur [147]. Diğer bir çalışmada HER2 ve *PTEN* polimorfiz

mleri ve meme kanseri ile ilişkisi incelenmiş, *PTEN* genin IVS4'te bir polimorfizm,NG_007466.2:g.72759_72760insATCTT,NM_000314.4:c.253+108_253+109insATCTT (rs 3830675) meme kanseri riski açısından önemli olduğu tespit edilmiştir [148]. Başka çalışmada ise bir Cowden sendromlu bir Türk kadın olgularında yapılan mutasyon taraması sonucunda intron 5 te IVS5-2A > C mutasyonu saptanmıştır [149].

Bizim çalışmamızda tüm hastalarda intron 8'de g.102452_102453delTT, c.802-4_802-3delTT değişimi homozigot durumda bulunmuştur. Bu polimorfizm hakkında kaynaklarda meme kanseri ile ilişkisi de dahil olmak üzere çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Ancak bu delesyon ekzonik bölgeye yakın olduğu için önemli olabilir, daha kesin bir yorum yapmak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Özellikle bu polimorfizmin kontrol ve hasta gruplarında sıklığının saptanması gerekmektedir.

CHEK2 geni bir G2 chekpoint kinazı kodlar, bu protein DNA tamirinde önemli rol oynamaktadır [116]. DNA hasarında, bu proteinin aktivasyonu hücrenin mitozu girişini engeller. Aktif olmuş *CHEK2* hücre siklusunun önemli proteinlerini, *p53* (MIM 191170), *Cdc25C* (MIM 157680),*Cdc25A* (MIM 116947) ve *BRCA1*'i (MIM 113705) fosforile ederek hücre döngüsünü durdurup DNA tamirini sağlar[114, 116, 150].

CHEK2'de , bir erken sonlanma mutasyonu olan 1100delC (exon 10'da), meme kanseri riskini iki kat arttırmaktadır, bu oran eğer birinci derece akrabalarda meme kanseri tanısı var ise daha da fazladır. Bu delesyon, proteinin kritik bölgesinde olması nedeni ile proteinin kinaz işlevini kaybetmesine yol açmaktadır [118].

CHEK2 geninde başka önemli mutasyon c.470T>C (p.I157T) mutasyonudur. Bu mutasyon bu genin FHA domainde ve ekzon 3'te lokalizedir. Bu mutasyon da

meme kanseri ile ilişkilidir ancak oluşan risk, 1100delC allelinin oluşturduğu riske göre daha azdır [151].

Türk popülasyonunda sadece bir kaç araştırma yapılmıştır. Bir çalışmada *CHEK2* 1100delC, IVS2+1G>A ve I157T mutasyonları 611 Türk olguda incelenmiş, bu çalışmada kan örnekleri incelenmiştir ve bu mutasyonlar ile Hepatocellular carcinoma (HCC) arasında ilişki araştırılmış olup, taranan olgularda herhangi bir değişim saptanmamıştır [152]. Başka bir çalışmada *BRCA1* ve *BRCA2* yeniden düzenlenmeleri ve ayrıca *CHEK2* ,1100delC mutasyonu, meme ya da yumurtalık kanseri tanısı almış 50 olguda incelenmiş, sonuçta 1100delC mutasyonu ve *BRCA1/BRCA2* yeniden düzenlemeleri olguların hiçbirisinde gözlemlenmemiştir [153]. Başka çalışmada 79 kalıtsal meme kanseri tanısı almış, *BRCA1/2* ve *P53* dizi analizlerinin sonucunda mutasyon bulunmamış hastalar kalıtsal *CHEK2* mutasyonu taramak için incelenmiştir. Bu hastalarda *CHEK2* geni dizi analizi yapılmıştır. Analizin sonunda bir olguda I157T mutasyonu bulunmuştur. Finlandiya’da sağlıklı kontrol popülasyonunda sık (%6.5) görüldüğü için etkili olabileceği rapor edilmiştir . Bu çalışmada 12 olgudan birinde (% 8) c.470T>C (p.I157T) mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon meme kanseri riskini ciddi bir şekilde arttırmaktadır. *CHEK2* mutasyonları coğrafyaya spesifik dağılım göstermektedir. Şu ana kadar Türk popülasyonda 1100delC, IVS2+1, I157T gibi önemli mutasyonlar fazla rapor edilmemiştir. Çalışmamızda sadece bir olguda I157T mutasyonunun bulunmuş olması *CHEK2* geninin kalıtsal mutasyonlarının Türk toplumunda meme kanseri oluşmasında etkin olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle *CHEK2* geninin allel frekanslarının hesaplanabilmesi için daha fazla sayıda olguyu ve kontrol gruplarını içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

