

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALITSAL MEME KANSERİ TANISI ALMIŞ OLGULARDA
DNA HASAR ONARIMINDAN SORUMLU OLAN
GENLERDEKİ MUTASYON SIKLIKLARININ
BELİRLENMESİ VE HASTALIĞIN KÖTÜ PROGNOZU İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seda KURU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2021

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALITSAL MEME KANSERİ TANISI ALMIŞ OLGULARDA
DNA HASAR ONARIMINDAN SORUMLU OLAN
GENLERDEKİ MUTASYON SIKLIKLARININ
BELİRLENMESİ VE HASTALIĞIN KÖTÜ PROGNOZU İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seda KURU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Doç. Dr. Naci ÇİNE

GOKAEK - 2020/338

KOCAELİ
2021

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Kalıtsal Meme Kanseri Tanısı Almış Olgularda DNA Hasar Onarımından Sorumlu Olan Genlerdeki Mutasyon Sıklıklarının Belirlenmesi ve Hastalığın Kötü Prognozu ile İlişkisinin Araştırılması

Tez Yazarı: Seda KURU

Tez Savunma Tarihi: 06.07.2021

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Naci Çine

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Moleküler Genetik Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI tezi olarak kabul edilmiştir.

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Kalıtsal Meme Kanseri Tanısı Almış Olgularda DNA Hasar Onarımından Sorumlu Olan Genlerdeki Mutasyon Sıklıklarının Belirlenmesi ve Hastalığın Kötü Prognozu ile İlişkisinin Araştırılması

Amaç: Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında kanser ölümlerinin en yaygın ve ikinci önde gelen nedenidir. BRCA1 ve BRCA2, kalıtsal meme kanseri gelişiminde en çok etkilenen genlerdir ve bunlara ek olarak meme kanserine sebep olan birçok gen tanımlanmıştır. DNA onarım genlerindeki germ hattı mutasyonları, ailesel meme kanseri gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu genlerdeki mutasyonların prevalansı ve penetrasyonunun büyük ölçüde değiştiği bilinmektedir. Bu çalışmada, meme kanseri tanısı almış ve ailevi meme kanseri yatkınlığından şüphelenilen ancak BRCA1 ve BRCA2 genlerinde herhangi bir patojenik değişim saptanmayan 96 olguda DNA hasar onarımından sorumlu olan genlerde genetik incelemelerin yapılması ve mutasyon sıklıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Kalıtsal meme kanseri yatkınlığından şüphelenilen 96 hastada DNA hasar onarımından sorumlu olan ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, MRE11A, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2, NBN, PALB2, RAD50, RAD51D, RAD51C, MUTYH, SLX4 ve BLM genlerindeki mutasyonların tespiti için yeni nesil dizileme yöntemi kullanılmıştır. Veri analizleri *Genomize Seq* yazılımı üzerinden gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda tespit edilen ACMG kriterlerine uygun olarak patojenik (P), muhtemel patojenik (LP) ve klinik önemi bilinmeyen (VUS) olarak sınıflandırılan varyantlar değerlendirilmeye alınıp varyant sıklıkları açısından analiz edilmiştir.

Bulgular: Çalışma sonucunda 41 (42,7%) hasta mutasyon taşıyıcısı olarak tanımlanmıştır. Taşıyıcıların 35'i (%36,4) en az bir tane VUS olarak tanımlanan varyanta sahipken bunlardan 2'si (%2) hem VUS hem patojenik varyant, 8'i (%8,3) patojenik veya muhtemel patojenik varyant taşımaktadır. Patojenik veya muhtemel patojenik bulgulardan 2'si ATM geninde, 1'i RAD50 geninde, 2'si MSH2 geninde ve 1'i MUTYH geninde tespit edilmiştir.

RAD51C: c.751G>A VUS varyantı akraba olan 3 hastada, MUTYH: c.884C>T muhtemel patojenik varyant 4 kişide birden saptanırken diğery varyantlar birer kez tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışma kapsamında, incelenen hastaların % 8,3'ünün DNA onarımında rol alan ATM, MSH2, RAD50 ve MUTYH genlerinde patojenik veya muhtemel patojenik mutasyon taşıdıkları tespit edilmiştir. Bu genlerde tanımladığımız varyantların, meme ve yumurtalık kanserine genetik yaklaşımda yeni tanı ve tedavi stratejileri için anahtar rol oynayabileceği, hastalık için aday moleküler belirteç olma potansiyeli taşıyabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, hastaların %36,4'ünün DNA onarımında rol alan 16 gende en az 1 VUS varyant taşıdığı tespit edilmiştir. Kalıtsal meme kanseri yatkınlığı olan hastalarda tanımlanan bu VUS'ların sınıflandırılması, hastalığın erken teşhisine ve taranmasına katkıda bulunabilir ve hedefe yönelik tedavilerle bakımı kişiselleştirerek tedavi seçeneklerini iyileştirebilir. Tespit ettiğimiz nadir varyantların potansiyel etkilerini belirlemek için web tabanlı programlar ve *in silico* analiz kullanılmış olsa da, protein fonksiyonu üzerindeki potansiyel etkileri doğrulamak için daha detaylı fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, DNA onarım genleri, Yeni Nesil Dizileme

ABSTRACT

Determination of Mutation Frequencies in Genes Responsible for DNA Damage Repair in Cases Diagnosed with Hereditary Breast Cancer and Investigation of Its Relationship with Poor Prognosis of The Disease

Objective: Breast cancer is the most common and second leading cause of cancer death among women worldwide. BRCA1 and BRCA2 are the most affected genes in the development of hereditary breast cancer, and in addition, many genes that cause breast cancer have been identified. Germline mutations in DNA repair genes contribute to the development of familial breast cancer. However, the prevalence and penetration of mutations in these genes are known to vary greatly. In this study, it was aimed to perform genetic analyzes and to determine the frequency of mutations in the genes responsible for DNA damage repair in 96 patients who were diagnosed with breast cancer and suspected familial breast cancer predisposition, but no pathogenic changes were detected in BRCA1 and BRCA2 genes.

Method: Next-generation sequencing was used to detect mutations in ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, MRE11A, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2, NBN, PALB2, RAD50, RAD51D, RAD51C, MUTYH, SLX4 ve BLM genes responsible for DNA damage repair in 96 patients with suspected hereditary breast cancer susceptibility. Data analyzes were performed using Genomize Seq software. As a result of the study, variants classified as pathogenic (P), likely pathogenic (LP) and of unknown clinical significance (VUS) in accordance with the identified ACMG criteria were evaluated and analyzed in terms of variant frequencies.

Results: As a result of the study, 41 (42.7%) patients were identified as mutation carriers. While 35 (36.4%) carriers have at least one variant defined as VUS, 2 (2%) of them carry both VUS and pathogenic variant, 8 (8.3%) pathogenic or likely pathogenic variant. Of the pathogenic or likely pathogenic findings, 2 were detected in the ATM gene, 1 in the RAD50 gene, 2 in the MSH2 gene and 1 in the MUTYH gene. RAD51C: c.751G>A VUS variant

was detected in 3 related patients, MUTYH: c.884C>T likely pathogenic variant was detected in 4 individuals, while other variants were detected once.

Conclusions: In this study, 8.3% of the patients examined were found to have pathogenic or likely pathogenic mutations in ATM, MSH2, RAD50 and MUTYH genes, which are involved in DNA repair. It is thought that the variants we identified in these genes may play a key role for new diagnosis and treatment strategies in the genetic approach to breast and ovarian cancer, and may have the potential to be a candidate molecular marker for the disease. In our study, 36.4% of the patients were found to have at least 1 VUS variant in 16 genes involved in DNA repair. Classification of these VUSs identified in patients with hereditary predisposition to breast cancer may contribute to early diagnosis and screening of the disease and improve treatment options by personalizing care with targeted therapies. Although web-based programs and in silico analysis were used to determine the potential effects of the rare variants we detected, more detailed functional studies are needed to confirm the potential effects on protein function.

Keywords: Breast cancer, DNA repair genes, Next Generation Sequencing

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik alanında eğitim alma şansını bana tanımış olan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hakan SAVLI'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen ve tez çalışmamın her aşamasında bana rehberlik eden danışman hocam Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye,

Tez çalışmam için hasta bilgileri ve verilerin analizi için destek sağlayan Duygu AYDIN ve diğer laboratuvar çalışanlarına,

Yüksek lisans eğitimimde birlikte yola çıktığım ve bu süreçte her zorluğu birlikte yardımlaşarak aştığımız değerli arkadaşım Cansu UĞURTAŐ'a,

Eğitim hayatım boyunca koşulsuz sevgi ve destekleriyle yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Seda KURU

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kalıtsal Meme Kanseri Tanısı Almış Olgularda DNA Hasar Onarımından Sorumlu Olan Genlerdeki Mutasyon Sıklıklarının Belirlenmesi ve Hastalığın Kötü Prognozu ile İlişkisinin Araştırılması” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

06 / 07 / 2021

Seda KURU

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Meme Kanseri Etiyolojisi	2
1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	3
1.3. Meme Kanseri Sınıflandırması	4
1.3.1. Histopatolojik Sınıflandırma	5
1.3.2. Derecelendirme	6
1.3.3. Evreleme.....	7
1.3.4. Geleneksel Biyobelirteçler	7
1.3.5. Meme Kanseri Alt Tiplerinin Moleküler Sınıflandırması.....	9
1.4. Meme Kanseri Tedavisi	11
1.4.1. Ameliyat	12
1.4.2. Radyoterapi	14
1.4.3. Hormon veya Hedefe Yönelik Tedavi	14
1.4.4. Meme kanserinde DDR yolunu hedefleyen yeni terapötik yaklaşımlar	15
1.4.4.1. PARP inhibitörleri.....	16
1.5. Ailesel Meme Kanseri	17
1.6. Sporadik Meme Kanseri	20
1.7. Meme Kanseri Yatkınlık Genleri.....	21

1.7.1. Yüksek Penetrans Genler	22
1.7.1.1. BRCA1 ve BRCA2	23
1.7.2. Orta Derece Penetrans Genler	24
1.7.2.1. ATM Geni	24
1.7.2.2. PALB2 Geni.....	25
1.7.2.3. BRIP1 Geni.....	26
1.7.2.4. MRE11A, RAD50 ve NBN Genleri (MRN Kompleksi)	26
1.7.2.5. RAD51 Geni	27
1.7.3. Meme Kanseri ile İlişkili Diğer Genler.....	28
1.7.3.1. BLM Geni	28
1.7.3.2. MUTYH Geni.....	28
1.7.3.3. SLX4 Geni.....	29
1.7.3.4. BARD1 Geni.....	30
1.7.3.5. MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PMS1 (MMR Genleri)	31
1.7.4. Düşük Penetrans Genler	33
1.8. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları	33
1.8.1. Baz Eksizyon Onarım Yolu (BER)	35
1.8.2. DNA Çift İplikli Kırık Onarım Yolları: HR, NHEJ.....	35
1.8.3. Uyumsuzluk Onarımı (MMR).....	38
1.9. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi	39
2. AMAÇ.....	41
3. YÖNTEM.....	42
3.1. Çalışma Grubu	42
3.2. Kullanılan Cihazlar	42
3.3. Yeni Nesil Dizileme Kit İçeriği	43
3.4. DNA Örneklerinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	43
3.5. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi İle İlgili Genlerin Dizilenmesi	43

3.5.1. Genomik DNA Örneklerinin Hazırlanması.....	44
3.5.2. Kütüphane Oluşturulması.....	45
3.5.2.1. DNA Fragmantasyonu, Uçların Onarımı ve dA-Kuyruğu Eklenmesi	45
3.5.2.2. İşaretli Adaptörlerin Ligasyonu ve Saflaştırma.....	46
3.5.2.3. PCR Amplifikasyonu, Saflaştırma ve Kalite Ölçümü.....	47
3.5.2.4. Kütüphane Havuzu Oluşturma ve SPRI ile Havuzunun Yoğunlaştırılması	48
3.5.2.5. Kütüphane Havuzu ile Capture Problemlerin Hibridizasyonu	49
3.5.3. Kütüphanelerin Zenginleştirilmesi.....	50
3.5.3.1. Hibridize Olan Hedeflerin Streptavidin Boncukları İle Bağlanması.....	50
3.5.3.2. PCR Amplifikasyonu, Saflaştırma ve Kalite Ölçümü.....	51
3.5.4. Yeni Nesil Dizileme Cihazında Sekanslama.....	52
3.6. Biyoinformatik Analiz ve Varyantların Sınıflandırılması	52
3.7. İstatistiksel Analiz	53
4. BULGULAR	54
4.1. Hasta Özellikleri	54
4.2. Yeni Nesil Dizileme Bulguları	55
4.2.1. Patojenik / Muhtemel Patojenik Mutasyon Saptanan Hasta Bulguları	59
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	64
7. KAYNAKLAR.....	82
8. ÖZGEÇMİŞ	102
EKLER	102
EK-1. Etik Kurul Onayı	102

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACMG: Amerikan Medikal Genetik Koleji (American College of Medical Genetics)

ATM: Gen; ing. Ataxia Telangiectasia Mutated

BARD1: Gen; BRCA1 İlişkili RING Domain 1

BER: Baz Ekzisyon Onarımı

BLM: REQ Helikazı

BRIP1: Gen; BRCA1 Etkileşim Protein C-Terminal Helikaz 1

DCIS: İn Situ Duktal Karsinom

DDR: DNA Hasar Yanıtı

DSB: Çift Sarmal Kırığı

ExAC: Ekzom Birleştirme Konsorsiyumu

ER: Östrojen Reseptörü

FA: Fankoni Anemisi

HER2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2

HGVS: İnsan Genomu Varyasyon Topluluğu

HNPCC: Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolorektal Kanser

HR: Homolog Rekombinasyon

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Derneği

IDC: İnvaziv Duktal Karsinom

ILC: İnvaziv Lobüler Karsinom

MAF: Minör Alel Frekansı

MAP: MUTYH ile ilişkili polipoz

MMR: Uyumsuzlu Onarım Yolu

MRE11A: Gen; Mayotik Rekombinasyon 11 Homolog A

MRI: Mikrosatellit İnstabilitesi

NBS: Nijmegen Breakage Sendromu

NER: Nükleotid Eksizyon Onarımı

NHEJ: Homolog Olmayan Uç Birleştirme

NGS: Yeni Nesil Dizileme

PALB2: Gen; BRCA2 Partner ve Lokalizörü

PARP: Poli (ADP-riboz) Polimeraz

PJS: Peutz-Jeghers Sendromu

PR: Progesteron reseptörü

RAD51C: Gen; RAD51 Paralog C

SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant

SSB: Tek İplik Kırığı

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

STK11: Gen; Serin/Treonin Kinaz 11

VUS: Önemi Bilinmeyen Varyant (ing. Variant of uncertain significance)

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. 2020 yılında Dünya genelinde her yaş ve cinsiyette melanom dışı deri kanserleri hariç 19 milyon yeni vaka içerisinde tahmini kanser yüzdeleri	4
Şekil 1. 2. Meme kanseri alt tiplerinin histolojik sınıflandırması	5
Şekil 1. 3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması.....	9
Şekil 1. 4. PARP yoluna genel bakış.....	17
Şekil 1. 5. Kanser riskinin genetik yapısı.....	21
Şekil 1. 6. Homolog rekombinasyon eksikliğinin (HRD) DNA onarım mekanizması.....	36
Şekil 1. 7. Uyumsuzluk Onarımı (MMR) yolunun şeması.....	39
Şekil 4. 1. Patojen riskine bağlı olarak varyantların genlere göre dağılımları	55
Şekil 4. 2. Çalışmaya dahil edilen hastalarda varyant sıklıkları.....	58

TABLÖLAR

Tablo 1. 1. Meme kanserinde yaygın genler ve klinik öneriler	13
Tablo 1. 2. Meme kanserine yatkınlık genleri	19
Tablo 3. 1. Yeni Nesil Dizileme İş Akış Şeması	44
Tablo 3. 2. Fragmantasyon Reaksiyonu.....	45
Tablo 3. 3. Fragmantasyon PCR Programı	46
Tablo 3. 4. Ligasyon Reaksiyonu	46
Tablo 3. 5. PCR Amplifikasyon Reaksiyonu.....	47
Tablo 3. 6. PCR amplifikasyonu PCR Programı	48
Tablo 3. 7. Kütüphane Havuzu Oluşturma	49
Tablo 3. 8. Hibridizasyon Reaksiyonu.....	49
Tablo 3. 9. Hibridizasyon PCR Programı	50
Tablo 3. 10. Hedef Zenginleştirme Reaksiyonu	51
Tablo 3. 11. Hedef Zenginleştirme PCR Programı.....	51
Tablo 4. 1. İncelenen popülasyon özellikleri.....	54
Tablo 4. 2. Çalışma grubunda tespit edilen varyantlar	56
Tablo 4. 3. Hasta grupları arasında mutasyon durumu	58
Tablo 4. 4. Meme kanseri tanılı hasta özellikleri ve mutasyon durumu	59
Tablo 4. 5. Patojenik/muhtemel patojenik varyant saptanan hastaların özellikleri	60

1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında kanser ölümlerinin en yaygın ve ikinci önde gelen nedenidir. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde etkili olan gerçek bir halk sağlığı sorununu temsil etmektedir. Meme kanseri, yaş, cinsiyet, etnik köken, üreme ve hormonal faktörler, geçmiş meme kanseri öyküsü, iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma, çevresel ve yaşam tarzı faktörleri, aile öyküsü ve genetik faktörler dahil olmak üzere klinik, patolojik ve biyolojik faktörlerle ilişkili karmaşık ve heterojen bir hastalıktır (Brinton ve ark., 2014; Farmer ve ark., 2010; Ferlay ve ark., 2012). Bununla birlikte, meme kanseri gelişiminde anahtar faktör, hastalığın erken başlamasıdır. Bireysel risk, meme kanserinden etkilenen akrabalar ve erken yaş ile orantılı olarak artmaktadır (Lalloo ve Evans, 2012).

Meme kanseri vakalarının yaklaşık %10-30'u kalıtsal faktörlere atfedilse de, bu vakaların sadece küçük bir kısmı otozomal dominant bir şekilde kalıtılan yüksek penetrans genlerdeki mutasyonlarla açıklanmaktadır. BRCA1 ve BRCA2 genleri, meme kanserinde önemli duyarlılık genleridir. Kalıtsal meme kanseri gelişiminden en sık sorumlu olan bu genlerin yanı sıra farklı tümör süpresor ve protoonkogen genlerinde meydana gelen mutasyonlar da hastalığın gelişme riskini artırabilmektedir. Bu durumda meme kanseri aday genleri olarak, BRCA1/2 dışı genlerde hastalıkla ilişkili olabilecek mutasyon ve değişimlerin belirlenmesi hastalığın patogenezi için oldukça önemlidir (Hoang ve Gilks, 2018). Yapılan çalışmalar, meme kanseri hastalarında ve meme kanseri aile öyküsü olan kadınlarda yüksek seviyelerde DNA hasarının meydana gelmesi ve DNA onarım kapasitesinin azalması arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (Helzlsouer ve ark., 1996; Jyothish ve ark., 1998).

DNA'nın kimyasal yapısındaki bir hasarın onarılamaması, kanserin ilerlemesinde önemli rol oynar (AlMutairi ve ark., 2015). DNA onarım mekanizmaları ile DNA hasarının tespiti ve onarımı, karsinogenezin önlenmesinde, genom bütünlüğünün korunmasında ve mutasyonlara karşı korumada önemlidir (Shadrina ve ark., 2016). Şimdiye kadar 150'den fazla DNA onarım geni tanımlanmış ve DNA onarımının kanserdeki rolü hala yaygın olarak

araştırılmaktadır. Bilimsel çalışmalar, bozulmuş bir DNA hasarı yanıtının meme kanseri riskini artırabileceğini ileri sürmektedir (RD, 2005).

Meme kanseri biyomedikal araştırma topluluğu özellikle, son derece heterojen ve karmaşık olan bu hastalığın çalışılmasında yeni nesil dizileme (NGS) uygulanmasından yararlanmıştır. Yüzlerce hastayı inceleyen büyük ölçekli girişimler, meme kanseriyle ilişkili yeni genlerin keşfedilmesine, bireysel tümörlerin heterojenitesinin incelenmesine ve ilgili mutasyon süreçlerinin aydınlatılmasına yol açmıştır (Ding ve ark., 2014). Son yıllarda, NGS teknolojilerinin hızlı gelişimi, geleneksel dizileme teknikleri kullanılarak tek gen dizilemesine benzer bir maliyetle birden çok genin eşzamanlı dizilenmesini sağlamıştır. Çalışmalar, bu tür uygun maliyetli bir yaklaşımın, yüksek meme kanseri riski taşıyan bireyler için genetik test ve kişiselleştirilmiş risk değerlendirmesinde kullanılabileceğini ileri sürmektedir. NGS, nadir genetik varyantlar için daha yüksek doğruluk ve hassasiyete sahiptir (Hong ve ark., 2013; Su ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014). Bu nedenle, NGS'nin karmaşık hastalıkların ve fenotipik özelliklerin genetiğinin anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunacağı hatta "eksik varyansı" açıklayabileceği düşünülmektedir (Londin ve ark., 2013; Marian 2012; Wagner 2013). BRCA1 ve BRCA2 genleri, meme kanserinde en önemli duyarlılık genleridir, ancak bu iki gende yerleşimli mutasyon sıklığı az olduğu göz önüne alındığında, NGS, tüm genler etrafındaki potansiyel patojenik mutasyonları taramanın etkili yolu haline gelmektedir (Dong ve ark., 2018).

1.1. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanserinin nedeninin tek bir etkene bağlı olmadığı ya da kesin olarak bilinmediği, genetik, hormonal, çevresel, psikolojik ya da biyokimyasal birçok faktörün etkili olabileceği düşünülmekte; ancak meme kanserli kadınların çoğunluğunda (%70) bilinen bir risk faktörünün bulunmadığı belirtilmektedir (Akyolcu ve ark., 2018). Kadınlarda genel sağlık taramasında meme kanseri gelişiminin artmasıyla ilişkili faktörlerin belirlenmesi önemlidir (Doren ve ark., 2018). Meme kanseri için risk faktörleri 7 geniş kategoriye ayrılabilir:

- 1) Yaş: Yaşa göre ayarlanmış meme kanseri insidansı, kadın nüfusunun ilerleyen yaşıyla birlikte artmaya devam etmektedir.
- 2) Cinsiyet: Meme kanserinin çoğu kadınlarda görülmektedir.

- 3) Bireysel meme kanseri öyküsü: Bir memede kanser öyküsü, diğer memede ikinci bir birincil kanser olasılığını artırmaktadır.
- 4) Histolojik risk faktörleri: Meme biyopsisi ile teşhis edilen histolojik anormallikler, meme kanseri risk faktörlerinin önemli bir kategorisini oluşturmaktadır.
- 5) Ailede meme kanseri öyküsü ve genetik risk faktörleri: Meme kanseri olan hastaların birinci derece akrabalarında, hastalığa yakalanma riski 2 - 3 kat daha fazladır.
- 6) Üreme riski faktörleri: Bir kadının yaşam boyu östrojen maruziyetini artıran üreme ile ilgili faktörlerin meme kanseri riskini artırdığı düşünülmektedir.
- 7) Ekzojen hormon kullanımı: Çeşitli koşullar altında terapötik veya tamamlayıcı östrojen ve progesteron alınması meme kanseri riskini artırmaktadır.

1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

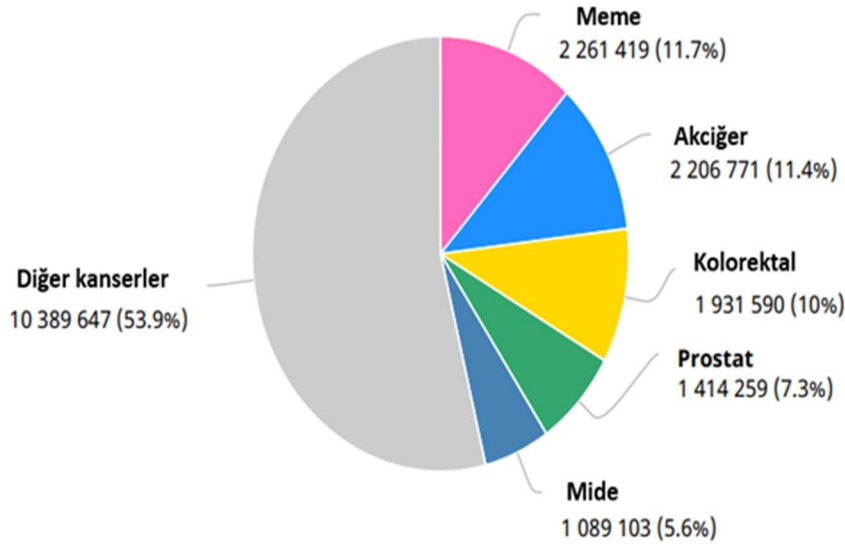
Kanser insidansı ve ölüm oranı dünya çapında hızla artmaktadır; bu, hem yaşlanmayı hem de nüfusun büyümesini yansıtırken, birçoğu sosyoekonomik gelişme ile ilişkili olan kanser için başlıca risk faktörlerinin yaygınlığı ve dağılımındaki değişiklikleri de yansıtmaktadır (Gersten ve Wilmoth, 2002; Omran, 1971).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 2018 yılında dünyada yeni tanı konulan hasta sayısının 2 milyonu aştığı, mortalitenin ise 627 bin olduğu belirtilmektedir. ABD’de 2019 yılında yeni tanı konulan meme kanseri sayısının 271.270, meme kanserinden kaybedilen hasta sayısının ise 42.260 olduğu tahmin edilmektedir. Bu, kadın kanserlerinin %24’ünü, kadınların kanserden ölümlerinin ise %15’ini teşkil etmektedir (Siegal, Miller ve Jemal, 2014). Gelişmiş ülkelerde, her 8 kadından birinde hayatı boyunca meme kanseri gelişeceği öngörülmekte olup, görülme sıklığındaki artışa rağmen mortalitede azalma dikkat çekmektedir. Bunun aksine düşük ve orta gelirli ülkelerde meme kanseri sıklığındaki artış mortalitedeki artış ile birlikte (Dogan ve Toprak, 2014; Ozmen, 2008).

Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2018 yılı için ülkemizde kadınlarda meme kanseri sıklığı yüz binde 45.6’dır. Ülkemizde Batı ve Doğu Anadolu Bölgeleri’nde meme kanseri sıklığı 50/100.000 ve 20/100.000 olarak bildirilmektedir. Bölgeler arasındaki bu fark, yaşam tarzı değişikliği ile açıklanmaktadır. Özellikle 45-54 yaş aralığında meme kanseri sıklığının daha fazla olduğu dikkat çekmektedir. Ancak meme kanserine bağlı mortalite birçok ülkede giderek azalmaktadır. Bu durumun en önemli nedeni taramada kullanılan görüntüleme

yöntemleri ile meme kanserine erken evrede tanı konulabilmesidir. Bunun yanı sıra sürekli geliştirilen medikal tedaviler de meme kanserine bağlı mortaliteyi azaltmıştır (Dilmac ve ark., 2020).

Uluslararası Kanser Araştırma Derneği (IARC) ve WHO tarafından yayınlanan 2020 verilerine göre, kadınlarda meme kanseri, tüm kanser vakalarının %11,7'sini temsil eden tahmini 2,3 milyon yeni vaka ile 2020'de dünya genelinde kanser insidansının önde gelen nedeni olarak akciğer kanserini geçtiği bildirilmiştir (Sung ve ark., 2020) (Şekil 1.1). Kadınlar arasında meme kanseri, 4 kanser vakasından 1'ini ve 6 kanser ölümlünden 1'ini oluşturarak, ülkelerin büyük çoğunluğunda insidans ve ölüm oranı açısından ilk sırada yer almaktadır.



Toplam: 19 milyon yeni vaka

Şekil 1. 1. 2020 yılında Dünya genelinde her yaş ve cinsiyette melanom dışı deri kanserleri hariç 19 milyon yeni vaka içerisinde tahmini kanser yüzdeleri (Sung ve ark., 2020).

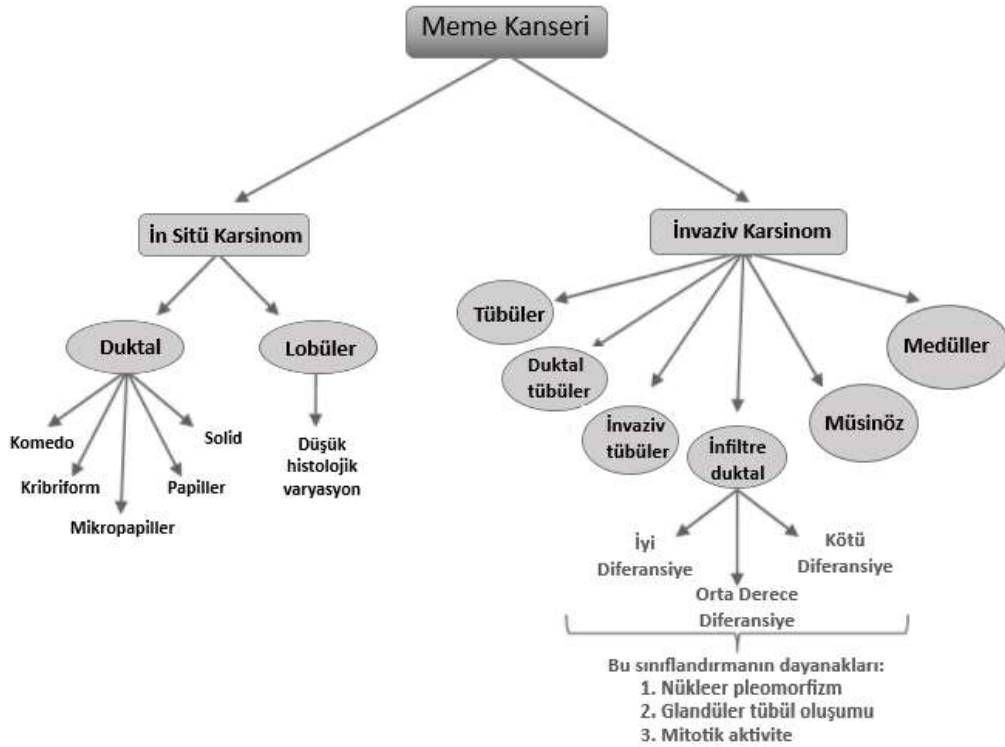
1.3. Meme Kanseri Sınıflandırması

Meme kanseri sınıflandırması, onkolojik olarak karar vermeyi kolaylaştırmak için hastalığın doğru teşhisini ve tümör davranışının tahminini sağlamayı amaçlamaktadır. Meme kanseri değerlendirmesinin temeli, WHO tümör sınıflandırmasında ayrıntılı olarak açıklanan histolojik alt tiplerinin belirlenmesi ve derecelendirmesine ve aynı zamanda tümör boyutu, nodal durum ve uzak metastazına bakılarak kanserin evrelendirilmesine dayanmaktadır. Meme kanserinin rutin değerlendirmesi ayrıca östrojen reseptörü (ER), progesteron

reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonunu içermektedir. Aynı histolojik tipteki kanserler, çok farklı biyolojik davranışlar gösterebilir. Bu yüzden bu parametrelerin değerlendirilmesi, bireysel meme kanserlerinin çeşitli klinik seyrini yakalayamayabilir. Kişiselleştirilmiş tıbbın mevcut çağında, daha iyi bir anlayış ve sınıflandırma gereklidir (Tsang ve Tse, 2020).

1.3.1. Histopatolojik Sınıflandırma

Meme kanserlerinin histolojik sınıflandırması, patolojik büyüme paternine dayanmaktadır. Meme kanseri genel olarak in situ karsinoma ve invaziv karsinoma olarak kategorize edilebilir. İn situ meme karsinomu, ayrıca duktal veya lobüler olarak alt sınıflandırılır; büyüme modelleri ve sitolojik özellikler, iki tip arasında ayrım yapmanın temelini oluşturmaktadır. İn situ duktal karsinom (DCIS), in situ lobüler karsinomdan (LCIS) önemli ölçüde daha yaygındır ve heterojen bir tümör grubunu kapsar. DCIS, geleneksel olarak, tümörün mimari özelliklerine dayalı olarak daha fazla alt sınıflandırmaya tabi tutulmuştur ve *Comedo*, *Cribriform*, *Mikropapiller*, *Papiller* ve *Katı* olmak üzere iyi tanınan beş alt tipi tanımlanmıştır (Connolly ve ark., 1996) (Şekil 1.2).



Şekil 1. 2. Meme kanseri alt tiplerinin histolojik sınıflandırması (Connolly ve ark., 1996).

Bu sınıflandırma şeması birkaç on yıldır değerli bir araç olsa da, prognostik önemi kanıtlanmış yeni moleküler belirteçler kullanmadan yalnızca histolojiye dayanmaktadır.

“Meme Tümörleri Sınıflandırması” dördüncü baskısında WHO tarafından tanımlanan 21'den fazla invaziv meme karsinomu alt tipi vardır (Weigelt ve ark., 2008). En yaygın olanları, tüm invaziv kanserlerin %70 -80'ini oluşturan invaziv duktal karsinom (IDC) ve yaklaşık %10'unu oluşturan invaziv lobüler karsinomdur (ILC). Geri kalan tümör tipleri müsinöz, kribriform, mikropapiller, papiller, tübüler, medüller, metaplastik ve apokrin karsinomlar gibi daha az yaygın olan histolojik tiplerdir (Şekil 1.2). Histolojik tiplere göre sınıflandırma, tümör hücre tipi, hücre dışı sekresyon, mimari özellikler ve immünohistokimyasal profil dahil olmak üzere çok çeşitli kriterlere dayanmaktadır (Lakhani ve ark., 2012; Rosai, 2011). IDC ayrıca nükleer pleomorfizm, glandüler/tübül oluşumu ve mitotik indeks seviyelerine göre iyi farklılaşmış (derece 1), orta derecede farklılaşmış (derece 2) veya zayıf farklılaşmış (derece 3) olarak alt sınıflandırılır (Lester ve ark., 2009). Moleküler belirteçlerin kullanımının hala tartışıldığı DCIS' nin aksine, ER, PR ve HER2'nin kullanımı IDC için kabul görmüştür ve durumlarının tüm invaziv karsinomlarda belirlenmesi tavsiye edilmektedir (Harris ve ark., 2007). IDC'de ER, PR ve HER2 tespitinin kullanımı, moleküler biyobelirteçlerin klinik kararlara rehberlik etme potansiyeline örnek oluşturmaktadır (Maughan, Lutterbie ve Ham, 2010).

Bazı özel meme kanseri türleri, karakteristik morfolojiye ek olarak spesifik genetik imzalar ve klinik davranışlarla ilişkilendirilir, bu nedenle doğru histolojik sınıflandırma önemli prognostik ve öngörücü bilgiler sağlamaktadır (Weigelt ve ark., 2008).

1.3.2. Derecelendirme

Histolojik tipine bakılmaksızın tüm invaziv meme karsinomları histolojik olarak derecelendirilmektedir. Scarff-Bloom Richardson derecelendirmesinin şu anda yaygın olarak kabul gören Nottingham modifikasyonu, her bir parametreyi 1'den 3'e kadar sayısal bir puanlama sistemi ile değerlendirmekte ve derecelendirme için toplam puanı ortaya koymaktadır (Mook ve ark., 2009). Puanlar, tübül oluşumu oranı (3'ü zayıf tübül oluşumunu gösteren 1-3 skoru), nükleer pleomorfizm derecesi (3'ü yüksek derecede pleomorfizm gösteren 1-3) ve mitotik sayım (1-3, 3 yüksek bir mitotik sayıdır, tam sayı mikroskopik alanın boyutuna bağlıdır) ile belirlenmektedir. Skorlar birleştirilerek 1 (toplam skor 3 ila 5),

2 (skor 6 veya 7) veya 3 (skor 8 veya 9) derecesini verecek şekilde birleştirilir, burada derece 1 tümörler en çok farklılaşırken derece 3 tümörler en az farklılaşmaktadır. Tümör derecesi güçlü bir prognostik faktördür ve “Nottingham Prognostic Index” ve “Adjuvant Online” gibi klinik karar verme araçlarında lenf nodu durumuyla birlikte kullanılır (Ravdin ve ark., 2001; Blamey ve ark., 2007).

Yüksek dereceli meme kanserleri erken dönemde nüks etme ve metastaz yapma eğilimindeyken, düşük dereceli tümörü olan hastalar genellikle çok iyi bir klinik sonuca sahiptir ve yan etkiler ortaya çıkarsa, hastanın yaşamı nispeten son bulmaktadır (Rakha ve ark., 2010). Ulusal Kanser Enstitüsü Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar Programından elde edilen veriler, histolojik derecenin tümörün boyutuna ve pozitif lenf düğümlerinin sayısına bakılmaksızın önemli bir prognostik faktör olduğunu göstermiştir (Schwartz ve ark., 2004).

1.3.3. Evreleme

Amerikan Ortak Kanser Komitesi tarafından yayınlanan TNM sınıflandırması, memedeki tümörün boyutu (T), bölgesel lenf düğümlerinin durumu (N) ve uzak metastazların (M) hem klinik hem de patolojik bilgilerini kullanır. Evreleme, bu faktörleri ve stratejileri hastalığı 5 aşamadan birinde (0, I, II, III ve IV) birleştirir. Evrelemede son güncellemeler ile meme kanserinde hormon reseptör durumları, HER-2 reseptör durumu, histolojik derecelendirme ve çoklu gen analizleri sonucunda alınan sistemik tedaviye yanıt ya da rekürrens olma ihtimalleri tahmini ile TNM’yi anatomik bir sınıflama sisteminden çıkararak prognostik bir sınıflama sistemine sokmuştur (Weiss ve ark., 2018).

