



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE *BRCA1* VE *BRCA2*
GENLERİNDE TESPİT EDİLMİŞ VARYANTLARIN
BİYOİNFORMATİK YÖNTEMLERLE ANALİZLERİ: RETROSPEKTİF
ÇALIŞMA**

Niyazi Kaya
0000-0002-5122-3824

Dr. Öğr. Üyesi Dilek PİRİM
(Danışman)
0000-0002-0522-9432

Doç. Dr. Şehime Gülsün TEMEL
Uludağ Üniversitesi
(İkinci Danışman)
0000-0002-9802-0880

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2019
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Niyazi KAYA tarafından hazırlanan “Yeni nesil dizileme yöntemi ile *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilmiş varyantların biyoinformatik yöntemlerle analizleri: Retrospektif çalışma” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Dilek PİRİM

İkinci Danışman:Doç. Dr. Şehime Gülsün TEMEL, Bursa Uludağ Üniversitesi

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Dilek PİRİM
0000-0002-0522-9432
Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM
0000-0002-1459-5485
Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Munis Dünder
0000-0003-0969-4611
Erciyes Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel Eren
Enstitü Müdürü

.....

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25.12.2019

Niyazi KAYA



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE *BRCA1* VE *BRCA2* GENLERİNDE
TESPİT EDİLMİŞ VARYANTLARIN BİYOİNFORMATİK YÖNTEMLERLE
ANALİZLERİ: RETROSPEKTİF ÇALIŞMA

Niyazi KAYA

Bursa Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Dilek PİRİM

İkinci Danışman: Doç. Dr. Şehime Gülsün TEMEL (Bursa Uludağ Üniversitesi)

BRCA1 ve *BRCA2* tümör baskılayıcı genler olarak DNA hasarı ve onarımında önemli bir role sahiptirler. *BRCA1* geni 24 ekzondan oluşur ve 1863 amino asit içeren bir protein kodlar. *BRCA2* geni ise 27 ekzona sahiptir ve 3418 amino asitlik *BRCA2* proteinini kodlar. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki germline mutasyonlar meme ve yumurtalık kanseri ile ilişkilendirilmiştir bu sebeple meme ve yumurtalık kanseri riski, prognozu ve tanısında *BRCA1* ve *BRCA2* gen taramaları büyük önem taşır. Çalışmamızda kullanılan veriler Bursa Uludağ Üniversitesi Tıbbi Genetik ABD'na *BRCA1* ve *BRCA2* gen taraması için başvuran 125 kişinin yeni nesil dizileme yöntemi ile oluşturulan genotip sonuçlarından elde edilmiştir. Yapılan yeni nesil dizileme sonucunda bulmuş olduğumuz varyantları çeşitli veri tabanları ve *in silico* algoritmalar tarafından patojenitesi, MAF değerleri, regülatör önemleri ve post-translasyonel modifikasyonlara etkileri açısından değerlendirilmiştir. Çalışmamız sonucunda *BRCA1* ve *BRCA2* geninde 16 tanesi daha önce toplumsal dizileme projelerinde (1000G, ExAC, gnomAD) rastlanmayan toplamda 96 varyant bulunmuştur. Ek olaral tespit etmiş olduğumuz novel varyantlarımızdan 3 tanesi kodlama yapan bölgede bulunurken diğerleri intronik bölgede bulunmaktadır. Çalışmamızda meme ve yumurtalık kanseri ile ilişkili olabilecek protein fonksiyonuna etkisi yüksek varyantları tespit ederken gen regülasyonunda da önemli olabilecek varyantlar da gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *BRCA1*, *BRCA2*, *in silico* analiz, yeni nesil dizileme,

2019, viii + 78 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

BIOINFORMATICS ANALYSES OF IDENTIFIED VARIANTS IN THE *BRCA1* AND *BRCA2* GENES BY NEXT GENERATION SEQUENCING: RETROSPECTIVE STUDY

Niyazi KAYA

Bursa Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Dilek PİRİM

Second Supervisor: Doç. Dr. Şehime Gülsün TEMEL (Bursa Uludag University)

The *BRCA1* and *BRCA2* genes play an important role in DNA damage and repair as tumor suppressor genes. The *BRCA1* gene consists of 24 exons and encodes a protein containing 1863 amino acids. The *BRCA2* gene has 27 exons and encodes a 3418 amino acid *BRCA2* protein. The germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes have been associated with breast and ovarian cancer so *BRCA1* and *BRCA2* gene scans are of great importance in the risk, prognosis and diagnosis of breast and ovarian cancer. The data used in this study were obtained from the genotype results of 125 individuals who applied to Bursa Uludag University, Department of Medical Genetics created by the next generation sequencing method. As a result of the next generation sequencing, the variants were evaluated by various databases and *in silico* tools in terms of pathogenicity, minor allele frequencies, regulator importance and impacts on post-translational modifications. As a result of our study, a total of 96 variants were found in the *BRCA1* and *BRCA2* genes of which 16 were not previously found in the sequencing projects (1000G, ExAC, gnomAD). In addition, three of our novel variants were located in the coding region and the others were located in the intronic region. In this study, we both show several variants that may affect the protein functions and associated with breast and ovarian cancer and also multiple variants were shown to potential role in gene regulation.

Key words: *BRCA1*, *BRCA2*, *in silico* analyses, next generation sequencing,

2019, viii + 78 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans yaptığım süre içerisinde benden her türlü desteğini, yardımını, bilgi birikimi ve tecrübelerini esirgemeyen, beni çalışarak bir şeyler üretmeye teşvik eden, beni her zaman dinleyen, kendisinden hayata dair de çok şey öğrendiğim ve çalışma azmine ve şekline hayran olduğum değerli danışman hocam Sayın; Dr. Öğr. Üyesi Dilek PİRİM'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans sürecim de sözlü sunumlar yapmama ve çalışmalarda bulunmama fırsat tanıyıp desteği ile yardımlarını esirgemeyen buna ek olarak iş hayatımda da yardımcı olup çeşitli tecrübeler kazanmamı sağlayıp kendimi geliştirmeme olanak tanıyan ikinci danışmanım Sayın; Doç. Dr. Şehime Gülsün TEMEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın yapılabilmesi için bizimle verilerini paylaşan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'n daki hocalarım ikinci danışmanım Sayın; Doç. Dr. Şehime Gülsün TEMEL ve Doç. Dr. Şebnem ÖZEMRİ SAĞ hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda görev yapan laboratuvar ekibindeki arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım ve eğitim sürecimde yanımda olan çeşitli zorluklara rağmen bana destek olan tüm hocalarıma, arkadaşlarıma ve de aileme teşekkürlerimi sunarım.

Niyazi KAYA

25.12.2019



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Meme ve Yumurtalık Kanseri.....	1
1.1.1. Meme kanseri.....	1
1.1.2. Yumurtalık kanseri.....	4
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	8
2.1. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genleri.....	8
2.1.1. <i>BRCA1</i> geni.....	8
2.1.1.1. <i>BRCA1</i> proteini ve biyolojik fonksiyonu.....	9
2.1.2. <i>BRCA2</i> geni.....	12
2.1.2.1. <i>BRCA2</i> proteini ve biyolojik fonksiyonu.....	13
2.2. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genleri Dizi Varyantları.....	16
2.2.1. NCBI dbSNP veri tabanında <i>BRCA1</i> dizi varyantlarının sınıflandırılması.....	16
2.2.2. NCBI dbSNP veri tabanında <i>BRCA2</i> dizi varyantlarının sınıflandırılması.....	18
2.2.3. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> dizi varyantlarının fenotiple ilişkileri.....	19
2.3. Gen Dizi Varyantlarını Sınıflandırma ve Kategorizasyonunda Biyoinformatik Araçların Önemi.....	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Örnek Materyaller.....	25
3.2. Varyantların Tespit Edilmesi ve Analizi.....	25
3.3. Haploview analizi.....	34
3.4. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> varyantlarının protein fonksiyonuna etkisinin analizi.....	35
3.5. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> varyantlarının gen regülasyonundaki potansiyel etkilerinin değerlendirilmesi.....	35
4. BULGULAR.....	37
4.1. Minör Alel Frekansı Hesaplanması.....	39
4.2. Varyantların Veri Tabanları Kullanılarak Kategorize Edilmesi.....	44
4.2.1 <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> varyantlarının protein fonksiyonuna ve post-translasyonel modifikasyonlara etkileri.....	44
4.2.2. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> gen varyantlarının potansiyel regülatör etkileri.....	54
4.2.3. miRNA bağlanma bölgelerinin analizi.....	56
4.3. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinde tespit edilen yeni varyantlar.....	56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

%	Yüzde
+	Pozitif
~	Yaklaşık Olarak
>	Büyüktür
≤	Küçük Eşittir
≥	Büyük Eşittir
<	Küçüktür

Kısaltmalar

Açıklama

ACMG	The American College of Medical Genetics and Genomics (Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji)
AMP	Association for Molecular Pathology (Moleküler Patoloji ile İlişkilendirilmesi)
AWESOME	A Website Exhibits SNP On Modification Even (Protein Post-Translasyonel Modifikasyonlarını Etkileyen SNP Veri Tabanı)
B	Benign Variant (İyi Huylu Varyant)
BASC	BRCA1 İle İlişkili Genom Denetim Kompleksi
BHK	Berrak Hücreli Karsinoma
BRCT	BRCA1 C-Terminus (BRCA1 C-terminali)
circRNA	Circular RNA (Halkasal RNA)
CK	Sitokeratin
CLASH	Çapraz Bağlanma, Ligasyon ve Hibrit Sekanslama
CTD	Karşılaştırmalı Toksikojenom Veri Tabanı
DBD	DNA Bağlama Alanı
DDS	Düşük Dereceli Seröz Tümörler
DisGeNET	A Database Of Gene-Disease Associations
DSB	Çift Zincirli DNA Kırılması
ENIGMA	Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (Germline Mutant Allellerin Yorumlanması İçin Kanıta Dayalı Ağ)
eQTL	Expression Quantitative Loci (Kantitatif Karakter Lokus)
ER	Östrojen Reseptörü
ExAC	Ekzon Agregasyon Konsorsiyomu
gnomAD	Genom Agregasyon Veri Tabanı
GWAS	Genom Wide Association Study (Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları)
HD	Heliks Bölgesi
HER-2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HGMD	Human Gene Mutation Database (İnsan Gen Mutasyonu Veri Tabanı)

Kısaltmalar

Açıklama

HGVS	Human Genome Variation Society (İnsan Genomu Varyasyon Derneği)
HR	Homolog Rekombinasyon
ICL	İntrastrand Çapraz Bağları
İndel	Kısa Ekleme ve/veya Silme
JASPAR	Transkripsiyon Faktör Bağlama Profilleri Veri Bankası
LB	Likely Benign Variant (Muhtemel İyi Huylu Varyant)
LD	Linkage Disequilibrium (Bağlantı Dengesizliği)
LOH	Heterozigozite Kaybı
LP	Likely Pathogenic Variant (Muhtemel Patojenik Varyant)
MAF	Minör Alel Frekansı
MGD	Fare Genom Veri Tabanı
miRNA	MikroRNA
MT	MutationTaster
MYK	Musinöz Yumurtalık Kanseri
NES	Nükleer Aktarım Sinyali
NGS	Yeni Nesil Dizileme
NHEJ	Homolog Olmayan DNA Uç Birleşmesi
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
OB	Oligonükleotid/Oligosakkarit Bağlayıcı
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man (İnsanlarda Mendel Kalıtımı Online)
P	Pathogenic Variant (Patojenik Varyant)
PP2	PolyPhen-2
PR	Progesteron Reseptörü
PTM	Post-Translasyonel Modifikasyon
RGD	Rat Genom Veri Tabanı
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
SNV	Tek Nükleotid Varyantı
SSB	Tek Zincirli DNA Kırılması
ssDNA	Tek Zincirli DNA
TF	Transkripsiyon Faktörü
TNBC	Üçlü Negatif Meme Kanseri
Tower	BRCA2 Kule Bölgesi
VEP	Variant Effect Predictor (Varyant Etkisi Tahminleyicisi)
VUS	Klinik Önemi Bilinmeyen Varyant
WGS	Tüm Genom Dizileme
YDS	Yüksek Dereceli Seröz Tümörler

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Dünya Sağlık Örgütü Verilerine Göre Meme Kanseri'nin Dünya Üzerindeki İnsidans Oranı	1
Şekil 1.2. Dünya Sağlık Örgütü Kanser Araştırma Ajansı Verilerine Göre Türkiye'de Görülen Kanser Türleri ve Oranları	2
Şekil 1.3. Meme Kanseri Moleküler Alt Grupları.....	2
Şekil 1.4. Dünya Sağlık Örgütü Verilerine Göre Yumurtalık Kanseri'nin Dünya Üzerindeki İnsidans Oranı	5
Şekil 2.1. <i>BRCA1</i> gen lokasyonu	9
Şekil 2.2. <i>BRCA1</i> 'in yapısal alanları.....	9
Şekil 2.3. <i>BRCA1</i> 'in aracılık ettiği moleküler işlemler	11
Şekil 2.4. <i>BRCA2</i> gen lokasyonu	13
Şekil 2.5. <i>BRCA2</i> 'nin yapısal alanları ve etkileşim ortakları.....	15
Şekil 2.6. <i>BRCA2</i> 'nin genom kararlılığının korunmasında işlevleri.....	16
Şekil 2.7. <i>BRCA1</i> geni dizi varyantlarının moleküler etkiye göre sınıflandırılması	17
Şekil 2.8. <i>BRCA1</i> geni dizi varyantlarının varyant türüne göre sınıflandırılması..	17
Şekil 2.9. <i>BRCA2</i> geni dizi varyantlarının moleküler etkiye göre sınıflandırılması	18
Şekil 2.10. <i>BRCA2</i> geni dizi varyantlarının varyant türüne göre sınıflandırılması	19
Şekil 3.1. Biyoinformatik analizler öncesi data oluşturma aşamaları.....	26
Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan veri tabanları ve <i>in silico</i> tahminleme araçları....	26
Şekil 4.1. <i>BRCA1</i> varyantlarının gen bölgeleri üzerindeki dağılımları.....	38
Şekil 4.2. <i>BRCA2</i> varyantlarının gen bölgeleri üzerindeki dağılımları.....	38
Şekil 4.3. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinde gözlemlenen varyantlar ve MAF sınıflandırılması	39
Şekil 4.4. <i>BRCA2/c.6010G>T</i> ve <i>BRCA2/c.3396dupA</i> varyantlarının Sanger Sekanslama Görüntüleri	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

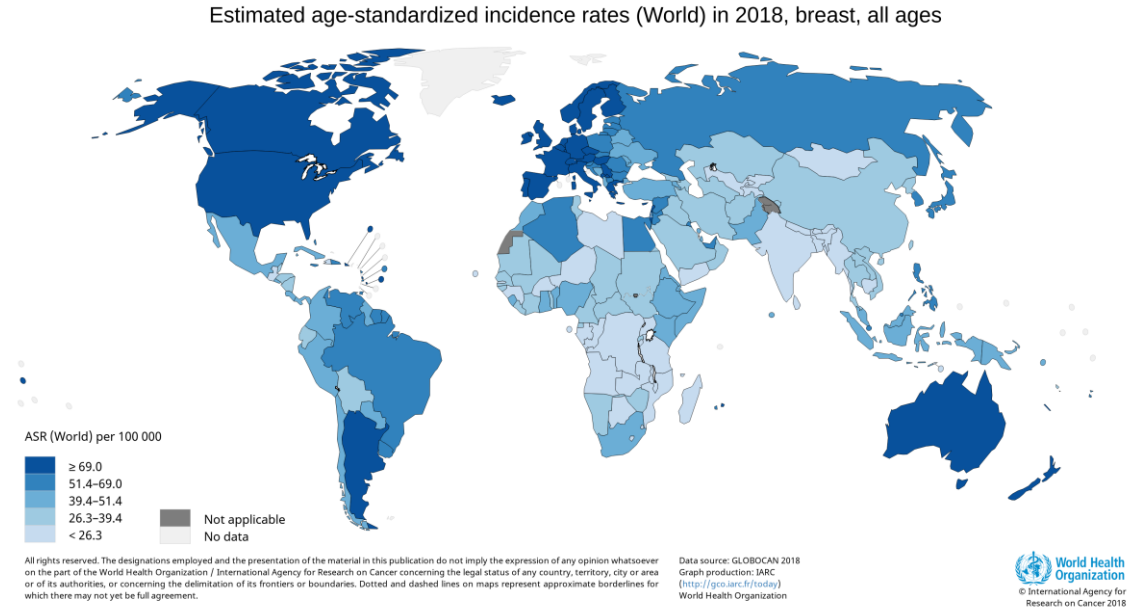
	Sayfa
Çizelge 1.1. Yumurtalık kanseri alt tipleri.....	5
Çizelge 2.1. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinin ilişkili olduğu fenotipler.....	20
Çizelge 2.2. <i>BRCA1</i> veya <i>BRCA2</i> mutasyonları taşıyan bireylerde ortaya çıkan kanser türleri.....	22
Çizelge 2.3. Veri tabanları ve içerdikleri bilgiler.....	23
Çizelge 2.4. <i>In silico</i> tahminleme araçları ve içerdikleri bilgiler.....	24
Çizelge 3.1. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> gen taraması yapılan örneklerin karakteristik özellikleri (n=125).....	25
Çizelge 3.2. RegulomeDB Skorları ve açıklamaları	35
Çizelge 4.1. Tespit edilen varyantların çalışma örneklerinde (n=125) ve diğer popülasyon veri tabanlarında görülme sıklıkları.....	41
Çizelge 4.2. <i>BRCA1</i> geninde bulunmuş olan varyantlar ve çeşitli veri bankaları ile <i>in silico</i> programlarına göre sonuçları.....	45
Çizelge 4.3. <i>BRCA2</i> geninde bulunmuş olan varyantlar ve çeşitli veri bankaları ile <i>in silico</i> programlarına göre sonuçları.....	46
Çizelge 4.4. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinde tespit edilen kodlama yapan varyantlar, çeşitli <i>in silico</i> algoritmalar sonuçları ve kişilerin profilleri	48
Çizelge 4.5. <i>BRCA1</i> geninde bulduğumuz varyantlar için AWESOME veri tabanı sonucu	53
Çizelge 4.6. <i>BRCA2</i> geninde bulduğumuz varyantlar için AWESOME veri tabanı sonucu	53
Çizelge 4.7. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> gen varyantlarının RegulomeDB sonuçları.....	55
Çizelge 4.8. rs15869A>C'nin miRNA hedef bölgeleri üzerindeki olası etkileri ...	56
Çizelge 4.9. Novel varyantlar ve çeşitli veri tabanları ile <i>in silico</i> programlara göre sonuçları	58

1. GİRİŞ

1.1. Meme ve Yumurtalık Kanseri

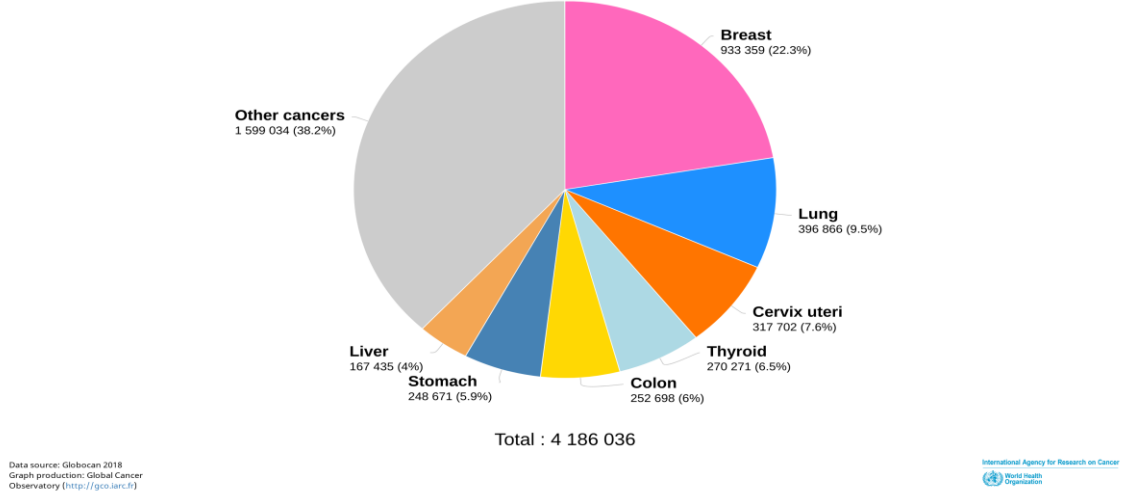
1.1.1. Meme kanseri

Meme kanseri, dünyada en sık görülen ikinci kanser türü olmakla beraber kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (Fidler ve ark. 2018). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 verilerine (Globocan 2018) göre meme kanserinin dünya genelinde görülme sıklığı Şekil 1.1'de gösterilmiştir (<http://gco.iarc.fr/>). Bu verilere göre Türkiye'de en sık görülen kanser türüdür (Şekil 1.2).



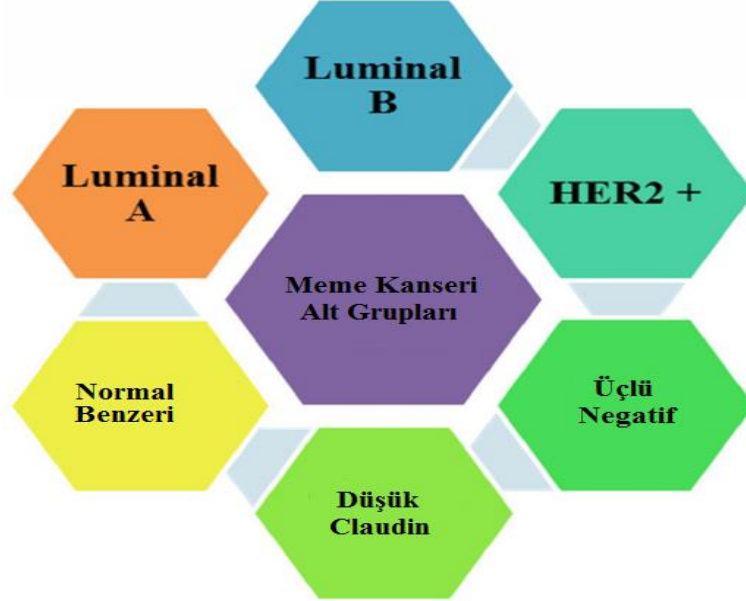
Şekil 1.1. Dünya Sağlık Örgütü Verilerine Göre Meme Kanseri'nin Dünya Üzerindeki İnsidans Oranı (<http://gco.iarc.fr/>)

Estimated number of new cases in 2018, Asia, Turkey, all cancers, females, all ages



Şekil 1.2. Dünya Sağlık Örgütü Kanser Araştırma Ajansı Verilerine Göre Türkiye’de Görülen Kanser Türleri ve Oranları (<http://gco.iarc.fr/>)

Birçok çalışma meme kanserini Şekil 1.3’de görüldüğü üzere 6 ana moleküler alt gruba ayırmaktadır (Mehrgou ve Akouchekian 2016).



Şekil 1.3. Meme Kanseri Moleküler Alt Grupları (Mehrgou ve Akouchekian 2016)

Mehrgou ve Akouchekian’ın tanımladığı şekilde sınıflandırılan altı ana moleküler grup aşağıda açıklanmıştır.

Luminal A: Luminal A tümör hücreleri ER (östrojen reseptörü) ve PR (progesteron reseptörü) için pozitif olma eğilimindedirler ancak HER-2 (insan epidermal

büyüme faktörü reseptörü 2) için negatiftir ve seviye 1 ve 2 olan tümörlerde bulunmaktadır. Luminal A tümörleri en iyi prognoza, yüksek sağ kalım oranlarına ve düşük tekrarlama oranlarına sahiptirler.

Luminal B: Luminal A tümör hücreleri gibi ER ve PR için pozitif olma eğilimindedirler ancak Luminal A'dan farklı olarak HER-2 için de pozitifler. Luminal A tümörlerine kıyasla, Luminal B tümörlerinin kadınlarda genç yaşta saptanması ilginçtir ancak daha büyük tümör boyutu ve lenf nodu tutulumu nedeniyle daha kötü prognozları bulunmaktadır.

Üçlü negatif/bazal benzeri: Üçlü negatif meme kanserleri (TNBC) PR, ER ve HER-2 için negatiftir ve bu nedenle üçlü negatif olarak adlandırılmaktadırlar. Bu tip meme kanseri tümörünün birkaç kategorisi vardır. Bu kategorilerden birine bazal-benzeri denilmektedir çünkü bu tümör hücre tipi göğüs kanallarını kaplayan dış hücrelere (bazal hücrelere) benzer özelliklere sahiptirler. Meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'si üçlü negatif veya bazal benzeridir. Bu tümörler daha genç ve Afro-Amerikalı kadınlarda ortaya çıkma eğiliminde bulunmaktadır. Meme kanseri gelişiminde *BRCA1* geni ile ilişkili meme kanserinin çoğunun, üçlü negatif ve bazal benzeridir. Üçlü negatif/bazal benzeri tümörler genellikle saldırgan ve kötü prognozludur.

HER-2 (+): HER-2 tipi tümörler ER ve PR için negatif olma eğilimindedir ve ayrıca lenf nodu tutulumu ve düşük tümör dereceleri bulunmaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'i bu alt grupta bulunmaktadır. HER-2 tipi tümörler kötü prognoza sahiptir, çabuk tekrarlamaktadır ve metastaz eğilimlidir. HER-2 tipi tümörler, kadınlarda Luminal A veya Luminal B tümörlerinden daha erken yaşta görülmektedir.

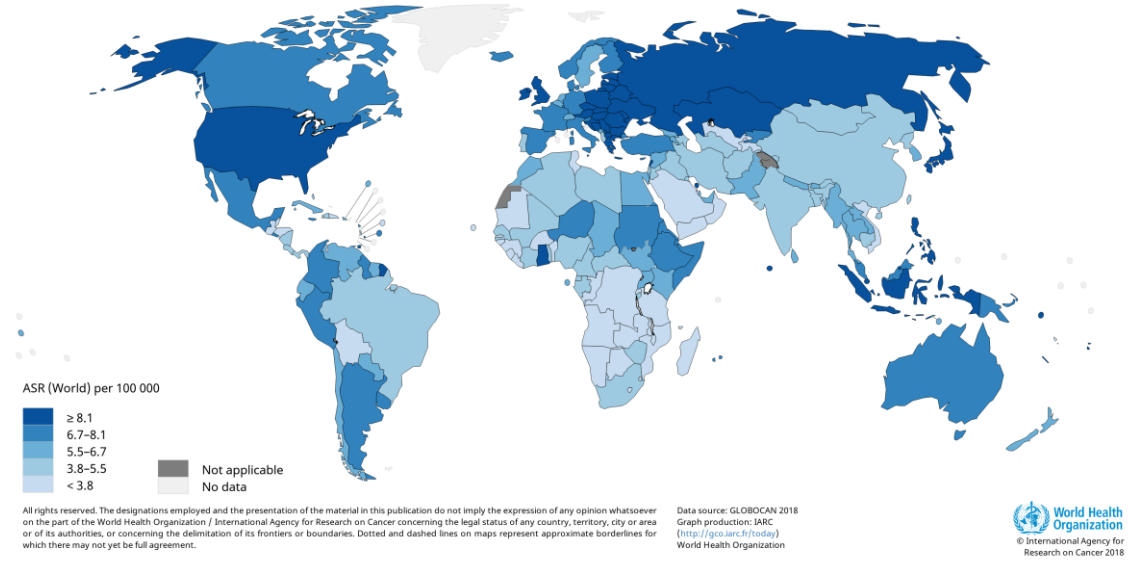
Düşük Claudin: Bu tip tümör sıklıkla üçlü negatiftir, ancak farkları ise E-cadherin gibi hücre-hücre yapışma proteinlerinin ekspresyonunun azaltılması ve lenfosit infiltrasyonu sıklıkla görülmektedir. Bu tip bir tümör aynı zamanda mezenkimal hücrelerin ve kök hücrelerin özelliklerine sahip bulunmaktadır.

Normal benzeri: Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %6-10'u normal benzeri tümörler olarak sınıflandırılır. Bu tümörler genellikle küçüktür ve iyi bir prognoza sahip olma eğiliminde olmaktadır.

1.1.2. Yumurtalık kanseri

Yumurtalık kanseri dünya genelinde kadınlarda insidans ve mortalite oranı en yüksek olan kanserlerden biridir (Fidler ve ark. 2018) (Şekil 1.4) (<http://gco.iarc.fr/>). Dünya sağlık örgütü son verilerine göre dünya genelinde tüm kanser türleri arasında yumurtalık kanseri vakaları 7. sırada gelmektedir. Bu açıdan hastalığın erken teşhisinde ve risk öngörüsünde etkin tarama testleri büyük önem arz etmektedir. Genom çapı ilişkilendirme çalışmalarında yaklaşık 30 varyant yumurtalık kanseri riski ile ilişkilendirilmesine rağmen kalıtsal yumurtalık kanserinin genetik epidemiyolojisinde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki patojenik varyantların etkisi büyüktür (Song ve ark. 2009, Phelan ve ark. 2017, Kuchenbaecker ve ark. 2015, Kelemen ve ark. 2015, Earp ve ark. 2013, Bolton ve ark. 2010, Yodsurang ve ark. 2018). Genetik faktörlerin yanında çevresel ve yaşam biçimi farklılıkları da kişilerde yumurtalık kanseri riskini etkileyen önemli etmenlerdir. Epidemiyolojik çalışmalarda belirlenen yumurtalık kanseri riskini etkileyen başlıca faktörler olarak hormonal ve üreme ile ilgili faktörler, endometriozis, menarş ve menopoz yaşı, parite, kısırlık, laktasyon, doğum kontrol hapları hormon yerine koyma tedavisi, obezite, sigara ve alkol kullanımı sayılmaktadır (Reid ve ark. 2017).

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, ovary, all ages



Şekil 1.4. Dünya Sağlık Örgütü Verilerine Göre Yumurtalık Kanseri'nin Dünya Üzerindeki İnsidans Oranı (<http://gco.iarc.fr/>)

Yumurtalık kanserleri vakalarında *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarının görülme frekansı %11-15 arasında tahmin edilmektedir (Koczkowska ve ark. 2016). Yumurtalık kanseri çok çeşitli genomik çeşitliliğe sahip farklı bir kanser alt kümesi olarak ortaya çıkarmaktadır. Örnek verilecek olursa somatik *TP53* mutasyonları, germline *BRCA1/2* mutasyonları, *BRAF*, *CCNE1*, *TERC*, *TERT* kopya sayısı artışı ve *RBI* ve/veya *PTEN* kopya sayısı kaybı örnek olarak verilebilir. Yumurtalık kanseri, patolojik ve genetik gözlemlere dayanarak alt sınıflara ayrılabilir. Her bir alt sınıf, tedaviye cevap olarak farklı genetik değişiklikler, hastalık patogenezi, tümör ilerlemesi ve hayatta kalma sonuçlarına sahiptirler. Her bir alt sınıf sadece farklı davranmakla kalmaz, belirli alt sınıflardaki heterojenlik, tedavi seçenekleri, ilaç direnci ve genel klinik yanıt konusunda zorluklar ortaya çıkarmaktadır (Hirst ve ark. 2018).

