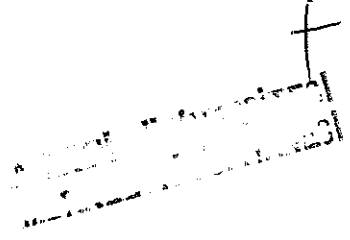


T1046

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



**MEME VE/VEYA OVER KANSERLİ  
HASTALARDA BRCA1 VE BRCA2  
GEN MUTASYONLARININ  
TARANMASI**

**Ayşe Esra MANGUOĞLU**

**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof.Dr. Güven LÜLECI**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.  
(Proje No:2003.03.0122.001)

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir”

**Antalya, 2004**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve  
Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı**

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (Orijinalleri ekte sunulmuştur).

1-Germline Mutations in the BRCA1 and BRCA2 Genes in Turkish Breast/Ovarian Cancer Patients. **Manguoğlu AE**, Lüleci G, Özçelik T, Çolak T, Schayek H, Akaydın M, Friedman E. *Human Mutation* 2003 Apr;21(4):444-5.

2-Analysis of Polymorphic Patterns in Candidate Genes in Israeli Patients with Prostate Cancer. Figer A, Friedman T, **Manguoglu AE**, Flex D, Vazina A, Novikov I, Shtrieker A, Sidi A, Tichler T, Sapir EE, Baniel J, Friedman E. *Israel Medical Association journal* 2003 Oct;5(10):741-745.

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında doktora (PhD) tezi olarak kabul edilmiştir...../...../2004

**05 TEM 2004**

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. Güven LÜLECI**

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Üye : Prof.Dr.Mustafa AKAYDIN**

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**Üye : Doç.Dr.Tayfun ÖZÇELİK**

Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

**Uye : Doç. Dr İbrahim KESER**

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Uye : Doç. Dr. Gürkan ZORLU**

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun .../16... / ...07... / 2004 tarih ve .../12... / 29... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof.Dr. Ramazan DEMİR**  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Bu çalışmada, meme/over kanseri yüksek risk grubu 75 bireyin *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tüm kodlayıcı bölgelerinin mutasyon analizi amaçlandı. Çalışmaya 38 erken yaş grubu kadın meme kanseri, 24 ailesel meme/over kanseri, üç erkek meme kanseri, yedi kadın bilateral meme kanseri, üç meme ve over kanseri hastası dahil edildi. Yirmidört hastada *BRCA1* geninin 11'inci ekzonu PTT yöntemi ile tarandı. Kalan bölgelerin ve hastaların tümünde DGGE analizi uygulandı. Sonuç olarak *BRCA1* geninde bir bilinen splice bölge mutasyonu IVS11.1 G-A, ilk defa bir çerçeve kayması mutasyonu 5154delCT, bir bilinen anlamsız mutasyon 3726C-T, üç tane ilk bulunan yanlış anlamlı mutasyon, 2566A-C, 3726A-C, 4849C-A, bir tane bilinen yanlış anlamlı mutasyon, 4755G-A, bir tane polimorfizm, 4427T-C, iki tane intronik bölge değişimi IVS6.602T-C ve IVS9.1288T-C gözlemlendi. *BRCA2* geninde ise sırasıyla biri bilinen, 1529delAAAG, biri yeni, 1621insT, iki tane çerçeve kayması mutasyonu bulundu. Ayrıca, bir bireyde bilinen bir yanlış anlamlı değişim, 353A-G, iki bireyde bir diğer bilinen yanlış anlamlı değişim olan 1379C-T, yeni yanlış anlamlı değişimler, 1001A-C, 1204A-C, 8935G-A ve önceden tanımlanmış bir intronik bölge değişimi olan IVS11.12 T-A bulundu. Ek olarak, bilinen polimorfizmlerden olan 2457T-C üç bireyde, 6741C-G bir bireyde, 7470A-G bir bireyde gösterilirken iki yeni polimorfizm olan 255A-G ve 1803T-C değişimleri de birer hastada gözlemlendi. Toplam beş adet net olarak hastalık yapıcı mutasyon saptanırken herhangi bir baskın mutasyon bulunmadı. Çalışmamızın bulguları da eklendiğinde Türk toplumunda meme/over kanserlerinde yapılan mutasyon taramaları sonucunda hastalık oluşturan mutasyon oranı yaklaşık %11 olarak belirlenmiştir. Türk bireylerle ilgili gerçekleştirilmiş olan tüm çalışmalarda bulunan mutasyonların çoğunluğu aileye özgül mutasyonlar olup, bir Ashkenazi mutasyonu olan 5382insC mutasyonu 5 bireyde bildirilmiştir. Bu nedenle, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tümünün analizi yapılmadan önce Ashkenazi kurucu mutasyonları için araştırma yapılması yararlı olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Meme/over kanserlerine kalıtsal yatkınlık, *BRCA1*, *BRCA2*, mutasyon analizi



## ABSTRACT

In this study, mutational analysis of all coding regions of *BRCA1* and *BRCA2* genes in 75 high risk individuals was aimed. Thirty eight early onset female breast cancer, 24 familial breast/ovarian cancer, three male breast cancer, seven female bilateral breast cancer, three breast and ovarian cancer patients were included in the study. Exon 11 of *BRCA1* gene was scanned in 24 patients by PTT. DGGE analyses were performed for the remaining coding regions and for the remaining patients. As a result, on *BRCA1* gene, a known splice site mutation (IVS11.1 G-A), a novel frameshift mutation (5154delCT), and a nonsense mutation (3726C-T), three novel and a known missense mutations (2566A-C, 3726A-C, 4849C-A and 4755G-A), a polymorphism (4427T-C) and two intronic region mutations (IVS6.602T-C and IVS9.1288T-C) were observed. On *BRCA2* gene, a novel and a known frameshift mutations (1529delAAAG and 1621insT) were detected. In addition, a known missense mutation in one of the patients (353A-G), another known missense mutation (1379C-T) in two patients, novel missense changes (1001A-C, 1204A-C, 8935G-A) and a known intronic region mutation (IVS11.12 T-A) were found. Moreover, 2457T-C, one of the known polymorphisms, was observed three times; 6741C-G and 7470A-G known polymorphisms and novel polymorphisms 255A-G and 1803T-C were found in one patient. There was no predominant mutations. However, a total of five disease causing mutations were found. Together with our findings, results of mutational analysis in breast/ovarian cancer patients, show that the ratio for disease causing mutations on *BRCA* genes for Turkish population is approximately 11%. Most of the mutations detected in these studies are family specific mutations and 5382insC mutation, one of the founder Ashkenazi Jewish mutation, was found in five patients. For this reason, it might be essential to screen high risk individuals for the Ashkenazi founder mutations before full analysis of both genes is carried out.

**Key words:** Predisposition to breast and ovarian cancers, *BRCA1*, *BRCA2*, mutational analysis.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora yaptığım süre boyunca her zaman göstermiş olduğu yakın ilgisi, desteği ve yol göstericiliği için danışman hocam Prof.Dr. Güven Lüleci'ye,

Çalışmanın başından itibaren bizimle işbirliği yaparak diğer projelerin de ortaya çıkmasını sağlayan hocam Doç.Dr. Tayfun Özçelik'e,

Pek çok farklı yöntemi laboratuvarında öğrenme ve uygulama imkanını sağlayan İsrail'deki hocam Prof.Dr Eitan Friedman'a,

Yoğun işleri arasında zaman ayırarak sağlamış olduğu katkıları nedeniyle değerli hocam Prof.Dr. Mustafa Akaydın'a, yine bu tezin gerçekleştirilmesinde ve yazım aşamasında, göstermiş oldukları ilgi ve önerileri için hocalarım Doç.Dr.İbrahim Keser'e ve Doç.Dr. Sibel Berker-Karaüzüm'e,

BRCA1 genine ait primer dizilerini gönderdiği için Hollanda Groningen Üniversite Hastanesi, Genetik Bölümünden Dr Annemarie van der Hout'a,

Tezin yazım aşamasında zamanlarını ayırarak önerilerde buldukları için Patoloji Anabilim Dalından hocalarım Doç.Dr. Elif Peştereli'ye ve Uz.Dr.Gülgün Erdoğan'a,

Bu tez çalışmalarını sırasında İsrail'deki birimle işbirliği kurabilmemiz ve DGGE aletinin alınabilmesi için sağladıkları maddi ve manevi destekler için Aspendos ve Haifa Rotary Kulüplerine,

İsrail'de olduğum süre boyunca hastalardan kan alma işleriyle ilgilenen arkadaşlarım Figen Sargın'a ve Sezin Yakut'a,

Oldukça uzun süren bu tez çalışmalarım süresince her zaman destek ve anlayışlarını esirgemeyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Dokusunun Anatomik Yapısı ve Fonksiyonu	3
2.2. Meme Lezyonlarının Histopatolojik Özelliklerine Genel Bakış	5
2.3. Meme Kanserlerinin Moleküler Biyolojik ve Genetik Özellikleri	7
2.4. Over Dokusunun Anatomik Yapısı ve Fonksiyonu	11
2.5. Over Lezyonlarının Histopatolojik Özelliklerine Genel Bakış	11
2.6. Over Kanserlerinin Moleküler Biyolojik ve Genetik Özellikleri	13
2.7. Meme/Over Kanserlerine Neden Olan Faktörler	15
2.7.1. Meme/Over Kanserlerine Neden Olan Genetik Faktörler	15
2.7.2. Meme/Over Kanserlerine Neden Olan Genetik Olmayan Diğer Faktörler	23
2.8. Meme/Over Kanser Tedavisi İçin Geliştirilen Yeni Yöntemler	24
<b>MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	27
3.1. Hasta Seçimi ve Grupların Oluşturulması	27
3.2. DNA İzolasyonu	27
3.2.1. Kullanılan Çözeltiler	28
3.2.2. İşlemler	29
3.3. PTT (Protein Truncation Test)	29
3.3.1. PCR Protokolü	29
3.3.2. PCR İçeriği	30
3.3.3. Toplam 20 Reaksiyon İçin PTT Testinin Hazırlanışı	30
3.4. BRCA1 ve BRCA2 Genlerinin Kodlayıcı Ekzonları	

İçin DGGE Yöntemi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; Katmanlı Denatüre Edici Jel Elektroforezi)	31
3.4.1.PCR Koşulları	38
3.4.2.Kullanılan Çözeltiler	40
3.5. DNA Dizi Analizi	42
<b>BULGULAR</b>	<b>43</b>
<b>TARTIŞMA VE SONUÇLAR</b>	<b>72</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>88</b>
<b>EKLER</b>	

**Ek1:** Germline Mutations in the BRCA1 and BRCA2 Genes in Turkish Breast/Ovarian Cancer Patients. **Manguoğlu AE**, Lüleci G, Özçelik T, Çolak T, Schayek H, Akaydın M, Friedman E. *Human Mutation* 2003 Apr;21(4):444-5.

**Ek2:** Analysis of Polymorphic Patterns in Candidate Genes in Israeli Patients with Prostate Cancer. Figer A, Friedman T, **Manguoğlu AE**, Flex D, Vazina A, Novikov I, Shtriker A, Sidi A, Tichler T, Sapir EE, Baniel J, Friedman E. *Israel Medical Association journal* 2003 Oct;5(10):741-745

## **ÖZGEÇMİŞ**

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum peroksidisulfat
BMI	: Body Mass İndeks
BRCA1	: Meme kanseri geni 1 (Breast cancer 1 gene)
BRCA2	: Meme kanseri geni 2 (Breast cancer 2 gene)
CCC	: Clear Cell Carcinoma
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
CHEK2	: Cycle-checkpoint kinase
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	: Amonyum Asetat
CSGE	: Conformation Sensitive Gel Electrophoresis
COMT	: Katekol O-metiltransferaz
DCIS	: Duktal karsinoma <i>in situ</i>
DGGE	: Katmanlı Denatüre Edici Jel Elektrodorezi (Denaturing Gel Electrophoresis)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
GPCR	: G-protein eşli reseptör
HNF-1beta	: Hepatosit nükleer faktör-1 beta
HRT	: Hormon replasman tedavisi
INK4	: Cdk4 inhibitörü
KHCO <sub>3</sub>	: Potasyum Karbonat
LH	: Luteinize hormon
LOH	: Heterozigosite kaybı
MAPK	: Mitojen-aktive protein kinazlar
MEN1	: Multiple Endokrin Neoplazi Tip1
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
NaCl	: Sodyum Klorür
NH <sub>4</sub> Cl	: Amonyum klorür
pRB	: Retina blastoma proteini
PTEN	: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
PTT	: Güdük Protein Testi (Protein Truncation Test)
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SDS	: Sodyumdodesilsülfat
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TSR	: Kalıp baskılayıcı ajan (template suppression reagent)
WBL	: Lökosit lizis (White Blood Lysis)
VDR	: Vitamin D reseptörü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	sayfa
Şekil 2.1. Memenin duktus sistemi	3
Şekil 2.2. Meme anatomisinde zaman içinde gerçekleşen değişimler	4
Şekil 2.3. Meme kitlesi değerlendirilmesi için başvuran bir seri kadında bulgular	5
Şekil 2.4. Değişik paternli fibrokistik değişiklikler	6
Şekil 2.5. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri	9
Şekil 2.6. Hücre döngüsünde null mutasyonların ard arda seçimi ile meme kanseri progresyon modeli	10
Şekil 2.7. Kadın üreme sistemi	12
Şekil 2.8. Over kanserlerinde MAPK sinyal yolunun FSH, ATP ve gonodotropin salıcı hormon (GnRH) ile aktivasyonu	14
Şekil 2.9. BRCA1 ve BRCA2'nin şematik yapısı	16
Şekil 2.10. BRCA1 geninde mutasyonların dağılımı	18
Şekil 2.11. BRCA2 geninde mutasyonların dağılımı	18
Şekil 3.1. BRCA1 genine ait DGGE jel örneği	31
Şekil 4.1. 1 nolu hastaya ait soyağacı	52
Şekil 4.2. 2 nolu hastaya ait soyağacı	53
Şekil 4.3. 3 nolu hastaya ait soyağacı	53
Şekil 4.4. 5 nolu hastaya ait soyağacı	54
Şekil 4.5. 7 nolu hastaya ait soyağacı	54
Şekil 4.6. 12 nolu hastaya ait soyağacı	55
Şekil 4.7. 19 nolu hastaya ait soyağacı	55
Şekil 4.8. 21 nolu hastaya ait soyağacı	56
Şekil 4.9. 49 nolu hastaya ait soyağacı	56
Şekil 4.10. 60 nolu hastaya ait soyağacı	57
Şekil 4.11. BRCA1 geni ekzon 11 için hazırlanmış PTT jel örneği	63
Şekil 4.12. BRCA1 genine ait DGGE jel örneği	63
Şekil 4.13. 68 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu BRCA1 geni intron 6'da saptanan IVS6.602 T-C mutasyonu	63
Şekil 4.14. 38 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu BRCA1 geni intron 9'da saptanan IVS9.1288T-C mutasyonu	64
Şekil 4.15. 67 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu BRCA1 geni ekzon 11'de saptanan c.1657 A-T mutasyonu	64
Şekil 4.16. 30 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu BRCA1 geni ekzon 11'de saptanan c.2566 A-C mutasyonu	64

<b>Şekil 4.17.</b> 26 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA1</i> geni ekzon 11'de saptanan c.3726C>T mutasyonu	65
<b>Şekil 4.18.</b> 12 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA1</i> geni intron 11'de saptanan IVS11.1 G-A mutasyonu	65
<b>Şkil 4.19.</b> 6 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA1</i> geni ekzon 13'de saptanan c.4427 T-C mutasyonu	65
<b>Şekil 4.20.</b> 64 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA1</i> geni ekzon 15'de saptanan c.4755 G-A mutasyonu	66
<b>Şekil 4.21.</b> 60 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA1</i> geni ekzon 16'da saptanan c.4849 C-A mutasyonu	66
<b>Şekil 4.22.</b> 20 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA1</i> geni ekzon 17'de saptanan c.5154delCT mutasyonu	66
<b>Şekil 4.23.</b> 46 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 2'de saptanan c.255A-G mutasyonu	67
<b>Şekil 4.24.</b> 2 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 3'de saptanan c.353A-G mutasyonu	67
<b>Şekil 4.25.</b> 17 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 9'de saptanan c.1001A-C mutasyonu	67
<b>Şekil 4.26.</b> 52 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 10'da saptanan c.1204 A-C mutasyonu	68
<b>Şekil 4.27.</b> 44 ve 51 nolu hastalarda geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 10'da saptanan c.1379C-T mutasyonu	68
<b>Şekil 4.28.</b> 30 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 10'da saptanan c.1529 del AAAG mutasyonu	68
<b>Şekil 4.29.</b> 49 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 10'da saptanan c.1621 insT mutasyonu	69
<b>Şekil 4.30.</b> 45 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 10'da saptanan c.1803 T-G mutasyonu	69
<b>Şekil 4.31.</b> 63,39,45 nolu hastalarda geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 11'de saptanan c.2457 T-C mutasyonu	69
<b>Şekil 4.32.</b> 21 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi	

	analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzón 11'de saptanan c.6741 C-G mutasyonu	70
<b>Şekil 4.33.</b>	12 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni intron 11'de saptanan IVS11.12 T-A mutasyonu	70
<b>Şekil 4.34.</b>	3 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 14'de saptanan c.7470 A-G mutasyonu	70
<b>Şekil 4.35.</b>	21 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu <i>BRCA2</i> geni ekzon 21'de saptanan c.8935 G-A mutasyonu	71



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Çizelge 3.1.</b> BRCA1 geninin 11. ekzonunun PTT analizinde kullanılan primer adları ve dizileri	30
<b>Çizelge 3.2.</b> BRCA1 geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının DGGE analizinde kullanılan primer adları, dizileri ve PCR ürün büyüklükleri	32
<b>Çizelge 3.3.</b> BRCA2 geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının DGGE analizinde kullanılan primer adları, dizileri ve PCR ürün büyüklükleri	34
<b>Çizelge 3.4.</b> BRCA1 geninde PCR ve DGGE analizi için kullanılan koşullar	37
<b>Çizelge 3.5.</b> BRCA2 geninde PCR ve DGGE analizi için kullanılan koşullar	38
<b>Çizelge 3.6.</b> Stok çözeltilerden kullanım çözeltilerinin hazırlamasında kullanılan oran ve miktarlar	41
<b>Çizelge 4.1.</b> Ailesel meme /over kanseri grubu hastaları	44
<b>Çizelge 4.2.</b> Bilateral meme ya da hem meme hem de over kanseri olan hastalar grubu	47
<b>Çizelge 4.3.</b> Erken yaş grubu kadın hastalar	48
<b>Çizelge 4.4.</b> Erkek meme kanseri grubu hastalar	52
<b>Çizelge 4.5.</b> BRCA1 geninde saptanan mutasyonların hastalara göre dağılımı ve özellikleri	58
<b>Çizelge 4.6.</b> BRCA2 geninde saptanan mutasyonların hastalara göre dağılımı ve özellikleri	61
<b>Çizelge 5.1.</b> Popülasyonumuzda yapılmış olan BRCA genlerinde mutasyon taraması çalışmalarının özeti	83
<b>Çizelge 5.2.</b> Popülasyonumuzda saptanan BRCA1 mutasyonların tümü	84
<b>Çizelge 5.3.</b> Popülasyonumuzda saptanan BRCA2 mutasyonların tümü	85

## GİRİŞ VE AMAÇ

Gerek moleküler biyoloji ve genetik, gerekse diğer bilim alanlarındaki hızlı ilerlemeler, birçok kanser için erken tanı ve daha etkili tedavi teknolojilerinin oluşmasına olanak sağlamıştır. Ancak tüm bu teknolojideki gelişmelere rağmen birçok kanser türü için mortalite oranı oldukça yüksektir. Meme kanseri prognozu en iyi olan kanserler arasında olmasına rağmen, kadınlar arasında en yaygın görülen malignansilerden biridir. Over kanseri ise, kadınlarda görülen malignansilerden mortalitesi en yüksek olanıdır ve hastaların büyük çoğunluğunda sadece ileri evrelerde tanı konabilmektedir.

1990'lı yılların ortalarında bu iki kanser türü ile ilişkili olarak *BRCA1* ve *BRCA2* genleri tanımlanmıştır. 17q21'de lokalize olan *BRCA1* geni 1863 amino asit, 13q12'de lokalize olan *BRCA2* geni ise 3418 amino asit büyüklüğünde proteinleri kodlarlar. Her iki gen de homolog rekombinasyonu, DNA tamiri, embriyonik proliferasyon, transkripsiyonel regülasyon olaylarında rol oynamaktadır. Ayrıca *BRCA1* ubiquitinasyonda da işe karışmaktadır. Hem embriyonik proliferasyonda rol oynamaları hem de tümör baskılayıcı olarak görev yapmaları ilginçtir.

Bu genlerin kalıtsal mutasyonlarını taşıyan bireylerin meme ve over kanseriyle birlikte prostat, kolon, serviks gibi diğer organ kanserlerine de yatkınlığa sahip oldukları bilinmektedir. Bu nedenle yüksek risk grubundaki bireylerin mutasyon taşıyıcısı olup olmadıklarını öğrenmeleri alınabilecek önlemler açısından önemlidir. Mutasyonların tipleri ve sıklıkları popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Bu genlerde mutasyon dağılımı heterojendir ve kurucu mutasyonlar dışında saptanan mutasyonların çoğu aileye özgüdür. Ülkemizde yapılmış çalışmalarda farklı kriterlere göre seçilmiş hastalarda farklı yöntemler kullanılarak mutasyon taraması yapılmıştır. Bu çalışmada, 75 hastada *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tüm kodlayıcı ekzonlarının PTT ya da DGGE yöntemleri kullanılarak hastalık yapıcı mutasyonlar açısından taranması ve dizi analizi ile mutasyon tipinin belirlenmesi ile Türk toplumundaki mutasyon sıklık ve çeşitlerinin daha netleştirilmesi ve verilecek genetik danışmanın daha güvenilir olmasına ve dolayısıyla hastalığın önlenmesine katkı da bulunulması amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

En sık görülen ve en ciddi hastalıklardan biri olan kanser istatistiklere göre popülasyonun üçte birini etkiler ve tüm ölümlerin %20'sini oluşturur. Bu hastalık tedavi edilmediğinde kaçınılmaz olarak öldürücüdür. Erken tanı ve erken tedavi hayatta kalmak için önemlidir. Hastalık gelişmeden önce risk altındaki bireylerin belirlenmesi kanser araştırmalarının önemli hedeflerinden biridir (1).

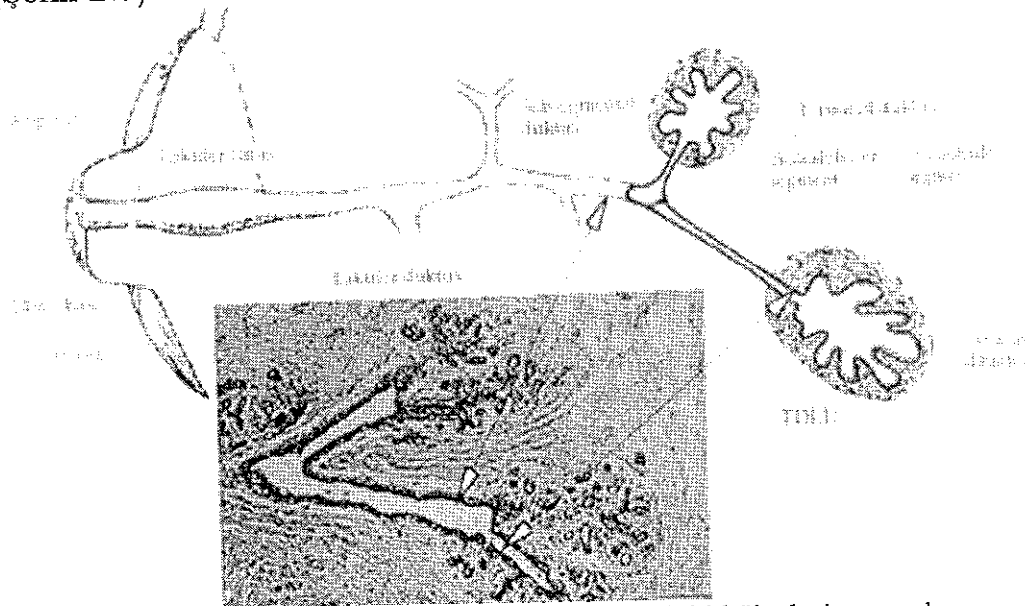
Tüm çok hücreli organizmalarda, hücrel proliferasyon genetik olarak kontrol altındadır ve eğer somatik bir mutasyon daha hızlı proliferasyona giren bir varyant yaratırsa, bu mutant klon organizmada tümör oluşturabilir. Milyarlarca yıl süren evrim sırasında bizleri tümörlere karşı koruyacak karmaşık hücrel mekanizmalar gelişmiştir. Potansiyel tümör hücreleri ya tamir edilir, ya inaktif olarak tutulur, ya da kendi kendilerine öldürtülürler (apoptoz). Hiçbir mutasyon tek başına bu mekanizmaları aşarak normal bir hücrenin tümör hücresine dönmesine neden olamaz. Ancak, aynı hücrede peş peşe 6-7 mutasyon ile savunma mekanizmaları aşılabirise normalden tümöre dönüşüm gerçekleşebilir. Bazı mutasyonlar hücre proliferasyonunu artırırken, bazıları da tüm genomun stabilitesini etkileyerek DNA ya da kromozom düzeyinde mutasyon oranının artışına neden olmaktadır. Kanser, bu iki mekanizmaya bağlı olduğu için, her zaman basamaklı olarak doku hiperplazisi ya da iyi huylu (benign, metastaz yapmayan) gelişimlerden başlayarak oluşmaktadır (2).

Farklı toplumlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kanser dağılımında değişik kanser türlerinde farklılıklar görülebilmektedir. Örneğin, özefagus kanserleri İran'da Nijerya'ya göre 300 kat, karaciğer kanserleri Mozambik'te İngiltere'ye göre 100 kat, prostat kanserleri ABD'de Japonya'ya göre 40 kat, meme kanserleri Kanada'da İsrail'e göre yedi kat fazla sıklıkla görülmektedir (3). Zaman içinde de kanser görülme sıklıklarında değişimler olmakla birlikte, dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser tipi meme kanseridir (4). Türkiye'de 1985-1990 yılları arasında 16 merkezde yapılan bir çalışmada kadınlar arasında en sık gözlenen kanser tipi %23.2 sıklıkla meme kanseri olmuştur. Bunu, %20.3 sıklıkla deri kanserleri ve sırasıyla %4'den daha az sıklıklarla serviks, yumuşak doku, mide, over, lenf, rektum ve beyin kanserleri takip etmektedir. Aynı çalışma, Türkiye'de erkekler arasında en sık gözlenen kanser tipinin %22.6 sıklıkla deri kanseri olduğunu göstermiştir. Bunu, %8'den daha az sıklıklarla sırasıyla larinks, mesane, mide, ağız, akciğer, prostat, yumuşak doku, lenf ve beyin tümörleri takip etmektedir. Bu çalışmaya göre tüm kanser olguları

içinde meme kanseri oranı; erkeklerde %0.53, kadınlarda %23.6'dır. Ayrıca kadınlarda tüm kanser olguları içinde over kanseri oranı %3.46 olarak verilmiştir (3). İzmir yöresinin 1993-1994 kanser kayıtlarına göre ise meme kanseri %26.7 sıklıkla kadınlar arasında en yaygın kanser tipi olurken, %9.6 sıklıkla deri, %6.5 sıklıkla uterus, %6.4 sıklıkla over, %5.9 sıklıkla rektum/kolon, % 5.9 sıklıkla serviks, %5.2 sıklıkla akciğer kanserleri takip etmiştir. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre erkekler arasında en yaygın olarak %38.6 sıklıkla akciğer, %7.7 sıklıkla deri, %6.9 sıklıkla larinks, %6.8 sıklıkla mesane, %5.2 sıklıkla mide, %4.5 sıklıkla kolon/rektum, %3.1 sıklıkla prostat kanserleri görülmektedir (5)).

### 2.1. Meme Dokusunun Anatomik Yapısı ve Fonksiyonu

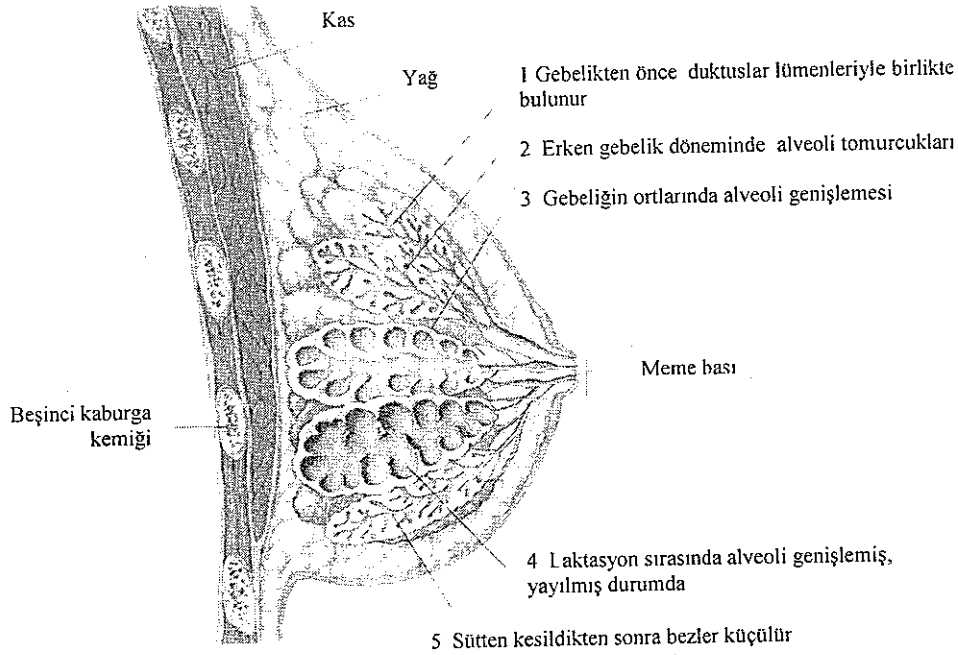
Meme, işlevsel yapı ünitelerinden (15-20 adet lobdan) oluşan bir bezdir. Memenin bu işlevsel yapı üniteleri olan lobları fibröz bağ dokusu (stroma) ile çevrelenerek birbirlerine sıkıca bağlanmıştır. Fibröz bağ dokusundan arta kalan boşluklar yağ dokusu ile doldurulmuştur. Her meme lobunda 20-40 lobulus bulunur. Her lobulusun terminal duktusu meme destek dokusu içinde ilerleyerek diğer terminal duktuslarla birleşir ve subsegmental duktusu oluşturur. Subsegmental duktusların birleşmesiyle laktifer (segmental) duktus oluşur. Laktifer duktus meme başından girer girmez genişler ve bu bölümü laktifer sinus olarak adlandırılır. Laktifer sinüsler koni şeklinde daralan boşaltıcı bölümle (ampulla) meme başı kubbesinden dışarı açılır. Laktasyonda süt deposu görevi yapan ampullanın lümeninde laktasyon dışında dökülmüş epitel kalıntıları bulunur. Duktuslar ve süt kesecikleri (alveoli) miyoepitel hücreler olarak adlandırılan özelleşmiş hücrelerle çevrilidir (6,7) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Memenin duktus sistemi. Oklar, şemadaki bölgelerin gerçek mikroskopik fotoğraf üzerindeki karşılıklarını göstermektedir (6)

Meme başı ektodermden gelişmiştir. Meme başı kitlesinin büyük kısmı dairesel ya da uzunlamasına yerleşmiş düz kas liflerinden oluşmuştur. Bunların arasında laktifer sinüsleri de çevreleyen elastik ve kollajen bağ dokusu vardır (6).

Menstrüel siklusun proliferasyon fazında lobulüsler küçük, mitoz seyrek ve intralobüler stroma daha yoğundur. Sekresyon fazında lobuluslar ve asinüsler irileşir, intralobüler stroma ödemli ve gevşektir. Östrojen ve progesteronun kanda değişen konsantrasyonlarına bağlı olarak memelerde menstrüel siklusun her fazında değişimler olur. Ancak bu değişimler gebelikte oluşan meme gelişimiyle karşılaştırıldığında çok azdır. Gebelikte progesteron, östrojen, prolaktin ve plasental laktojenin plazma konsantrasyonlarının artması nedeniyle memenin duktal ve alveolar yapısı gelişimini tamamlar ve lobuluslar ileri derecede proliferasyon olarak büyürler (Şekil 2.2). Meme alveoli olarak da adlandırılan bu kesecikler süt sekresyon bezleridir. 3. Trimesterde epitelde yağ birikmeye başlar, büyüyen lobuluslar birbirlerine yaklaşır. Intralobüler stroma görülmeyecek kadar azalır. Laktasyonda epitel hücreleri vakuollüdür ve süt sekresyonu apokrin tipte (sitoplazmanın bir kısmını atarak) olduğundan hücrelerin sitoplazması gebeliğe göre daha azdır. Laktasyondan sonra normal görünümün geri gelmesi en az üç ay sürer. Menopozdan sonra lobuluslar yavaş atrofiye uğrayabilir. Epitel hücreleri küçülebilir, asinüs lümenleri görülmeyecek kadar daralabilir (6,7).

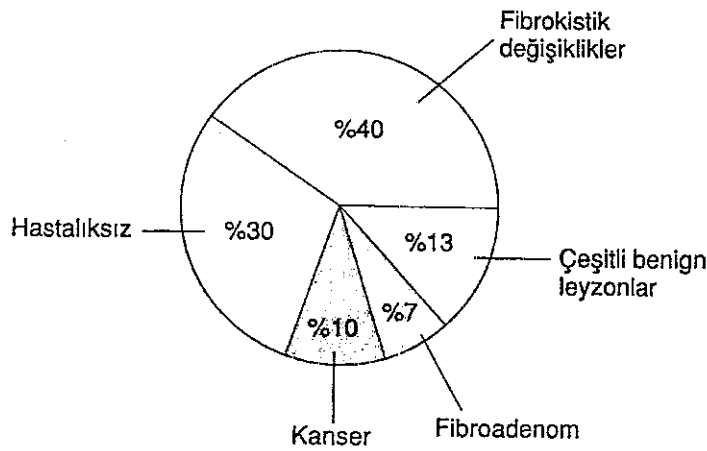


Şekil 2.2: Meme anatomisinde zaman içinde gerçekleşen değişimler. Numaralar sırasıyla verilmiştir (7)

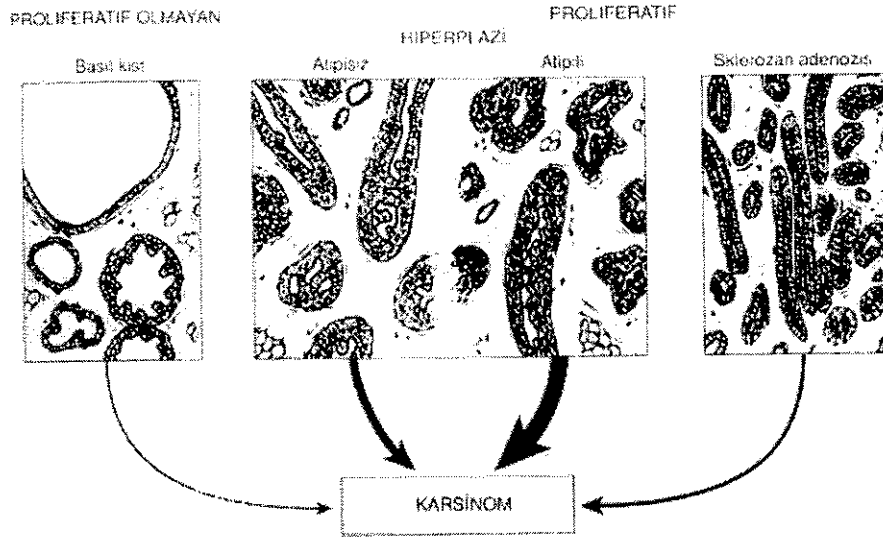
Erkeklerde ise ergenliğe kadar kadınlardakine benzer ama gelişmemiş bir duktus sistemi mevcuttur. Ergenlikte kadınlarda hormonal etkilerle meme gelişimi olurken, erkeklerde normalde gelişmemiş duktus sistemleri kalır. Ender olarak erkeklerde de meme bezleri gelişerek jinekomasti adı verilen durum gerçekleşir. Bu durum genellikle geçici bir durumdur ve meme gelişimi birkaç ay içinde geriler. Erişkinlerde jinekomasti görülmesinin nedenleri gonadal, östrojen tedavisi, Klinefelter sendromu gibi cinsiyet bozuklukları ya da siroz ve böbrek yetmezliği (hemodiyaliz tedavisi ile) gibi genel metabolik hastalıklar olabilir (8).

## 2.2. Meme Lezyonlarının Histopatolojik Özelliklerine Genel Bakış

Çoğu iyi huylu olmasına rağmen meme lezyonları kadınlar arasında görülen malignansilerin başında gelir. Meme kitlelerinde gözlenen değişimlerin büyük bölümünü fibrokistik değişiklikler oluşturur (Şekil 2.3). Bu değişiklikler proliferatif ve nonproliferatif olmak üzere iki ana grupta toplanır. Nonproliferatif lezyonlar, epitelyal hiperplazi içermeyen basit fibrokistik değişimlerdir. Bu, fibrokistik değişiklikler en sık gözlenen tip olup, duktuslarda genişleme ve değişik büyüklüklerde kist oluşumu ile karakterizedir. Proliferatif değişikliklerse sıradan bir epitelyal hiperplaziden atipik hiperplaziye kadar değişen epitel değişikliklerini içine alır. Epitel hiperplazisi ve proliferatif fibrokistik değişiklik terimleri; duktuslar, ve bazen de meme lobüllerindeki bir dizi proliferatif lezyonu içine alır. Epitel hiperplazilerin bir kısmı hafiftir, düzenlidir ve çok az karsinom riski taşırlar, fakat spektrumun diğer ucundaki atipik hiperplazilerde karsinom riski daha yüksektir (Şekil 2.4) (9).



Şekil 2.3: Meme kitlesi değerlendirilmesi için başvuran bir seri kadında bulgular (9).



**Şekil 2.4:** Değişik paternli fibrokistik değişikliklerde, malign transformasyon riskinin oranı okların boyutu ile orantılı şekilde gösterilmiştir (9)

Memede malign tümörlerin büyük çoğunluğunu epitelyal orijinli kanserler olan karsinomalar oluşturur. Lenfomalar ve bağ dokusu, vasküler doku ve kemik gibi mezenşimal hücrelerden köken alan sarkomalar çok daha ender görülür (9,10). Meme karsinomlarının evrelendirilmesi, tümör büyüklüğü, bölgesel ya da uzak yayılım ve nodüler yayılım özelliklerine göre yapılır. Günümüzde, evrelendirmede genellikle kullanılan TNM (Tümör-nodül-metastaz) sistemi UICC (Union International Cancer Center) ve AJCC (American Joint Committee on Cancer) tarafından biçimlendirilmiştir.

Duktal karsinoma *in situ* (DCIS), histolojik olarak heterojen meme lezyonlarından oluşur. DCIS'nun ortak özelliği atipik hücresel proliferasyonun duktusların dışına çıkmayıp, duktus içinde sınırlı kalmasıdır. Prognoz, lezyonun büyüklüğüne ve evresine ayrıca etkilenmemiş sınırların genişliğine bağlıdır (11).

Meme kanserlerinin %60-80'ini invazif duktal karsinomalar oluşturur. Mikroinvazif karsinomalar, baskın lezyonun DCIS olduğu ancak 1mm'den küçük invazyon odaklarının olduğu karsinomalardır (11). Tüm invazif meme tümörleri arasında %0.7-15 sıklıkla gözlenen diğer bir tip de invazif lobüler karsinomadır. Bu tümörler az sitoplazmalı, intrasitoplazmik vakuoller bulunduran, küçük, üniform tümör hücreleriyle karakterizedir. Tubular karsinoma, çok iyi prognozu olan bir tiptir. Hücreler yuvarlak, oval, kıvrılmış lezyonlar oluşturur. Tubular karsinomaya benzer özelliklere sahip invazif kribriform karsinomada, hücreler büyük adacıklar oluşturur

Medüller karsinomada hücreler makroskopik olarak iyi sınırlanmıştır. İnflamatör karsinoma klinik olarak da çok farklılık gösterir. Genişlemiş, şişmiş ve kızarmış bir meme görünümü vardır. Mikroskopik olarak memedeki lenfatikler tümör hücreleriyle doludur. Tümör hücreleri genellikle ileri evrededir. Diğer bir tip meme karsinomu da sekresyon tipi (secretory) karsinomadır. Mikroskopik olarak iyi sınırlanmış ve iyi prognozludur (11).

Her 100 meme karsinomasından biri erkekte gerçekleşir. Erkek meme karsinomalarının büyük çoğunluğu (%85) invazif duktal tipte evre 2 ve 3'tedir. Papiller karsinomalar nispeten daha sık görülmekle birlikte, lobuler karsinomalar erkeklerde bildirilmemiştir. Meme karsinomalarının erkeklerde prognozu genellikle kötüdür (11).

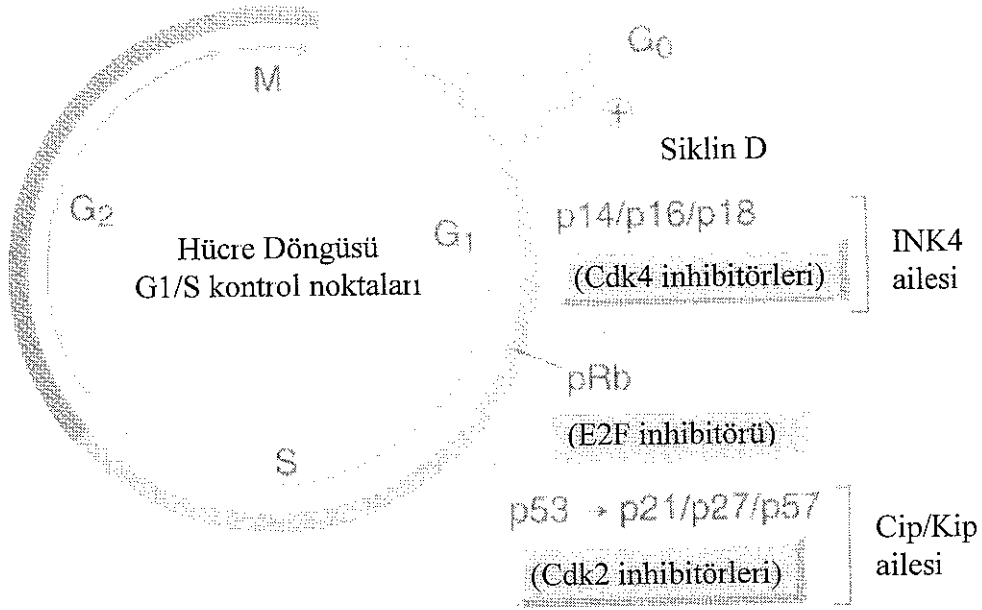
### **2.3. Meme Kanserlerinin Moleküler Biyolojik ve Genetik Özellikleri**

Kadınlar arasında iyonizan radyasyona maruz kalanlarda kalmayanlara oranla daha sık meme kanser gözlenmesi ve hastalığın ortaya çıkışıyla radyasyona maruz kalma zamanı arasında (ortalama en az 10 yıl) uzun süre geçmesi ve ayrıca meme kanserlerinin yaklaşık %40'ında primer tümör çıkarıldıktan 10 yıl sonra hastalığın tekrarlaması, kök hücrelerine benzer şekilde yarı ömrü çok uzun olan bir takım hücrelerin varlığını göstermektedir (12). Sell ve Pierce tarafından ortaya atılan teoriye göre her dokuda doku yenilenmesi için bulunan kök hücreler bu dokuların karsinomalarının hücre sel kaynaklarıdır (13). İnsan meme hücrelerinin yenilenmesi ve farklılaşmasında kullanılan sinyal mekanizmaları hakkında bilinen çok az bilgi vardır. Meme epitel kök hücreleri üç farklı projenitör popülasyondan oluşur, birisi bütün epitel hücrelerini oluşturma kapasitesine sahip olan kök hücreleri, diğer iki gruptan biri salgılama lobüllerini oluşturan hücreler grubu, diğeri de dallanan duktuslara dönüşebilen projenitör hücre grubudur. Meme epitel kök hücreleri altı bölünmeden sonra hücre sel yaşlanma geçirirler. Duktus ya da lobül oluşturma, duktal gelişimde artış, duktal lateral boşluklarda artış gibi kararlar kök hücre otonom mekanizmaları tarafından alınır ve bu mekanizmalar klonojenik projenitorlerle epitelyal projeniye aktarılır. Premalignant hiperplastik alveolar nodüller ve meme tümörleri tek bir klonojenik projenitor hücre den köken alırlar (12). Meme kök hücre sinde mutasyon olduğunda, bu mutasyonu bütün oğul hücrelerine geçirebilir, ve bu da normal ve mutant hücrelerden oluşan kimerik duktal ağlarla sonuçlanır (14). Doku yenilenmesi, tamiri ve gelişiminde oynadıkları önemli rol nedeniyle kök hücreleri, çok hücreli organizmalarda çok önemlidir (15). Ancak, uzun yaşam süreleri nedeniyle doku yenilenmesinde genetik değişimlerin birikimine daha yatkın oluşları nedeniyle karsinogenik



transformasyon açısından hedef olarak değerlendirilmelidirler. Memelilerde meme gelişimi gebeliğin sonuna, hatta süttten kesilmeye kadar devam ettiği için, memenin gelişimi için meme dokusuna özgül kök hücrelerine gereksinim kaçınılmazdır (16).