1.3.4. Geleneksel Biyobelirteçler

Biyobelirteç, “normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik bir müdahaleye farmakolojik yanıtların bir göstergesi olarak objektif olarak ölçülen ve değerlendirilen bir özellik olarak tanımlanır (Biomarkers Definitions Working Group ve ark., 2001). Potansiyel olarak çok büyük bir biyobelirteç havuzu mevcut olmasına rağmen, dünya çapında rutin klinik uygulamada yalnızca üçü kullanılmaktadır: ER, PR ve HER2 (Rakha, Reis-Filho, ve Ellis, 2010).

ER, 1950'lerin sonlarında Ellwood Jensen tarafından tanımlanmıştır (Jensen ve Jordan 2003) ve ER durumu, hem tümörün endokrin tedaviye yanıtını tahmin etmek için hem de erken nüks ve uzun vadeli sonuç için prognostik bir faktör olarak 1970'lerin ortalarından beri kullanılmaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık %80'i ER pozitifdir (Anderson ve ark., 2002). ER ve PR mevcut olduklarında, hormonal tedaviye yanıt verme konusunda gerçek göstergelerdir ve %1 nükleer ekspresyon eşiği ile immünohistokimyasal olarak değerlendirilmektedir (Hammond ve ark., 2010). ER / PR pozitif kanserler genellikle düşük derecedir ve daha az agresiftir. ER pozitif kanserlerin çoğu aynı zamanda PR + 'dır. Bununla birlikte, meme kanserlerinin küçük bir yüzdesi, tek hormon reseptör pozitifliği göstermektedir. Bu tümörler, ER / PR-pozitif kanserlerle karşılaştırıldığında daha agresif ve hormonal tedaviye daha az yanıt verdiği bilinmektedir (Cui ve ark., 2005; Ethier ve ark., 2018).

HER2 durumu, immünohistokimyasal ve DNA in situ hibridizasyon tekniklerinin bir kombinasyonu kullanılarak test edilmektedir (Wolff ve ark., 2018). HER2 gen amplifikasyonu ve aşırı protein ekspresyonunun gösterilmesi, klinik uygulamada zayıf prognozun bir göstergesi olarak ve insanlaştırılmış anti-HER2'ye spesifik monoklonal antikor (trastuzumab; Herceptin) ile sistemik tedaviye yanıtın bir öngörücüsü olarak kullanılmaktadır. HER2 pozitifliği invaziv meme kanserlerinin % 13-20'sinde görülür ve bu tümörlerin yarısından fazlası hormon reseptörü negatiftir (Dandachi, Dietze, ve Hauser-Kronberger, 2002; Slamon ve ark., 1987). HER2 pozitifliğinin prognostik önemi, nod negatif hastalara kıyasla nod pozitif için daha fazladır (Rakha ve ark., 2010).

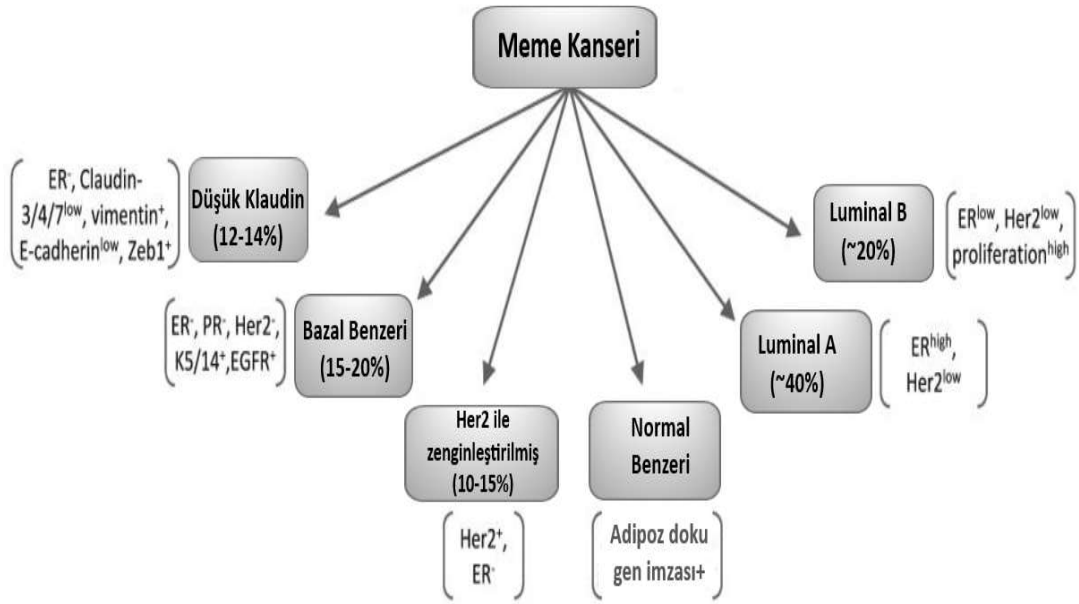
Ki-67, hücre proliferasyon döngüsünde G0 fazı hariç diğer fazlarda çoğalmış olan hücreler tarafından eksprese edilen immunohistokimyasal olarak belirlenen bir belirteçtir. Kötü prognoz ile ilişkilidir. Yapılan meta analizler sonucunda Ki-67 yüksek ekspresyonunun, yüksek lokal nüks ve daha düşük yaşam süresi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Luporsi ve ark., 2012). Ki67, proliferasyonu belirlemek ve kemosenitiviteyi tahmin etmek için yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte, Ki67 yalnızca ER-pozitif, HER2-negatif meme kanserleri ile ilgilidir. HER2-pozitif meme kanserleri ve TNBC'ler (bazı istisnalar dışında) kemoterapi gerektirdiğinden, Ki67 bu alt tiplerde tedaviye karar vermede herhangi bir fayda sağlamadığı bildirilmiştir. Ayrıca, Ki67 tespiti ne standartlaştırılmıştır ne de genel olarak tavsiye edilmektedir. En yaygın olarak kullanılan limit değeri, invaziv tümör hücrelerinde %20 boyanmış çekirdeklerdir; Yoğunluk ne olursa

olsun <% 15 boyanmış çekirdek bölgeleri düşük proliferasyon olarak kabul edilir ve >% 30 yüksek proliferasyon olarak kabul edilmektedir (Dowsett ve ark., 2011).

Anatomik bilgilere tümör derecesi, hormon reseptörü ve onkojen ekspresyonu (ER, PR ve HER2 dahil) ve multigen panel sonuçlarının eklenmesi daha doğru prognostik sağlar. Düşük dereceli tümörler, ER-pozitif tümörler ve PR-pozitif tümörler popülasyonlar arasında daha olumlu olma eğiliminde olsalar da, multigen panellerden elde edilen sonuçlar daha da kişiselleştirilmiş prognostik bilgiler sunmaktadır (Giuliano ve ark., 2017).

1.3.5. Meme Kanseri Alt Tiplerinin Moleküler Sınıflandırması

Meme kanseri, gen ekspresyon profiline göre luminal A, luminal B, HER2 ile zenginleştirilmiş, bazal benzeri ve normal benzeri olmak üzere beş olası alt tipte sınıflandırılmıştır (Şekil 1.3).



Şekil 1. 3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması (Perou ve ark., 2000; Sorlie ve ark., 2001; Sorlie ve ark., 2003).

Bu alt tipler çoğunlukla hormon reseptörü ve HER2 durumu ile ilişkilidir ve luminal tümörlerinin daha ileri sınıflandırması proliferasyona dayanmaktadır. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %80'inde ER pozitif ve yaklaşık %65'i PR pozitifdir. Bu meme kanserine özgü alt tiplerin her biri, moleküler düzeyde temel farklılıklara ve hastalığın ilerlemesi, prognozu ve terapötik hedefler için farklı risk faktörlerine sahiptir (Sotiriou ve

Pusztai, 2009; Weigelt, Baehner ve Reis-Filho, 2010; Sørli ve ark., 2003; Dai ve ark., 2015).

- 1) Luminal A alt tipi, genellikle pozitif ER ve / veya PR, HER2-negatif ve düşük Ki67 seviyesini ifade etmektedir. Bu alt tip en yaygın olanıdır ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %50'sini oluşturur. Genel olarak, luminal A meme kanserleri yavaş büyüyen ve daha az agresif, düşük dereceli, düşük nüklü, en iyi prognozludur ve 5 yıllık sağkalım oranı %94'tür (Polyak, 2007).
- 2) Luminal B alt tipi, ER-pozitif ve / veya PR-pozitif, HER2-pozitif veya negatif ve daha yüksek Ki-67 seviyelerini ifade etmektedir (Morris ve Carey, 2007). Bu alt tip, tüm meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturmaktadır. Luminal A alt tipine kıyasla daha yüksek proliferasyon oranına, yüksek rekürrense ve önemli ölçüde daha kötü prognoza sahiptirler ve 5 yıllık hayatta kalma oranı ise yaklaşık %90'dır.
- 3) HER2 ile zenginleştirilmiş meme kanserleri, ER negatif, PR negatif, HER2'nin yüksek ekspresyonu ve proliferasyon gen kümeleri, lüminal ve bazal kümelerin düşük ekspresyonu olarak adlandırılır. Bu alt tip, tüm meme kanserlerinin % 10-20'sini oluşturur ve lümen tümörlerinden daha hızlı büyüme ve yayılma eğilimindedir. Bunların yüksek dereceli lenf nodu pozitif olma olasılığı daha yüksektir ve daha kötü bir prognoz taşır. HER2 ile zenginleştirilmiş meme kanserinin beş yıllık sağkalım oranı yaklaşık %83'tür (Polyak, 2007).
- 4) Bazal benzeri veya üçlü negatif meme kanserleri (TNBC) ER-negatif, PR-negatif, HER2-negatiftir ve sıklıkla EGFR, keratinler ve proliferasyon ile ilişkili genler gibi aşırı ifade edilen bazal belirteçlerdir (Perou ve ark., 2000). Klinik olarak, bazal benzeri tümörleri olan hasta grubunun prognozu çok kötüdür ve halen hedefe yönelik bir tedavi bulunmamaktadır. TNBC / bazal benzeri meme kanserlerinin spektrumu geniştir ve medüller özelliklere sahip karsinomları ve BRCA1 ile ilişkili meme kanserlerini içerir (Rakha ve ark., 2010; Valentin ve ark., 2012). Beş yıllık bazal kanser sağkalım oranı yaklaşık %76'dır (Dai ve ark., 2015).

- 5) Normal benzeri meme kanserleri, ER ve / veya PR, HER2-negatif ve düşük Ki-67 ifade eden luminal A tipi gibidir. Normal benzeri tümörler, lenf düğümü negatif kohorttaki tüm meme kanserinin yaklaşık %7,8'ini oluşturmaktadır (Smid, 2008). Bu alt tipin prognozu iyidir, ancak lümen A meme kanserleri ile karşılaştırıldığında daha kötüdür.
- 6) Alt tiplerin belirlenmesinden sonra, klaudin-düşük, moleküler apokrin ve interferon ile ilgili gruplar dahil olmak üzere başka alt tipler tanımlanmıştır. Claudin-low kümesi, lüminal belirteçlerinin az ya da hiç ifadesi, epitelden mezenkime geçiş belirteçleri için zenginleşme, bağışıklık tepkisi genleri ve kanser kök hücresi benzeri özellikler ile karakterizedir. Claudin-low tümörler genellikle üçlü negatiftir ve bu grup metaplastik karsinom ve medüller benzeri farklılaşmaya sahip tümörler için zenginleştirilmiştir. Sağkalım oranları, luminal ve bazal benzeri tümörler için orta düzeydedir (Prat ve ark., 2010).

1.4. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanseri yönetimine multidisipliner yaklaşım, meme dokusunun cerrahi rezeksiyonuna ve patolojik değerlendirmesine ve ardından lokal nüks riskini azaltmak için radyasyon terapisine ve / veya uzak metastatik hastalık riskini azaltmak için sistemik tedaviye yol açabilen, saptama ve tarama için tanısal görüntülemeyi içermektedir. Ek olarak, sağlıklı kadınlarda meme kanseri risk faktörlerinin değerlendirilmesi, artan klinik ve radyografik izleme veya profilaktik ameliyatlara veya ilaç uygulaması ile meme kanserinin önlenmesi yoluyla erken tanıdan fayda sağlayabilecek yüksek riskli hastaları belirlemektedir.

Meme kanseri riski yüksek olmayan kadınlarda 40 yaşından itibaren mamografi ile meme kanseri taraması önerilmektedir. Önemli aile geçmişi veya bilinen kalıtsal kanser sendromlarına sahip olanlar gibi meme kanseri geliştirme riski yüksek olan kadınlara, daha erken yaşlarda tarama önerilebilir ve manyetik rezonans görüntüleme gibi daha hassas görüntüleme tekniklerinden yararlanılabilir. Meme kanseri teşhisi doğrulandıktan sonra tedavi, hastalığın evresine ve reseptör durumu ve tümör derecesi gibi patolojik özelliklere bağlıdır. Hastalık evresi, tümör boyutu, ilgili lenf düğümlerinin sayısı ve konumu ve uzak

metastatik hastalığın varlığı veya yokluğu ile belirlenmektedir (Moulder ve Hortobagyi, 2008).

1.4.1. Ameliyat

Meme kanseri tedavisi için birincil seçenek genellikle büyük tümör kitlesini tamamen ortadan kaldırmak amacıyla ameliyat işlemini içermektedir. Meme kanseri hastalarında başlangıçta meme koruyucu ve rekonstrüksiyon ameliyatları, lenf nodu diseksiyonları veya mastektomi yapılmaktadır (Dhankhar ve ark., 2010). Etkili bir tedavi için tümörü küçültmek ve meme korumasını en üst düzeye çıkarmak için sistemik neoadjuvan tedavilerle ameliyat yapılabilir. Örneğin HER2 + vakalarında neoadjuvan tedavi olarak Pertuzumab (Perjeta) ve Trastuzumab (Herceptin) verilmektedir (Tsang ve Finn, 2012). Cerrahiyi çoğunlukla meme veya lenf düğümlerinden kaçan mikrometastatik kanser hücrelerini tamamen uzaklaştırmak, genel hasta sağ kalımını artırmak ve nüks olasılığını azaltmak için radyoterapi veya kemoterapi izlemektedir (Matsen ve Neumayer, 2013).

Birkaç çalışma, BRCA1 veya BRCA2 mutasyonları olan ve olmayan meme kanserleri arasında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Örneğin, BRCA mutasyonları taşıyan kadınların, aynı memede veya karşı memede ikincil bir kanser geliştirme olasılığı daha yüksektir. Çalışmalar, BRCA1 / 2 mutasyon taşıyıcısı olan ve iki taraflı mastektomi uygulanan kadınların, tek taraflı mastektomi ile tedavi edilen kadınlara göre meme kanserinden ölme olasılığının daha düşük olduğunu gösterdiğinden, bu kadınlar için bilateral mastektomi önerilmektedir (Metcalf ve ark., 2014; Rebbeck ve ark., 2004). Hasson, Menes ve Sonnenblick (2020) tarafından yayınlanan bir çalışmada, diğer meme kanseri ile ilişkili genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda cerrahi, radyasyon ve sistemik tedavi ile ilgili klinik karar verme önerileri Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. 1. Meme kanserinde yaygın genler ve klinik öneriler (Hasson ve ark., 2020).

Gene	Ameliyat Önerileri	Radyasyon Önerileri	Sistemik Tedavi Önerileri
BRCA1/2	İki taraflı risk azaltıcı mastektomi tartışılabilir.	Endikasyon başına lumpektomi sonrası radyasyon. Diğer memeye radyasyon düşünülebilir.	Metastaz varlığında PARPi/platinyum düşünülebilir.
TP53	İki taraflı risk azaltıcı mastektomi tartışılabilir.	İkincil malignite riskinin yüksek olması nedeniyle radyasyondan kaçınma düşünülebilir.	Kemoterapiye sınırlı yanıt. Her2 durumunu kontrol edilebilir. İkincil malignite riski düşünülmelidir.
CDH1	Risk azaltıcı mastektomi için yetersiz kanıt, aile öyküsü ile yönetilebilir.		Adjuvan endokrin tedavisi tercih edilir. AKT inhibitörleri klinik çalışma çerçevesinde düşünülebilir.
PTEN	Risk azaltıcı mastektomi için yetersiz kanıt, aile öyküsü ile yönetilebilir.		PARP inhibitörleri ve AKT inhibitörleri ile klinik çalışma önerilebilir.
MSH1, MLH1, MSH6, PMS2 ve EPCAM	Risk azaltıcı mastektomi için yetersiz kanıt, aile öyküsü ile yönetilebilir.	İkincil malignite riski düşünülmelidir.	Metastaz varlığında immünoterapi düşünülebilir.
PALB2	İki taraflı risk azaltıcı mastektomi tartışılabilir.		PARPi ile klinik çalışma önerilebilir.
CHEK2	Risk azaltıcı mastektomi için yetersiz kanıt, aile öyküsü ile yönetilebilir.		
ATM	Risk azaltıcı mastektomi için yetersiz kanıt, aile öyküsü ile yönetilebilir.	Zararlı ATM hatalı varyantlarında radyasyondan kaçınılmalıdır. Risk-yarar oranı diğer varyantlarda tartışılmalıdır.	
BRIP1	Risk azaltıcı mastektomi için yetersiz kanıt, aile öyküsü ile yönetilebilir.		PARPi ile klinik çalışma önerilebilir.

1.4.2. Radyoterapi

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini öldürmek veya büyümelerini engellemek için yüksek enerjili x-ışınları veya diğer radyasyon türlerini kullanan bir kanser tedavisidir. Radyasyon tedavisinin verilme şekli tedavi edilen kanserin türüne ve evresine bağlıdır (Board, 2021a). Radyasyon tedavisi hem terapötik hem de palyatif ortamlarda meme kanserinin tedavisinde değerli bir rol oynamaktadır (Bese ve ark., 2008). Hastalığın erken evresinde, meme koruyucu cerrahi sonrası memeyi ışınlamak mastektomiye benzer onkolojik sonuçlar sunmaktadır (Fisher ve ark., 2002; Veronesi ve ark., 2002). Memeye yardımcı radyasyon, aynı taraf memede lokal nüks riskini üçte iki oranında azalmaktadır. İleri evre hastalıkta, göğüs duvarına ve bölgesel lenf düğümlerine adjuvan lokorejyonel radyasyon, hastalığa özgü genel sağkalım yararı ile birlikte lokorejyonel nüks riskini ve uzak nüks riskini azaltmaktadır (Braunstein ve ark., 2017). Bu fayda, genç yaş, düğüm pozitifliği, üçlü negatif moleküler belirteçler, lenfovasküler invazyon ve yüksek dereceli karsinom gibi risk faktörlerinin varlığında daha büyüktür (Vrieling ve ark., 2017).

1.4.3. Hormon veya Hedefe Yönelik Tedavi

Hedefe yönelik veya hormon terapisi, sırasıyla hedef protein veya hormon reseptörünün ekspresyonuna bağlı olarak meme kanseri hastaları için kullanılmaktadır (Maughan ve ark., 2010). Hormon reseptörleri pozitif ekspresyonu olan meme kanseri hastaları, bu kanserleri tetikleyebilecek hormon reseptörü sinyal yollarını engelleyen hormonal terapilerle rutin olarak tedavi edilmektedir. Bu hastalara genellikle cerrahi rezeksiyondan sonra veya birlikte alternatif olarak seçici ER bozucular ve ER modülatörleri, aromataz inhibitörleri dahil olmak üzere birkaç ilaç sınıfı verilmektedir (Puhalla, Brufsky ve Davidson, 2009; Nasrazadani ve ark., 2018).

Kemoterapi genellikle adjuvan veya neoadjuvan tedavi olarak uygulanabilir (Buchholz ve ark., 2003). Adjuvan tedaviler, birincil tedaviden sonra uygulanan neoadjuvan tedaviler ise birincil tedaviden önce verilen terapilerdir. Bu prosedür, patologların, aşağıdaki kriterlere göre rezidüel hastalığın yokluğunu veya varlığını değerlendirerek etkili tedavi hakkında düşünmesini sağlamaktadır: (i) kısmi yanıt, (ii) tam yanıt, (iii) stabil hastalık ve (iv) ilerleyen hastalık (Shahbandi ve ark., 2020).

Neoadjuvan uygulama, optimal cerrahi sonuçlar için veya tümörün in vivo yanıtını değerlendirmek için tümör boyutunun küçültülmesi gerekiyorsa tercih edilir. Bazı alt tiplerde (HER2-pozitif göğüs kanserleri ve TNBC'ler) neoadjuvan uygulama, patolojik olarak tam yanıt veren hasta sonucu ile ilişkili olduğundan ve adjuvan tedavi seçimi patolojik tam yanıt durumuna bağlı olarak farklılık gösterebileceğinden standart bakım haline gelmiştir (Harbeck ve ark., 2019). HER2 pozitif hastalarda neoadjuvan ortamda, kemoterapi ile birlikte trastuzumab ve pertuzumab ile ikili HER2 blokajı, patolojik yanıt oranlarını iyileştirir ve bu nedenle standart olarak kabul edilmektedir (Gianni ve ark., 2016). Üçlü negatif meme kanseri hastaları kötü prognozlidir ve tedavisi zordur. Genellikle DNA'yı hedefleyen platin ilacı (karboplatin) veya PARP inhibitörleri ile birlikte standart kemoterapi verilmektedir (Bayraktar ve Glück 2010; Robson ve ark., 2017).

1.4.4. Meme kanserinde DDR yolunu hedefleyen yeni terapötik yaklaşımlar

Kanserde hücre metabolizmasının oynadığı role ek olarak, metabolik sürecin düzenlenmesindeki anormallik daha yüksek seviyelerde genomik dengesizliğe, artan mutasyon oranına ve gelişmiş tümör içi heterojeniteye yol açmasından dolayı DNA hasar onarım yollarının kanser ilerlemesinde önemli olduğu iyi bilinmektedir (Burrell ve ark., 2013; Chae ve ark., 2016; Gavande ve ark., 2016; Lord ve Ashworth, 2016). Halihazırda, hücrenin metabolik durumundaki değişikliklerin DNA hasarı onarım yolları üzerinde bir etkiye sahip olduğu düşünülen üç ana mekanizma vardır: kromatin yeniden modelleme, çift sarmallı kırık (DSB) onarımı ve redoks homeostazi. Kanser biyolojisinin bu önemli yönleri arasındaki yeni bağlantıların ortaya çıkarılması, DNA onarımı eksik kanserlerde yeni hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine ve hatta PARP inhibitörleri, antrasiklinler ve platin tuzları gibi mevcut tedavilerin etkinliğinin iyileştirilmesine yol açabilmektedir (Turgeon, Perry ve Poulgiannis, 2018).

Meme kanserli hastaların prognozunu ve sağkalımını iyileştirmek için yeni ve etkili tedavi stratejileri araştırılmaktadır. Önceki çalışmalar, DNA hasarı onarım mekanizmalarının meme kanserinin oluşumu, gelişimi ve tedavi etkinliğinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Son yıllarda, bazı klinik ve klinik öncesi çalışmalar, DDR yolağı inhibitörlerinin ilerlemesiz sağkalımı veya genel sağkalımı uzatabileceğini kanıtlamıştır. DDR inhibitörleri, bozulmuş DNA onarımına katılan veya onarım proteinleriyle etkileşime giren molekülleri hedeflemek için kullanılmaktadır. Olaparib ve talazoparib gibi çeşitli

ajanlar klinik tedavi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Bazı umut vaat eden inhibitörler ayrıca klinik veya klinik öncesi çalışmalara da maruz kalmıştır (Nur Husna ve ark., 2018).

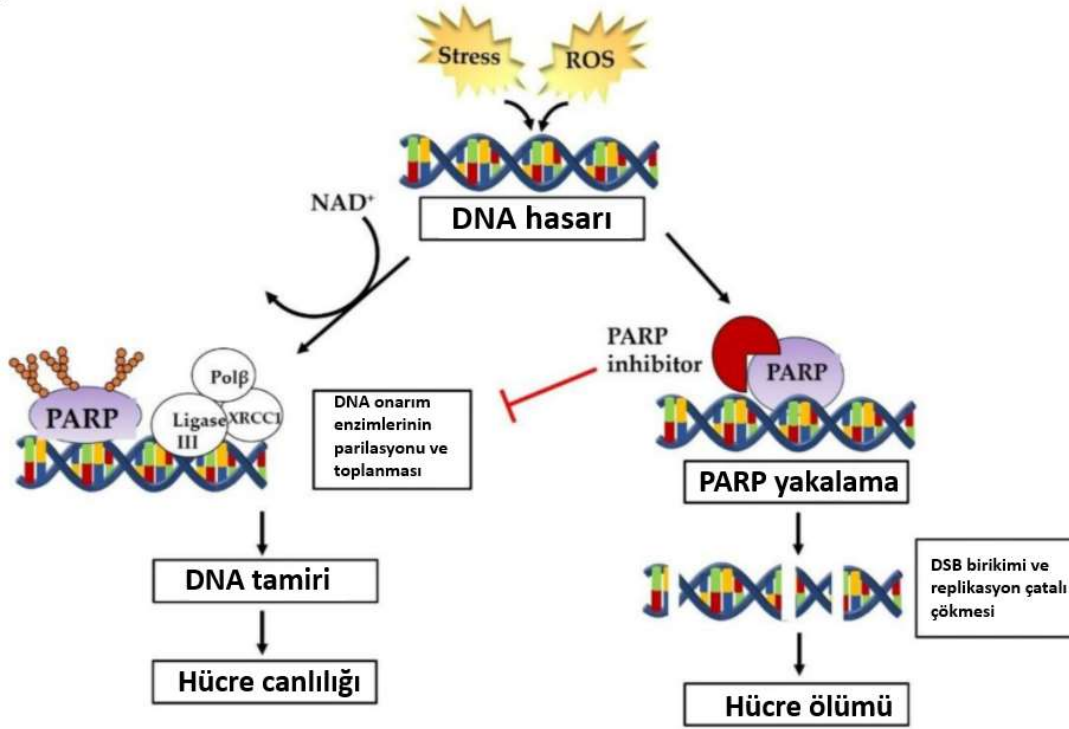
1.4.4.1. PARP inhibitörleri

Poli (ADP-riboz) polimerazlar (PARP), DNA hasar onarım mekanizmalarında önemli enzimlerdir. Genel olarak, PARP aktivasyonu, DNA hasar tepkisinin başlatıcıları aracılığıyla (PARP1-PARP3) DNA hasarı tarafından desteklenmektedir. PARP, hasar bölgelerinde DNA onarım komplekslerinin birleşimini çeken bir polimeri (ADP-riboz polimeri) sentezlemektedir (Livraghi ve Garber, 2015). PARP inhibitörleri, kromozomal istikrarsızlık, hücre döngüsü durması ve ardından apoptoz ile sonuçlanan DNA hasarının onarımını bloke ederek normalde homolog rekombinasyonla tamir edilen DNA lezyonlarının kalıcılığına yol açmaktadır.

Tümörlerde bir DNA onarım yolu kusurlu olduğunda, diğer onarım yollarının inhibisyonu sentetik letaliteye yol açabilmektedir (Faraoni ve Graziani, 2018; Amir ve ark., 2010). Sentetik letalite teorisinde, DDR yolaklarında yer alan iki spesifik genden biri işlevsiz olsa bile hücreler hayatta kalabilir. Bununla birlikte, bu genlerin her ikisi de aynı anda baskılandığında hücre ölümü indüklenebilmektedir (Sunada, Nakanishi ve Miki, 2018).

PARP ailesinin en çok ifade edilen üyesi ve nükleer lokalizasyona sahip olan PARP1, tek iplik kırıkları (SSB) ile birleşerek ve X-ışını tamiri çapraz tamamlayıcı protein 1 (XRCC1) gibi önemli onarım proteinleri ile birleşerek Baz ekzisyon onarımında (BER) önemli bir rol oynar. PARP1 inhibisyonunun, BRCA1 veya BRCA2 genlerinde mutasyon taşıyan tümörlerin tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur. Bu tümörlerde, PARP1 inhibitörleri ile tedavi üzerine SSB'lerin birikmesi, replikasyon çatallarının durmasına ve fonksiyonel BRCA1 ve / veya BRCA2 proteinlerinin yokluğunda tamir edilemeyen DSB'lerin oluşumuna yol açmakta, bu da nihayetinde yüksek düzeyde genomik dengesizliğe ve sonunda hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle, sentetik letalite kavramından yararlanarak PARP1 inhibitörleri, homolog rekombinasyon (HR) eksikliği olan kötü huylu hücreleri seçici olarak öldürmektedir (Şekil 1.4). Yetersiz BRCA1 ve / veya BRCA2'ye sahip hücreler DNA lezyonlarını onaramaz ve apoptoza uğrayamaz. Bu nedenle, BRCA1 / 2 mutasyonlarını barındıran meme kanseri hastaları, PARP-1 inhibitörleri ile tedavilerden fayda görmektedirler (Amir ve ark., 2010).

Potansiyel olarak yüksek verimli ve daha az toksik ilaçların bir sınıfı olarak PARP inhibitörü, BRCA1 / BRCA2 germ hattı mutasyonu ile ilişkili meme kanserleri için perspektif ve hedefli bir tedavi sağlar ve diğer gen mutasyonlarıyla meme kanseri için yeni bir terapötik strateji sunabilmektedir. BRCA1 ve BRCA2'nin yanı sıra PARP1 inhibitörlerine duyarlılık, RAD51, RAD54, DSS1, RPA1, NBS1, ATR, ATM, CHK1, CHK2, FANCD2, FANCA ve FANCC dahil olmak üzere diğer HR genlerinin eksikliği için de in vitro olarak gözlenmiştir. Bu bulgu, BRCA ile ilişkili kanserlerin anormal HR nedeniyle PARP1 inhibitörlerine yanıt verdiği fikrini desteklemekte ve bu tedavinin "BRCAness" özelliklerini gösteren tüm tümörler için olası bir tedavi olduğunu göstermektedir (McCaba ve ark., 2006).



Şekil 1. 4. PARP yoluna genel bakış. (Keung, Wu ve Vadgama,2019).

1.5. Ailesel Meme Kanseri

Meme kanserine yatkınlığın kalıtsal geçmişiyle ilişkili olduğu gösterilmiş olup, kalıtsal ve genetik faktörlerin meme kanseri vakalarının %27'sine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (Paradiso ve Formenti, 2011; Peto ve Mack, 2000). Özellikle birinci dereceden bir akrabada aile öyküsü olan kadınlar meme kanserine yakalanma riski altındadır; birden fazla birinci derece akrabada meme kanseri gelişmişse bu risk daha yüksektir. Aile öyküsü

olmayan kadınlarla karşılaştırıldığında, meme kanseri riski birinci derece etkilenmiş kadın akrabası olanda 1,8 kat, iki akrabası olanlarda yaklaşık 3 kat ve üç veya daha fazla akrabası etkilenen kadınlarda ise yaklaşık 4 kat daha yüksektir (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001). Etkilenen akrabaya genç yaşta teşhis konulduğunda bu risk daha da artış göstermektedir.

Meme kanseri gelişiminin anahtar faktörü, hastalığın erken başlamasıdır. Bireysel risk, meme kanseri olan etkilenen akrabalar ve hastalığın erken yaşta başlaması ile orantılı olarak artmaktadır (Lalloo ve Evans, 2012). Meme kanseri vakalarının yaklaşık %10-30'u kalıtsal faktörlere atfedilse de, bu vakaların sadece küçük bir kısmı (% 4-5) otozomal dominant bir şekilde iletilen yüksek penetran genlerdeki mutasyonlarla açıklanırken sadece % 5-10'u güçlü bir kalıtsal bileşenle tanımlanmaktadır (Claus, Risch ve Thompson, 1991; Newman ve ark., 1988; Hall ve ark., 1990; Miki ve ark., 1994). Mutasyonların meme kanserine yatkınlığı artırdığı başlıca yüksek penetranslı genler BRCA1 ve BRCA2'dir. BRCA1 ve BRCA2 germ hattı mutasyonları, kalıtsal meme kanserinin en yaygın nedenidir (Wooster ve Weber, 2003). Popülasyonda çok nadir olmasına rağmen BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, meme kanserinin ailesel kümelenmesinin yaklaşık %20'sini açıklamaktadır (Stratton ve Rahman, 2008). Bu mutasyonlara sahip kadınlarda meme kanseri riskine ilişkin tahminler değişkenlik göstermektedir; 70 yaşına gelindiğinde, BRCA1 mutasyonları olan kadınların % 44 - 78'i ve BRCA2 mutasyonları olan kadınların %31-56'sı meme kanseri geliştirmesi beklenmektedir (Antoniou ve ark., 2003; Chen ve Parmigiani, 2007).

BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarından daha az yaygın olan, farklı penetrasyon ve görülme sıklığına sahip diğer gen mutasyonları da kalıtsal meme kanseri sendromları ile ilişkili bulunmuştur. Genel olarak, bu genlerin çoğu genomik bütünlüğün ve DNA onarım mekanizmalarının korunmasında rol oynamaktadır ve birçoğu, Li-Fraumeni sendromu (TP53), Cowden sendromu (PTEN) ve Peutz-Jeghers sendromu (STK11) gibi çoklu kanser sendromları ile ilişkilidir (Vargas, Reis-Filho ve Lakhani, 2011). Bu genlerin yanı sıra DNA tamir mekanizmalarından homolog rekombinasyonda önemli görevi olan BRCA1 ve BRCA2 genleriyle ortak çalışan ATM, CHEK2, BARD1, BRIP1, MRE11, RAD50, NBN, RAD51 ve PALB2 genlerinin de meme kanserinde etkili olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Hoang ve Gilks, 2018). Tanımlanan meme kanserine yatkınlık genleri, kromozomal konumları ile birlikte ve fenotipik özellikler Tablo 1.2'de özetlenmiştir.

Tablo 1. 2. Meme kanserine yatkınlık genleri (Apostolou ve Fostira, 2013).

Sendrom	Gen veya Lokus (Kromozomal Lokasyon)	Neoplazma	Ömür Boyu Risk
Yüksek Penetranslı mutasyonlara sahip genler			
Kalıtsal meme/yumurtalık kanseri sendromu	BRCA1 (17q12-21)	Kadın meme, yumurtalık kanseri	% 40-80
	BRCA2 (13q12-13)	Erkek ve kadın meme, yumurtalık, prostat ve pankreas kanseri	% 20-85
Li-Fraumeni sendromu	TP53 (17p13.1)	Meme kanseri, sarkomlar, lösemi, beyin tümörü, adrenokortikal karsinom, akciğer kanseri	% 56-90
Cowden sendromu	PTEN (10q23.3)	Meme, tiroid, endometriyal kanser	% 25-50
Peutz-Jeghers sendromu	STK11 (19p13.3)	Meme, yumurtalık, servikal, uterin, testis, ince bağırsak ve kolon karsinomu	% 32-54
Kalıtsal mide kanseri	CDH1 (16q22.1)	Kalıtsal yaygın mide, lobüler meme, kolorektal kanser	% 60 -
Orta Penetrans Mutasyonlara Sahip Genler			
ATM ile ilişkili	ATM (11q22,3)	Meme ve yumurtalık kanserleri	% 15-20
CHEK2 ile ilişkili	CHEK2 (22q12.1)	Meme, kolorektal, yumurtalık, mesane kanserleri	% 25-37
PALB2 ile ilişkili	PALB2 (16p12.1)	Meme, pankreas, yumurtalık kanseri, erkek meme kanserleri	% 20-40
Orta riskli meme / yumurtalık kanseri	BARD1 (2q34-q35), BRIP1 (17q22-q24), MRE11A (11q21), NBN (8q21), Rad50 (5q31), RAD51C (17q25.1), XRCC2 (7q36.1), RAD51D (17q11), ABRAXAS (4q21.23)	Meme ve yumurtalık kanserleri	değişken

Dizileme teknolojilerinin evrimi, birden fazla genin paralel test edilmesini sağlayarak, yüksek veya orta penetrasyon gösteren meme kanseri yatkınlık genlerinin eşzamanlı analizine yol açmıştır. Meme kanseri kalıtsal sendromlarının belirlenmesi, etkilenen bireylere genetik danışma, test, tarama ve önleme stratejileri sunulabilmesi için büyük önem taşımaktadır (Economopoulou, Dimitriadis ve Psyri, 2015).

1.6. Sporadik Meme Kanseri

Kanser vakalarının sadece % 5-10'unu oluşturan kalıtsal meme kanserinin aksine, meme kanserinin çoğunu sporadik alt tip oluşturmaktadır (Higgins ve Baselga, 2011; Walsh ve ark., 2006; Prat ve Perou, 2011). Bu alt tip, germ hattı mutasyonları olmaksızın somatik genlerde, tamir edilmemiş edinilmiş mutasyonların artan birikimi ile gelişmiştir. Sporadik meme kanseri için risk faktörleri genellikle hormonaldir (Clemons ve Goss, 2001). Sporadik meme tümörlerinin gelişimi, genellikle onkojenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyonel olmayan inaktivasyonu ile başlatılır. Bunu diğer genlerde dört veya beş bağımsız mutasyon izler ve bu mutasyonların sırası tümör gelişiminde çok önemli değildir (Gonzalez-Angulo ve ark., 2011; Guler ve ark., 2011).

Ailesel çalışmalarda tanımlanan germ hattı değişikliklerine ek olarak, diğer birçok DNA hasarı yanıt genindeki nokta mutasyonları, kopya sayısı değişiklikleri ve kromozomal yeniden düzenlemeler, birden fazla kanser genomunun dizilenmesi yoluyla meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Sporadik kanserlerin %10 kadarının DNA hasar yanıt genleri olan ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2, PTEN and TP53 germ hattı nokta varyantlarını içerdiği bulunmuştur, ancak, bu varyantların işlevsel olarak ilgisi henüz net değildir.