Çizelge 1.1. Yumurtalık kanseri alt tipleri (Hirst ve ark. 2018)

Alt Tip	Mutasyon Gözlenen Genler	Klinik Prognoz	Frekans
Yüksek dereceli seröz	<i>TP53</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>CDK12</i>	Genellikle geç evrede teşhis edilir ve kromozomal olarak kararsızdır.	~%65
Düşük dereceli seröz	<i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>ERBB2</i>	Genellikle genç hastalarda tanı konur, daha az agresif ve genomik olarak stabildir.	~%5
Endometriyoid	<i>PTEN</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>PPP2R1a</i>	İyi prognoz gösterir ve kemoterapiye yanıt verir.	~%20
Berrak hücreli karsinoma	<i>PIK3CA</i> , <i>KRAS</i> , <i>PTEN</i> , <i>ARID1A</i>	Orta dereceli prognoz gösterir ve kemoterapiye düşük yanıt verir.	~%5
Musinöz	<i>KRAS</i> , <i>HER-2 amplifikasyonu</i>	Kemoterapiye düşük yanıt verir.	~%5

Yüksek dereceli seröz tümörler (YDS): Yumurtalık kanseri tanılarının ve ölümlerinin büyük bir kısmını oluşturur (Malpica ve ark. 2004, Kurman 2013). YDS tümörler pembe sitoplazma ile kolon hücreleri içeren papiller, mikropapiller, glandüler, kalbursu ve trabeküler yapıları (Burks ve ark. 1996, Seidman ve Kurman 1996) ile histolojik fenotipleri geniş bir aralıkta dağılım göstermektedirler.

YDS tümörleri genomik instabilite ile ilişkilidir (Braicu ve ark.2011, Gorrige ve ark. 2007). Çünkü neredeyse hepsi (>%95) yüksek dereceli seröz kanserler somatik *TP53* mutasyonlarına sahiptir ve bunların yarısından fazlası esas olarak BRCA1, BRCA2 veya ilgili proteinlerdeki hatalarla temsil edilen homolog DNA onarım yolu eksikliklerine sahiptir (Ahmed ve ark. 2010, Cancer Genome Atlas Research Network 2011, Turner ve ark. 2004, Jazaeri ve ark. 2002).

Düşük Dereceli Seröz Tümörler (DDS): Seröz tümörlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. DDS tümörleri, yüksek dereceli seröz tümörlere kıyasla daha genç hastalarda sık görülmektedir. DDS yumurtalık kanseri daha erken evrelerde, iki taraflı tutulumla ve invaziv potansiyel olmadan daha sık teşhis edilmektedir (Vang ve ark. 2009). İnvaziv olmayan tümörleri olan hastalar, invaziv tümörleri olan hastalar ile karşılaştırıldığında, 7 yıllık sağ kalımları daha yüksek oranda (%66) bulunmuştur (Bell ve ark. 2001, Gershenson ve Silva 1990). Yüksek dereceli seröz ile karşılaştırıldığında, DDS tümörleri tipik olarak yavaş büyürler. *KRAS*, *BRAF* ve *ERBB2*'de daha sık mutasyonlara gözlenmektedir ve *TP53* mutasyonlarına uğrama eğilimindedirler (Singer ve ark. 2003, Singer ve ark. 2005, Hunter ve ark. 2015).

Endometriyoid Tümörler: Tüm yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %10-20'sini oluşturmaktadır. *CTNNB1* ve *PIK3CA*'da ve ayrıca *ARID1A*'da sıklıkla aktive edici mutasyonlar ortaya koymaktadır. *PTEN* mutasyonları endometrioid tümörlerin ~%20'sin de görülürken *KRAS* ve *BRAF* mutasyonları daha az oranda görülmektedir (Obata ve ark. 1998, Coward ve ark. 2015).

Berrak hücreli karsinoma (BHK): Amerika Birleşik Devletleri'ndeki tüm yumurtalık kanseri hastalarının yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır ve Asyalı

kadınlarda (~%11), Afro-Amerikalılardan (~%3) veya Kafkasyalılarından (~%5) daha sık görülmektedir (Sugiyama ve ark. 2000, Tung ve ark. 2003, Seidman ve ark. 2004). BHK'ler genellikle büyüktür (15cm'nin üzerinde büyüyebilir). Berrak sitoplazmayı içeren hobnail hücreli sadece papiller, tübülistik ve katı mimariler gösteren tek taraflı tümörlerdir. Moleküler mekanizmalar açısından, BHK'ler genomik seviyede karmaşıktır ve *ARID1A*, *PIK3CA*, *KRAS* ve *PTEN*'de mutasyonlara sahip olabilirler (Tan ve ark. 2011, Zannoni ve ark. 2014). *ARID1A* hastaların yaklaşık %50'sinde mutasyona uğramaktadır ve *PIK3CA* ise hastaların yaklaşık %33'ünde mutasyona uğramaktadır (Campbell ve ark. 2004, Wiegand ve ark. 2010). Buna karşın, BHK'ler genellikle yabani tiptedir ve daha düşük *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları görülmektedir (Alsop ve ark. 2012, Mabuchi ve ark. 2016). Musinöz: Musinöz yumurtalık kanseri (MYK) çok büyük olabilir (10-48 cm'ye kadar değişebilir) ve erken evrelerde teşhis edilebilirler (Riopel ve ark. 1999, Lee ve Young 2003, Seidman ve ark. 2003). İnvaziv hastalık vakalarının %10'undan azını oluşturmaktadırlar (Seidman ve ark. 2003, Leitao ve ark. 2004). Musinöz tipin gastrointestinal sistemden kaynaklandığı düşünülmektedir, ancak hastalığın moleküler mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Zaino ve ark. 2011). Diğer yumurtalık kanseri alt tiplerinde bulunan *KRAS* mutasyonları (Cuatrecasas ve ark. 1997, Vereczkey 2011, Teer ve ark. 2017) ve *HER-2* amplifikasyonları MYK'da en sık görülen genetik değişikliklerdir (Lin ve ark. 2011). MYK'da *BRAF*, *TP53* ve *CDKN2A* gibi diğer mutasyonlar da bildirilmiştir (Ryland ve ark. 2015).

Bu tez çalışmasında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Bölümü'ne *BRCA1* ve *BRCA2* gen taraması amacıyla başvuran 125 kişinin gen dizilemeleri sonucunda elde edilen dizi varyantlarının geniş kapsamlı biyoinformatik analizleri, protein fonksiyonuna etkilerinin *in silico* yöntemlerle belirlenmesi ve fenotiple ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Ek olarak detaylı biyoinformatik analizler sonucunda olası protein fonksiyonu üzerinde patojenik ve regülatör öneme sahip varyantların tespiti ile fonksiyonel önemlerinin *in vitro* fonksiyonel çalışmalar ile araştırılması için ön veri oluşturması da amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *BRCA1* ve *BRCA2* Genleri

BRCA1 ve *BRCA2* geni tümör baskılayıcı genler olarak DNA hasarı ve onarımında önemli bir role sahiptirler. *BRCA1* ve *BRCA2*'deki kalıtsal mutasyonlar, yaşam boyu meme kanseri veya yumurtalık kanseri oluşma riskini arttırmaktadır (Koczkowska ve ark. 2016). Tüm meme kanseri hastası kadınların yaklaşık olarak %5-10'unun pozitif aile öyküsü olan kadınlardan oluştuğu ve bu kadınların yaklaşık olarak %15-25'inin *BRCA1* veya *BRCA2* genlerindeki germline mutasyonlar sonucu kanserden etkilendiği düşünülmektedir (Colombo ve ark. 2013). Ayrıca bu mutasyonları taşıyan kişilerde yumurtalık kanseri gelişimi yaşı artmasına bağlı olarak da artış göstermektedir. Bu oran 40 yaşında yaklaşık %3'den az iken 50 yaşında %10'lara kadar çıkmaktadır (Andrews ve ark. 2017). *BRCA* genlerindeki dizi varyantlarının sadece meme ve yumurtalık kanseri değil diğer kanser türleriyle de ilişkisi tespit edilmiştir (Al-Sukhni 2008).

2.1.1. *BRCA1* geni

BRCA1 (NCBI# 672) geni Miki ve arkadaşları tarafından 1994 yılında tanımlanmıştır. 17q21.31 sitogenetik lokasyonunda 17:43,044,294-43,125,482 (GRCh38) genomik lokasyonunda bulunmaktadır ve 24 ekzon'dan oluşmaktadır. Şekil 2.1'de *BRCA1* geni gösterilmektedir. *BRCA1* ayrıca *IRIS*, *PSCP*, *BRCA1*, *BRCC1*, *FANCS*, *PNCA4*, *RNF53*, *BROVCA1*, *PPP1R53* olarak da bilinmektedir.

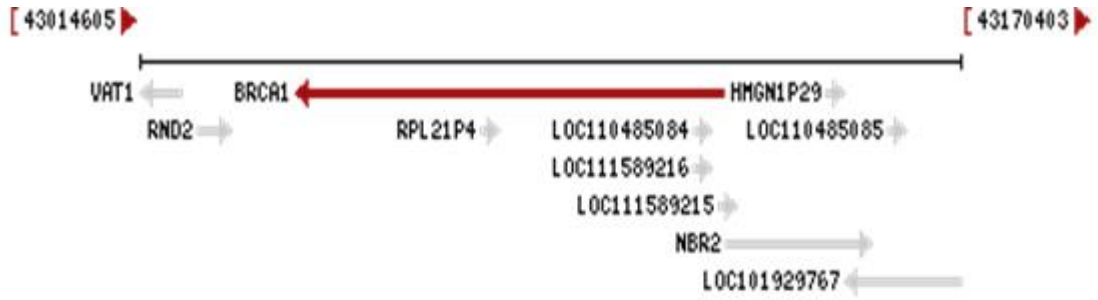
Bu gen, genomik kararlılığın korunmasında rol oynayan bir nükleer fosfoproteini kodlamaktadır ve aynı zamanda da bir tümör baskılayıcı görevi görmektedir. Bu gendeki mutasyonlar, kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %40'ından ve kalıtsal meme ve yumurtalık kanserlerinin %80'inden fazlasından sorumludur.

BRCA1, çift zincirli DNA kırılmalarında (DSB) yer alan bir tümör baskılayıcıdır. *BRCA1* eksikliği, farelerde embriyonik dönemde ölümlere yol açar ve *BRCA1*

genindeki mutasyonlar kadınların yumurtalık ve meme kanseri riskini artırmasına neden olur.

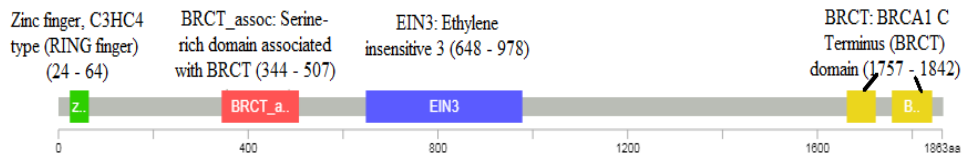
BRCA1 mutasyonlarının taşıyıcılarındaki meme kanserinin moleküler bileşimi ER, PR ve HER-2 ekspresyonu eksikliği ile karakterize edilir. Bu tip meme kanserine TNBC denir (Hirshfield ve Ganesan 2014). *BRCA1* mutasyonu meme kanserinin ve sporadik bazal karsinomların immünohistokimyasal profilleri benzerdir ve sitokeratin (CK) 5/6 ve CK14'ün ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. *BRCA1* mutasyonlarının taşıyıcılarında kontralateral meme kanseri riski de artmaktadır (kümülatif risk yaklaşık %70 oranındadır). *BRCA1* mutasyonları ile ilişkili yumurtalık tümörleri genellikle yüksek dereceli seröz epitel karsinomudur (Rigakos ve Razis 2012).

BRCA1 (MIM# 113705), OMIM veri tabanı'na göre Falkoni Anemisi (MIM# 617883), Meme-Yumurtalık Kanseri, (MIM# 604370), Pankreas kanseri (MIM# 614320) ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 2.1. *BRCA1* gen lokasyonu (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>)

2.1.1.1. BRCA1 proteini ve biyolojik fonksiyonu



Şekil 2.2. *BRCA1*'in yapısal alanları (https://www.cbiportal.org/mutation_mapper)

BRCA1 geni genomik kararlılığın korunmasında rol oynayan bir nükleer fosfoprotein kodlamaktadır ve bir tümör baskılayıcı olarak da işlev görmektedir. Kodlanmış protein, *BRCA1* ile ilişkili genom denetim kompleksi (BASC) olarak bilinen büyük çok alt üniteli bir protein kompleksi oluşturmak için diğer tümör baskılayıcılar, DNA hasar sensörleri ve sinyal aktarıcıları ile birleşmektedir. Bu gen ürünü, RNA polimeraz II ile ve C-terminal alanı yoluyla birleşmektedir ve ayrıca histon deasetilaz kompleksleri ile etkileşime girmektedir. Bu sebeple protein, transkripsiyon, çift zincirli DNA kırılmalarının onarımı ve rekombinasyonda rol oynamaktadır.

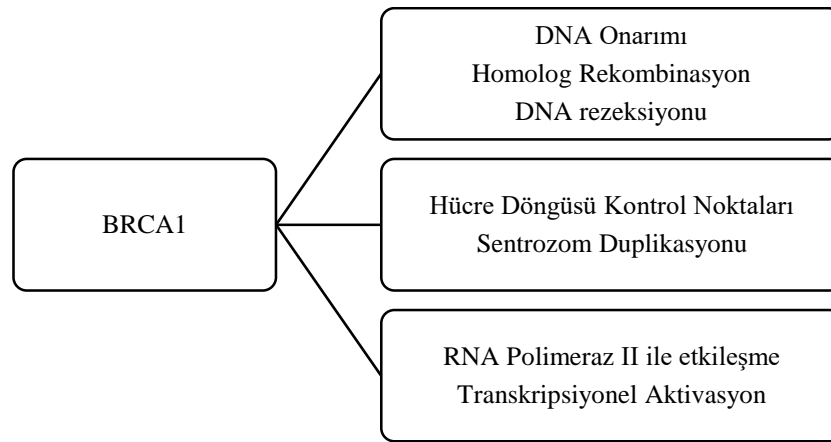
BRCA1 proteininin insanlarda 5 farklı izoformu bulunmaktadır. İzofom 1 (NP_009225.1) 1863 amino asit uzunluğunda, İzofom 2 (NP_009231.2) 1884 amino asit uzunluğunda, İzofom 3 (NP_009228.2) 1816 amino asit uzunluğunda, İzofom 4 (NP_009229.2) 759 amino asit uzunluğunda ve İzofom 5 (NP_009230.2) ise 699 amino asit uzunluğundadır.

BRCA1 proteini iki fonksiyonel alan içermektedir. Bunlar N-Ring Domain (N-Halka alanı) alanı ve bir *BRCA1* C-Terminus (*BRCA1* C-terminali, BRCT) alanı. Diğer halka alanlarına benzer şekilde, *BRCA1*'in Halka alanı, E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahiptir ve protein çoğalmasını kolaylaştırmaktadır (Panier ve Durocher 2009). *BRCA1*'in BRCT alanı, *BRCA1*'in translokasyonu ve DNA hasarında birikmesi için gerekli olan bir fosfoprotein bağlayıcı alandır (Manke ve ark. 2003, Rodriguez ve ark. 2003, Yu ve ark. 2003). Her ne kadar *BRCA1*'deki mutasyonlar gen boyunca dağılmış olsa da, her iki alanın da meme ve yumurtalık kanseri oluşumunu baskılamak için çok önemli olduğunu gösteren, *BRCA1*'in Halka alanı (Ring domain) ve BRCT alanı içinde birçok kanser ilişkili mutasyonlar bulunmuştur (Monteiro ve ark. 1996, Brzovic ve ark. 2001, Williams ve Glover 2003).

BRCA1 proteininin halka alanı, BARD1 ile birleşerek sentrozom proteinlerini özellikle de gama tübülünü ubiquitine eden ve kompleks *BRCA1/BARD1*'i oluşturmak için birleştiren bir amino terminalidir. *BRCA1* halka alanının olmaması,

ubikinasyon aktivitesinin kaybolmasına ve meme hücre hatlarında sentrozom amplifikasyonuna yol açmaktadır (Starita ve ark. 2004). Gamma tübülünün ubikleştirilmesi, mitotik iğ ipliğinin oluşumu sırasında mikrotübül çekirdeklenmesindeki desteğinin rolü için önemlidir. M fazı sırasında BRCA1, AURKA fosforilasyonu yoluyla devre dışı bırakıldığında, BAP-1, gama tübülünü ile aynı yerde bulunmaktadır ve dağıtımını yapmaktadır. Bu işlem değiştirilmemiş gama tübülünün sentrozoma toplanmasına ve normal mitotik iğ organizasyonunun korunmasına yol açmaktadır. BAP-1'in ekspresyonu metastatik adenokarsinoma meme kanseri hücre hatlarında azalır ve düşük BAP-1 ekspresyonu, meme kanseri hastalarının düşük sağkalım oranları ve mitotik anormallikler ile ilişkilendirilmiştir (Zarrizi ve ark. 2014). BRCA1'in fosforilaz CDK2 tarafından aktivasyonu aynı zamanda, sentrozomun amplifikasyonunu kontrol etme kabiliyetine de dahil edilebilmektedir (Ruffner ve ark. 1999).

BRCA1, RNA polimeraz II holoenzim kompleksi ile etkileşimi yoluyla birkaç genin transkripsiyonunu modüle edebilmektedir ve aktivatör veya baskılayıcı olarak işlev görebilmektedir. Bir aktivatör olarak örneğin *XPC*, *DDB2* ve *GADD45* gibi nükleotid eksizyon onarımında yer alan genlerin transkripsiyonel aktivitesini indüklemektedir. BRCA1'in, muhtemelen E3 ubiquitin ligaz aktivitesi ile heterokromatin transkripsiyonunun susturulmasında rol oynadığı da bildirilmiştir (Zhu ve ark. 2011). BRCA1'in aracılık ettiği moleküler işlemler, Şekil 2.3'de özetlenmiştir.



Şekil 2.3. BRCA1'in aracılık ettiği moleküler işlemler (Romagnolo ve ark. 2015)

Tüm organizmalarda DSB'nin onarımı için iki yol bulunmaktadır; serbest uçların homolog olmayan bağlanması (NHEJ) ve homolog rekombinasyon (HR) (Chapman ve ark. 2012). NHEJ hücre döngüsü süresince aktif olarak bulunmaktadır ve DNA kırılmaları olduğu zaman ortamda sağlam ve uyumlu nükleotidler bulunduğunda verimli çalışmaktadır. Onarım eşleşmemiş nükleotidleri içeriyorsa, NHEJ aracılı onarım DNA kaybı ve muhtemelen kromozomal translokasyonlarla sonuçlanmaktadır. HR, hücre döngüsünün S ve G2 fazları sırasında aktif olarak bulunur çünkü DNA onarımı yapabilmesi için şablon olarak yeni sentezlenmiş bir kardeş kromatid gerektirmektedir. NHEJ ve HR arasındaki hücresel seçim, DNA hasarı kontrol noktası proteinleri, telomerik faktörler, ubiquitinasyon ve sumoylasyon adımları, histon modifikasyonları ve BRCA1 gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

BRCA1 fosforilasyonu, DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsü kontrol noktalarını aktive etme yeteneğini düzenler.

2.1.2. BRCA2 geni

BRCA2 (NCBI# 675) geni Wooster ve arkadaşları tarafından 1995 yılında tanımlanmıştır. 13q13.1 sitogenetik lokasyonunda 13:32,315,479-32,399,671 (GRCh38) genomik lokasyonunda bulunmaktadır ve 27 ekzon'dan oluşmaktadır (Şekil 2.3). *BRCA2* ayrıca *FAD*; *FACD*; *FAD1*; *GLM3*; *BRCC2*; *FANCD*; *PNCA2*; *FANCD1*; *XRCC11*; *BROVCA2* olarak da bilinmektedir. *BRCA2* geni de *BRCA1* gibi genom kararlılığının korunmasında, özellikle çift sarmallı DNA onarımı için homolog rekombinasyon yolağında rol oynamaktadır. *BRCA2* mutasyonları olan tümörler genellikle yabani tip alelin heterozigozite kaybı (LOH) gösterdiğinden, bir tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilir.

BRCA2 (MIM# 600185), OMIM veri tabanı'na göre Falkoni Anemisi, tamamlayıcı grup D1 (MIM# 605724), Wilms tümörü (MIM# 194070), Meme kanseri, erkek, duyarlı ailesel (MIM# 114480), Meme-Yumurtalık Kanseri (MIM# 612555), Glioblastoma 3 (MIM# 613029), Medulloblastoma (MIM# 155255), Pankreatik kanser 2 (MIM# 613347), Prostat kanseri (MIM# 176807) ile ilişkilendirilmiştir.

BRCA2'deki kalıtsal mutasyonlar, meme, yumurtalık ve pankreas kanseri riskindeki artışla ilişkilidir. Ayrıca *BRCA2*'deki bi-alelik mutasyonlar, çocuklarda aplastik aneminin yanı sıra lösemi ve kansere duyarlılığı ile karakterize nadir bir kromozom kararsızlık sendromu olan Falkoni Anemisi ile de bağlantılıdır (Fradet-Turcotte ve ark. 2016).



Şekil 2.4. *BRCA2* gen lokasyonu (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/675>)

2.1.2.1. *BRCA2* proteini ve biyolojik fonksiyonu

Genomumuz, iyonize radyasyon, ultraviyole ışık veya sitotoksik DNA lezyonları oluşturabilen DNA replikasyon hataları gibi DNA'ya zarar veren ajanlara sürekli olarak maruz kalır. DNA lezyonları arasında, tek zincir kırılmaları (SSB'ler) ve DSB'ler, ve deaminasyon ile oksidatif hasar bulunmaktadır (Goldstein ve Kastan 2015). Bu lezyonlar, temel hücresel işlemlere müdahale etmekte ve DNA replikasyon hataları, duraklanmış transkripsiyon kompleksleri veya mitoz sırasında kromozomların yanlış ayrılması ile sonuçlanabilmektedir. Sonuç olarak DNA lezyonlarının mutajenik potansiyeli, kanser hücrelerinin bir özelliği olan genomik düzenlemelere yol açabilmektedir. Kalıcı DNA hasarı ayrıca, nörodejeneratif hastalıklar, kısırılık, gelişimsel bozukluklar, immün yetmezlik sendromları ve hızlandırılmış yaşlanma gibi çeşitli insan patolojileri ile de bağlantılıdır. DNA'ya zarar veren ajanların yol açtığı tehdidi aşmak için, hücreler hücre döngüsü boyunca bu lezyonları tespit eden, işaret eden ve nihayetinde onarabilen oldukça karmaşık ve spesifik DNA hasarı tepkileri geliştirmiştir (Helleday ve ark. 2014). Her bir DNA lezyonun türü farklı bir yolağı aktive etmesine rağmen genom bütünlüğünü en üst seviyeye çıkarmak için belirli bir örtüşme derecesi vardır. Bu bağlamda, *BRCA2*, HR ile DSB onarımı ve Falkoni Anemisi yolu ile DNA çapraz bağ onarımı

dahil olmak üzere, birkaç DNA onarım yolunda önemli bir rol oynar (Fradet-Turcotte ve ark. 2016).

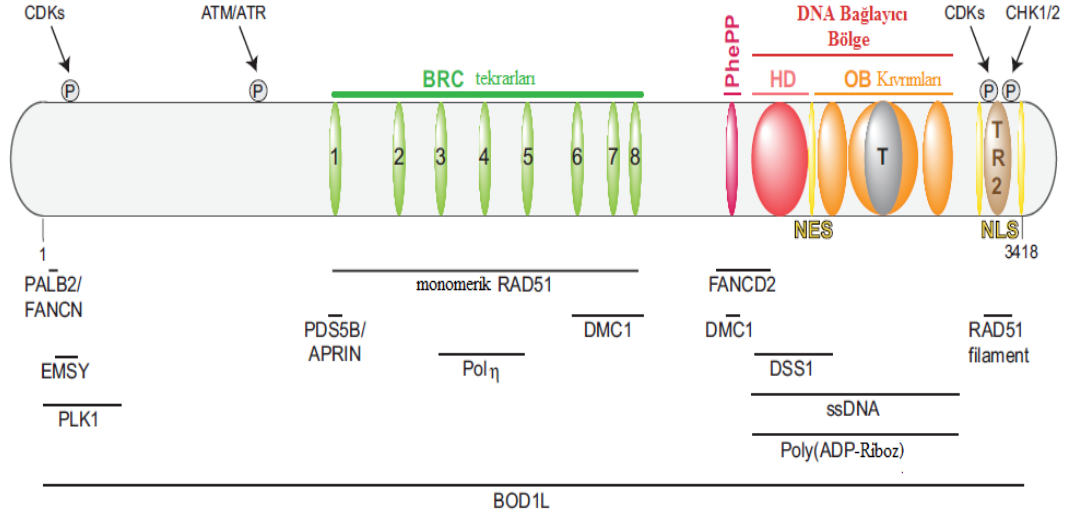
Genomik kararlılığın korunması, normal hücresel fizyolojiyi korumak ve kanser dahil olmak üzere birçok insan patolojisinin ortaya çıkmasını önlemek için gereklidir. BRCA2, HR ile DSB onarımında yoğun olarak çalışılmış güçlü bir tümör baskılayıcıdır. Bununla birlikte, DNA replikasyonu, telomer homeostazı ve hücre döngüsü ilerlemesi de dahil olmak üzere genom kararlılığının korunmasında merkezi olarak sayısız başka sürece katılmaktadır.

BRCA2'de birkaç önemli yapısal eleman tanımlanmıştır. Bunlar yaklaşık 35 amino asidin sekiz korunmuş motifinden oluşan BRC tekrarları (Bork ve ark. 1996, Bignell ve ark. 1997, Wong ve ark. 1997); uzun bir heliks bölgesi (HD) ve üç oligonükleotid/oligosakarit bağlayıcı (OB) kıvrımlarından oluşan DNA bağlama alanı (DBD) ve son olarak C-terminali TR2 bölgesidir (Sharan ve ark. 1997, Yang ve ark. 2002). BRCA2, ağırlıklı olarak nükleer bir proteindir ve hücre altı lokalizasyonu, iki ayrı nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve bir nükleer aktarım sinyali (NES) tarafından kontrol edilmektedir (Yano ve ark. 2000, Jeyasekharan ve ark. 2013).

BRCA2 proteini, BRC motifi olarak adlandırılan 70 amino asit motifinin birkaç kopyasını içermektedir ve bu motifler DNA onarımında işlev gören RAD51'e bağlanmaya aracılık etmektedir.

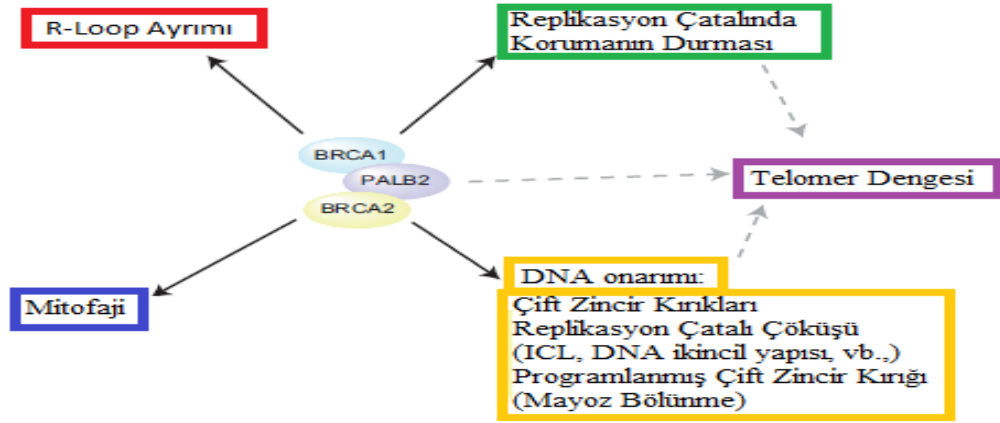
BRCA2'nin N-terminal alanı, PALB2 ve EMSY dahil olmak üzere çeşitli protein-protein etkileşimlerine katılmaktadır. BRCA2'de bulunan BRC tekrarları ekstra protein-protein etkileşimlerine (PDS5B/APRIN ve Polη) de dahil olmalarına rağmen, monomerik RAD51'e bağlanma ile ilişkilidirler. BRCA2'nin bir DBD, bir HD, üç OB kıvrımları ve bir Kule bölgesi (Tower) bulunmaktadır. Bu kısımlar BRCA2'nin tek zincirli DNA'ya (ssDNA) ve Poli (ADP-Riboz)'a bağlanmasını teşvik etmektedirler. BRCA2'nin C-terminali, RAD51 çekirdeklenicileriyle etkileşime giren TR2 alanını içermektedir. Ayrıca, BRCA2, birkaç siklin bağımlı

(CDK, PLK1) ve DNA hasarına bağlı (ATM/ATR, CHK1/2) kinazlar tarafından translyasyon sonrası modifiye edilmektedir (Fradet-Turcotte ve ark. 2016). Şekil 2.5’de BRCA2’nin yapısal alanları ve etkileşim ortakları gösterilmiştir.



Şekil 2.5. BRCA2’nin yapısal alanları ve etkileşim ortakları (Fradet-Turcotte ve ark. 2016)

BRCA1 ve PALB2’ye bağlı olan BRCA2, aynı zamanda genom kararlılığını korumak için kritik olan birçok biyolojik işleme katılmaktadır. İlk olarak BRCA2, DSB’ler ve intrastrand çapraz bağları (ICL’ler) içeren DNA lezyonlarının onarımında çok önemli bir role sahip bulunmaktadır. Üstelik, BRCA2, DNA’nın tamirinde duraklamış replikasyon çatallarında nükleolitik bozulmayı önlemektedir. Bu fonksiyonların her ikisi de telomerlerin bakımında doğrudan veya dolaylı olarak yer almaktadır. BRCA2, TREX-2 kompleksi ile işbirliği içinde R-halkalarının işlenmesi için gereklidir. Daha yakın zamanlarda yapılan bir araştırmaya göre, BRCA2, hasarlı mitokondrinin temizlenmesinde (mitofaji) de rol oynayarak genom kararlılığını dolaylı olarak korumaktadır (Fradet-Turcotte ve ark. 2016). Şekil 2.6’de BRCA2’nin genom kararlılığının korunmasında işlevleri gösterilmiştir.

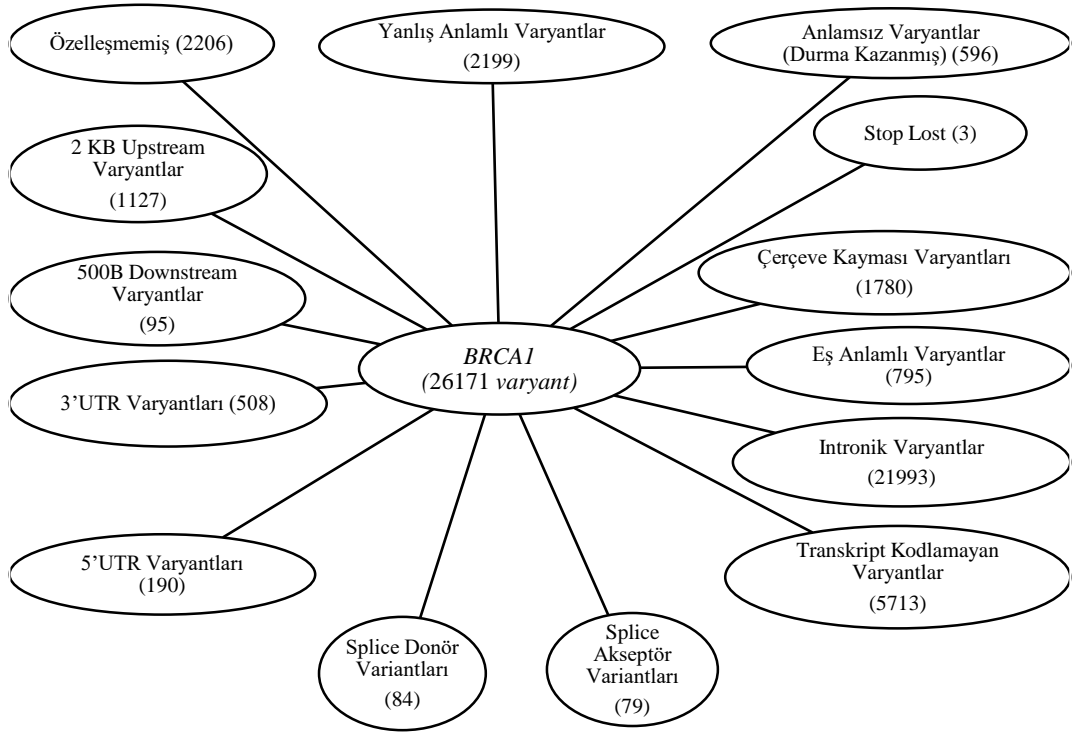


Şekil 2.6. BRCA2'nin genom kararlılığının korunmasında işlevleri (Fradet-Turcotte ve ark. 2016).