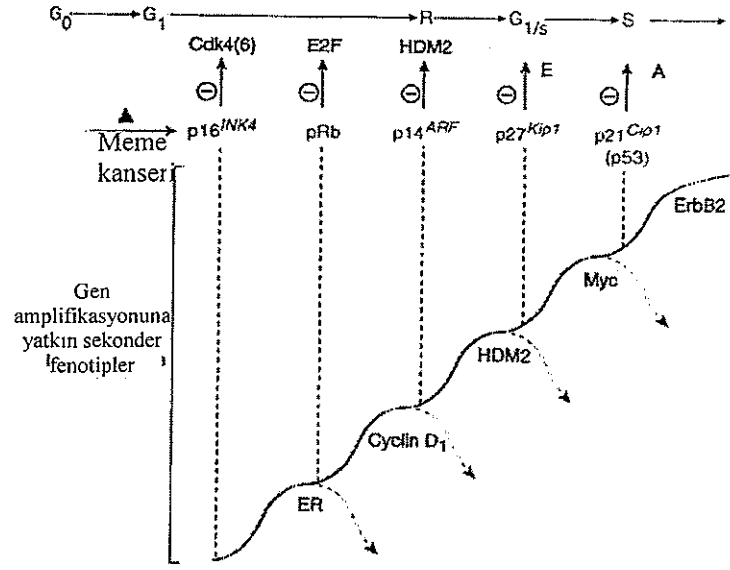
Hücre döngüsünde siklinler tarafından aktive olan siklin bağımlı kinazlar (Cdk) fosforilasyonla hücre döngüsünün ilerlemesini sağlarken, Cdk-inhibitör proteinleri tarafından regüle edilirler. Bu proteinler, INK4 (inhibitor of Cdk4) proteinleri p14<sup>ARF</sup>, p15(INK4B, CDKN2B geni tarafından kodlanır), p16 (INK4A, CDKN2A geni tarafından kodlanır) ve p18 (INK4C)'dir. INK4 ailesi hücre döngüsünün erken-orta G<sub>1</sub> evresinde aktiftir. G<sub>1</sub> fazının sonlarına doğru bir E2F inhibitörü olan pRB aktivite gösterir. Bir transkripsiyon faktörü olan E2F hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli proteinlerin ekspresyonunu kontrol eder (17). PRB'nin hipofosforile formu E2F ile kompleks oluşturarak transkripsiyonu baskılarken, pRB'nin hiperfosforile formu inaktif formu olarak kabul edilir ve bu durumda ilgili genler E2F tarafından transkribe edilir (18). Cip/Kip ailesi ise Cdk2 inhibitörlerinden oluşur. p21 (Cip1, Waf1, Sdi1), p27 (Kip1), p57 (Kip2) bu ailenin üyelerindedir Cip/Kip ailesi S fazında aktiftir (Şekil 2.5). Tümör oluşumunda merkezdeki proteinlerden biri çoklu domainli bir transaktive edici protein olan p53'tür. p53 de pRB gibi G<sub>1</sub>-S geçişinin moleküler kontrolünden sorumludur ve "gatekeeper" olarak iş görür. Eğer DNA hasarı, hipoksi, pRB sinyal defekti mevcutsa normal olarak S fazına geçiş engellenir. p53 DNA'ya bağlanarak p21'i transaktive eder ve bu da Cdk2'nin inhibisyonuna yol açar. İnsan tümörlerinde sıklıkla bozukluklar p16<sup>INK4A</sup>'yı kodlayan CDKN2A gen lokusunun ikinci ekzonunda saptanmıştır. p16<sup>INK4A</sup> molekülü Cdk4-siklinD1 interaksiyonunu inhibe ederek hücrenin G<sub>1</sub>'den S fazına ilerlemesini engeller. p16<sup>INK4A</sup>'nın hipermetilasyonla susturulması ailesel melanoma, pankreas kanserleri, meme kanserleri, glioblastoma ve mezotelyoma'nın patogeneziyle ilişkili bulunmuştur (17). Hücre döngüsünde G<sub>1</sub>'den S fazına geçişte p27 anahtar rol oynar. Sitoplazmik yanlış yerleşim ve siklinD - siklin bağımlı kinaz kompleksi ile, p27 proteolizisinin artışı nedeniyle, p27, fonksiyonel olarak insan kanserlerinin çoğunluğunda inaktive haldedir. Kanser hücrelerinde reseptör tirozin kinaz ve Ras yollarıyla p27 proteolizisinde artış ve yanlış lokalizasyon görülür. Azalmış p27 protein konsantrasyonları kanser hücrelerinin de-differansiye (farklılaşmanın geriye dönmesi, farklılaşmamış hale geçmesi) oluşuyla ve nodül negatif meme kanserleri de dahil olmak üzere çoğunlukla kötü prognozla ilişkilidir (19).



**Şekil 2.5:** Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (17)

Over steroidleri meme bezlerinin gelişiminde ve tumörögenezinde önemli rol oynarlar. Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) bulunduran hücreler duktal ve lobüler yapıların luminal epitelyumlarında bulunurlar. Epitelyal hücrelerin %10-20'sinin reseptör pozitif olduğu tahmin edilmektedir. Reseptör pozitif hücrelerle yan yana durmalarına rağmen bölünen hücreler reseptör negatiftir. Meme tumörögenezinin başında bu ayırım bozulur ve aktif olarak bölünen reseptör pozitif tümör hücreleri atipik duktal hiperplazi gibi premalign lezyonlarda görülür. Steroid reseptör pozitif hücreler, bir kök hücre popülasyon markırı olan CK19 ekspresyonu yaparlar (20). Bütün bu veriler göz önüne alındığında steroid reseptör pozitif hücreler kök hücrelerini de içerebilir. Steroid reseptör ekspresyonuyla p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ekspresyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (16). p21 hücrenin bölünmeye mi yoksa farklılaşmaya mı gideceğine karar verir. Eğer hücrede hasar varsa, p21 Cdk2'yi inhibe ederek hücre döngüsünün S fazına girmeden durmasını sağlar. Böylece hasarlı hücrenin tamiri için olanak sağlanmış olur (17).

Meme kanserlerinin progresyonunda rol oynadığı düşünülen moleküller Şekil 2.6'de verilmiştir. Gelişimi indükleyen genlerin aşırı ekspresyonu ve/veya amplifikasyonu, hücre döngüsünde kontrol noktalarında rol oynayan proteinlerde null mutasyonların birikimi sonucu oluşabilir.



**Şekil 2.6:** Hücre döngüsünde null mutasyonların ard arda seçimi ile meme kanseri progresyon modeli (17)

Son yıllarda meme karsinomalarında bulunan genetik değişimle histolojik görünüm arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Genel olarak, *BRCA1* mutasyon taşıyıcılarında çok sayıda mitoz görülmektedir. *BRCA1* mutasyonları genellikle yüksek evre duktal karsinoma, medüller ya da atipik medüller karsinoma olgularında bulunur (11). Her ne kadar *BRCA1* ile ilgili çalışmalar iki Yahudi mutasyonu sınırlı olsa da, sonuçlar diğer mutasyonlar için de genellenebilir. *BRCA1* mutasyon taşıyıcıları kemoterapi ile tedavi gördüklerinde daha iyi sonuç alınır. Bu nedenle, *BRCA1* mutasyonu pozitif olan hastalarda, küçük ve nodül negatif tümörlerde de kemoterapi uygulanmalıdır. Kemoterapi tipinin önemli olup olmadığı hakkında daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (21). *BRCA2* lokusundaki değişimlerin genellikle düşük evreli meme karsinomalarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (11). *BRCA2* ve meme kanseri prognozu arasında ilişki kurabilmek için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır (21). Ayrıca p53 mutasyonlarının da agresif evre 2 ya da 3 invazif karsinomalarda bulunduğu bilinmektedir (11).

HER2/neu geni insan epidermal büyüme faktörü reseptörüne homolog, trozin kinaz özelliği olan bir protein kodlar. Bu nedenle aynı zamanda C-ERBB2 olarak da adlandırılır. Evre II (lenf nodu pozitif) meme kanserlerinde, ERBB2'nin aşırı ekspresyonunun relaps riskini arttırarak yaşam süresini kısalttığı bildirilmiştir. Nodül negatif meme kanserlerinde ise ERBB2 ekspresyonu ve prognoz arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (22).

Meme kanserlerinde metastazlar, morbidite ve mortaliteyi etkilemektedir. 5 yıllık sağ kalım oranı lokalize hastalıklarda %90 iken metastatik durumlarda %20'ye inmektedir. Fosfoinositid 3-kinaz/Akt sinyal yolu, hücre motilitesi, invazyon, ve metastaz için

önemlidir. Akt ailesinin bu olaya katkısı tam olarak bilinmemektedir. Akt ailesinin üyelerinin (Akt1, Akt2, Akt3) tümör ilerlemesinde farklı rolleri olması muhtemeldir (23). Arboleda ve ark., Akt2'yi aşırı ekspresyon eden meme kanseri hücrelerinin nude fareye verildiğinde metastaz oluşturdıklarını göstermiştir. Akt2'nin bir grup metastatik genin regulasyonunda görevli olması muhtemeldir (24).

İnvazif meme kanserlerinden en öldürücü tipi olan inflammatör meme kanserlerinde 5 yıl hastalısız yaşama oranı %45'ten daha azdır. Hastalığın agresifliği ve genetik değişimler açısından yapılan araştırmada RhoC ve WISP3 gibi genlerin inflammatör meme dokularında değişime uğradığı gözlenmiştir. RhoC bir onkogen olarak, WISP 3 de bir tümör baskılayıcı gen olarak görev yaptığından WISP3'ün kaybı ve RhoC'nin aşırı ekspresyonu inflammatör meme kanserlerinin gelişiminde anahtar rol oynamakta olabilir (25).

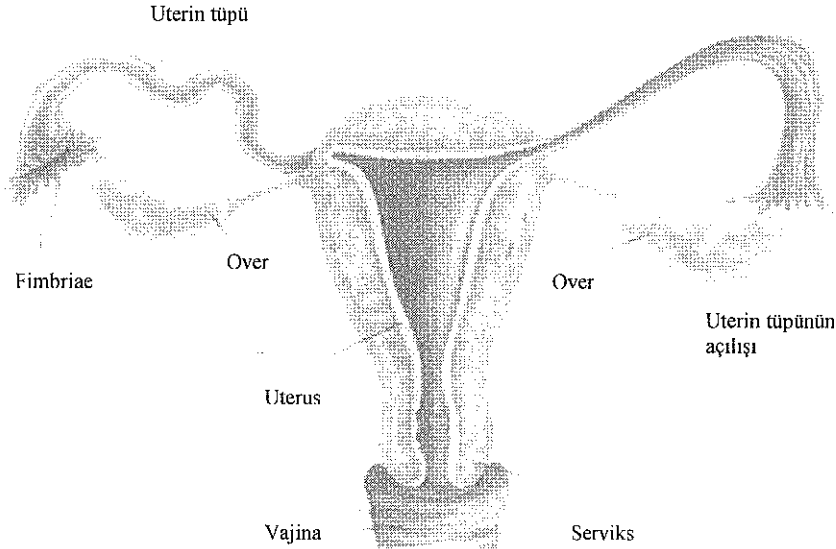
#### **2.4. Over Dokusunun Anatomik Yapısı ve Fonksiyonu**

Overler uterusun her iki yanında bulunan germinal ve endokrin özellikte bir çift organdır. Badem şeklinde bir yapıya sahip olan overler, pelvik boşluğun üst kısmında bulunur. Uterin tüplerinin uçları (ovidukt, follopyan tüpleri) overlere direk olarak bağlı değildir. Ancak uçları abdominal boşlukta overlere yakın yerlere açılır (Şekil 2.7). Overlerin iki farklı işlevi bulunur. Birincisi, oogenezi yani gametlerin oluşumudur. İkincisi ise dişi steroid seks hormonları olan östrojen ve progesteron ve bir peptid hormon olan inhibinin salgılanmasıdır. Doğduklarında dişilerin overleri 2-4 milyon yumurta içerir ve primer oositler (46 kromozomlu) şeklindedir. Bu hücreler mayoz bölünmenin profaz I aşamasında durdurulmuştur (meiotik arrest) Ergenlikte ovulasyonun başlamasıyla her ay bir yumurta hücresinde mayoz I tamamlanır ve primer oositler, sekonder oositlere (23 kromozomlu) dönüşür. İkinci mayotik bölünme uterin tüpte sadece döllenme olduğunda tamamlanır. Overlerde yumurtalar folikül olarak adlandırılan yapılarla birlikte bulunur. Over işlevi açısından menstrüel siklus uzunlukları yaklaşık aynı iki faza bölünür. Foliküler fazda, tek bir matüre folikül ve sekonder oosit gelişir ve bu faz ovulasyona kadar sürer. İkinci faz ise luteal fazdır. Bu faz ovulasyondan itibaren başlar ve korpus luteum dejenerasyonuna kadar sürer (6,9).

#### **2.5. Over Lezyonlarının Histopatolojik Özelliklerine Genel Bakış**

Over kanseri insidansı 40 yaşın altındakilerde 100.000'de 1.4 iken; 60 yaşın üstündeki kadınlarda 100.000'de 45'e yükselir. Kadınlarda görülen kanserlerden ölüm oranı fazla olanı over kanserleridir. Epitelyal over kanserli hastaların çoğunda tanı konduğunda hastalık ileri aşamada, tedavi çok zordur ve çoğunda

birincil tedavi cerrahidir. Erken evrelerdeki hastalar genellikle sadece cerrahi tedavi görürler. Bazıları adjuvan tedavi de görebilir. İleri aşamalarda hastalar için genellikle cerrahiden sonra kemoterapiye de başvurulur (11,26).



**Şekil 2.7:** Kadın üreme sisteminde uterin tüpleri, uterus, yumurtalıklar ve vajina (7)

Overler, mezodermal orijinli epitelyum ile kaplıdır. Primer malign over tümörlerinin %85'i bu epitel'den köken alır. Epitelyal over tümörleri benign, sınırdaki (borderline) ve malign olarak gruplandırılır (11). Primer over karsinomalarının evrelendirmesi genellikle FIGO'nun (Federation of Gynaecology and Obstetrics) kriterleri esas alınarak yapılır (11).

5 yıllık sağ kalım oranlarının evre I'de %80.8, evre II'de %64.3, evre III'de %7.7 ve evre IV'te %0 olduğu bildirilmiştir (26).

Benign over tümörleri yapı itibarıyla genellikle kistik yapıdadır. Borderline over tümörleri bütün epitelyal over neoplazmalarının %10-20'sini oluşturur. Histolojik ve biyolojik olarak malign ve benign arasındadır. Seröz (%7.5) ve müsinöz (%5) sınırdaki tümörler en sık görülen gruplardır (26).

Overin germ hücreli tümörleri genellikle adolesan dönemde ve genç kadınlarda görülür. Germ hücreli tümörlerin yaş dağılımı 6-47 arasındadır. Germ hücreli tümörler totipotent germ hücrelerinden geliştiklerinden geniş bir grubu içine alır. Over tümörlerinin %25-30'u germ hücreli tümörlerdir ve bunların %95'i benign, yalnız %3-4'ü maligndir. Overin germ hücreli tümörleri tanı sırasında genellikle oldukça büyüktürler ancak bilateral lezyonların görülme oranı azdır (27).

Over kanserleri her yaşta görülebilmesine rağmen sıklıkla 45-79 yaşta ortaya çıkmakta ve pik insidans 75-79 yaş arasında görülmektedir. Menopoz öncesi hastalarda epitelyal over tümörlerinin %7'si malign iken, menopoz sonrası dönemde malignite %30'a çıkmaktadır. Epitelyal neoplazmalar arasında seröz tümörler %5 sıklıkla en geniş grubu oluşturur. Bunların yaklaşık %10'u sınırdaki ve düşük malignitededir. Seröz karsinomalar genellikle büyük tümörlerdir. Yarıdan fazlasında tümör çapı tanıda 15cm'den büyüktür. Seröz karsinomalar pelvik epitelyumundan da köken alabilir (10). Malign müsinöz over tümörleri epitelyal over kanserleri arasında %20 oranında görülmektedir. Genellikle seröz karsinomlardan daha büyük tümörlerdir. Çoğunlukla iyi diferansiye, ve overlerle sınırlıdır. Bilateral görülmesi %10 civarındadır. Düzgün yüzeyle, kalın opak kapsülle çevrilidir. Nodüler ve solid yapılar içerir. Malign endometrioid tümörler yaklaşık %2-20 oranında görülür. Malign berrak hücreli tümörler epitelyal over kanserleri arasında %1 oranında görülür. Bu tümörler; bez yapıda, papiller oluşumlar, tübüler ve kistik yapılardaki tümörlerdir. Malign Brenner tümörlerinin, overin kortikal yüzeyinden geliştiği kabul edilir ve tümör yapısı üriner sistemin epiteli ile büyük benzerlik gösterir. İndiferansiye karsinomların görülme sıklığı %1'dir. Hastaların çoğu evre III-IV olarak değerlendirilir (26).

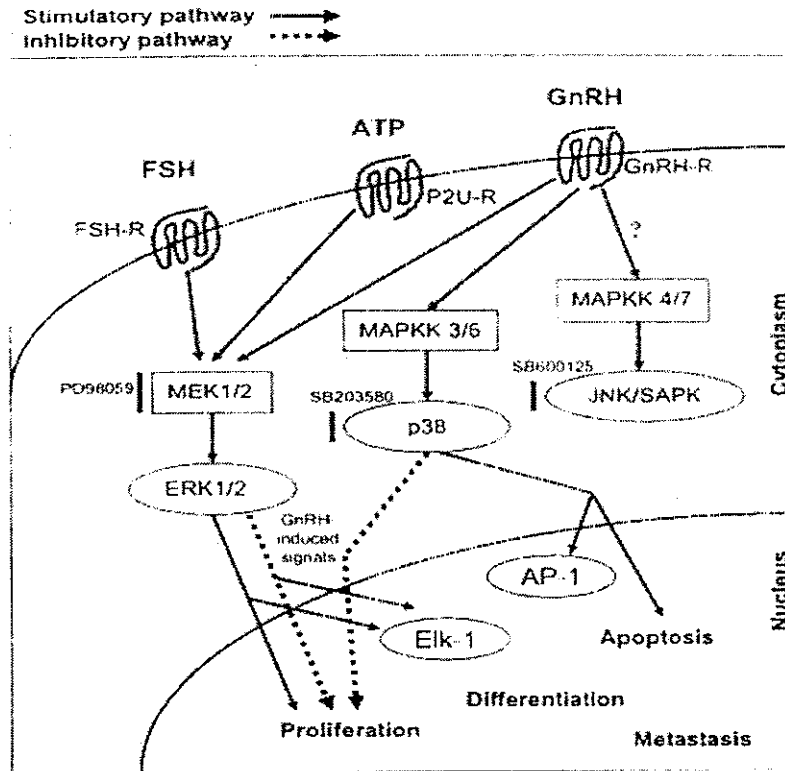
## 2.6. Over Kanserlerinin Moleküler Biyolojik ve Genetik Özellikleri

Metastaz paternlerinin izlenmesi, mikrosatellit instabilite ve X inaktivasyonu çalışmaları sonucu over kanserlerinin unifokal orijinli olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca LOH (heterozigosite kaybı) çalışmaları, Ki-ras ve p53 mutasyon analizleri de borderline, benign, ve invazif kanserlerde monokloniteyi göstermiştir. Over kanser gelişiminde pek çok farklı düzeyde genetik değişikliğin rol oynadığı düşünülmektedir. Karyotipik çalışmalar over kanserlerinde kompleks genetik değişikliklerin varlığını göstermiştir. Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemlerinin gelişmesi ile anomalilerin daha çok 1,3,11 ve 17. kromozomlarda yoğunlaştığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda LOH'un en çok 17.kromozomun kısa kolunda p53 lokusunun yer aldığı 17p13.3 ve *BRCA1* lokusunun yer aldığı 17q22-23 'de olduğu belirlenmiştir (27).

*BRCA1* mutasyonları en çok meme-over sendromlu ailesel olgularda ve bölgeye özgül (site-specific) over kanserlerinde gözlenmektedir. Over kanserlerinin %95'ini oluşturan sporadik olgularda *BRCA1* mutasyonu saptanmamıştır (27).

Over kanserlerinin gelişiminde rol oynayan önemli protoonkogenlerden biri HER2/neu (c-erbB2, neu, HER2) genidir (26). Berchuck ve ark.'nın yaptığı çalışmada 73 evre III ve IV over kanserli olgunun 50'sinde (%68) HER-2/neu aşırı ekspresyonu saptanmıştır (28).

Yapılan çalışmalarda over kanserlerinde proliferasyon, hücrenin yaşaması, ve apoptozisin kontrolünde MAPK (mitogen-activated protein kinases) ailesinin üç üyesinin (ERK1/2, JNK/SAPK ve p38) önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Şekil 2.8). Bir grup serin/treonin kinaz olan MAPK'lar büyüme faktörleri, üreme hormonları ve kemoterapatiklerle over yüzeyinde aktive olurlar. MAPK yolu reseptör trozin kinazlar (RTK) ve G-protein eşli reseptör (GPCR) yollarıyla aktive olurlar. Over kanserlerinin metastazında ve progresyonunda gonodotrofinlerin, folikül stimüle edici hormonun (FSH) ve luteinize hormonun (LH) rol oynadığı ileri sürülmekte fakat mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Over kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapatik olan sisplatinin de biyolojik etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte doza bağlı olarak sisplatinin ERK1/2 ve JNK1'i aktive ettiği bilinmektedir. Bir mikrotübül stabilize edicisi olan taksol de over kanser tedavisinde kullanılır ve ERK1/2 ve p38 MAPK aktivasyonuna neden olur (29).



Şekil 2.8: Over kanserlerinde MAPK sinyal yolunun FSH, ATP ve gonodotropin salıcı hormon (GnRH) ile aktivasyonu (29).

Hücre membranının iç yüzeyinde yer alan ve intrasellüler sinyal iletiminde görev yapan p21 proteinini kodlayan ras gen ailesi

(c-Ha-ras, c-Ki-ras ve N-ras) de over kanserleri gelişiminde rol oynar. Scambia ve ark., p21 negatif primer over neoplazmlı olguların ortalama sağ kalım süresinin 58 ay, p21 pozitif olgularda ise bu sürenin 17 ay olduğunu bildirmişlerdir. Bu veri p21 ras proteininin aşırı ekspresyonunun bir prognostik faktör olabileceğini göstermektedir (30).

## **2.7. Meme/Over Kanserlerine Neden Olan Faktörler**

Meme ve over kanserlerinin etiyolojisinde rol oynayan faktörler genetik olanlar ve genetik olmayanlar olmak üzere iki başlık altında toplanmıştır.

### **2.7.1. Meme/Over Kanserlerine Neden Olan Genetik Faktörler**

Meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'u dominant kalıtım modeli gösterir. Yapılan çalışmalarda birinci derece akrabalarında meme kanseri olan bireylerin meme kanseri geliştirme riskinin iki ya da üç kat artmış olduğu saptanmıştır. Ailesel meme kanserleri, genellikle genç yaşlarda ve bilateral olarak ortaya çıkma eğilimi gösterir (22).

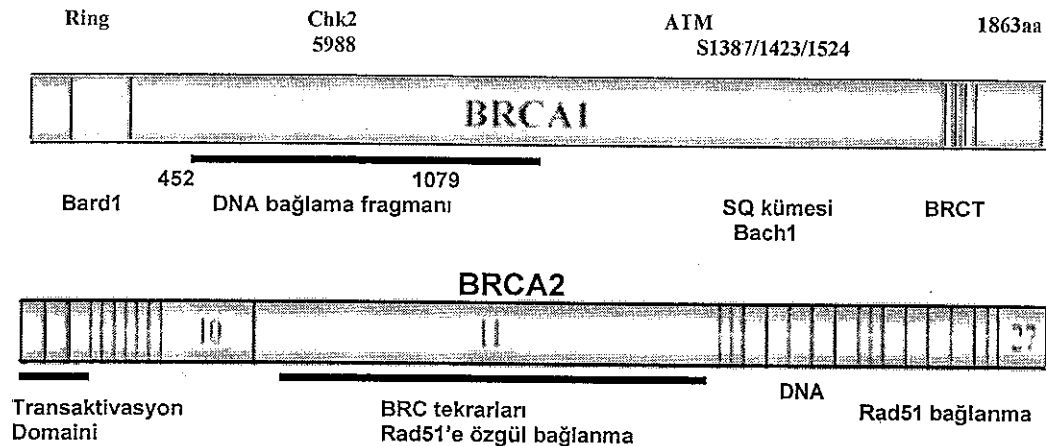
Kanser genetiği alanındaki gelişmelerle 1990'lı yılların ortalarında kalıtsal meme /over sendromları için yüksek penetranslı iki gen olan *BRCA1* (17q21) ve *BRCA2* (13q12) genlerinin tanımlanması gerçekleşmiştir (31,32). *BRCA1* ve *BRCA2*'nin allellerinden birinde kalıtsal mutasyon olması kanser yatkınlığı nedeni olmak için yeterlidir, ama tümör hücrelerinin oluşması için diğer allelin de kaybolması gerekir. Bu nedenle, *BRCA* genleri klasik tümör baskılayıcı gen özelliğini taşımaktadır (33). Fakat, kalıtsal meme kanserli hastaların sadece %2-3'ünde *BRCA1* ya da *BRCA2* mutasyonları tanımlanmıştır. Bu nedenle, kanser gelişimini etkileyen *BRCA1* ve *BRCA2*'ye ek olarak diğer yatkınlık allellerinin bulunması beklenmesine rağmen bunların tanımlanmasının zor olacağı belirtilmiştir (34-36). Yapılan bir çalışmada, over tümörlü hastaların yakın akrabalarında diğer tip malign hastalıkların ortaya çıkışı, bu ailelerde kanser için daha genel bir yatkınlık işareti olarak yorumlanmıştır (37).

Kanser yatkınlık genleri iki genel sınıfta toplanmıştır. Mutasyonları ya da değişen ekspresyonları hücre bölünmesinin, ölümünün, hayat döngüsünün normal kontrolünü bozan yatkınlık genleri "gatekeeper" olarak adlandırılırken, mutasyonları ya da ekspresyon bozuklukları genom instabilitesine neden olan yatkınlık genleri "caretaker" olarak adlandırılmıştır (38). *BRCA2* negatif hücre kültürlerinde kromozom ve kromatid kırıkları, triradyal, kuadriradyal yapılar, translokasyonlar ve delesyonlar gözlenmiştir (39,40). Benzer



bulgular BRCA1 negatif hücrelerde de gözlenmiştir (41). Bu bulgulara dayanılarak BRCA genlerinin kromozom yapısının korunmasında gerekli olduğu ve genomun stabil kalmasını sağlayarak "caretaker" olarak davrandığı sonucuna ulaşılmıştır (33).

BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarıyla ilişkili olarak meme ve over kanseri genellikle erken yaşta ortaya çıkmaları, bilateral ve ailesel olmaları gibi özellikleri nedeniyle birbirine benzerse de bu genlerin dizileri arasında bir ilişki kurulamamıştır. Primer dizideki farklılara rağmen yine de genomik olarak iki gen arasında pek çok benzerlik vardır. Her iki gen de oldukça büyüktür ve genomik DNA'da yaklaşık 80kb'lik bir alan kaplarlar. Her iki genin de yarısından fazlasını oluşturan geniş bir merkezi ekzonu vardır. BRCA1 ve BRCA2 genleri sırasıyla 1863 ve 3418 aminoasit uzunluğunda büyük proteinleri kodlarlar ve 24 ve 27 ekzondan oluşurlar (Şekil 2.9). İnsan BRCA1 ile fare brca1 ve insan BRCA2 ile fare brca2 amino asit dizilerinin karşılaştırılması sonucunda %60 oranında homoloji belirlenmekle beraber, bir çok tümör baskılayıcı genin türler arasında çok daha fazla korunmuş olduğu da bildirilmektedir (42).



**Şekil 2.9:** BRCA1 ve BRCA2'nin şematik yapısı. BRCA1 C-terminalindeki BRCT (BRCA1 karboksi terminal) motifi ve SQ küme bölgesi (fosforilasyon bölgesi) ve N-terminalinde ring domaini ile karakterize iken, BRCA2, çok geniş bir ekzon olan 11'inci ekzonunda 8 BRC peptid motifi ve RAD51 interaksiyon domaini ile karakterizedir ve ayrıca BRCA2'nin C-terminalinde ssDNA bağlayıcı domaini bulunur (43).

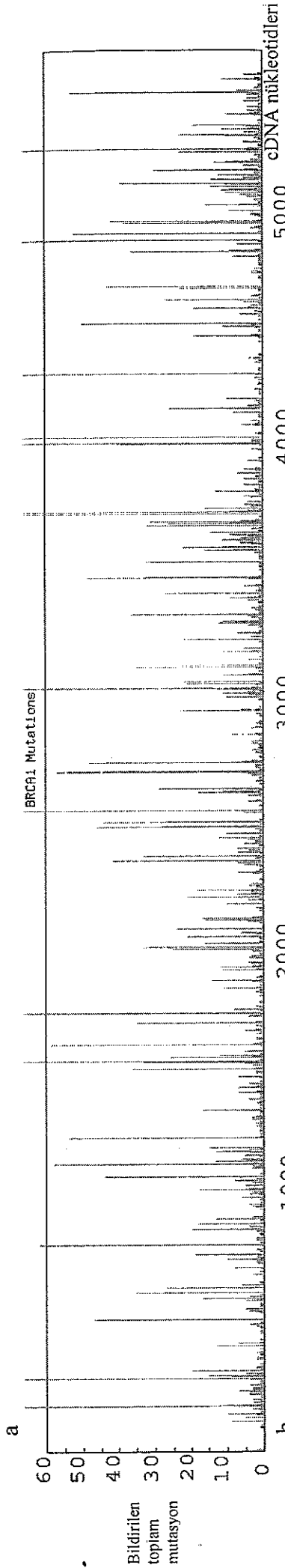
Biyokimyasal, genetik ve sitolojik çalışmalar, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin çoklu fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir. BRCA1 ve BRCA2 proteinleri homolog kromozomların rekombinasyonu kontrolünde, DNA hasarına cevapta çift zincir kırıklarının tamirinde, hücre döngüsünün kontrolünde ve transkripsiyonda rol oynamaktadır. BRCA1'in DNA hasarına erken cevapta rol oynadığı bildirilmiştir. DNA hasarından sonra birkaç dakika içinde histon H2A ailesi üyesi olan H2AX kırık bölgesinde aşırı fosforillenir. BRCA1 bu

bölgeye diğer proteinler (RAD50, RAD51 gibi) gelmeden çok önce gelir. Bu bulgular H2AX ve BRCA1'in yerel kromatin yapısını değiştirerek tamirin başlamasında rol aldığını gösterir. BRCA1 ve BRCA2 aynı zamanda diziye-özel transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek transkripsiyonel ko-regulatör olarak fonksiyon gösterir. Ayrıca BRCA1'in SWI/SNF-ilişkili kromatin-remodelling kompleksinin bir parçası olduğu bildirilmiştir. BRCA1'in endojen p53 bağımlı olarak p21 ve p53 promotorlarını stimüle etmesi de fiziksel olarak SWI/SNF kompleksine bağlanmasına bağlıdır. *BRCA1* ya da *BRCA2* bozukluğuna neden olan kromozomal instabilite (kromozomal kırıklar, anöploidiler, sentrozom amplifikasyonları) meme tümör oluşumunun temelini oluşturabilir. Genellikle DNA tamirinde bozulma, gelişimin durması ve hücre ölümüyle sonuçlanır. *BRCA* negatif farelerde embriyogenezin ilk aşamalarında oluşan ölüm bu hücrel cevaplardan kaynaklanıyor olabilir. *BRCA1* ve *BRCA2* ekspresyonu gelişimsel olarak regüle edilirler. Puberte ve gebelikte ekspresyonları artarken, östrojen düzeylerinde de artış görülmesi, östrojenin *BRCA1* ve *BRCA2* ekspresyonunu stimüle ediyor olabileceğini göstermektedir (33,44)

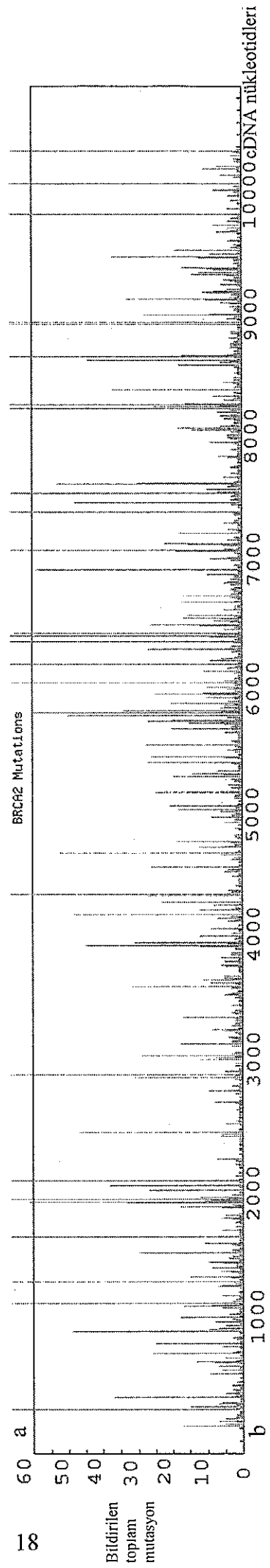
Risk grubu kadınları saptamak oldukça güç olmasına rağmen, aile öykülerinde veya kendilerinde kolon veya meme kanseri olan kadınlarda ovaryum kanserine yakalanma riski diğer kadınlara göre daha yüksek bulunmuştur (26).

Meme ve over kanserlerinin yaklaşık %5-10'unun ortaya çıkış nedeni olarak, kansere yatkınlık genlerinin penetransı fazla mutasyonları kabul edilmektedir ve *BRCA1* ve *BRCA2* bu olguların en az yarısından sorumludur. Bu mutasyonları taşıyan bireylerde hayat boyu meme, over, prostat ve çeşitli diğer bölgelerin kanserlerini oluşma riski artmaktadır (45,46). Özellikle erken yaş meme kanseri olan bireylerin birinci derece akrabalarında meme kanseri riski *BRCA* mutasyonu taşıyıp taşıyamamalarından bağımsız olarak artmaktadır. Bu risk yaş azaldıkça ve hasta birey sayısı arttıkça artmaktadır. Ayrıca *BRCA* mutasyonu taşımayan erken yaş meme kanserli bireylerin birinci derece akrabaları arasında prostat, serviks, non-melanoma deri kanserlerinin sıklıklarının arttığı gösterilmiştir (33). Genetik bağlantı analizleri kullanılarak yapılan ilk çalışmalar, *BRCA1* genindeki mutasyonların kalıtsal kanserlerin %45'inden, *BRCA2* mutasyonlarının ise bu olguların %35'inden sorumlu olduğunu göstermiştir (46).

Bu iki büyük gende kalıtsal mutasyonların yoğunlaştığı herhangi bir hotspot bölge bulunmamıştır (47) (Şekil 2.10,2 11).



Şekil 2.10: BRCA1 geninde mutasyonların dağılımı a) Mutasyonların cDNA nükleotid dizilerine göre sayıları b) BRCA1 geni ekzonları



Şekil 2.11: BRCA2 geninde mutasyonların dağılımı a) Mutasyonların cDNA nükleotid dizilerine göre sayıları b) BRCA2 geni ekzonları

Bu nedenle genellikle hızlı mutasyon tarama yöntemleri kullanılarak (örneğin SSCP, DGGE, DHPLC, PTT gibi) çeşitli popülasyonlarda çok sayıda mutasyon taraması çalışması yapılmıştır. Bazı popülasyonlarda kurucu ("founder") mutasyonlar görülmüştür. Bunlardan en çok bilineni Ashkenazi Yahudilerinde saptanan üç kurucu mutasyondur. Bu mutasyonlardan ikisi *BRCA1* genindeki 185delAG ve 5382 insC mutasyonları ve bir diğeri *BRCA2* genindeki 6174delT mutasyonudur. Örneğin çok merkezli bir araştırmaya 40 yaşın altında meme kanseri tanısı almış 457 Ashkenazi Yahudisi kadın dahil edilmiş ve bu üç kurucu mutasyondan biri hastaların %40'ında saptanmıştır (48). Ayrıca *BRCA* mutasyon taşıyıcısı meme kanseri hastalarında kontralateral tümör oluşturma riskinin %60-70 kadar yüksek olabileceği bildirilmiştir (48). Farklı toplumlarda farklı kurucu mutasyonlar değişik oranlarla belirlenmiştir. Örneğin, İsveç'in batısında yapılan bir çalışmada 62 bireyden 16'sında 3171ins5 mutasyonu bulunmuş ve bu mutasyonu taşıyan ailelerin İsveç'in batı kıyısında yerleşik oldukları belirtilmiştir (49). İzlanda'lı 42 bireyin analiz edildiği bir çalışmada ise 11 bireyde *BRCA2* geninde 999del5 mutasyonu, ve bir bireyde de *BRCA1* geninde G5193A mutasyonu saptanmıştır (90). *BRCA2*'nin 999del5 mutasyonu Finlandiya popülasyonunda da sıklıkla gözlenen bir kurucu mutasyondur, *BRCA2* geninde bulunmuş olan toplam 40 mutasyondan 13'ünü oluşturur (51). Slovenya'lı yüksek risk grubu yedi bireyde yapılan mutasyon analizinde ise bu bireylerin üçünde *BRCA2*'de bir "splice" bölge mutasyonu olan IVS16.2 A-G bulunmuştur (52). Polonya'dan 63 ailede yapılan çalışmada da, ailelerin %9'unda *BRCA1*'de 5382insC ve %5'inde 300T-C mutasyonları gözlenmiştir (53). Ayrıca yine Polonya'lı bireylerde yapılmış daha geniş çaplı bir çalışmaya dahil edilmiş olan 200 yüksek risk grubu meme ve/veya over kanserli bireyden 111'inde üç kurucu mutasyondan (*BRCA1*'de 5382insC, C61G, ve 4153delA) birisi bulunmuştur (54). İskandinavya'lı (çoğunlukla İsveç'li) 106 meme ve/veya over kanserli bireyin tarandığı bir çalışmada da *BRCA2*'nin 4486delG mutasyonu toplam beş bireyde bulunmuştur (55). Hollanda'lı 170 meme kanseri ailesinde yapılan çalışmada ise 3 büyük delesyonun ailelerin %36'sında gözlendiği bildirilmiştir (56). Ayrı bir çalışmada da 643 Hollanda'lı ve 23 Belçika'lı bireyde *BRCA1*'de mutasyon taraması yapılmış ve 2804delAA mutasyonu 19 bireyde gözlenmiştir. Ayrıca bu mutasyonun Hollanda dışında hiçbir yerde rapor edilmediği belirtilmiştir (57). İspanya'da yapılan çalışmada *BRCA1*'de 185delAG ve *BRCA2*'de 9254delATCAT gibi tekrarlanan mutasyonlar olduğu ancak bunların frekanslarının çok düşük olduğu bulunmuştur (58). Benzer şekilde Kuzey ve Güney Çin orijinli 214 over kanseri olgusunun incelendiği çalışma sonucunda *BRCA1*'de 2371-2372delTG ve *BRCA2*'de 3337C-T mutasyonları iki ya da üç bireyde bulunmuştur. Özellikle bu tekrarlayan mutasyonların Çin'in Güney'inde Hong Kong'lu bireylerde bulunduğu vurgulanmıştır

(59). 82 Japon over kanserli hasta ile yapılan bir çalışmada ise *BRCA1*'de L63X ve Q934X mutasyonlarının sırasıyla yedi ve sekiz ailede tanımlandığı bildirilmiştir (60). Meme/over kanserli Rus 25 bireyin çalışıldığı bir çalışmada da üç bireyde *BRCA1*'de 5382insC mutasyonu bulunmuştur (61). Kurucu mutasyonlar çoğunlukla genetik olarak izole toplumlarda ya da etnik orijine bağlı olarak saptanmaktadır.

Kore'li Meme ve/veya Over kanser ailelerinde yapılan çalışmada ise 9 ailede *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine ait dokuz farklı mutasyon bulunmuştur (62). Filipin'li 294 meme kanseri olgusunda yapılan *BRCA1* ve *BRCA2* taraması sonucunda toplam mutasyon oranı %5.1 bulunurken, *BRCA2*'de 4265delCT ve 4859delA mutasyonları sırasıyla iki ve dört ailede gösterilmiştir (63). İran'lı 22 bireyin *BRCA1* mutasyonları açısından tarandığı araştırmada ise dört yanlış anlamlı mutasyon, iki polimorfizm, ve iki intronik bölge değişimi bulunmuştur (64). Meksika'lı 51 meme kanseri hastasının *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin taranması sonucunda toplam iki erken sonlanma mutasyonu ve altı tane de biyolojik önemi bilinmeyen varyant gözlenmiştir (65). Tayland'lı toplam 18 bireyin dahil edildiği çalışmada ise toplam 6 hastalık yapıcı, iki yanlış anlamlı, ve iki intronik bölge mutasyonu bulunmuş ve bulunan bu mutasyonların Asya popülasyonunda yapılan diğer çalışmaların bulgularından farklı olduğu belirtilmiştir (66). Bu çalışmalar sonucunda, mutasyon saptanma sıklığı çalışılan popülasyona, kullanılan yöntem, genin hangi bölgelerinin tarandığına, ve çalışmaya dahil edilen bireylerin seçim kriterlerine göre farklılık göstermektedir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da hasta seçim kriterleri, taranan gen bölgeleri, kullanılan yöntemler ve saptanan mutasyon oranları farklılık göstermektedir. Balcı ve ark.'ları 15 ailesel meme ve/veya over kanseri hastasında PTT ya da CSGE yöntemleri kullanarak *BRCA1* ve *BRCA2*'nin tüm kodlayıcı bölgelerini taramış ve üç tane hastalık yapıcı mutasyonun varlığını göstermiştir (67). Yazıcı ve ark. ise 53 ailesel meme ve/veya over kanseri, 52 erken yaş meme kanseri hastasında *BRCA1*'in 2,11,14 ve 20'inci ekzonlarını, *BRCA2*'nin ise 10 ve 11'inci ekzonlarını PTT ya da heterodupleks analizi ile taramış ve toplam 11 hastada hastalık yapıcı mutasyon göstermiştir (68). Özdağ ve ark., altı kalıtsal, yedi ailesel, 27 erken yaş ve 10 erkek meme kanseri hastasında *BRCA1* geninin 2,5,11,13 ve 20'inci ekzonlarını, *BRCA2* geninin ise 11'inci ekzonunu heterodupleks analizi yöntemi ile taramış ve üç hastada hastalık yapıcı mutasyon, *BRCA1* geninin 11'inci ekzonunda ise altı farklı yanlış anlamlı mutasyon bulmuşlardır (69). Yazıcı ve ark.'nın, yapmış olduğu 15 ailesel, 87 ailesel olmayan over kanserini kapsayan PTT yöntemi ile mutasyon tarama çalışması sonucunda ise 17 hastada

mutasyon gösterilmiştir (70). Bu çalışmalarda saptanan mutasyonlar heterojen bir dağılım göstermektedir.

*BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları dışında *p53* mutasyonlarının neden olduğu Li-Fraumeni Sendromu, *PTEN* mutasyonlarının neden olduğu Cowden Sendromu, DNA tamir mekanizmalarındaki hataların neden olduğu Lynch sendromu (herediter nonpolipozis kolorektal kanser), *MEN1* gen mutasyonlarının yol açtığı multiple endokrin neoplazi tip I gibi sendromlarda da meme ve/veya over kanserine yatkınlık olduğu bildirilmiştir (17,22). Diğer bir çalışmada da, kalıtsal meme kanserlerine kalıtsal yatkınlığın %20'sinden *BRCA1*, %20'sinden *BRCA2*, %5'inden *CHEK2* (cycle-checkpoint kinase gene), %1'inden *p53*'ün sorunlu olduğu bildirilmiştir. Kalan %54'lük dilimin ise henüz sayıları bilinmeyen ve farklı penetranslara sahip yatkınlık genleri, hormonal ve çevresel faktörlere maruz kalma ve tesadüfen oluşan genetik olaylar nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği tahmin edilmektedir (71). Meme kanseri olma riskiyle çeşitli genlerin polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı pek çalışma mevcuttur. Örneğin, Dalay ve ark.'larının yapmış olduğu 115 meme kanseri hasta ve 76 sağlıklı bireyin dahil edildiği çalışmada *p53*'ün 72'inci kodonundaki Prolin'in Arjinin'e dönüşümüne neden olan polimorfizmin homozigositesi ile meme kanseri arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (72). Diğer bir çalışmada ise, vitamin D reseptör polimorfizmleri ile meme kanseri arasında ilişki olduğu gösterilememiştir (73). Ambrosone ve ark.'larının yaptığı çalışmada, *CYP17* polimorfizmleri ile meme kanseri riski arasında ilişki olmadığı bulunmuştur (74). Folat metabolizmasında, DNA biyosentezinde ve metilasyonda rol oynayan metilentetrahidrofolat redüktaz (*MTHFR*)'in C677C/C1298C ve T677T/A1298A birleşik heterozigotlarının premenapozal kadınlarda sporadik meme kanseri risk faktörü olduğu saptanmıştır (75). Östrojen reseptör gen polimorfizmlerini belirlemek amacıyla 100 meme kanseri hastasının ve 100 kontrol bireyin genomik DNA'larında yapılan çalışmada C975G'de G/G ve G1782A'da A/A genotipinin meme kanserine karşı koruyucu etkisi olduğunu istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır (76). Ancak, Kore'li 110 meme kanseri hastasında ve 45 normal kontrol bireyde yapılan çalışmada C975G değişiminin meme kanseri riskini etkilemediği fakat östrojen ve progesteron reseptörlerinin ekspresyonuyla pozitif, *p53* ekspresyonuyla negatif bir korelasyon olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir (77). Sitokrom *p4501B1* (*CYP1B1*) ve Katekol O-metiltransferaz (*COMT*) gen polimorfizmlerinin 84 Türk meme kanseri hastası ve 103 sağlıklı kontrol bireyde araştırıldığı çalışma sonucunda, *CYP1B1*'de L432V allelinin BMI'i 24kg/m<sup>2</sup> olan bireyler için anlamlı bir yatkınlık faktörü olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir (78). Diğer yandan, 178 meme kanseri hastası ve 356 kontrol bireyde yapılmış olan bir çalışmada ise *CYP1B1* L432V

polimorfizmi ve CYP19 geni tetranükleotid tekrarları ile meme kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı bulunmuştur (79). Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) gen polimorfizmleri açısından 117 over kanserli bireyin değerlendirildiği çalışmada, CYP1A1 İle/Val genotipinin over kanseri riskini arttırdığı gözlenmiştir (80). 152 Yunan ve 301 Türk meme kanseri hastası ile yapılan bir çalışmada ise *RNASEL* Arg462Gln varyantı ile meme kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (81). *CHEK2* (cell-cycle-checkpoint kinaz 2) geninin de *BRCA1* ve *BRCA2* negatif ailesel meme kanserleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir. *CHEK2* geninin 1100delC varyantı açısından 327 meme kanseri hastası ve 331 sağlıklı kontrol birey değerlendirilmiş ve sadece 6 sağlıklı bireyde bu varyantın varlığı saptanırken 27 hastada (%11.4) varyantın gözlenmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca bu varyantı taşıyan bireylerde hastalık gelişiminin taşımayanlara göre daha erken yaşta gerçekleştiği gözlemlenmiştir (82).

Meme ve kolon kanserleri gibi sık gözlenen kanserlerin kalıtsal formları daha iyi tanımlandıkça, kanserde genetik danışma alanı da hızla gelişmiştir. Kanserde genetik danışma, prenatal ve postnatal klinik danışmadan farklıdır. Örneğin, ailede kanserin kalıtsal paterninin belirlenebilmesi için en az üç kuşaklı soyağacı gereklidir. Ayrıca hastalığın yaşı ve lokalizasyonu gibi bilgilerin doğruluğu çok önemlidir. Bu aielelere verilecek genetik danışmada aileler bilinen birkaç kanser açısından değerlendirilir. Bunlardan biri *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin kalıtsal mutasyonlarının neden olduğu kalıtsal meme-over kanserleridir. Meme kanseri olma riski %45-85 arasındadır. Ayrıca over ve prostat kanserleri de görülebilir. *PTEN* geninin neden olduğu Cowden sendromunda meme kanseri riski %25-50 arasındadır ve troid ve endometrium kanserleri de oluşabilir. En iyi bilinen kanserlerden biri olan Li-Fraumeni sendromunun oluşum nedeni p53 genindeki mutasyonlardır ve meme kanseri riski % 50 olup, sarkoma, adenokortikal tümör, beyin, ve lösemi de ortaya çıkabilir. *STK11* geninin mutasyonlarıyla oluşan Peutz-Jeghers sendromunda meme ve jinekolojik kanser riski normal topluma göre 20.3 kat artar ve gastrointestinal, pankreatik, over ve uterin tümörleri görülebilir. *ATM* mutasyonlarının taşıyıcılarında da meme kanseri olma riski normal popülasyona göre 1.5-7.1 kat artmaktadır. Ayrıca, ailesel meme kanseri/kalıtsal meme ve kolorektal kanserlerde gözlenen *CHK2* geninde 1100delC varyantı da meme kanserini iki kat arttırmakta ve bu sendromda da kolon kanserleri gözlenmektedir (83). Kendilerinde ya da yakınlarında meme/over kanseri olan bireylerin yaşadığı en büyük güçlükler arasında bireylerin meme kanseri riskini doğru anlayamaması, ve kanser nedeniyle oluşan anksiyete vardır. Genetik danışma sayesinde bireylerin meme kanseri riskini daha iyi anlamaları sağlanabilmektedir. Riskin hasta tarafından doğru algılanması çok önemlidir çünkü tarama ve

korunma stratejilerine karar verilmesinde önemli yer tutmaktadır. Yine riskin algılanmasında psikolojik ve kültürel farklılıklar da etkilidir (84).

### **2.7.2. Meme/Over Kanserlerine Neden Olan Genetik Olmayan Diğer Faktörler**

Meme kanseri tüm kanser türlerinin 1/10'unu oluşturmaktadır ve sıklıkla kadınlar arasında görülmektedir, bu nedenle meme kanserleri epidemik olarak değerlendirilir. 2000 yılı için dünya çapında meme kanseri nedeniyle 370.000 kişinin yaşamını kaybetmiş olmasına rağmen, coğrafik farklılıklar dikkati çekmektedir. Afrika ve Asya'da meme kanseri görülme oranı Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'ya oranla 10 kat daha düşük bulunmuştur. Göç etmiş popülasyonlarda yapılan çalışmalar genetik altyapının bu farklılıkta çok az etkisi olduğunu göstermiştir. Zaman içinde de meme kanseri olgu sayılarında gözle görülür bir artış olmuştur. Global olgu sayısı 1980'de 572.000 iken, 2000 yılında bu sayı 1.050.000'e yükselmiştir. Bu artışın nedenleri tam olarak açıklanamamakla beraber, çevresel faktörlerle ilgi kurmak olasıdır. Bu artışın bir başka sebebi de teknolojinin gelişmesiyle daha önce tanı konulamayan hastalara da tanı konulabilmesi olabilir. Olgu sayılarının artışına ters olarak mortalite sayısı ABD'de ve İngiltere'de hafif düşüş göstermeye başlamıştır. Risk faktörleri reprodaktif hayat (ilk gebelik yaşı, doğum sayısı, menarş ve menopoz yaşı gibi), hormonal faktörler, diyet, genetik ve radyasyon ve bazı kimyasallara maruz kalma ile ilişkilendirilse de meme kanserlerinin çoğu açıklanamamakta ve yeni risk faktörlerinin tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yiyecek, hava, su, toprak kirliliğine, kimyasal ve nükleer kirliliğe maruz kalma ile meme kanseri arasındaki ilişki hakkında daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (85).

Meme ve over kanserleri etiyolojide pek çok ortak faktöre sahiptirler. Bu, over kanserinin tanımlanmasını takiben malign meme tümörlerinin ortaya çıkışını açıklayabilir. Meme ve over kanserleri hormon bağımlıdır ve erken menarş, geç menopoz, ilk doğum yaşının geç olması her iki kanserde de risk faktörü olarak kabul edilmektedir (37). Endojen ya da ekzojen olarak östrojene maruz kalma süresi uzadıkça (örneğin erken menarş ve geç menopozda olduğu gibi) kanser gelişme riski de artmaktadır (86). Nijeryalı 234 meme kanseri kadın ve 273 normal kontrol bireyle yapılan bir çalışmada da postmenopozal kadınlarda obezite ve meme kanseri gelişme riski arasında pozitif bir korelasyon bulunması da östrojene maruz kalma ile açıklanabilir (87). Primer over kanserli hastalarda ortaya çıkan meme kanserlerinin %43'ü klinik takipte



semptom göstermemişlerdir ve bu durum over kanserli hastalara artan meme kanseri riskinin açıklanmasında önemlidir (86).

Hormon replasman tedavisinin (HRT) kullanımı meme kanseri görülme sıklığını arttırmaktadır. Bir milyondan fazla kadınla yapılan bir çalışmada, HRT tedavisini halen kullanmakta olan kadınlarda, hiç kullanmamış olanlara göre meme kanseri gelişme ve bu nedenle ölüm riskinin artmış olduğu saptanmıştır. Ayrıca etkinin östrojen-progesteron kombinasyonunda diğer HRT tiplerine oranla daha fazla olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışma, önceden HRT kullanmış fakat halen kullanmamakta olan bireylerde ise riskin artmadığını göstermiştir (88).

Katı ve sıvı yağların yüksek miktarda kullanıldığı toplumlarda over kanserine yakalanma oranının yüksek olduğu bulunmuştur (26). Ayrıca yapılan pek çok çalışmada meme kanseri ve lifli yiyecek yeme arasında ters orantı olduğu gösterilmiştir (89). Lifli yiyeceklerin meme kanserine karşı potansiyel koruma mekanizması, bu yiyeceklerin serum östrojen düzeylerini ve steroid hormon düzeyini düşürmesi ile açıklanabilir. Hormon metabolizmasıyla ilgili olarak over kanserleri ve meme kanserleri arasındaki benzerlik nedeniyle aynı mekanizma over kanserleri için de geçerli olabilir. Nitekim lifli yiyecek tüketimi ile over kanseri riski arasında ters orantı bulunmuştur (90). Aynı reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif stresin de meme kanseri başlangıcında ve progresyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Meme hücrelerinde oksijen radikalleri aerobik respirasyonda oksijen kullanımı sonucu sürekli olarak üretilmektedir. Mitokondride yapılan superoksit hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine dönüştürülür. Epidemiyolojik çalışmalar, antioksidanlarca zengin diyetin meme kanseri gelişiminin engellenmesine yardımcı olduğunu ortaya koymuştur. Hatta bu bulgular, İngiltere hükümetinin bireylere günde en az beş porsiyon meyve ya da sebze yemelerini önermesine neden olmuştur (91). Antioksidanlar reaktif oksijen türlerini inaktive ederek oksidatif hasarı engeller ya da geciktirir. Yiyeceklerden alınabilen antioksidanlar olan E vitamini, C vitamini, polifenoller, ve karotenoidlere ek olarak domates ve domates ürünlerinde bulunan likopen'in serum ve doku düzeyleri ile meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser oluşum riskleri arasında ters bir orantı olduğu gösterilmiştir (92).

## **2.8. Meme/Over Kanseri Tedavisi İçin Geliştirilen Yeni Yöntemler**

Normal meme gelişiminde, üreme sisteminin, kemik metabolizmasının, kardiyovasküler ve merkezi sinir sisteminin regülasyonunda önemli fizyolojik rolü olan östrojenler ve reseptörleri

meme, endometrium ve over gibi tümörlerin başlangıcı ve gelişimi için önemlidir. Kısmi antiöstrojen olan tamoksifen kullanımının erken evre meme kanserlerinde hastalıksız yaşam süresi ve genel yaşam süresinin uzamasını sağladığı gösterilmiştir. Ancak tamoksifen tedavisinin uzun süreli olması durumunda uterotrofik etkisi nedeniyle endometrial kanser riski artmaktadır ve ayrıca tamoksifene karşı klinik dirençle de karşılaşılabilir. Östrojen-ER sinyalini hedef alan direk hormonal tedavilerin dışında büyüme faktörü aktivitesini durduran meme kanseri tedavi yöntemleri de ilgi çekmektedir. EGFR ve ErbB2/HER-2/neu meme kanserleri için hedef alınan büyüme faktörü sinyal moleküllerindedir (93). Her-2 amplifikasyonu meme kanserlerinin %25'inde rastlanmakta ve bu grupta kemoterapiye ve endokrin tedaviye direnç görülmektedir (94). EGFR ve ErbB2/HER-2/neu'yu hedef alan stratejiler antireseptör antikörlerini tirozin kinaz inhibitörlerini, reseptör antisens moleküllerini içerir. Her 2 proteininin ekstrasellüler domainine karşı oluşturulan monoklonal antikor olan herceptin metastatik meme kanserlerinin tedavisi için geliştirilmiştir. Meme kanseri tedavisi için geliştirilmekte olan diğer ajanlar diğer nükleer reseptör ligantlarını içermektedir. Bunlar arasında retinoik asit reseptör ligantları olan retinoidler ve vitamin D reseptörleri (PPAR $\gamma$  ve VDR) de vardır (93). Bir nükleer reseptör olan VDR ligantına (vitamin D-3'ün biyolojik olarak aktif formu) bağlandığında aktive olarak VDR sinyal yolunu etkiler. Bu yolda gelişimin durması, farklılaşma ve/veya apoptozis yani büyümenin negatif regülasyonu gerçekleşir. VDR normal meme dokusunda sentezlenir ve östrojene ters şekilde etki ederek farklılaşmaya neden olur. Hayvanlarda yapılan çalışmalar vitamin D içeriklerinin meme kanseri gelişimini azalttığını gösterirken, insanlarda yapılan çalışmalar da vitamin D durumunun ve genetik varyasyonlarının meme kanseri riskini etkilediğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, hücresel, moleküler ve popülasyon düzeyinde yapılan çalışmalarda VDR'nin meme kanserlerinin tedavisinde kullanılabilecek bir hedef olabileceğini göstermektedir (95).

Over kanseri cerrahi yöntemlerinin gelişimine ve yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesine rağmen son 25 yılda over kanseri hastalarının genel hayatta kalım süresinde değişim olmamıştır. Over kanserlerinin moleküler biyolojisinin ve tek nükleotid polimorfizmlerinin, onkogenlerin, ve tümör baskılayıcı genlerin tümör hücre gelişimindeki etkisinin anlaşılmasında önemli gelişmeler olmuştur. Gen defektlerine karşı ve tek bir over hücresinin yıkımına özgül stratejiler geliştirilmiştir. Hücre proliferasyonu, apoptoz, angiogenez, hücresel adezyon, hücre motilitesini kontrol eden hedef reseptörleri ve sinyal iletimi yollarını hedef alan moleküler temelli terapiler ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar sonucunda normal hücrelere daha az toksik tedavi yollarının geliştirilmesi beklenmektedir (96). Ayrıca over karsinogenezinde işe

karışan yeni moleküllerin saptanmasıyla yeni stratejiler geliştirilebilecektir. Örneğin, Over Clear Cell Karsinoma (CCC) ekspresyon profilleriyle yapılan bir çalışmada oligonükleotid array tekniği ile bir transkripsiyon faktörü olan hepatosit nükleer faktör-1beta'nın (HNF-1beta) over kanserlerinde up-regüle olduğu gösterilmiştir. Yapılan RNA interferans çalışmasında HNF-1beta ekspresyonunun engellenmesi ile over kanseri hücrelerinde apoptozun gerçekleştiği ve bu nedenle HNF-1beta'nın hem CCC'ye özgül bir marker hem de tedavide moleküler bir hedef olabileceği bildirilmiştir (97).

## MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran hastalardan aşağıda listelenen koşullardan en az birini sağlayan bireyler araştırma hakkında bilgilendirildi ve gönüllü olanlardan imzalı izin alınarak 10 ml periferik kan alındı. 37 erken yaş grubu, 26 ailesel meme/over kanseri grubu, üç erkek meme kanseri, altı bilateral kadın meme kanseri ve üç meme ve over kanseri hastası olmak üzere toplam 75 hasta araştırmaya dahil edildi.

Bireylerin genomik DNA'ları elde edilerek *BRCA1* ve *BRCA2* gen mutasyonları, katmanlı denatüre edici jel elektroforezi (DGGE) ya da güdük protein testi (PTT) uygulanarak tarandı. Bu analizler sonucunda jelde mutasyon olma olasılığı gösteren örnekler için dizi analizi uygulanarak mutasyonlar karakterize edildi.

### 3.1. Hasta Seçimi ve Grupların Oluşturulması

Çalışmada yüksek risk grubu meme/over kanseri hastaları dört ana grupta toplandı:

- *Erken yaş meme/over kanseri hastaları:* 40 yaş ya da daha önce meme ya da over kanseri tanısı almış kadın hastalar
- *Ailesel meme/over kanseri hastaları:* Birinci ya da ikinci derece akrabalarından en az birinde meme ve/veya over kanseri öyküsü olan meme ve/veya over kanseri tanısı almış kadın hastalar
- *Erkek meme kanseri hastaları:* Herhangi bir yaşta meme kanseri tanısı almış erkek hastalar
- *Bilateral meme ya da hem meme hem over kanseri tanısı almış kadın bireyler*

### 3.2. DNA İzolasyonu

Hastalardan alınan 10 ml periferik kan EDTA'lı steril tüplere (venoject® EDTA(K<sub>3</sub>)) toplandı. Miller ve arkadaşları, tarafından geliştirilen standart DNA izolasyon yöntemi (98) değiştirilerek, kullanılan çözeltiler ve işlem basamakları aşağıda verildiği gibi uygulandı.

### 3.2.1. Kullanılan Çözeltiler:

#### Lizis Tamponu

155 mM NH<sub>4</sub>Cl (Sigma)

10 mM KHCO<sub>3</sub> (Sigma)

1 mM EDTA pH 7.4 – 8.0 (Sigma)

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

#### WBL (White Blood Lysis) Tamponu

0.1M NaCl

0.025 M EDTA pH 7.4 – 8.0

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

#### 9.5 M Amonyum Asetat

36.613 gram amonyum asetat ( CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, Merck) 50 ml distile suda çözüldü. Otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

#### %10 SDS Çözeltisi

1gr SDS 10 ml distile suda çözüldü. Filtre ile steril edildi ve oda ısısında saklandı.

#### Proteinaz K

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

#### %70'lik Etanol

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

### 3.2.2. İşlemler

10 ml EDTA'lı kan alt üst edilerek homojenize edildikten sonra steril 50 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Üzerine 30 ml lizis tamponu eklendi ve vortekse iyice karıştırıldı. Buzda 15-20 dakika bekletildi. Bu süre boyunca bir ya da iki defa vortekse karıştırıldı. +4°C'de dakikada devir sayısı (rpm) 1500 olacak şekilde 10 dakika santrifuj(Sigma) edildi. Dökelti atıldı. Çökelti elle vurularak iyice homojenize edildikten sonra üzerine 20 ml lizis tamponu eklendi. +4°C'de 1500 rpm'de 10 dakika santrifuj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti homojenize edildi. Çökeltiye 9.4 ml WBL tamponu, 500 µl %10'luk SDS, 50 µl Proteinaz K (20mg/ml) eklendi. 37°C'lik etüvde 16 saat (bir gece) bekletildi. Ertesi gün üzerine 3.7 ml 9.5M amonyum asetat çözeltisi eklendi. Beyazımsı bir renk oluşana kadar elle vurularak iyice karıştırıldı. 25 dakika oda ısısında 5000 rpm'de santrifuj edildi. Sıvı dökelti fazı yeni bir steril falkon tüpünde topladı. Toplanan sıvı fazın üzerine 1:2 oranında saf etanol ya da izopropanol eklendi, ve alt üst edilerek DNA'nın toplanması sağlandı. Gözle ayırt edilebilir bir şekilde çökelti oluşturan DNA'lar %70'lik Etanol bulunduran 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. 13000 rpm'de oda ısısında 10 dakika santrifuj edildi. Üst faz atıldı. Çökelti 37°C'lik etüvde ağzı açık olarak kurutuldu. Kurutulan DNA steril distile suda çözüldü. Elde edilen DNA örnekleri uzun süre saklanacaksa -20°C'de, kısa sürede kullanılacaksa +4°C'de saklandı.

### 3.3. PTT (Protein Truncation Test; Güdük Potein Testi)

Bazı hastalarda BRCA1 geninin 11. ekzonunda mutasyon taraması için PTT testi kullanıldı. Hogervorst ve arkadaşları tarafından geliştirilen PCR protokolleri aşağıda verildiği şekilde uygulandı (99). Bir T7 promotor dizisi ve bir ökaryot translasyon başlangıç dizisi içeren ileri (forward) primer kullanıldı. Beklenen büyüklükteki PCR ürünleri PTT analizi için kullanıldı.

#### 3.3.1. PCR Protokolü:

94 °C 'de 4 dakika	} 35 döngü
94 °C 'de 1 dakika	
52 °C 'de 3 dakika	
72 °C 'de 1 dakika	
72 °C 'de 5 dakika	

### 3.3.2. PCR İçeriği

dNTP karışımı(10mM)	2.5µl
10X Tampon	2.5µl
İleri primer (10pmol/µl)	1µl
Geri primer (10pmol/µl)	1µl
MgCl <sub>2</sub> [50mM]	0.75µl
Taq pol (5u/µl)	0.1µl
H <sub>2</sub> O	16.25µl
DNA(100-500ng/µl)	1µl

Kullanılan primer adları ve dizileri Çizelge 3.1'de verildi.

**Çizelge 3.1:** BRCA1 geninin 11 ekzonunun PTT analizinde kullanılan primer adları ve dizileri

Primer adı	Primer diziler (5'→ 3' yönünde)
BRCA1-1F	GCTAATACGACTCACTATAGGAACA GACCACCATGGCTTGTGAATTTTCTG AGACGG
BRCA1-1R	ATGAGTTGTAGGTTTCTGCTGTG
BRCA1-2F	GCTAATACGACTCACTATAGGAACA GACCACCATGGACAATTCAAAGCA CCTAAAAG
BRCA1-2R	AACCCCTAATCTAAGCATAGCATT
BRCA1-3F	GCTAATACGACTCACTATAGGAACA GACCACCATGGCACCCTTTTCCC ATCAAGTC
BRCA1-3R	TTATTTTCTTCCAAGCCCGTTCC

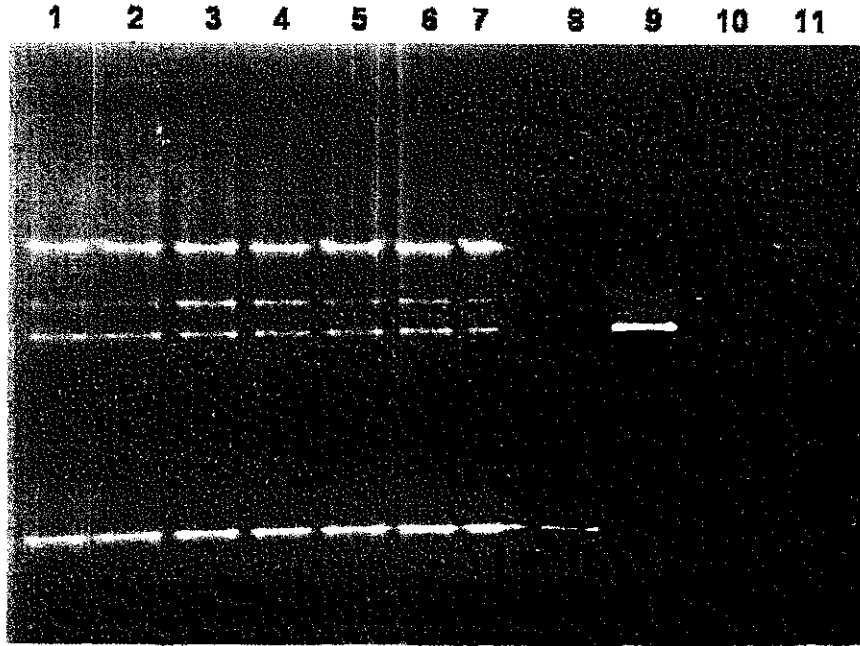
### 3.3.3. Toplam 20 Reaksiyon İçin PTT Testinin Hazırlanışı

Buz üstünde temiz tüplere 0.5µl H<sub>2</sub>O, 1.3µl PCR ürünü ve 0.8 µl enhancer eklendi. 200µl TNT master (Promega TNT Quick coupled transcription/translation systems L1170) karışımına 10µl radyoaktif S<sup>35</sup> metiyonin (S<sup>35</sup>- 1000 ci/mmol at 10mci/ml) eklendi. 30°C'de 90 dakika bekletildi. Buz üstünde her tüpe S<sup>35</sup> metiyonin içeren 10.5µl TNT karışımı, 10.5µl örnek tamponu ve 7µl beta-merkaptetanol eklendi. 70°C'de 10 dakika bekletildi. Örneğin tümü jele (NuPAGE electrophoresis system Np0301 %10 Bis Tris Gel, Running Buffer 20X(MES) NP0002, Sample Buffer NP0007, antioksidan NP0005) yüklendi. 100 Volt'da mavi boya jelin ucuna gelinceye kadar yürütüldü. Jeller kurutuldu. Otoradyografi uygulandı.

### 3.4. *BRCA1* ve *BRCA2* Genlerinin Kodlayıcı Ekzonları İçin DGGE Yöntemi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; Katmanlı Denatüre Edici Jel Elektroforezi)

*BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tüm kodlayıcı ekzonlarında mutasyon taranması için BioRad Dcode modeli sistem kullanılarak paralel DGGE düzenekleri kullanıldı. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine ait primer adları ve dizileri sırasıyla Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te verildi. Çizelge 3.2'de verilen *BRCA1* dizileri ve aşağıda detaylı olarak verilen PCR ve DGGE koşulları Dr. Annemarie van der Hout'dan (Moleküler Genetik DNA Servisi, Klinik Genetik Bölümü, Groningen Üniversite Hastanesi, Groningen, Hollanda) alındı.

*BRCA2* geninin Çizelge 3.3'de verilen primer dizileri Prof. Dr. Eitan Friedman'dan (Sheba Tıp Merkezi, Onkogenetik Ünitesi, Ramat Gan, İsrail) alındı. PCR ve DGGE koşulları daha önce Shirisverdlov ve arkadaşları (100) tarafından oluşturulan ve aşağıda detayları verilen şekilde uygulandı. Multipleks DGGE jel örneği Şekil 3.1'de verilmiştir.



**Şekil 3.1:** *BRCA1* genine ait DGGE jel örneği. Kuyular: 1-7: Multipleks örnekler; kuyu 8: ekzon 7; kuyu 9: ekzon 18; kuyu 10: ekzon 10; kuyu 11: ekzon 20.



**Çizelge 3.2:** BRCA1 geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının DGGE analizinde kullanılan primer adları, dizileri ve PCR ürün büyüklükleri  
[40GC]= CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCGCGGCCGC

Primer adı	Primer diziler (5'→ 3' yönünde)	PCR ürün büyüklüğü (baz çifti cinsinden verilmiştir)
B1-GC2AF	[40GC]ATGATAAAATGAAGTTGTC	204
B1-2AR	ACACTCTAAGATTTTCTGC	
B1-2BF	TTATCTGCTCTTCGCGTTG	202
B1-GC2BR	40GC]CTTCCCTAGTATGTAAGGTC	
B1-3F	GCGCGTTGAGCCTCATTATTTTC	185
B1-GC3R	[40GC]ACAAAAGCTAATAATGGAGC	
B1-GC5F	[40GC]GTATTCTTTCTACAAAAGG	208
B1-5R	TCCAACCTAGCATCATTAC	
B1-GC6F	[40GC]TTTTTTTTTTGGTTGATAATCACTTGCTG	223
B1-6R	CACTTGAGTTGCATTCTTG	
B1-GC7F	[40GC]ATACATAGGGTTTCTCTTG	293
B1-CGC7R	CGCAGAAGAAAACAAATGGTTT	
B1-GC8F	[40GC]TTGCTTGACT GTTCTTTACC	209
B1-8R	CGCCCGCCACTTAAAAACCTGAGACC	
B1-GC9F	[40GC]CCCTTTTAAT TAAGAAAAC	191
B1-9R	ACTAAATAGGAAAATACCAG	
B1-GC10F	[40GC]CATTTGACAGTTCTGCATAC	217
B1-10R	TTCAGTGCCTGTAAAGTTG	
B1-GC11F1	[40GC]ATGACAATTCAGTTTTTGAG	147
B1-11R1	TATTACTGGGTTGATGATG	
B1-GC11F2	[40GC]AGCTGCTTGTGAATTTTCTG	243
B1-11R2	ATAAACTGCTGTTCTCATGC	
B1-GC5T11F3	[40GC]TTTTTACAAATACTCATGCCAGCTC	313
B1-11R3	TAGGATTCTCTGAGCATGGC	
B1-GC10T11F4	[40GC]TTTTTTTTTTTGTGTGAGAGAAAAGAATG G	272
B1-11R4	CATCTACCTCATTTAGAACG	
B1-11F14	CTTTCACCCATACACATTTG	277
B1-GC11R14	[40GC]TGCAGTCATTTAAGCTATTC	
B1-GC11F15	[40GC]GAGTGTCTGTCTAAGAACAC	221
B1-11R15	TATTTGCAGTCAAGTCTTCC	
B1-11F16	GTTTTCTTCACAGTGCAGTG	296
B1-GC5T11R16	[40GC]TTTTTAAATAGACTGGGGCAAACAC	
B1-GC12F	[40GC]GTCTGCTTTTACATCTGAACC	221
B1-12R	AATGCAAAGGACACCACAC	
B1-13F	GCGCGATTTCAATTTCTTGGTGCC	305
B1-GC13R	[40GC]GGGAAGGAAAGAATTTTGC	
B1-GC14F	[40GC]TCAGAACAAAGCAGTAAAG	257
B1-14R	AAGATGTCAGATACCACAG	
B1-GC15AF	[40GC]ATTGGTGGCGATGGTTTTTC	204
B1-15AR	CTCCTCCACATCAACAACCT	

**Çizelge 3.2 devam:** *BRCA1* geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının DGGE analizinde kullanılan primer adları, dizileri ve PCR ürün büyüklükleri

[40GC]= CGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCGCCCCGCGGCCGC		
B1-15BF	ACTACCCATCTCAAGAGGAG	196
B1-GC15BR	[40GC]AAATCAAAGTGTGGTTCC	
B1-GC16AF	[40GC]GACCAGAACTTTGTAATTC	299
B1-16AR	CCAGCAGTATCAGTAGTAT	
B1-16BF	AAAGTTGCAGAATCTGCC	252
B1-GC16BR	[40GC]TAAGTCTTAGTCATTAGGG	
B1-GC17F	[40GC]GTGCTAGAGGTAACATCATG	213
B1-17R	CAGCAGATGCAAGGTATTC	
B1-18F	ACAGCACTTCCTGATTTTG	222
B1-GC18R	[40GC]TCTGAGGTGTTAAAGGGAG	
B1-19F	TCTATCTCCGTGAAAAGAG	176
B1-GC19R	[40GC]CTGGTTAGTTTGTAACATC	
B1-GC20F	[40GC]TGCTCCACTTCCATTGAAG	220
B1-20R	TTGTCAACTTGAGGGAGG	
B1-GC21F	[40GC]CCTTCTCTCCATTCCCCTG	182
B1-21R	AAGGCTGGTGCTGGAATC	
B1-GC22F	[40GC]GCCTGGGTAAAGTATGCAG	210
B1-22R	ATTGTGTCCTCCCTCTCTG	
B1-GC23F	[40GC]ACAGTCCAGTAGTCCTAC	190
B1-23R	CATATAGCACAGGTACATG	
B1-GC24F	[40GC]AGCCTAGTCCAGGAGAATG	251
B1-24R	TGTGGCTCTGTACCTGTGG	
1Bex11-5FTgc	[40GC]TTTTTTTTGAATCAAATGCCAAAGTAGC	329
1Bex11-5R	GGACGCTCTTGATTATCTG	
1Bex11-6F	ATTATAGGAGCATTGTGTTAC	324
1Bex11-6Rgc	[40GC]TTTTCGAGTGATTCTATTGG	
1Bex11-7Fgc	[40GC]CAAAGGTGATTCTATTTCAG	276
1Bex11-7R	ATTAGGTGGGCTTAGATTTTC	
1Bex11-8Fgc	[40GC]CAGGCATATTCATGCGCTTG	281
1Bex11-8R	GAAAGTATCGCTGTCATGTC	
1Bex11-9F	TAAAGAACCCTGCAACTGGAG	300
1Bex11-9Rgc	[40GC]AAACCCTTCTCCACTTAAC	
1Bex11-10Fgc	[40GC]TTTGTCAATCCTAGCCTTCC	324
1Bex11-10R	ATTAGTCCCTTGGGGTTTTC	
1Bex11-11FTgc	[40GC]TTTTTTTTAATAAATGTGTGAGTCAGTG	300
1Bex11-11R	ACATTCCTCTTCTGCATTTTC	
1Bex11-12F	ATTCAAGGTTTCAAAGCGCC	238
1Bex11-12Rgc	[40GC]GTGATATTAAGTGTCTGTAC	
1Bex11-13aFgc	[40GC]AGGAAGAAAATCAAGGAAAG	223
1Bex11-13aR	TAATGAGTCCAGTTTCGTTG	
1Bex11-13bF	GCCAAATGTAGTATCAAAGG	248
1Bex11-13bRgc	[40GC]CAGGTGACATTGAATGTTC	
1Bex11-13cF	AAAATCTGCTAGAGGAAAAC	259

**Çizelge 3.2 devam:** *BRCA1* geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının DGGE analizinde kullanılan primer adları, dizileri ve PCR ürün büyüklükleri

[40GC]= CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCGCGGCCG

1Bex11-13cRTgc	[40GC]TTTTTTTTTCATCACTGGAACCTATTTC	
1Bex11-13dF	TTAAAGAAGCCAGCTCAAGC	325
1Bex11-13dRgc	[40GC]CTGAAATCAGATATGGAGAG	
1Bex11-13eFgc	[40GC]GCAAGAATATGAAGAAGTAG	181
1Bex11-13eR	CCATCATCTAACAGGTCATC	
1Bex11-13fFTgc	[40GC]TTTTTTTTTAGTCATGCATCTCAGGTTTG	272
1Bex11-13fR	ATAAGTTCTCTTCTGAGGAC	

**Çizelge 3.3 :** *BRCA2* geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının DGGE analizinde kullanılan primer adları, dizileri ve PCR ürün büyüklükleri

[40GC]= CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCG

Primer adı	Primer diziler (5'→ 3' yönünde)	PCR ürün büyüklüğü (baz çifti cinsinden verilmiştir)
1F1	TGCTGCGTGTCGCGTCACGG	238
1R1	[40GC]GTAAGCTGACAAAAACCGCG	
1F2	[40GC]TTTTTTTTTAGAAGCGTGAGGGGACAGAT	173
1R2	GAAGACGCGCTCGTCCCAAC	
2F	TCCCTGTGTAAGTGCATT	227
2R	[40GC]CACTTCTCGGTGTAATT	
3F	[40GC]ACTAAGGTGGGATTTTTT	350
3R	CGCCCCCCCAGTCTACCATATTG	
4F	CACTGAATTATTGTACTG	189
4R	[40GC]CTTCATCATACTTTCAC	
5F	AAATAACCTAAGGGATTT	170
5R	[40GC]CATTTCTAGTATTCTAAG	
6F	CTTAACAATTTTCCCCTT	169
6R	[40GC]GCTATTGTCAAATTCTCA	
7F	[40GC]GATCAGGGCATTCTATA	248
7R	CGCCCTCATCTGCTCTTTCTTG	
8F	[40GC]GTTTTTGCATTCTAGTGATA	185
8R	GTTAGCAATTTCAACAGTCT	
9F	[40GC]GAGAGTTTTTATACTAGTGA	278
9R	ACAGAGCAAGACTCCACCTC	
10F1	[40GC]ATGTGCTTCTGTTTTATACT	396
10R1	CTTCTGATTTGCTACATTTG	
10F2	[40GC]CTCATTTGTATCTGAAGTGG	255
10R2	CGCCCTTTTGGTCACATGAAGAAAT	
10F3	[40GC]TTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCCCAGATGGAGAAA	234
10R3	CTGTTTCCTCATTTAATGGC	

**Çizelge 3.3 devam :** BRCA2 geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının DGGE analizinde kullanılan primer adları, dizileri ve PCR ürün büyüklükleri

	[40GC]= CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCG	
10F4	CCACGTATTTCTAGCCTACC	
10R4	[40GC]TTAAAGTTTGGATCAGTCAT	271
10F5	[40GC]GAGAATCACCTAAAGAGACT	
10R5	GGCCAGCTTCCATTATCAAT	200
10F6	[40GC]TTTTTTTTTTTTTTTGTGTGCTCACAGAAG GAGGA	161
10R6	CCTGCATTCTTCAAAGCTAC	
10F7	AGCCACCACCACACAGAATT	
10R7	[40GC]CTTTCGGTATTTTTTTTCCT	168
10F8	[40GC]GCTATACATGATGAAACATC	
10R8	GGAATCGTCATCTATAAAAC	231
11F1	CGCGTGAATGTGATGTATGGTAC	
11R1	[40GC]CTGTAGTTTTTCCTTATTAC	284
11F2	[40GC]GTAATCTCTCAGGATCTTGA	
11R2	ATGACTAGGTTTGACAGAAC	351
11F3	GCACTCTTATTTAACTCCT	
11R3	[40GC]AAGCACATACATCTTGATTC	211
11F16	[40GC]CTTCCTCGTGTGATAAGAG	
11R16	GGCATGACTTGGCAGTTTAG	472
11F17	GGAGATGATGAACTGACAG	
11R17	[40GC]GTGATTGGCAACACGAAAGG	214
12F	[40GC]GACTTTTGAGAAATAAACTG	
12R	GATCCACCTGAGGTCAGAAT	278
13F	CGCCCGTAATATAAAATAATTGTTTCC	
13R	[40GC]AAACGAGACTTTTCTCATAC	196
14F1	GTGTACTAGTCAATAAACTT	
14R1	[40GC]TTCAACTCTGTGAAAATGTG	335
14F2	[40GC]AACCAAAGTCTTTGTTCCAC	
14R2	GGCAAAAATTCATCACACAA	305
15F1	[40GC]GGTTGTGCTTTTTAAATTC	
15R1	CTTCTTAATTTCGCATATCCTG	151
15F2	[40GC]ATTACAAGTCTTCAGAATGC	
15R2	CGCCCAAAGCCATCAGTATTGTAG	254
16F	[40GC]GTGTGATACATGTTTACTT	
16R	CGCCCGGATGAGGGAATACATAAAA	358
17F	[40GC]CAGTATCATCCTATGTGGTT	
17R	CTGCCGTATATGATTACGTA	303
18F1	[40GC]CTCAGTTATTCAGTGACTTG	
18R1	GATCTAACTGGGCCTTAACA	245
18F2	TTGAACTTACAGATGGGTGG	
18R2	[40GC]CTGATTTTTACCAAGAGTGC	255
19F	CGCCCGAATTGAATACATATTTAACTAC	
19R	[40GC]TATGGTAAGTTTCAAGAATAC	277

**Çizelge 3.3 devam :** *BRCA2* geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının DGGE analizinde kullanılan primer adları, dizileri ve PCR ürün büyüklükleri

[40GC]= CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCG

20F	TATGTGACTTTTTTGGTGTG	281
20R	[40GC]CTCTAAGACTTTGTTCTCAT	
21F1	[40GC]GGTGTTTTATGCTTGGTTCT	146
21R1	TGCACGTGATGGTAAATATG	
21F2	CATATTTACCATCACGTGCA	177
21R2	[40GC]GCCTCATTATATGTCCTCTT	
22F	CGCCCCTAGTTACAATAGATGGAAC	331
22R	[40GC]CTGATAAAAACAAAGCATTTAC	
23F1	GATAATCACTTCTTCCATTG	205
23R1	[40GC]GTTAGCTCTTTCAGATTTAC	
23F2	[40GC]GAAGGAAAGAGATACAGAAT	211
23R2	TTCATAAACTAACAAGCAC	
24F	[40GC]GTGCTTGTTAGTTTATGGAA	270
24R	CGCCCAAAAATTAATATATTGTGC	
25F	[40GC]CTTGCATCTTAAAATTCATC	384
25R	CAAATGTGTGGTGATGCTG	
26F	GGAAATACTTTTGGAAACAT	282
26R	TTCCTTGAGTTTACATTAAC	
27F1	[40GC]ATGATAGGCTACGTTTTCAT	227
27R1	TTGCAGTTCTTTTGGTCATC	
27F2	[40GC]GTCTTGTAAGGGGAGAAAG	256
27F2	CGCCCCTGAGGAGAATTCAGTTCTT	
27R3	[40GC]CTGCACAGAAGGCATTTTCAG	333
27R3	CAGAGATGTAGTACAACGTC	
27F4	ACCAGTTCAGAAGATTATCT	209
27R4	[40GC]GTCAATAATTTATTGTCCGCC	

*BRCA1* geninin kodlayıcı bölgeleri ve bu bölgelerin PCR ve DGGE koşulları aşağıdaki Çizelgede verildi (Çizelge 3.4). *BRCA1* geni için aşağıda verilen gen bölgeleri ayrı tüplerde PCR (Techne marka thermal cycler) ile çoğaltıldı ve Çizelge 3.2'ye uygun olarak, örnekler, yükleme yapılmadan önce gruplarına göre karıştırıldı ve multipleks olarak jellere yüklendi.