Olgularımızda 12 hastanın tümünde *P53* geninde c.215C > G (p.Pro72Arg) polimorfizmi saptanmış olup tüm olgularımızda Arg/Arg alleli frekansı %100'dür. Başka çalışmalarda Arg/Arg alleli frekansı hastalarda %100 rapor edilmemektedir. Bu sebeple bu polimorfizm Türk toplumunda önemli olabilir. *P53* geninde 6. ekzonunda c.638G > A (p.Arg213Gln) mutasyonu meme kanserinin riskini artmaktadır. Bizim çalışmamızda oniki hastanın birinde bu mutasyon bulunduğu için allel frekansının belirlenmesi ve meme kanserinin riskini ne kadar etkilediğinin buluna bilmesi için daha fazla araştırmalara ihtiyaç vardır. Oniki olgunun tümünde *PTEN* geninde c.802-4_802-3delTT delesyonu saptanmıştır. Bu delesyon herhangi bir ekleme bırakma değişimine sebep olmamaktadır ve bu neden ile önem taşımamaktadır *CHEK2* geninde ise bir olguda c.470T (p.I157T) mutasyonu bulunmuştur. Bu mutasyon çok önemli bir mutasyondur ve meme kanserinin riskini arttırdığı için Türk hastalarda dikkate alınmalıdır.

Elde edilen sonuçların daha iyi yorumlanması için çalışmanın sınırlarını göz önünde tutmalıyız. Bu çalışmada 12 hasta incelendi ve 12 hasta sayı olarak azdır, tüm ekzonlar yerine *PTEN* ve *TP53* genlerinin mutasyon hotspot bölgelerini içeren ekzolar incelendi, her üç gende intronik bölgeler incelenmedi. Yöntem olarak PCR'a dayalı bir yöntem kullanıldı ve bu yöntemin bazı dezavantajları vardır, örneğin büyük boyutlu yeniden düzenlenmeler bu yöntem ile saptanmaz.

Bulunan polimorfizmlerin öneminin anlaşılması için daha çok sayıda hasta ve kontrol gruplarının incelenmesine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda sınırlı sayıda hasta çalışılmış olmasına rağmen 12 yüksek risk grubu aileden birisinde *P53* geni c.638G > A (p.Arg213Gln) mutasyonu diğerin *CHEK2* geni c.470T (p.I157T) mutasyonu saptanmıştır. Bu neden ile çalışmamız toplumumuzda yüksek risk grubu ailelerde *P53* ve *CHEK2* genlerinin önemli olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. National Cancer Institute, *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2009 (Vintage 2009 Populations)*, Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et. al., Editor 2012, Bethesda, MD.
2. Carroll, J.C., et al., *Hereditary breast and ovarian cancers*. Can Fam Physician, 2008. **54**(12): p. 1691-2.
3. Toss, A. and M. Cristofanilli, *Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2015. **17**(1): p. 60.
4. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
5. Lalloo, F. and D.G. Evans, *Familial breast cancer*. Clin Genet, 2012. **82**(2): p. 105-14.
6. Economopoulou, P., G. Dimitriadis, and A. Psyrris, *Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes*. Cancer Treat Rev, 2015. **41**(1): p. 1-8.
7. Liu Y, Xu Y, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Xie Y, *Association between CHEK2 H371Y mutation and response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 194.
8. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB, *Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes*. Pharm Res, 2008. **25**(9): p. 2097-2116.
9. Bailar, J.C., 3rd Gornik, H. L., *Cancer undefeated*. N Engl J Med, 1997. **336**(22): p. 1569-74.
10. Sonnenschein C, Soto AM., *Theories of carcinogenesis: an emerging perspective*. Semin Cancer Biol, 1997. **18**(5): p. 372-7.
11. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
12. Leslie NR, F.M., *Non-genomic loss of PTEN function in cancer: not in my genes*. Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(3): p. 131-40.
13. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.

14. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A, *Cancer Statistics, 2014*, in *CA CANCER J CLIN* 2014. p. 9-29.
15. Yilmaz, H.H., et al., *Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey*. *Jpn J Clin Oncol*, 2011. **41**(1): p. 10-6.
16. Stephens, P.J., et al., *Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes*. *Nature*, 2009. **462**(7276): p. 1005-10.
17. Esteller, M., *cancer epigenetics: DNA methylomes and histon modification maps*. *Nat.Rev Genet* 2007. **8**(4): p. 286-98.
18. Apostolou P, Fostira F, *Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes*. *Biomed Res Int* 2013;2013:747318. doi: 10.1155/2013/747318. Epub 2013 Mar 21., 2013.
19. Xiong A, W.L., Ying M, Wu H, Hua J, Wang Y., *Wwox suppresses breast cancer cell growth through modulation of the hedgehog-GLII signaling pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **443**(4): p. 1200-5.
20. Chodosh, L.A., *Breast cancer: current state and future promise*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(6): p. 113.
21. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
22. Lorusso G, R.C., *New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis*. *Semin Cancer Biol*, 2012. **22**(3): p. 226-33.
23. Cedolini, C., et al., *Type of breast cancer diagnosis, screening, and survival*. *Clin Breast Cancer*, 2014. **14**(4): p. 235-40.
24. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM, *Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(10): p. 1973-9.
25. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. *JAMA*, 2006. **295**(21): p. 2492-502.
26. Dent, R., et al., *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4429-34.
27. Vakil, D.V. and R.W. Morgan, *Etiology of breast cancer. I. Genetic aspects*. *Can Med Assoc J*, 1973. **109**(1): p. 29-32.
28. Cury, N.M., V.E. Ferraz, and W.A. Silva, Jr., *TP53 p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families*. *Hered Cancer Clin Pract*, 2014. **12**(1): p. 8.

29. Claus, E.B., et al., *The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer*. Cancer, 1996. **77**(11): p. 2318-24.
30. King MC, M.J., Mandell JB; New York Breast Cancer Study Group *Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2*. Science 2003. **302**(5645): p. 643-6.
31. Franco, C.R., et al., *Male breast cancer retrospective institution review of a 17-year period*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(15).
32. Friedman, L.S., et al., *Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(2): p. 313-9.
33. Struewing, J.P., et al., *The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews*. New England Journal of Medicine, 1997. **336**(20): p. 1401-1408.
34. Antoniou, A.C., et al., *The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions*. British Journal of Cancer, 2008. **98**(8): p. 1457-1466.
35. Cybulski C, W.D., Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Masojć B, Deebniak T, Górski B, Blecharz P, Narod SA, Lubiński J., *Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(28): p. 3747-52.
36. Shuen AY, Foulkes WD., *Inherited mutations in breast cancer genes--risk and response*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011. **16**(1): p. 3-15.
37. Turnbull, C. and N. Rahman, *Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 321-45.
38. DeLeo, A.B., et al., *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(5): p. 2420-4.
39. Lamb, P. and L. Crawford, *Characterization of the human p53 gene*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(5): p. 1379-85.
40. Slee EA, O'Connor DJ, Lu X., *To die or not to die: how does p53 decide?* Oncogene, 2004. **12**;23(16): p. 2809-18.
41. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
42. Bode, A.M. and Z. Dong, *Post-translational modification of p53 in tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 793-805.

