

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BLM(rs2270132) VE RAD51 (rs1801320) GEN
POLİMORFİZMLERİNİN MEME KANSERİNDEKİ ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Tuğcan KORAK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji AD. Yüksek Lisans Programı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ
2016

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BLM(rs2270132) VE RAD51 (rs1801320) GEN POLİMORFİZMLERİNİN
MEME KANSERİNDEKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuğcan KORAK

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji AD. Yüksek Lisans Programı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç.Dr.Emel ERGÜL

Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir (KOU-BAP

proje no: 2015/080HD)

Etik Kurul Onay Numarası: KOU KAEK 2015/283

KOCAELİ

2016

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: BLM (rs2270132) VE RAD51(rs1801320) GEN POLİMORFİZMLERİNİN
MEME KANSERİNDEKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tez yazarı: Tuğcan KORAK
Tez savunma tarihi: 13.06.2016

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emel ERGÜL

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Üye	Prof. Dr. Ali SAZCI	
Üye	Doç. Dr. Emel ERGÜL	
Üye	Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız
Enstitü Müdürü

ÖZET

BLM(rs2270132) ve RAD51 (rs1801320) Gen Polimorfizmlerinin Meme Kanserindeki Rollerinin Araştırılması

Amaç: BLM ve RAD51 genleri homolog rekombinasyona dayalı DNA tamirinde oluşan Holliday kavşağının çözülmesi ve DNA onarımının tamamlanması sırasında önemli görevler üstlenir. RAD51(rs1801320) ve BLM(rs2270132) polimorfizmleri bu genlerin anlatımında değişikliğe neden olabilecek polimorfizmlerdir. Bu veriler ışığında, bu çalışmanın amacı hastane tabanlı kadın popülasyonunda RAD51(rs1801320) ve BLM(rs2270132) polimorfizmleri ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Yöntem: RAD51(rs1801320) ve BLM(rs2270132) polimorfizmleri için 103 meme kanserli kadın hasta ve 142 sağlıklı kadının DNA örnekleri kullanılarak PCR-RFLP yöntemi ile genotipleme yapıldı. İstatistiksel analiz için SPSS programı kullanılarak genotip ve allel frekansları, p , χ^2 ve OR (%95 güven aralığında) değerleri elde edildi. Son olarak Hardy-Weinberg eşitliği (HWE) test edilen hastalar ve kontrol popülasyonu için doğrulandı.

Bulgular: Her iki polimorfizm ile meme kanseri riski arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık olmadığı bulundu (RAD51 ve BLM için p değerleri: 0.115 ve 0.907). Allel frekansları RAD51(rs1801320) polimorfizminde sırasıyla hasta ve kontrollerde G alleli için %86.0, %92.0, C alleli için %14.0, %8.0 şeklinde ve BLM(rs2270132) polimorfizminde A alleli için %88.0, %89.0, C alleli için %12.0, %11.0 şeklinde ortaya çıkarıldı. Her iki SNP için de genotip ve allel frekansları ile meme kanseri riski arasında anlamlı ilişki olmadığı bulundu. (Tüm frekanslar için $p>0.05$). Bu polimorfizmler için genotip dağılımı hasta ve kontrol popülasyonu için Hardy-Weinberg eşitliğine göre kararlı bulundu ($p>0.05$).

Sonuç: Bu çalışmada yer alan polimorfizmlerin meme kanseri riski ile ilişkili olmadığı bulunmuştur. İleriki çalışmalarda daha geniş ve daha iyi tanımlanmış bir popülasyonda klinik bilgilerin varlığında bu polimorfizmlerin meme kanserinde tanımlayıcı bir biyomarkör olarak kullanılabilmesi için daha geniş çaplı çalışmalar yapılabilir ve ayrıca haplotip analiziyle, aynı gendeki SNP'lerin kombinasyonları sonucu ortaya çıkan meme kanseri riski elde edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, RAD51, BLM, rs1801320, rs2270132

İNGİLİZCE ÖZET

The Investigation of the Roles of BLM(rs2270132) and RAD51 (rs1801320) Gene Polymorphisms in Breast Cancer

Objective: RAD51 and BLM genes play an important role in Holliday junction resolution that occurs during homolog recombination-based DNA repair and completion of DNA repair. RAD51(rs1801320) and BLM(rs2270132) polymorphisms may lead to changes in the expression of these genes. In the light of these data, the purpose of this study is to investigate association between RAD51 (rs1801320) and BLM (rs2270132) polymorphisms and breast cancer risk in hospital-based women population.

Methods: Genotyping for RAD51(rs1801320) and BLM(rs2270132) polymorphisms in DNA samples of 103 breast cancer patients and 142 healthy women was performed by PCR-RFLP method. SPSS software was used to calculate genotype and allele frequencies, p, χ^2 and OR (95% confidence intervals) values. Finally, Hardy-Weinberg equilibrium was confirmed for tested patient and control populations.

Results: It was found that there was no statistically significant association between these polymorphisms and breast cancer (p values for RAD51 and BLM: 0.115 and 0.907, respectively). Allele frequencies of RAD51(rs1801320) for G allele were 86.0%, 92.0% and for C allele 14.0%, 8.0% and allele frequencies of BLM(rs2270132) for A allele were 88.0%, 89.0% and for C allele 12.0%, 11.0% in cases and controls, respectively. There was not statistical difference between both genotype and allele frequencies in cases and controls (p>0.05 for all frequencies). The distribution of genotypes of these polymorphisms was in agreement with HWE for cases and controls (p>0.05).

Conclusions: The polymorphisms in this study were found to be not associated with breast cancer risk. In the future, these polymorphisms may be studied as biomarker for breast cancer but in well-defined larger population with correlation to clinical data. To show combined effects of these polymorphisms on breast cancer risk, haplotype analysis can be performed for these genes.

Key Words: Breast Cancer, RAD51, BLM, rs1801320, rs2270132

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli bilgisi, deneyimleri ve desteğinin yanı sıra özgür bir planlama yapmamı ve mutlu bir şekilde tezimi tamamlamamı sağlayan değerli hocam ve danışmanım Doç.Dr. Emel ERGÜL'e,

Bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ali SAZCI' ya,

Deneylerim süresince fikir aldığım ve yardımlarını benden esirgemeyen çalışma arkadaşım Arş. Gör. Nihal ÜREN'e

Maddi ve manevi olarak yanımda olduklarını her daim hissettiren ve bana huzurlu bir yaşantı sunan aileme,

Her daim enerjimi yükselten, dertlerimi ve mutluluğumu paylaşan dostlarıma teşekkür ederim.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

23 /05/ 2016

Adı Soyadı: Tuğcan KORAK

İmza: 

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY YAZISI	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÇİZİMLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. GENETİK POLİMORFİZMLER	1
1.2. MEME KANSERİ	1
1.2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri	2
1.2.1.1. Demografik Özellikler	2
1.2.1.2. Reprodüktif Öykü	3
1.2.1.3. Genetik Risk Faktörleri	3
1.2.1.4. Çevresel Faktörler	4
1.2.1.4.1. Sosyoekonomik Seviye	4
1.2.1.4.2. Radyasyona Maruz Kalma	4
1.2.1.4.3. Alkol Kullanımı, Beslenme Alışkanlığı ve Egzersiz	4
1.2.1.4.4. Hormon Replasman Tedavisi (HRT)	5
1.2.1.5. Diğer Faktörler	5
1.2.1.5.1. Vücut Kütle İndeksi	5
1.2.1.5.2. Proliferatif Meme Lezyonları	5
1.2.1.5.3. Kişisel Meme Kanseri Öyküsü	5
1.2.1.5.4. Yoğun Meme Yapısı	5
1.3. MEME KANSERİ GENETİĞİ	5
1.3.1. Meme Kanserinde Etkili Onkogenler	7

1.3.1.1. Epiderman Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR)	7
1.3.1.2. CerbB-2 (HER2/Neu) Geni	7
1.3.1.3. c-Myc Geni	8
1.3.1.4. Ras Geni	8
1.3.1.5. Siklinler, Siklin Bağlı Kinazlar (CDK) ve İnhibitörleri	9
1.3.1.6. Östrojen reseptörü (ER) ve Progesteron reseptörü (PR)	9
1.3.2. Meme Kanserinde Etkili Tümör Baskılayıcı Genler	10
1.3.2.1. TP53 Geni	10
1.3.2.2. ATM Geni	10
1.3.3. Ailesel Meme Kanseri Yatkınlık Genleri	11
1.4. DNA HASAR ÇEŞİTLERİ	11
1.4.1. Tek Zincirli DNA Lezyonları	11
1.4.2. Çift Zincirli DNA Kırıkları	11
1.5. DNA HASAR TAMİR YOLAKLARI	12
1.5.1. Homolog Rekombinasyon	12
1.5.2. Tek İplikli Bağlanma-Eşleşme (SSA-Single Strand Annealing)	15
1.5.3. Homolog Olmayan Uçların Birleşimi (NHEJ- Non-Homologous End joining)	15
1.6. DSB TAMİRİNDE BRCA PROTEİNLERİ VE DİĞER PROTEİNLERLE ETKİLEŞİMLERİ	15
1.7. RAD51 ve BLM GEN FONKSİYONLARI VE ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR	18
1.7.1. RAD51(rs18013020) ve BLM (rs2270132) Polimorfizmleri	22
2. AMAÇ VE KAPSAM	23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1. Gereçler	24
3.1.1. Enzimler ve Primerler	24
3.1.2. Kimyasallar	24
3.1.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	25
3.1.3.1. Elektroforez Çözeltileri	25
3.1.3.2. Gümüş Boyama Çözeltileri	25
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	26
3.1.5. Etik Kurul Onayı ve Destek	26
3.1.6. Hasta ve Kontrol Grubu	26

3.2. YÖNTEMLER	26
3.2.1. Genotipleme	26
3.2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	27
3.2.1.1.1. PCR Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kontrolü	27
3.2.1.2. Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)	28
3.2.1.2.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi	28
3.2.1.2.2. Gümüş Boyama	29
3.2.2. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. Jel Görüntüleri	30
4.2. Demografik Veri ve İstatistik Sonuçları	30
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	44
TEZ DENETLEME LİSTESİ	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ABD : Amerika Birleşik Devletleri
ADP : Adenozin Difosfat
APC : Adenomatöz Polipozis Koli
ATM : Ataksi Telenjektazi
ATP : Adenozin Trifosfat
BAP : Bilimsel Araştırma Projeleri
BASC : BRCA1 İlişkili Genom Gözetim Kompleksi
BCCIP : BRCA2 ve CDKN1A ile Etkileşen Protein
Bcl-2 : B Hücreli Lenfoma-2
bç : Baz Çifti
BER : Baz Çıkarma Onarımı
BLM : Bloom Sendromu
BRAF35 : BRCA2 ilişkili Faktör 35
BRCA1 Geni : Meme Kanseri Duyarlılık Geni 1
BRCA2 Geni : Meme Kanseri Duyarlılık Geni 2
CDK : Siklin Bağımlı Kinazlar
CDKI : Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri
CI : Güven Aralığı
Ctp : Retinoblastomaya Bağlanıcı Protein 8
DHEA : Dehidroepiandrosteron
dk : Dakika
D-loop : Deplasman (Yerinden Çıkma) İlmiği
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
Dna2 : DNA replikasyonu ATP-bağımlı helikaz/nükleaz DNA2
DNA-PKCs : DNA Bağımlı Protein Kinazlar
dNTP : Deoksinükleosid Trifosfat
DSB : Çift Zincirli DNA kırığı
DSBR : Çift Zincirli Kırık Tamiri
dsDNA : Çift Zincirli DNA
DSS1 : SUV3 Supresör Silinimi 1

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGFR : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER : Östrojen Reseptörü
Exo1 : Ekzonükleaz 1
HER2 : İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
HER3 : İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 3
HER4 : İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 4
HR : Homolog Rekombinasyon
HRDC : Helikaz ve Rnaz D Benzeri C-ucu Altbirimi
HRR : Homolog Rekombinasyon ile DNA Tamiri
HRT : Hormon Replasman Tedavisi
HWE : Hardy-Weinberg Dengesi
IR : İyonize Radyasyon
MAPK : Mitojen-Aktiveli Protein Kinaz
MLH : MutL Homolog 1
MRE11 : Mayotik Rekombinasyon 11
MRN : MRE11-RAD50-NBS1
mRNA : Mesajcı RNA
MSH2 : DNA Yanlış Eşleşme Tamiri Proteini 2
MSH6 : DNA Yanlış Eşleşme Tamiri Proteini 6
NaOH : Sodyum Hidroksit
NBS1 : Nibrin
NER : Nükleotid Çıkarma Onarımı
NHEJ : Homolog Olmayan Uç Birleşmesi
OR : Risk Oranı
PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCNA : Prolifere edici hücre çekirdek antijeni
PCR-RFLP: Polimeraz Zincir Tepkimesi- Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi
PI3K : Fosfoinositid 3-kinaz
PKC : Protein Kinaz C
PR : Progesteron Reseptörü
PTEN : Fosfataz ve Tensin Homolog
RCC1 : Kromozom Yoğunlaşma Regulatorü 1

RFC : DNA Replikasyon Faktörü
RFLP : Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi
RMT1 : RecQ Aracılı Genom instabilite 1
RPA : Replikasyon Proteini A
RTS : Rothmund-Thomson syndrome
SD : Standart Sapma
SDSA : Sentez Bağımlı İplik Değişimi
Sgs1 : Yavaş büyüme supresörü 1
SNP : Tek Nükleotid Polimorfizmi
SP : İstatistiksel Güç
SPSS : Sosyal Bilimler İçin İstatistiksel Paket
SSA : Tek zincir bağlaması
SSB : Tek Zincir Kırığı
ssDNA : Tek Zincirli DNA
TBE : Tris-Borat-EDTA
TEMED : Tetrametiletilediamin
TOP3 : Topoizomeraz 3
TOP3A : Topoizomeraz IIIA
TP53 (P53) : Tümör Protein 53
UTR : Translasyonu Yapılmayan Bölge
UV : Ultraviyole
V : Volt
WRN : Werner Sendromu
XPF : DNA Tamir Endonükleazı
XRRC2 : X-ray Onarımı Çapraz-Tamamlayıcı Protein 2
XRRC3 : X-ray Onarımı Çapraz-Tamamlayıcı Protein 3
XRRC4-Ligaz IV : X-ray Onarımı Çapraz-Tamamlayıcı Protein 4- Ligaz IV
 χ^2 : Ki kare
°C : Celsius

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Holliday kavşaklarının izomerleşmesi ve çözünmesi sonucunda oluşan rekombinant ve rekombinant olmayan heterodupleksler	13
Çizim 1.2. HRR erken ve geç basamaklarının şematik özeti. Erken basamakta presinaptik RAD51 filamentinin oluşmasının ardından geç basamaklarda krossover olan ve olmayan ürünün oluşması.....	21
Çizim 4.1. RAD51 geni rs1801320 polimorfizmi için poliakrilamid jel görüntüsü (M: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, AA-227 bç, AC-227, 147, 80 bç).....	30
Çizim 4.2. BLM geni rs2270132 polimorfizmi için poliakrilamid jel görüntüsü (M:GeneRuler 50 bp DNA Ladder, AA-227 bç, AC-227, 147, 80 bç).....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Meme kanseri için orta veya yüksek riskte mutasyonlara sahip genler...	17
Çizelge 3.1. Polimorfizmlere göre kullanılan primer dizileri ve enzimler.....	24
Çizelge 3.2. PCR ile çoğaltılan gen dizileri ve uzunlukları.....	27
Çizelge 3.3. Polimorfizmlere göre RFLP için kullanılan enzimler, kesimde kullanılacak enzim, distile su, PCR ürünü miktarları ve kesim sıcaklığı.....	28
Çizelge 3.4. BLM ve RAD51 polimorfizmleri için poliakrilamid jel elektroforezi koşulları.....	28
Çizelge 4.1. Hasta ve kontrollerin demografik verileri.....	31
Çizelge 4.2. Hasta ve Kontrol gruplarında RAD51(rs1801320) ve BLM(rs2270132) için genotip dağılımı, allel frekansları ve meme kanseriyle ilişkilendirme amaçlı lojistik regresyon analizi sonuçları.....	32

1.GİRİŞ

1.1 GENETİK POLİMORFİZMLER

Bir genin belli bir bölgesinde bulunan alternatif kopyalarından her biri allel olarak adlandırılır. Bir allelin popülasyonda %1'den daha fazla bulunması genetik polimorfizm olarak tanımlanır. Eğer alleller %1'den daha az bulunuyorsa, nadir değişimler olarak bilinirler.

En sık rastlanan polimorfizm yaklaşık olarak 1300 bazda bir görülen tek nükleotid polimorfizmidir (SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi). Rastlanma sıklığı bireyler ve popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir ve evrimsel olarak iyi korunmuştur. SNP'lerin çoğu sessiz SNP (non-coding region SNPs) sınıfına girmekte, gen fonksiyonlarını ve kalıtılan özellikleri etkilememektedir. Ancak protein fonksiyonunu etkileyen SNP'ler (coding region SNPs) de mevcuttur. Bunlar, ya doğrudan aminoasit dizisini değiştirirler ya da regülatör dizinin fonksiyonunu değiştirirler ve farklı bir fenotip oluşmasına yol açarlar. Hastalığa yatkınlıkta ve oluşan hastalığın bakteri, virüs, ilaç vb. dış etmenlere vereceği yanıtta oldukça önemli rol üstlenmektedirler.