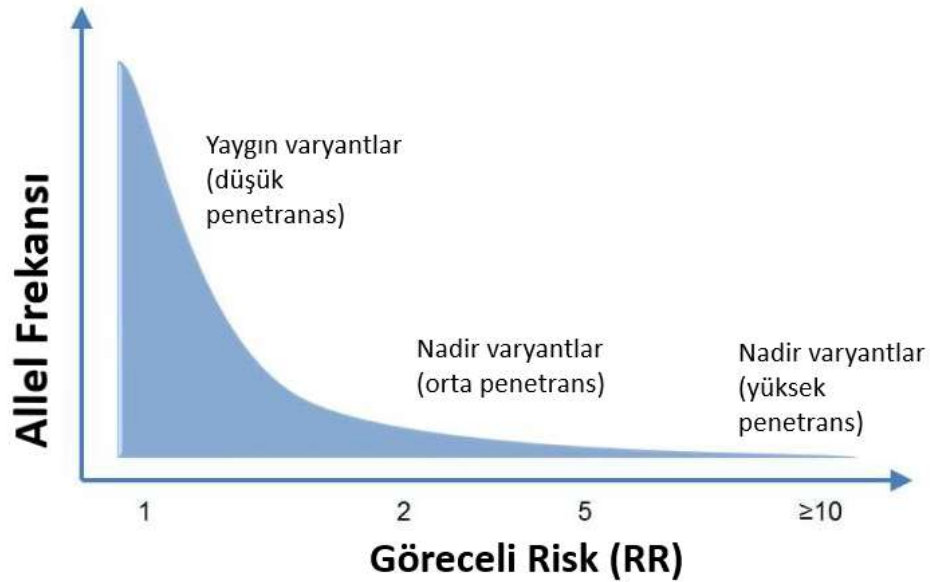
Öte yandan, aynı çalışmada kromozomal yeniden düzenlemelerin analizi ile bazı tümörlerde DNA hasar tepkisindeki fonksiyonel değişiklikler vurgulanmıştır. Örneğin, birçok üçlü negatif meme kanseri, yeniden düzenlenmiş bölgelerde ardışık kopyalar sergilerken, BRCA1 / 2 eksikliği olan tümörler bu tümörlerde alternatif kromozomal yeniden düzenleme mekanizmalarının var olduğunu düşündürmektedir (Ali ve ark., 2017).

1.7. Meme Kanseri Yatkınlık Genleri

Çeşitli yaklaşımlar, genel olarak sıklıklarına ve kazandıkları riske bağlı olarak üç gruba ayrılan risk allellere sahip meme kanserine yatkınlık genlerinin tanımlanmasına yol açmıştır. İnsan Genomu Varyasyon Topluluğu (HGVS), mutasyon yerine nötr varyant terimi kullanılmasını öneren uluslararası kabul görmüş bir isimlendirme geliştirmiştir.

Risk varyantları, yüksek penetrasyonlu çok nadir olan varyantlardan %50'ye kadar alel frekansı olan yaygın düşük riskli tek nükleotid varyantlarına kadar çoğunlukla ters orantılı bir etki göstermektedir:

- Yüksek riskli varyantlar: Minör alel frekansı <0.005 ile popülasyonda çok nadirdir. Göreceli meme kanseri riski 4'ün üzerindedir.
- Orta riskli varyantlar: Minör alel frekansı 0,005-0,01 arasında olup nadirdir. Patojenik varyantlar 2-4 göreceli risk verir.
- Düşük riskli varyantlar: Minör alel frekansı > 0.05 ve 1.5 kattan daha az meme kanseri riski vermektedir (Mavaddat ve ark., 2010; Şekil 1.5).



Şekil 1. 5. Kanser riskinin genetik yapısı (Board, 2021b).

1.7.1. Yüksek Penetrans Genler

BRCA1 ve BRCA2 gibi yüksek riskli sendromların altında yatan genler, esas olarak bağlantı analizi ve konumsal klonlama yoluyla tanımlanmıştır. Mary-Claire King ve ekibi BRCA1'i belirleme çalışmalarına başladığında, epidemiyolojik araştırmalar, etkilenen kadınların birinci derece akrabalarında, özellikle de başlangıç yaşı erken ise ve / veya iki taraflı hastalığı varsa, meme kanseri riskinin arttığını göstermiştir (Anderson, 1972). Poligenetik etkiler ve / veya çevresel faktörler gibi mekanizmalar muhtemelen meme kanserinin ailesel kümelenmesini açıklayabilir. Bununla birlikte, geniş bir aile örnekleminde yapılan bir segregasyon analizi, meme kanserinin ailesel kümelenmesinin, ailelerin % 4'ünde yüksek oranda penetran otozomal dominant duyarlılık geni ile açıklanabileceğine dair kanıt sağlamıştır (Newman ve ark., 1988). 1990'larda yapılan bağlantı çalışmaları, tümör baskılayıcı genler olan BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonların yüksek meme kanseri riskine neden olduğunun keşfedilmesine yol açmıştır (Easton ve ark., 1993; Hall ve ark., 1990; Wooster ve ark., 1994). BRCA1 ve BRCA2'ye ek olarak, diğer beş gen, iyi bilinen meme kanserine yatkınlık genleri olarak kabul edilebilir. Bunlar BRCA1, BRCA2, TP53, STK11, CD1 ve PTEN genleridir ve ailesel riskin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Wendt ve Margolin, 2019).

Tümör baskılayıcı STK11 (serin / treonin kinaz 11) , hücre döngüsü düzenlemesi ve apoptoz aracılığı için önemli bir gen ürününe sahip diğer yüksek penetrans genidir. Zararlı mutasyonlar, intestinal hamartomoz polipler ve mukokutan pigmentasyon ile karakterize Peutz-Jeghers sendromuna (PJS) neden olur (Tomlinson ve Houlston, 1997). Bu mutasyonlar, meme karsinomları için yaklaşık %20'lik bir riskle bağlantılıdır. Mevcut kanıtlar, PJS'li hastaların sağlıklı bireylere kıyasla %54 oranında meme kanseri geliştirme riski olduğunu göstermektedir (Zhuang ve ark., 2006). STK11 mutasyonlarının, duyarlı kişilerde meme kanserine neden olabilecek östrojen reseptör pozitifliği ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Launonen, 2005).

TP53 genindeki germ hattı mutasyonlarının Li-Fraumeni sendromunun nedeni olduğu belirtilmiştir (Malkin ve ark., 1990). Meme kanseri, bu sendromun bir özelliği olarak ortaya çıkmaktadır ve TP53 mutasyonlarının taşıyıcıları, erken başlangıçlı meme kanseri geliştirme açısından yüksek risk altındadır (Garber ve ark., 1991). Bununla birlikte, TP53 mutasyonları ile açıklanan genel popülasyonda erken başlangıçlı meme

kanserinin oranı, mutasyonlar çok nadir olduğu için küçüktür (Borresen ve ark., 1992; Sidransky ve ark., 1992; Lalloo ve ark., 2003).

Diğer yüksek penetranslı gen, bir fosfatidilinositol-3-kinazı kodlayan PTEN'dir. Anormal PTEN ekspresyonu, artan proliferasyona yol açan, değişmiş hücre döngüsü durması ve apoptoz ile sonuçlanır. PTEN'deki germline mutasyonları tüm meme kanserlerinin % 1'inden daha azını oluşturur ancak bu erken başlangıçlı tümör etkisi artmış olan bir mutasyon taşıyıcısında yaşam boyu meme kanseri riski % 25-50 olması bakımından önemlidir (Tan ve ark., 2012).

Yüksek meme kanseri riski, kalıtsal yaygın mide kanseri sendromunun nedeni olan CDH1 ile de ilişkilidir. Kesik varyantların taşıyıcıları, genç yaşta yaygın mide karsinomu açısından çok yüksek bir risk altındadır ve buna ek olarak, tahmini 6,6'lık göreceli meme kanseri riski (çoğunlukla lobüler meme kanseri) altındadır (Pharoah ve ark., 2001).

1.7.1.1. BRCA1 ve BRCA2

BRCA1 geni, 17q kromozomu üzerinde bulunan 22 kodlayıcı eksondan oluşan büyük kodlama dizilerine sahiptir (Hall ve ark., 1990; Miki ve ark., 1994). BRCA2 geni, kromozom 13q üzerinde bulunur ve 26 kodlayıcı eksondan oluşur (Ramus ve Gayther, 2009). Dünya çapında her iki genin çok sayıda mutasyonu karakterize edilmiştir. Bu genlerdeki yanlış anlam mutasyonları, intronik değişiklikler, delesyonlar, büyük yeniden düzenlemeler ve küçük çerçeve içi eklemeler gibi farklı mutasyonlar yumurtalık veya meme kanseri riskine neden olabilmektedir (Couch, Nathanson ve Offit, 2014; Tung ve Garber, 2018). BRCA1 ile ilişkili kanserler, farklı patolojik özelliklere sahiptir ve genellikle HER2, ER ve PR'nin ekspresyonunun eksikliği (üçlü negatif meme kanseri) ile karakterizedir (Fostira ve ark., 2012). BRCA2 ile ilişkili tümörler ise genellikle ER ve PR eksprese eder ve BRCA1 ile ilişkili kanserlerin aksine sporadik meme kanserlerine benzer özelliklere sahip olma eğilimindedir (Foulkes, 2006; Lakhani ve ark., 1998; Narod ve Foulkes, 2004).

BRCA genleri, DNA sentezinde transkripsiyonel düzenlenmeden sorumlu multiprotein komplekslerinin sentezi ve DNA'da meydana gelen özellikle DSB'ler ile bazı DNA hasarlarının fark edilmesi ve tamir edilmesinde görevli bakıcı tipi tümör baskılayıcı genlerdir. BRCA genlerinin işlevlerini kaybetmesi, hücrede DNA onarım mekanizmasının bozulmasına ve p53 bağımlı DNA yıkım noktasının aktive olarak hücrenin apoptoza

uğramasını durmasına neden olmaktadır. BRCA mutasyonlarının aktarımında kalıtsal ve çevresel etkenlerin rol oynadığı kabul edilmektedir (Phelan ve ark., 1996). Bu genlerde mutasyon taşıyıcılarının meme kanseri ile karşılaşma riski, BRCA mutasyonları olmayanlara göre 10-20 kat daha yüksektir (Seal ve ark., 2006).

BRCA1 ve BRCA2, kalıtsal meme kanseri gelişiminde en çok etkilenen genlerdir. Yüksek penetrasyon duyarlılığına sahip bu 2 gen, meme / yumurtalık kanserine genetik yatkınlıkta önemli bir rol oynamaktadır. BRCA1 / 2 genlerindeki germline mutasyonların, kalıtsal meme kanserine yatkınlığından sorumlu olduğu ve 70 yaşına kadar meme kanseri gelişimi için kümülatif riskin ortalama %60 oranında olduğu bildirilmiştir (Henouda ve ark., 2016). Son on yılda BRCA1 / 2 mutasyonları, bireysel genetik risk faktörlerini karakterize etmek ve meme kanserine yatkınlığı belirlemek için kullanılan ana moleküler belirteçlerdir (Rinella ve ark., 2013). Genomik teknolojideki gelişmeler, düşük ve orta penetranslı p53, PTEN, ATM, BRIP1, PALB2 ve CHEK2 dahil olmak üzere hastaların germ hattı genetik testi için meme kanserine duyarlılık gen panellerinin geliştirilmesine izin vermiştir (Zaridze, 2008).

1.7.2. Orta Derece Penetrans Genler

Yüksek penetranslı genlerin keşfedilmesinin ardından, aday genlerin araştırılması, meme kanseri riskini orta derecede artıran kalıtsal mutasyonlara neden olan genlerin keşfedilmesine yol açmıştır. Bu genler, orta derecede penetranslı genler olarak kabul edilmektedir. DNA hasar onarımındaki ATM, PALB2, CHEK2, BRIP1, RAD51C, RAD51D, BARD1, MRE11, NBN, RAD50, and FANCM genlerinde meydana gelen belirli mutasyonların heterozigot taşıyıcılarının hepsinde meme kanseri riskinin orta derecede artışına neden olduğu bildirilmiştir (Economopoulou ve ark., 2015; Stephens ve ark., 2009). Meme kanseri ile ilişkili bu genetik varyant gruplarının minör alel frekansı (MAF):0,005-0,01 ve RR:2-4 kat olup, kanser riski üzerinde orta derecede etkiye sahiptir. Bu mutasyonlar tamamen nüfuz edici olmadığından kansere yatkınlık mutasyonunu miras alan bazı aile üyeleri yaşamları boyunca kansere yakalanmayabilirler (Swift ve ark., 1987).

1.7.2.1. ATM Geni

11. kromozomun 22 ve 23. pozisyonlarında bulunan ATM geni, hücrelerin DNA hasarına tepkisinde önemli bir fonksiyonel rol oynamaktadır (Savitsky ve ark., 1995). DNA

hasar-yanıt yolağındaki anahtar faktörlerin fosforilasyonu yoluyla, DNA'da meydana gelen DSB'lerde hücresele yanıtın etkinleştirilmesinde rol oynayan PI3K ile ilişkili bir protein kinazı kodlamaktadır (Shiloh, 2006).

Her hücrede gen delesyonu ile ilişkili bir ATM kopyası barındıran bireyler, yüksek meme kanseri riski altındadır; sonradan bu genin bir kopyasını kaybeden hücreler, normal miktarda üretilen ATM proteininin yarısını sağlayabilirler, bu da DNA hasarının uygun şekilde onarılmasının önlenmesine yol açarak diğer genlerde mutasyonların meydana gelmesine neden olmaktadır (Prokopcova ve ark., 2007; Alpay ve ark., 2015). ATM mutasyonlarının heterozigot taşıyıcılarının iki kat daha yüksek meme kanseri riskine sahip olduğu tahmin edilmektedir. Giderek artan sayıda kanıt, bu riskin 50 yaşın altındaki kadınlarda artabileceğini göstermiştir (Cavaciuti ve ark., 2005; Olsen ve ark., 2001).

1.7.2.2. PALB2 Geni

PALB2, kromozom 16p12.2'de bulunan homolog rekombinasyon ve çift iplikli kırılma onarımı sırasında BRCA2 ile etkileşime giren bir proteini kodlayan Fanconi anemisi (FA) genidir. Meme ve yumurtalık kanserlerine duyarlılık kazandırmaktadır. Bol miktarda kanıt, PALB2'nin FA / HR yolu aracılığıyla DNA hasar onarımında rol oynadığını ve burada DNA'daki DSB'lerin HR yoluyla onarımını tetiklemek için bir anahtar paneli olarak rol oynadığını göstermektedir (Buisson ve ark., 2017; Nepomuceno ve ark., 2017; Sy, Huen ve Chen, 2009). PALB2 ve BRCA2 proteinleri, tümör baskılayıcılarının yanı sıra hücre büyümesinin ve hücre bölünmesinin düzenlenmesine yardımcı olabilir. PALB2'deki homozigot mutasyonlar FA ile bağlantılıyken, PALB2'deki heterozigot mutasyonlar, aile öyküsünde meme kanseri olan kadınlarda meme kanseri riskinin gelişmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2008). PALB2'deki gen mutasyonu, meme kanseri gelişme riskinin yaklaşık iki kat artmasına neden olmaktadır. Meme kanseri hastalarında PALB2 geninde yaklaşık 10 mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar, her hücrede genin tek bir kopyasında meydana gelmekte ve PALB2 proteininin anormal derecede kısa versiyonuyla sonuçlanmaktadır. Kusurlu PALB2 proteini, hasarlı DNA'yı onarmak için BRCA2 proteini ile etkili bir şekilde çalışmamaktadır (Rahman ve Thompson, 2007).

1.7.2.3. BRIP1 Geni

BRIP1, DNA hasarı olan bölgelerde BRCA1 ile ortak lokalize edilebilen ve hasarlı DNA'nın onarımına yardımcı olan BRCA1 ile etkileşimde olan gen olarak tanımlanmıştır (Cantor ve ark., 2001). BRIP1 geni, BRCA1 lokusunun yakınında 17q22.2 pozisyonunda bulunmaktadır. Genin bir kopyasındaki mutasyon, BRIP1 proteininin işlevini bozar; bu işlev kaybı veya bu işaretin eksik olması, BRCA1 proteini ile etkileşim eksikliğine yol açarak hasarlı DNA'nın onarımının başarısız olmasına yol açabilmektedir (Seal ve ark., 2006).

Önceki araştırmalar, BRIP1 genindeki kalıtsal mutasyonun artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Pabalan, Jarjanazi ve Ozcelik, 2013; Rafnar ve ark., 2011). Ek olarak, Sean ve arkadaşları(2006), bazı ailelerde daha yüksek risk raporları olmasına rağmen, meme kanseri ailelerinde kesik mutasyonlar tespit edilmiştir. BRIP1 germline mutasyonları ayrıca yumurtalık kanseri riskinin artmasıyla da ilişkilidir. Ancak, BRIP1 genindeki germ hattı mutasyonlarının meme kanseri riskindeki etkisi hala tartışmalıdır (Weber-Lassalle ve ark., 2018).

1.7.2.4. MRE11A, RAD50 ve NBN Genleri (MRN Kompleksi)

Yüksek oranda korunan MRN, homolog rekombinasyon yoluyla DNA'daki DSB'lerin rejenerasyonunda ve homolog uç birleştirme yollarının yanı sıra telomer bakımı, DNA replikasyonu ve hücre döngüsü kontrol noktalarında da önemli rol oynayan bir kompleks olarak bilinmektedir (Seemanova, 1990). MRE11A, RAD50 ve NBN tarafından kodlanan proteinlerin dimeri, bu kompleksi oluşturmada rol oynamaktadır. Bu protein kompleksi ATM, BRCA1 ve CHEK2 proteinleri sayesinde kontrol noktası sinyali ile DNA onarımını birleştirmektedir (Heikkinen ve ark., 2006). NBN, RAD50 ve MRE11A genlerindeki germ hattı mutasyonları, düşük frekanslarda görülmesine ve popülasyona spesifik olmasına rağmen, BRCA1 ve BRCA2 olmayan ailelerin bir alt kümesinde meme kanseri duyarlılığı için yeni adaylar olarak nitelendirilebilir (Apostolou ve Fostira, 2013).

Kompleks aktivitesindeki küçük bozukluklar bile genomik bütünlük üzerinde derin etkilere sahiptir ve bu nedenle, üç bileşenin tümü resesif genetik kararsızlık bozukluklarında rol oynamıştır. Daha da önemlisi, bialelik hipomorfik NBN mutasyonları taşıyan bireyler, çeşitli kanser türlerine duyarlı olan Nijmegen breakage sendromundan (NBS) muzdariptir. Bunların yaklaşık %40'ı 21 yaşından önce malignite geliştirmektedir (Bogdanova ve ark.,

2008). NBS hastaları ve akrabalarının, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerini geliştirme riskinin arttığı bilinmektedir (Seemanova ve ark., 2007). Bugüne kadar, dokuz NBN varyantı, kanser geliştirme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir, bunlardan biri kesin olarak meme kanseriyle ilişkilendirilmiştir. NBN genindeki “657del5” mutasyonu, NBS hastalarının %90'ında ve kanser geliştiren NBN heterozigotlarının %50'sinde rol oynayan en yaygın patojenik NBN varyantıdır. “657del”5 mutasyonunun heterozigot taşıyıcıları, tahmini üç kat artmış meme kanseri riskine sahiptir ve 50 yaşın altındaki kadınlar için daha yüksek riskler vardır (Steffen ve ark., 2006).

1.7.2.5. RAD51 Geni

RAD51 homologu, sitogenetik olarak 15.1 konumunda (15q15.1) kromozom 15'in uzun kolunda bulunmaktadır (Conway ve ark., 2004). RAD51 ve RAD51 ile ilgili gen ailesi, hücre hasar algılama ve hücre döngüsü kontrol noktaları yollarında hasarlı DNA'yı onarmak için BRCA1, BRCA2 ve PALB2 ve p53 gibi bir dizi proteinle etkileşimde rol oynayan proteinleri kodlamada rol oynamaktadır (Le Calvez-Kelm ve ark., 2012; Suwaki, Klare ve Tarsounas, 2011). BRCA2 proteini, RAD51 proteinini çekirdeğin içindeki DNA'nın hasar bölgelerine taşır. RAD51'deki birçok mutasyon, meme kanseri gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Sheikh ve ark., 2015).

Rekombinasyonel DNA onarımı ve bölgesel kırılmalar için RAD51'in görevlendirilmesi, RAD51 paraloglarına bağlıdır (Vaz ve ark., 2010). RAD51C, DSB'lerin onarımının önemli bir parçası olarak kabul edilir; bialelik mutasyonları, BRCA1 / 2-negatif meme veya yumurtalık kanserli ailelerinin ~%1,3'ünde gözlenmiştir (Loveday ve ark., 2012). RAD51D patojenik mutasyonları genellikle nadirdir ve BRCA1 ve BRCA2 negatif ailelerin meme / yumurtalık probandlarının yaklaşık %0,5-0,9'una katkıda bulunmaktadır. RAD51D eksikliği, PARP inhibitörlerine duyarlı olduğundan, PARP inhibitörleri, RAD51D mutasyon taşıyıcıları için terapötik bir alternatif olarak düşünülebilir (Lalloo ve Evans., 2012; Loveday ve ark., 2011). RAD51C ve RAD51D'deki zararlı mutasyonlar, meme kanserinin üçlü negatif ve bazal alt tipleri için daha yüksek risk sağlamaktadır (Couch ve ark., 2015).

1.7.3. Meme Kanseri ile İlişkili Diğer Genler

1.7.3.1. BLM Geni

BLM geni, DNA replikasyonunda ve genomik bütünlüğün korunmasında rol oynayan önemli bir nükleer protein olan BLM helikazı kodlar. BLM, evrimsel olarak korunmuş RecQ helikaz ailesine ait bir 3 ila 5 ' DNA helikazdır (Alzahrani ve ark., 2020). BLM, bozulmamış DNA replikasyonu sırasında çatal stabilitesi için gereklidir. Polimerazın durmasına neden olan DNA hasarı veya diğer ajanların neden olduğu çatalları stabilize eder ve replikasyonun yeniden başlamasına yardımcı olmaktadır (Ralf, Hickson ve Wu, 2006). Ek olarak, HR DNA onarımında da önemli bir rol oynamaktadır (Wu ve Hickson, 2003). ATM'ye bağlı bir şekilde sinyalleşmeden sonra DNA hasarını algılar ve diğer onarım proteinlerini DNA kırılmalarının olduğu bölgeye toplar (Bischof ve ark., 2001). BLM, MSH2-MSH6 ve MLH1 gibi diğer DNA hasarı onarım proteinlerinin yanı sıra ATM, NBN ve MRE11A'yı içeren BRCA1 genom gözetim kompleksi olarak adlandırılan BRCA1 çoklu alt birim protein kompleksinin bir parçasıdır (Futaki ve Liu, 2001). BLM, RAD51, RAD51D ve FANCD1 ile etkileşim yoluyla FA yolunda rol oynamaktadır (Sahasani ve Brosh, 2012). BLM homozigot mutasyonlu hücreler (Bloom sendromlu hastalarda), yüksek oranda kardeş kromatid değişimi ve geniş yapısal yeniden düzenlemelerle karakterize edilen kromozomal kararsızlık sergilemektedir (German, Archibald ve Bloom, 1965). Homozigot durumdaki BLM mutasyonlarının, ortalama tanı yaşı yaklaşık 33 olan erken başlangıçlı meme kanserine yatkın olduğuna dair ne kanıtlar bulunmamaktadır (Cunniff ve ark., 2018).

1.7.3.2. MUTYH Geni

MUTYH geni, kromozom 1 üzerinde bulunur ve BER yolunda yer alan bir DNA glikozilazı kodlar. Homozigot ve bileşik heterozigot MUTYH mutasyonları, MUTYH ile ilişkili polipoz (MAP) için yatkınlık yaratır (Wasielewski ve ark., 2010). MAP aynı zamanda ailesel adenomatöz polipoz 2 (OMIM: 608456) olarak da bilinir. MAP'dan etkilenen bireyler, çok sayıda kolorektal adenom ve kolorektal kanser gelişimine yatkındır. MAP, etkilenen her iki MUTYH alleli ile büyük ölçüde otozomal resesif bir şekilde miras alınmaktadır. Polipozlu hastaların yaklaşık %25'inde homozigot ve bileşik heterozigot MUTYH mutasyonları tanımlanmıştır (Cheadle ve Sampson, 2007; Nielsen ve ark., 2005). Germ hattı MUTYH mutasyonları, duodenal polipler, mide kanseri, melanom, meme

kanseri, diş ve dermoid kistler ve osteomların artmış insidansı ile ilişkilendirilmiştir (Tao ve ark., 2004).

MUTYH tarafından başlatılan BER ve uyumsuzluk onarımı (MMR) yolları, fonksiyon ve eylem zamanlaması açısından ortak özellikleri paylaşmaktadır. Fonksiyonel olarak, her iki yol da DNA oksidasyonundan kaynaklanan DNA lezyonlarının onarımına katılır. Her iki yol da, DNA replikasyonunun doğruluğunu artırmak için DNA replikasyonundan hemen sonra gerçekleşir ve yeni sentezlenen DNA ipliklerini paternal olanlardan ayırt etme görevi taşır (Slupska ve ark., 1996). Gu ve meslektaşları deneylerinde, MUTYH'ın, uyumsuzluklara bağlanma ve yavru DNA zincirlerinde onarımı başlatma işlevi gören MSH2 / MSH6 (MutS α) heterodimerinde MSH6 ile doğrudan etkileşime girdiğini bulmuşlardır (Gradia, Acharya ve Fishel, 2000).

MUTYH inaktivasyonu ile ilişkili BER eksikliği, çeşitli farklı moleküler yolları etkileyen hedef genlerde somatik mutasyonların birikmesine yol açabilir ve sonuç olarak MUTYH mutasyonları ile ilişkili neoplazilerin spektrumu kolon ile sınırlı olmayabilir. Meme kanseri ile MUTYH geni arasındaki ilişki şu ana kadar net olarak tanımlanmamıştır. Vogt ve arkadaşları (2009), 691 ve 1469 meme kanseri hastaları arasında bialelik MUTYH taşıyıcı bulunmamasına rağmen, 276 MAP hastasından oluşan geniş bir kohortta meme kanseri riskinin artmasına yönelik bir eğilim bildirmiştir. Monoallelic (heterozigot) MUTYH mutasyonları, yani sadece bir ebeveynden miras alınan, Kafkas nüfusunun %1-2'sinde meydana gelen, orta derecede artmış kolorektal kanser riski ile ilişkilendirilmiştir (Win ve ark., 2011). Önceki çalışmalarda monoallelik mutasyon taşıyıcıları için mide, karaciğer ve endometriyal ve meme kanseri riskinde artış bildirilirken, diğer çalışmalar meme veya karaciğer kanseri riskinde artışa ilişkin istatistiksel kanıt bulamamıştır (Baudhin ve ark., 2006; Beiner ve ark., 2009).

1.7.3.3. SLX4 Geni

SLX4 geni, kromozom 16'da bulunur ve 1834 amino asitlik 200 kDa protein kodlar. Çinko parmak alanları ve yapısal olarak diğer BTB içeren çinko parmak proteinleriyle ilişkili bir BTB / POZ alanı içerir. DNA çift sarmal kırılmalarına yanıt olarak, stabilitesini düzenleyebilen ve / veya hücre içi DNA hasar bariyerinin bir parçası olarak aktivasyonu ile sonuçlanabilen ATM / ATR'ye bağımlı bir şekilde fosforile hale gelmektedir. SLX4 geninin

bialelik mutasyonları Fanconi Anemi Tip P'nin nedeni olarak tanımlanmıştır (Cybulski ve Howlett, 2011; Kim ve ark., 2011).

SLX4, spesifik DNA ikincil yapılarına yönelik aktivitelerini başlatmak için farklı yapıya özgü endonükleazlarla etkileşime girer. SLX4, dallanmış DNA substratlarını ve Holliday bağlantılarını çözmek için SLX1 ile etkileşime girer. Aynı zamanda uyumsuz onarım kompleksindeki MSH2 ile etkileşir. Bu nedenle SLX4, farklı DNA onarımı türleri için gerekli olan çok yönlü bir iskele proteindir (Fekairi ve ark., 2009; Svendsen ve ark.,2009).

Genom stabilitesinin korunmasında SLX4'ün önemi, SLX4'teki bi-allelük mutasyonların Fanconi anemisine neden olabileceği gerçeğiyle vurgulanmaktadır. FA, kemik iliği yetmezliği, gelişimsel bozukluklar ve kansere güçlü bir yatkınlıkla ilişkili nadir bir genetik bozukluktur. FA genleri tarafından kodlanan proteinler, DNA hasarı sinyallemesi ve onarımında çeşitli işlevleri yerine getirir. İplikler arası çapraz bağlar gibi nadir fakat zarar verici lezyonlar, DNA glikosilazları veya Fanconi anemi yolağının enzimleriyle onarılabilir. DNA onarım yollarındaki mutasyonlar, özellikle meme, yumurtalık ve bağırsak kanserleri olmak üzere tümörjenez ile ilişkilendirilmiştir (Young ve West, 2021).

1.7.3.4. BARD1 Geni

1996'da Wu ve arkadaşları, BRCA1 ile ilişkili RING domaini 1 (BARD1) olarak adlandırdıkları bir BRCA1 bağlanma ortağı proteinini keşfetmiştir. BARD1, 2q35'te 85 kb'lik bir bölgeye yayılmış 11 eksondan oluşur ve BRCA1 ile hem yapısal hem de işlevsel benzerlikleri paylaşan 777 amino asitli bir proteini kodlar. Her iki protein de, BARD1 / BRCA1 heterodimer oluşumunu kolaylaştıran bir amino terminal RING parmak motifine sahiptir. Bu da sırasıyla her iki proteini de stabilize eder ve BRCA1'in tümör baskılayıcı fonksiyonlarının ekspresyonu için gereklidir. BRCA1 RING parmak alanındaki heterodimer oluşumunu engelleyen yanlış anlam mutasyonlarının, oldukça nüfuz edici zararlı mutasyonlar olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark., 1996).

1996'daki keşfinden bu yana, BARD1 geni ve çeşitli mutasyonları, meme kanserine duyarlılık için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Meme kanseri olan 65.000'den fazla Amerikalı BRCA1 olmayan ve BRCA2 olmayan hasta (ortalama tanı yaşı 48.5) üzerinde yapılan bir çalışmada, beyaz kadınlarda BARD1'deki patojenik varyantlar, meme kanseri

riskinin önemli ölçüde artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu popülasyondaki patojenik varyantın oldukça nadir olduğu kanıtlanmıştır (Couch ve ark., 2017). BARD1'in sadece bir meme kanserine yatkınlık geni olduğu değil, aynı zamanda üçlü negatif meme kanserine (TNBC) yatkın olan bir gen olduğu da düşünülmektedir (Shimelis ve ark., 2018).

BARD1-BRCA1 heterodimeri aynı zamanda östrojen reseptörlerinin α (ER α) ubikitinasyonu ve ardından bozunmasından da sorumludur. Östrojen reseptörleri α (ER α) ve β (ER β) hücre proliferasyonundan sorumlu genleri aktive ettiğinden meme kanseri patogenezi açısından önemli bir işlevdir (Dizin ve Irminger-Finger, 2010). Meme kanserlerinin yaklaşık %70'i ER pozitifdir. ER antagonisti olan birden fazla ilacı (örn. Tamoksifen) kullanılmasına rağmen, tedavi sonrası 15 yıllık takipte bile çok sayıda relaps gözlenmektedir (Bosse ve ark., 2012). Bu problemi çözümedeki temel sınırlama, kemorezistans mekanizmalarının hala çok az anlaşılmiş olmasıdır. Bununla birlikte, pek çok hücrel mekanizma ile ilişkili olan BARD1 proteininin burada anahtar bir rol oynayabileceği görülmektedir.

1.7.3.5. MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PMS1 (MMR Genleri)

MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 uyumsuz onarım genlerindeki germ hattı mutasyonları, Lynch sendromuna yatkınlık sağlar. MLH1 (%50) ve MSH2'deki (%40) kusurlar Lynch sendromu vakalarının çoğunluğunu oluştururken MSH6 (~%7–10) ve PMS2'deki (<%5) mutasyonlar vakaların azınlığından sorumludur (Hedge ve ark., 2014).

MSH2 geni, DNA tamirinde önemli rol oynayan bir proteini yapmak için talimatlar sağlar. Bu protein, hücre bölünmesine hazırlanırken DNA replikasyonunda yapılan hataları düzeltmeye yardımcı olur. MSH2 proteini, MSH6 veya MSH3 (her biri farklı bir genden üretilir) ile birleşerek dimer adı verilen iki proteinli bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, DNA replikasyonu sırasında hataların yapıldığı DNA üzerindeki yerleri tanımlar (Mitchell ve ark., 2002). MSH2 genindeki patojenik varyantlar Lynch sendromuna veya kalıtsal polip dışı kolorektal kanser sendromuna yol açabilir. Anlamsız varyantlar, MSH2 patojenik varyantların %82'sini oluşturan MMR fonksiyon eksikliğinin en yaygın nedenidir (Peltomäki ve Vasen, 2004). MSH2 geninin mutasyonunun, Lynch sendromlu Lübnanlı bir ailede erken başlangıçlı meme kanseri gelişiminde rol oynadığını, MSH2 mutasyonunun kanser tarama programlarında dikkate alınabileceğini düşündürmektedir (Akoum ve ark.,

2009). MLH1 ve MSH2, en çok ifade edilen uyumsuzluk onarım proteinleridir ve bunların aktivasyonu, özellikle mikro uydu kararsızlığı durumunda, DNA üzerinde karmaşık patolojik sonuçlara sahiptir (Masood ve Kayani, 2013).

MLH1 geni kromozom 3q21-23'de bulunur ve protein ürünü, DNA uyumsuzluğu onarım yolunun başka bir bileşenidir ve MLH3, PMS2 veya PMS1 ile bir heterodimer oluşturduğu gösterilmiştir (Modrich,1991). MMR genleri ile ilgili çalışmalar, MSH2 veya MLH1 kaybının veya her ikisinin kaybının, meme kanserinde daha büyük tümörlerde ve daha ileri evrelerde daha sık gözlemlendiğini ortaya koymuştur (Murata ve ark., 2005).

PMS1 geni kromozom 2q31-33'te PMS2 geni ise 7p22'de bulunan diğer MMR genleri ilk olarak, biri PMS1'de bir kesik germ hattı mutasyonu taşıyan ve diğeri bir PMS2 mutasyonuna sahip olan iki Lynch sendromu hastasında tanımlanmıştır (Nicolaidis ve ark., 1994). PMS1 geninin tümör kontrolü ve ilerlemesinde nasıl rol oynadığı ve kalıtsal kansere yatkınlık riskini artırmadaki rolü tam olarak anlaşılammıştır (Silva-Fernandes ve ark., 2021). PMS2, bir C-terminal etkileşim alanı aracılığıyla MLH1 ile bir heterodimer oluşturur. Bu etkileşim, PMS2'nin in vivo stabilitesi için gereklidir (Chang ve ark., 2000). Pms2 geninin protein ürünü, DNA duplikasyonu sırasında oluşan hataları düzeltmeye yardımcı olur. Patojenik varyantları olan Lynch sendromu ailelerinin yaklaşık %2'sinde PMS2 geninde bir varyant vardır (Talseth-Palmer ve ark., 2010). Popülasyona dayalı bir çalışma, klasik Lynch sendromu ailelerinde PMS2 mutasyonlarının nadir olduğunu veya hiç olmadığını öne sürmüştür (Liu ve ark., 2001).

MSH6 geni 2. kromozomda bulunur ve gen ürünü, MutS alfa oluşturmak için MSH2 ile heterodimerize olur, bu da DNA uyumsuzluklarına bağlanır ve böylece DNA onarımını başlatır. MutS alfa bağlandığında, DNA sarmalını büker ve DNA'daki tek baz uyumsuzluklarını ve dinükleotit ekleme-silme döngülerini tanır (Iarccarino ve ark., 1998). MSH6'daki mutasyonlar , Lynch sendromlu kolorektal kanserlerin %10-20'sini ve tüm kolorektal kanserlerin %0.4'ünü oluşturur (Hampel ve ark., 2008). MSH6 ve PMS2 mutasyon taşıyıcılarının bir kısmının kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri sendromu fenotipi ile ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Espenschied ve ark., 2017). Ek olarak, Lynch sendromlu MSH6 mutasyon taşıyıcılarının meme kanseri risk artışı en fazla iki katı olduğundan ve çoğu ülke 50 yaşında meme kanseri için risk taraması sunduğundan, mevcut veriler MSH6 taşıyıcıları için mikrosatellit instabilite (MRI) ile ek önleyici tedbirleri veya

daha erken yaş taramasını doğrulamak için yetersiz olduğu da belirtilmektedir (Shah ve Guraya, 2017).

1.7.4. Düşük Penetrans Genler

Yüksek veya orta riskli genlerdeki germ hattı mutasyonları, meme kanserine genetik yatkınlıktan tek başına sorumlu değildir. Genel popülasyonda veya diğer gen mutasyonuna sahip olan bireylerde nihai risk seviyesi, bir dizi tek nükleotid polimorfizmi (SNP) veya düşük penetranslı varyantlar tarafından belirlenecektir. Ailesel göreceli riskin açıklanamayan kısmının çoğu, düşük penetranslı polimorfizmler adı verilen, riskle zayıf ilişkileri olan birçok bireysel varyantın bir kombinasyonunu içeren poligenik bir modelle açıklanabilir (Antoniou ve Easton, 2006). İnsan genomunun dizilenmesi ve genetik varyasyonun en yaygın formu olan SNP'lerin haritalanması, yaygın genetik duyarlılık faktörlerini incelemeye yönelik yaklaşımların hızlı bir şekilde evrimleşmesine olanak sağlamıştır. Bu SNP'lerin bazılarının BRCA1 ve BRCA2 için modifiye edici olarak hizmet ettiği bilinmektedir (Kelsey ve Wiencke, 1998).