Çizelge 3.4: BRCA1 genininde PCR ve DGGE analizi için kullanılan koşullar

Gruplar	Ekzonlar	PCR koşulları	PCR programı	DGGE jel denatüran oranı
1	7	Koşul 1	Program 1	%60-20
	18	Koşul 1	Program 1	
	10	Koşul 1	Program 1	
	20	Koşul 1	Program 1	
2	9	Koşul 1	Program 2	%70-30
	6	Koşul 1	Program 1	
	8	Koşul 1	Program 1	
	23	Koşul 1	Program 1	
3	5	Koşul 2	Program 1	%70-30
	2B	Koşul 3	Program 3	
	11.3	Koşul 1	Program 4	
	16B	Koşul 2	Program 1	
4	14	Koşul 1	Program 1	%70-30
	11.4	Koşul 1	Program 3	
	22	Koşul 1	Program 3	
	24	Koşul 1	Program 3	
5	2A	Koşul 3	Program 5	%60-20
	11.1	Koşul 1	Program 3	
	16A	Koşul 1	Program 1	
6	19	Koşul 2	Program 3	%70-30
	13	Koşul 1	Program 1	
	21	Koşul 1	Program 1	
7	17	Koşul 1	Program 1	%60-20
	11.14	Koşul 1	Program 1	
	3	Koşul 2	Program 3	
8	11.15	Koşul 1	Program 1	%60-20
	15A	Koşul 1	Program 1	
	15B	Koşul 1	Program 1	
9	11.16	Koşul 1	Program 1	%60-20
	11.2	Koşul 1	Program 1	
	12	Koşul 1	Program 1	
10	11.5	Koşul 2	Program 1	%60-20
	11.10	Koşul 2	Program 1	
	11.8	Koşul 2	Program 1	
11	11.13B	Koşul 1	Program 1	%70-30
	11.13E	Koşul 1	Program 1	
	11.13F	Koşul 1	Program 1	
12	11.13C	Koşul 1	Program 1	%60-20
	11.7	Koşul 1	Program 1	
	11.12	Koşul 1	Program 1	
13	11.9	Koşul 1	Program 1	%60-20
	11.11	Koşul 1	Program 1	
	11.13A	Koşul 1	Program 1	
14	11.13D	Koşul 1	Program 1	%60-20
	11.6	Koşul 1	Program 1	

*BRCA2* genine ait kodlayıcı bölgeler Çizelge 3.5'da verildiği gibi gruplandırıldı. Detaylar Çizelgede görülmektedir. *BRCA2* geninin bütün PCR'ları Koşul 1'e uygun olarak multipleks PCR ile çoğaltıldı.

**Çizelge 3.5:** *BRCA2* geninde PCR ve DGGE analizi için kullanılan koşullar

Gruplar	Ekzonlar	PCR programı	DGGE jel denatüran oranı
1	8, 23.1, 19, 18.1, 27.1, 10.5,10.2	Program 1	%60-20 /55-15
2	14.2, 22, 24, 27.2, 15.2, 21.2	Program 1	%65-25/55-15
3	21.1, 23.2, 27.3, 18.2	Program 1	%50-10
4	12, 15.1, 10.3, 13, 26, 10.6, 2	Program 1	%50-10
5	10.1, 25, 11.2,	Program 1	%50-10
6	10.4, 27.4	Program 2	%50-10
7	11.1, 20, 6, 14.1, 4	Program 1	%60-20
8	10.7, 16, 17, 7	Program 1	%60-20
9	5, 3, 11.17	Program 1	%60-20
10.1	9	Program 3	%50-10/50-15
10.2	10.8	Program 3	%60-20
10.3	11.3	Program 3	%60-20
10.4	11.16	Program 1	%60-20
10.5	1.1	Program 1	%60-20
10.6	1.2	Program 3	%60-20

### 3.4.1. PCR Koşulları

#### Koşul 1

dNTP karışımı(10mM)	1,25µl
10X Tampon	2.5µl
İleri primer (10pmol/µl)	1µl
Geri primer (10pmol/µl)	1µl
Mg Cl <sub>2</sub> [25mM]	1,5µl
Taq pol (5u/µl)	0.1µl
H <sub>2</sub> O	16.65µl
DNA(100-500ng/µl)	1µl

**Koşul 2**

dNTP karışımı(10mM)	1,25µl
10X Tampon	2.5µl
İleri primer (10pmol/µl)	1µl
Geri primer (10pmol/µl)	1µl
Mg Cl <sub>2</sub> [25mM]	2µl
Taq pol (5u/µl)	0.1µl
H <sub>2</sub> O	16.15µl
DNA(100-500ng/µl)	1µl

**Koşul 3**

dNTP karışımı(10mM)	1,25µl
10X Tampon	2.5µl
İleri primer (10pmol/µl)	1µl
Geri primer (10pmol/µl)	1µl
Mg Cl <sub>2</sub> [25mM]	3µl
Taq pol (5u/µl)	0.1µl
H <sub>2</sub> O	15.15µl
DNA(100-500ng/µl)	1µl

**Program 1**

94 °C 'de 4 dakika	} 35 döngü
94 °C 'de 1 dakika	
55 °C 'de 3 dakika	
72 °C 'de 1 dakika	
72 °C 'de 5 dakika	

**Program 2**

94 °C 'de 4 dakika	} 35 döngü
94 °C 'de 1 dakika	
50 °C 'de 3 dakika	
72 °C 'de 1 dakika	
72 °C 'de 5 dakika	

**Program 3**

94 °C 'de 4 dakika	} 35 döngü
94 °C 'de 1 dakika	
52 °C 'de 3 dakika	
72 °C 'de 1 dakika	
72 °C 'de 5 dakika	



#### **Program 4**

94 °C 'de 4 dakika	}	5 döngü
94 °C 'de 1 dakika		
57 °C 'de 1 dakika		
72 °C 'de 1 dakika		
94 °C 'de 1 dakika	}	5 döngü
55 °C 'de 1 dakika		
72 °C 'de 1 dakika		
94 °C 'de 1 dakika	}	20 döngü
52 °C 'de 1 dakika		
72 °C 'de 1 dakika		
72 °C 'de 5 dakika		

#### **Program 5**

94 °C 'de 4 dakika	}	5 döngü
94 °C 'de 1 dakika		
55 °C 'de 3 dakika		
72 °C 'de 1 dakika	}	5 döngü
94 °C 'de 1 dakika		
52 °C 'de 3 dakika		
72 °C 'de 1 dakika	}	20 döngü
94 °C 'de 1 dakika		
50 °C 'de 3 dakika		
72 °C 'de 1 dakika		
72 °C 'de 5 dakika		

Yukarıda sunulan içeriklerde hazırlanan PCR reaksiyonlarında Fermentas marka Taq DNA polimeraz kullanıldı. Belirtilen süre ve derecelerde PCR reaksiyonları yapıldı.

### **3.4.2. Kullanılan çözeltiler**

#### **10X TBE Tamponu**

Tris-baz ( $C_4H_{11}NO_3$ , Sigma)	216.8 gr.
Borik asit ( $H_3BO_3$ , Merck)	110 gr.
EDTA(Sigma)	14.8 gr

Hacim distile su ile 2 litreye tamamlandı. Eklenen tuzlar eriyinceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Otoklavda sterilize edildi. Oda ısısında saklandı. Direk 10X olarak ya da 1X, 0.5X şeklinde sulandırılarak kullanıldı.

**%9'luk (%0 denatüre edici) poliakrilamid çözeltisi**

100 ml 10X TBE tamponu

225 ml Acrilamid: bisakrilamid (37.5:1 %40 (w/v), ultra saf)

(Amresco)

675 ml distile su

Kimyasallar karıştırıldı ve ışık geçirmeyen koyu renkli bir şişede +4°C'de saklandı.

**%9'luk (%100 denatüre edici) poliakrilamid çözeltisi**

100 ml 10X TBE tamponu

225 ml Acrilamid: bisakrilamid (37.5:1 %40 (w/v), ultra saf)

(Amresco)

420 gr. Üre (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O, Amresco)

400 ml ultra saf formamid (Amresco)

Hacim 1 litreye tamamlandı. Üre eriyinceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Işık geçirmeyen koyu renkli bir şişede +4°C'de saklandı.

**Yükleme tamponu**

%80 gliserol (Sigma)

%0.09 bromofenol mavisi (bromophenol blue) (Sigma)

%0.09 ksilen siyanol (xylene cyanol) (Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde kullanma solüsyonu hazırlandı. +4°C'de saklandı.

**Stok çözeltilerden katmanlı (grandient) jelin hazırlanışı**

15 ml jel çözeltisi hazırlamak için %0 ve %100 denatüre edici stok çözeltilerden alınması gereken miktarlar aşağıdaki Çizelgede (Çizelge 3.6) ml cinsinden verilmiştir.

**Çizelge 3.6:** Stok çözeltilerden kullanım çözeltilerinin hazırlamasında kullanılan oran ve miktarlar

	Hazırlanan yüzdeler									
	%1 0	%1 5	%2 0	%2 5	%3 0	%5 0	%5 5	%6 0	%6 5	%7 0
%0'luk stoktan alınması gereken miktar (ml)	13.5	12.7 5	12	11.2 5	10.5	7.5	6.75	6	5.25	4.5
%100'lük stoktan alınması gereken miktar (ml)	1.5	2.25	3	3.75	4.5	7.5	8.25	9	9.75	10.5

Hazırlanan jel solüsyonlarına 10 µl TEMED'den (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>) ve %10'luk APS'den (amonyum peroksidisulfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 100 µl eklendi. BioRad Dcode sistemlerinin 475 model katman yapıcısı (gradient maker) kullanma talimatına uygun olarak kullanılarak DGGE jelleri hazırlandı. Hazırlanan jellerde 25 µl örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. Tank tamponu olarak 0.5X TBE kullanıldı. Örnekler 16 saat 58°C'de sabit 40 volt'da yürütüldü. Jeller etidyum bromid ile boyanarak mor ötesi (ultravirole, UV) ışıkta görüntülendi.

### 3.5. DNA Dizi Analizi

DGGE analizinde ya da PTT analizinde farklı bant kayması gösteren örnekler direk dizi analizine alındı. PCR reaksiyonu ürünleri kalıp DNA olarak kullanıldı. Purifikasyon BioRad Quantum Prep® PCR Kleen Spin Column , ya da Roche High Pure PCR Product Purification Kit üretici firmanın talimatlarına göre kullanılarak gerçekleştirildi. Dizi analizi reaksiyonları PE 9700 marka Thermal Cycler kullanılarak aşağıdaki programa göre gerçekleştirildi. Reaksiyon içeriği aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Primer (1pmol/µl)	3µl
Kalıp DNA	3µl
BigDye V3.1	4µl
H <sub>2</sub> O	10µl

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

Elde edilen ürünler Edge Biosystems Edge Gel Filtration Cartridge (ver.11) ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak temizlendi. Ya da manuel olarak purifikasyon gerçekleştirildi. Manuel purifikasyon aşağıdaki gibi yapıldı:

Örneklerin tümü (20 µl örnek) 3µl 3M Sodyum asetat (pH=4.6'ya ayarlanmış ve filtre ile sterilize edilmiş), 62.5 µl %95 Etanol, 14.5µl Steril distile su ile karıştırıldı. Vorteks ile karıştırılıp oda ısısında 15 dakika bekletildi. 20 dakika maksimum devirde santrifuj edildi. 250µl %70 Etanol eklendi. 5 dakika maksimum devirde santrifuj edildi. Örnekler 20µl TSR (template suppression reagent) eklendi. ABI 310 (Applied Biosystems) cihazına örnekler yüklenmeden önce 96°C'de 4 dakika denatüre edilip buzda soğutuldu. Örnekler ABI310 cihazında yürütüldü ve elde edilen diziler analiz edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya 26 ailesel meme ve/veya over kanseri hastası, 6 bilateral meme kanseri hastası, üç hem meme hem over kanseri hastası, 32 erken yaş grubu meme kanseri hastası, beş erken yaş grubu over kanseri hastası ve üç erkek meme kanseri hastası olmak üzere 75 hasta dahil edildi (Çizelge 4.1-4.4). Ailesel meme/over kanseri grubuna dahil edilen hastaların 18'inin birinci ya da ikinci derece akrabaları arasında sadece bir bireyde meme ya da over kanseri bulunmakta idi. Daha fazla birey içeren ailelerin soyağaçları çıkarıldı (Şekil 4.1-4.8). Ailesel meme/over kanseri grubunu oluşturan hastalardan beşinin kendisinde ve birinci ya da ikinci derece akrabalarından iki kişide meme kanseri tanısı (hasta no: 1-3, 7, 19), birinin ise kendisinde (hasta no: 21) ve kendisi dışında iki kızkardeşinde over kanseri tanısı vardı. Yine aynı ailesel grup meme kanseri hastalarından birinin (hasta no: 12) halasında ve babasının annesinde meme kanseri tanısı varken, annesinde de over kanseri tanısı mevcuttur. Yine ailesel gruba dahil etmiş olduğumuz bir meme kanseri hastasının (hasta no:5) annesinde bilateral ve teyzesinde tek taraflı meme kanseri tanısı varken, iki halasında ve iki hala kızında da meme kanseri tanısı mevcuttur. Birinci ya da ikinci derece akrabalarından birinde meme ve over kanseri olmadığı için ailesel gruba dahil edilmeyen ancak erken yaş grubuna dahil edilen iki hastanın da aile hikayesi olduğu için soyağaçları çizildi. Bunlardan birisi olan 34 yaşında meme kanseri tanısı almış 49 no'lu hastanın kendisinden bir önceki kuşaktaki üç akrabasında da meme kanseri hikayesi vardı (Şekil 4.9). Diğer hastanın da kendisinde ve iki akrabasında meme kanseri tanısı vardı (Şekil 4.10).

**Çizelge 4.1: Ailesel meme /over kanseri grubu hastaları**

Hasta no	Kanser tipi	Tanı aldığı zamandaki yaş	Menarş yaşı	İlk gebelik yaşı	Doğum sayısı	Menapozal durum (pre/post-menapozal)	Menapoz yaşı	Sigara içme alışkanlığı	Ailede kanser hikayesi
1	Meme	40	17-18	20	2	Post	34	Yok	Soyacağı Şekil 4.1'de verildi
2	Meme	48	14	38	2	Post	45	Yok	Soyacağı Şekil 4.2'de verildi
3	Meme	58	12	15	2	Post	55	Yok	Soyacağı Şekil 4.3'te verildi
4	Meme	43	12	21	3	Pre	-	Günde 5-6 tane	Teyze meme kanseri (89 yaş)
5	Meme	52	Bilinmiyor	-	0	Post	Bilinmiyor	Yok	Soyacağı Şekil 4.4'te verildi
6	Meme	73	14	21	3	Post	50	Yok	Kızkardeşinin kızı meme kanseri (42 yaş)
7	Meme	57	Bilinmiyor	30	2	Post	Bilinmiyor	Yok	Soyacağı Şekil 4.5'te verildi
8	Meme	46	11	28	0	Post	44	Günde 1 paket	Anne meme kanseri
9	Meme	54	13	-	0	Post	Bilinmiyor	Yok	Kızkardeşi meme kanseri
10	Meme	44	13	18	4	Post	Bilinmiyor	Yok	Teyzesi meme kanseri

**Çizelge 4.1 devam: Ailesel meme /over kanseri grubu hastaları**

11	Meme	43	Bilinmi- yor	-	0	Pre	-	Yok	Kızkardeşi meme kanseri (45 yaş)
12	Meme	35	13	26	2	Pre	-	Günde yarım paket	Soyacağı Şekil 4.6'da verildi
13	Meme	51	13	-	0	Pre	-	Günde 1 paket	Kızkardeşi over kanseri (47 yaş)
14	Meme	51	Bilinmi- yor	23	3	Post	Bilinmiyor	Yok	Babasının annesi meme kanseri (60-70 yaş)
15	Meme	53	13	18	2	Post	Bilinmiyor	Yok	Teyzesi meme kanseri
16	Over	57	Bilinmi- yor	18	6	Post	Bilinmiyor	Yok	Kızkardeşi over kanseri (40 yaş)
17	Over	59	Bilinmi- yor	20	6	Post	45	Yok	Kızkardeşinin kızı over kanseri (40 yaş)
18	Meme	47	13-14	27	2	Pre	-	Yok	Kızkardeşi meme kanseri (43 yaş)
19	Meme	50	13	20	2	Pre	-	Yok	Soyacağı Şekil 4.7'de verildi

Çizelge 4.1 devam: Ailesel meme / over kanseri grubu hastaları

20	Over	45	13-14	19	2	Post	44	Günde 1 paket	Halası meme kanseri (45-46 yaş)
21	Over	50	12	20	4	Post	46	Yok	Soyacağı Şekil 4.8'de verildi
22	Over	47	13	18	5	Pre	-	Yok	Anne meme kanseri (45-50 yaş)
23	Meme	43	16	30	2	Pre	-	Yok	Kızkardeşi meme kanseri (47 yaş)
24	Bilateral meme	74 (bilateral)	11	18	3	Post	55	Yok	Kızkardeşi meme kanseri (50 yaş) Erkek kardeşi akciğer kanseri (42 yaş)
25	Meme	34	13	20	2	Pre	-	Günde 1 paket	Kızkardeşi meme kanseri (32 yaş)
26	Over	38	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Günde 10-15 tane	Annesi over kanseri (48 yaş)

**Çizelge 4.2 : Bilateral meme ya da hem meme hem de over kanseri olan hastalar grubu**

Hasta no	Kanser tipi	Tanı aldığı zamandaki yaş	Menarş yaşı	İlk gebelik yaşı	Doğum sayısı	Menapozal durum (pre/post-menapozal)	Menapoz yaşı	Sigara içme alışkanlığı	Ailede kanser hikayesi
27	Bilateral meme	65, 67	12	22	3	Post	57	Yok	Yok
28	Bilateral meme	75 (bilateral)	14	15	10	Post	44	Yok	Babası karaciğer kanseri (65 yaş)
29	Bilateral meme	42, 45	Bilinmiyor	-	0	Pre	-	Yok	Yok
30	Bilateral meme	70 (bilateral)	Bilinmiyor	34	3	Post	Bilinmiyor	Yok	Yok
31	Bilateral meme	36 (bilateral)	Bilinmiyor	31	2	Pre	-	Yok	Yok
32	Bilateral meme	29, 39	13	30	2	Pre	-	Yok	Yok
33	Meme ve over	52 yaş, over 54 yaş, meme	13	42	3	Post	54	Yok	Teyzesinin kızı gırtlak kanseri (35 yaş) Amcasının kızı gırtlak kanseri (35 yaş)



**Çizelge 4.2 devam :** Bilateral meme ya da hem meme hem de over kanseri olan hastalar grubu

Hasta no	Meme ve over	Bilinmiyor	Post	Menapoz	Menapoz yaşı	Bilinmiyor	Yok	Dayısının oğlu gırtlak kanseri Teyzesinde akciğer kanseri (75-80 yaş)
34	44 yaş, over 54 yaş, meme	Bilinmiyor	20	2	Post	Bilinmiyor	Yok	Dayısının oğlu gırtlak kanseri Teyzesinde akciğer kanseri (75-80 yaş)
35	47 yaş, meme 58 yaş, over	16	19	3	Post	44	Yok	Annesi karaciğer kanseri (44 yaş)

**Çizelge 4.3 :** Erken yaş grubu kadın hastalar

Hasta no	Kanser tipi	Tanı aldığı zamandaki yaş	Menarş yaşı	İlk gebelik yaşı	Doğum sayısı	Menapozal durum (pre/post-menapozal)	Menapoz yaşı	Sigara içme alışkanlığı	Ailede kanser hikayesi
36	Meme	40	13	20	1	Pre	-	Yok	Yok
37	Meme	34	12	29	2	Pre	-	Günde yarım paket	Anne mide kanseri (34 yaş), Anneanne akciğer kanseri (60-65 yaş) Amca mide kanseri (65 yaş)
38	Meme	35	Bilinmiyor	25	2	Pre	-	Yok	Yok

Çizelge 4.3 devam : Erken yaş grubu kadın hastalar

39	Meme	39	13	19	3	Pre	-	Yok	Babasının amcasının kızı meme kanser (40-45 yaş)
40	Meme	29	13	22	2	Pre	-	Günde yarım paket	Yok
41	Meme	40	12	21	3	Pre	-	Günde 3-4 tane	Yok
42	Meme	35	12	23	4	Pre	-	Yok	Yok
43	Meme	31	12	25	2	Pre	-	Yok	Yok
44	Meme	30	Bilinmiyor	20	1	Pre	-	Günde 15 tane	Yok
45	Meme	40	14	36	2	Pre	-	Yok	Dayısının oğlu akciğer kanseri
46	Meme	37	13	23	2	Pre	-	Yok	Yok
47	Meme	37	Bilinmiyor	-	-	Pre	-	Yok	Yok
48	Meme	38	13	23	2	Pre	41	Yok	Amcasının oğlu beyin tümörü
49	Meme	34	12-13	30	1	Pre	-	Yok	Soyağacı Şekil 4.9'da verildi
50	Meme	40	Bilinmiyor	18	3	Pre	-	Yok	Yok
51	Meme	37	12-13	27	2	Pre	-	Yok	Yok
52	Meme	37	13	25	2	Pre	-	Günde 10 tane	Yok

**Çizelge 4.3 devam : Erken yaş grubu kadın hastalar**

53	Meme	30	Bilinmi- yor	20	2	Pre	-	Yok	Halası akciğer kanseri (50 yaş) Dayısı akciğer kanseri (68 yaş)
54	Meme	40	12	20	1	Pre	-	Yok	Yok
55	Meme	40	13	25	2	Pre	-	Günde yarım paket	Kızı nöroblastoma (1 yaş) Dayısı akciğer kanseri (47 yaş)
56	Meme	34	13-14	16	2	Pre	-	Günde yarım paket	Yok
57	Meme	40	13	20	2	Pre	-	Yok	Erkek kardeşinde lenf kanseri (20 yaş)
58	Meme	38	18	24	3	Pre	-	Yok	Annesinde cilt kanseri (45 yaş)
59	Meme	27	13	20	2	Pre	-	Günde 5 tane	Yok
60	Meme	36	Bilinmi- yor	31	1	Pre	-	Günde 1 paket	Soyacağı Şekil 4.10'da verildi

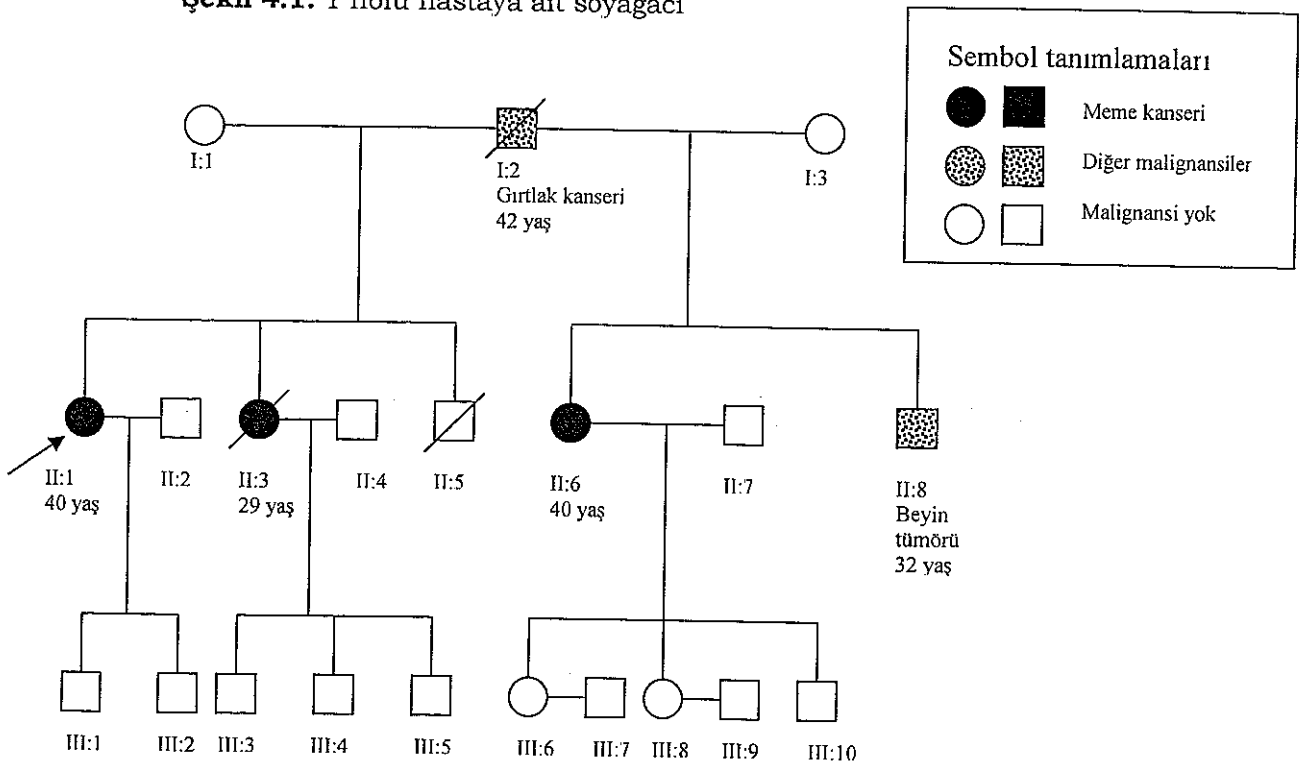
**Çizelge 4.3 devam : Erken yaş grubu kadın hastalar**

61	Meme	29	Bilinmi- yor	20	2	Pre	-	Yok	Yok
62	Meme	29	Bilinmi- yor	-	-	Pre	-	Yok	Yok
63	Meme	40	12	24	3	Pre	-	Yok	Yok
64	Meme	38	13	26	2	Pre	-	Yok	Yok
65	Meme	27	12-13	21	2	Pre	-	Yok	Yok
66	Meme	30	12	21	3	Pre	-	Yok	Yok
67	Meme	39	13	32	1	Pre	-	Günde 1 tane	Amcası bağırsak kanseri (65 yaş)
68	Over	40	Bilinmi- yor	21	3	Pre	-	Yok	Yok
69	Over	30	Bilinmi- yor	23	1	Pre	-	Yok	Yok
70	Over	39	14	19	1	Pre	-	Günde 1 paket	Halasının kızı meme kanseri (43 yaş) Babası tükrük bezi kanseri (60 yaş) Dayısı akciğer kanseri (88 yaş)
71	Over	39	13	15	2	Pre	-	Günde 1 paket	Yok
72	Over	38	13-14	14	4	Pre	-	Yok	Yok

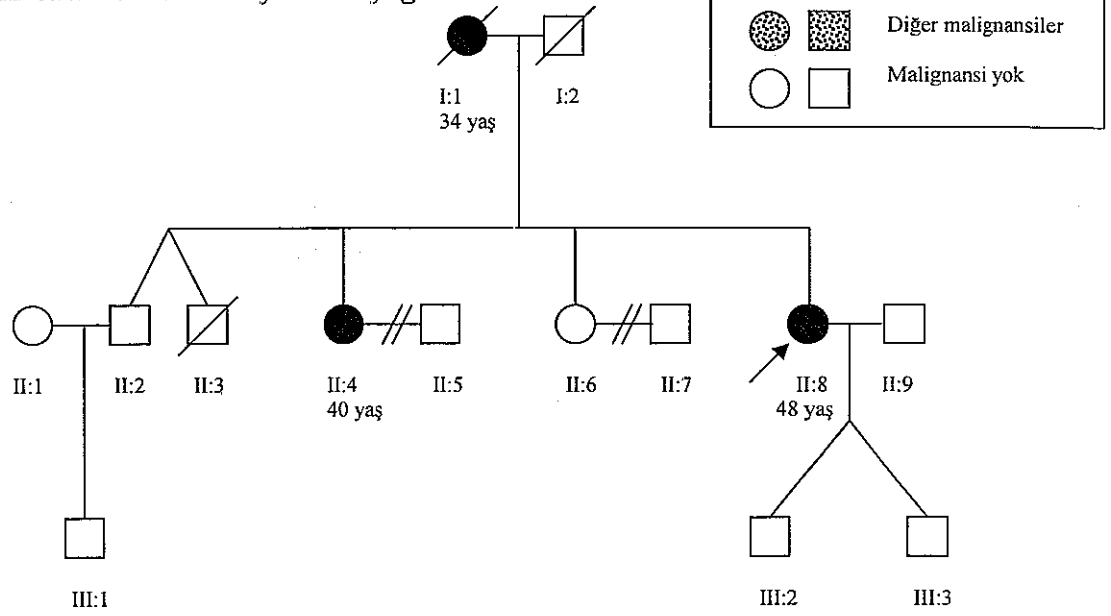
**Çizelge 4.4:** Erkek meme kanseri grubu hastalar

Hasta no	Tanı aldığı zamandaki yaş	Sigara içme alışkanlığı	Ailede kanser hikayesi
73	70	Yok	Yok
74	35	Günde 1-1.5 paket	Dedesi ve Amcası kanserden ölmüş. Hangi organla ilgili olduğu bilinmiyor.
75	65	Yok	Yok

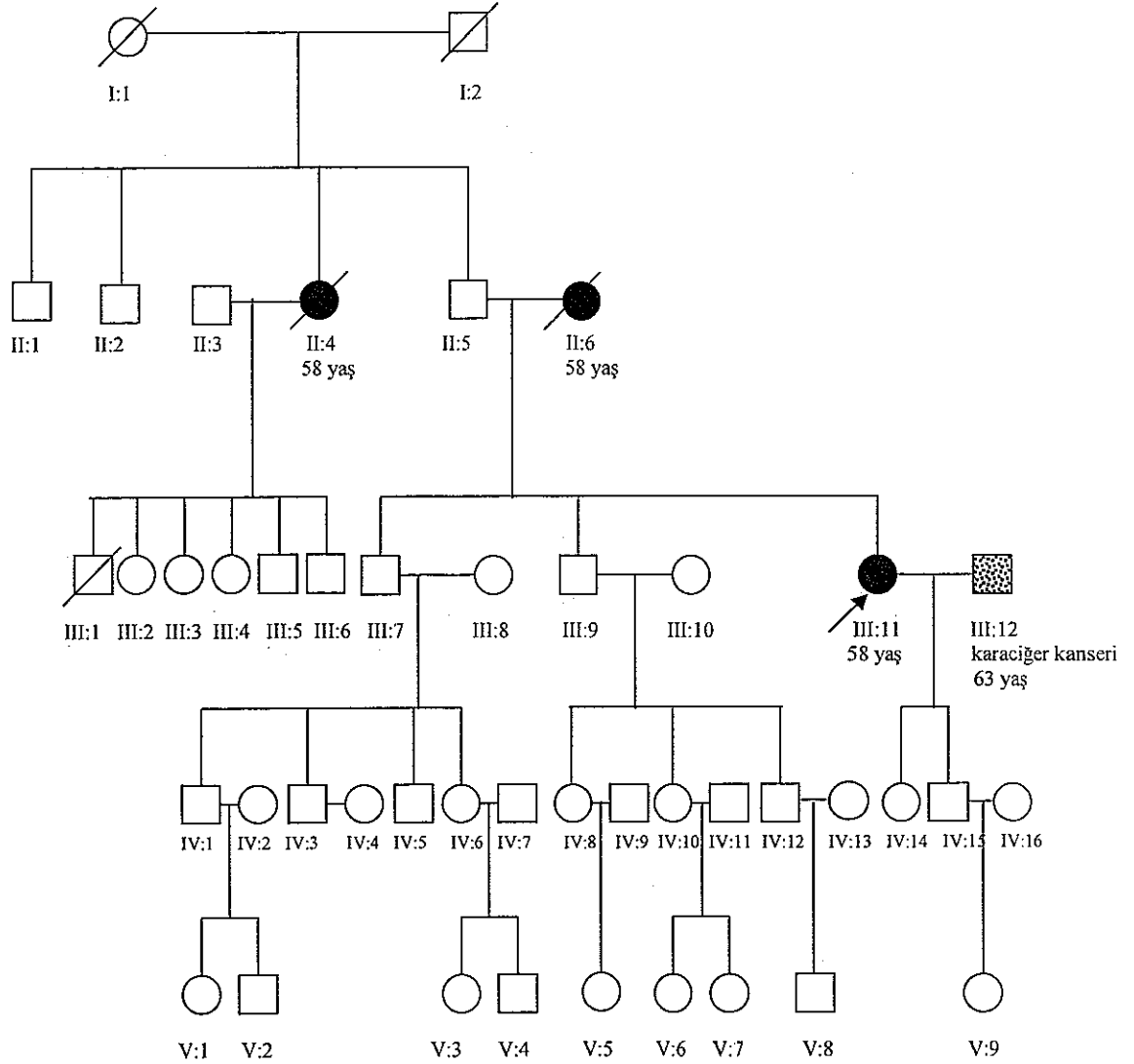
**Şekil 4.1:** 1 nolu hastaya ait soyağacı



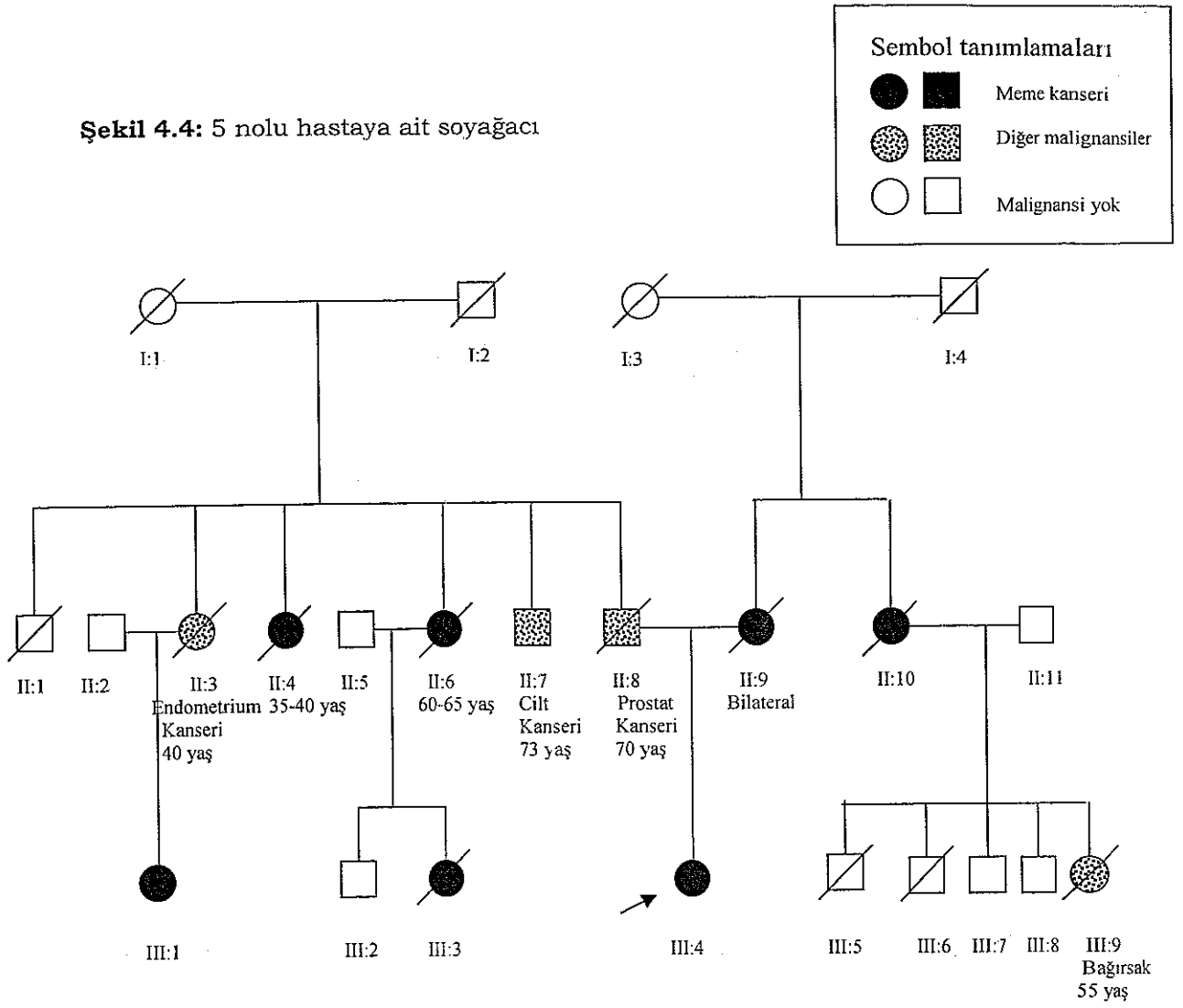
Şekil 4.2: 2 nolu hastaya ait soyağacı



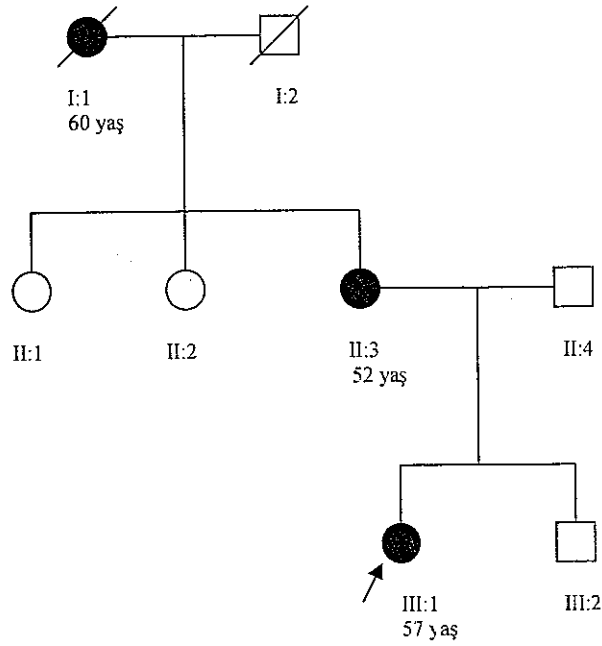
Şekil 4.3: 3 nolu hastaya ait soyağacı



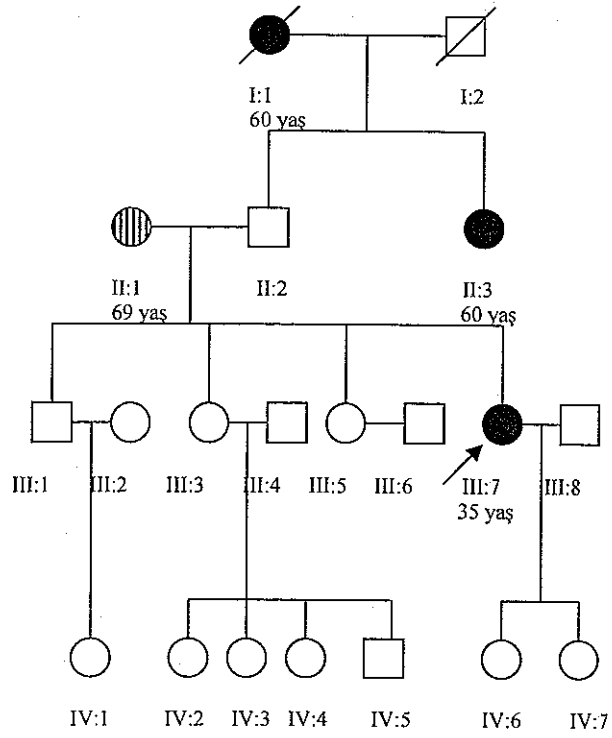
Şekil 4.4: 5 nolu hastaya ait soyağacı



Şekil 4.5: 7 nolu hastaya ait soyağacı



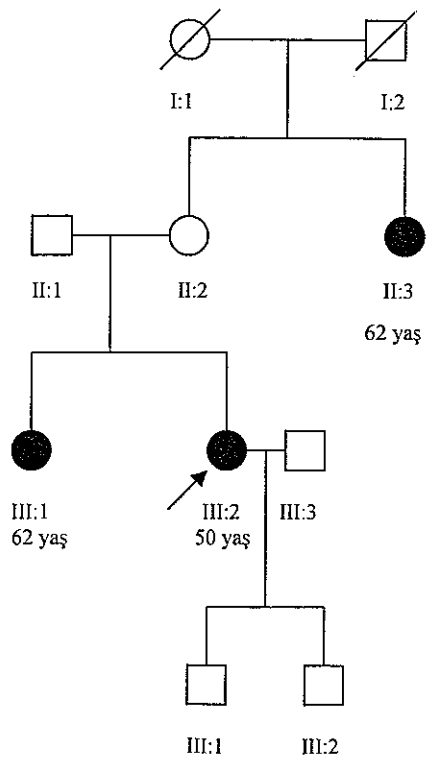
Şekil 4.6: 12 nolu hastaya ait soyağacı



Sembol tanımlamaları

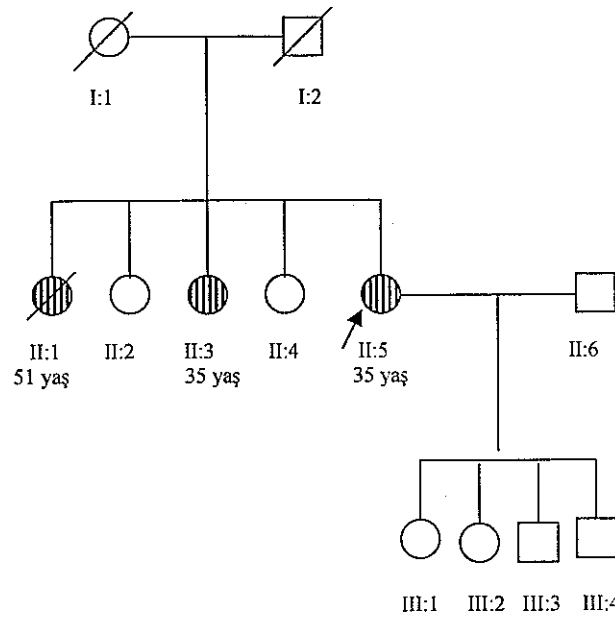
- ■ Meme kanseri
- ◐ Over kanseri
- □ Malignansi yok

