T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

# *MUTYH* VARYANTLARININ DERİN FENOTİPLEME VE BİLGİSAYAR TEMELLİ YAPISAL BİYOLOJİ ARAÇLARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ravza Nur YILDIRIM**

**İZMİR / 2023**

**T.C.**
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**
**TIP FAKÜLTESİ**
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

# *MUTYH* VARYANTLARININ DERİN FENOTİPLEME VE BİLGİSAYAR TEMELLİ YAPISAL BİYOLOJİ ARAÇLARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ravza Nur YILDIRIM**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**Prof. Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN**

**İZMİR / 2023**

# İÇİNDEKİLER

**KISALTMALAR** ..... **I**

**TABLOLAR DİZİNİ** ..... **III**

**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **IV**

**TEŞEKKÜR** ..... **V**

**ÖZET** ..... **VI**

**ABSTRACT** ..... **VIII**

**1. GİRİŞ VE AMAÇ** ..... **1**

**2. GENEL BİLGİLER** ..... **5**

*2.1. MUTYH Geni* ..... *5*

2.1.1. Genin Moleküler Yapısı ..... 5

2.1.2. Ekspresyonu ve İzoformları ..... 5

2.1.3. Protein Yapısı ..... 8

2.1.4. Protein Fonksiyonu ..... 11

2.1.5. Baz Eksizyonu ile DNA Tamir Sistemi ..... 16

2.1.6. İlişkili Kanserler ..... 17

2.1.7. Genotip-Fenotip Korelasyonu ..... 23

2.1.8. Taşıyıcılık Saptanan Bireylerde Takip Önerileri ..... 24

2.1.9. Tedavi Araştırmaları ..... 25

2.1.10. İlişkili Diğer Klinikler ..... 26

*2.2. Derin Fenotipleme Kavramı ve Kanserde Kullanımı* ..... *27*

**3. GEREÇ VE YÖNTEM** ..... **30**

*3.1. Hasta Seçimi* ..... *30*

*3.2. Verilerin Toplanması* ..... *31*

*3.3. Arşiv Genetik Verilerinin Elde Edilme Metodu* ..... *31*

3.3.1. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu ..... 31
3.3.2. DNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi ..... 32
3.3.3. Hedefli Yeni Nesil Dizileme ..... 33
3.3.4. Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyon Analizi ..... 37
*3.4. Protein Yapısında Varyantların Modellenmesi ..... 39*
*3.5. İstatistiksel Analiz ..... 44*
**4. BULGULAR ..... 46**
*4.1. Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri ..... 47*
*4.2. Varyant Temelli Bulgular ..... 57*
*4.3. Modelleme Sonuçları ..... 64*
*4.4. Olgu Örnekleri ..... 66*
**5. TARTIŞMA ..... 73**
**6. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 91**
**7. KAYNAKLAR ..... 93**
**8. EKLER ..... 116**
EK-1 Etik Kurul Onayı ..... 116
EK-2 Veri Kayıt Formu ..... 117
EK-3 Türler Arası Protein Sekanslarının Hizalanması ..... 119
EK-4 Filogenetik Korunmuş Bölgelerin Görsellenmesi ..... 121
EK-5 Modellenen Yapının Ramachandran Analizi ..... 122
EK-6 Modelde Bölgesel Kalite Değerlendirmesi ..... 123
EK-7 Modelin Enerjetik Olarak Rafine Edilmesi ..... 124

## KISALTMALAR

| | |
|---|---|
| **Å** | Ångström |
| **ACMG** | ‘American College of Medical Genetics and Genomics' |
| **AP** | Apürinik/apirimidinik |
| **bç** | baz çifti |
| **BER** | Baz Eksizyon Onarımı<br>'Base Excision Repair' |
| **dbSNP** | ‘Database for Single Nucleotide Polymorphisms' |
| **dk** | Dakika |
| **DNA** | Deoksiribonükleik Asit |
| **dsDNA** | ‘double-stranded DNA' |
| **ECOG** | ‘Eastern Cooperative Oncology Group' |
| **EDTA** | Etilendiamintetraasetik asit |
| **EEG** | Elektroensefalografi |
| **EKG** | Elektrokardiyografi |
| **EKS** | Evrimsel Korunmuşluk Skoru |
| **EMG** | Elektromyografi |
| **FAP** | Familyal Adenomatöz Polipozis |
| **HGMD** | ‘Human Gene Mutation Database' |
| **HGNC** | ‘HUGO Gene Nomenclature Committee' |
| **HhH** | ‘Helix–hairpin–helix' |
| **HPO** | ‘Human Phenotype Ontology' |
| **IDC** | ‘interdomain connector' |
| **IGV** | ‘Integrative Genomics Viewer' |
| **kb** | Kilobaz |
| **kDa** | Kilodalton |
| **KRK** | Kolorektal kanser |
| **LOVD** | ‘Leiden Open (source) Variation Database' |
| **MAP** | *‘MUTYH*-associated polyposis' |
| **ml** | Mililitre |

| | |
|---|---|
| **MLPA** | ‘Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification' |
| **MLS** | ‘mitochondrial localization signal’ |
| **MMR** | ‘DNA mismatch repair' |
| **MSI** | Mikrosatellit instabilitesi |
| **MSS** | Mikrosatellit stabil |
| **MTS** | Muir-Torre sendromu |
| **NCBI** | ‘National Center for Biotechnology Information' |
| **NLS** | ‘nuclear localization signal’ |
| **OG** | 8-oxoG (7,8-dihidro-8-oxoguanin) |
| **OMIM** | ‘Online Mendelian Inheritance in Man' |
| **PARP** | Poli-ADP riboz polimeraz |
| **PV/LPV** | Patojenik / Muhtemel patojenik varyant |
| **sa** | Saat |
| **SNP** | ‘Single nucleotide polymorphism' |
| **ssDNA** | ‘single-stranded DNA' |
| **TCGA** | ‘The Cancer Genome Atlas' |
| **UCSC** | ‘University of California, Santa Cruz' |
| **VCF** | ‘Variant Call Format' |
| **VUS** | ‘variant of uncertain significance' |
| **YND** | Yeni Nesil Dizileme |
| **µl** | Mikrolitre |

# TABLOLAR DİZİNİ

**Tablo 1.** *MUTYH* Transkriptleri ve İzoformları ..... 7
**Tablo 2.** Dahil Edilme ve Dışlama Kriterleri ..... 30
**Tablo 3.** Genomik DNA İzolasyon Aşamaları ..... 32
**Tablo 4.** Kalıtsal Kanser Risk Paneli Genleri ..... 33
**Tablo 5.** YND Islak Laboratuvar Aşamaları ..... 34
**Tablo 6.** MLPA Islak Laboratuvar Aşamaları ..... 38
**Tablo 7.** MLPA Yorumlanmasında Kullanılan Oranlar ..... 39
**Tablo 8.** Modelleme Hesaplamalarına Dahil Edilen Varyantlar ..... 41
**Tablo 9.** Model Oluşturulurken İzlenilen Yol Haritası ..... 44
**Tablo 10.** Hesaplamalı Yapısal Biyoloji Araçlar ve İşlevleri ..... 44
**Tablo 11.** Aile Taraması Kapsamında Değerlendirilen Bireyler ..... 49
**Tablo 12.** P/LP Varyant Saptanan Malignite Tanılı Olguların Klinik Özellikleri ..... 51
**Tablo 13.** VUS Saptanan Malignite Tanılı Olguların Klinik Özellikleri ..... 55
**Tablo 14.** Saptanan P/LP Varyantların Özellikleri ..... 60
**Tablo 15.** Klinik Önemi Bilinmeyen Varyantların Özellikleri ..... 62
**Tablo 16.** Patojenitesi Bilinen Varyantların Protein Modelindeki Sonuçları ..... 64
**Tablo 17.** Klinik Önemi Bilinmeyen Varyantların Protein Modelindeki Sonuçları ..... 65

# ŞEKİLLER DİZİNİ

*Şekil 1. Kromozom 1 üzerinde MUTYH lokalizasyonu* ..... 6
*Şekil 2. Ökaryotlardan Memeliye MutY ve Hominoidea familyasındaki dağılımı* ..... 8
*Şekil 3. Adenin DNA Glikozilaz Yapısı* ..... 9
*Şekil 4. Demir-Kükürt Kümesi ve Çinko İyonu Yerleşimi* ..... 10
*Şekil 5. MutY Aracılı Adenin Bazının Eksizyonu* ..... 14
*Şekil 6. MUTYH Yapısı ve Etkileşim Partnerleri* ..... 16
*Şekil 7. MUTYH Yapılarının Karşılaştırılması* ..... 42
*Şekil 8. Seçilen AlphaFold MUTYH Protein Yapısı* ..... 43
*Şekil 9. Hasta Seçiminde İzlenen Yol Haritası* ..... 46
*Şekil 10. Modelleme Varyantlarının Seçiminde İzlenen Yol Haritası* ..... 47
*Şekil 11. P/LP Varyant Saptanan Olguların Klinik Tanılarının Dağılımı* ..... 50
*Şekil 12. VUS Saptanan Olguların Klinik Tanılarının Dağılımı* ..... 54
*Şekil 13. Varyantların Güncel Yorumlama Sonrası Patojenite Dağılım Oranları* ..... 57
*Şekil 14. P/LP Varyantların Zigositesi* ..... 58
*Şekil 15. P/LP Varyant Tipi Dağılım Grafiği* ..... 59
*Şekil 16. P/LP Varyantların Gen Üzerindeki Yerleşimleri* ..... 61
*Şekil 17. Genin Fonksiyonel Domainleri* ..... 61
*Şekil 18: Aile Örnekleri* ..... 67

**TEŞEKKÜR**

Bir insan, mevcudiyetini kendisiyle paylaşan ve yaşam seyri esnasında gönlüne dokunan sevgili öğretmenlerine, ailesine, ekip arkadaşlarına ve dostlarına minnettarlığını belirtme konusunda hiç yeterli olabilir mi? Sanmıyorum; lakin (kesinlikle yetersiz olacağımı bilerek) sizleri burada şükranla anmayı deneyeceğim.

Değerli Ayfer Ülgenalp hocam, bana her durumda sakinliği koruyabilmeyi gösterdiğiniz için; değerli Elçin Bora hocam, bir hastanın her şeyden önce bir insan olduğunu ve buna göre davranmanın ehemmiyetini gözetip bana örnek olduğunuz için; değerli Tufan Çankaya hocam, kısıtlı koşulları alternatif yollarla nasıl değerlendirebileceğimi hep ters köşeden gol atarak işaret ettiğiniz için; değerli Özlem Bozkaya hocam, dinamik bir ekiple çalışmayı öğrettiğiniz için; sevgili Semra Gürsoy ablacım, neşeniz ve canlılığınızla sizinle birlikteyken kıkır kıkır bir çalışma alanı sunduğunuz için, sevgili Altuğ Koç abim, kısa zamanda da olsa deneyimlerinizle beni beslediğiniz için; bu tezde emeği olan değerli Ezgi Karaca hocam, sevgili Mehdi Koşaca ve sevgili İrem Yılmazbilek, bilgilerinizle ve desteğinizle bu sürecimde beni yalnız bırakmadığınız için;

Değerli ve sevgili Okay Çağlayan hocam, sadece bu tez sürecinde değil, günün hangi saati olduğu fark etmeksizin herhangi bir derdime geri dönüşleriniz, hoşgörünüz ve toleransınız, her fırsatta bilgiye olan sevginizi bana da aşılamaya çalışmanız, her (ama her) koşulda gayret göstermeye devam ederek örnek olduğunuz için;

Asistanlık sürecimi birlikte yürüttüğüm kıymetli asistan arkadaşlarım ve pek sevgili laboratuvardaki ekip arkadaşlarım, sizinle birlikte olmanın keyfini (ve de stresini :D) bana yaşattığınız ve tez sürecimde gösterdiğiniz anlayış için;

Canım annem Suzan Yıldırım, ilk öğretmenim olarak yaşam yolculuğumun en başından bugüne dek verdiğin daimî destekle bizzat öğrettiğin ya da öğrenmem için alan açtığın her hayat dersi için; ve sevgili bacım, abişim, minik yeğenlerim, topyekun canım ailem, varlığınızla hayat yolculuğumu lezzetlendirdiğiniz için;

Çok teşekkür ederim!
İyi ki varsınız. Dilerim kıymetinizi bileyim.