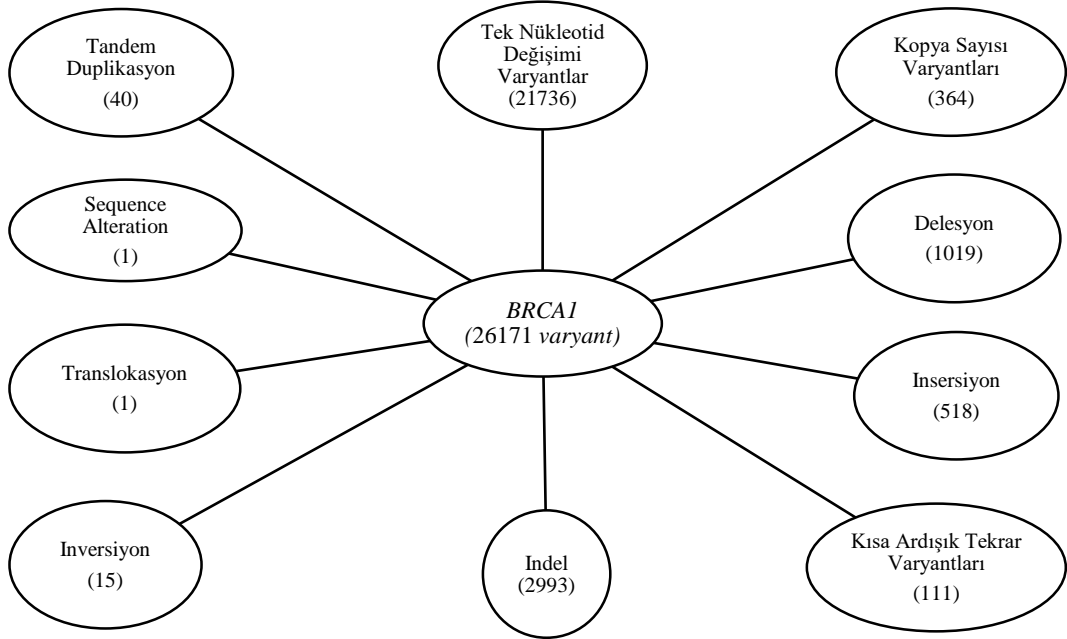
2.2. BRCA1 ve BRCA2 Genleri Dizi Varyantları

2.2.1. NCBI dbSNP veri tabanında BRCA1 dizi varyantlarının sınıflandırılması

NCBI dbSNP veri tabanında *BRCA1* geni için toplam 26171 dizi varyantı bulunmaktadır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/> (Erişim tarihi: 11.05.2019)). Bunlardan 5823 tanesi ClinVar'da taranmakta ve bunlardan 2450 tanesi patojenik ve muhtemel patojenik olarak raporlanmıştır. Bu varyantlardan 2145 tanesinden ise çeşitli yayınlarda bahsedilmektedir. Bu varyantlar 1000 Genom Projesi'ndeki Minör Alel Frekansı'na (MAF) göre sınıflandırılacak olursa 310 tanesi nadir, 165 tanesi yaygın olmayan varyant, 199 tanesi de yaygın varyanttır 5149 tane varyant ise sınıflandırılmamıştır. Bu varyantlar ExAC için MAF göre sınıflandırılacak olursa 79 tanesi nadir, 25 tanesi yaygın olmayan varyant, 11 tanesi de yaygın varyanttır 4913 tane varyant ise sınıflandırılmamıştır. Şekil 2.7 ve Şekil 2.8'de *BRCA1* geni varyantlarının NCBI dbSNP veri tabanına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmaları gösterilmiştir.



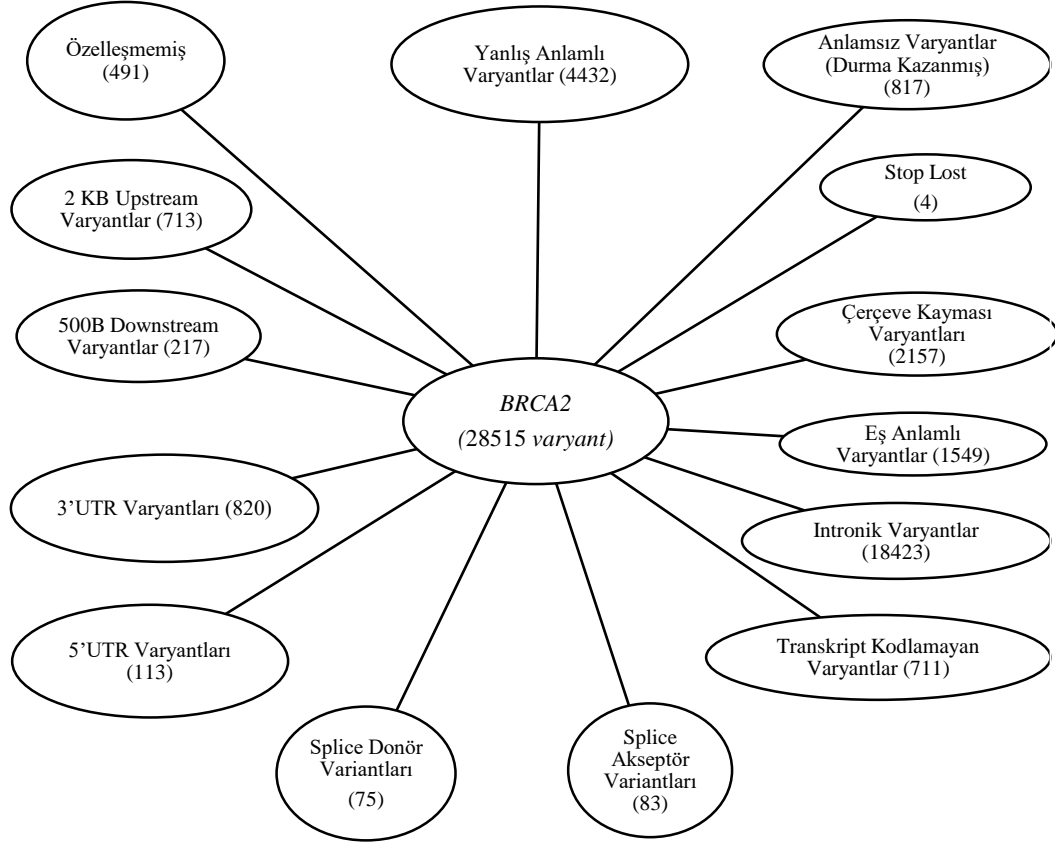
Şekil 2.7. BRCA1 geni dizi varyantlarının moleküler etkiye göre sınıflandırılması



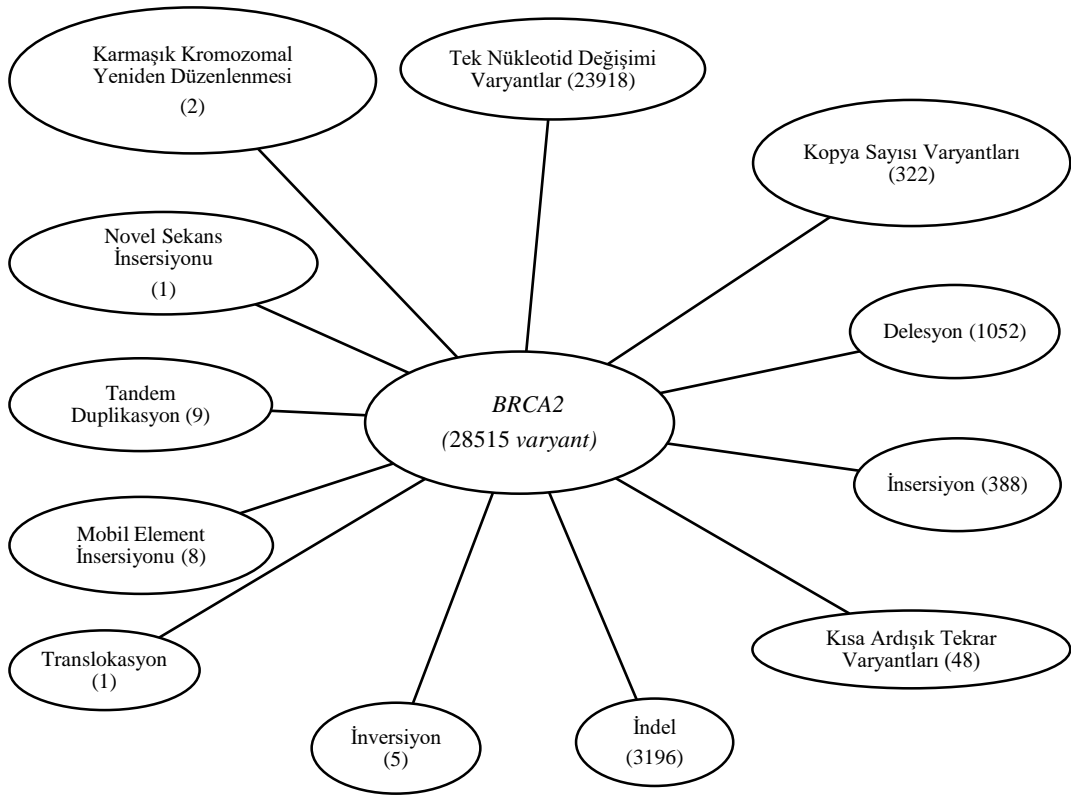
Şekil 2.8. BRCA1 geni dizi varyantlarının varyant türüne göre sınıflandırılması

2.2.2. NCBI dbSNP veri tabanında *BRCA2* dizi varyantlarının sınıflandırılması

NCBI dbSNP veri tabanında *BRCA2* geni için toplam 28515 dizi varyantı bulunmaktadır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/> (Erişim tarihi: 07.05.2019)). Bunlardan 8388 tanesi ClinVar’da taranmakta ve 2956 tanesi patojenik ve muhtemel patojenik olarak raporlanmıştır. Bu varyantlardan 2719 tanesinden ise çeşitli yayınlarda bahsedilmektedir. Bu varyantlar 1000 Genom Projesi’nde ki MAF’a göre sınıflandırılacak olursa 403 tanesi nadir, 228 tanesi yaygın olmayan varyant, 187 tanesi de yaygın varyanttır 7570 tane varyant ise sınıflandırılmamıştır. Bu varyantlar ExAC için MAF’a göre sınıflandırılacak olursa 147 tanesi nadir, 47 tanesi yaygın olmayan varyant, 5 tanesi de yaygın varyanttır 6777 tane varyant ise sınıflandırılmamıştır. Şekil 2.9 ve Şekil 2.10’da *BRCA2* gen varyantlarının NCBI dbSNP veri tabanına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmaları gösterilmiştir.



Şekil 2.9. *BRCA2* geni dizi varyantlarının moleküler etkiye göre sınıflandırılması



Şekil 2.10. *BRCA2* geni dizi varyantlarının varyant türüne göre sınıflandırılması

2.2.3. *BRCA1* ve *BRCA2* dizi varyantlarının fenotiple ilişkileri

BRCA1 ve *BRCA2* genleri sadece meme ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere birçok hastalık ve fenotip ile ilişkilendirilmişlerdir.

DisGeNET (A database of gene-disease associations, Gen-Hastalık ilişkileri veri tabanı), farklı halka açık (ücretsiz) veri tabanlarında olan genlerin fenotiplerle ilişkilerini derleyen bir veri tabanıdır (<http://disgenet.org/home/>). Bunun yanı sıra Karşılaştırmalı Toksikojenom Veri TabanıTM(CTDTM), UniProt/SwissProt, Orphanet, Fare Genom Veri Tabanı (MGD), PsyGeNET, Genomics İngiltere, ClinGen, Rat Genom Veri Tabanı (RGD) dahil olmak üzere tahmin edilen verileri içermektedir. DisGeNET'teki varyant-hastalık ilişkileri ClinVar'dan, NHGRI-EBI GWAS (Genom wide association study, Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları) kataloğundan ve GWAS db'den açıklamalıdır (Piñero ve ark.2017). DisGeNET veri tabanına göre *BRCA1* ve *BRCA2* genleri birçok hastalık, fenotipik özellik ve

hastalık grubu ile ilişkilendirilmiştir. DisGeNET veri tabanından alınan sonuçlara göre *BRCA1* ve *BRCA2* genleri ile ilişkili 118 fenotip Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin ilişkili olduğu fenotipler (<http://disgenet.org/home/>) (Erişim tarihi:20.10.2019)

Gen	Fenotip	DisGeNET Fenotip ID
<i>BRCA1</i>	Breast-Ovarian Cancer, Familial, Susceptibility To, 1	C2676676
<i>BRCA1</i>	Ovarian Cancer, Familial, Susceptibility To, 1	C2676678
<i>BRCA1</i>	Breast Cancer, Familial, Susceptibility To, 1	C2676677
<i>BRCA1</i>	Undifferentiated Carcinoma	C0205698
<i>BRCA1</i>	Neoplastic Cell Transformation	C0007621
<i>BRCA1</i>	Cytopenia	C0010828
<i>BRCA1</i>	Chromosome Breaks	C0333704
<i>BRCA1</i>	Chromosome Breakage	C0376628
<i>BRCA1</i>	Carcinomatosis	C0205699
<i>BRCA1</i>	Abnormality of The Fallopian Tube	C0281842
<i>BRCA1</i>	Icterus	C0022346
<i>BRCA1</i>	Dyschezia	C0237326
<i>BRCA1</i>	Decrease in Appetite	C0232462
<i>BRCA1</i>	Chronic Fatigue	C0518656
<i>BRCA1</i>	Carcinogenesis	C0596263
<i>BRCA1</i>	Abdominal Discomfort	C0232487
<i>BRCA1</i>	Nausea and Vomiting	C0027498
<i>BRCA1</i>	Neoplasm Metastasis	C0027627
<i>BRCA1</i>	Tumor Progression	C0178874
<i>BRCA1</i>	Abdomen Distended	C0000731
<i>BRCA1</i>	Pancreatic Cancer, Susceptibility To, 4	C3280442
<i>BRCA1</i>	Constipation	C0009806
<i>BRCA1</i>	Weight Decreased	C1262477
<i>BRCA1</i>	Functional Intestinal Obstruction	C3639956
<i>BRCA1</i>	Back Pain	C0004604
<i>BRCA1</i>	Gastrointestinal Pain	C0687713
<i>BRCA1</i>	Loss Of Appetite (Finding)	C1971624
<i>BRCA1</i>	Abdominal Pain	C0000737
<i>BRCA1</i>	Mammary Tumorigenesis	C1512981
<i>BRCA1</i>	Invasive Cancer	C0677898
<i>BRCA1</i>	Depressive Symptoms	C0086132
<i>BRCA1</i>	Tumor Initiation	C0598935
<i>BRCA1</i>	Hyperactive Behavior	C0424295
<i>BRCA1</i>	Premature Menopause	C0025322
<i>BRCA1</i>	Invasive Carcinoma	C1334274
<i>BRCA1</i>	Precancerous Lesions	C0940937
<i>BRCA1</i>	Cyst	C0010709
<i>BRCA1</i>	Tumor Immunity	C1519680
<i>BRCA1</i>	HER2 Gene Amplification	C1512127
<i>BRCA1</i>	Colonic Polyps	C0009376
<i>BRCA1</i>	Amenorrhea	C0002453
<i>BRCA1</i>	Metastatic Neoplasm	C2939420
<i>BRCA1</i>	Anoxia	C0003130
<i>BRCA1</i>	Memory Impairment	C0233794
<i>BRCA1</i>	Senile Plaques	C0333463
<i>BRCA1</i>	Abnormal Behavior	C0233514
<i>BRCA1</i>	Solid Neoplasm	C0280100
<i>BRCA1</i>	Multiple Tumors	C0260037
<i>BRCA1</i>	Coinfection	C0275524

Çizelge 2.1 *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin ilişkili olduğu fenotipler (devam)

<i>BRCA1</i>	Difficulty Sleeping	C0235162
<i>BRCA1</i>	Adnexal Lesion	C0237053
<i>BRCA1</i>	Endothelial Dysfunction	C0856169
<i>BRCA1</i>	Progressive Neoplastic Disease	C0677932
<i>BRCA1</i>	Recurrent Tumor	C0521158
<i>BRCA1</i>	Recurrent Carcinoma	C0549379
<i>BRCA1</i>	Emotional Problems	C0677660
<i>BRCA2</i>	Breast-Ovarian Cancer, Familial, Susceptibility To, 2	C2675520
<i>BRCA2</i>	Ovarian Cancer, Familial, Susceptibility To, 2	C2675522
<i>BRCA2</i>	Breast Cancer, Familial, Susceptibility To, 2	C2675521
<i>BRCA2</i>	Cytopenia	C0010828
<i>BRCA2</i>	Breast Cancer, Susceptibility To	C3469522
<i>BRCA2</i>	Abnormality Of The Fallopian Tube	C0281842
<i>BRCA2</i>	Abdominal Pain	C0000737
<i>BRCA2</i>	Functional İntestinal Obstruction	C3639956
<i>BRCA2</i>	Chromosomal Breakage İnduced by Crosslinking Agents	C4021737
<i>BRCA2</i>	Decrease İn Appetite	C0232462
<i>BRCA2</i>	Abdominal Discomfort	C0232487
<i>BRCA2</i>	Low Density Lipoprotein Cholesterol Measurement	C0202117
<i>BRCA2</i>	Dull İntelligence	C4020876
<i>BRCA2</i>	Mental And Motor Retardation	C4020875
<i>BRCA2</i>	Almond-Shaped Palpebral Fissure	C4024780
<i>BRCA2</i>	Pancreatic Cancer, Susceptibility To, 2	C3150546
<i>BRCA2</i>	Short Stature	C0349588
<i>BRCA2</i>	Poor School Performance	C1843367
<i>BRCA2</i>	Hypopigmented Skin Patch	C1836735
<i>BRCA2</i>	Gastrointestinal Pain	C0687713
<i>BRCA2</i>	Acquired Scoliosis	C0700208
<i>BRCA2</i>	Serum Total Cholesterol Measurement	C1445957
<i>BRCA2</i>	Weight Decreased	C1262477
<i>BRCA2</i>	Bone Marrow Hypocellularity	C1855710
<i>BRCA2</i>	İrregular Hyperpigmentation	C1860236
<i>BRCA2</i>	Chromosome Breakage	C0376628
<i>BRCA2</i>	Decreased Platelet Count	C0392386
<i>BRCA2</i>	Short Palpebral Fissure	C0423112
<i>BRCA2</i>	Glioma Susceptibility 3	C2751641
<i>BRCA2</i>	Low İntelligence	C0423903
<i>BRCA2</i>	Small Head	C0424688
<i>BRCA2</i>	Aplasia/Hypoplasia Of The Radius	C2749463
<i>BRCA2</i>	Breast-Ovarian Cancer, Familial, Susceptibility To, 1	C2676676
<i>BRCA2</i>	Loss Of Appetite (Finding)	C1971624
<i>BRCA2</i>	Cognitive Delay	C1864897
<i>BRCA2</i>	Chronic Fatigue	C0518656
<i>BRCA2</i>	Carcinogenesis	C0596263
<i>BRCA2</i>	Curvature Of Spine	C0037932
<i>BRCA2</i>	Tracheoesophageal Fistula	C0040588
<i>BRCA2</i>	Neoplasm Metastasis	C0027627
<i>BRCA2</i>	Thrombocytopenia	C0040034
<i>BRCA2</i>	Back Pain	C0004604
<i>BRCA2</i>	Icterus	C0022346
<i>BRCA2</i>	Solid Neoplasm	C0280100
<i>BRCA2</i>	Tumor Progression	C0178874
<i>BRCA2</i>	Hyperactive Behavior	C0424295
<i>BRCA2</i>	Mammary Tumorigenesis	C1512981
<i>BRCA2</i>	Plaque, Amyloid	C2936349

Çizelge 2.1 *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin ilişkili olduğu fenotipler (devam)

<i>BRCA2</i>	Invasive Carcinoma	C1334274
<i>BRCA2</i>	Confusion	C0009676
<i>BRCA2</i>	Cyanosis	C0010520
<i>BRCA2</i>	Senile Plaques	C0333463
<i>BRCA2</i>	Seizures	C0036572
<i>BRCA2</i>	Multiple Tumors	C0260037
<i>BRCA2</i>	Depressive Symptoms	C0086132
<i>BRCA2</i>	Disorientation	C0233407
<i>BRCA2</i>	Exanthema	C0015230
<i>BRCA2</i>	Recurrent Tumor	C0521158
<i>BRCA2</i>	Refractory Cancer	C0677936
<i>BRCA2</i>	Invasive Cancer	C0677898
<i>BRCA2</i>	Myoclonus	C0027066

Çizelge 2.2. *BRCA1* veya *BRCA2* mutasyonları taşıyan bireylerde ortaya çıkan kanser türleri (Roy ve ark. 2016)

Kanser Türü	<i>BRCA1</i> mutasyonları	<i>BRCA2</i> mutasyonları	Notlar
Meme	% 70–80 Hayat boyu risk	% 50–60 Hayat boyu risk	Meme ve yumurtalık kanseri <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> mutasyon taşıyıcılarında baskın kanser yatkınlığıdır. <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcıları <i>BRCA2</i> mutasyon taşıyıcılarına göre daha genç yaşta meme ve yumurtalık kanseri geliştirmektedirler.
Yumurtalık	% 50 Hayat boyu risk	% 30 Hayat boyu risk	Meme ve yumurtalık kanseri <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> mutasyon taşıyıcılarında baskın kanser yatkınlığı olmakla birlikte yabancı tip BRCA alelinin heterozigotluk kaybı her zaman bulunmaktadır.
Prostat	Aşkenazi Yahudilerinde bulunan mutasyonlar risk artışı ile ilişkilidir	20 kat artmış risk	<i>BRCA2</i> mutasyon taşıyıcılarının <% 1'i prostat kanserine sahiptir. Prostat kanseri <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcılarında daha nadir görülmektedir (<i>BRCA1</i> mutasyonlarına sahip Aşkenazi Yahudi nüfusu üyeleri hariç).
Pankreatik	Anekdotalı ve sadece vaka raporları bulunmaktadır	10 kat risk artışı	<i>BRCA2</i> mutasyon taşıyıcılarının <% 1'i pankreas kanseridir. <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcılarında görülme sıklığı net bir şekilde belgelenememiştir.
Gastrit	Bildirilmemiş	Sınırlı raporlar	Mide kanserinin <i>BRCA2</i> mutasyonları ile ilişkili olup olmadığı net değildir.
Diğerleri	Bildirilmemiş	Beyin, medulloblastom, gırtlak, CLL ve AML	Fanconi anemi alt tipi D1 (<i>BRCA2</i> mutasyonlarının neden olduğu) merkezi sinir sistemi kanseri ile ilişkilidir.
Fallopian tüpü	Nadir	Nadir	Bu kanser tipi yumurtalık kanseri gibidir, ancak genel olarak nadir görülen bir kanserdir ve <i>BRCA</i> mutasyon taşıyıcılarında nadir görülmektedir.

2.3. Gen Dizi Varyantlarını Sınıflandırma ve Kategorizasyonunda Biyoinformatik Araçların Önemi

Varyantların sınıflandırılması; protein düzeyinde etkileri, amino asit değişiminin protein fonksiyonuna etkisi, popülasyon dağılımları, hastalarda görülme sıklıkları, buldukları gen bölgesinin korunmuşluğu değerlendirilerek yapılmaktadır ve regülatör önemleri, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel mekanizmalardaki olası rolleri değerlendirilmektedir. Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4 bu amaçlarla

kullanılan bazı veri tabanları ve *in silico* tahminleme araçların ait bilgiler bulunmaktadır.

Çizelge 2.3. Veri tabanları ve içerdikleri bilgiler (Richards ve ark. 2015'den değiştirilerek alınmıştır)

Hastalık veri tabanları	
ClinVar (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar)	İnsan varyasyonlarının klinik önemi ve fenotip ilişkisi ile ilgili veri tabanı.
OMIM (http://www.omim.org)	İnsan genlerinin ve hastalıklarla ilişkili genetik varyantların temsili bir örneklemesini içeren genetik koşulların veri tabanı.
İnsan Gen Mutasyonu Veri Tabanı (http://www.hgmd.org)	Literatürde yayınlanan varyant anotasyonlarını içeren veri tabanı. İçeriğin çoğuna erişmek için ücrete dayalı abonelik gerektirmektedir.
Lokus / hastalık / etnik / diğer özel veri tabanları	
İnsan Genomu Varyasyon Topluluğu (http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html)	İnsan Genomu Varyasyon Topluluğu sitesi, insani varyasyonun belirli alt gruplarına değişken açıklamalar sağlayan binlerce veritabanının bir listesini geliştirdi. Leiden Open Variation Database sisteminde büyük miktarda veri tabanı oluşturulmuştur.
Leiden Açık Varyasyon Veri tabanı (http://www.lovd.nl)	
DECIPHER (http://decipher.sanger.ac.uk)	Ensembl genom tarayıcıyı kullanarak genomik mikroarray verilerini fenotip ile bağlayan klinisyenler ve araştırmacılar için moleküler bir sitogenetik veri tabanı.
Populasyon veri tabanları	
Ekzon Toplama Veri tabanı (gnomAD) (https://gnomad.broadinstitute.org)	Bu web sitesinde sağlanan veriler, hastalığa özgü ve populasyon genetik çalışmalarının bir parçası olarak dizilen ilgisiz bireylerden 125.748 ekzon dizileri ve 15.708 tam genom dizilerini kapsamaktadır.
Ekzon Toplama Konsorsiyumu (http://exac.broadinstitute.org)	Çeşitli hastalığa özgü ve populasyon genetik çalışmalarının bir parçası olarak dizilenen varyantlar ve hastalık ile ilgili olmayan kişilerin ekzon sekansı sırasında bulunan varyantların veri tabanı. Pediyatrik hastalık hastaları ve ilgili kişiler hariç tutulmuştur.
Ekzon Variant Sunucusu (http://evs.gs.washington.edu/EVS)	Avrupa ve Afrika kökenli Amerikan kökenli bireylerin birkaç büyük kohortunun ekzon sekanslaması sırasında bulunan varyantların veri tabanı.
1000 Genom Projesi (http://browser.1000genomes.org)	26 popülasyondan düşük kapsama ve yüksek kapsama genomik ve hedefli sıralama sırasında bulunan varyantların veri tabanı. Ekzon Variant Sunucusuna kıyasla daha fazla çeşitlilik sağlar, ancak aynı zamanda daha düşük kaliteli veriler içerir ve sadece bazı kohortlar ilgili bireyleri içerir.
dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)	Birçok kaynaktan gönderilen kısa genetik varyasyonların veritabanı (tipik olarak ≤ 50 bp). Kaynak araştırmanın detayları eksik olabilir ve patojenik değişkenler içerebilir.
dbVar (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar)	Birçok kaynaktan gönderilen yapısal değişkenlik veri tabanı (genellikle > 50 bp).
NHLBI TOPMed (https://www.nhlbiwgs.org/group/project-studies)	TOPMed projesi, NHLBI'nin Hassas Tıp İçin Trans-Omics (TOPMed) Tüm Genom Sıralama (WGS) Projesi'nin bir parçası olan çalışmalara katkıda bulunan tüm katılımcılarla toplanan varyasyon verilerini rapor etmektedir.

Kullandığımız *in silico* tahminleme algoritmaları dışında birçok *in silico* tahminleme algoritması mevcuttur. Örneğin, The American College of Medical Genetics and Genomics (Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji, ACMG)'nin önerdiği birçok farklı algoritma bulunmaktadır. Bu algoritmalar, kullanım amaçları ve web adresleri Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. *In silico* tahminleme araçları ve içerdikleri bilgiler (Richards ve ark. 2015)

Yanlış Anlamli Varyantlar için	ConSurf http://consurf.tau.ac.il	Evrimsel koruma
	FATHMM http://fathmm.biocompute.org.uk	
	MutationAssessor http://mutationassessor.org	
	PANTHER http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp	
	PhD-SNP http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html	
	SIFT http://sift.jcvi.org	
	SNPs&GO http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go	Protein yapısı ve fonksiyonu
	Align GVGD http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php	Protein yapısı, fonksiyonu ve evrimsel koruma
	MAPP http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/MAPP/index.html	
	MutationTaster http://www.mutationtaster.org	
	MutPred http://mutpred.mutdb.org	
	PolyPhen-2 http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2	
	PROVEAN http://provean.jcvi.org/index.php	Varyant dizisi arasındaki benzerlik ve protein dizilimi benzerliği
	nsSNPAnalyzer http://snpanalyzer.uthsc.edu	Çoklu dizi hizalaması ve protein yapı analizi
Condel http://bg.upf.edu/fannsd/	SIFT, PolyPhen-2 ve MutationAssessor'ü birleştirir	
CADD http://cadd.gs.washington.edu	Simüle varyantları ile insanlarda sabit / neredeyse sabit türetilmiş aleller	
Kesim noktasında bulunan varyantlar için	GeneSplicer http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml	Markov modelleri
	Human Splicing Finder http://www.umd.be/HSF/	Pozisyona bağlı sonuç
	MaxEntScan http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html	Maximum entropi prensibi
	NetGene2 http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2	Nöral ağlar
	NNSplice http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html	Nöral ağlar
	FSPLICE http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fssplice&group=programs&subgroup=gfind	Ağırlık matrisi modeline dayanan ek yerleri için türlere özgü öngörü
Nükleotid korunmuşluk tahmini	GERP http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html	Genomik evrimsel oran profili
	PhastCons http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/	Koruma puanlaması ve korunan unsurların belirlenmesi

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Örnek Materyaller

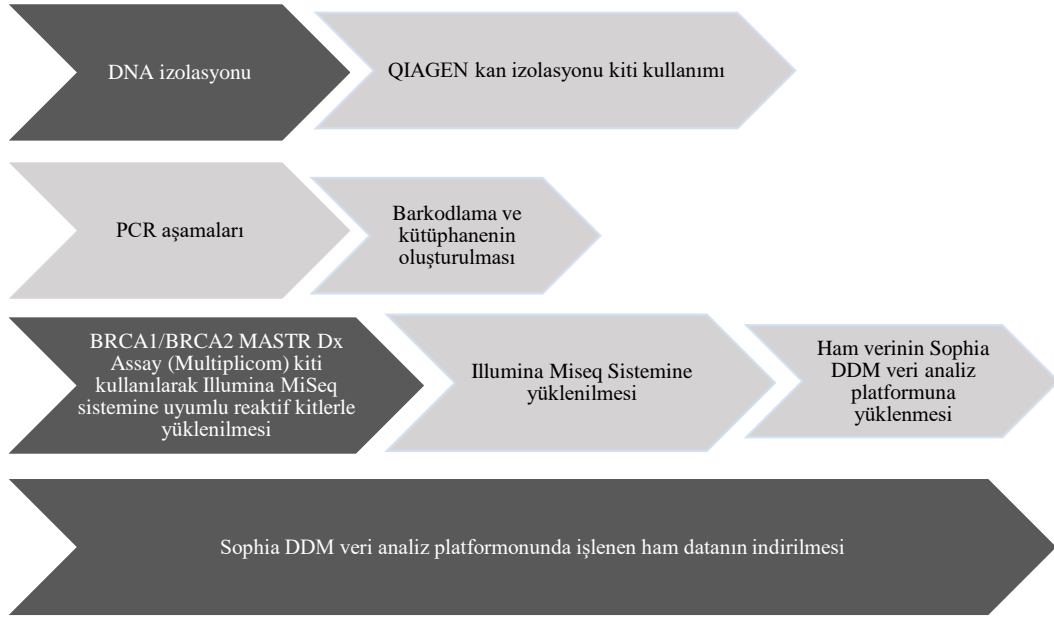
Çalışmamız için Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na çeşitli sebeplerle Mart 2018-Eylül 2018 tarihleri arasında başvuran 125 kişinin *BRCA1* ve *BRCA2* gen dizilemesi sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır. Bu tez çalışması Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulundan (Karar no: 2018-21/6) onaylanmıştır. Örneklerden alınan periferik kandan (2ml) QIAGEN DNA izolasyon kiti ile DNA izole edilmiştir. DNA konsantrasyonları Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific) cihazında ölçüldükten sonra *BRCA2* (56 amplikon) ve *BRCA1* (35 amplikon) genlerinin tüm ekzonları ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri BRCA MASTR Plus Dx Assay (Multiplicom) kiti kullanılarak çoğaltılıp, Illumina Miseq yeni nesil dizileme cihazı kullanılarak dizi analizi yapılmıştır.