Şekil 4.7: 19 nolu hastaya ait soyağacı



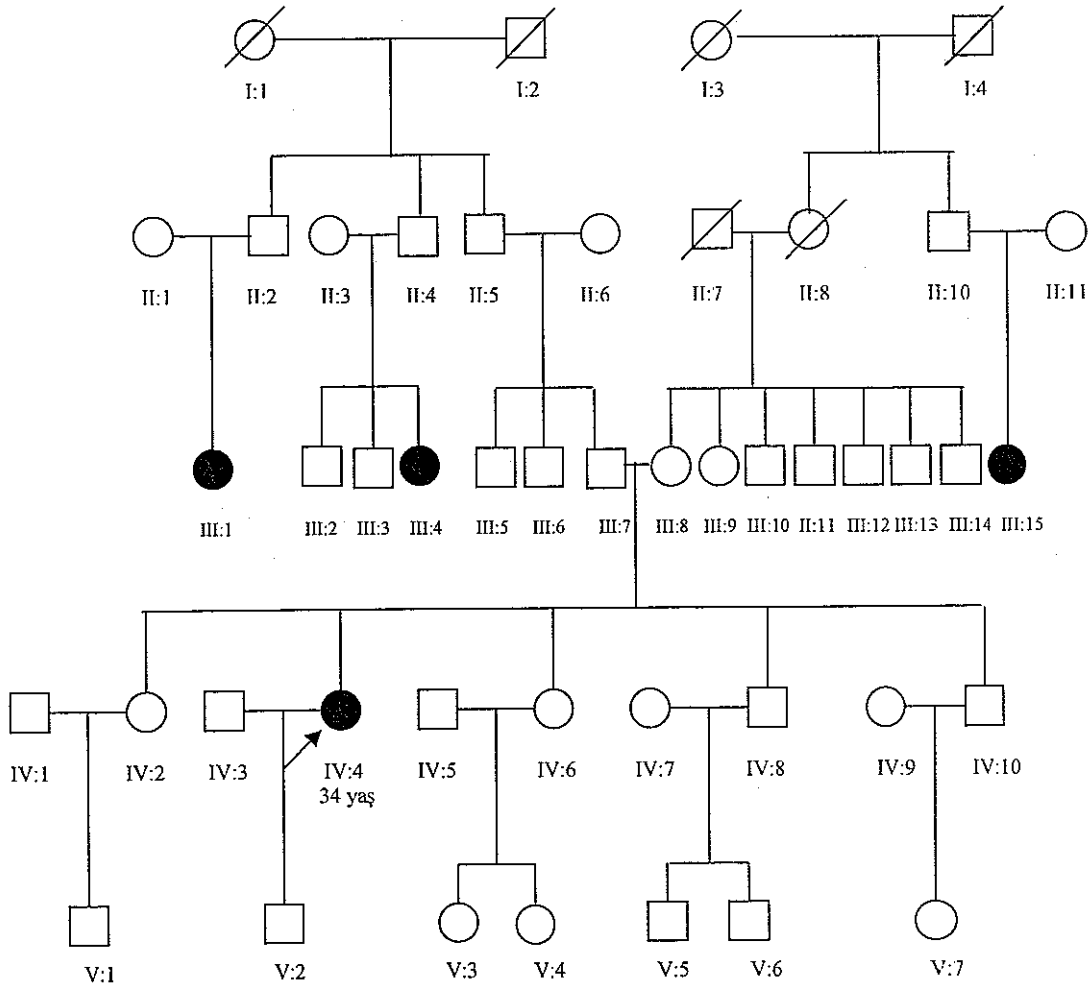


**Şekil 4.8:** 21 nolu hastaya ait soyağacı

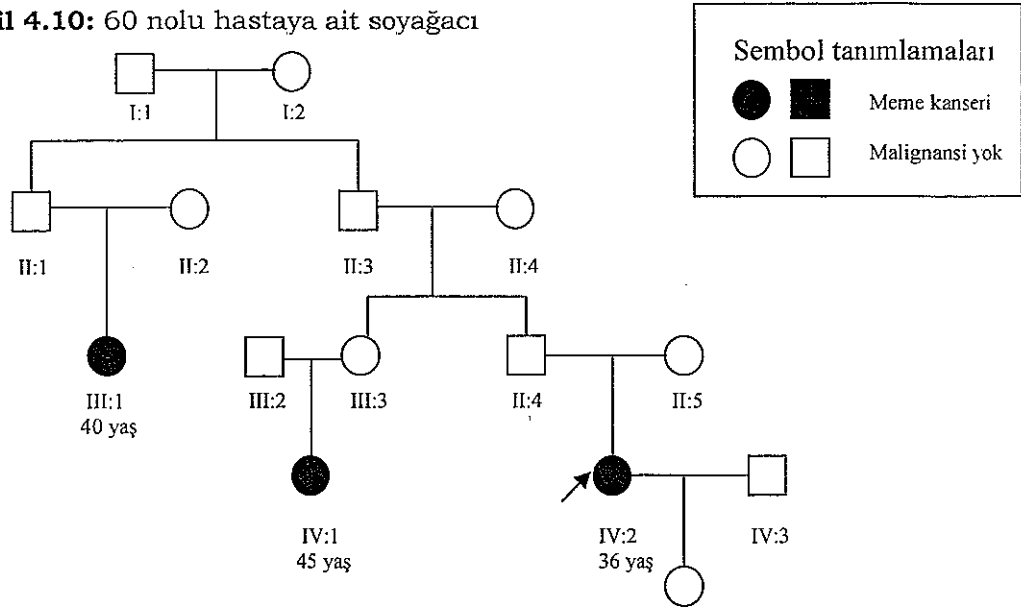


Sembol tanımlamaları		
●	■	Meme kanseri
◐	◑	Over kanseri
○	□	Malignansi yok

**Şekil 4.9:** 49 nolu hastaya ait soyağacı



Şekil 4.10: 60 nolu hastaya ait soyağacı



Çalışmada ailesel meme/over grubu hastalarından 24'ünde *BRCA1* geni ekzon 11 de PTT yöntemi (Şekil 4.11) ile, kalan hastalar ise DGGE yöntemi (Şekil 4.12) ile tarandı. *BRCA1* geninin 11'inci ekzonu dışındaki tüm kodlayıcı dizileri ve *BRCA2* geninin tüm kodlayıcı dizileri multipleks DGGE yöntemi ile tarandı. Yapılan PTT analizleri sonucunda *BRCA1* geni 11'inci ekzonda daha önceden tanımlanmış bir mutasyon olan R1203X değişimi (Şekil 4.17) 38 yaşında over kanseri almış ve ailesinde over kanseri hikayesi olan 26 no'lu hastada bulundu. Aynı ekzon için yapılan DGGE çalışmasında ise iki yeni yanlış anlamlı mutasyon olan H816P (Şekil 4.16) ve H513L (Şekil 4.15) yanlış anlamlı mutasyonları sırasıyla bir bilateral (hasta no:30) ve bir erken yaş (hasta no:67) meme kanseri hastasında saptandı. Halasında meme kanseri (45-46 yaş) ve kendisinde over kanseri (45 yaş) olan bir olgumuzda (hasta no:20) yeni bir çerçeve kayması mutasyonu olan *BRCA1* geninin 17'inci ekzonunda iki bazlık bir delesyon nedeniyle L1679fsX1682 mutasyonunun (Şekil 4.22) varlığı gösterildi. Ailesel gruptan 20 no'lu hastada *BRCA1* geni 11'inci intronun ilk nükleotidinde meydana gelen G-A değişimi ile oluşan "splice" bölge mutasyonu (Şekil 4.18) saptandı. Bu mutasyonlara ek olarak *BRCA1* geninde, erken yaş meme kanseri hastalarından 64 no'lu hastada 15'inci ekzondaki D1546N mutasyonu (Şekil 4.20) ve bir diğer erken yaş grubu hastada 16'inci ekzonda yeni bir mutasyon olan S1577Y değişimi (Şekil 4.21) bulundu. Ayrıca protein düzeyinde olan etkisi bilinmeyen ve *BRCA1*'in intronik bölgelerinde yer alan IVS6.602T>C (Şekil 4.13) ve IVS9.1288T>C (Şekil 4.14) mutasyonları sırasıyla bir erken yaş over kanserli (hasta no:68) ve bir erken yaş meme kanserli (hasta no:38) hastada gözlemlendi. Ek olarak, 6 no'lu olgumuzda, bilinen bir polimorfizm olan S1436S polimorfizmi (Şekil 4.19) tanımlandı (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5: BRCA1 geninde saptanan mutasyonların hastalara göre dağılımı ve özellikleri**

Hasta no	Endikasyon (yaş)	Yöntem	Ekzon	Dizi değişimi (cDNA dizisine göre)	Protein düzeyinde tahmini etkisi	Mutasyon tipi	BIC* (Breast cancer information core) kaydı
67	Erken yaş meme kanseri (39)	DGGE- Dizi analizi	11	c.1657 A-T	H513L	Yanış anlamlı (missense)	Yeni
30	Bilateral meme kanseri (70)	DGGE- Dizi analizi	11	c.2566 A-C	H816P	Yanış anlamlı (missense)	Yeni
26	Ailesel over kanseri (38)	PTT - Dizi analizi	11	c.3726C-T	R1203X	Anlamsız (nonsense)	Önceden tanımlanmış
68	Erken yaş over kanseri (40)	DGGE- Dizi analizi	IVS6	IVS6.602 T-C	Bilinmiyor	İntron bölgesinde tek baz değişimi	Yeni
38	Erken yaş meme kanseri (35)	DGGE- Dizi analizi	IVS9	IVS9.1288T-C	Bilinmiyor	İntron bölgesinde tek baz değişimi	Yeni
12	Meme kanseri(35) Ailesel meme/over	DGGE- Dizi analizi	IVS11	IVS11.1 G-A	Splice bölge mutasyonu	İntron bölgesinde tek baz değişimi	Önceden tanımlanmış
6	Ailesel meme kanseri (73)	DGGE- Dizi analizi	13	c.4427 T-C	S1436S	Polimorfizm	Önceden tanımlanmış

**Çizelge 4.5 (devam): BRCA1 geninde saptanan mutasyonların hastalara göre dağılımı ve özellikleri**

64	Erken yaş meme kanseri (38)	DGGE-Dizi analizi	15	c.4755 G-A	D1546N	Yanış anlamlı (missense)	Önceden tanımlanmış		
60	Erken yaş meme kanseri (36) Ailesel meme kanseri	DGGE-Dizi analizi	16	c.4849 C-A	S1577Y	Yanış anlamlı (missense)	Yeni		
20	Ailesel meme/over (45)	DGGE-Dizi analizi	17	c.5154delCT	L1679fsX1682	Çerçeve kayması	Yeni		

\*BIC internet adresi: <http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic>

75 hastada DGGE ile *BRCA2* genin tüm kodlayıcı ekzonlarında mutasyon taranması sonucunda, 10'uncu ekzonda erken sonlanmaya neden olan iki çerçeve kayması mutasyonu bulundu. Bunlardan birisi, 70 yaşında bilateral meme kanseri tanısı almış 30 no'lu olgumuzda dört bazlık bir delesyon nedeniyle oluşan K434fsX458 mutasyonu (Şekil 4.28) idi. Bu mutasyon daha önce başka hastalarda tanımlanmış bir mutasyondur. İkincisi ise, 34 yaşında meme kanseri tanısı almış olan bir erken yaş grubu meme kanseri hastasında tek baz insersiyonu nedeniyle oluşmuş olan V465fsX467 mutasyonu (Şekil 4.29) olarak ilk olarak bizim olgumuzda tanımlandı. Toplam 6 hastada *BRCA2* genine ait yanlış anlamlı mutasyon saptandı. Ailesel meme kanseri grubu hastalarından biri olan 2 no'lu hastada genin 3'üncü ekzonunda bulunan ve önceden tanımlanmış olan Y42C mutasyonu (Şekil 4.24) gözlemlendi. Ailesel over kanseri grubu hastalarından 17 no'lu hastada gösterilmiş olan G258P mutasyonu (Şekil 4.25), erken yaş meme kanseri hastalarından 52 no'lu hastada saptanmış olan S326R mutasyonu (Şekil 4.26), ve ailesel over kanserli olgularımızdan biri olan 21 no'lu hastada bulunmuş olan E2903K mutasyonu (Şekil 4.35) ilk olarak bu çalışmada bulundu. İki farklı erken yaş meme kanseri hastasında (hasta no: 44, 51) saptanmış olduğumuz S384F mutasyonu (Şekil 4.27) ise önceden tanımlanmış bir mutasyondur. Yine ailesel gruptan bir meme kanseri olgumuzda (hasta no:12) önceden bilinen bir mutasyon olan IVS11.12 T-A dönüşümünün (Şekil 4.33) varlığı gösterildi.

Bu mutasyonların yanında protein düzeyinde etkisi olmayan polimorfizmler de bulundu. Bunlardan c.255A-G değişimi nedeniyle oluşan P9P mutasyonu (Şekil 4.23) 1 hastada, c.2457 T-C değişimi (Şekil 4.31) ile oluşan H743H polimorfizmi üç hastada, c.6741 C-G polimorfizmi (Şekil 4.32) bir hastada, c.7470 A-G sonucu oluşan S2414S polimorfizmi (Şekil 4.34) 1 hastada, ve c.1803 T-C dönüşümüyle oluşan T525T polimorfizmi de (Şekil 4.30) 1 hastada gösterildi. Bu polimorfizmlerden P9P ve T525T polimorfizmleri ilk olarak bu çalışmada gösterilmiş, diğerleri ise önceden tanımlanmış olan değişimlerdir (Çizelge 4.6).

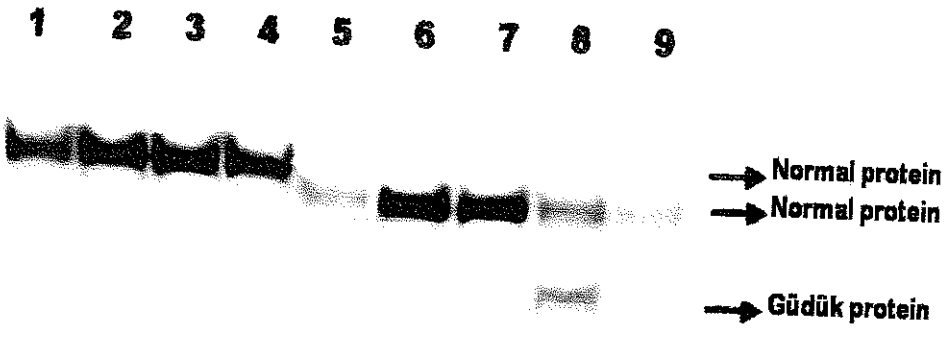
Çizelge 4.6: BRCA2 geninde saptanan mutasyonların hastalara göre dağılımı ve özellikleri

Hasta no	Endikasyon (yaş)	Saptama yöntemi	Ekzon	Dizi değişimi (cDNA dizisine göre)	Protein düzeyinde tahmini etkisi	Mutasyon tipi	BIC* (Breast cancer information core) kaydı
46	Erken yaş meme kanseri (37)	DGGE-Dizi analizi	2	c.255A-G	P9P	Polimorfizm	Yeni
2	Ailesel meme kanseri (48)	DGGE-Dizi analizi	3	c.353A-G	Y42C	Yanış anlamlı (missense)	Önceden tanımlanmış
17	Ailesel over kanseri (59)	DGGE-Dizi analizi	9	c.1001A-C	G258P	Yanış anlamlı (missense)	Yeni
52	Erken yaş meme kanseri (37)	DGGE-Dizi analizi	10	c.1204 A-C	S326R	Yanış anlamlı (missense)	Yeni
44	Erken yaş meme kanseri (30)	DGGE-Dizi analizi	10	c.1379C-T	S384F	Yanış anlamlı (missense)	Önceden tanımlanmış
51	Erken yaş meme kanseri (40)	DGGE-Dizi analizi	10	c.1379C-T	S384F	Yanış anlamlı (missense)	Önceden tanımlanmış
30	Bilateral meme kanseri (70)	DGGE-Dizi analizi	10	c.1529 del AAAG	K434fsX458	Çerçeve kayması	Önceden tanımlanmış
49	Erken yaş meme kanseri (34)	DGGE-Dizi analizi	10	c.1621 insT	V465fsX467	Çerçeve kayması	Yeni
45	Erken yaş meme kanseri (40)	DGGE-Dizi analizi	10	c.1803 T-C	T525T	Polimorfizm	Yeni

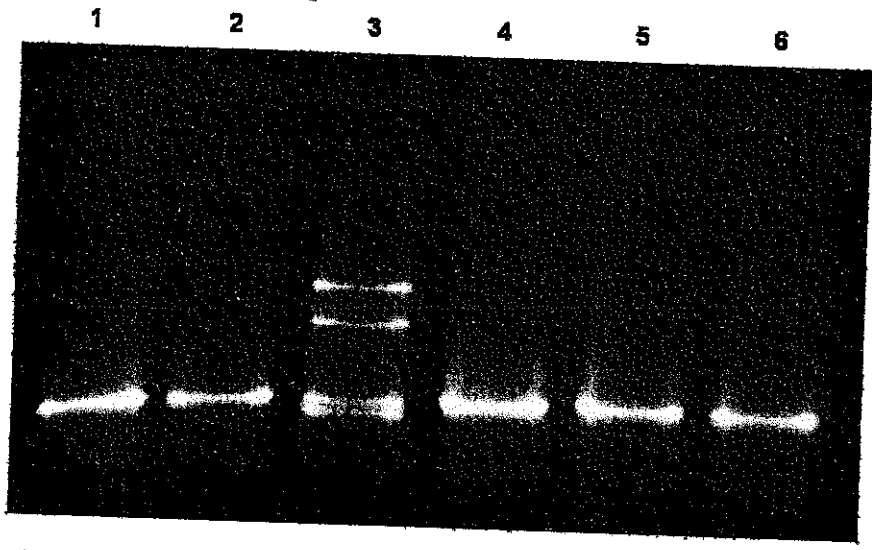
**Çizelge 4.6 devam: BRCA2 geninde saptanan mutasyonların hastalara göre dağılımı ve özellikleri**

63	Erken yaş meme kanseri (40)								
39	Erken yaş meme kanseri (39)	DGGE-Dizi analizi	11	c. 2457T-C	H743H	Polimorfizm	Önceden tanımlanmış		
45	Erken yaş meme kanseri (40)								
21	Ailesel meme kanseri (50)	DGGE-Dizi analizi	11	c.6741 C-G	V2171V	Polimorfizm	Önceden tanımlanmış		
12	Meme kanseri (35) Ailesel meme/over kanseri	DGGE-Dizi analizi	IVS11	IVS11.12 T-A	?	İntron bölgesinde tek baz değişimi	Önceden tanımlanmış		
3	Ailesel meme kanseri (58)	DGGE-Dizi analizi	14	c.7470 A-G	S2414S	Polimorfizm	Önceden tanımlanmış		
21	Ailesel meme kanseri (50)	DGGE-Dizi analizi	21	c.8935 G-A	E2903K	Yanlış anlamalı (missense)	Yeni		

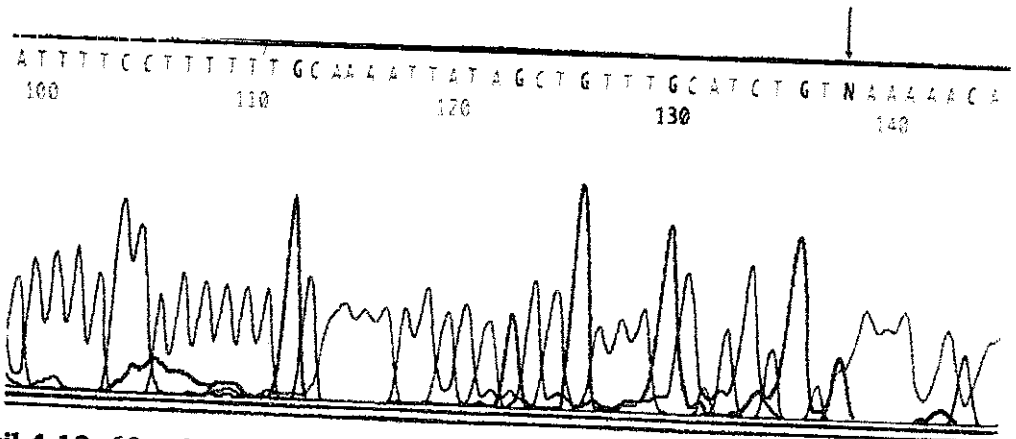
\*BIC internet adresi: <http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic>



**Şekil 4.11:** *BRCA1* geni ekzon 11 için hazırlanmış PTT jel örneği. Kuyular 1-4: ekzon 11'in birinci bölgesi (normal proteinler); 5-7,9: ekzon 11'in ikinci bölgesi (normal proteinler); 8: ekzon 11'in ikinci bölgesi erken sonlanmış protein.



**Şekil 4.12:** *BRCA1* genine ait DGGE jel örneği. Kuyular: 1-2,4-6: Normal örnekler ; 3 : Mutant örnek

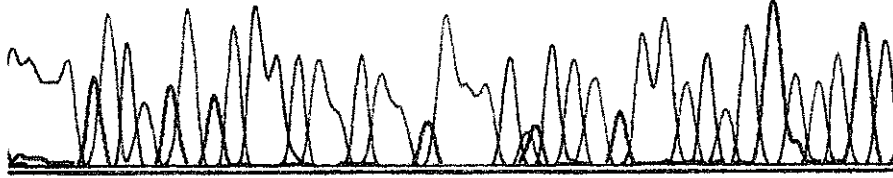


**Şekil 4.13:** 68 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni intron 6'da saptanan IVS6.602 T-C mutasyonu

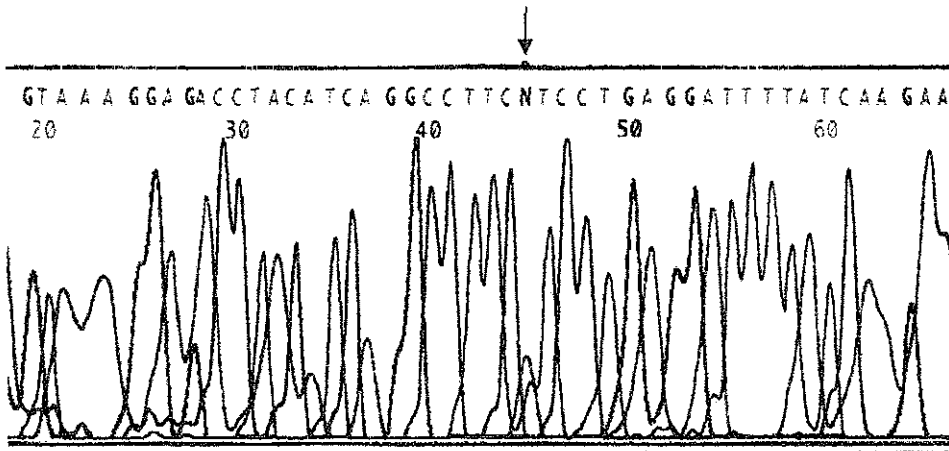


↓

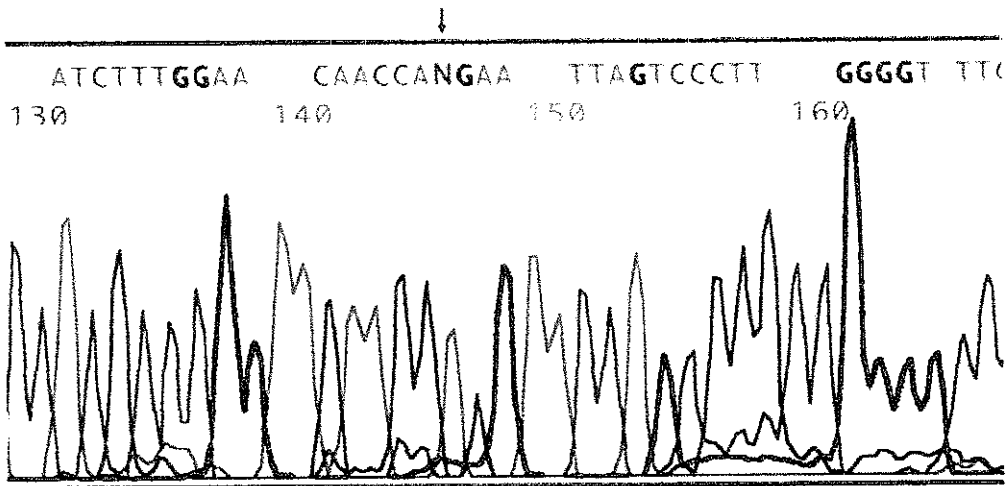
AAAGACAGAGTCCCTAATAAGAAA C NCTAGTTACATGTATGC  
 100 110 120 130



**Şekil 4.14:** 38 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni intron 9'da saptanan IVS9.1288T-C mutasyonu

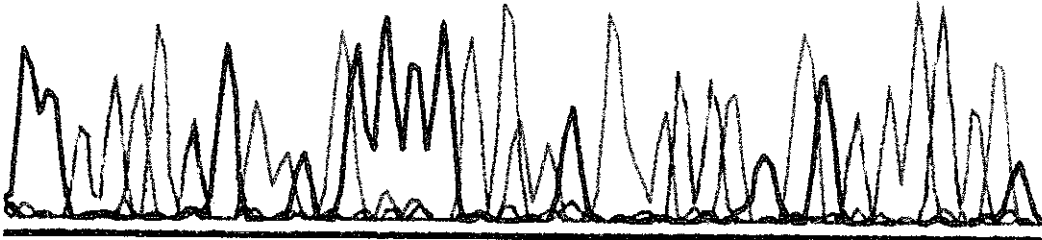


**Şekil 4.15:** 67 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni ekzon 11'de saptanan c.1657 A-T mutasyonu



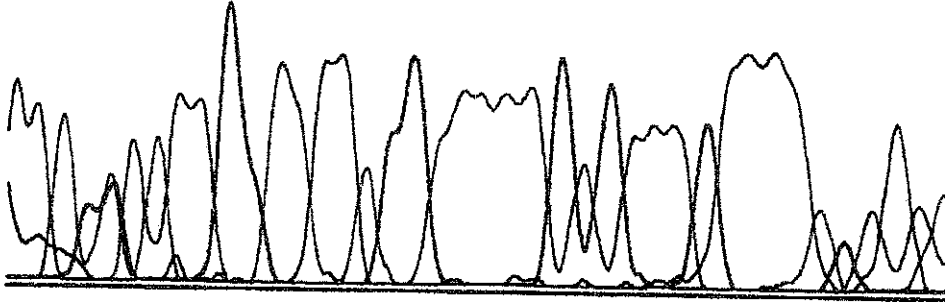
**Şekil 4.16:** 30 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni ekzon 11'de saptanan c.2566 A-C mutasyonu

↓  
GGTT C N GAAG AGGG GCC C AGCAAATTA G AGI CCT CAG  
30 40 50 60



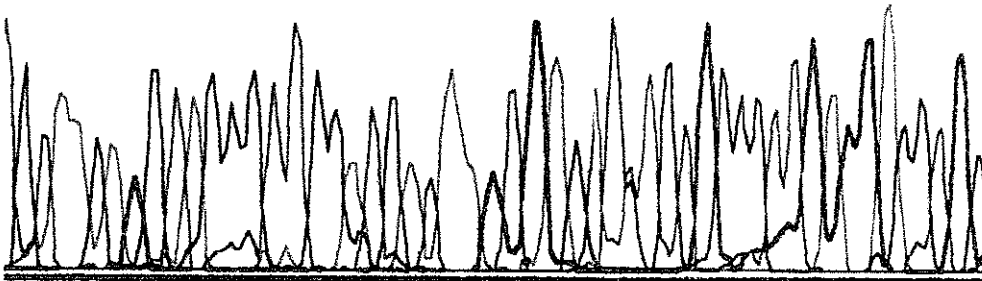
Şekil 4.17: 26 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni ekzon 11'de saptanan c.3726C>T mutasyonu

↓  
TTAGNTATTGGAAACCAGGTTTTTGTGTTTGCCCCAGTCYA  
40 150 160 170



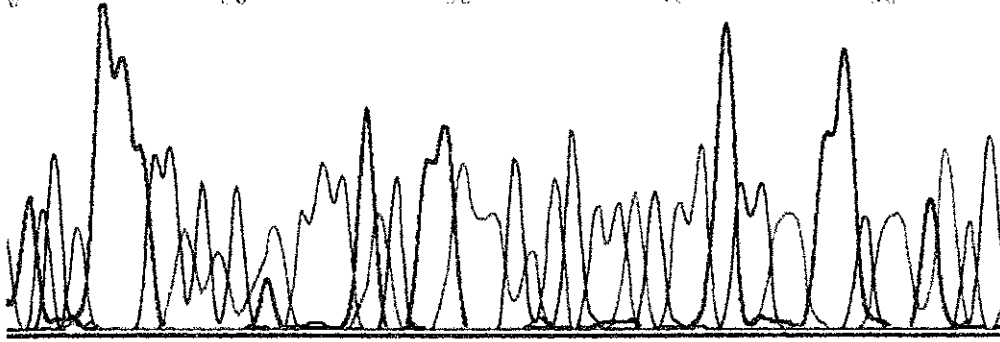
Şekil 4.18: 12 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni intron 11'de saptanan IVS11.1 G-A mutasyonu

↓  
CTAACAGCT ACCCTTCCAT CATAAGTGAC TCNTCTGCC TTGAGGACCT GCC  
90 100 110 120 130



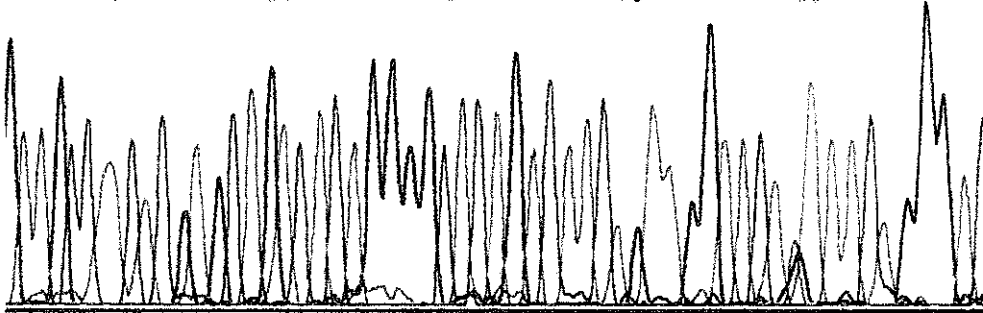
Şkil 4.19: 6 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni ekzon 13'de saptanan c.4427 T-C mutasyonu

↓  
G C T G G C C C A C N A T T T G C G G A A C A T C T T A C T T T G C C A A G G C A A G A T C  
0 20 30 40 50



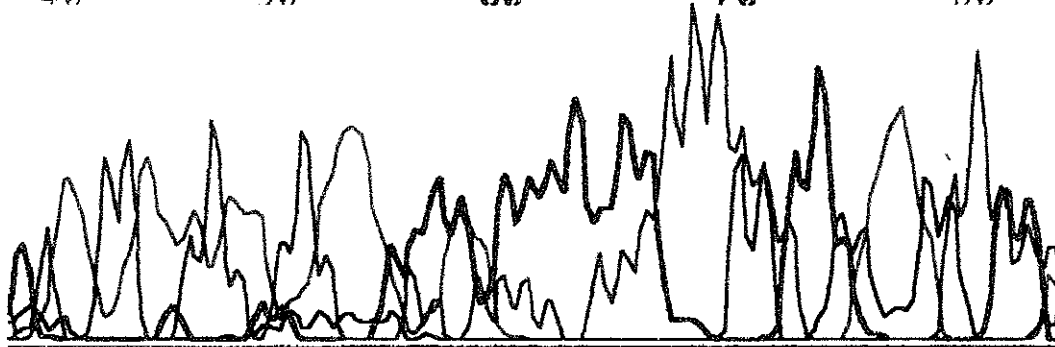
Şekil 4.20: 64 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni ekzon 15'de saptanan c.4755 G-A mutasyonu

↓  
T T G C C A C C C G A G G T G A C T C G G G G C C T C G T C T C A G A A G G A T C A N A T T C A G G G T C  
40 50 60 70 80



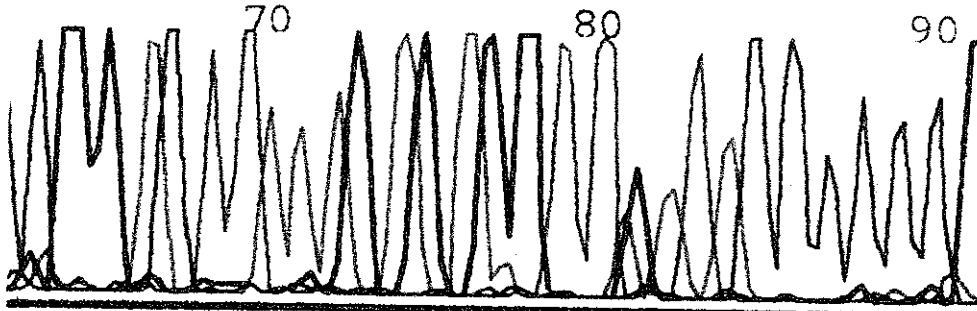
Şekil 4.21: 60 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni ekzon 16'da saptanan c.4849 C-A mutasyonu

↓  
G T A A T T A A N T A A T T N A G N G N N G G G G N G N T T T N N G G N C A A C N T N N T  
40 50 60 70 80



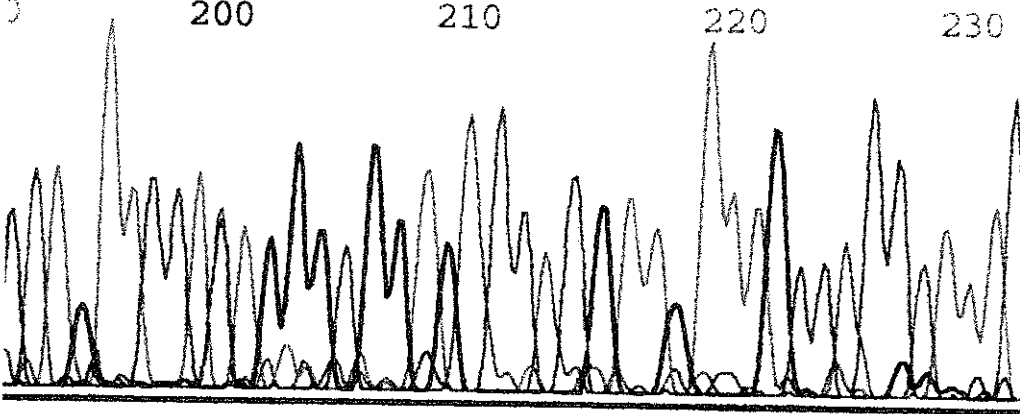
Şekil 4.22: 20 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA1* geni ekzon 17'de saptanan c.5154delCT mutasyonu

T G G A T C C A A A G A G A G G C C G A C A T T T T T T G



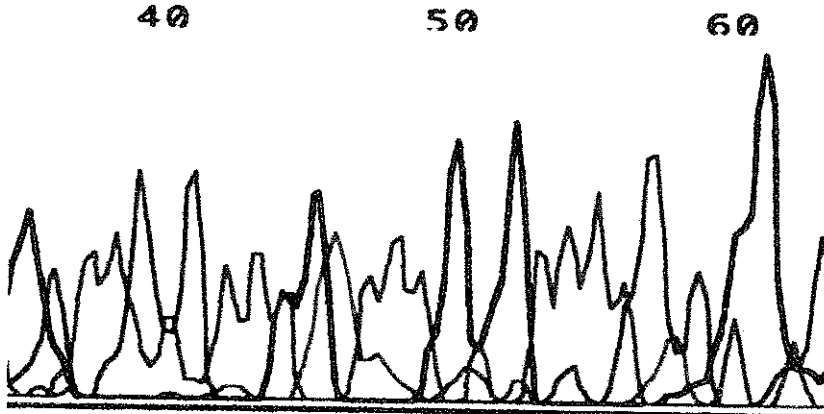
Şekil 4.23: 46 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 2'de saptanan c.255A-G mutasyonu

T C A G A A P T A N A G G G T G G A G C T T C T G A A G A A A G T T C T T C A A A C



Şekil 4.24: 2 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 3'de saptanan c.353A-G mutasyonu

G C T T C N C T T N G A T T T G N G T T T T C A C G G T C



4.25: 17 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 9'de saptanan c.1001A-C mutasyonu

Şekil

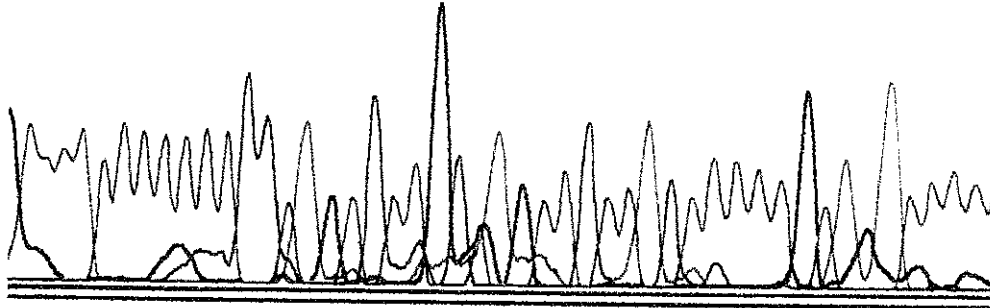
I A A A A T T T T T T T C C T A G T C T T G C G A G T T C T T A C T T T T T G T A G A T T T T T

90

100

110

120



Şekil 4.26: 52 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 10'da saptanan c.1204 A-C mutasyonu

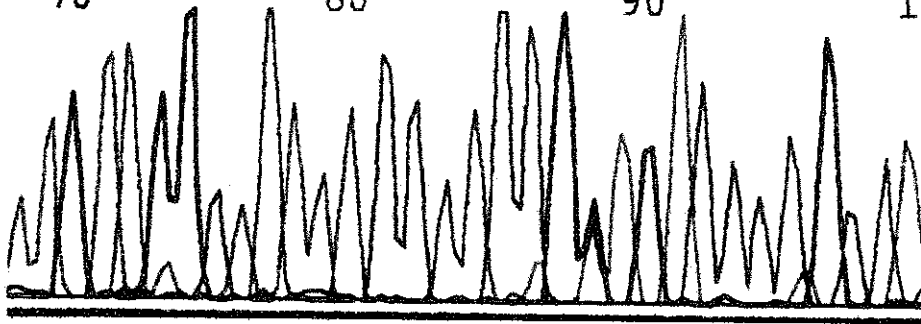
A A G A C G G T A C A A C T T C C T T G N A G A T T T T G T C A C

70

80

90

100



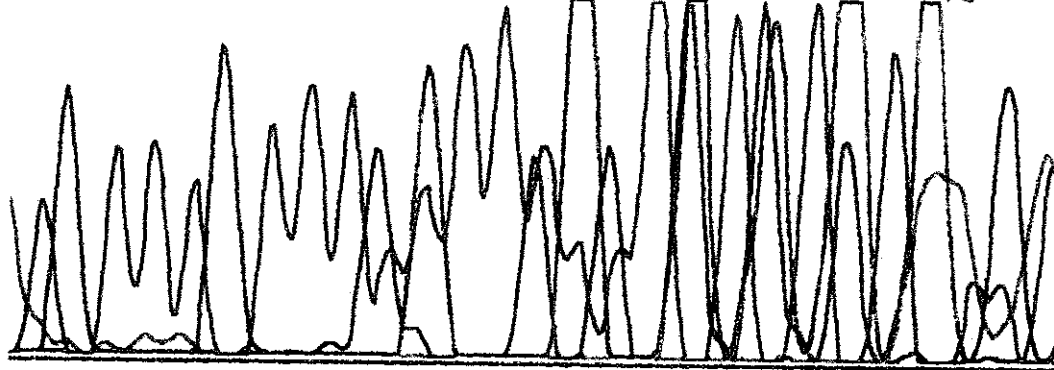
Şekil 4.27: 44 ve 51 nolu hastalarda geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 10'da saptanan c.1379C-T mutasyonu

T C T T T C T T T C G T T N G C T N T N T G T G N C N

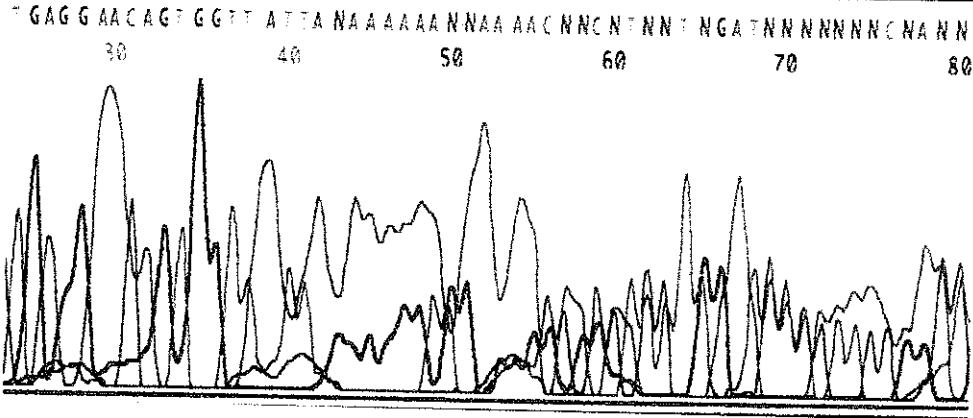
20

30

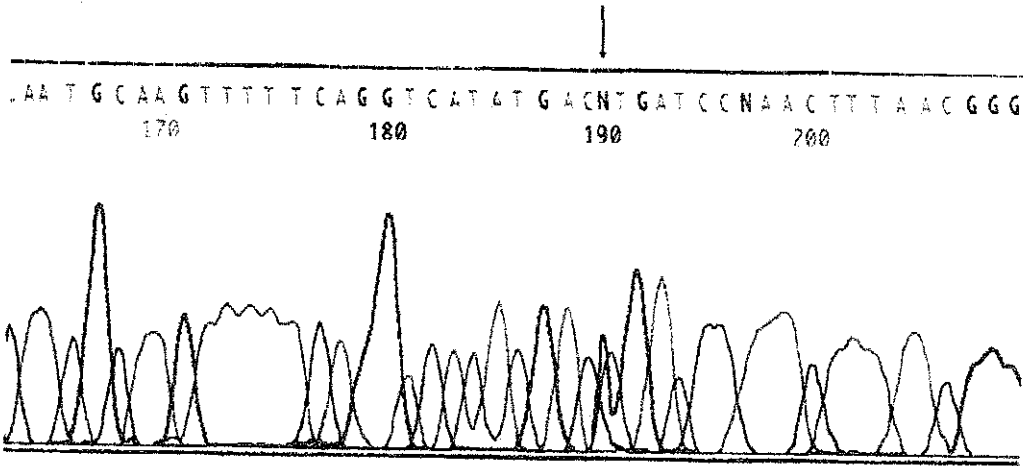
40



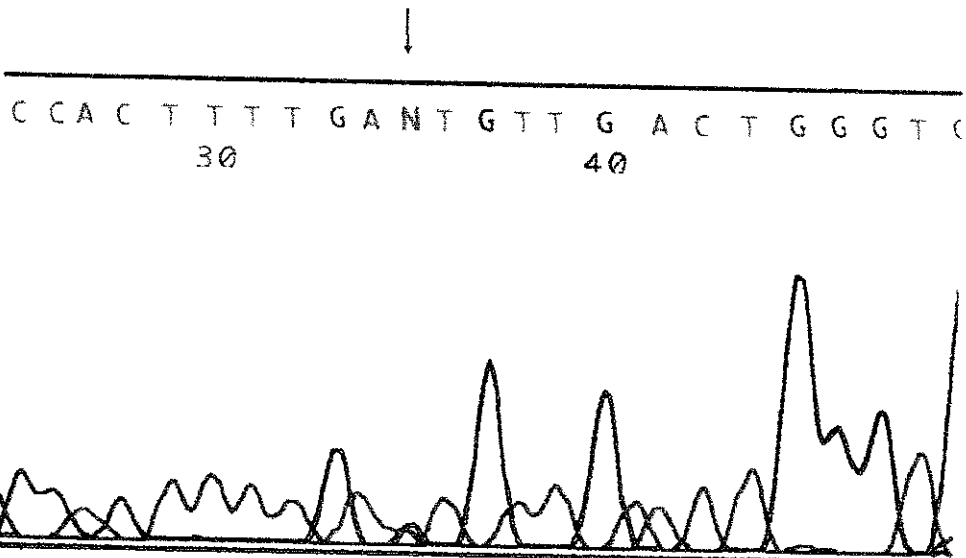
Şekil 4.28: 30 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 10'da saptanan c.1529 del AAAG mutasyonu



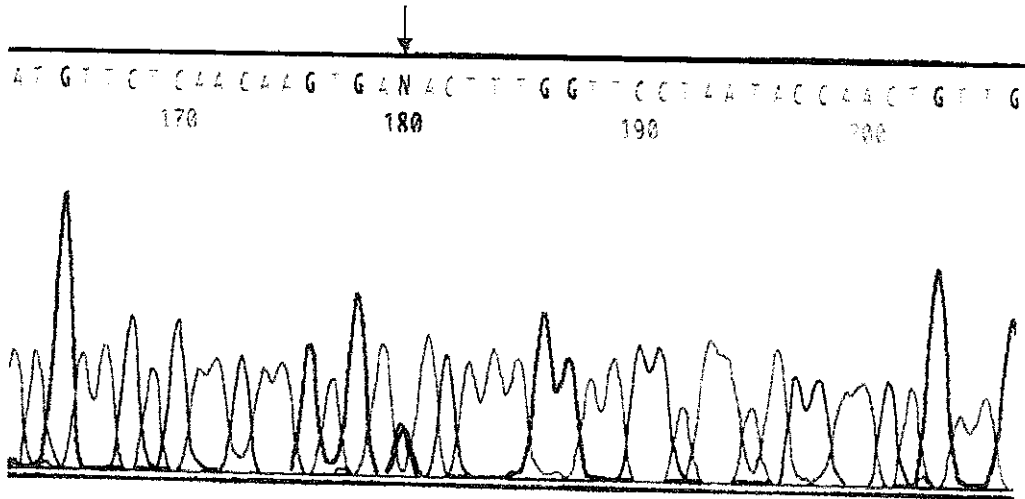
**Şekil 4.29:** 49 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 10'da saptanan c.1621 insT mutasyonu



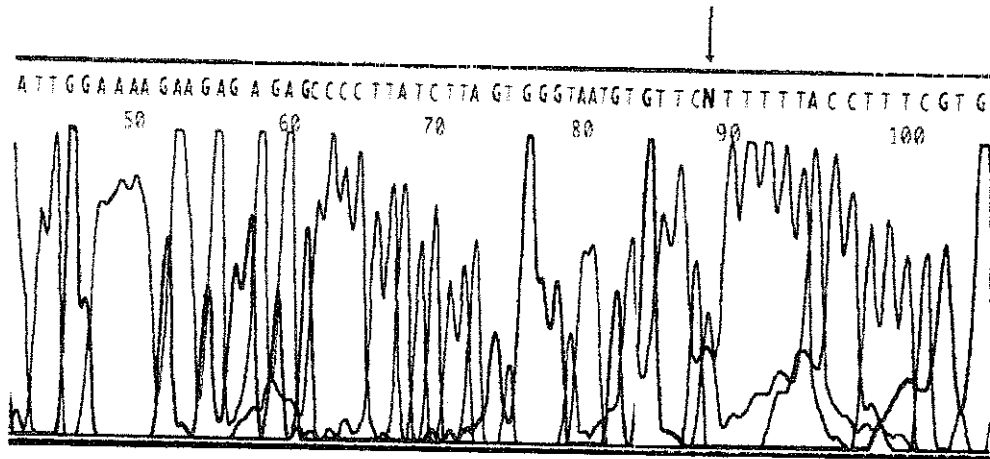
**Şekil 4.30:** 45 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 10'da saptanan c.1803 T-G mutasyonu



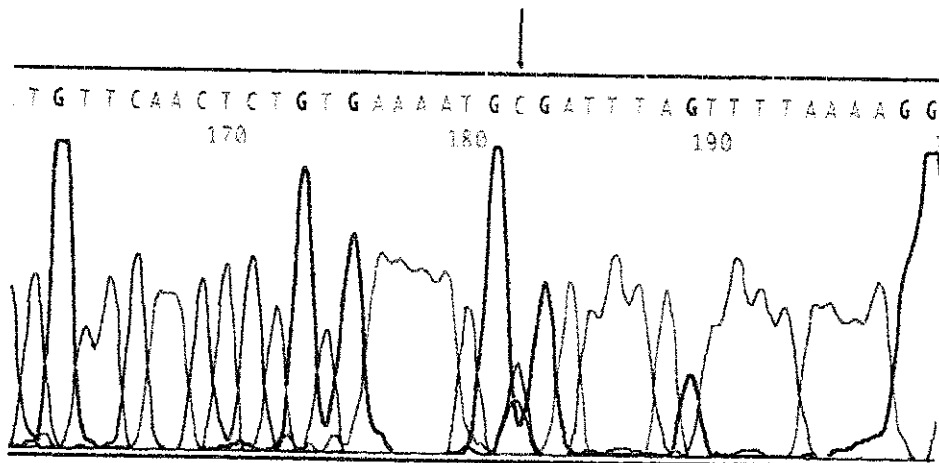
**Şekil 4.31:** 63,39,45 nolu hastalarda geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 11'de saptanan c. 2457 T-C mutasyonu



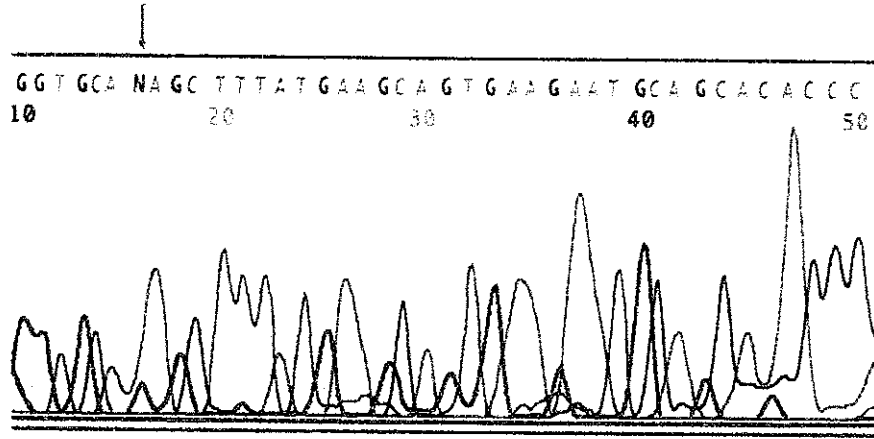
**Şekil 4.32:** 21 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 11'de saptanan c.6741 C-G mutasyonu



**Şekil 4.33:** 12 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni intron 11'de saptanan IVS11.12 T-A mutasyonu



**Şekil 4.34:** 3 nolu hastada geri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 14'de saptanan c.7470 A-G mutasyonu



**Şkil 4.35:** 21 nolu hastada ileri primerlerle yapılan dizi analizi sonucu *BRCA2* geni ekzon 21'de saptanan c.8935 G-A mutasyonu



## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Kanserin moleküler öğelerinin tanımlanması ve genotipik ve fenotipik özellikler ile hastalığın klinik seyrinin ilişkisi çağımızda çok ilgi çekmektedir. Yeni genlerin giderek artan bir hızla keşfi, ürünlerinin neden olduğu biyolojik olayların daha fazla anlaşılması ve bu bilgilerin klinikte kişiye özel tedavi uygulamalarına olanak tanıyabileceğinin anlaşılması kanserde moleküler çalışmaların artan hızla devam etmesine yol açmıştır (101). Bu çalışmalarla varılan sonuçlardan birisi de mikrorray ekspresyon profilleriyle meme kanser prognozunun bireylere özgül olarak belirlenmesi olmuştur (102). Son yıllarda yapılan ekspresyon çalışmalarıyla meme kanserlerinin hem biyolojik hem de klinik olarak farklılık gösterdiği saptanmıştır. Sorlie ve ark.'larının yaptığı mikrorray çalışmasında *BRCA1* mutant allelini taşıyan kadınların tümörlerinin aynı gen ekspresyon patternine sahip olduğu gösterilmiştir (103). Diğer yandan İsveçli meme kanseri ailelerinde meme kanseri morfolojisinin genetik olarak belirlenip belirlenmediğinin araştırıldığı yaklaşık 25.000 meme kanserli hastayı kapsayan geniş çaplı bir araştırmada, ailesel olgulardan anne - kız arasında ya da iki kızkardeş arasında, ayrıca aynı bireyin iki ayrı primer meme kanseri odağı arasında morfolojik olarak benzerlik olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve çalışma sonucunda meme kanseri morfolojisinin genetik olarak belirlenmediği ortaya konmuştur (104). Bu bulgu aynı zamanda, meme kanserlerinde çoğunlukla karışık (mixed) tip morfolojilerle karşılaşılmasının, genetik olarak tek tip kökenden, çoklu morfolojilerin oluşabileceği görüşünü de desteklemektedir.