Genotipleme maliyetindeki önemli düşüşlerle bağlantılı olan bu teknik ilerlemeler, araştırmacıların anahtar genlerdeki birkaç aday varyantı değerlendirmenin ötesine geçmesine, kansere giden aday yollarda yaygın genetik varyasyonun daha kapsamlı bir değerlendirmesini yapmasına ve çok büyük çalışma popülasyonunda genom çapında ilişki çalışmaları (GWAS) gerçekleştirmesine olanak sağlamıştır. Meme kanserinde aday genlerle ilgili çalışmalar, hormon metabolizması ve DNA onarımı gibi bilinen meme kanserine yol açan yollarda yer alan birkaç yüz geni değerlendirmiştir. GWAS tarafından belirlenen toplam yaygın düşük risk varyantlarının ailesel göreceli riskin %18'ini açıkladığı tahmin edilmiştir (Michailidou ve ark., 2017).

1.8. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları

Normal hücrelerdeki DNA, endojen kaynaklardan (reaktif oksijen türleri, normal metabolizmadan gelen serbest radikaller ve içsel replikasyon hataları) veya eksojen kaynaklardan (ultraviyole radyasyon, maruz kalınan kimyasallar) gelen DNA'ya zarar veren maddelere sürekli olarak maruz kalmaktadır (Dexheimer, 2013). DNA'da meydana gelen hasarların onarılamaması genomik instabiliteye neden olabilmekte ve bunun sonucunda

özellikle kanser, nörolojik anomaliler, immün yetmezlik ve erken yaşlanma gibi çeşitli hastalıklar meydana gelebilmektedir (Hoeijmakers, 2009; Iyama ve Wilson, 2013).

DNA onarım yolları, hücre metabolik durumdan ve tümör mikro çevresindeki besin mevcudiyetinden etkilenebilirken, DNA hasarının dışsal ve içsel genotoksik stres nedeniyle birikmesi veya eksik DNA hasar onarımı da hücre metabolizmasının yeniden yapılanmasına neden olmaktadır. Hücreler, bu genotoksik stresi gözlemek ve genetik bilginin sonraki nesillere doğru bir şekilde iletilmesini sağlamak için DNA hasar yanıtı (DDR) yolunu geliştirmiştir. Böylece DDR, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurabilmekte, DNA onarım mekanizmalarını tetikleyebilmekte veya DNA hasarı onarılamadığında programlanmış hücre ölümünü tetikleyebilmektedir (Marechal ve Zou, 2013). DDR sistemleri, tümör oluşumunun önlenmesi için kritik öneme sahiptir. DDR genlerinin ekspresyonundaki kusurlar ve genomik istikrarsızlık, yüksek bir meme kanseri riski ile ilişkilidir ve meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesinin önemli bir nedenidir (Majidinia ve Yousefi, 2017; Kwei ve ark., 2010).

Başlıca DNA onarım yolları arasında nükleotid kesip çıkarma onarımı (NER), BER, MMR, HR onarımı ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yer almaktadır (Konecny ve Kristeleit, 2016). DNA onarım sürecinin koordinasyonu organizmanın gelişmesi ve sağ kalımında önemli bir rol oynamaktadır (Ciccio ve Elledge, 2010).

DNA onarım yolları, farklı DNA hasar türlerini onarmak için bağımsız veya koordineli olarak çalışabilir. DSB'ler ağırlıklı olarak NHEJ veya HR ile onarılır. HR, onarım için bir şablon olarak hizmet vermesi için hasarsız bir kardeş kromatid gerektiren hatasız bir onarım yoludur. HR ile ilgili faktörler arasında MRN kompleksi, CtIP, replikasyon proteini A (RPA), BRCA1, PALB2, BRCA2 ve RAD51 bulunur. NHEJ ve HR'ye ek olarak, alternatif bir NHEJ formu olan alt-NHEJ de DSB onarımında yer almaktadır (Dueva ve Iliakis, 2013). Klasik NHEJ'den daha yavaş bir süreç sergiler ve translokasyonların oluşumunun yanı sıra büyük silmelere ve bağlantıdaki diğer sekans değişikliklerine yol açarak ilgisiz DNA moleküllerinin birleşmesini katalize edebilir. NHEJ, iki kırık ucun doğrudan birleştirilmesinin aracılık ettiği, hataya açık bir onarım yoludur (Hartlerode ve Scully, 2009). Tek iplikli kırılmalar ve DNA'daki küçük değişiklikler, BER proteinleri kullanılarak onarılır (Dianov ve Hübscher, 2013). UV radyasyonunun neden olduğu pirimidin dimerleri gibi

hacimli DNA lezyonları, NER yolu ile işlenir. Çoğaltma hatalarının bir sonucu olarak ortaya çıkan temel uyumsuzlukları, MMR ile onarılabılır (Hsieh ve Yamane, 2008).

1.8.1. Baz Eksizyon Onarım Yolu (BER)

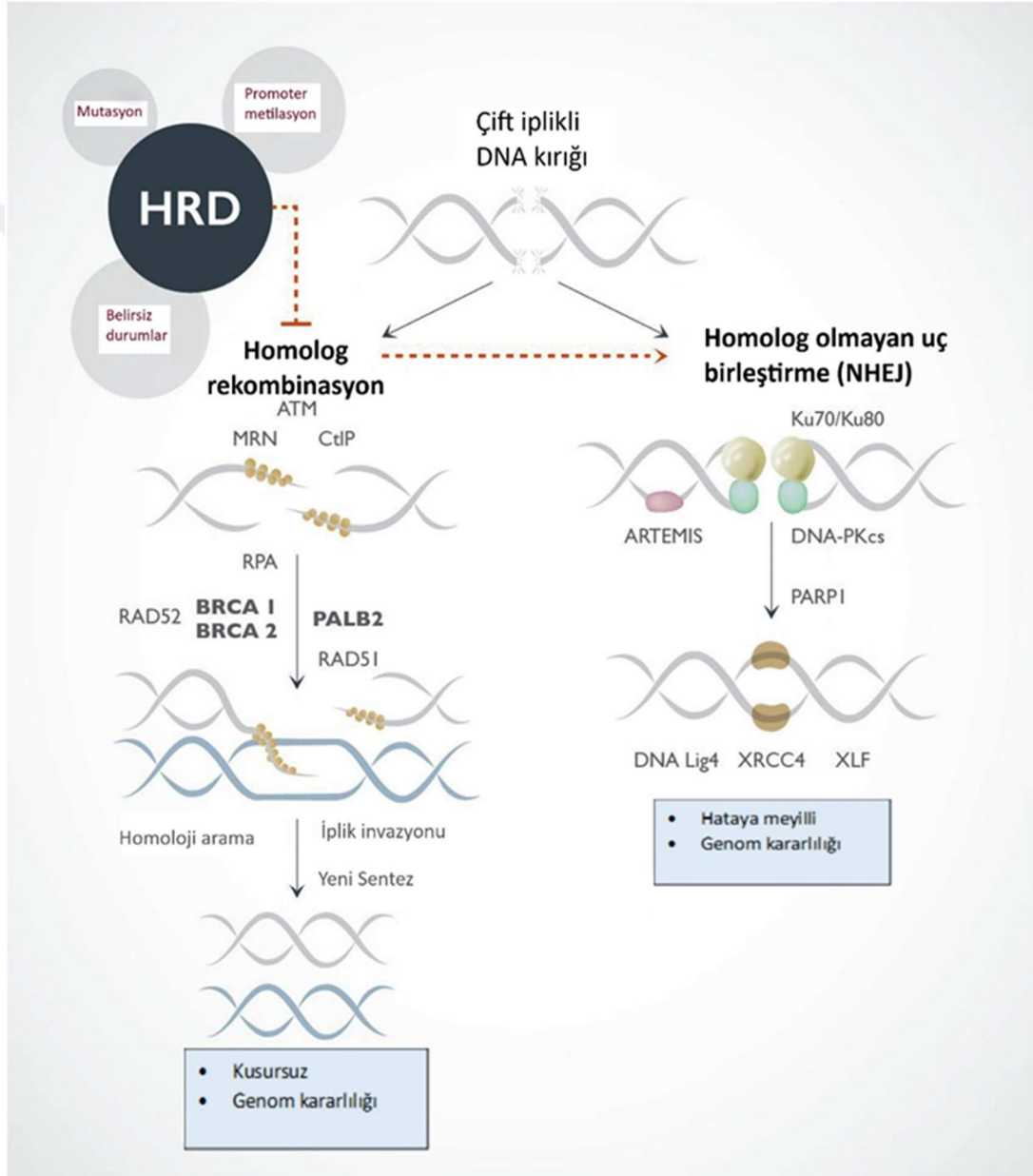
Baz eksizyon onarımı, normal metabolik süreçler sırasında alkilasyon, oksidasyon ve deaminasyon olaylarının bir sonucu olarak kendiliğinden ortaya çıkan olaylar dahil olmak üzere çevresel olarak indüklenen DNA hasarını iyileştiren en önemli DNA onarım yollarından biridir (Lindahl ve Wood, 1999). BER ayrıca kimyasal kanserojenlerin neden olabileceği küçük, sarmal olmayan deforme edici lezyonların onarımından da sorumludur (Loeb ve Preston, 1986). Nükleotid eksizyon onarımı gibi diğer onarım makineleri ile karşılaştırıldığında, BER makinesinin temel bileşenleri, evrim sırasında bakterilerden insanlara hem yapısal hem de işlevsel olarak iyi korunmuştur ve BER'in genom bütünlüğünü korumada oynadığı hayati rolü vurgulamaktadır.

BER yolu, genel olarak iki aşamaya bölünebilen bir dizi iyi koordine edilmiş enzimatik olay ile işlev görür. BER'in ilk adımı, hasarlı bir bazın veya bir abazik bölgenin bir dizi spesifik DNA glikosilaz tarafından tanınması ve eksizyonudur. Bir sonraki adım, hasarlı bölgeden başlayarak bir veya birkaç nükleotidin şablona yönelik yerleştirilmesi yoluyla DNA'yı düzelteren farklı proteinlerin ardışık eylemini içerir (Wood ve ark., 2001). Epidemiyolojik çalışmalar, hem DNA glikozilaz hem de BER çekirdek protein genlerindeki SNP'leri meme kanseri dahil insan kanser riskine bağlamıştır (Goode, Ulrich ve Potter, 2002; Hao ve ark., 2004).

1.8.2. DNA Çift İplikli Kırık Onarım Yolları: HR, NHEJ

DNA çift iplik kırıkları, genetik bütünlüğün kaybıyla sonuçlanabilen kromozomal kırıklardır. Çift iplik kırılmaları; iyonize radyasyon ve genotoksik bileşenler gibi ekzojen kaynaklarla indüklenebildiği gibi hücrel metabolizmanın yan ürünleri olan reaktif oksijen türlerinin etkisiyle replikasyon, mayotik rekombinasyon ve DNA onarımı sırasında replikasyon çatalının çökmesi sonucu da meydana gelebilmektedir. İnsanda çift zincir kırıklarının tamiri iki majör mekanizma ile sağlanmaktadır: homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uç birleştirme (Iyama ve Wilson, 2013; Jeppesen, Bohr ve Stevensner, 2011; Slupphaug, Kavli ve Krokan, 2003).

Homolog rekombinasyon, kromozomal yeniden düzenleme ve hücre ölümünü tetiklemede yüksek potansiyele sahip en tehlikeli ve tehdit edici genotoksik hasarlar olan DSB lezyonlarının onarımı için yüksek doğrulukta gerçekleşen onarım mekanizmasıdır (Prakash ve ark., 2015). HR, hasarsız bir homolog şablon olarak kardeş kromatidi kullanır ve hatasız bir şekilde hasarı onararak DSB lezyonlarını ortadan kaldırır (Jasin ve Rothstein, 2013) (Şekil 1.6).



Şekil 1. 6. Homolog rekombinasyon eksikliğinin (HRD) DNA onarım mekanizması (Belli ve ark., 2019).

HR, hücre döngüsünün S ve G2 fazları sırasında çalışır ve BRCA1 ve BRCA2, MRN kompleks proteinleri (MRE11 / RAD50 / NBN), CtIP, MRE11, RAD51, ATM, H2AX, PALB2, RPA, RAD52 ve fankoni anemi yolağı proteinleri dahil olmak üzere birçok protein kullanır (Moschetta ve ark., 2016; Lupo ve Trusolino, 2014). DNA DSB'leri meydana geldiğinde, hücrelerin hasarı tanımlamak ve ardından düzeltmek için derhal yanıt vermesi gerekir. Serbest DNA uçları, MRE11, RAD50 ve NBN faktörlerinden oluşan MRN protein kompleksi tarafından hızla tespit edilir. MRN kompleksi, üç faktörün de işlev görmesini gerektirir ve MRE11, dsDNA'nın ssDNA'ya rezeksiyonunu başlatan DNA nükleaz alt birimidir (Stracker ve Petrini, 2011).

MRN kompleksi, ATM serin / treonin protein kinazı aktive ederek DNA hasarı kontrol noktası sinyalinin teşvik eder (Lavin ve ark., 2015; Paull, 2015). Rezeksiyon işlemi sonuçta BRCA2'nin ssDNA bağlayıcı protein olan RAD51'i yüklediği önemli ssDNA bölgesini açığa çıkarır. Bu, HR'de önemli bir adımdır çünkü kardeş kromatid üzerindeki bozulmamış DNA zincirinin, bir DNA polimeraz reaksiyonunda kırık ipliği uzatmak için bir şablon olarak işlev görmesine izin verir. Son olarak bir polimeraz (genellikle pol δ) tarafından DNA uzatılır ve ligasyonla süreç tamamlanır (Iyama ve Wilson, 2013; Slupphaug, 2003). Hücreler, örneğin BRCA1 veya BRCA2 eksikliği nedeniyle çalışmayan HR'ye sahip olduğunda, daha az kesin ve daha hataya açık olan NHEJ gibi diğer onarım yollarına güvenirlir. NHEJ, ek mutasyonların ve kromozomal kararsızlığın birikmesine neden olarak bir hücrenin kötü huylu dönüşüme uğrama riskini artırır (Wang ve ark., 2006; Hoeijmakers, 2001). NHEJ çift zincir kırık uçları modifiye ederek birbirine bağlar. Bu tamir sistemi ile hasarlanmamış DNA kalıbına ihtiyaç duyulmaksızın hataya meyilli olarak, birkaç nükleotid kaybı ile DNA onarımı gerçekleşmektedir.

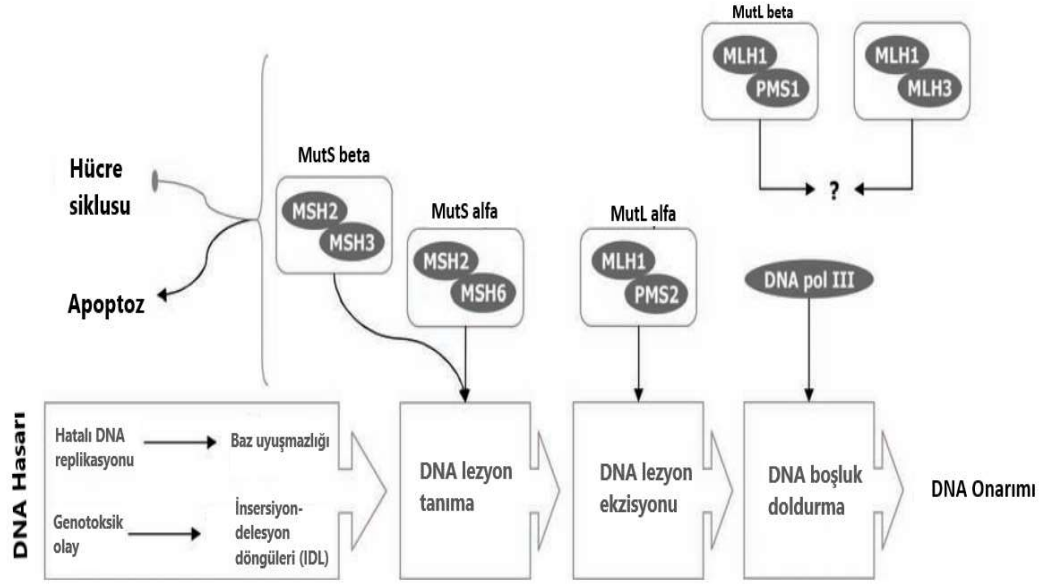
DNA onarım sisteminin bu anahtar bileşenlerinden birindeki mutasyonlar, sınırlı DNA onarım kapasitesinden sorumludur. Bu genlerden birinde mutasyon barındıran tümörler, örneğin, platin ajanlarına veya PARP inhibitörlerine daha duyarlı duruma gelir, çünkü bu bileşikler, tanınamayan ve daha sonra HR sistemi tarafından onarılamayan DNA iç ve sarmal çapraz bağlarına neden olur ve kusurlu olarak sonuçlanır. HR defektleri, BRCA1 / BRCA2 gibi HR yolunun temel bileşenlerinin hem germ hattı hem de somatik mutasyonlarından meme kanserlerinin %25-40'ında meydana gelmektedir (Akashi-Tanaka ve ark., 2015; Turner, Tutt ve Ashworth, 2004).

1.8.3. Uyumsuzluk Onarımı (MMR)

DNA uyuşmazlığı onarımı, uyuşmayan baz çiftlerinin düzeltilmesi yoluyla genom stabilitesini korumaya kritik bir şekilde katkıda bulunan, oldukça korunmuş bir DNA onarım sistemidir. Uyuşmazlıklar, diğer biyolojik süreçlerden de kaynaklanabilmesine rağmen, öncelikli olarak DNA replikasyonu sırasında hatalar olarak ortaya çıkmaktadır (Li, Pearlman ve Hsieh, 2016). Bu sistem, BER ve NER'e benzer şekilde, DNA'nın çift sarmallı olması ve aynı bilginin her iki sarmalda da mevcut olması gerçeğinden yararlanır: bir iplikçikte hasar olduğu durumlarda, hasar kesilerek (eksizyon) ve tamamlayıcı iplik şablon olarak kullanılarak sentezlenen yeni DNA ile değiştirilerek tam olarak onarılabilir (Şekil 1.7).

MMR, replikasyon hataları nedeniyle yanlış eşleşmiş nükleotitleri ortadan kaldırır ve platin bazlı kemoterapötik ajanlar gibi DNA eklentilerini onarır (Fink, Aebi ve Howell, 1998; Harfe ve Jinks-Robertson, 2000). Uyumsuz bazlar, iki ana MutS Homolog (MSH) heterodimer kompleksi tarafından tanınır: MSH2 ve MSH6 alt birimlerini içeren MutS alfa ve MSH2 ve MSH3 alt birimleri içeren MutS beta (Erie ve Weninger, 2014). İlki esas olarak tek baz çifti uyumsuzluklarını ve bir veya iki bazın küçük ekleme / silme (indel) mutasyonlarını tanımlar, ikincisi ise daha büyük indellerin tanınmasına aracılık eder (Hsieh ve Zhang, 2017). Başlangıçta, MSH kompleksi, nükleotid uyumsuzluğunu tanır, ardından MLH1 / PMS2 ve MLH1 / MLH3 kompleksleri ile etkileşimi izler. MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS1 ve PMS2 gibi çeşitli proteinler, nükleotid kesip çıkarma ve yeniden sentez sürecine katılır. MMR'de eksiklik olan tümör hücrelerinin, normal hücrelere göre mikrosatellit instabilite gösterme olasılığı daha yüksektir.

MMR yolağının önemi, yüksek derecede penetran otozomal dominant bir kanser sendromu olan kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanserde (HNPCC) belirli insan MMR genlerindeki mutasyonların tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır. Lynch sendromu olarak da bilinen HNPCC, tümörlerde yüksek MSI seviyeleri ile erken başlangıçlı kolorektal kanser ile karakterizedir. HNPCC'li bireyler, kolorektal kanser için yaklaşık % 80 yaşam boyu riske sahiptir ve ayrıca endometriyal, yumurtalık, mide ve diğer kanser türlerinin gelişimine yatkındır (Vasen ve ark., 2007).



Şekil 1. 7. Uyumsuzluk Onarımı (MMR) yolunun şeması (Mocellin ve ark., 2012).

Mevcut kanıtlar, kanserlerin çoğunun dinükleotid tekrarlarının spesifik sekans motiflerinde kararsızlık gösterdiğini göstermektedir. Bu MSI fenotipi, DNA uyumsuzluğu onarımı yolu kusurlarında yaygın olarak gözlenmektedir (Hoeijmakers, 2001). MMR genlerinde sık görülen SNP'lerin, genom stabilitesi ve bütünlüğünün korunmasındaki önemli rolleri nedeniyle meme kanseri riskine katkıda buldukları da bildirilmiştir (Ford ve ark., 2000; Murata ve ark., 2005). MSI ve / veya heterozigotluk kayıpları, 12 invaziv duktal meme kanserini hastasından alınan deri örneklerinin %83'ünde saptanmıştır, bu da MMR'nin meme kanseri duyarlılığında potansiyel bir rolünü düşündürmektedir. Ek olarak, kilit MMR genleri olan MLH1 ve MSH2'deki genetik değişikliklerin MSI gösteren sporadik meme kanserleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Moinfar ve ark., 2008).

1.9. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi

Geleneksel moleküler test yöntemleri büyük ölçüde Sanger sıralama teknolojisine dayanıyordu (Sanger, 1983). Sanger, birkaç kısa DNA fragmanını sıralamak için verimli olsa da, büyük sekans fragmanlarını sıralarken yorucu ve etkisiz bir yöntemdir. Genom dizilemedeki son gelişmeler, yeni nesil dizileme teknolojilerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Morey ve ark., 2013; Reuter, Spacek ve Snyder, 2015; Heather ve Chain, 2016). NGS teknolojisi, onkoloji gibi tıbbın birçok alanında genetik testlere klinik yaklaşımda devrim yaratmıştır. NGS teknolojisinin büyük gücü, önemli ölçüde zaman ve maliyet azaltımı

yaparak çok düşük miktarda nükleik asit kullanımı ile çok sayıda genin "durumunun" doğru bir şekilde nitelendirilmesine olanak tanıyan milyonlarca DNA okumasını dizileme yeteneğidir (Del Vecchio ve ark., 2017). Yüksek sayıda varyantı aynı anda tespit etme yeteneği sayesinde, NGS teknolojisi, tümörjenik sürecin karakterizasyonu ve tümör heterojenliği hakkında fikir vermek için birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmıştır (Kandoth ve ark., 2013, Ding ve ark., 2012). Tümörlerin moleküler mekanizmasının analizi, tanı, prognoz ve terapi yanıtı tahmini açısından klinik kullanıma ilişkin bilgi sağlayabilir. Ayrıca, NGS teknolojisi, hastalara ve ailelerine tarama, sürveyans ve risk azaltma seçenekleriyle ilgili danışmanlık yapma olasılığıyla, kansere duyarlılıktan sorumlu yeni genlerin tanımlanması ve keşfi için çok güçlü bir yöntem sağlar (Kamps ve ark., 2017).

NGS tarafından sunulan verilerin kalitesi ile birlikte uygun maliyetler, gelişmiş veri işleme yetenekleri, artırılmış hesaplama gücü ve verimli biyoinformatik analiz araçları birleştirilmesiyle NGS tabanlı genetik analiz stratejilerinin klinik teşhis ve genetik tıpta entegrasyonunu büyük ölçüde kolaylaştırmıştır (Horton ve Lucassen, 2019; Koboldt ve ark., 2013; Posey, 2019).

2. AMAÇ

Çalışmamızda meme kanseri tanısı almış ve ailevi meme kanseri yatkınlığından şüphelenilen ancak BRCA1 ve BRCA2 genlerinde herhangi bir patojenik değişim saptanmayan 96 olguda DNA hasar onarımından sorumlu olan genlerindeki mutasyon sıklıklarının belirlenmesi ile hastalığın patojenitesinin daha iyi anlaşılması ve literatüre katkıda bulunulması amaçlanmaktadır. Bu amaçla ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, MRE11A, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2, NBN, PALB2, RAD50, RAD51D, RAD51C, MUTYH, SLX4 ve BLM genlerindeki mutasyonların tespiti ve sıklığının belirlenmesi için yeni nesil dizileme yöntemi kullanılmış ve tespit edilen varyantlar ACMG klavuzuna uygun olarak patojenik (P), muhtemel patojenik (LP) ve klinik önemi bilinmeyen (VUS) şeklinde sınıflandırılarak değerlendirilmeye alınmıştır.

Türk toplumunda yapılan çalışmalar göz önüne alındığında DNA hasar onarımında rol alan genlerin meme kanseri üzerine etkisinin araştırılmasına dair yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır. Elde ettiğimiz sonuçlar, toplumumuzda meme kanseri ile ilişkili hangi genlerin ve varyantların yaygın olduğunun gösterilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmaların artması ile meme kanseri ile ilişki genlerin tanımlanması koruyucu ve önleyici tedavilerin yanı sıra bireyselleşmiş tedavi planlamasında da yol gösterici olacaktır.

3. YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Ailesel Meme Kanseri tanısı almış ve ailevi meme kanseri yatkınlığından şüphelenilen olgulardan önceki çalışmalar sonucunda BRCA1 ve BRCA2 genlerinin tüm kodlayıcı bölgelerinin dizilenmesi ile bu genlerde herhangi bir patojenik varyant saptanmayan 96 hasta çalışmamıza dahil edilmiştir.

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezinde gerçekleştirilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde herhangi bir patojenik varyant saptanmayan olgularda, DNA hasar onarımından sorumlu ve meme kanseri ile ilişkilendirilmiş ATM, BRCA1, BRCA2, BARD1, BRIP1, MRE11A, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2, NBN, PALB2, RAD50, RAD51D, RAD51C, MUTYH, SLX4 ve BLM genlerinin tüm kodlayıcı bölgeleri Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile analiz edilmiştir. Çalışmamız, 2020 tarih ve 338 proje numarası ile Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Bkz. Ek-1).

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Thermal Cyler cihazı
- Thermal Çalkalayıcı
- Santrifüj
- Vorteks
- Qubit® Florometre Cihazı
- Bioanalyzer DNA 7500 Cihazı
- Spektrofotometre (NanoDrop)

3.3. Yeni Nesil Dizileme Kit İÇeriği

- Qubit® dsDNA Broad Range Quantitation Assay Kit,
- Qubit® dsDNA High Sensitivity Quantitation Assay Kit,
- Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit,
- Library Preparation EF Kit 1, Twist Library Preparation Kit 2 (Enzimatik DNA fragmentasyonu ve adaptör ligasyonu için karışımları içerir),
- Human Core Custom Panel Multiplex Hybridization Kit (Biyotinlenmiş probelar, hibridizasyon buffer ve PCR çoğaltma primerleri içerir),
- Enrichment Reagents (Hedeflenen bölgelerin saflaştırılması ve zenginleştirilmesi için karışımları içerir),
- CD Index Adapter Set 1–96 (DNA kütüphanesinin ligasyonu için işaretlenmiş adaptörleri içerir),
- Universal Blockers (Spesifik olmayan bağlanmaları önleyen engelleyicileri içerir).
- Custom Panel Probe Kit (Dizilenmesi istenen 19 gen' e spesifik probları içerir)

3.4. DNA Örneklerinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hastalardan EDTA'lı tüp içerisine alınmış periferik kan örneklerinden daha önceki çalışmalar için “Tam Otomatik İzolasyon cihazı” kullanılarak izole edilmiş ve +4°C’ de saklanan DNA’ ların konsantrasyonlarının çalışma için yeterli olup olmadığına nanodrop (spektrofotometre) ile bakıldı. Konsantrasyonu en az 10ng/ µL olması beklenen DNA örnekleri çalışma için yeterli bulunmuştur.

3.5. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi İle İlgili Genlerin Dizilenmesi

DNA hasar onarımından sorumlu ve ailesel meme kanserleri ile ilişkili olduğu düşünülen 19 geni içeren, tüm kodlayıcı bölgeleri kapsayacak şekilde tasarlanan çoklu gen paneli kullanılarak dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir.

İş akışı aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi gerçekleştirilmiş olup hastalar çalışmaya 8’li setler halinde dahil edilmiştir. İş akışının ana basamakları Genomik DNA örneklerinin hazırlanması, kütüphane oluşturulması, kütüphane havuzunun zenginleştirilmesi ve Yeni Nesil Dizileme cihazında sekanslama, sekanslama işlemi tamamlandıktan sonra verilerin analizi ile çalışma kalitesinin tayini, hastaların klinik öyküleri doğrultusunda varyant analizi ile varyantların biyoinformatik olarak yorumlanması aşamalarından oluşmaktadır.

Tablo 3. 1. Yeni Nesil Dizileme İş Akış Şeması

		Genomik DNA Örneklerinin Hazırlanması Örnek başına 50ng DNA, hibridizasyon başına 8 örnek	
1. GÜN	Adım 1	DNA Fragmanı, Uçların Onarımı ve dA-Kuyruğu Eklenmesi dA Kuyruklu DNA Fragmanları	1 Saat
	Adım 2	İşaretli Adaptörlerin Bağlanması ve Saflaştırma İşaretlenmiş gDNA Kütüphaneleri	1 Saat
	Adım 3	PCR Amplifikasyonu, Saflaştırma ve Kalite Ölçümü Çoğaltılmış İşaretli Kütüphaneler	1 Saat
	Adım 4	Amplifiye Edilmiş İşaretli Kütüphanelerle 8'li Setler Halinde Havuz Oluşturulması İşaretli Kütüphane Havuzu	0.5 Saat
	Adım 5	Kütüphane Havuzu ile Capture Probların Hibridizasyonu Probların Hedefe Hibridizasyonu	16.5 Saat
2. GÜN	Adım 6	Hibridize Olan Hedeflerin Streptavidin Bağlama Boncukları ile Bağlanması Boncuklara Hedeflerin Yakalanması	1.5 Saat
	Adım 7	PCR Amplifikasyonu, Saflaştırma ve Kalite Ölçümü Zenginleştirilmiş Kütüphane	1 Saat
	Adım 8	Yeni Nesil Dizileme Cihazında Sekanslama Hazır Kütüphanelerin Cihazda Sekanslanması	

3.5.1. Genomik DNA Örneklerinin Hazırlanması

Genomik DNA (gDNA) örneklerinin konsantrasyonunu belirlemek için “*Qubit® dsDNA Broad Range Quantitation Assay Kit*” kullanılmıştır. Kit içerisindeki kimyasallar vorteksenerek, her bir örnek için 1 µL Qubit Reagent + 199 µL Qubit buffer olacak şekilde toplam solüsyon hazırlandı. Hazırlanan solüsyon içerisinde 198 µL çekilerek her hastaya ait hazırlanmış 0,5mL’lik ependorflara aktarılır. Üzerlerine her hasta için 2 µL DNA eklenerek vortekslendi. Kit içerisindeki standartlar aynı miktarlarda hazırlanarak cihazda

“dsDNA→High Sensitivity” modu seçildi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra önce standartlar sonra örnekler ölçülerek ng/μL cinsinden değerler kaydedildi. Çıkan sonuçlara göre DNA’lar 5 ng/ μl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltildi.

3.5.2. Kütüphane Oluşturulması

3.5.2.1. DNA Fragmentasyonu, Uçların Onarımı ve dA-Kuyruğu Eklenmesi

Fragmentasyon aşaması DNA’nın enzimatik reaksiyonlarla kesilerek çok sayıda DNA parçasına ayrılmasını içermektedir. Elde edilen DNA fragmanlarının 3’ ve 5’ uçlarında oluşan tek iplik uçlar (overhangs) temizlendikten sonra “Adaptör bağlanması” aşaması sonrasında fragmanların kendi uçları ile birleşmelerini önlemek için parçalara dA dizisi eklenmesi gerçekleştirilmektedir.

Fragmentasyon reaksiyonu için gerekli olan reaktifler “ Library Preparation EF Kit 1” ile sağlandı. Sulandırılan DNA örneklerinden 10’ar μL 0,2 mL PCR tüplerine aktarıldı. Tablo 3.2’ de yer alan hacimlerde ilgili reaktifler tüpün içerisine eklendi ve pipetaj yaparak karıştırıldı.

Tablo 3. 2. Fragmentasyon Reaksiyonu

REAKTİF	1 REAKSİYON İÇİN HACİM	8 REAKSİYON İÇİN HACİM	16 REAKSİYON İÇİN HACİM
Su	25 μL	212.5 μL	425 μL
10x Fragmentasyon Tamponu	5 μL	42.5 μL	85 μL
5x Fragmentasyon Enzimi	10 μL	85 μL	170 μL
Toplam	40 μL	340 μL	680 μL

Hazırlanan karışım Tablo 3.3’teki PCR programının kurulu olduğu Thermal Cycler cihazına yerleştirildi ve fragmentasyon programı başlatıldı.

Tablo 3. 3. Fragmantasyon PCR Programı

PCR PROGRAMI		
ADIM	SICAKLIK	ZAMAN
1. Ön soğutma	4 °C	Bekleme
2. Fragmentasyon	32 °C	22 Dakika
3. İnaktivasyon	65 °C	30 Dakika
4. Bekletme	4 °C	Bekleme

PCR programı tamamlandıktan sonra tüpler buz üzerine alınarak sonraki aşamaya geçildi. Reaksiyon sonucunda dA kuyruğu eklenmiş olan DNA fragmanları elde edilmiştir.

3.5.2.2. İşaretli Adaptörlerin Ligasyonu ve Saflaştırma

Adaptör ligasyonu aşaması, dizilenen DNA'ların sekans cihazı tarafından tanınması ve örneklerin birbirinden ayırt edilmesini sağlamak amacıyla uzunlukları belli olan DNA parçalarının uç kısımlarına adaptör denilen, dizisi ve sayısı bilinen nükleotid dizileri eklenmesi ve sonrasında manyetik boncuklar ile saflaştırılmasını içermektedir. Her örnek tüpüne farklı diziye sahip nükleotid parçaları eklendiğinden her örneğe özgü, dizisi bilinen bir DNA bölgesi oluşturularak bu bölgeler sayesinde örneklerin birbirinden ayırt edilmesi sağlanır.

Bu aşamada “Library Preparation EF Kit 1” içerisindeki reaktifler ve “CD Index Adapter Set 1–96” kiti kullanıldı. dA kuyruğu eklenmiş DNA fragmanlarını içeren tüplere 5.5 µL işaretli adaptör eklendi ve diğer reaktifler Tablo 3.4’de gösterilen hacimlerde tüplere eklenerek pipetaj ile karıştırıldı.

Tablo 3. 4. Ligasyon Reaksiyonu

REAKTİF	1 REAKSİYON İÇİN HACİM	8 REAKSİYON İÇİN HACİM	16 REAKSİYON İÇİN HACİM
Su	14.5 µL	123.3 µL	246.5 µL
DNA Ligation Buffer	20 µL	170 µL	340 µL
DNA Ligation Mix	10 µL	85 µL	170 µL
Toplam	44.5 µL	378.3 µL	756.5 µL

Karışımı içeren tüpler Thermal Cycler cihazında 20°C’ de 15 dakika boyunca inkübe edildikten sonra örneklerin saflaştırılması aşamasına geçildi.

Saflaştırma aşamasında;

1. Oda sıcaklığında bekletilen DNA saflaştırma boncukları homojen olana kadar vorteksledikten sonra örneklerin üzerine 80 µL DNA saflaştırma boncuğundan eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
2. Örnekler manyetik stand üzerine yerleştirilerek 1 dakika bekletildi. Berrak olan süpernatant pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı.
3. 200 µL taze hazırlanmış %80'lik etanol ile boncuklar yıkanarak, 1 dakika bekletildikten sonra uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
4. Manyetik stand üzerinde boncukların 5-10 dakika kuruması beklendikten sonra tüpler stand üzerinden kaldırılarak her bir tüpe 17 µL su eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. Tüpler tekrar standı yerleştirildi ve 2 dakika boncukların tamamen bir araya toplanması beklendi.
6. İşaretli adaptörlerin bağlandığı kütüphaneyi içeren süpernatant kısımdan 15 µL temiz 0,2mL' lik PCR tüplerine aktarıldı.

3.5.2.3. PCR Amplifikasyonu, Saflaştırma ve Kalite Ölçümü

Bu aşama, işaretli adaptörlerin bağlandığı DNA bölgelerinin çoğaltılması ve ortamda kalan enzim ve diğer kontaminantları uzaklaştırmak için saflaştırma işlemi uygulanması, son olarak da ele edilen fragman boylarının ve konsantrasyonunun doğruluğunun teyid edilmesinden oluşmaktadır.

PCR için gerekli olan reaktifler “Library Preparation Kit 2” ile sağlanır. Tablo 3.5’de yer alan reaktifler buz üzerinde 1,5 mL tüp içinde hazırlandı. Bir önceki basamaktaki örneklerin üzerine karışımdan 35'er µL eklendi ve pipetaj yaparak karıştırıldı.

Tablo 3. 5. PCR Amplifikasyon Reaksiyonu

REAKTİF	1 REAKSİYON İÇİN HACİM	8 REAKSİYON İÇİN HACİM	16 REAKSİYON İÇİN HACİM
Amplification Primers, ILMN	10 µL	85 µL	170 µL
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µL	212.5 µL	425 µL
Toplam	35 µL	297.5 µL	595 µL

Tablo 3.6'daki PCR programının kayıtlı olduğu Thermal Cycler cihazına tüpler yerleştirildi ve program başlatıldı.

Tablo 3. 6. PCR amplifikasyonu PCR Programı

ADIM	SICAKLIK	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
1. Başlatma	98°C	45 saniye	1
1. Denatürasyon	98°C	15 saniye	10
Bağlanma	60°C	30 saniye	
Uzama	72°C	30 saniye	
2. Son Uzama	72°C	1 Dakika	1
3. Son Bekletme	4°C	Bekleme	-

Program tamamlandıktan sonra 50 µL hacimde DNA saflaştırma boncukları kullanılarak saflaştırma aşamaları tekrarlandı. Saflaştırmanın 4. basamağında 22 µL su ile boncuklar homojenize edildikten sonra son hacim 20 µL olacak şekilde süpernatant alındı ve temiz 0,2 mL' lik PCR tüplerine aktarıldı.

“Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kiti” ve “Qubit® dsDNA Broad Range Quantitation Assay Kit” kullanarak elde edilen kütüphanenin fragman boyları ve konsantrasyonları ölçüldü ve bir sonraki aşamaya geçildi. Ortalama DNA fragman uzunluğu, 150 bp ile 1000 bp aralık ayarı kullanılarak 375 bp ile 425 bp arasında olmalıdır. Son konsantrasyon değerleri ise ≥ 80 ng / µL olmalıdır.

