

ESRA İLDEMİZ ÖZALP	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DIYARBAKIR-2025
--------------------	------------------------------------	--------------	-----------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BRCA POZİTİF BİREYLERDE MYC GENİNİN ROLÜ

Esra İLDENİZ ÖZALP

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr.Öğr.Üyesi Diclehan ORAL

DİYARBAKIR-2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BRCA POZİTİF BİREYLERDE MYC GENİNİN ROLÜ

Esra İLDENİZ ÖZALP

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr.Öğr.Üyesi Diclehan ORAL

DIYARBAKIR-2025



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Esra İLDENİZ ÖZALP’ın hazırladığı “BRCA Pozitif Bireylerde MYC Geninin Rolü.” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr.Öğr.Üyesi Diclehan ORAL _____

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı	Prof.Dr .Selahattin TEKEŞ	_____
Üye	Dr.Öğr.Üyesi Diclehan ORAL	_____
Üye	Dr.Öğr.Üyesi İlyas YÜCEL	_____
Üye	Prof.Dr.Selda ŞİMŞEK	_____
Üye	Dr.Öğr.Üyesi Hasret ECEVİT	_____

Tarih: 07/11/2025

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/..../2025 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../2025

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi , bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

07.11.2025

Esra İLDENİZ ÖZALP

İMZA:

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi. Diclehan ORAL'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yanımda olan ve tezimde emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Selahattin TEKEŞ'e Doktora'ya başladığım ilk günden beri eğitimime katkı sağlayan hocalarım Prof.Dr. Mahmut BALKAN, Dr. Öğr. Üyesi.İlyas YÜCEL, Arş. Gör.Mahir BİNİCİ ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına da sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez süresince desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim Özgür ÖZALP'e ve her zaman yanımda olan maddi ve manevi her konuda daima beni motive eden ve destek olan, benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen hayatım boyunca örnek aldığım ve almaya çalışacağım sevgili annem ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.24.009 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	V
TABLolar LİSTESİ.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
1. ÖZETLER.....	IX
1.1. Türkçe Özet	IX
1.2. Abstract	X
2. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
3. GENEL BİLGİLER.....	5
3.1. Kanser	5
3.2. Meme Kanseri	6
3.2.1. Meme kanseri epidemiyolojisi	6
3.2.2. Herediter meme kanseri	8
3.3. Over Kanseri	10
3.3.1. Over kanseri epidemiyolojisi	10
3.3.2. Over kanseri risk faktörleri	11
3.4. Genetik Faktörler	12
3.4.1. Kanserde rol oynayan genler:.....	13
3.4.1.1. Onkogenler.....	13
3.4.1.2. Tümör baskılayıcı genler.....	13
3.4.1.3. DNA tamir genleri.....	14
3.4.2. Tek nükleotid polimorfizmleri	15
3.5. BRCA 1 ve BRCA 2 Gen Mutasyonlarının Kanseri Riskleri	16
3.5.1. BRCA1	17
3.5.2. BRCA2.....	19
3.6. BRCA1 ve BRCA2 İlişkili Moleküler Mekanizmalar	20
3.7. MYC Geni.....	23
3.8.1. MYC geni moleküler mekanizması	24
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
4.1. Materyal	27
4.1.1. Hasta ve kontrol grupları.....	27

4.1.2. Örneklerin alınması	28
4.2. Metod	28
4.2.1. DNA izolasyon protokolü	28
4.2.2. NGS analizi	30
4.2.3. Real Time PCR ile TaqMan genotiplleme analizi	31
4.2.3.1. TaqMan genotiplleme analizi	34
4.2.3.2. TaqMan genotiplleme analiz verileri	37
4.2.3.2.1. Hasta ve kontrol grubunun rs2070583 SNP analizi	40
4.2.3.2.2. Hasta ve kontrol grubunun rs4645943 SNP analizi	42
4.3. İstatistiksel Analiz	44
5. BULGULAR.....	46
5.1. NGS Yöntemi Sonuçları	46
5.2. MYC rs2070583 Polimorfizminin Real-Time PCR Tabanlı Analizi.....	48
5.3. MYC rs4645943 Polimorfizminin Real-Time PCR Tabanlı Analizi.....	49
6.TARTIŞMA.....	51
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
8. KAYNAKLAR.....	58
9. ÖZGEÇMİŞ.....	66
10. EKLER.....	67
Ek-1 Etik Kurul Onayı	67
Ek-2 Gönüllü Hasta Onam Formu	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Ek-3 Mezuniyet Yayın	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
11. ORJİNALLİK RAPORU.....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kanser Türleri ve Genetik Mutasyonlar ile İnsidans-Mortalite Oranları .	9
Şekil 2. Over Kanseri Risk Faktörleri.....	12
Şekil 3. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP).....	16
Şekil 4. BRCA1 mutasyonlarında ailesel kalıtım örüntüsüne bir örnek	18
Şekil 5. BRCA 1-2 bulundukları kromozom lokusları	20
Şekil 6. DNA hasarı tamirinde BRCA geninin rolü	22
Şekil 7. DNA hasar yanıtının moleküler mekanizması.....	23
Şekil 8. SYBR Green ve TaqMan probleminin gerçek zamanlı PCR’da çalışma prensibi.	33
Şekil 9. Taqman Çalışma Prensibi.....	36
Şekil 10. PCR da kullanılan boyaların idiyogramı	37
Şekil 11. RT-PCR SNP analizinde değerlendirme profili	39
Şekil 12. RT-PCR cihazında SNP genotipleme için yapılan cihaz ayarları.....	40
Şekil 13. rs2070583 Hasta Grubu SNP genotipleme sonuçları	41
Şekil 14. rs2070583 Kontrol Grubu SNP genotipleme sonuçları	42
Şekil 15. rs4645943 Hasta grubu	43
Şekil 16. rs4645943 Kontrol grubu	44

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kanseri Tipleri, Mutasyon Kaynakları ve Özellikleri	6
Tablo 2. Meme kanseri için risk faktörleri	7
Tablo 3. Kanserden sorumlu genlerin özellikleri	15
Tablo 4. BRCA1 ve BRCA2 Mutasyonu Taşıyan Bireylerde Kanseri Riskleri.....	17
Tablo 5. Floresan sinyalleri ile örnek genotipi arasındaki korelasyon.	35
Tablo 6. PCR reaksiyon mix oranı	36
Tablo 7. PCR reaksiyon sıcaklık dereceleri ve süreleri.....	37
Tablo 8. Hastalarda saptanan BRCA1 ve BRCA2 gen varyantlarının NGS analizi sonucu .	46
Tablo 9. MYC rs2070583 A>G polimorfizmi genotip ve allel dağılımları ile hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması	49
Tablo 10. MYC rs4645943 C>T polimorfizmi genotip ve allel dağılımları ile hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACMG	:	Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji
BARD1	:	BRCA1 ilişkili Halka Alanı 1
BRCA1/2	:	Breast Cancer Genes 1 and 2
BRCT	:	BRCA1 C Terminali
C-ucu	:	Karboksi terminal
DDR	:	DNA hasar yanıtı
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EGFR	:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	:	Östrojen reseptörü
GA	:	Güven aralıkları
gBRCA	:	Germ hattı BRCA
HBOC	:	Ailesel Meme ve Over Kanseri
HR	:	Homolog rekombinasyon
HWE	:	Hardy-Weinberg dengesinden
KVD	:	Kardiyovasküler hastalık
MGB	:	Minör oluk bağlayıcı
MKKH	:	Meme kanseri kök hücreleri
MTS1	:	Çoklu tümör baskılayıcı geninden
MYC	:	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
NFQ	:	Floresan içermeyen söndürücüler
NGS	:	Next-Generation Sequencing
NHEJ	:	Homolog olmayan uç birleştirme
N-ucu	:	Proteinin amino terminal
OR	:	Olasılık oranları
r	:	Korelasyon katsayısı
ROC	:	Alıcı Çalışma Karakteristiği
RT-PCR	:	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	:	Standart sapma
SNP	:	Tek nükleotid polimorfizmi
SSA	:	Single-strand annealing

Tm	:	Erime sıcaklığını
TNBC	:	Üçlü negatif meme kanseri
WT	:	Wilms tümörü



1. ÖZETLER

1.1. Türkçe Özet

BRCA Pozitif Bireylerde MYC Geninin Rolü

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Esra İLDENİZ ÖZALP

Danışmanı: Dr.Öğr.Üyesi Diclehan ORAL

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Amaç: Meme ve yumurtalık kanserleri, dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türleri arasında yer almaktadır. Her iki kanser türünde belirgin heterojenliğe sahip karmaşık hastalıklardır. Çalışmamızda, meme veya over kanseri ön tanısıyla incelenen ve BRCA(Breast Cancer Susceptibility) mutasyonu pozitif saptanan bireylerde MYC(MYC proto-onkogen) geninin olası rolünü araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Dicle Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalımıza meme veya over kanseri ön tanısı ile başvuran hastalardan alınan kan örneklerinden NGS(Next-Generation Sequencing) yöntemi ile BRCA1/2 mutasyonu analizine bakıldı. BRCA mutasyonu pozitif saptanan olguların DNA materyallerinden RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile MYC gen bölgesinde bulunan ve potansiyel olarak işlevsel iki SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi)'nin rs4645943, rs2070583 gen polimorfizmi analiz edildi. Veriler arasındaki ilişkiler istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi.

Bulgular: MYC genindeki rs2070583 lokusundaki genotip dağılımları, kontrol grubunda %100 AA, %0 AG ve %0 GG; hasta grubunda ise %97,8 AA, %2,2 AG ve %0 GG olarak belirlenmiş olup, bu polimorfizmin BRCA geni ile anlamlı bir ilişkisinin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Diğer çalışılan rs4645943 polimorfizmin genotip dağılımları ise, kontrol grubunda %15,6 CC, %84,4 CT ve %0 TT; hasta grubunda %0 CC, %100 CT ve %0 TT olarak belirlenmesi rs 4645943 tek nükleotid polimorfizmin BRCA geni ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir ($p<0,05$).

Sonuç: Çalışmamızda BRCA mutasyonu taşıyan bireylerde MYC genindeki rs4645943 C> T tek nükleotid polimorfizminde ($p<0,05$) anlamlı bir fark saptanmıştır. Bu çalışma rs4645943 C> T polimorfizmi ile BRCA arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: BRCA1/2, NGS, Meme kanseri, Yumurtalık kanseri

1.2. Abstract

The Role of the MYC Gene in BRCA Positive Results

Student's Surname and Name: Esra İLDENİZ ÖZALP

Adviser of Thesis: Asst prof . Diclehan ORAL

Department: Medical Biology

Aim: Breast and ovarian cancers are among the most common cancers in women worldwide. Both are complex diseases with significant heterogeneity. In our study, we aimed to investigate the possible role of the MYC gene in individuals who were examined with a preliminary diagnosis of breast or ovarian cancer and were found to have a positive BRCA mutation.

Materials and Methods: BRCA1/2 mutations were analyzed using NGS from blood samples collected from patients presenting to our Department of Medical Biology at Dicle University with a preliminary diagnosis of breast or ovarian cancer. DNA samples from patients with positive BRCA mutations were analyzed using RT-PCR for two potentially functional SNPs located in the MYC gene region, rs4645943 and rs2070583. Correlations between the data were evaluated using statistical methods.

Result: The genotype distributions at the rs2070583 locus in the MYC gene were determined as 100% AA, 0% AG, and 0% GG in the control group; 97.8% AA, 2.2% AG, and 0% GG in the patient group; and this polymorphism was not observed to be significantly associated with the BRCA gene ($p>0.05$). The genotype distributions of the other studied locus, rs4645943, were determined as 15.6% CC, 84.4% CT, and 0% TT in the control group; and 0% CC, 100% CT, and 0% TT in the patient group, suggesting that rs4645943 polymorphism may be associated with the BRCA gene

Conclusion: In our study, a significant difference was found in the rs4645943 C> T single nucleotide polymorphism ($p<0,05$) in the MYC gene in individuals carrying BRCA mutations. This study suggests that there may be a relationship between the rs4645943 C> T polymorphism and BRCA.

Keywords:BRCA1/2, NGS, Breast cancer, Ovarian cancer

2. GİRİŞ ve AMAÇ

Kadınlarda meme ve over kanseri, dünya genelinde en sık görülen malign tümörler arasında yer almaktadır. Bu kanserlerin görülme sıklığı tüm dünyada giderek artmakta olup, tanı konulan yaş giderek daha genç yaşlara inmektedir (1). Kadınlarda görülen tüm kanserler arasında meme kanseri, yaklaşık %25–30 oranında bir paya sahiptir. Meme kanserinin ortalama insidansı yüz binde 38–40 iken, Avrupa’da bu oran yüz binde 66–67, ülkemizde ise ortalama yüz binde 40 civarındadır (2). Uluslararası Kanser Ajansı, özellikle meme kanserindeki artışa dikkat çekmektedir (3). Bölgemizde ileri evre meme kanseri ve 40 yaş altı olguların sıklığı önemli ölçüde artış göstermektedir. Meme kanseri için başlıca risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet, ailede meme kanseri öyküsü ve genetik yatkınlık yer almaktadır (4). Meme kanseri oluşumunda birçok tümör baskılayıcı gen, onkogen ve DNA tamir mekanizmasında görev alan genler rol almaktadır. Özellikle c-Myc, EGFR, HER-2/neu, Ras ile siklin bağımlı kinazlar ve bunların inhibitörleri, kanserde etkili onkogenler arasında bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerden p53, ATM, PTEN, BRCA1 ve BRCA2 gibi bazı genlerin, meme kanseri gelişiminde rol oynadığı belirlenmiştir. Meme kanserlerinin çoğunluğu sporadik vakalar şeklinde görülmekle birlikte, olguların yaklaşık %5–10’u kalıtsal nedenli ailesel meme kanserini oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar, BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germline mutasyonların tüm ailesel kanser olgularının %40–50’sinden sorumlu olduğunu göstermiştir (5).

BRCA2 patojenik varyantı taşıyan bireylerde meme kanseri ile over kanseri riskinde belirgin bir artış gözlenmektedir. Bunun yanı sıra, daha düşük oranda prostat kanseri, pankreas kanseri ve melanom gibi diğer maligniteler için de artmış risk söz konusudur. İlgili kanserlerin gelişme riski, Ailesel Meme ve Over Kanseri (HBOC) sendromunun BRCA1 veya BRCA2 patojenik varyantından kaynaklanmasına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Over kanserinin, meme kanseri gibi kadınlarda sık görülen ve mortalitesi yüksek kanser türlerinden biri olması, bu alandaki bilimsel araştırmaların hız kazanmasına neden olmuştur (6).

Meme kanseri, genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı heterojen bir hastalıktır. Meme kanseri kök hücreleri (MKKH), farklı tümörlerin agresifliğinde temel rol oynamakta olup, aynı zamanda kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli zorluklardan birini teşkil eder. Bu hücreler, mevcut tedavilere karşı dirençli olmaları nedeniyle etkili bir tedaviye ulaşmanın önündeki en büyük engellerden biridir. Buna rağmen bazı etkili prognostik yaklaşımlar mevcuttur (7). Değiştirilebilir risk faktörlerinin ortadan kaldırılması (birincil koruma), meme kanseriyle ilişkili morbidite ve mortalitenin azaltılmasına katkı sağlayabilir. Tanı testlerini (örneğin mamografi, ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme, kendi kendine meme muayenesi gibi yöntemler) içeren ikincil koruma yaklaşımları ise, tümörlerin veya tümör gelişimine yatkın lezyonların erken teşhisinde önemli bir rol oynamaktadır (8). Over kanseri, jinekolojik kanser tanısı alan kadınlarda önde gelen ölüm nedenidir (9). Over kanseriyle ilişkili çeşitli risk faktörleri vardır. Çoğunlukla postmenopozal kadınları etkiler; burada artan yaş, artan insidans, bu hastalığın ileri evresi ve bildirilen daha düşük hayatta kalma oranları ile ilişkilidir (10). Over kanserinin en güçlü risk faktörü, ailede meme veya over kanseri öyküsünün pozitif olmasıdır; kişisel meme kanseri öyküsü de riski artırır (11). Vakaların büyük çoğunluğunun ileri evrede tanı alması, hastalığın olumsuz klinik sonuçlarına yol açmaktadır. İlk tedaviyi takiben yüksek oranda nüks gözlenmekte olup, tekrarlayan olguların çoğu daha sınırlı tedavi seçeneklerine yanıt verebilmekte ve tedavi başarısızlıklarının sıklığı artmaktadır. Bu nedenle, önlem ve erken tespit stratejilerinin geliştirilmesi ile birlikte söz konusu kanserin moleküler karakterizasyonunun daha iyi anlaşılmasına dayalı yeni tedavi yaklaşımlarına günümüzde ihtiyaç duyulmaktadır (10). Birçok epidemiyolojik çalışma, pozitif aile öyküsü ile ilişkili kanser riskini belirlemeye odaklanmış ve bazı araştırmalar ailesel kümelenmeye işaret etmiştir. BRCA1 ve BRCA2 başta olmak üzere belirli genlerin, genetik yatkınlıkta önemli rol oynadığı saptanmıştır (12).

Genetik yatkınlık, özellikle son yıllarda meme kanseri etiyolojisinde önemli bir faktör olarak vurgulanmaktadır. Herediter meme ve over kanseri sendromlarından sorumlu başlıca tümör süpresör genler BRCA1 ve BRCA2'dir. Bu genler, DNA hasarına karşı gelişen hücresel yanıtta görev alan proteinleri kodlamakta, hücre

döngüsünde negatif regülatör olarak işlev görmekte ve neoplastik progresyonu aktif biçimde inhibe etmektedirler (13).

BRCA1 ve BRCA2 genleri normal genetik yapının bir parçası olarak tüm bireylerde bulunmakla birlikte, kanser riski açısından yüksek risk grubunda yer alan kişilerde bu genlerde patojenik mutasyonlar mevcuttur. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar, heterozigot taşıyıcılar için hem meme hem de over kanseri açısından güçlü bir predispozan faktör olarak kabul edilmektedir. BRCA1/2 genlerinin penetransı mutasyon tipine göre oldukça değişkenlik göstermektedir. Sporadik over kanserlerinde, BRCA1 ekspresyonunda azalma olduğu rapor edilmiştir (14).

BRCA1/2 mutasyon taşıyıcıları için 70 yaşına kadar over kanseri geliştirme riski %11–40 arasında hesaplanmıştır. Borderline over tümörlerinde ise BRCA mutasyonu saptanmamıştır (15). Genetik temel, tümör süpresör ve DNA onarım genlerindeki mutasyonel inaktivasyon ile ilişkilidir. Bu genlerdeki mutasyonlar mendelyen kalıtım paterni izler ve sıklıkla hedef organlar olan meme ve over için belirgin bir kanser riski oluştururlar (12). Bu genlerden biri olan MYC proto-onkogen ailesi, en çok çalışılan onkogenlerden biridir (16). MYC, tüm insan kanserlerinin yaklaşık %70'inde aktive olmakta ve hücre proliferasyonunu teşvik etme ile hücrel farklılaşmayı engelleme gibi malign özellikleri düzenleyen insan genlerinin yaklaşık %10'unu kontrol etmektedir (17). MYC'nin deregülasyonu, prostat kanseri ve meme kanseri dahil olmak üzere çok çeşitli insan kanserlerinde tespit edilmiştir (18,19). MYC'deki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler), proteinin yapısında ve işlevinde değişikliklere ve ayrıca MYC ekspresyon seviyelerinde farklılıklara yol açarak kanser duyarlılığına katkıda bulunması muhtemeldir (19,20). Birkaç çalışma, kolorektal, prostat ve meme kanserinde 8q24 kromozomu üzerinde çok sayıda SNP'nin kanser duyarlılığı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, mevcut literatürde meme ve over kanseri ile MYC SNP'leri arasında olası ilişkiler hakkında herhangi bir rapor bulunmamaktadır (21,22).

Çalışmamızın amacı, meme kanseri ve over kanseri hastalarında BRCA pozitif bireylerde MYC geninin rolünü araştırmaktır. Anabilim dalımıza meme veya over kanseri tanısıyla başvuran ve NGS yöntemi ile BRCA pozitifliği saptanmış hastaların DNA örnekleri üzerinden, RT-PCR yöntemi ile MYC bölgesindeki potansiyel olarak

işlevsel iki tek nükleotid polimorfizminin (rs4645943 C>T ve rs2070583 A>G) ilişkisi incelenmiş ve elde edilen bulgular ışığında literatüre katkı sağlanması hedeflenmiştir.



3. GENEL BİLGİLER

3.1. Kanser

Kanser, dünya çapında yüksek ölüm oranına sahip önemli bir hastalık olup giderek artan bir sıklıkta yayılmaya devam etmektedir. Durum o kadar endişe verici ki, her dört kişiden biri yaşam boyu kanser riski taşımaktadır (23). Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğaldığı ve daha sonra da yayılım gösterdiği bir hastalık olarak karakterize edilmektedir (24). Normal hücrelerimizin belirli bir ömrü vardır. Hücre büyümesi, çoğalması ve apoptozu arasında kritik bir denge vardır. Bu denge genetik bir kusurla bozulabileceği gibi kanser oluşumunu tetikleyen ajanlarla da bozulabilir. Bu hücrel bozulma sonucunda artan hücre kitlesi, artan metabolik ihtiyaçlarını karşılayabilmek için mevcut damarlar aracılığıyla yeni damar oluşumunu tetikler. Bu olay anjiyogenez olarak tanımlanmaktadır. Anjiyogenez, kanser progresyonu ve metastazda kritik bir rol oynar. Kanserde anjiyogenezin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, kanser tedavisi açısından yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (25). Bazı kanser türleri tedavi edilebilmekte, bazıları ise hastanın yaşam süresi uzatılarak kronik bir süreçte dönüştürülmektedir. Kanser tedavisinde çoğunlukla kemoterapi, radyoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır fakat toksisite profilleri nedeniyle sınırlılıkları olduğundan, kanserin klinik yönetimi hala zorlu bir süreç olmaya devam etmektedir. İnsanda görülen kanserlerin yalnızca %7'si kalıtsal iken %93'ü kalıtsal olmayan çevresel faktörlerle etkileşim sonucu ortaya çıkmaktadır (24,26).

Bir kanserin evrimini etkileyebilecek çeşitli faktörler vardır. Bunlar çoğunlukla sağlıksız yaşam tarzı, kötü beslenme alışkanlıkları, genetik veya epigenetik kanser için temel risk faktörleridir. Kalıtsal kanser sendromlarının çoğunda genetik faktör rol almaktadır. Kanser, birden fazla dış etkenin ve iç genetik değişikliklerin bir araya gelmesiyle ortaya çıkabilen genetik bir hastalıktır (27). Bu kötü huylu hastalığın hücrel düzeyde gelişimi, DNA'da meydana gelen somatik mutasyonlarla başlar ve ardından kanserojen faktörlere maruz kalma süreciyle ilerler. Bu somatik mutasyonlar, bazı genlerin yer değiştirmesi (translokasyon) ve aktivitesinin artması (amplifikasyon) gibi olayları içerir; bu da “yeniden yapılandırılmış genler” olarak adlandırılan genetik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu yeniden

yapılandırılmış genler genellikle proto-onkogenler olarak tanımlanır. Oluşan genetik hasar, hücrelerin aşırı çoğalmasıyla birlikte büyük ölçüde geri döndürülemez hale gelir (26). Kanserin genetik olarak üç ana sınıfa ayrıldığı, Tablo 1’de gösterilmektedir (28,29).