Kadınlar arasında en sık gözlenen malignansi olan meme kanserinin de, diğer kanserlerde olduğu gibi klonal seçime neden olan mutasyonların hücrelerde birikmesi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Meme kanserlerinde tanımlanan mutasyonların büyük çoğunluğu sadece tümör hücrelerinde bulunan kalıtsal olmayan sonradan kazanılmış mutasyonlardır. Meme kanserlerinin kalıtsal özelliklerinin olduğunun gösterilmesi meme kanseri ailelerinin bildirilmesiyle başlamıştır. Bu ailelerden bazılarında hasta bireylerin sayısı, şans ya da çevresel faktörlerle açıklanamayacak kadar fazladır. Bu ailelerin çoğunda en çok dikkat çeken özellik hastaların, genellikle menapoz öncesi dönemde ve 50 yaşın altında olmalarıdır. Ayrıca ailelerde meme kanserinin oluşum patterni incelendiğinde soyağaçlarının, en çok otozomal dominant kalıtım modeli ile uyumlu olduğu görülmüştür (105). Yapılan çalışmalarla, meme kanseri ile ilişkili onlarca gen saptanmıştır. Bunlar içinde yüksek penetransa sahip olan *BRCA1* ve *BRCA2* genleri en fazla ilgi çekenlerdir (106). Genel olarak, *BRCA1* ya da *BRCA2* genlerinden birinde mutasyon taşıyan bir kadının 80 yaşına kadar meme kanseri olma riski %80 iken, bu

risk normal popülasyonda ortalama %13 olarak kabul edilmektedir. Mutasyon taşıyıcılarında 40 yaşına kadar meme kanseri geliştirme riski %20, 60 yaşına kadar ise %55'tir. BRCA1 geninde mutasyon olan bir kadının ömür boyu over kanseri olma riski %54, BRCA2 geninde mutasyon olan bir kadının ise %23 olarak bildirilmiştir (107). Meme kanseriyle ilgili diğer genlerin ise düşük penetransla daha az kanser riski oluşturduğu, ancak daha yüksek prevalansa sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle de düşük penetranslı bu genlerin meme kanserlerinin daha büyük bölümünden sorumlu olduğu düşünülmektedir (106). Çalışmamızda aile hikayeleri Çizelge 4.1'de ve soyağaçları Şekil 4.1-7,9,10'da verilmiş olan 20 meme kanseri hastası (ki aile hikayesi pozitif olan bu gruptaki hastalardan biri aynı zamanda bilateral meme kanseri tanısı da almıştır), aile hikayesi olmadığı halde bilateral meme kanseri tanısı almış altı kadın hasta (Çizelge 4.2), hem meme hem over kanseri tanısı almış üç birey (Çizelge 4.2), 40 yaşında ya da daha önce meme kanseri tanısı almış 32 kadın hasta (Çizelge 4.3) ve herhangi bir yaşta meme kanseri tanısı almış üç erkek hasta (Çizelge 4.4) olmak üzere dahil edilen toplam 64 meme kanseri ve altı ailesel (Çizelge 4,1) ve beş erken yaş grubu over kanseri (Çizelge 4.3) hastasının BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları açısından araştırılması sonucunda BRCA1 geninde 12 no'lu hastada IVS11.1G-A "splice" bölge mutasyonu, 26 no'lu hastada R1203X mutasyonu, 20 no'lu hastada L1679fsX1682 mutasyonu, BRCA2 geninde 30 no'lu hastada K434fsX458, 49 no'lu hastada V465fsX467 mutasyonu olmak üzere toplam beş tane hastalık yapıcı mutasyon saptanmıştır. Bu nedenle, taramış olduğumuz meme kanseri grubunda yaklaşık %7 oranında BRCA1 ve BRCA2 genleri kalıtsal mutasyonlarının kanserden sorumlu olduğu ve bu orana şu anda sınıflandırılmayan diğer varyantlardan (BRCA1 geninde saptamış olduğumuz dört adet yanlış anlamlı mutasyon ve iki intronik bölge değişimi ile altı hastanın BRCA2 geninde saptamış olduğumuz yanlış anlamlı mutasyonlar ve bir hastanın BRCA2 geninde bulunan intronik bölge değişimleri) bazıları da eklenecek olursa daha da artabileceği sonucuna ulaşılabilir. Farklı etnik gruplarda farklı oranlarda mutasyon saptanmış olmasına rağmen verilen genel oran BRCA1 ve BRCA2 genlerinin kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık yarısından yani %50'sinden sorumlu olduğudur (108). Bizim çalışmamızda farklı sonuç almamızın en önemli nedeni olarak popülasyon farklılığı ve kalıtsal grup hasta seçim kriterleri düşünülebilir. Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalarda, bu genlerin PCR'a dayalı yöntemlerle ile saptanabilen mutasyonlarına ek olarak, genomik büyük değişimlerinin de meme ve over kanseri oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (109-111). Hogervorst ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada da, BRCA1 mutasyonu pozitif toplam 121 ailenin 33'ünde (%27) bir delesyon ya da duplikasyon

tanımlanmış ve bu değişimlerin 5'inin PCR'a dayalı yöntemlerle saptanamayan büyük değişimler olduğu bildirilmiştir (112)

Çoğu olgularda erken tanının gerçekleştirildiği meme kanserlerinin aksine over kanserlerinin sadece %25'inde evre 1'de (ki bu evrede tedavi oranı %90'dır) tanı konulabilmektedir. İleri evrelerdeki over kanserlerinde tedavi oranı %20'nin altındadır. Ayrıca over kanserinin biyolojisinin çok iyi anlaşılammış olması ve erken tanıda kullanılabilir güvenilir biyobelirteçlerin eksikliği söz konusudur (113). Bu nedenlerle, jinekolojik malignansiler arasında ölüme en çok neden olanı over kanseridir. Over kanserlerinde aile hikayesi, en iyi tanımlanmış ve en önemli risk faktörüdür. Ortalama olarak bir kadının ömür boyunca over kanserine yakalanma riski %1.4 iken aile hikayesi olan ya da kanser yatkınlık genlerinde mutasyon taşıyan kadınlarda bu risk % 15-60 olarak hesaplanmaktadır. Lynch sendromunda MSH2 ve MLH1 gibi DNA yanlış eşleşme onarım genlerinin tanımlanması, kalıtsal meme/over kanseri sendromlarında *BRCA1* ve *BRCA2* tümör baskılayıcı genlerinin tanımlanmasıyla ailesel over kanserlerinin etiyojisine ait bilgiler de artmıştır. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonların ailesel over kanseri olan kadınların %90'ından sorumlu olduğu ve bu mutasyonları taşıyan kadınların ömür boyunca over kanseri geliştirme riskinin %60-70 kadar yüksek olduğu bildirilmiştir (114). Çalışmamızda, kızkardeşinde over kanseri olan bir (hasta no:16), kızkardeşinin kızında over kanseri olan bir (hasta no: 17), halasında meme kanseri olan bir (hasta no: 20), iki kızkardeşinde de over kanseri olan bir (hasta no:21), annesinde meme kanseri olan bir (hasta no:22), annesinde over kanseri olan bir (hasta no: 26), hem meme hem de over kanseri tanısı almış 3 (hasta no: 33-35), 40 yaş ya da daha öncesinde over kanseri tanısı almış 5 birey (hasta no:68-72) olmak üzere toplam 14 overli kanserli olgu dahil edilmiştir. Bu hastalardan 2'sinin (yaklaşık %17'sinin) (hasta no: 26,20) *BRCA1* geninde hastalık yapıcı mutasyon olduğu belirlenirken, hastaların hiçbirinde *BRCA2* genine ait hastalık yapıcı olduğu kesin olarak söylenebilecek mutasyon bulunmamıştır. *BRCA1* geni çoğunlukta olmak üzere her iki gende hastalık yapıcı mutasyon oranı %39 olarak bulunan geniş çaplı bir çalışmada toplam 238 birey (50 yaşından önce meme kanseri tanısı almış ya da herhangi bir yaşta over kanseri tanısı almış ve birinci ya da ikinci derece akrabalarından en az birinde meme ya da over kanseri olan) çalışılmıştır. 238 bireyin 63'ünde hastalık yapıcı bir *BRCA1* mutasyonu, 31'inde ise hastalık yapıcı bir *BRCA2* mutasyonu bulunmuştur (46). Bizim bulgumuzdaki düşük oran yine etnik farklılıklar, kullanılan yöntemlerdeki farklılıklar, hasta grubu sayısının az oluşu gibi nedenlerle açıklanabilir.

Araştırmamızda, kalıtsal yatkınlığa sahip olduğu düşünölen ailesel hikayesi olan meme kanseri, erkek meme kanseri, erken yaş meme kanseri, bilateral meme kanseri, ve hem meme hem over kanseri olmuş toplam 75 bireyin *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tüm kodlayıcı ekzonları taranarak kalıtsal mutasyonlar açısından değerlendirilmesi sonucunda bu genlere ait en az beş tane patojenik mutasyon saptanmıştır. Bunlardan biri *BRCA1* geninde PTT yöntemi ile saptanmış olan c.2566A-C nokta mutasyonu sonucu oluşan R1203X değişimidir. Protein düzeyinde erken sonlanmaya neden olduğu tahmin edilen bu mutasyon, annesinde (48 yaş) ve kendisinde (38 yaş) over kanseri hikayesi olan bir hastamızda (hasta no 26) saptanmıştır. Meme kanseri bilgi veri tabanı'na (Breast cancer information core, BIC) göre, bu mutasyon daha önce Batı Avrupa, Doğu Avrupa, ve Meksika'nın da dahil olduğu çeşitli popöasyonlarda toplam 20 meme ya da meme/over ailesinde bulunmuştur (47). Bu mutasyonun oldukça çeşitli popöasyonlarda gözlenmiş olması bu popöasyonlar arasında etkileşimlerin ya da mutasyonun multisentrik orijinin varlığının göstergesi olabilir.

Halasında 45-46 yaşlarında meme kanseri tanısı olan ve kendisinde 45 yaşında over kanseri tanısı olan 20 no'lu hastamızda ise *BRCA1* geninin 17'inci ekzonunda iki bazlık bir delesyon sonucu oluşan c.5154delCT mutasyonu saptanmıştır. Literatürde ilk olarak bizim olgumuzda bulunmuş olan bu delesyonun 1682'inci pozisyonda terminasyon kodonu oluşturarak erken sonlanmaya neden olduğu tahmin edilmektedir. Gerek bu c.5154delCT mutasyonunun neden olduğu çerçeve kayması ve bunu takip eden erken sonlanma, gerekse bir önceki paragrafta tartışılmış olan R1203X mutasyonu nedeniyle ortaya çıkan erken sonlanma nedeniyle *BRCA1* geninin karboksi terminalinin sentezi tam olarak gerçekleşemeyecektir. Bu nedenle *BRCA1* genindeki bu iki mutasyonun, *BRCA1*'in 1685-1863'üncü amino asitlerini kapsayan "BRCA1 karboksi terminal" (BRCT) motifi olarak adlandırılan ve özellikle DNA tamirinde görev alan, ve proteinin 1560-1863'üncü amino asit bölgesindeki transaktivasyon domaininin eksik kalışına da neden olarak *BRCA1*'in fonksiyonunu etkileyebileceği ve meme/ over kanseri fenotipine neden olabileceği ileri sürölebilir (115,116).

*BRCA1* geninde saptadığımız ve patojenik olduğu tahmin edilen diğer bir mutasyon da 11'inci intronun 1'inci pozisyonunda G-A değişimi nedeniyle oluşan IVS11.1G-A splice bölge mutasyonudur. Bu mutasyonu taşıyan 35 yaşında meme kanseri tanısı almış olgumuzun (hasta no:12) annesinde 69 yaşında over kanseri tanısı varken, halasında ve babaannesinde ise 60 yaşlarında meme kanseri hikayeleri bulunmaktadır (Şekil 4.6). BIC veri tabanında bu mutasyonun daha önce Batı, Orta ve Doğu

Avrupa'lı 3 olguda tanımlanmış olduğu görülmüştür (47), ve olgumuz 4'üncü olgudur. İntronlarda korunmuş motiflerden olan intronun ilk iki bazı 5'-GU-3' ("donör" bölgede) ve son iki bazı 5'-AG-3' ("acceptor" bölgede), GU-AG intronlar olarak adlandırılır. İntronlardaki bu korunmuş bazlar "splicing" işlemi için büyük önem taşırlar (117). Bu nedenle 11'inci intronun ilk bazında saptamış olduğumuz bu "splice donor" bölge mutasyonunun yanlış "splice" işlemine neden olarak BRCA1'in yapısını ve fonksiyonunu etkileyeceği ve hastalık yapıcı olabileceği tahmin edilmektedir.

*BRCA2* geninde saptamış olduğumuz patojenik mutasyonlardan birisi 4 bazlık bir delesyonla çerçeve kaymasına neden olan c.1529delAAAG mutasyonudur. BIC veri tabanına göre bu mutasyon daha önce 6 hastada bulunmuştur (47), bu nedenle olgumuz bu mutasyonu taşıdığı saptanmış olan 7'inci olgudur. 70 yaşında bilateral meme kanseri tanısı almış olan bir hastamızda (hasta no: 30) tanımlamış olduğumuz bu dört bazlık delesyonun oluşturduğu çerçeve kayması nedeniyle 458'inci pozisyonda erken sonlanmaya neden olduğu ve bu nedenle protein fonksiyon yapamadığı için hastalık oluşturduğu tahmin edilmektedir.

*BRCA2* geninde saptadığımız bir diğer çerçeve kayması mutasyonu ise tek baz insersiyonu nedeniyle oluşan ve ilk olarak bu çalışmada saptanmış yeni bir mutasyon olan c.1621insT mutasyonudur. Bu mutasyon aile hikayesi olmayan ancak 34 yaşında meme kanseri tanısı konduğu için erken yaş grubuna dahil edilmiş olan 49 no'lu hastamızda bulunmuştur. *BRCA2*'nin 465'inci aminoasitinde meydana gelen tek baz insersiyonunun yol açtığı çerçeve kaymasının 467'inci pozisyonda erken sonlanmaya neden olacağı tahmin edilmektedir. Yukarıda belirtilmiş olan c.1529delAAAG ve c.1621insT mutasyonlarının, 3418 amino asit büyüklüğündeki *BRCA2*'nin sırasıyla 458'inci ve 457'inci pozisyonlarda erken sonlamaya neden oluşu ve dolayısıyla proteinin büyük bölümünün sentezlenememesi, buna bağlı olarak birçok fonksiyonunu gerçekleştirememesi söz konusu olduğundan bu iki mutasyonun da hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Tartışılan beş patojenik mutasyona ek olarak biyolojik açıdan önemi tam olarak bilinmeyen yanlış anlamlı mutasyonlar, polimorfizmler ve intronik bölge değişimleri de saptanmıştır. Bunlardan *BRCA2* geninin 11.ekzonunda saptanan ve aminoasit düzeyinde değişime neden olmayan c.T2457C değişimi üç bireyde ve yine aynı gende saptanmış olan S384F mutasyonu iki bireyde bulundu ve bunların dışındaki tüm mutasyonlar sadece bir bireyde gözlemlendi.

Erken yaş grubu meme kanseri hastalarından birinde saptanan cDNA'da 1657'inci pozisyonda A-T değişimi sonucu protein düzeyinde H513L değişimine neden olan mutasyon literatürde ilk olarak bizim olgumuzda saptanmış bir yanlış anlamlı mutasyondur. BRCA1 proteininin 513'üncü amino asitinin fonksiyonel olarak önemi tam olarak bilinmemekle beraber, proteinin 341 ve 748'inci kodonları arasındaki bölgenin RAD50 ile etkileşime giren bölge olduğu ve RAD50'nin DNA çift zincir kırıklarının tamirinde rol aldığı bildirilmiştir (118). Ayrıca, Xia ve Xie'nin yaptığı çalışmaya göre, beta-sheet oluşturucu Histidin'in alfa-heliks oluşturucu Lösin'e dönüşümü, ve Dayoff ve ark.'nın protein benzerlik indeks matriksine göre de Histidin ile Lösin arasındaki benzerlik indeksinin düşük oluşu söz konusudur (119,120). Ek olarak, Gonnet ve ark.'larının PAM 250 matriksine göre, Histidin'in Lösin'e dönüşümü negatif bir değere sahiptir ve bu da non-konservatif bir mutasyon olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir (121). Bu açılardan değerlendirildiğinde H513L mutasyonunun proteinin fonksiyonunu etkileyici bir mutasyon olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda bazı bireylerde birden fazla genetik değişim gözlemlendi. Bunlardan birisi de 70 yaşında bilateral meme kanseri tanısı almış 30 no'lu hastamızdı. BRCA2 geninde c.1529delAAAG çerçeve kayması mutasyonu saptanmış olduğumuz bu hastanın, BRCA1 geninin 11'inci ekzonunda ise H816P değişimi saptanmıştır. cDNA'da 2566'ıncı noktada A-C dönüşümü nedeniyle oluşan bu yanlış anlamlı mutasyon da literatürde ilk olarak bizim olgumuzda tanımlanmış bir mutasyondur. Bu iki değişikliğin hastamızda aynı allelde mi yoksa farklı allellerde mi olduğu araştırılmamıştır. BRCA1'in 758 ve 1064'üncü kodonları arasında kalan bölgesinin DNA çift zincir kırıklarının tamirinde rol oynayan RAD51 proteini ile etkileşime giren bölge olduğu bilinmektedir (118,122). Histidin- Prolin değişimi, Gonnet'in PAM 250 matriksine göre negatif değere sahip olduğuiçin non-konservatif bir değişim olarak kabul edilmektedir (121). Fleming ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmada, insanlarda ve evrimsel olarak insanlara uzanan diğer primatlarda RAD51 etkileşim bölgesinin bazı domainlerinde pozitif bir seçim altında evrimleşme olduğu saptanmıştır (118). BRCA1'in 11.ekzonu tarafından kodlanan amino asitlerle RAD51 geni arasındaki etkileşimin nasıl olduğu tam olarak bilinmemekle beraber, DNA tamirine karşı oluşturulacak cevap için oldukça önemli olduğu açıktır. Bu etkileşimin dolaylı olarak da olabileceğini gösteren kaynaklar vardır. Evrimsel süreçte çeşitlenme seçiminin, neden RAD51 domaini üzerinde olduğu net olarak bilinmemekle beraber, bu bölgenin adaptif evrimleşmede rol oynadığı ve fonksiyonel olarak önemli olduğu tahmin edilmektedir (118).

Yapılan DGGE analizleri sonucunda aile hikayesi olmayan ancak 38 yaşında meme kanseri tanısı almış olması nedeniyle erken yaş grubuna dahil edilmiş olan 64 no'lu hastada da *BRCA1* geni 15'inci ekzonda G-A değişimi nedeniyle oluşan D1546N mutasyonu bulundu. Bu mutasyon, BIC veri tabanında daha önceden kaydedilmiş ve Ashkenazi (Yahudi olmayan), Batı Avrupalı, İspanyol, Yakın Doğulu, Sudi Arabistanlı, Lübnanlı toplam 27 bireyde bildirilmiş bir mutasyondur (47). Ayrıca Phelan ve ark.'ları tarafından, 245 Ashkenazi- Yahudisi meme-over kanserli bireyde yapılan *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyon taraması çalışması sonucunda sadece bir bireyde bu mutasyon tanımlanmıştır (123). *BRCA1* proteininde 1546'ncı amino asidin fonksiyonel olarak önemi tam olarak bilinmemektedir. Aspartik asit ve asparajin amino asitlerinin ikisi de asidik gruplar içeren yan zincirlere sahiptirler ve polar yapıdadırlar (124). Ayrıca Gonnet'in PAM250 matriksine göre aspartik asit ile asparajin arasındaki indeksin pozitif değer almış olması nedeniyle bu mutasyon konservatif bir mutasyon olarak değerlendirilebilir (121). Her ne kadar normal gruplarda ve hasta gruplarında bu mutasyonun görülme sıklığı hakkında hiçbir veri yoksa da, yukarıda verilen nedenlerle bu mutasyonun protein fonksiyonu değişimine neden olma ihtimalinin düşük olduğu söylenebilir.

Literatürde ilk bizim olgumuzda saptanmış olan diğer bir *BRCA1* yanlış anlamlı mutasyonu ise c.4849 C-A dönüşümü nedeniyle oluşan S1577Y mutasyonudur. Soyağacı Şekil 4.10'da verilmiş olan 36 yaşında tanı almış bir meme kanseri hastasında (hasta no:60) tanımlanmış olan bu Serin - Trozin değişimi, Dahoff'un benzerlik indeksine göre oldukça düşük bir frekansa sahiptir (120). Bununla uyumlu olarak PAM 250 matriksinde de negatif değer göstermektedir (121). Monteiro ve ark. yapmış oldukları çalışmada, *BRCA1*'in C-terminal bölgesinde 16-24'üncü ekzonları kapsayan (1560'ncü ve 1863'üncü amino asitler arasında kalan) bölgenin GAL4 DNA bağlayıcı domain ile birleşerek maya ve memeli hücrelerinde transkripsiyonu aktive edebileceğini göstermişlerdir. Ayrıca yine aynı çalışmada, 21-24'üncü ekzonları kapsayan (1760-1823'üncü aminoasitler arasında kalan) bölge minimal transaktivasyon domaini olarak tanımlanmış ve bu bölgede saptanmış 4 farklı kalıtsal mutasyonu taşıyan meme ya da over kanserli hastalarda transkripsiyon aktivasyonunun gerçekleşmediği gösterilmiştir (116). Bu bulgulara ek olarak, Serin'in hidroksilik gruplar içeren bir yan zinciri varken, Trozinin aromatik halka içerdiği de göz önünde tutulduğunda (119,124), olgumuzda saptanmış olduğumuz S1577Y mutasyonu non-konservatif bir mutasyon olarak değerlendirilebilir ve bu mutasyonun hastalık yapıcı etkisi olabilir.



*BRCA2* geni ile ilgili bulgularımız arasındaki c.353 A-G değişimi ile ortaya çıkan Y42C mutasyonu 48 yaşında tanı almış bir meme kanseri olgumuzda (hasta no: 2) saptanmıştır. Annesi 34 yaşında, ve bir kızkardeşi de 40 yaşında meme kanseri olan bu olguya ait soyağacı Şekil 4.2'de verilmiştir. Y42C mutasyonu BIC veri tabanına göre daha önce Latin Amerika (Caribbean), Yunanistan, Batı/Orta/Doğu Avrupa, Danimarka, İskoçya, İngiltere, İrlanda, İtalya, Fransa, Almaya gibi bölgelerden toplam 142 bireyde saptanmıştır. *BRCA2* proteininin 3'üncü ekzonunda bulunan 23'üncü ve 105'inci amino asitlerinin arasında kalan bölgesinin proteinin transaktivasyon domaini olduğu bilinmektedir (115). Bu transaktivasyon domaininin, DNA'nın transkripsiyon aparatusunun yüzeyine özgül bir şekilde uyum sağlayabilmesi için gerekli olduğu ileri sürülmektedir (114). *BRCA2* geninde primer transaktivasyon domaini 18'inci ve 60'uncü amino asitler arasındaki bölgeden oluşmaktadır ve Y42C mutasyonun tümörle ilişkili bir mutasyon olduğu ve primer aktivasyon bölgesinin aktivasyon potansiyelini baskıladığı bilinmektedir (115). Wong ve ark.'ları protein affinite kromatografisi ve koimmünopresipitasyon tekniklerini kullanarak, *BRCA2*'nin N-terminal transaktivasyon domain'inin, DNA tamir, replikasyon, ve rekombinasyonunda gerekli bir protein olan replikasyon proteini A (RPA) ile etkileşime girdiğini göstermişlerdir. RPA ve *BRCA2* arasındaki bu etkileşim, Y42C mutasyonu tarafından ciddi bir şekilde engellendiği ve bu mutasyonun tümör yapıcı olduğu bilindiği için, RPA ve *BRCA2* arasındaki etkileşimin biyolojik olarak önemli olabileceği ve hatta belki de *BRCA2*'deki transaktivasyon domainlerinin transkripsiyon yerine, RPA ve DNA tamiriyle bağlantısının kurulabileceği vurgulanmıştır (125).

*BRCA2* geninde saptamış olduğumuz yanlış anlamlı mutasyonlardan bir diğeri de c.1001 A-C değişimi sonucu 9'uncü ekzonda oluşan G258P mutasyonudur. Daha önce hiçbir olguda bildirilmemiş olan bu yeni mutasyon 59 yaşında over kanseri tanısı almış ve kızkardeşinin kızında da 40 yaşında over kanseri hikayesi olan bir olguda (hasta no:17) saptanmıştır. Bu mutasyon nedeniyle *BRCA2*'nin 1001'inci pozisyonunda alifatik yan zincirli ve polar yapıdaki Glisin'in, non-polar yapıdaki Prolin'e dönüşümü gerçekleşmiştir (124). Ayrıca Dayoff matriksine göre Glisin ile Prolin arasındaki benzerlik indeksi düşük (120), ve PAM 250 matriksinde de bu iki amino asit için negatif değer olduğu (121) göz önünde bulundurulduğunda bu mutasyonun non-conservatif bir mutasyon olabileceği sonucu çıkarılabilir.

S326R mutasyonu da *BRCA2* geninde saptadığımız ve ilk olarak bizim olgumuzda saptanmış olan yanlış anlamlı mutasyonlar arasındadır. Bu mutasyon, *BRCA2* geninin 10'uncü ekzonunda c.1204 A-C dönüşümü sonucu oluşmuştur ve aile



hikayesi olmayan ancak 37 yaşında meme kanseri tanısı alması nedeniyle çalışmada erken yaş grubuna dahil edilmiş olan 52 no'lu hastamızda saptanmıştır. Serin amino asidi hidroksilik gruplar içeren bir yan zincire sahipken, Arjinin amino asidi bazik grup içeren bir yan zincire sahiptir. Ancak bu iki amino asitin de polar yapıda oluşu ve PAM250 ve Dayhoff matrikslerinde ortalama değerler ortaya çıkması nedeniyle bu mutasyonun protein yapı ve fonksiyonuna fazla etki göstermeyebileceği sonucuna ulaşılabilir (120,121,124).

İki erken yaş meme kanseri hastamızda S384F yanlış anlamlı mutasyonu tanımlamıştır. Bu olgularımızın her ikisinde de aile hikayesi bulunmamaktadır (hasta no: 44,51). *BRCA2* geninin 10'uncu ekzonunda c.1379 C-T dönüşümü oluşan bu S384F mutasyonu, BIC veri tabanına daha önceden kayıtlı bir mutasyondur. İtalya, Batı Avrupa, Kanada, Orta Avrupa, Doğu Avrupa, Latin Amerika, Almanya, Yakın Doğu, ve Türkiye'den toplam 96 bireyde bu mutasyonun varlığı gösterilmiştir (47). Polar yapıda olan ve hidroksilik bir yan zinciri olan Serin'in, non-polar yapıdaki ve aromatik halkalı yan zincirli fenilalanine dönüşümü sonucu oluşan bu mutasyon Dayhoff ve Gonnet'in matrikslerine göre de değerlendirildiğinde non-konservatif olarak kabul edilebilir (120,121,124).

*BRCA2* geninde saptamış olduğumuz yanlış anlamlı mutasyonlardan bir diğeri, c8935 G-A dönüşümü sonucunda oluşan ve ilk olarak bizim olgumuzda gösterilmiş olan E2903K mutasyonudur. Bu mutasyon 50 yaşında over kanseri tanısı almış bir olguda (hasta no:21) saptanmıştır. Bu olgumuzun, kendisi dışında iki kızkardeşinde de over kanseri tanısı vardır (Şekil 4.8). Glutamik asit'in Lösin'e dönüşümü, Dayhoff ve Gonnet matrikslerine göre konservatif kabul edilebilir ve her iki amino asit de polar yapıdadırlar (120,121,124). Ancak, Lösin, alifatik yan zincire sahipken, glutamik asit, asidik yapıda bir yan zincire sahiptir (124). Ek olarak, *BRCA2*'nin 2479'uncu ve 3152'inci kodonları arasındaki geniş karboksil domaini insanla kemirgenler arasında %86 benzerliğe sahiptir. Bu derece bir korunmuşluk, proteinin diğer bölgeleriyle karşılaştırıldığında dikkate değerdir. Bu dizilerin potansiyel fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber, bu bölgede tanımlanmış pek çok ailesel mutasyonun bulunması, bu bölgenin *BRCA2*'nin fonksiyonu için önemli olduğunu göstermektedir (115). Bu nedenlerle, saptamış olduğumuz E2903K mutasyonu hastalık yapıcı bir mutasyon olabilir.

Yapılan DGGE analizlerinde bazı olgularımızda intronik bölgelerde tek baz değişimleri saptanmıştır. Bunlardan biri *BRCA1* geninin 6'ncı ekzonunda 602'inci noktada T-C dönüşümüdür ve aile hikayesi olmayan 40 yaşında over kanseri tanısı almış bir

olguda (hasta no 68) ilk olarak gösterilmiştir. IVS9.1288 T-C dönüşümü de *BRCA1* geninde saptanmış olduğumuz bir diğer intronik bölge mutasyonudur. Bu mutasyon da ilk olarak bu çalışmada erken yaş meme kanseri grubundan bir olgumuzda (hasta no:38) tanımlanmıştır. Saptanan intronik bölge mutasyonlarından biri de *BRCA2* geni 11'inci intronunda IVS11.12T-A mutasyonudur. Bu mutasyon 35 yaşında meme kanseri tanısı almış olan olgumuzda (hasta no:12) tanımlanmıştır. Soyağacı Şekil 4.6'da verilmiş olan bu olgumuzun aynı zamanda *BRCA1* geninde, splicing bölge mutasyonu olan IVS11.1 G-A mutasyonu da saptanmıştır. IVS11.12 T-A mutasyonu BIC veri tabanına göre daha önce sadece bir hastada bulunmuş olan mutasyondur (47). *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin intronik bölgelerinin önemi tam olarak bilinmemekle beraber, Majewski ve ark.'larının çalışmasında, intronik "splicing" regülatörlerin genellikle splice bölgelere yakın yerlere lokalize olduğu, ancak, splicing bölgelerinden 200 nükleotid kadar uzaklıklarda da bulunabileceği gösterilmiştir (126). Bu nedenle, bizim çalışmamızda saptanmış olan intronik bölge mutasyonları da "splicing" işlemi açısından önemli olabilir ve hastalık oluşmasında da rol oynayabilir.

Biyolojik olarak önemi bilinmeyen bu yanlış anlamlı mutasyonlar ve intronik bölge değişimleri için fonksiyonel testler yapılmadan, geniş ailelerde bu varyantların geçişlerini incelemeyen, yüksek sayıda kontrol ve hasta gruplarında bu varyantları taramadan, net bir sonuca ulaşmak mümkün değildir. Daha fazla birey ve daha fazla etnik orijin çalışıldıkça, biyolojik önemi şu anda tam olarak bilinmeyen bu varyantların daha açıklık kazanması beklenmektedir.

*BRCA1* geni ekzon 13'de bilinen bir polimorfizm olan S1436S polimorfizmi, kızkardeşinin kızında da meme kanseri olan, 73 yaşında meme kanseri olmuş hastamızda (hasta no: 6) bulundu. Bu polimorfizm, Batı Avrupa, Yunanistan, İspanya, Amerika (beyaz ırk), İskoçya ve Çin'de meme, over, meme/over kanserli toplam 30'dan fazla bireyde saptanmıştır (47,127,128).

Çalışmamız sonucunda, *BRCA2* geninde de çeşitli polimorfizmler belirlendi. Bunlardan birisi, 46 no'lu erken yaş meme kanseri hastasında saptadığımız c.255 A-G değişimi nedeniyle oluşmuş olan P9P polimorfizmidir. Bu polimorfizm ilk olarak bizim olgumuzda tanımlanmış bir polimorfizmdir. Yine erken yaş meme kanseri olgularımızdan birinde (hasta no:45) ilk olarak tanımlanmış olan c.1803 T-C değişimi nedeniyle ortaya çıkan T525T polimorfizmi de *BRCA2* geninde saptanmış olan polimorfizmler arasındadır.

Erken yaş meme kanseri grubu üç olgumuzda (hasta no:39,45,63) *BRCA2* geni 11'inci ekzonda c.T2457C değişimi sonucu oluşan H743H polimorfizmi saptanmıştır. Bu polimorfizm daha önce Belçika'lı ve Alman üç hastada saptanmış ve normal bireylere ait toplam 332 kromozomun incelenmesi sonucunda C allelinin sıklığının %13 olduğu gösterilmiştir (47). *BRCA2* geninde saptadığımız diğer bir polimorfizm ise c.6741 C-G dönüşümüyle oluşmuş olan V2171V'dir. Bu polimorfizmin saptandığı 50 yaşında over kanseri tanısı almış olan soyağacı Şekil 4.8'de verilmiş olan 21 no'lu hastanın *BRCA1* geninde aynı zamanda E2903K mutasyonu da tanımlanmıştır. Bilinen bir polimorfizm olan V2171V polimorfizminin, Afrika'lı normal kontrollere ait 332 kromozomdaki sıklığının, %1.8 olduğu bildirilmiştir (47).

*BRCA2* geninde saptadığımız polimorfizmlerden sonuncusu c.7470 A-G dönüşümü sonucu oluşmuş S2414S polimorfizmdir. Ailesel over kanseri grubu hastalarından birinde (hasta no:3) saptanan bu polimorfizm, Belçika'da, İspanya'da, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Polonya'da, hastalarda daha önce saptanmıştır. Bu polimorfizmin 332 kromozomda global frekansı %25, Polonya'lı kontrol bireylere ait 288 kromozomda sıklığı %20 olarak belirlenirken, Friedman L ve ark.'larının çalışmasında 54 erkek meme kanserli bireyde polimorfik allel sıklığı %17 olarak bulunmuştur (47,129).

Önceki yayınlara göre Türk popülasyonu ile ilgili toplam 299 yüksek risk grubu birey çeşitli tarama yöntemleri kullanılarak *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin kalıtsal mutasyonları için analiz edilmiştir (67-69, 130) Literatürdeki çalışmalara ait bilgiler ve bu çalışmamıza ait bilgiler Çizelge 5.1'de özetlenmiştir. Çalışmalar ayrı ayrı değerlendirildiğinde farklı oranlarda mutasyon saptama yüzdeleri ortaya çıkmaktadır. Örneğin tüm ekzonların tarandığı bizim çalışmamızda bu oran yaklaşık %7 iken, sadece over kanserlerinin dahil edildiği çalışmada bu oran %17, yüksek risk grubu 15 ailesel meme ve/veya over kanseri olgusunun değerlendirildiği çalışmada bu oran %20 olarak ortaya çıkmaktadır (67,70). Diğer yandan 50 meme kanseri hastasıyla gerçekleştirilmiş olan ve sadece belli ekzonların (*BRCA1* ekzon 2.11.14.20 ve *BRCA2* ekzon 11) tarandığı diğer bir çalışmada aynı oran %6 olarak görülürken, hemen hemen benzer ekzonların 105 bireyde tarandığı başka bir çalışma sonucunda ise oran, %10 bulunmuştur (69,70). Bu çalışmada ise benzer ekzonlarda mutasyon saptama oranı yaklaşık %6 olarak belirlenmiştir. Her çalışmada farklı yöntemlerin kullanılması, genlerin farklı bölgelerinin değerlendirilmesi, farklı hasta seçim kriterleri ve incelenen hasta grup sayılarının az oluşu nedeniyle böyle bir fark ortaya çıkmış olabilir. Çalışmamızdaki olgular da eklendiğinde Türk toplumunda *BRCA1* ve *BRCA2* genleri açısından tüm ekzonların ya da bazı ekzonların tarandığı birey

sayısı toplam 374'tür ve her iki genden birinde mutasyon taşıyan bireylerin sayısı 41'dir. Eğer kümülatif olarak değerlendirilirse Türk toplumu için meme/over kanseri gruplarında *BRCA* gen mutasyon oranı en az yaklaşık %11 (41/374) olarak ortaya çıkmaktadır.

**Çizelge 5.1:** Popülasyonumuzda yapılmış olan *BRCA* genlerinde mutasyon taraması çalışmalarının özeti

Çalışılan hasta sayısı ve grupları	Taranan ekzonlar	Kullanılan yöntem	Hastalık yapıcı mutasyon saptama oranı (yüzde)	Kaynak
15 meme ve/veya over kanseri (ailesel)	Tüm kodlayıcı ekzonlar	PTT ya da CSGE	3/15 (% 20)	(67)
53 meme ve/veya over kanseri (ailesel), 52 erken yaş meme kanseri	<i>BRCA1</i> : ekzon 2,11,14,20 <i>BRCA2</i> : ekzon 10,11	PTT ya da heterodupleks analizi	11/105 (%10)	(68)
6 kalıtsal, 7 ailesel, 27 erken yaş, 10 erkek meme kanseri	<i>BRCA1</i> : ekzon 2,5,11,13,20 <i>BRCA2</i> : ekzon 11	Heterodupleks analizi	3/50 (%6)	(69)
15 ailesel, 87 ailesel olmayan over kanseri	38 hastada <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> 'nin tüm kodlayıcı bölgeleri, kalan hastalarda kodlayıcı bölgenin yaklaşık %60'ı	PTT	17/102 (%17)	(70)
5 erken yaş over, 41 erken yaş meme, 35 ailesel meme/over, 11 erkek meme, 6 bilateral meme, 4 meme ve over kans.	6 bireyde sadece <i>BRCA2</i> 'nin kodlayıcı bölgeleri, diğer hastalarda her iki genin de tüm kodlayıcı bölg.	DGGE ya da PTT	7/102 (% 7)	(126), mevcut çalışma

Çizelge 5.2 ve 5.3'te bu çalışmalarda saptanmış olan sırasıyla *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları listelenmiştir. Çalışmamızın sonuçları da dahil edildiğinde *BRCA1* geninin de 20 çeşit mutasyon 26 bireyde tanımlanmıştır. Bunlardan, 2476delT ve 3870delTGTC ikişer bireyde, bir Ashkenazi mutasyonu olan 5382 ins C mutasyonu ise beş bireyde tanımlanmıştır. Diğer mutasyonların

hepsi bireye özgül mutasyonlardır. *BRCA2* geni için ise daha az olan tanımlanan mutasyon sayısı 15 bireyde 14'tür. *BRCA2*'de daha az mutasyon bulunmuş olmasının en önemli nedenlerinden biri bu gen için yapılmış tarama çalışmalarının daha az oluşu olabilir. *BRCA2* geninde iki bireyde tanımlanan mutasyon 5295insA mutasyonudur. Çalışmamızda ise hiçbir hastalık yapıcı mutasyon birden fazla bireyde tanımlanmamıştır. Mutasyonların büyük bölümü her iki gende de genin yarısından fazlasını kapsayan 11'inci ekzonlarında saptanmıştır. Bunun nedeni de büyük çoğunlukla bu ekzonların mutasyon taramasına alınmış olması olabilir. Bu nedenle Çizelge 5.2 ve 5.3'e göre mutasyonların gende oluşturdıkları herhangi bir hotspot mutasyon bölgesi görülmemektedir. Ayrıca bu bulgulara göre, popülasyonumuz için herhangi bir baskın mutasyondan söz etmek de mümkün olmamaktadır.