# ÖZET

## *MUTYH* VARYANTLARININ DERİN FENOTİPLEME VE BİLGİSAYAR TEMELLİ YAPISAL BİYOLOJİ ARAÇLARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Ravza Nur YILDIRIM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İZMİR

*MUTYH* geni, resesif kalıtımlı familyal adenomatöz polipozis (FAP) ve kolorektal kanser (KRK) ile karakterize edilen nadir bir kalıtsal kanser sendromu sebebidir. *MUTYH* geninde her ne kadar farklı mutasyon çeşitleri bildirilmiş olsa da bildirimlerin çoğunluğu yanlış anlamlı değişimlerden oluşmaktadır. Atipik FAP hastalarının %7-10'unda ve atenüe FAP hastalarının %40'ında *MUTYH* geninde biallelik patojenik ya da muhtemel patojenik varyantlar saptanmaktadır. Ancak monoallelik formların net etkisi konusunda ve intestinal sistem dışındaki malignitelerle ilişkisine dair belirsizlik devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında patojenik ve muhtemel patojenik *MUTYH* varyantı taşıyan malignite tanılı 29 hasta ve 8 aile üyesi ile klinik önemi bilinmeyen *MUTYH* varyantı taşıyan malignite tanılı 22 hasta retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışma popülasyonunun oluşturduğu total allel havuzunda yeni nesil dizileme (YND) ile 7 patojenik ve 3 muhtemel patojenik değişim bulunmuştur. Bu değişimlerin %68,89'u yanlış anlamlı, %22,22'si çerçeve içi insersiyon veya delesyon, %6,67'si çerçeve kayması oluşturan ve %2,22'si de kırpılma bölgesi değişimi şeklindedir. En sık varyantlar sırasıyla ENST00000450313.1:c.884C>T, ENST00000450313.1:c.1437_1439del ve ENST00000450313.1:c.734G>A olarak tespit edilmiştir. Delesyon/duplikasyon analizi yapılan toplam 15 olguda kopya sayısı değişimi saptanmamıştır.

Klinik açıdan alt gruplara ayrılarak değerlendirildiğinde olgularda %41 meme kanseri, %28 KRK, %17 endometrium veya over kanseri ve 3 hastada multiple kanser öyküsü şeklinde bir dağılım gözlenmiştir. Aile taraması sayesinde *MUTYH* geninde değişim saptanması üzerine kolonoskopiye yönlendirilen 8 olgunun 3 tanesinde sayısı 1-30 arasında değişen adenomatöz polip varlığı saptanmıştır. Ayrıca daha önce bildirilmemiş ENST00000450313.1:c.1358_1359del varyantı, kliniğiyle birlikte bu tez çalışmasında aydınlatılmıştır.

Bu çalışma modellenen MUTYH protein yapısında yanlış anlamlı varyantların termodinamik etki değişiminin araştırıldığı ilk ve tek çalışmadır. Oluşturulan protein modelinde klinik önemi bilinmeyen dört adet yanlış anlamlı varyant, kullanılan tüm tahmin araçlarında dengesiz etki yönünde termodinamik değişim sonucu vermiştir. Bu değerlendirme sonucuna göre; ENST00000450313.1:c.797C>G varyantı muhtemel patojenik olarak yorumlanmış ve yapılacak fonksiyonel çalışmalar için öncelikli varyant olarak belirlenmiştir. Ayrıca ENST00000450313.1:c.715G>A varyantı da patojenitesinin tekrar değerlendirilmesi için aday varyant olarak tartışılmıştır. Yorumlanması esnasında meydan okuyucu olabilen klinik önemi bilinmeyen varyantların patojenite sınıflandırmasında gün geçtikçe farklı in silico yöntemler ve biyoinformatik yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu minvalde klinik önemi bilinmeyen yanlış anlamlı varyantların yorumlanması yolunda ek bir yöntem uygulanarak yapısal biyolojik araçların kullanımına bu çalışma ile dikkat çekilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *MUTYH*, heterozigot, kolorektal kanser, meme kanseri, protein modelleme, termodinamik etki, yapısal biyoloji araçları

## ABSTRACT

## EVALUATION OF *MUTYH* VARIANTS WITH DEEP PHENOTYPING AND IN SILICO STRUCTURE MODELING TOOLS



Ravza Nur YILDIRIM, MD

Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, IZMIR


The *MUTYH* gene is a rare cause of hereditary cancer syndrome characterized by recessive familial adenomatous polyposis (FAP) and colorectal cancer (CRC). The majority of the reports consist of missense variants, although different types of mutations have been reported in the *MUTYH* gene. Biallelic pathogenic or likely pathogenic variants in the *MUTYH* gene are detected in 7-10% of patients with atypical FAP and 40% of patients with attenuated FAP. Nevertheless, uncertainties maintain regarding the clear effect of monoallelic forms and their relationship with malignancies outside extraintestinal systems.

In this study, 29 patients with a diagnosis of malignancy carrying pathogenic and likely pathogenic *MUTYH* variant and theirs' 8 family members and 22 patients with a diagnosis of malignancy with a variant of unknown clinical significance were evaluated retrospectively. Seven pathogenic and three likely pathogenic variants were found by next generation sequencing in the total allele pool constituted by these study population. These variants types are occured of 68.89% missense, 22.22% in-frame insertion or deletion, 6.67% frameshift and 2.22% splice region changes. The most common detected variants are ENST000000450313.1:c.884C>T, ENST000000450313.1:c.1437_1439del and ENST00000450313.1:c.734G>A, respectively. Any change in copy number was detected in deletion/duplication analysis of 15 index patients.

A distribution in study cohort was observed as breast cancer in 41%, CRC in 28%, endometrial or ovarian cancer in 17%, and multiple cancer history in 3 patients when evaluated by dividing them into subgroups clinically. During family screening, 3 out of 8 individuals referred for colonoscopy due to detected changes in the *MUTYH* gene were found to have adenomatous polyps ranging in number from 1 to 30. Furthermore the novel ENST000000450313.1:c.1358_1359del variant was elucidated together with phenotype of case in this study.

This study is the first and only one that investigates the thermodynamic effect of missense variants among the MUTYH protein structure modeled using in silico structural biology techniques. In the protein model, 4 missense variants of unknown clinical significance resulted in destabilising effect for thermodynamic energy changes in all prediction tools. In accordance with the results of this assessment, ENST000000450313.1:c.797C>G variant was interpreted as likely pathogenic and determined as the priority variant for functional studies to be performed. Moreover ENST000000450313.1:c.715G>A variant is also debated as a candidate pathogenic variant. Several in silico methods and bioinformatics approaches are utilized in the pathogenicity classification of variants of unknown clinical significance which may be challenging during interpretation. In respect of this, this study emphasized the use of structural computational biology tools by applying an additional method for the interpretation of missense variants of unknown clinical significance.

**Keywords:** *MUTYH*, heterozygous, colorectal cancer, breast cancer, protein modeling, thermodynamic effect, structural biology tools

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelinde insan sağlığının önemli bir tehdidi olan kanser, etiyolojisinde genetik ve çevresel etmenlerin karşılıklı rol oynadığı multifaktöriyel bir hastalıktır. Artan yaşlı nüfusu ve popülasyon büyüklüğü nedeniyle kanser insidansı ve mortalitesi hızla yükselmektedir.[1] Hücrenin kontrolsüzce bölünmesi ve çoğalması anlamında kullanılan bu terim, tek bir tanıma sığdırılamayacak kadar kompleks bir süreci ifade etmektedir.[2] Metastaz sonucu hücrenin primer yaşam alanından ayrılarak ikincil bir dokuya yerleşmesi ve burada çoğalması malignitelerin karakteristik özelliklerindendir.[3–7]

Moleküler seviyede seyri oldukça karmaşık olan karsinogenezin temelinde hücrenin proliferatif sinyali sürdürme, büyüme baskılayıcı sinyalden kaçma, hücre ölümüne direnç gösterme, ölümsüz replikasyona sahip olma, anjiyogenezi uyarma/vaskülariteye erişme, invazyon ve metastazı aktive etme gibi özellikler kazanması yatmaktadır.[8,9] Kanser hücresinin sahip olduğu bu özellikler genomik instabiliteye neden olan mutasyonlar sonucu oluşmaktadır.[10] Kansere yatkınlığa sebep olan genlerdeki bir mutasyon germ hücre hattında meydana geldiğinde kuşaklar boyunca aktarılan kanser kliniği oluşmaktadır. Kalıtsal vakaların tüm kanser tipleri içinde %5-10 olduğu tahmin edilmektedir.[11,12] Rehberler kalıtsal kanser ön tanısı olan olgularda, sadece kanser tanılı vaka için değil; risk altındaki aile bireylerine yönelik de yakın klinik izlem ve gerekli durumlarda risk azaltıcı yaklaşımlar önermektedir.[13–15] Bu nedenle kalıtsal kanser sendromu tanısının konulması oldukça önem arz etmekte olup moleküler genetik tetkikler bu sürecin kaçınılmaz bir parçası olarak hizmet etmektedirler. Son yıllarda kullanımı giderek artan yeni nesil dizileme yöntemleri sayesinde, oldukça geniş spektrumu olan kalıtsal kanser sendromlarına kısa sürede, yüksek doğrulukla moleküler tanı konulabilmektedir.[10]

*MUTYH* geni, kodladığı adenin DNA glikozilaz enzimi ile replikasyon sonrası 8-oxoguanin ile yanlış eşleşmiş adenin ya da 2-hidroksiadenin bazını dsDNA'dan uzaklaştırarak G:C→T:A transversiyonunu önlemekte ve böylelikle oksidatif genomik hasara karşı yanıtta görev almaktadır.[16,17] Gendeki hasar yapıcı değişimler sonucu bu görevin yerine getirilememesiyle genomik hasar birikmekte ve karsinogenez süreci

başlamaktadır. Ayrıca biriken genomik hasarın bazı nörodejeneratif ve okülodejeneratif hastalıklara yatkınlığa neden olabileceği düşünülmektedir.[18]

Germline biallelik patojenik veya muhtemel patojenik *MUTYH* varyantı taşıyan bireylerde 60 yaşa kadar %43 ile %100 penetransla kolorektal polipozis ve kolorektal kanser kliniği görülmektedir.[18–23] Herediter kolorektal polipozis tabloları içerisinde yer alan atipik FAP ve atenüe FAP kliniği ile izlenen hastalarda bu genin taranması önerilmektedir.[24,25] Malignite tanılı hastalarda çoklu gen panelleri yardımıyla kanser yatkınlık genlerinin dizilenmesi sonucu birçok farklı kanser türünün de *MUTYH* geniyle ilişkisi açığa çıkarılmaktadır.[18,23] Zigosite fark etmeksizin genin kalıtsal fonksiyon bozukluğunun çeşitli kanser tipleri için değişken derecelerde risk artışına sebebiyet verdiği gözlenmektedir.[26–29] *MUTYH* geni ile ilişkisi daha önceden bilinmeyen kanser türlerinin bile, tümör dokusundan gerçekleştirilen analizlerinde bu gene özgün "imza 36" olarak tanımlanan moleküler imza profilini taşıması, genin diğer kanserlere ilişkin henüz bilinmeyen kısmına ışık tutmaktadır.[30,31] Günümüzde, bu imza profilini taşıyan hastalarda ya da büyük miktarda G:C>T:A transversiyonu içeren tümörlerde *MUTYH* geninin kalıtsal mutasyonlarına yönelik ek tetkik yapılması güncel yayınlarda önerilmektedir.[31,32] Ancak literatürde *MUTYH* geninin intestinal sistem dışındaki farklı kanser türleriyle ilişkisine ya da monoallelik formunun risk artışı yapıp yapmadığına dair belirsizlikler hala devam etmektedir.[22,27,29,32,33]