43. Bai, L., , Zhu W *p53 structure function and therapeutic applications*. journal of cancer molecules, 2006. **2**(4): p. 141-153.
44. Prives C, Hall PA, *The p53 pathway*. J Pathol, 1999. **187**(1): p. 112-26.
45. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18*. EMBO J, 1991. **10**(13): p. 4129-35.
46. Wu, X., et al., *The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop*. Genes Dev, 1993. **7**(7A): p. 1126-32.
47. Linares, L.K., et al., *HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12009-14.
48. Gu J, Kawai H, Nie L, Kitao H, Wiederschain D, Jochemsen AG, Parant J, Lozano G, Yuan ZM., *Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53*. J Biol Chem, 2002(31;277): p. 22.
49. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
50. Maltzman W, C.L., *UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells*. Mol Cell Biol, 1984. **4**(9): p. 16-89-94.
51. Levine AJ, Oren M., *The first 30 years of p53: growing ever more complex*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(10): p. 749-58.
52. Goh, A.M., C.R. Coffill, and D.P. Lane, *The role of mutant p53 in human cancer*. J Pathol, 2011. **223**(2): p. 116-26.
53. Rotter, V, *p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(9): p. 2613-2617.
54. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1233-8.
55. Varley, J.M., *Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome*. Hum Mutat, 2003. **21**(3): p. 313-20.
56. Lomax, M.E., et al., *Two functional assays employed to detect an unusual mutation in the oligomerisation domain of p53 in a Li-Fraumeni like family*. Oncogene, 1997. **14**(15): p. 1869-74.
57. DiGiammarino, E.L., et al., *A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(1): p. 12-6.

58. Olivier, M., M. Hollstein, and P. Hainaut, *TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(1): p. a001008.
59. Bullock AN, Fersht AR, *Rescuing the function of mutant p53*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 68-76.
60. Weinberg, R.L., et al., *Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain*. J Mol Biol, 2004. **342**(3): p. 801-11.
61. Milner J, Medcalf EA, *Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation*. Cell, 1991. **65**(5): p. 765-74.
62. Srivastava S, Wang S, Tong YA, Hao ZM, Chang EH, *Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis*. Cancer Res, 1993. **53**(19): p. 4452-5.
63. Kern, S.E., et al., *Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression*. Science, 1992. **256**(5058): p. 827-30.
64. Kato, S., et al., *Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8424-9.
65. Brachmann, R.K., M. Vidal, and J.D. Boeke, *Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4091-5.
66. Cadwell, C. and G.P. Zambetti, *The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth*. Gene, 2001. **277**(1-2): p. 15-30.
67. Walerych D, Napoli M, Collavin L, Del Sal G., *The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer*. Carcinogenesis. , 2012. **33**(11): p. 2007-17.
68. Arcand, S.L., et al., *Germline TP53 mutations in BRCA1 and BRCA2 mutation-negative French Canadian breast cancer families*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **108**(3): p. 399-408.
69. Malkin, D., *Li-fraumeni syndrome*. Genes Cancer, 2011. **2**(4): p. 475-84.
70. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P., *TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use*. Cold Spring Harb Perspect Biol. , 2010. **2**(1).
71. Hollander, M.C., G.M. Blumenthal, and P.A. Dennis, *PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(4): p. 289-301.