Etnik olarak farklı popülasyonlarda yüksek risk taşıyan ailelerde kalıtsal mutasyonların oranları da farklılık göstermektedir. Örneğin bu oran Belçika'da %33 (14/42 aile), Batı-İsveç'te %42 (26/62 aile), İspanya'da %25 (8/32 aile) olarak rapor edilmiştir (49,131,132). Ortadoğu popülasyonlarında bu oran dikkat çekici bir şekilde düşmektedir. İran'lı toplam 22 yüksek risk ailenin *BRCA1* geninin taranması sonucunda hiçbir patojenik mutasyon tanımlanmamıştır (64). Yirmibeş yüksek risk non-Askenazi Yahudisi bireyde yapılan çalışmanın sonucunda da benzer şekilde her iki gende de hiçbir patolojik mutasyon bulunmamıştır (100). Bu nedenle popülasyonumuz da dahil olmak üzere Ortadoğu popülasyonlarında meme/over kanserlerine kalıtsal yatkınlıkta *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin kalıtsal mutasyonlarının katkısının az olduğu görülmektedir. Mutasyon bulunma oranının az olma nedenleri arasında mutasyonların, genlerin promotor ve intronik bölgeleri gibi analiz edilmeyen bölgelerde olma olasılığı olabileceği gibi, mutasyonların PCR'a dayalı bu tarama yöntemleriyle saptanamaması da olabilir. Ancak bizim bu çalışmada kullanmış olduğumuz DGGE yönteminin mutasyon bulma oranı %95-%100 olarak tahmin edildiği için, saptamış olduğumuz mutasyon oranının kullanılan teknik kısıtlamalar nedeniyle düşük olmadığı düşüncesindeyiz (133,134). Ayrıca henüz tanımlanmamış yatkınlık genlerinin meme/over kanseri ailelerinde kümelenmelere neden olmuş olması da etkili olmuş olabilir.

**Çizelge 5.2:** Popülasyonumuzda saptanan *BRCA1* mutasyonlarının tümü

Mutasyonun adı	Ekzon	Kaç bireyde gözleendiği	Hasta grubu	Kaynak
158 insA	2	1	Ailesel meme kanseri	(69)
1201 insA	11	1	Erkek meme kanseri	(69)
1623delTTAAA	11	1	Meme kanseri	(68)
1815del A	11	1	Over kanseri	(70)
2073del A	11	1	Over kanseri	(70)
2137delA	11	1	Over kanseri	(70)
2139 delC	11	1	Ailesel meme kanseri	(68)
2476delT	11	2	Ailesel over kanseri	(68,70)
2990insA	11	1	Ailesel over kanseri	(126)
3726 C-T	11	1	Ailesel over kanseri	(126) *
3819delGTAAA	11	1	Ailesel meme kanseri	(68)
3870delTGTC	11	2	Ailesel over kanseri	(70)
IVS11.1 G-A	İntron 11	1	Ailesel meme/over kanseri	*
4508delC	14	1	Ailesel meme kanseri	(68)
IVS14.1 del G	İntron 14	1	Ailesel meme kanseri	(68)
5055delG	16	1	Ailesel over kanseri	(70)
5154delCT	17	1	Ailesel meme/over kanseri	*
5382 ins C	20	5	Meme ve/veya over kanseri	(67,68,70)
5563 G-A	23	1	Ailesel over kanseri	(70)
5622 C-T	24	1	Meme ve/veya over kanseri	(67)

\* İşareti bu çalışmada saptanan mutasyonları göstermektedir.

Saptanan mutasyon oranını etkileyebilen diğeri bir faktör de yüksek risk bireylerin seçim kriterleridir. Örneğin, yapılan bir çalışmada en az üç hasta bireyin olduğu 148 ailede 16 *BRCA1* ve 13 *BRCA2* mutasyonu (toplam %19.6) tanımlanırken, beşden fazla hasta birey olan 39 ailede bu oranın %33.3 olduğu bildirilmiştir (135). Bu nedenle bizim çalışmamızda da bulunan mutasyon oranının düşük olması, çalışmaya dahil edilen kansere yatkın ailelerin sayısının az oluşundan kaynaklanmış olabilir. Çünkü çalışmamıza, beşden fazla hasta birey bulunan sadece bir aile, dört hasta birey bulunan iki aile, ve üç hasta birey olan yedi aile olmak üzere hasta birey sayısının üç ve daha yüksek olduğu toplam 10 aile dahil edilmiştir. Ailesinde kendisinden başka dört hasta birey bulunan hastamızda (hasta no:5) herhangi bir mutasyon saptanamamıştır ancak, ailesinde kendisinden başka iki hasta bireyin bulunduğu iki hastanın (hasta no: 12,49) ikisinde de

hastalık yapıcı olduğu tahmin edilen mutasyonlar bulunmuştur. Sonuç olarak, sadece ailelerinde toplam hasta birey sayısının üç ve üstü olan aileleri ele aldığımızda mutasyon oranı %20'dir (2/10).

**Çizelge 5.3:** Popülasyonumuzda saptanan *BRCA2* mutasyonlarının tümü

Mutasyonun adı	Ekzon	Kaç bireyde gözleendiği	Hasta grubu	Kaynak
1529delAAAG	10	1	Bilateral meme kanseri	*
1621insT	10	1	Erken yaş meme	*
3034delAAAC	11	1	Ainsel meme kanseri	(69)
3414delTCAG	11	1	Meme ve/veya over kanseri	(67)
3693delTT	11	1	Over kanseri	(70)
3976insA	11	1	Over kanseri	(70)
4391delT	11	1	Over kanseri	(70)
5295insA	11	2	Meme/over kanseri	(68,70)
5950delCT	11	1	Over kanseri	(70)
6630delTAACT	11	1	Over kanseri	(70)
6656delC	11	1	Ainsel meme kanseri	(69)
6880insG	11	1	Ainsel meme kanseri	(69)
8643insA	19	1	Over kanseri	(70)
9255delT	23	1	Erken yaş meme kanseri	(126)

\* İşareti bu çalışmada saptanan mutasyonları göstermektedir.

*BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tüm ekzonların taranması oldukça zaman alıcı ve pahalıdır. Askenazi ve Rus popülasyonlarında kurucu mutasyon olarak görülen *BRCA1* geni 5382insC mutasyonu popülasyonumuzda yapılmış olan daha önceki çalışmalarda beş farklı bireyde saptanmıştır. Buna rağmen, bu çalışmada *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde hiçbir kurucu (founder) mutasyon belirlenmemiştir. Ancak yine de Türk bireylerin *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin bütünüünün analizi yapılmadan önce 5383insC mutasyonu açısından değerlendirilmelerinin yararlı olacağı görüşündeyiz. Ayrıca prediktif amaçlarla *BRCA* genlerinde mutasyon taraması çalışmaları yapılmadan önce ilgili anabilim dallarının bir araya gelip ortak bir strateji planı geliştirmesi, hastaya test öncesinde ve test sonrasında genetik danışma verilmesi, ve bu basamaklar gerçekleştirilirken Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'dan eğitim, kültürel, sosyal ve ekonomik açıdan farklı olan toplumumuzun özelliklerinin göz önünde bulundurulması oldukça önemlidir.

Sonuç olarak *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin kalıtsal mutasyonlarının oranı popülasyonumuzda meme/over kanseri yatkınlığına sahip ailelerde %11 civarındadır ve herhangi bir baskın mutasyon şimdiye kadar tanımlanmamakla birlikte mutasyon dağılımı son derece heterojendir. Mutasyon dağılımındaki heterojenitenin ve özellikle mutasyonların ailelere özgül olmasının genetik danışmayı güçleştirebileceği tahmin edilmektedir.

Bundan sonraki çalışmalarda, *BRCA1* ve *BRCA2* dışındaki diğer yatkınlık genlerinin (büyük olasılıkla düşük penetranslı) araştırılması, modifiye edici genlerin ve SNP'lerin araştırılması meme ve over kanserlerinin genetik etiyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Strachan T, Read AP (1999) Human Molecular Genetics, Second Edition BIOS Scientific Publishers Ltd, ISBN 0-471-33061-2.
2. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF (2001) Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Sixth Edition. W.B. Saunders Company, ISBN 0-7216-6902-6.
3. Tuncer İ, Burgut R, Bozdemir N, Coşar EF (1994) Türkiye'de Kanser Sıklığı. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi.
4. Bundred NJ (2001) Prognostic and Predictive factors in breast cancer. Cancer Treatment Reviews 27:137-142.
5. Fidaner C, Eser SY, Parkin DM (2001) Incidence in İzmir in 1993-1994: first results from İzmir Cancer Registry. European Journal of Cancer 37:83-92.
6. Topuz E (1997) Meme kanseri. İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Yayınları 3.
7. Vancer AJ, Sherman JH, Luciana DS (1994) Human Physiology The Mechanisms of Body Function, Sixth Edition. McGraw-Hill, Inc. ISBN 0-07-113761-0.
8. Tucher A, Ng YY (2001) Textbook of Mammography, Second Edition. Churchill Livingstone. ISBN 044-3063400.
9. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, Çeviri Editörü: Prof.Dr.U.Çelikbaş (2000) Basic Pathology. Nobel Tıp Kitabevleri . ISBN 975-420-044-0.
10. Tannock IF, Hill RP (1998) The Basic Science of Oncology, Third Edition. McGraw-Hill ISBN 0-07-105484-7.
11. Sauhami RL, Tannock I, Hohenberger P, Horiot JC (2002) Oxford Textbook of Oncology, Second Edition. Oxford University Press ISBN 0-19-262926-3.
12. Welm B, Behbod F, Goodell MA, Rosen JM (2003) Isolation and Characterization of functional mammary gland stem cells. Cell Prolif 36(Suppl 1):17-32
13. Sell S, Pierce GB (1994) Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelialcancers. Lab Invest 70:6.
14. Tsai YC, Lu Y, Nichols PW, Zlotnikov G, Jones PA, Smith HS (1996) Contiguous patches of normal human mammary epithelium derived from a single stem cell: implications for breast carcinogenesis. Cancer Res 56: 402-12.
15. Fuchs E, Segre JA (2000) Stem cells: a new lease on life. Cell 100:143.

16. Clarke RB, Anderson E, Howell A, Potten CS (2003) Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif* 36 (Suppl.1):45-58.
17. Epstein RJ (2003) *Human Molecular Biology, An Introduction to the Molecular Basis of Health and Disease*. First Edition. Cambridge University Press. ISBN 0-521-64481.
18. Krauss G (1999) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Second Edition. Wiley-VCH.
19. Alkarain A, Slingerland (2004) Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 6:13-21.
20. Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW (2002) Isolation, immortalisation and characterisation of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev* 52:382.
21. Evans DG, Howell A (2004) Are BRCA1- and BRCA2-related breast cancers associated with increased mortality? *Breast Cancer Res* 6:E7.
22. Offit K (1998) *Clinical Cancer Genetics*. First Edition. Wiley-Liss, Inc.
23. Chau N, Ashcroft M (2004) Akt2: a role in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 6:55-57.
24. Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinnavar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY, Slamon DJ (2003) Overexpression of AKT2/protein kinase B beta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63:196-206.
25. Kleer CG, Zhang Y, Pan Q, Gallagher G, Wu M, Wu ZF (2004) WISP3 and RhoC guanosine triphosphate cooperate in the development of inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res* 6:R110-R115.
26. Atasü T, Kılıç A (1999) *Jinekolojik Onkoloji*. İkinci baskı. İstanbul Logos Yayıncılık ISBN975-349-018-6.
27. Erten O, Uslu T (1998) *Jinekolojik Onkoloji*. Birinci baskı. İzmir D.E.Ü. Rektörlük Matbaası ISBN 975-6981-148.
28. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Keith DE (1990) Studies of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 50:4087-4091.
29. Choi KC, Auersperg N, Leung PCK (2003) Mitogen-activated protein kinases in normal and (pre)neoplastic ovarian surface epithelium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:71.
30. Scambia G, Catozzi L, Panici PB (1993) Expression of rasoncogene p21 protein in normal and neoplastic ovarian tissues: Correlation with histopathologic features and receptors for estrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor. *Am J Obstet Gynecol* 168:71-78.

16. Clarke RB, Anderson E, Howell A, Potten CS (2003) Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif* 36 (Suppl. 1):45-58.
17. Epstein RJ (2003) *Human Molecular Biology, An Introduction to the Molecular Basis of Health and Disease*. First Edition. Cambridge University Press. ISBN 0-521-64481.
18. Krauss G (1999) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Second Edition. Wiley-VCH.
19. Alkarain A, Slingerland (2004) Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 6:13-21.
20. Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW (2002) Isolation, immortalisation and characterisation of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev* 16:382.
21. Evans DG, Howell A (2004) Are BRCA1- and BRCA2-related breast cancers associated with increased mortality? *Breast Cancer Res* 6:E7.
22. Offit K (1998) *Clinical Cancer Genetics*. First Edition. Wiley-Liss, Inc.
23. Chau N, Ashcroft M (2004) Akt2: a role in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 6:55-57.
24. Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY, Slamon DJ (2003) Overexpression of AKT2/protein kinase B beta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63:196-206.
25. Kleer CG, Zhang Y, Pan Q, Gallagher G, Wu M, Wu ZF (2004) WISP3 and RhoC guanosine triphosphate cooperate in the development of inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res* 6:R110-R115.
26. Atasü T, Kılıç A (1999) *Jinekolojik Onkoloji*. İkinci baskı İstanbul Logos Yayıncılık ISBN975-349-018-6.
27. Erten O, Uslu T (1998) *Jinekolojik Onkoloji*. Birinci baskı İzmir D.E.Ü. Rektörlük Matbaası ISBN 975-6981-148.
28. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Keith DE (1990) Studies of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 50:4087-4091.
29. Choi KC, Auersperg N, Leung PCK (2003) Mitogen-activated protein kinases in normal and (pre)neoplastic ovarian surface epithelium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:71.
30. Scambia G, Catozzi L, Panici PB (1993) Expression of ras oncogene p21 protein in normal and neoplastic ovarian tissues: Correlation with histopathologic features and receptors for estrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor. *Am J Obstet Gynecol* 168:71-78.

31. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harsman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Benent LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rossteck P, Lai M, Barret C, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick M (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266:66-71.
32. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G, Barfoot M, Hamoudi R, Patel S, Rice C, Biggs P, Hashim Y, Smith A, Connor F, Arason A, Gudmundsson J, Ficencic D, Keisell D, Ford D, Tonin P, Bishop DT, Spurr NK, Ponder BAJ, Eeles R, Pete J, Devilee P, Carnelisse C, Lynch H, Narod S, Lenior G, Eglisson V, Bjork-Barkadottir R, Easton DF, Bentley DR, Futra PA, Ashworth A, Stratton MR (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378:789-92.
33. Venkitaraman AR (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108:171-82.
34. Easton DF (1999) How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast Cancer Res* 1:14-7.
35. Nathanson KL, Weber BL (2001) 'Other' breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. *Hum Mol Genet* 10(7):715-20.
36. Thompson D, Szabo CI, Mangion J, Oldenburg RA, Odefrey F, Seal S, Barfoot R, Kroze-Jansema K, Teare D, Rahman N, Renard H, Consortium K, Mann G, Hopper JL, Buys SS, Andrulis IL, Senie R, Daly MB, West D, Ostrander EA, Offit K, Peretz T, Osorio A, Benitez J, Nathanson KL, Sinilnikova OM, Olah E, Bignon Y, Ruiz P, Badzioch MD, Vasen HFA, Futreal AP, Phelan CM, Narod SA, Lynch HT, Ponder BAJ, Eeles RA, Meijers-Heijboer H, Stoppa-Lyonnet D, Couch FJ, Eccles DM, Evans DG, Chang-Claude J, Lenoir G, Weber BL, Devilee P, Easton DF, Goldgar DE, Stratton MR (2002) Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. *PNAS* 99(2):827-31.
37. Bergfeldt K, Nilsson B, Einhorn S, Hall P (2001) Breast cancer risk in women with a primary ovarian cancer - a case-control study. *European Journal of Cancer* 37: 2229-34.
38. Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761-2.
39. Patel KJ, Yu VPCC, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA, Venkitaraman AR (1998) Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* 1:347-57.

40. Yu VPCC, Koehler M, Steinlein C, Schmid M, Hanakahi L, van Gool A, West SC, Venkitaraman AR (2000) Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* 14:1400-6.
41. Xu X, Weaver KU, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, Harris CC, Ried T, Deng CX (1999) Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* 3:389-95.
42. Welch PL, Owens KN, King MC (2000) Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *TIG* 16 (2): 69-74
43. Powell SN, Kachnic LA (2003) Roles of NRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* 22:5784-5791.
44. Welch PL, King MC (2001) BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10(7):705-13
45. Hamann U, Liu X, Bungardt N, Ulmer HU, Bastert G, Sinn HP (2003) Similar contributions of BRCA1 and BRCA2 germline mutations to early-onset breast cancer in Germany. *Eur J Hum Genet*. 11(6):464-7.
46. Frank TS, Manley SA, Olopade OI, Cummings S, Garber JE, Bernhardt B, Antman K, Russo D, Wood ME, Mullineau L, Isaacs C, Peshkin B, Buys S, Venne V, Rowley PT, Loader S, Offit K, Robson M, Hampel H, Brener D, Winer EP, Clark S, Weber B, Strong LC, Thomas A, et al. (1998) Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol* 16(7):2417-25.
47. Breast cancer information core (BIC) veritabanı : <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>
48. Chappuis PO, Nethercot V, Foulkes WD (2000) Clinico-pathological characteristics of BRCA1- and BRCA2- related breast cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 18:287-95.
49. Einbeigi Z, Bergman A, Kindblom LG, Martinsson T, Meis-Kindblom JM, Nordling M, Suurkula M, Wahlstrom J, Wallgren A, Karlsson P (2001) A founder mutation of the BRCA1 gene in Western Sweden associated with a high incidence of breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer* 15:1904-9.
50. Arason A, Jonasdottir A, Barkardottir RB, Bergthorsson JT, Teare MD, Easton DF, Egilsson V (1998) A population study of mutations and LOH at breast cancer gene loci in tumours from sister pairs: two recurrent mutations seem to account for all BRCA1/BRCA2 linked breast cancer in Iceland. *J Med Genet* 35(6):446-9
51. Sarantaus L, Huusko P, Eerola H, Launonen V, Vehmanen P, Rapakko K, Gillanders E, Syrjakoski K, Kainu T, Vahteristo P, Krahe R, Paakkonen K, Hartikainen J, Blomqvist C, Lopponen T, Holli K, Ryyanen M, Butzow R, Borg A, Wasteson Arver B, Holmberg E, Mannermaa A, Kere J, Kallioniemi OP, Winqvist

- R, Nevanlinna H (2000) Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland. *Eur J Hum Genet* 8(10):757-63.
52. Kraje M, Greve J, Goelen G, Teugels E (2002) BRCA2 founder mutation in Slovenian breast cancer families. *Eur J Hum Genet* 10(12):879-82.
  53. Janiszewska H, Haus O, Lauda-Swieciak A, Pasinska M, Laskowski R, Szymanski W, Gorski B, Lubinski J (2003) Frequency of three BRCA1 gene founder mutations in breast/ovarian cancer families from the Pomerania-Kujawy region of Poland. *Clin Genet* 64:502-8.
  54. Gorski B, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Grzybowska E, Mackiewicz A, Stawicka M, Bebenek M, Sorokin D, Fiszer-Maliszewska L, Haus O, Janiszewska H, Niepsuj S, Gozdz S, Zaremba L, Posmyk M, Pluzanska M, Kilar E, Czudowska D, Wasko B, Miturski R, Kowalczyk JR, Urbanski K, Szwiec M, Koc J, Debniak B, Rozmiarek A, Debniak T, Cybulski C, Kowalska E, Toloczko-Grabarek A, Zajaczek S, Menkiszak J, Medrek K, Masojc B, Mierzejewski M, Narod SA, Lubinski J (2004) A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *Int J Cancer* 110(5):683-6.
  55. Hakansson S, Johannsson O, Johannsson U, Sellberg G, Loman N, Gerdes AM, Holmberg E, Dahl N, Pandis N, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A (1997) Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 60(5):1068-78.
  56. Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drusedau M, Hogervorst FB, Hageman S, Arts PJ, Ligtenberg MJ, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, Vasen HF, Cornelisse CJ, van 't Veer LJ, Bakker E, van Ommen GJ, Devilee P (1997) BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 17(3):341-5.
  57. Peelen T, van Vliet M, Petrij-Bosch A, Mieremet R, Szabo C, van den Ouweland AM, Hogervorst F, Brohet R, Ligtenberg MJ, Teugels E, van der Luijt R, van der Hout AH, Gille JJ, Pals G, Jedema I, Olmer R, van Leeuwen I, Newman B, Plandsoen M, van der Est M, Brink G, Hageman S, Arts PJ, Bakker MM, Devilee P, et al. (1997) A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 60(5):1041-9.
  58. Llorca G, Mnoz CY, Tuser MP, Guillermo IB, Lluch JR, Ble AE, Franco MA (2002) Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum Mutat* 19(3):307.
  59. Khoo US, Chan KY, Cheung AN, Xue WC, Shen DH, Fung KY, Ngan HY, Choy KW, Pang CP, Poon CS, Poon AY, Ozcelik H. (2002) Recurrent BRCA1 and BRCA2 germline mutations in

- ovarian cancer: a founder mutation of BRCA1 identified in the Chinese population *Hum Mutat* 19(3):307-8
60. Sekine M, Nagata H, Tsuji S, Hirai Y, Fujimoto S, Hatae M, Kobayashi I, Fujii T, Nagata I, Ushijima K, Obata K, Suzuki M, Yoshinaga M, Umesaki N, Satoh S, Enomoto T, Motoyama S, Tanaka K; Japanese Familial Ovarian Cancer Study Group. (2001) Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 and clinicopathologic analysis of ovarian cancer in 82 ovarian cancer families: two common founder mutations of BRCA1 in Japanese population. *Clin Cancer Res.* 7(10):3144-50.
  61. Tereschenko IV, Basham VM, Pomder BA, Pharoah PD (2002) BRCA1 an BRCA2 mutauions in Russion familial breast cacner cases. *Hum Mutat* 19(2):184.
  62. Kang HC, Kim IJ, Park JH, Kwon HJ, Won YJ, Heo SC, Lee SY, Kim KH, Shin Y, Noh DY, Yang DH, Choe KJ, Lee BH, King SB, Park JG (2002) Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 in Korean breast and/or ovarian cancer families. *Hum Mutat*; 20(3):235.
  63. Matsuda DL, Liede A, Kwan E, Mapua CA, Cutiongco EM, Tan A, Narod SA (2002) *Int J Cancer* 98(4): 596-603.
  64. Ghaderi A, Talei A, Farjadian S, Mosalaei A, Doroudhi M, Kimura H (2001) Germline BRCA1 mutations in Iranian women with breast cancer. *Cancer letters* 165:87-94.
  65. Ruiz-Flores P, Sinilnikova OM, Badzioch M, Calderon-Garciduenas AL, Chopin S, Fabrice O, Gonzalez-Guerrero JF, Szabo C, Lenoir G, Goldgar DE, Barrera-Saldana HA (2002) BRCA1 and BRCA2 mutation analysis of early-onset and familial breast cancer cases in Mexico. *Hum Mutat.* 20(6):474-5.
  66. Patmasiriwat P, Bhothisuwan K, Sinilnikova OM, Chopin S, Methakijvaroon S, Badzioch M, Padungsutt P, Vattanaviboon P, Vattanasapt V, Szabo C, Saunders GF, Goldgar D, Lenoir GM (2002) Analysis of breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2 in Thai familial and isolated early-onset breast and ovarian cancer. *Hum Mutat.* 20(3):230.
  67. Balci A, Huusko P, Paakkonen K, Launonen V, Uner A, Ekmekci A, Winqvist R (1999) Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in Turkish cancer families: a novel mutation BRCA2 3414del4 found in male breast cancer. *Eur J Cancer* ;35(5):707-10.
  68. Yazici H, Bitisik O, Akisik E, Cabioglu N, Saip P, Muslumanoglu M, Glendon G, Bengisu E, Ozbilen S, Dincer M, Turkmen S, Andrulis IL, Dalay N, Ozcelik H (2000) BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish breast/ovarian families and young breast cancer patients. *Br J Cancer* ;83(6):737-42.
  69. Ozdag H, Tez M, Sayek I, Muslumanoglu M, Tarcan O, Icli F, Ozturk M, Ozcelik T (2000) Germ line BRCA1 and BRCA2 gene mutations in Turkish breast cancer patients. *Eur J Cancer.* 36(16):2076-82

70. Yazici H, Glendon G, Yazici H, Burnie SJ, Saip P, Buyru F, Bengisu E, Andrulis IL, Dalay N, Ozcelik H (2002) BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish familial and non-familial ovarian cancer patients: a high incidence of mutations in non-familial cases. *Hum Mutat.* 20(1):28-34.
71. Lakhani SR (2000) The pathology of familial breast cancer morphological aspects. *Breast Cancer Research* 1(1):31-35.
72. Buyru N, Tigli H, Dalay N (2003) p53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep.* 10(3):711-4.
73. Buyru N, Tezol A, Yosunkaya-Fenerci E, Dalay N (2003) Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast cancer. *Exp Mol Med* 35(6):550-5.
74. Ambrosone CB, Moysich KB, Furberg H, Freudenheim JL, Bowman ED, Ahmed S, Graham S, Vena JE, Shields PG (2003) CYP17 genetic polymorphism, breast cancer, and breast cancer risk factors. *Breast Cancer Res* 5(2):R45-51
75. Ergul E, Sazci A, Utkan Z, Canturk NZ (2003) polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer. *Tumour Biol* 24(6):286-90.
76. Han W, Kang D, Lee KM, Kim HJ, Ahn SJ, Kim SW, Chung KW, Lee ES, Noh DY (2003) Full sequencing analysis of estrogen receptor-alpha gene polymorphism and its association with breast cancer risk. *Anticancer Res* 23(6C):4703-7.
77. Kang HJ, Kim SW, Kim HJ, Ahn SJ, Bae JY, Park SK, Kang D, Hirvonen A, Choe KJ, Noh DY (2002) Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk. *Cancer Lett.* 178(2):175-80.
78. Kocabas NA, Sardas S, Cholerton S, Daly AK, Karakay AE (2002) Cytochrome p450 CYP1B1 and catechol O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphisms and breast cancer susceptibility in Turkish population. *Arch Toxicol* 76(11):643-9.
79. Thyagarajan B, Brott M, Mink P, Folsom AR, Anderson KE, Oetting WS, Gross M (2004) CYP1B1 and CYP19 gene polymorphisms and breast cancer incidence: no association in the ARIC study. *Cancer Lett.* 207(2):183-9.
80. Aktas D, Guney I, Alikasifoglu M, Yuce K, Tuncbilek E, Ayhan A (2002) CYP1A1 gene polymorphism and risk of epithelial ovarian neoplasm. *Gynecol Oncol* 86(2): 124-8.
81. Sevinç A, Yannoukakos D, Manguoglu E, Luleci G, Akyerli C, Tez M, Sayek I, Bozkurt B, Aygun N, Yuluğ I, Özçelik T No Association Between RNASEL Arg462Gln Variant and Breast Cancer Risk (Basım aşamasındadır)
82. Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Kraan J, Morreau H, Klijn JG, Hoogerbrugge N, Ligtenberg MJ, van Asperen CJ, Vasen HF, Meijers C, Meijers-Heijboer H, de Bock TH, Cornelisse CJ, Devilee P (2003) The CHEK2\*1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple-case families. *Cancer Res.* 63(23):8153-7.



83. Bennett RL, Hampel HL, Mandell JB, Marks JH (2003) Genetic counselors: translating genomic science into clinical practice. *The Journal of Clinical Investigation* 112(9):1274-1279.
84. Hopwood P (2000) Breast cancer risk perception: what do we know and understand? *Breast Cancer Research* 2:387-391.
85. Sasco AJ (2003) Breast cancer and the environment. *Hormone Research* 60 (suppl 3):50.
86. Welch PL, King MC (2001) BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10(7):705-13.
87. Adebamowo CA, Ogundiran TO, Adenipekun AA, Oyeseun RA, Campbell OB, Akang EE, Rotimi CN, Olopade OI (2003) Waist-hip ratio and breast cancer risk in urbanized Nigerian women. *Breast Cancer Research* 5(2):R18-R24.
88. Beral V, Million Women Study Collaborators (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the million women study. *Lancet* 362 (9382):419-27.
89. Baghurst PA, Rohan TE (1994) High-fiber diets and reduced risk of breast cancer. *Int J Cancer* 56:173-6.
90. Pellucchi C, Vecchia CL, Chatenoud L, Negri E, Conti E, Montella M, Caglia S, Maso LD, Franceschi S (2001) Dietary fibres and ovarian cancer risk. *Eur J Cancer* 37:2235-9.
91. Brown NS, Bicenell R (2001) Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 3:323-7.
92. Agarwall S, Rao AV (2000) Tomato lycopene and its role in human health and chronic disease. *CMAJ* 163(6):739-44.
93. Shao W, Brown M (2004) Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res* 6:39-52.
94. Spigel DR, Burstein HJ (2002) HER2 overexpressing metastatic breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 3:163-74.
95. Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ (2003) Vitamin D-3 Receptor as a Target for Breast Cancer Prevention. *American Society for Nutritional Sciences. Supplement* 2425-2433.
96. DiSaia P, Bloss JD (2003) Treatment of ovarian cancer: new strategies. *Gynecologic Oncology* 90:S24-S32.
97. Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, Yasugi T, Taketani Y, Hirohashi S (2003) Expression Profiling in Ovarian Clear Cell Carcinoma: Identification of Hepatocyte Nuclear Factor 1-beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathology* 163(6):2503-12.
98. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from humna nucleated cells *Nucleic Acids Res* 16:215.
99. Hogervorst FBL, Cornelis LS, But M, van Vliet M, Oosterwijk C, Olmer R, Bakker B, Klijn JGM, Vasen HFA, Meijers-Heijboer R,

- Menco FH, Cornelisse DJ, den Dunnen JT, Devilee P, van Ommen GJB (1995) Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 10:208-12.
100. Shiri-Sverdlov R, Oefner p, Gren L, Gershoni Baruch R, Wagner T, Kruglikova A, Haitchick S, Hofstra RMW, Papa MZ, Mulder I, Rizel S, Bar sade RB, Dagan E, Abdeen Z, Goldman B, Friedman E (2000) Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in Ashkenazi and non Ashkenazi women with familial breast cancer. *Human Mutatin* 16:491-501.
  101. Dowsett M (2000) New hurdles for translational research. *Breast Cancer Res* 2:241-3.
  102. Veer LJ, Hongyue D, Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Bernards R, Friemd DH (2003) expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 5:57-58.
  103. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8;100(14):8418-23.
  104. Hemminki K, Granström C (2002) Morphological types of breast cancer in family members and multiple primary tumours: is morphology genetically determined? *Breast Cancer REs.* 4:R7.
  105. Tonin P (2000) Genes implicated in hereditary breastcancer syndromes. *Seminars in Surgical Oncology* 18:281-286.
  106. Amstrong K (2001) Genetic susceptibility to breast cancer *JAMA* 285 (22): 2907-9.
  107. Reynolds T (2003) Study clarifies risk of breast, ovarian cancer among mutation carriers. *Journal of National Cancer institute* 95(24):1816-1818.
  108. Nicoletto MO, Donach M, Nicole A, Artioli G, Bana G, Mnfardini S (2001) BRCA1 and BRCA2 mutations as prognostic factor in clinical and genetic counselling.
  109. Frolov A, Provse AH, Vanderveer L, Bove B, Wu H, Godwin AK (2002) DNA array-based method for detection of large rearrangements in the BRCA1 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 35(3):232-41.
  110. Gad S, Bieche I, Barrois M, Casilli F, Pages-Berhouet S, Dehainault C, Gauthier-Villars M, Bensimon A, Aurias A, lidereau R, Bressac-de Pailerets B, Tosi M, Mazoyer S, Stoppa-Lyonnet D (2003) Characterisation of a 161 kb deletion extending from the NBR1 to the BRCA1 genes in a French breast-ovarian cancer family. *Hum Mutat* 21(6):654.
  111. Tancredi M, Sensi E, Cipollini G, Aretini P, Lombardi G, Critofano CD, Presciuttini S, Bevilacqua G, Caligo MA (2004) Haplotype analysis of BRCA1 gene reveals a new gene rearrangement: characterisation of a 19.9 KBP deletion. *Eur J Hum Genet.* May 26.

112. Hogervorst FB, Nedelof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluij I, Dommering C, ef S, Schouten JP, van't Veer LJ, Pals G (2003) Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res.* 63(7):1149-53.
113. Cvetkovic D (2003) Early events in ovarian cancer *Reproductive Bioogy and Endocrinology* I:68.
114. Krauss G (1999) *Biochemistry of signal transduction and regulation.* Wiley -VCH, Second Edition.
115. Bear R, Lee WH (1998) Functional domains of the BRCA1 and BRCA2 proteins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3(4):403-11.
116. Monteiro AN, August A, Hanafusa H (1996) Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13595-9.
117. Brown TA (1999) *Genomes* Bios Scientific Publishers , First Edition
118. Fleming MA, Potter JD, Ramirez J, Ostrander GK, Ostrander EA (2003) Understanding missense mutations in the BRCA1 gene: An evolutionary approach. *PNAS* 100(3): 1151-6.
119. Xia X, Xie Z (2002) protein structure, neighbor effect and a new index of amino acid dissimilarities. *Mol Biol Evol* 19(1):58-67.
120. Dayoff MO, Scwards RM, Orcutt BC (1978) Atlas of protein sequence and structure vol:5 suppl:3 M.O.Dayoff ed. *Natl. Biomed Res. Found.* 345-58
121. Gonnet GH, Cohen MA, Benner SA (1992) Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* 256, 1443-5.
122. Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotik cells.
123. phelan CM, Kwan E, Jack E, Li S, Morgan C, Aube J, Hana D, Narod SA (2002) A low frequency of non-founder BRCA1 mutations in Ashkenazi Jewish breast-ovarian cancer families. *Hum Mutat* 20(5):352-7.
124. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (1991) *harper's Biochemistry* , Twenty-second edition.
125. Wong JMS, Ionescu D, Ingles CJ (2003) Interaction between BRCA2 and replication protein A is compromised by a cancer-predisposing mutation in BRCA2 *Oncogene* 22(1):28-33.
126. Majewski J, Ott J (2002) Distribution and characterization of regulatory elemenets in the human genome. *Genome Res.* 12(12):1827-36.
127. Konstantopoulou I, Kroupis C, Ladopoulou A, Pantazidis A, Boumba D, Lianidou ES, Petersen MB, Florentin L, Chiotellis E, Nounesis G, Efstathiou E, Skarlos D, Tsionou C, Fountzilias G, Yannoukacos D (2000) BRCA1 mutation analysis in

- breast/ovarian cancer families from Greece. *Hum Mutat.* 16(3):272-3.
128. Deng S, Wang Y, Ke Y, Xu G (2003) Analysis of the mutations of BRCA1 in 9 familiar breast cancer patients Beijing Da Xue Xue Bao. 35(4):373-6.
  129. Friedman LS, Gayther SA, Kurosaki T, Gordon D, Noble B, Casey G, Ponder BAJ, Anton-Culver H (1997) Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population.
  130. Manguoglu AE, Luleci G, Ozcelik T, Çolak T, Schayek H, Akaydin M, Friedman E (2003) Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish Breast and ovarian cancer patients. *Hum Mutat.* 21(4):444-5.
  131. Goelen G, Bonduelle M, Neyns B, De Greve J (1999) High frequency of BRCA1/2 germline mutations in 42 Belgian families with a small number of symptomatic subjects. *J Med Genet* 36:304-8.
  132. Osorio A, Barroso A, Martinez B, Cebran A, San Roman JM, Lobo F, Robledo M, Benitez J (2000) Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Br J Cancer* 82:1266-70.
  133. Cotton RGH (1997) *Mutation Detection*. Oxford University Press, Oxford, New York (Vol1).
  134. Taylor GR (1997) *Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA*, CRC Press.
  135. Vahteristo P, Eerola H, Tamminen A, Blomqvist C, Nevanlinna H (2001) A probability model for predicting BRCA1 and BRCA2 mutations in breast-ovarian cancer families. *Br J Cancer* 84:704-8.

**EKLER**

**MUTATION IN BRIEF**

## **Germline Mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* Genes in Turkish Breast/Ovarian Cancer Patients**

A. Esra Manguoglu<sup>1,2</sup>, Güven Lüleci<sup>1</sup>, Tayfun Özçelik<sup>3</sup>, Taner Çolak<sup>4</sup>, Hagit Schayek<sup>2</sup>, Mustafa Akaydin<sup>4</sup>, and Eitan Friedman<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey, <sup>2</sup> The Susanne-Levy Gertner Oncogenetics Unit, The Danek Gertner Institute of Genetics, Chaim Sheba Medical center, Tel-Hashomer, 52621, and the Sackler School of Medicine, Tel-Aviv University, Ramat Aviv Israel; <sup>3</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Bilkent University, Ankara 06533, Turkey; <sup>4</sup> Department of Surgery, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey

\*Correspondence to: Eitan Friedman M.D., Ph.D., Chief, The Susanne Levy Gertner Oncogenetics Unit, The Danek Gertner Institute of Genetics, Chaim Sheba Medical Center Tel-Hashomer, 52621 Israel; Tel : 972-3-530-3173; Fax: 972-3-535-7308; E-mail: eitan211@netvision.net.il or eitan211@sheba.health.gov.il

Grant sponsor: Middle East Cancer Consortium (MECC) to Eitan Friedman; Grant sponsors: Aspendos and Haifa Rotary Clubs; Moshe Greidinger Scholarship Fund.

Communicated by Mark H. Paalman

In this study we genotyped Turkish breast/ovarian cancer patients for *BRCA1/BRCA2* mutations: protein truncation test (PTT) for exon 11 *BRCA1* of and, multiplex PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for *BRCA2*, complemented by DNA sequencing. In addition, a modified restriction assay was used for analysis of the predominant Jewish mutations: 185delAG, 5382InsC, Tyr978X (*BRCA1*) and 6174delT (*BRCA2*). Eighty three breast/ovarian cancer patients were screened: twenty three had a positive family history of breast/ovarian cancer, ten were males with breast cancer at any age, in eighteen the disease was diagnosed under 40 years of age, one patient had ovarian cancer in addition to breast cancer and one patient had ovarian cancer. All the rest (n=30) were considered sporadic breast cancer cases. Overall, 3 pathogenic mutations (3/53-5.7%) were detected, all in high risk individuals (3/23 - 13%): a novel (2990insA) and a previously described mutation (R1203X) in *BRCA1*, and a novel mutation (9255delT) in *BRCA2*. In addition, three missense mutations [two novel (I42S, N2742S) and a previously published one (S384F)] and two neutral polymorphisms (P9P, P2532P) were detected in *BRCA2*. Notably none of the male breast cancer patients harbored any mutation, and none of the tested individuals carried any of the Jewish mutations. Our findings suggest that there are no predominant mutations within exon 11 of the *BRCA1* and in *BRCA2* gene in Turkish high risk families © 2003 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: *BRCA1*; *BRCA2*; DGGE; PTT; Turkish Population high risk for breast cancer

### **INTRODUCTION**

Breast cancer is the most common feminine malignancy worldwide, with more than 180,000 new cases diagnosed in the USA and 6,123 cases in Turkey [<http://www-dep.iarc.fr/dataava/infodata.htm>] Germline mutations in both *BRCA1* (17q21) and *BRCA2* (13q12) account for a substantial proportion of families with inherited predisposition to breast and/or ovarian cancer [Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995; Weber, 1998]. Mutation detection rate is highly dependent on the ethnicity of the population studied and the definition of

Received 10 September 2002; accepted revised manuscript 3 January 2003.

familial clustering of cancer [Szabo and King MC, 1997]. The majority of germline mutations within both genes, are mostly "private mutations", unique to each high-risk family [[http://www.nhgri.nih.gov/Intramuarl.research/Lab transfer/Bic](http://www.nhgri.nih.gov/Intramuarl.research/Lab%20transfer/Bic)]. There are a few examples of founder mutations within these two genes, mostly in genetic isolates such as the Icelandic population [Arason et al., 1998] and the Finnish population [Huusko et al., 1998], as well as subsets of Dutch and French families [Peelen et al., 1997; Szabo and King MC, 1997]. The most notable example of founder mutations in these genes is the Ashkenazi (East European) Jews [Struewing et al., 1995; Odduoux et al., 1996; Hartge et al., 1999], where three predominant mutations: 185delAG and 5382insC (BRCA1) and 6174delT (BRCA2) seem to account for a substantial proportion of high-risk families [Abeliovich et al., 1997; Szabo and King MC, 1997]. Approximately 40% of Ashkenazi patients with breast cancer diagnosed before the age of 40 [Hartge et al., 1999; Warner et al., 1999] and 29% of unselected Ashkenazi Jewish ovarian cancer patients [Modan et al., 2001] are carriers of one of these mutations. One of these mutations (185delAG) and a novel BRCA1 mutation (Tyr978X) were detected in non-Ashkenazi Jews [Abeliovich et al., 1997; Bruchim Bar-Sade et al., 1998; Shiri-Sverdlov et al., 2001] and rarely in non-Jewish individuals [Berman et al., 1996; Diez et al., 1998].

In Turkish high-risk families no predominant mutations have been reported [Balci et al., 1999; Ozdag et al., 2000; Yazici et al., 2000], but the combined number of Turkish individuals analyzed thus-far for germline mutations in both genes (n=170), is probably too small to draw such a conclusion. Furthermore, the previously published studies in Turkish high-risk families only partially analyzed the coding region of both genes using screening techniques that probably cannot detect all existing mutations.

The objective of this study was to expand the spectrum of germline mutations in *BRCA1/2* in Turkish high risk individuals, and evaluate the contribution, if any, of four Jewish predominant mutations in *BRCA1* (185delAG, 5382insC Tyr978X), and in *BRCA2* (6174delT) to breast cancer phenotype in Turkish patients.

#### PATIENTS AND METHODS

**Patient selection and recruitment** - Patients with histopathologically diagnosed breast cancer were eligible for participation. The study was approved by the institutional review board of all participating medical centers, and each participant signed a written informed consent. The participating centers were Bilkent University and Akdeniz University Faculty of Medicine Hospital, both in Turkey, and Jewish Turkish patients from the Chaim Sheba Medical Center in Israel. Eligible patients were divided into several subsets: familial breast cancer (FAMBC), were defined as having at least two additional first or second degree relatives with breast or ovarian cancer; early onset breast cancer (EOBC) were all breast cancer cases diagnosed under the age of 40 years; male patients with breast cancer (MBC); all the others who did not fit into one of these categories, were defined as sporadic breast cancer (SpBC).

**DNA extraction** - DNA was extracted from peripheral venous leukocytes by standard salting out protocol [Miller et al., 1988].

**Predominant Jewish mutations analysis** - Four predominant Jewish mutations were tested: the three "Ashkenazi" Jewish mutations in *BRCA1* (185delAG and 5382insC), *BRCA2* (6174delT) and a non-Ashkenazi Jewish mutation on *BRCA1* (Tyr978X). Mutation analysis schemes were based on PCR and restriction enzyme digests that distinguish the wild type from the mutant allele, as previously described [Odduoux et al., 1996; Rohlf et al., 1997; Shiri-Sverdlov et al., 2001]. For each mutation, a known mutation carrier was used as a positive control.

**Protein truncation test (PTT)** - Using forward primers containing a T7-promotor region and an eukaryotic translation initiation sequence PCR reactions were performed for PTT test of exon11 of *BRCA1* gene as previously described [Hogervorst et al., 1995; Shiri-Sverdlov et al., 2000].

**Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)** - Using previously described primers and conditions all coding exons of the *BRCA2* gene were PCR amplified and subsequent analysis of PCR products was performed using D-Gene model DGGE system (BioRad, Richmond, CA) [Wagner et al., 1999; Shiri-Sverdlov et al., 2000].