Tablo 1. Kanseri Tipleri, Mutasyon Kaynakları ve Özellikleri

Kanser Tipi	Mutasyon Kaynağı	Oran (%)	Özellikleri
Kalıtsal Kanser	Germline mutasyon	Yaklaşık 5–10 %	Erken yaşta, belirli sendromlarla ilişkili, aile geçmişi pozitif
Sporadik Kanser	Somatik mutasyon (edinseldir)	Yaklaşık 90–95 %	Yaşam süreci içinde gelişir, çevresel ve rastgele faktörlerle bağlantılı
Ailesel (Familial) Kanser	Paylaşılan genetik/çevresel etkiler	%10–15 arasında değişen olasılık	Genetik belirteç tanımlamasının yetersiz kaldığı aile öyküleri

3.2. Meme Kanseri

3.2.1. Meme kanseri epidemiyolojisi

Dünya genelinde kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında meme kanseri ilk sıralarda yer almaktadır. Epidemiyolojik verilere göre meme kanseri, giderek daha erken yaşlarda görülmekte olup kanser tanısı alan her dört kadından birinde saptanmaktadır. Bununla birlikte, meme kanserine bağlı mortalite oranları ülkeler ve bölgeler arasında belirgin farklılıklar göstermektedir (30,31). Ülkemizde meme kanseri insidansı yüz binde 40 olarak bildirilmektedir ve her yıl yaklaşık 15.000 kadın meme kanseri tanısı almaktadır (32). Diğer ülkelerde bu oran; Orta Afrika ve Doğu Asya’da 100.000 kişide yaklaşık 27 olarak bildirilirken, Kuzey Amerika’da bu oran 100.000 kişide 92’ye kadar çıkmaktadır. Az gelişmiş bölgelerde kansere bağlı ölümler arasında meme kanseri birinci sırada yer almaktadır. Bunun başlıca nedeni, bu bölgelerde meme kanserinin tanı ve tedavisine yönelik yeterli sağlık olanaklarının bulunmamasıdır. Oysa meme kanserinin düzenli takibi ve uygun tedavi süreci, hastalığın seyrini olumlu yönde etkileyen kritik bir faktördür. Diğer taraftan, genetik çalışmalardaki artış, bu tür genetik hastalıkların tedavisi açısından umut verici gelişmelere olanak sağlamaktadır (33).

Meme kanserinin etiyolojisinde rol oynayan risk faktörlerine bakıldığında aile öyküsü ön plana çıkmaktadır. Ailede meme kanseri öyküsünün bulunması, özellikle etkilenen birey sayısının artması ve hastalık tanısının daha genç yaşlarda konulması durumunda, meme kanseri riskini belirgin şekilde artırmaktadır. Özellikle meme kanseri başta olmak üzere bazı kalıtsal kanser türlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için moleküler mekanizmaların belirlenmesi ve moleküler düzeyde çalışmalar yapılması gerekmektedir (34). Meme kanserinin etiyolojisinde rol oynayan risk faktörleri Tablo 2’ de gösterilmektedir (35).

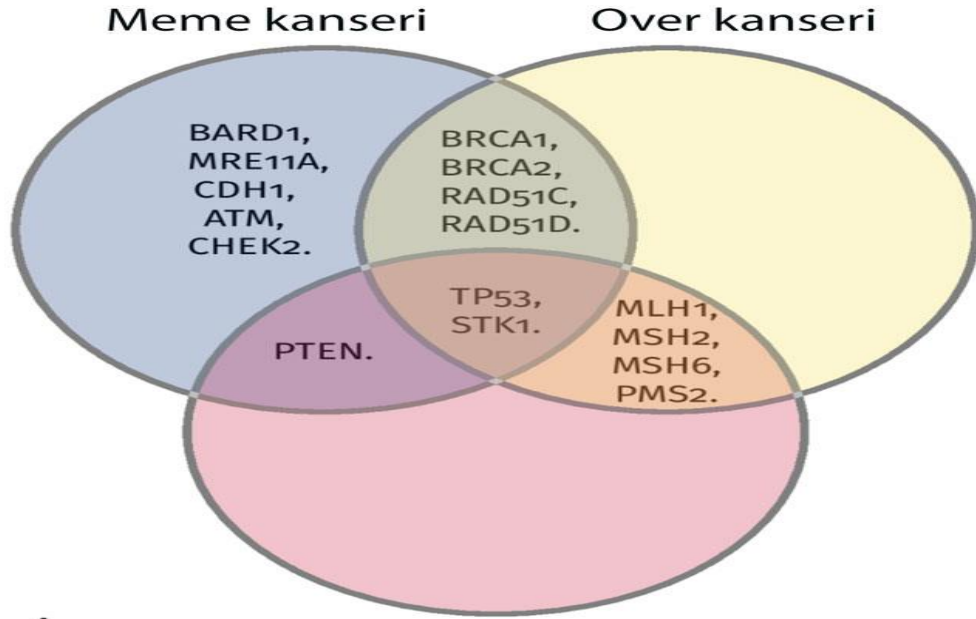
Tablo 2. Meme kanseri için risk faktörleri

Risk Düzeyi	Meme kanseri için risk faktörleri
Çok Yüksek Risk	BRCA1/2 mutasyonu
	Lobüler karsinoma in situ
	Hereditör meme kanseri özellikleri taşıyan 1. dereceden aile ferdi
	Göğüs boşluğuna yönelik iyonize radyasyon
	Multifokal atipik duktal hiperplazi / atipik lobüler hiperplazi
Yüksek/Artmış Risk	İleri yaş
	Yakın akrabada meme kanseri
	Diğer memede invaziv kanser veya duktal karsinoma in situ
	Tek odakta atipik duktal hiperplazi / atipik lobüler hiperplazi
Ortalama/Düşük Risk	Erken menarş
	Geç menopoz
	35 yaş üzeri ilk doğum yaşı
	Hormon replasman tedavisi
	Nulliparite
	Emzirmeme
	Alkol
	Sedanter yaşam
	Obezite
	İntraduktal papillom
	Şiddetli epitelyal hiperplazi

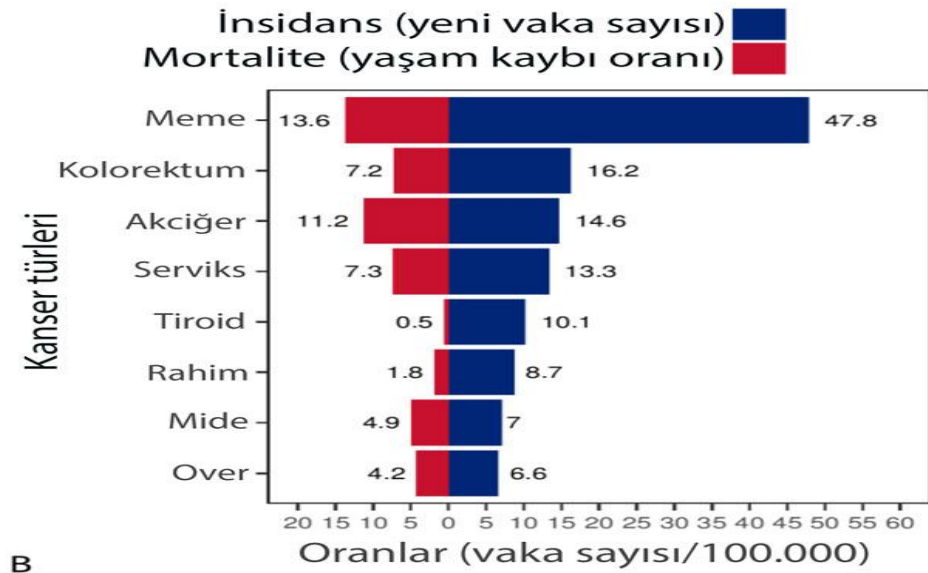
3.2.2. Herediter meme kanseri

Kalıtsal faktörler, meme kanseri riskinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Kalıtsal meme kanseri, ailede çok sayıda meme kanseri veya ilişkili diğer kanserlerin görülmesi ile karakterizedir ve genellikle genel popülasyona kıyasla daha erken yaşta ortaya çıkar. Ailede beklenenden fazla sayıda meme kanseri vakasının bulunması, genetik bir etyoloji olasılığını düşündürür. Bu durumda, meme kanseri ile ilişkili genlerin değerlendirilmesi önem taşır. Söz konusu genler BRCA1 ve BRCA2 genleri olup meme kanserlerinin yaklaşık %20'si bu genlerdeki patojenik varyantlardan kaynaklanmaktadır (36). Bu patojenik varyantı taşıyan bireyler, genel popülasyona kıyasla daha yüksek kanser riski altındadır. Kalıtsal yatkınlık; erken tanı yaşı, aile öyküsünde bilateral tutulumun yüksek insidansı ve diğer maligniteler ile birliktelik gösterebilir (37). Sporadik meme kanseri ise somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonların kademeli birikimi ile oluşur. BRCA1/2 mutasyonları sporadik olgularda nadiren görülür; bu tür vakalarda daha çok MYC, CCND1 ve HER2/neu gibi onkogenler rol oynamaktadır (38).

BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarının büyük bir kısmı kalıtsal (germline) mutasyonlar olarak ortaya çıkmaktadır. BRCA1 ve BRCA2 genleri tümör baskılayıcı genler olup, kodladıkları proteinlerin DNA tamirinde görev aldığı bilinmektedir. Bu sayede genomik stabilitenin korunmasına önemli katkı sağlarlar. Ayrıca bu görevleri gerçekleştirebilmek için çeşitli genler ve proteinlerle etkileşim hâlinde dirler. Ancak bu genlerde mutasyonların ortaya çıkması, DNA tamir mekanizmalarının işlev kaybına yol açarak genomik instabiliteye neden olmakta ve sonuç olarak kanser gelişimine yol açmaktadır. Bu tür patojenik varyantları taşıyan kadınlarda, yaşam boyu meme kanseri riski %80'e, over kanseri riski ise %20–40'a kadar çıkmaktadır (39). Şekil 1'de Meme ve over kanseri ile ilişkili ortak genler ve bu genlerin görülme oranları verilmiştir.



A Endometrium (rahim) kanseri



Şekil 1. Kanser Türleri ve Genetik Mutasyonlar ile İnsidans-Mortalite Oranları .

Üç farklı kanser türü ile ilişkili genetik mutasyonların dağılımını gösteren Venn diyagramı incelendiğinde; mavi renkli sol daire meme kanseri ile ilişkili genleri (BARD1, MRE11A, CDH1, ATM, CHEK2), sarı renkli sağ daire over kanseri ile ilişkili genleri (BRCA1, BRCA2, RAD51C, RAD51D), pembe renkli alt daire endometriyal kanseri ile ilişkili genleri (PTEN, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) göstermektedir. Diyagramın kesişim bölgeleri birden fazla kanser türü ile ilişkili genleri göstermektedir. Örneğin, BRCA1 ve BRCA2 hem meme hem de over kanseri

riskini artıran genlerdir. Farklı kanser türlerinde insidans ve mortalite oranlarını gösteren grafikte ise mavi sütunlar insidans oranlarını kırmızı sütunlarsa mortalite oranlarını göstermekte olup, bu durum Şekil 1’de sunulmuştur (40).

3.3. Over Kanseri

Over kanseri, dünya genelinde kadınlarda insidans açısından sekizinci sırada, kansere bağlı ölümler açısından ise beşinci sırada yer almakta olup, her yıl yaklaşık 300.000 kadını etkilemekte ve 152.000’den fazlasının ölümüne yol açmaktadır. Kanser hastalarının sayısı her geçen yıl artmakta olup, bu oranlar hastalığın kadın sağlığı ve yaşam süresi üzerindeki ciddi tehdidini ortaya koymaktadır. Over kanserinin kötü prognozunun başlıca nedeni, genellikle spesifik semptomların ve etkili biyobelirteçlerin eksikliğine bağlı olarak tanının ileri evrede konulmasıdır. Küresel insidans %3,4 ve mortalite %4,7 olup, geç tanı bu yüksek ölüm oranlarının en önemli belirleyicisidir (41).

3.3.1. Over kanseri epidemiyolojisi

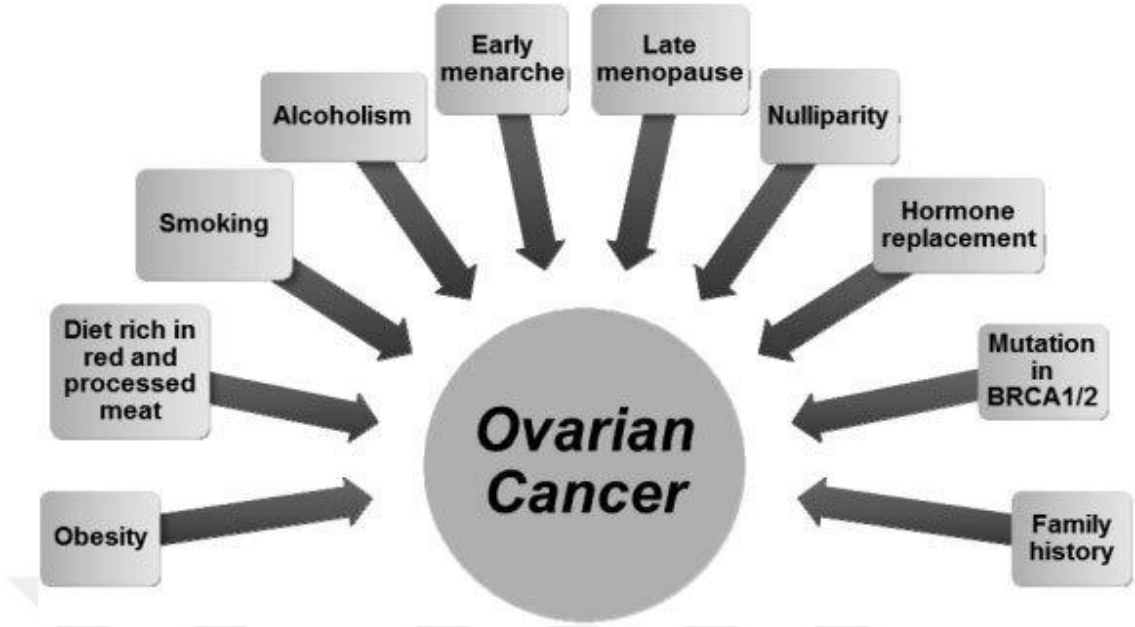
Küresel epidemiyolojik raporlar, over kanserinde istikrarlı bir artış olduğunu göstermektedir. Over kanserinin görülme sıklığı, ülke ve etnik kökene göre farklılık arz etmektedir. 2022 yılında yaklaşık 314.000 yeni vaka bildirilmiş olup, bu rakam tüm kadın kanser vakalarının yaklaşık %3,4’ünü oluşturmaktadır. Aynı yıl içinde yaklaşık 207.000 kadın over kanseri nedeniyle yaşamını yitirmiş ve bu durum kanser kaynaklı ölümlerin %4,4’üne karşılık gelmiştir. Over kanseri vakalarının en yüksek görüldüğü ülkeler ise Çin, Hindistan ve ABD olarak rapor edilmiştir (42). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından üretilen GLOBOCAN 2020 Türkiye verilerine göre, yaşa bağlı standardize insidans oranı yaklaşık 6,5/100.000 kadın olup, yılda ortalama 4.059 yeni over kanseri vakası görülmektedir. Bu veriler, over kanserinin hem küresel hem de ulusal ölçekte kadın sağlığı için önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu ortaya koymaktadır (43).

Over kanseri vakalarının çoğu menopoz sonrası dönemde ortaya çıkmakta olup, genellikle 55–70 yaş aralığındaki kadınları etkilemektedir. En yüksek görülme sıklığı 55–59 yaşları arasında kaydedilmiştir (44). Over kanserinin semptomları çoğunlukla spesifik olmadığından, hastalığın erken evrede tespitini sağlayacak etkili bir tarama yöntemi mevcut değildir. Tedavi yaklaşımı genellikle cerrahi, kemoterapi ve

radoterapinin tek başına veya kombine olarak uygulanmasını içermektedir. Günümüzde, over kanserinin biyolojisi, kalıtsal formlarının genetik temeli, hastalığın evreleri ile sitoredüktif cerrahi ve kemoterapinin rolü konusunda daha kapsamlı bir bilgi birikimine sahibiz. Bu gelişmeler, tanı sonrası 5 yıllık sağkalım oranlarının artmasına katkı sağlamaktadır. Artan bilimsel kanıtlar, kanser gelişiminde genetik faktörlerin önemli rol oynadığını göstermektedir. Özellikle BRCA1/2 genindeki mutasyonların, over kanseri gelişme riskini anlamlı ölçüde artırdığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra, polimorfik varyantlar gibi diğer genetik değişikliklerin de hastalık riskini artırmadaki rolleri halen araştırılmaktadır (45).

3.3.2. Over kanseri risk faktörleri

BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonların taşıyıcısı olmak, over kanseri açısından en iyi bilinen risk faktörlerinden biridir. Tüm over kanserlerinin yaklaşık %10–15'i, bu genlerdeki kalıtsal mutasyonlarla ilişkili genetik bir temele dayanmaktadır. BRCA1 mutasyonu taşıyan bireylerde yaşam boyu over kanseri geliştirme riski yaklaşık %44 iken, BRCA2 mutasyonu taşıyanlarda bu risk yaklaşık %17 olarak bildirilmektedir (46,47). Yumurtalık kanseri için bilinen diğer risk faktörleri arasında yaş, obezite, erken menarş, geç menapoz, üreme geçmişi, aile geçmişi, hormon replasman tedavisi ve sigara kullanımı yer alır (48). Over kanseri için risk faktörleri Şekil 2'de gösterilmektedir.



Şekil 2. Over Kanseri Risk Faktörleri (48)

BRCA1/2 gen mutasyonu taşıyıcısı olan kişilere düzenli tıbbi takip ve görüntüleme yöntemleri ile izlem önerilmektedir. Yüksek riskli ailelerin takibinde, ilk aşama olarak meme ve over kanseri geliştirme riski taşıyan bireylerin belirlenmesi hedeflenir. Bu süreçte ayrıntılı bir aile öyküsü alınır ve tıbbi gereklilikler doğrultusunda genetik testler uygulanır. İkinci aşamada ise, kalıtsal olarak yüksek risk taşıyan kadınlara multidisipliner uzman bakımı sağlanır. Bu kapsamda, koruyucu cerrahi (profilaktik mastektomi ve salpingo-ooforektomi) uygulanması, hem meme hem de over kanseri gelişme riskini anlamlı ölçüde azaltmaktadır. Genel kadın sağlığı açısından her kadının düzenli olarak jinekolojik muayene yaptırması büyük önem taşımaktadır. Bu kontroller, yumurtalıklar ve çevre dokulardaki olası şekil ve boyut değişikliklerinin erken tespiti açısından kritik rol oynamaktadır (49).

3.4. Genetik Faktörler

Son yıllarda gerçekleştirilen moleküler genetik ve gen analizlerine yönelik çalışmalar, kanserin temelde genetik bir hastalık olduğunu ortaya koymuştur. Hücresel çoğalma, genetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmekte olup; çevresel mutajenler, somatik mutasyonlar ve ailesel yatkınlık faktörleri kanser gelişimi ile

yakından ilişkilidir. Günümüze kadar, kanser oluşumunun genetik mekanizmalarını açıklamaya yönelik moleküler genetik çalışmalar, kanser gelişiminde üç temel gen sınıfının kritik rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, tümör oluşum sürecinin temelini oluşturmaktadır (50).

3.4.1. Kanserde rol oynayan genler:

1. Onkogenler
2. Tümör baskılayıcı (supresör) genler
3. DNA tamir (onarım) genleridir (50).

3.4.1.1. Onkogenler

Proto-onkogenler, normal hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve apoptozisi için alınan iletileri hücre membranından başlayarak çekirdeğe kadar sürdüren bir taşıma mekanizmasından sorumlu genlerdir. Protoonkogenlerin aktive olma aşaması mutasyonlar aracılığı ile gerçekleşir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda onkogenler oluşur. Onkogenler, hücre çoğalmasının kontrolsüz hâle gelmesine yol açarak tümör oluşumuna, dolayısıyla kansere neden olabilir. Meme kanseri oluşumunda rol oynayan çeşitli onkogenler tanımlanmıştır. Bunlar arasında HER-2/neu, c-myc, c-myb, c-jun, bcl-1, H-ras, ER, siklin ve RAR- α gibi genler yer almaktadır (50,51). Bu onkogenlerin aktivasyonu, kanserin daha agresif seyretmesine ve kötü prognoza neden olabilmektedir.

3.4.1.2. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genler, tıpkı proto-onkogenler gibi hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynayan proteinleri kodlar. Bu genlerin kodladığı proteinler, genellikle DNA hasarı gibi hücresel streslere yanıt olarak hücre büyümesini inhibe eder, hücre döngüsünü durdurur veya apoptozu başlatır (50). Proto-onkogenlerin aksine, tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını baskılayıcı bir işlev görür. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, kontrolsüz hücre büyümesine ve sonuç olarak kansere neden olabilir. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, meme kanseri oluşumunda da bu tür mutasyonlar önemli rol oynamaktadır. Meme kanserlerinin

yaklaşık %10–15'i kalıtsal olup, bu vakaların büyük kısmında tümör baskılayıcı gen mutasyonları saptanmaktadır (52). Kalıtsal meme kanseri olan kadınların yaklaşık yarısında BRCA1, üçte birinde ise BRCA2 gen mutasyonu tespit edilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 genlerine ek olarak; TP53, PTEN, CHEK2, ATM, FHIT, nm23, p16 (MTS1), Rb1, DCC, FOXP1 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların da kalıtsal meme kanseri gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (50,52). Ayrıca, TP53 ve Rb1 gibi bazı tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar yalnızca kalıtsal meme kanseri ile değil, sporadik (edinsel) meme kanseri ile de ilişkilidir. Bununla birlikte, HRAS1, NAT1, GSTM1, GSTP1, CYP1A1, CYP1B1, PR, AR ve APO E gibi diğer genetik değişimlerin de meme kanseri gelişiminde etkili olabileceği bildirilmektedir (50).