RFLP (restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi) yöntemi; restriksiyon enzimlerinin nükleotid değişimini tanıması ya da tanımamasından faydalanarak poliakrilamid veya agaroz jelde farklı bant tiplerinin oluşması sonucu SNP analizi için oldukça uygun ve ekonomik bir yöntemdir. SNP kullanılma amaçları arasında tanı ve risk profillemesi, epidemiyolojik çalışmalar, farmakogenetik ve adli genetik çalışmaları bulunmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar çeşitli popülasyonların hasta ve kontrol gruplarında SNP analizi ve karşılaştırmasını kapsamakta ve bunun sonucunda hastalıklara özgü SNP profilleri elde edilebilmektedir. Kanserde bu hastalıklardan biridir ve SNP'ler kanser etiyojisinin aydınlatılması ve kemoterapiye cevabın öngörülmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadırlar(http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s_snp2.pdf,www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome, Klug ve Cummings, 2000, Nussbaum ve diğ. 2005).

1.2. MEME KANSERİ

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması olarak bilinen neoplazinin malign özellik kazanması sonucu kontrolsüz büyümesi ve çevre dokuları istila edip yayılma göstermesiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Sağlıklı vücut hücreleri (kas ve sinir hücreleri hariç), ölen

hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarımı amacıyla bölünebilme özelliğine sahiptirler. Hücrelerin hayatı boyunca bölünebilme sayıları ve ayrıca nerede ve ne zaman bölüneceği belirlidir. Normal vücut fonksiyonlarının yerine getirilmesi için hücrelerin büyümesi, bölünmesi ve hücre sayısının dengede tutulmasına ihtiyaç vardır. Bu süreçlerin uygun bir şekilde yerine getirilmesi DNA molekülüne bağlıdır. DNA ipliğindeki hasarlar, normal şartlarda hücre tarafından onarılır veya hücrenin ölümüne sebep olur. Hasarlı DNA'nın onarımı yapılamayan bazı durumlarda, normal süreç sekteye uğrar ve kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olarak kanser hücresi oluşumuna yol açarlar. Kanser hücrelerinin birikimi normal dokuların sıkışmasına ve tahribine yol açabilen tümörleri oluşturur. Tümördeki kanser hücreleri, oluştukları tümörden ayrılıp kan veya lenf dolaşımı ile vücudun diğer bölgelerine yayılıp burada yeniden koloni oluşturup büyümeyi sürdürebilirler ve bu durum metastaz olarak adlandırılır (<http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.htm>).

Meme kanseri oldukça yaygın rastlanan bir kanser tipidir ve kadınlar arasında ölüme neden olmada ikinci sırada yer almaktadır. Kadınların meme kanserine dayalı ölme olasılıkları yaklaşık %3'tür. Ölüm oranları 1989 yılından beri azalmaktadır ve bunun nedeninin tarama ve erken tanının olduğu düşünülmektedir. Amerikan kanser topluluğunun 2016 yılı tahminlerine göre; ABD'de kadınlar arasında 246.660 yeni meme kanseri vakası ve buna dayalı 40,450 ölüm beklenmektedir. Türkiye'de ise raslantı hızı son yıllarda yaklaşık 3 kat artarak 2012 yılında kadınlar arasındaki tahmini meme kanseri sayısı 51.990 olarak kaydedilmiştir (<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-key-statistics>, Özmen 2008). İstatistik verilerin yanı sıra meme kanserinin belirleyici faktörleri üzerindeki epidemiyolojik çalışmalar, çift zincirli DNA kırıklarına (DSB) neden olabilecek çevresel faktörlerin meme kanseri riskini arttıran etmenler arasında olduğunu göstermekle birlikte meme kanserinin ana nedeninin genetik faktörlerden oluştuğunu ortaya çıkarmıştır (Lu ve diğ. 2006).

1.2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Pek çok kanser türüne benzer şekilde, meme kanseri etyolojisinde etkili çeşitli risk faktörleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

1.2.1.1. Demografik Özellikler

Demografik özellikler cinsiyet, yaş ve etnisite durumlarını kapsamaktadır. Cinsiyet olarak değerlendirildiğinde kadınlar erkeklere oranla 100 kat daha fazla meme kanseri riski

olma ihtimali taşır. Bunun yanı sıra yaş ilerlemesi de önemli bir risk faktörüdür. Bir kadının hayatı boyunca taşıdığı risk oranı, invazif ve non invazif meme kanseri açısından sırasıyla 1/8 ve 1/6 şeklindedir ve bu riskin oluşmasında yaşın ilerlemesi önemli bir yer tutar. Bir diğer risk faktörü etnisitedir. Meme kanseri beyaz kadınlarda siyalara kıyasla %20 daha fazla gözlenmektedir. Ancak ölüm oranları incelendiğinde siyah ırkta bu ölüm daha fazladır. Bu durumun nedeninin yaşam tarzı ve sosyoekonomik seviye farklılıklarının olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde doğu ile batı arasında bir kıyaslama yapılacak olursa, araştırmalar batı bölgelerde meme kanseri insidansının doğuya oranla yaklaşık 2 kat daha fazla olduğunu göstermekte ve bu farklılığın doğu ve batı bölgelerindeki farklı yaşam tarzına dayandığı düşünülmektedir.

1.2.1.2. Reprodüktif Öykü

Reprodüktif öykü menarş yaşı, doğum yapma, hamilelik ve menopoz yaşı, laktasyon, infertilite, düşük yapma durumlarını içermektedir. Östrojen alt tipleri olan östradiol, östriol, östron modulasyonu over işlevleri (menarş, gebelik, menopoz) sayesinde sağlanır. Menopoz sonrası ise, adrenal bezlerden salgılanan dehidroepiandrosteron (DHEA) östrojenin ana kaynağı olmaktadır. Erken menarş (12 yaş öncesi) ve geç menopoz (55 yaş sonrası) durumlarında olduğu gibi östrojen hormonuna maruz kalma süresinin artmasının, meme kanseri riskinin artışıyla ilişkili olduğu ve bu sürenin azalmasının koruyucu olduğu düşünülmektedir. Bunların yanı sıra, ilk doğumu ileri yaşlarda yapma ve hiç doğum yapmama durumlarının meme kanserindeki riskin artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Laktasyonun ise meme kanseri riskini azaltma etkisi olduğu gösterilmiştir. Multiparite ve infertilitenin meme kanseri üzerindeki etkileri henüz net olmamakla birlikte düşük yapma ile meme kanseri ilişkilendirilememiştir.

1.2.1.3. Genetik Risk Faktörleri

Diğer kanserlerde olduğu gibi aile öyküsü varlığı meme kanseri açısından da önemli bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalarda elde edilen veriler gösteriyor ki; ailede bir tane birinci derece meme kanseri akraba olması meme kanseri olasılığını 1.8 kat ve iki adet birinci derece akraba olması bu riski 2.9 kat arttırmaktadır. 30 yaşından önce meme kanseri tanısı almış akraba meme kanseri riskini 2.9 kat ve 60 yaşından sonra tanı almış ise riski 1.5 kat arttırmaktadır.

Kanser genetiği üzerine yapılan çalışmalarda kansere yatkınlık sağlayan farklı genler tanımlanmış ve bu genlerdeki mutasyonlara sahip bireylerin kanser riskinin fazla olduğu

gösterilmiştir. Genetik alanındaki bu gelişmeler kansere yatkınlığın kalıtılmasında rol oynayan farklı genlerin tanımlanmasına da yol açıp kanser vakalarına ve aile öyküsüne yaklaşımı etkilemiştir. Meme kanserine odaklanıldığında olguların %5-10'unun ailesel olduğu gözlemlenmektedir. Kalıtsal meme kanseri ile ilişkilendirilmiş BRCA1/2, TP53, PTEN gibi çeşitli genler keşfedilmiştir.

1.2.1.4. Çevresel Faktörler:

1.2.1.4.1. Sosyoekonomik Seviye

Bu etmen, diğer etmenlerle tamamıyla bağımsız olarak değerlendirilememekle birlikte, yüksek sosyoekonomik seviyenin meme kanseri riskini 2 kat arttırdığı gözlemlenmiştir. Yüksek ve düşük sosyoekonomik düzeyin arasındaki meme kanseri riski farkının reproduktif alışkanlıkların arasındaki farktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

1.2.1.4.2. Radyasyona Maruz Kalma

Bu etmende maruz kalma yaşı önemli bir faktördür. Memenin aktif olarak gelişiminin olduğu 10-14 yaşlarında radyasyona maruz kalma meme kanseri riskini artırırken, 45 yaş sonrası maruz kalma veya radyo terapinin risk üzerine bir etkisi bulunmamaktadır. Terapi amaçlı yapılan işlemlerden dolayı radyasyona maruz kalmanın meme kanseri riski üzerine etkisi tartışmalı olmakla birlikte genetik geçiş riski taşıyan olgular hariç bu risk yok ya da önemsenmeyecek kadar az kabul edilmektedir (Koçak ve diğ. 2011).

1.2.1.4.3. Alkol Kullanımı, Beslenme Alışkanlığı ve Egzersiz

Alkol kullanımı östradiol serum seviyelerinde artışa neden olmakta ve kullanım miktarı ile süresinin meme kanseri riskinde artışa yol açtığı düşünülmektedir. Suzuki ve diğ. tarafından yaklaşık 1200 invazif meme kanserli hasta üzerinde yapılan çalışmada, yüksek miktarda alkol alımının östrojen reseptör pozitif meme kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Terry ve diğ. 2006, Suzuki ve diğ. 2005).

Yağ bakımından zengin gıdaların uzunca süre tüketimi, serum östrojen miktarını arttırmasına dayanarak meme kanseri riskinin de artmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur, ancak net bir kanıya ulaşılamamıştır. Vitamin D tüketiminin meme kanserine karşı koruyucu olabileceğini savunan çalışmalar bulunmaktadır. Vitamin A, E ve C'nin meme kanseri riskine katkısı, sigara ve meme kanseri ilişkilendirilmesi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları gibi tartışmalıdır. Bunların yanı sıra, kafein ve meme kanseri

riski arasında bir ilişki gözlemlenmemiştir. Son olarak, egzersiz yapılmasının meme kanseri riskini azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

1.2.1.4.4. Hormon Replasman Tedavisi (HRT)

HRT uygulanan kadınlarda, alkol kullanımı, aşırı kilo ve geç menapoz risk faktörlerine benzer şekilde meme kanserine yakalanma riskinin arttığı gözlemlenmiştir (Koçak ve diğ. 2011).

1.2.1.5. Diğer Faktörler

1.2.1.5.1. Vücut Kitle İndeksi

Yapılan çalışmalar, postmenapozal meme kanserine yakalanma olasılığının fazla kilolu ve obez kadınlarda daha fazla olduğunu göstermiş ancak premenapozal kadınlarda daha düşük risk olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak aynı menapozal evrede olan kadınlarda yapılan bazı çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (Xia ve diğ. 2014).

1.2.1.5.2. Proliferatif Meme Lezyonları

Bu tip meme lezyonları içerisinde sitolojik atipi bulunduranlar invazif ve non invazif meme kanseri için risk oluşturmaktadırlar. Atipi olmayan bir proliferatif lezyonun meme kanseri oluşturma riski atipi olana oranla daha düşüktür.

1.2.1.5.3. Kişisel Meme Kanseri Öyküsü

Kişisel meme kanseri öyküsüne sahip bireylerde kontralateral memede invazif kanser gelişme riski daha fazladır.

1.2.1.5.4. Yoğun Meme Yapısı

Mamografik olarak yoğun meme yapısı olan kadınlar, olmayanlara göre yaklaşık 5 kat daha fazla meme kanserine yakalanma riski taşımaktadırlar (Koçak ve diğ. 2011).

1.3. MEME KANSERİ GENETİĞİ

Diğer kanser tiplerine benzer şekilde meme kanseri de hücre büyümesi ve gelişiminde rol alan temel hücresel yollarda görevli genlerin değişimi ile multifaktöriyel etkiler sonucunda meydana gelmektedir. Bu değişimlerin çoğu yalnızca kanserli dokularda bulunan kanser hücrelerinde olurken, germ hücrelerinde meydana geldiğinde kalıtsal bir özellik gösterirler. Malignite oluşması için belirli genlerin özel bölgelerinde değişimlerin gözlemlenmesi gerekmektedir. Hücre büyümesi ve farklılaşması gibi fonksiyonların normal

bir şekilde gerçekleşmesinden sorumlu genlerde (protoonkogen) meydana gelen değişimler sonucu protoonkogenler onkogenlere dönüşür ve hücre bölünmesi kontrolü kaybedilerek malignite meydana gelir. Onkogenlerin ekspresyon seviyelerinde kantitatif değişikliklerin oluşması veya yapısında değişikliklerin meydana gelmesi ile kanser oluşumuna katkıda buldukları savunulmaktadır. Protoonkogenler nokta mutasyonu, delesyon, kromozomlarda yeni düzenlenmeler (kırık veya translokasyon), gen amplifikasyonu ve insersiyon sonucu olarak onkogenlere dönüşebilirler. Meme kanserinde onkogen amplifikasyonun tümör oluşumu ile ilişkilendirildiği temel genlerden biri *cerbB-2(Her2-neu)* genidir. Tüm bu süreçler sonucu oluşan onkogen ürünleri, hücre proliferasyonu ve farklılaşması esnasında hücre nükleusundan plazma zarına kadar uzanan birçok hücre bölümünde görev alırlar. Örneğin onkogenler büyüme faktörleri veya hormon reseptörlerine ait kodları barındırabilir ve bu sayede plazma zarından nükleusa belirli sinyallerin iletimini sağlayabilirler. Bazı durumlarda onkogenler, transkripsiyon düzenleyici faktörlere benzeyen ve DNA'ya bağlanan proteinleri sentezleyerek gen ekspresyonunu kontrol edebilirler. Onkogenler hücre düzeyinde dominant bir etki gösterirler ve tek bir mutattan allelin var olması ve aktifleşmesi, hücrenin malignite göstermesinde yeterlidir.

Onkogenler dışında bir diğer önemli gen grubu tümör-baskılayıcı genlerdir. Malignite oluşumuna neden olan onkogenlere zıt olarak tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde görevli genlerin kontrolünü sağlayarak tümör oluşumunu engellerler. Tümör baskılayıcı bu genlerde bir değişim veya hasar meydana gelirse, hücre büyüme kontrolü ortadan kalkar ve yine kanser oluşumu gözlenir. Bu tip genlerdeki mutasyonlar çekinik özellik gösterirler ve tek bir normal allelin olması normal hücre fonksiyonunun yerine gelmesi için yeterlidir (Öztürk 2006, Lodish ve diğ. 2012).

Son olarak, daha özelleşmiş gen sınıfı olan caretaker (bakıcı) genleri kanser ile ilişkilendirilmiştir. Bu genler genom bütünlüğünü sağlamakla görevlidir. İnaktif halde olduklarında, hücreler artan hızda mutasyonlara açık hale gelmektedirler. Bu mutasyonlar hücre büyümesi ve çoğalmasına görevli genlerde meydana gelip kansere yol açabilmektedirler. Sonuç olarak, bu üç sınıfta bulunan genler hücre çoğalmasını düzenlenmesinde veya apoptozis ile hücre ölümünün gerçekleşmesinde görevli olmakla birlikte bir kısmı da hasarlı DNA onarımında görev yapan proteinleri kodlamaktadırlar (Lodish ve diğ. 2012).

1.3.1. Meme Kanserinde Etkili Onkogenler

Diğer kanser tiplerinde de ileri sürülen tümör oluşumunun çok adımda gerçekleşmesi hipotezinin meme kanseri için de benzer şekilde olduğu düşünülmektedir. Meme kanseri oluşumu bahsedilen mekanizmalarla birlikte onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde oluşan birtakım değişimler sonucu gerçekleşir. Meme için ayırıcı özellikte olan çeşitli onkogenler mevcuttur (ras ,myc ve cerbB-2 (veya HER2/neu)) ve bu genlerin normal ve kanserli meme dokularında ekspresyonları gözlemlenmektedir.

Meme kanseri oluşumunda önem taşıyan bazı onkogenler aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır.

1.3.1.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR)

Hücre zarında bulunan bu reseptör ailesi EGFR, HER2, HER3 ve HER4'ü kapsamaktadır. Bu ailede bulunan üyeler transfosforilasyon yoluyla birçok etkileşim yaparak heterodimerler oluşturabilmekte ve çeşitli proteinlerin aktivasyonunu sağlayabilmektedir. Sinyal sistemi şu şekilde işlemektedir; EGF'nin reseptörüne bağlanıp reseptörde uyarılmaya yol açmasının ardından hücre içerisine alımı gerçekleşir. Bu esnada EGFR'de otofosforilasyon meydana gelir ve hücrede bulunan diğer substratların fosforilasyonu sağlanır. Hücre zarından gelen uyarıyı nukleusa ulaştıran sinyal sisteminde bazı proto-onkogenler de görev yapmaktadır ve bunların birçoğunun kansere zemin hazırlayabileceği bilinmektedir. Bu sinyal yolağında meydana gelen onkogenik bir mutasyon mitozun sürekli aktif kalmasını sağlayarak kansere yol açabilmektedir. EGFR gen amplifikasyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu ve kanser hücrelerinde gözlemlenmesi sebebiyle onkogen olarak sınıflandırılmaktadır. Meme kanseri vakalarının neredeyse yarısında EGFR'nin aşırı üretimi görülmekle birlikte meme kanserinde gen amplifikasyonu dışında herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (Öztürk 2006).