72. Li DM, Sun H., *TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta*. *Cancer Res*, 1997. **57**(11): p. 2124-9.
73. Tamura, M., et al., *Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN*. *Science*, 1998. **280**(5369): p. 1614-7.
74. Lu, Y., et al., *The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells*. *Oncogene*, 1999. **18**(50): p. 7034-45.
75. Waite, K.A. and C. Eng, *Protean PTEN: form and function*. *Am J Hum Genet*, 2002. **70**(4): p. 829-44.
76. Weng, L.P., J.L. Brown, and C. Eng, *PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model*. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(6): p. 599-604.
77. Tamguney T, Stokoe D., *New insights into PTEN*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(pt23): p. 4071-9.
78. Dahia, P.L., *PTEN, a unique tumor suppressor gene*. *Endocr Relat Cancer*, 2000. **7**(2): p. 115-29.
79. Ali, I.U., L.M. Schriml, and M. Dean, *Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(22): p. 1922-32.
80. Saal, L.H., et al., *Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair*. *Nat Genet*, 2008. **40**(1): p. 102-7.
81. Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP., *Pten is essential for embryonic development and tumour suppression*. *Nat. Genet*, 1998. **19**(4): p. 348-55.
82. Podsypanina, K., et al., *Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1563-8.
83. Trotman, L.C., et al., *Pten dose dictates cancer progression in the prostate*. *PLoS Biol*, 2003. **1**(3): p. E59.
84. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, Said JW, Isaacs WB, Sawyers CL., *Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(9): p. 5246-50.
85. Nelen, M.R., et al., *Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23*. *Nat Genet*, 1996. **13**(1): p. 114-6.

86. Hobert, J.A. and C. Eng, *PTEN hamartoma tumor syndrome: an overview*. Genet Med, 2009. **11**(10): p. 687-94.
87. Knowles S, Thomas RM, Lindenbaum RH, Keeling JW, Winter RM, *Pulmonary agenesis as part of the VACTERL sequence*. Arch Dis Child 1998. **63**: p. 723-6.
88. Salmena, L., A. Carracedo, and P.P. Pandolfi, *Tenets of PTEN tumor suppression*. Cell, 2008. **133**(3): p. 403-14.
89. Romano, C. and C. Schepis, *PTEN gene: a model for genetic diseases in dermatology*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 252457.
90. C, E., *Cowden syndrome and related disorders*, in *Familial Breast and Ovarian Cancer, Genetics, Screening and Management*, Morrison PJ, Hodgson SV, Haites NE Editor. 2002, Cambridge: UK. p. 22-42.
91. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1943-7.
92. Leslie NR, Downes CP., *PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it*. Biochem J, 2004. **358**(pt 1): p. 1-11.
93. Maehama, T. and J.E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.
94. Stambolic, V., et al., *Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN*. Cell, 1998. **95**(1): p. 29-39.
95. Sun, H., et al., *PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6199-204.
96. Liliental, J., et al., *Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases*. Curr Biol, 2000. **10**(7): p. 401-4.
97. Molinari, F. and M. Frattini, *Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 326.
98. Georgescu, M.M., *PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control*. Genes Cancer, 2010. **1**(12): p. 1170-7.
99. Wiencke, J.K., et al., *Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma*. Neuro Oncol, 2007. **9**(3): p. 271-9.

100. Kim, H., et al., *Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(5): p. 2183-8.
101. Silva, A., et al., *PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3762-74.
102. Molina, J.R., et al., *Loss of PTEN binding adapter protein NHERF1 from plasma membrane in glioblastoma contributes to PTEN inactivation*. Cancer Res, 2010. **70**(17): p. 6697-703.
103. Beck, S.E. and J.M. Carethers, *BMP suppresses PTEN expression via RAS/ERK signaling*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(8): p. 1313-7.
104. Hettinger, K., et al., *c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN*. Cell Death Differ, 2007. **14**(2): p. 218-29.
105. Palomero, T., et al., *Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1203-10.
106. Vasudevan KM, B.R., Goswami A, Rangnekar VM, *Suppression of PTEN expression is essential for antiapoptosis and cellular transformation by oncogenic Ras*. Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10343-50.
107. Shi, Y.J., et al., *PTEN at a glance*. Journal of Cell Science, 2012. **125**(20): p. 4687-4692.
108. Lee, J.O., et al., *Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: Implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association*. Cell, 1999. **99**(3): p. 323-334.
109. Georgescu, M.M., et al., *The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10182-7.
110. Wu, X., et al., *Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4233-8.
111. Tolkacheva, T. and A.M. Chan, *Inhibition of H-Ras transformation by the PTEN/MMAC1/TEP1 tumor suppressor gene*. Oncogene, 2000. **19**(5): p. 680-9.
112. Georgescu, M.M., et al., *Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 7033-8.
113. Bartek, J., J. Falck, and J. Lukas, *CHK2 kinase--a busy messenger*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(12): p. 877-86.