3.4.1.3. DNA tamir genleri

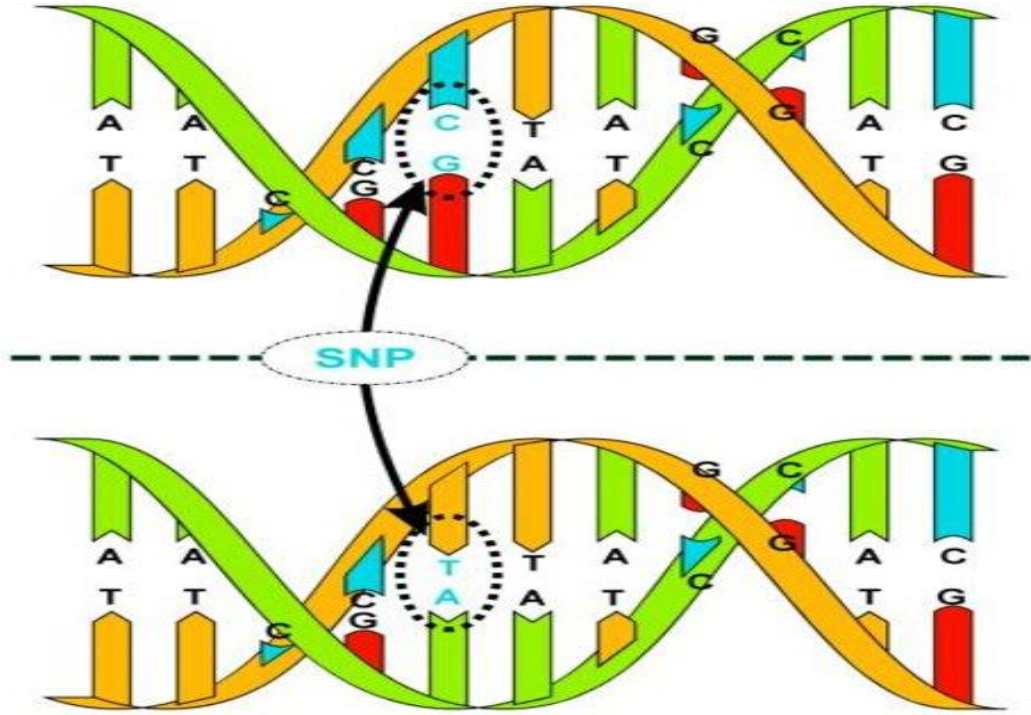
DNA tamir genleri, hücrede meydana gelen DNA hasarlarının onarılmasından sorumludur. Bu genlerde oluşan mutasyonlar, DNA hasarlarının birikmesine ve genetik kararsızlık gelişimine yol açarak kanserleşme sürecini destekler. DNA tamir mekanizmasının bozulması, yalnızca kendi içinde kalmayıp, proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler gibi diğer önemli gen gruplarında da mutasyon sıklığını artırır. Bu durum, hücre genomunda mutator fenotip olarak adlandırılan genetik bir istikrarsızlık yaratır ve zincirleme mutasyonlar yoluyla bireyde kansere yatkınlık gelişmesine neden olur. DNA tamir genleri, kanserleşmenin biyolojik mekanizmasında kilit rol oynamaktadır. Özellikle son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar, meme kanseri oluşumunda önemli yeri olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinin yalnızca tümör baskılayıcı işlevleriyle değil, aynı zamanda DNA onarımında görev alan genler olduklarını da ortaya koymuştur. Ayrıca BRCA1'in, BAP1 adlı bir DNA tamir geni ile ilişkili olduğunda gösterilmiştir (50,53). Kanser gelişiminde rol oynayan genlerin temel işlevlerine ilişkin bilgiler Tablo 3'te özetlenmiştir (29).

Tablo 3. Kanserden sorumlu genlerin özellikleri

Kanser Genleri				
Genin türü	Normal fonksiyonu	Mutasyon durumunda fonksiyonu	Protein çeşitleri	Örnek
Onkogenler	Bölünmeyi tetikler	Anormal bölünme hızı veya normalde bölünmeyen bir hücrede bölünmenin tetiklenmesi	Büyüme faktörleri	RAS, BRAF, MYC
Tümör baskılayıcı genler	Hücre bölünmesini baskılar	Bölünmeyi baskılamayı başaramaz	Kontrol noktası molekülleri	P53
DNA tamir genleri	DNA mutasyonlarını tamir etme	DNA mutasyonları tamir edilemez	Hatalı eşleşme için enzimler veya eksizyon onarımı	BRCA

3.4.2. Tek nükleotid polimorfizmleri

Polimorfizm, bir popülasyonda %1'den daha yüksek sıklıkla gözlenen kalıcı genetik değişikliklerdir. Bu değişiklikler, genin belirli bir allelinde meydana gelir ve popülasyonlar arasında genetik çeşitliliğin oluşmasına katkı sağlar. Genetik polimorfizmler, başlıca tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) ile mini ve mikrosatellit dizisi polimorfizmleri olarak sınıflandırılmaktadır. SNP, DNA diziliminde tek bir bazın (A, T, C veya G) varyasyonu ile karakterize edilen bir polimorfizm türüdür. Bu varyasyonlar, ya farklı bireyler arasında ya da aynı bireyin homolog kromozomları arasında görülebilir. Tek nükleotid polimorfizmleri, yalnızca bireyler arası genetik farklılıkları değil, aynı zamanda kanser riskinde ve tedavi yanıtlarında da farklılıkları belirleyebilir. Bu polimorfizmler, ilaçların taşınması, metabolizması, dokuya dağılımı ve atılımı gibi farmakokinetik süreçlerde önemli rol oynar. Özellikle hormon reseptörlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmler, farklı etnik gruplarda üreme faktörlerindeki farklılıklar ve over kanseri riskinin artışı ile ilişkilendirilmiştir (54). Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) örneği Şekil 3' te gösterilmiştir.



Şekil 3. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) (55)

3.5. BRCA 1 ve BRCA 2 Gen Mutasyonlarının Kansere Riskleri

BRCA1 ve BRCA2 genleri homolog rekombinasyon (HR) yoluyla çift sarmallı DNA kırıklarının onarımında görev alan BRCA1 ve BRCA2 proteinlerini kodlayan tümör baskılayıcı genlerdir ve genomik stabilitenin korunmasında kritik rol oynar (36). Fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için birçok gen ve proteinle etkileşim gösterirler. BRCA1 ve BRCA2 genleri her ikisi de 80 kb'den uzun olan büyük genlerdir ve kodlama bölgelerinde yüzlerce farklı mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyonlar nedeniyle bu fonksiyonların kaybedilmesi kanser gelişimine yol açar. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5–15'ini oluşturur. Ayrıca BRCA2 mutasyonu erkek meme kanseri ile daha sık ilişkilendirilirken, BRCA2 kaynaklı meme kanserleri BRCA1'e kıyasla daha sık östrojen reseptörü (ER) pozitifliği göstermektedir. Yüksek riskli meme kanseri genlerindeki tekli mutasyonlar, bazı ailelerde artmış kanser riskinin temel nedeni olarak bildirilmektedir (56).

BRCA1 ve BRCA2 dışındaki genlere bağlı herediter yatkınlıklar, daha düşük sıklıkta gözlemlenmektedir (39). Bu nedenle genetik testlerin uygulanması zordur ve

genellikle güçlü aile öyküsü olan bireyler veya belirli etnik gruplarla sınırlıdır; örneğin, Aşkenazi Yahudilerinde %2–3 oranında üç spesifik mutasyon (ikisi BRCA1, biri BRCA2’de) tanımlanmıştır (56). BRCA1 veya BRCA2 genlerinde germ hattı patojenik varyant taşıyan bireylerin büyük çoğunluğu, bu varyantı otozomal dominant kalıtım yoluyla bir ebeveynden miras almaktadır. Bu durum Tablo 4’te gösterilmiştir (39).

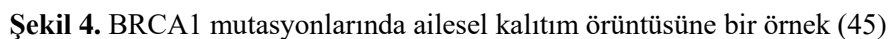
Tablo 4. BRCA1 ve BRCA2 Mutasyonu Taşıyan Bireylerde Kanseri Riskleri

Kanser Türü	Genel Popülasyon Riski	BRCA1 Taşıyıcıları İçin Risk	BRCA2 Taşıyıcıları İçin Risk
Meme Kanseri (Kadın)	%12	%55–72 (70 yaşına kadar)	%45–69
Kontralateral Meme Kanseri	%2 (5 yıl içinde)	%20–30 (10 yıl içinde); %40–50 (20 yıl içinde)	%20–30 (10 yıl içinde); %40–50 (20 yıl içinde)
Over Kanseri	%1–2	%39–44	%11–17
Meme Kanseri (Erkek)	%0,1	%1–2	%6–8
Prostat Kanseri	%6 (69 yaşına kadar)	%21 (75 yaşına kadar); %29 (85 yaşına kadar)	%27 (75 yaşına kadar); %60 (85 yaşına kadar)
Pankreas Kanseri	%0,5	%1–3	%3–5 (70 yaşına kadar)
Melanom (Kutanöz & Oküler)	%1,6	Bilgi yok	Artmış risk

3.5.1. BRCA1

BRCA1 geninin 17. kromozomun 17q21.31 bölgesinde konumlandığı ilk olarak 1990 yılında belirlenmiştir. BRCA1 geni yaklaşık 110 kb uzunluğunda olup, 22 ekzon içermektedir ve bunların en büyüğü ekzon 10’dur. BRCA1 geni, 1863 aminoasitten oluşan büyük bir protein kodlar (57,58). BRCA1 proteini hücre döngüsü kontrol noktalarının düzenlenmesinde, DNA hasar onarımında, apoptozda, transkripsiyonel düzenlemede ve ubikuitin ligaz aktivitesinde kritik rol oynamaktadır. Ancak BRCA1’in tüm mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (59,60). BRCA1 geninin büyük ve kompleks yapısı nedeniyle mutasyon oluşma

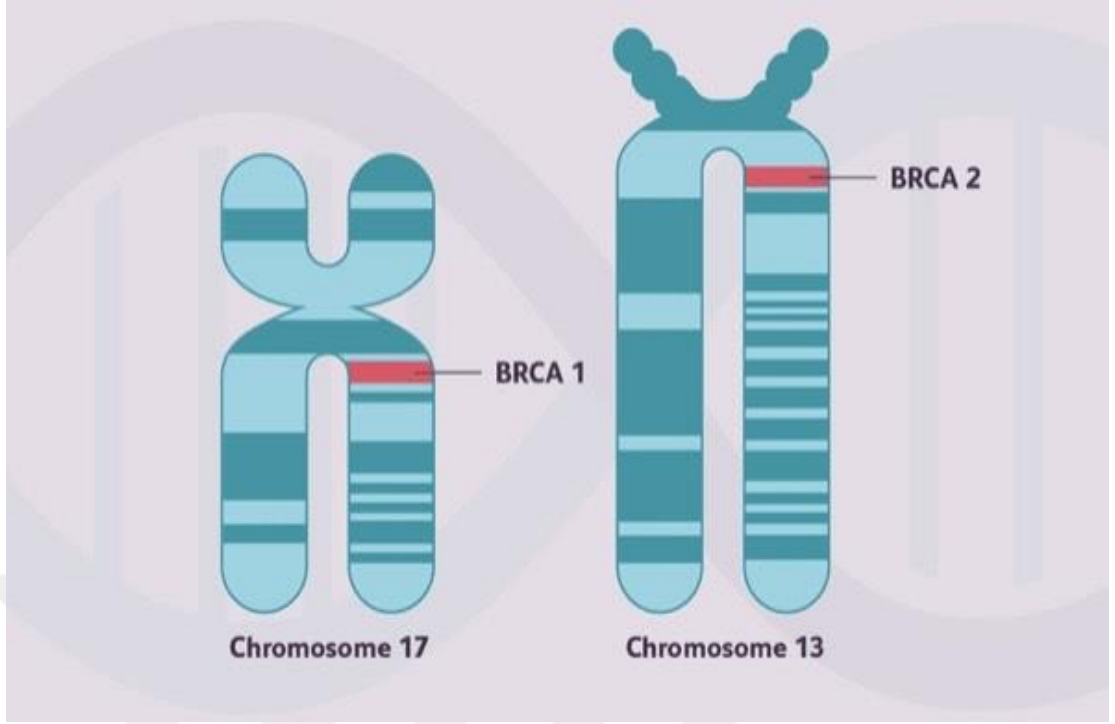
Genetik bağlantı analizleri, BRCA1 geninin erken yaşta ortaya çıkan kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %45'inden sorumlu olduğunu göstermiştir (64). BRCA1 mutasyonları genel olarak farklı ırk ve etnik gruplar arasında belirgin farklılık göstermekle birlikte, bazı mutasyonların Aşkenazi Yahudilerinde daha sık görüldüğü bildirilmiştir (63,65). Aşkenazi Yahudilerinde erken başlangıçlı meme kanseri olgularının yaklaşık %8'inde ve normal popülasyonun %1-1,5'inde 617delT mutasyonu bildirilmiştir. İzlanda toplumunda ise erken başlangıçlı meme kanseri olgularında 999del5 mutasyonunun sık görüldüğü rapor edilmiştir (15). Meme kanseri ile ilişkisi, erken başlangıçlı meme kanseri görülen geniş aile soyağaçlarının incelenmesi ile doğrulanmıştır (66). BRCA1 mutasyonlarının ailesel kalıtımına bir örnek Şekil 4'te sunulmaktadır.



3.5.2. BRCA2

BRCA1 geninde mutasyon taşımayan kalıtsal meme kanseri sendromlu hastalar, kalıtsal meme kanserine yatkınlığa neden olabilecek başka bir genin varlığını düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda bu genin BRCA2 olduğu ortaya konmuştur. 1995 yılında klonlanan BRCA2, ikinci meme kanseri yatkınlık geni olarak tanımlanmış ve 13. kromozomun 13q13.1 bölgesinde lokalize olduğu belirlenmiştir. Yaklaşık 84 kb uzunluğa sahip olan bu gen, 27 ekzon içermekte ve 3.418 amino asitten oluşan büyük bir proteini kodlamaktadır (38,67-70). BRCA2 proteini, her biri 30–80 amino asitten oluşan sekiz adet tekrar eden protein bölgesi içermektedir. Bu bölgeler, olağanüstü uzun bir yapıya sahip olan 11. ekzon tarafından kodlanmaktadır. Söz konusu tekrar dizileri, BRCA2 geninin karakteristik özelliklerinden biri olup proteinin merkez bölgesinin yaklaşık üçte birini kapsamaktadır. Bu bölge “BRC” olarak adlandırılmaktadır (71).

Ekzon 11 yaklaşık 5000 nükleotid, ekzon 10 ise yaklaşık 1000 nükleotid uzunluğunda olup, BRCA2 proteininin yaklaşık %60’ını kodlamaktadır. Mutasyonlar belirli bölgelerde yoğunlaşmayıp tüm gen boyunca dağılmış şekilde görülmektedir (62). BRCA genleri DNA onarım mekanizmasında kritik rol oynadığından, bu genlerde meydana gelen herhangi bir defekt, BRCA proteininin hatalı sentezlenmesine veya hiç oluşmamasına yol açmaktadır. Bu durumda tamir mekanizması işlevini yerine getiremez; homolog rekombinasyon yoluyla onarılması gereken DNA çift zincir kırıkları onarılamadan kalır ve bu hasar meme kanseri gelişimine zemin hazırlar (72). BRCA1 geninde olduğu gibi BRCA2 geninde de en yaygın mutasyonlar, eksik protein oluşumuna neden olan mutasyonlardır (61,73,74). BRCA1 ve BRCA2 genlerinin kromozom üzerindeki lokasyonları Şekil 5'te gösterilmiştir.



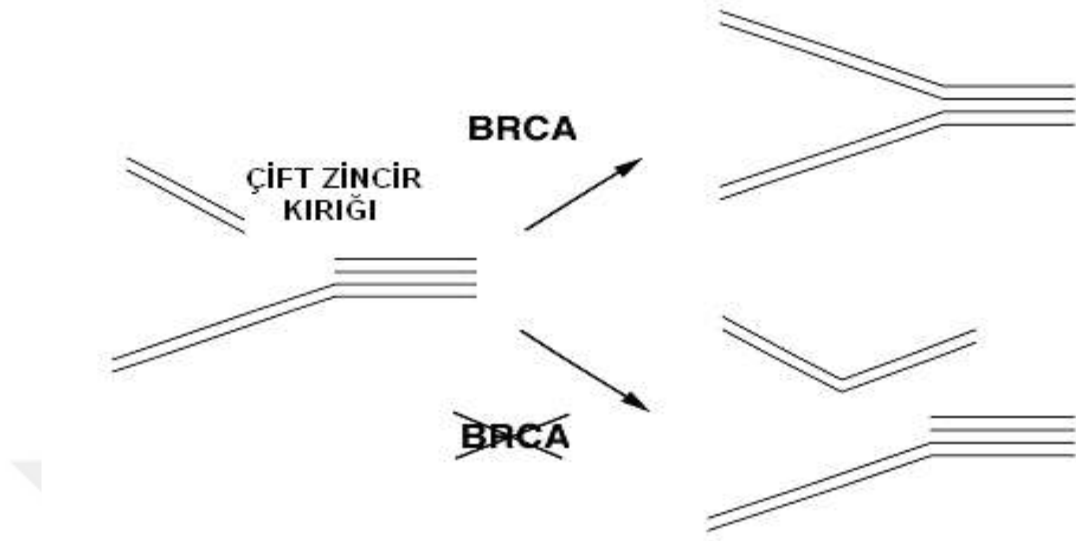
Şekil 5. BRCA 1-2 bulundukları kromozom lokusları

3.6. BRCA1 ve BRCA2 İlişkili Moleküler Mekanizmalar

BRCA1 ve BRCA2, tümör baskılayıcı genler olarak görev yapmaktadır. Kalıtsal meme kanserlerinin önemli bir kısmında bu genlerin baskılayıcı işlevlerini yitirdiği gösterilmiştir. Özellikle, dört veya daha fazla meme kanseri vakasının bulunduğu ailelerde BRCA genlerinde mutasyon oranının yüksek olduğu bildirilmiştir (75). Genetik araştırmalar, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin hücre bölünmesi, hayatta kalması ve DNA hasarına verilen yanıt süreçlerinde kritik roller üstlendiğini ortaya koymuştur. Bu genlerin kodladığı proteinlerin; hücre proliferasyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre döngüsü kontrol noktaları ve homolog rekombinasyon gibi DNA onarım süreçlerinde yer alan diğer proteinlerle yakın etkileşim içinde olduğu belirlenmiştir (76,77). BRCA1 geni, insanlarda dört ana bölgeye ayrılmaktadır. Proteinin amino terminal (N-ucu) bölgesinde bir RING çinko parmak motifi, karboksi terminal (C-ucu) bölgesinde ise iki adet BRCT tekrar bölgesi ve bir serin açısından zengin bölge yer almaktadır. RING çinko parmak motifi, BARD1 proteininin aynı bölgesi ile etkileşim kurarak, ubiquitinasyon işlemini gerçekleştiren E3 ligaz aktivitesini oluşturan BRCA1/BARD1 kompleksini meydana getirir (78). BRCA1 C Terminal (BRCT) bölgesi ise RNA polimeraz II, p53 ve RB

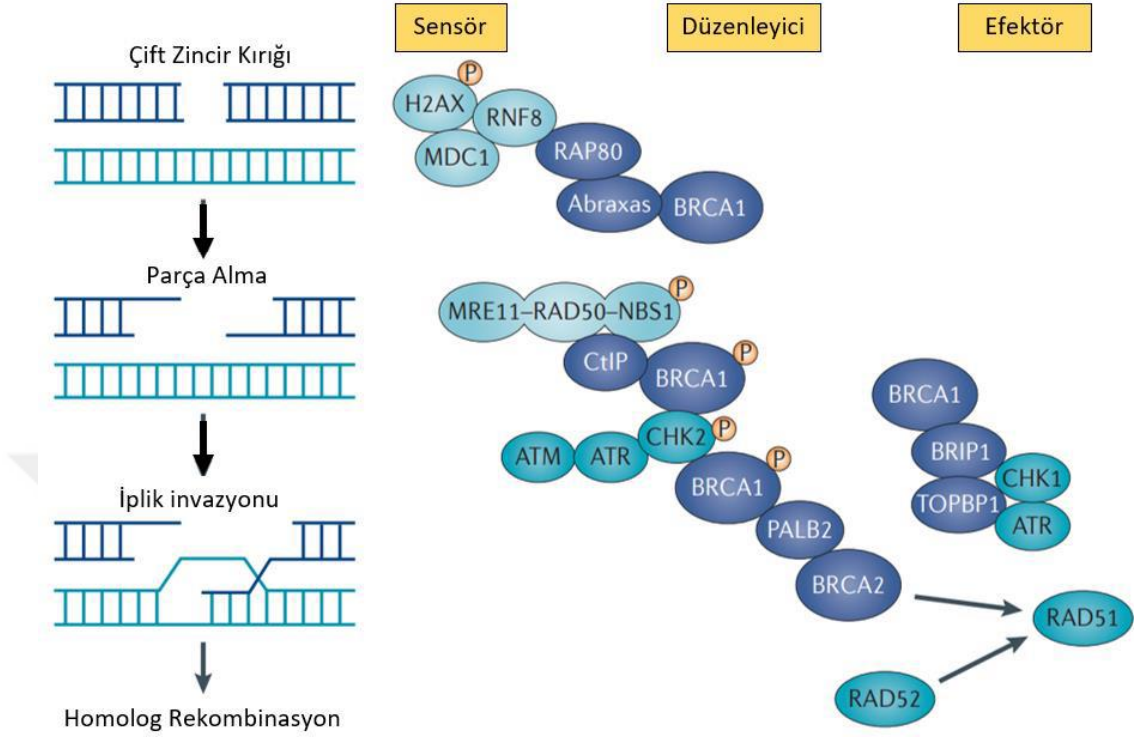
gibi proteinlerle etkileşerek transkripsiyonel aktivasyon, kromatin yeniden düzenlenmesi ve özellikle DNA hasar onarımı gibi hücresel süreçlerde görev alır (79).