3.5.2.4. Kütüphane Havuzu Oluşturma ve SPRI ile Havuzunun Yoğunlaştırılması

- Tablo 3.7' deki bilgiler doğrultusunda Amplifiye edilmiş kütüphanelerin ng/ul cinsinden konsantrasyon değerleri ölçülerek 187.5'e bölündü, her bir örneğin 187,5ng için gereken µL cinsinden hacmi hesaplandı.
- Her amplifiye edilmiş kütüphaneden hesaplanan hacimde 8'li setler halinde temiz 0,2mL'lik PCR tüpüne aktarıldı. Havuzlanan kütüphanelerin toplam hacmi ≥ 25 µL ise, doğrudan bir sonraki adıma geçilir. Toplam hacmi < 25 µL ise, toplam hacmi 25 µL'ye getirmek için su eklendi.

Tablo 3. 7. Kütüphane Havuzu Oluşturma

Havuz başına işaretlenmiş kütüphane sayısı	Havuz başına işaretlenmiş her kütüphanenin miktarı	Havuz başına toplam kütle
8	187.5 ng	1500

- Havuzlanmış kütüphane hacminin 1.5X'i kadar hacimde homojenize SPRI boncukları eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Örnekler manyetik stand üzerinde 1 dakika bekletildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol ile örnekler yıkandı ve 1 dakika bekletildikten sonra etanol uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı.
- Boncuklar manyetik stand üzerinde 5-10 dakika kurutulduktan sonra stand üzerinden kaldırılarak her örnek için 25 µL Hibridizasyon karışımı eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Kütüphane havuzlarını içeren bu karışım temiz 0,2mL' lik tüplere aktarılarak hızlı bir şekilde diğer adıma geçildi.

3.5.2.5. Kütüphane Havuzu ile Capture Problemlerinin Hibridizasyonu

Hibridizasyon aşaması hedeflenen 19 gene spesifik problemlerin kütüphane havuzunda ilgili bölgelere bağlanmasından oluşmaktadır. Hibridizasyon için gerekli olan reaktifler “Human Core Exome Multiplex Hybridization Kit”, “Universal Blockers” ve “Custom Panel Probe kit” ile sağlandı. Bir önceki aşamada elde edilen ürünlerin üzerine Tablo 3.8’de yer alan reaktifler belirtilen hacimde eklendi.

Tablo 3. 8. Hibridizasyon Reaksiyonu

Reaktif	Hacim
Amplifiye edilmiş işaretli kütüphane ve SPRI boncuk karışımı	20 µL
Blocker Mix 1 (Human Cot-1 DNA;[1ug/ul]	2 µL
Blocker Mix 2	5 µL
Custom Panel Probes	4 µL
Su	4 µL
Total	40 µL

Hibridizasyon için gerekli olan PCR programı Tablo 3.9’da belirtildiği şekilde cihaza tanımlandıktan sonra örnekler yerleştirildi ve program başlatıldı.

Tablo 3. 9. Hibridizasyon PCR Programı

Adım	Sıcaklık	Zaman	Siklus sayısı
1	95°C	5 dakika	1
2	70°C	16 saat bekleme	

3.5.3. Kütüphanelerin Zenginleştirilmesi

3.5.3.1. Hibridize Olan Hedeflerin Streptavidin Boncukları İle Bağlanması

Hedef zenginleştirme aşaması, elde edilen genomik DNA’dan sekans yapılması istenilen bölgenin primer yardımı ile PCR yapılarak elde edilip çoğaltılması, saflaştırılması ve kalite kontrolünün yapılmasını içermektedir. Bu aşamada kullanılan reaktifler “Enrichment Reagents” ile sağlandı.

- Her reaksiyon için temiz 1.5mL’ lik tüp hazırlandı ve 100 µL Streptavidin boncukları eklendi.
- Üzerine 200 µL Binding Buffer eklendi ve homojenize oluncaya kadar pipetaj yapılarak karıştırıldıktan sonra manyetik stand üzerinde 1 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırılarak tüpler manyetik stand üzerinden alındı.
- Bu işlem 2 kez daha tekrarlandıktan sonra 200 µL Binding Buffer tüplere eklenerek boncuklar homojen hale gelene kadar vortekslendi.
- Hazırlanan Streptavidin boncuklu karışım 16 saat hibridizasyonda olan örneklerin üzerine eklendi ve tüpler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde çözeltiyi homojenize tutmak için karıştırıldı.
- Tüpler manyetik stand üzerine alınarak 1 dakika bekletildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüpler manyetik standdan alınarak 200 µL Wash Buffer 1 eklendi ve tüm karışım temiz bir 1.5mL’ lik tüpe aktarıldıktan sonra manyetik standda yerleştirilerek 1 dakika bekletildi.

- Süpernatant uzaklaştırılarak tüpler manyetik standdan alındı ve önceden 48°C de ısıtılmış olan 200 µL Wash Buffer 2 eklenerek 48°C de 5 dakika inkübe edildikten sonra manyetik standda alınarak süpernatant uzaklaştırıldı.
- Bu yıkama aşaması 2 kez daha tekrarlandıktan sonra 45 µL su eklenerek boncuklar homojenize olana kadar pipetaj yapıldı ve temiz tüpe aktarıldı.

3.5.3.2. PCR Amplifikasyonu, Saflaştırma ve Kalite Ölçümü

Bu aşamada kullanılan reaktifler “Enrichment Reagents” ve “Hybridization Reagents” ile sağlandı. Bir önceki basamakta elde edilen karışımdan 22,5µL 0.2ml’lik tüplere eklendi ve üzerine Tablo 3.10’da belirtilen reaktifler eklendi.

Tablo 3. 10. Hedef Zenginleştirme Reaksiyonu

Reaktif	Reaksiyon başına hacim
Streptavidin Bağlama Boncuğu karışımı	22.5 µL
Amplifikasyon primerleri, ILMN	2.5 µL
KAPA HiFi HotStart Ready Mix	25 µL
Toplam	50 µL

Thermal Cycler cihazına Tablo 3.11’deki PCR programı koşulları kaydedildi ve tüpler cihaza yerleştirildikten sonra program başlatıldı.

Tablo 3. 11. Hedef Zenginleştirme PCR Programı

Adım	Sıcaklık	Zaman	Siklus sayısı
Başlatma	98°C	45 saniye	1
Denatürasyon	98°C	15 saniye	8
Bağlanma	60°C	30 saniye	
Uzama	72°C	30 saniye	
Final Uzama	72°C	1 dakika	1
Final Bekletme	4°C	Bekleme	-

PCR programı tamamlandıktan sonra 50µL DNA saflaştırma boncuğu ile saflaştırma basamakları tekrarlandı. Son olarak 32 µL su eklenerek elüsyonu yapılan örneklerden 30 µL süpernatant çekilerek zenginleştirilmiş kütüphane yeni 0,2mL’ lik tüpe aktarıldı.

Her zenginleştirilmiş kütüphane, “Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kiti” ve “Qubit® dsDNA High Sensitivity Quantitation Assay Kit” kullanarak ölçüldü ve sonuçlar kaydedildi.

Bioanalyzer ile ölçüm sonucunda ortalama fragment uzunluğu 150 bp ile 1000 bp aralık ayarı kullanılarak 375 bp ile 425 bp arasında olmalıdır. İdeal olarak, nihai konsantrasyon değerleri ≥ 10 ng / μ L olmalıdır.

3.5.4. Yeni Nesil Dizileme Cihazında Sekanslama

8’ li setler halinde hazır olan kütüphanelerin konsantrasyon ölçümleri tamamlandıktan sonra cihazın talimatları doğrultusunda eşit konsantrasyonlarda olacak şekilde tek bir tüpte toplandı.

Dizileme reaksiyonu aşamasının gerçekleştirileceği Yeni Nesil Dizileme cihazının sarf malzemeleri hazır hale getirildikten sonra örneklerin cihaza yüklenmesi gerçekleştirildi ve sekanslama başlatıldı.

3.6. Biyoinformatik Analiz ve Varyantların Sınıflandırılması

Varyantların analizi “Genomize Seq ”platformu üzerinden gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda kaplanmış bölgelerde ortalama okuma derinliği 226,2 olup kaplanan hedef bölge ise 99,9’ dur. Hastalara ait veriler analiz edilmeden önce varyantların minimum kapsamı 5x okuma ve sıklığı $> \% 20$ olacak şekilde hedef dışı varyantlar filtrelenmiştir.

Dizileme sonucunda elde edilen verilerin analizi için varyantların yorumlanmasında kullandığımız patojenite hesaplamaya yardımcı veritabanları: ClinVar, Varsome, Franklin’dir. İn silico tahminler için Mutation Taster, SIFT, DANN, PROVEAN verileri kullanıldı ve varyantların toplumdaki sıklıkları için ExAC, GnomAD ve 1000Genome verileri kullanıldı.

Varyantlar, ACMG (Amerikan Medikal Genetik Koleji) beş aşamalı sınıflandırma sistemine göre patojenik (P), muhtemel patojenik (LP), klinik önemi bilinmeyen varyant (VUS), muhtemel iyi huylu ve iyi huylu olmak üzere beş kategoriye ayrılmıştır. Patojenik veya muhtemel patojenik varyantlar zararlı olarak kabul edilmiştir. Analiz sonucunda

muhtemel iyi huylu ve iyi huylu olarak veritabanlarında yer alan varyantlar negatif olarak kabul edilmiştir ve değerlendirmeye alınmamıştır. Yapılan toplum çalışmaları sonucunda minör alel frekansı %1'in altında olduğu belirtilen ve merkez içinde çalışılan hastalar arasındaki sıklığı az olan, Clinvar, Varsome, Franklin veritabanlarında VUS olarak bildirilmiş varyantlar değerlendirmeye alınarak VUS olarak sınıflandırılmıştır.

3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS (statistic package for social sciences, Chicago, IL, USA) 23.0 paket programı ile yapıldı. Kategorik değişkenler, mutasyon taşıyıcıları ve taşıyıcı olmayanlar arasında Pearson Chi-Square testi ve Fisher's Exact Test kullanılarak karşılaştırıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Özellikleri

Çalışmamıza 96 hasta dahil edilmiş olup bunlardan 93'ü (%96,8) kadın, 3'ü (%3,1) ise erkektir. Meme kanseri tanısı konan ve tedavi geçmişi olan hasta sayısı 59 olup bunlardan biri erkektir ve hastaların ortalama yaş aralığı 45,5'tir. Aile öyküsü ile başvuran hasta sayısı 26 (%27) olup hastalardan biri Prostat kanser tanılı erkek hasta, biri aile öyküsüne ulaşılamayan erkek hasta, bir tanesi de Kolon kanser tanılı olup hastaların ortalama yaşı 42 olarak hesaplanmıştır. Yumurtalık kanseri tanılı hasta sayısı 12 (%12,5) olup bunlardan biri aynı zamanda meme kanseri tanılıdır ve yaş ortalaması 46,7'dir. Çalışmaya dahil edilen hastaların özellikleri Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4. 1. İncelenen popülasyon özellikleri

Özellikler	Hastalar; n=96	%	Hasta Bilgilerine Ulaşılamayan	Aile Öyküsü Bilgilerine Ulaşılamayan
Cinsiyet				
Kadın	93	96,8		
Erkek	3	3,1		1
Meme kanseri tanılı ortalama yaş	45,5			
Meme kanseri tanılı hasta sayısı	59	59,3		
≤ 40 yaş	25	26	3	
> 40 yaş	34	35,4	5	1
Yumurtalık kanser tanılı hasta sayısı	12 *	12,5	3	3
Aile öyküsü ile gelen hasta sayısı	26 **	27		7
Meme kanserli aile öyküsü				
1 Meme Kanseri	19			
2 Meme Kanseri	16			
≥ 3 Meme Kanseri	5			
Diğer kanserler	34			

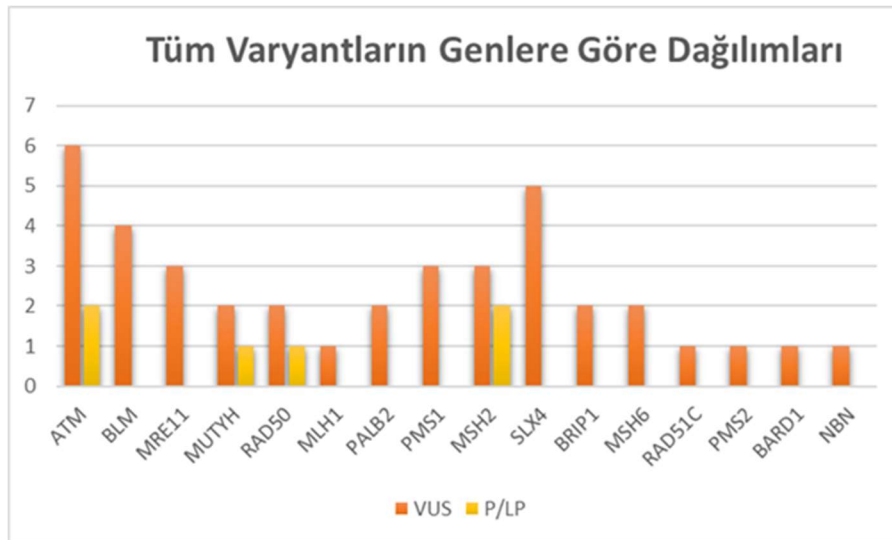
Not: * Yumurtalık kanseri tanılı hastalardan biri meme kanseri öykülü,

** Aile öyküsü ile gelen hastalardan biri Prostat Kanser öykülü, biri Kolon Kanser öykülü

4.2. Yeni Nesil Dizileme Bulguları

Çalışmaya daha önce BRCA1/2 genleri negatif olarak tespit edilmiş olan 96 hasta alındı ve 19 geni içeren panele BRCA1/2 genleri kontrol amaçlı yeniden dizilenmek üzere dahil edildi. Dizileme sonucunda BRCA genlerinde önceki çalışmalarla uyumlu olarak patojenik varyant saptanmamıştır. Çalışmaya dahil edilen 96 hastanın yeni nesil dizileme çalışması sonucunda tespit edilen, ACMG kriterlerine uygun olarak patojenik, muhtemel patojenik ve klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılan varyantlar Tablo 4.2’de listelenmiştir.

BRCA1 ve BRCA2 genleri hariç sadece RAD51D geninde zararlı veya VUS olarak sınıflandırılan varyant tespit edilmemiştir. Diğer 16 gende (ATM, BARD1, BRIP1, PALB2, MRE11A, RAD50, NBN, MSH2, MLH1, MSH6, PMS1, PMS2, RAD51C, BLM, SLX4) toplamda 46 farklı varyant saptanıp sınıflandırılmıştır. Klinik önemi bilinmeyen varyantlar bulgularımızın %86,9’unu (40/46) patojenik veya muhtemel patojenik varyantlar %13’ünü (6/46) oluşturmaktadır. Patojenik veya muhtemel patojenik mutasyonlar 96 hastanın 8’inde ATM, MSH2, RAD50 ve MUTYH genlerinde tespit edilmiştir. Patojenik veya muhtemel patojenik varyantlar, ATM geninde 2, MLH2 geninde 2, RAD50 geninde 1 ve MUTYH geninde 1 olarak tespit edilmiştir. Tüm varyantların genlere göre dağılımı Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. Patojen riskine bağlı olarak varyantların genlere göre dağılımları

Tablo 4. 2. Çalışma grubunda tespit edilen varyantlar

Gen	Lokasyon	cDNA değişikliği	Protein değişikliği	dbSNP	Değişim Sonucu	Patojenite Durumu
ATM	Ekzon 23	c.3352A>G	p.Thr1118Ala	rs572564322	Missense	VUS
ATM	Ekzon 17	c.2638G>A	p.Gly880Ser	-	Missense	Muhtemel Patojenik
ATM	Ekzon 57	c.8415G>A	p.Met2805Ile	rs1555135878	Missense	VUS
ATM	Ekzon 41	c.6025T>C	p.Tyr2009His	rs199586999	Missense	VUS
ATM	Ekzon 23	c.3382C>G	p.Gln1128Glu	rs876659825	Missense	VUS
MLH1	Ekzon 12	c.1344G>T	p.Glu448Asp	rs587779952	Missense	VUS
ATM	Ekzon 24	c.3495C>A	p.Ser1165Arg	rs878853505	Missense	VUS
SLX4	Ekzon 12	c.4569G>T	p.Glu1523Asp	rs377443183	Missense	VUS
ATM	Ekzon 47	c.6823A>G	p.Ile2275Val	rs587779857	Missense	VUS
SLX4	Ekzon 12	c.2620G>A	p.Gly874Ser	rs113420526	Missense	VUS
ATM	Ekzon 61	c.8833_8834delCT	p.Leu2945ValfsTer10	rs786203030	Çerçeve kayması-delesyon	Patojenik
SLX4	Ekzon 12	c.2347G>A	p.Val783Ile	rs771580450	Missense	VUS
BARD1	Ekzon 4	c.1032T>A	p.Ser344Arg	rs1060501293	Missense	VUS
SLX4	Ekzon 15	c.5228C>T	p.Ser1743Leu	rs144057906	Missense	VUS
SLX4	Ekzon 12	c.2675C>T	p.Ala892V	-	Missense	VUS
RAD50	Ekzon 9	c.1336A>G	p.Lys446Glu	rs149217423	Missense	VUS
RAD50	Ekzon 18	c.2840T>C	p.Ile947Thr	rs150401251	Missense	VUS
RAD50	Ekzon 4	c.412C>T	p.Arg138Ter	rs786203485	Nonsense	Patojenik
PALB2	Ekzon 4	c.892G>A	p.Val298Ile	rs1060502765	Missense	VUS
PALB2	Ekzon12	c.3306C>G	p.Ser1102Arg	rs515726112	Missense	VUS
BRIP1	Ekzon 14	c.1981T>G	p.Cys661Gly	rs876660402	Missense	VUS
BRIP1	Ekzon 5	c.446A>G	p.Asp149Gly	rs770613242	Missense	VUS
BLM	Ekzon 4	c.3179A>T	p.Asp1060Val	rs1377802274	Missense	VUS
BLM	Ekzon 10	c.2237C>T	p.Ala746Val	rs769498533	Missense	VUS
BLM	Ekzon 18	c.3427G>A	Glu1143Lys	rs140387675	Missense	VUS
MSH2	Exon 2	c.229_230delAG	p.Ser77CysfsTer4	rs63749848	Çerçeve kayması-delesyon	Patojenik
MSH2	Ekzon 15	c.2515C>T	p.His839Tyr	-	Missense	VUS
MSH2	Ekzon 12	c.1787A>G	p.Asn596Ser	rs41295288	Missense	VUS
MSH2	Ekzon 6	c.958_959dupAC	p.Thr321ProfsTer11	-	Çerçeve kayması-insersiyon	Patojenik
MSH2	Ekzon 3	c.435T>G	p.Ile145Met	rs63750124	Missense	VUS
BARD1	Ekzon 1	c.121C>T	p.Leu41Phe	rs751665426	Missense	VUS
MUTYH	Ekzon 11	c.958T>C	p.Ser320Pro		Missense	VUS
MUTYH *	Ekzon 10	c.884C>T	p.Pro295Leu	rs374950566	Missense	Muhtemel Patojenik
MUTYH	Ekzon 13	c.1258C>A	p.Leu420Met	rs144079536	Missense	VUS
BLM	Ekzon 3	c.458A>C	p.Asp153Ala		Missense	VUS

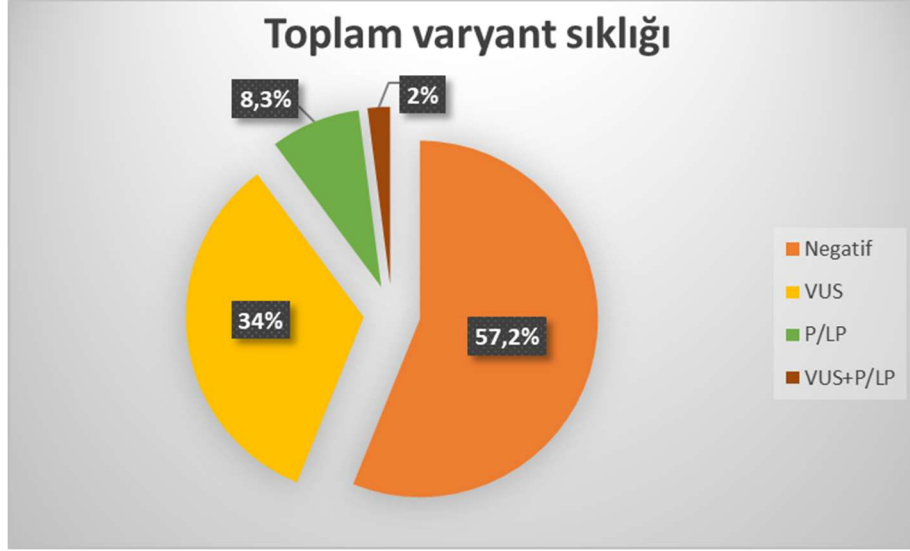
Gen	Lokasyon	cDNA değişikliği	Protein değişikliği	dbSNP	Değişim Sonucu	Patojenite Durumu
MRE11	İntron 2	c.20+92A>G	-	rs771997999	İntronik	VUS
MRE11	Ekzon 10	c.1051C>T	p.Arg351Cys	rs757492041	Missense	VUS
MRE11	Ekzon 8	c.818C>G	p.Ser273Cys	rs143400546	Missense	VUS
MSH6	Ekzon 4	c.2686A>G	p.Lys896Glu	rs1553414015	Missense	VUS
MSH6	Ekzon 4	c.1661G>A	p.Arg554His	rs730881791	Missense	VUS
PMS2	Ekzon 10	c.1240G>T	p.Asp414Tyr	rs370752614	Missense	VUS
NBN	Ekzon 12	c.1912T>C	p.Ser638Pro	rs199657566	Missense	VUS
PMS1	Ekzon 9	c.1801G>A	p.Ala601Thr	rs147450758	Missense	VUS
PMS1	Ekzon 13	c.2780A>G	p.Tyr927Cys	rs111254723	Missense	VUS
PMS1	Ekzon 3	c.224C>T	p.Thr75Ile	rs61756360	Missense	VUS
RAD51C**	Ekzon 5	c.751G>A	p.Asp251Asn	-	Missense	VUS

*: MUTYH varyantı dört hastada tespit edilmiştir.

** : RAD51C varyantı akraba olan üç hastada tespit edilmiştir.

Aile öyküsü ile başvuran 3 hastada RAD51C c.751G>A varyantı heterozigot olarak saptanmıştır. Hastalardan biri 22 yaşında diğeri 29 yaşında olan kız kardeş, diğeri ise 47 yaşında olan teyzeleridir. Teyzenin annesi ve kız kardeşi meme kanseri tanılı olup ailede akciğer kanseri öyküsü bulunmaktadır. MUTYH c.884C>T varyantı ise akrabalık ilişkisi bulunmayan 4 farklı kişide tespit edilmiştir. Bunlardan 2'si meme kanseri tanılı, 1'i yumurtalık kanseri ve 1'i de ailede meme kanseri öyküsü ile başvuran hastalardır.

Çalışmamız sonucunda hastaların %42,7'si (41/96) mutasyon taşıyıcısı olarak tanımlanmıştır. Taşıyıcıların 35'i (%36,4) en az bir tane VUS olarak tanımlanan varyanta sahipken bunlardan 2'si (%2) hem VUS hem patojenik varyant, 8'i (%8,3) patojenik veya muhtemel patojenik varyant taşımaktadır. Geri kalan 55 (%57,2) hastada 19 gende hiçbir varyant tespit edilmemiştir. Tespit edilen varyantların hasta grubuna göre sıklık yüzdeleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 2. Çalışmaya dahil edilen hastalarda varyant sıklıkları

Tüm hasta grubu karşılaştırıldığında, meme kanseri tanılı hastaların 23'ünde (%54,8), aile öyküsü ile gelen hastaların 13'ünde (%31) ve yumurtalık kanseri tanılı hastaların 6'sında (%14,3) mutasyon tespit edilmiştir. Hasta grupları arasında mutasyon durumuna göre anlamlı ilişki bulunamamıştır ($P = 0,565$) (Tablo 4.3).

Tablo 4. 3. Hasta grupları arasında mutasyon durumu

Grup	Mutasyon Taşıyan;N		Mutasyon Taşımayan;N		P
	N	%	N	%	
Toplam	41		55		0,565
Meme Kanseri Tanılı	23	54,8	36	65,5	
Aile Öyküsü ile Başvuran	13	31	13	23,6	
Yumurtalık Kanseri Öyküsü ile Başvuran	6	14,3	6	10,9	

NOT: $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir

Çalışmaya dahil edilen 96 hastadan 3'ü (3%) erkek hastadır. Bunlardan biri 63 yaşında Prostat kanser öyküsüne sahiptir ve anne ve teyzesi meme kanseri tanılı olan bu hasta ailede meme kanseri öyküsü ile başvurmuştur. Diğer 49 yaşında meme kanseri tanılı ve invaziv karsinom türüne ve lenf nodu metastazına sahip hastadır ve çalışmamız sonucunda bu iki hastada anlamlı varyant saptanmamıştır. Ailede kanser öyküsü ile başvuran bir diğer hasta 26 yaşında olup çalışmamız sonucunda MSH2 geninde c.1787A>G (p.Asn596Ser) heterozigot VUS varyantı saptanmıştır.

Meme kanseri tanıli hastaların özellikleri ile mutasyon durumu arasında ilişki olup olmadığına bakmak için ayrı değerlendirilmiştir. Meme kanseri alt tipleri ER, PR, Her2 ve Ki-67 biyobelirteçlerin durumuna göre Luminal A, B ve TNBC olarak sınıflandırılmıştır. Meme kanseri tanıli TNBC alt tipine sahip 5 (%13,9) hastada hiç varyant saptanmamıştır. Tablo 4.4’de gösterildiği gibi meme kanseri tanıli hastaların klinik özellikleri ile mutasyon durumu arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Tablo 4. 4. Meme kanseri tanıli hasta özellikleri ve mutasyon durumu

Özellikler	Mutasyon Taşıyan;N		Mutasyon Taşımayan;N		P
		%		%	
Meme Kanseri Tanılı Toplam	23	38,9	36	61	
Histolojik Sınıflandırma					0,74
İnvaziv Karsinom	10	43,5	22	61,1	
İn Sitü Karsinom	7	30,4	12	33,3	
Bilinmeyen	6	26,1	2	5,6	
Meme Kanseri Alt Tipleri					0,206
Luminal A	4	17,4	7	19,4	
Luminal B	8	34,8	11	30,6	
TNBC	0		5	13,9	
bilinmeyen	11	47,8	13	36,1	
Tümör Derecesi					0,693
1 veya 2	9	39,1	16	44,4	
3	2	8,7	3	8,3	
Bilinmeyen	12	52,2	17	47,2	
Metastaz					0,146
Negatif	7	30,4	7	19,4	
Pozitif	4	17,4	15	41,7	
Bilinmeyen	12	52,2	14	38,9	

NOT: P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir

4.2.1. Patojenik / Muhtemel Patojenik Mutasyon Saptanan Hasta Bulguları

Mutasyon saptanan 41 hastadan 8’inde (%21,9) patojenik ve/veya muhtemel patojenik varyantlar saptanmıştır. 2 (%4,8) hastada patojenik/muhtemel patojenik varyantlara ek olarak VUS olarak sınıflandırılan varyantlar da tespit edilmiştir. Hastaların özellikleri ve saptanan genlerin özeti Tablo 4.5’te gösterilmiştir.

Tablo 4. 5. Patojenik/muhtemel patojenik varyant saptanan hastaların özellikleri

Hasta	Yaş	Başvuru Nedeni	Karsinom Türü	Derece/ Metastaz	Ailede meme kanseri	Ailede diğer neoplazmlar	Biyobelirteçler	Etkilenen Gen	Mutasyon	Patojenite
1	69	Meme Ca	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Kız kardeş meme ca	YOK	Bilinmiyor	ATM	p.Gly880Ser	LP
2	48	Meme Ca	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Kız kardeş meme ca	YOK	Bilinmiyor	ATM SLX4 BARD1	p.Leu2945ValfsTer10 p.Val783Ile p.Ser344Arg	P VUS VUS
3	49	Meme Ca	İnvaziv Karsinom	2 / Lenf nou	YOK	YOK	ER, PR+, Her2-	RAD50	p.Arg138Ter	P
4	44	Over Ca	Endometrioid karsinom	3 / metastaz yok	YOK	Abla endometrium ca	Bilinmiyor	MSH2	p.Ser77CysfsTer4	P
5	39	Over Ca	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	MSH2 MUTYH	p.Thr321ProfsTer11 p.Pro295Leu	P LP
6	45	Meme Ca	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	MUTYH	p.Pro295Leu	LP
7	28	Meme Ca	İnvaziv karsinom	Bilinmiyor	YOK	Pankreas, tiroid, akciğer ca	ER, PR+, Her2-	MUTYH	p.Pro295Leu	LP
8	43	Ailede meme Ca	YOK	YOK	Anne ve Abla meme ca	Mide ca ve lenfoma	YOK	MUTYH BLM MRE11	p.Pro295Leu p.Asp153Ala c.20+92A>G	LP VUS VUS

Hasta 1:

48 yaşında kadın hasta meme kanseri tanısı olmayan sadece aile öyküsü ile başvurmuş olup hastanın aile bilgilerine ulaşılamamıştır. Dizileme sonucunda hastada saptanan ATM geni 17. ekzonda p.Gly880Ser (c.2638G>A) heterozigot varyantı Varsome veritabanında muhtemel patojenik olarak bildirilmiş olup Clinvar veritabanında bildirilmemiş ve varyanta dair toplum çalışması yapılmamıştır. Yapılan in-silico analizlerde Mutation Taster, DANN ve SIFT'e göre zararlı bir varyant olabileceği tespit edilmiştir. ACMG kriterleri göz önünde bulundurulduğunda muhtemel patojenik varyant olarak sınıflandırılabilir.

Hasta 2:

48 yaşında kadın hasta meme kanseri tanısı almış ve karsinom türü, metastaz ve tümör derecesi gibi bilgilere ulaşılamamıştır. Kız kardeşinde de meme kanseri tanısı mevcuttur. Hastada saptanan ATM geni 61. Ekzonda p.Leu2945ValfsTer10 (c.8833_8834delCT) çerçeve kayması delesyonu literatürde kalıtsal kanser sendromu ile ilişkilendirilmiştir. cDNA'da 8834. Pozisyonda meydana gelen 'CT delesyonu' sonucu 2945. pozisyondaki Lösin aminoasidi Valin'e dönüşmüş ve devamındaki dizide çerçeve kayması sonucu protein 10 aminoasit sonra erken sonlanmıştır. Bu mutasyon proteinin kinaz domaininde yer almakta ve protein stabilitesinin değişmesi sonucunda kinaz aktiitesinin kaybına yol açmaktadır. İlgili mutasyon, Varsome, Franklin ve Clinvar veritabanlarında patojenik olarak bildirilmiştir. GenomAD tarafından bildirilen toplum çalışmalarında minör allel frekansı

%0,0004 olarak bildirilmiştir. ACMG kriterleri göz önünde bulundurulduğunda ilgili varyant, patojenik olarak sınıflandırılabilir.

Hastada aynı zamanda SLX4 geninde p.Val783Ile (c.2347G>A) heterozigot varyantı ve BARD1 geninde p.Ser344Arg (c.1032T>A) heterozigot varyantı saptanmış olup bu genler Franklin ve Clinvar veritabanlarında VUS olarak tanımlanmış ve minör allel frekansı % 1'in altında bildirilmiştir.

Hasta 3:

49 yaşında meme kanseri tanısı almış kadın hasta, İnvaziv karsinom türüne sahip olup ER, PR pozitif Her2 negatif olarak tespit edilmiş moleküler alt tipi Luminal A olarak belirlenmiştir. Tümör derecesi 3 ve lenf nodu metastazı bulunan hastanın aile öyküsü bulunmamaktadır. Hastada RAD50 geni 4. Ekzonda saptanan p.Arg138Ter (c.412C>T) heteozigot mutasyonu literatürde kalıtsal kanser sendromu ile ilişkilendirilmiş stop kodonuna yol açan 'nonsense' mutasyondur. Bu mutasyon proteinin ATPaz domaininde yer almakta ve fonksiyon kaybına neden olmaktadır. İlgili varyant Varsome, Franklin ve Clinvar veritabanlarında patojenik olarak bildirilmiş olup minör allel frekansı % 0,001'dir. Yapılan in-silico analizlerde DANN ve Mutation Taster'a göre zararlı varyant olduğu tespit edilmiştir. ACMG kriterleriyle değerlendirildiğinde varyant patojenik bir değişim olarak sınıflandırılabilir.

Hasta 4:

44 yaşındaki hasta yumurtalık kanseri tanılı olup karsinom türü endometrioid karsinomdur ve aile öyküsünde endometrium yumurtalık kanserli abla ve üvey abla olmak üzere 2 kişi bulunmaktadır. İmmünohistokimya analizleri sonucunda MSH2 ve MSH6 genleri negatif olarak saptanan hasta mikrosatellit instabilitesi (MSI) açısından değerlendirilmek üzere moleküler test için yönlendirilmiştir. Hastada saptanan MSH2 geni 2. ekzonda meydana gelen p.Ser77CysfsTer4 (c.229_230delAG) çerçeve kayması delesyonu literatürde kalıtsal kanser sendromu ve meme karsinomu ile ilişkilendirilmiştir. Bu delesyon proteinin DNA bağlanma domaininde yer almaktadır. cDNA'da 230. pozisyonda meydana gelen 'AG delesyonu' sonucu 77. pozisyondaki Serin aminoasidi Sistein'e dönüşmüş ve devamındaki dizide çerçeve kayması sonucu protein 4 aminoasit sonra erken sonlanmıştır. İlgili mutasyon, Varsome, Franklin ve Clinvar veritabanlarında patojenik olarak bildirilmiş

ve varyanta dair toplum çalışması yapılmamıştır. *In silico* analizler sonucunda Mutation Taster ve SIFT'e göre zararlı olduğu tespit edilen bu varyant ACMG kriterleri göz önünde bulundurulduğunda patojenik olarak sınıflandırılabilir.

Hasta 5:

39 yaşında yumurtalık kanseri tanılı hastanın klinik bilgileri ve aile öyküsü bilgilerine ulaşılamamıştır. Hastada MSH2 geni 6. Ekzonda p.Thr321ProfsTer11 (c.958_959dupAC) çerçeve kayması insersiyonu tespit edilmiş olup ilgili varyant literatürde endometriyal kanser ile ilişkilendirilmiştir ve varyanta dair toplum çalışması yapılmamıştır. Bu varyant, proteinin DNA'ya bağlanmada kaldiraç görevi olan ve MSH6 ile etkileşim bölgesinde yer almaktadır. Varyantla ilgili in-silico tahminler bulunmamaktadır. Franklin veritabanında muhtemel patojenik ve Varsome veritabanında patojenik olarak bildirilen bu varyant ACMG kriterleri göz önünde bulundurulduğunda patojenik olarak sınıflandırılabilir.

Hastada saptanan bir diğer varyant MUTYH geni 10. Ekzonda c.884C>T (p.Pro295Leu) heterozigot olarak saptanmış olup bu varyant literatürde polipoz ve kalıtsal kansere yatkınlık sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Varsome ve Franklin veritabanlarında patojenik, Clinvar'da ise muhtemel patojenik olarak bildirilen ilgili varyanta dair yapılan toplum çalışmalarında minör alel frekansı % 0,001 olarak saptanmıştır. İn vitro fonksiyonel çalışmalar, mutasyon sonucunda DNA bağlanma aktivitesinin ve baz eksizyon onarım aktivitesinin ciddi şekilde kusurlu olduğunu göstermektedir. İlgili varyant Clinvar veritabanında farklı protein kodlaması ile de yer almaktadır (NM_001048171.1-p.Pro281Leu). İn-silico analizler sonucunda Mutation Taster, DANN ve SIFT'e göre zararlı olduğu tespit edilen bu varyant ACMG kriterleri göz önünde bulundurulduğunda muhtemel patojenik olarak sınıflandırılabilir.

Aynı MUTYH varyantı çalışma grubumuzda 3 kişide daha heterozigot olarak tespit edilmiştir. Bunlardan biri "**6 numaralı**" 45 yaşında meme kanseri tanılı hastadır ve klinik bilgileri ile aile öyküsü bilgilerine ulaşılamamıştır. Diğeri "**7 numaralı**" 28 yaşında meme kanseri tanısı almış ve karsinom türü invaziv karsinom'dur. ER, PR pozitif, Her2 negatif olduğu bilinen hastanın moleküler alt tipi Luminal A olarak belirlenmiştir. Aile öyküsünde meme kanseri yoktur ancak tiroid, pankreas ve akciğer kanseri öyküsü olan aile üyeleri bulunmaktadır.