114. Lee, J.S., et al., *hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 201-4.
115. Chehab NH, M.A., Appel M, Halazonetis TD *Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53*. Genes Dev 2000. **14**(3): p. 278–288.
116. Matsuoka, S., M. Huang, and S.J. Elledge, *Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase*. Science, 1998. **282**(5395): p. 1893-7.
117. Nevanlinna, H. and J. Bartek, *The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility*. Oncogene, 2006. **25**(43): p. 5912-9.
118. Consortium, C.B.C.C.-C., *CHEK2*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(6): p. 1175-82.
119. Sodha, N., et al., *CHEK2 variants in susceptibility to breast cancer and evidence of retention of the wild type allele in tumours*. Br J Cancer, 2002. **87**(12): p. 1445-8.
120. Vahteristo, P., et al., *A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(2): p. 432-8.
121. Huijts, P.E., et al., *CHEK2*1100delC homozygosity in the Netherlands--prevalence and risk of breast and lung cancer*. Eur J Hum Genet, 2014. **22**(1): p. 46-51.
122. Liu Y, Xu Y, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Xie Y., *Association between CHEK2 H371Y mutation and response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 194.
123. Liu Y, L.J., Xu Y, Chen W, Liu D, Ouyang T, et al. , *A recurrent CHEK2 p.H371Y mutation is associated with breast cancer risk in Chinese women*. Hum Mutat., 2011. **32**(9): p. 1000-3.
124. Shaag, A., et al., *Functional and genomic approaches reveal an ancient CHEK2 allele associated with breast cancer in the Ashkenazi Jewish population*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(4): p. 555-63.
125. Kilpivaara, O., et al., *CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk*. Int J Cancer, 2004. **111**(4): p. 543-7.
126. Bogdanova, N., et al., *Association of two mutations in the CHEK2 gene with breast cancer*. Int J Cancer, 2005. **116**(2): p. 263-6.
127. Mohamad, S., et al., *Low prevalence of CHEK2 gene mutations in multiethnic cohorts of breast cancer patients in Malaysia*. PLoS One, 2015. **10**(1): p. e0117104.

128. Baloch, A.H., et al., *Missense mutations (p.H371Y, p.D438Y) in gene CHEK2 are associated with breast cancer risk in women of Balochistan origin*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(2): p. 1103-7.
129. Bak, A., et al., *A risk of breast cancer in women - carriers of constitutional CHEK2 gene mutations, originating from the North - Central Poland*. Hered Cancer Clin Pract, 2014. **12**(1): p. 10.
130. Schneider, S. and J. Sariego, *Male Breast Cancer Presenting as an Axillary Mass: A Case Report and Literature Review*. Southern Medical Journal, 2009. **102**(7): p. 736-737.
131. Balci, A., et al., *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): p. 707-10.
132. Allinen, M., et al., *Mutation analysis of the CHK2 gene in families with hereditary breast cancer*. Br J Cancer, 2001. **85**(2): p. 209-12.
133. Vijayaraman, K.P., et al., *p53 exon 4 (codon 72) polymorphism and exon 7 (codon 249) mutation in breast cancer patients in southern region (Madurai) of Tamil Nadu*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(2): p. 511-6.
134. Hainaut, P., et al., *IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(1): p. 205-13.
135. Nichols, K.E., et al., *Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. **10**(2): p. 83-7.
136. Masciari, S., et al., *Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **133**(3): p. 1125-30.
137. Chompret, A., et al., *P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals*. Br J Cancer, 2000. **82**(12): p. 1932-7.
138. Wu, C.C., et al., *Joint effects of germ-line p53 mutation and sex on cancer risk in Li-Fraumeni syndrome*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 8287-92.
139. Ozer, E., T. Canda, and F. Kuyucuodlu, *p53 mutations in bilateral breast carcinoma. Correlation with Ki-67 expression and the mean nuclear volume*. Cancer Lett, 1998. **122**(1-2): p. 101-6.
140. Guran, S., et al., *Hereditary breast cancer syndromes in a Turkish population. Results of molecular germline analysis*. Cancer Genet Cytogenet, 2005. **160**(2): p. 164-8.