1.3.1.2. CerbB-2 (HER2/Neu) Geni

Bu genin ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasında görev almaktadır. EGFR ailesinden olan bu genin amplifikasyon ve aşırı ekspresyona bağlı olarak bir takım agresif meme kanseri tiplerinin oluşumuna katkıda bulunan bir onkogen olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda meme kanseri hastalarının yaklaşık %30'unda terapi için hedeflenmiş ve önemli bir belirteç haline gelmiştir (Mitri ve diğ. 2012). Plazma zarında reseptör tirozin kinaz sınıfında olan bu reseptör liganda bağlı veya bağımsız olarak diğer üç reseptör HER1,3 veya 4 ile

dimerizasyon oluşturur. Bunun sonucunda tirozinlerin otofosforilasyonu gerçekleşir ve bu MAPK (Mitojen-Aktiveli Protein Kinaz), PI3K/Akt (fosfoinositid 3-kinaz) ve PKC (protein kinaz C) gibi sinyal yollarının aktive olmasını sağlar. Özetle bu reseptör ailesi hücre çoğalmasında tetikleyici yollarla görevlidir ve bu yüzden kontrolsüz bir hücre büyümesi olmaması için sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir (Olayioye 2001, Roy ve Perez 2009). Meme kanseri vakalarının yaklaşık %15-30'unda bu genin aşırı ekspresyonu görülmektedir (Burstein 2005). Ayrıca HER2 proteinlerinin hücre zarında kümeleşmesinin tümör oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kaufmann ve diğ. 2011).

1.3.1.3. c-Myc Geni

Bu genin protein ürünü hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoziste görevli genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol alan bir fosfoproteindir. Birçok kanserde bulunan c-Myc mutasyonu, bu genin sürekli ekspresyonuna yol açmaktadır. Bu durum hücre çoğalması gibi görevleri olan genlerin kontrolünün ortadan kalkmasıyla kanser oluşumuna yol açmaktadır. Ayrıca bu gende meydana gelen amplifikasyon hücre döngüsünde aksamaya ve hücrenin apoptoza gönderilmesine yol açar. Bu genin aşırı üretimi ve yapısal değişiklikleri meme kanseri oluşumunu tetikler. İstatiksel olarak, karsinomların %32'sinde myc gen amplifikasyonuna rastlanırken invazif duktal karsinomlu vakalarda ise bu gende yapısal değişiklikler gözlemlenmiştir. c-Myc gen amplifikasyonu meme kanserinde oldukça sık ortaya çıkan genetik değişikliklerdendir ve tek başına meme kanseri oluşumu için yeterli olabilmektedir (Öztürk 2006, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17869>).

1.3.1.4. Ras Geni

G proteini sınıfından olan Ras proteinleri hücre içinde sinyal iletiminden sorumludurlar. Genelde plazma zarındaki büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmaya uzanan kısımları çevresinde bulunurlar. Gelen sinyale göre aktive olduklarında hücre büyümesi, farklılaşması ve yaşamı için gerekli genlerin ekspresyonu için diğer proteinlerin de uyarılmasını sağlarlar. Ras genlerinde meydana gelebilecek mutasyonlar Ras proteinlerinin kalıcı bir şekilde aktif kalmasını sağlayabilir ve bu durum hücreye gelen bir sinyal olmamasına rağmen hücre içinde aşırı aktif bir sinyal iletimi olmasına neden olur. Bu sinyaller sürekli hücre büyümesi ve bölünmesine neden olabileceğinden Ras sinyaline bağlı kanser oluşumu gözlemlenebilir. Ras geninin aşırı ekspresyonu meme kanserlerinde en sık karşılaşılan mutasyon türüdür. Metastazlarda ve histolojik olarak ileri derecedeki tümörlerde

ras'ın artmış ekspresyonu görülmektedir ve bir ras geni olan *H-ras* genindeki mutasyonlar meme kanserinde %70'lik bir risk oluşturmaktadır (Öztürk 2006, Goodsell 1999).

1.3.1.5. Siklinler, Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK) ve İnhibitörleri (CDKI)

Bu proteinler, hücre döngüsünü doğrudan kontrol etmekte ve sürecin sıralı ve kademeli olarak ilerlemesinde görev almaktadırlar. Hücre döngüsü sırasında, siklinler Cdk ile kompleks oluşturarak CDK aktivasyonunu başlatır ancak CDK'nın tamamen aktive olabilmesi için ek olarak fosforilasyonda gerekmektedir. Aktif hale geçen CDK kendi substratlarını fosforileder ve hücrenin G₀ fazını geçip mitoz girmesini sağlarlar. CDKI ise siklin-CDK kompleksinin kinaz aktivitesini engeller. Siklinlerin amplifiye olması onkogen gibi görev yapmasına neden olur ve CDKI'nın ise tümör baskılayıcı özellikte olduğu düşünülmektedir. Meme kanserinde siklin -D1 ve E'nin %30 kadar aşırı üretimi ortaya çıkmış ve bu artışların hücre kontrolünü bozduğu bulunmuştur. Bu genlerdeki mutasyon veya delesyonun meme kanserine yol açabileceği düşünülmektedir (Öztürk 2006, Lim ve Kaldis 2013, Keaton 2007).

1.3.1.6. Östrojen Reseptörü (ER) ve Progesteron Reseptörü (PR)

Meme kanseri hücreleri hücre yüzeyinde, sitoplazmada ve nükleusta reseptörlere sahiptirler. Hormon gibi kimyasal uyarılar reseptöre bağlanarak hücrede değişimlere sebep olurlar. ER, PR ve daha önce bahsedilen HER2 önemli reseptörlerdendir. Eğer bu reseptörlerden biri veya fazlası kanser hücresinde bulunuyorsa, hücrenin büyümesi o reseptörün ligandına bağlı olarak gerçekleşir. Örneğin bir ER+ kanser hücresinin büyümesi östrojene bağlıdır ve östrojen etkisini engelleyecek ilaçlarla kanser tedavisi uygulanabilir. ER ve PR izoformları bulunur ve birbirleriyle homodimer ya da heterodimer oluşturarak görev yaparlar. Meme kanserlerinde, izoform çeşitliliği dimer oluşumundaki farklılıklara ve uyarının bağlanma spesifikliğinde değişikliğe yol açar ve hedef genin farklı şekilde kontrol edilmesine sebep olabilirler. Meme kanseri oluşumunda dişi seks hormonlarının rolü olduğu gösterilmiş ve onkogen ya da tümör baskılayıcı gen sınıfına girmeyen bu reseptör genleri, meme kanserinin başlangıcı ve ilerlemesinde görev almaları nedeniyle kansere yol açmada önem taşırlar (Öztürk 2006, Kumar ve diğ. 2005, Sotiriou ve Pusztai 2009)

1.3.2. Meme Kanserinde Etkili Tümör Baskılayıcı Genler

1.3.2.1. TP53 Geni

Bu gen tümör baskılayıcı protein olan ve genomik stabilitenin korunmasında önemli rol oynayan P53'ü kodlar. P53 proteini hücre döngüsünde, apoptoziste, DNA tamirinde veya metabolizma değişikliklerinde görev alan hedef genlerin ekspresyonunu düzenler. Toksik kimyasallar, UV ışık ve radyasyon gibi etmenlerle, DNA hasarı olduğunda p53 hasarı ortadan kaldırmakla görevli genleri aktive eder. Eğer hasar düzeltilemezse hücrelerin bölünmesini engelleyerek apoptozisi sağlar ve böylece tümör oluşumuna yol açabilecek durumları engellemiş olur Bu gendeki mutasyonlar meme kanserini de içeren birçok kanser tipiyle ilişkilendirilmiş ve birçok tümör tipinde mutasyona uğradığı saptanmıştır. Meme kanserlerinin %20-30'unda inaktif p53 proteini gözlemlenirken, meme kanserlerinde bu proteinin yaklaşık %60'ının nokta mutasyon tipi görülmüştür (Öztürk 2006, Vymetalkova ve diğ. 2015, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>).

1.3.2.2. ATM Geni

Bu gen, DNA çift zincirli kırıklara hücrel yanıtı, DNA hasar yollarında rol oynayan BRCA1 ve p 53 gibi önemli proteinlerin fosforilasyon yoluyla aktivasyonunu sağlayan protein kinaz sentezinden sorumludur. Yıllar önceki çalışmalarında Swift ve diğ. , bu genin otozomal resesif formunun özellikle meme kanseri olmak üzere kanser riskini arttırdığını bildirmişlerdir. Bunun üzerine bu genin üzerine çeşitli mutasyon tarama ve SNP (single nükleotide polymorphism) çalışmaları yapılmış ve Renwick ve ark. ailesel meme kanseri vakalarında, ATM (Mutant ataxia-telangiectasia) geninin çeşitli genetik varyasyonlarının meme kanseri riskini arttırdığını göstermiştir. Allellerden biri veya ikisinde meydana gelecek mutasyonun meme kanseri gelişimine yol açtığı da gözlemlenmiştir (Goldgar ve diğ. 2011, Ahmed ve Rahman 2006).

ATM ve TP53 geni dışında tümör baskılayıcı aday genler de bulunmuştur. Bu genler arasında hücre-hücre adezyonunu sağlayan ve hücre hareketini sınırlamakla sorumlu *E-kaderin* geni de bulunmaktadır. Bu genin ekspresyonu sağlanmadığında epitel hücrelerin hareketlilik yeteneğinde ve lokal yayılma da artış gözlenir. *Brush-1* geni ise bir takım meme kanseri hücre soylarında delesyonuna rastlanmış diğer bir aday gendir. Bunların dışında Bcl-2 gibi apoptoziste rol oynayan genler ve normal hücrelerde aktivite göstermeyip kanser hücrelerinde aktif olan telomeraz genlerinin de meme kanserinde rol oynadığı düşünülmektedir (Öztürk 2006).

1.3.3. Ailesel Meme Kanseri Yatkınlık Genleri

Ailesel meme kanseri vakaları sporadiklere kıyasla oldukça az gözlemlenmekte ve meme kanseri vakalarının %5-10'unu oluşturmaktadır. Birçok gen meme kanseri oluşumuna katkıda bulunmaktadır ve bunlardan ailesel yatkınlığı sağlayan genel olarak germ hücrelerinde genom devamlılığını koruyan proteinleri üreten genlerde mutasyonların meydana gelmesidir. Yüksek penetransa sahip BRCA1 ve BRCA2 genleri bu genler arasında gösterilmektedir. Bu genlerin temel görevi DNA çift zincirli kırıklarının tamirinin hatasız bir şekilde yerine getirilmesini sağlamaktır. Ayrıca hücre proliferasyonu kontrolü esnasında tümör baskılayıcı proteinlerle, hücre döngüsünde görevli önemli proteinlerle ve DNA rekombinasyonunda rol oynayan proteinlerle bağlantısı gösterilmiştir. İkisinden birinde bir mutasyon meydana gelmesi, DNA'nın uygun bir şekilde tamir edilememesine neden olur. Bu durumun meme kanseri riskini arttırdığı gösterilmiş ve meme kanser riski tespitinde yapılan mutasyon analizinde ilk sıralarda yer almıştır. Bu genlerde meydana gelen germ hücre soyu mutasyonuna sahip kadınların yaşam boyu meme kanseri geliştirme riski %50-80 olarak ileri sürülmektedir (Öztürk 2006, Friedenson 2007).

1.4. DNA HASAR ÇEŞİTLERİ

1.4.1. Tek Zincirli DNA Lezyonları

Tek DNA zincirinin etkilendiği ve tamamlayıcı zincirin tamir esnasında kalıp olarak kullanıldığı bu lezyonlar, baz-çıkarma onarımı (BER), nükleotid-çıkarma onarımı (NER) veya hata eğilimli onarım yollarıyla tamir edilir. Kullanılacak tamir mekanizmaları bazı durumlarda örtüşebilseler de, genelde DNA lezyon çeşidine özgü farklı yollar tercih edilir.

1.4.2. Çift Zincirli DNA Kırıkları

Çift zincirde meydana gelen kırıklar tek zincirdekilere göre daha fazla probleme yol açarlar. Bunun nedeni tamir için gerekli tamamlayıcı DNA ipliğinin olmamasıdır. DSB'nin meydana gelmesine iyonize radyasyon (IR) gibi dış etmenler ile replikasyon çatalında görülen aksaklıklar gibi iç etmenler de neden olabilirler. Ökaryotlarda tanımlanan üç temel DSB tamir yolu bulunmaktadır ve bunlar homolog rekombinasyon (HR, rekombinasyonel onarım), tek-zincir bağlanması (single-strand annealing, SSA) ve homolog olmayan uç birleşmesi (non-homologous end joining, NHEJ) olarak sınıflandırılabilir. HR ve SSA sekans homolojisine dayanırken, NHEJ homolojiyi hiç kullanmamakta ya da çok az faydalanmaktadır (Gudmundsdottir ve Ashworth 2006).

Bahsedildiği üzere DNA hasarının meme kanseri oluşumunda önemli bir etken olduğu kanıtlanmıştır. Buradan yola çıkarak genom devamlılığı için DNA tamir yolağında rol oynayan proteinler de oldukça önem taşımaktadır.

1.5. DNA HASAR TAMİR YOLAKLARI

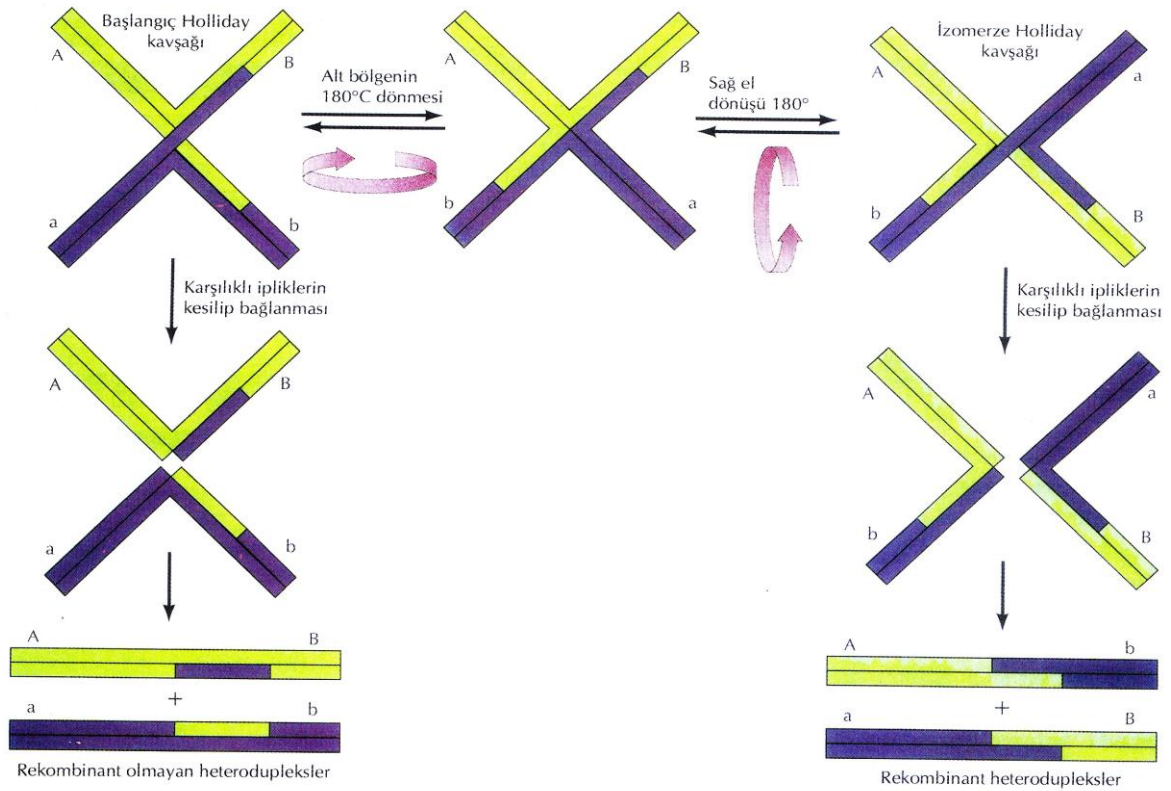
Ökaryot hücrelerde gözlemlenen ve korunmuş olan çeşitli DNA hasar tamir mekanizmaları hasarlı tek bir bazı, tek zincir kırıkları (SSB) ve daha şiddetli sorunlara neden olabilecek çift zincirli DNA kırıklarının (DSB) tamirinde görev almaktadırlar.

1.5.1. Homolog Rekombinasyon

Homolog rekombinasyon, hasarlı DNA zincirinin hasarsız olan ile rekombinasyonu sonucu onarımı gerçekleştirme temeline dayanır. DNA replikasyonu esnasında, DNA polimerazın işlevini yerine getirmesini engelleyen özellikle timin dimerleri veya birtakım lezyonların olduğu hasarların onarımında kullanılır. Bunlara ek olarak, çift zincirli DNA kırıklarının onarımında da rol oynamaktadır. Bu durumda iki DNA ipliği de hasara uğradığı için onarım zordur ve hasarsız kromozom üzerindeki homolog DNA dizileri kullanılarak onarım gerçekleşir. Tek DNA molekülündeki DSB'lerin doğrudan birleştirilmesiyle onarılması (NHEJ), hasar bölgesindeki bazların kaybı olabileceğinden hata oranı daha yüksek bir onarım şeklidir. Ailesel meme kanserinden sorumlu BRCA1/2 genlerinden kodlanan proteinleri DSB tamirinde görevli olmalarından dolayı, bu tip DNA hasarının kadınlarda meme kanserine neden olabileceği gösterilmiştir.