Çeşitli veri tabanlarındaki bildirimler (dbSNP, LOVD, ClinVar ve Varsome) göz önünde bulundurularak *MUTYH* geninde tanımlanan varyantlar değerlendirildiğinde, tüm mutasyon çeşitlerinin bu gen üzerinde gözlendiği görülmektedir.[34–37] Bu bildirimlerin yarısından fazlasını temsil eden yanlış anlamlı varyantların patojenitesini yorumlamaksa her zaman kolay olmamakta ve ilaveten in silico, in vitro ya da in vivo analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.[38,39] Yüksek bütçe gerekliliği ve yoğun emek gereksinimi olan ıslak laboratuvar çalışmalarına geçmeden önce, varyantları önceliklendirmek ve destekli hipotezler oluşturmak amacıyla in silico analizler kullanılabilmektedir. Biyofizik kuralları dahilinde moleküler potansiyel enerji fonksiyonlarının entegre edildiği ve/veya makine öğrenimi metoduyla otomatize analizlerin gerçekleştirildiği in silico yazılımlar sayesinde yanlış anlamlı bir varyantın yapıdaki termodinamik etkisi tahmini olarak

hesaplanabilmektedir.[40,41] Bilimsel bilginin artışına paralel bir şekilde, kullanılan in silico araçların tahmin sonuçlarında son derece başarılı çıktılar görülmektedir. Hesaplanan skorlar varyantın yorumlanmasında tek başına yeterli olmasa da patojenite sınıflandırmasında katkı sağlamaktadır. Hatta kullanılan araçların validasyonları ile patojenite sınıflandırmasında ACMG (‘American College of Medical Genetics and Genomics') tarafından önerilen kanıt düzeyi değişebilmektedir.[42]

Bu tez çalışmasında herediter kanser ön tanısıyla takip edilen ve moleküler tetkikleri Dokuz Eylül Üniversitesi Genetik Değerlendirme Merkezi’nde (DEGEDEM) tamamlanarak *MUTYH* geninde patojenik, muhtemel patojenik ve klinik önemi bilinmeyen varyant saptanan hastalarda klinik bulgular derin fenotipleme ile retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın amacı *MUTYH* geninde değişim tespit edilen hastalarda klinik bulguların retrospektif olarak detaylıca irdelenmesi, genotip-fenotip ilişkilerinin tartışılması, homozigot ve heterozigot vakaların varyant ekseninde değerlendirilmesiyle fenotipteki farklılıkların gösterilmesidir. Böylece patojenik ya da muhtemel patojenik *MUTYH* gen varyantı taşıyıcı frekansı hesaplanmış, homozigot ve heterozigot formun klinikteki yansıması gözlenmiş ve ekstraintestinal malignitelerin sınıflandırması yapılmıştır. Elde edilen sonuçların benzer literatür verisiyle uyum sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır. Ayrıca oluşturulan yapısal modelde hesaplamalı yapısal biyoloji araçları aracılığıyla tespit edilen yanlış anlamlı değişimlerin termodinamik etkileri hesaplanmıştır. Bu sayede klinik önemi bilinmeyen yanlış anlamlı varyantların patojenitelerinin aydınlatılması yönünde ek bir yöntem uygulanmıştır. Nihayetinde bu çalışma ile *MUTYH* gen varyantı saptanan olguların ülkemizdeki varyant spektrumunu ortaya çıkararak moleküler süreci aydınlatılması ve bir polipozis koli nedeni olan bu kliniğe diğer yönleriyle bakarak dikkat çekilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın soruları şu şekildedir:

- Olgularda tespit edilen *MUTYH* varyantları kanser tipleri arasında farklılık gösteriyor mu? Varyantın pozisyonu ya da tipi fenotip üzerinde etkili mi?

- Henüz kanser tanısı olmayan ve genetik danışmanlık sonrası aile taramasına yönelik moleküler inceleme ile patojenik/muhtemel patojenik *MUTYH* gen varyantı tespit edilmiş olgular kılavuz önerisi ile kolonoskopik değerlendirmeye yönlendirilmektedir. Geriye dönük izlemde, sağlıklı ancak kanser sendromuna yatkınlık geni olarak *MUTYH* varyantı taşıyan bireylerin kolonoskopik değerlendirmesi sonucu tespit edilen polip sayısı yaşla, cinsiyetle ya da varyantın tipiyle ilişkili mi?

- *MUTYH* geniyle ilişkili kanser kliniğinde taşıyıcı frekansı ve en sık gözlenen varyantlar farklı etnik köken ve ülkelerden yapılan hasta serilerinde değişkenlik göstermektedir.[43–46] Bu tez çalışması için belirlenmiş hasta grubundaki varyant çeşitleri ve sıklığı, global literatür ya da yayınlanmış hasta serilerinin verisiyle uyumlu mu? Yoksa Türkiye verisine dair bir kesit olacak şekilde kliniğimizdeki oranlarda bir farklılık saptandı mı?

- Biallelik patojenik/muhtemel patojenik mutasyonların varlığında kliniği tanımlanmış olan bu gen heterozigot formda değişken derecelerde risk artışı ile maligniteye yatkınlığı oluşturmaktadır. Bu çalışmada değerlendirilen olgularda zigositenin etkisi klinik farklılık olarak yansımakta mı?

- *MUTYH* geninde saptanan değişimler için mutasyonel bir sıcak nokta (‘hotspot’) tanımlanmamıştır ve bu değişimler genin tamamında dağınık bir halde yerleşmektedir. [47] Bununla birlikte genin çeşitli fonksiyonel domainleri ve motifleri bilinmektedir.[16,17] Bu bilgiler ışığında, bilgisayarlı yapısal biyoloji araçlarının yardımıyla bu varyantlar değerlendirilebilir mi? Özellikle klinik önemi bilinmeyen değişim taşıyan hastaların moleküler etiyolojiside patojenisiteye dair bir bilgi sağlanabilir mi?

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. *MUTYH* Geni

### 2.1.1. Genin Moleküler Yapısı

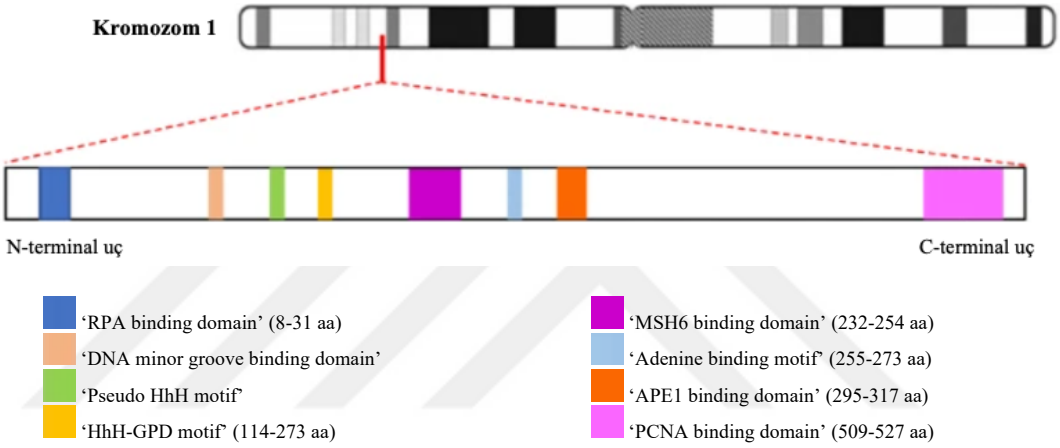
*MUTYH* geni, 1. kromozomun p34.3-p32.1 bandındaki 11.2 kb'lık bir alanda yerleşim gösterir.[47] Eski yayınlarda *MYH* veya *hMYH* olarak anılmakla birlikte bu isimlendirme miyozin ağır zincir protein ailesinin genleriyle benzerliği nedeniyle kafa karışıklığına yol açmış ve HGNC ('HUGO Gene Nomenclature Committee') tarafından adlandırması *MUTYH* olarak kabul edilmiştir.[48] Muhtemel en uzun genom versiyonu olan "NG_008189.1" referans alındığında 18.229 bç boyutundadır.[49] Yaklaşık 1.6 kb'dan oluşan açık okuma çerçevesi ile protein kodlayan bu gen 16 ekzon içermektedir.[50] Bugüne kadar çeşitli sınıflandırmalarla dbSNP, LOVD ve ClinVar veri tabanlarında sırasıyla 6770, 3692 ve 2403 sayıda varyant bildirimi mevcuttur.[34–36] Bu bildirimler; sinonim, yanlış anlamlı, anlamsız, çerçeve kaymasına neden olan, başlangıç ya da sonlanma kodonu kaybı, çerçeve içi indel'ler ve kırpılma bölgesi değişimleri ile farklı mutasyon tiplerinde gözlenmektedir.[35,36,43] Ayrıca nadir olmakla birlikte Güney Avrupa'da muhtemel bir kurucu varyant olduğu düşünülen intron 3'ten 3'UTR'a kadar uzanan 4.2 kb'lık geniş delesyonu ve vaka bazında tek ekzon delesyon bildirimleri mevcuttur.[43,51,52] Olgularda saptanan değişimler sıklıkla fonksiyonel domainlerde olmakla birlikte, herhangi bir bölge ayırt etmeksizin gen boyunca dağılım göstermektedirler.[47] Klinik analizlerde çoğunlukla yanlış anlamlı değişimlerin gözlediği *MUTYH* geninde, saptanan bu değişimlerin protein işlevindeki önemini ve etkilerini değerlendirmek her zaman kolay olmamaktadır.[38]

### 2.1.2. Ekspresyonu ve İzoformları

Negatif zincirden eksprese edilen *MUTYH* geni için alternatif kırpılma sonucu oluşan 10'dan fazla transkript ve en az yedi farklı protein izoformu belirlenmiştir.[16,47,53] Bu izoformlar boyutları ya da ekzon 3 tarafından kodlanıp proteinin N-terminal ucunda yerleşen MLS (Mitokondrial yerleştirme sinyali, 'mitochondrial localization signal') varlığı ile farklılık gösterirler. Mitokondri içerisindeki baskın izoformlar MLS içermekle birlikte, MLS içermeyen izoformlar da mitokondride bulunmaktadır.[53,54] Yani MLS'nin fonksiyonel önemi belirsizdir.[47] Bir

diğer sinyal olan NLS (Nükleer yerleştirme sinyali, 'nuclear localization signal') ise N-terminal ve C-terminal her iki uçta da bulunmaktadır. Bu sinyallerin etkisiyle enzimin glikozilaz aktivitesinin değişebileceği ve/veya çeşitli dokularda ekspresyon düzeylerinde farklılık olabileceği belirtilmektedir.[54] Ancak doku spesifik ekspresyonuna bakıldığında bugüne kadar izoformlar arasında bir farklılık saptanmamıştır. *MUTYH* geninin neredeyse her dokuda eksprese edildiği ve sırasıyla serebellar hemisferler ile serebellum başta olmak üzere beyinde, tiroid bezi ve dalakta yoğun miktarda bulunduğu tespit edilmiştir.[55]