Hasta 8:

43 yaşında meme kanseri tanısı olmayan hasta aile öyküsü ile başvurmuştur. Ailede lenfoma ve mide kanseri bulunan hastanın annesi 57 yaşında, ablası 46 yaşında meme kanseri öyküsü bulunmaktadır. MUTYH geninde muhtemel patojenik p.Pro295Leu varyantının saptandığı 4. hastadır. Bu varyanta ek olarak, BLM geni 3. Ekzonda p.Asp153Ala (c.458A>C) heterozigot varyantı ve MRE11 geni 2. İntronda c.20+92A>G heterozigot varyantı saptanmıştır. BLM varyantı Varsome ve Franklin veritabanlarında VUS olarak bildirilmiş olup varyanta dair toplum çalışması yapılmamıştır. MRE11 intronik varyantı Franklin ve Varsome'da VUS olarak bildirilmiş olup minör alel frekansı %0,001'dir. Her iki mutasyonda literatürde herhangi bir kanserle ilişkilendirilmemiş olup ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırılabilir.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, tüm dünyada kadınlarda en yaygın kanserlerden biridir ve BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar, yaygın olarak kalıtsal meme ve / veya yumurtalık kanseri sendromuna yatkınlıkla ilişkilidir (Antoniou ve ark., 2003; Chen ve Parmigiani, 2007). Bununla birlikte birkaç büyük ölçekli çalışma çoklu gen testinin, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin geleneksel testi ile gözden kaçabilecek, BRCA bulgusu olmayanlarda diğer genlerdeki potansiyel bulguları ortaya çıkaran kapsamlı bir test yöntemi olduğunu göstermiştir. Meme kanseri hastalarında yapılan bu çoklu gen çalışmaları sonucunda BRCA olmayan genlerdeki tanısal verimin çok yüksek olduğu görünmektedir, bu da BRCA1 / 2'nin ötesinde testlerin farklı meme kanseri alt türleri için daha kapsamlı bir genetik kanser risk değerlendirmesi sunduğunu göstermektedir (Singh ve ark., 2018).

DNA onarım genlerindeki kusurlar, Bloom sendromu, Ataksi Telenjiektazi ve Werner sendromu gibi nadir görülen insan kansere yatkınlık bozuklukları ile ilişkilidir. Bu nadir sendromların dışında, yetersiz DNA onarımının ailesel meme kanserinde ve bazı sporadik meme kanserlerinde predispozan bir faktör olduğu ileri sürülmektedir. DNA onarım genlerinde doğal olarak oluşan polimorfizmlerin taranmasıyla meme kanserine genetik yatkınlığın anlaşılmasında ilerlemeler sağlanmıştır. Bu çalışmalar, düşük penetranslı genlerden veya bunların kombinasyonlarından kaynaklanan DNA onarım kapasitesindeki kusurların, diğer genetik veya çevresel faktörler tarafından değiştirildiği belirlenen meme kanseri riskiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Sassi ve ark., 2013).

Birçok çalışmada, kalıtsal meme kanseri ile ilişkili genleri ve varyantları tespit etmek için çoklu gen panelleri kullanılmıştır (Castera ve ark., 2014; Kurian ve ark., 2014; Maxwell ve ark., 2015; Minion ve ark., 2015; Tung ve ark., 2016). Bu çalışmada, literatürle benzer olarak kalıtsal meme kanserine yatkınlığı olan hastalarda DNA hasar onarımından sorumlu olan ve hastalığa sebep olan varyantları belirlemek amacıyla BRCA1 ve BRCA2 genlerinde patojenik mutasyon taşımayan 96 hastada 19 gen yeni nesil dizileme yöntemi ile dizilenmiştir.

BRCA olmayan genlerde, zararlı mutasyonların %36-61'inin rapor edildiği diğer çoklu gen bazlı çalışmalara kıyasla çok daha düşük olan kohortumuzda %8,3 oranında zararlı mutasyon saptadık (Buys ve ark., 2017; Castera ve ark., 2014; Eliade ve ark., 2017; Susswein ve ark., 2016). Bu varyantlar ATM, MSH2, RAD50 ve MUTYH genlerinde tespit edilmiştir.

ATM genindeki bialelik mutasyonlar, ilerleyici serebellar ataksi, bağışıklık bozuklukları, insüline dirençli diyabet, radyosensitivite ve yüksek malignite riski ile karakterize nadir görülen otozomal resesif geçişli bir bozukluk olan Ataksi-telanjektaziye (AT) neden olmaktadır (Gatti ve ark., 1991; Su ve Swift, 2000). Meme kanseri ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda ATM geni, artık ailesel erken başlangıçlı meme kanseri olan BRCA1/2 negatif hastalarda orta derecede penetrasyonlu bir kansere yatkınlık geni olarak kabul edilmektedir (Maxwell ve ark., 2015). Crawford ve arkadaşları (2017), çalışmalarında bilateral meme kanseri öyküsü olan 99 kadından 1'inde ATM geninde patojenik varyant tespit etmiştir. Aynı zamanda ailede meme ve yumurtalık kanser öyküsü bulunan 104 hastanın 3'ünde ATM geninde patojenik varyant saptadıklarını bildirmişlerdir. Biz de popülasyon sayımızın yakın olduğu bu çalışma ile benzer olarak %2 (2/96) oranında ATM geninde patojenik/muhtemel patojenik varyant tespit ettik.

ATM heterozigot mutasyon taşıyıcılarının genel popülasyona kıyasla meme kanseri riskinin iki kat arttığını ve özellikle 50 yaşın altındaki kadınların beş kat daha fazla riske sahip olduğunu bildirilmiştir (Thompson ve ark., 2005). Bununla tutarlı olarak, analizimiz bir ATM patojenik mutasyonu taşıyan hastanın 48 yaşında meme kanseri geliştirdiğini gösterdi. Ayrıca, varyantın saptandığı hastanın meme kanseri geliştiren birinci derece akrabası vardı. Literatürde patojenik olarak sınıflandırılan c.8833_8834delCT çerçeve kayması delesyonu daha önce AT ve meme kanserinden etkilenen bireylerde bildirilmiştir (Coppa ve ark., 2018; Magliozzi ve ark., 2006; Prodosmo ve ark., 2016). Proteinin kinaz domaininde yer alan bu delesyon protein stabilitesinin değişmesine ve kinaz aktivitesinin kaybına yol açmaktadır. Varyantın saptandığı hastada ek olarak SLX4:c.2347G>A ve BARD1:c.1032T>A varyantları saptanmış olup bunlar Clinvar veritabanında VUS olarak tanımlanmış ve minör allel frekansı % 1'in altında klinik önemi bilinmeyen varyant olduğu bildirilmiştir. 69 yaşında meme kanseri tanısı almış ve ailede meme kanseri öyküsü bulunan diğer hastada ATM geninde c.2638G>A varyantı saptanmıştır. Bu varyant ClinVar veritabanında bildirilmemiş ve toplum çalışması yapılmamıştır. Varsome veritabanında muhtemel patojenik olarak sınıflandırılan varyant daha önce bir çalışma grubu tarafından

klirik önemi bilinmeyen olarak da bildirilmiştir. Proteindeki fonksiyon kaybının yanı sıra hastanın aile öyküsünde de meme kanseri olması ve varyantın muhtemel patojenik olarak sınıflandırılması göz önüne alındığında ilgili varyantın meme kanseri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda hastaların %6'sında (6/96) ATM geninde klinik önemi bilinmeyen varyanta rastlanmıştır. Bunlardan c.3352A>G varyantı 58 yaşında over seröz karsinomlu bir hastada tespit edilmiştir. Literatürde daha önce meme kanseri tanılı bir hasta grubunda saptanan bu varyantın *in silico* analizler sonucunda zararsız olabileceği tahmin edilmekte ve yeterli çalışma bulunmadığından klinik önemi belirsizliğini korumaktadır (Decker ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda, ATM genindeki patojenik varyantların meme kanserinin yanı sıra yumurtalık kanserinde de etkisinin olabileceği gösterilmiştir (Kurian ve ark., 2017; Kurian ve ark., 2019). Ancak mevcut kanıtlar, ilgili varyantın yumurtalık kanseri kliniği üzerine etkisi olup olmadığını anlamamız için yetersizdir. Varyantın tespit edildiği hastanın meme kanseri riski açısından değerlendirilmesi ve takip edilmesi düşünülebilir. Birinci dereceden ailede meme kanseri öyküsü ile başvuran 2 hastada ATM geninde c.8415G>A ve c.6025T>C varyantları tespit edilmiştir. Literatürde c.6025T>C varyantı 50 yaşından önce meme kanseri teşhisi konan bireylerde tespit edilmiştir (Tung ve ark., 2015). Bu çalışma ile uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da 46 yaşındaki hastada saptanmıştır. Literatürde c.8415G>A varyantı daha önce meme kanserli hiçbir hastada rapor edilmemiş ve toplum çalışması yapılmamıştır. *In silico* analizler sonucunda zararsız olabileceği tahmin edilen bu varyantın klinik önemi bilinmemektedir. Daha büyük kohortlarda yapılacak çalışmalar sonucunda bu varyantların meme kanseri üzerine etkisi ile ilgili kanıtlar artabilir ve aile geçmişinden dolayı hastaların takip edilmesi büyük önem taşımaktadır.

İnvaziv karsinomlu bir hastada ATM ve MLH1 genindeki varyantlar aynı anda tespit edilmiştir. ATM:c.3382C>G ve MLH1:c.1344G>T varyantı literatürde meme kanseri hastalarında bildirilmemiş ve klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmıştır. ATM gen ürünü, MLH1 ve MSH2 tarafından kodlanan DNA uyumsuzluğu onarım proteinleri gibi, DNA bütünlüğünün korunmasında rol oynamaktadır (Canman ve Lim, 1998). Maillet ve arkadaşları (2000), yaptığı çalışmada MLH1 veya MSH2 mutasyon taşıyıcılarındaki kanser insidansının belirli bir ATM polimorfizminin varlığından etkilendiğini ve bu genlerde aynı anda kusur olan hastaların yüksek HNPCC ile ilişkili risk altında olduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda bizim çalışmamızda aynı anda bu varyantların tespit edilmesinin tesadüf

olmadığını düşündürmektedir ancak bu varyantların hastada diğer kanserlere yatkınlığa neden olup olmadığına dair ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamızda ATM ve SLX4 varyantları invaziv karsinomlu 3 hastada aynı anda tespit edilmiştir. Hastalardan biri 39 yaşında, ATM geninde c.3495C>A ve SLX4 geninde c.4569G>T varyantı taşımaktaydı. Diğeri 58 yaşında olan hastada, ATM:c.6823A>G ve SLX4:c.2620G>A varyantları saptanmıştır. Bu varyantlar daha önce literatürde kanser ile ilişkilendirilmemiş ve meme kanseri hastalarında tespit edildiği bildirilmemiştir. SLX4, çeşitli DNA onarım aktiviteleri için iskele görevi gören bir ATM substratıdır (Holloway ve ark., 2011). Bu da DNA onarımı sırasında bu gendeki kusurların birbirlerini etkileyebileceğini ve bu nedenle hastalarda aynı anda bu genlere rastladığımızı düşündürmektedir. Ancak klinik önemi henüz bilinmeyen bu varyantların aynı anda görülmesinin meme kanseri kliniğine etkisi hakkında yorum yapabilmemiz için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Önceki çalışmalar, ATM taşıyıcılarında gelişen meme kanserlerinin histopatolojik değerlendirmelerinde ER, PR pozitif ancak HER2 reseptörünün negatif olduğunu göstermiştir (Prodosmo ve ark., 2013; Prodosma ve ark., 2016). Ancak çalışmamızda hasta bilgilerinin tamamına ulaşamadığı için histopatolojik yönden değerlendirilmesi yapılamamıştır. AT sendromu ve ATM mutasyonlarının heterozigot taşıyıcıları olan hastalarda, muhtemelen kusurlu DNA onarımı ve normal dokulardaki genomik instabilite nedeniyle radyoterapiye karşı artan toksisite bildirilmiştir (Xiong ve ark., 2013). ATM heterozigotlarında artan meme kanseri riski göz önüne alındığında, radyasyon tedavisine yanıt potansiyel klinik öneme sahiptir ve daha fazla araştırma gerektirir.

Başlangıçta ATM/ATR için fosforilasyon hedeflerinden biri olarak tanımlanan SLX4, en az üç nükleaz ile etkileşime giren çok alanlı bir iskele proteindir (Svendsen ve ark., 2009). SLX4 biallelik mutasyonları daha önce Fankoni anamisinin alt tipi olan FAP hastalarında tanımlanmıştır (Kim ve ark., 2011; Stoepker ve ark., 2011). FA yollarında önceden tanımlanmış tüm akış aşağı efektörlerin monoalelik germ hattı değişiklikleri meme kanserine yatkınlık yaratmaktadır. Bu hastalara ait hücre hatlarının fenotipi, DNA onarımı için gerekli olan SLX4 ile tutarlı olduğundan SLX4'teki monoalelik germ hattı mutasyonlarının taşıyıcıları meme kanserine yatkın hale getirebileceği hipotezi ortaya atılmıştır (Shah ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda 5 hastada SLX4 geninde monoallelik

varyantlar saptanmış ancak bunlar klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmıştır. Varyantlardan biri, c.5228C>T olup lenf nodu metastazlı ileri evre meme kanseri hastasında saptanmıştır. Diğeri, c.2675C>T varyantı invaziv lobüler karsinomlu hastada saptanmıştır. Fonksiyonel çalışmaların eksikliğinden dolayı klinik önemi belirsizliğini koruyan bu varyantların meme kanserine yatkınlığını anlayabilmemiz için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Shah ve arkadaşları (2013), SLX4'teki fonksiyon kaybı mutasyonlarının çok nadir durumlarda meme kanseri gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda SLX4 geninde saptadığımız varyantların fonksiyon kaybına neden olup olmadığı belirsizliğini koruduğu için meme kanseri gelişimi üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Ancak, ileri çalışmaların yapılmasıyla VUS varyantların patojenitesinin değişmesi muhtemeldir ve nadir de olsa SLX4 genindeki bu varyantların klinik ile ilişkili olabileceğini düşündürtebilir.

MUTYH ile ilişkili polipoz, MUTYH genindeki bialelik germ hattı mutasyonlarının neden olduğu otozomal resesif bir kolorektal adenom ve karsinoma yatkınlık sendromudur (Jones ve ark., 2009). MAP'li hastalar son derece yüksek kolorektal kanser riski altındadır, ancak tek bir MUTYH mutasyonunun heterozigot taşıyıcılarında kolorektal ve diğer kanserlerin riskleri belirsizdir. Bialelik MUTYH gen mutasyonları meme kanserine yatkınlık yaratır, ancak monoallelik MUYH mutasyonlarının meme kanserini arttırdığı tartışmalıdır (Fulk ve ark., 2019). Çalışmamızda MUTYH: c.884 C>T varyantı 4 kişide monoallelik (heterozigot) olarak saptanmıştır (Tablo 4.5). Bu varyant daha önce MAP'den etkilenen bireylerde bialelik (hem homozigot hem bileşik heterozigot) durumda gözlenmiştir (Jones ve ark., 2009; Morak ve ark., 2010). Aynı zamanda ilgili varyant, kolorektal kanser tanılı türk popülasyonunda yapılan çalışmalarda bialelik olarak tespit edilirken kalıtsal meme kanserli hastalarda monoallelik olarak saptanmıştır (Erdem ve Bahsi, 2020; Erdem ve Bahsi, 2019; Solmaz ve ark., 2021). Bu varyant Clinvar'da farklı protein kodu ile de yer almaktadır (NM_001048171.1 - p.Pro281Leu). Yapılan fonksiyonel çalışmalar sonucunda varyantın FLC (Demir-Kükürt kümesi) domaininde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu domainde yer alan mutasyonun substrat bağlanmasını ve baz eksizyon aktivitesini bozduğu bulunmuştur (Brinkmeyer ve David, 2015). Bizim çalışmamızda hastalarda ikinci isabetin eksik olmasından bu muhtemel patojenik değişiklik klinik ile ilişkilendirilememiştir. NGS yöntemi ile CNV'ler değerlendirilebilmesine rağmen, CNV'leri tespit etmek için altın

standart MLPA genetik test analizidir. Hastalarda ikinci isabetin dışlanması için MLPA analizi önerilebilir.

Meme kanseri ile ilgili yapılan çalışmalarda en çok odaklanılan BRCA1 ve BRCA2 genlerine ek olarak, NBN, RAD51C ve BRIP1 gibi bazı yeni aday genler listeye eklenmiştir (Tung ve ark., 2015). Bu çalışmada da hastalarda bu 3 gende monoalelik değişiklikler gözlenmiştir. Ancak bu genlerin penetransı ve klinik spektrumunun daha fazla araştırılması gerekmektedir.

RAD51 rekombinaz, homolog rekombinasyon ile DNA çift zincir kırıklarının onarımında kritik bir role sahiptir. İnsanlarda beş adet RAD51 paralogu vardır; RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 ve XRCC3. Bunlar RAD51'in DNA'ya bağlanmasını teşvik ederler (Stratton ve Rahman, 2008). Çalışmalar, homolog rekombinasyon onarımı için gerekli olan RAD51C'nin nadir görülen bir kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri duyarlılık geni olduğu bildirilmiştir ve BRCA1 ve BRCA2 negatif kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri ailelerinde birkaç patojenik RAD51C mutasyonu tanımlanmıştır (Meindl ve ark., 2010). Çalışmamızda vakaların %3'ünün aynı RAD51C:c.751G>A varyantı taşıdığı tespit edilmiş olup bunların aile öyküsü ile başvuran 3 akraba olduğu belirlenmiştir. *In silico* analizlerde Mutation Taster ve DANN'a göre zararlı, SIFT'e göre zararsız bir varyant olabileceği tahmin edilen bu varyant ClinVar'da daha önce bildirilmemiştir. Klinik önemi bilinmeyen c.751G>A varyantı için öngörülen zarar verici etkiler ve protein yapısındaki değişiklikler nedeniyle meme kanseri ile ilişkilendirilebilir. Ek olarak çalışmaya dahil edilen hasta popülasyonunda RAD51 rekombinazın bir diğer paralogu olan RAD51D geninde hiç varyant saptanmamıştır.

BRIP1'deki germline mutasyonları, gelişimsel anormallikler, kemik iliği yetmezliği ve kansere yatkınlık ile karakterize bir kromozom instabilite bozukluğu olan Fanconi anemisi ile ilişkilidir (Levitus ve ark. 2005; Levran ve ark., 2005). BRIP1 geninin işlev kaybı mutasyonları çoğunlukla yumurtalık kanseri riski ile ilişkili olsa da, risk oranı bildirilmemekle birlikte meme kanserine yatkınlığı da arttırmaktadır (Weber-Lassalle ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar sonucunda BRIP1'deki nadir bir protein kesen varyant, düşük penetranslı meme kanserine duyarlılık allelleri olarak tanımlanmıştır (Seal ve ark., 2006). Çalışmamızda BRIP1 c.1981T>G varyantı aile öyküsü ile başvuran ve annesi yumurtalık kanseri tanılı 33 yaşındaki hastada saptanmıştır. ClinVar veritabanı bu varyant için klinik

önemi bilinmeyen olarak tek bir giriş (Varyasyon Kimliği: 233429) içermektedir. Bu amino asit pozisyonu, mevcut omurgalı türlerinde yüksek oranda korunmuş bölgede yer almaktadır. Yanlış anlam değişikliklerinin protein yapısı ve işlevi üzerindeki etkisini tahmin etmek için geliştirilen algoritmalarından Mutation Taster ve PROVEAN'a göre zararlı, SIFT'e göre tolere edilebilir olduğu belirtilmiştir, ancak bu tahminler, yayınlanmış fonksiyonel çalışmalarla doğrulanmamıştır. Diğer klinik önemi bilinmeyen bir varyant olarak BRIP1: c.446A>G değişikliği, çok genli bir panel ile test edilen Hindistanlı 1010 meme ve / veya yumurtalık kanseri hastasından oluşan bir kohortta bildirilmiştir (Singh ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda da bu varyant 34 yaşında meme kanseri ve yumurtalık kanser öyküsü bulunan hastada tespit edilmiştir. *In silico* analizler sonucunda ilgili varyantın tolere edilebilir olduğu tahmin edilmiştir. Bu klinik önemi bilinmeyen varyantların klinik ile ilişkilendirilebilmesi için fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. BRIP1 genindeki nadir varyantları saptamak için yapılan bir çalışmada yumurtalık ve erken başlangıçlı meme kanseri olan hastaların yaklaşık % 2'sinin BRIP1 DNA helikazında nadir bir missense varyant taşıdığı gösterilmiştir (Moyer ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda da BRIP1 geni VUS varyantı sıklığı % 2 olarak saptanmıştır.

NBN geni, MRE11A ve RAD50 genleri ile birlikte MRN kompleksini oluşturarak DNA hasar onarımında rol alır (Walters ve ark., 2009). NBN genindeki mutasyonlar, mikrosefali, büyüme geriliği, immün yetmezlik ve özellikle kansere yakınlıkla sonuçlanabilen bir radyasyon duyarlılığı bozukluğu olan Nijemen kırılma sendromu gibi otozomal resesif bozukluğa yol açar. NBN geni üzerinde yapılan çalışmalar, bu gende meydana gelen polimorfik varyantların ve kusurlu mutasyonların DSB onarım mekanizması aracılığıyla meme kanseri riskini artırdığını düşündürmektedir (Uzunoglu ve ark., 2016). Çalışmamızda sadece bir hastada NBN:c.1912T>C varyantı tespit edilmiştir. İlgili varyant daha önce kalıtsal kanser sendromu ile ilişkilendirilmiş ve yapılan çalışmalar bu varyantın MRE11A bağlanma bölgesinde yer aldığını belirtmiştir. Bu, MRE11A'nın NBN'ye bağlanmasını bozabilir ve böylece MRN kompleksinin işlevini değiştirerek kansere yakınlığı artırabilir (Wang ve ark., 2013). Klinik önemi belirsiz olan bu varyantın klinikle ilişkilendirilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

MRE11A proteini, çift sarmallı DNA kırıklarının onarımı sırasında meydana gelen homolog olmayan uç birleştirme ve homolog rekombinasyonda işlev görür (Xie, Kwok ve Scully, 2009). MRE11A genindeki hipomorfik mutasyonların, fenotipleri AT'ninkilerden

ayırt edilemeyen ataksi-telanjiektazi benzeri bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir (Stewart ve ark., 1999). MRE11A'nın meme kanserine yatkınlık geni olduğuna dair artan kanıtlar vardır ve bazı veriler bunun özellikle üçlü negatif/bazal benzeri meme kanserleriyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Ollier ve ark., 2015). Bu çalışmada, MRE11A genindeki mutasyon sıklığı %3 olarak tespit edilmiştir ve bu mutasyonlar literatürde klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmıştır. MRE11A:c.1051C>T varyantı literatürde daha önce meme kanseri olan hastalarda bildirilmemiştir. Çalışmamızda 48 yaşında meme kanseri tanılı ve ailesinde meme ve akciğer kanser öyküsü bulunan bir hastada tespit edilmiştir. İn silico analizler sonucunda Mutation Taster ve PROVEAN'a göre zararlı, SIFT'e göre ise zararsız olduğu tahmin edilen bu varyantın çelişkili sonuçlardan dolayı klinik önemi belirsizliğini korumaktadır. MRE11A:c.818C>G varyantı literatürde daha önce kanser ile ilişkilendirilmemiştir ancak türk popülasyonunda kolorektal hastalarda yapılan bir çalışmada tespit edilmiştir (Erdem ve Bahsi, 2020). Çalışmamızda, 36 yaşında invaziv karsinomlu meme kanserli bir hastada saptanan bu varyant için *in silico* analizler zararlı olabileceğini tahmin etmektedir. Son olarak c.20+92A>G intronik varyantı ailede meme kanseri öyküsü ile başvuran bir hastada tespit edilmiştir. ClinVar'da bildirilmeyen bu varyantla ilgili yapılan toplum çalışmalarında (ExAC ve GnomAD) MAF değeri %0,001 olduğu bildirilmiş ancak daha önce klinikle ilişkilendirilen çalışmalar yapılmamıştır. Hastada aynı zamanda MUTYH:c.884C>T muhtemel patojenik varyantı ve BLM:c.458A>C VUS varyantı heterozigot olarak saptanmıştır. BLM:c.458A>C daha önce literatürde kanserle ilişkilendirilmemiş ve ClinVar'da bildirilmemiştir. BLM geninin protein ürünü, MRE11A'nın eksonükleaz aktivitesinden sonra DNA uçlarındaki çift yönlü rezeksiyonu sağlamaktadır. Bu VUS varyantların tek başına etkisi olmasa da aynı mekanizmada rol alan genlerdeki kusurlar birbirlerini etkileyerek DNA onarımının düzgün bir şekilde gerçekleştirilememesine ve kanserin ilerlemesine neden olabilir. Sınırlı kanıtlara rağmen, MRE11A'daki mutasyonlar meme kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bartkova ve ark., 2008). Verilerimiz, MRE11A mutasyonu taşıyan probandların meme kanseri geliştiren ve ailede meme kanseri öyküsü olduğunu göstermektedir. Tespit ettiğimiz varyantların patojenitesinin netleştirilmesi MRE11A'nın meme kanseri için predispozan bir gen olduğuna dair kanıtları güçlendirecektir.

RAD50 , önemli bir DNA onarım genidir ve homolog rekombinasyon yolunda yer alır (Stracker ve ark., 2004). Yeni nesil dizileme ile tespit edilen RAD50 germ hattı mutasyon oranları daha önce üçlü negatif meme kanseri hastaları (%0.33) (Couch ve ark., 2015), erken

başlangıçlı meme kanseri hastaları (%0.36) (Maxwell ve ark., 2015) ve ailesel meme kanseri hastaları (%0.10) (Thompson ve ark., 2016) olmak üzere meme kanseri hastalarında rapor edilmiştir. Çalışmamızda hasta grubunun %3'ünde RAD50 varyantı saptanmıştır ve hastaların hepsi meme kanseri tanısı almış invaziv karsinom türüne sahiptir. Çalışmamızda, RAD50 geninde c.412C>T patojenik varyantı 49 yaşında lenf nodu metastazı bulunan ileri evre meme kanser tanılı bir hastada saptanmıştır. Bu gen daha önce meme kanseri olan hastalarda bildirilmiş ve patojenik olarak sınıflandırılmıştır (Fan ve ark., 2018; Guan ve ark., 2015). Tespit ettiğimiz varyant proteinin ATPaz bölgesinde yer almakta ve fonksiyon kaybına neden olmaktadır. RAD50'deki fonksiyon kaybı varyantlarının patojenik olduğu bilinmektedir (Tommiska ve ark., 2006; Waltes ve ark., 2009). Literatürde sunulan bu bilgi doğrultusunda, bu değişikliğin fonksiyon kaybına yol açmasından dolayı meme kanseri gelişiminde etkisi olduğu düşünülmektedir. RAD50 geninde saptanan diğer c.2840T>C ve c.1336A>G varyantları invaziv karsinomlu iki hastada saptanmış ve klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmıştır. c.2840T>C varyantı literatürde daha önce meme kanseri tanılı hastalarda saptanmamıştır ve mevcut kanıtlar bu varyantın hastalıktaki rolünü belirlemek için yetersizdir. c.1336A>G varyantı daha önce erken başlangıçlı meme kanseri hastalarında tespit edilmiştir (Damiola ve ark., 2014; Lu ve ark., 2015; Young ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda da hasta erken başlangıçlı meme kanseri tanısına sahipti. Thompson ve arkadaşları (2016), yumurtalık kanseri hücrelerinde RAD50 ekspresyonunun aşağı regülasyonunun sisplatin ve olaparib'e artan bir yanıtı açtığını ileri sürmüştür. Bu nedenle, RAD50 mutasyon taşıyıcıları, PARP inhibitörleri ile tedavi için potansiyel adaylar olabilir.

Çalışmamızda MRN kompleksi genlerinde varyant tespit ettiğimiz hastaların yaş ortalaması 43'tür (31-55). Söderlund ve arkadaşları (2007), yaptıkları çalışmada MRN kompleksinde yer alan genlerin azalmış ekspresyonunun erken meme kanserli hastalarda radyoterapinin zayıf etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Bu doğrultuda, erken yaşta meme kanserine yakalanan bu hastalarda MRN genlerindeki mutasyonların tespit edilmesi ile radyoterapinin yanı sıra farklı tedavi seçeneklerinin de düşünülmesi hastalığın ilerlemesini önlemede faydalı olabilir. Çoklu panel testlerinin yaygın hale gelmesi ve tespit edilen varyantların fonksiyonel çalışmalarının arttırılması ile bu varyantlara sahip bireyler için bireyselleşmiş tedavilerin uygulanmasına aracılık edecektir.

BLM, çift sarmal kırıklarının homolog rekombinasyon ile onarımının başlatılması ve düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir ve germ hattı mutasyonları Bloom Sendromuna neden olmaktadır (Arora ve ark., 2015). BLM geni ile ilgili yapılan bir çalışmada, sağlıklı kadınlara kıyasla meme kanseri hastalarında aşırı miktarda germ hattı BLM mutasyonu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, birinci derece aile öyküsü, hastalığın erken başlangıcı ve bilateralitesi gibi hastalığın klinik belirtileri ile karakterize edilen meme kanseri vakalarında BLM heterozigotluğu daha yaygın eğilimde olduğu gösterilmiştir (Sokolenko ve ark., 2012). Bu çalışmayla uyumlu olarak, biz de hastaların %4'ünde BLM varyantları tespit ettik ve bunlar ailede meme kanseri öyküsü bulunan, bilateral meme kanseri tanılı ve erken başlangıç yaşına sahip hastalardı. Bu varyantlardan BLM:c.3179A>T varyantı, bilateral meme kanseri tanılı ve invaziv duktal karsinomlu bir hastada tespit edilmiştir. İlgili varyant, ClinVar'da bildirilmemiştir ve *in silico* analizler zararlı olabileceğini tahmin etmektedir. Diğer varyant, BLM:c.2237C>T erken başlangıçlı invaziv karsinom türüne sahip hastada tespit edilmiştir. Bu varyant daha önce meme kanserli veya diğer kanserlere sahip hastalarda bildirilmemiş olup klinik önemi bilinmeyen olarak ClinVar'da yer almaktadır. BLM:c.3427G>A varyantı literatürde klinik önemi bilinmeyen olarak yer almaktadır ve daha önce meme ve yumurtalık kanser riski taşıyan bir bireyde tespit edilmiştir (Mirzaei ve Schmidt, 2012; Quezada ve ark., 2018). Çalışmamızda da ailesinde meme kanseri öyküsü bulunan bir kişide saptanmıştır. Deneysel çalışmalar, bu varyantın bir maya modelinde BLM protein fonksiyonunu bozmadığını göstermiştir ancak mevcut kanıtlar bu varyantın hastalığındaki rolünü belirlemek için yetersizdir (Mirzaei ve Schmidt, 2012). BLM ekspresyonundaki düşüş, bozulmuş HR onarımının bir belirteci olduğundan, düşük BLM tümörlerinin, PARP'ı hedefleyenler gibi BER inhibitörleri kullanılarak sentetik ölümcüllük tarafından hedef alınabileceğini iddia eden çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar, BLM'nin meme kanserinde umut verici bir biyobelirteç ve rasyonel bir ilaç hedefi olduğuna dair kanıtlar sunmuşlardır (Arora ve ark., 2015; Bryant ve ark., 2005; Nguyen ve ark., 2013).

MMR genlerindeki germ hattı mutasyonları otozomal dominant olarak kalıtım gösteren Lynch sendromu ile ilişkilidir. MMR mutasyon taşıyıcıları, genel popülasyonla karşılaştırıldığında kolorektum, endometriyum, mide, yumurtalık, meme ve pankreas gibi diğer kanserler açısından önemli ölçüde artmış risk altındadır (Bonadona ve ark., 2011; Vierkoetter ve ark., 2014). Yumurtalık kanserinde MMR eksikliği, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarından sonra kalıtsal yumurtalık kanserinin en yaygın nedenidir (Xiao, Melton ve Gourley, 2014). Önceki araştırmacılar, yumurtalık kanseri olan seçilmemiş hastaların %

2-10'unun MMR ekspresyonunda kayıp olduğunu bildirmişlerdir (Lu ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda, vakaların % 2'sinin (2/96) MMR genlerinde patojenik mutasyon taşıdığı % 9,3'ünün (9/96) ise en az bir VUS varyant taşıdığı tespit edilmiştir. Her iki patojenik mutasyon da MSH2 geninde ve yumurtalık kanseri öykülü iki kadında saptanmıştır. MSH2 geninde tespit edilen c.229_230delAG çerçeve kayması delesyonu literatürde Lynch sendromundan etkilenen birden fazla kişide bildirilmiştir. Mutasyonun saptandığı hasta 45 yaşında yumurtalık endometriyum kanser tanılı olup, tümör dokusunda immünohistokimya analiz sonucunda MLH1, PMS2 pozitif, MSH2, MSH6 negatif olarak tespit edilmiş ve mikrosatellit instabilite açısından incelenmek üzere moleküler tetkik istenmiştir. c.229_230delAG patojenik mutasyonu nedeniyle tümör dokusunda MSH2 protein ekspresyonlarının yetersizliğine neden olacağından sonucumuz immünohistokimya sonucunu destekler niteliktedir.

Diğer patojenik mutasyon, MSH2:c.958_959dupAC çerçeve kayması insersiyonu olup InSIGHT veritabanında sadece 1 vakada tespit edilmiş ve bugüne kadar başka bir çalışma rapor edilmemiştir. İlgili varyant 39 yaşında yumurtalık kanser tanılı hastada tespit edilmiştir. Jensen ve arkadaşları (2008), MMR ekspresyonu kaybı gösteren yumurtalık kanserli hastaların erken evre tümörlerle başvurduğunu bildirmişlerdir, bizim çalışmamızda bunu doğrulamaktadır. Hastada aynı zamanda MUTYH geninde muhtemel patojenik olduğu düşünülen c.884C>T varyantı heterozigot olarak saptanmıştır. Önceki çalışmalarda, aynı bireyde birden fazla gende patojenik mutasyonlar, meme, yumurtalık, kolon ve genel kalıtsal kanser risk testi yapılan daha büyük kohortlardaki hastaların yaklaşık %3'ünde gözlenmiştir (LaDuca ve ark., 2014). Bununla uyumlu olarak çalışmamızda %1 (1/96) oranında aynı hastada birden fazla patojenik mutasyona rastlanmıştır ancak MUTYH geninde bileşik heterozigotluk varlığının tespiti için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Diğer çalışmalar (Jensen ve ark., 2008; Walsh ve ark., 2011), yumurtalık kanserinde yaygın olarak mutasyona uğrayan genin MSH6 olduğunu saptamıştır ancak bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ışığında MSH2 geninin yumurtalık kanseri patogenezinde önemli bir rol oynamış olabileceği belirlenmiştir.

MMR' deki diğer genlere kıyasla MSH6 ve PMS2 germ hattı mutasyonları daha az yaygındır (Kovacs ve ark., 2009; Kuiper ve ark., 2011) ancak Roberts ve arkadaşları (2018), yaptıkları çalışmada MSH6 ve PMS2 patojenik varyanta sahip olan kadınlarda meme kanseri riskinin iki ve üç kat arttığını tespit etmiştir. Çalışmamızda, yumurtalık kanseri tanılı

ve ince bağırsak metastazı bulunan bir hastada MSH6:c.1661G>A ve PMS2:c.1240G>T varyantları aynı anda tespit edilmiştir. Bu varyantlar literatürde VUS olarak sınıflandırılmıştır. Erken meme kanseri tanısı konmuş invaziv karsinoma sahip bir hastada da MSH6 geninde c.2686A>G varyantı saptanmıştır. İlgili varyant VUS olarak sınıflandırılmış olup varyanta dair toplum çalışması yapılmamıştır. Daha fazla veri elde edildikçe, bu VUS varyantlardan bazıları patojenik olarak yeniden sınıflandırılabilir ve böylece literatürle uyumlu olarak hastalarda risk değerlendirmesinde bulunulabilir. Finlandiya'da yapılan bir araştırma, MMR eksikliği olan meme kanseri hastalarının oranının, mutasyon taşıyıcılarında taşıyıcı olmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir (Lotsari ve ark., 2012). MMR genlerinde patojenik mutasyon taşıyan yumurtalık kanseri tanılı hastaların 20 yıl içerisinde meme kanseri için kümülatif risk artışına sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Saslow ve ark., 2007). Sonuç olarak, önceden yumurtalık kanser teşhisi konan MMR gen mutasyonları taşıyan kadınların, meme kanseri de dahil olmak üzere bir dizi kanser riskinde artışa sahip olduğu düşünülerek klinisyenler tarafından meme kanseri taraması ile takibi yapılabilir.

MLH1 ve MSH2 gibi 2 çok önemli uyumsuzluk onarım geninin genetik değişiklikleri, meme kanseri gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Kappil ve ark., 2016; Murata ve ark., 2005). Meme kanseri aile öyküsü olan iki hastada MSH2 geninde c.1787A>G ve c.435T>G VUS varyantları saptanmıştır ve bu varyantların klinik ile ilişkisi belirsizdir. MSH2: c.435T>G saptanan hastada aynı zamanda BARD1 geninde c.121C>T varyantı tespit edilmiştir. Bu varyant daha önce ailesel meme kanseri olan hastada tespit edilmiş olup yapılan *in silico* analizler varyantın zararlı olabileceğini tahmin etmektedir. Fonksiyonel çalışmaların eksikliğinden dolayı VUS olarak sınıflandırılan bu varyantların patojenitesinin belirlenmesi ve meme kanseri ile ilişkilendirilmesi için daha büyük popülasyonda çalışılmasına ihtiyaç vardır.