Holliday modeli, rekombinasyon mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar için temel oluşturmaktadır. Bu model, iki atasal DNA molekülünde aynı bölgede çentik oluşturulması ile rekombinasyonun başladığını savunmaktadır. Kesik olan DNA ipleri belirli ölçüde çözüldükten sonra diğer DNA molekülündeki kesilmemiş tamamlayıcı iplikle eşleşir. Bu esnada Holliday kavşağı olarak adlandırılan çaprazlanmış yapıda bir ara ürün ortaya çıkar. Daha sonra bu kavşak, çaprazlanmış ipliklerin kesilip yeniden birleştirilmesi yardımıyla rekombinant molekülün oluşturma amacıyla çözülür. Holliday kavşağının yönelimine göre iki farklı izomer oluşumu gerçekleşir. Bu izomerlerin birisi, başlangıçtaki iplik değişimi ile oluşmuş ve rekombinant olmayan heterodupleksleri oluşturan şekilde gelişirken bir diğeri de çaprazlanmış ipliğin iki dönüşü sayesinde başlangıçta kesilen ipliklerin değil kesilmemiş atasal ipliklerin çaprazlandığı bir izomerdir. Bu izomerin kesilme ve yeniden birleşmesi ise rekombinant DNA içeren yeni DNA moleküllerinin oluşmasını sağlar. Holliday modeli tarafından açıklanamayan nokta her iki atasal molekülde aynı anda

ve pozisyonda kesilme ile rekombinasyonun nasıl meydana geldiğidir. Günümüzde DNA onarımı esnasında gözlenen rekombinasyonun DSB'ler ile başladığı bilinmektedir. DSB'de önce her iki iplik nükleazlar yardımıyla 5'den 3' yönüne yıkılır ve tek iplikli uçlar haline getirilir. Bu uçlar daha sonra homolog baz eşleşmesi yardımıyla diğer atasal DNA molekülüne geçer ve ardından oluşan boşluklar onarılır. Son olarak, bahsedildiği gibi iplikler rekombinant ve rekombinant olmayan heterodupleks moleküllerin oluşmasını sağlayacak şekilde çift Holliday kavşaklı bir molekül ortaya çıkacak şekilde bağlanır (Çizim 1.1) (Sakızlı ve Atabey 2006).



Çizim1.1. Holliday kavşaklarının izomerleşmesi ve çözünmesi sonucunda oluşan rekombinant ve rekombinant olmayan heterodupleksler.

DSB oluştuğunda DNA uçlarının homolog kromozom baz alınarak yapılan etkin tamirinde nükleaz, helikaz, ligaz ve topoizomeraz gibi çeşitli enzimler görev yapmaktadırlar. Bu enzimler arasında olan helikazlar DNA zincirinin çözünmesinde görev alarak onarım sırasında önemli bir görev üstlenirler. RecQ DNA helikazları bakterilerden insanlara kadar korunmuş ve DNA hasar onarımının hasarsız bir şekilde gerçekleşmesinde önemli rol oynayan helikazlardır. İnsanlarda beş adet RecQ homoloğu vardır ve bu genlerden üçünde (BLM, WRN, RTS/RECQ4) meydana gelen mutasyonlar genom devamlılığını etkileyerek kansere yatkınlığa ve ayrıca erken yaşlanma, Bloom, Werner and Rothmund-Thomson

sendromlarına neden olmaktadır. RecQ helikazlar homolog rekombinasyona (HR) öncülük ederken hem erken hem de geç evredeki rekombinasyon basamaklarında görev yaparlar ve krossover basamaklarını engellerler (Sakızlı ve Atabey 2006).

RecQ helikaz proteinleri HR sırasında çeşitli onarım basamaklarında görev yapmaktadırlar. İlk olarak DSB oluştuğunda, MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) kompleksi tarafından farkedilir. Ardından MRE11'in ekzonükleaz aktivitesiyle DNA uçlarından 5'den 3' ne doğru parçalar kesilir ve eşzamanlı olarak Sae2/CtIP endonükleazların aktivitesiyle 3' tek zincirli DNA (ssDNA) parçaları oluşturulur. Homolog kalıp kullanılarak onarımı yapılacak DNA parçasına yönelim sağlandığı ve NHEJ gibi diğer onarım mekanizmaları engellendiği için bu ilk aşamalar oldukça önemlidir. Bu işlemlerin ardından DNA uçlarını bir daha kesmek için birinde EXO1 ve diğerinde Sgs1 ile Dna2'nin rol oynadığı iki yoldan biri kullanılır. Bu süreçte helikaz aktivitesi olan ve DNA parçası kesiminde görev yapan RecQ proteinleri devreye girer. ssDNA'ya bağlanan RPA proteinleriyle ssDNA kaplanır ve ikincil yapıların oluşumu engellenir. Ardından Rad52 proteini Rad51'in RPA kaplı ssDNA bölgesine gelmesini sağlar. Rad51, RPA ile yerdeğiştirerek Rad51 nükleofilamentini oluşturur. DNA ipliğinde birikip D-loop oluşumunun sağlanmasının ardından, Rad51-ssDNA filamenti kardeş kromatid üzerinde homolog sekans taraması yapar ve bu sekans bulunduğu kırık uçların hatasız tamiri için kardeş kromatid kalıp olarak kullanılır. Onarım tamamlandıktan sonra, tüm rekombinasyon ara elemanları ortamdan ayrılır ve işlem sonuçlanır (Gudmundsdottir ve Ashworth 2006, Bernstein ve diğ. 2010).

Rad51 nükleofilamentinin bozulması ve D-loop oluşumunun engellenmesinde çeşitli RecQ helikazlar görev yapmaktadır. D-loop oluşuktan sonra, çatal göçü meydana gelir. Ardından bu yapının çözünmesi için homolog kromozomların uçlarının ikinci kez tutulmasıyla görevli farklı iki mekanizma rol oynar. Bunlardan birincisi DNA ipliğinin orijinal kalıbına tekrar birleştiği SDSA (synthesis dependent strand annealing) süreci, diğeri de BLM-TOP3-RMI1 gibi kompleks ile çözülebilen ikili-Holliday kavşakları oluşumudur. Sonuç olarak, RecQ proteinleri HR sırasında, DSB kısmının kesimine yardımcı olma, Rad51 protein filamentinin ve D-loop oluşumunun engellenmesi ve double-Holliday kavşaklarının çözünmesi gibi önemli görevler üstlenirler. RecQ helikazların Topoisomerase III (TOP3) ile spesifik interaksiyonları DNA'ya bağlanma statülerinin değişmesi bakımından önem taşır. TOP3 enzimi ssDNA veya dsDNA ipliğinin oluşmasını geçici kesikler oluşturabilmesi ve ardından birleştirilmesini sağlayabilmesi sayesinde yapar ve iki form arasında geçişi sağlayabildiği için tamir mekanizmalarında önem taşır (Bernstein ve diğ. 2010).

1.5.2 Tek İplikli Bağlanma-Eşleşme (SSA- Single-Strand Annealing)

Bu DSB onarım yönteminde yine homolog sekanslardan faydalanılır. Ancak rekombinasyonel onarımdan farklı olarak bu yöntemde RAD51 görev yapmaz. Görev alan proteinler ve mekanizmalar tam olarak bilinmese de, ilk olarak DSB uçlarının ekzonükleazlar (genelde MRN kompleksi) tarafından kesilmesinin ardından RPA ve RAD52'nin bağlanabileceği tek zincirli DNA sarkıntıları oluşturulur. Bu sarkıntılarda homolojiye rastlandığında, birleşme gerçekleştirilir ve çıkıntı olan uçlar RCC1/XPF nükleazlar tarafından düzeltilir ve ardından oluşan boşluk DNA polimeraz tarafından gerçekleşen DNA sentezi ile doldurulur. SSA yöntemi, silinmelere yol açabilmesinden dolayı hataya yol açabilecek bir yöntemdir. Rekombinasyonel onarım gibi bu onarımında hücre döngüsünde S-G₂ fazlarında aktif olduğu düşünülmektedir (Gudmundsdottir ve Ashworth 2006).

1.5.3. Homolog Olmayan Uçların Birleşimi (NHEJ- non-homologous end joining)

Homolojiye dayanmayan bu DSB onarım yönteminde ilk olarak kırık DNA uçlarına Ku70/Ku80 heterodimerlerinin bağlanması gerçekleşir. Ardından heterodimerler kırılan uçlar arasında köprü oluşturmak için bir araya gelirler ve DNA bağımlı protein kinazların (DNA-PKcs) ortama gelmesini sağlarlar. Nedeni tam olarak kesin olmasa da DNA-PKcs kinaz aktivitesi NHEJ için gereklidir ve DNA-PKcs otofosforilasyonunun önem taşıdığı düşünülmektedir. DNA-PKcs'nin substratı, bu kinazlarla kompleks oluşturan bir nükleaz olan Artemis'tir. İkisi birlikte endonükleaz aktivitesi gösterir ve DNA uçlarını XRCC4-Ligaz IV tarafından gerçekleştirilecek ligasyon işlemi için hazırlar. NHEJ, DSB tamiri için yaygın kullanılan bir onarım yöntemi olup hücre döngüsünün G₀, G₁ ve erken S evrelerinde (tahminen tüm evrelerde) aktif olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizmanın hataya yatkın bir onarım sağladığı ve kırılan uçların birleşmesi sırasında kırılma bölgesinde sıklıkla DNA dizisinde değişimlerle sonuçlandığı düşünülmektedir (Gudmundsdottir ve Ashworth 2006).

1.6. DSB TAMİRİNDE BRCA PROTEİNLERİ VE DİĞER PROTEİNLERLE ETKİLEŞİMLERİ

Yapılan ilk çalışmalar BRCA1'in DNA tamiri sırasında nükleusta RAD51 ile kolokelize ve ilişkili olduğunu göstermiştir. BRCA1 sentezlenmeyen hücrelerin IR'ye karşı oldukça duyarlı olduğu ve yapısal ve sayısal kromozomal bozukluklara yol açarak tamir edilemeyen DNA hasarlarının oluşmasına neden olabileceği ortaya koyulmuştur. İleriki çalışmalar, RAD51 aracılı DNA tamiri sırasında BRCA1/2 ile RAD51 arasında fonksiyonel

bağlantı olduğunu göstermiştir. BRCA2 doğrudan RAD51 aracılı DNA tamirinde görev alıp GC ve SSA arasındaki seçimi sağlarken, BRCA1 bu etkileşim ve yolaklardan önce devreye girer. BRCA1, GC ve SSA ayırımından önce görev alır ve iki tamir yolağında da etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunur. Ayrıca GC ile DSB tamiri sırasında RAD51 ile kolokelize halde bulunur ve etkileşim gösterir. BRCA1'in NHEJ üzerine etkili olmadığını savunan çalışmalar olsa da BRCA1'in NHEJ'in alt yolaklarında görev alarak daha az hataya yatkın NHEJ gerçekleşmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. Böylece BRCA1, HR ile hatasız DSB tamirini sağlamanın yanı sıra NHEJ'in mutasyonel potansiyelini azaltıp genomik kararlılığa katkıda bulunmaktadır. BRCA1, DNA tamiri ve genomik kararlılık sağlanırken, RAD51 dışında birçok proteinle etkileşime girmektedir. Bunların arasında BRCC (BRCA1/2 içeren kompleks) ve BASC (BRCA1 ile ilişkili genom gözetim kompleksi) kompleksleri bulunur. BASC kompleksi tümör baskılayıcı, DNA hasar sensörü olan ve sinyal iletiminden sorumlu MRN kompleks, MSH2/6, MLH, ATM kinaz, DNA replikasyon faktörü C (RFC), PCNA ve BLM gibi proteinleri içerir (Gudmundsdottir ve Ashworth 2006).

BRCA2, RAD51'in rekombinaz fonksiyonuna bağlı olan HR aracılığıyla DSB tamirinde oldukça önem taşımaktadır. BRCA2, RAD51 ile BRCA2'nin karboksi terminali ve proteininin ortasına yerleşmiş BRC tekrarları aracılığıyla etkileşime girer ve onun fonksiyonunu düzenler. BRC tekrarları türler arasında oldukça korunmuştur ve BRCA2 fonksiyonu için önem taşımaktadır. BRCA2 ve RAD51 arasındaki bu fiziksel etkileşimin RAD51'in nükleusa ve DNA hasarı kısmına taşınmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Ardından rekombinasyonun meydana gelmesi için RAD51 BRCA2'den ayrılır ve ssDNA'da nükleoprotein filamentini oluşturur. Daha sonra bu filament, homolog DNA duplesi ile eşleşme oluşturur ve eşleşen DNA molekülleri arasında iplik değişimi başlar. BRCA2 hem RAD51'in DNA'da hasar bölgesine gelmesinde anahtar rol oynar hem de RAD51 filamentinin nükleasyonunu ve nükleasyon bölgesindeki RPA proteinlerinin yer değişmesini kolaylaştırır. RAD51 dışında BRCA2 proteini DNA tamiri için BRAF35, DSS1, BCCIP ve CDK gibi çeşitli proteinlerle interaksiyona girmektedir (Gudmundsdottir ve Ashworth 2006, Lu ve diğ. 2005).

BRCA1/2'nin DSB tamirinde taşıdığı bu önemli görevler bahsedildiği gibi birçok protein ile etkileşimi sonucunda gerçekleşmektedir. BRCA1/2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar yaşam boyu kanser riskinin oldukça artmasına yol açsa da meme kanseri poligenik özellik gösterdiği için birçok genin meme kanserine yatkınlığı arttırdığı

görülmektedir. Bu genler minör allel frekanslarına göre ve allelik etkilerinin büyüklüklerine göre meme kanseri oluşumunu farklı düzeyde etkilemektedirler. TP53, PTEN, ATM, NBN, RAD51 ve BLM gibi genlerin arasında bulunduğu bu genlerin birçoğu kodladıkları proteinlerle DNA hasarı sinyaline ve DSB tamirine katkıda bulunmaktadırlar. Hayat boyu meme kanserine yatkınlıkta oluşturacakları riskler birbirinden farklıdır ve yüksek, orta ve düşük olarak kategorize edilirler (Çizelge 1.1). Homolog rekombinasyonda anahtar rol oynayan RAD51 geni mutasyon ve polimorfizmleri meme kanseri için düşükten ortaya risk oluştururken, RecQ tipi DNA helikazın fonksiyonu için önemli olan BLM mutasyon ve polimorfizmleri meme kanseri için orta derecede risk oluşturmaktadır (Bogdanova ve diğ. 2013).

Çizelge 1.1. Meme kanseri için orta veya yüksek riskte mutasyonlara sahip genler

Gen	Monoallelik mutasyon	Biallelik mutasyon	Meme kanseri için riski
BRCA1	Meme ve yumurtalık kanseri	Mikrosefali ve büyüme bozuklukları	Yüksek
BRCA2	Meme ve yumurtalık kanseri	Fankoni anemisi tip D1	Yüksek
TP53	Li Fraumeni sendromu	-	Yüksek
PTEN	Cowden sendromu	-	Yüksek
BLM	Meme kanseri	Bloom's sendromu	Orta
RAD51C	Meme ve yumurtalık kanseri	Fankoni anemisi tip O	Düşükten ortaya (yumurtalık kanseri için yüksek)
RAD51D	Meme ve yumurtalık kanseri	-	Düşükten ortaya (yumurtalık kanseri için yüksek)
NBN	Meme kanseri, prostat kanseri	Nijemen Breakage sendromu	Orta
ATM	Meme kanseri, pankreas kanseri	Ataxia telangiectasia	Orta

1.7. RAD51 VE BLM GEN FONKSİYONLARI VE ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bazı çalışmalarda, DSB kaynaklı genetik instabilite ile kalıtsal ve sporadik meme kanseri arasında ilişkilendirme gösterilmiştir. DSB'lerin tamirinde rol oynayan temel yollar HR ve NHEJ yollarıdır. Her iki yolak da tümörigenezi önlemede etiyolojik önem taşısalar da, HR tamir mekanizması kardeş kromatidleri baz alarak tamir gerçekleştirilmesi bakımından oldukça önemlidir (Sassi ve diğ. 2013, Ding ve diğ. 2009). Bunların dışında, başta Rec Q helikazlar olmak üzere DNA helikazların genetik rekombinasyon ve DNA tamirinde genom stabilitesini sağlamak üzere etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, insan Rec Q helikaz genleri olan ve aynı zamanda Werner sendromu ve Bloom sendromuna yol açan WRN ve BLM genlerindeki mutasyonlar meme kanserini de içeren çeşitli kanser tipleriyle ilişkilendirilmiştir (Wang ve diğ. 2009).

15q26.1 kromozomal bölgede yer alan BLM (Bloom syndrome, RecQ helicase-like) geni tarafından kodlanan BLM helikaz (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BLM#location>), HR ile DSB tamiri sırasında duraksamış replikasyon çatalının tamirinde önemli bir role sahiptir ve DNA tarafından tetiklenen ATPaz aktivitesi ile ATP-bağımlı DNA helikaz aktivitesine sahiptir. BLM helikaz, rekombinasyon ara elemanının (Holliday kavşağı) dallanmış yapıdaki göçünün düzenlenmesine ihtiyaç olduğu zaman, HR tamamlama amacıyla görev almaktadır. Ayrıca HR sırasında, homolog sekans aranması ve iplik değişiminde öncü olan RAD51 ile interaksiyona girerler (Ding ve diğ. 2009, Shen ve diğ. 2010). Buna ek olarak, BLM, çift Holliday kavşağı ara elemanlarını, krossover olmayan rekombinantlara dönüştüren TOP3A ve RMI1 proteinleriyle kompleks oluşturur ve bu aktivitesinin mitotik hücrelerde DNA krossover oluşumunu engellemede ve kanserden kaçınmada önemli olduğu öne sürülmektedir (Broberg ve diğ. 2009). Bunların yanında, anafaz köprülerinin çözülmesiyle, doğru kromozom ayrılması sağlayarak genom bütünlüğünü sağlar (Frank ve diğ. 2010). Ek olarak, BLM-TOP3A-RMI1 kompleksinin DNA hasarı esnasında kontrol noktası sinyal yolağında ve yanıt oluşturulmasında fonksiyonu olduğu düşünülmektedir (Broberg ve diğ. 2009). Tüm bunların yanında, BASC'ın bir parçası olan BLM proteininin, tümör baskılayıcı bazı proteinler ve DNA hasar tamir proteinleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wang ve diğ. 2009).