*Şekil 1. Kromozom 1 üzerinde MUTYH lokalizasyonu*




Kromozom 1p34.1'e yakından bakış ve *MUTYH* geninin 535 amino asit uzunluğundaki 2 numaralı protein izoformu üzerinde amino asit yerleşimleriyle fonksiyonel domainler. Şekil Magrin ve ark.'dan alınmıştır.[32] MLS (1-14 aa), NLS (505-509 aa) ve demir-kükürt kümesi bağlayıcı domain (276-292 aa) şekilde gösterilmemektedir. Amino asit pozisyonları için Parker ve ark.'dan yararlanılmıştır.[16]
RPA: 'Replication protein A', HhH: 'Helix-hairpin-helix', APE1: 'AP-endonükleaz-1', PCNA: 'Proliferating cell nuclear antigen, GPD: Glisin-Prolin-Aspartat'

Protein izoform-1, *MUTYH* geninin en uzun olduğu kanıtlanmış transkripti olan MutYα1'den köken almaktadır. Hücrede en bol miktarda eksprese edilen MutYα3 transkriptinden, N-terminal ucunda MLS içeren ve mitokondride yerleşim gösteren izoform-2 oluşmaktadır. Nükleer ortamda en çok bulunan protein izoformu ise MutYβ3, MutYβ5 ve MutYγ3 transkriptlerinden oluşan izoform-4'tür. MutYα1 transkriptinin üçüncü ekzonunun 5' ucunda fazladan üç kodon bulunduran ve hipotetik olarak bu genin muhtemel en uzun transkripti olduğu kabul edilen MutYα5 transkripti ise protein izoform-5'i meydana getirmektedir.[47]

Transkript seçimine bağlı olarak farklı bildirimlerden doğan kafa karışıklığını önlemek için saptanan değişimi adlandırırken hangi transkriptin kullanıldığını not

ederek raporlamanın, özellikle *MUTYH* geninin analiz raporlarında zorunlu olduğu ACMG tarafından vurgulanmaktadır.[56] Tablo 1'de seçili transkript ve izoformlara yönelik bilgiler özet halinde verilmiştir.

**Tablo 1.** *MUTYH* Transkriptleri ve İzoformları




(Şekil Parker ve ark. makalesinden alıntıdır.[16])

| İzoform | Transkript | Aminoasit uzunluğu | AUG 1, 2 ya da 3 | Muhtemel lokalizasyonu | Yorum |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | MutYα1 | 546 | 1 | Mitokondri (Tip 1) | 33 bç insersiyonu |
| **5*** | MutYα5* | 549* | 1* | | MutYα1'in 3. ekzonu 5'ucunda fazladan 3 kodon* |
| **6** | MutYα2 | 536 | 1 | | 3 bç CAG insersiyonu |
| **2** | MutYα3 | 535 | 1 | | Slupska ve ark.'nın klonlama ile deneysel olarak kanıtladığı insandaki homolog MutY[50] |
| **8** | MutYα4 | 429 | 3 | Nükleus (Tip 2) | MutYγ4 benzeri |
| **7** | MutYβ1 | 532 | 2 | | Aynı 33 bç insersiyonu MutYα1 benzeri |
| **4** | MutYβ3 | 521 | 2 | | MutYγ3 benzeri |
| **4** | MutYβ5 | 521 | 2 | | - |
| **3** | MutYγ2 | 522 | 2 | | 5' UTR ucunda çerçeve içi alternatif bir kırpılma bölgesi |
| **4** | MutYγ3 | 521 | 2 | | MutYβ3 benzeri |
| **8** | MutYγ4 | 429 | 3 | | MutYα4 benzeri |

*Parker ve ark.'nın 2003 yılındaki yayınında MutYα5* transkripti ve protein izoformlara yönelik transkript bilgisi bulunmamaktadır. Bu tablo ilgili yayın baz alınarak, *MUTYH* transkript ve izoformlarına yönelik NCBI veri tabanı güncel bilgileri eşliğinde Türkçeleştirilerek oluşturulmuştur.[16,47,57]

Ensembl genom veri bankasında *MUTYH* geninin protein kodlayan en az 19 adet transkripti belirtilmiştir.[58] Seçili transkriptler için GRch37/hg19 genomu referans alındığında RefSeq ve Ensembl karşılıkları şu şekildedir:

MutYα1: NM_012222.2 / ENST00000372098.3,

MutYα3: NM_001048171.1 / ENST00000372115.3

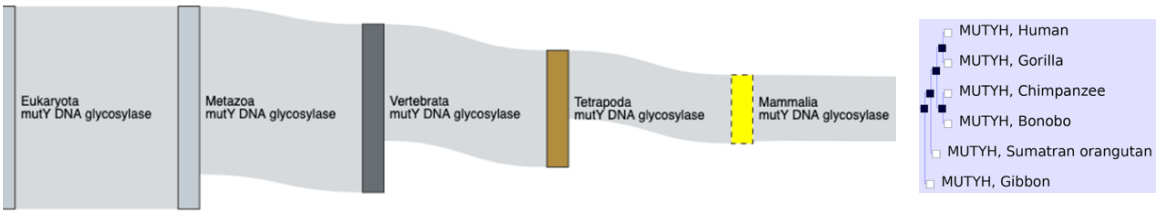
MutYα5: NM_001128425.1 / ENST00000450313.1.[47,58]

*MUTYH* geninin ekspresyonu hücre siklusunun S fazında ve *PCNA* ('proliferating cell nuclear antigen') gen ekspresyonuna paralel şekilde pik

yapmaktadır ve diğer DNA onarım genlerine benzer şekilde *MUTYH* ekspresyonunun da proliferasyon ile tetiklendiği düşünülmektedir.[59,60] Ancak oksidatif hasarla ilişkisine bakıldığında beklendiğinin aksine, oksidatif stres altında genin transkripsiyonu down-regüle olarak mRNA seviyeleri düşmekte ve MutY protein aktivitesi de %70 kadar azalmaktadır.[61] Oksidatif stres zamanlarında modifiye olan farklı bazların yanlışlıkla MutY proteini tarafından eksize edilmesinin önüne geçilmesi için bu aktivite kısıtlanmasının oluştuğu öne sürülmektedir.[62] Bununla birlikte rat beyninde respiratuar hipoksi ile oluşan DNA hasarında koruyucu bir mekanizma olarak MutY mRNA ekspresyonunun arttığı da bildirilmiştir.[63]

İnsan MutY alfa 3 transkripti sırasıyla fare, rat ve E.coli MutY proteinleri ile %78, %74.1 ve %41 benzerlik göstermektedir.[16,17,50,64] Ancak rodent cDNA'sının ikinci metiyoninden başlayan insan MutY$\beta$ transkriptlerinden oluşan izoform-4'e benzerliği daha yüksektir.[63] Farklı türler arasındaki yüksek orandaki benzerliği, bu enzimin evrimsel korunmuşluğunu göstermektedir.[50,65,66] MutY proteinlerinin prokaryotlarda bulunmayan farklı yapısal uzantıları için subsellüler lokalizasyonda ve diğer proteinlerle etkileşimde görev aldıkları düşünülmektedir.[67] Ökaryotlar içinde tüm türlerde evrimsel olarak izlenebilen bu genin filogenetik ağacı ve Hominoidea familyasındaki dağılımı Şekil 2'de verilmiştir.

*Şekil 2. Ökaryotlardan Memeliye MutY ve Hominoidea familyasındaki dağılımı*




(OrthoDB v.11 ve Ensembl veri tabanlarından alıntıdır.[58])

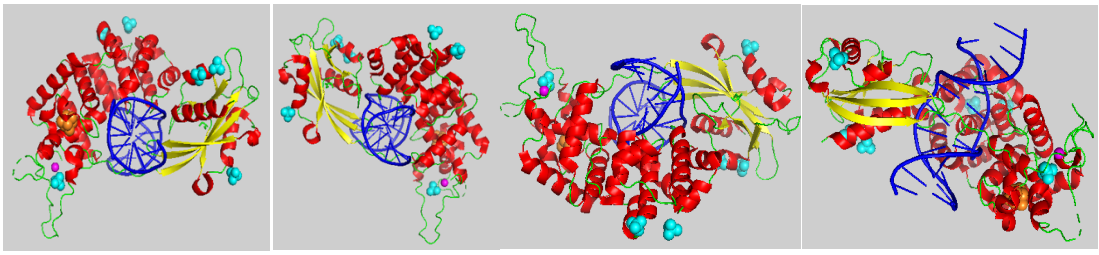
### 2.1.3. Protein Yapısı

*MUTYH* geni baz eksizyon tamirinde görevli bir adenin DNA glikozilaz enzimini kodlamaktadır.[47] İlk olarak E.coli'de keşfedilen MutY proteini, insanda "MutY Homolog" anlamındaki 'MUTYH' kısaltması ile adlandırılmıştır.[68,69]

Mus musculustaki MutY proteininin dsDNA ile etkileşimdeki yapısı 2021 yılında Nakamura ve ark. tarafından X-ray kırınım metodu ile 1.97 Å ve 2.45 Å rezolüsyonlarında gösterilmiştir.[17] Proteinin sekonder yapısı çok sayıda alfa heliks ve beta tabakadan oluşmaktadır. Ayrıca kendisine non-kovalent bağlı birer adet demir-kükürt kümesi ('İron-sulfur cluster') ve çinko iyonu, altı adet sülfat iyonu ve bir adet gliserol ile bütün ligandlarıyla yapısal bütünlük oluşturmaktadır.[16,17,65,70] Ağırlığı izoformları arasında değişmekle birlikte 65 kDa ile 50.52 kDa ölçülmüş olup ortalama 59 kDa'dur.[53,62,66] Proteinin hem nükleus plazmasında hem mitokondri matriksinde bulunduğu gösterilmiştir.[53,71–75]

Proteinin posttranslasyonel modifikasyonları için farklı protein kinazlar tarafından fosforile edildiği bilinmekle birlikte hangi bölgelerin modifikasyona uğradığı ve fosforilasyonun fonksiyona katkısı henüz net olarak bilinmemektedir.[62] Ancak bakteri hücresinden saflaştırılmış rekombinant MutY proteini ile insan hücrelerinden elde edilen doğal MUTYH proteininin aktivitesi karşılaştırıldığında, saptanan dramatik glikozilaz aktivite farklılığının fosforilasyon durumundan kaynaklı olduğu düşünülmektedir.[62]

*Şekil 3. Adenin DNA Glikozilaz Yapısı*

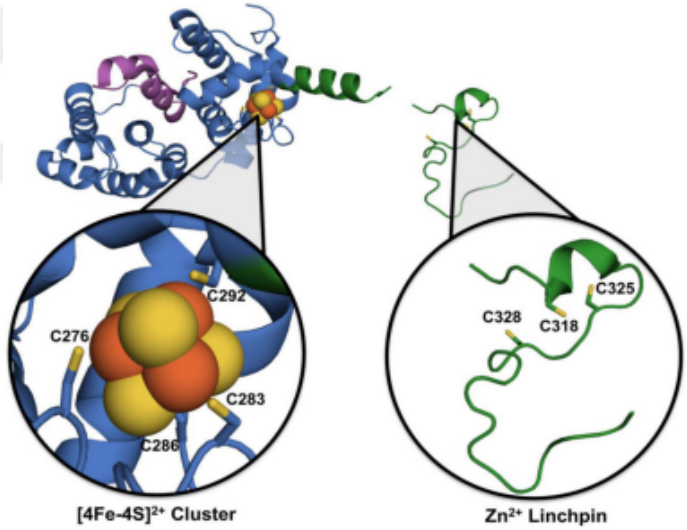


Mus musculus adenin DNA glikozilazı ve etkileşimdeki dsDNA yapısı. Resimler Pymol uygulaması aracılığıyla farklı düzlemsel kesitlerden "PDB_ID: 7EF9" referans alınarak oluşturulmuştur. Renkler "Kırmızı: Alfa Heliks, Sarı:Beta Tabaka, Yeşil: 'Loop' formasyonu, Açık mavi: Sülfat iyonları, Turuncu: Demir-Kükürt kümesi, Pembe: Çinko iyonu, Parlement Mavisi: dsDNA" yapılarını temsil etmektedir.