Çizelge 3.1. *BRCA1* ve *BRCA2* gen taraması yapılan örneklerin karakteristik özellikleri (n=125)

Cinsiyet	122 Kadın, 3 Erkek
Yaş ortalaması	46
Aile Öyküsü	7
Diğer Kanser Öyküsü	3 (Tiroid, Mide, Jejunum)
Meme Kanseri	101
• Kişide başka kanser öyküsü	1
• Kişide meme ve/veya yumurtalık kanseri aile öyküsü	17
• Ailede meme ve/veya yumurtalık ve diğer kanser öyküsü	4
Yumurtalık Kanseri	14
• Kişide meme/yumurtalık ve/veya yumurtalık kanseri aile öyküsü	1

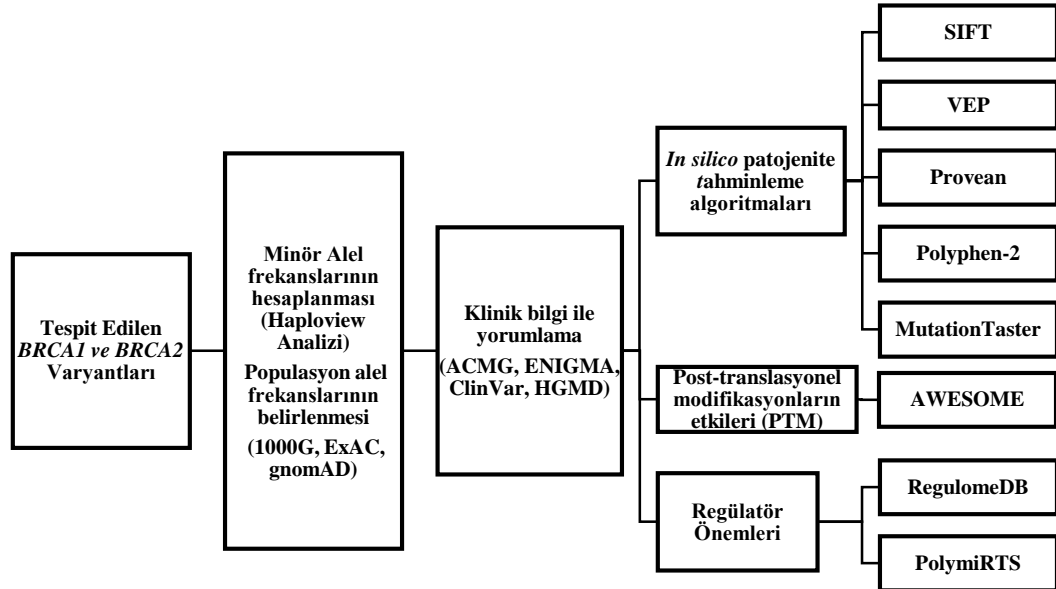
3.2. Varyantların Tespit Edilmesi ve Analizi

Illumina Miseq cihazından alınan .fastq dosyaları Sophia DDM veri analiz platformuna yüklenerek Sophia Genetics'in MOKA yazılımı ile ham veri dosyaları işlenilmiş ve bu işlenilmiş olan .vcf genotip dosyaları .xsl formatında indirilmiştir. Biyoinformatik analizler öncesi data oluşturma aşamaları Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Biyoinformatik analizler öncesi data oluşturma aşamaları

Bu aşamalardan sonra varyantların anotasyonu ve patojenite sınıflandırılmaları için birçok *in silico* tahminleme algoritması kullandık (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan veri tabanları ve *in silico* tahminleme araçları

Tespit edilen tüm varyantların klinik ile ilişkili bilgilerine ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), HGMD Professional 2019.3 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>), ACMG/AMP kriterlerini kullanarak dizi değişkenlerinin klinik önemini yorumlayan InterVar (<http://quanli.tk/wInterVar/>)(Li ve Wang 2015) ve ENIGMA kullanılarak ulaşılmıştır. Buna ek olarak çalışmamızda varyantların popülasyonlarda görülme sıklığı, büyük ölçekli dizileme projelerinin verilerini toplayan üç kaynaktan elde edilmiştir (1000G, ExAC ve gnomAD).

Çalışmamızda varyantları sınıflandırmak için kullandığımız veri tabanı ve *in silico* araçlardan bahsedecek olursak;

Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT): Ng PC ve Henikoff tarafından 2003 yılında oluşturulmuştur. SNP çalışmaları ve rastgele mutagenез projeleri, protein kodlama bölgelerinde amino asit değişimlerini tanımlamak üzere oluşturulmuş bir algoritmadır (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>). Bilindiği üzere her bir amino asit değişimi protein fonksiyonunu etkileme potansiyeline sahiptir. SIFT, bir amino asit değişiminin protein fonksiyonunu etkileyip etkilememesini öngören bir programdır. SIFT'nin mutajenez çalışmalarında ve insan polimorfizmlerinde fonksiyonel olarak nötr ve zararlı amino asit değişiklikleri arasındaki farkı ayırt edebileceğini gösterilmiştir (Ng PC ve Henikoff 2003).

SIFT'in verdiği sonuçlara göre; Tolerated: Amino asit değişiminin etkisi tolere edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir. Damaging: Amino asit değişiminin etkisi hasar verici düzeyde olduğunu göstermektedir.

PROVEAN: Choi Y. ve arkadaşları tarafından 2012 yılında oluşturulmuştur. Bir amino asit değişiminin veya indel'in, bir proteinin biyolojik fonksiyonu üzerinde bir etkisi olup olmadığını öngören bir yazılım aracıdır (<http://provean.jcvi.org>).

PROVEAN, işlevsel olmayan, önemli olduğu tahmin edilen ve indel değişkenleri tanımlamak için kullanışlıdır. PROVEAN'ın verdiği sonuçlara göre; Neutral: Proteinin etkisi nötr olduğunu göstermektedir. Deleterious: Proteinin etkisi hasar verici düzeyde olduğunu göstermektedir.

Variant Effect Predictor (Varyant Etkisi Tahminleyicisi, VEP): McLaren ve arkadaşları tarafından 2016 yılında oluşturulmuştur (<http://www.ensembl.org/Tools/VEP>). Kodlama ve kodlama yapmayan bölgelerde genom varyantlarının analizi, ek açıklama ve önceliklendirme için güçlü bir araç setidir. Farklı gereksinimlere uyacak çeşitli arabirimlere ve analizi yapılandırmak ve genişletmek için basit seçeneklere sahip geniş bir genomik açıklama koleksiyonuna erişim sağlar. Açık kaynaktır, kullanımı ücretsizdir ve sonuçların tam olarak üretilebilirliğini destekler. VEP, çok çeşitli çalışma tasarımlarında değişken yorumlamayı basitleştirebilir ve hızlandırabilir. Human Genome Variation Society (İnsan Genomu Varyasyon Derneği, HGVS) isimlendirmesini kullanan değişken raporlama da transkriptlere veya proteinlere dayanır. VEP'in verdiği sonuçlara göre; High: Varyantın, protein üzerinde yüksek (yıkıcı) bir etkiye sahip olduğu ve muhtemelen protein kesilmesine, fonksiyon kaybına veya anlamsız değişim kaynaklı bozulmaya neden olduğu varsayılmaktadır. Low: Çoğunlukla zararsız veya proteinin etkisini değiştirmeyen varyant. Moderate: Protein etkinliğini değiştirebilecek yıkıcı olmayan bir varyant. Modifier: Genellikle, kodlamayan değişkenler veya kodlama yapmayan genleri etkileyen, tahminlerin zor olduğu veya etki kanıtı bulunmayan değişkenlerdir.

POLYPHEN-2: Adzhubei ve arkadaşları tarafından 2010 yılında oluşturulmuştur. Bir amino asit yerini tanımlayan vahşi tip alel özelliklerinin ve mutant (türetilmiş, hastalığa neden olan) alel özelliklerinin karşılaştırılmasını içerir (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>). Bilgilendirici özelliklerin çoğu, iki insan alelinin, homolog proteinlerin çoklu dizilimi dizisindeki amino asit değiştirmelerinin modeline ne kadar iyi uyduğunu, insan vahşi tip alelden ilk sapmayı barındıran proteinin, insan proteininden ne kadar uzak olduğunu belirler. Hizalama hattı, bir kümeleme algoritması kullanarak analiz için homolog sekans setini seçer ve daha sonra çoklu hizalamalarını oluşturur ve geliştirir.

PP2 verdiği sonuçlara göre; Benign: Amino asit değişimi proteinin etkisini değiştirmez. Possibly damaging: Amino asit değişimi proteinin etkisinde hasar

verebilir. Probably damaging: Amino asit değişimi proteinin etkisinde muhtemelen hasar verir.

MutationTaster: Schwarz ve arkadaşları tarafından 2014 yılında oluşturulmuştur (<http://www.mutationtaster.org>). Yalnızca amino asit değişimlerinin değil aynı zamanda intronik ve eş anlamlı değişikliklerin, kısa ekleme ve/veya silme (indel) mutasyonlarının ve intron-ekzon sınırlarını kapsayan varyantların fonksiyonel sonuçlarını tahmin etmek için tasarlanmıştır. 1000G'de veya HapMap'te homozigot durumda dört defadan fazla bulunan değişiklikler otomatik olarak nötr olarak kabul edilir. ClinVar'da patojenik olarak işaretlenmiş varyantların otomatik olarak hastalığa neden olduğu tahmin edilir ve hastalık fenotipi görüntülenir. ENCODE projesi ve Database of Transcription Factor Binding Profiles (transkripsiyon faktör bağlama profilleri veri bankası, JASPAR)'dan gelen veriler de dahil olmak üzere düzenleyici özellikler için entegre testler yapmışlar ve DNA varyantları etrafındaki evrimsel korumayı puanlamışlardır. MutationTaster'ın verdiği sonuçlara göre; Disease causing: Muhtemelen zararlı varyant. Disease causing automatic: Zararlı olduğu bilinen varyant (varyant detayları için dbSNP/ TGP/ClinVar/HGMD veri bankalarına erişim sağlamaktadır). Polymorphism: Muhtemelen zararsız. Polymorphism automatic: Zararsız olduğu bilinen varyant (varyant detayları için dbSNP/ TGP/ClinVar/HGMD veri bankalarına erişim sağlamaktadır).

RegulomeDB: Boyle ve arkadaşları tarafından 2012 yılında oluşturulmuştur (<http://www.regulomedb.org/>). İnsan genomunun kodlama yapmayan bölgelerinde bilinen ve ön görülen tek nükleotid değişimlerinin düzenleyici elemanlarla ilişkisini skorlama sistemi ile analiz eden bir veri tabanıdır. Bu veri tabanında ilişki kurulan genom bölgeleri DNaz aşırı duyarlılık bölgelerini, transkripsiyon faktörlerinin bağlayıcı bölgelerini ve düzenleme transkripsiyonuyla biyokimyasal olarak karakterize edilmiş promotör bölgeleri içerir. Bu verilerin kaynağı GWAS'ın halka açık veri kümelerini, ENCODE projesini ve yayınlanmış literatürü içermektedir. RegulomeDB'nin verdiği sonuçlardan bölüm 3.5'de bahsedilecektir.

PolymiRTS: MikroRNA'lardaki (miRNA'lardaki) ve bunların hedef bölgelerindeki (PolymiRTS) polimorfizmlerin miRNA fonksiyonunu bozduğu, hastalık gelişmesine ve fizyolojik ve davranışsal fenotiplerde varyasyona yol açtığı bilinmektedir. Genomik teknolojilerdeki son gelişmeler, miRNA-mRNA bağlanma sahalarının CLASH (çapraz bağlanma, ligasyon ve hibrit sekanslama) gibi doğrudan haritalama deneylerinden tanımlanmasını mümkün kılmıştır. Daha eksiksiz ve doğru miRNA-mRNA etkileşimleri sağlamak için PolymiRTS veri tabanında CLASH deneylerinden veriler entegre edilmiştir. PolymiRTS'in tarama ve arama sayfaları, kullanıcıların PolymiRTS'ler ve gen ekspresyon özellikleri, fizyolojik ve davranışsal fenotipler, insan hastalıkları ve biyolojik yollar arasındaki ilişkileri keşfetmelerini sağlamaktadır (Bhattacharya ve ark. 2014).

A Website Exhibits SNP On Modification Even (AWESOME): Fosforilasyon, çoğaltma, metilasyon, asetilasyon, glikozilasyon ve diğerleri de dahil olmak üzere post-translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler) çok önemli biyolojik proseslerdir. Yanlış anlamlı SNP'lerin işlevsel mekanizmalarından biri, PTM'leri etkileyebilmeleri ve bir protein işlev bozukluğuna ve bunun aşağı yöndeki sinyal yolu bozukluğuna yol açabilmeleridir. Burada, SNP'lerin hemen hemen her türlü PTM üzerindeki mevcut 20 araçtan oluşan SNP'lerin rolünü sistematik olarak değerlendiren etkileşimli bir web tabanlı analiz aracı olan AWESOME adlı bir veri tabanı adlı bir veri tabanı yapmışlardır (Yang ve ark. 2019).

Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA): Spurdle ve arkadaşları tarafından 2012 yılında oluşturulmuştur. On dokuz ülkeden 100'den fazla araştırmacının katılımı ile oluşturulmuş bir konsorsiyumdur (<https://brcaexchange.org>). Meme kanseri genlerindeki dizi varyantlarının klinik önemini belirlemeye odaklanan uluslararası bir araştırmacı konsorsiyumudur. *BRCA1* ve *BRCA2* gen varyantlarının sınıflandırılması için 5 sınıf sistemi tanımlayan kurallar başlangıçta ENIGMA Yönlendirme komitesi üyeleri tarafından tasarlandı ve belgelendirildi ve ENIGMA ortaklarından gelen girdilerle revize edilmiştir. Bu ENIGMA kriterleri, yayınlanan kılavuzlara göre genetik danışma alanındaki hasta ve aile yönetimiyle bağlantılı olabilecek *BRCA1/2*

gen sekansı varyasyonunun standart klinik sınıflandırması için bir temel sağlamaktadır. Şu anda, önerilen sınıflandırma kriterlerinin, germline yüksek risk varyantlarını (bilinen veya tahmin edilen klasik patojenik varyantlara eşdeğer kanser riski ile ilişkili), düşük veya risksiz varyantlardan erken bir sonlandırma kodonunu kodlayan (yani anlamsız veya çerçeve değişimini) ayırt etmesi amaçlanmıştır.

Human Gene Mutation Database (HGMD): Stenson ve arkadaşları tarafından 2017 yılında oluşturulmuştur (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/introduction.php>). İnsan kalıtsal hücre çekirdeklerinde oluşan ve insan kalıtım hastalıklarına ve sakatlıklarına sebep olan veya bunlarla yakın ilişkisi olan mutasyonları kapsayan detaylı bir derlemedir. Bu veri tabanı başlangıçta insan genlerinde oluşan mutasyonların mekanizmalarını incelemek üzere geliştirilmiş olsa da, günümüzde kalıtsal insan gen hastalıkları hakkındaki güncel bilgileri de içerdiği için daha geniş bir uygulama kapsamına ulaşmıştır. HGMD'nin iki farklı versiyonu mevcuttur. Bu versiyonlar ise HGMD Public ve HGMD Professional'dır. Bu iki versiyon arasında ki fark ise HGMD Professional'ın ücretli olması ve her 3 ay da bir veri tabanını güncellemesidir. HGMD bütün yayınlanan kalıtsal hastalıklara sebep olan mutasyonları ve de hastalıklar veya fonksiyonla bağlantılı polimorfizmleri kapsar ve bu bilgileri kolayca ulaşılabilecek bir şekilde, ister akademik, ister kliniksel ve isterse ticari amaçla olsun, bütün ilgilenenlere sunar. Buradaki veriler, gen kodlarında tek baz-çifti değişikliklerini (yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlar gibi), insan hücre çekirdek genlerinin regülasyon ve ekleme için önemli kısımlarını, mikrodelesyonları ve mikroinsersiyonları, indel polimorfizmlerini, nükleotid tekrar büyümelerini ve de büyük gen hatalarını (delesyonlar, insersiyonlar, duplikasyonlar gibi) ve komplike gen düzenlemelerini içermektedir. Bu çalışmada kullanılan HGMD Professional sürümü 2019.3'tür.

ClinVar: İnsanlarda gözlenen varyantlar ve fenotipler arasındaki ilişkileri destekleyici kanıtlarla sunan ücretsiz halka açık bir veri tabanıdır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). ClinVar, hasta örneklerinde bulunan varyantları, hastaların klinik bilgilerini ve bunları bildiren kişilerle ilgili verileri

işler. Bildirim yapıldıktan sonra açıklanan aleller referans diziler ile eşleştirilip HGVS standartlarına göre rapor edilir. ClinVar, tıbbi genetik topluluğunun ihtiyaçlarını verimli ve etkili bir şekilde karşılamak için kuruluşlar ile işbirliği içerisinde çalışmaktadır.

ACMG/AMP kriterleri: Bu uluslararası kriterler bir varyantın klinik olarak önemini hakkında sınıflandırma yapar (Richards ve ark. 2015). Bu sınıflandırma genel olarak patojen-muhtemel patojen ve iyi huylu-muhtemel iyi huylu olarak sunulur. Her patojenik kriter, çok güçlü (PVS1), güçlü (PS1-4), orta (PM1-6) ve destekleyici (PP1-5) olarak ayrılırken her iyi huylu kriter, tek başına (BA1), güçlü (BS1-4) veya destekleyici (BP1-6) olarak tanımlanır.

Patojenik kriterler yakından incelenecek olursa;

1) Çok Güçlü Patojenite Kanıtı

PVS1: Fonksiyon kaybının bilinen bir hastalık sebebi olduğu durumlarda anlamsız, çerçeve kayması mutasyonları, başlama kodonu ya da birçok ekzonun delesyonudur.

2) Patojenik Etkinin Güçlü Kanıtları

PS1: Patojenik özellik gösteren amino asite dönüşüm.

PS2: Aile hikâyesi olmadan hastalığın *de nova* görülmesi.

PS3: Zararlı etkisi in vivo ve in vitro desteklenen gen ürünü.

PS4: Etkilenen bireylerde varyant prevalansının anlamlı derecede artması.

3) Patojenik Etkinin Orta Dereceli Kanıtları

PM1: Hot-spot (Mutasyonların fazla gerçekleştiği) noktalar ve kritik fonksiyonel alanlarda değişim.

PM2: Ekzon Sekans Projesi, 1000 Genom veya ExAC gibi büyük projelerde görülmemesi.

PM3: Resesif bozukluklar için trans olarak tespit edilen patojenik bir varyant.

PM4: Protein uzunluğunun çerçeve içi delesyon ya da insersiyonla kısalması.

PM5: Farklı bir amino asit kalıntısında tespit edilen değişimin patojen olarak tespit edilmesi.

PM6: Aile hikâyesi öğrenilmeden *de nova* olarak kabul edilmesi.

4) Patojeniteyi Destekleyen Kanıtlar

PP1: Hastalığa yol açtığı bilinen bir genden etkilenen aile bireylerinden köken alma.

PP2: Düşük huylu bir kötü huylu varyasyon varyasyonuna sahip olan ve bir kötü huylu varyantların ortak bir hastalık mekanizması olduğu bir gende yanlış varyasyon.

PP3: *In silico* analizlerle hesaplama.

PP4: Hastanın fenotipi ve aile öyküsü.

PP5: Varyant yakın zamanda patojenik olarak bildirilmiştir fakat kanıtlar laboratuvar deneyleri için uygun değildir.

İyi huylu kriterleri yakından incelenecek olursa;

1) İyi Huylu Etkinin Bağımsız Kanıtı

BA1: Ekzon Sekans Projesi, 1000 Genom veya ExAC projelerinde minör alel frekansı %5'in üzerindedir.

2) İyi Huylu Etkinin Güçlü Kanıtı

BS1: Alel sıklığı beklenenden daha yüksek.

BS2: Sağlıklı bir erişkin bireyde resesif (homozigot), dominant (heterozigot) veya X'e bağlı (hemizigot) bir hastalık gözlenmiştir ve erken yaşta tam penetrasyon beklenmektedir.

BS3: *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarla zararlı etkisinin gözlemlenememesi.

BS4: Ailenin etkilenen bireylerinde segregasyon eksikliği.

Not: Yaygın gözlenen fenotipler (örneğin; kanser, epilepsi, vb.) için etkilenen bireylerde segregasyon eksikliğini taklit edilebilir. Ayrıca ek olarak, ailelerin otozomal dominant bozukluğa katkıda bulunan birden fazla patojenik varyantı olabilir ve bu da belirgin bir segregasyon eksikliği oluşturabilmektedir.

3) İyi Huylu Etkiyi Destekleyen Kanıtlar

BP1: Öncelikle kesilen varyantların hastalığa yol açtığı bilinen bir gende yanlış anlamlı varyant.

BP2: Tamamen nüfuz eden bir baskın gen/hastalık için patojenik bir varyant ile *trans*'da gözlendi veya herhangi bir kalıtım paterninde patojenik varyant *cis*'te gözlenmesi.

BP3: Bilinen bir işlevi olmayan, yinelenen bir bölgedeki çerçeve içi silme/ekleme işlemleri.

BP4: Çok sayıda *in silico* hesaplama kanıtının, gen veya gen ürünü üzerinde bir etkisi olmadığını göstermesi (koruma, evrimsel, ek etki vb.).

Not: *In silico* algoritmalarının çoğu, tahminleri için aynı veya çok benzer girdi kullandığından, her bir algoritma bağımsız bir kriter olarak sayılmaz. BP4, bir varyantın değerlendirilmesinde yalnızca bir kez kullanılabilir.

BP5: Varyantın, hastalık için alternatif bir moleküler temele sahip bir vakada bulunması.

BP6: Varyant son zamanlarda iyi huylu olarak değişken bildirilmiştir, ancak kanıtlar bağımsız bir değerlendirme yapmak için laboratuvara uygun olmamasıdır.

BP7: Splicing tahminleme algoritmalarının hiçbir etki öngörmediği ve nükleotidi çok fazla korunmayan eş anlamlı varyant.

3.3. Haploview analizi

Haploview, çok çeşitli veri kümesi boyutları için haplotip analizi için kapsamlı bir araç paketi sağlamak üzere tasarlanmıştır. Haploview kolay bir biçimde değişken kalite istatistikleri, LD (linkage disequilibrium, bağlantı dengesizliği) bilgileri, haplotip blokları, nüfus haplotip frekansları ve tek değişkenli ilişkilendirme istatistiklerini üretir (Barrett ve ark. 2005).

Çalışmamızda Haploview (4.2) programı kullanarak tespit edilen varyantların MAF değerleri hesaplandı. MAF değerlerine göre sonucumuz; 0.05'e büyük veya eşit varyant yaygın, sonucumuz 0.05'den küçük ve 0.01'e eşit veya büyük ise varyantımız yaygın olmayan, eğer sonucumuz 0.01'den küçük ise varyantımız nadir varyant olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmamızda kullanılan 125 kişide gözlenen

varyantların MAF değerleri ile varyantların diğer çalışmalarda tespit edilen frekanslarını karşılaştırma şansımız oldu.

3.4. *BRCA1* ve *BRCA2* varyantlarının protein fonksiyonuna etkisinin analizi

Varyantları sınıflandırmak için farklı *in silico* tahmin araçları kullanılarak varyantların protein fonksiyonuna etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen *in silico* araçların belirli hesaplama algoritmaları bulunmaktadır. Bu çalışmada kodlama yapan gen bölgelerindeki varyantların fonksiyonel sonuçlarını değerlendirmek için temel olarak kullanılan tahmin algoritmaları; SIFT, MT, PP2, Provean ve VEP'dir. PP2, ilgili varyant için analiz edilmesi için spesifik protein tanımlayıcı gerektirir ve PP2' deki sekans varyantlarını analiz etmek için UniProtKB veri tabanından P38398 ve P51587 alınmıştır, ancak SIFT, PP2 ve Provean tahminleri sadece yanlış anlamlı varyantları kapsamaktadır. MT aynı zamanda indelleri de ele alabilmektedir. Fosforilasyon, çoğaltma, metilasyon, asetilasyon, glikozilasyon ve diğerleri de dahil olmak üzere post-translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler) çok önemli biyolojik proseslerdir. Yanlış anlamlı SNP'lerin işlevsel mekanizmalarından biri, PTM'leri etkileyebilmeleri ve bir protein işlev bozukluğuna ve bunun aşağı yöndeki sinyal yolu bozukluğuna yol açabilmeleridir. Bu kısımda AWESOME veri tabanı kullanılmıştır.

3.5. *BRCA1* ve *BRCA2* varyantlarının gen regülasyonundaki potansiyel etkilerinin değerlendirilmesi

Varyantların düzenleyici etkilerinin değerlendirilmesi için RegulomeDB (Boyle ve ark. 2012) veri tabanı kullanıldı. Çizelge 3.2'de RegulomeDB'ye ait skorlar ve açıklamaları bulunmaktadır.

Çizelge 3.2. RegulomeDB Skorları ve açıklamaları

RegulomeDB Skoru	Açıklama
1a	eQTL + TF binding + matched TF motif + matched DNase Footprint + DNase peak
1b	eQTL + TF binding + any motif + DNase Footprint + DNase peak
1c	eQTL + TF binding + matched TF motif + DNase peak
1d	eQTL + TF binding + any motif + DNase peak
1e	eQTL + TF binding + matched TF motif
1f	eQTL + TF binding / DNase peak
2a	TF binding + matched TF motif + matched DNase Footprint + DNase peak
2b	TF binding + any motif + DNase Footprint + DNase peak
2c	TF binding + matched TF motif + DNase peak
3a	TF binding + any motif + DNase peak
3b	TF binding + matched TF motif

Çizelge 3.2. RegulomeDB Skorları ve açıklamaları (devam)

4	TF binding + DNase peak
5	TF binding or DNase peak
6	Diğer

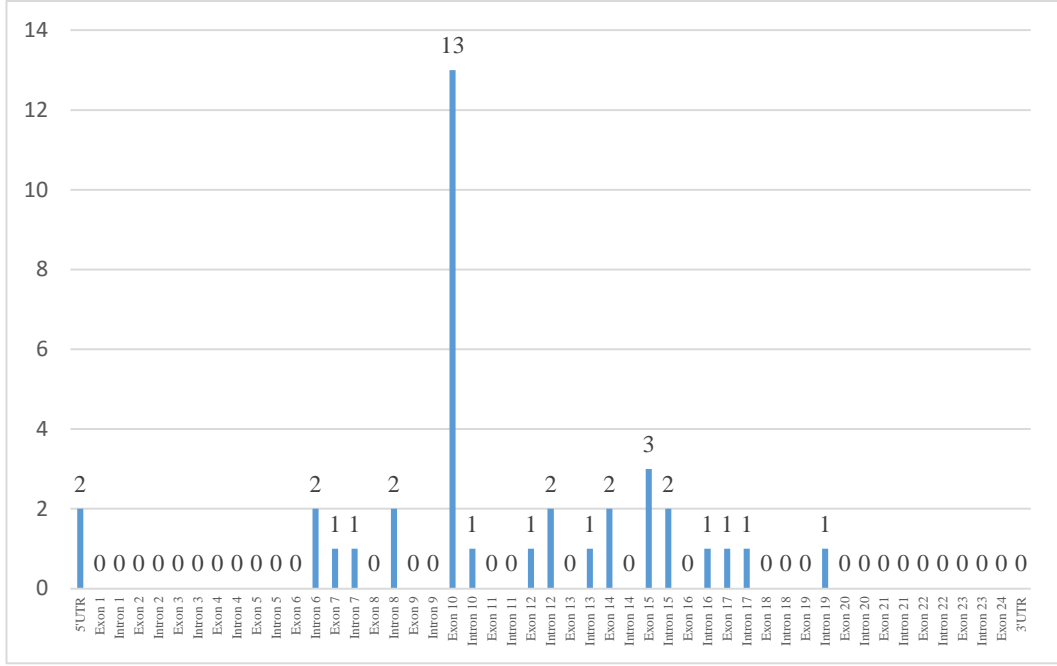
4. BULGULAR

Çalışmamıza toplam 125 kişinin genotip verisi dahil edildi. Örneklerimizin özellikleri ise; %98'i kadın, %6'sı aile öyküsü bulunan, %11'i yumurtalık kanserine sahip, %81'i meme kanserine sahip ve %2'sinde ise diğer kanser türleri bulunmaktadır.

Çalışmamız sonucunda bulmuş olduğumuz varyantların %87'si SNV, %13'ü ise indel varyanttır. *BRCA1* geninde 37 varyant, *BRCA2* geninde 59 varyant olmak üzere toplamda 96 varyant saptanmıştır. *BRCA1* geninde toplam 23 tane kodlama yapan bölgede varyantımız bulunmaktadır. Bu varyantlardan 2 tanesi çerçeve kayması varyantı olmak üzere 4 tane eş anlamlı varyantımız ve de 15 adet yanlış anlamlı varyantımız bulunmaktadır. Ek olarak 2 tane varyantımız ise 5'UTR bölgesine denk gelmektedir. Ayrıca 5' UTR da bulunan c.-63delCinsGATATATATATGT varyantımız novel varyanttır.

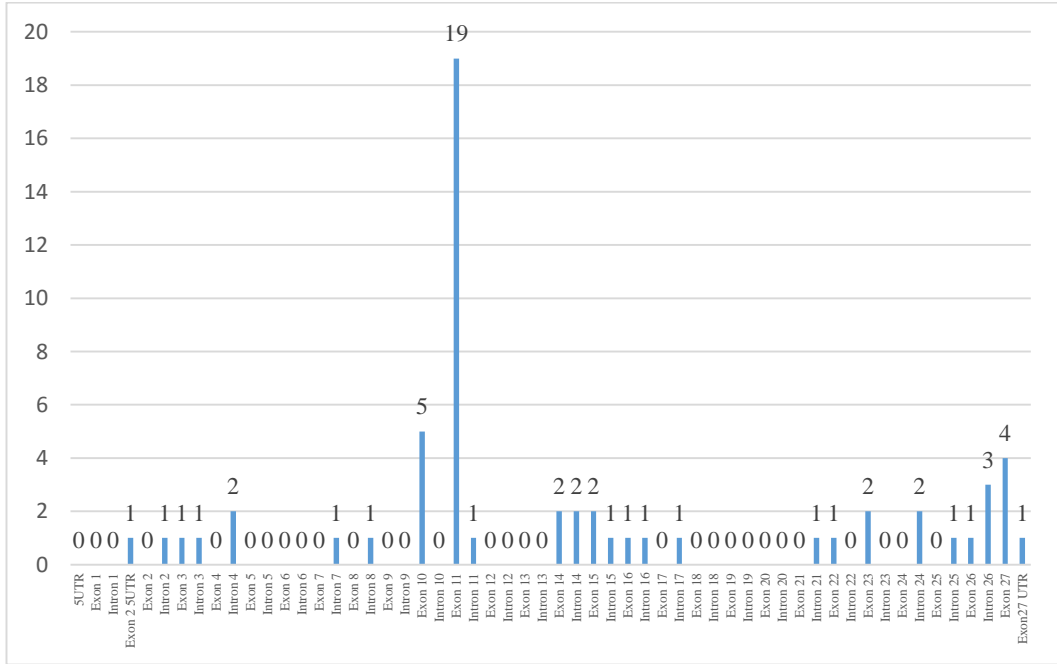
BRCA2 geninde toplam 40 tane kodlama yapan bölgelerde bulunan varyantımız bulunmaktadır. Bu varyantlardan 5 tanesi çerçeve kayması varyantı olmak üzere 11 adet eş anlamlı varyantımız, 19 tane yanlış anlamlı varyantımız ve 3 tane de anlamsız varyantımız bulunmaktadır. Ek olarak 1 tane varyantımız ise 5'UTR bölgesine, 1 tane varyantımız da 3'UTR bölgesine denk gelmektedir. *BRCA1* geninde saptamış olduğumuz varyantların 3 tanesi novel varyant olmakla beraber *BRCA2* geninde saptamış olduğumuz varyantların 5 tanesi novel varyanttır.