BLM geninde meydana gelen mutasyonlar boy kısalığı, fertilité sorunları, büyüme engellenmesi, ışığa karşı duyarlılık ve kansere karşı yatkınlık ile karakterize edilebilen bir

genetik hastalık olan Bloom sendromuna neden olmaktadır (Ding ve diğ. 2009, Broberg ve diğ. 2009). BLM geni 10,11 ve 12. exonlarının işlevini yerine getiremediği fare modellerinde bu ekzonlar için heterozigot mutasyon taşıyan farelerin, APC gibi tümör baskılayıcı genleri inaktive olmuş olanlara göre daha fazla kansere yatkın oldukları gösterilmiştir. Dolayısıyla BLM genindeki haplo-yetersizliğin kanser oluşumunu tetiklemek için yeterli olduğu ortaya çıkmıştır (Bernstein ve diğ. 2010). Fareler üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, homozigot BLM kaybının embriyonik ölümlere ve heterozigot BLM formunun ise neoplazi riskinin yükselmesine yol açtığı gösterilmiştir. Bazı tartışmalı çalışmalar olmasına rağmen, Aşkenaz Yahudilerinin BLM heterozigotlarında kanser riskinde artış gösterilmiştir (Schuetz ve diğ. 2009). Diğer bir yandan, BLM protein yokluğunda, somatik mutasyonlarda ve kromozom yeniden düzenlenmelerinde artış gözlemlenebilmektedir. Ayrıca, anormal kromozom ayrılması, anöploide, kromozomal instabilite ve DNA hasar faktörlerine karşı duyarlılığa da yol açmaktadır. DNA tamir sürecini sekteye uğratan tüm bu durumlar, sonunda kanser oluşumuna yol açabilmektedir. Ek olarak, BLM'nin işlevini yerine getiremediği hücreler fonksiyonel BLM helikaz içerenlere göre yüz kat daha fazla malignan transformasyon riskine sahiplerdir. BLM eksikliği dışında, DNA tamir genlerindeki polimorfizmler de tamir sürecinin uygun bir şekilde ilerlemesini engelleyip kanser oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Son yıllardaki vaka-kontrol çalışmaları BLM polimorfizmleri ve meme kanserini de içeren çeşitli kanser tipleri arasında ilişkilendirme olduğunu göstermiştir (Sassi ve diğ. 2013, Frank ve diğ. 2010).

15q15.1 kromozom bölgesinde yer alan (Zhao ve diğ. 2014) RAD 51 geninin ürünü olan RAD51 proteini, DSB esnasında gerçekleşen HR ile tamir sürecinde, DNA çapraz bağlantı tamirinde ve kromozom stabilitesinde görev alan diğer bir proteindir (Michalska ve diğ. 2015). Escherichia coli RecA homologu olan RAD51 proteini, DSB tamiri sırasında XRCC2, XRCC3 ve BRCA1/2 gibi proteinlerle kompleks oluşturur (Zhang ve diğ. 2014, Silva ve diğ. 2010). Bu protein HRR yolağında, DSB ile hasar görmüş uçların hasarsız kardeş kromatidlere göçünde görev yapmaktadır. HRR gerçekleşirken, dallanmış göç sırasında ve Holliday kavşağının çözünmesine katkıda bulunduğu düşünülen XRCC2 proteininin RAD51 proteinine iplikçiklerin göçünde ve değişim aktivitelerinde yardım ettiği ileri sürülmektedir (Silva ve diğ. 2010). Buna ek olarak, daha önceden ayrıntılı olarak bahsedildiği gibi RAD51, HR tamiri ile DSB bulunan hasarlı kısmı yeniden sentezleyip onarmak amacıyla görev yapan BRCA1 ve BRCA2 proteinleriyle de interaksiyona girmektedir (Le Calvez-Kelm ve diğ. 2012). Ayrıca yine bahsedildiği gibi, HR ile tamir

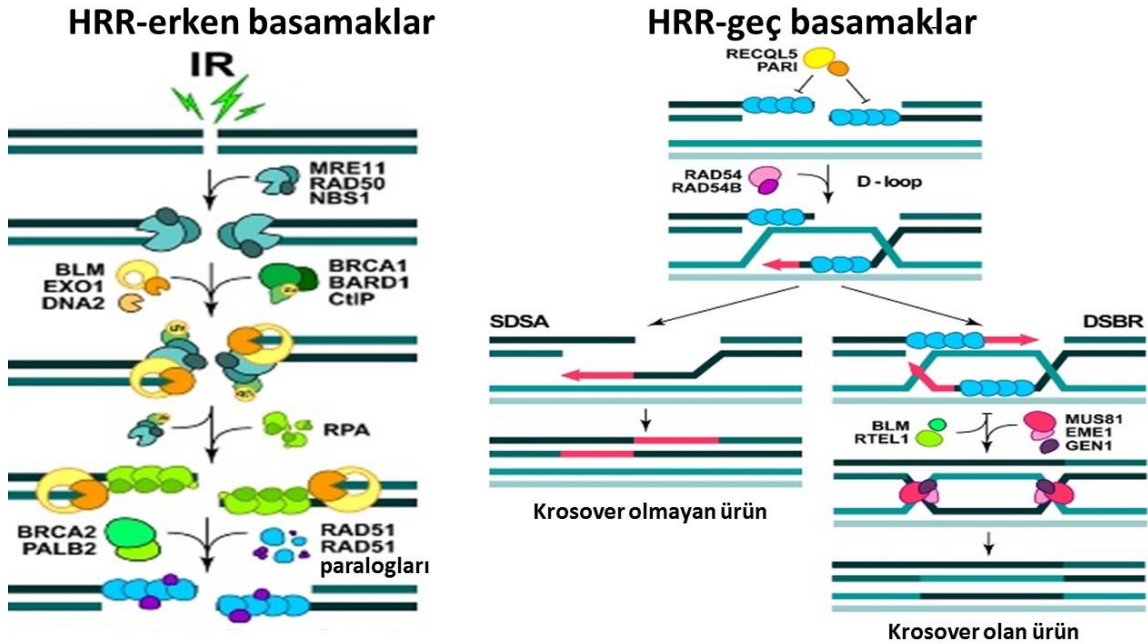
sırasında RAD51, BLM helikazlar ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşim, RAD51'in, homoloji taraması ve iplik göçünde görev alan nükleoprotein filamentlerden yer değişimini sağlar. Bu birbiriyle ilişkilendirilmiş aktiviteleri, RPA proteini ve ATP varlığında, RAD51 proteini tarafından oluşturulan RAD51-ssDNA nükleoflamentlerinin konformasyonuna dayanır. Bu nükleofilamentler ADP bağlı durumdaysa inaktif formdadır ve BLM, RAD51-ssDNA nükleoflamentleri destabilize edebilmektedir. Nükleofilamentlere ATP bağlanırsa aktif hale geçerler ve bu durumda BLM, RAD51 tarafından yapılan iplik değişimini uyarır (Sassi ve diğ. 2013).

Ayrı ayrı BLM ve RAD51 proteinlerinin HRR tamiri sırasında çeşitli proteinler ile etkileşime girmesi ve sonuçlarından yukarıda bahsedilmiştir. Ancak bu iki proteinin HRR sırasında tamire katılmaları sıralı ve bütün bir şekilde özetlenirse, HRR başlaması için DNA uçlarının kesimi ve homoloji taraması için 3'-DNA uçlarının oluşması gereklidir. Bunların gerçekleşmesi için önce MRN kompleks DSB bölgesine gelir ve CtIP ile birlikte uçların kesim sürecini destekler. Aynı zamanda içerisinde BLM'nin de bulunduğu proteinler de bu süreçte yer alır. Bu aşamadan sonra HRR ile tamirden geri dönülemeyeceği ileri sürülür ve bundan dolayı ssDNA oluşumu HRR için kullanılır. Çeşitli enzimler sayesinde ssDNA elde edildikten sonra RPA proteiniyle kaplanır. Ardından RPA, RAD51 ile yer değiştirir ve öncü sinaptik RAD51 nükleoprotein filamentini oluşturur. Bu yer değiştirme BRCA2 ve RAD51 paraloglarının aktiviteleriyle gerçekleşir ve oluşan filament homoloji taraması için ve D-loop oluşturmak için dsDNA molekülüne saldırır. Homoloji bulunduğu saldıran zincirin 3' ucunda DNA sentezi başlar. Bu aşamadan sonra iki seçenek mevcuttur; senteze bağlı iplik birleşimi (SDSA) ve çift zincirli kırık onarımı (DSBR). SDSA sonucu krossover olmayan ürün oluşur ve ökaryotlar tarafından daha sık kullanılır. DSBR sırasında iki adet Holliday kavşağı oluşur ve bu evrede BLM ve diğer bazı proteinler görev alır. Ardından Holliday kavşağı çözünür ve bunun sonucunda da krossover olan ya da olmayan ürün oluşur. Tüm bunların sonucunda genel amaç olan DSB onarımı gerçekleşmiş olur (Çizim 1.2.).

RAD51'in normal fonksiyonundaki herhangi bir değişiklik radyasyona karşı hipersensitivite ve düşük mitotik ve mayotik rekombinasyona sebep olabilmektedir (Krivokuca ve diğ. 2014). Bazı çalışmalar, RAD51 genindeki en ufak değişimlerin bile, DNA instabilite, kanser ve malignansiye yol açabileceğini göstermiştir (Zhang ve diğ. 2014, Wang ve diğ. 2010). Öte yandan fareler üzerindeki araştırmalarda, RAD51-knockout genotype sahip olanların embriyo letal olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, RAD51 germline mutasyonların genetik hastalığa ve RAD51'deki varyasyonların, RAD51 protein

ekspresyonu değişimiyle meme kanserine yol aabileği gösterilmiştir (Wang ve diğ. 2010). Ek olarak, bazı çalışmalarda meme kanseri hücre hatlarında ve meme kanseri hücrelerinde, düşük RAD51 ve BRCA1 protein seviyeleri gözlemlenmiş ve bu durumda RAD51'in meme tmrigenezinde görev aldığı yönünde önemli bir spekülasyon oluşturduğu ileri srlmştir (Le Calvez-Kelm ve diğ. 2012). Bazı deneyler ise, RAD51 kaybının genetik instabiliteye, kromozomal bozukluklara ve ardından tüm bu genetik değişimlerin birikimi sonucu karsinogeneze yol açtığını göstermiştir (Ricks-Santi ve diğ. 2011). Ayrıca, meme kanserli hastalarda RAD51 protein miktarı araştırıldığında, vakaların %30'unun düşük RAD51 miktarına sahip olduğu gözlemlenmiştir (Sassi ve diğ. 2013). Tüm bu deneysel araştırma sonuçlarından da anlaşılacağı üzere, RAD51 ekspresyonu veya yapısındaki değişimler meme kanserinde kapsayan çeşitli tmrigenezler için önemli yolakları olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Krivokuca ve diğ. 2014).

Öte yandan, bazı alışmalar BLM ve RAD51 proteinlerinin eksikliğinin etkisini araştırmış ve bu iki proteinin eksikliğinin somatik mutasyonlara, kromozom yeniden düzenlenmelerine yol açtığını göstermiştir. Bunların yanında, bu eksikliğin anormal kromozom ayrılmalarına, anploidiye, kromozomal instabiliteye ve DNA hasar ajanlarına karşı sensitiviteye katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir. Tüm bu hasarlar, genomic instabiliteye ve sonucunda da kanser oluşumuna neden olabilmektedir (Sassi ve diğ. 2013).



Çizim 1.2. HRR erken ve geç basamaklarının şematik zeti. Erken basamakta presinaptik RAD51 filamentinin oluşmasının ardından geç basamaklarda krossover olan ve olmayan ürünün oluşması (Mladenov ve diğ. 2013).

1.7.1. RAD51 (rs1801320) ve BLM (rs2270132) Polimorfizmleri

20. Intronda yer alan BLM, rs 2270132 polimorfik varyantı HRDC (helicase and RNase D-like C-terminal domain) kodlayan ekzonları ayırmaktadır. RecQ ailesine benzer helikalardan olan HRDC, substrat tanıma ve bağlanması ve de protein-protein interaksiyonlarında görevlidir. Ayrıca, Holliday yapısının hareketi ve gelişimi süreçlerinde de önemli görevler üstlenmektedir. Ek olarak, BLM, rs2270132 polimorfizmi mRNA matürasyonu sırasında intronların uygun bir şekilde tanınması ve kesilip uzaklaştırılmasında da etkilidir. Bunun yanında BLM helikazın fonksiyonunun düzgün gerçekleşmesinde önem taşıdığı düşünülmektedir (Sassi ve diğ. 2013).

RAD51 rs1801320 polimorfizminin RAD51 ekspresyonu ve DNA tamiriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang ve diğ. 2014). Meme kanserine katkısı olup olmadığı hala araştırma konusu olmakla birlikte, kansere yol açabileceği ileri sürülmektedir (Krivokuca ve diğ. 2014). 5'UTR (untranslated region, translasyonu yapılmayan bölgeler) kısmında yer almasından dolayı, RAD51 protein fonksiyonu bozukluğuna ve ardından hatalı DNA tamir kapasitesine neden olabilecek mRNA stabilitesini veya translasyonel verimi etkilediği düşünülmektedir (Zhang ve diğ. 2014).

Bu polimorfizmler üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, BLM rs2270132 polimorfizmiyle alakalı çok az çalışma bulunmaktadır. Bu polimorfizm üzerine bir çalışmada A/A genotipi ve A/C genotipi ile G3 dereceli meme tümörü oluşumu arasında bağlantı gösterilmiştir. BLM'nin bazı diğer polimorfizmleri ile meme kanseri riski arasında ilişki gösterilmesine rağmen, bu polimorfizm için meme kanseri ile ilişkilendirme bulunmamaktadır (Sassi ve diğ. 2013). RAD51 rs1801320 polimorfizmi için, 2013'te Sırp kadınları arasında yapılan bir çalışmada CC genotipinin meme kanseri riskinin artmasıyla önemli derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir (Krivokuca ve diğ. 2014). Ayrıca, 2014'te yapılan ve 45 uygun çalışma içeren ve de yaklaşık 28.000 kontrol ve vaka ile yapılan bir metaanalizde, C alelinin Kafkasyalılarda kanser riskini arttırıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilirken, Asyalı popülasyonda bu durum gözlemlenmemiştir. Ek olarak, kanser tipine göre yapılan analizlerde de, CC genotipinin riski arttırdığı kanserler meme kanseri, yumurtalık kanseri, kolorektal kanser ve endometriyal kanser olarak bulunmuştur (Zhang ve diğ. 2014).

2. AMAÇ

Meme kanseri, Dünya’da ve Türkiye’de kadınlar arasında yaygın olarak rastlanan ve yine kadınlar arasında ölüme yol açmada ikinci sırada yer alan multifaktöriyel bir hastalıktır. Meme kanseri gelişiminde genetik faktörlerin etkisi birçok çalışmada vurgulanmış ve DNA hasarının tamir mekanizmasında görevli genlerdeki mutasyonların tümör oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca epidemiyolojik çalışmalar, çift zincirli DNA kırıklarının meme kanseri riskini arttıran etmenler arasında olduğunu göstermektedir. Homolog rekombinasyon, çift zincirli kırıkların tamir yolları arasında yer alır ve hata riski diğer tamir yollarına göre daha azdır. Bu nedenle bu yolda görev yapan proteinler uygun DNA onarımı açısından oldukça önem taşımaktadır.

RAD51 ve BLM genleri homolog rekombinasyona dayalı DNA tamirinde oluşan Holliday kavşağının çözülmesi ve DNA onarımının tamamlanması sırasında önemli görevler üstlenir. Ayrıca RAD51(rs1801320) ve BLM(rs2270132) polimorfizmlerinin hücrel fonksiyonlara etkileri ve tümör oluşumuna tetikleme yolları üzerine bazı çalışmalar mevcuttur. 5’UTR kısmında yer alan RAD51(rs1801320) polimorfizminin mRNA kararlılığını ve/veya translasyon verimini etkileyerek farklı RAD51 protein seviyelerine yol açmasıyla agresif tümör oluşumunu sağladığı düşünülmektedir. İntronda yer alan BLM(rs2270132) polimorfizmi mRNA olgunlaşması süresinde intronların fark edilip uzaklaştırılması bakımından önemlidir ve BLM helikazın görevini doğru bir şekilde yapması üzerinde bu yolla etki sahibi olduğu düşünülür. Bu polimorfizmin meme kanseri ve diğer kanserlere yatkınlık riski oluşturması BLM helikazın fonksiyonundaki değişikliğinden ötürü genom bütünlüğünün etkilenmesi ile açıklanabilir

Bu çalışmanın amacı; hastane tabanlı kadın popülasyonunda DNA hasarı onarımından sorumlu RAD51 ve BLM genlerindeki sırasıyla rs1801320 ve rs2270132 polimorfizmleri ve meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi araştırmak ve genotipe dayalı vaka-kontrol çalışmasıyla Türk popülasyonunda meme kanserine yatkınlık sağlayabilecek genotipler ve allel frekansları ortaya çıkartmaktır. RAD51(rs1801320) için Türk popülasyonunda sporadik meme kanseri hasta grubunu kapsayan ilk çalışma olması bakımından bu polimorfizmi çalışmak, genotip ve allel dağılımlarını göstermek önem taşımaktadır. BLM(rs2270132) ile alakalı literatürde çok az sayıda çalışma mevcuttur ve henüz Türk popülasyonunda çalışılmamıştır. Dolayısıyla bu polimorfizmin genotip ve allel dağılımlarını göstermek hem Türk popülasyonu için hem de diğer popülasyonlarda çalışılması bakımından öncül nitelikte görülmektedir.

3. YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Enzimler ve Primerler

Taq DNA polimeraz (Fermentas)

Proteinaz *K* (Sigma)

Çizelge 3.1 Polimorfizmlere göre kullanılan primer dizileri ve enzimler

Gen Adı	SNP no	Primer	Enzim
RAD51	rs1801320	F: 5' - TGGGAACTGCAACTCATCTGG-3' R: 5' - GCGCTCCTCTCTCCAGCA -3'	<i>Mva</i> I
BLM	rs2270132	F: 5' - CAGGCTCCCGGATTCTACTC -3' R: 5' -GTACACCCACCCCTAGACG -3'	<i>Sty</i> I

3.1.2 Kimyasallar

Agaroz	Sigma	A 5093
Akrilamid	Fluka	01699
Amonyum persülfat	Fluka	09913
Asetik asit	Riedel-de Haen	50480
Bisakrilamid	Sigma	M 7256
Borik asit	Merck	1.00165.1000
Brom fenol mavisi	Sigma	B 5525
Etanol	Sigma	32221
Etidium bromid	Sigma	E 8751
EDTA	Sigma	E 5134
Formaldehit	Riedel-de Haen	93410
Gümüş nitrat	Carlo Erba	423955
Ksilen siyanol	Sigma	X4126
Sodyum hidroksit	Merck	1.06498.1000
Sodyum klorid	Riedel-de Haen	13450
Sodyum karbonat	Sigma	S 7277
TEMED	Sigma	T 7024
Tris baz	Sigma	T 6066
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma	L 5750

3.1.3 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

3.1.3.1 Elektroforez Çözeltileri

5X TBE

0.45 M Tris Borat

0.01 M EDTA (pH 8,0)

% 30'luk non-denatüre poliakrilamid jel solüsyonu (100 ml için)

29 g Akrilamid

1 g Bisakrilamid

100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

120°C'de 15 dk. otokavlanır.

% 7'lik non-denatüre poliakrilamid jel solüsyonu (100 ml için)

23,3 ml %30'luk Poliakrilamid

20 ml 5X TBE

56.67 ml dd H₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

% 8'lik non-denatüre poliakrilamid jel solüsyonu

26,67 ml %30'luk Poliakrilamid

20 ml 5X TBE

53.33 ml ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

% 10'luk non-denatüre poliakrilamid jel solüsyonu (29:1 akrilamid: bisakrilamid)

33,33 ml %30'luk Poliakrilamid

20 ml 5X TBE

46.67 ml ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.1.3.2. Gümüş Boyama Çözeltileri

10 X A solüsyonu: %5 asetik asit % 95 absolüt etil alkol

10 X B solüsyonu: %1 gümüş nitrat

C solüsyonu: 3 g NaOH, 0.02 g Boraks, %0,2 formaldehit

10 X D solüsyonu: 22,5 g Sodyum bikarbonat/ 1lt (opsiyonel)

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Thermocyclers (Eppendorf Mastercycler)

ThermalCycler T100 (BIORAD)

Dikey elektroforez (BIORAD)

Yatay elektroforez (BIORAD)

Santrifüj (Eppendorf 5415R)

Güç kaynağı (BIORAD Power Pac 3000)

UV transilimünatör (BIORAD)

Spektrofotometre (SHIMADZU)

CanoScan N670U (Canon)

Bilgisayar

3.1.5 Etik Kurul Onayı ve Destek

Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurul'una yapılan başvuru sonucu, çalışma için etik kurul onayı alındı (Etik kurul karar no: KOU KA EK 2015/283). Ayrıca bu çalışma; Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir (KOU-BAP proje no: 2015/080HD).

3.1.6 Hasta ve Kontrol Grubu

Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 06.03.2012 tarihli toplantısında KOÜ KA EK 2012/52 proje numarası ile onay almış olan Dr. Hakan UZUNOĞLU'nun "Türk popülasyonunda sporadik meme kanserli kadınlarda NBS1(nibrin) gen polimorfizminin meme kanseri ile ilişkisinin araştırılması" isimli uzmanlık tezinde kullanılan materyaller (Meme Kanseri Tanılı Hasta ve Kontrol Grubu DNA örnekleri) üzerinden çalışma yapılmıştır. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'na başvuran meme kanseri tanısı almış kadınlar hasta grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubu ise herhangi hastalık tanısı konmamış, kronik rahatsızlığı olmayan kadınlardan oluşturulmuştur.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1 Genotipleme

Genotipleme alınan kan örneklerinden izole edilmiş olarak bulunan DNA'lardan Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (Polymerase

Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) metodu ile yapıldı.

3.2.1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonunda 100 ng genomic DNA, 10 pmol forward ve reverse primerler kullanıldı. RAD51 (rs1801320) için PCR şartları; 94°C’de 3 dk. ilk denatürasyonun ardından, 95°C’de 30 sn., 53 °C’de 30 sn ve 72 °C’de 30 sn. olmak üzere 35 döngü ve sonrasında 72 °C’de 10 dk. şeklindedir. BLM (rs2270132) için PCR şartları; 95°C’de 5 dk. ilk denatürasyonun ardından, 95°C’de 30 sn., 63 °C’de 30 sn ve 72 °C’de 1 dk. olmak üzere 35 döngü ve sonrasında 72 °C’de 7 dk. şeklindedir. Total miktarı 25µl olan PCR karışımını 10mM Tris-Cl (pH 8,8), 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40 ve 1.5 mM MgCl₂ miktarı, 200 µM dNTP ve 1,0 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas) içerecek şekilde hazırlandı.

3.2.1.1.1. PCR Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kontrolü

Toplam 25µl hacimde gerçekleştirilen reaksiyondan kontrol amacı ile 5µl alınarak 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırıldı. Önce agaroz jelde PCR’ın çalışıp çalışmadığı kontrol edildi ardından %8’lik poliakrilamid jele GeneRuler 50 bp DNA Ladder(Thermo Scientific) ile birlikte yüklenen PCR ürünleri, 80 V ile 30 dk yürütüldü. PCR ürünleri DNA Ladder ile kıyaslandı ve doğru bant büyüklükleri gözlemlendiğinde restriksiyon enzimleri ile kesime geçildi.

Çizelge 3.2. PCR ile çoğaltılan gen dizileri ve uzunlukları

Gen	SNP	Uzunluk (bç)	Dizi
RAD51	rs1344706	157bç	<u>TGGGA</u> <u>ACTGCAACTCATCTGG</u> GTTGTGCGCAGAAGG CTGGGGCAAGCGAGTAGAGAAGTGGAGCGTAAGCCA GGGG CGTTGGGGG(C/G)CGTGCGGGTTCGGCGCGTGCCACG CCCGCGGGGTGAAGTCGGAGCGCGGGGC <u>TGCTGGA</u> <u>GAGAGGAGCGC</u>
BLM	rs13025591	227bç	<u>CAGGCTCCCGATTCTACTC</u> TTTCCTTTACAGTCAAG TTCTTAAACAGCAGCCAGGGTGGCCTTTAAATGACAG GCTTGTCTAGCTGCAAGACTGATATGCGACCTCTATGC AGAGGACTCAGCTGGCTGCTTGTTCCTCAACCC(A/C) CATGGGGAAAGAGTGGAGGAAGAAAAGTTTGTGCTGG GGAAGTAACAATTTGGTTATGC <u>CGTCTAGGGTGGGG</u> <u>TGTACA</u>

3.2.1.2 Restriksiyon Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon enzim kesiminin toplam hacmi 15 µl olup, restriksiyon enzimi, her enzime uygun 1.5 µl 1X tampon çözeltisi, PCR ürünü ve steril distile su içerecek şekilde hazırlandı. Kesim, gece boyunca uygun sıcaklıkta bekletilerek yapıldı. Her polimorfizm için koşullar Çizelge 3.3’de yer almaktadır. Kesim ürünleri poliakrilamid jelde yürütülüp, gümüş nitrat metodu ile boyanarak görüntülendi. Tarayıcı yardımı ile tüm görüntüler bilgisayara kaydedildi.

Çizelge 3.3. Polimorfizmlere göre RFLP için kullanılan enzimler, kesimde kullanılacak enzim, distile su, PCR ürünü miktarları ve kesim sıcaklığı

Gen Adı	SNP nosu	Enzim	Enzim miktarı	Steril distile su (µl)	PCR ürünü (µl)	Kesim Sıcaklığı (°C)
RAD51	rs1801320	<i>MvaI</i>	2 U	11.3	2	37
BLM	rs2270132	<i>StyI</i>	2 U	11.3	2	37

3.2.1.2.1 Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofrez

35 cm x 10 cm ebatlarında hazırlanan jelin elektrofrez için dikey elektrofrez cihazı kullanıldı. Jelin kalınlığı 0,5 mm olarak ayarlandı. %8’lik PAGE stok solüsyonlarına sırası ile % 10’luk APS stoğundan % 1 hacim ve TEMED’den % 0,1 hacim ilave edilip 0,5 mm’lik cam aralığına döküldü. Polimerizasyonun tamamlanması için 45 dk bekletildi.

Polimerizasyon sonrası camlar elektrofrez cihazına yerleştirildi, 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek akım Çizelge 3.4’de verildiği gibi ayarlandı ve Çizelge 3.4’de verilen süreler sonunda jel çıkartılarak gümüş boyama işlemine geçildi.

Çizelge 3.4. BLM ve RAD51 polimorfizmleri için poliakrilamid jel elektrofrez koşulları

SNP no	Akım			PAGE (%)	Yürüme zamanı (dk)
	mA	V	W		
rs1801320	~50	~180	20	8	35
rs2270132	~50	~180	20	8	35

3.2.1.2.2. Gümüş Boyama

Solüsyonlarda ve yıkamada kullanılan suyun kalitesi önemli olduğundan test edilmiş distile su kullanıldı. Elde hafif çalkalama ile aşağıdaki solüsyonlarda sıra ile bekletildi. C solüsyonu kullanımdan hemen önce hazırlandı. Sonraki solüsyonlara geçerken aralarda distile su ile bir kaç saniyelik kısa süreler ile yıkandı.

A solüsyonu (Asetik asit-etanol): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

B solüsyonu (Gümüş nitrat): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 10 dakika muamele edildi.

C solüsyonu (NaOH-Boraks-Formaldehit): 200 ml distile suya 2.5 gr NaOH ve 0.02 gr boraks ilave edildi ve jel bu solüsyona alındıktan sonra solüsyonun içerisine 1ml formaldehit ilave edilerek bantlar görülünceye kadar jel solüsyon içerisinde tutuldu.

D solüsyonunu (NaHCO₃): 200 ml distile suya stok solüsyondan 20 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

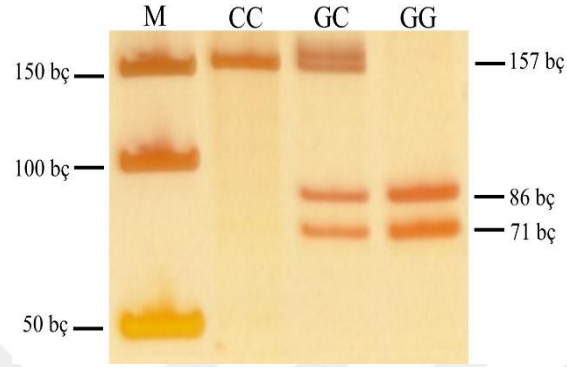
Distile suda yıkanan jel nemli olarak asetat arasına alındı ve naylon dosya poşeti içine alınarak hava alması engellenecek şekilde saklandı.

3.2.2 İstatiksel Analiz:

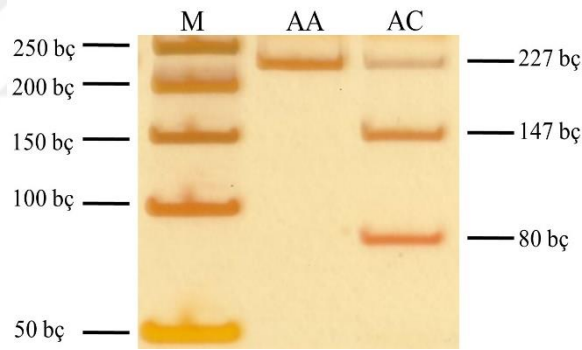
Odds ratio, %95 güven aralığı ve χ^2 analizi, conditional logistic regression analizi kullanarak yapıldı. Hücre frekansları 5'ten az olduğunda gerçek metodlar kullanılarak risk oranları hesaplandı. Tüm analizler PC için SPSS 13,0 versiyonu kullanılarak yapıldı.

4.BULGULAR

4.1 Jel Görüntüleri



Çizim 4.1. RAD51 geni rs1801320 polimorfizmi için poliakrilamid jel görüntüsü (M: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, CC-157 bç, GC-157,86,71, GG-86,71 bç)



Çizim 4.2. BLM geni rs2270132 polimorfizmi için poliakrilamid jel görüntüsü (M: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, AA-227 bç, AC-227, 147, 80 bç)

4.2 Demografik Veri ve İstatistik Sonuçları

Bu çalışmada 103 kadın meme kanseri [53.29 ± 11.17] ve yaş ortalaması meme kanseri grubuna yakın 145 meme kanseri tanısı almamış kadın kontrolün [52.16 ± 11.15] DNA örnekleri kullanılmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.2.'de RAD51(rs1801320) ve BLM(rs2270132) için istatistiksel analiz sonucu elde edilen allel ve genotip dağılımları, χ^2 , p ve %95 güven aralığı içinde Odds Ratio

değeri ile Hardy-Weinberg dengesi-exact test değerleri listelenmiştir. Her iki SNP için genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesine göre kararlı olarak bulunmuştur ($p>0.05$).

Sırasıyla hasta ve kontrollerde RAD51(rs1801320) genotip dağılımları; GG için %73.8, %84.5, GC için %24.3, %14.8, CC için %1.9, %0.7 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grubu genotipleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görüldü ($\chi^2=4.464$, $p=0.115$). Allel frekansı G alleli için hastalarda %86.0 ve kontrollerde %92.0, C alleli için hastalarda %14.0 kontrollerde %8.0 şeklinde gözlemlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız bulundu (G alleli: $p=0.574$, C alleli: $p=0.056$) (Çizelge 4.2.).

Sırasıyla hasta ve kontrollerde BLM(rs2270132) genotip dağılımları; AA için %76.7, %78.2, AC için %23.3, %21.8 olarak ortaya çıktı ve CC genotipine her iki grupta da rastalanmadı. Hasta ve kontrol grubu genotipleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görüldü ($\chi^2=0.014$, $p=0.907$). Allel frekansı A alleli için hastalarda %88.0 ve kontrollerde %89.0, C alleli için vakalarda %12.0 kontrollerde %11.0 şeklinde gözlemlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız bulundu (A alleli: p değeri hesaplanamadı, C alleli: $p=0.907$) (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.1 Hasta ve Kontrollerin demografik verileri

	HASTA	KONTROL
Yaş Ortalaması \pm SD, yıl	53.29 \pm 11.17	52.16 \pm 11.15
Cinsiyet, n (kadın/erkek)	103/0	142/0

SD: Standard sapma

Çizelge 4.2. Hasta ve Kontrol gruplarında RAD51(rs1801320) ve BLM(rs2270132) için genotip dağılımı, allel frekansları ve meme kanseriyle ilişkilendirme amaçlı lojistik regresyon analizi sonuçları.

Genotipler	Hasta, n (%)	Kontrol, n(%)	χ^2	P değeri	Crude-OR (95% CI)
Örnek sayısı	103 (100.0)	142 (100.0)			
Allel sayısı	206	284			
RAD51 (rs1801320)	103 (100.0)	142 (100.0)	4.464	0.115	-
GG	76 (73.8)	120 (84.5)	3.644	0.056	0.516 (0.274-0.971)
GC	25 (24.3)	21 (14.8)	2.926	0.087	1.847 (0.968-3.524)
CC	2 (1.9)	1 (0.7)	-	0.574	2.972 (0.250-31.212)
Allel Frekansı					
G	177 (86.0)	261 (92.0)	-	0.574	0.358 (0.032-4.004)
C	29 (14.0)	23 (8.0)	3.644	0.056	1.938 (1.030-3.646)
HWE(exact)	1.00	1.00			
BLM (rs2270132)	103 (100.0)	142 (100.0)	0.014	0.907	1.088 (0.593-1.994)
AA	79 (76.7)	111 (78.2)	0.014	0.907	0.919 (0.502-1.685)
AC	24 (23.3)	31 (21.8)	0.014	0.907	1.088 (0.593-1.994)
CC	0 (0.0)	0 (0.0)	-	-	-
Allel Frekansı					
A	182 (88.0)	253 (89.0)	-	-	-
C	24 (12.0)	31 (11.0)	0.014	0.907	1.088 (0.593-1.994)
HWE(exact)	0.35	0.37			

HWE (exact): Hardy-Weinberg dengesi-exact test değeri, OR (%95 CI): Odds Ratio (Risk oranları)(%95 güven aralığı)

5.TARTIŞMA

Meme kanseri, Dünya’da ve Türkiye’de kadınlar arasında yaygın olarak rastlanan ve yine kadınlar arasında ölüme yol açmada ikinci sırada yer alan multifaktöriyel bir hastalıktır. Ölüm oranları genel olarak azalma göstermesine rağmen halen göz ardı edilemeyecek kadar yeni meme kanseri vakası ve buna dayalı ölümler tahmin edilmektedir (<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-key-statistics>, Üren N ve diğ. 2016). Meme kanseri gelişiminde genetik faktörlerin etkisi birçok çalışmada vurgulanmış ve tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve DNA hasarının tamir mekanizmasında görevli genlerdeki mutasyonların tümör oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Üren N ve diğ. 2016). Bu çalışmada hastane tabanlı kadın popülasyonunda DNA onarımından sorumlu RAD51 ve BLM genlerindeki sırasıyla rs1801320 ve rs2270132 polimorfizmleri ve meme kanseri riski arasındaki ilişki tespit edildi. Her iki polimorfizm ile meme kanseri riski arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık olmadığı bulundu (RAD51 için: $p=0.115$, $\chi^2=4.464$ ve BLM için $p=0.907$, $\chi^2=0.014$) Böylece genotipe dayalı vaka-kontrol çalışmasıyla Türk popülasyonunda meme kanserine yatkınlık sağlayabilecek genotipler ve allel frekansları ortaya çıkartılmıştır.