BRCA2 geni ise karakteristik olarak ortasında yer alan ve proteinin üçte birini oluşturan BRC tekrar dizileri ile tanımlanır. Bu alanlar, Rad51 proteini için bağlanma bölgeleri olarak işlev görür (80). Ayrıca, BRCA2 proteininin C-terminalinde yer alan TR2 bölgesi de Rad51 ile etkileşime girerek homolog rekombinasyon yoluyla DNA onarımında rol oynar (81,82). Diğer yandan, PALB2 proteini BRCA2'nin amino terminal bölgesi ile etkileşime geçerek BRCA2'nin nükleer yapılarda stabilitesini artırır (83). DNA hasarı; replikasyon hataları, baz deaminasyonu, metilasyon değişiklikleri ve oksidatif stres gibi endojen nedenlerle ya da iyonizan radyasyon, ultraviyole ışınları, alkilleyici ajanlar, toksik kimyasallar ve ekstrem sıcaklık gibi ekzojen etkenlerle oluşabilir. Oluşan bu hasarlar, özgül sensör proteinler tarafından tanınır ve uygun DNA hasar yanıtı (DNA damage response; DDR) başlatılarak spesifik onarım mekanizmaları devreye sokulur. DNA onarım mekanizmaları; hatalı eşleşme onarımı, baz eksizyon onarımı, nükleotid eksizyon onarımı, tek ve çift zincir kırılmalarının onarımı, zincirler arası çapraz bağ onarımı ve translezyon sentezi gibi çeşitli yolları içermektedir (84). BRCA1 ve BRCA2 proteinleri, özellikle iyonizan radyasyon gibi dış etkenler sonucu oluşan çift zincir DNA kırıklarının onarımında görev alır. Bu proteinler, hücre döngüsünün anormal hızlanmasını engelleyerek DNA tamiri aracılığıyla genomik stabilitenin korunmasında önemli rol oynamaktadır (85). BRCA genlerinin DNA hasarının tamirindeki işlevi Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. DNA hasarı tamirinde BRCA geninin rolü (72)

BRCA1, farklı yapısal bölgeleri sayesinde DNA hasar proteinleri, tümör baskılayıcılar ve hücre döngüsü düzenleyicileri ile etkileşime girerek homolog rekombinasyon (HR), non-homologous end joining (NHEJ) ve single-strand annealing (SSA) gibi DNA tamir yollarında görev alır (86). Özellikle BRCT motifi, DNA hasarının tanınması, hasarlı bölgenin rezeksiyonu, replikasyon sırasında onarım ve hücre döngüsünün G1/S, S ve G2/M fazlarındaki kontrol noktalarında kritik rol oynamaktadır. DNA hasarının meydana gelmesinin hemen ardından, ilgili bölgenin çevresinde sensör proteinler birikir. Bu proteinler, RAP80-ABRAXAS1-BRCA1 kompleksinin oluşumunu tetikleyerek efektör yanıtların başlatılmasını sağlar. HR mekanizması, çoğalan hücrelerde genom bütünlüğünü koruyan en hassas tamir yoludur; çünkü çift zincir kırıkları delesyon ve translokasyonlara yol açma potansiyeli yüksek olan hasarlardır (87). Özellikle replikasyon sırasında ortaya çıkan çift zincir kırıkları, en tehlikeli DNA hasarı formlarından biri olarak kabul edilir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinin bu süreçlerdeki fonksiyonları, hem genomik bütünlüğün sağlanmasında hem de kanser gelişiminin önlenmesinde yaşamsal önem taşımaktadır (86). DNA hasarında moleküler mekanizmasının çalışma prensibi Şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7. DNA hasar yanıtının moleküler mekanizması (86)

3.7. MYC Geni

MYC (c-MYC olarak da bilinir) geni, nükleer düzenleyici bir protein kodlayan güçlü bir onkogendir ve insan kromozomu 8q24 üzerinde lokalizedir. c-myc geni üç eksondan oluşur. Ekson 1, iki promotör içerir ve kodlama yapmaz. Translasyon, genellikle ekson 2'nin 16. nükleotidinden başlar ve ekson 2 ile 3, Myc proteinini kodlar (88). Transkripsiyon faktörü olarak görev yapan bu fosfoprotein, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptozun belirli aşamalarını kontrol etmektedir (51). MYC, tümör oluşumunun güçlü bir aktivatörü olarak kabul edilmekte ve pek çok kanser türünde düzensizliği ile ilişkilendirilmektedir (89,90). Hücrel onkogenler arasında yer alan MYC gen ailesi, üç iyi tanımlanmış üyeden oluşmaktadır: C-MYC, N-MYC ve L-MYC. Bu gen ailesinde ilk keşfedilen ve en kapsamlı şekilde incelenen üye olan c-MYC, bir kuş retrovirüsünün dönüştürücü geninin hücrel homologue olarak tanımlanmıştır. İnsan MYC geninin, Burkitt lenfoması olgularında gözlenen dengeli kromozomal translokasyonlar sonucunda sürekli olarak aktive olduğunun

gösterilmesi, bu genin tümör oluşumundaki kritik rolünü ortaya koymuştur. MYC ile ilgili çalışmalar sonucunda myc onkogeninin, üçlü negatif meme kanseri (TNBC), pankreas, yumurtalık ve prostat kanserleri dahil olmak üzere birkaç farklı kanser türünde amplifikasyonu gözlenmektedir (91). Özellikle Meme kanserinde MYC geninin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu ilk kez 1986 yılında bildirilmiştir (92). c-MYC geninde meydana gelen mutasyonlar malign transformasyona yol açmakta, ayrıca gen amplifikasyonu ile meme kanseri görülme olasılığı artmaktadır (93). Literatürde c-MYC amplifikasyonu, meme kanserlerinin yaklaşık %17–32'sinde saptanmıştır (94).

Meme kanserinde en sık görülen genetik değişikliklerden biri c-MYC amplifikasyonudur. Ancak c-MYC proteininin oldukça kısa yarı ömre sahip olması, bu değişikliğin izlenmesini güçleştirmektedir. Bu nedenle c-MYC amplifikasyonu, hastaların yaklaşık üçte birinde saptanmasına rağmen protein düzeyinde gözlemlenmesi sınırlı kalabilmektedir (95). Bu durum, MYC geni ile ilgili daha fazla çalışma yapılmasını ve genin tüm özelliklerinin ayrıntılı olarak incelenmesini gerektirmektedir. MYC geni, NCBI veritabanında incelendiğinde toplam 5954 SNP içerdiği belirlenmiştir. Bu varyantların 647'si Homo sapiens türünde bulunmakta olup, bunların 156'sı kodlama bölgesinde missense, 101'i synonymous, 42'si 3' UTR ve 47'si 5' UTR bölgesinde yer almaktadır. Bu gende bulunan zararlı SNP'ler, bazı hastalıkların ortaya çıkmasında temel bir rol oynayabilir ve özellikle kanser gibi hücre proliferasyonunun bozulduğu durumlarla ilişkilendirilmektedir (89).

3.8.1. MYC geni moleküler mekanizması

Transkripsiyon faktörü MYC, pek çok kanser türünde tümör gelişiminde merkezi bir unsur olarak tanımlanmaktadır. MYC yalnızca tümör hücrelerinin proliferasyonunu değil, aynı zamanda tümör mikroçevresi ile etkileşimleri de yönlendirmektedir. Bu nedenle MYC, tümör progresyonunu destekleyen ve tedaviye karşı ilaç direncinin gelişiminde rol oynayan temel bir düzenleyici olarak öne çıkmaktadır (96). Bu gibi durumlarda, c-MYC'yi hedeflemek insan kanserlerinde moleküler tedavide önemli bir adım haline gelmektedir. Genetik çalışmalar, c-MYC aktivasyonunun ve çoğalmasının engellenmesiyle apoptozun indüklenerek tümör

gerilemesine neden olabileceğini göstermiştir. c-Myc çok sayıda insan kanserinde aşırı ifade edilir ve ifadesi kötü prognozla ilişkilidir (97).

MYC geninde gözlenen yapısal veya fonksiyonel düzensizlikler, özellikle meme ve over kanserlerinin gelişiminde ve progresyonunda önemli katkılar sağlamakta ve sıklıkla olumsuz klinik sonuçlarla ilişkilendirilmektedir. Bu düzensizlikler; gen amplifikasyonu, transkripsiyonel düzenleme bozuklukları, tümör baskılayıcı genlerin kaybı, onkojenik sinyal yollarının aktivasyonu ile mRNA ve protein stabilizasyonundaki değişiklikler aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, meme kanserinde görülen biyolojik heterojenlik, söz konusu mekanizmaların daha ayrıntılı biçimde araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerden biri olan BRCA1, MYC'nin transkripsiyonel ve transformasyonel aktivitelerini baskılayıcı bir rol oynamaktadır. BRCA1 kaybı ile birlikte MYC'nin aşırı ekspresyonu, özellikle bazal-benzeri meme kanseri alt tipinde, tümör gelişimine ve ilerlemesine zemin hazırlamaktadır. Buna ek olarak, MYC; östrojen reseptörü (ER) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesi sinyal yollarının aşağı akım düzenleyicisi olarak görev yapmakta olup, bu özelliği sayesinde adjuvan tedavilere karşı direnç gelişimine katkıda bulunmaktadır (93). BRCA1 genindeki germ hattı mutasyonları, yüksek tümör derecesi, yüksek proliferasyon hızı ile karakterize belirgin bir fenotipe sahip erken başlangıçlı meme kanserlerine yatkınlık oluşturur. BRCA1 eksikliği olan hücrelerde çok aşamalı tümör ilerlemesine katkıda bulunan moleküler mekanizmalar ve işbirlikçi onkogenler iyi tanımlanmamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda MYC onkogen amplifikasyonunun BRCA1 ile ilişkili meme kanserlerinde tümör ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, BRCA1 ile ilişkili tümörlerin agresif histopatolojik özelliklerinin kısmen düzensiz MYC aktivitesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. DNA mikrodizi tabanlı analizler, MYC'nin BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında aşırı eksprese edildiği bulmuştur. Bu görüşle uyumlu olarak, Wang ve arkadaşları, BRCA1'in MYC'ye fiziksel olarak bağlandığını ve transkripsiyonel ve dönüştürücü aktivitesini baskıladığını göstermiştir (98).

c-Myc, BRCA1 ile fiziksel olarak ilişki kurabilir. BRCA1'in mayada, in vitro deneylerde ve memeli hücrelerinde c-Myc ile etkileşime girdiği gözlemlenmektedir. Bu veriler, BRCA1'in c-Myc'nin davranışını düzenleyerek tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini ve BRCA1 gen ürününün bazı etkilerine moleküler bir açıklama

getirebileceğini göstermektedir. Li ve arkadaşlarının çalışmasında, Çinli BRCA meme kanseri hastalarında MYC amplifikasyonlarının yaygınlığı incelenmiş ve MYC amplifikasyonu ile klinikopatolojik ve moleküler özellikler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışma, MYC-amplifikasyonlu meme tümörlerinin, amplifikasyonsuz tümörlere kıyasla farklı klinikopatolojik ve moleküler özellikler sergilediğini göstermiştir (99,100). Yüksek c-MYC ekspresyonu gösteren BRCA ilişkili tümörlerin, düşük c-MYC ekspresyonuna sahip tümörlere göre kemoterapiye karşı artmış direnç gösterdiği çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (101). Myc proteini ve onun aile üyeleri, birden fazla mekanizma tarafından sıkı kontrol altındadır; ancak Myc, tümör oluşumu sırasında sıklıkla düzensizleşir (102). c-Myc tükenmesi, BRCA1 promotör aktivitesini azaltırken, ektopik c-Myc ifadesi promotör aktivitesini artırmaktadır. c-Myc eksikliği nedeniyle BRCA1 ekspresyonu azalan meme kanseri hücrelerinde DNA onarım aktivitesi bozulmaktadır. Distal BRCA1 promotör bölgesi, c-Myc ile etkileşerek genin aktivasyonuna katkıda bulunur. Bu veriler, BRCA1 ekspresyonunun c-Myc gibi transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlendiği bir modeli desteklemektedir. BRCA1, MYC'ye bağlanarak onun transkripsiyonel ve dönüştürücü aktivitesini baskılar. Ancak bu süreçte BRCA1, tek başına değil, çeşitli gen ve proteinlerle etkileşim içinde hareket eder. MYC ve BRCA1'in tümör oluşumundaki rolleri göz önüne alındığında, aralarındaki etkileşimin meme kanseri ilerlemesindeki işlevsel önemi büyüktür (103,104).

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Hasta ve kontrol grupları

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na 01.01.2021–15.08.2023 tarihleri arasında merkezimize başvuran, meme kanseri veya over kanseri şüphesi ya da tanısı almış hastalar çalışmaya dahil edildi. Çalışma grubumuz, hasta ve kontrol grubu olmak üzere toplam 90 kişiden oluşmaktadır. Hasta grubumuz, meme kanseri veya over kanseri tanısı almış 45 bireyden oluşmaktadır. Bu hastalardan periferik kan örnekleri alındı ve elde edilen DNA örnekleri üzerinde NGS yöntemi ile BRCA gen paneli analizi gerçekleştirildi. BRCA mutasyonu pozitif saptanan olgular seçildi ve bu hastaların DNA örnekleri, ilgili gen bölgelerinin incelenmesi amacıyla RT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Kontrol grubunda ise tümör içermediği patolojik olarak doğrulanan normal dokulara ait parafin blok örnekleri kullanıldı. Bu bloklardan DNA izolasyonu yapılarak elde edilen örnekler RT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen veriler, hasta grubuna ait veriler ile karşılaştırıldı.

Çalışmamızda hasta grubunun seçimi aşağıdaki kriterler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir:

- Aile öyküsü: Birinci veya ikinci derece akrabalık bağı olan, 40 yaş ve altında meme ve/veya over kanseri tanısı almış olanlar.
- Ailesel risk: Ailesel kanser sendromları veya güçlü aile öyküsü bulunan bireyler.
- Klinik özellikler: Bilateral meme kanseri veya hem meme hem de over kanseri tanısı almış olan hastalar.

Bu kriterleri karşılayan hasta gruplarında yalnızca kadın hastalar çalışmaya dahil edildi. Hasta grubunda yer alan 45 olgunun tamamına NGS analizi uygulandı ve BRCA pozitif bulunan olgular çalışma kapsamında değerlendirmeye alındı. Kontrol grubunda ise seçilen dokuların hiçbirinde tümöral oluşum bulunmamasına özellikle dikkat edildi. Bu yaklaşımın nedeni, çalışmada incelenen genlerin transkripsiyon faktörü ile ilişkili olması ve kontrol grubunda herhangi bir tümör hücresinin bulunmasının sonuçları etkileme olasılığıdır.

Çalışmanın etik uygunluğunu teyit eden Etik Kurul raporu, Dicle Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu tarafından 20.12.2023 tarihinde onaylanmıştır ve -

2023/21 numarası ile tescil edilmiştir (Ek 1). Her iki gruptaki bireylere araştırmanın amaçları hakkında bilgi verildikten sonra, çalışmaya katılmayı kabul etmeleri için gönüllü onam formu okutulmuş ve imzalatılmıştır. Bireylerin pedigrileri için gerekli bilgiler alındı. Pedigride bireylerin cinsiyet, yaş, akraba evliliği, herhangi bir ilaç kullanıp kullanmadığı gibi faktörler değerlendirildi.

4.1.2. Örneklerin alınması

Çalışma grubuna dahil edilen hastalardan, DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla her biri 8 cc olmak üzere toplam 4 tüp kan örneği alınmıştır. DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilene kadar -20° C de saklandı. Hastalardan alınan kan örneklerinden DNA elde etmek amacıyla, uygun bir protokol izlenerek DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon işlemleri standart laboratuvar koşullarında uygulanmış olup, elde edilen DNA örnekleri sonraki moleküler analizler için saklandı.

4.2. Metod

4.2.1. DNA izolasyon protokolü

Örneklerin Hazırlanması

Hastalardan sodyum-EDTA'lı mor kapaklı tüplere alınan kan örnekleri, izolasyon öncesinde -20°C'de saklandı. İzolasyon işlemine başlamadan önce örnekler dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmeleri sağlandı. DNA izolasyonu, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirildi.

- Adım 4 için kullanılacak su banyosu veya ısıtıcı blok 56°C'ye ayarlandı.
- Elüsyon için kullanılacak Buffer AE veya distile su oda sıcaklığına getirilmelidir.
- Buffer AW1, Buffer AW2 ve QIAGEN Proteaz üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde hazırlanmalıdır.
- Her hasta için kullanılan 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerinin üzerine hasta bilgileri (ad, tarih, numara vb.) yazılmalıdır.

İzolasyon protokolü:

1. 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne 20 µL Proteaz (veya proteinaz K) eklendi.
2. Tüp içerisine 200 µL örnek eklendi. RNA'sız DNA istenirse 4 µL RNaz A eklenebilir.
3. Üzerine 200 µL Buffer AL eklendi, 15 saniye pulse-vorteks ile karıştırıldı. Homojen çözelti elde edilmesi etkin lizis için kritiktir.
4. Tüp 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. Kapağın iç yüzeyindeki sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüj yapıldı.
6. Örneğe 200 µL %96–100 etanol eklenerek, 15 saniye pulse-vorteks ile karıştırıldı ve tüp tekrar kısa süre santrifüj edilerek kapağın iç yüzeyindeki damlalar uzaklaştırıldı.
7. Karışım, dikkatlice QIAamp Mini spin kolona (2 mL toplama tüpü içinde) aktarıldı. Kapak kapatılarak 6000 xg (8000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktardı ve filtrat atıldı.
8. Kolon kapağı açılarak üzerine 500 µL Buffer AW1 eklendi. Kapak kapatılarak 6000 xg (8000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılarak, filtrat atıldı.
9. Kolon üzerine 500 µL Buffer AW2 eklendi. Kapak kapatılarak maksimum hızda (20.000 xg; 14.000 rpm) 3 dakika santrifüjlendi.
10. Önerilen: Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve eski tüp atıldı. Ardından maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilerek Buffer AW2 kalıntısı uzaklaştırıldı.
11. Kolon, temiz 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolon üzerine dikkatlice 200 µL Buffer AE eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra, 6000 × g (8000 rpm) hızında 1 dakika santrifüj edilerek DNA elüsyonu elde edildi.
12. İzolasyon sonrası elde edilen genomik DNA Qubit 4 Florometre analiz kiti ile ölçüldü.
13. Elde edilen DNA örnekleri, yapılacak moleküler çalışmalar için -20°C'de saklanmıştır.

4.2.2. NGS analizi

Ailesel meme ve over kanserleri ile ilişkili olduğu bilinen BRCA1/2 kodlayıcı bölgeleri kapsayacak şekilde tasarlanan gen paneli üreticinin belirttiği protokollere uygun olarak kullanıldı. Çalışmada hasta materyalinden izole edilen DNA örnekleri NGS gen panelinde kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla, Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) kullanılmıştır. Ölçüm protokolü, üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kitin kimyasalları vortekslenmiş ve örnek sayısına göre 1 µL Qubit Reagent + 199 µL Qubit Tampon karıştırılarak 1:200 oranında çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin 198 µL'si, üzerine 2 µL DNA örneği eklenerek vortekslenmiştir. Ölçüm sırasında hava kabarcıkları giderilmiştir. Cihazda “dsDNA-High Sensitivity” modu seçilerek DNA miktarları belirlenmiştir.

Ölçüm sonuçlarına göre yeterli konsantrasyona sahip hastaların DNA örnekleri, Illumina MiSeq platformu kullanılarak Mid Output Kit ile yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) yöntemi aracılığıyla analiz edilmiştir. Analiz kapsamında ekzon bölgeleri ve ekzon-intron sınırları (± 10 baz çifti) değerlendirmeye alınmıştır. Elde edilen varyantların patojenisite sınıflaması, American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) kılavuzları (PMID: 25741868) temel alınarak gerçekleştirilmiştir.

NGS analiz basamakları

1. DNA kalite ve miktar kontrolü

Elde edilen DNA örnekleri Qubit dsDNA HS Assay Kit kullanılarak miktar ve kalitesi açısından kontrol edilmeli. DNA konsantrasyonu, NGS kütüphane hazırlığı için ayarlanır.

2. DNA fragmentasyonu

DNA örnekleri, hedeflenen fragment boyutuna ulaşacak şekilde parçalanır (fragmentasyon). Fragment boyutu, kütüphane hazırlık protokolüne ve kullanılan dizileme platformuna uygun olarak optimize edilir.

3. Kütüphane hazırlığı

Fragment edilmiş DNA, uç onarımı (end-repair) ve A-tailing işlemleri ile dizilemeye hazır hale getirilir.

Adaptör ligasyonu yapılır; bu adaptörler dizileme sırasında DNA fragmentlerinin tanınmasını sağlar. Ligasyon sonrası, kütüphaneler temizlenir.

4. PCR amplifikasyonu

Kütüphaneler, gerekli miktarda DNA elde edilecek şekilde PCR ile çoğaltılır. Amplifikasyon sonrası kütüphaneler tekrar temizlenir ve kalite kontrol için hazırlanır.

5. Kütüphane kalite kontrolü

Elde edilen kütüphane konsantrasyonu, fluorometrik yöntemlerle doğrulanır. İstenilen konsantrasyonda kütüphane elde edildikten sonra yüklenme aşaması için hazırlıklar yapılmaya başlanır.

6. Dizileme (Sequencing)

Hazırlanan kütüphane uygun dizileme platformuna yüklenir (Illumina).

Dizileme sırasında kütüphaneler, platforma özgü prosedürlerle analiz edilir.

7. Veri analizi

Dizileme işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen ham veriler işlenmiş, kalite kontrolü yapılmış ve dizi verileri bioinformatik analiz süreçlerinden geçirilmiştir. Analiz sonucunda varyantlar belirlenmiş ve yorumlanmıştır. Elde edilen veriler ışığında, BRCA pozitif olarak belirlenen hasta DNA'ları, sonraki aşamada gerçekleştirilecek diğer moleküler çalışmalara dahil edilmiştir.

4.2.3. Real Time PCR ile TaqMan genotipleme analizi

Klasik PCR yöntemi, 1980'li yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiş, Mullis'e 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazandırmıştır. PCR, bir nükleik asit dizisinin döngüsel bir süreçte çoğaltılarak milyonlarca özdeş kopyasının elde edilmesine olanak tanımaktadır. Bu sayede klonlama, genetik mühendisliği ve dizileme gibi moleküler biyolojide pek çok alanda DNA manipülasyonu mümkün hale gelmiştir. Ancak geleneksel PCR yönteminde, ürün miktarının başlangıçtaki şablon miktarıyla doğrudan ilişkilendirilmesi güç olduğundan kantifikasyon sınırlı kalmıştır. Bu sorun, 1992 yılında Higuchi ve arkadaşları tarafından geliştirilen gerçek zamanlı PCR (real-time PCR, qPCR) yöntemiyle aşılmıştır. qPCR'de, amplifikasyon sürecinde oluşan ürün miktarı floresan boyalar veya probalar yardımıyla eş zamanlı olarak izlenebilmekte, belirli

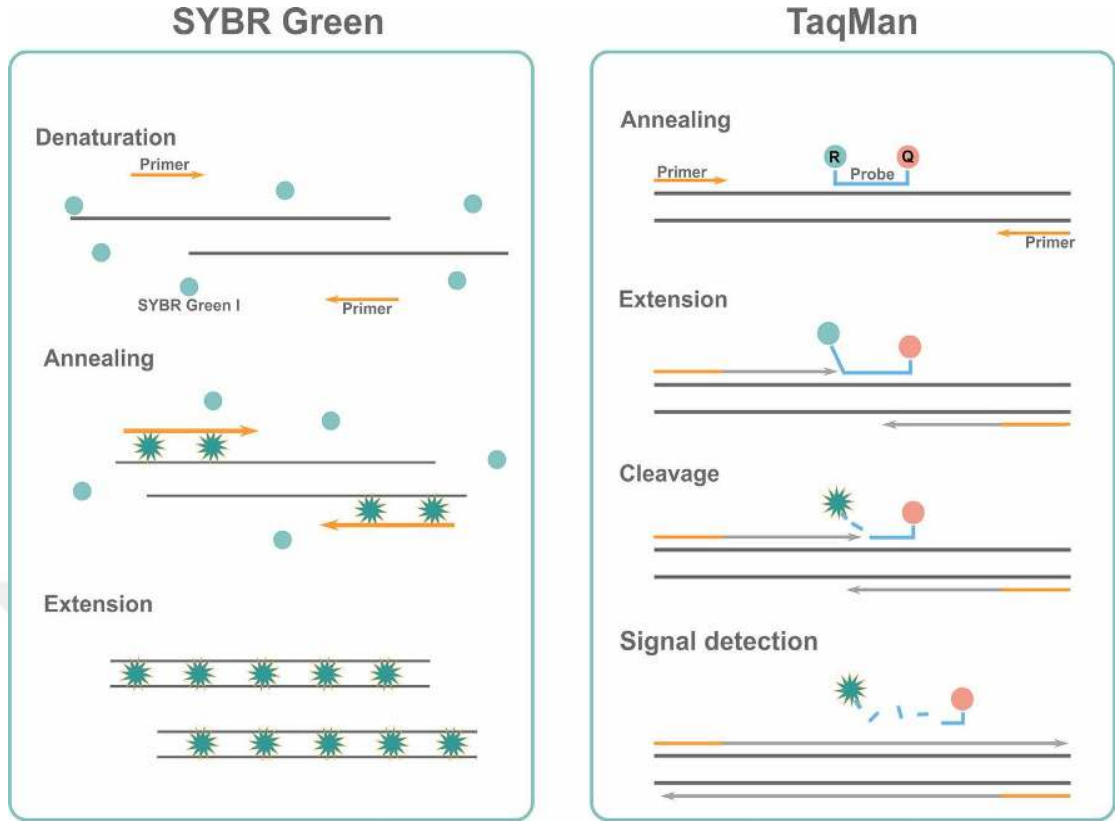
DNA miktarına ulaşmak için gerekli döngü sayısı kaydedilmektedir. Bu sayede, başlangıçtaki DNA molekül sayısı yüksek doğruluk ve hassasiyetle hesaplanabilmektedir (105).