Demir-kükürt protein sınıfına ait olan MutY için yapılan fonksiyonel çalışmalarda önceleri hem N-glikozilaz hem 3'AP-endonükleaz aktivitesine sahip olduğu düşünülse de sonradan bu deneylerdeki AP (apürinik/apirimidinik) bölgelerindeki ayrılmanın ısı kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Artık enzimin herhangi bir AP-liyaz aktivitesi taşımadığı ve bifonksiyonel olmadığı bilinmektedir.[76,77]

Proteinin N-terminal ucunda yerleşim gösteren ve dört adet sistein aminoasiti (MutYα1 transkriptinden oluşan izoform 1'deki Cys287, Cys294, Cys297 ve Cys303) ile etkileşimde olan demir-kükürt kümesi, esasında bulunduğu enzimlerde bir redoks kofaktörü olarak görev alsa da MutY enziminin bilinen fonksiyonu için redoks kimyasına ihtiyaç duymadığı ifade edilmektedir.[78] Bununla birlikte bu kümenin elektriksel yük transferinde ve hasarlı bazı bulmada görev aldığı düşünülmektedir.[62,78] Birkaç bakteriyel soy hariç, neredeyse bütün türlerdeki MutY enzimlerinde kofaktör olarak görülen bu demir-kükürt kümesinin onarım aktivitesi için elzem olduğu gösterilmiştir.[78,79] Bu kümenin kataliz aktivitesinde direkt rolü olmamakla birlikte, enzimin DNA boyunca uygun şekilde konumlanmasında ve 8-oxoG'nin karşı zincirindeki hatalı eşlenmiş adenin bazının tanınmasında görevinin olduğu addedilmektedir.[38,79]

*Şekil 4. Demir-Kükürt Kümesi ve Çinko İyonu Yerleşimi*




C-terminal 8-oxoG tanıma domaininden yoksun H.sapiens MUTYH fragmanının kristal yapısı (PDB ID: 3N5N). Renkler "Mavi: N-terminal katalitik ünite, Mor: HhH motif, Yeşil: IDC bölge, Turuncu küreler: Demir iyonları, Sarı küreler: Sülfid iyonları, Sarı çubuklar: Sistein liganları"nı temsil etmektedir. Şekil Banda ve ark.'dan alınmıştır.[78]

Görseldeki aminoasit pozisyon bilgileri 535 aa uzunluğundaki izoform 2 (MutYα3) için gösterilmiş olup izoform 1 için karşılık gelen pozisyon bilgileri Clustal Omega v.1.2.4 aracılığıyla elde edilerek aşağıda belirtilmiştir.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| İzoform 1 (MutYα1) | ... | C | 2 | 8 | 7 | T | P | Q | R | P | L | C | 2 | 9 | 4 | S | Q | C | 2 | 9 | 7 | P | V | E | S | L | C | 3 | 0 | 3 | ... | C | 3 | 2 | 9 | A | P | N | T | G | Q | C | 3 | 3 | 6 | H | L | C | 3 | 3 | 9 | ... |
| İzoform 2 (MutYα3) | ... | C | 2 | 7 | 6 | T | P | Q | R | P | L | C | 2 | 8 | 3 | S | Q | C | 2 | 8 | 6 | P | V | E | S | L | C | 2 | 9 | 2 | ... | C | 3 | 1 | 8 | A | P | N | T | G | Q | C | 3 | 2 | 5 | H | L | C | 3 | 2 | 8 | ... |

Demir-kükürt kümesine benzer şekilde, hasarlı bölgenin tanınması ve onarılması için, bir kofaktör olarak çinko iyonuna ($Zn^{+2}$) da gereksinim

duyulmaktadır.[80] Memelilere özgü bir özellik olarak IDC ('interdomain connector') bölgede üç tane sistein aminoasiti (İzoform 1'de Cys329, Cys336 ve Cys339) ile çevrelenen bu çinko iyonunun 8-oxoG:A hatalı eşleşmiş baz çiftinin doğru bir şekilde tanınma, ekzisyon ve onarımı için MUTYH proteininin N-terminal ve C-terminal bölgelerini koordine etmede rolü olduğu gösterilmiştir.[18,78,80]

Enzimin C-terminal ucunda yerleşik nudix tipi motifi ise oksidatif hasara karşı nükleotid havuzundaki 8-oxo-dGTP'nin hidrolizinde görev alan *NUDT1* geninin ürünü ile yüksek homoloji göstermektedir.[60] Bu motif, her iki enzimde de 8-oxoG'nin tanınmasında görev almaktadır.[60,62]

### 2.1.4. Protein Fonksiyonu

İyonizan radyasyon, çeşitli kimyasal ajanlar ve normal hücre metabolizması sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitleri ile DNA üzerinde oksidatif hasar meydana gelmektedir.[81] Guanin bazının düşük redoks potansiyeli, onu oksidatif hasar karşısında duyarlı hale getirir.[79] Bu duyarlılığı neticesinde guanin bazından oksidatif hasarla korelasyonu iyi bilinen genomik bir belirteç olan 8-oxoG (7,8-dihidro-8-oxoguanin, 'OG') meydana gelmektedir.[62,81,82] Replikasyon esnasında genomda bulunan 8-oxoG, hatalı bir şekilde sitozin yerine adenin nükleotidi ile eşleşmekte ve oluşan 8-oxoG:A baz çifti bir sonraki replikasyon döngüsünde G:C>T:A transversiyonlarına yol açmaktadır.[16,20,68,83,84]

Genomdaki 8-oxoG'lerin çoğunluğu, OGG1 DNA glikozilaz tarafından tanınmakta ve hasarlı baz eksize edilerek APE1, pol β, XRCC1 ve DNA ligaz III enzimlerinin dahil olduğu kısa-yama baz eksiyon tamir yolağı (SP-BER, 'short-patch base-excision repair') ile düzeltilmektedir.[62] Şayet bu noktada hasar tamir edilemezse replikasyon sırasında genomda 8-oxoG:A baz çifti oluşmakta ve 8-oxoG ile yanlış eşlemiş adenin bazı postreplikatif süreçte MutY proteini tarafından tanınarak eksize edilmektedir.[16]

Slupska ve ark. MutY proteini için A:8-oxoG veya A:G yanlış eşleşmesi meydana geldiğinde adenin bazını eksize ettiğini göstermişken, Ushijima ve ark. 2-OH-A:G yanlış eşleşmesi durumunda 2-hidroksi-adenin'i eksize ettiğini deneysel

olarak göstermişlerdir. [69,85] Yani bu protein, hatalı bir şekilde guanin bazı ile eşleşmiş olan hem adenin bazını hem de 2-hidroksi-adenin bazını ortadan kaldırmaktadır.

MutY hasarlı zincirdeki oksidasyonla modifiye olmuş bazı çıkarmak yerine, karşı zincirdeki normal bazı eksize ederek "sağlam zincirde" etki gösteren eşsiz bir glikozilazdır.[62] Bu yönüyle oksidatif hasara karşı hücrede koruyucu bir faktör olarak etkili bir şekilde fonksiyon göstermektedir.[18] Nihayetinde 8-oxoG aracılı mutagenez, *OGG1* ve *MUTYH* genleri tarafından kodlanan DNA glikozilazların etkisi ile önlenmektedir. OGG1 enzimi replikasyon öncesinde 8-oxoG:C baz çiftindeki 8-oxoG'e müdahale ederken, *MUTYH*'ın kodladığı adenin glikozilaz aracılığıyla postreplikatif aşamada yanlış eşleşmiş 8-oxoG:A baz çiftindeki adenin bazı eksize edilmektedir.[86]

Farklı organizmalar arasında 8-oxoG'nin mutajenik etkilerinden korunmada görevli DNA tamir yolakları oldukça korunmuş görünmektedir.[66] Nitekim bu evrimsel korunmuşluk canlı organizmalarda oksidatif hasarla başa çıkmanın önemini vurgulamaktadır. Prokaryotlardan itibaren görülen ve ökaryot canlılar içerisinde makroalg grubundaki kırmızı yeşil alglerden, trichinella spiralis gibi nematodlara kadar geniş bir canlılık ağında bulunan MutY homologları filogenetik olarak oldukça eski bir protein ailesi olarak kabul edilmektedir.[50,62,87] Ancak türler arasında MutY protein yapılarında farklılıklar gözlenmektedir. Örneğin; adenin eksizyonunu gerçekleştiren kor yapısı ve OG tanıma bölgesi canlılar arasında yüksek korunmuşluk gösterirken, gelişmiş DNA hasar tamiri yolağındaki farklı genlerle etkileşime giren IDC gibi fonksiyonel yeni domainler sadece daha yüksek ökaryotlarda gözlenmektedir.[79,88]

Evrimsel süreçte pozitif seleksiyon altında geliştiği düşünülen *MUTYH* geninin varyantları için, türlerin dallanmasında faydalı özellikler sağlamış olabileceği söylenmektedir.[89] Genin varyasyonlarına köken olarak bakıldığında; patojenik varyantların hiçbir primat sınıfında görülmediği, kısmen Neandartallerden kaldığı ve esasında yakın insanlık tarihinde ortaya çıktığı saptanmıştır.[88] Benign *MUTYH* varyantlarının ise diğer vertebralılarla paylaşılan evrim ağacının sırasını takip ettiği gözlenmiştir.[88] Filogenetik ve arkeolojik analiz sayesinde *MUTYH* genindeki varyantların evrimsel kökenini araştıran bu yeni çalışmada, türlerin dallanmasında

faydalı gibi görünen varyasyonun kanser kliniği reprodüktif dönem sonrasında ortaya çıktığı için aslında canlıya faydalı herhangi bir özellik sağlamadığı vurgulanmaktadır.[88]

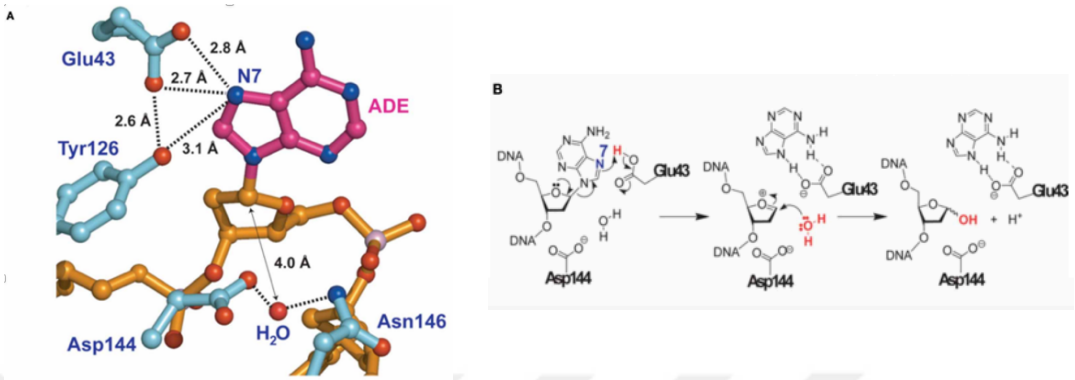
Fonksiyonel açıdan DNA glikozilazlara bakıldığında, oldukça fazla miktarda normal bazın içinden DNA üzerinde gizlenmiş hasarlı bazı bulup çıkarabilmeleri ile oldukça dikkat çekmektedirler.[67] Bir DNA glikozilaz olarak MUTYH'nın katalitik aktivitesi kabaca 3 kısımda incelenebilir; 8-oxoG substratının tanınması ve bağlanma, N-glikozidik bağın hidrolizi ile baz eksizyonu ve oluşan AP bölgeden enzimin ayrılması.[62] Bir DNA glikozilazın aktif bölgesi yalnızca ekstrahelikal bir bazı barındırabilir.[67] MUTYH için bu baz hem adenin hem de 2-hidroksi-adenin'dir.[69,85] Ancak MUTYH oluşmuş hasarlı baz lezyonuna dsDNA'da oldukça spesifik bir şekilde etkiliyken ssDNA üzerinde inaktiftir.[67]