RAD51(rs1801320) polimorfizminin literatürde meme kanseri dahil birçok kanserle ilişkili olduğu gösterilmiş ve Türk popülasyonunda meme kanseri üzerine yapılan yalnızca bir çalışma bulunduğ ve onunda ailesel meme kanseri hastalarını içerdiği görülmüştür (Akisik ve diğ. 2011). Türk popülasyonunda sporadik meme kanseri hasta grubunu kapsayan ilk çalışma olması bakımından bu polimorfizmi çalışmak, genotip ve allel dağılımlarını göstermek önem taşımaktadır. BLM (rs2270132) polimorfizmi için bazı genotiplerin meme kanseri tümörü oluşumuna yatkınlık sağladığı görülmüş ancak meme kanseri riski ile ilişkisi aydınlatılamamıştır (Sassi ve diğ. 2013). Buna ek olarak literatürde bu polimorfizm ile alakalı çok az sayıda çalışma mevcuttur ve henüz Türk popülasyonunda çalışılmamıştır. Dolayısıyla bu polimorfizmin genotip ve allel dağılımlarını göstermek hem Türk popülasyonu hem de diğer popülasyonlarla kıyaslanması bakımından öncül nitelik göstermektedir.

PCR-RFLP sonucunda, genotip analizi için oluşan bantlar beklenen pozisyonda elde edildi ve herhangi bir optimizasyon gerektirmedi (Çizim 4.1, Çizim 4.2). Ardından yapılan istatistik analiz sonucu RAD51(rs1801320) polimorfizmi ile meme kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.115$) (Çizelge 4.2.). Benzer şekilde,

Batı New York'ta yürütülen meme kanseri çalışmaları sonucu oluşturulan büyük çaplı popülasyondan elde edilen örnekler üzerinde yapılan çalışmada ayrı ayrı premenopoz ($n_{\text{hasta}}=351$, $n_{\text{kontrol}}=556$) ve postmenopoz ($n_{\text{hasta}}=777$, $n_{\text{kontrol}}=1360$) olarak oluşturulan gruplarda RAD51(rs1801320) ile meme kanseri riski arasında bir ilişki ortaya çıkmamıştır (Ricks-Santi ve diğ. 2011). Kıbrıs'ta yapılan ve yaşları eşleşmiş yaklaşık 1000 hasta ve kontrol içeren bir çalışmada ($p=0.05$) ve Polonya'da ($n_{\text{hasta}}=100$, $n_{\text{kontrol}}=106$) yapılan diğer bir çalışmada da ($p>0.05$) bu polimorfizm meme kanseri riskiyle bağlantılı bulunmamıştır (Loizidou ve diğ. 2009). Bu SNP üzerine farklı popülasyonlar üzerinde yapılmış diğer bir takım çalışmalarda da elde edilen sonuçlar bu çalışmayla örtüşmektedir (Kadouri ve diğ. 2004, Kuschel ve diğ. 2002). Ancak İran'da ($n_{\text{hasta}}=294$, $n_{\text{kontrol}}=315$) ve Polonya'da ($n_{\text{hasta}}=700$, $n_{\text{kontrol}}=780$) yapılmış bazı çalışmalar meme kanseri riski ile RAD51(rs1801320) arasında istatistiksel olarak ilişki bulmuşlardır (Tulbah ve diğ. 2016).

Farklı popülasyonlarda ve hatta aynı popülasyonlarda elde edilen sonuçlar birbiriyle çelişebilmektedir. Bu durum meme kanseri tiplerinin birbirinden farklı olmasından (ailesel veya sporadik), farklı BRCA1/2 statülerinden ve popülasyon büyüklüğünün farklı olmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle daha net bir sonuç almak ve bu çalışmaların sonuçlarının toplamak amacıyla metaanalizler yapılmıştır. Yaklaşık 20.000 hasta ve kontrol içeren ve 42 çalışmayı kapsayan bir metaanalizde RAD51(rs1801320) polimorfizminin meme kanserini de kapsayan diğer kanser tiplerinin de riskini arttırdığı ortaya çıkmıştır (Tulbah ve diğ. 2016). Portekiz, Çin, Polonya, İngiltere, Almanya, Kore, Avustralya ve Rusya gibi ülkelerde yapılmış toplam 17 hasta-kontrol çalışmasını kapsayan yaklaşık 10.000 hasta ve kontrol içeren diğer bir metaanalizde de RAD51(rs1801320) ile meme kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Sun ve diğ. 2011).

RAD51(rs1801320) polimorfizminin genotiplerinin meme kanserine yatkınlık riski incelendiğinde tüm genotipler için p değerleri 0.05'ten büyük olduğu için istatistiksel olarak anlamsız sonuç bulunmuştur ve bu durumda OR değerlerine bakılıp koruyuculuk ve risk oluşturma oranı hakkında yorum yapılamamaktadır. Eğer tüm genotipler için p değeri 0.05'in altında olsaydı, GG genotipinin yaklaşık 2 kat koruyucu ($\chi^2=3.644$, OR=0.516, %95 güven aralığı=0.274-0.971), GC genotipinin 1.8 kat ($\chi^2=2.926$, OR=1.847, %95 güven aralığı=0.968-3.524) ve CC genotipinin de 2.9 kat (OR=2.972, %95 güven aralığı=0.250-31.212) risk oluşturduğu yönünde yorum yapılabilirdi (Çizelge 4.2.). OR değerinin 1'den küçük ve büyük olma durumlarına göre sırasıyla koruyucu ve risk olduğu anlaşılır ve güven aralığının fazla olması OR değerinin güvenilirliğiyle ters orantılıdır. Örneğin, GG

genotipinin güven aralığının dar olmasından dolayı 2 kat koruyucu olma sonucu CC genotipinin 2.9 kat risk oluşturmasından daha güvenilirdir. χ^2 değerinin büyüklüğüyle p değeri arasında ters orantılı bir ilişki bulunmaktadır. Genelde χ^2 değeri arttıkça p değerinin azalır sonucun daha anlamlı olma olasılığı artar. Bu bilgi ışığında GG genotipi ($\chi^2=3.644$, $p=0.056$) GC genotipine ($\chi^2=2.926$, $p=0.087$) oranla anlamlılığa daha yakındır. Öte yandan diğer çalışmalardaki genotiplere dayalı karşılaştırmada, 45 vaka-kontrol çalışmasının içeren bir metanalizde ($n_{hasta}=28,956$ $n_{kontrol}=28.372$) ve bir diğer metanalizde ($n_{hasta}=27,895$ $n_{kontrol}=26.344$) arasında meme kanserinde bulunduğu çeşitli kanser tiplerine CC genotipinin risk oluşturduğu gözlemlenmiştir (Zhang ve diğ. 2014, Sun ve diğ. 2014).

Sun ve diğ.'nin metaanalizinde RAD51 135CC genotip taşıyanların meme kanserine yatkın olabileceği bulunmuş ve bu sonucun daha önceden yapılan biyolojik fonksiyon çalışmasıyla örtüştüğü görülmüştür. Bu fonksiyon çalışmasında RAD51 135 C genotipi daha agresif tümör oluşumuyla ve genel olarak daha düşük kaliteli yaşam sürme ile ilişkili bulunmuştur. Bu durum nedeni 5'UTR kısmında yer alan RAD51(rs1801320) polimorfizminin mRNA kararlılığını ve/veya transkripsiyon verimini etkileyerek farklı RAD51 protein seviyelerine yol açmasıyla açıklanabilir (Sun ve diğ. 2011).

Türkiye'de RAD51(rs1801320) ile ilgili yalnızca bir çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmada ($n_{hasta}=170$, $n_{kontrol}=120$) ailesel meme kanseri taşıyan hastalar kullanılmıştır. Genotip frekansları ($\chi^2= 36.99$, $p<0.0001$) ve allel frekansları ($\chi^2= 25.9$, $p<0.0001$) olarak hasta ve kontroller arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Akisik ve diğ.'nin yaptığı çalışmada literatürde var olan RAD51 C allelinin hem sporadik hem de ailesel meme kanseri riskini arttırdığını gösteren çalışmalar ile örtüşen sonuçlar elde edilmiştir (Akisik ve diğ. 2011). Bu çalışmada da RAD51 C allel frekansının hasta grubunda daha fazla olması, diğer bazı popülasyonlar için olduğu gibi Türk popülasyonlarında elde edilen sonuçlarla aynı doğrultudadır.

Etnik kökene göre sınıflandırılma yapılarak RAD51(rs1801320) polimorfizminin meme kanseri gelişimine yatkınlık sağlama durumu analiz edildiğinde, Asyalılarda istatistiksel olarak anlamlı risk azaltıcı bir etki bulunmasına karşılık Kafkasya kökenliler için böyle bir etki bulunmamıştır. Bu çalışmada da Kafkas kökenle örtüşen sonuçlar bulunmuş ve RAD51 135 C allelinin frekansı hastalarda (C alleli= %14) kontrollere (C alleli=%8) oranla daha fazla bulunmuştur. Aynı polimorfizm farklı etnik kökenli popülasyonlar arasında farklı sonuçlar doğurabilmektedir. Bu durum kanserin multigenetik bir hastalık

olmasından dolayı farklı genetik alt yapının sonuçlar arasında tutarsızlığa neden olmasından kaynaklanabilir. Örneğin, Kafkasya kökenlilerde RAD51 135 C allelinin etkisi meme kanseri gelişimine katılan bazı diğer genlerin varlığıyla baskılanabilir ve dolayısıyla Asyalılar ile aynı etki sağlanamayabilir (Sun ve diğ. 2011). Öte yandan siyahi kadınların %37.4'ü RAD51 135 C varyant allelinin en az bir kopyasına sahipken, Yahudi olmayan beyaz kadınlar, Yahudi beyaz kadınlar ve diğer etnik popülasyonlardaki kadınlarda bu oranlar sırasıyla %15.9, 9.6 ve 17.3 şeklindedir (Zhou ve diğ. 2011). Bu frekanslara bakıldığında da Yahudi olmayan beyaz kadınlar ile bu çalışmada kullanılan hasta grubundaki C alleli frekansları beklendiği gibi benzer bulunmuştur.

Bu çalışmada BLM(rs2270132) polimorfizmi ile meme kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.907$). Bu polimorfizm genotiplerinin meme kanseri riskine yatkınlığı incelendiğinde yine istatistiksel olarak anlamsız sonuçlar elde edilmiştir (AA ve AC genotipi için $p=0.907$). CC genotipine rastlanmadığı için çizelgedeki bazı istatistik değerleri hesaplanamamıştır. Ayrıca hasta ve kontrollerdeki allel frekansları arasında büyük farklar yoktur ve bu durum bir allelin hastalığa yatkınlık oluşturma ihtimalinin düşük olduğuna işaret etmektedir (Çizelge 4.2.).

Tayvan'da BLM (rs2270132) üzerine yapılan çalışmada ($n_{hasta}=933$, $n_{kontrol}=1539$), bu çalışmaya oranla çok daha fazla kişi dahil edilmiş ve sonuçlarda bu çalışmada olduğu gibi bu SNP'nin meme kanseri riskiyle istatistiksel olarak anlamlı ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, fonksiyonel olarak birbirleriyle alakalı olan BLM ve RAD51'in birbirleriyle etkileşime girerek meme kanseri riski oluşturduğu üzerine destekleyici bilgiler elde edilmiştir. Ancak bu sonucun elde edildiği SNP'ler bu çalışmadaki SNP'lerden farklıdır (Ding ve diğ. 2009).

Polonya'da yapılan diğer bir çalışmada ($n_{hasta}=304$, $n_{kontrol}=319$) AA genotipinin meme kanseri riskini yaklaşık 2.5 kat arttırdığı ($p<0.001$, OR=0.249, %95 güven aralığı=1.52-4.09), AC genotipinin ise 2.5 kat koruyucu olduğu bulunmuştur ($p<0.001$, OR=0.40, %95 güven aralığı=0.25-0.66). Bu çalışmayla benzer şekilde CC genotipine hasta ve kontrollerde rastlanmamış olmasıdır. Polonya popülasyonu (hasta ve kontrollerde yaklaşık değerler; A alleli için 0.55, C alleli için 0.45) bu çalışmada (hasta ve kontrollerde yaklaşık değerler; A alleli için 0.85, C alleli için 0.10) elde edilen allel frekansları birbirine yakın değildir. Tayvan'da yapılan çalışma ile Polonya'da yapılan bu çalışma karşılaştırıldığında ise sonuçlar AC genotipinin koruyucu olması bakımından örütüşürken,

AA genotipinin Tayvan’da koruyucu çıkması yönüyle birbiriyle çelişmektedir (Sassi ve diğ. 2013, Ding ve diğ. 2009). Bu çelişkilerin nedeni etnisite, coğrafik olarak farklı bölgelerde bulunma ve yaşam tarzındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

BLM(rs2270132) polimorfizmi intronda yer alır ve RecQ ailesi helikazları kodlayan ekzonları birbirinden ayırır. BLM helikazda bu aileye dahildir ve bahsedildiği gibi Holliday kavşaklarının hareketi ve çözünmesini sağlar. Böylece bu polimorfizm mRNA olgunlaşması süresinde intronların fark edilip uzaklaştırılması bakımından önemlidir ve BLM helikazın görevini doğru bir şekilde yapması üzerinde bu yolla etki sahibi olduğu düşünülür. Bu polimorfizmin meme kanseri ve diğer kanserlere yatkınlık riski oluşturması BLM helikazın fonksiyonundaki değişikliğinden ötürü genom bütünlüğünün etkilenmesi ile açıklanabilir (Sassi ve diğ. 2013, Frank ve diğ. 2010).

Bu çalışmada amaçlandığı gibi Türk popülasyonu için de RAD51(rs1801320) ve BLM(rs2270132) için allel ve genotip frekansları tespit edilmiştir. Böylece bu çalışma farklı popülasyonlardan elde edilen metaanalizlere dahil edilme olanağı sağlayarak, bu polimorfizmler üzerinde var olan tartışmalı sonuçların giderilmesi açısından da önemli katkı sağlayacaktır. RAD51(rs1801320) polimorfizmi için elde edilen frekanslar yalnızca Türk popülasyonu bakımından öncül olmasına karşılık BLM(rs2270132) hakkında çok az çalışma bulunduğu ve Türkiye’de ilk kez çalışıldığı için hem Türk hem de Dünya kapsamında öncül sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın bir diğer güçlü yanı Çizelge 4.2’deki HWE değerleri incelendiğinde iki gen içinde hasta ve kontrol popülasyonlarında bu değer 0.05’ten büyük olduğunun görülmesidir. Bu durum popülasyonların dengede olduğunu ve allel frekanslarının bir jenerasyondan diğerine değişmediğini gösterir. Böylece bu çalışmada yer alan popülasyonlar için elde edilen sonuçlar güvenilirdir (http://grows.ups.edu/analysis/data_analysis_text.htm). Son olarak yaş ortalamaları birbirine yakın hasta ve kontrol popülasyonu (Çizelge 4.1.) 100 kişi üzerinde tutularak SNP tanımında var olan “ %0.01’den fazla rastlanma” ifadesi için ideal minimum koşul sağlanmıştır.

Bu çalışmada bazı sınırlılıklar da mevcuttur. İlk olarak popülasyon büyüklüğü öncül bir bilgi elde edilmesini sağlamakla birlikte genel bir ilişkilendirme kurmak için yeterli değildir. Çalışmanın tam olarak sonlanması ve olması gereken χ^2 ve p değerlerinin elde edilmesi için hesaplanan SP (istatistiksel güç-statistical power) değerinin 0.80 olması gerekir. Bu çalışmada hasta ve kontrollerde RAD51(rs1801320) için SP (istatistiksel güç) değeri yaklaşık 0.30 ve BLM(rs2270132) için ise 0.04’tür. 0.80 değerine ulaşılması için

RAD51(rs1801320) polimorfizminde kontrol ve hastanın 426, BLM(rs2270132)'de yaklaşık 15.000 sayısına ulaştırılması çalışmanın tam olarak sonlanması için gerekmektedir (<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/b2.html>). Bunların yanı sıra kullanılan kontrol popülasyonu sağlıklı bireylerden oluşturulmuştur ancak bireyler hastalık başlangıcında olup henüz hastalığın etkilerini göstermemiş olabilirler. Ek olarak deneye katılan bireylerin menopoz dönemleri, eğitim durumları, vücut kütle indeksi, menarş yaşları gibi kişisel bilgileri ile östrojen ve progesteron reseptör düzeyleri, tümör dereceleri gibi klinik bilgilerine sahip olunması ilişkilendirme hakkında daha ayrıntılı bir sonuç elde edilmesine olanak tanıyabilir. (Örneğin, CC genotipi östrojen reseptörü negatif meme kanseri olan Suudi kadınlarda pozitif olanlara göre daha yaygın olarak bulunmuştur (Tulbah ve diğ. 2016).).