Bir PCR döngüsü üç temel adımdan oluşur: denatürasyon, bağlanma ve uzama.

- Denatürasyon adımı sırasında, çift zincirli DNA çözülerek 94–95 °C'ye ısıtılır ve iki zincir birbirinden ayrılır.
- Bağlanma adımı, oligonükleotid primerleri tek zincirli DNA üzerindeki tamamlayıcı dizilerine bağlanır. Bu aşama genellikle primerlerin uzunluğu ve G/C içeriğine bağlı olarak 50–60 °C arasında gerçekleştirilir.
- Uzama adımı ise 72 °C'de DNA polimeraz, şablon ipliğini okur ve uygun nükleotidleri ekleyerek yeni iplik sentezler. Böylece her döngüde orijinal DNA'nın tamamlayıcı kopyaları oluşur.

Yapılan bu işlem 30–40 döngü tekrarlanarak uygulandığında, ideal koşullarda hedef DNA dizisinin miktarı her döngüde yaklaşık iki kat artar. PCR sonunda, spesifik DNA dizisinin milyonlarca kopyası elde edilir. Geleneksel PCR'de çoğaltılan ürünler jel elektroforezi veya hibridizasyon teknikleri ile tespit edilmektedir. Gerçek zamanlı PCR (qPCR) cihazı ise termo döngü sürecini floresan sinyal ölçümüyle birleştirerek, her amplifikasyon döngüsünden sonra floresan miktarını kaydeder. Bu yöntem, ürün miktarını gerçek zamanlı olarak izlemede önemli avantajlar sağlar (106).

Gerçek zamanlı PCR'nin en önemli avantajları; geniş dinamik aralık, yüksek hassasiyet, dizi özgüllüğü, minimal amplifikasyon sonrası işlem gereksinimi ve yüksek örnek verimliliği nedeniyle özellikle gen ekspresyon analizinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Bununla birlikte, yöntemin güvenilirliği primer ve problemlerin tasarımına ve reaksiyon koşullarının optimizasyonuna bağlıdır (107). Gerçek zamanlı PCR'de ürünlerin floresan ile izlenmesi, ürünlerin tespitinde en sık kullanılan iki yaklaşım TaqMan ve SYBR Green tabanlı qPCR yöntemleridir (108,109). Bu yöntemler Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. SYBR Green ve TaqMan probleminin gerçek zamanlı PCR’de çalışma prensibi.

Çeşitli floresan raporlayıcı boyalar kullanılmaktadır:

- SYBR Green en basit ve ekonomik seçenek olup, çift zincirli DNA’ya bağlanarak floresan yayar. Ancak özgüllüğü düşüktür; primer-dimerler veya spesifik olmayan ürünlere de bağlandığından sinyalin olduğundan yüksek tahmin edilmesine neden olabilmektedir (110,111).
- TaqMan problemleri (çift etiketli problemler veya 5'-nükleaz problemleri), bir haberci (reporter) boya ve bir söndürücü (quencher) boya içeren doğrusal problemlerdir.
- PCR’nin uzama aşamasında prob hedefe hibridize olur. DNA polimerazın 5'-ekzonükleaz aktivitesi probu keserek habercinin söndürücüden ayrılmasına neden olur. Böylece haberci floresansı serbestleşir ve sinyal yoğunluğu artar. Bu nedenle, yalnızca özgül PCR ürünleri TaqMan temelli PCR’de floresan sinyali üretir (106).

4.2.3.1. TaqMan genotipleme analizi

TaqMan SNP genotipleme analizi, saflaştırılmış genomik DNA örneklerinde spesifik polimorfizmleri çoğaltmak ve tespit etmek amacıyla 5'-nükleaz temelli bir yöntem kullanır. Bu analiz, bireylerin tek nükleotid polimorfizmi (SNP) açısından genotiplenmesini mümkün kılmakta ve elde edilen veriler biyoinformatik tabanlı yöntemlerle doğrulanmaktadır. Bu yöntem, hedef diziyi çoğaltmak için diziye özgü ileri ve geri primerler, ayrıca iki adet TaqMan minör oluk bağlayıcı (MGB) probu ve floresan içermeyen söndürücüler (NFQ) içermektedir.

TaqMan MGB probları, hedefe özgü oligonükleotidlerden oluşur ve şu özellikleri içerir: Probu 5' ucunda raporlayıcı bir boya bulunur:

- VIC boyası: Alel 1 probu için,
- FAM boyası: Alel 2 probu için.

Probu 3' ucunda floresan içermeyen bir söndürücü (NFQ) boya yer alır. Ayrıca, 3' ucunda minör oluk bağlayıcı (MGB) bulunur. Bu yapı: Prob uzunluğunu artırmadan erime sıcaklığını (Tm) yükseltir. Daha kısa problemlerin tasarlanmasına olanak sağlar.

MGB problemlerinin minör oluğa bağlanma özelliği, prob-şablon kompleksinin stabilitesini artırarak daha kısa problemlerin kullanılmasına olanak tanır. Bu durum, alellik ayırım gücünü artırmakta, sinyal oranını iyileştirmekte ve testin özgüllüğünü yükseltmektedir. Floresan sinyaller ile genotip arasındaki ilişki Tablo 5'te gösterilmiştir

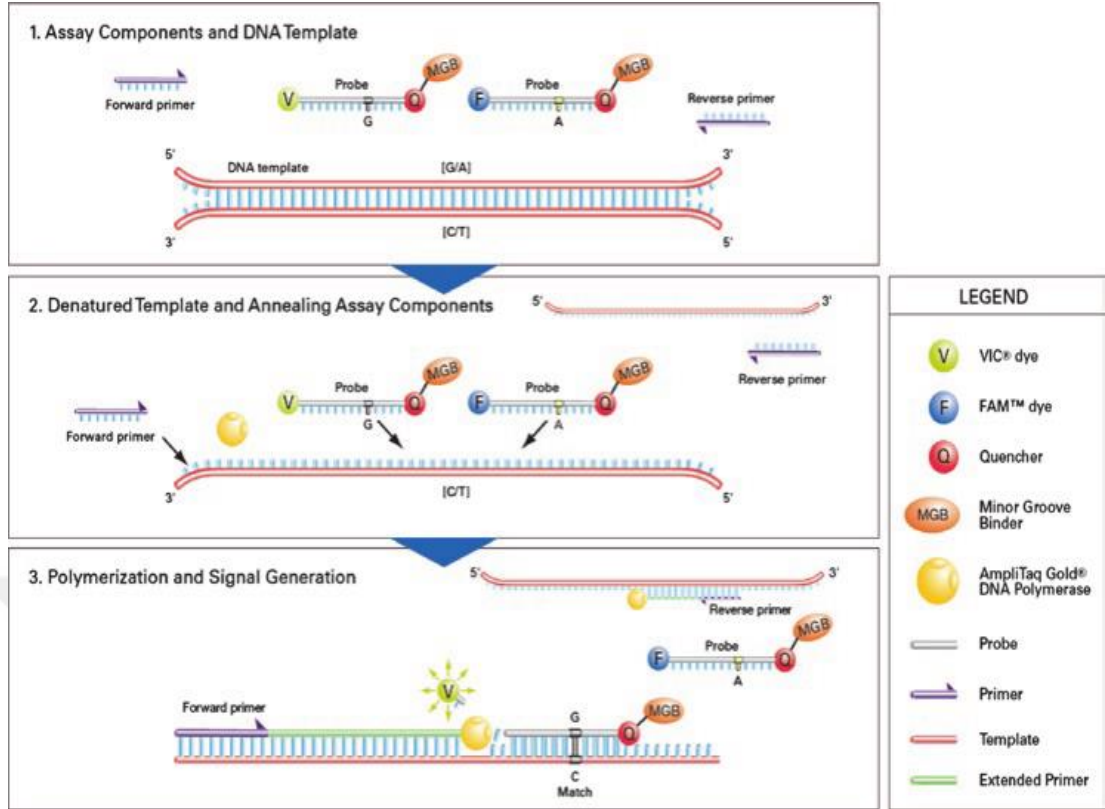
Tablo 5. Floresan sinyalleri ile örnek genotipi arasındaki korelasyon.

Floresan sinyali(leri)	Örnek genotipi
Yalnızca VIC sinyali	Alel 1 için homozigotluk
Yalnızca FAM sinyali	Alel 2 için homozigotluk
Hem VIC hem FAM sinyali	Heterozigotluk (Alel 1 / Alel 2)

TaqMan Genotipleme Master mixi içerisinde; AmpliTaq Gold DNA polimeraz, Ultra saf (UP) su, Deoksiribonükleotit trifosfatlar (dntp' ler), ROXTM Pasif referansı ve tampon bileşenler (Buffer) bulunmaktadır.

5' Nükleaz reaksiyonunun temelleri şu şekildedir:

- PCR amplifikasyonu için genomik DNA, master mix, ileri ve geri primerler ile iki adet TaqMan probu içeren reaksiyon karışımına eklenir.
- PCR sırasında, ileri ve geri primerler, denatüre olmuş cDNA şablon zincirlerindeki tamamlayıcı dizilere bağlanır.
- TaqMan probu, ileri ve geri primer bölgeleri arasında bulunan tamamlayıcı bir diziye özgü olarak bağlanır. Prob sağlam kaldığı sürece, raporlayıcı boya ile karartıcı boya arasındaki yakınlık, esas olarak Förster tipi enerji transferi (FRET) mekanizması yoluyla raporlayıcı floresansın baskılanmasına neden olur.
- Polimerizasyon sırasında AmpliTaq Gold DNA polimeraz, yalnızca hedef diziye bağlanan probu keser. Bu kesilme, raporlayıcı boyayı probdan ayırır ve raporlayıcı boyanın karartıcı boyadan ayrılması, floresansın artmasına yol açar.
- Floresan sinyalindeki artış, yalnızca hedef DNA dizisi prob ile tamamlayıcı olduğunda ve PCR süreci sırasında amplifiye edildiğinde gözlemlenmektedir. Bu nedenle, özgül olmayan çoğaltmalar tespit edilmez ve elde edilen floresans sinyali örnekte hangi allellerin bulunduğunu gösterir. Şekil 9'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 9. Taqman Çalışma Prensibi

PCR reaksiyonunda kullanılan karışım (mix) bileşenlerinin miktarları Tablo 6’da sunulmuştur.

Tablo 6. PCR reaksiyon mix oranı

Reaksiyon Karışımı Bileşenleri	Miktar
2X TaqMan Master Mix	12,50 µL
40X Assay Çalışma Probu	0,625 µL
Nükleaz İçermeyen Su	9,875 µL
DNA	2 µL
Toplam Hacim	25,0 µL

Analizde kullanılan PCR cihazına ait sıcaklık döngü koşulları Tablo 7’de sunulmuştur.

Tablo 7. PCR reaksiyon sıcaklık dereceleri ve süreleri

Adım	Sıcaklık°C	Süre	Döngü Sayısı
Polimeraz aktivasyonu	95°C	10 dakika	1
Denatürasyon	95°C	10 saniye	40
Bağlanma / Uzama	60°C	1 dakika	

Çalışmamızda kullanılan boyalar, cihaz tarafından Şekil 10'daki ideogramda gösterildiği üzere, Green (FAM) ve Yellow (VIC) floresans sinyallerini tespit etmektedir.

Dye Channel Selection Chart

Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM ⁱ , SYBR Green 1 ⁱ , Fluorescein, EvaGreen ⁱ , Alexa Fluor 488 ⁱ
Yellow	530nm	555nm	JOE ⁱ , VIC ⁱ , HEX, TET ⁱ , CAL Fluor Gold 540 ⁱ , Yakima Yellow ⁱ
Orange	585nm	610nm	ROX ⁱ , CAL Fluor Red 610 ⁱ , Cy3.5 ⁱ , Texas Red ⁱ , Alexa Fluor 568 ⁱ
Red	625nm	660nm	Cy5 ⁱ , Quasar 670 ⁱ , Alexa Fluor 633 ⁱ
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 ⁱ , Alexa Fluor 680 ⁱ
HRM	460nm	510nm	SYTO 9 ⁱ , EvaGreen ⁱ

Şekil 10. PCR da kullanılan boyaların ideogramı

4.2.3.2. TaqMan genotipleme analiz verileri

Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarına ait SNP genotipleme analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda her iki grup için rs2070583 ve rs4645943 SNP'leri incelenmiştir. İncelenen varyantlardan rs4645943 C>T, MYC geninin 5' UTR bölgesine veya transkripsiyon başlama noktasına yaklaşık 2 kb upstream (yukarıda) kalan promotör bölgesine yakın bir konumda yer almaktadır. Bu bölge, gen

ekspresyonunun transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. Rs4645943 C>T polimorfizminin prostat kanseri riskiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Diğer bir bölgemiz olan rs2070583 A>G ise 3' UTR (3' untranslated region) bölgesinde yer almaktadır. Genin bu bölgesi, translasyon sonrası regülasyon süreçlerinde önemli rol oynayan bir alandır. her iki SNP'de gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir.

- rs2070583 için context sequence (VIC/FAM prob dizileri)

Çalışmada kullanılan tek nükleotid polimorfizmine (SNP) ait Assay ID, C__15867473_10'dur.

TCTAACAGAAATGTCCTGAGCAATC[A/G]CCTATGAACTTGTTTCA
AATGCATG

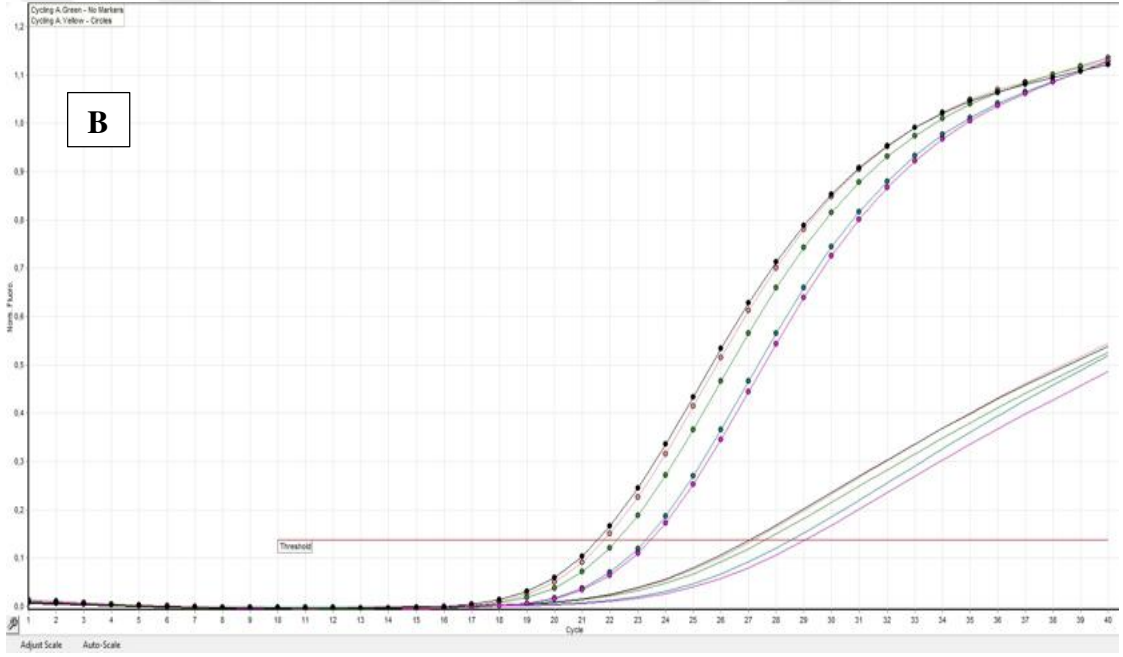
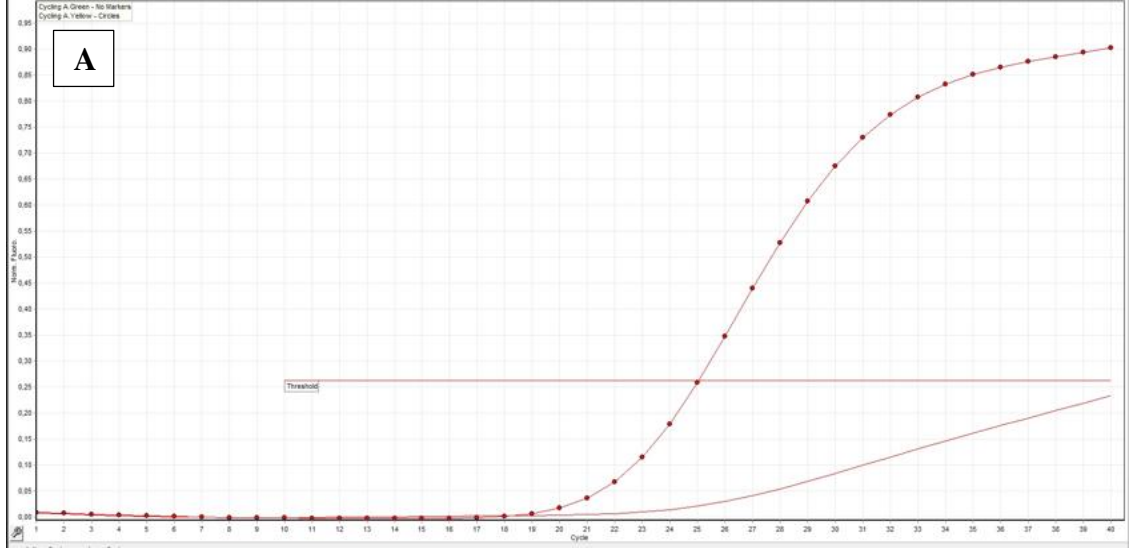
sekansında, varyant lokusunda adeninden (A) guanine (G) dönüşüm olup olmadığı araştırılmıştır.

- rs4645943 için context sequence (VIC/FAM prob dizileri)
- Çalışmada kullanılan tek nükleotid polimorfizmine (SNP) ait Assay ID, C__31798222_10'dur.

GCAGGCAACCTCCCTCTCGCCCTAG[C/T]CCAGCTCTGGAACAGGC
AGACACAT

sekansında, varyant lokusunda sitozinden (C) timine (T) dönüşüm olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmamızda nükleotid değişimlerinin analizi, RT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar; wild-type, homozigot mutant ve heterozigot alleller şeklinde değerlendirilmiştir.



Şekil 11. RT-PCR SNP analizinde değerlendirme profili (A.Wild type, B.Heterozigot).

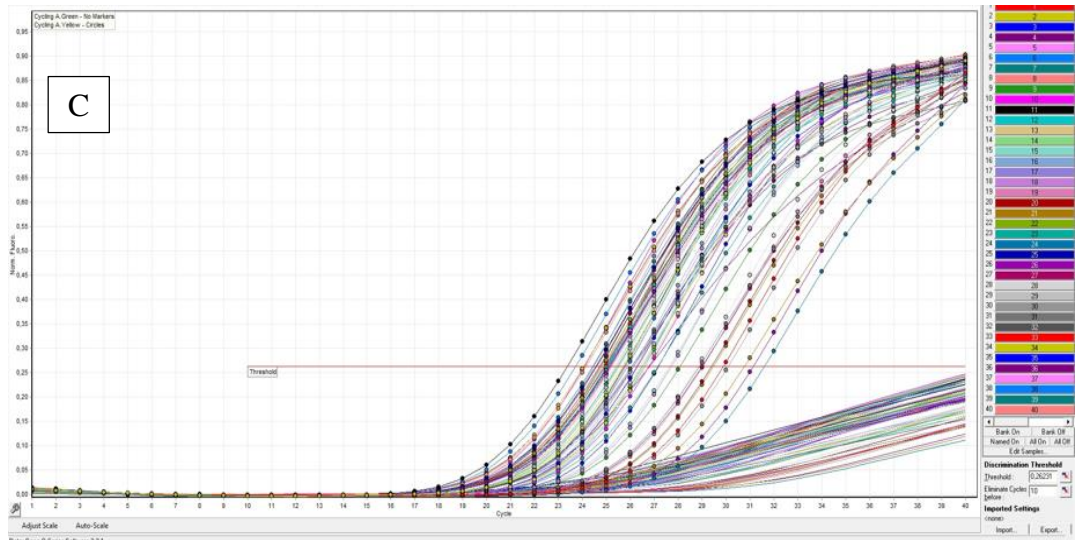
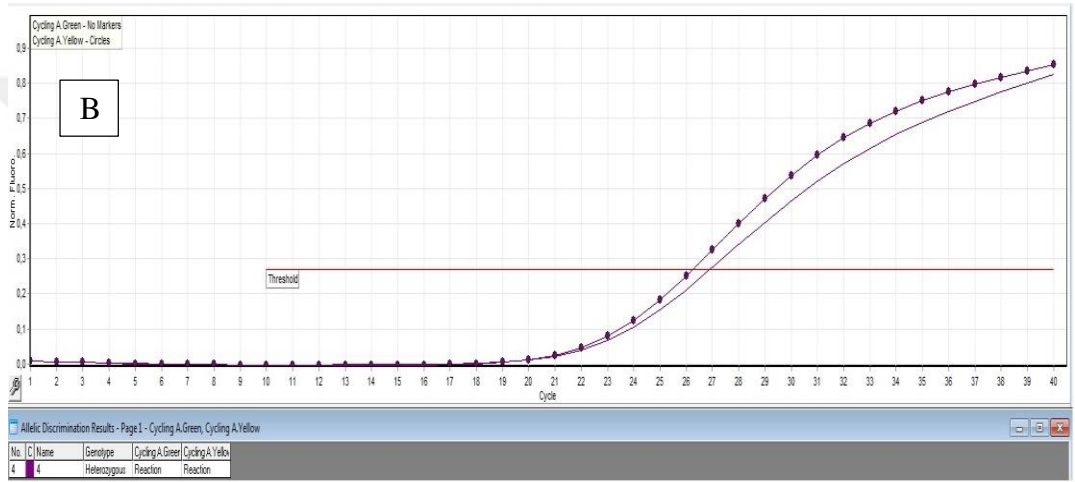
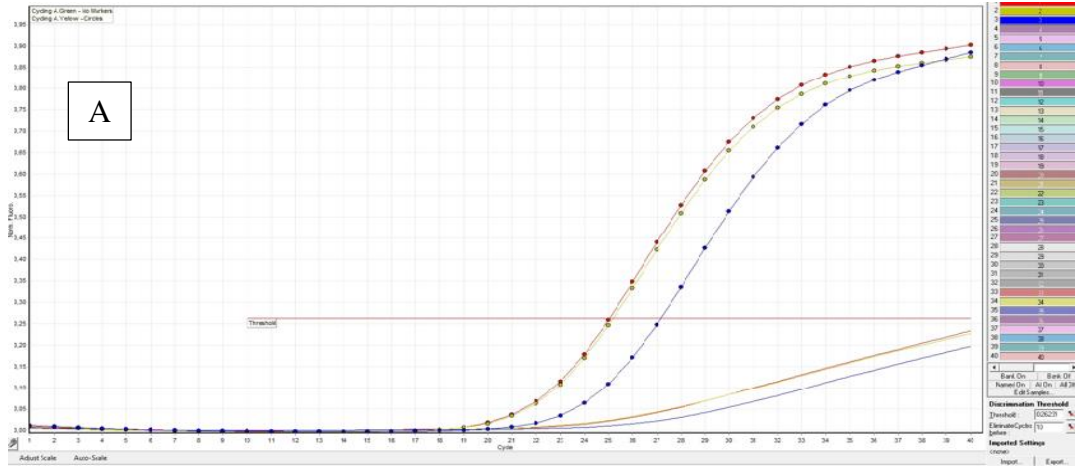
Bu çalışmada, genotiplendirme sonuçlarına ilişkin FAM ve VIC floresan sinyalleri, Şekil 12’de gösterilen genotiplerin (Wild Type, Heterozygous, Mutant) reaksiyon kanallarına göre dağılımı temel alınarak değerlendirilmiştir.