Enzimin yapısına yakından bakıldığında C-terminal ucunun substrata bağlanmada ve 8-oxoG'e özgünlükte rol oynadığı saptanmıştır.[62,65] N-terminal ucunda ise diğer baz eksizyon tamir genlerine benzer şekilde HhH ('Helix-hairpin-helix'), psödo HhH ile demir-kükürt küme motifi bulunmaktadır ve katalitik bölgenin burada yerleştiği düşünülmektedir.[60,90]

Geobacillus stearothemophilus üzerinde yapılan bir çalışmada, enzimin lezyon tanıma cebinde Asp144 ile Asn146 arasında bir nükleofilik su molekülünün konumlanmasının ardından adenin bazının N7 azotunun aktif bölgedeki Glu43'ün karboksil grubu yardımıyla protonlanmakta olduğu ve bu elektron aktarımı sayesinde baz ile şeker arasındaki N-glikozidik bağın parçalandığı gösterilmiştir.[91] Baz ayrılırken, deoksiriboz şekerin C1 atomu ile yakınındaki Asp144'ün karboksil grubu arasında oluşan elektrostatik güç ile geçici kovalent bir ara ürün oluşmaktadır. Bu geçici asetal ara ürün Glu43 tarafından aktive edilen su molekülü yardımıyla hidrolize edilerek abazik bölge meydana gelmektedir.[91] Enzimin yapısındaki bu iki amino asit (Asp144 ve Glu43) yan gruplarında bulunan karboksilik asit yapısı sayesinde katalitik aktivasyonda ve elektrostatik dengenin sağlanmasında önemli görünmektedirler.[65,92] Benzer şekilde insandaki MUTYH proteini için bu iki aminoasitin (insan protein izoform 1 için karşılığı Asp233 ve Glu131) oldukça korunmuş olduğu

gözlenmektedir.[78] Şekil 5'te MutY'deki fonksiyonel aminoasitlerle etkileşen adenozin substratı ve enzimin adenin bazını uzaklaştırma mekanizması gösterilmektedir.

*Şekil 5. MutY Aracılı Adenin Bazının Eksizyonu*




A) MutY proteininin katalitik bölgesi ile etkileşen adenozin substratı.

B) G. Stearothermophilus'ta yapısal bilgiye[91] dayalı olarak önerilen glikolitik mekanizma.

Şekil Markkanen ve ark.'dan alınmıştır.[62] İnsan MutYa1 izoformundaki aminoasit pozisyonlarının karşılığı için paragrafta bilgiye bakınız.

Fenilalanin gibi büyük aromatik aminoasitler bulundukları proteinde DNA heliksiyle interkalasyon yaparak zincirin sorgulanmasında görev alırlar. Bu bilgiden yola çıkarak MutY enziminin oldukça korunmuş tirozin rezidüsünün (E.coli'deki Tyr82, B. Stearothermophilus'daki Tyr88 ve insandaki Tyr176) benzer rolü olduğu öne sürülmektedir.[78] Tirozin kamasında oluşan interkalasyon sayesinde adenin bazının enzimdeki aktif bölgeye kayması sağlanmakta ve bu esnada bükülmüş DNA'nın stabilizasyonunu sağlamak için katalitik aktivasyon enerjisi düşürülmektedir.[17,78] Yine bir başka tirozin rezidüsü (B. Stearothermophilus'daki Tyr126, insanda Tyr215) yan grubundaki hidroksil grubu sayesinde, geçici asetal ara ürün olan oksakarbenium molekülünün stabilizasyonunda görev almaktadır.[78]

Yanlış eşleşmiş OG:A hasar tamiri için adenin bazının eksize edilmesinden bağımsız olarak MUTYH proteinin DNA hasar yanıtında çok daha kriptik bir şekilde yer aldığı düşünülmektedir. Yapılan son deneysel çalışmalar, bir takım esrarlı özelliklerin proteinin iki ucunu birbirine bağlayan 56 aminoasit uzunluğundaki IDC bölgesinde gizlendiğini göstermektedir.[78,79] Nitekim sitotoksik DNA lezyonlarının onarımı ile ilgili diğer proteinlerle etkileşimleri MutY'nin oksidatif hasar onarımı dışında da rolü olabileceğini desteklemektedir.[16] Bunlardan biri MSH2/MSH6 protein kompleksiyle olan etkileşimidir. Kompleksin MSH6 alt ünitesi MUTYH enziminin

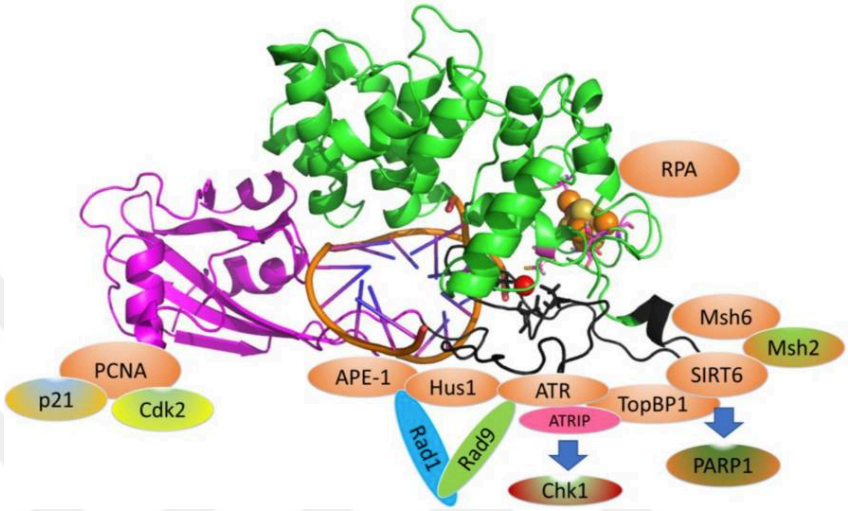
katalitik glikozilaz aktivitesinin artmasında ve bağlanma afinitesini arttırarak substrat tanınmasının güçlenmesinde fiziksel ve fonksiyonel destek sağlıyor görünmektedir.[60,92] Ayrıca MSH6-eksik hücrelerde gözlenen artmış düzeydeki G:C>T:A transversiyonları MutY'nin glikozilaz aktivitesinin sürdürülmesi için bu etkileşimin gerekli olduğunu destekler niteliktedir.[16]

MUTYH'nın bir başka etkileşim partneri SIRT6 proteinidir. Yoğun oksidatif hasar sonrası her iki zincirde oldukça fazla miktarda 8-oxoG:A lezyonları oluşmakta ve MUTYH aracılı adenin eksizyonu ile genomda AP bölgeleri birikmektedir.[78] Baz içermeyen ancak şeker-fosfat omurgasının korunduğu bu bölgelerde, AP-endonükleaz aracılığıyla fosfodiester bağlarının kesilmesi sonucu tek zincir kırıkları meydana gelmektedir.[78] Genomda kayda değer bir oranda 8-oxoG:A meydana geldiğinde, MUTYH'nın SIRT6 proteini ile etkileşimi aracılığıyla PARP (Poli-ADP riboz polimeraz) aktivasyonunda görevli olduğu belirtilmektedir.[79] Nükleusta biriken tek zincir kırıklarını bir sensör gibi algılayan PARP, apoptoz indükleyici faktörü aktive etmekte ve hücrede ATP ile NAD+ konsantrasyonlarının tükenmesi sonucu apoptoz gerçekleşmektedir.[78] Mitokondride ise bu olay kalpain aktivasyonu sonucu lizozomal rüptürün indüklenmesi şeklinde nekrotik bir süreci başlatmaktadır.[78] Yani MUTYH aracılı hasar tamirinin ileri yolağında oluşan toksik tek zincir kırıkları ile aşırı hasar meydana geldiği anlaşılmakta ve hücre ölümüne apoptotik ya da nekrotik olacak şekilde farklı yolaklardan katkıda bulunulmaktadır.[62] Özetle MUTYH'nın fonksiyonu sayesinde hücrede mutasyona uğramış genetik formasyonun yavru hücreye aktarımı iki şekilde önlenmektedir; ya 8-oxoG:A oluşumu nedeniyle kaybolan G:C baz çiftinin geri kazanılmasına yardımcı olarak ya da uygun onarımın sağlanamaması durumunda tek zincir kırıklarının birikimiyle apoptotik ya da nekrotik hücre ölümüne aracı olarak.[78]

Hücresel fitness için MUTYH'nın başka yolaklarla olan etkileşimleri de elzem görünmektedir. Örneğin; heterotrimer yapısındaki kompleks 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1) Hus1 alt grubu ile MUTYH'nın IDC bölgesini bir yapı iskelesi gibi kullanmaktadır.[79] APE1'le birlikte MUTYH'nın bu 'checkpoint' proteinleri ile etkileşimi '9-1-1 kelepçe formasyonu' oluşumunu güçlendirmektedir.[93] Aynı zamanda Hus1 proteininin SIRT6'nın IDC bölgesindeki stabilizasyondan sorumlu olduğu kabul edilmektedir.[79]

Bu karşılıklı etkileşimlerin S fazı kontrol noktası aktivasyonunda görev aldığı tahmin edilmektedir.[86] Ayrıca MUTYH'nın hızlı DNA hasar yanıtında ATR kinaz aracılığıyla Chk1 fosforilasyonunu gerçekleştirmesi ve Chk1 ekspresyonunun artışında rolünün saptanması bu kanıyı destekler niteliktedir.[79]

*Şekil 6. MUTYH Yapısı ve Etkileşim Partnerleri*




Turuncu ile gösterilen proteinler doğrudan MUTYH ile etkileşime girdiği raporlanan partnerler iken, gölgeli gösterimler aksesuar ya da ileri yolak partnerleridir. N-terminal adenin glikozilaz bölgesi yeşil, C-terminal bölge pembe ve IDC bölge siyah renkle gösterilmiştir. Şekil Raetz ve ark.'dan alınmıştır.[79]

Sonuç olarak MUTYH proteini salt bir adenin DNA glikozilaz değildir. Etkileşimde bulunduğu partnerleri aracılığıyla hızlı DNA hasar yanıtında hem sinyal görevi taşımakta hem de bu yolaklarda multifonksiyonel bir iskele gibi yer almaktadır.[79] MUTYH proteini, baz eksizyon tamirinde hatalı olarak eşleşmiş bazın çıkarılmasındaki görevinin yanı sıra; hasarın giderilememesi durumunda diğer DNA hasar yanıtlarını aktifliyor görünmektedir.[78,86]

### 2.1.5. Baz Eksizyonu ile DNA Tamir Sistemi

Genomik stabilitenin sürdürülebilmesi amacıyla insan vücudundaki DNA tamir sistemleri sofistike bir şekilde hizmet etmektedirler.[94] Bu sistemdeki herhangi bir bozukluğun deaminasyon, metilasyon ve oksidasyon ile genomik hasar oluşturarak hücreyi karsinojenik transformasyona sürükleyen yollardan biri olduğu düşünülmektedir.[95]