Bunlara ek olarak bulunan varyantların genlerin bölgeleri üzerindeki dağılımları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *BRCA1* varyantlarının gen bölgeleri üzerindeki dağılımları

Şekil 4.1’de görüldüğü üzere *BRCA1* geninde en fazla varyantımız ekzon 10’da gözlemlenmiştir. Ekzon 10 NCBI veri tabanına göre 3,425 baz uzunluğunda olup *BRCA1* geni için en uzun ekzondur. Mehta ve arkadaşlarının 2018 yılında Kuzey Hindistan’da meme ve yumurtalık kanseri üzerine yaptığı çalışmaya göre *BRCA1* geninde en fazla varyant ekzon 10’da saptamışlardır (Mehta ve ark. 2018)

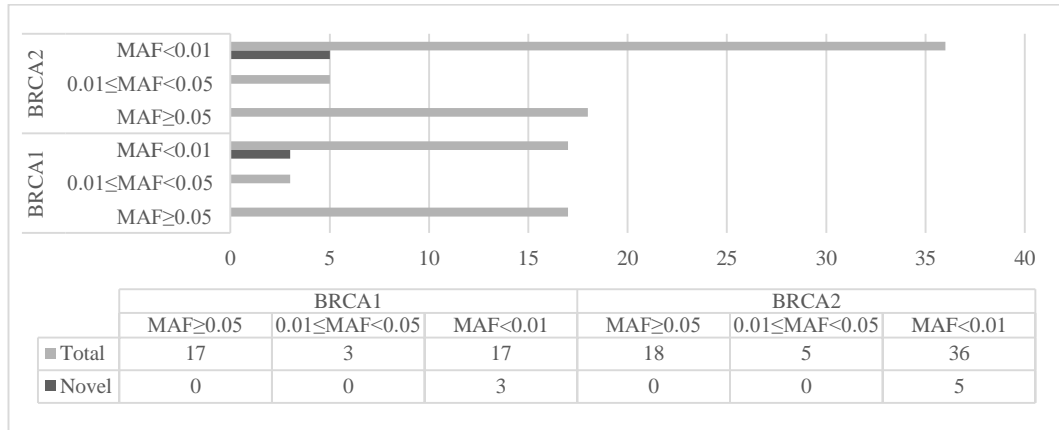


Şekil 4.2. *BRCA2* varyantlarının gen bölgeleri üzerindeki dağılımları

Şekil 4.2’de görüldüğü üzere *BRCA2* geninde en fazla varyantımız exon 11’de gözlemlenmiştir. Ekzon 11 NCBI veri tabanına göre 4,931 baz uzunluğunda olup *BRCA2* geni için en uzun ekzondur. Yine aynı şekilde Mehta ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmaya göre *BRCA2* geninde saptanmış olan mutasyonların yarısı ekzon 11’de bulunmaktadır (Mehta ve ark. 2018).

4.1. Minör Alel Frekansı Hesaplanması

Yapılan Haploview analizi sonucunda nadir, yaygın olmayan ve yaygın varyantlara rastlanılmıştır. Şekil 4.3’de de gösterildiği üzere *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde toplam 35 yaygın ($MAF \geq 0.05$) varyant, 8 yaygın olmayan $0.01 \leq MAF < 0.05$ varyant ve 53 nadir ($MAF < 0.01$) varyant belirlenmiştir. *BRCA1* ve *BRCA2* geninde tespit etmiş olduğumuz 8 novel varyantımızın ise doğal olarak MAF değerleri 0.01’den küçüktür.



Şekil 4.3. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde gözlemlenen varyantlar ve MAF sınıflandırılması

Ayrıca, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilen varyantların MAF değerleri 1000G, ExAC, gnomAD veri tabanları ile karşılaştırılmıştır ve çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Veri tabanları ile Haploview sonucumuzun benzerliği sonuçlarımızı desteklemektedir. Fakat novel varyant olmamasına rağmen *BRCA1* geninde c.4358-3A>G (rs1567779966) *BRCA2* geninde c.10078A>G veri tabanlarında gözlenmemişlerdir. Aynı şekilde *BRCA2* geninde ise c.67+1G>A, c.2765dupT,

c.4563A>G, c.6468_6469delTC, c.6513G>C, c.7436-1G>C, c.7618-53T>C varyantları da veri tabanlarında gözlenmemiştir.

Çizelge 4.1. Tespit edilen varyantların çalışma örneklerinde (n=125) ve diğer popülasyon veri tabanlarında görülme sıklıkları

Gen	Lokasyon	RefSNP ID	c.DNA	Amino Asit Değişimi	MAF	ExAC	gnomAD	1000G
BRCA1	41276318	Novel	c.-63delCinsGATATATATATGT		0.004	NA	NA	NA
BRCA1	41276247	rs3765640	c.-134T>C		0.392	NA	0.3169	NA
BRCA1	41251973	Novel	c.442-76T>C		0.004	NA	NA	NA
BRCA1	41251931	rs799923	c.442-34C>T		0.204	0.1738	0.1711	0.0986
BRCA1	41251803	rs56187033	c.536A>G	p.Tyr179Cys	0.004	0.0002718	0.0002545	0.0002
BRCA1	41249364	rs8176144	c.548-58delT		0.176	NA	0.3005	0.3349
BRCA1	41248009	Novel	c.594-70C>T		0.004	NA	NA	NA
BRCA1	41247973	rs147314539	c.594-34T>C		0.004	0.0004272	0.0003021	0.0006
BRCA1	41246483	rs41286292	c.1065G>A	p.Lys355Lys	0.004	0.0001895	0.0001274	0.0002
BRCA1	41246481	rs1799950	c.1067A>G	p.Gln356Arg	0.064	0.04407	0.04712	0.0218
BRCA1	41246092	rs55906931	c.1456T>C	p.Phe486Leu	0.004	0.0002966	0.0002724	0.0002
BRCA1	41245900	rs56012641	c.1648A>C	p.Asn550His	0.004	0.0002727	0.0002551	0.0002
BRCA1	41245601	rs397508920	c.1938_1947delCAGTGAAGAG	p.Ser646Argfs*2	0.004	0.008243	NA	NA
BRCA1	41245471	rs4986850	c.2077G>A	p.Asp693Asn	0.08	0.05681	0.05800	0.0335
BRCA1	41245466	rs1799949	c.2082C>T	p.Ser694Ser	0.38	0.3483	0.3486	0.3365
BRCA1	41245237	rs16940	c.2311T>C	p.Leu771Leu	0.392	0.342	0.3422	0.3353
BRCA1	41244936	rs799917	c.2612C>T	p.Pro871Leu	0.38	0.41	0.4127	0.3628
BRCA1	41244664	rs80356955	c.2884G>A	p.Glu962Lys	0.004	0.008244	0.00001769	NA
BRCA1	41244435	rs16941	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	0.396	0.3429	0.3430	0.3357
BRCA1	41244000	rs16942	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	0.388	0.349	0.3486	0.3526
BRCA1	41243509	rs28897689	c.4039A>G	p.Arg1347Gly	0.004	0.00398	0.003869	0.0006
BRCA1	41243190	rs799916	c.4097-141A>C		0.388	NA	0.4490	0.3648
BRCA1	41234470	rs1060915	c.4308T>C	p.Ser1436Ser	0.392	0.3431	0.3433	0.3363
BRCA1	41234399	rs1407411387	c.4357+22C>T		0.004	NA	0.000003985	NA
BRCA1	41228634	rs1567779966	c.4358-3A>G		0.004	NA	NA	NA
BRCA1	41226601	rs273900734	c.4485-63C>G		0.388	NA	0.3164	NA
BRCA1	41226488	rs1800744	c.4535G>T	p.Ser1512Ile	0.004	0.002151	0.002366	0.0006
BRCA1	41226387	rs28897691	c.4636G>A	p.Asp1546Asn	0.004	0.0001318	0.0001344	NA
BRCA1	41223094	rs1799966	c.4837A>G	p.Ser1613Gly	0.396	0.3496	0.3500	NA
BRCA1	41223048	rs4986854	c.4883T>C	p.Met1628Thr	0.016	0.001524	0.001425	NA
BRCA1	41222975	rs1799967	c.4956G>A	p.Met1652Ile	0.024	0.01762	0.01818	0.0112
BRCA1	41219804	rs8176233	c.4987-92A>G		0.392	NA	0.3128	NA
BRCA1	41219780	rs8176234	c.4987-68A>G		0.388	NA	0.3148	NA
BRCA1	41216021	rs8176258	c.5075-53C>T		0.012	NA	0.01825	NA
BRCA1	41215940	rs80357608	c.5102_5103delTG	p.Leu1701GlnfsTer14	0.004	0.000008	0.000003979	NA
BRCA1	41215825	rs3092994	c.5152+66G>A		0.396	NA	0.3139	NA

Çizelge 4.1. Tespit edilen varyantların çalışma örneklerinde (n=125) ve diğer popülasyon veri tabanlarında görülme sıklıkları (devam)

BRCA1	41209010	rs572766355	c.5277+48_5277+59dupGTATTCCACTCC		0.004	NA	0.001974	NA
BRCA2	32890572	rs1799943	c.-26G>A		0.272	0.2465	0.2427	0.2093
BRCA2	32890665	rs81002796	c.67+1G>A		0.008	NA	NA	NA
BRCA2	32893271	rs4987046	c.125A>G	p.Tyr42Cys	0.004	0.001696	0.001627	0.0008
BRCA2	32893590	Novel	c.316+127dupT		0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32899388	rs11571610	c.425+67A>C		0.08	NA	0.03064	0.0743
BRCA2	32900149	rs3783265	c.426-89T>C		0.084	NA	0.03061	0.0743
BRCA2	32900933	rs3752451	c.631+183T>A		0.404	NA	0.3374	0.3482
BRCA2	32903685	rs2126042	c.681+56C>T		0.132	NA	0.2163	0.1859
BRCA2	32906480	rs766173	c.865A>C	p.Asn289His	0.084	0.05178	0.04959	0.0737
BRCA2	32906558	rs79483201	c.943T>A	p.Cys315Ser	0.004	0.000374	0.0003936	0.0016
BRCA2	32906729	rs144848	c.1114A>C	p.Asn372His	0.244	0.2779	0.2733	0.2494
BRCA2	32906766	rs41293475	c.1151C>T	p.Ser384Phe	0.004	0.0006789	0.0007280	NA
BRCA2	32906980	rs1801439	c.1365A>G	p.Ser455Ser	0.084	0.05178	0.04986	0.0737
BRCA2	32910721	rs1801499	c.2229T>C	p.His743His	0.08	0.05158	0.05026	0.0735
BRCA2	32911254	rs397507639	c.2765dupT	p.Lys923Glnfs*13	0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32911411	rs45525041	c.2919G>A	p.Ser973Ser	0.004	0.0004481	0.0003211	0.0004
BRCA2	32911463	rs1799944	c.2971A>G	p.Asn991Asp	0.08	0.05341	0.05221	0.0801
BRCA2	32911565	rs80358550	c.3073A>G	p.Lys1025Glu	0.004	0.04156	0.00004799	0.0002
BRCA2	32911810	rs1298550035	c.3318C>G	p.Ser1106Arg	0.004	NA	0.000004195	NA
BRCA2	32911888	rs1801406	c.3396A>G	p.Lys1132Lys	0.324	0.2945	0.2950	0.2668
BRCA2	32911889	Novel	c.3396dupA	p.Pro1133Thrfs*11	0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32912036	rs80359388	c.3545_3546delTT	p.Phe1182*fs*1	0.004	0.03299	NA	NA
BRCA2	32912299	rs543304	c.3807T>C	p.Val1269Val	0.22	0.1898	0.1754	0.1681
BRCA2	32913055	rs206075	c.4563A>G	p.Leu1521Leu	0.004	0.9931	0.9927	0.999
BRCA2	32913691	rs28897734	c.5199C>T	p.Ser1733Ser	0.004	0.004504	0.004865	0.0016
BRCA2	32914126	rs80358784	c.5634C>T	p.Asn1878Asn	0.004	0.00008295	0.00007239	NA
BRCA2	32914236	rs4987117	c.5744C>T	p.Thr1915Met	0.016	0.0179	0.01790	0.0086
BRCA2	32914502	Novel	c.6010G>T	p.Glu2004Ter	0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32914779	rs587781396	c.6287C>G	p.Pro2096Arg	0.004	NA	0.00003185	NA
BRCA2	32914815	rs35029074	c.6323G>T	p.Arg2108Leu	0.004	0.001277	0.000	NA
BRCA2	32914954	rs80359596	c.6468_6469delTC	p.Gln2157Ilefs*18	0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32915005	rs206076	c.6513G>C	p.Val2171Val	0.024	0.9930	0.9925	0.999
BRCA2	32915411	rs276174881	c.6841+80_6841+83delTTAA		0.108	NA	NA	0.2658
BRCA2	32929232	rs1799955	c.7242A>G	p.Ser2414Ser	0.268	0.2244	0.2257	0.2326
BRCA2	32929387	rs169547	c.7397T>C	p.Val2466Ala	0.008	0.9937	0.9934	0.9758

Çizelge 4.1. Tespit edilen varyantların çalışma örneklerinde (n=125) ve diğer popülasyon veri tabanlarında görülme sıklıkları (devam)

BRCA2	32929478	rs11147489	c.7435+53C>T		0.084	NA	0.03010	0.0725
BRCA2	32930564	rs886040939	c.7436-1G>C		0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32930673	rs28897744	c.7544C>T	p.Thr2515Ile	0.012	0.0007531	0.0005978	NA
BRCA2	32930725	rs748631472	c.7596C>T	p.Pro2532Pro	0.004	NA	0.00003189	NA
BRCA2	32931826	rs1227981644	c.7618-53T>C		0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32931961	Novel	c.7700A>G	p.Tyr2567Cys	0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32936646	rs9534262	c.7806-14T>C		0.496	0.5208	0.5255	0.5316
BRCA2	32936865	rs181176701	c.7976+35C>A		0.004	0.0002236	0.0001846	0.0002
BRCA2	32953388	rs4942486	c.8755-66T>C		0.5	NA	0.5257	0.5116
BRCA2	32953604	rs59004709	c.8905G>A	p.Val2969Met	0.004	0.0004069	0.0002955	0.0006
BRCA2	32953971	rs28897755	c.9038C>T	p.Thr3013Ile	0.004	0.0002326	0.0002448	NA
BRCA2	32954023	rs397507419	c.9097dupA	p.Thr3033AsnfsTer11	0.004	0.01711	0.00003185	NA
BRCA2	32968743	rs9595456	c.9257-83G>A		0.004	NA	0.04116	0.0505
BRCA2	32968810	rs11571818	c.9257-16T>C		0.016	0.007647	0.006459	0.0044
BRCA2	32969074	rs81002848	c.9501+4A>G		0.004	0.008256	0.00001195	NA
BRCA2	32971042	rs80359224	c.9509A>G	p.Asp3170Gly	0.004	0.008243	0.000003979	NA
BRCA2	32971265	rs81002832	c.9648+84G>A		0.008	NA	0.0007962	0.0004
BRCA2	32972217	Novel	c.9649-82A>G		0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32972280	rs11571830	c.9649-19G>A		0.008	0.001354	0.001254	0.0038
BRCA2	32972626	rs11571833	c.9976A>T	p.Lys3326Ter	0.016	0.007017	0.006468	0.0044
BRCA2	32972728	NA	c.10078A>G	p.Lys3360Glu	0.004	NA	NA	NA
BRCA2	32972872	rs80358402	c.10222A>T	p.Lys3408Ter	0.004	0.008328	0.000007082	NA
BRCA2	32972884	rs1801426	c.10234A>G	p.Ile3412Val	0.004	0.02266	0.02482	0.0449
BRCA2	32973012	rs15869	c.*105A>C		0.228	NA	0.1563	0.1607

(MAF, Minör Allele Frequency; 1000G, 1000 Genome Project; ExAC, The Exome Aggregation Consortium; gnomAD, Genome Aggregation Database; NA, Not Available)

4.2. Varyantların Veri Tabanları Kullanılarak Kategorize Edilmesi

Bulunan varyantlar ve onların çeşitli veri tabanları (Enigma, ClinVar, HGMD, ACMG/AMP) ile çeşitli *in silico* tahminleme proramlarının (VEP, SIFT, PP2, Provean, MT, RegulomeDB) verdiği sonuçlar Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3’de verilmiştir. Bu sonuçlara ek olarak varyantların bulduğumuz minör alel frekansı da çizelgelerde bulunmaktadır.

4.2.1 *BRCA1* ve *BRCA2* varyantlarının protein fonksiyonuna ve post-translasyonel modifikasyonlara etkileri

BRCA1 ve *BRCA2* genleri için tespit etmiş olduğumuz kodlama yapan varyantlar, çeşitli *in silico* araçların (SIFT, MT, PP2, AWESOME) sonuçları ve varyantların görülmüş olduğu kişilerin profilleri Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. BRCA1 geninde bulunmuş olan varyantlar ve çeşitli veri bankaları ile *in silico* programlarına göre sonuçları

Lokasyon	RefSNP ID	c.DNA	Ekzon/Intron	Amino Asit Değişimi	MAF	ACMG	ENIGMA	VEP	ClinVar	HGMD	Provean	SIFT	PP2	MT	RDB
41276318	Novel	c.-63delCinsGATATATATATGT	Ekzon 1-5'utr		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
41276247	rs3765640	c.-134T>C	Ekzon 1-5'utr		0.392	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	lf
41251973	Novel	c.442-76T>C	Intron 6		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
41251931	rs799923	c.442-34C>T	Intron 6		0.204	B	BLCS	Mo	B	R	NA	NA	NA	NA	lf
41251803	rs56187033	c.536A>G	Ekzon 7	p.Tyr179Cys	0.004	LB	BLCS	M	B	DM	D	D	PD	DC	6
41249364	rs8176144	c.548-58delT	Intron 7		0.176	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
41248009	Novel	c.594-70C>T	Intron 8		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
41247973	rs147314539	c.594-34T>C	Intron 8		0.004	LB	GG	Mo	LB	DM?	NA	NA	NA	NA	NA
41246483	rs41286292	c.1065G>A	Ekzon 10	p.Lys355Lys	0.004	LB	LB	L	LB	NA	N	T	NA	NA	4
41246481	rs1799950	c.1067A>G	Ekzon 10	p.Gln356Arg	0.064	B	BLCS	M	B	DP	D	D	PD	PL	4
41246092	rs55906931	c.1456T>C	Ekzon 10	p.Phe486Leu	0.004	LB	BLCS	M	B	DM	N	T	B	PL	NA
41245900	rs56012641	c.1648A>C	Ekzon 10	p.Asn550His	0.004	LB	BLCS	M	B	DM?	D	D	PD	PL	6
41245601	rs397508920	c.1938_1947delCATGAAGAG	Ekzon 10	p.Ser646Argfs*2	0.004	P	P	H	P	NA	NA	NA	NA	NA	6
41245471	rs4986850	c.2077G>A	Ekzon 10	p.Asp693Asn	0.08	B	BLCS	M	B	DP	N	D	B	PLA	2b
41245466	rs1799949	c.2082C>T	Ekzon 10	p.Ser694Ser	0.38	B	BLCS	L	B	R	N	T	NA	NA	lf
41245237	rs16940	c.2311T>C	Ekzon 10	p.Leu771Leu	0.392	B	BLCS	L	B	R	N	T	NA	NA	lf
41244936	rs799917	c.2612C>T	Ekzon 10	p.Pro871Leu	0.38	B	BLCS	M	B	DFP	N	T	B	PLA	4
41244664	rs80356955	c.2884G>A	Ekzon 10	p.Glu962Lys	0.004	LB	GG	M	B/VUS	NA	N	T	PSD	PL	5
41244435	rs16941	c.3113A>G	Ekzon 10	p.Glu1038Gly	0.396	B	BLCS	M	B	DP	D	D	PSD	PLA	6
41244000	rs16942	c.3548A>G	Ekzon 10	p.Lys1183Arg	0.388	B	BLCS	M	B	DP	N	T	B	PLA	6
41243509	rs28897689	c.4039A>G	Ekzon 10	p.Arg1347Gly	0.004	LB	BLCS	M	B	DM?	N	T	B	PL	5
41243190	rs799916	c.4097-141A>C	Intron 10		0.388	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
41234470	rs1060915	c.4308T>C	Ekzon 12	p.Ser1436Ser	0.392	B	BLCS	L	B	R	N	T	NA	NA	lf
41234399	rs1407411387	c.4357+22C>T	Intron 12		0.004	VUS	GG	Mo	NA	DM?	NA	NA	NA	NA	5
41228634	rs1567779966	c.4358-3A>G	Intron 12		0.004	VUS	GG	L	VUS	NA	NA	NA	NA	NA	NA
41226601	rs273900734	c.4485-63C>G	Intron 13		0.388	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	5
41226488	rs1800744	c.4535G>T	Ekzon 14	p.Ser1512Ile	0.004	LB	BLCS	M	B	DM?	N	D	B	NA	NA
41226387	rs28897691	c.4636G>A	Ekzon 14	p.Asp1546Asn	0.004	LB	BLCS	M	B	DM?	N	T	PSD	PL	NA
41223094	rs1799966	c.4837A>G	Ekzon 15	p.Ser1613Gly	0.396	B	BLCS	M	B	R	N	D	B	PLA	6
41223048	rs4986854	c.4883T>C	Ekzon 15	p.Met1628Thr	0.016	LB	BLCS	M	B	DM?	N	T	B	PL	5
41222975	rs1799967	c.4956G>A	Ekzon 15	p.Met1652Ile	0.024	LB	BLCS	M	B	DM?	N	T	B	PL	5
41219804	rs8176233	c.4987-92A>G	Intron 15		0.392	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
41219780	rs8176234	c.4987-68A>G	Intron 15		0.388	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	NA
41216021	rs8176258	c.5075-53C>T	Intron 16		0.012	VUS	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	5
41215940	rs80357608	c.5102_5103delTG	Ekzon 17	p.Leu1701GlnfsTer14	0.004	P	P	H	P	DM	NA	NA	NA	NA	NA

Çizelge 4.2. BRCA1 geninde bulunmuş olan varyantlar ve çeşitli veri bankaları ile *in silico* programlarına göre sonuçları (devam)

41215825	rs3092994	c.5152+66G>A	Intron 17		0.396	B	BLCS	Mo	B	DM?	NA	NA	NA	NA	6
41209010	rs572766355	c.5277+48_5277+59dupGTATTCCA CTCC	Intron 19		0.004	VUS	GG	Mo	LB	DM?	NA	NA	NA	NA	NA

(P, Pathogenic; B, Benign; LB, Likely Benign; VUS, Verdict of Uncertain Significance; GG, Not Yet Reviewed; BLCS, Benign/Little Clinical Significance; H, High; L, Low; M, Moderate; Mo, Modifier; T, Tolerated; D, Damaging; N, Neutral; PP2, Polyphen2; PD, Probably Damaging; PSD, Possibly Damaging; PL, Polymorphism; PLA, Polymorphism automatic; DC, Disease causing; DCA, Disease causing automatic; RDB, RegulomeDB; MAF, Minor Allele Frequency; NA, Not Available)

Çizelge 4.3. BRCA2 geninde bulunmuş olan varyantlar ve çeşitli veri bankaları ile *in silico* programlarına göre sonuçları

Lokasyon	RefSNP ID	c.DNA	Ekzon/Intron	Amino Asit Değişimi	MAF	ACMG	Enigma	VEP	ClinVar	HGMD	Provean	SIFT	PP2	MT	RDB
32890572	rs1799943	c.-26G>A	Ekzon 2,5'utr		0.272	B	BLCS	Mo	B	DFP	NA	NA	NA	NA	5
32890665	rs81002796	c.67+1G>A	Intron2		0.008	P	GG	H	P	DM	NA	NA	NA	DC	5
32893271	rs4987046	c.125A>G	Ekzon 3	p.Tyr42Cys	0.004	LB	BLCS	M	B	DM?	N	T	B	DC	NA
32893590	Novel	c.316+127dupT	Intron3		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32899388	rs11571610	c.425+67A>C	Intron4		0.08	VUS	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32900149	rs3783265	c.426-89T>C	Intron4		0.084	VUS	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
32900933	rs3752451	c.631+183T>A	Intron7		0.404	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
32903685	rs2126042	c.681+56C>T	Intron8		0.132	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32906480	rs766173	c.865A>C	Ekzon 10	p.Asn289His	0.084	B	BLCS	M	B	DP	N	D	B	PLA	NA
32906558	rs79483201	c.943T>A	Ekzon 10	p.Cys315Ser	0.004	LB	GG	M	B/LB	DM?	N	T	B	PL	5
32906729	rs144848	c.1114A>C	Ekzon 10	p.Asn372His	0.244	B	BLCS	M	B	DFP	N	T	B	PLA	5
32906766	rs41293475	c.1151C>T	Ekzon 10	p.Ser384Phe	0.004	LB	BLCS	M	B	DM?	N	D	PD	PL	5
32906980	rs1801439	c.1365A>G	Ekzon 10	p.Ser455Ser	0.084	B	BLCS	L	B	NA	N	T	NA	NA	5
32910721	rs1801499	c.2229T>C	Ekzon 11	p.His743His	0.08	B	BLCS	L	B	NA	N	T	NA	NA	NA
32911254	rs397507639	c.2765dupT	Ekzon 11	p.Lys923Glnfs*13	0.004	P	P	H	P	DM	NA	NA	NA	NA	NA
32911411	rs45525041	c.2919G>A	Ekzon 11	p.Ser973Ser	0.004	LB	BLCS	L	B	NA	N	T	NA	NA	NA
32911463	rs1799944	c.2971A>G	Ekzon 11	p.Asn991Asp	0.08	B	BLCS	M	B	R	N	T	B	PLA	6
32911565	rs80358550	c.3073A>G	Ekzon 11	p.Lys1025Glu	0.004	LB	GG	M	B/LB/VUS	NA	D	D	PSD	PL	6
32911810	rs1298550035	c.3318C>G	Ekzon 11	p.Ser1106Arg	0.004	VUS	GG	M	VUS	DM	D	D	PD	DC	NA
32911888	rs1801406	c.3396A>G	Ekzon 11	p.Lys1132Lys	0.324	LB	BLCS	L	B	NA	N	T	PSD	NA	5
32911889	Novel	c.3396dupA	Ekzon 11	p.Pro1133Thrfs*11	0.004	P	NA	H	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5
32912036	rs80359388	c.3545_3546delTT	Ekzon 11	p.Phe1182*fs*1	0.004	P	P	H	P	DM	NA	NA	NA	NA	NA
32912299	rs543304	c.3807T>C	Ekzon 11	p.Val1269Val	0.22	B	BLCS	L	B	NA	N	T	NA	NA	6
32913055	rs206075	c.4563A>G	Ekzon 11	p.Leu1521Leu	0.004	B	BLCS	L	B	NA	N	T	NA	NA	NA
32913691	rs28897734	c.5199C>T	Ekzon 11	p.Ser1733Ser	0.004	LB	BLCS	L	B	DM?	N	T	NA	NA	NA
32914126	rs80358784	c.5634C>T	Ekzon 11	p.Asn1878Asn	0.004	LB	LB	L	LB	NA	N	T	NA	NA	6
32914236	rs4987117	c.5744C>T	Ekzon 11	p.Thr1915Met	0.016	LB	BLCS	M	B	DP	N	T	B	PL	6
32914502	Novel	c.6010G>T	Ekzon 11	p.Glu2004Ter	0.004	P	NA	H	NA	NA	NA	NA	NA	DCA	NA
32914779	rs587781396	c.6287C>G	Ekzon 11	p.Pro2096Arg	0.004	VUS	GG	M	VUS	DM?	N	D	PSD	PL	NA
32914815	rs35029074	c.6323G>T	Ekzon 11	p.Arg2108Leu	0.004	LB	GG	M	LB/VUS	NA	N	T	B	PL	6

Çizelge 4.3. *BRCA2* geninde bulunmuş olan varyantlar ve çeşitli veri bankaları ile *in silico* programlarına göre sonuçları (devam)

32914954	rs80359596	c.6468_6469delTC	Ekzon 11	p.Gln2157Ilefs*18	0.004	P	P	H	P	DM	NA	NA	NA	NA	6
32915005	rs206076	c.6513G>C	Ekzon 11	p.Val2171Val	0.024	B	BLCS	L	B	DM?	N	T	NA	NA	6
32915411	rs276174881	c.6841+80_6841+83delTTAA	Intron11		0.108	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
32929232	rs1799955	c.7242A>G	Ekzon 14	p.Ser2414Ser	0.268	B	BLCS	L	B	NA	N	T	NA	NA	6
32929387	rs169547	c.7397T>C	Ekzon 14	p.Val2466Ala	0.008	B	GG	M	B	DM?	N	T	PSD	PLA	NA
32929478	rs11147489	c.7435+53C>T	Intron14		0.084	LB	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
32930564	rs886040939	c.7436-1G>C	Intron14		0.004	P	GG	H	P	NA	NA	NA	NA	DC	NA
32930673	rs28897744	c.7544C>T	Ekzon 15	p.Thr2515Ile	0.012	LB	BLCS	M	B	DM?	N	T	PSD	PL	5
32930725	rs748631472	c.7596C>T	Ekzon 15	p.Pro2532Pro	0.004	LB	LB	L	LB	NA	N	T	NA	NA	NA
32931826	rs1227981644	c.7618-53T>C	Intron15		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32931961	Novel	c.7700A>G	Ekzon 16	p.Tyr2567Cys	0.004	VUS	NA	M	NA	NA	N	T	PSD	DC	NA
32936646	rs9534262	c.7806-14T>C	Intron16		0.496	B	BLCS	Mo	B	FP	NA	NA	NA	NA	NA
32936865	rs181176701	c.7976+35C>A	Intron17		0.004	LB	GG	Mo	LB	NA	NA	NA	NA	NA	4
32953388	rs4942486	c.8755-66T>C	Intron21		0.5	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	5
32953604	rs59004709	c.8905G>A	Ekzon 22	p.Val2969Met	0.004	LB	BLCS	M	B	DM?	N	D	PSD	DC	5
32953971	rs28897755	c.9038C>T	Ekzon 23	p.Thr3013Ile	0.004	LB	GG	M	B/LB/VUS	DM?	N	D	PSD	PL	5
32954023	rs397507419	c.9097dupA	Ekzon 23	p.Thr3033AsnfsTer11	0.004	P	P	H	P	DM	NA	NA	NA	NA	5
32968743	rs9595456	c.9257-83G>A	Intron24		0.004	VUS	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
32968810	rs11571818	c.9257-16T>C	Intron24		0.016	LB	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
32969074	rs81002848	c.9501+4A>G	Intron25		0.004	VUS	GG	L	LB/VUS	NA	NA	NA	NA	NA	5
32971042	rs80359224	c.9509A>G	Ekzon 26	p.Asp3170Gly	0.004	LB	BLCS	M	B	NA	N	T	B	PL	6
32971265	rs81002832	c.9648+84G>A	Intron26		0.008	VUS	GG	Mo	B/LB	NA	NA	NA	NA	NA	6
32972217	Novel	c.9649-82A>G	Intron26		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32972280	rs11571830	c.9649-19G>A	Intron26		0.008	LB	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6
32972626	rs11571833	c.9976A>T	Ekzon 27	p.Lys3326Ter	0.016	VUS	BLCS	H	B	DFP	NA	NA	NA	DC	6
32972728	NA	c.10078A>G	Ekzon 27	p.Lys3360Glu	0.004	LB	GG	M	NA	NA	N	D	B	PL	NA
32972872	rs80358402	c.10222A>T	Ekzon 27	p.Lys3408Ter	0.004	LP	GG	H	LB/VUS	NA	NA	NA	NA	DC	6
32972884	rs1801426	c.10234A>G	Ekzon 27	p.Ile3412Val	0.004	LB	BLCS	M	B	DM?	N	T	B	PL	6
32973012	rs15869	c.*105A>C	Ekzon 27,3'utr		0.228	B	BLCS	Mo	B	NA	NA	NA	NA	NA	6