MLH1 geninde c.1344G>T varyantı meme kanseri tanılı invaziv karsinoma sahip 48 yaşındaki hastada tespit edilmiştir. Bu varyant, daha önce kolorektal kanserden etkilenen bir kişide rapor edilmiştir (PMID:25559809) ve ClinVar veritabanında VUS olarak sınıflandırılmıştır. *In silico* analizler bu varyantın muhtemel tolere edilebileceğini göstermektedir ancak bu tahminler yayınlanmış fonksiyonel çalışmalar ve klinikleri tarafından doğrulanmamıştır. Bu nedenle, bu varyantın patojenik olup olmadığını belirlemek için daha fazla aile çalışmasına ihtiyaç vardır. Harkness ve arkadaşları (2015), kadın MLH1

taşıyıcılarının meme kanseri açısından orta derecede risk altında görüldüğünü ve meme taraması için düşünülmesi gerektiğini bildirmiştir. Scott ve arkadaşları (2001), ayrıca bir MLH1 patojenik varyant pozitif grubunda meme kanseri vakalarında önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, varyantın klinik önemini ve meme kanseri ile ilişkisini geliştirmek için fonksiyonel analizleri içeren daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Hastada aynı zamanda ATM geninde c.3382C>G varyantı saptanmıştır. *In silico* analizler sonucunda bu değişikliğin tolere edilebilir olduğu tahmin edilmektedir. Bu tahminler yayınlanmış fonksiyonel çalışmalarla doğrulanmadığı için VUS olarak sınıflandırılmıştır. MMR genleri, DNA onarımındaki yerleşik rollerinin yanı sıra, hücre döngüsü kontrol noktalarında ve DNA hasarı tarafından uyarılan apoptozda da rol oynarlar (Li, 1999; O'Brien ve Brown, 2006) . MLH1, ATM ile büyük bir komplekste etkileşime girerek DNA hasar sinyal yanıtını yükseltmek için pozitif bir geri besleme döngüsü oluşturur ve böylece hücrelerin apoptoz geçirmesi için duyarlı hale getirilmesinde birlikte rol oynadıkları belirtilmiştir (Brown ve ark., 2003; Zink ve ark., 2002). Bu bilgiler doğrultusunda hastada tespit edilen MLH1 ve ATM genlerindeki değişimlerin protein yapısında değişikliklere neden olup hücrelerin apoptoza gitmesine engel olabileceği ve sonuçta hücrelerin birikerek kanserleşmeye neden olabileceğini düşündürmektedir.

PMS1 geni, MMR sisteminin bir parçasıdır ancak kalıtsal kanser sendromu geliştirme riskini artırmadaki rolü hakkındaki bilgiler tam olarak anlaşılammıştır (Prolla ve ark., 1998; Räschele ve ark., 2000). Çalışmamızda PMS1 varyantlarının oranı %3'tür. PMS1:c.2780A>G varyantı ailede meme kanseri ve pankreas kanseri öyküsü ile başvuran bir hastada tespit edilmiştir. PMS1:1801G>A varyantı 37 yaşında invaziv karsinomlu meme kanser tanılı bir hastada tespit edilmiştir. Bu varyantlar daha önce ClinVar veritabanında bildirilmemiş olup *in silico* analizlerde tolere edilebilir olduğu tahmin edilmektedir. Varyantla ilgili fonksiyonel çalışmaların eksikliğinden dolayı VUS olarak sınıflandırılmıştır. Diğer PMS1 varyantı c.224C>T olup meme kanseri tanılı ve lenf nodu metastazı olan bir hastada saptanmıştır. *In silico* analizler sonucunda zararlı olabileceği tahmin edilen bu varyant ClinVar'da bildirilmemiş ve VUS olarak sınıflandırılmıştır. PMS1 ekspresyonundaki artışın Lynch Sendromu ve MSI ile karakterize edilen diğer sporadik kanser türlerindeki MMR kusurlarına benzer şekilde, MMR inaktivasyonuna yol açabilecek ve tümör oluşumunu teşvik edebilecek bir mekanizmayı temsil edebileceği düşünülmektedir (Campbell ve ark., 2014; Harfe ve Jinks-Robertson, 2000). PMS1 geninde bulduğumuz bu varyantlar ile ilgili çalışmaların eksikliğinden dolayı tümör gelişimine etkisi hakkında yorum yapılamamaktadır.

PALB2 genindeki patojenik varyantlar meme, pankreas ve muhtemelen yumurtalık kanserleri ile ilişkilidir (Kluska ve ark., 2017; Reid ve ark., 2007; Xia ve ark., 2006). Kadın PALB2 mutasyon taşıyıcıları için ortalama 70 yaşına kadar meme kanseri riski %35'tir. PALB2'deki fonksiyon kaybı mutasyonları, hem kansere yatkınlık oluşturan mutasyonların sıklığı hem de bunlarla ilişkili risk açısından kalıtsal meme kanserinin önemli bir nedenidir (Antoniou ve ark., 2014). Çalışmamızdan hastaların %2'sinde sadece VUS olarak sınıflandırılan PALB2 varyantlarına rastlanmıştır. Bunlardan biri, 54 yaşında invaziv karsinomlu meme kanser tanılı bir hastada saptanan PALB2:c.3306C>G varyantıdır. İlgili varyant daha önce kuzeybatı Çin'de etnik gruptan oluşan bir bölgede meme kanseri hastalarında ve türk popülasyonunda yapılan çalışmada invaziv duktal karsinomlu meme kanseri hastalarında saptanmıştır (Cecener ve ark., 2016; Li ve ark., 2015). Diğer varyant, PALB2:c.892G>A olup invaziv karsinomlu hastada tespit edilmiştir. Bu varyant Literatürde kalıtsal kanserden etkilenen bireylerde bildirilmemiştir. *In silico* analizler sonucunda zararsız olduğu tahmin edilen varyantla ilgili yeterli çalışma olmadığından klinik önemi belirsizliğini korumaktadır. PALB2 gen mutasyonları , güçlü bir aile öyküsü olan hastalarda daha yaygın görünmektedir (Hofstatter ve ark., 2011; Southey ve ark., 2010); ancak bazı varyantlar aile öyküsü veya tümör immünohistokimyasal özellikleri ile ilişkili olmayabilir. Bizim çalışmamızda ise varyantların tespit edildiği hastalarda, ailede meme kanseri öyküsü yoktu ancak diğer kanser öyküleri (Kolon, mesane, tiroid) bulunmaktaydı. Orta derece penetrans geni olarak tanımlanan PALB2 genindeki VUS bulguların aydınlatılması diğer aile üyelerinin meme kanseri riski açısından takip edilmesinde büyük öneme sahiptir.

Bu çalışmanın sınırlamalarından biri, NGS tekniğinde multipleks ligasyona bağlı prob amplifikasyon analizi yapılmadığı için büyük genomik yeniden düzenlemeleri belirleyememiş olmamızdır. Bu nedenle, kohortumuzda büyük genomik yeniden düzenleme varyantları hala mevcut olabilir ve mevcut bulgularımızın meme kanseri kliniği ile ilişkilendirilmesinde önemli rolü olabilir. Çalışmamızdaki diğer bir sınırlama ise prob yerleşimi nedeniyle 3' ve 5' bölgelerindeki varyantların ve derin intronik varyantların hariç tutulmasıdır.

BRCA1 veya BRCA2 genlerinde bir germ hattı mutasyonunun tanımlanması, meme veya yumurtalık kanseri olan kadınlar için hem birincil önleme (cerrahi profilaksi) hem de adjuvan ve / veya ikinci basamak tedavi için en iyi yaklaşımlarla ilgili kararların merkezinde yer alır. Şu anda, germ hattı testi çoğunlukla kansere duyarlı çok sayıda gen için

yapılmaktadır. Test edilen genlerdeki mutasyonların bazılarının oynadığı rol tam olarak anlaşılamamıştır ve bunlar sıklıkla düşük ve orta derece penetrans mutasyonlar olarak bilinmektedir. Panel testinin bir karmaşıklığı, nadir ve / veya önceden karakterize edilmemiş VUS'ların patojenik mutasyonlardan daha sık tespit ediliyor olmasıdır. Nadir varyantlar, özellikle orta ila düşük penetrasyonlu yatkınlık genlerinde tanımlananlar, sağlık hizmeti sağlayıcıları için bir zorluk oluşturmaktadır. Bu varyantlarla ilişkili risk genellikle bilinmemektedir ve varyantları sınıflandırmak için aile temelli çalışmalar (penetrasyon ve ekspresyon analizlerinin yanı sıra tümör çalışmaları) uygulanabilir değildir (Moyer ve ark., 2020). Kanseri riskini daha iyi yorumlamak ve hastalık yönetimi stratejilerine rehberlik etmek için fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda meme kanseri ile ilişkilendirilen DNA onarımında rol alan 16 gende (ATM, BARD1, BRIP1, PALB2, MRE11A, RAD50, NBN, MSH2, MLH1, MSH6, PMS1, PMS2, RAD51C, MUTYH, BLM, SLX4) toplamda 46 farklı varyant saptanıp değerlendirilmiştir. Klinik önemi bilinmeyen varyantlar bulgularımızın %86,9'unu (40/46) patojenik veya muhtemel patojenik varyantlar %13'ünü (6/46) oluşturmaktadır. Patojenik veya muhtemel patojenik mutasyonlar 96 hastanın 8'inde ATM, MSH2, RAD50 ve MUTYH genlerinde tespit edilmiştir. Bu bulgular, DNA onarım genlerinde germ hattı mutasyonları taşıyan bireylerin meme veya yumurtalık kanseri riski altında olduğunu göstermiştir.

Hastaların %57,2'sinde (55/96) taradığımız genlerde hiçbir varyant tespit edilmemiştir. Meme kanseri tanılı 36 hasta, aile öyküsü ile başvuran 13 hasta ve yumurtalık kanser öyküsü olan 6 hastanın DNA onarımından sorumlu olan genler açısından negatif olduğu saptanmıştır. Mutasyonların penetransı ve fenotipi bireyler arasında farklılık göstermektedir. Çalışmamızda da gösterildiği gibi, zararlı bir mutasyonun saptanması, her zaman bir kişinin kansere yakalanacağı anlamına gelmemekte ve tersine, çok genli bir panel testinden elde edilen negatif sonuç, bireyin kansere yakalanma riskinin olmadığı anlamına gelmemektedir. Bu nedenle mutasyon açısından negatif olan bireylerin aile üyelerinin hedeflenen genetik testler dahil olmak üzere ek araştırmalara yönlendirilmesi klinisyenler tarafından takibi gerektirebilir.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında MSH2 genindeki c.229_230delAG ve c.958_959dupAC patojenik varyantlar yumurtalık kanseri tanılı 2 hastada tespit edilmiştir. MSH genindeki patojenik varyantların yumurtalık kanseri patogenezinde önemli bir rol oynamış olabileceği belirlenmiştir. ATM geninde saptanan c.8833_8834delCT patojenik varyantı ve c.2638G>A muhtemel patojenik varyantı meme kanser tanılı ve birinci derece meme kanseri aile öyküsü bulunan hastalarda tespit edilmiştir. Literatürle uyumlu olarak ATM genindeki zararlı mutasyonların meme kanserine yatkınlıkta önemli rol oynadığı ve

mutasyonların erken tespiti ile ailelerin koruyucu tedavilere yönlendirilmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir.

RAD50 geninde saptanan c.412C>T patojenik varyantı daha önce meme kanseri tanılı hastalarda tespit edilmiş ve çalışmamızda da ileri evre meme kanseri tanılı hastada bu varyantı saptadığımızı bildiriyoruz. Bu bulgu, RAD50 genindeki bu varyantın meme kanseri kliniği ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Literatürde MRN kompleksinde yer alan genlerin azalmış ekspresyonunun erken meme kanserli hastalarda radyoterapinin zayıf etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu doğrultuda, erken yaşta meme kanserine yakalanan bu hastalarda MRN genlerindeki mutasyonların tespit edilmesi ile radyoterapinin yanı sıra farklı tedavi seçeneklerinin de düşünülmesi hastalığın ilerlemesini önlemede faydalı olabilir. Çoklu panel testlerinin yaygın hale gelmesi ve tespit edilen varyantların fonksiyonel çalışmalarının artırılması ile bu varyantlara sahip bireyler için bireyselleşmiş tedavilerin uygulanmasına aracılık edecektir. Bununla birlikte, bu çalışma, kalıtsal meme kanserli hastalarda DNA hasar onarımında rol alan genlerdeki P veya LP olarak sınıflandırılan varyantlar için klinik sonuçların araştırılmasına ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Çalışmaya dahil ettiğimiz probandın az olması ve incelediğimiz genlerin meme kanseri riskinde orta ve düşük penetranslı olmasından dolayı patojenik mutasyonlara az rastlanmış olması muhtemeldir. Bulgularımızın %86,9'unu VUS olarak sınıflandırılan varyantlar oluşturmaktadır. Bu genlerin daha fazla test edilmesi, bu varyantları zararlı mutasyonlar veya iyi huylu polimorfizmler olarak yeniden sınıflandıracaktır. Kalıtsal meme kanseri yatkınlığı olan hastalarda tanımlanan bu VUS'ların sınıflandırılması, hastalığın erken teşhisine ve taranmasına katkıda bulunabilir ve hedefe yönelik tedavilerle bakımı kişiselleştirerek tedavi seçeneklerini iyileştirebilir. Tespit ettiğimiz nadir varyantların potansiyel etkilerini belirlemek için web tabanlı programlar ve *in silico* analizler kullanılmış olsa da, protein fonksiyonu üzerindeki potansiyel etkileri doğrulamak için daha detaylı fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamız, meme kanserinde DNA onarım mekanizmalarına yönelik çoklu panellerin, hem hastanın bireysel kanser geçmişiyle ilişkili olmayan yüksek riskli genlerde hem de orta veya düşük penetrasyona sahip genlerde önemli varyantları belirleme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Orta ve düşük penetranslı genlerde mutasyona

sahip olan bireyler için meme kanseri risk yönetimi klavuzları henüz mevcut olmasa da aile öyküsü ile birlikte bu tür mutasyonların tanımlanması hastaların daha yoğun gözetimi ve önleme stratejileri açısından fayda görmesini sağlayacaktır.



7. KAYNAKLAR

Akashi-Tanaka, S., Watanabe, C., Takamaru, T., Kuwayama, T., Ikeda, M., Ohyama, H., ... & Nakamura, S. (2015). BRCAness predicts resistance to taxane-containing regimens in triple negative breast cancer during neoadjuvant chemotherapy. *Clinical breast cancer*, 15(1), 80-85.

Akyolcu, N., Aksoy, G., Kanan, N. (2018). Meme Cerrahi Hastalıkları ve Bakımı. *Cerrahi Hemşireliği II. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi*, 327-76.

Ali, R., Rakha, E. A., Madhusudan, S., & Bryant, H. E. (2017). DNA damage repair in breast cancer and its therapeutic implications. *Pathology*, 49(2), 156-165.

AlMutairi, F., Ali Khan Pathan, A., Alanazi, M., Shalaby, M., Alabdulkarim, H. A., Alamri, A., ... & Reddy Parine, N. (2015). Association of DNA repair gene APE1 Asp148Glu polymorphism with breast cancer risk. *Disease markers*, 2015.

Alpay, M., Backman, L. R., Cheng, X., Dukel, M., Kim, W. J., Ai, L., & Brown, K. D. (2015). Oxidative stress shapes breast cancer phenotype through chronic activation of ATM-dependent signaling. *Breast cancer research and treatment*, 151(1), 75-87.

Alzahrani, F. A., Ahmed, F., Sharma, M., Rehan, M., Mahfuz, M., Baeshen, M. N., ... & Jamal, M. S. (2020). Investigating the pathogenic SNPs in BLM helicase and their biological consequences by computational approach. *Scientific reports*, 10(1), 1-22.

Amir, E., Seruga, B., Serrano, R., & Ocana, A. (2010). Targeting DNA repair in breast cancer: a clinical and translational update. *Cancer treatment reviews*, 36(7), 557-565.

Anderson, D. E. (1972). A genetic study of human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 48(4), 1029-1034.

Anderson, W. F., Chatterjee, N., Ershler, W. B., & Brawley, O. W. (2002). Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast cancer research and treatment*, 76(1), 27-36.

Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., ... & Easton, D. F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117-1130.

Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pyrkäs, K., Roberts, J., ... & Tischkowitz, M. (2014). Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *New England Journal of Medicine*, 371(6), 497-506.

Antoniou, A. C., & Easton, D. F. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*, 25(43), 5898-5905.

Apostolou, P., & Fostira, F. (2013). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed research international*, 2013.

Arora, A., Abdel-Fatah, T. M., Agarwal, D., Doherty, R., Moseley, P. M., Aleskandarany, M. A., ... & Madhusudan, S. (2015). Transcriptomic and protein expression analysis reveals clinicopathological

- significance of bloom syndrome helicase (BLM) in breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 14(4), 1057-1065.
- Bartkova, J., Tommiska, J., Oplustilova, L., Aaltonen, K., Tamminen, A., Heikkinen, T., ... & Bartek, J. (2008). Aberrations of the MRE11–RAD50–NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene. *Molecular oncology*, 2(4), 296-316.
- Baudhuin, L. M., Roberts, L. R., Enders, F. T., Swanson, R. L., Mettler, T. A., Aderca, I., ... & Highsmith, W. E. (2006). MYH Y165C and G382D mutations in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma patients. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 132(3), 159-162.
- Bayraktar, S., & Glück, S. (2012). Systemic therapy options in BRCA mutation-associated breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 135(2), 355-366.
- Beiner, M. E., Zhang, W. W., Zhang, S., Gallinger, S., Sun, P., & Narod, S. A. (2009). Mutations of the MYH gene do not substantially contribute to the risk of breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 114(3), 575-578.
- Belli, C., Duso, B. A., Ferraro, E., & Curigliano, G. (2019). Homologous recombination deficiency in triple negative breast cancer. *The Breast*, 45, 15-21.
- Bese, N. S., Munshi, A., Budrukkar, A., Elzawawy, A., Perez, C. A., & Breast Health Global Initiative Radiation Therapy Focus Group. (2008). Breast radiation therapy guideline implementation in low-and middle-income countries. *Cancer*, 113(S8), 2305-2314.
- Biomarkers Definitions Working Group, Atkinson Jr, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., ... & Zeger, S. L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 69(3), 89-95.
- Bischof, O., Kim, S. H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N. A., & Campisi, J. (2001). Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *The Journal of cell biology*, 153(2), 367-380.
- Blamey, R. W., Pinder, S. E., Ball, G. R., Ellis, I. O., Elston, C. W., Mitchell, M. J., & Haybittle, J. L. (2007). Reading the prognosis of the individual with breast cancer. *European Journal of Cancer*, 43(10), 1545-1547.
- Board, P. A. T. E. (2021a). Breast Cancer Treatment (Adult)(PDQ®). In *PDQ Cancer Information Summaries [Internet]*. National Cancer Institute (US).
- Board, P. A. T. E. (2021b). Cancer Genetics Overview (PDQ®): Health Professional Version. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65761/>
- Bogdanova, N., Feshchenko, S., Schürmann, P., Waltes, R., Wieland, B., Hillemanns, P., ... & Dörk, T. (2008). Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer. *International journal of cancer*, 122(4), 802-806.
- Bonadona, V., Bonaïti, B., Olschwang, S., Grandjouan, S., Huiart, L., Longy, M., ... & Bonaïti-Pellié, C. (2011). Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *Jama*, 305(22), 2304-2310.
- Borresen, A. L., Andersen, T. I., Garber, J., Barbier-Piroux, N., Thorlacius, S., Eyfjörd, J., ... & Friend, S. H. (1992). Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer research*, 52(11), 3234-3236.
- Bosse, K. R., Diskin, S. J., Cole, K. A., Wood, A. C., Schnepf, R. W., Norris, G., ... & Maris, J. M. (2012). Common variation at BARD1 results in the expression of an oncogenic isoform that influences neuroblastoma susceptibility and oncogenicity. *Cancer research*, 72(8), 2068-2078.
- Braunstein, L. Z., Taghian, A. G., Niemierko, A., Salama, L., Capuco, A., Bellon, J. R., ... & Harris, J. R. (2017). Breast-cancer subtype, age, and lymph node status as predictors of local recurrence following breast-conserving therapy. *Breast cancer research and treatment*, 161(1), 173-179.

- Brinton, L. A., Figueroa, J. D., Awuah, B., Yarney, J., Wiafe, S., Wood, S. N., ... & Clegg-Lampsey, J. N. (2014). Breast cancer in Sub-Saharan Africa: opportunities for prevention. *Breast cancer research and treatment*, 144(3), 467-478.
- Brinkmeyer, M. K., & David, S. S. (2015). Distinct functional consequences of MUTYH variants associated with colorectal cancer: Damaged DNA affinity, glycosylase activity and interaction with PCNA and Hus1. *DNA repair*, 34, 39-51.
- Brown, K. D., Rathi, A., Kamath, R., Beardsley, D. I., Zhan, Q., Mannino, J. L., & Baskaran, R. (2003). The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. *Nature genetics*, 33(1), 80-84.
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., ... & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913-917.
- Buchholz, T. A., Hunt, K. K., Whitman, G. J., Sahin, A. A., & Hortobagyi, G. N. (2003). Neoadjuvant chemotherapy for breast carcinoma: multidisciplinary considerations of benefits and risks. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 98(6), 1150-1160.
- Buisson, R., Niraj, J., Rodrigue, A., Ho, C. K., Kreuzer, J., Foo, T. K., ... & Zou, L. (2017). Coupling of homologous recombination and the checkpoint by ATR. *Molecular cell*, 65(2), 336-346.
- Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J., & Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501(7467), 338-345.
- Buys, S. S., Sandbach, J. F., Gammon, A., Patel, G., Kidd, J., Brown, K. L., ... & Daly, M. B. (2017). A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer*, 123(10), 1721-1730.
- Campbell, C. S., Hombauer, H., Srivatsan, A., Bowen, N., Gries, K., Desai, A., ... & Kolodner, R. D. (2014). Mlh2 is an accessory factor for DNA mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*, 10(5), e1004327.
- Canman, C. E., & Lim, D. S. (1998). The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene*, 17(25), 3301-3308.
- Cantor, S. B., Bell, D. W., Ganesan, S., Kass, E. M., Drapkin, R., Grossman, S., ... & Livingston, D. M. (2001). BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell*, 105(1), 149-160.
- Casadei, S., Norquist, B. M., Walsh, T., Stray, S., Mandell, J. B., Lee, M. K., ... & King, M. C. (2011). Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer. *Cancer research*, 71(6), 2222-2229.
- Castera, L., Krieger, S., Rousselin, A., Legros, A., Baumann, J. J., Bruet, O., ... & Vaur, D. (2014). Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *European Journal of Human Genetics*, 22(11), 1305-1313.
- Cavaciuti, E., Lauge, A., Janin, N., Ossian, K., Hall, J., Stoppa-Lyonnet, D., & Andrieu, N. (2005). Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 42(1), 1-9.
- Cecener, G., Eskiler, G. G., Egeli, U., Tunca, B., Alemdar, A., Gokgoz, S., & Tasdelen, I. (2016). Association of PALB2 sequence variants with the risk of early-onset breast cancer in patients from Turkey. *Molecular biology reports*, 43(11), 1273-1284.
- Chae, Y. K., Anker, J. F., Carneiro, B. A., Chandra, S., Kaplan, J., Kalyan, A., ... & Giles, F. J. (2016). Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget*, 7(17), 23312.

- Cheadle, J. P., & Sampson, J. R. (2007). MUTYH-associated polyposis—from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA repair*, 6(3), 274-279.
- Chen, S., & Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(11), 1329.
- Chen, P., Liang, J., Wang, Z., Zhou, X., Chen, L., Li, M., ... & Wang, H. (2008). Association of common PALB2 polymorphisms with breast cancer risk: a case-control study. *Clinical Cancer Research*, 14(18), 5931-5937.
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2), 179-204.
- Claus, E. B., Risch, N., & Thompson, W. D. (1991). Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *American journal of human genetics*, 48(2), 232.
- Clemons, M., & Goss, P. (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 344(4), 276-285.
- Connolly, J. L., Fechner, R. E., Kempson, R. L., Livolsi, V. A., Page, D. L., Patchefsky, A. A., & Silverberg, S. G. (1996). Recommendations for the reporting of breast carcinoma. *Hum Pathol*, 27(3), 220-224.
- Conway, A. B., Lynch, T. W., Zhang, Y., Fortin, G. S., Fung, C. W., Symington, L. S., & Rice, P. A. (2004). Crystal structure of a Rad51 filament. *Nature structural & molecular biology*, 11(8), 791-796.
- Coppa, A., Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Capalbo, C., Belardinilli, F., Colicchia, V., ... & Giannini, G. (2018). Optimizing the identification of risk-relevant mutations by multigene panel testing in selected hereditary breast/ovarian cancer families. *Cancer medicine*, 7(1), 46-55.
- Couch, F. J., Nathanson, K. L., & Offit, K. (2014). Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. *Science*, 343(6178), 1466-1470.
- Couch, F. J., Hart, S. N., Sharma, P., Toland, A. E., Wang, X., Miron, P., ... & Fasching, P. A. (2015). Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 33(4), 304.
- Couch, F. J., Shimelis, H., Hu, C., Hart, S. N., Polley, E. C., Na, J., ... & Dolinsky, J. S. (2017). Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. *JAMA oncology*, 3(9), 1190-1196.
- Crawford, B., Adams, S. B., Sittler, T., van den Akker, J., Chan, S., Leitner, O., ... & van't Veer, L. (2017). Multi-gene panel testing for hereditary cancer predisposition in unsolved high-risk breast and ovarian cancer patients. *Breast cancer research and treatment*, 163(2), 383-390.
- Cui, X., Schiff, R., Arpino, G., Osborne, C. K., & Lee, A. V. (2005). Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *Journal of clinical oncology*, 23(30), 7721-7735.
- Cunniff, C., Djavid, A. R., Carrubba, S., Cohen, B., Ellis, N. A., Levy, C. F., ... & Zauber, A. G. (2018). Health supervision for people with Bloom syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 176(9), 1872-1881.
- Cybulski, K. E., & Howlett, N. G. (2011). FANCP/SLX4: a Swiss army knife of DNA interstrand crosslink repair. *Cell Cycle*, 10(11), 1757-1763.
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*, 5(10), 2929.
- Damiola, F., Pertesi, M., Oliver, J., Le Calvez-Kelm, F., Voegelé, C., Young, E. L., ... & Tavtigian, S. V. (2014). Rare key functional domain missense substitutions in MRE11A, RAD50, and NBN contribute to breast cancer susceptibility: results from a Breast Cancer Family Registry case-control mutation-screening study. *Breast Cancer Research*, 16(3), 1-16.

- Dandachi, N., Dietze, O., & Hauser-Kronberger, C. (2002). Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Laboratory investigation*, 82(8), 1007-1014.
- Decker, B., Allen, J., Luccarini, C., Pooley, K. A., Shah, M., Bolla, M. K., ... & Easton, D. F. (2017). Rare, protein-truncating variants in ATM, CHEK2 and PALB2, but not XRCC2, are associated with increased breast cancer risks. *Journal of medical genetics*, 54(11), 732-741.
- Del Vecchio, F., Mastroiaco, V., Di Marco, A., Compagnoni, C., Capece, D., Zazzeroni, F., ... & Tessitore, A. (2017). Next-generation sequencing: recent applications to the analysis of colorectal cancer. *Journal of translational medicine*, 15(1), 1-19.
- Dexheimer, T. S. (2013). DNA repair pathways and mechanisms. In *DNA repair of cancer stem cells* (pp. 19-32). Springer, Dordrecht.
- Dhankhar, R., Vyas, S. P., Jain, A. K., Arora, S., Rath, G., & Goyal, A. K. (2010). Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 38(5), 230-249.
- Dianov, G. L., & Hübscher, U. (2013). Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic acids research*, 41(6), 3483-3490.
- Dilmac, E., Ozmen, V., Duman, B., Atabekoglu, C. S., Tezel, E., Aksoy, F., ... Tezcan, Y. (2020). Meme kanseri korunma, tarama, tanı, tedavi ve izlem klinik rehberi. *T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü*, TC Sağlık Bakanlığı Yayın Numarası: 1170 ISBN: 978-975-590-771-0.
- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., ... & DiPersio, J. F. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481(7382), 506-510.
- Ding, L., Wendl, M. C., McMichael, J. F., & Raphael, B. J. (2014). Expanding the computational toolbox for mining cancer genomes. *Nature Reviews Genetics*, 15(8), 556-570.
- Dizin, E., & Irminger-Finger, I. (2010). Negative feedback loop of BRCA1–BARD1 ubiquitin ligase on estrogen receptor alpha stability and activity antagonized by cancer-associated isoform of BARD1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(5), 693-700.
- Dogan, N., & Toprak, D. (2014). Female breast cancer mortality rates in Turkey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(18), 7569-7573.
- Dong, L. I., Wu, N., Wang, S., Cheng, Y., Han, L., Zhao, J., ... & Hao, X. (2018). Detection of novel germline mutations in six breast cancer predisposition genes by targeted next-generation sequencing. *Human mutation*, 39(10), 1442-1455.
- Doren, A., Vecchiola, A., Aguirre, B., & Villaseca, P. (2018). Gynecological–endocrinological aspects in women carriers of BRCA1/2 gene mutations. *Climacteric*, 21(6), 529-535.
- Dowsett, M., Nielsen, T. O., A'Hern, R., Bartlett, J., Coombes, R. C., Cuzick, J., ... & Hayes, D. F. (2011). Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(22), 1656-1664.
- Dueva, R., & Iliakis, G. (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research*, 2(3), 163-177.
- Easton, D. F., Bishop, D. T., Ford, D., & Crockford, G. P. (1993). Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American journal of human genetics*, 52(4), 678.
- Economopoulou, P., Dimitriadis, G., & Psyrris, A. (2015). Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer treatment reviews*, 41(1), 1-8.

- Eliade, M., Skrzypski, J., Baurand, A., Jacquot, C., Bertolone, G., Loustalot, C., ... & Faivre, L. (2017). The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare: What are the implications for the management of patients and families?. *Oncotarget*, *8*(2), 1957.
- Erdem, H. B., & Bahsi, T. (2019). Multigene panel testing for hereditary breast cancer: An analysis of 70 BRCA-negative Turkish patients. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, *41*(3), 569-575.
- Erdem, H. B., & Bahsi, T. (2020). Spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations in Turkish colorectal cancer patients: a single center study. *Turkish journal of medical sciences*, *50*(4), 1015-1021.
- Erie, D. A., & Weninger, K. R. (2014). Single molecule studies of DNA mismatch repair. *DNA repair*, *20*, 71-81.
- Ethier, J. L., Ocana, A., Lescure, A. R., Ruiz, A., Alba, E., Calvo, L., ... & Martin, M. (2018). Outcomes of single versus double hormone receptor-positive breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *European journal of cancer*, *94*, 199-205.
- Fan, C., Zhang, J., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., ... & Xie, Y. (2018). RAD50 germline mutations are associated with poor survival in BRCA1/2-negative breast cancer patients. *International journal of cancer*, *143*(8), 1935-1942.
- Faraoni, I., & Graziani, G. (2018). Role of BRCA mutations in cancer treatment with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Cancers*, *10*(12), 487.
- Farmer, P., Frenk, J., Knaul, F. M., Shulman, L. N., Alleyne, G., Armstrong, L., ... & Seffrin, J. R. (2010). Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: a call to action. *The Lancet*, *376*(9747), 1186-1193.
- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E. R., Tissier, A., Coulon, S., ... & Gaillard, P. H. L. (2009). Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell*, *138*(1), 78-89.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, *136*(5), E359-E386.
- Fink, D., Aebi, S., & Howell, S. B. (1998). The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clinical Cancer Research*, *4*(1), 1-6.
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R. G., Deutsch, M., Fisher, E. R., ... & Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, *347*(16), 1233-1241.
- Ford, B. N., Ruttan, C. C., Kyle, V. L., Brackley, M. E., & Glickman, B. W. (2000). Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis*, *21*(11), 1977-1981.
- Fostira, F., Tsilaidou, M., Papadimitriou, C., Pertesi, M., Timotheadou, E., Stavropoulou, A. V., ... & Fountzilas, G. (2012). Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Breast cancer research and treatment*, *134*(1), 353-362.
- Foulkes, W. D. (2006). BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis. *Familial cancer*, *5*(2), 135-142.
- Fulk, K., LaDuca, H., Black, M. H., Qian, D., Tian, Y., Yussuf, A., ... & Jaspersen, K. (2019). Monoallelic MUTYH carrier status is not associated with increased breast cancer risk in a multigene panel cohort. *Familial cancer*, *18*(2), 197-201.
- Futaki, M., & Liu, J. M. (2001). Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex. *Trends in molecular medicine*, *7*(12), 560-565.

- Garber, J. E., Goldstein, A. M., Kantor, A. F., Dreyfus, M. G., Fraumeni, J. F., & Li, F. P. (1991). Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer research*, *51*(22), 6094-6097.
- Gatti, R. A., Boder, E., Vinters, H. V., Sparkes, R. S., Norman, A., & Lange, K. (1991). Ataxia-telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. *Medicine*, *70*(2), 99-117.
- Gavande, N. S., VanderVere-Carozza, P. S., Hinshaw, H. D., Jalal, S. I., Sears, C. R., Pawelczak, K. S., & Turchi, J. J. (2016). DNA repair targeted therapy: the past or future of cancer treatment?. *Pharmacology & therapeutics*, *160*, 65-83.
- German, J., Archibald, R., & Bloom, D. (1965). Chromosomal breakage in a rare and probably genetically determined syndrome of man. *Science*, *148*(3669), 506-507.
- Gersten, O., & Wilmoth, J. R. (2002). The cancer transition in Japan since 1951. *Demographic Research*, *7*, 271-306.
- Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y. H., Tseng, L. M., Liu, M. C., Lluch, A., ... & Valagussa, P. (2016). 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *The Lancet Oncology*, *17*(6), 791-800.
- Giuliano, A. E., Connolly, J. L., Edge, S. B., Mittendorf, E. A., Rugo, H. S., Solin, L. J., ... & Hortobagyi, G. N. (2017). Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*, *67*(4), 290-303.
- Gonzalez-Angulo, A. M., Timms, K. M., Liu, S., Chen, H., Litton, J. K., Potter, J., ... & Meric-Bernstam, F. (2011). Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *17*(5), 1082-1089.
- Goode, E. L., Ulrich, C. M., & Potter, J. D. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *11*(12), 1513-1530.
- Gradia, S., Acharya, S., & Fishel, R. (2000). The role of mismatched nucleotides in activating the hMSH2-hMSH6 molecular switch. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(6), 3922-3930.
- Guan, Y., Hu, H., Peng, Y., Gong, Y., Yi, Y., Shao, L., ... & Yi, X. (2015). Detection of inherited mutations for hereditary cancer using target enrichment and next generation sequencing. *Familial cancer*, *14*(1), 9-18.
- Guler, G., Himmetoglu, C., Jimenez, R. E., Geyer, S. M., Wang, W. P., Costinean, S., ... & Huebner, K. (2011). Aberrant expression of DNA damage response proteins is associated with breast cancer subtype and clinical features. *Breast cancer research and treatment*, *129*(2), 421-432.
- Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., & King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, *250*(4988), 1684-1689.
- Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., ... & Wolff, A. C. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Archives of pathology & laboratory medicine*, *134*(7), e48-e72.
- Hao, B., Wang, H., Zhou, K., Li, Y., Chen, X., Zhou, G., ... & He, F. (2004). Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer research*, *64*(12), 4378-4384.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*, *5*(1), 66.
- Harfe, B. D., & Jinks-Robertson, S. (2000). DNA mismatch repair and genetic instability. *Annual review of genetics*, *34*(1), 359-399.

- Harkness, E. F., Barrow, E., Newton, K., Green, K., Clancy, T., Lalloo, F., ... & Evans, D. G. (2015). Lynch syndrome caused by MLH1 mutations is associated with an increased risk of breast cancer: a cohort study. *Journal of medical genetics*, 52(8), 553-556.
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., ... & Bast Jr, R. C. (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 25(33), 5287-5312.
- Hartlerode, A. J., & Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochemical Journal*, 423(2), 157-168.
- Hasson, S. P., Menes, T., & Sonnenblick, A. (2020). Comparison of Patient Susceptibility Genes Across Breast Cancer: Implications for Prognosis and Therapeutic Outcomes. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 13, 227.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8.
- Heikkinen, K., Rapakko, K., Karppinen, S. M., Erkkö, H., Knuutila, S., Lundán, T., ... & Winqvist, R. (2006). RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. *Carcinogenesis*, 27(8), 1593-1599.
- Helzlsouer, K. J., Harris, E. L., Parshad, R., Perry, H. R., Price, F. M., & Sanford, K. K. (1996). DNA repair proficiency: potential susceptibility factor for breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 88(11), 754-755.
- Henouda, S., Bensalem, A., Reggad, R., Serrar, N., Rouabah, L., & Pujol, P. (2016). Contribution of BRCA1 and BRCA2 germline mutations to early Algerian breast cancer. *Disease markers*, 2016.
- Higgins, M. J., & Baselga, J. (2011). Novel targets and therapies for a personalized approach. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(2), 65-66.
- Hoang, L. N., & Gilks, B. C. (2018). Hereditary breast and ovarian cancer syndrome: moving beyond BRCA1 and BRCA2. *Advances in anatomic pathology*, 25(2), 85-95.
- Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475-1485.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *nature*, 411(6835), 366-374.
- Hofstatter, E. W., Domchek, S. M., Miron, A., Garber, J., Wang, M., Compositeschi, K., ... & Tung, N. (2011). PALB2 mutations in familial breast and pancreatic cancer. *Familial cancer*, 10(2), 225-231.
- Holloway, J. K., Mohan, S., Balmus, G., Sun, X., Modzelewski, A., Borst, P. L., ... & Cohen, P. E. (2011). Mammalian BTBD12 (SLX4) protects against genomic instability during mammalian spermatogenesis. *PLoS Genet*, 7(6), e1002094.
- Hong, H., Zhang, W., Shen, J., Su, Z., Ning, B., Han, T., ... & Tong, W. (2013). Critical role of bioinformatics in translating huge amounts of next-generation sequencing data into personalized medicine. *Science China Life Sciences*, 56(2), 110-118.
- Horton, R. H., & Lucassen, A. M. (2019). Recent developments in genetic/genomic medicine. *Clinical Science*, 133(5), 697-708.
- Hsieh, P., & Yamane, K. (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 129(7-8), 391-407.
- Hsieh, P., & Zhang, Y. (2017). The Devil is in the details for DNA mismatch repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(14), 3552-3554.