DNA üzerindeki sitozin bazının deaminasyonunu ile oluşan urasil bazı üzerinde etkili bir enzim arayan Lindahl; bir nükleaz aktivitesi ararken beklenmedik bir şekilde deoksiriboz şeker ile urasil bazı arasındaki bağı parçalayan bir enzim olan DNA glikozilazı bularak baz eksizyonu ile tamir sisteminin keşfine olanak sağlamıştır.[96]

Baz eksizyonuyla hasar tamiri, şeker-fosfat omurgasına dokunmaksızın yanlış eşleşmiş ya da modifiye olmuş bazın eksize edilmesiyle başlamaktadır.[16] BER sisteminde bir DNA glikozilazla inisiasyondan sonra ya kısa-yama yolağı ile tek nükleotidlik boşluk oluşturularak uygun şekilde tamir süreci gerçekleşmekte ya da uzun-yama yolağı ile 2-10 nükleotidlik boşluk oluşumu sonrası onarım yapılmaktadır.[67] Kısa-yama BER yolağı hem proliferatif hem non-proliferatif hücrede dominant yolak olarak gözlense de özellikle proliferatif hücrelerde postreplikatif süreçteki tamirler için uzun-yama yolağı da elzem görünmektedir.[67] Bu yolaktaki genlerin hepsi için fonksiyon bozukluklarının kanser predispozisyonuna aday olabileceği söylenmekle birlikte, şu ana kadar *MUTYH* geni dışında BER sisteminin diğer genleri ile kolorektal kanser ve polipozis fenotipi arasında bir ilişki saptanmamıştır.[60,97]

Genel olarak DNA onarım sistemlerine bakıldığında, bu yolaklarda oluşan bir aksaklığın tedavide etkinlik artışına ve daha iyi prognoza sahip olduğu bildirilmiştir.[98,99] Metastazın ise DNA onarım sistemlerindeki genlerin overekspresyonu ile yeterli genetik kararlılığa ulaşan primer tümörde gerçekleştiği ifade edilmektedir.[100–102] Yani normal hücrede genomik bütünlüğün sürdürülmesindeki desteklerinin yanı sıra, bu sistemlerin kanser hücresinde henüz tam aydınlatılmayan etkileri mevcuttur. Bu minvalde maligniteye yönelik anlayışın geliştirilmesi açısından DNA tamir sistemlerinin fonksiyonel mekanizmalarının çözülmesi oldukça önemlidir.[102]

### 2.1.6. İlişkili Kanserler

İlk kez 2002 yılında multiple adenomatöz polipozis ve kolorektal karsinom kliniği ile etkilenmiş üç kardeşin bulunduğu Kafkas kökenli İngiliz bir ailede *MUTYH* ilişkili adenomatöz polipozis ve kolorektal kanser (MAP, '*MUTYH*-associated

polyposis') kliniği tanımlanmıştır.[20] Bu ailedeki etkilenmiş bireylerin *APC* geninde herhangi bir kalıtsal mutasyon barındırmamasına rağmen tümör dokusu analizinde toplam 18 adet somatik *APC* inaktivasyonlarından 15'inin G:C>T:A transversiyonu olduğunun gözlemlenmesi, bu durumun transversiyonu tamir eden genlerdeki fonksiyon bozukluğundan kaynaklı kalıtsal bir sendrom olabileceğini düşündürmüş ve baz eksizyonuyla DNA tamir sisteminde rol oynayan *OGG1*, *MUTYH* ve *MTH1* genleri incelenmiştir. Böylelikle *MUTYH* geninde bileşik heterozigot durumda patojenik p.Tyr179Cys (eski ismiyle p.Tyr165Cys) ile p.Gly396Asp (eski ismiyle p.Gly382Asp) mutasyonlarının saptanmasıyla otozomal resesif kalıtılan MAP tablosu literatürde yerini almıştır.[20]

MAP, resesif kalıtımlı yüksek riskli bir kolorektal kanser yatkınlık sendromudur.[22] Etkilenmiş bireylerde kolon ve rektum başta olmak üzere, duodenum ve midede de olmak üzere gastrointestinal kanalda çok sayıda adenomlar ya da hiperplastik polipler gözlenmektedir.[60] Herediter kolorektal polipozisle giden klinik tablolar içerisindeyse *MUTYH* ilişkili bu sendrom farklı oranlarda gözlenmektedir. Polip sayısının 100'den fazla olması ile karakterize familyal adenomatöz polipozis (FAP) kliniği olan hastalarda biallelik *MUTYH* mutasyonu taşıma oranı %7-10 iken, 10'dan fazla ancak 100'den az polip taşıyan atenüe FAP kliniği olan hastaların %40'ında kalıtsal *MUTYH* mutasyonları bulunmaktadır.[24,25] Ancak MAP hastaları için artmış kolorektal karsinom riski polip varlığından bağımsızdır.[27,103]

Kalıtsal polipozis tablosuna neden olan farklı kliniklerin cilt tutulumları da değişkenlik göstermektedir. Örneğin; FAP hastalarında gözlenen desmoid tümörler MAP hastalarının hiçbirinde gözlenmezken, Lynch sendromunun fenotipik varyantı kabul edilen Muir-Torre sendromunun (MTS) karakteristiği olan sebase bez tümörleri MAP hastalarında bildirilmiştir.[23] Genel popülasyonda görece nadir olan cildin sebase tümörleri (sebaseöz adenom, sebaseoma, ekstraoküler sebaseöz karsinom... vb.) MTS'nin iyi bilinen bir özelliğidir.[104] Fakat Muir-Torre sendromu ön tanısıyla takip edilen bazı olgularda, kalıtsal patojenik *MUTYH* değişimleri saptanmıştır.[23,104–106] Ayrıca MTS'li hastaların klinik tanımlamasında yer almayan sebase bez hiperplazileri de MAP hastalarında raporlanmıştır.[105] Bunların dışında, tipik olarak FAP hastalarında bildirilen lipom, konjenital retinal pigment epitel hipertrofisi, osteoma, epidermoid

kist, desmoid tümör ve pilomatrikoma ise çok az sayıda MAP hastasında bildirilmiştir.[60]

Biallelik patojenik veya muhtemel patojenik *MUTYH* varyantı taşıyan bireylerde kolorektal kanser penetransının 60 yaşa kadar %43 ile %100 arasında değiştiği tahmin edilmektedir.[21–23,103] Duodenal polipler MAP hastalarının %17-34'ünde gözlenirken, duodenum kanseri için yaşam boyu risk yaklaşık %4'tür.[23,107,108] 20.000'den fazla olgunun ve 15.000'den fazla kontrol grubunun değerlendirildiği bir meta-analiz çalışmasında biallelik formda *MUTYH* varyantları taşıyan bireyler için kolorektal kanser gelişim riski genel popülasyona göre 28 kat artmış olarak hesaplanmıştır.[109] Başka bir çalışmada ise kalıtsal monoallelik ya da biallelik *MUTYH* varyantı taşıyan 39 kolorektal kanser hastası ve onların birinci derece akrabalarından 300 kişinin analiziyle biallelik formun 50 kat ve monoallelik formun 3 kat kolorektal kanser risk artışına neden olduğu raporlanmıştır.[27,29] Ancak heterozigot varyantların kayda değer bir risk artışı yapmadığını ya da ılımlı bir risk oluşturduğunu belirten yayınlar da mevcuttur.[22,27,110] Bununla birlikte, daha nadir varyantların daha yüksek penetranslı olabileceği ve bu yüzden MAP hastalarında yaygın mutasyonlara yönelik kısıtlı genotipleme ile kolorektal kanser riski arasında kurulan ilişkinin aslında hesaplanandan daha yüksek olabileceği belirtilmektedir.[60]

Kafkas ırkında yaygın görülen c.536A>G / p.Tyr179Cys ve c.1187G>A / p.Gly396Asp varyantları için heterozigot formda taşıyıcılık oranı %1-2'dir.[111] Kafkas ırkında MAP hastalarının %70'e kadar yüksek bir kesiminde biallelik durumda bu iki amino asit değişiminin bulunduğu ve Avrupa popülasyonundaki MAP hastalarında neredeyse %90 oranında bu iki değişimden birinin taşındığı düşünülmektedir.[19,20] Ancak diğer etnik kökenlerde bu iki değişimin dışında farklı *MUTYH* varyantları yaygın olarak bulunmaktadır. Bu varyantlar sırasıyla; batı toplumlarında c.1147del / p.Ala385fs, Flemenklerde c.1214C>T / p.Pro405Leu, İtalyanlarda c.1437_1439del / p.Glu480del, İngiliz Hintlilerde c.1438G>T / p.Glu480Ter, Pakistanlılarda c.312C>A / p.Tyr104Ter, İspanyol, Portekiz ve Tunuslularda c.1227_1228dup ve Japonlar ile Korelilerde c.857G>A / p.Gly286Glu şeklindedir.[19,43,60]

MAP hastalarında görülen kolorektal kanserin sağ kolon yerleşimli, çoğunlukla MSS (mikrosatellit stabil) ya da MSI-L (düşük mikrosatellit instabilite,

'low microsatellite instability'), diploid ve faal bir immun yanıtı gösteren görece yüksek oranda tümör lenfosit infiltrasyonu (TIL, 'tumor-infiltrating lymphocyte') içermekte olduğu belirtilmektedir.[60] Sporadik KRK'e kıyasla MAP hastalarında daha iyi sağkalımın görülmesi bu aktive olmuş immun sistemin varlığıyla açıklanmaktadır.[60] Ayrıca Lynch sendromlu hastaların tümörlerinde yaygın olarak gözlenen HLA-1 kaybı MAP karsinomlarında da sıklıkla gözlenmektedir.[112] Ancak MAP hastalarında MMR eksikliği beklenen bir özellik değildir. Literatürde biallelik patojenik *MUTYH* varyantı taşıyan birkaç KRK olgusunun MSI (mikrosatellit instabil) olduğu bildirilmiş olmakla birlikte, bu durumun nadir olduğu kabul edilmektedir.[110] Toplam mutasyon yükü açısından değerlendirildiğinde MSI karsinomlarda mikrosatellit-stabil tümörlere nazaran 10 kat artmış tümör yükü bulunurken, MAP hastalarında gelişen karsinomlarda bu artış sadece 2 kat ile sınırlıdır.[30] Nitekim MAP hastalarında tümör gelişimi için MSI yaygın bir yolak değildir; ancak MAP karsinomlarının karakteristik olarak MSI olan Lynch sendromuna ve sporadik MSI-H kolorektal tümörlerine benzer bir takım histolojik özellikler gösterdiği kabul edilmektedir.[60,113] Bu özellikler; tercihen proksimal yerleşimli oluşu, metakron ve senkron tümör gözlenmesi, yüksek oranda müsinöz doku tipi ile prezentasyonu ve artmış tümör lenfosit infiltrasyonudur.[113]

MAP hastaları genel popülasyonla kıyaslandığında yüksek insidansa sahip olan ekstra intestinal kanserlerle de ilişkilidir.[23] Kalıtsal patojenik *MUTYH* varyantları gastrik kanser, mesane kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, endometrium kanseri, akciğer kanseri, çocukluk çağı lösemisi, baş-boyun tümörleri, hepatosellüler karsinom ve kolanjiokarsinoma ile ilişkili bulunmuştur.[18,23,31–33,79,114] Bunlara ek olarak, MAP hastalarının KRK'in yanında tiroid kanseri de geliştirdiği birçok farklı çalışmada gösterilmektedir.[23,106,115] Yapılan bir kohort çalışmasında intestinal sistem dışında genel malignite geliştirme insidansı neredeyse 2 kat artışla ilişkilendirilmiş ve tümör gelişim riski yaşam boyu %38 olarak saptanmıştır.[23] Ancak MAP hastalarında yüksek oranda artmış KRK riski iyi bilinmesine rağmen ekstraintestinal kanserler ve monoallelik patojenik varyantlar söz konusu olduğunda risk değerlendirmesi belirsizliğini korumaktadır.[32]