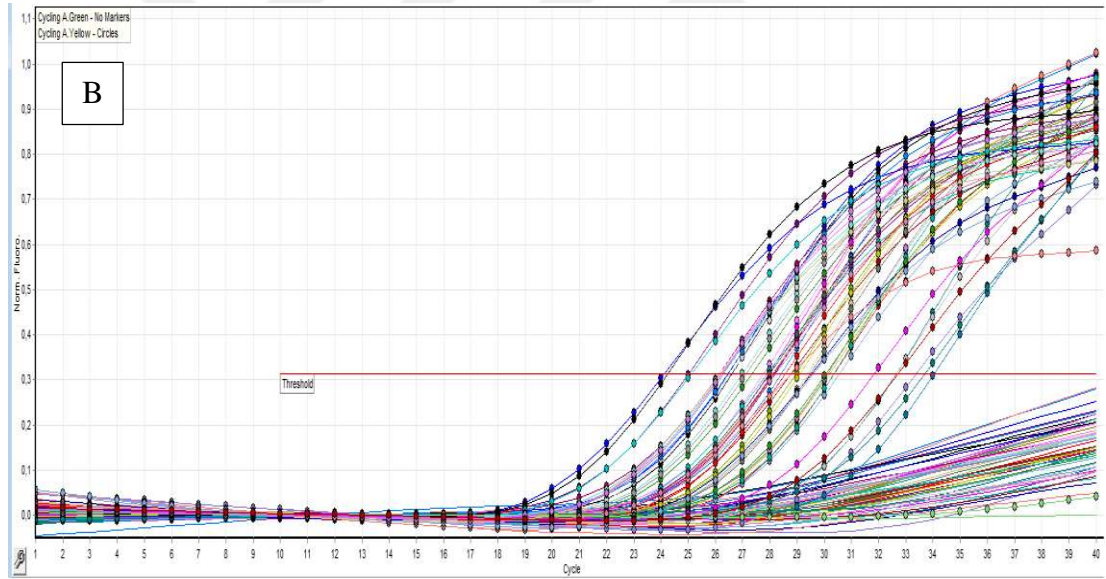
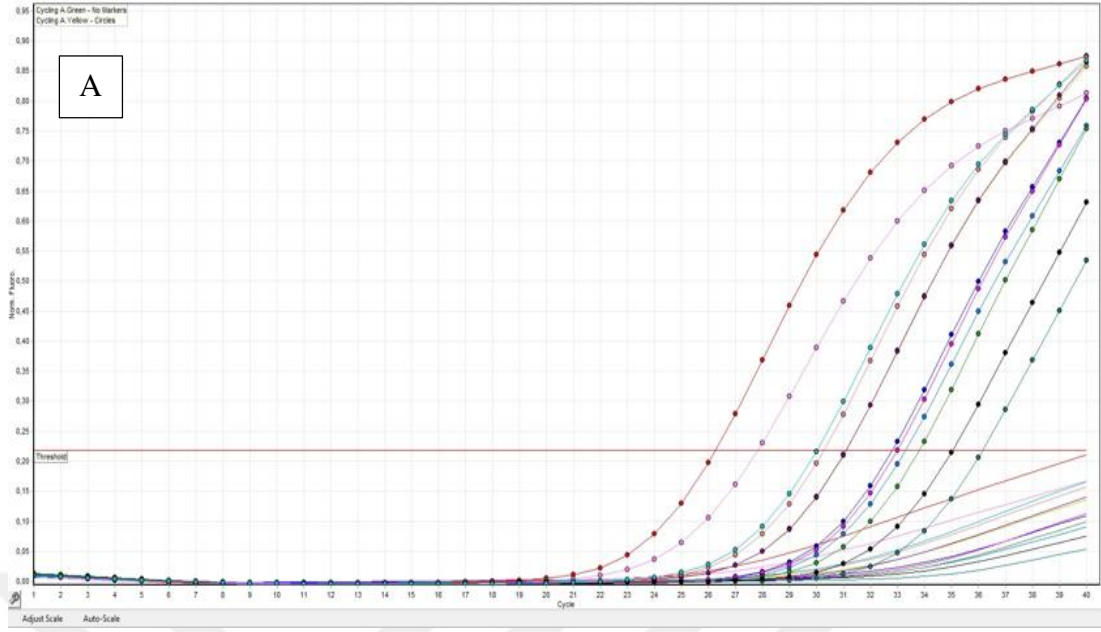
Şekil 12. RT-PCR cihazında SNP genotipleme için yapılan cihaz ayarları.

4.2.3.2.1. Hasta ve kontrol grubunun rs2070583 SNP analizi

Yapılan çalışmada kullanılan VIC ve FAM boyaları, prob üzerinde farklı alelleri tanımak için işaretlenmiştir. Her sinyal farklı bir genotipi temsil eder: floresan boyamalara göre, VIC boyası (yellow) ile sinyal veren bireyler AA (wild-type) genotipi göstermektedir. Her iki allel de normal (referans) aleldir. FAM sinyali yoktur. Yalnızca FAM boyası (green) ile sinyal veren bireyler GG (homozigot mutant) genotipi taşımaktadır. Her iki allel de değişmiş (varyant) aleldir. VIC sinyali yoktur. Hem VIC hem FAM boyası ile sinyal veren bireylerde ise AG (heterozigot) genotipi gözlenmiştir. Bir alel referans, diğer alel varyanttır. Çalışmamızda elde edilen veriler, yukarıda belirtilen floresan sinyalleri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Kontrol ve hasta gruplarına ait SNP verileri, gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 13 ve Şekil 14'te gösterilmektedir).



Şekil 13. rs2070583 Hasta Grubu SNP genotipleme sonuçları (A. wild type, B. heterozigot, C. korelasyon)

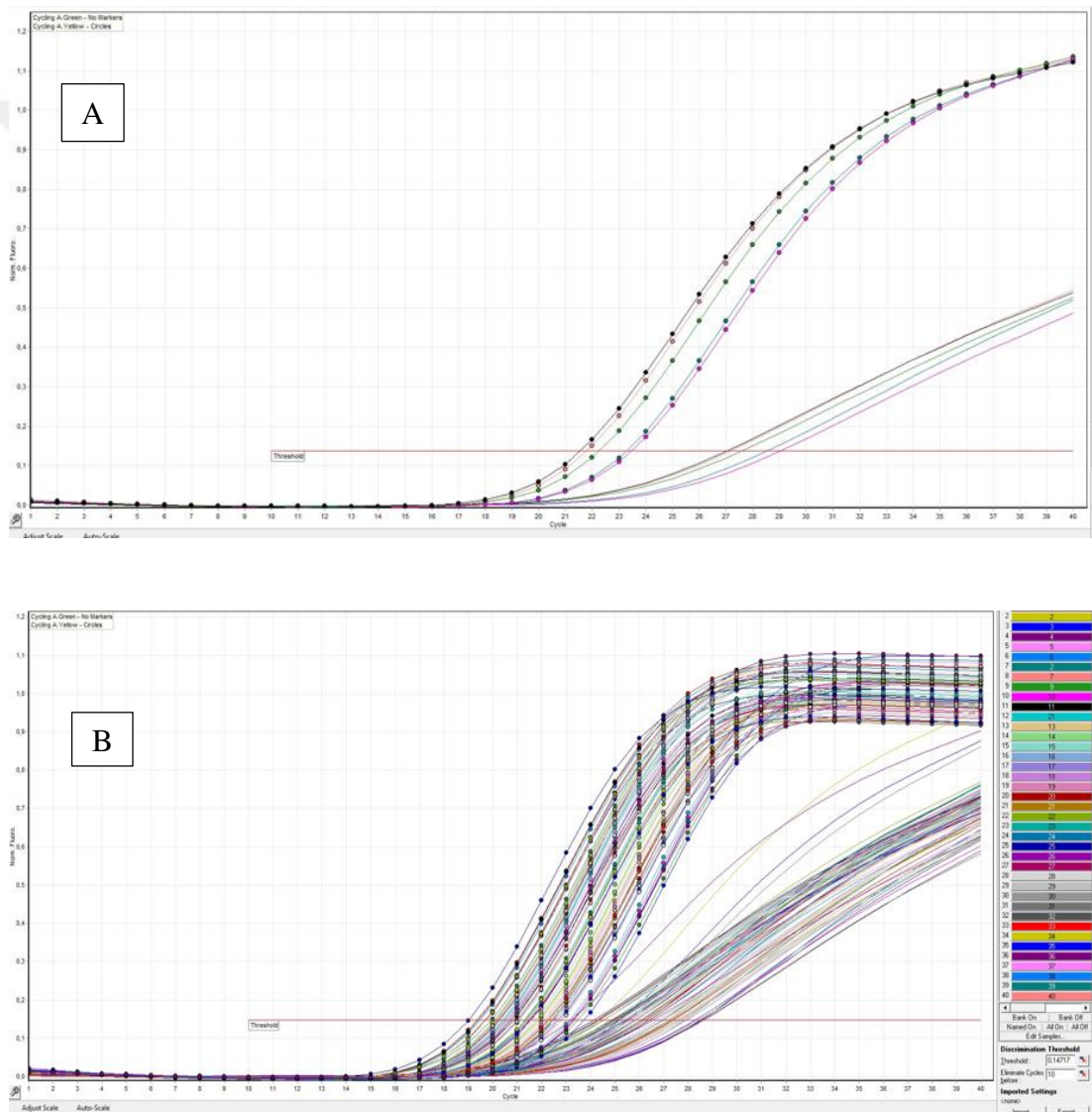


Şekil 14. rs2070583 Kontrol Grubu SNP genotipleme sonuçları (A. wild type, B. korelasyon)

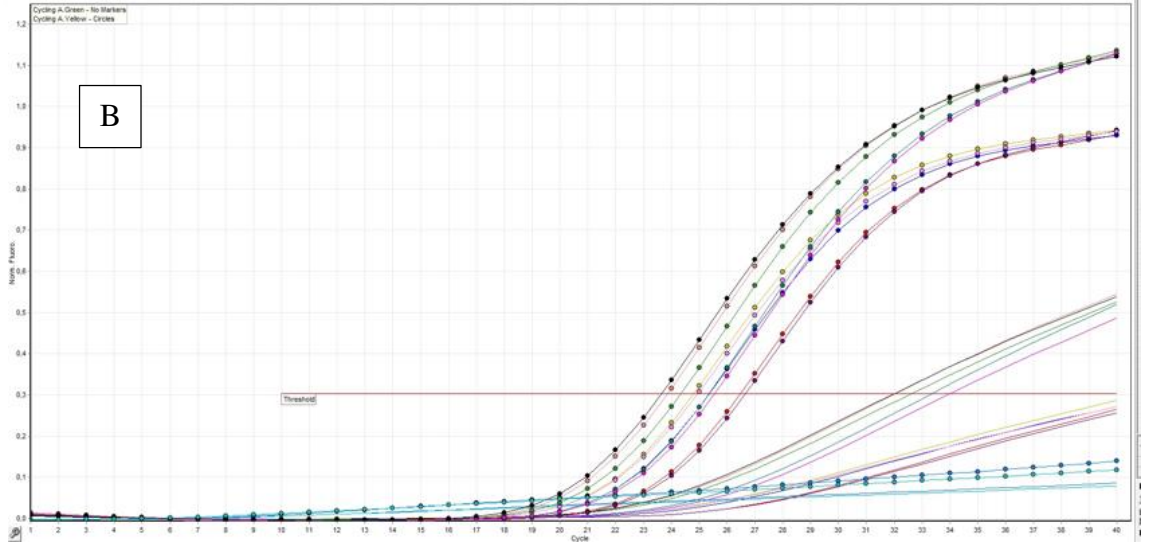
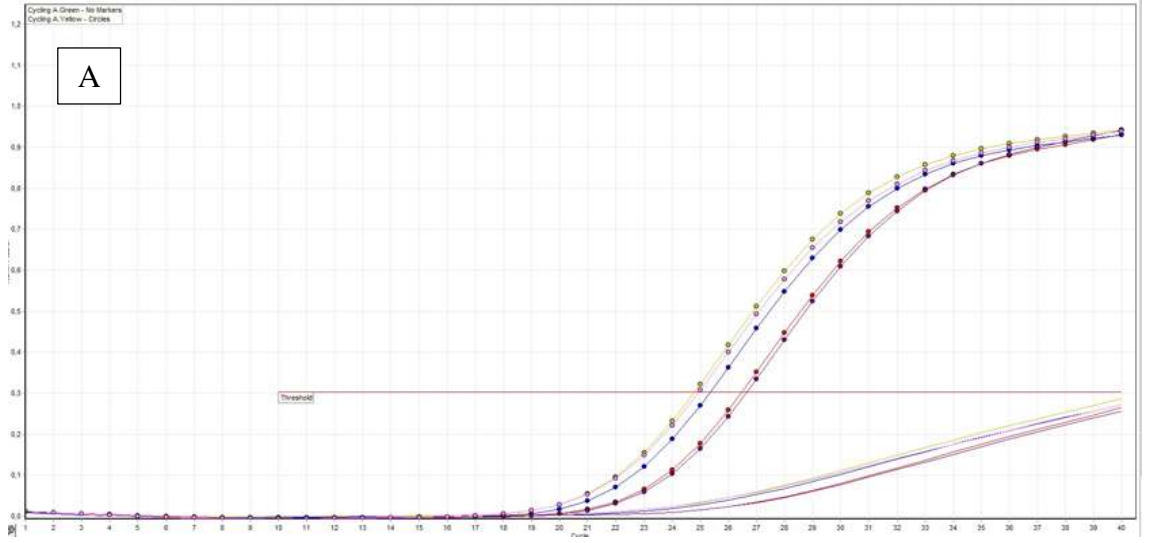
4.2.3.2.2. Hasta ve kontrol grubunun rs4645943 SNP analizi

Diğer bir grubumuzda kullanılan VIC ve FAM boyaları, prob üzerinde farklı alelleri tanımak için işaretlenmiştir. Her sinyal farklı bir genotipi temsil eder: floresan boyamalara göre, VIC boyası (yellow) ile sinyal veren bireyler CC (wild-type) genotipi göstermektedir. Her iki allel de normal (referans) aleldir. FAM sinyali

yoktur. Yalnızca FAM boyası (green) ile sinyal veren bireyler TT (homozigot mutant) genotipi taşımaktadır. Her iki allel de değişmiş (varyant) aleldir. VIC sinyali yoktur. Hem VIC hem FAM boyası ile sinyal veren bireylerde ise CT (heterozigot) genotipi gözlenmiştir. Bir alel referans, diğer alel varyanttır. Çalışmamızda elde edilen veriler, yukarıda belirtilen floresan sinyalleri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Şekil 15 ve Şekil 16’da, kontrol ve hasta gruplarına ait SNP verileri, gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar doğrultusunda gösterilmektedir.



Şekil 15. rs4645943 Hasta grubu (A. heterozigot, B. korelasyon)



Şekil 16. rs4645943 Kontrol grubu (A. wild type, B. korelasyon)

4.3. İstatistiksel Analiz

BRCA pozitif vakaları ile sağlıklı kontroller arasındaki alel ve genotiplerin frekans dağılımlarındaki farklılıkları değerlendirmek için χ^2 testi uygulandı. Frekansların hesaplanmasında Hardy-Weinberg dengesinden (HWE) sapma, uyum iyiliği χ^2 testi ile değerlendirildi. Verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS for Windows, Version 21.0 (IBM Corp. Armonk, NY, USA) programı ile yapılmıştır. MYC geni ile ilişkili polimorfizmler ile BRCA duyarlılığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi, olasılık oranları (OR) ve %95 güven aralıkları (GA) hesaplanarak

yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ölçümsel değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma (SD), kategorik değişkenler için sayı ve yüzde (%) olarak verilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında bağımsız gruplar t-testi, normal dağılıma uymayanlarda ise Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Kategorik değişkenlerin karşılaştırmalarında Ki-kare testi ve uygun durumlarda Fisher's exact testi kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiş olup, korelasyon katsayısı (r) değişkenler arasındaki yön ve büyüklüğü belirlemek için kullanılmıştır. Tüm hipotez testlerinde P değerleri $<0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir.



5. BULGULAR

Çalışmamızda, meme ve over kanseri tanısı almış hastalardan alınan kan örneklerinden elde edilen DNA'lar kullanılarak, NGS yöntemi ile BRCA geninde patojenik veya olası patojenik varyantlar tespit edilmiştir. Bu analiz sonucunda BRCA mutasyonu pozitif olarak belirlenen hastalar ile çalışmaya devam edilmiştir. Seçilen bu hastalarda, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi ile MYC genine ait iki farklı polimorfizm (örneğin rs2070583 ve rs4645943) incelenmiş ve ardından değerlendirme aşamasına geçilmiştir.

5.1. NGS Yöntemi Sonuçları

Hedeflenen genler BRCA1 (NM_007294.4) ve BRCA2 (NM_000059.3) olup, analizlerde referans genom olarak hg19 kullanılmıştır. Varyantların yorumlanmasında ClinVar, Franklin ve Varsome veri tabanlarından yararlanılmıştır. Çalışmaya BRCA pozitif çıkan 45 hastayla devam edilmiştir. Bu kapsamda hastalarda en çok saptanan varyantlara ilişkin bulgular Tablo 8'de özetlenmiştir.

Tablo 8. Hastalarda saptanan BRCA1 ve BRCA2 gen varyantlarının NGS analizi sonucu

Gen,Transkript	HGVSc, Değişim	ACMG Sınıfı	Genotip	İlişkili Hastalıklar	Genlerdeki Patojenik Varyantlara Bağlı BRCA1& BRCA2İlişkili Kalıtsal Meme ve Yumurtalık Kanseri Oranı
BRCA1NM_007294.4	Splice Regionc.135-1G>A	Patojenik (PVS1, PP5, PM2)	Heterozigot VAF%48(C:208)(T:193)	Meme-yumurtalık kanseri, familia, Fanconi anemisi, Pankreas kanseri	BRCA1 = %66
BRCA2NM_000059.3	Missense Variantc.9518G>A p.Cys3173Tyr	Klinik Önemi Bilinmeyen	Heterozigot VAF%50(G: 422 A : 429)	Medulloblast oma Pankreas kanseri, Meme-yumurtalık kanseri, ailevi	BRCA2 = %34

				hastalıklar, Prostat kanseri, Wilms tümörü	
BRCA2NM_000059.3	Frameshiftc.9027delp.H3010Ifs*18	Patojenik	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA2 = %34
BRCA2NM_000059.3	Missense Variantc.230C>Ap.T77N	VUS	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA2 = %34
BRCA2NM_000059.3	Missense Variantc.1118A>Gp.Q373R	VUS	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA2 = %34
BRCA2NM_000059.3	Missense Variantc.3814A>Gp.M1272V	VUS	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA2 = %34
BRCA2NM_000059.3	Missense Variantc.1592A>Cp.K531T	VUS	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA2 = %34
BRCA1NM_007294.4	Nonsense Variantc.5444G>Ap.W1815	Patojenik	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA1 = %66
BRCA1NM_007294.4	Missense Variantc.3877G>Cp.A1293P	VUS	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA1 = %66
BRCA2NM_000059.3	Missense Variantc.7205C>Gp.P2402R	VUS	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA2 = %34
BRCA2NM_000059.3	Missense Variantc.2798C>Ap.T933K	VUS	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA2 = %34

BRCA2NM_00059.3	Frameshift Variantc. 5574_5577delAATTp.I1859Kfs	Patojenik	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA2 = %34
BRCA1NM_007294.4	Frameshift Variantc. 1881_1884delCAGTp.S628Efs	Patojenik	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA1 = %66
BRCA1NM_007294.4	Inframe Deletionc. 3005delp. N1002Tfs	Patojenik	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA1 = %66
BRCA1NM_007294.4	Stop Gainedc.470_471delCTp.S157	Patojenik	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA1 = %66
BRCA1NM_007294.4	Nonsense Variantc. 1444_1447delATTAp.I482	Patojenik	HETEROZİGOT	Meme-yumurtalık kanseri, ailevi hastalıklar	BRCA1 = %66

5.2. MYC rs2070583 Polimorfizminin Real-Time PCR Tabanlı Analizi

Çalışmada kontrol grubunu temsil eden 45 birey ile hasta grubunu temsil eden 45 hasta değerlendirilmiştir. Hasta grubunda yer alan 45 bireyin 44'ü (%97,8) rs2070583 (A/G) polimorfizmi açısından AA genotipine (wild type) sahipken, kontrol grubundaki 45 sağlıklı bireyin tamamında (%100) AA genotipi belirlenmiştir. Hasta grubunda yalnızca 1 bireyde (%2,2) AG genotipi (heterozigot) saptanmış, kontrol grubunda ise AG genotipi gözlenmemiştir. Her iki grupta da GG genotipi (homozigot mutant) tespit edilmemiştir. Genotip dağılımları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Allel frekansları değerlendirildiğinde, hasta grubunda G alleli frekansı 1 (%1,1) ve A alleli frekansı 89 (%98,9) olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda ise G alleleline rastlanmamış (%0), tüm bireylerde A alleli (%100) belirlenmiştir. Allel frekansları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p >$

0,05, $X^2 = 1,006$). Kontrol grubunda G allelinin hiç gözlenmemesi nedeniyle odds oranı (OR) hesaplanamamıştır ve teorik olarak sonsuz kabul edilmektedir. Bu çalışma sonucunda rs2070583 polimorfizminin alallerinin BRCA pozitif geniyle anlamlı bir ilişkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Kontrol ve hasta gruplarında MYC genindeki rs2070583 polimorfizmine ait genotip ve allel frekansları Tablo 9’da sunulmuştur.