- Iyama, T., & Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12(8), 620-636.
- Jasin, M., & Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(11), a012740.
- Jensen, E. V., & Jordan, V. C. (2003). The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clinical cancer research*, 9(6), 1980-1989.
- Jensen, K. C., Mariappan, M. R., Putcha, G. V., Husain, A., Chun, N., Ford, J. M., ... & Longacre, T. A. (2008). Microsatellite instability and mismatch repair protein defects in ovarian epithelial neoplasms in patients 50 years of age and younger. *The American journal of surgical pathology*, 32(7), 1029-1037.
- Jeppesen, D. K., Bohr, V. A., & Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in neurobiology*, 94(2), 166-200.
- Jones, N., Vogt, S., Nielsen, M., Christian, D., Wark, P. A., Eccles, D., ... & Sampson, J. R. (2009). Increased colorectal cancer incidence in obligate carriers of heterozygous mutations in MUTYH. *Gastroenterology*, 137(2), 489-494.
- Jyothish, B., Ankathil, R., Chandini, R., Vinodkumar, B., Nayar, G. S., Roy, D. D., ... & Nair, M. K. (1998). DNA repair proficiency: a potential marker for identification of high risk members in breast cancer families. *Cancer letters*, 124(1), 9-13.
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., ... & Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), 333-339.
- Kamps, R., Brandão, R. D., Bosch, B. J., Paulussen, A. D., Xanthoulea, S., Blok, M. J., & Romano, A. (2017). Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification. *International journal of molecular sciences*, 18(2), 308.
- Kappil, M., Terry, M. B., Delgado-Cruzata, L., Liao, Y., & Santella, R. M. (2016). Mismatch repair polymorphisms as markers of breast cancer prevalence in the breast cancer family registry. *Anticancer research*, 36(9), 4437-4441.
- Kelsey, K. T., & Wiencke, J. K. (1998). Growing pains for the environmental genetics of breast cancer: observations on a study of the glutathione S-transferases.
- Keung, M. Y. T., Wu, Y., & Vadgama, J. V. (2019). PARP inhibitors as a therapeutic agent for homologous recombination deficiency in breast cancers. *Journal of clinical medicine*, 8(4), 435.
- Kim, Y., Lach, F. P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A. D., & Smogorzewska, A. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature genetics*, 43(2), 142-146.
- Kluska, A., Balabas, A., Piatkowska, M., Czarny, K., Paczkowska, K., Nowakowska, D., ... & Ostrowski, J. (2017). PALB2 mutations in BRCA1/2-mutation negative breast and ovarian cancer patients from Poland. *BMC medical genomics*, 10(1), 1-6.
- Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K., & Mardis, E. R. (2013). The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*, 155(1), 27-38.
- Konecny, G. E., & Kristeleit, R. S. (2016). PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions. *British journal of cancer*, 115(10), 1157-1173.
- Kovacs, M. E., Papp, J., Szentirmay, Z., Otto, S., & Olah, E. (2009). Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Human mutation*, 30(2), 197-203.

- Kuiper, R. P., Vissers, L. E., Venkatachalam, R., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Goossens, M., ... & Ligtenberg, M. J. (2011). Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome. *Human mutation*, 32(4), 407-414.
- Kurian, A. W., Hare, E. E., Mills, M. A., Kingham, K. E., McPherson, L., Whittemore, A. S., ... & Ford, J. M. (2014). Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. *Journal of clinical oncology*, 32(19), 2001.
- Kurian, A. W., Hughes, E., Handorf, E. A., Gutin, A., Allen, B., Hartman, A. R., & Hall, M. J. (2017). Breast and ovarian cancer penetrance estimates derived from germline multiple-gene sequencing results in women. *JCO Precision Oncology*, 1, 1-12.
- Kurian, A. W., Ward, K. C., Howlader, N., Deapen, D., Hamilton, A. S., Mariotto, A., ... & Katz, S. J. (2019). Genetic testing and results in a population-based cohort of breast cancer patients and ovarian cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15), 1305.
- Kwei, K. A., Kung, Y., Salari, K., Holcomb, I. N., & Pollack, J. R. (2010). Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Molecular oncology*, 4(3), 255-266.
- LaDuca, H., Stuenkel, A. J., Dolinsky, J. S., Keiles, S., Tandy, S., Pesaran, T., ... & Chao, E. (2014). Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. *Genetics in medicine*, 16(11), 830-837.
- Lakhani, S. R., Jacquemier, J., Sloane, J. P., Gusterson, B. A., Anderson, T. J., van de Vijver, M. J., ... & Easton, D. F. (1998). Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(15), 1138-1145.
- Lakhani, S. R., Ellis, I. O., Schnitt, S., Tan, P. H., & van de Vijver, M. (2012). WHO Classification of Tumours of the Breast.
- Laloo, F., Varley, J., Ellis, D., Moran, A., O'Dair, L., Pharoah, P., ... & Early Onset Breast Cancer Study Group. (2003). Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *The Lancet*, 361(9363), 1101-1102.
- Laloo, F., & Evans, D. G. (2012). Familial breast cancer. *Clinical genetics*, 82(2), 105-114.
- Launonen, V. (2005). Mutations in the human LKB1/STK11 gene. *Human mutation*, 26(4), 291-297.
- Lavin, M. F., Kozlov, S., Gatei, M., & Kijas, A. W. (2015). ATM-dependent phosphorylation of all three members of the MRN complex: from sensor to adaptor. *Biomolecules*, 5(4), 2877-2902.
- Le Calvez-Kelm, F., Oliver, J., Damiola, F., Forey, N., Robinot, N., Durand, G., ... & Lesueur, F. (2012). RAD51 and breast cancer susceptibility: no evidence for rare variant association in the Breast Cancer Family Registry study. *PLoS One*, 7(12), e52374.
- Lester, S. C., Bose, S., Chen, Y. Y., Connolly, J. L., de Baca, M. E., Fitzgibbons, P. L., ... & Winer, E. (2009). Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 133(10), 1515-1538.
- Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B. C., De Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W. W., ... & Joenje, H. (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature genetics*, 37(9), 934-935.
- Levrán, O., Attwooll, C., Henry, R. T., Milton, K. L., Neveling, K., Rio, P., ... & Auerbach, A. D. (2005). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nature genetics*, 37(9), 931-933.
- Li, G. M. (1999). The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis. *Oncology research*, 11(9), 393-400.

- Li, Y. T., Jiang, W. H., Wang, X. W., Zhang, M. S., Zhang, C. G., Yi, L. N., ... & Ou, J. H. (2015). PALB2 mutations in breast cancer patients from a multi-ethnic region in northwest China. *European journal of medical research*, 20(1), 1-5.
- Li, Z., Pearlman, A. H., & Hsieh, P. (2016). DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA repair*, 38, 94-101.
- Lindahl, T., & Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science*, 286(5446), 1897-1905.
- Livraghi, L., & Garber, J. E. (2015). PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC medicine*, 13(1), 1-16.
- Loeb, L. A., & Preston, B. D. (1986). Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annual review of genetics*, 20(1), 201-230.
- Londin, E., Yadav, P., Surrey, S., Kricka, L. J., & Fortina, P. (2013). Use of linkage analysis, genome-wide association studies, and next-generation sequencing in the identification of disease-causing mutations. *Pharmacogenomics*, 127-146.
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, 16(2), 110.
- Lotsari, J. E., Gylling, A., Abdel-Rahman, W. M., Nieminen, T. T., Aittomäki, K., Friman, M., ... & Peltomäki, P. (2012). Breast carcinoma and Lynch syndrome: molecular analysis of tumors arising in mutation carriers, non-carriers, and sporadic cases. *Breast cancer research*, 14(3), 1-11.
- Loveday, C., Turnbull, C., Ruark, E., Xicola, R. M. M., Ramsay, E., Hughes, D., ... & Breast Cancer Susceptibility Collaboration. (2012). Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nature genetics*, 44(5), 475.
- Loveday, C., Turnbull, C., Ramsay, E., Hughes, D., Ruark, E., Frankum, J. R., ... & Rahman, N. (2011). Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nature genetics*, 43(9), 879-882.
- Lu, F. I., Gilks, C. B., Mulligan, A. M., Ryan, P., Allo, G., Sy, K., ... & Clarke, B. A. (2012). Prevalence of loss of expression of DNA mismatch repair proteins in primary epithelial ovarian tumors. *International journal of gynecological pathology*, 31(6), 524-531.
- Lu, C., Xie, M., Wendl, M. C., Wang, J., McLellan, M. D., Leiserson, M. D., ... & Ding, L. (2015). Patterns and functional implications of rare germline variants across 12 cancer types. *Nature communications*, 6(1), 1-13.
- Lupo, B., & Trusolino, L. (2014). Inhibition of poly (ADP-ribosyl) ation in cancer: old and new paradigms revisited. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1846(1), 201-215.
- Luporsi, E., André, F., Spyrtos, F., Martin, P. M., Jacquemier, J., Penault-Llorca, F., ... & Bellocq, J. P. (2012). Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast cancer research and treatment*, 132(3), 895-915.
- Magliozzi, M., Piane, M., Torrente, I., Sinibaldi, L., Rizzo, G., Savio, C., ... & Chessa, L. (2006). DHPLC screening of ATM gene in Italian patients affected by ataxia-telangiectasia: fourteen novel ATM mutations. *Disease markers*, 22(4), 257-264.
- Maillet, P., Chappuis, P. O., Vaudan, G., Dobbie, Z., Müller, H., Hutter, P., & Sappino, A. P. (2000). A polymorphism in the ATM gene modulates the penetrance of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *International journal of cancer*, 88(6), 928-931.
- Majidinia, M., & Yousefi, B. (2017). DNA repair and damage pathways in breast cancer development and therapy. *DNA repair*, 54, 22-29.

- Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Nelson, C. E., Kim, D. H., ... & Tainsky, M. A. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250(4985), 1233-1238.
- Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(9), a012716.
- Marian, A. J. (2012). Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational Research*, 159(2), 64-79.
- Matsen, C. B., & Neumayer, L. A. (2013). Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA surgery*, 148(10), 971-980.
- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*, 81(11), 1339-46.
- Mavaddat, N., Antoniou, A. C., Easton, D. F., & Garcia-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular oncology*, 4(3), 174-191.
- Maxwell, K. N., Wubbenhorst, B., D'Andrea, K., Garman, B., Long, J. M., Powers, J., ... & Nathanson, K. L. (2015). Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. *Genetics in medicine*, 17(8), 630-638.
- McCabe, N., Turner, N. C., Lord, C. J., Kluzek, K., Białkowska, A., Swift, S., ... & Ashworth, A. (2006). Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer research*, 66(16), 8109-8115.
- Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., ... & Hanenberg, H. (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature genetics*, 42(5), 410-414.
- Metcalfe, K., Gershman, S., Ghadirian, P., Lynch, H. T., Snyder, C., Tung, N., ... & Narod, S. A. (2014). Contralateral mastectomy and survival after breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations: retrospective analysis. *Bmj*, 348.
- Michailidou, K., Lindström, S., Dennis, J., Beesley, J., Hui, S., Kar, S., ... & Ishiguro, J. (2017). Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature*, 551(7678), 92-94.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., ... & Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266(5182), 66-71.
- Minion, L. E., Dolinsky, J. S., Chase, D. M., Dunlop, C. L., Chao, E. C., & Monk, B. J. (2015). Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2. *Gynecologic oncology*, 137(1), 86-92.
- Mirzaei, H., & Schmidt, K. H. (2012). Non-Bloom syndrome-associated partial and total loss-of-function variants of BLM helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19357-19362.
- Mocellin, S., Bertazza, L., Benna, C., & Pilati, P. (2012). Circumventing melanoma chemoresistance by targeting DNA repair. *Current medicinal chemistry*, 19(23), 3893-3899.
- Moinfar, F., Beham, A., Friedrich, G., Deutsch, A., Hrzenjak, A., Luschin, G., & Tavassoli, F. A. (2008). Macro-environment of breast carcinoma: frequent genetic alterations in the normal appearing skins of patients with breast cancer. *Modern Pathology*, 21(5), 639-646.
- Mook, S., Schmidt, M. K., Rutgers, E. J., van de Velde, A. O., Visser, O., Rutgers, S. M., ... & Ravdin, P. M. (2009). Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study. *The lancet oncology*, 10(11), 1070-1076.

- Morak, M., Laner, A., Bacher, U., Keiling, C., & Holinski-Feder, E. (2010). MUTYH-associated polyposis—variability of the clinical phenotype in patients with biallelic and monoallelic MUTYH mutations and report on novel mutations. *Clinical genetics*, 78(4), 353-363.
- Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castineiras, D., Fraga, J. M., Couce, M. L., & Cocho, J. A. (2013). A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Molecular genetics and metabolism*, 110(1-2), 3-24.
- Morris, S. R., & Carey, L. A. (2007). Molecular profiling in breast cancer. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8(3), 185-198.
- Moschetta, M., George, A., Kaye, S. B., & Banerjee, S. (2016). BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Annals of Oncology*, 27(8), 1449-1455.
- Moulder, S., & Hortobagyi, G. N. (2008). Advances in the treatment of breast cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(1), 26-36.
- Moyer, C. L., Ivanovich, J., Gillespie, J. L., Doberstein, R., Radke, M. R., Richardson, M. E., ... & Goodfellow, P. J. (2020). Rare BRIP1 missense alleles confer risk for ovarian and breast cancer. *Cancer research*, 80(4), 857-867.
- Murata, H., Khattar, N. H., Gu, L., & Li, G. M. (2005). Roles of mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1 in the development of sporadic breast cancer. *Cancer letters*, 223(1), 143-150.
- Narod, S. A., & Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 665-676.
- Nasrazadani, A., Thomas, R. A., Oesterreich, S., & Lee, A. V. (2018). Precision medicine in hormone receptor-positive breast cancer. *Frontiers in oncology*, 8, 144.
- Nepomuceno, T. C., De Gregoriis, G., De Oliveira, F. M. B., Suarez-Kurtz, G., Monteiro, A. N., & Carvalho, M. A. (2017). The role of PALB2 in the DNA damage response and cancer predisposition. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1886.
- Newman, B., Austin, M. A., Lee, M., & King, M. C. (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(9), 3044-3048.
- Nguyen, G. H., Dexheimer, T. S., Rosenthal, A. S., Chu, W. K., Singh, D. K., Mosedale, G., ... & Hickson, I. D. (2013). A small molecule inhibitor of the BLM helicase modulates chromosome stability in human cells. *Chemistry & biology*, 20(1), 55-62.
- Nielsen, M., Franken, P. F., Reinards, T. H. C. M., Weiss, M. M., Wagner, A., Van der Klift, H., ... & Hes, F. J. (2005). Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *Journal of medical genetics*, 42(9), e54-e54.
- Nur Husna, S. M., Tan, H. T. T., Mohamud, R., Dyhl-Polk, A., & Wong, K. K. (2018). Inhibitors targeting CDK4/6, PARP and PI3K in breast cancer: a review. *Therapeutic advances in medical oncology*, 10, 1758835918808509.
- O'Brien, V., & Brown, R. (2006). Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis*, 27(4), 682-692.
- Ollier, M., Radosevic-Robin, N., Kwiatkowski, F., Ponelle, F., Viala, S., Privat, M., ... & Bidet, Y. (2015). DNA repair genes implicated in triple negative familial non-BRCA1/2 breast cancer predisposition. *American journal of cancer research*, 5(7), 2113.
- Olsen, J. H., Hahnemann, J. M., Børresen-Dale, A. L., Brøndum-Nielsen, K., Hammarström, L., Kleinerman, R., ... & Tucker, M. (2001). Cancer in patients with ataxia-telangiectasia and in their relatives in the nordic countries. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(2), 121-127.

- Omran, A. R. (1971). The Epidemiological Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change. *Millbank Memorial Fund Quarterly*, 49, 509-538.
- Ozmen, V. (2008). Breast cancer in the world and Turkey. *J Breast Health*, 4(2), 6-12.
- Pabalan, N., Jarjanazi, H., & Ozcelik, H. (2013). Association between BRIP1 (BACH1) polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*, 137(2), 553-558.
- Paradiso, A., & Formenti, S. (2011). Hereditary breast cancer: clinical features and risk reduction strategies. *Annals of Oncology*, 22, i31-i36.
- Paull, T. T. (2015). Mechanisms of ATM activation. *Annual review of biochemistry*, 84, 711-738.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *nature*, 406(6797), 747-752.
- Peto, J., & Mack, T. M. (2000). High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. *Nature genetics*, 26(4), 411-414.
- Pharoah, P. D., Guilford, P., Caldas, C., & International Gastric Cancer Linkage Consortium. (2001). Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, 121(6), 1348-1353.
- Phelan, C. M., Rebbeck, T. R., Weber, B. L., Devilee, P., Ruttledge, M. H., Lynch, H. T., ... & Narod, S. A. (1996). Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus. *Nature genetics*, 12(3), 309-311.
- Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation*, 117(11), 3155-3163.
- Posey, J. E. (2019). Genome sequencing and implications for rare disorders. *Orphanet journal of rare diseases*, 14(1), 1-10.
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W., & Jasin, M. (2015). Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(4), a016600.
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., ... & Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research*, 12(5), 1-18.
- Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology*, 5(1), 5-23.
- Prodosmo, A., De Amicis, A., Nisticò, C., Gabriele, M., Di Rocco, G., Monteonofrio, L., ... & Soddu, S. (2013). p53 centrosomal localization diagnoses ataxia-telangiectasia homozygotes and heterozygotes. *The Journal of clinical investigation*, 123(3), 1335-1342.
- Prodosmo, A., Buffone, A., Mattioni, M., Barnabei, A., Persichetti, A., De Leo, A., ... & Soddu, S. (2016). Detection of ATM germline variants by the p53 mitotic centrosomal localization test in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 1-10.
- Prokopcova, J., Kleibl, Z., Banwell, C. M., & Pohlreich, P. (2007). The role of ATM in breast cancer development. *Breast cancer research and treatment*, 104(2), 121-128.
- Prolla, T. A., Baker, S. M., Harris, A. C., Tsao, J. L., Yao, X., Bronner, C. E., ... & Liskay, R. M. (1998). Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nature genetics*, 18(3), 276-279. Harfe, B. D., & Jinks-Robertson, S. (2000). DNA mismatch repair and genetic instability. *Annual review of genetics*, 34(1), 359-399.

- Puhalla, S., Brufsky, A., & Davidson, N. (2009). Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with breast cancer. *The Breast*, *18*, S122-S130.
- Quezada Urban, R., Díaz Velásquez, C. E., Gitler, R., Rojo Castillo, M. P., Sirota Toporek, M., Figueroa Morales, A., ... & Vaca Paniagua, F. (2018). Comprehensive analysis of germline variants in Mexican patients with hereditary breast and ovarian cancer susceptibility. *Cancers*, *10*(10), 361.
- Rafnar, T., Gudbjartsson, D. F., Sulem, P., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., ... & Stefansson, K. (2011). Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nature genetics*, *43*(11), 1104-1107.
- Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., ... & Stratton, M. R. (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature genetics*, *39*(2), 165-167.
- Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., Baehner, F., Dabbs, D. J., Decker, T., Eusebi, V., ... & Ellis, I. O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research*, *12*(4), 1-12.
- Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2010). Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, *120*(2), 293-308.
- Ralf, C., Hickson, I. D., & Wu, L. (2006). The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *Journal of biological chemistry*, *281*(32), 22839-22846.
- Ramus, S. J., & Gayther, S. A. (2009). The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Molecular oncology*, *3*(2), 138-150.
- Raschle, M., Marra, G., Nyström-Lahti, M., Schär, P., & Jiricny, J. (1999). Identification of hMutL β , a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(45), 32368-32375.
- Ravdin, P. M., Siminoff, L. A., Davis, G. J., Mercer, M. B., Hewlett, J., Gerson, N., & Parker, H. L. (2001). Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. *Journal of clinical oncology*, *19*(4), 980-991.
- RD, W. (2005). Mitchell M. Lindahl T. Human DNA repair genes. *Mutat Res*, *577*, 275-283.
- Rebbeck, T. R., Friebel, T., Lynch, H. T., Neuhausen, S. L., van't Veer, L., Garber, J. E., ... & Weber, B. L. (2004). Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, *22*(6), 1055-1062.
- Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., ... & Rahman, N. (2007). Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nature genetics*, *39*(2), 162-164.
- Reuter, J. A., Spacek, D. V., & Snyder, M. P. (2015). High-throughput sequencing technologies. *Molecular cell*, *58*(4), 586-597.
- Rinella, E. S., Shao, Y., Yackowski, L., Pramanik, S., Oratz, R., Schnabel, F., ... & Ostrer, H. (2013). Genetic variants associated with breast cancer risk for Ashkenazi Jewish women with strong family histories but no identifiable BRCA1/2 mutation. *Human genetics*, *132*(5), 523-536.
- Roberts, M.E., Jackson, S.A., Susswein, L.R. et al. *MSH6* and *PMS2* germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med* **20**, 1167–1174 (2018). <https://doi.org/10.1038/gim.2017.254>
- Robson, M., Im, S. A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., ... & Conte, P. (2017). Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *New England Journal of Medicine*, *377*(6), 523-533.
- Rosai, J. (2011). *Rosai and Ackerman's surgical pathology e-book*. Elsevier Health Sciences.

- Sanger, F. (1983). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *80*, 2432-2436.
- Saslow, D., Boetes, C., Burke, W., Harms, S., Leach, M. O., Lehman, C. D., ... & American Cancer Society Breast Cancer Advisory Group. (2007). American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA: a cancer journal for clinicians*, *57*(2), 75-89.
- Sassi, A., Popielarski, M., Synowiec, E., Morawiec, Z., & Wozniak, K. (2013). BLM and RAD51 genes polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Pathology & Oncology Research*, *19*(3), 451-459.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., ... & Sfez, S. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, *268*(5218), 1749-1753.
- Schwartz, A. M., Henson, D. E., Chen, D., & Rajamarthandan, S. (2014). Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: a study of 161 708 cases of breast cancer from the SEER Program. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, *138*(8), 1048-1052.
- Scott, R. J., McPhillips, M., Meldrum, C. J., Fitzgerald, P. E., Adams, K., Spigelman, A. D., ... & Service, H. F. C. (2001). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds. *The American Journal of Human Genetics*, *68*(1), 118-127.
- Seal, S., Thompson, D., Renwick, A., Elliott, A., Kelly, P., Barfoot, R., ... & Rahman, N. (2006). Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nature genetics*, *38*(11), 1239-1241.
- Seemanova, E. (1990). An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, *238*(3), 321-324.
- Seemanová, E., Jarolim, P., Seeman, P., Varon, R., Digweed, M., Swift, M., & Sperling, K. (2007). Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. *Journal of the National Cancer Institute*, *99*(24), 1875-1880.
- Shadrina, A. S., Ermolenko, N. A., Boyarskikh, U. A., Sinkina, T. V., Lazarev, A. F., Petrova, V. D., & Filipenko, M. L. (2016). Polymorphisms in DNA repair genes and breast cancer risk in Russian population: a case-control study. *Clinical and experimental medicine*, *16*(1), 21-28.
- Shahbandi, A., Nguyen, H. D., & Jackson, J. G. (2020). TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines. *Trends in cancer*, *6*(2), 98-110.
- Shah, S., Kim, Y., Ostrovnyaya, I., Murali, R., Schrader, K. A., Lach, F. P., ... & Smogorzewska, A. (2013). Assessment of SLX4 mutations in hereditary breast cancers. *PloS one*, *8*(6), e66961.
- Sheikh, A., Hussain, S. A., Ghorri, Q., Naeem, N., Fazil, A., Giri, S., ... & Al Tamimi, D. M. (2015). The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *16*(6), 2177-2185.
- Shiloh, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends in biochemical sciences*, *31*(7), 402-410.
- Shimelis, H., LaDuca, H., Hu, C., Hart, S. N., Na, J., Thomas, A., ... & Couch, F. J. (2018). Triple-negative breast cancer risk genes identified by multigene hereditary cancer panel testing. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *110*(8), 855-862.
- Siegel, R., Miller, K. D., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2012. *Ca Cancer J Clin*, *64*(1), 9-29.
- Sidransky, D., Tokino, T., Helzlsouer, K., Zehnbaauer, B., Rausch, G., Shleton, B., ... & Davidson, N. (1992). Inherited p53 Gene Mutations in Breast Cancer] fr1. *Cancer research*, *52*(10), 2984-2986.

- Singh, J., Thota, N., Singh, S., Padhi, S., Mohan, P., Deshwal, S., ... & Mannan, A. U. (2018). Screening of over 1000 Indian patients with breast and/or ovarian cancer with a multi-gene panel: prevalence of BRCA1/2 and non-BRCA mutations. *Breast cancer research and treatment*, *170*(1), 189-196.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *science*, *235*(4785), 177-182.
- Slupphaug, G., Kavli, B., & Krokan, H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *531*(1-2), 231-251.
- Slupska, M. M., Baikalov, C., Luther, W. M., Chiang, J. H., Wei, Y. F., & Miller, J. H. (1996). Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *Journal of bacteriology*, *178*(13), 3885-3892.
- Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Yu, J., Klijn, J. G., ... & Martens, J. W. (2008). Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer research*, *68*(9), 3108-3114.
- Sokolenko, A. P., Iyevleva, A. G., Preobrazhenskaya, E. V., Mitiushkina, N. V., Abysheva, S. N., Suspitsin, E. N., ... & Imyanitov, E. N. (2012). High prevalence and breast cancer predisposing role of the BLM c. 1642 C> T (Q548X) mutation in Russia. *International journal of cancer*, *130*(12), 2867-2873.
- Solmaz, A. E., Yeniay, L., Gökmen, E., Zekioğlu, O., Haydaroğlu, A., Bilgen, I., ... & Onay, H. (2021). Clinical Contribution of Next-Generation Sequencing Multigene Panel Testing for BRCA Negative High-Risk Patients With Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*.
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, *98*(19), 10869-74.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., ... & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the national academy of sciences*, *100*(14), 8418-8423.
- Sotiriou, C., & Pusztai, L. (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, *360*(8), 790-800.
- Southey, M. C., Teo, Z. L., Dowty, J. G., Odefrey, F. A., Park, D. J., Tischkowitz, M., ... & Hopper, J. L. (2010). A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer. *Breast Cancer Research*, *12*(6), 1-10.
- Söderlund, K., Stål, O., Skoog, L., Rutqvist, L. E., Nordenskjöld, B., & Askmalm, M. S. (2007). Intact Mre11/Rad50/Nbs1 complex predicts good response to radiotherapy in early breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, *68*(1), 50-58.
- Steffen, J., Nowakowska, D., Niwińska, A., Czapczak, D., Kluska, A., Piątkowska, M., ... & Paszko, Z. (2006). Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *International journal of cancer*, *119*(2), 472-475.
- Stephens, P. J., McBride, D. J., Lin, M. L., Varela, I., Pleasance, E. D., Simpson, J. T., ... & Stratton, M. R. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*, *462*(7276), 1005-1010.
- Stewart, G. S., Maser, R. S., Stankovic, T., Bressan, D. A., Kaplan, M. I., Jaspers, N. G., ... & Taylor, A. M. R. (1999). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*, *99*(6), 577-587.

- Stoepker, C., Hain, K., Schuster, B., Hilhorst-Hofstee, Y., Rooimans, M. A., Steltenpool, J., ... & de Winter, J. P. (2011). SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nature genetics*, 43(2), 138-141.
- Stracker, T. H., Theunissen, J. W. F., Morales, M., & Petrini, J. H. (2004). The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA repair*, 3(8-9), 845-854.
- Stracker, T. H., & Petrini, J. H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(2), 90-103.
- Stratton, M. R., & Rahman, N. (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature genetics*, 40(1), 17.
- Su, Y., & Swift, M. (2000). Mortality rates among carriers of ataxia-telangiectasia mutant alleles. *Annals of internal medicine*, 133(10), 770-778.
- Su, Z., Fang, H., Hong, H., Shi, L., Zhang, W., Zhang, W., ... & Tong, W. (2014). An investigation of biomarkers derived from legacy microarray data for their utility in the RNA-seq era. *Genome biology*, 15(12), 1-25.
- Suhasini, A. N., & Brosh Jr, R. M. (2012). Fanconi anemia and Bloom's syndrome crosstalk through FANCD1-BLM helicase interaction. *Trends in Genetics*, 28(1), 7-13.
- Sunada, S., Nakanishi, A., & Miki, Y. (2018). Crosstalk of DNA double-strand break repair pathways in poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor treatment of breast cancer susceptibility gene 1/2-mutated cancer. *Cancer science*, 109(4), 893-899.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Susswein, L. R., Marshall, M. L., Nusbaum, R., Postula, K. J. V., Weissman, S. M., Yackowski, L., ... & Chung, W. K. (2016). Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genetics in Medicine*, 18(8), 823-832.
- Suwaki, N., Klare, K., & Tarsounas, M. (2011, October). RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 22, No. 8, pp. 898-905). Academic Press.
- Swift, M., Reitnauer, P. J., Morrell, D., & Chase, C. L. (1987). Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *New England Journal of Medicine*, 316(21), 1289-1294.
- Svendsen, J. M., Smogorzewska, A., Sowa, M. E., O'Connell, B. C., Gygi, S. P., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell*, 138(1), 63-77.
- Sy, S. M., Huen, M. S., & Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 7155-7160.
- Tan, M. H., Mester, J. L., Ngeow, J., Rybicki, L. A., Orloff, M. S., & Eng, C. (2012). Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clinical Cancer Research*, 18(2), 400-407.
- Tao, H., Shinmura, K., Hanaoka, T., Natsukawa, S., Shaura, K., Koizumi, Y., ... & Tsugane, S. (2004). A novel splice-site variant of the base excision repair gene MYH is associated with production of an aberrant mRNA transcript encoding a truncated MYH protein not localized in the nucleus. *Carcinogenesis*, 25(10), 1859-1866.
- Thompson, D., Duedal, S., Kirner, J., McGuffog, L., Last, J., Reiman, A., ... & Easton, D. F. (2005). Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(11), 813-822.

Thompson, E. R., Rowley, S. M., Li, N., McInerney, S., Devereux, L., Wong-Brown, M. W., ... & Campbell, I. G. (2016). Panel testing for familial breast cancer: calibrating the tension between research and clinical care. *Journal of Clinical Oncology*, 34(13), 1455-1459.

Tomlinson, I. P., Houlston, R. S. (1997). Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet*, 34(12), 1007-11.

Tommiska, J., Seal, S., Renwick, A., Barfoot, R., Baskcomb, L., Jayatilake, H., ... & Rahman, N. (2006). Evaluation of RAD50 in familial breast cancer predisposition. *International journal of cancer*, 118(11), 2911-2916.

Tsang, R. Y., & Finn, R. S. (2012). Beyond trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer. *British journal of cancer*, 106(1), 6-13.

Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in anatomic pathology*, 27(1), 27-35.

Tung, N., Battelli, C., Allen, B., Kaldate, R., Bhatnagar, S., Bowles, K., ... & Hartman, A. R. (2015). Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA 1 and BRCA 2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer*, 121(1), 25-33.

Tung, N., Lin, N. U., Kidd, J., Allen, B. A., Singh, N., Wenstrup, R. J., ... & Garber, J. E. (2016). Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(13), 1460.

Tung, N. M., & Garber, J. E. (2018). BRCA 1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. *British journal of cancer*, 119(2), 141-152.

Turgeon, M. O., Perry, N. J., & Poulgiannis, G. (2018). DNA damage, repair, and cancer metabolism. *Frontiers in oncology*, 8, 15.

Turner, N., Tutt, A., & Ashworth, A. (2004). Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nature reviews cancer*, 4(10), 814-819.

Uzunoglu, H., Korak, T., Ergul, E., Uren, N., Sazci, A., Utkan, N. Z., ... & Yirmibesoglu, O. (2016). Association of the nibrin gene (NBN) variants with breast cancer. *Biomedical reports*, 4(3), 369-373.

Valentin, M. D., Da Silva, S. D., Privat, M., Alaoui-Jamali, M., & Bignon, Y. J. (2012). Molecular insights on basal-like breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 134(1), 21-30.

Vargas, A. C., Reis-Filho, J. S., & Lakhani, S. R. (2011). Phenotype-genotype correlation in familial breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 16(1), 27-40.

Vasen, H. F., Möslein, G., Alonso, A., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., ... & Wijnen, J. (2007). Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Journal of medical genetics*, 44(6), 353-362.

Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., ... & Mathew, C. G. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature genetics*, 42(5), 406-409.

Veronesi, U., Cascinelli, N., Mariani, L., Greco, M., Saccozzi, R., Luini, A., ... & Marubini, E. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 347(16), 1227-1232.

Vierkoetter, K. R., Ayabe, A. R., VanDrunen, M., Ahn, H. J., Shimizu, D. M., & Terada, K. Y. (2014). Lynch syndrome in patients with clear cell and endometrioid cancers of the ovary. *Gynecologic oncology*, 135(1), 81-84.

Vogt, S., Jones, N., Christian, D., Engel, C., Nielsen, M., Kaufmann, A., ... & Aretz, S. (2009). Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology*, 137(6), 1976-1985.

- Vrieling, C., van Werkhoven, E., Maingon, P., Poortmans, P., Weltens, C., Fourquet, A., ... & Bartelink, H. (2017). Prognostic factors for local control in breast cancer after long-term follow-up in the EORTC boost vs no boost trial: a randomized clinical trial. *JAMA oncology*, 3(1), 42-48.
- Wagner, M. J. (2013). Rare-variant genome-wide association studies: a new frontier in genetic analysis of complex traits. *Pharmacogenomics*, 14(4), 413-424.
- Walsh, T., Casadei, S., Coats, K. H., Swisher, E., Stray, S. M., Higgins, J., ... & King, M. C. (2006). Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *Jama*, 295(12), 1379-1388.
- Walsh, T., Casadei, S., Lee, M. K., Pennil, C. C., Nord, A. S., Thornton, A. M., ... & Swisher, E. M. (2011). Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18032-18037.
- Walters, R., Kalb, R., Gatei, M., Kijas, A. W., Stumm, M., Sobock, A., ... & Dörk, T. (2009). Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *The American Journal of Human Genetics*, 84(5), 605-616.
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., & Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic acids research*, 34(21), 6170-6182.
- Wang, Y., Hong, Y., Li, M., Long, J., Zhao, Y. P., Zhang, J. X., ... & Huang, J. (2013). Mutation inactivation of Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS One*, 8(12), e82426.
- Wasielowski, M., Out, A. A., Vermeulen, J., Nielsen, M., van den Ouweland, A., Tops, C. M., ... & Schutte, M. (2010). Increased MUTYH mutation frequency among Dutch families with breast cancer and colorectal cancer. *Breast cancer research and treatment*, 124(3), 635-641.
- Weber-Lassalle, N., Hauke, J., Ramser, J., Richters, L., Gross, E., Blümcke, B., ... & Hahnen, E. (2018). BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Research*, 20(1), 1-6.
- Weigelt, B., Horlings, H. M., Kreike, B., Hayes, M. M., Hauptmann, M., Wessels, L. F. A., ... & Peterse, J. L. (2008). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 216(2), 141-150.
- Weigelt, B., Baehner, F. L., & Reis-Filho, J. S. (2010). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 220(2), 263-280.
- Weiss, A., Chavez-MacGregor, M., Lichtensztajn, D. Y., Yi, M., Tadros, A., Hortobagyi, G. N., ... & Mittendorf, E. A. (2018). Validation study of the American Joint Committee on Cancer eighth edition prognostic stage compared with the anatomic stage in breast cancer. *JAMA oncology*, 4(2), 203-209.
- Wendt, C., & Margolin, S. (2019). Identifying breast cancer susceptibility genes—a review of the genetic background in familial breast cancer. *Acta Oncologica*, 58(2), 135-146.
- Win, A. K., Hopper, J. L., & Jenkins, M. A. (2011). Association between monoallelic MUTYH mutation and colorectal cancer risk: a meta-regression analysis. *Familial cancer*, 10(1), 1-9.
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J. M., ... & Dowsett, M. (2018). Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 142(11), 1364-1382.

- Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., & Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science*, 291(5507), 1284-1289.
- Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., ... & Averill, D. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265(5181), 2088-2090.
- Wooster, R., & Weber, B. L. (2003). Breast and ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(23), 2339-2347.
- Wu, L. C., Wang, Z. W., Tsan, J. T., Spillman, M. A., Phung, A., Xu, X. L., ... & Baer, R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature genetics*, 14(4), 430-440.
- Wu, L., & Hickson, I. D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, 426(6968), 870-874.
- Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., ... & Livingston, D. M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular cell*, 22(6), 719-729.
- Xiao, X., Melton, D. W., & Gourley, C. (2014). Mismatch repair deficiency in ovarian cancer—molecular characteristics and clinical implications. *Gynecologic oncology*, 132(2), 506-512.
- Xie, A., Kwok, A., & Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nature structural & molecular biology*, 16(8), 814.
- Xiong, H., Liao, Z., Liu, Z., Xu, T., Wang, Q., Liu, H., ... & Wei, Q. (2013). ATM polymorphisms predict severe radiation pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 85(4), 1066-1073.
- Young, E. L., Feng, B. J., Stark, A. W., Damiola, F., Durand, G., Forey, N., ... & Tavtigian, S. V. (2016). Multigene testing of moderate-risk genes: be mindful of the missense. *Journal of medical genetics*, 53(6), 366-376.
- Young, S. J., & West, S. C. (2021). Coordinated roles of SLX4 and MutS β in DNA repair and the maintenance of genome stability. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 56(2), 157-177.
- Zaridze, D. G. (2008). Molecular epidemiology of cancer. *Biochemistry Moscow*, 73, 532-542.
- Zhang, W., Meehan, J., Su, Z., Ng, H. W., Shu, M., Luo, H., ... & Hong, H. (2014, December). Whole genome sequencing of 35 individuals provides insights into the genetic architecture of Korean population. In *BMC bioinformatics* (Vol. 15, No. 11, pp. 1-13). BioMed Central.
- Zhang, M., Liu, G., Xue, F., Edwards, R., Sood, A. K., Zhang, W., & Yang, D. (2016). Copy number deletion of RAD50 as predictive marker of BRCAness and PARP inhibitor response in BRCA wild type ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 141(1), 57-64.
- Zhuang, Z. G., Di, G. H., Shen, Z. Z., Ding, J., & Shao, Z. M. (2006). Enhanced expression of LKB1 in breast cancer cells attenuates angiogenesis, invasion, and metastatic potential. *Molecular cancer research*, 4(11), 843-849.
- Zink, D., Mayr, C., Janz, C., & Wiesmüller, L. (2002). Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase. *Oncogene*, 21(31), 4788-4800.