(P, Pathogenic; B, Benign; LB, Likely Benign; VUS, Verdict of Uncertain Significance; GG, Not Yet Reviewed; BLCS, Benign/Little Clinical Significance; H, High; L, Low; M, Moderate; Mo, Modifier; T, Tolerated; D, Damaging; N, Neutral; PP2, Polyphen2; PD, Probably Damaging; PSD, Possibly Damaging; PL, Polymorphism; PLA, Polymorphism automatic; DC, Disease causing; DCA, Disease causing automatic; RDB, RegulomeDB; MAF, Minor Allele Frequency; NA, Not Available)

Çizelge 4.4. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilen kodlama yapan varyantlar, çeşitli *in silico* algoritmalar sonuçları ve kişilerin profilleri

Gen	Lokasyon	Ref SNP ID	Lokasyon	Amino Asit Değişimi	MAF	SIFT	MT	PP2	Awesome	#Meme Kanserli Kişiler	#Aile Öykülü Meme Kanserli Kişiler	#Yumurtalık Kanserli Kişiler	#Aile Öykülü Yumurtalık Kanserli Kişiler	#Diğer Kanserli Kişiler	#Aile Öykülü Diğer Kanserli Kişiler	#Sadece Aile Öykülü Kişiler
<i>BRCA1</i>	41251803	rs56187033	Ekzon 7	p.Tyr179Cys	0.004	D	DC	PD	PTM	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	41246483	rs41286292	Ekzon 10	p.Lys355Lys	0.004	T	NA	NA	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	41246481	rs1799950	Ekzon 10	p.Gln356Arg	0.064	D	PL	PD	NA	9	1	1	0	0	0	2
<i>BRCA1</i>	41246092	rs55906931	Ekzon 10	p.Phe486Leu	0.004	T	PL	B	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	41245900	rs56012641	Ekzon 10	p.Asn550His	0.004	D	PL	PD	PTM	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	41245601	rs397508920	Ekzon 10	p.Ser646Argfs*2	0.004	NA	NA	NA	NA	0	0	1	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	41245471	rs4986850	Ekzon 10	p.Asp693Asn	0.08	D	PLA	B	PTM	12	1	3	1	0	0	1
<i>BRCA1</i>	41245466	rs1799949	Ekzon 10	p.Ser694Ser	0.38	T	NA	NA	NA	50	6	10	1	2	0	5
<i>BRCA1</i>	41245237	rs16940	Ekzon 10	p.Leu771Leu	0.392	T	NA	NA	NA	52	6	10	1	2	0	5
<i>BRCA1</i>	41244936	rs799917	Ekzon 10	p.Pro871Leu	0.38	T	PLA	B	NA	52	6	10	1	2	0	5
<i>BRCA1</i>	41244664	rs80356955	Ekzon 10	p.Glu962Lys	0.004	T	PL	PSD	PTM	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	41244435	rs16941	Ekzon 10	p.Glu1038Gly	0.396	D	PLA	PSD	NA	52	6	10	1	2	0	5
<i>BRCA1</i>	41244000	rs16942	Ekzon 10	p.Lys1183Arg	0.388	T	PLA	B	PTM	51	6	10	1	2	0	5
<i>BRCA1</i>	41243509	rs28897689	Ekzon 10	p.Arg1347Gly	0.004	T	PL	B	NA	0	0	0	0	0	0	1
<i>BRCA1</i>	41234470	rs1060915	Ekzon 12	p.Ser1436Ser	0.392	T	NA	NA	NA	51	6	10	1	2	0	5
<i>BRCA1</i>	41226488	rs1800744	Ekzon 14	p.Ser1512Ile	0.004	D	Na	B	PTM	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	41226387	rs28897691	Ekzon 14	p.Asp1546Asn	0.004	T	PL	PSD	PTM	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	41223094	rs1799966	Ekzon 15	p.Ser1613Gly	0.396	D	PLA	B	PTM	52	6	10	1	2	0	5

Çizelge 4.4. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilen kodlama yapan varyantlar, çeşitli *in silico* algoritmalar sonuçları ve kişilerin profilleri (devam)

<i>BRCA1</i>	41223048	rs4986854	Ekzon 15	p.Met1628Thr	0.016	T	PL	B	PTM	4	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	41222975	rs1799967	Ekzon 15	p.Met1652Ile	0.024	T	PL	B	NA	5	0	0	0	0	0	1
<i>BRCA1</i>	41215940	rs80357608	Ekzon 17	p.Leu1701GlnfsTer14	0.004	NA	NA	NA	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32893271	rs4987046	Ekzon 3	p.Tyr42Cys	0.004	T	DC	B	PTM	0	1	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32906480	rs766173	Ekzon 10	p.Asn289His	0.084	D	PLA	B	PTM	18	0	3	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32906558	rs79483201	Ekzon 10	p.Cys315Ser	0.004	T	PL	B	PTM	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32906729	rs144848	Ekzon 10	p.Asn372His	0.244	T	PLA	B	PTM	36	4	7	0	1	1	4
<i>BRCA2</i>	32906766	rs41293475	Ekzon 10	p.Ser384Phe	0.004	D	PL	PD	PTM	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32906980	rs1801439	Ekzon 10	p.Ser455Ser	0.084	T	NA	NA	NA	18	0	3	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32910721	rs1801499	Ekzon 11	p.His743His	0.08	T	NA	NA	NA	17	0	3	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32911254	rs397507639	Ekzon 11	p.Lys923Glnfs*13	0.004	NA	NA	NA	NA	0	0	0	1	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32911411	rs45525041	Ekzon 11	p.Ser973Ser	0.004	T	NA	NA	NA	0	1	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32911463	rs1799944	Ekzon 11	p.Asn991Asp	0.08	T	PLA	B	PTM	18	0	3	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32911565	rs80358550	Ekzon 11	p.Lys1025Glu	0.004	D	PL	PSD	PTM	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32911810	rs1298550035	Ekzon 11	p.Ser1106Arg	0.004	D	DC	PD	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32911888	rs1801406	Ekzon 11	p.Lys1132Lys	0.324	T	NA	PSD	PTM	46	9	6	1	2	0	4
<i>BRCA2</i>	32911889	Novel	Ekzon 11	p.Pro1133Thrfs*11	0.004	NA	NA	NA	NA	0	0	1	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32912036	rs80359388	Ekzon 11	p.Phe1182*fs*1	0.004	NA	NA	NA	NA	0	1	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32912299	rs543304	Ekzon 11	p.Val1269Val	0.22	T	NA	NA	NA	35	6	4	0	1	1	2
<i>BRCA2</i>	32913055	rs206075	Ekzon 11	p.Leu1521Leu	0.004	T	NA	NA	NA	89	12	13	1	2	1	7

Çizelge 4.4. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilen kodlama yapan varyantlar, çeşitli *in silico* algoritmalar sonuçları ve kişilerin profilleri (devam)

<i>BRCA2</i>	32913691	rs28897734	Ekzon 11	p.Ser1733Ser	0.004	T	NA	NA	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32914126	rs80358784	Ekzon 11	p.Asn1878Asn	0.004	T	NA	NA	PTM	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32914236	rs4987117	Ekzon 11	p.Thr1915Met	0.016	T	PL	B	PTM	3	0	1	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32914502	Novel	Ekzon 11	p.Glu2004Ter	0.004	NA	DCA	NA	NA	0	0	1	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32914779	rs587781396	Ekzon 11	p.Pro2096Arg	0.004	D	PL	PSD	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32914815	rs35029074	Ekzon 11	p.Arg2108Leu	0.004	T	PL	B	PTM	0	0	0	0	0	0	1
<i>BRCA2</i>	32914954	rs80359596	Ekzon 11	p.Gln2157Ilefs*18	0.004	NA	NA	NA	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32915005	rs206076	Ekzon 11	p.Val2171Val	0.024	T	NA	NA	NA	86	12	13	1	2	1	7
<i>BRCA2</i>	32929232	rs1799955	Ekzon 14	p.Ser2414Ser	0.268	T	NA	NA	NA	38	9	5	1	2	0	4
<i>BRCA2</i>	32929387	rs169547	Ekzon 14	p.Val2466Ala	0.008	T	PLA	PSD	NA	88	12	13	1	2	1	7
<i>BRCA2</i>	32930673	rs28897744	Ekzon 15	p.Thr2515Ile	0.012	T	PL	PSD	PTM	2	0	1	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32930725	rs748631472	Ekzon 15	p.Pro2532Pro	0.004	T	NA	NA	NA	0	0	0	1	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32931961	Novel	Ekzon 16	p.Tyr2567Cys	0.004	T	DC	PSD	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32953604	rs59004709	Ekzon 22	p.Val2969Met	0.004	D	DC	PSD	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32953971	rs28897755	Ekzon 23	p.Thr3013Ile	0.004	D	PL	PSD	PTM	0	0	0	0	0	1	0
<i>BRCA2</i>	32954023	rs397507419	Ekzon 23	p.Thr3033AsnfsTer11	0.004	NA	NA	NA	NA	1	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32971042	rs80359224	Ekzon 26	p.Asp3170Gly	0.004	T	PL	B	NA	0	0	1	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32972626	rs11571833	Ekzon 27	p.Lys3326Ter	0.016	NA	DC	NA	NA	4	0	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32972728	NA	Ekzon 27	p.Lys3360Glu	0.004	D	PL	B	NA	0	1	0	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	32972872	rs80358402	Ekzon 27	p.Lys3408Ter	0.004	NA	DC	NA	NA	0	1	0	0	0	0	0

Çizelge 4.4. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilen kodlama yapan varyantlar, çeşitli *in silico* algoritmalar sonuçları ve kişilerin profilleri (devam)

<i>BRCA2</i>	32972884	rs1801426	Ekzon 27	p.Ile3412Val	0.004	T	PL	B	NA	0	0	1	0	0	0	0
--------------	----------	-----------	----------	--------------	-------	---	----	---	----	---	---	---	---	---	---	---

(T, Tolerated; D, Damaging; S, SIFT; PP2, Polyphen2; PD, Probably Damaging; PSD, Possibly Damaging; PL, Polymorphism; PLA, Polymorphism automatic; DC, Disease causing; DCA, Disease causing automatic; Minör Allele Frequency; NA, Not Available; PTM, Post-translational modification)

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinde eş anlamlı olmayan (yanlış anlamlı, anlamsız ve çerçeve kayması) 44 varyant tanımlanmıştır. Bunlardan 7 tanesi SIFT, PP2 ve MT tahmin araçlarıyla puanlanmayan çerçeve kayması varyantlarıydı. Bunlardan rs56187033 ve rs56012641'in PTM bölgelerinde bulunduğu tespit edilmiştir. AWESOME veri tabanının verdiği sonuç varyantın sadece post-translasyonel etkilerin yanında o varyantla ilgili birçok bilgiyi içermekteydi. Fakat bize sadece post-translasyonel etkileri gerektiği için PTM verileri kullanılmıştır.

Bu varyantlardan 3 tanesinin (rs41293475, rs28897755 ve rs80358550) AWESOME veri tabanına göre birden fazla post-translasyonel bölgeyi etkilediği belirlenmiştir. rs41293475 ve rs28897755; Fosforilasyon, O-N-Asetilgalaktozamin, O-N-Asetilglukozamin bölgelerinde değişikliğe sebep olabilecek iken rs80358550 Ubikitinasyon, Metilasyon, bölgelerini değiştirebileceğini göstermiştir. SIFT ve PP2 tahmin araçlarında çerçeve kayması ve anlamsız varyantlar için bir sonuç bulunmamasına rağmen *BRCA2* varyantlarından c.3396dupA ve c.6010G>T için MT tahmin aracına ve ACMG kriterlerine göre patojenik oldukları görülmüştür. Bununla birlikte *BRCA2* c.7700A>G'in, protein işlevi üzerinde PP2 ve MT tarafından zararlı etkisinin olduğu ve ACMG kriterlerine göre VUS olarak sınıflandırıldığı görülmüştür.

AWESOME veri tabanından aldığımız sonuçlar Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6'da gösterilmiştir (Modifikasyon bölgesi kaybı veya kazancı olmayan varyantlar çizelgeye dahil edilmemiştir). Sonuç pozitif ise o bölgede varyantımız modifikasyon bölgesini kaybetmiştir, sonuç negatif ise o bölgede varyantımız modifikasyon bölgesi kazanmıştır.

Çizelge 4.5. BRCA1 geninde bulduğumuz varyantlar için AWESOME veri tabanı sonucu

Lokasyon	RefSNP ID	Amino Asit. Değişimi	Phos.	Ubi.	Meth.	SUMO.	O-GalNAc.	O-GlcNAc.	N-Gly.	K-Ace.	N-t-Ace.	Exp Skor
17:41226387-41226387	rs28897691	D/N	0	0	0	0	0	0	-0.7931	0	0	0
17:41226488-41226488	rs1800744	S/I	0.796	0	0	0	0.845	0.4894	0	0	0	0
17:41244664-41244664	rs80356955	E/K	0	-0.513	0	0	0	0	0	0	0	0
17:41245900-41245900	rs56012641	N/H	0	0	0	0	0	0	0.5336	0	0	0
17:41251803-41251803	rs56187033	Y/C	2.145	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17:41223048-41223048	rs4986854	M/T	-1.399	0	0	0	0	-0.3131	0	0	0	0
17:41245471-41245471	rs4986850	D/N	0	0	0	0	0	0	-0.6968	0	0	0
17:41244000-41244000	rs16942	K/R	0	1.79	0.834	0	0	0	0	0.43	0	0
17:41223094-41223094	rs1799966	S/G	2.753	0	0	0	0.9902	0.4484	0	0	0	0

(Phos, Fosforilizasyon; Ubi, Ubikitinasyon; Meth, Metilasyon; SUMO, Küçük Ubikitin Benzeri Değiştiriciler; O-GalNAc, O-N-Asetilgalaktozamin; O-GlcNAc, O-N-Asetilglukozamin; N-Gly, N-Glikozilasyon; K-Ace, Lizin Asetilasyon; N-t-Ace, N-Terminal Asetilasyon; Exp Skor, Deneysel Veri Tabanlarından Gelen Sonuç; A, Alanin; R, Arjinin; N, Asparjin; D, Aspartik Asit; C, Sistein; E, Glutamik Asit; Q, Glutamin; G, Glisin; H, Histidin; I, İzölösin; L, Lösin; K, Lizin; M, Metiyonin; F, Fenilalanin; P, Prolin; S, Serin; T, Treonin; Y, Tirozin; V, Valin; Pozitif skor SNP'in modifikasyon bölgesi kaybettiği, negatif skor ise SNP'in modifikasyon bölgesi kazandığını ifade etmektedir.)

Çizelge 4.6. BRCA2 geninde bulduğumuz varyantlar için AWESOME veri tabanı sonucu

Lokasyon	RefSNP ID	Amino Asit. Değişimi	Phos.	Ubi.	Meth.	SUMO.	O-GalNAc.	O-GlcNAc.	N-Gly.	K-Ace.	N-t-Ace.	Exp Skor
13:32906766-32906766	rs41293475	S/F	3.006	0	0	0	0.3896	0.2622	0	0	0	1
13:32906558-32906558	rs79483201	C/S	-0.711	0	0	0	0	-0.2167	0	0	0	0
13:32911565-32911565	rs80358550	K/E	0	0.513	0.768	0	0	0	0	0	0	0
13:32914126-32914126	rs80358784	N/K	0	0	0	0	0	0	0.5932	0	0	0
13:32914815-32914815	rs35029074	R/L	0	0	0.768	0	0	0	0	0	0	0
13:32953971-32953971	rs28897755	T/I	1.956	0	0	0	0.1336	0.3274	0	0	0	0
13:32893271-32893271	rs4987046	Y/C	2.753	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13:32930673-32930673	rs28897744	T/I	0.737	0	0	0	0.6536	0.5107	0	0	0	0
13:32914236-32914236	rs4987117	T/M	0.05	0	0	0	0.5408	0.4117	0	0	0	0
13:32911463-32911463	rs1799944	N/D	0	0	0	0	0	0	0.5369	0	0	0
13:32906480-32906480	rs766173	N/H	0	0	0	0	0	0	0.7609	0	0	0
13:32906729-32906729	rs144848	N/H	0	0	0	0	0	0	0.1011	0	0	0
13:32911888-32911888	rs1801406	K/N	0	0.513	0.834	0	0	0	-0.5614	0	0	0

(Phos, Fosforilizasyon; Ubi, Ubikitinasyon; Meth, Metilasyon; SUMO, Küçük Ubikitin Benzeri Değiştiriciler; O-GalNAc, O-N-Asetilgalaktozamin; O-GlcNAc, O-N-Asetilglukozamin; N-Gly, N-Glikozilasyon; K-Ace, Lizin Asetilasyon; N-t-Ace, N-Terminal Asetilasyon; Exp Skor, Deneysel Veri Tabanlarından Gelen Sonuç; A, Alanin; R, Arjinin; N, Asparjin; D, Aspartik Asit; C, Sistein; E, Glutamik Asit; Q, Glutamin; G, Glisin; H, Histidin; I, İzölösin; L, Lösin; K, Lizin; M, Metiyonin; F, Fenilalanin; P, Prolin; S, Serin; T, Treonin; Y, Tirozin; V, Valin; Pozitif skor SNP'in modifikasyon bölgesi kaybettiği, negatif skor ise SNP'in modifikasyon bölgesi kazandığını ifade etmektedir.)

4.2.2. *BRCA1* ve *BRCA2* gen varyantlarının potansiyel regülatör etkileri

BRCA1 geninde 14, *BRCA2* geninde 19 olmak üzere toplam 33 intronik varyant tanımlanmıştır. *BRCA1* genindeki 26 varyantımıza bir RegulomeDB skor atamıştır ve bu varyantlardan 18 tanesi kodlama yapan bölgede bulunmaktadır. *BRCA1* geni varyantları için almış olduğumuz RegulomeDB skorlarından bahsedecek olursak; 5 varyantımız transkripsiyon faktörü (TF) bağlanmasını etkileyen ve gen hedefi ekspresyonu ile ilişkili olduğunu gösteren (eQTL) 1'lik bir RegulomeDB skoruna, yanlış anlamlı rs4986850 varyantımız TF bağlanmasını etkileyen ve zayıf DNase ile ilişkilendirilen 2b'lik skora sahipti. Bunun dışında RegulomeDB skoru 4 olan 3 varyant (1 eş anlamlı), skoru 5 olan 7 varyant (4 yanlış anlamlı) ve skoru 6 olan 10 varyant (5 yanlış anlamlı, 1 çerçeve kayması) bulunmuştur.

BRCA2 geni için RegulomeDB 37 varyanta skor atamıştır ve bu varyantlardan 25 tanesi kodlama yapan bölgede bulunmaktadır. Fakat *BRCA2*'de bulunan varyantlarımız için RegulomeDB önemli bir skorunu atamamıştır. RegulomeDB skorlarına göre 1 intronik varyant 4 skorunu almış olup 14 varyant 5 skorunu ve 22 varyant 6 skorunu almıştır.

BRCA1 ve *BRCA2* geni varyantları ve aldıkları RegulomeDB skorları Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. BRCA1 ve BRCA2 gen varyantlarının RegulomeDB sonuçları

Gen	Lokasyon	RefSNP ID	Ekzon/Intron	RegulomeDB	MAF
BRCA1	41276247	rs3765640	E 1-5'UTR	1f	0.392
BRCA1	41251931	rs799923	I 6	1f	0.204
BRCA1	41251803	rs56187033	E 7	6	0.004
BRCA1	41249364	rs8176144	I 7	6	0.176
BRCA1	41246483	rs41286292	E 10	4	0.004
BRCA1	41246481	rs1799950	E 10	4	0.064
BRCA1	41245900	rs56012641	E 10	6	0.004
BRCA1	41245601	rs397508920	E 10	6	0.004
BRCA1	41245471	rs4986850	E 10	2b	0.08
BRCA1	41245466	rs1799949	E 10	1f	0.38
BRCA1	41245237	rs16940	E 10	1f	0.392
BRCA1	41244936	rs799917	E 10	4	0.38
BRCA1	41244664	rs80356955	E 10	5	0.004
BRCA1	41244435	rs16941	E 10	6	0.396
BRCA1	41244000	rs16942	E 10	6	0.388
BRCA1	41243509	rs28897689	E 10	5	0.004
BRCA1	41243190	rs799916	I 10	6	0.388
BRCA1	41234470	rs1060915	E 12	1f	0.392
BRCA1	41234399	rs1407411387	I 12	5	0.004
BRCA1	41226601	rs273900734	I 13	5	0.388
BRCA1	41223094	rs1799966	E 15	6	0.396
BRCA1	41223048	rs4986854	E 15	5	0.016
BRCA1	41222975	rs1799967	E 15	5	0.024
BRCA1	41219804	rs8176233	I 15	6	0.392
BRCA1	41216021	rs8176258	I 16	5	0.012
BRCA1	41215825	rs3092994	I 17	6	0.396
BRCA2	32890572	rs1799943	E 2,5'UTR	5	0.272
BRCA2	32890665	rs81002796	I 2	5	0.008
BRCA2	32900149	rs3783265	I 4	6	0.084
BRCA2	32900933	rs3752451	I 7	6	0.404
BRCA2	32906558	rs79483201	E 10	5	0.004
BRCA2	32906729	rs144848	E 10	5	0.244
BRCA2	32906766	rs41293475	E 10	5	0.004
BRCA2	32906980	rs1801439	E 10	5	0.084
BRCA2	32911463	rs1799944	E 11	6	0.08
BRCA2	32911565	rs80358550	E 11	6	0.004
BRCA2	32911888	rs1801406	E 11	5	0.324
BRCA2	32911889	Novel	E 11	5	0.004
BRCA2	32912299	rs543304	E 11	6	0.22
BRCA2	32914126	rs80358784	E 11	6	0.004
BRCA2	32914236	rs4987117	E 11	6	0.016
BRCA2	32914815	rs35029074	E 11	6	0.004
BRCA2	32914954	rs80359596	E 11	6	0.004
BRCA2	32915005	rs206076	E 11	6	0.024
BRCA2	32915411	rs11571661	I 11	6	0.108
BRCA2	32929232	rs1799955	E 14	6	0.268
BRCA2	32929478	rs11147489	I 14	6	0.084
BRCA2	32930673	rs28897744	E 15	5	0.012
BRCA2	32936865	rs181176701	I 17	4	0.004
BRCA2	32953388	rs4942486	I 21	5	0.5
BRCA2	32953604	rs59004709	E 22	5	0.004
BRCA2	32953971	rs28897755	E 23	5	0.004
BRCA2	32954023	rs397507419	E 23	5	0.004
BRCA2	32968743	rs9595456	I 24	6	0.004
BRCA2	32968810	rs11571818	I 24	6	0.016
BRCA2	32969074	rs81002848	I 25	5	0.004
BRCA2	32971042	rs80359224	E 26	6	0.004
BRCA2	32971265	rs81002832	I 26	6	0.008
BRCA2	32972280	rs11571830	I 26	6	0.008
BRCA2	32972626	rs11571833	E 27	6	0.016
BRCA2	32972872	rs80358402	E 27	6	0.004
BRCA2	32972884	rs1801426	E 27	6	0.004
BRCA2	32973012	rs15869	E 27,3'UTR	6	0.228

(MAF, Minör Allele Frequency)

4.2.3. miRNA bağlanma bölgelerinin analizi

PolymiRTS veri tabanına göre sadece bir varyant (rs15869) tanımlanmıştır. Bu varyant *BRCA2* geninde 3'UTR bölgesinde bulunmaktadır. PolymiRTS sonucuna göre rs15869A>C miRNA'ların (hsa-miR-627-3p, hsa-miR-6758-3, hsa-miR-1178-3p, hsa-miR-6844, hsa-miR-6847-3p) bağlanma bölgelerinde bulunmaktadır. Çizelge 4.8'de rs15869A>C'de sonuçlar gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. rs15869A>C'nin miRNA hedef bölgeleri üzerindeki olası etkileri

Alel	miRNA ID	Fonksiyonu	Kaynak + skor değişimi*
A	hsa-miR-627-3p	Hedef miRNA bölgesini bozar	-0.18
A	hsa-miR-6758-3p	Hedef miRNA bölgesini bozar	-0.084
C	hsa-miR-1178-3p	Yeni miRNA bölgesi oluşturur	-0.161
C	hsa-miR-6844	Yeni miRNA bölgesi oluşturur	-0.083
C	hsa-miR-6847-3p	Yeni miRNA bölgesi oluşturur	-0.146

* Varsayılan miRNA hedef sitelerindeki her SNP veya INDEL için referans ve türetilmiş aleller arasındaki TargetScan veri tabanının puanlarındaki farklılıklar

4.3. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilen yeni varyantlar

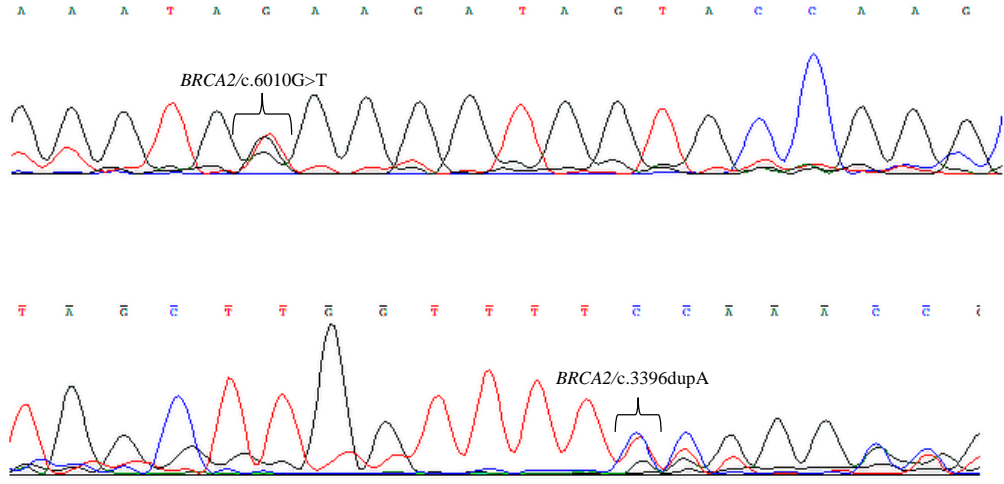
Çalışmamızda *BRCA1* geninde 3, *BRCA2* geninde de 5 varyant olmak üzere toplamda 8 novel varyant saptadık.

BRCA1 genindeki novel varyantlarımızdan kodlama yapan bölgede varyantımız bulunmamakta iken 2 tanesi intronik bölgede, kalan 1 varyant ise 5'UTR bölgesinde bulunmaktadır. Bu varyantlar ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen varyant olup ENIGMA veri tabanında bulunmamaktadır.

BRCA2 geninde ki novel varyantlarımızdan ise 3 tanesi kodlama yapan bölgede iken 2 tanesi intronik bölgede bulunmaktadır. Bu varyantlar da ENIGMA veri tabanında bulunmamaktadır. Kodlama yapan varyantlarımızdan 2 tanesi ACMG kriterlerine göre Patolojik olup 1 varyantımız da klinik önemi bilinmeyen varyant sınıfına girmiştir. Kodlama yapan varyantlarımızdan sadece 2 tanesine *in silico* programlar

sonuç vermiştir. Sonuçların kombine edilmiş sonucu ise klinik önemi bilinmeyen varyant şeklindedir. Bu varyantlar hakkındaki bilgiler ve veri tabanları ile *in silico* algoritmalarından alınan sonuçlar Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Buna ek olarak *BRCA2* geninde saptanan 3 ekzonik varyanttan (1 çerçeve kayması, 1 yanlış anlamlı ve 1 anlamsız) 2 tanesi Sanger Sekanslama ile konfirmasyona gönderilmiş olup kalan 1 ekzonik varyant (yanlış anlamlı varyant) *BRCA1* ve *BRCA2* yeni nesil gen dizilemesi için başvuran kişiye ulaşlamaması sebebiyle Sanger Sekanslama ile konfirme edilememiştir. Sanger sekanslama yönteminden elde edilen şekiller Şekil 4.4’te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. *BRCA2/c.6010G>T* ve *BRCA2/c.3396dupA* varyantlarının Sanger Sekanslama Görüntüleri

Çizelge 4.9. Novel varyantlar ve çeşitli veri tabanları ile *in silico* programlara göre sonuçları

Gen	Lokasyon	c.DNA	Ekzon/Intron	Amino Asit Değişimi	MAF	ACMG	ENIGMA	VEP	ClinVar	HGMD	Provean	SIFT	PP2	MT	RDB
BRCA1	41276318	c.63delCinsGA TATATATAT GT	Ekzon 1-5'UTR		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BRCA1	41251973	c.442-76T>C	Intron 6		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BRCA1	41248009	c.594-70C>T	Intron 8		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BRCA2	32893590	c.316+127dupT	Intron3		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BRCA2	32911889	c.3396dupA	Ekzon 11	p.Pro1133Thrfs* 11	0.004	P	NA	H	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5
BRCA2	32914502	c.6010G>T	Ekzon 11	p.Glu2004Ter	0.004	P	NA	H	NA	NA	NA	NA	NA	DCA	NA
BRCA2	32931961	c.7700A>G	Ekzon 16	p.Tyr2567Cys	0.004	VUS	NA	M	NA	NA	N	T	PSD	DC	NA
BRCA2	32972217	c.9649-82A>G	Intron26		0.004	VUS	NA	Mo	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

(BRCA1 NM_007294; BRCA2 NM_000059; P, Pathogenic; VUS, Verdict of Uncertain Significance; H, High; L, Low; M, Moderate; Mo, Modifier; T, Tolerated; PP2, Polyphen2; PSD, Possibly Damaging; DC, Disease causing; DCA, Disease causing automatic; RDB, RegulomeDB; MAF, Minör Allele Frequency; NA, Not Available)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızın amacı yeni nesil dizileme yöntemi Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Bölümüne meme ve yumurtalık kanser tanısı ya da aile hikâyesi ile başvuran 125 kişide *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilmiş varyantların biyoinformatik yöntemlerle analizleri ve fenotiple ilişkilendirilmesidir. *BRCA1* ve *BRCA2* geni tümör baskılayıcı genler olarak DNA hasarı ve onarımında önemli bir role sahip olmalarının yanı sıra bu genlerdeki patojenik germline mutasyonlar aynı zamanda meme ve yumurtalık kanseri gelişimine sebep olmaktadır.

Bu tez çalışması sonucunda 96 varyant saptanmıştır. Bu varyantlar ACMG kriterlerine göre sınıflandırılacak olursa toplamda 10 adet patojenik varyant, 1 adet muhtemel patojenik varyant, 19 adet klinik önemi bilinmeyen varyant, 32 adet muhtemel iyi huylu varyant, 34 adet iyi huylu varyant olmak üzere sınıflandırılmaktadırlar.