All PCR fragments showing abnormal migration pattern on DGGE, or a pattern suggestive of a truncating mutation on PTT were sequenced to verify and define the mutation. Each mutation was independently verified in

two sequencing reactions, from both strands PCR products were cleaned by High Pure PCR Product Purification Kit from Roche, and subjected to cycle sequencing using a fluorescence based cycle sequencing and dye terminator system. Products were cleaned by using Edge Biosystems Gel Filtration Cartridges. For the analysis ABI Prism 310 (PE biosystems, Foster City, CA) automated genetic analyser was employed, according to manufacturer's recommendations.

## RESULTS

**Patients' characteristics** – Overall, 83 patients were analyzed in the present study: 23 patients with FAMBC, one of which had bilateral breast cancer, 18 patients with EOBC, 10 males with breast cancer, 1 patient with familial ovarian cancer and 1 patient with co-occurrence of breast and ovarian cancer in the same patient. All other patients were considered sporadic cases (n=30). The range for age at diagnosis for FAMBC was 31-62 years ( $45.8 \pm 9.2$  years - mean  $\pm$  SD); for EOBC age range 27-39 ( $32.9 \pm 3.5$ ) years; for males with breast cancer – age range was 25-77 ( $63.3 \pm 15.2$ ) years; and for the sporadic cases – 40-75 ( $52.6 \pm 9.5$ ) years. Of the MBC patients there was only one individual with a family history of male breast cancer in a second-degree relative.

**Mutational analyses** – None of the 83 participants genotyped for the four Jewish predominant mutations was found to carry any of those mutations. PTI analysis of exon 11 in the same subsets of patients revealed two truncating mutations in *BRCA1*: a novel mutation (2990insA) and a previously described one (R1203X). Full mutation screening of all coding exons of the *BRCA2* gene in the 53 patients who constituted the FAMBC, MBC and EOBC groups, revealed 6 sequence alterations: a novel truncating mutation in exon 23 (9255delT), 3 missense mutations (two novel and a previously described one) of unknown functional significance, and two silent polymorphisms (table 1).

Table 1. Polymorphisms and mutations found

Patient ID	Gene	Exon	Sequence alteration (nucleotide by cDNA)	Predicted effect on protein	Mutation type
97-477	BRCA1	11	c.2990insA	Q957fsX970	FS
BC34	BRCA1	11	c.3726C>T	R1203X	N
BC64	BRCA2	2	c.255A>G	P9P	P
BC16	BRCA2	3	c.353A>G	T42C	M
BC53	BRCA2	10	c.1379C>T	S384F	M
97-702	BRCA2	15	c.7824C>T	P2532P	P
97-631	BRCA2	18	c.8453A>G	N2742S	M
97-344	BRCA2	23	c.9255delT	Y3009fsX3027	FS

FS: Frameshift; M: Missense; N: Nonsense; P: Polymorphism; U: Unknown

## DISCUSSION

In this study, screening for *BRCA1* and *BRCA2* mutations in 53 Turkish individuals with presumed inherited predisposition to breast cancer, male breast cancer, and early onset breast cancer revealed only three clearly pathogenic mutations in both genes: R1203X, and 2990insA in *BRCA1*, and 9255delT in *BRCA2*. In addition, three missense mutation of uncertain biological significance and two neutral polymorphisms were detected. None of the latter sequence variations was detected in more than one individual. A total of 170 Turkish high-risk individuals were previously analyzed for germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes using a variety of screening techniques. In only 15 Turkish high-risk individuals both genes' coding regions were comprehensively analyzed [Balci et al., 1999]. A total of 17 bona fide truncating mutations were described in previous studies. Taken together with the present study, 20 mutations were detected from among 199 Turkish high risk individuals, a rate of about 10%.



**Table 2. The previously reported mutations in BRCA1 and BRCA2 in Turkish families at high risk for breast and ovarian cancer**

Nucleotide change	Result	Type of Cancer	Times	Reference
<b>BRCA1</b>				
Exon2- 185insA	Frameshift	Breast	1	Yazici et al.,2000
Exon11- 2080A->G	Missense	Breast	1	Ozdag et al.,2000
Exon11- 1013 T->C	Silent	Breast	2	Ozdag et al.,2000
Exon11-1201insA	Frameshift	Breast	1	Ozdag et al.,2000
Exon11- 1623delTTAAA	Frameshift	Breast	1	Yazici et al.,2000
Exon11- 2139delC	Frameshift	Breast	1	Yazici et al.,2000
Exon11- 2196G->A	Missense	Breast	1	Ozdag et al.,2000
Exon11- 2201 C->T	Silent	Breast	1	Ozdag et al.,2000
Exon11- 3819delGTAAA	Frameshift	Breast	1	Yazici et al.,2000
Exon11- 2476delT	Frameshift	Ovary	1	Yazici et al.,2000
Exon11-2731 C->T	Missense	Breast	3	Ozdag et al.,2000
Exon11-3667 A->G	Missense	Breast	16	Ozdag et al.,2000
Exon14- 4508delC	Frameshift	Breast	1	Yazici et al.,2000
Int 14- IVS14+1delG	Splice error	Breast	1	Yazici et al.,2000
Exon20- 5382insC	Frameshift	Breast and ovarian	3	Balci et al.,1999; Yazici et al.,2000
Exon24- 5622C->T	Nonsense	Breast and ovarian	1	Balci et al.,1999
<b>BRCA2</b>				
Exon11- 3414delTCAG	Frameshift	Breast	1	Balci et al.,1999
Exon11- 5295insA	Frameshift	Breast	1	Yazici et al.,2000
Exon11- 6656delC	Frameshift	Breast	1	Yazici et al.,2000
Exon11- 6880insG	Frameshift	Breast	1	Ozdag et al.,2000
Exon 11- 3034delAAAC	Frameshift	Breast	1	Ozdag et al.,2000

In ethnically diverse populations the rate of germline mutations in both genes among high-risk families varies. The rate in Belgium is 33% (14/42 families) [Goelen et al., 1999], in Western Sweden 26 mutations were identified in 62 families (42%) [Einbeigi et al., 2001], and in Spain the reported rate is 25% (8/32 families) [Osorio et al., 2000]. Notably from studies in Middle Eastern populations the rates are substantially lower. No pathogenic mutations were detected in the *BRCA1* gene among 22 Iranian high-risk families [Ghaderi et al., 2001], and no mutations in either gene were detected among 25 high risk Non-Ashkenazi Jewish individuals [Shir-Sverdlov et al., 2000]. Thus it seems that in Middle Eastern populations, including the Turkish population, the contribution of germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes to inherited predisposition to breast/ovarian cancer is relatively small. It could be that the mutations exist in regions of the genes not analyzed (e.g., promotor, intronic regions) or are major gene rearrangements that are not detectable by PCR-based techniques. Alternatively, other, yet unidentified, genes may exist that underlie the familial clustering of breast and ovarian cancer in these populations.

Combined, *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations are predicted to account for a substantial proportion of all hereditary breast cancer cases (2% to 5% of all incident breast cancer cases) [Evans et al., 1994; Ford et al., 1998; Weber, 1998]. Furthermore, mutations in both genes contribute to early onset breast cancer: 6% to 16% of all breast cancer cases diagnosed before the age of 36 years are predicted to carry a *BRCA1* mutation and a somewhat lower or similar percentage a *BRCA2* mutation [Chappuis et al., 2000], and 16% of the cases diagnosed before age of 45 was attributable to mutations in these two genes [Peto et al., 1999]. Yet, in the present study, no mutations were detected in any individual with early age at diagnosis that did not have a family history of breast/ovarian cancer.

Thus in Turkish individuals, early onset breast cancer with no family history of related cancer is not a good indicator to search for germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes

Detecting a high rate of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in high-risk families is dependent on selection criteria. For example, among 148 families with at least 3 affected individuals with breast or ovarian cancer, sixteen *BRCA1* and thirteen *BRCA2* mutations were identified (total 19.6%) and mutation rate in both genes was 33.3% among 39 patients with more than five affected individuals in their family [Vahteristo et al., 2001]. At least 17% of Jewish male breast cancer patients were found to carry a *BRCA1/2* mutation [Struwing et al., 1999]. Thus the low rate of *BRCA1/2* mutations in the present study may also reflect the lack of such cancer prone families in the tested population. Indeed, only one family in the present study had more than 5 affected individuals and eight family had there or more affected individuals.

In the present study, as well as in previous studies analyzing Turkish high-risk families, no predominant mutations in *BRCA1/BRCA2* genes were detected (Table 1-2) [Balci et al., 1999; Ozdag et al., 2000; Yazici et al., 2000]. One exception is the 5382insC *BRCA1* gene mutation, which is one of the founder mutations of Ashkenazi Jews and Russian populations [Abeliovich et al., 1997; Szabo and King MC, 1997], which was described 3 times among 170 Turkish high-risk patients [Balci et al., 1999; Ozdag et al., 2000].

In the present study none of the tested patients harbored this specific mutation. The data from all studies pertaining to Turkish individuals indicate that the 5382insC mutation occurs at a low rate (3/255 – about 1%) in Turkish patients. This finding suggests a certain level of admixture between Jewish, Russian, and Turkish individuals, despite religious and cultural barriers separating these diverse populations. Yet none of the other Jewish mutations was incorporated into the Turkish population, as evidenced by the lack of any of the other mutations in Turkish individuals in the present study. It seems logical that Turkish high risk individuals should first be screened for the 5382insC *BRCA1* mutation before full analysis of both genes is carried out.

In conclusion, the rate of germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in Turkish families with breast/ovarian cancer predisposition is about 10%, with no predominant mutations detected, and a low probability of detecting mutations in male breast cancer patients and in women with early onset breast cancer but no family history of cancer.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Burhan Savas, Akdeniz University Medical School, Department of Oncology for his cooperation in referring the patients

#### REFERENCES

- Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, Weinberg N, Amir G, Sagi M, Zlotogora J, Heching N, Peretz I. 1997. The founder mutations 185delAG and 5382insC in *BRCA1* and 6174delG in *BRCA2* appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. *Am J Hum Genet* 60:505-514
- Araon A, Jonasdottir A, Barkardottir RB, Bergthorsson JI, Leare MD, Easton DF, Egilsson V. 1998. A population study of mutations and LOH at breast cancer gene loci in tumours from sister pairs: two recurrent mutations seem to account for all *BRCA1/BRCA2* linked breast cancer in Iceland. *J Med Genet* 35: 446-449
- Balci A, Huusko P, Pakkonen K, Launonen V, Uner A, Ekmekci A, Winqvist R. 1999. Mutation analysis of *BRCA1* and *BRCA2* in Turkish cancer families: a novel mutation *BRCA2* 3424del4 found in male breast cancer. *European Journal of Cancer* 35:707-710
- Berman DB, Wagner-Costalas J, Schultz DC, Lynch HI, Daly M, Godwin AK. 1996. Two distinct origins of a common *BRCA1* mutation in breast-ovarian cancer families: a genetic study of 15 185 del AG mutation kindreds. *Am J Hum Genet* 58:1166-1176
- Bruchim Bar-Sade R, Kruglikova A, Modan B, Gak E, Hirsh-Yechezkel G, Theodor L, Novikov I, Gershoni-Baruch R, Risel S, Papa MZ, Ben-Baruch G, Friedman E. 1998. The 185delAG *BRCA1* mutation originated before the dispersion of Jews in the Diaspora and is not limited to Ashkenazim. *Hum Mol Genet* 7:801-806
- Bruchim Bar-Sade R, Kruglikova A, Modan B, Gak E, Hirsh-Yechezkel G, Theodor L, Novikov I, Gershoni-Baruch R, Risel S, Papa MZ, Ben-Baruch G, Friedman E. 1998. The 185delAG *BRCA1* mutation originated before the dispersion of Jews in the Diaspora and is not limited to Ashkenazim. *Hum Mol Genet* 7:801-806
- Chappuis PO, Nethercot V, Foulkes WD. 2000. Clinico-pathological characteristics of *BRCA1*- and *BRCA2*-related breast cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 18:287-295

- Diez O, Domenech M, Alonso MC, Brunet J, Sanz J, Cortes J, del Rio E, Baiget M 1998 Identification of the 185delAG BRCA1 mutation in a Spanish Gypsy population *Hum Genet* 103:707-708
- Einbeigi Z, Bergman A, Kindblom LG, Martinsson I, Meis-Kindblom JM, Nordling M, Suurkula M, Wahlstrom J, Wallgren A, Karlsson P 2001 A founder mutation of the BRCA1 gene in Western Sweden associated with a high risk incidence of breast and ovarian cancer *Eur J Cancer* 37:1904-9
- Evans DGR, Fentiman IS, McPherson K, Asbury D, Ponder BAJ, Howell A 1994 Familial breast cancer *British Medical Journal* 308:183-187
- Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DI, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struwing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BAJ, Gayther SA, Birch JM, Lindblom A, Stoppa-Lyonnet D, Bignon Y, Borg A, Hamann U, Haites N, Scott RJ, Maugard CM, Vasen H, Seitz S, Cannon-Albright LA, Schofield A, Zelada-Hedman, the Breast Cancer Consortium 1998 Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families *Am J Hum Genet* 62:676-689 Ghaderi A, Talei A, Farjadian S, Mosalaei A, Doroudchi M, Kimra H 1998 Germline BRCA1 mutations in Iranian women with breast cancer *Cancer Letters* 165:87-94
- Ghaderi A, Talei A, Farjadian S, Mosalaei A, Doroudchi M, Kimra H 2001 Germline BRCA1 mutations in Iranian women with breast cancer *Cancer Letters* 165:87-94
- Goelen G, Teugels E, Bonduelle M, Neyns B, De Greve J 1999 High frequency of BRCA1/2 germline mutations in 42 Belgian families with a small number of symptomatic subjects *J Med Genet* 36:304-308
- Hartge P, Struwing JP, Wacholder S, Brody LC, Tucker MA 1999 The prevalence of common BRCA1 and BRCA2 mutations among Ashkenazi Jews *Am J Hum Genet* 64:963-970
- Hogervorst FBL, Cornelis LS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk C, Olmer R, Bakker B, Klijn JGM, Vasen HFA, Meijers-Heijboer H, Menko FH, Cornelisse CJ, den Dunnen JT, Devilee P, van Ommen GJB 1995 Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test *Nat Genet* 10:208-212
- Huusko P, Paakkonen K, Launonen V, Poyhonen M, Blanco G, Kauppila A, Puistola U, Kiviniemi H, Kujala M, Leiste J, Wingqvist R 1998 Evidence of founder mutations in Finnish breast cancer families *Am J Hum Genet* 62:1544-1548
- Loman N, Johannsson O, Kristofferson U, Olsson H, Borg A 2001 Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer *J Natl Cancer Inst* 93:1215-23
- Modan B, Hartge P, Hirsh-Yechezkel G, Chetrit A, Lubin F, Beller U, Ben-Baruch G, Fishman A, Menczer J, Ebbers SM, Tucker MA, Wacholder S, Struwing JP, Friedman E, Piura B 2001 Parity, oral contraceptives, and the risk of ovarian cancer among carriers of a BRCA1 and BRCA2 mutation *N Eng J Med* 345:235-240
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harsman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rostek P, Lai M, Barret C, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick M 1994 A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 *Science* 266:66-71
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells *Nucleic Acids Res* 16:215
- Oddoux C, Struwing JP, Clayton CM, Neuhausen S, Brody LC, Kaback M, Haas B, Norton L, Borgen P, Jhanwar S, Goldgar D, Ostrer H, Offit K 1996 The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1% *Nat Genet* 14:188-190
- Osorio A, Barroso A, Martinez B, Cebrian A, San Roman JM, Lobo F, Robledo M, Benitez J 2000 Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families *Br J Cancer* 82:1266-1270
- Ozdag H, Tez M, Sayek I, Muslumanoglu M, Tarcan O, Icli F, Ozturk M, Ozcelik I 2000 Germline BRCA1 and BRCA2 gene mutations in Turkish breast cancer patients *European Journal of Cancer* 36:2076-2082
- Peelen I, van Vliet M, Petrij-Bosch A, Mieremet R, Szabo C, van den Ouweland AM, Hogervorst F, Brohet R, Ligtenberg MJ, Teugels E, van der Luijt R, van der Hout AH, Gille JJ, Pals G, Jedema I, Olmer R, van Leeuwen I, Newman B, Pfandsöen M, van der Est M, Brink G, Hageman S, Arts PJ, Bakker MM, Willems HM, van der Loos E, Nyens B, Bonduelle M, Jansen R, Oosterwijk JC, Sijmons R, Sdmeets HJM, van Asperen CJ, Meijers-Heijboer H, Klijn JGM, de Greve J, King MC, Menko FH, Brunner HG, Halley D, van Ommen GJB, Vasen HFA, Cornelisse CJ, van't Veer LJ, de Krijff P, Bakker

- E, Devilee P 1997 A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families *Am J Hum Genet* 60:1041-1049
- Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warre W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR. 1999. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early -onset breast cancer *J Natl Cancer Inst* 91:943-949
- Rohlf EM, Learning WG, Friedman KJ, Couch FJ, Weber BL, Silverman LM. 1997 Direct detection of mutations in the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 by PCR -mediated site-directed mutagenesis *Clin Chem* 43:24-29
- Shiri-Sverdlov R, Oefner P, Green L, Gershoni Baruch R, Wagner I, Kruglikova A, Haitchick S, Hofstra RMW, Papa MZ, Mulder I, Rizel S, Bar Sade RB, Dagan E, Abdeen Z, Goldman B, Friedman E. 2000. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jewish women with familial breast cancer *Human Mutation* 16:491-501
- Shiri -Sverdlov R, Gershoni Baruch R, Ichezkel-Hirsch G, Gotlieb WH, Bruchim Bar-Sade R, Chetrit A, Rizel S, Modan B, Friedman. 2001 The Tyr978x BRCA1 mutation in non-Ashkenazi Jews: occurrence in high risk families, general population and unselected ovarian cancer patients. *Community Genetics* 4:50-55
- Struewing JP, Abeliowitch D, Peretz I, Avishai N, Kaback MM, Collins FS, Brody LC. 1995. The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals *Nat Genet* 11:198-200
- Struewing JP, Coriaty ZM, Ron E, Livoff A, Konichezky M, Cohen P, Resnick MB, Lifzchiz-Mercerl B, Lew S, Iscovich J. 1999. Founder BRCA1/2 mutations among male patients with breast cancer in Israel *Am J Hum Genet* 65:1800-2
- Szabo CI, King MC. 1997 Population genetics of BRCA1 and BRCA2 *Am J Hum Genet* 60:1013-1020
- Vahteristo P, Eerola H, Tamminen A, Blomqvist C, Nevanlinna H. 2001. A Probability model for predicting BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and breast-ovarian cancer families *Br J Cancer* 84: 704-708
- Wagner I, Stoppa-Lyonner D, Fleischmann E, Muhr D, Pages S, Sandberg I, Caux V, Moeslinger R, Langbauer G, borg A, Oefner P. 1999. Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations *Genomics* 62:369-376
- Warner E, Foulkes W, Goodwin P, Meschino W, Blondal J, Paterson C, Ozcelik H, Goss P, Allingham-Hawkins D, Hamel N, Di Prospero L, Contiga V, Serruya C, Klein M, Moslehi R, Honeyford J, Liede A, Glendon G, Brunet JS, Narod S. 1999. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer *J Natl Cancer Inst* 91:1241-1247
- Weber BL. 1998 Update on breast cancer susceptibility genes *Recent Results Cancer Res* 152:49-59
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G, Barfoot M, Hamoudi R, Patel S, Rice C, Biggs P, Hashim Y, Smith A, Connor F, Arason A, Gudmundsson J, Ficenec D, Keisell D, Ford D, Tonin P, Bishop DT, Spurr NK, Ponder BAI, Eeles R, Pete J, Devilee P, Carnelisse C, Lynch H, Narod S, Lenior G, Eglisson V, Bjork-Barkadottir R, Easton DF, Bentley DR, Futreau PA, AshWorth A, Stratton MR. 1995 Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 *Nature* 378:789-792
- Yazici H, Bitisik O, Akisik E, Cabioglu N, Saip P, Muslumanoglu M, Glendon G, Bengisu E, Ozbilen S, Dincer M, Turkmen S, Andralis IL, Dalay N, Ozcelik H. 2000 BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish breast/ovarian families and young breast cancer patients *Br J of Cancer* 83:737-42



## Analysis of Polymorphic Patterns in Candidate Genes in Israeli Patients with Prostate Cancer

Arie Figer MD<sup>1,3\*</sup>, Tal Friedman MD<sup>3\*</sup>, Ayse Esra Manguoglu MD<sup>3</sup>, Dov Flex MD<sup>8</sup>, Amnon Vazina MD<sup>7</sup>, Ilia Novikov MD<sup>5</sup>, Avi Shtricker MD<sup>6</sup>, A. Ami Sidi MD<sup>6</sup>, Thomas Tichler MD<sup>4</sup>, Einat Even Sapir MD<sup>2</sup>, Jack Baniel MD<sup>7</sup> and Eitan Friedman MD PhD<sup>3</sup>

Institutes of <sup>1</sup>Oncology and <sup>2</sup>Nuclear Medicine, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israel

<sup>3</sup>Gertner Oncogenetics Unit, <sup>4</sup>Institute of Oncology and <sup>5</sup>Gertner Institute of Health Policy Research, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel

<sup>6</sup>Department of Urology, Wolfson Medical Center, Holon, Israel

<sup>7</sup>Department of Urology and <sup>8</sup>Institute of Oncology, Rabin Medical Center (Beilinson Campus), Petah Tiqva, Israel. Affiliated to Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Israel

**Key words:** prostate cancer, genetic factors, functional polymorphisms, candidate genes

### Abstract

**Background:** The precise genes involved in conferring prostate cancer risk in sporadic and familial cases are not fully known.

**Objectives:** To evaluate the genetic profile within several candidate genes of unselected prostate cancer cases and to correlate this profile with disease parameters.

**Methods:** Jewish Israeli prostate cancer patients (n=224) were genotyped for polymorphisms within candidate genes: *p53*, *ER*, *VDR*, *GSTT1*, *CYP1A1*, *GSTP1*, *GSTM1*, *EPHX* and *HPC2/ELAC2*, followed by analysis of the genotype with relevant clinical and pathologic parameters.

**Results:** The *EPHX* gene His113 allele was detected in 21.4% (33/154) of patients in whom disease was diagnosed above 61 years, compared with 5.7% (4/70) in earlier onset disease ( $P < 0.001$ ). Within the group of late-onset disease, the same allele was noted in 5.5% (2/36) with grade I tumors compared with 18% (34/188) with grade II and up ( $P = 0.004$ ). All other tested polymorphisms were not associated with a distinct clinical or pathologic feature in a statistically significant manner.

**Conclusions:** In Israeli prostate cancer patients, the *EPHX* His113 allele is seemingly associated with a more advanced, late-onset disease. These preliminary data need to be confirmed by a larger and more ethnically diverse study.

IMAJ 2003 5:00-00

Prostate cancer is the most common solid tumor diagnosed and the second leading cause of cancer-related death among American men with 175 000 new cases diagnosed annually in the USA [1]. The worldwide estimate is 239 000 prostate cancer-related deaths per year. The majority of prostate cancer cases occur sporadically, most commonly in the seventh decade of life. In about 10% of prostate cancer cases familial clustering occurs, clinically heralded by an earlier age at onset (i.e. below age 60 years). These familial cases usually exhibit an autosomal dominant mode of transmission

and are putatively attributable to germline mutation(s) in major cancer susceptibility gene(s) [2]. Yet the precise genetic factors associated with inherited predisposition to prostate cancer have not yet been fully elucidated. A small subset of inherited prostate cancer cases segregate with a locus on chromosome 1 (1q24-q25)-HPC1 locus; and recently germline mutations and polymorphisms within a candidate gene in that region (RNASEL) were detected in two families with two or more prostate cancer cases [3]. Several potentially important chromosomal regions have been associated with early and late-onset familial prostate cancer: a region proximal to the site of HPC1 locus on chromosome 1 [4], CAPB [5], as well as two missense mutations (Leu127 and Thr541) in the *HPC2/ELAC2* gene [6].

Genetic factors may also be involved in sporadic disease. These genes presumably confer a mild or moderate prostate cancer susceptibility, and the inheritance pattern is compatible with a multigenic multifactorial inheritance [7]. The precise genes involved in conferring prostate cancer risk in non-familial cases are currently unknown, but several have been suggested and tested as candidate genes. These include genes that are somatically involved in disease pathogenesis (e.g. *p53*), genes involved in prostate tumorigenesis based on theoretical considerations (e.g. estrogen receptor), and genes whose protein products affect the metabolism and detoxification of environmental carcinogens. Sequence alterations, in particular missense mutations within some of the relevant genes have been tested for an association with prostate cancer risk [7] and for a less favorable prognosis in affected individuals [8].

A polymorphism of the *CYP17* gene, a member of the cytochrome *p450* gene family responsible for biosynthesis of testosterone, was reportedly associated with prostate cancer risk in Caucasians with a family history of the disease [9]. Similarly the Val/Val polymorphism in the *CYP1A1*, and the Leu432Val polymorphism in *CYP1B1*, both members of the cytochrome *p450* gene

\* Both authors contributed equally to this manuscript.

family have also been associated with prostate cancer risk in ethnically diverse populations [10]

Functional polymorphisms within genes whose products promote detoxification of potentially carcinogenic substances, in particular the GST superfamily, have been tested for association with prostate cancer risk. The 1105V *GSTP1* gene polymorphism but not polymorphisms within other GST supergene family members was associated with early-onset prostate cancer [11]

The role that p53 mutations play in the pathogenesis of the disease are well established and the finding that somatic overexpression, taken as an indication for the presence of a mutant allele, was associated with clinical failure [12] may serve to further support its pivotal role in predisposition to prostate cancer. Indeed a missense mutation at codon 72 (R72P) of the p53 gene was reported to be associated with a reduction of risk to prostate cancer in carriers of the codon 72 pro/pro alleles [13]

A homozygous pattern of a missense mutation (His113) within the microsomal epoxid hydroxylase (*mEPHX*) gene was expressed somatically in more than 90% of prostate cancer tissue analyzed [14]. The more active form of the enzyme (Tyr113) is associated with increased risk of ovarian cancer [15], but this polymorphism was never tested in prostate cancer risk. Of three neutral polymorphisms in the vitamin D receptor (*VDR*) gene, one was reportedly associated with an increased risk of developing prostate cancer [16] whereas no association with prostate cancer risk was reported in other studies [17]

To gain insight into the possible contribution of some of these polymorphisms and the two HPC2 missense mutations to prostate cancer predisposition and pathogenesis in Israeli patients, we genotyped unselected Jewish Israeli prostate cancer patients for polymorphisms within some of these genes, and correlated the resulting genotype with clinical and histopathologic parameters

## Materials and Methods

### Study population

The study population comprised unselected Jewish Israeli men with pathologically confirmed prostate cancer, who were treated at one of the three participating medical centers between January 1998 and June 2000. Demographic and relevant clinical data were obtained from medical files and a detailed questionnaire that was completed during a personal or telephone interview. The Institutional Review Boards approved the study, and a written informed consent was obtained from each patient. Cases with at least one additional first-degree relative with prostate cancer, or other seemingly associated cancer types (breast, ovary) were designated familial. All others were considered sporadic.

### Control population

The control population used to assess the rate of the HPC/ELAC2 missense mutations in an unaffected population included ethnically and age-matched individuals who were recruited from among consultees at the Genetics Institute of Sheba Medical Center and from patients with non-cancer related problems who attended the hospital's Urology outpatient clinic. Their medical status (i.e., healthy with normal prostate-specific antigen levels and no

suspicious mass on digital rectal examination) was ascertained by a personal interview, physical examination and, in cases of doubt by contact with their treating physician.

### DNA extraction

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes obtained by venopuncture using standard procedures and using the Genra kit (Genra Systems Inc., Minneapolis, USA) according to the manufacturer's recommended protocol.

### Polymerase chain reaction amplifications

PCR amplifications were carried out in a thermocycler (PTC-100-60 MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) in a final reaction volume of 50  $\mu$ l containing 15 pmol of each primer, 50–100 nanograms of genomic DNA, 200  $\mu$ M dNTPs, 0.5 units of thermostable Taq DNA polymerase (BioTaq, Appligene, France) and standard 10x PCR buffer. Following PCR, 10% of the PCR product (5  $\mu$ l) was analyzed on 2% agarose gels to ensure success and specificity of the PCR and visualized by ultraviolet transillumination of the ethidium bromide stained gels.

The primer sequences, PCR amplification conditions and the detection techniques for the P53 (P72R) polymorphism [18] and the three polymorphisms in the *VDR* gene [19] were performed as previously described. The polymorphisms of the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP1A1* genes [20], the polymorphic valine to isoleucine change at codon 105 in the *GSTP1* gene [21] and the histidine to tyrosine change at codon 113 in the *EPHX* gene [22] were all carried out as previously described. The Leu217 and Thr541 missense mutations were detected as previously described [6]. The c1088 C  $\geq$  T (R243R) polymorphism in the estrogen receptor was detected by employing the DGGE technique.

### Statistical analysis

Analysis of relationship between gene exposure and discrete (nominal or ordinal) variables was performed using Pearson's chi-square test for appropriate cross-tabulation. The difference between mean values of continuous variables and gene exposure was analyzed using one-way ANOVA. All calculations used SAS6.12 for Windows software.

### Results Patients' characteristics

The study included 224 Jewish Israeli patients with prostate cancer. The age range of diagnosis was 45–81 years ( $64.6 \pm 7.4$  years) (mean  $\pm$  SD). Regarding the patients' origin, 100 (44.6%) were Ashkenazi (East European), 78 (34.8%) were non-Ashkenazi – mostly (n=48) Asian (i.e., Iraqi, Iranian) and the remaining patients (n=46) were mixed Ashkenazi–non-Ashkenazi (n=29, 12.9%) or Israeli-born for more than four generations (n=17, 7.5%). Prostate cancer was diagnosed in 70 patients prior to or at 60 years of age and in 154 patients older than 61 years. A family history of cancer could be elicited in 122 patients only primarily because of truncated family trees as a result of the Holocaust or immigration to Israel at an early age with loss of contact with other family members. Of these

PCR = polymerase chain reaction

Table 1 Selected clinical, histological and genotype data of study participants

Age at Dx	EPHX			P	CYP1A1			P	ER		P	GSTM1		P	GSTP1			P	
	HH	HY	YY		HH	Hh	hh		M	N		N	P		I	IV	W		
>60 years	58/154	63/154	33/154		4/154	42/154	108/154		18/154	136/154		69/154	91/154		72/154	66/154	16/154		
<60 years	4/70	62/70	4/70		1/66	15/66	50/66		7/66	59/66		30/66	36/66		32/66	27/66	7/66		
				<0.001				0.765			0.957			0.74				0.987	
Grade + Age	>60 + Grade I	2/36	26/36	7/36		2/202	52/202	148/202		7/28	25/28		10/24	14/24		5/9	7/9	1/9	
	<60 + Grade >2	74/188	80/188	34/188		6/18	8/18	10/18		23/192	169/192		82/196	114/196		101/211	86/211	24/211	
				0.004				0.24			0.964			0.838				0.894	
Smoking	YES	5/1172	92/1172	23/1172		3/154	46/154	107/154		6/98	90/98		62/146	84/146		55/118	51/118	12/118	
	NO	29/52	15/52	8/52		1/66	20/66	25/66		10/54	44/54		31/74	43/74		51/102	46/102	11/102	
				<0.001				0.219			0.103			0.949				0.834	
Age at Dx	GSTT1		P	p53 R72P			P	VDRBsm			P	VDRAge			P				
	N	P		RR	RP	PP		BB	Bb	bb		AA	Aa	aa		TT	Tt	tt	
> 60 years	43/154	111/154		38/154	79/154	17/154		38/154	64/154	52/154		52/154	83/154	19/154		37/154	74/154	20/154	
< 60 years	20/66	46/66		19/70	38/70	15/70		22/70	30/70	18/70		37/70	28/70	5/70		15/70	38/70	17/70	
			0.943				0.073				0.349			0.038				0.132	
Grade+Age	>60+Grade I	5/195	139/195		70/192	97/192	25/192		51/191	81/191	59/191		70/193	100/193	23/193		64/194	92/194	36/194
	<60+Grade >2	5/25	20/25		7/2	20/2	5/2		10/33	13/33	10/33		14/31	15/31	2/31		7/30	17/30	6/30
				0.497				0.274			0.406			0.512				0.525	
Smoking	YES	39/145	110/145		52/147	69/147	26/147		55/154	68/154	39/154		74/148	63/148	11/148		32/150	80/150	38/150
	NO	25/55	56/55		25/77	42/77	16/77		5/70	29/70	36/70		16/76	49/76	11/76		30/74	32/74	4/74
				<0.001			0.494				<0.001			<0.001				<0.001	

For each tested polymorphism the common and rare homozygote and the heterozygote genotype are shown according to various clinical and pathologic characteristics. The P values for whole-group comparisons are shown. For the ER polymorphism, M denotes a heterozygote as there were no homozygotes for the rare allele. For the GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, N denotes normal wild type and P denotes the polymorphic allele. For the GSTP1, EPHX and the p53 missense mutations, the single letter symbols of the encoded amino acids are shown. For the vitamin D receptor polymorphisms, the capital letters denote an uncut allele and lower case letters denote an allele that was cleaved by the specified restriction enzyme.

12 of 122 (9.8%) had prostate, breast and/or ovarian cancer in at least one first-degree relative. 25 (20.5%) had a more remote family history of cancer (in second-degree relatives and cancer types other than prostate, breast, or ovary) and in the remaining 85 patients (69.7%) prostate cancer was designated sporadic. There were 35 tumors at stage T1 disease, 135 at stage T2, 46 at stage T3, and 8 at stage T4 (staging was assigned by the revised TNM system from 1997) and was based on digital rectal exam, transrectal and pelvic ultrasonography, abdominal computerized tomography and bone scan. Tumor grades were as follows: well-differentiated (Gleason scores 2-4) collectively referred to as grade I (n=36), moderately differentiated (Gleason scores 5-6) or grade II (n=122), moderately to poorly differentiated (Gleason score 7) or grade III (n=60), poorly differentiated (Gleason scores 8-10) or grade IV tumors (n=6).

**Control population characteristics**

Overall, 250 men were genotyped for the two missense mutations in the HPC2/ELAC2 gene. Their ages ranged from 35 to 83 years (61.7 ± 9.7 years). 113 (45.2%) were Ashkenazi, 91 (36.4%) were of non-Ashkenazi origin, mostly (n=63) Iraqi-Iranian born, and the rest were either mixed Ashkenazi-non-Ashkenazi (n=31, 12.4%) or Israeli-born (n=15, 6%) for more than four generations. All were asymptomatic with no personal history of cancer, no abnormal masses on digital rectal exam, and PSA levels within the normal range within the preceding 12 months.

PSA = prostate-specific antigen

**Genetic analyses**

Homozygosity for the low activity genotype of the EPHX gene (His113 allele) was significantly less common in patients with early-onset prostate cancer (≤ 60 years) (4/70, 5.7%) as compared with late-onset disease (≥ 61 years) (33/154, 21.4%) (P < 0.001). In addition, within the late-onset group of patients, the same low activity genotype was encountered less commonly among grade I tumors (2/36, 5.5%) compared with higher grade tumors (grades 2 and up) (34/188, 18%) (P = 0.004). Patients with a family history of cancer other than prostate, breast, or ovary displayed the BB genotype of the VDR gene less frequently than those with no family history of cancer (1/25, 4% vs 31/97, 31.9%) (P = 0.023) (data not shown in the table). Patients with prostate cancer who were non-smokers more often displayed the TT (38/74, 51.3%), Aa (49/76, 64.4%) and bb (36/70, 51.4%) pattern in the VDR gene polymorphisms than did smokers (TT 32/150, 21.3%; Aa 63/148, 42.5%; bb 39/154, 25.3%) - P < 0.001 for all three comparisons. In addition, non-smokers more often carried the wild-type GSTT1 allele (25/75, 33.3%) than smokers (35/145, 6.9%) (P < 0.001). For all other tested polymorphisms, no significant associations were noted between the specific polymorphism and age at diagnosis, ethnic origin, family history of cancer, smoking history, disease stage and grade. The distribution of polymorphisms in all candidate genes within the study population analyzed by age at diagnosis, tumor grade and smoking history is shown in Table 1.

In addition to the data presented in Table 1, the rate of the Leu217 missense mutation among prostate cancer patients was

36.6% (82/224) and 37.2% (93/250) among healthy, ethnically and age-matched asymptomatic controls. Similarly, the rate of the Thr54I missense mutation in the same gene was 4.9% (11/224) in the prostate cancer group and 5.8% (29/250) in the controls. Both were statistically insignificant differences.

### Discussion

In this study, a missense mutation in the *EPHX* gene His113Tyr (H113Y) was associated with diagnosis at age older than 61 years and a more advanced grade prostate cancer in Israeli patients. The biologically more active Tyr113 allele (YY genotype) was associated with an increased risk for ovarian cancer [15]. This association may reflect enhanced activation of endogenous or exogenous carcinogens to more mutagenic derivatives by the high activity genotypes. Alternatively, this polymorphic variation in *EPHX* activity could modify the penetrance of other prostate cancer susceptibility gene(s).

The initial enthusiasm sparked by the findings of the role that the Thr54I and Leu217 missense mutations play in prostate cancer predisposition and pathogenesis [6] has somewhat abated. Subsequent studies failed to show a more frequent occurrence of these mutations in prostate cancer patients than in controls [23,24] and even in the selected group of familial prostate cancer cases, the role of *HPC2/ELAC2* mutations may be limited [25]. Our data support the limited role, if any, of these polymorphisms in prostate cancer pathogenesis in Israeli patients.

Polymorphic patterns in the vitamin D receptor and the functional polymorphism in the *GSTT1* significantly differed between smokers and non-smokers in the present study. This finding, if confirmed in other populations, may help to identify individuals who smoke and are genetically at higher risk for developing prostate cancer. While the involvement of the *GSTT1* in the detoxification pathway is well established, no such role has been proposed for the *VDR* and its presumed involvement in prostate cancer pathogenesis has been attributed to its role in cellular proliferation. Our finding may indicate that the *VDR* may be a modulator of some of the carcinogenic substances in cigarette smoke. The other polymorphisms tested in this study appear not to be involved in prostate cancer tumorigenesis in Israeli patients. However, analysis of other polymorphisms within the same genes, preferably single nucleotide polymorphisms in a larger group of patients, may help provide a more accurate answer regarding the putative role of these genes in prostate cancer risk and/or progression.

The clinical implications of this study, if confirmed, may affect several aspects of prostate cancer detection and prevention. Analysis of the *EPHX* gene polymorphism may help to identify asymptomatic individuals at high risk for developing late-onset prostate cancer in the general moderate risk population. It may also help to target prostate cancer patients who are likely to have a more advanced disease and hence should be placed under a more strict surveillance scheme. Lastly, it may provide a genetic tool for identifying individuals who smoke and are at a higher than average risk for developing prostate cancer. Nonetheless, caution is called for in interpreting and extrapolating

these results. Certainly, confirmation of these preliminary data based on a larger patient number of diversified ethnic origin is needed.

### References

- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;49:8-31.
- Lesko SM, Rosenberg L, Shapiro S. Family history and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 1996;144:1041-7.
- Carpén J, Nupponen N, Isaacs S, et al. Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet* 2002;30(2):181-4.
- Suarez BK, Lin J, Burmester JK, et al. Chromosome screen of multiplex sibships with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2000;66:933-44.
- Gibbs M, Chakrabarti L, Stanford JL, et al. Analysis of chromosome 1q42.2-43 in 152 families with high risk of prostate cancer. *Am J Hum Genet* 1999;64:1087-95.
- Rebbeck TR, Walker AH, Zeigler-Johnson C, et al. Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2000;67:1014-19.
- Raunio H, Hulgafvel Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, Hirvonen A, Pelkonen O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility. *Gene* 1995;159:113-21.
- Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, Oesch F. Polymorphisms of N-Acetyltransferases, Glutathione S-Transferase, Microsomal Epoxide Hydrolase and Sulfotransferases: Influence on Cancer Susceptibility. Recent Results in Cancer Research. Vol. 154. Berlin: Springer, 1998.
- Stanford JL, Noonan EA, Iwasaki L, et al. A polymorphism in the CYP17 gene and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:243-7.
- Tang YM, Green BL, Chen GF, et al. Human CYP1B1 Leu432Val gene polymorphism: ethnic distribution in African-Americans, Caucasians and Chinese; oestradiol hydroxylase activity; and distribution in prostate cancer cases and controls. *Pharmacogenetics* 2000;10:761-6.
- Kote-Jarai Z, Easton D, Edwards SM, et al, for the CRC/BPG UK Familial Prostate Cancer Study Collaborators. Relationship between glutathione S-transferase M1, P1 and T1 polymorphisms and early onset prostate cancer. *Pharmacogenetics* 2001;11:325-30.
- Rakozzy C, Grington DJ, Li Y, et al. P53 gene alterations in prostate cancer after irradiation failure and their association with clinical outcome: a molecular and immunohistochemical analysis. *Pathol Res Pract* 1999;195:129-35.
- Henner WD, Evans AJ, Hough KM, Harris EL, Lowe BA, Beer TM. Association of codon 72 polymorphism of p53 with lower prostate cancer risk. *Prostate* 2001;49:263-6.
- Murray GI, Taylor VE, McKay JA, et al. The immunohistochemical localization of drug-metabolizing enzymes in prostate cancer. *J Pathol* 2000;177:147-52.
- Lancaster IM, Brownlee HA, Bell DA, et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer. *Mol Carcinog* 1996;17:160-2.
- Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Mohler JL, Bell DA. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res* 1996;56:4108-10.
- Gsur A, Madersbacher S, Haidinger G, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and prostate cancer risk. *Prostate* 2002;51:30-4.
- Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. P53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res* 1999;5:129-34.
- Riggs BL. Vitamin D receptor genotypes and bone density. *N Engl J Med* 1997;337:125-6.
- Bailey LR, Roodi N, Varrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. *Cancer Res* 1998;58:65-70.



- 21 Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18:641-4
- 22 Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Human microsomal epoxide hydroxylase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 1994;3:412-28
- 23 Vesprini D, Nam RK, Trachtenberg J et al. HPC2 variants and screen detected prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 912-17
- 24 Xu J, Zheng SL, Carpten JD et al. Evaluation of linkage and association of HPC2/ELAC2 in patients with familial or sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2001;68:901-11
- 25 Wang L, McDonnell SK, Elkins DA et al. Role of HPC2/ELAC2 in hereditary prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:6494-9

**Correspondence:** Dr E. Friedman, Chief, Gertner Oncogenetics Unit, Gertner Institute of Genetics, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, 52621, Israel.

Phone: (972-3) 530-3173

Fax: (972-3) 535-7308

email: eitan211@sheba.health.gov.il or feitan@post.tau.ac.il



Capsule



## ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Ankara'da doğan Ayşe Esra MANGUOĞLU, 1992 tarihinde Çanakkale Lisesi'nden mezun olmuştur. 1992-1993 eğitim-öğretim yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi, İngilizce Hazırlık Okulu'nu şeref öğrencisi olarak tamamlamıştır. 1993-1997 yılları arasında Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji bölümünü yine şeref öğrencisi olarak tamamlamıştır. 1997 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atanmış ve Yüksek lisans programına kabul edilmiştir. 1999 yılında Yüksek Lisans programını tamamlamış ve aynı Anabilim Dalında doktora programına başlamıştır.

2000 yılında İtalya, Genova'da düzenlenen 5. Gaslini-IARC-Menarini Kanser Genetigi ve Pediatrik Onkoloji Kursuna Amerika Birleşik Devletleri National Institutes of Health'den almaya hak kazandığı bursla katılmıştır. Yine burslu olarak 2000 yılında Pakistan'da ICGEB tarafından düzenlenen "Human Genome Diversity Workshop"a katılmıştır. 2000-2001'de sekiz ay boyunca Hayfa Rotary Klübü-Moshe Greidinger Scholarship Fund'dan kazandığı bursla İsrail Sheba Tıp Merkezi Onkogenetik Ünitesinde Prof.Dr. Eitan Friedman'in laboratuvarında çeşitli araştırmalar ve doktora tez projesinin bir bölümünü yapmıştır. Yurtiçinde ve yurtdışında bildirili olarak pek çok kongreye kursa katılmış, IV.Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresinde sunduğu bildiri kongrenin "Sitogenetik Poster Başarı Ödülü"ne değer bulunmuştur. Science Citation Index'e kayıtlı dergilerde 5 makalesi yayınlanmış. 1997 yılından beri Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. 1999 yılından bu yana Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği üyesidir.