141. Karakas, Z., et al., *Li-Fraumeni syndrome in a Turkish family*. *Pediatr Hematol Oncol*, 2010. **27**(4): p. 297-305.
142. Kara, N., et al., *P53 codon 72 and HER2 codon 655 polymorphisms in Turkish breast cancer patients*. *DNA Cell Biol*, 2010. **29**(7): p. 387-92.
143. Li D M, Sun H, *TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta*. *Cancer Res* 1997. **57**: p. 2124-2129.
144. Knowles S, Thomas RM, Lindenbaum RH, Keeling JW, Winter RM., *Pulmonary agenesis as part of the VACTERL sequence*. *Arch Dis Child.*, 1988. **63**(7): p. 723-726.
145. Eng C, *Cowden syndrome and related disorders*, in *Familial Breast and Ovarian Cancer. Genetics, Screening and Management*, Morrison PJ, Hodgson SV, Haites NE Editor. 2002, Cambridge: UK. p. 22-42.
146. Ertoy Baydar D, Özen H, Saracbası O, Karabulut E, *PTEN Expression in Primary Prostate Carcinoma in Turkish Patients*. *Turk J Med Sci* 2008. **38**(5): p. 387-397.
147. Canbay, E., et al., *Increased gastric cancer risk with PTEN IVS4 polymorphism in a Turkish population*. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2013. **17**(3): p. 249-53.
148. Ozturk, O., et al., *HER2 Ile655Val and PTEN IVS4 polymorphisms in patients with breast cancer*. *Mol Biol Rep*, 2013. **40**(2): p. 1813-8.
149. Soysal, Y., et al., *Analysis of PTEN gene mutations in a Turkish patient with Cowden syndrome*. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2009. **13**(4): p. 547-51.
150. Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD *Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53*. *Genes Dev* 2000. **14**(3): p. 278-288.
151. Kilpivaara O, Vahteristo P, Falck J, Syrjäkoski K, Eerola H, Easton D, Bartkova J, Lukas J, Heikkilä P, Aittomäki K, Holli K, Blomqvist C, Kallioniemi OP, Bartek J, Nevanlinna H., *CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk*. *Int J Cancer*, 2004. **111**(4): p. 543-7.
152. Bayram S, A.H., Topaktaş M, *CHK2 1100delC, IVS2+1G>A and I157T mutations are not present in hepatocellular cancer cases from a Turkish population*. *Gene.*, 2013. **512**(2): p. 232-6.

153. Manguoğlu E, Gran S, Yamaç D, Simşek M, Akdeniz S, Colak T, Glkesen H, Lleci G, *Genomic large rearrangement screening of BRCA1 and BRCA2 genes in high-risk Turkish breast/ovarian cancer patients by using multiplex ligation-dependent probe amplification assay.* . Cancer Invest., 2011. **29**(1): p. 73-7.