Bulunan varyantlar ENIGMA veri bankasına göre sınıflandırılacak olursa 6 adet patojenik varyant, 3 adet muhtemel iyi huylu varyant, 59 adet iyi huylu/az klinik anlamlı varyanttır. ENIGMA aynı zamanda kalan varyantların 19 tanesine gözden geçirilmemiş sonucu vermekte ve 9 tane varyanta da sonuç verememektedir. Bakılacak olursa ENIGMA'nın patojenik sonuç verdiği tüm varyantlar ACMG kriterlerine göre de patojeniktir. Fakat ACMG'nin patojenik sonuç verdiği tüm varyantlara ENIGMA sonuç verememiştir. Çünkü ACMG kriterlerinin patojenik sonuç verdiği varyantlardan bazıları novel varyanttır. Aynı şekilde tam tersi sonuç olarak ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen varyantlardan bazıları ENIGMA'ya göre iyi huylu/az klinik anlamlı olarak sınıflandırılmıştır.

Minör alel frekansı bakımından veri tabanları Haploview sonucumuz arasında birkaç varyantta frekans farklılığı gözlemledik. Bu varyantlardan *BRCA1* geninde c.4358-3A>G veri tabanlarında gözlenmemiştir. Aynı şekilde *BRCA2* geninde ise c.67+1G>A, c.2765dupT, c.4563A>G, c.6468_6469delTC, c.6513G>C, c.7436-

1G>C, c.7618-53T>C varyantları da veri tabanlarında gözlenmemiştir. *BRCA1* geninde bulunan c.4358-3A>G varyantı GeneKor MSA tarafından 2018 yılında bulunmuştur. GeneKor MSA, Yunanistan da bulunan bir laboratuvardır. Bunun dışında *BRCA2* geninde gözlemlemiş olduğumuz frekansları farklı olan varyantlardan c.67+1G>A, c.2765dupT, c.6468_6469delTC, c.7436-1G>C, c.7618-53T>C bizim örneklerimiz içersinde nadir olarak gözlemlenmişken veri tabanlarında görülmemiştir. Örneklerimizde iyi huylu veya muhtemel iyi huylu varyantların frekansı yüksek olarak gözlemlenirken Dünya genelinde de frekansı yüksek olarak belirtilmiştir. Ek olarak c.6513G>C, c.4563A>G ise örneklerimizde nadir olarak gözlemlenirken veri tabanlarında yaygın olarak gözlemlenmişlerdir. Bu çalışma sonucunda ACMG kriterlerine göre sınıflandırdığımız 10 adet patojenik varyant ve 1 adet muhtemel patojenik varyanttan 2 tanesi novel varyant olmakla birlikte Haploview sonucumuza göre hepsi nadir varyanttır. Ek olarak bu varyantlardan 6 tanesi ExAC, gnomAD veya 1000G da gözlenmemiştir.

Çalışmamız sonucunda ACMG kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen 19 adet varyantımızdan 2 tanesi yaygın varyant, 1 adet yaygın olmayan varyant ve 16 adet nadir varyant gözlemlenmiştir. Nadir varyantlardan 8 tanesi ExAC, gnomAD veya 1000G da gözlenmemiştir. Bu varyantlardan sadece 4 tanesi *in silico* algoritmalarda sonuç vermişlerdir. Dolayısıyla bu 4 varyant hastalık bakımından önemli yere sahip olabilir.

ACMG kriterlerine göre muhtemel iyi huylu olarak bulmuş olduğumuz 32 varyanttan sadece 1 tanesi hariç bulmuş olduğumuz minör alel frekansı ile veri bankalarının vermiş olduğu sonuç benzerdir. O varyant ise novel olduğu için veri bankalarında gözlemlenmemiştir.

Tespit etmiş olduğumuz ACMG kriterlerine göre iyi huylu olan 34 varyantımızı minör alel frekasına göre kıyaslayacak olursak 3 tanesi hariç sonuçlarımız veri tabanlarına benzerdir.

Ek olarak, novel varyantlarımızın 1 tanesinde RegulomeDB sonucu alabildik. Bu varyant ekzonik varyanttır. Ayrıca ACMG kriterlerine göre patojenik olup RegulomeDB sonucu 5'tir. Bu da bize aslında bu varyantın aslında önemli olduğunu göstermektedir.

RegulomeDB'den 63 varyant için sonuç alabildik. En yüksek sonuç olan 6'yı 32 varyant için aldık. Bu varyantları ACMG kriterlerine göre sınıflandıracak olursak 14 tanesi iyi huylu, 11 tanesi muhtemel iyi huylu, 1 tanesi muhtemel patojenik, 2 tanesi patojenik ve 4 tanesi klinik önemi bilinmeyen varyanttır. En düşük aldığımız sonucumuz (regülatör önemi en fazla) olan 1f'yi almış olduğumuz varyantlar ise ACMG kriterlerine göre iyi huylu varyantlardı. Fakat bu varyantlar Bölüm 4.2.2'de de anlatıldığı üzere transkripsiyon faktörü bağlanmasını etkileyen ve gen hedefi ekspresyonu ile ilişkili olan varyantlardır.

AWESOME veri tabanı sonuçlarından da bahsedecek olursak; *BRCA1* geninde rs28897689, rs55906931, rs56187033, rs1799967, rs1799950, rs799917, rs16941 varyantlarında, *BRCA2* geninde de rs59004709, rs80359224, rs1801426, rs169547 varyantlarında *in silico* programlar veya deneysel olarak yapılmış bir sonuç verememiştir. Bu varyantların AWESOME veri tabanında tanımlanmıştı fakat veri tabanına göre post-translasyonel modifikasyonla ilişkilendirilmediği ve hiçbir sonuç vermediği için çizelgelere dahil edilmediler.

Bunun dışında bu tez çalışmasında kodlamayan çeşitli varyantların miRNA hedef bölgeleri dahil olmak üzere önemli regülatör bölgelerde bulunduğunu belirledik. Çalışmamızda gen regülasyonunda önemli ölçüde düzenleyici rolü öngörülen *BRCA1/rs799923* ve *BRCA2/rs15869* (3'UTR) varyantları daha önce meme kanseri riski ile de ilişkilendirilmişti (Han ve ark. 2017, Cao ve ark. 2016).

Tespit edilen dizi varyantlarının *BRCA1* ve *BRCA2* proteinlerinin fonksiyonel kısımlarında dağılımlarını incelediğimizde *BRCA1* Zing finger bölgesinde ve *BRCA2* Oligonükleotid/Oligosakkarit bağlayıcı bölge 1 ile *BRCA2* Tower bölgelerinde ekzonik varyant saptanmadığı gözlenmiştir. *BRCA1* Zing finger

bölgesi ER- α , ATF1 ve BARD1'in proteinlerinin doğrudan bağlanmasında işlev yaptığı bilinmektedir (Fan ve ark. 2001, Hashizume ve ark. 2001, Houvras ve ark. 2000). BRCA2 Oligonükleotid/Oligosakkarit bağlayıcı bölge 1 ile Tower bölgeleri ise Bölüm 2.1.2.1'de anlatıldığı üzere BRCA2'nin ssDNA ve Poli (ADP-Riboz)'a bağlanmasını teşvik etmektedirler.

Bisgin ve ark. (2019) tarafından yayınlanan çalışmada 129 kadın örneğe (aileden bağımsız) yeni nesil dizileme ile *BRCA1* ve *BRCA2* geni taraması yapılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre 18 adet patojenik varyant tespit etmişlerdir. Bu varyantlardan 7 tanesi *BRCA1* geninde 11 tanesi ise *BRCA2* geninde bulunmaktadır. Çalışmanın sonuçlarını bizim sonuçlarımızla karşılaştıracak olursak bizim örnek sayımız daha az ve içerisinde aile bireyleri de bulunmaktadır. Bunun yanı sıra bizim bulmuş olduğumuz novel varyantlar bulunmaktadır. Fakat patojenik varyant sayımız daha azdır. Genel olarak iki çalışmanın da ortak noktası patojenik varyantların daha çok *BRCA2* geninde bulunması sayılabilir.

Diğer ülkelerde yapılan son iki çalışmaya göre sadece *BRCA1* ve *BRCA2* genini yeni nesil dizilemekle kalmayıp bu genler yanında farklı genlerde içeren paneller ile çalışmaları yapmaktadırlar (Seeber ve ark. 2019, Lima ve ark. 2019).

Bu çalışma, *BRCA* ile ilişkili kanserli 125 Türk kişide kodlama yapan ve kodlama yapmayan *BRCA1* ve *BRCA2* varyantlarını ortaya koymaktadır ve fonksiyonel önemini biyoinformatik araçlar kullanarak araştırılmıştır. Sonuçlarımız ise potansiyel patojenik olan yeni kodlama yapan *BRCA1* ve *BRCA2* varyantlarını bunlara ek olarak kodlama yapmayan fakat regülasyon üzerinde etkileri olan birkaç varyantı ortaya çıkarmıştır ve tespit etmiş olduğumuz ekzonik novel varyantların patojenitesinin tam olarak anlaşılabilmesi için fonksiyonel çalışma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(4):248-9. doi: 10.1038/nmeth0410-248. PubMed PMID: 20354512; PubMed Central PMCID: PMC2855889.

Ahmed, A.A., Etemadmoghadam, D., Temple, J., Lynch, A.G., Riad, M., Sharma, R., Stewart, C., Fereday, S., Caldas, C., Defazio, A., Bowtell, D., Brenton, J.D. 2010. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol*. 2010 May;221(1):49-56. doi: 10.1002/path.2696. PubMed PMID: 20229506; PubMed Central PMCID: PMC3262968.

Alsop, K., Fereday, S., Meldrum, C., deFazio, A., Emmanuel, C., George, J., Dobrovic, A., Birrer, M.J., Webb, P.M., Stewart, C., Friedlander, M., Fox, S., Bowtell, D., Mitchell, G. 2012. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 20;30(21):2654-63. doi: 10.1200/JCO.2011.39.8545. Epub 2012 Jun 18. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2012 Nov 20;30(33):4180. PubMed PMID: 22711857; PubMed Central PMCID: PMC3413277.

Al-Sukhni, W., Rothenmund, H., Borgida, A.E., Zogopoulos, G., O'Shea, A.M., Pollett, A., Gallinger, S. 2008. Germline BRCA1 mutations predispose to pancreatic adenocarcinoma. *Hum Genet*. 2008 Oct;124(3):271-8. doi: 10.1007/s00439-008-0554-0. Epub 2008 Sep 2. PubMed PMID: 18762988.

Andrews, L., Mutch, D. G. 2017. Hereditary Ovarian Cancer and Risk Reduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017 May;41:31-48. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.10.017. Epub 2017 Jan 17. Review. PubMed PMID: 28254144.

Bhattacharya, A., Ziebarth, J.D., Cui, Y. 2014. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D86-91. doi: 10.1093/nar/gkt1028. Epub 2013 Oct 24. PubMed PMID: 24163105; PubMed Central PMCID: PMC3965097.

Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15;21(2):263-5. Epub 2004 Aug 5. PubMed PMID: 15297300.

Bell, K.A., Smith Sehdev, A.E., Kurman, R.J. 2001. Refined diagnostic criteria for implants associated with ovarian atypical proliferative serous tumors (borderline) and micropapillary serous carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2001 Apr;25(4):419-32. PubMed PMID: 11257616.

Bignell, G., Micklem, G., Stratton, M.R., Ashworth, A., Wooster, R. 1997. The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum Mol Genet*. 1997 Jan;6(1):53-8. PubMed PMID: 9002670.

Bisgin, A., Boga, I., Yalav, O., Sonmezler, O., Tug Bozdogan, S. 2019. BRCA mutation characteristics in a series of index cases of breast cancer selected independent

of family history. *Breast J.* 2019 Sep;25(5):1029-1033. doi: 10.1111/tbj.13400. Epub 2019 Jun 22. PubMed PMID: 31228304.

Bolton, K.L., Tyrer, J., Song, H., Ramus, S.J., Notaridou, M., Jones, C., Sher, T., Gentry-Maharaj, A., Wozniak, E., Tsai, Y.Y., Weidhaas, J., Paik, D., Van Den Berg, D.J., Stram, D.O., Pearce, C.L., Wu, A.H., Brewster, W., Anton-Culver, H., Ziogas, A., Narod, S.A., Levine, D.A., Kaye, S.B., Brown, R., Paul, J., Flanagan, J., Sieh, W., McGuire, V., Whittemore, A.S., Campbell, I., Gore, M.E., Lissowska, J., Yang, H.P., Medrek, K., Gronwald, J., Lubinski, J., Jakubowska, A., Le, N.D., Cook, L.S., Kelemen, L.E., Brooks-Wilson, A., Massuger, L.F., Kiemeny, L.A., Aben, K.K., van Altena, A.M., Houlston, R., Tomlinson, I., Palmieri, R.T., Moorman, P.G., Schildkraut, J., Iversen, E.S., Phelan, C., Vierkant, R.A., Cunningham, J.M., Goode, E.L., Fridley, B.L., Kruger-Kjaer, S., Blaesker, J., Hogdall, E., Hogdall, C., Gross, J., Karlan, B.Y., Ness, R.B., Edwards, R.P., Odunsi, K., Moyisch, K.B., Baker, J.A., Modugno, F., Heikkinen, T., Butzow, R., Nevanlinna, H., Leminen, A., Bogdanova, N., Antonenkova, N., Doerk, T., Hillemanns, P., Dürst, M., Runnebaum, I., Thompson, P.J., Carney, M.E., Goodman, M.T., Lurie, G., Wang-Gohrke, S., Hein, R., Chang-Claude, J., Rossing, M.A., Cushing-Haugen, K.L., Doherty, J., Chen, C., Rafnar, T., Besenbacher, S., Sulem, P., Stefansson, K., Birrer, M.J., Terry, K.L., Hernandez, D., Cramer, D.W., Vergote, I., Amant, F., Lambrechts, D., Despierre, E., Fasching, P.A., Beckmann, M.W., Thiel, F.C., Ekici, A.B., Chen, X.; Australian Ovarian Cancer Study Group; Australian Cancer Study (Ovarian Cancer); Ovarian Cancer Association Consortium., Johnatty, S.E., Webb, P.M., Beesley, J., Chanock, S., Garcia-Closas, M., Sellers, T., Easton, D.F., Berchuck, A., Chenevix-Trench, G., Pharoah, P.D., Gayther, S.A. 2010. Common variants at 19p13 are associated with susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet.* 2010 Oct;42(10):880-4. doi: 10.1038/ng.666. Epub 2010 Sep 19. Erratum in: *Nat Genet.* 2016 Jan;48(1):101. Brook-Wilson, Angela [corrected to Brooks-Wilson, Angela]. PubMed PMID: 20852633; PubMed Central PMCID: PMC3125495.

Bork, P., Blomberg, N., Nilges, M. 1996. Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat Genet.* 1996 May;13(1):22-3. PubMed PMID: 8673099. doi:10.1038/ng0596-22.

Boyle, A.P., Hong, E.L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M.A., Kasowski, M., Karczewski, K.J., Park, J., Hitz, B.C., Weng, S., Cherry, J.M., Snyder, M. 2012. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 2012 Sep;22(9):1790-7. doi: 10.1101/gr.137323.112. PubMed PMID: 22955989; PubMed Central PMCID: PMC3431494.

Braicu, E.I., Sehouli, J., Richter, R., Pietzner, K., Denkert, C., Fotopoulou, C. 2011. Role of histological type on surgical outcome and survival following radical primary tumour debulking of epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancers. *Br J Cancer.* 2011 Dec 6;105(12):1818-24. doi: 10.1038/bjc.2011.455. Epub 2011 Nov 1. PubMed PMID: 22045193; PubMed Central PMCID: PMC3251879.

Brzovic, P.S., Meza, J.E., King, M.C., Klevit, R.E. 2001. BRCA1 RING domain cancer-predisposing mutations. Structural consequences and effects on protein-protein interactions. *J Biol Chem.* 2001 Nov 2;276(44):41399-406. Epub 2001 Aug 28. PubMed PMID: 11526114.

Burks, R.T., Sherman, M.E., Kurman, R.J. 1996. Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors. *Am J Surg Pathol.* 1996 Nov;20(11):1319-30. PubMed PMID: 8898836.

Campbell, I.G., Russell, S.E., Choong, D.Y., Montgomery, K.G., Ciavarella, M.L., Hooi, C.S., Cristiano, B.E., Pearson, R.B., Phillips, W.A. 2004. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res.* 2004 Nov 1;64(21):7678-81. PubMed PMID: 15520168.

Cao, J., Luo, C., Yan, R., Peng, R., Wang, K., Wang, P., Ye, H., Song, C. 2016. rs15869 at miRNA binding site in BRCA2 is associated with breast cancer susceptibility. *Med Oncol.* 2016 Dec;33(12):135. Epub 2016 Nov 2. PubMed PMID: 27807724.

Cancer Genome Atlas Research Network. 2011. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011;474(7353):609-615.

Chapman, J., Taylor, Martin., Boulton, Simon. 2012. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular cell.* 47. 497-510. 10.1016/j.molcel.2012.07.029.

Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R., Chan, A. P. 2012. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS one*, 7(10), e46688.

Colombo, M., De Vecchi, G., Caleca, L., Foglia, C., Ripamonti, C.B., Ficarazzi, F., Barile, M., Varesco, L., Peissel, B., Manoukian, S., Radice, P. 2013. Comparative in vitro and in silico analyses of variants in splicing regions of BRCA1 and BRCA2 genes and characterization of novel pathogenic mutations. *PLoS One.* 2013;8(2):e57173. doi: 10.1371/journal.pone.0057173. Epub 2013 Feb 22. PubMed PMID: 23451180; PubMed Central PMCID: PMC3579815.

Coward, J. I., Middleton, K., Murphy, F. 2015. New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer. *International journal of women's health*, 2015;7:189-203.

Cuatrecasas, M., Villanueva, A., Matias-Guiu, X., Prat, J. 1997. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer*, 79(8), 1581-1586.

Earp, M.A., Kelemen, L.E., Magliocco, A.M., Swenerton, K.D., Chenevix-Trench, G.; Australian Cancer Study; Australian Ovarian Cancer Study Group, Lu, Y., Hein, A., Ekici, A.B., Beckmann, M.W., Fasching, P.A., Lambrechts, D., Despierre, E., Vergote, I., Lambrechts, S., Doherty, J.A., Rossing, M.A., Chang-Claude, J., Rudolph, A., Friel, G., Moysich, K.B., Odunsi, K., Sucheston-Campbell, L., Lurie, G., Goodman, M.T., Carney, M.E., Thompson, P.J., Runnebaum, I.B., Dürst, M., Hillemanns, P., Dörk, T., Antonenkova, N., Bogdanova, N., Leminen, A., Nevanlinna, H., Pelttari, L.M., Butzow, R., Bunker, C.H., Modugno, F., Edwards, R.P., Ness, R.B., du Bois, A., Heitz, F., Schwaab, I., Harter, P., Karlan, B.Y., Walsh, C., Lester, J., Jensen, A., Kjær, S.K., Høgdall, C.K., Høgdall, E., Lundvall, L., Sellers, T.A., Fridley, B.L., Goode, E.L., Cunningham, J.M., Vierkant, R.A., Giles, G.G., Baglietto, L., Severi, G., Southey, M.C., Liang, D., Wu, X., Lu, K., Hildebrandt, M.A., Levine, D.A., Bisogna, M., Schildkraut, J.M., Iversen, E.S., Weber, R.P., Berchuck, A., Cramer, D.W., Terry, K.L., Poole, E.M., Tworoger, S.S., Bandera, E.V., Chandran, U., Orlow, I., Olson, S.H., Wik, E., Salvesen, H.B., Borge,

L., Halle, M.K., van Altena, A.M., Aben, K.K., Kiemeneij, L.A., Massuger, L.F., Pejovic, T., Bean, Y.T., Cybulski, C., Gronwald, J., Lubinski, J., Wentzensen, N., Brinton, L.A., Lissowska, J., Garcia-Closas, M., Dicks, E., Dennis, J., Easton, D.F., Song, H., Tyrer, J.P., Pharoah, P.D., Eccles, D., Campbell, I.G., Whittemore, A.S., McGuire, V., Sieh, W., Rothstein, J.H., Flanagan, J.M., Paul, J., Brown, R., Phelan, C.M., Risch, H.A., McLaughlin, J.R., Narod, S.A., Ziogas, A., Anton-Culver, H., Gentry-Maharaj, A., Menon, U., Gayther, S.A., Ramus, S.J., Wu, A.H., Pearce, C.L., Pike, M.C., Dansonka-Mieszkowska, A., Rzepecka, I.K., Szafron, L.M., Kupryjanczyk, J., Cook, L.S., Le, N.D., Brooks-Wilson, A; Ovarian Cancer Association Consortium. 2013. Genome-wide association study of subtype-specific epithelial ovarian cancer risk alleles using pooled DNA. *Hum Genet.* 2014 May;133(5):481-97. doi: 10.1007/s00439-013-1383-3. Epub 2013 Nov 5. PubMed PMID: 24190013; PubMed Central PMCID: PMC4063682.

Fan, S., Ma, Y. X., Wang, C., Yuan, R., Meng, Q., Wang, J., Erdos, M., Goldberg, I. D., Webb, P., Kushner, P. J., Pestell, R. G., Rosen, E. M. 2001. Role of Direct Interaction in BRCA1 Inhibition of Estrogen Receptor Activity. *Oncogene.* 2001;20:77–87. doi: 10.1038/sj.onc.1204073.

Fidler, M. M., Bray, F., Soerjomataram, I. 2018. The global cancer burden and human development: a review. *Scandinavian journal of public health*, 46(1), 27-36. doi:10.1177/1403494817715400. Epub 2017 Jul 1. Review. PubMed PMID:28669281.

Fradet-Turcotte, A., Sitz, J., Grapton, D., Orthwein, A. 2016. BRCA2 functions: from DNA repair to replication fork stabilization. *Endocr Relat Cancer*, 23(10), T1-T17. doi: 10.1530/ERC-16-0297. Epub 2016 Aug 16. Review. PubMed PMID: 27530658.

Gershenson, D. M., Silva, E. G. 1990. Serous ovarian tumors of low malignant potential with peritoneal implants. *Cancer*, 65(3), 578-585.

Goldstein, M., Kastan, M. B. 2015. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annual review of medicine*, 66, 129-143. doi:10.1146/annurevmed-081313-121208

Gorringe, K. L., Jacobs, S., Thompson, E. R., Sridhar, A., Qiu, W., Choong, D. Y., Campbell, I. G. 2007. High-resolution single nucleotide polymorphism array analysis of epithelial ovarian cancer reveals numerous microdeletions and amplifications. *Clinical cancer research*, 13(16), 4731-4739.

Han, M.R, Zheng, W., Cai, Q., Gao, Y.T., Zheng, Y., Bolla, M.K., Michailidou, K., Dennis, J., Wang, Q., Dunning, A.M., Brennan, P., Chen, S.T., Choi, J.Y., Hartman, M., Ito, H., Lophatananon, A., Matsuo, K., Miao, H., Muir, K., Sangrajrang, S., Shen, C.Y, Teo, S.H., Tseng, C.C., Wu, A.H., Yip, C.H., Kang, D., Xiang, Y.B., Easton, D.F., Shu, X.O., Long, J. 2017. Evaluating genetic variants associated with breast cancer risk in high and moderate-penetrance genes in Asians. *Carcinogenesis*. 2017 May 1;38(5):511-518. doi: 10.1093/carcin/bgx010. PubMed PMID: 28419251; PubMed Central PMCID: PMC5963497.

Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuke, Y., Ogata, H., Ohta, T. 2001. The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is a Ubiquitin

Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation. *J Biol Chem.* 2001;276:14537–14540. doi: 10.1074/jbc.C000881200.

Helleday, T., Eshtad, S., Nik-Zainal, S. 2014. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 585. doi:10.1038/nrg3729

Hirshfield, K. M., Ganesan, S. 2014. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and targeted therapy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2014, 26(1), 34-40.

Hirst, J., Crow, J., Godwin, A. 2018. Ovarian Cancer Genetics: Subtypes and Risk Factors. *Ovarian Cancer: From Pathogenesis to Treatment*, 1. doi: 10.5772/intechopen.72705

Houvras, Y., Benezra, M., Zhang, H., Manfredi, J. J., Weber, B. L., Licht, J. D. 2000. BRCA1 Physically and Functionally Interacts with ATF1. *J Biol Chem.* 2000;275:36230–36237. doi: 10.1074/jbc.M002539200.

Hunter, S.M., Anglesio, M.S., Ryland, G.L., Sharma, R., Chiew, Y.E., Rowley, S.M., Doyle, M.A., Li, J., Gilks, C.B., Moss, P., Allan, P.E., Stephens, A.N., Huntsman, D.G., deFazio, A., Bowtell, D.D.; Australian Ovarian Cancer Study Group, Gorringer, K.L., Campbell, I.G. 2015. Molecular profiling of low grade serous ovarian tumours identifies novel candidate driver genes. *Oncotarget.* 2015 Nov 10;6(35):37663-77. doi: 10.18632/oncotarget.5438. PubMed PMID: 26506417; PubMed Central PMCID: PMC4741956.

Jazaeri, A. A., Yee, C. J., Sotiriou, C., Brantley, K. R., Boyd, J., Liu, E. T. 2002. Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(13), 990-1000.

Jeyasekharan, A.D., Liu, Y., Hattori, H., Pisupati, V., Jonsdottir, A.B., Rajendra, E., Lee, M., Sundaramoorthy, E., Schlachter, S., Kaminski, C.F., Ofir-Rosenfeld, Y., Sato, K., Savill, J., Ayoub, N., Venkitaraman, A.R. 2013. A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Oct;20(10):1191-8. doi: 10.1038/nsmb.2666. Epub 2013 Sep 8. PubMed PMID: 24013206; PubMed Central PMCID: PMC3796201.

Kelemen, L.E., Lawrenson, K., Tyrer, J., Li, Q., Lee, J.M., Seo, J.H., Phelan, C.M., Beesley, J., Chen, X., Spindler, T.J., Aben, K.K., Anton-Culver, H., Antonenkova, N.; Australian Cancer Study; Australian Ovarian Cancer Study Group; Ovarian Cancer Association Consortium. 2015. Genome-wide significant risk associations for mucinous ovarian carcinoma. *Nat Genet.* 2015 Aug;47(8):888-97. doi: 10.1038/ng.3336. Epub 2015 Jun 15. PubMed PMID: 26075790; PubMed Central PMCID: PMC4520768.

Koczkowska, Magdalena., Zuk, Monika., Gorczyński, Adam., Ratajska, Magdalena., Lewandowska, Marzena., Wojciech, Biernat., Limon, Janusz., Wasag, Bartosz. 2016. Detection of somatic BRCA1/2 mutations in ovarian cancer - next-generation sequencing analysis of 100 cases. *Cancer medicine.* 5. 10.1002/cam4.748.

Kuchenbaecker, K.B., Ramus, S.J., Tyrer, J., Lee, A., Shen, H.C., Beesley, J., Lawrenson, K., McGuffog, L., Healey, S., Lee, J.M., Spindler, T.J., Lin, Y.G., Pejovic, T., Bean, Y., Li, Q., Coetzee, S., Hazelett, D., Miron, A., Southey, M., Terry,

M.B., Goldgar, D.E., Buys, S.S., Janavicius, R., Dorfling, C.M., van Rensburg, E.J., Neuhausen, S.L., Ding, Y.C., Hansen, T.V., Jønson, L., Gerdes, A.M., Ejlersen, B., Barrowdale, D., Dennis, J., Benitez, J., Osorio, A., Garcia, M.J., Komenaka, I., Weitzel, J.N., Ganschow, P., Peterlongo, P., Bernard, L., Viel, A., Bonanni, B., Peissel, B., Manoukian, S., Radice, P., Papi, L., Ottini, L., Fostira, F., Konstantopoulou, I., Garber, J., Frost, D., Perkins, J., Platte, R., Ellis, S.; EMBRACE, Godwin, A.K., Schmutzler, R.K., Meindl, A., Engel, C., Sutter, C., Sinilnikova, O.M.; GEMO Study Collaborators, Damiola, F., Mazoyer, S., Stoppa-Lyonnet, D., Claes, K., De Leeneer, K., Kirk, J., Rodriguez, G.C., Piedmonte, M., O'Malley, D.M., de la Hoya, M., Caldes, T., Aittomäki, K., Nevanlinna, H., Collée, J.M., Rookus, M.A., Oosterwijk, J.C.; Breast Cancer Family Registry, Tihomirova, L., Tung, N., Hamann, U., Isaccs, C., Tischkowitz, M., Imyanitov, E.N., Caligo, M.A., Campbell, I.G., Hogervorst, F.B.; HEBON, Olah, E., Diez, O., Blanco, I., Brunet, J., Lazaro, C., Pujana, M.A., Jakubowska, A., Gronwald, J., Lubinski, J., Sukiennicki, G., Barkardottir, R.B., Plante, M., Simard, J., Soucy, P., Montagna, M., Tognazzo, S., Teixeira, M.R.; KConFab Investigators, Pankratz, V.S., Wang, X., Lindor, N., Szabo, C.I., Kauff, N., Vijai, J., Aghajanian, C.A., Pfeiler, G., Berger, A., Singer, C.F., Tea, M.K., Phelan, C.M., Greene, M.H., Mai, P.L., Rennert, G., Mulligan, A.M., Tchatchou, S., Andrulis, I.L., Glendon, G., Toland, A.E., Jensen, U.B., Kruse, T.A., Thomassen, M., Bojesen, A., Zidan, J., Friedman, E., Laitman, Y., Soller, M., Liljegren, A., Arver, B., Einbeigi, Z., Stenmark-Askmal, M., Olopade, O.I., Nussbaum, R.L., Rebbeck, T.R., Nathanson, K.L., Domchek, S.M., Lu, K.H., Karlan, B.Y., Walsh, C., Lester, J.; Australian Cancer Study (Ovarian Cancer Investigators); Australian Ovarian Cancer Study Group, Hein, A., Ekici, A.B., Beckmann, M.W., Fasching, P.A., Lambrechts, D., Van Nieuwenhuysen, E., Vergote, I., Lambrechts, S., Dicks, E., Doherty, J.A., Wicklund, K.G., Rossing, M.A., Rudolph, A., Chang-Claude, J., Wang-Gohrke, S., Eilber, U., Moysich, K.B., Odunsi, K., Sucheston, L., Lele, S., Wilkens, L.R., Goodman, M.T., Thompson, P.J., Shvetsov, Y.B., Runnebaum, I.B., Dürst, M., Hillemanns, P., Dörk, T., Antonenkova, N., Bogdanova, N., Leminen, A., Pelttari, L.M., Butzow, R., Modugno, F., Kelley, J.L., Edwards, R.P., Ness, R.B., du Bois, A., Heitz, F., Schwaab, I., Harter, P., Matsuo, K., Hosono, S., Orsulic, S., Jensen, A., Kjaer, S.K., Hogdall, E., Hasmad, H.N., Azmi, M.A., Teo, S.H., Woo, Y.L., Fridley, B.L., Goode, E.L., Cunningham, J.M., Vierkant, R.A., Bruinsma, F., Giles, G.G., Liang, D., Hildebrandt, M.A., Wu, X., Levine, D.A., Bisogna, M., Berchuck, A., Iversen, E.S., Schildkraut, J.M., Concannon, P., Weber, R.P., Cramer, D.W., Terry, K.L., Poole, E.M., Tworoger, S.S., Bandera, E.V., Orlow, I., Olson, S.H., Krakstad, C., Salvesen, H.B., Tangen, I.L., Bjorge, L., van Altena, A.M., Aben, K.K., Kiemeny, L.A., Massuger, L.F., Kellar, M., Brooks-Wilson, A., Kelemen, L.E., Cook, L.S., Le, N.D., Cybulski, C., Yang, H., Lissowska, J., Brinton, L.A., Wentzensen, N., Hogdall, C., Lundvall, L., Nedergaard, L., Baker, H., Song, H., Eccles, D., McNeish, I., Paul, J., Carty, K., Siddiqui, N., Glasspool, R., Whittmore, A.S., Rothstein, J.H., McGuire, V., Sieh, W., Ji, B.T., Zheng, W., Shu, X.O., Gao, Y.T., Rosen, B., Risch, H.A., McLaughlin, J.R., Narod, S.A., Monteiro, A.N., Chen, A., Lin, H.Y., Permuth-Wey, J., Sellers, T.A., Tsai, Y.Y., Chen, Z., Ziogas, A., Anton-Culver, H., Gentry-Maharaj, A., Menon, U., Harrington, P., Lee, A.W., Wu, A.H., Pearce, C.L., Coetzee, G., Pike, M.C., Dansonka-Mieszkowska, A., Timorek, A., Rzepecka, I.K., Kupryjanczyk, J., Freedman, M., Noushmehr, H., Easton, D.F., Offit, K., Couch, F.J., Gayther, S.,

Pharoah, P.P., Antoniou, A.C., Chenevix-Trench, G.; Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2. 2015. Identification of six new susceptibility loci for invasive epithelial ovarian cancer. *Nat Genet.* 2015 Feb;47(2):164-71. doi: 10.1038/ng.3185. Epub 2015 Jan 12. PubMed PMID: 25581431; PubMed Central PMCID: PMC4445140.