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada Türk popülasyonunda sporadik meme kanserli kadınlarda BLM (rs 2270132) ve RAD51 (rs1801320) polimorfizmleri ile meme kanseri riski arasındaki ilişki analiz edildi ve genotipe dayalı vaka-kontrol çalışması yapılarak Türk popülasyonunda daha önce gösterilmemiş, hastalığa yatkınlık sağlayan genotipler ortaya çıkarıldı ve allel frekansları bulundu.

RAD51(rs1801320) ve BLM(rs2270132) polimorfizmleri ile meme kanseri riski arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık olmadığı bulunmuştur (Sırasıyla p değerleri: 0.115 ve 0.907). Benzer şekilde iki SNP için de allel ve genotip frekansları ile meme kanseri riski arasında anlamlı ilişki olmadığı bulunmuştur. (SNP'lerin allel frekansları ve tüm genotip frekansları için $p > 0.05$).

İleriki çalışmalarda var olan sınırlılıklar ortadan kaldırılıp daha geniş ve daha iyi tanımlanmış bir popülasyonda klinik bilgilerin varlığında RAD51(rs1801320) ve BLM (rs2270132) varyantlarının meme kanserinde tanımlayıcı bir biyomarkör olarak kullanılabilmesi için daha kullanışlı veri elde edilebilir. BLM için sonuçlandırıcı veri elde etme amacıyla 15.000 kişi sayısına ulaşmak güç olsa da RAD51(rs1801320) için 426 kişi sayısına ulaşıp net bir sonuç elde edilmesi planlanmaktadır. Ek olarak RAD51 ve BLM'nin farklı SNP'lerine, çift zincirli DNA kırıklarını tamirde görevli TP53, PTEN, ATM, NBN, XRCC2/3 genleri gibi diğer tamir genlerindeki SNP'ler analiz edilip Türk popülasyonu için allel ve genotip frekansları çıkarılıp hastalığın oluşum mekanizmasını aydınlatma bakımından da önemli bir adım atılmış olacaktır. Tüm bu genler ile RAD51 ve BLM'nin varyantlarının meme kanseri oluşumuna etkisi haplotip analiziyle tespit edilebilip bu sayede aynı gendeki SNP'lerin kombinasyonları sonucu ortaya çıkan meme kanseri riski yüzde olarak elde edilebilir ve genlerin etkileşim halinde meme kanserine yatkınlık sağlama durumları üzerine ön bilgi sahibi olunabilir. Ayrıca bu çalışmadaki polimorfizmlerin gen fonksiyonu üzerine etkileri mRNA ve protein düzeylerindeki çalışmalar ile netleştirilebilir. Son olarak gen-gen ve gen çevre etkileşimlerini göz önünde bulundurarak meme kanserinin multifaktoriyel etkilerini aydınlatmaya odaklanılıp bu sayede bireylerin genotiplere göre özgü ilaç ve tedavi

geliştirilebilir. Böylece hastalığın ilerleme riskinde azalma ve tedaviden alınan verimde artma elde edilebilmiş olur.



KAYNAKLAR

- Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 2006;25(43):5906-11.
- Akisik E, Yazici H, Dalay N. ARLTS1, MDM2 and RAD51 gene variations are associated with familial breast cancer. *Mol Biol Rep*. 2011;38(1):343-8.
- Bernstein KA, Gangloff S, Rothstein R. The RecQ DNA helicases in DNA repair. *Annu Rev Genet*. 2010;44:393-417.
- BLM, Bloom syndrome RecQ like helicase. Erişim: 18 Mayıs 2016, <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BLM#location>
- Bogdanova N, Helbig S, Dörk T. Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle. *Hered Cancer Clin Pract*. 2013;11(1):12.
- Broberg K, Huynh E, Schläwicke Engström K ve diğ. Association between polymorphisms in RMI1, TOP3A, and BLM and risk of cancer, a case-control study. *BMC Cancer*. 2009;9:140.
- Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1652-4.
- Ding SL, Yu JC, Chen ST ve diğ. Genetic variants of BLM interact with RAD51 to increase breast cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 2009;30(1):43-9.
- Frank B, Hoffmeister M, Klopp N ve diğ. Colorectal cancer and polymorphisms in DNA repair genes WRN, RMI1 and BLM. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):442-5.
- Friedenson B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer*. 2007;7:152.
- Goldgar DE, Healey S, Dowty JG ve diğ. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):R73.
- Goodsell DS. The molecular perspective: the ras oncogene. *Oncologist*. 1999;4(3):263-4.
- Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006;25(43):5864-74.
- Hardy Weinberg Analysis, 2016. Erişim: 17 Mayıs 2016. http://grows.ups.edu/analysis/data_analysisistext.htm
- Human Genome Project Information Archive, 2016. Erişim: 05 Mayıs 2016, www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome
- Inference for Proportions: Comparing Two Independent Samples, 2016. Erişim: 16 Mayıs 2016. <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/b2.html>.
- Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A ve diğ. A single-nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies breast cancer risk in BRCA2 carriers, but not in BRCA1 carriers or noncarriers. *Br J Cancer*. 2004;90(10):2002-5.
- Kanser Nedir, 2013. Erişim: 11 Nisan 2016, <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.htm>
- Kaufmann R, Müller P, Hildenbrand G ve diğ. Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. *J Microsc*. 2011;242(1):46-54.
- Keaton MA. Review of "The Cell Cycle: Principles of Control" by David O. Morgan. *Cell Division*. 2007;2:27.
- Klug WS., Cummings MR. (2000) Concepts of Genetics, 6th Edition, Chapter 21. S:577-579, Prentice Hall Inc. New Jersey.
- Koçak S, Çelik L, Özbaş S ve diğ. Risk factors in breast cancer, risk assessment and prevention: 2010 İstanbul consensus meeting report. *J Breast Health*. 2011; 7: 47-67.

- Krivokuca AM, Malisic EJ, Dobricic JD ve diğ. RAD51 135G>C and TP53 Arg72Pro polymorphisms and susceptibility to breast cancer in Serbian women. *Fam Cancer*. 2014;13(2):173-80.
- Kumar V, Abbans K, Nelson F, Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005.
- Kuschel B, Auranen A, McBride S ve diğ. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet*. 2002;11:1399 – 407.
- Le Calvez-Kelm F, Oliver J, Damiola F ve diğ. RAD51 and breast cancer susceptibility: no evidence for rare variant association in the Breast Cancer Family Registry study. *PLoS One*. 2012;7(12):e52374.
- Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 2013;140(15):3079-93.
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA ve diğ. Molecular Cell Biology. Freeman, New York, 2012.
- Loizidou MA, Michael T, Neuhausen SL ve diğ. DNA-repair genetic polymorphisms and risk of breast cancer in Cyprus. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 ;115(3):623-7.
- Lu H, Guo X, Meng X ve diğ. The BRCA2-interacting protein BCCIP functions in RAD51 and BRCA2 focus formation and homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol*. 2005;25(5):1949-57.
- Lu J, Wei Q, Bondy ML ve diğ. Polymorphisms and haplotypes of the NBS1 gene are associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women <or=55 years. *Carcinogenesis*. 2006; 27(11):2209-16.
- Michalska MM, Samulak D, Romanowicz H ve diğ. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of RAD51-G172T and XRCC2-41657C/T Homologous Recombination Repair Genes and the Risk of Triple- Negative Breast Cancer in Polish Women. *Pathol Oncol Res*. 2015;21(4):935-40.
- Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract*. 2012;2012:743193.
- Mladenov E, Magin S, Soni A ve diğ. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front Oncol*. 2013;3:113.
- Myc myelocytomatosis oncogene [Mus musculus (house mouse)]. Erişim: 11 Nisan 2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17869>
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Tıbbi Genetik. Güneş Kitabevi, İstanbul, 2005.
- Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res*. 2001;3(6):385-9.
- Özmen V. Breast Cancer in the World and Turkey. *J Breast Health*. 2008; 4(2):2-5.
- Öztürk M. Meme Kanserinin Genetiği Ve Risk Faktörleri. Gazioğlu E (Ed). Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Dizisi No:54, İstanbul, 2006.
- Ricks-Santi LJ, Sucheston LE, Yang Y ve diğ. Association of Rad51 polymorphism with DNA repair in BRCA1 mutation carriers and sporadic breast cancer risk. *BMC Cancer*. 2011;11:278.
- Roy V, Perez EA. Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer. *Oncologist*. 2009;14(11):1061-9.
- Sakızlı M, Atabey N. Hücre Moleküler Yaklaşım. İzmir Kitabevi, İzmir, 2006.
- Sassi A, Popielarski M, Synowiec E ve diğ. BLM and RAD51 genes polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 2013;19(3):451-9.
- Schuetz JM, MaCarthur AC, Leach S ve diğ. Genetic variation in the NBS1, MRE11, RAD50 and BLM genes and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *BMC Med Genet*. 2009;10:117.
- Shen M, Menashe I, Morton LM ve diğ. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin lymphoma in a pooled analysis of three studies. *Br J Haematol*. 2010;151(3):239-44.

- Silva SN, Tomar M, Paulo C ve diğ. Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51. *Cancer Epidemiol.* 2010;34(1):85-92.
- SNP, Tek Nükleotid Polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphisms), 2016. Erişim: 05 Mayıs 2016, http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s_snp2.pdf
- Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J. Med.* 2009;360(8):790-800.
- Sun GL, Zhang BB, Xuan C ve diğ. RAD51 135G>C Polymorphism and Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis Involving 54,239 Subjects. *Austin J Pharmacol Ther.* 2014; 2 (3).9.
- Sun H, Bai J, Chen F ve diğ. RAD51 G135C polymorphism is associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 22,399 subjects. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(1):157-61.
- Suzuki R, Ye W, Rylander-Rudqvist T ve diğ. Alcohol and postmenopausal breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 1601-1608.
- Terry MB, Zhang FF, Kabat G ve diğ. Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. *Ann Epidemiol.* 2006; 16: 230-240.
- TP53 tumor protein p53 [Homo sapiens (human)]. Erişim: 11 Nisan 2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>
- Tulbah S, Alabdulkarim H, Alanazi M ve diğ. Polymorphisms in RAD51 and their relation with breast cancer in Saudi females. *Onco Targets Ther.* 2016;11;9:269-77.
- Üren N, Korak T, Dündar DA ve diğ. TP53 (RS1042522) polymorphism in breast cancer. *Journal of Health Sciences of Kocaeli University.* 2016;2(1):28-31
- Vymetalkova V, Soucek P, Kunicka T ve diğ. Genotype and Haplotype Analyses of TP53 Gene in Breast Cancer Patients: Association with Risk and Clinical Outcomes. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134463.
- Wang Z, Dong H, Fu Y ve diğ. RAD51 135G>C polymorphism contributes to breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 26,444 subjects. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124(3):765-9.
- Wang Z, Xu Y, Tang J ve diğ. A polymorphism in Werner syndrome gene is associated with breast cancer susceptibility in Chinese women. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;118(1):169-75.
- What are the key statistics about breast cancer?, 2016. Erişim: 25 Nisan 2016, <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-key-statistics>
- Xia X, Chen W, Li J ve diğ. Body mass index and risk of breast cancer: a nonlinear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Sci Rep.* 2014; 4:7480.
- Zhang BB, Wang DG, Xuan C ve diğ. Genetic 135G/C polymorphism of RAD51 gene and risk of cancer: a meta-analysis of 28,956 cases and 28,372 controls. *Fam Cancer.* 2014;13(4):515-26.
- Zhao M, Chen P, Dong Y ve diğ. Relationship between Rad51 G135C and G172T variants and the susceptibility to cancer: a meta-analysis involving 54 case-control studies. *PLoS One.* 2014;9(1):e87259.
- Zhou GW, Hu J, Peng XD ve diğ. RAD51 135G>C polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 125:529–535.

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Tuğcan KORAK
- İstanbul. 08.07.1991
- T.C.
- Bekar
- Askerlik Tecilli
- Mehmet Ali Paşa Mah. Erdem Sk. No:31 İzmit/KOCAELİ

2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

Kocaeli Üniversitesi, İzmit, Kocaeli Tıbbi Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans programı	2014-halen
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Urla, İzmir Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Lisans programı	2009-2014
Bahçeşehir Koleji, İzmit, Kocaeli	2008-2009
24 Kasım Anadolu Lisesi, İzmit, Kocaeli	2005-2008

Yabancı Dil: İngilizce

Uluslararası Yayın(lar):

1-Uzunoğlu H, **Korak T**, Ergül E, Uren N, Utkan NZ, Sazcı A “Relationship Between Breast Cancer And NBS1(NIBRIN) Gene Polymorphisms In Women With Sporadic Breast Cancer In Turkish Population” adlı makale *Biomedical Reports dergisinde yayına kabul edilmiştir (Aralık 2015)*.

Ulusal Yayın(lar):

1-Üren N, **Korak T**, Altınok D, Ergül E, Şimşek T, Güllüoğlu B, Cantürk NZ, Utkan NZ, Sazcı A. Tp53 (rs1042522) Polymorphism in Breast Cancer. Adlı makale *Journal of Health Science of Kocaeli University dergisine yayına kabul edilmiştir (Aralık 2015)*.

Uluslararası Bildiri(ler):

1-Timur Z, Demir SA, Calhan Y, **Korak T**, Ates E, Seyrantepe V. Altered vasoactive peptide composition in the tissues of Cathepsin A deficient mice, *FEBS JOURNAL Vol: 281 p.545-545 Suppl:1 Special Issue:SI Meeting Abstract: TUE-350,2014*

Onur Belgeleri ve Sertifikalar

- Lisans eğitimi boyunca not ortalaması bazlı alınan onur belgeleri;

2010-2011 bahar	onur sertifikası
2011-2012 kış	onur sertifikası
2011-2012 bahar	yüksek onur sertifikası
2012-2013 kış	yüksek onur sertifikası
2012-2013 bahar	yüksek onur sertifikası
2013-2014 kış	yüksek onur sertifikası
2013-2014 bahar	yüksek onur sertifikası

- 2014 yılı İYTE mezunları arasında tüm bölümlerdeki genel not ortalaması en yüksek 14 öğrencinin bulunduğu İYTE Rektörün Listesinde 13. lük.

Akademik Aktiviteler

- Kocaeli Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından düzenlenen programda Deneysel Hayvanları Kullanımı Sertifikası (B Kategorisi-araştırmacılar) alınmıştır.kursu katılımı.
- 03.11.14 tarihli Tübitak Yeni Nesil Genom Dizileme Sempozyumu'na dinleyici olarak katılım.
- 24 -26.02.12 tarihli Uluslararası IX. IUGEN İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrencilerinin Kış Okuluna dinleyici olarak katılım.



KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMA ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Birimi Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
TELEFON	0262 303 71 64 – 74 50
FAKS	0262 303 74 63
E-POSTA	etikkurul@kocaeli.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Türk Toplumunda BLM (rs2270132) ve RAD51 (rs1801320) gen polimorfizmlerinin meme kanserindeki rollerinin araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	KOÜ KAİK 2015/283			
	EUDRACT NUMARASI				
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Emel Ergül			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Yük. Lisans Öğrencisi Tuğcan Korak			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA (YÜKSEK LİSANS TEZİ)			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	10.09.2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	10.09.2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer	
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer	

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>	
SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		KOÜ BAP Fonu
BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
İLAN	<input type="checkbox"/>		
YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER	<input type="checkbox"/>		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 5/16	Proje No: KOU KA EK 2015/283	Tarih : 29.09.2015
	Doç. Dr. Emel Ergül sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen Klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420), Hasta Hakları Yönetmeliği Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik (8 Mayıs 2014/ 28994), Helsinki Bildirgesi (2008), İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (Nisan 2013),ICH/GCP-Guideline for Good Clinical Practice (10 Haziran 1996)İnsan Denekleri İçeren Biyomedikal Araştırmaların Uluslar arası Rehber Kuralları (CIOMS, 2002), Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (10 Mart 2011/6212), Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesi (4 Nisan 1997), Ek Madde - 10 (6 Nisan 2011, 6225)) Resmi Gazetede 13.04.2013 tarih ve 28617 sayı ile yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (25 Haziran 2014/29041)
---------------	--

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: PROF. DR. NERMİN ERSOY
ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Nermin ERSOY Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	KOÜ Tıp Fak. Tıp Tarihi ve Etik AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	N. Ersoy
Prof. Dr. Dilek URAL Başkan Yrd.	Kardiyoloji	KOÜ Tıp Fak. Kardiyoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	—
Prof. Dr. B. Faruk ERDEN Üye	Farmakoloji	KOÜ Tıp Fak. Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	—
Prof. Dr. Gülcan TÜRKER Üye	Pediyatri	KOÜ Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hst.AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	—
Prof. Dr. Yavuz GÜRKAN Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	KOÜ TF Anesteziyoloji ve Reanimasyon	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	—
Prof. Dr. Hale M. KIR Üye	Biokimya	KOÜ Tıp Fak. Biokimya AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	—
Doç. Dr. Ayşe KARSON Raportör	Fizyoloji	KOÜ Tıp Fak. Fizyoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	—
Jzm. Dr. Murat GÜVEN Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Derince Eğt. ve Arş. Hastanesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	—
Jzm. Dr. Berna A. ŞERİFİ Üye	Halk Sağlığı	İzmit 1 Nolu AÇSAP	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	—
Arş. Gör. Dr. İŞİK Üye	Avukat	Kocaeli Barosu	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	—
Arş. Gör. Dr. Masemin ÜLSOY Üye	Hasta Hakları Temsilcisi	Ev Hanımı	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	—
Doç. Dr. Öngen TAK	Danışman Dış Hekimi	KOU Dış Hekimliği Fak.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	—

* :Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Değerlendirme Formu
28 Nisan 2009 Versiyon No:1

TEZ DENETLEME LİSTESİ

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

23 / 05 / 2016

Danışman: Doç. Dr. Emel ERGÜL

İmza :