Tablo 9. MYC rs2070583 A>G polimorfizmi genotip ve allel dağılımları ile hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması

A/G Pol. Genotipi	Hasta N=45 n (%)	Kontrol N= 45 n (%)	p	X ²	Odds Ratio	%95 CI
AA	44(97,8)	45 (100)				
AG	1 (2,2)	0 (0)	0,3146	1,011	-	-
GG	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-
Allel (F)						
A	89 (98,9)	90(100)	0,3160	1,006		-
G	1 (1,1)	0 (0)	0,3160	1,006	-	-

Not: GG genotipi gözlenmediğinden OR hesaplanamamıştır.

5.3. MYC rs4645943 Polimorfizminin Real-Time PCR Tabanlı Analizi

Çalışmada hasta grubundaki 45 bireyin hiçbiri rs4645943 (C/T) polimorfizmi açısından CC genotipine (wild type) sahip bulunmamıştır. Kontrol grubundaki 45 sağlıklı bireyin ise 7’sinde (%15,6) CC genotipi belirlenmiştir. Hasta grubundaki tüm bireylerde (n=45, %100) CT genotipi (heterozigot mutant) gözlenirken, kontrol grubunda 38 bireyin (%84,4) CT genotipine sahip olduğu saptanmıştır. İki grup arasında genotip dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$, $X^2 = 5,577$). Bu çalışma sonucunda, CT genotipinin BRCA pozitif geni ile ilişkili olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, her iki grupta da TT genotipi (homozigot mutant) tespit edilmemiş olup, bu açıdan gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$, $X^2 = 0$).

Allel frekansları incelendiğinde, hasta grubunda C alleli frekansı 45 (%50,0) ve T alleli frekansı 45 (%50,0) olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda ise C alleli

frekansı 52 (%57,8) ve T alleli frekansı 38 (%42,2) olarak belirlenmiştir. İki grup arasında allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$, $X^2 = 1,096$; OR = 1,368, %95 CI: (0,760-2,464). Kontrol ve hasta gruplarında MYC genindeki rs4645943 polimorfizmine ait genotip ve allel frekansları Tablo 10’da sunulmuştur.

Tablo 10. MYC rs4645943 C>T polimorfizmi genotip ve allel dağılımları ile hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması

C/T Pol. Genotipi	Hasta N=45 n (%)	Kontrol N= 45 n (%)	p	X ²	Odds Ratio	%95 CI
CC	0(0)	7 (15,6)				
CT	45 (100)	38 (84,4)	0,0182	5,577	-	-
TT	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-
Allel (F)						
C	45 (50)	52 (57,8)	0,2953	1,096	0,731	(0,406, 1,316)
T	45 (50)	38 (42,2)	0,2953	1,096	1,368	(0,760, 2,464)

Not: CC genotipi hasta grubunda gözlenmediğinden OR hesaplanamamıştır.

6. TARTIŞMA

Kanser, çok sayıda genetik olayın ve kanserin temel özelliklerinin kazanılmasını gerektiren karmaşık bir süreçtir (112). Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malignitedir ve her yıl tanı alan yeni kanser vakalarının %10'undan fazlasını oluşturmaktadır (113). Meme kanseri özünde heterojen bir hastalık olup, ailesel meme kanseri öyküsü (kalıtsal meme kanseri) de dâhil olmak üzere çeşitli faktörlerin etkileşimleri sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (114). Buna karşılık, over kanseri gelişme riski, erken adet görme, geç menopoz ve infertilite ile ilişkilendirilmiştir. Ancak, over kanseri için en güçlü risk faktörü, ailede meme ve/veya over kanseri öyküsüdür. Birinci derece akrabasında bu kanserlerden biri bulunan bireylerde over kanseri gelişme riski 2 ila 6 kat artmaktadır. Bir popülasyondaki over kanseri gelişme riskinin genetik belirleyicileri incelendiğinde, genel popülasyonda BRCA taşıyıcılarının sıklığı, risk faktörlerinin tahmin edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, over kanseri hastalarında germ hattı BRCA1/2 mutasyonlarının sıklığı ve bu mutasyonların dağılımı popülasyona bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Bu farklılığın kesin nedeni henüz bilinmemektedir. Ancak etnik açıdan farklı popülasyonlarda kurucu mutasyonların varlığı ve yayılımı, germ hattı BRCA1/2 mutasyon oranlarını etkilemiş olduğu düşünülmektedir. Tartışmalar devam etmekle birlikte, over kanseri riskinde hem etnik kökene hem de BRCA mutasyon tipine bağlı farklılıklar olduğu görülmektedir (115).

Genetik yatkınlık, meme ve over kanseri gelişiminde önemli bir rol oynamakta ve kalıtsallık gösteren bazı genler bu süreci tetikleyebilmektedir. Örneğin BRCA ve MYC genleri bu bağlamda öne çıkmaktadır (114). BRCA1 ve BRCA2 genleri, genom bütünlüğünün korunmasında kritik roller üstlenmektedir. Bu genlerde çok sayıda mutasyon tanımlanmıştır bu patojenik germ hattı mutasyonları, fonksiyon kaybına yol açarak genom instabilitesini artırmakta ve bireyleri meme, over, pankreas ve prostat gibi çeşitli kanser türlerine yatkın hale getirmektedir (116).

BRCA1/2 bazı mutasyonlar birbiriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan birden fazla ailede saptanmıştır. Örneğin, Aşkenaz Yahudilerinde BRCA1 genine ait 187delAG mutasyonu ile BRCA2 genine ait 6174delT mutasyonu yaygın olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, belirlenen bu mutasyonların diğer popülasyonlarda da tanımlandığı bildirilmiştir (115).

Uluslararası düzeyde yürütülen çalışmalarda, BRCA1/2 mutasyonlarının meme kanseri üzerindeki yaygınlığına dair önemli farklılıklar rapor edilmiştir. Örneğin, BRCA1/2 mutasyon prevalansı sporadik meme kanserinde %1,8 (İspanya) ile %36,9 (ABD) arasında değişmektedir. Aile öyküsü, etnik köken, cinsiyet veya yaş gözetilmeksizin gerçekleştirilen iki geniş ölçekli çalışmada, germ hattı BRCA (gBRCA) mutasyon prevalansı ülkeler arasında farklı olarak bulunmuştur (117).

Yapılan başka bir çalışmada Kuchenbaecker ve arkadaşları, 3886 BRCA mutasyon taşıyıcısı üzerinde gerçekleştirilen prospektif bir analizde, 70 yaşına kadar kümülatif meme kanseri insidansını BRCA1 için %66, BRCA2 için ise %61 olarak bildirmiştir. BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında risk özellikle 30–50 yaş arasında artarken, BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınlarda en yüksek risk 40–60 yaş aralığında gözlenmiştir. Bu çalışma, etnik açıdan çeşitli bir popülasyonu kapsamı bakımından önem arz etmektedir. Bu çalışmada farklı varyantlar tespit edilmiştir; ancak mevcut literatür göz önüne alındığında, sürekli kalıtılan belirli bir varyanttan söz etmek doğru değildir. Bizim çalışmamızda da farklı yaş gruplarında kadın hastalarda farklı varyantlar tespit edilmiştir (118).

Brodie ve Deng tarafından yapılan bir çalışmada, BRCA1 eksikliği bulunan farelerde, bazı tümör baskılayıcı genlerde heterozigotluk kaybı ve onkogenleri içeren genomik bölgelerde amplifikasyon geliştiği gösterilmiştir. Bu bulgular, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının genomik instabiliteyi artırarak onkogen aşırı ekspresyonu, hücre döngüsü kontrolünün kaybı ve dolayısıyla kanser gelişimi ile sonuçlandığını ortaya koymaktadır (113).

BRCA1, histon deasetilaz kompleksleri ile etkileşime girmekte, DNA polimeraz II holoenzimi ile ilişkili olmakta ve ayrıca RNA helikaz A, c-Myc ve p53 gibi kritik moleküllerle doğrudan etkileşim göstermektedir. Özellikle c-Myc, tipik olarak bir transkripsiyonel aktivatör olarak görev yaparken, BRCA1 bu aktiviteyi baskılayarak tümör gelişiminin engellenmesine katkı sağlar. Myc amplifikasyonları, BRCA1 mutasyonu taşıyan tümörlerde daha sık gözlenmektedir; ancak tüm BRCA1-mutant tümörlerde bu durum ortaya çıkmadığı için BRCA1 mutasyonunun tipi ile Myc amplifikasyonu arasında olası bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. MYC amplifikasyonu, özellikle Myc bağlanma bölgelerinin üstünde veya içinde yer alan

BRCA1 mutasyonlu tümörlerde ve daha nadiren bu bölgelerin aşağı akışında mutasyon taşıyan olgularda görülmektedir. Bu durum, aşağı akıştaki bölgelerin BRCA1–MYC etkileşimini dolaylı olarak etkileyebileceğini veya mutasyon sonucu oluşan kesilmiş (truncated) BRCA1 proteininin Myc ile etkili bir etkileşim kuramayacak kadar kararsız hâle gelebileceğini düşündürmektedir (113).

Literatürde, MYC gen amplifikasyonunun meme kanseri progresyonunda önemli bir rol oynadığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu amplifikasyon, BRCA1 germ hattı mutasyon taşıyıcıları ve BRCA1 promotör hipermetilasyonu ile inaktive olmuş sporadik tümörlerde sık gözlenmektedir. Araştırmalar, BRCA1 mutasyonlu tümörlerin %53'ünde, sporadik tümörlerin ise %23'ünde MYC amplifikasyonu olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, BRCA1'in MYC kaynaklı meme hücresi dönüşümünü önlemedeki kritik tümör baskılayıcı rolünü ortaya koymaktadır. MYC ve BRCA1, tümör oluşumuna önemli katkıda bulunan iki protein olarak öne çıkmakta olup meme ve over tümörü ilerlemesinde MYC–BRCA1 etkileşiminin işlevsel sonuçları halen büyük ilgi görmektedir (119). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda BRCA mutasyonu olan hastalarda incelenen iki farklı MYC polimorfizimlerinden rs4645943'ün istatistiksel olarak anlamlı bulunması, rs2070583'ün ise anlamlılık göstermemesi, BRCA ile MYC ilişkisinin farklı etkenlerde bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu durumun daha iyi anlaşılabilmesi için MYC geniyle ilgili daha kapsamlı bilgilere sahip olunması gerekmektedir. MYC süper ailesi transkripsiyon faktörü veya yardımcı düzenleyici proteinler olarak işlev gördüğü düşünülen ve insan kanserlerinde çok yaygın olarak aktive olan birden fazla proteini kodlayan genleri de içerir (120). MYC'nin aşırı ekspresyonu veya hiperaktivasyonu, insan kanserlerinin en yaygın nedenlerinden biridir. Bu aktivasyon, toplam RNA ve protein üretimini artırarak kanser hücrelerine tümör oluşumunu destekleyen özellikler kazandırırken, aynı zamanda hücrelerin bu makromolekülleri işleme kapasitesinde ek yük oluşturur. MYC aktivasyonu tek başına genellikle malign olmayan hücrelerin neoplastik dönüşümünü başlatmak için yeterli değildir. Gerçekte, onkojenik MYC'nin tümörijenik fonksiyonları hücre döngüsü durmasına, apoptoza veya hücre yaşlanmaya neden olan birçok fizyolojik mekanizma tarafından kısıtlanır. MYC, DNA replikasyonu üzerindeki spesifik etkileriyle hücre yaşlanma programlarını aktive eder (121,122).

Kanser riski ile ilişkili bir diğer önemli etken ise tek nükleotid polimorfizmleridir (SNP'ler). SNP'ler, genomdaki genetik çeşitliliğin en yaygın kaynaklarını oluşturur ve sıklıkla potansiyel olarak hastalık yatkınlığına, özellikle de kanser gelişimine katkı sağlayabilecek genetik varyantlar olarak değerlendirilir. Literatürde, MYC geninde yer alan polimorfizmler ile mide kanseri, kolorektal kanser, meme kanseri, akciğer kanseri, özofagus kanseri, Wilms tümörü (WT) ve böbrek kanseri dahil olmak üzere çeşitli maligniteler arasındaki olası ilişkiler, farklı etnik gruplar üzerinde gerçekleştirilen çok sayıda çalışmada araştırılmıştır. MYC genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler), proteinin yapısı, fonksiyonu ve gen ekspresyon düzeyleri üzerinde değişikliklere neden olabileceği; bu durumun ise kanser duyarlılığını artırabileceği, elde edilen bulgular doğrultusunda öne sürülmektedir. (123). Literatür incelemeleri yapıldığında SNP'lerimizin birçok kanser türünde ilişkili olabileceği gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda c-MYC proteini, yakın zamanda kardiyovasküler hastalık (KVD) ile ilişkili bulunmuştur (124).

Lee ve arkadaşları, c-MYC rs4645943 polimorfizminin, kalp kapağı replasmanı geçiren hastalarda varfarin doz gereksinimi ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, c-MYC rs2070583 polimorfizmi, Afrikalı Amerikalılarda koroner kalp hastalığı ile anlamlı bir ilişki göstermektedir (125). Çalışmamızda yer alan hasta grubunda kalp rahatsızlığına dair herhangi bir beyan bulunmamaktadır. Ancak rs4645943 polimorfizmi taşıyan bireylerde kalp hastalıkları ile ilişkili risklerin olup olmadığının belirlenebilmesi için ileri düzey araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan başka bir çalışmada, aynı iki SNP kullanılarak Çinli çocuklarda MYC gen polimorfizmleri ile nöroblastoma duyarlılığı arasındaki ilişki araştırılmış, ancak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (123). Benzer şekilde, aynı SNP'ler kullanılarak Wilms tümörlü hastalarda gerçekleştirilen bir başka çalışmada da istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bununla birlikte, söz konusu bölgelerin bu kanserlerin gelişiminde rol oynayabilecek diğer genleri etkilediği gösterilmiştir (126).

Wu ve arkadaşları, c-MYC proteininin inaktivasyonunun tümör yaşlanmasını desteklediğini rapor etmiştir. Olbromski ve ekibi, Polonya'daki yumurtalık kanseri hastalarında c-MYC ekspresyon ve protein düzeyinde kontrol grubuna kıyasla azalma olduğunu bulmuştur. Gen ekspresyon analizleri, c-MYC'nin over kanseri riskiyle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Polimorfizm çalışmaları ise, MYC geninin rs4645943 ve rs2070583 varyantlarının nöroblastoma üzerinde zayıf etkisi olabileceğini ancak hepatoselüler karsinom riskiyle ilişkili olmadığını ortaya koymuştur (97).

Çalışmamızda, seçilen MYC polimorfizmleri rs4645943 (C>T) ve rs2070583 (A>G) varyantlarının, BRCA geni ile ilişkili kanser riskiyle bağlantısı genel analiz ve tabakalama analizleri aracılığıyla incelenmiş ve anlamlılık düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu SNP'lerin alel frekanslarının farklı popülasyonlardaki prostat kanseri vakaları ile kontroller arasında değişkenlik gösterdiği daha önce rapor edilmiştir (127). Mevcut literatür bilgileri ışığında, MYC geninde analiz edilen polimorfizmler ile BRCA pozitif meme ve over kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk araştırma niteliğindedir. Daha önce yapılan çok sayıda çalışma, MYC düzensizliğinin meme ve akciğer kanseri de dâhil olmak üzere birçok kanser ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, MYC genindeki bazı SNP'lerin MYC ekspresyonunu bozarak kanser duyarlılığını etkileyebileceği bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda MYC geninin belirli SNP'leri üzerinde odaklanılmıştır (124).

rs4645943 C>T polimorfizminin daha önce prostat kanseri riski ile ilişkili olduğu bildirilmiş olmasına karşın, BRCA pozitif meme ve over kanseri ile ilişkisi şimdiye kadar araştırılmamıştır. Öte yandan, rs2070583 A>G ile kanser duyarlılığı arasındaki ilişkiye dair herhangi bir bulgu literatürde mevcut değildir (126).

Hasta grubumuz, meme ve over kanseri olgularından oluşmaktadır. Çalışmamızda rs4645943 polimorfizminin anlamlı bulunması ve literatürde bu varyantın prostat kanseri ile de ilişkili olduğunun bildirilmiş olması, rs4645943 polimorfizminin üreme organlarında gelişen kanserlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu güncel vaka-kontrol çalışmasında, MYC geninin düzenleyici bölgelerindeki seçilmiş SNP'ler ile MYC-BRCA etkileşimi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Bulgularımıza göre, rs2070583 A>G polimorfizmi hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Buna karşılık, rs4645943 C>T polimorfizmi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$).

Sonuç olarak, seçilen iki polimorfizm MYC gen ekspresyonu ve işlevini doğrudan etkileyebilir. Bununla birlikte, önceki çalışmalar MYC genindeki SNP'lerin gen ifadesi ve fonksiyonunu etkileyerek kanser duyarlılığına katkıda bulunabileceğini desteklemektedir.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, transkripsiyon faktörü olan MYC polimorfizmlerinin BRCA1/2 ile ilişkili kanser duyarlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tek lokus ve birleşik analizler sonucunda, incelenen MYC genindeki iki polimorfizmden yalnızca rs4645943 C>T varyantı, BRCA pozitif meme ve over kanseri hastalarında anlamlı bulunmuştur. Diğer polimorfizm olan rs2070583 A>G için ise herhangi bir ilişki saptanmamıştır.

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle, örneklem büyüklüğünün sınırlı olması istatistiksel gücü azaltabilmektedir. İkinci olarak, MYC geninde yalnızca iki polimorfizm incelenmiş olup, potansiyel olarak işlevsel olabilecek diğer varyantlar değerlendirilmemiştir. Literatürde mevcut sınırlı sayıdaki çalışma ile bulgularımız arasındaki farklılıkların, bölgesel varyasyonlardan veya çalışmamızda değerlendirilen popülasyonun kısıtlı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Belirtilen sınırlılıkların gelecekteki çalışmalarda giderilmesi, elde edilecek sonuçların bilimsel güvenilirliğini ve klinik uygulanabilirliğini artıracak; daha güçlü ve yönlendirici verilerin elde edilmesine olanak sağlayacaktır. Sonuç olarak, çalışmamız, rs4645943 C>T polimorfizminin BRCA ile ilişkili meme kanseri riskinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu bulguların doğrulanması için, daha geniş örneklem büyüklüklerine sahip, iyi tasarlanmış prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

1. Katsura C, Ogunmwonyi I, Kankam HK, Saha S. Breast cancer: presentation, investigation and management. *British journal of hospital medicine* (London, England). 2022; 2:83(2):1-7.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal, A. Cancer statistics, CA: a cancer journal for clinicians, 2012; 62(1), 10–29.
3. Akkuzu M, Küçüköner M, Irtegun S, Akdeniz N, vd. Meme Kanserinde Brca-1 ve Brca-2’de Sık Görülen Polimorfizm Mutasyonların Bölgemizde Varlığı. *Dicle Medical Journal*, 2019; 46(4), 623-631.
4. Levine PH. "Risk Factors for the development of aggressive inflammatory and non-inflammatory breast cancer" in "Abstracts of the 27th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium" 2004 ; 8-11; 88 Supplement 1: S91.
5. Baskan S, Atahan K, Arıbal E, Özaydın N, Balcı, P, & Yavuz E. MEME KANSERİNDE TARAMA VE TANI (İSTANBUL MEME KANSERİ KONSENSUS KONFERANSI). *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 2012 ;8(3).
6. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 [updated 2025 Mar 20]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2025.
7. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, Safari E, Farahmand L. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*. 2020;84:106535.
8. Kolak A, Kamińska M, Sygit K, Budny A, Surdyka D, Kukielka-Budny B, Burdan F. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Ann Agric Environ Med*. 2017;24(4):549–553.
9. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Ovarian, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancers Prevention (PDQ®): Patient Version. 2025 Feb 12. In: *PDQ Cancer Information Summaries* [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-.
10. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health*. 2019;11:287–299.
11. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Gaudet MM, Jemal A, Siegel RL. Ovarian cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(4):284–296.
12. Hanby AM, Walker C, Tavassoli FA, Devilee P. *Pathology and Genetics: Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon, France: IARC Press. Breast Cancer Res. 2004;6:133.
13. Lee WY, Jin YT, Chang TW, Lin PW, Su IJ. Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopathology*. 1999;34(2):106–112.
14. Wang C, Horiuchi A, Imai T, Ohira S, Itoh K, Nikaido T, Katsuyama Y, Konishi I. Expression of BRCA1 protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *J Pathol*. 2004;202(2):215–223.

15. Rafnar T, Benediktsdottir KR, Eldon BJ, Gestsson T, Saemundsson H, Olafsson K, Salvarsdottir A, Steingrimsson E, Thorlacius S. BRCA2, but not BRCA1, mutations account for familial ovarian cancer in Iceland: a population-based study. *Eur J Cancer*. 2004;40(18):2788–2793.
16. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):976–990.
17. Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*. 2003;17(9):1115–1129.
18. Haiman CA, Patterson N, Freedman ML, Myers SR, Pike MC, Waliszewska A, Neubauer J, Tandon A, Schirmer C, McDonald GJ, Greenway SC, Stram DO, Le Marchand L, Kolonel LN, Frasco M, Wong D, Pooler LC, Ardlie K, Oakley-Girvan I, Whittemore AS, Reich D. Multiple regions within 8q24 independently affect risk for prostate cancer. *Nat Genet*. 2007;39(5):638–644.
19. Terunuma A, Putluri N, Mishra P, Mathé EA, Dorsey TH, Yi M, Wallace TA, Issaq HJ, Zhou M, Killian JK, Stevenson HS, Karoly ED, Chan K, Samanta S, Prieto D, Hsu TY, Kurley SJ, Putluri V, Sonavane R, Edelman DC, Ambis S. MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J Clin Invest*. 2014;124(1):398–412.
20. De Baets G, Van Durme J, Reumers J, Maurer-Stroh S, Vanhee P, Dopazo J, Schymkowitz J, Rousseau F. SNPeffect 4.0: on-line prediction of molecular and structural effects of protein-coding variants. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D935–D939.
21. Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM, Prendergast J, Olschwang S, Chiang T, Crowdy E, Ferretti V, Laflamme P, Sundararajan S, Roumy S, Olivier JF, Robidoux F, Sladek R, Montpetit A, Campbell P, Bezieau S, Dunlop MG. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet*. 2007;39(8):989–994.
22. Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, Amundadottir LT, Gudbjartsson D, Helgason A, Rafnar T, Bergthorsson JT, Agnarsson BA, Baker A, Sigurdsson A, Benediktsdottir KR, Jakobsdottir M, Xu J, Blondal T, Kostic J, Sun J, Ghosh S, Stacey SN, Mouy M, Stefansson K. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat Genet*. 2007;39(5):631–637.
23. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016;53(3):441–442.
24. Ayaz GB, Şahin Ö, Ayaz U, Özdemir SM. Epigenetik ve kanser. *Madde Diyalektik Toplum*. 2019;2(1):94–103.
25. Kucukkaya R, Celik H, Alkaç İ, Gunel T. Kanser ve endotel hücreleri [Cancer and endothelial cells]. *LLM Dergi*. 2018;2:27–33.
26. Kamal Kucukkaya R, Celik H, Alkaç İ, Gunel T. Kanser ve endotel hücreleri [Cancer and endothelial cells]. *LLM Dergi*. 2018;2:27–33.
27. N, Ilowefah MA, Hilles AR, Anua NA, Awini T, Alshweh HA, Aldosary SK, Jambocus NGS, Alosaimi AA, Rahman A, Mahmood S, Mediani A. Genesis and mechanism of some cancer types and an overview on the role of diet and nutrition in cancer prevention. *Molecules (Basel)*. 2022;27(6):1794.
28. Ponder BA. Cancer genetics. *Nature*. 2001;411(6835):336–341.