ÖZGEÇMİŞ

18.03.1979 tarihinde Bamiyan-Afganistan’da doğan Asef MOBALLEGH, 1990-1997 yılları arasında bir kısmını ev eğitimi olmak üzere bir kısmını da Afgan mülteciler tarafından kurulmuş bir okul olan Tarbiat okulunda tamamlanmıştır. Orta öğretimini 1997-2000 yılları arasında İran-Mashhad şehrinde Turabi Lisesi’ni tamamlanmıştır. 2000-2001 ön üniversite eğitimini Şehit Agha Mustafa ön-üniversite merkezinde İran’ın Mashhad şehrinde bitirmiştir. 2002 yılında İran üniversite giriş sınavına katılıp Hakim Sabzevari Üniversitesinde Genel Biyoloji bölümüne başlamıştır ve 2006 yılında mezun olmuştur. 2007 yılında Mashhad Ferdowsi Üniversitesinde yüksek lisansına Hücre ve Moleküler Biyoloji bölümüne başlamıştır ve 2009 yılına kadar devam etmiştir ama bilimsel olmayan nedenlerden dolayı program tamalanmamıştır. 2009-2011 yıllar arasında Afganistanda öğretmen olarak çalışmıştır. 2011’de Türkiye eğitim bursunu kazanmıştır ve 2011-2012 yılında Türkçe öğrenimini Bursa TÖMER merkezinde tamalamıştır. 2012 yılında üniversite tercihini yaptıktan sonra YÖK tarafından Akdeniz Üniversitesine ataması yapılmış, yüksek lisans eğitimi için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana bilim dalında Tıbbi Genetik programına başlamıştır.



EK

Aydınlatılmış Onam Formu

1. Çalışmanın bir araştırma olduğu,
2. Araştırmanın amacı,
3. Araştırmada uygulanacak tedaviler,
4. Varsa, farklı tedaviler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığının bulunduğu,
5. Araştırma sırasında uygulanacak olan invazif yöntemler dahil olmak üzere izlenecek veya gönüllüye uygulanacak yöntemlerin tümü,
6. Gönüllünün sorumlulukları,
7. Araştırmanın deneysel kısımları,
8. Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya loğusalarda yapılacak ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının) maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar,
9. Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak gönüllü açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığında gönüllünün bu durum hakkında bilgilendirildiği,
10. Gönüllüye uygulanabilecek olan alternatif yöntemler veya tedavi şeması ve bunların olası yarar ve riskleri,
11. İlgili mevzuat gereğince gerekiyorsa, gönüllüye verilecek tazminat veya sağlanacak tedaviler,
12. Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler hakkındaki bilgiler,
13. Gönüllünün araştırmaya katılımının isteğe bağlı olduğu ve gönüllünün istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceği veya araştırmadan çekilebileceği,
14. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceği, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağı, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacağı,

15. İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağı,
16. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya yasal temsilcisinin zamanında bilgilendirileceği,
17. Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bunlara günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları,
18. Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler,
19. Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre,
20. Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı,
21. Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçla kullanılacağı,
22. Biyolojik materyallerin analizlerinin yurtdışında yapıp yapılmayacağı hususunun açıklanması,
23. *“Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.”* benzeri ifadenin yer alması,
24. *“Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.”* benzeri ifadenin yer alması,
25. Gönüllünün adı / soyadı / imzası / tarih yer almalı,
26. Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin bir araştırmacının adı / soyadı / imzası / tarih yer almalı,
27. Gerekiyorsa olur işlemine tanık olan kişinin adı / soyadı / imzası / tarih yer almalı,
28. Gerekiyorsa yasal temsilcinin adı / soyadı / imzası / tarih yer almalı,
29. Gönüllülerden elde edilen biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için; *“[Araştırmanın Açık Adı]* araştırması kapsamında alınan

biyolojik örneklerimin (kan, idrar vb.); *“Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum”* veya *“İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum”* veya *“hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum”* şeklinde uygun ifadenin işaretlendiği bilgi yer almalıdır.

- 30.** Ayrıca, Aydınlatılmış onam formu, gönüllü veya kanuni temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içeremez ayrıca araştırmacıyı, kurumu, destekleyici veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlölükten kurtaracak hüküm veya ifade taşıyamaz.