Kurman, R. J. 2013. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Annals of Oncology.* 2013;24(Suppl 10):x16-x21

Lee, K. R., Young, R. H. 2003. The distinction between primary and metastatic mucinous carcinomas of the ovary: Gross and histologic findings in 50 cases. *The American Journal of Surgical Pathology.* 2003;27(3):281-292

Leitao, M.M. Jr., Boyd, J., Hummer, A., Olvera, N., Arroyo, C.D., Venkatraman, E., Baergen, R.N., Dizon, D.S., Barakat, R.R., Soslow, R.A. 2004. Clinicopathologic analysis of early-stage sporadic ovarian carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2004 Feb;28(2):147-59. PubMed PMID: 15043303.

Li, Q., Wang, K. 2015. "InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines," *Am J Hum Genet*, vol. 100, no. 2, pp. 267-280, 2017.

Lima, Z. S., Ghadamzadeh, M., Arashloo, F. T., Amjad, G., Ebadi, M. R., Younesi, L. 2019. Recent advances of therapeutic targets based on the molecular signature in breast cancer: genetic mutations and implications for current treatment paradigms. *Journal of hematology & oncology*, 12(1), 38.

Lin, W.L., Kuo, W.H., Chen, F.L., Lee, M.Y., Ruan, A., Tyan, Y.S., Hsu, J.D., Chiang, H., Han, C.P. 2011. Identification of the coexisting HER2 gene amplification and novel mutations in the HER2 protein-overexpressed mucinous epithelial ovarian cancer. *Ann Surg Oncol.* 2011 Aug;18(8):2388-94. doi: 10.1245/s10434-011-1572-z. Epub 2011 Feb 23. PubMed PMID: 21347793.

Mabuchi, S., Sugiyama, T., Kimura, T. 2016. Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. *Journal of gynecologic oncology*, 27(3).

Malpica, A., Deavers, M. T., Lu, K., Bodurka, D. C., Atkinson, E. N., Gershenson, D. M., Silva, E. G. 2004. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *The American journal of surgical pathology*, 28(4), 496-504.

Manke, I. A., Lowery, D. M., Nguyen, A., Yaffe, M. B. 2003. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*, 302(5645), 636-639.

McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, Flicek P, Cunningham F. 2016. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016 Jun 6;17(1):122. doi: 10.1186/s13059-016-0974-4. PubMed PMID: 27268795; PubMed Central PMCID: PMC4893825.

Mehrgou, A., Akouchekian, M. 2016. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Med J Islam Repub Iran.* 2016 (15 May2016). Vol. 30:369.

Mehta, A., Vasudevan, S., Sharma, S. K., Kumar, D., Panigrahi, M., Suryavanshi, M., Gupta, G. 2018. Germline BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations and variants of unknown clinical significance associated with breast/ovarian cancer: a report from north india. *Cancer management and research*, 10, 6505.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., Bell, R., Rosenthal, J., Hussey, C., Tran, T., McClure, M., Frye, C., Hattier, T., Phelps, R., Haugen-Strano, A., Katcher, H., Yakumo, K., Gholami, Z., Shaffer, D., Stone, S., Bayer, S., Wray, C., Bogden, R., Dayananth, P., Ward, J., Tonin, P., Narod, S., Bristow, P., Norris, F.H., Helvering, L., Morrison, P., Rosteck, P., Lai, M., Barrett, J. C., Lewis, C., Neuhausen, S., Cannon-Albright, L., Goldgar, D., Wiseman, R., Kamb, A., Skolnick, M.H. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):66-71. PubMed PMID: 7545954.

Monteiro, A. N., August, A., Hanafusa, H. 1996. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13595-13599.

Ng, P. C., Henikoff, S. 2003. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jul 1;31(13):3812-4. PubMed PMID: 12824425; PubMed Central PMCID: PMC168916.

Obata, K., Morland, S. J., Watson, R. H., Hitchcock, A., Chenevix-Trench, G., Thomas, E. J., Campbell, I. G. 1998. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer research*, 58(10), 2095-2097.

Panier, S., Durocher, D. 2009. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Apr 5;8(4):436-43. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.01.013. Epub 2009 Feb 18. Review. PubMed PMID: 19230794.

Phelan, C.M., Kuchenbaecker, K.B., Tyrer, J.P., Kar, S.P., Lawrenson, K., Winham, S.J., Dennis, J., Pirie, A., Riggan, M.J., Chornokur, G., Earp, M.A., Lyra, P.C. Jr., Lee, J.M., Coetzee, S., Beesley, J., McGuffog, L., Soucy, P., Dicks, E., Lee, A., Barrowdale, D., Lecarpentier, J., Leslie, G., Aalfs, C.M., Aben, K.K.H., Adams, M., Adlard, J., Andrulis, I.L., Anton-Culver, H., Antonenkova, N.; AOCS study group, Aravantinos, G., Arnold, N., Arun, B.K., Arver, B., Azzollini, J., Balmaña, J., Banerjee, S.N., Barjhoux, L., Barkardottir, R.B., Bean, Y., Beckmann, M.W., Beeghly-Fadiel, A., Benitez, J., Bermisheva, M., Bernardini, M.Q., Birrer, M.J., Bjorge, L., Black, A., Blankstein, K., Blok, M.J., Bodelon, C., Bogdanova, N., Bojesen, A., Bonanni, B., Borg, Å., Bradbury, A.R., Brenton, J.D., Brewer, C., Brinton, L., Broberg, P., Brooks-Wilson, A., Bruinsma, F., Brunet, J., Buecher, B., Butzow, R., Buys, S.S., Caldes, T., Caligo, M.A., Campbell, I., Cannioto, R., Carney, M.E., Cescon, T., Chan, S.B., Chang-Claude, J., Chanock, S., Chen, X.Q., Chiew, Y.E., Chiquette, J., Chung, W.K., Claes, K.B.M., Conner, T., Cook, L.S., Cook, J., Cramer, D.W., Cunningham, J.M., D'Aloisio, A.A., Daly, M.B., Damiola, F., Damirova, S.D., Dansonka-Mieszkowska, A., Dao, F., Davidson, R., DeFazio, A., Delnatte, C., Doheny, K.F., Diez, O., Ding, Y.C., Doherty, J.A., Domchek, S.M., Dorfling, C.M., Dörk, T., Dossus, L., Duran, M., Dürst, M., Dworniczak, B., Eccles, D., Edwards, T., Eeles, R., Eilber, U., Ejlertsen, B., Ekici, A.B., Ellis, S., Elvira, M.;

EMBRACE Study, Eng, K.H., Engel, C., Evans, D.G., Fasching, P.A., Ferguson, S., Ferrer, S.F., Flanagan, J.M., Fogarty, Z.C., Fortner, R.T., Fostira, F., Foulkes, W.D., Fountzilas, G., Fridley, B.L., Friebel, T.M., Friedman, E., Frost, D., Ganz, P.A., Garber, J., García, M.J., Garcia-Barberan, V., Gehrig, A.; GEMO Study Collaborators, Gentry-Maharaj, A., Gerdes, A.M., Giles, G.G., Glasspool, R., Glendon, G., Godwin, A.K., Goldgar, D.E., Goranova, T., Gore, M., Greene, M.H., Gronwald, J., Gruber, S., Hahnen, E., Haiman, C.A., Håkansson, N., Hamann, U., Hansen, T.V.O., Harrington, P.A., Harris, H.R., Hauke, J.; HEBON Study, Hein, A., Henderson, A., Hildebrandt, M.A.T., Hillemanns, P., Hodgson, S., Høgdall, C.K., Høgdall, E., Hogervorst, F.B.L., Holland, H., Hooning, M.J., Hosking, K., Huang, R.Y., Hulick, P.J., Hung, J., Hunter, D.J., Huntsman, D.G., Huzarski, T., Imyanitov, E.N., Isaacs, C., Iversen, E.S., Izatt, L., Izquierdo, A., Jakubowska, A., James, P., Janavicius, R., Jernetz, M., Jensen, A., Jensen, U.B., John, E.M., Johnatty, S., Jones, M.E., Kannisto, P., Karlan, B.Y., Karnezis, A., Kast, K.; KConFab Investigators, Kennedy, C.J., Khusnutdinova, E., Kiemeny, L.A., Kiiski, J.I., Kim, S.W., Kjaer, S.K., Köbel, M., Kopperud, R.K., Kruse, T.A., Kupryjanczyk, J., Kwong, A., Laitman, Y., Lambrechts, D., Larrañaga, N., Larson, M.C., Lazaro, C., Le, N.D., Le Marchand, L., Lee, J.W., Lele, S.B., Leminen, A., Leroux, D., Lester, J., Lesueur, F., Levine, D.A., Liang, D., Liebrich, C., Lilyquist, J., Lipworth, L., Lissowska, J., Lu, K.H., Lubinński, J., Luccarini, C., Lundvall, L., Mai, P.L., Mendoza-Fandiño, G., Manoukian, S., Massuger, L.F.A.G., May, T., Mazoyer, S., McAlpine, J.N., McGuire, V., McLaughlin, J.R., McNeish, I., Meijers-Heijboer, H., Meindl, A., Menon, U., Mensenkamp, A.R., Merritt, M.A., Milne, R.L., Mitchell, G., Modugno, F., Moes-Sosnowska, J., Moffitt, M., Montagna, M., Moysich, K.B., Mulligan, A.M., Musinsky, J., Nathanson, K.L., Nedergaard, L., Ness, R.B., Neuhausen, S.L., Nevanlinna, H., Niederacher, D., Nussbaum, R.L., Odunsi, K., Olah, E., Olopade, O.I., Olsson, H., Olswold, C., O'Malley, D.M., Ong, K.R., Onland-Moret, N.C.; OPAL study group, Orr, N., Orsulic, S., Osorio, A., Palli, D., Papi, L., Park-Simon, T.W., Paul, J., Pearce, C.L., Pedersen, I.S., Peeters, P.H.M., Peissel, B., Peixoto, A., Pejovic, T., Pelttari, L.M., Permuth, J.B., Peterlongo, P., Pezzani, L., Pfeiler, G., Phillips, K.A., Piedmonte, M., Pike, M.C., Piskorz, A.M., Poblete, S.R., Pocza, T., Poole, E.M., Poppe, B., Porteous, M.E., Prieur, F., Prokofyeva, D., Pugh, E., Pujana, M.A., Pujol, P., Radice, P., Rantala, J., Rappaport-Fuerhauser, C., Rennert, G., Rhiem, K., Rice, P., Richardson, A., Robson, M., Rodriguez, G.C., Rodríguez-Antona, C., Romm, J., Rookus, M.A., Rossing, M.A., Rothstein, J.H., Rudolph, A., Runnebaum, I.B., Salvesen, H.B., Sandler, D.P., Schoemaker, M.J., Senter, L., Setiawan, V.W., Severi, G., Sharma, P., Shelford, T., Siddiqui, N., Side, L.E., Sieh, W., Singer, C.F., Sobol, H., Song, H., Southey, M.C., Spurdle, A.B., Stadler, Z., Steinemann, D., Stoppa-Lyonnet, D., Sucheston-Campbell, L.E., Sukiennicki, G., Sutphen, R., Sutter, C., Swerdlow, A.J., Szabo, C.I., Szafron, L., Tan, Y.Y., Taylor, J.A., Tea, M.K., Teixeira, M.R., Teo, S.H., Terry, K.L., Thompson, P.J., Thomsen, L.C.V., Thull, D.L., Tihomirova, L., Tinker, A.V., Tischkowitz, M., Tognazzo, S., Toland, A.E., Tone, A., Trabert, B., Travis, R.C., Trichopoulou, A., Tung, N., Tworoger, S.S., van Altena, A.M., Van Den Berg, D., van der Hout, A.H., van der Luijt, R.B., Van Heetvelde, M., Van Nieuwenhuysen, E., van Rensburg, E.J., Vanderstichele, A., Varon-Mateeva, R., Vega, A., Edwards, D.V., Vergote, I., Vierkant, R.A., Vijai, J., Vratimos, A., Walker, L., Walsh, C., Wand, D., Wang-Gohrke, S., Wappenschmidt, B., Webb, P.M., Weinberg, C.R., Weitzel, J.N.,

- Wentzensen, N., Whittemore, A.S., Wijnen, J.T., Wilkens, L.R., Wolk, A., Woo, M., Wu, X., Wu, A.H., Yang, H., Yannoukakos, D., Ziogas, A., Zorn, K.K., Narod, S.A., Easton, D.F., Amos, C.I., Schildkraut, J.M., Ramus, S.J., Ottini, L., Goodman, M.T., Park, S.K., Kelemen, L.E., Risch, H.A., Thomassen, M., Offit, K., Simard, J., Schmutzler, R.K., Hazelett, D., Monteiro, A.N., Couch, F.J., Berchuck, A., Chenevix-Trench, G., Goode, E.L., Sellers, T.A., Gayther, S.A., Antoniou, A.C., Pharoah, P.D.P. 2017. Identification of 12 new susceptibility loci for different histotypes of epithelial ovarian cancer. *Nat Genet.* 2017 May;49(5):680-691. doi: 10.1038/ng.3826. Epub 2017 Mar 27. PubMed PMID: 28346442; PubMed Central PMCID: PMC5612337.
- Piñero, J., Bravo, À., Queralt-Rosinach, N., Gutiérrez-Sacristán, A., Deu-Pons, J., Centeno, E., García-García, J., Sanz, F., Furlong, L.I. 2017. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D833-D839. doi: 10.1093/nar/gkw943. Epub 2016 Oct 19. PubMed PMID: 27924018; PubMed Central PMCID: PMC5210640.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehman, H.L., ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PubMed PMID: 25741868; PubMed Central PMCID: PMC4544753.
- Reid, B. M., Permuth, J. B., Sellers, T. A. 2017. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer biology & medicine*, 14(1), 9.
- Rigakos, G., Razis, E. 2012. BRCAness: Finding the Achilles heel in ovarian cancer. *Oncologist*, 2012, 17(7), 956-962.
- Riopel, M. A., Ronnett, B. M., Kurman, R. J. 1999. Evaluation of diagnostic criteria and behavior of ovarian intestinal-type mucinous tumors: atypical proliferative (borderline) tumors and intraepithelial, microinvasive, invasive, and metastatic carcinomas. *The American journal of surgical pathology*, 23(6), 617-635.
- Rodriguez, M., Yu, X., Chen, J., Songyang, Z. 2003. Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52914-52918.
- Ruffner, H., Jiang, W., Craig, A. G., Hunter, T., Verma, I. M. 1999. BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. *Molecular and cellular biology*, 19(7), 4843-4854.
- Ryland, G.L., Hunter, S.M., Doyle, M.A., Caramia, F., Li, J., Rowley, S.M., Christie, M., Allan, P.E., Stephens, A.N., Bowtell, D.D., Australian Ovarian Cancer Study Group, Campbell, I.G., Gorringer, K.L. 2015. Mutational landscape of mucinous ovarian carcinoma and its neoplastic precursors. *Genome Med.* 2015 Aug 7;7(1):87. doi: 10.1186/s13073-015-0210-y. eCollection 2015. Erratum in: *Genome Med.* 2017 Jan 12;9(1):1. PubMed PMID: 26257827; PubMed Central PMCID: PMC4528310.
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., Seelow, D. 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature methods*, 11(4), 361.

Seeber, A., Puccini, A., Xiu, J., Goldberg, R.M., Grothey, A., Shields, A.F., Salem, M.E., Battaglin, F., El-Deiry, W.S., Tokunaga, R., Philip, P.A., Marshall, J., Kocher, F., Hall, M.J., Korn, W.M., Lenz, H.J., Spizzo, G. 2019. Association of *BRCA*-mutant pancreatic cancer with high tumor mutational burden (TMB) and higher PD-L1 expression. *Journal of Clinical Oncology* 37:15_suppl (May 20 2019) 4133-4133.

Seidman, J. D., Kurman, R. J., Ronnett, B. M. 2003. Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *The American journal of surgical pathology*, 27(7), 985-993.

Seidman, J. D., Horkayne-Szakaly, I., Haiba, M., Boice, C. R., Kurman, R. J., Ronnett, B. M. 2004. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *International journal of gynecological pathology*, 23(1), 41-44.

Seidman, J. D., Kurman, R. J. 1996. Subclassification of serous borderline tumors of the ovary into benign and malignant types. A clinicopathologic study of 65 advanced stage cases. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1996;20(11):1331-1345

Sharan, S., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., Bradley, A. 1997. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking *BRCA2*. *Nature* 386: 804-810. *Nature*. 386. 804-10. 10.1038/386804a0.

Singer, G., Oldt III, R., Cohen, Y., Wang, B. G., Sidransky, D., Kurman, R. J., Shih, I. M. 2003. Mutations in *BRAF* and *KRAS* characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(6), 484-486.

Singer, G., Stöhr, R., Cope, L., Dehari, R., Hartmann, A., Cao, D.F., Wang, T.L., Kurman, R.J., Shih, IeM. 2005. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol*. 2005 Feb;29(2):218-24. PubMed PMID: 15644779.

Spurdle, A.B., Healey, S., Devereau, A., Hogervorst, F.B., Monteiro, A.N., Nathanson, K.L., Radice, P., Stoppa-Lyonnet, D., Tavtigian, S., Wappenschmidt, B., Couch, F.J., Goldgar, D.E.; ENIGMA. 2012. ENIGMA--evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Hum Mutat*. 2012 Jan;33(1):2-7. doi: 10.1002/humu.21628. Epub 2011 Nov 3. PubMed PMID: 21990146; PubMed Central PMCID: PMC3240687.

Starita, L.M., Machida, Y., Sankaran, S., Elias, J.E., Griffin, K., Schlegel, B.P., Gygi, S.P., Parvin, J.D. 2004. *BRCA1*-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number. *Mol Cell Biol*. 2004 Oct;24(19):8457-66. PubMed PMID: 15367667; PubMed Central PMCID: PMC516733.

Stenson, P.D., Mort, M., Ball, E.V., Evans, K., Hayden, M., Heywood, S., Hussain, M., Phillips, A.D., Cooper, D.N. 2017. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet*. 2017 Jun;136(6):665-677.

doi: 10.1007/s00439-017-1779-6. Epub 2017 Mar 27. Review. PubMed PMID: 28349240; PubMed Central PMCID: PMC5429360.

Song, H., Ramus, S.J., Tyrer, J., Bolton, K.L., Gentry-Maharaj, A., Wozniak, E., Anton-Culver, H., Chang-Claude, J., Cramer, D.W., DiCioccio, R., Dörk, T., Goode, E.L., Goodman, M.T., Schildkraut, J.M., Sellers, T., Baglietto, L., Beckmann, M.W., Beesley, J., Blaakaer, J., Carney, M.E., Chanock, S., Chen, Z., Cunningham, J.M., Dicks, E., Doherty, J.A., Dürst, M., Ekici, A.B., Fenstermacher, D., Fridley, B.L., Giles, G., Gore, M.E., De Vivo, I., Hillemanns, P., Hogdall, C., Hogdall, E., Iversen, E.S., Jacobs, I.J., Jakubowska, A., Li, D., Lissowska, J., Lubiński, J., Lurie, G., McGuire, V., McLaughlin, J., Medrek, K., Moorman, P.G., Moysich, K., Narod, S., Phelan, C., Pye, C., Risch, H., Runnebaum, I.B., Severi, G., Southey, M., Stram, D.O., Thiel, F.C., Terry, K.L., Tsai, Y.Y., Tworoger, S.S., Van Den Berg, D.J., Vierkant, R.A., Wang-Gohrke, S., Webb, P.M., Wilkens, L.R., Wu, A.H., Yang, H., Brewster, W., Ziogas, A.; Australian Cancer (Ovarian) Study; Australian Ovarian Cancer Study Group; Ovarian Cancer Association Consortium, Houlston, R., Tomlinson, I., Whittemore, A.S., Rossing, M.A., Ponder, B.A., Pearce, C.L., Ness, R.B., Menon, U., Kjaer, S.K., Gronwald, J., Garcia-Closas, M., Fasching, P.A., Easton, D.F., Chenevix-Trench, G., Berchuck, A., Pharoah, P.D., Gayther, S.A. **2009.** A genome-wide association study identifies a new ovarian cancer susceptibility locus on 9p22.2. *Nat Genet.* 2009 Sep;41(9):996-1000. doi: 10.1038/ng.424. Epub 2009 Aug 2. PubMed PMID: 19648919; PubMed Central PMCID: PMC2844110.

Sugiyama, T., Kamura, T., Kigawa, J., Terakawa, N., Kikuchi, Y., Kita, T., Suzuki, M., Sato, I., Taguchi, K. 2000. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer.* 2000 Jun 1;88(11):2584-9. PubMed PMID: 10861437.

Tan, D., Irvani, M., McCluggage, W., Lambros, M., Milanezi, F., Mackay, A., Gourley, C., Geyer, F., Vatcheva, R., Millar, J., Thomas, K., Natrajan, R., Savage, K., Fenwick, K., Williams, Al., Jameson, C., El-Bahrawy, M., Gore, M., Gabra, H., Reis-Filho, J. 2011. Genomic Analysis Reveals the Molecular Heterogeneity of Ovarian Clear Cell Carcinomas. *Clinical cancer research.* 17. 1521-34. 10.1158/1078-0432.CCR-10-1688.

Teer, J. K., Yoder, S., Gjyshi, A., Nicosia, S. V., Zhang, C., Monteiro, A. N. 2017. Mutational heterogeneity in non-serous ovarian cancers. *Scientific reports,* 7(1), 9728.

Tung, K.H., Goodman, M.T., Wu, A.H., McDuffie, K., Wilkens, L.R., Kolonel, L.N., Nomura, A.M., Terada, K.Y., Carney, M.E., Sobin, L.H. 2003. Reproductive factors and epithelial ovarian cancer risk by histologic type: a multiethnic case-control study. *Am J Epidemiol.* 2003 Oct 1;158(7):629-38. PubMed PMID: 14507598.

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

Vang, R., Shih, I. M., Kurman, R. J. 2009. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Advances in anatomic pathology,* 16(5), 267.

Vereczkey, I., Serester, O., Dobos, J., Gallai, M., Szakács, O., Szentirmay, Z., Tóth, E. 2011. Molecular characterization of 103 ovarian serous and mucinous tumors. *Pathology & Oncology Research*, 17(3), 551-559.

Wiegand, K.C., Shah, S.P., Al-Agha, O.M., Zhao, Y., Tse, K., Zeng, T., Senz, J., McConechy, M.K., Anglesio, M.S., Kalloger, S.E., Yang, W., Heravi-Moussavi, A., Giuliany, R., Chow, C., Fee, J., Zayed, A., Prentice, L., Melnyk, N., Turashvili, G., Delaney, A.D., Madore, J., Yip, S., McPherson, A.W., Ha, G., Bell, L., Fereday, S., Tam, A., Galletta, L., Tonin, P.N., Provencher, D., Miller, D., Jones, S.J., Moore, R.A., Morin, G.B., Oloumi, A., Boyd, N., Aparicio, S.A., Shih, IeM., Mes-Masson, A.M., Bowtell, D.D., Hirst, M., Gilks, B., Marra, M.A., Huntsman, D.G. 2010. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*. 2010 Oct 14;363(16):1532-43. doi: 10.1056/NEJMoa1008433. Epub 2010 Sep 8. PubMed PMID: 20942669; PubMed Central PMCID: PMC2976679.

Williams, R. S., Glover, J. N. 2003. Structural consequences of a cancer-causing BRCA1-BRCT missense mutation. *J Biol Chem* 278, 2630–2635.

Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V., Bartel, P. L. 1997. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 31941-31944. doi:10.1074/jbc.272.51.31941

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):789-92. Erratum in: *Nature* 1996 Feb 22;379(6567):749. PubMed PMID: 8524414.

Yang, H., Jeffrey, P., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N., Zheng, N., Chen, P., Lee, W., Pavletich, N. 2002. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*. 297. 1837-48. 10.1126/science.297.5588.1837.

Yang, Y., Peng, X., Ying, P., Tian, J., Li, J., Ke, J., Zhu, Y., Gong, Y., Zou, D., Yang, N., Wang, X., Mei, S., Zhong, R., Gong, J., Chang, J., Miao, X. 2019. AWESOME: a database of SNPs that affect protein post-translational modifications. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D874-D880. doi: 10.1093/nar/gky821. PubMed PMID: 30215764; PubMed Central PMCID: PMC6324025.

Yano, K. I., Morotomi, K., Saito, H., Kato, M., Matsuo, F., Miki, Y. 2000. Nuclear localization signals of the BRCA2 protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 270(1), 171-175. doi:10.1006/bbrc.2000.2392

Yodsurang, V., Tang, Y., Takahashi, Y., Tanikawa, C., Kamatani, Y., Takahashi, A., Momozawa, Y., Fuse, N., Sugawara, J., Shimizu, A., Fukushima, A., Hishida, A., Furusyo, N., Naito, M., Wakai, K., Yamaji, T., Sawada, N., Iwasaki, M., Tsugane, S., Hirata, M., Murakami, Y., Kubo, M., Matsuda, K. 2018. Genome-wide association study (GWAS) of ovarian cancer in Japanese predicted regulatory variants in 22q13.1. *PLOS ONE*. 13(12): e0209096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209096>

Yu, X., Chini, C. C. S., He, M., Mer, G., Chen, J. 2003. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*, 302(5645), 639-642.

Zaino, R. J., Brady, M. F., Lele, S. M., Michael, H., Greer, B., Bookman, M. A. 2011. Advanced stage mucinous adenocarcinoma of the ovary is both rare and highly lethal: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*, 117(3), 554-562.

Zannoni, G.F., Improta, G., Chiarello, G., Pettinato, A., Petrillo, M., Scollo, P., Scambia, G., Frassetto, F. 2014. Mutational status of KRAS, NRAS, and BRAF in primary clear cell ovarian carcinoma. *Virchows Arch.* 2014 Aug;465(2):193-8. doi: 10.1007/s00428-014-1599-1. Epub 2014 Jun 3. PubMed PMID: 24889043.

Zarrizi, R., Menard, J. A., Belting, M., Massoumi, R. 2014. Deubiquitination of γ -tubulin by BAP1 prevents chromosome instability in breast cancer cells. *Cancer research*, 74(22), 6499-6508.

Zhu, Q., Pao, G., Huynh, A., Suh, H., Tonnu, N., Nederlof, P., Gage, F., Verma, I. 2011. BRCA1 tumor suppression occurs via heterochromatin mediated silencing. *Nature*. 477. 179-84. 10.1038/nature10371.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Niyazi Kaya

Doğum Yeri ve Tarihi: Fethiye/01.01.1994

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Fethiye Anadolu Lisesi

Lisans: Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik

Çalıştığı Kurum/Kurumlar :

SEM Laboratuvar Cihazları Pazarlama Sanayi ve Tic A.Ş

MEDTECH Tıbbi Ürünler Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti.

İletişim (e-posta): niyazi.kaya93@gmail.com

Yayınları:

Kaya, N., Kurt, Z., Aliyeva, L., Kablan, A., ÖzemriSağ, Ş., Yıldırım Uz, E., Pirim, D., Temel, Ş.G. 2018. Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) Semptomları Taşıyan Hastalarda Yeni Nesil Dizileme Metodu ile MEFV Genindeki Yaygın ve Yeni Varyantların Taranması. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi , Sözlü Sunum, 7-11 Kasım 2018, Rixos Premium Belek, Antalya.

Aliyeva, L., Kaya, N., Kurt, Z., Kablan, A., Özemri Sağ, Ş., Yıldırım Uz, E., Pirim, D., Temel, Ş.G. 2018. BRCA1 ve BRCA2 Genlerinde Meme ve Over Kanseri ile İlişkili Yeni Varyantların Saptanması ve Analizleri. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Sözlü Sunum, 7-11 Kasım 2018, Rixos Premium Belek, Antalya.

Kaya, N., Alkaya, A., Aliyeva, L., Kablan, A., Pirim, D., ÖzemriSağ, Ş., Yıldırım Uz, E., Temel, Ş.G. 2019. Targeted gene panel sequencing for hereditary kidney diseases: Efficiently detects candidate pathogenic variants related with these disorders. Erciyes Tıp Genetik Günleri, Sözlü Sunum, 21-23 Şubat 2019, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Kablan, A., Kaya, N., Aliyeva, L., Pirim, D., ÖzemriSağ, Ş., Yıldırım Uz, E., Temel, Ş.G. 2019. Molecular diagnosis of connective tissue disorders using targeted gene panel screening. 13th Balkan Congress of Human Genetics, Sözlü Sunum, 17-20 Nisan 2019, Trakya Üniversitesi, Edirne.

Temel, Ş.G., Alemdar, A., Kaya, N., Aliyeva, L., Kablan, A., Pirim, D., Yıldırım Uz, E., ÖzemriSağ, Ş. 2019. Targeted gene panel sequencing for hereditary Cancers: Diagnostic Efficiency. 13th Balkan Congress of Human Genetics, Sözlü Sunum, 17-20 Nisan 2019, Trakya Üniversitesi, Edirne.

ÖzemriSağ, Ş., Kaya, N., Aliyeva, L., Kablan, A., Örnek, Ö., Doğan, B., Pirim, D., Yıldırım Uz, E., Temel, Ş.G. 2019. Identification of BRCA1/2 Variants via Next Generation Sequencing for Therapeutic Approach. 13th Balkan Congress of Human Genetics, Sözlü Sunum, 17-20 Nisan 2019, Trakya Üniversitesi, Edirne.

Yılmaz, E. B., Kaya, N., Aliyeva, L., Kablan, A., Pirim, D., Yıldırım Uz, E., ÖzemriSağ, Ş., Temel, Ş.G. 2019. Genetic evaluation of the CFTR gene and comprehensive analysis of the sequence variants using bioinformatic tools. 13th Balkan Congress of Human Genetics, Sözlü Sunum, 17-20 Nisan 2019, Trakya Üniversitesi, Edirne.

Alemdar, A., Kaya, N., Aliyeva, L., Kablan, A., Pirim, D., Yıldırım Uz, E., ÖzemriSağ, Ş., Temel, Ş.G. 2019. Diagnostic Efficiency of Multiple Gene Panel in Cardiomyopathy and Hereditary Arrhythmias. 13th Balkan Congress of Human Genetics, Sözlü Sunum, 17-20 Nisan 2019, Trakya Üniversitesi, Edirne.

Pirim, D.,Yıldırım Uz, E.,Kaya, N.,Kurt, Z.,Ulusoy, E. 2019. Assessing the Functional Properties of the TMC01 Sequence Variants by Using In Silico Analyses. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*,7(3): 1931 –1946