29. Garreffa E, Lee R. Hereditary and familial cancer. Surgery (Oxford). 2024;42(3):177–183.
30. Özdoğan M. Prof. Dr. Mustafa Özdoğan Tıbbi Onkoloji Uzmanı Web Sitesi. Genlerimiz bencil olabilir mi? Kalıtsal kanserler ve genleri. 2024 Aug 4 [cited 2025 Jan 8]. Available from: <https://www.drozdogan.com/genlerimiz-bencil-olabilir-mi-kalitsal-kanserler-ve-genleri/>
31. Butti R, Das S, Gunasekaran VP, Yadav AS, Kumar D, Kundu GC. Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. Mol Cancer. 2018;17(1):34.
32. (Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye Kanser İstatistikleri (2017). [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye Kanser Istati stikleri 2017.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf))
33. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı.(2021) <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kansertaramalari>
34. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2015;24(10):1495-506.
35. Kuzey GMT. Temel Patoloji. 1st ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 2007. p. 705–744.
36. Kozan R, Tokgöz VY. Türkiye’de meme kanseri farkındalığı ve tarama programı. ACU Sağlık Bil Dergisi. 2016;4:185–188.
37. Sokolova A, Johnstone KJ, McCart Reed AE, Simpson PT, Lakhani SR. Hereditary breast cancer: syndromes, tumour pathology and molecular testing. Histopathology. 2023;82(1):70–82.
38. Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. Genet Med. 2010;12(5):245–259.
39. Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RH. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. Maturitas. 2004;49(1):34–43.
40. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 [Updated 2025 Mar 20].
41. Bertozzi S, Londero AP, Xholli A, Azioni G, Di Vora R, Paudice M, Bucimazza I, Cedolini C, Cagnacci A. Risk-reducing breast and gynecological surgery for BRCA mutation carriers: a narrative review. J Clin Med. 2023;12(4):1422.
42. Zhang R, Siu MKY, Ngan HYS, Chan KKL. Molecular biomarkers for the early detection of ovarian cancer. Int J Mol Sci. 2022;23(19):12041.
43. World Cancer Research Fund International. Ovarian cancer statistics [Internet]. 2020 [cited 2025 Jan 8].
44. Türk Jinekolojik Onkoloji Derneği. 2020. Yumurtalık kanserini anlamak. Erişim: <https://www.trsgo.org/files/toplum-icin/yumurtalik-kanserini-anlamak.pdf>
45. Ali AT, Al-Ani O, Al-Ani F. Epidemiology and risk factors for ovarian cancer. Przegl Menopauzalny. 2023;22(2):93–104.
46. Smolarz B, Biernacka K, Łukasiewicz H, Samulak D, Piekarska E, Romanowicz H, Makowska M. Ovarian cancer—epidemiology, classification, pathogenesis, treatment, and estrogen receptors' molecular backgrounds. Int J Mol Sci. 2025;26(10):4611.
47. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2012 roku. Warszawa: Ministerstwo Zdrowia; 2014.

48. Barili V, Ambrosini E, Bortesi B, Minari R, De Sensi E, Cannizzaro IR, Pellegrino B, et al. Genetic basis of breast and ovarian cancer: approaches and lessons learnt from three decades of inherited predisposition testing. *Genes*. 2024;15(2):219.
49. Jammal MP, Lima CA, Murta EFC, Nomelini RS. Is ovarian cancer prevention currently still a recommendation of our grandparents? A prevenção do câncer de ovário ainda é uma recomendação de nossos avós? *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2017;39(12):676–685.
50. Smolarz B, Biernacka K, Łukasiewicz H, Samulak D, Piekarska E, Romanowicz H, Makowska M. Ovarian cancer—epidemiology, classification, pathogenesis, treatment, and estrogen receptors' molecular backgrounds. *Int J Mol Sci*. 2025;26(10):4611.
51. Turan İ. MLPA tekniği ile meme kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 genlerinde delesyon ve duplikasyonların belirlenmesi [master's thesis]. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı;2008. Available from: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=slMvCbzCFCIMaLu_ZKaAw&no=KUayQ3RuCvLc_lwzY_vtXQ
52. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 1992;69(1):119–128.
53. Iau PT, Macmillan RD, Blamey RW. Germ line mutations associated with breast cancer susceptibility. *Eur J Cancer*. 2001;37(3):300–321.
54. Borg A, Isola J, Chen J, Rubio C, Johansson U, Werelius B ve ark. Germline BRCA1 and HMLH1 mutations in a family with male and female breast carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 85 (6): 796-800.
55. Smolarz B, Biernacka K, Łukasiewicz H, Samulak D, Piekarska E, Romanowicz H, Makowska M. Ovarian cancer—epidemiology, classification, pathogenesis, treatment, and estrogen receptors' molecular backgrounds. *Int J Mol Sci*. 2025;26(10):4611.
56. Brade W. Body size of Holstein cows: a critical analysis from the point of view of breeding and animal welfare. *Berichte uber Landwirtschaft*. 2017;95:—.
57. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins and Cotran LS. The breast. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, editors. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2010. p. 280–286, 1073–1095.
58. PDQ Genetics of Hereditary Hematologic Malignancies Editorial Board. Genetics of hereditary hematologic malignancies (PDQ®): health professional version [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [cited 2025 Nov 6].
59. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266(5182):66–71.
60. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2004;95(11):866–71.
61. Somasundaram K. Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair—perhaps through transcription. *J Cell Biochem*. 2003;88(6):1084–91.

62. Scully R, Puget N. BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast cancer. *Biochimie*. 2002;84(1):95–102.
63. Welcsh PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):705–13.
64. Mann GB, Borgen PI. Breast cancer genes and the surgeon. *Journal of surgical oncology*. 1998;67(4):267–74.
65. Boyd J, Rubin SC. Hereditary ovarian cancer: molecular genetics and clinical implications. *Gynecologic oncology*, 1997;64(2):196–206.
66. Wenham RM, Lancaster JM, Berchuck A. Molecular aspects of ovarian cancer. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*. 2002;16(4):483–97.
67. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. 1990;250(4988):1684–9.
68. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995;378(6559):789–92.
69. Duncan JA, Reeves JR, Cooke TG. BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease. *Molecular pathology*. 1998;51(5):237–247
70. Palma M, Ristori E, Ricevuto E, Giannini G, Gulino A. BRCA1 and BRCA2: the genetic testing and the current management options for mutation carriers. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2006;57(1):1–23.
71. Schwab M, Claas A, Savelyeva L. BRCA2: a genetic risk factor for breast cancer. *Cancer letters*. 2002;175(1):1–8.
72. Bork P, Blomberg N, Nilges M. Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nature genetics*. 1996;13(1):22–3
73. De Soto JA, Deng CX. PARP-1 inhibitors: are they the long-sought genetically specific drugs for BRCA1/2-associated breast cancers? *International journal of medical sciences*. 2006;3(4):117–123
74. Rudkin TM, Foulkes WD. BRCA2: breaks, mistakes and failed separations. *Trends in molecular medicine*. 2005;11(4):145–148.
75. Welcsh PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends in genetics*. 2000;16(2):69–74.
76. Eccles DM. Hereditary cancer: guidelines in clinical practice. *Breast and ovarian cancer genetics. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2004;15 Suppl 4:iv133–8
77. Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 20):3591–3598
78. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature reviews. Cancer*. 2004;4(9):665–676
79. Chen A, Kleiman FE, Manley JL, Ouchi T, Pan ZQ. Autoubiquitination of the BRCA1•BARD1 RING ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(24):22085–22092
80. Chapman MS, Verma IM. Transcriptional activation by BRCA1. *Nature*. 1996;382(6593):678–679.
81. Chen PL, Chen CF, Chen Y, Xiao J, Sharp ZD, Lee WH. The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(9):5287–5292.

82. Mizuta R, LaSalle JM, Cheng HL, Shinohara A, Ogawa H, Copeland N, Jenkins NA, Lalande M, Alt FW. RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(13):6927–6932.
83. Davies OR, Pellegrini L. Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2007;14(6):475–483.
84. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell*. 2006;22(6):719–29.
85. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(5):235–63.
86. Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int*. 2013;2013:747318.
87. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. 2011;12(1):68–78.
88. Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell*. 2011;145(4):529–42.
89. Fadlalla Elshaikh AAE, Elmahdi Ahmed MT, Daf Alla TIM, Mogammed Elbasheer AS, Ahmed AA, et al. Computational analysis of single nucleotide polymorphism (SNPs) in human MYC gene. *J Bioinform Genomics Proteomics*. 2016;1(3):1011.
90. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(4):253–64.
91. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):976–90.
92. Carey JPW, et al. Synthetic lethality of PARP inhibitors in combination with MYC blockade is independent of BRCA status in triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2018;78(3):742–57.
93. Alt FW, DePinho R, Zimmerman K, Legouy E, Hatton K, Ferrier P, Tesfaye A, Yancopoulos G, Nisen P. The human myc gene family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 2:931–41.
94. Xu J, Chen Y, Olopade OI. MYC and breast cancer. *Genes Cancer*. 2010;1(6):629–40.
95. Brouillet JP, Theillet C, Maudelonde T, Defrenne A, Simony-Lafontaine J, Sertour J, Pujol H, Jeanteur P, Rochefort H. Cathepsin D assay in primary breast cancer and lymph nodes: relationship with c-myc, c-erb-B-2 and int-2 oncogene amplification and node invasiveness. *Eur J Cancer*. 1990;26(4):437–41.
96. Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjänen K. Expression of c-myc proteins in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. *Anticancer Res*. 1995;15(3):959–64.
97. Doha ZO, Sears RC. Unraveling MYC's role in orchestrating tumor intrinsic and tumor microenvironment interactions driving tumorigenesis and drug resistance. *Pathophysiology*. 2023;30(3):400–19.
98. Olbromski PJ, Bogacz A, Bukowska M, Kamiński A, Moszyński R, Pawlik P, Szeliga A, Kotrych K, Czerny B. Analysis of the polymorphisms and expression

- levels of the BCL2, BAX and c-MYC genes in patients with ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2023;24(22):16309.
99. Grushko TA, Dignam JJ, Das S, Blackwood AM, Perou CM, Ridderstråle KK, Anderson KN, Wei MJ, Adams AJ, Hagos FG, Sveen L, Lynch HT, Weber BL, Olopade OI. MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2004;10(2):499–507
 100. Wang Q, Zhang H, Kajino K, Greene MI. BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene.* 1998;17(15):1939–48.
 101. Li C, Ren C, Zhang G, Li X, Chen B, Li K, Li C, Mok H, Wang Y, Wen L, Jia M, Wei G, Lin J, Liao N. [Title not provided]. *DNA Cell Biol.* 2022;41(5):521–38.
 102. Ali A, Shafarin J, Muhammad JS, Farhat NM, Hamad M, Soofi A, Hamad M. SCAMP3 promotes breast cancer progression through the c-MYC- β -Catenin-SQSTM1 growth and stemness axis. *Cell Signal.* 2023;104:110591.
 103. Wang C, Zhang J, Yin J, et al. Kanser tedavisinde Myc'yi hedeflemeye yönelik alternatif yaklaşımlar. *Sig Transduct Target Ther.* 2021;6:117.
 104. Chen Y, Xu J, Borowicz S, et al. c-Myc activates BRCA1 gene expression in breast cancer cells through distal promoter elements. *BMC Cancer.* 2011;11:246.
 105. Xu J, Chen Y, Olopade OI. MYC and breast cancer. *Genes Cancer.* 2010;1(6):629–40.
 106. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2–3):95–125.
 107. Domiati-Saad R, Scheuermann RH. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clin Chim Acta.* 2006;363(1–2):197–205.
 108. Mulhardt C. Molecular biology and genomics. Elsevier; 2010.
 109. Pattyn F, Speleman F, De Paepe A, Vandesompele J. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(1):122–3.
 110. Cao H, Shockey JM. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *J Agric Food Chem.* 2012;60(50):12296–303.
 111. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998;24(6):954–8.
 112. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997;245(2):154–60.
 113. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
 114. Carbone FP, Ancona P, Volinia S, Terrazzan A, Bianchi N. Druggable molecular networks in BRCA1/BRCA2-mutated breast cancer. *Biology.* 2025;14(3):253.
 115. Yadav BS, Chanana P, Jhamb S. Biomarkers in triple negative breast cancer: a review. *World J Clin Oncol.* 2015;6(6):252–63.
 116. Sekine M, Nishino K, Enomoto T. Differences in ovarian and other cancers risks by population and BRCA mutation location. *Genes.* 2021;12(7):1050.
 117. Bhaskaran SP, Chandratre K, Gupta H, Zhang L, Wang X, Cui J, Kim YC, Sinha S, Jiang L, Lu B, Wu X, Qin Z, Huang T, Wang SM. Germline variation in

- BRCA1/2 is highly ethnic-specific: evidence from over 30,000 Chinese hereditary breast and ovarian cancer patients. *Int J Cancer*. 2019;145(4):962–73.
118. Armstrong N, Ryder S, Forbes C, Ross J, Quek RG. A systematic review of the international prevalence of BRCA mutation in breast cancer. *Clin Epidemiol*. 2019;11:543–61.
 119. Kotsopoulos J. BRCA mutations and breast cancer prevention. *Cancers (Basel)*. 2018;10(12):524.
 120. Xu J, Chen Y, Olopade OI. MYC and breast cancer. *Genes Cancer*. 2010;1(6):629–40.
 121. Hsu TY, Simon LM, Neill NJ, Marcotte R, Sayad A, Bland CS, Echeverria GV, Sun T, Kurley SJ, Tyagi S, Karlin KL, Dominguez-Vidaña R, Hartman JD, Renwick A, Scorsone K, Bernardi RJ, Skinner SO, Jain A, Orellana M, Lagisetti C, ... Westbrook TF. The spliceosome is a therapeutic vulnerability in MYC-driven cancer. *Nature*. 2015;525(7569):384–8.
 122. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012;149(1):22–35.
 123. Dhanasekaran R, Deutzmann A, Mahauad-Fernandez WD, Hansen AS, Gouw AM, Felsner DW. The MYC oncogene – the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(1):23–36.
 124. Liu J, Hua RX, Fu W, Zhu J, Jia W, Zhang J, Zhou H, Cheng J, Xia H, Liu G, He J. MYC gene associated polymorphisms and Wilms tumor risk in Chinese children: a four-center case-control study. *Ann Transl Med*. 2019;7(18):475.
 125. Franceschini N, Hu Y, Reiner AP, Buyske S, Nalls M, Yanek LR, Li Y, Hindorff LA, Cole SA, Howard BV, Stafford JM, Carty CL, Sethupathy P, Martin LW, Lin DY, Johnson KC, Becker LC, North KE, Dehghan A, Bis JC, ... Boerwinkle E. Prospective associations of coronary heart disease loci in African Americans using the MetaboChip: the PAGE study. *PLoS One*. 2014;9(12):e113203.
 126. Yang T, Wen Y, Li J, Tan T, Yang J, Pan J, Hu C, Yao Y, Zhang J, Li S, Xia H, He J, Zou Y. Association of CMYC polymorphisms with hepatoblastoma risk. *Transl Cancer Res*. 2020;9(2):849–55.
 127. Pan J, Zhu J, Wang M, Yang T, Hu C, Yang J, Zhang J, Cheng J, Zhou H, Xia H, He J, Zou Y. Association of MYC gene polymorphisms with neuroblastoma risk in Chinese children: a four-center case-control study. *J Gene Med*. 2020;22(8):e3190.
 128. Solé X, Hernández P, de Heredia ML, Armengol L, Rodríguez-Santiago B, Gómez L, Maxwell CA, Aguiló F, Condom E, Abril J, Pérez-Jurado L, Estivill X, Nunes V, Capellá G, Gruber SB, Moreno V, Pujana MA. Genetic and genomic analysis modeling of germline c-MYC overexpression and cancer susceptibility. *BMC Genomics*. 2008;9:12.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Esra	Soyadı	İLDENİZ ÖZALP
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu	T.C.	Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Ünivewrsitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü –Tıbbi Biyoloji	2021
Lisans	Kilis 7 Aralık Üniversitesi-Fen Edebiyat Fakültesi-Moleküler Biyoloji ve Genetik	2017
Lise	Şair Cahit Sıtkı Tarancı Anadolu Lisesi	2013

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Moleküler Biyolog	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı	2021-2025
Öğretim Görevlisi	Bitlis Eren Üniversitesi	2025-Günümüz

Yabancı Dil Sınav Notu

KPDS/ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	63,75							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	74,85		

10. EKLER

Ek-1 Etik Kurul Onayı



Ek-2 Gönüllü Hasta Onam Formu

Sizi Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı tarafından yürütülen “BRCA Pozitif Bireylerde MYC Geninin Rolü” başlıklı araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz.

Genetik analiz sonucu BRCA pozitif çıkan hastaların MYC geninde bulunan iki SNP bölgesine bakılarak BRCA ile olan etkisini saptayarak elde edilecek verilerin incelenmesi ve derlenmesi ile toplanacak bilgilerin bilimsel çalışmalara katkısı amacıyla sizlerin vereceği kan örnekleri bu araştırmaya büyük bir etki sağlayacaktır.

Bağışlayacağınız kan örneğiyle, çalışmaların sonuçlarından herhangi bir ticari kazanç beklememeyi de taahhüt ediyorsunuz. Bu çalışmaya katılmak için herhangi bir ücret ödemeniz de gerekmemektedir.

Bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 10 ml (1 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Kol damarınızdan kan alınması sırasında iğne batmasına bağlı olarak biraz acı duyabilirsiniz. Az bir ihtimal de olsa, iğne batması sonrasında kanamanın uzaması, iğne batan yerde geçici bir morluk gelişmesi ya da çok daha nadir olarak enfeksiyon riski bulunmaktadır.

Dr.Öğr.Üyesi Diclehan ORAL ve Sorumlu Araştırmacı Doktora öğrencisi Esra İLDENİZ ÖZALP tarafından Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında ortak olarak yürütülecek bu genetik araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam genetikçi ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim). Bu durumda genetik malzememle ilgili çalışma araştırmanın en yakın aşaması tamamlandığında sonlandırılacaktır.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana bir ödeme de yapılmayacaktır. İstedığınız anda çalışmadan çıkabilirsiniz ve size ait veriler izniniz olmadan bilimsel amaçlı dahi kullanılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya

katılmama veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz. Çalışmayı yanıtlamanız, araştırmaya katılım için onay verdiğiniz biçiminde yorumlanacaktır. Size verilen formlardaki soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayın. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır. Sizden alınacak kan örneği sadece çalışmada belirtilen amaç için kullanılacaktır. İlave bir inceleme yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. İstedğim anda çalışmadan çıkabileceğim ve bana ait verilerin iznim olmadan bilimsel amaçlı dahi kullanılmayacağını biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu araştırmaya genetik/biyolojik incelemeler yapılmak üzere kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı ve kan örneği vermeyi kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-Soyadı: İmzası:

Vesayet altında bulunanlar için vasisinin:

Anne

Adı-Soyadı: İmzası:

Baba

Adı-Soyadı: İmzası:

Açıklamaları yapan/örneği alan araştırmacının:

Adı-Soyadı: İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-Soyadı: İmzası:

Tarih:/...../.....



Chromosome Analysis and Rt-Pcr Results of Sox9 and Sry Genes in Patients With Gender Development Disorder

Received Date: 07.04.2025, Accepted Date: 28.07.2025

DOI: 10.56484/iamr.1672129

Esra İLDENİZ ÖZALP^{1a*}, Diclehan ORAL^{1b}, Selahattin TEKEŞ^{1c}, Mahmut BALKAN^{1d},
İlyas YÜCEL^{1e}, Mahir BİNİCİ^{1f}

¹ Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Diyarbakır, Türkiye

^aORCID: 0009-0002-6109-682X, ^bORCID: 0000-0002-0074-0602, ^cORCID: 30000-0001-6405-1112,

^dORCID: 0000-0002-0589-9399, ^eORCID: 0000-0002-4446-0469, ^fORCID: 0000-0003-1039-9361

Abstract

Objective:

In this study, we aimed to investigate the effects of SRY and SOX9 genes on changes that occur after bipotential gonad development in patients with disorders of sex development encountered in our region and to examine the relationship between mutations in these genes and testicular and ovarian development.

Method:

Blood samples were collected from 60 patients who were admitted to the Medical Biology and Genetics Department of Dicle University's Medical Faculty with suspicion of sexual development disorder. Karyotype and RT-PCR analysis of SRY and SOX9 genes were performed on blood samples of the participant patients

Results:

Molecular analyses revealed that 4 of 44 individuals with a 46, XY/47, XXY karyotype lacked the SRY gene, while 3 of 16 individuals with a 46, XX karyotype had the SRY gene. However, the SOX9 gene was positive in all individuals.

Conclusion:

The results of the present study, no significant relationship was found between the SRY and SOX9 gene regions, and more detailed studies are needed to clarify the relationship between these genes and sexual development.

Keywords: SOX9 gene, SRY gene, Gender anomaly

11. ORJİNALLİK RAPORU

ORJİNALLİK RAPORU			
% 10	% 7	% 5	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2	
2	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1	
3	bilimveaydinlanma.org İnternet Kaynağı	%1	
4	diclemedj.org İnternet Kaynağı	<%1	
5	halksagligiokulu.org İnternet Kaynağı	<%1	
6	doczz.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1	
7	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1	
8	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1	
9	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1	
10	Zorukoş, Sedefnur. "Birinci Derece Yakınlarında Meme Kanseri Olan Kadınlar İçin Bilgi ve Destek Gereksinimleri Ölçeği'nin Türkçe'ye Uyarlanması", Dokuz Eylül Universitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1	