Kanser tanılı bireylerde kalıtsal patojenik monoallelik *MUTYH* varyant frekansı genel popülasyona göre yüksek olsa da tümör tipleri arasında dağılım homojen değildir ve çeşitli kanser tiplerinde *MUTYH* geni ile ilişkili insidans ve tümör gelişim riski değişkenlik göstermektedir.[26] Örneğin; bir çalışmada biallelik *MUTYH* mutasyon taşıyıcılarında genel popülasyon ile over kanseri ve mesane kanseri insidansı karşılaştırıldığında sırasıyla 17 ile 19 kat risk oranı (HR, 'hazard ratio') saptanmıştır.[33] Aynı çalışmada gastrik, hepatobiliyer, endometrial ve meme kanserleri için ise sırasıyla 9.3, 4.5, 2.1 ve 1.4 risk oranı hesaplanmıştır.[33] Bu anlamda biallelik durumda artmış mesane ve over kanseri riskinden söz edilirken; monoallelik formun gastrik kanser, meme kanseri, endometrium kanseri ve hepatobiliyer sistem maligniteleri için kayda değer oranda artmış riske neden olduğu yorumu yapılmaktadır.[29] Benzer şekilde bir başka çalışmada over, mesane ve cilt kanserleri insidansında belirgin artış ve meme kanserine eğilim oluşturan bir risk artışı saptanmıştır.[23] Bunlara ek olarak zigosite fark etmeksizin *MUTYH* genindeki kalıtsal p.Tyr179Cys varyantının erkek meme kanseri için düşük-orta penetranslı bir risk alleli olduğu belirtilmektedir.[116] Meme kanseri gelişim riskinde *MUTYH* geninin *BRCA1* gibi diğer kanser yatkınlık genleri ile etkileşiminin rolü olabileceği düşünülmektedir.[79,117] Öte yandan meme ve over kanserlerinde germline *MUTYH* patojenik varyantlarının ilişkisiz olduğunu belirten yayınlar da mevcuttur.[33,116,118]

Sadece farklı kanser tipleri değil, premalign bir lezyon olarak kabul edilen Barrett özofagus da MAP hastalarında 5 kat daha sık görülmektedir.[119] Ayrıca serbest oksidatif radikallerin oluşturduğu DNA hasarının tamir edilememesi sebebiyle bu lezyonun MAP hastalarında daha hızlı malign transformasyona uğradığı ifade edilmektedir.

MAP hastalarında karsinogenezin lokasyon tercihli gelişiminde bölge spesifik bir tutulum sonucu malignite çeşitliliğinin olabileceği düşünülmektedir.[32] Oksidatif strese maruz bırakılan *MUTYH* -/- farelerde belirgin kardiyak, hepatik ve renal doku hasarı görülürken pulmoner dokunun daha az incinmesi bu hipotezi deneysel olarak desteklemektedir.[120] Monoallelik ve biallelik kalıtımın birbirinden farklı kliniklere sebep olmasında ise zigosite ile hücre ve/veya doku tipine göre fonksiyonel hasar yapıcı etkide değişkenlik oluşmasının rolü olabilir. Monoallelik kalıtımda meydana

gelen karsinogenez somatik bir mekanizma sonucu hücredeki fonksiyonel allelin kaybı neticesinde gerçekleşmektedir.[26,79] Nitekim *MUTYH* eksikliğiyle ilişkisi daha önceden bilinmeyen pankreatik nöroendokrin tümör ve adrenokortikal kanserlerle ilgili genom çapında iki ayrı çalışmada olguların heterozigot *MUTYH* mutasyonu taşıyıcısı olduğu saptanmıştır.[79] Devamında gerçekleştirilen analizler sayesinde G:C>T:A transversiyonlarının baskın olarak bulunduğu tümörlere sahip bu hastalarda *MUTYH* gen lokusunda somatik heterozigotluk kaybı doğrulanmıştır.[79] Bu nedenle genel risk düşük olsa da, heterozigotluk kaybı olaylarının sık gözlendiği adrenokortikal karsinom gibi tümörlerin gelişim riskinin monoallelik patojenik *MUTYH* varyant taşıyıcılarında yüksek olduğu belirtilmektedir.[26]

Germline patojenik *MUTYH* mutasyonlarının kalıtsal kanser yatkınlığı ve polipozis kliniği için yüksek riskli ilişkisi mevcutken, genin somatik mutasyonlarının yalnızca sporadik kolon kanserlerinin patogenezinde rolünün olabileceği ifade edilmektedir.[121,122] Bununla birlikte, baz eksizyon tamir sistemi başarısızlığının bir sonucu olarak MAP hastalarında; başta *APC* ve *KRAS* genleri olmak üzere, onkogenezle bağlantılı diğer genlerde somatik G:C>T:A transversiyonlarının birikimi gözlenmektedir.[20,68,84] Özellikle sporadik KRK'li bireylerde %5-10'dan az gözlenen *KRAS* genindeki patojenik c.34G>T değişimi MAP hastalarında gelişen adenomlarda %40-100 ve KRK'de %60-90 oranlarında görülmektedir.[30,60] Dahası, *KRAS* geninde bu somatik değişimi taşıyan KRK'li bireylerin %10-25'i *MUTYH* geninde germline biallelik patojenik varyant taşımaktadır.[30,123,124] MAP hastalarında tümörogenezin bu somatik mutasyon birikimlerinin sonucunda başladığı ve kanserin hipermutator bir fenotip gösterdiği ifade edilmektedir.[19,121,125,126] Nitekim hastalığın erken döneminde dahi mutator fenotipin varlığını konfirme edecek şekilde, somatik mutasyonlar erken evre MAP adenomlarında kayda değer oranda yüksek derecede bulunmaktadır.[79]

Tümör dokusundan yapılan analizler sayesinde MAP hastalarındaki kolorektal karsinomlarda oldukça fazla sayıda bulunan G:C>T:A transversiyonlarının "imza 36" ('COSMIC signature 36'; 'SigProfiler SBS18/SBS36'; 'SignatureAnalyzer SBS18/SBS36') olarak adlandırılan yeni bir mutasyonel imzayı temsil ettiği gösterilmiştir.[30] İmza 36, sıklıkla AGAA ya da TGAA motiflerinin bulunduğu spesifik sekans bölgelerindeki aşırı miktarda G:C>T:A transversiyonları ile karakterizedir.[30]

Bu imza aynı zamanda pankreatik nöroendokrin tümörler gibi diğer gastrointestinal tümörleri veya meme kanseri ile adrenokortikal karsinom gibi ekstraintestinal tümörlerin gözlendiği kalıtsal *MUTYH* mutasyonu taşıyan hastalarda da raporlanmıştır.[31,127,128] Nihayetinde hem monoallelik hem biallelik patojenik değişimlerin varlığında farklı organlardan gelişen malignitelerin bu spesifik mutasyonel imzayı taşıdığı görülmektedir. Bu nedenle büyük miktarda G:C>T:A transversiyonu taşıyan tümörlerde *MUTYH* geninin taranması önerilmektedir.[31,32]

Bütün bunlar göz önünde bulundurularak MAP hastaları klinik yönden değerlendirildiğinde; kolondaki bulguları açısından ana ayırıcı tanı atenüe FAP ya da atipik FAP iken, ekstrakolonik lezyonların spektrumu Lynch sendromuna daha çok benzemektedir.[129,130] MAP hastalarındaki kolon dışı tutulumlar, Lynch sendromu hastalarından daha az yaygın ve daha az dikkat çekici olmakla birlikte, benzer bir dağılım gözlenmektedir.[60] Ancak tümör spektrumuyla birlikte histolojik özellikleri ve moleküler biyoloji açısından kıyaslandığında MAP fenotipinin Lynch sendromu fenotipiyle birçok açıdan örtüştüğü görülmektedir.[60] Bu yüzden MAP hastalarındaki klinik prezentasyonun FAP-benzeri fenotipten Lynch-benzeri fenotipe kadar geniş bir dağılımda olduğu ifade edilmektedir.[131] Nitekim son yıllarda, yalnızca polipozis bulgusu ile MAP olarak adlandırılan bu klinik tabloyu "*MUTYH*-ilişkili tümör sendromu" ('*MUTYH*-associated tumor syndrome', MAT) veya "*MUTYH*-ilişkili kanserogenez" ('*MUTYH*-related cancerogenesis', MRC) olarak adlandırmanın daha uygun olacağı düşünülmektedir.[32] Gün geçtikçe sayısı artan bir şekilde hem monoallelik hem biallelik *MUTYH* mutasyonlarıyla ilişkili tanımlanan geniş fenotipik spektrum varlığı bu düşünceyi destekler niteliktedir.

### 2.1.7. Genotip-Fenotip Korelasyonu

MAP ilişkili karsinogenezin genotip spesifik olabileceği düşünülmektedir.[132,133] Fonksiyonel bir çalışmayla 37°C'de G:A substratı için adenin bazının eksizyonu p.Tyr179Cys ve p.Gly396Asp değişimleri için sırasıyla %98 ve %86 azalmış olarak gözlenmiştir.[133] İn vitro çalışmalardan elde edilen bu sonuçların in vivo ortamda çok daha belirgin olabileceği belirtilmektedir.[60] Sonuçta kromozomal DNA, subsrat olarak kullanılan oligonükleotidden kat be kat büyük ve enzimin hasarlı bölgeyi arama işlemi çok daha zahmetlidir. Ayrıca sellüler ortamda diğer DNA

bağlayıcı proteinlerin varlığı nedeniyle bağlanma rekabeti de meydana gelmektedir. Bunlar, fonksiyonel çalışmayla elde edilen verilerin biyolojik ortamda daha dramatik etkili olabileceğini göstermektedir. Nitekim homozigot Y179C taşıyan kişilerde intestinal kanalda displastik adenom ve kolorektal kanser gelişim riskinin homozigot G396D ya da bileşik heterozigot Y179C/G396D varyantlarını taşıyan bireylere göre daha yüksek olmasının, bu mutasyonların neticesinde DNA hasar tamiri için glikozilaz enzim aktivitesinde oluşan fonksiyonel farklılıktan kaynaklanmış olabileceği belirtilmektedir.[19] Y179C değişimi taşıyan bireylerde klinik bulguların daha erken yaşta ortaya çıkışı ve daha şiddetli bir fenotiple seyri, varyantın sebep olduğu daha düşük adenin glikozilaz aktivitesi ile korelasyon göstermektedir.[19,132] Ekstrakolonik lezyonlar için ise herhangi bir genotip-fenotip korelasyonu bulunamamıştır.[23] Henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da, yaşam boyu kanser riskinin genotip bağımlı olarak değişebileceğinin altı çizilmektedir.[79]

### 2.1.8. Taşıyıcılık Saptanan Bireylerde Takip Önerileri

Biallelik patojenik *MUTYH* varyantı taşıyan bireylerde 25-30 yaşından geç olmamak kaydıyla, her 1-2 yılda bir kolonoskopi ve polipektomi önerilmektedir.[15] Yirmi yaşın altında oldukça nadir ve vaka bazında KRK olgularının bildirilmesi ekstra genetik ve çevresel faktörler ile açıklanmakta olup takiplerin 18-20'li yaşlarda başlaması yeterli görülmektedir.[46,60] Üst gastrointestinal sistem maligniteleri açısından ampulla vater bölgesini tamamıyla görselleyecek şekilde 30-35 yaşlarında bazal endoskopik tarama ile değerlendirme önerilmektedir.[15] Bu aşamada Spigelman kalsifikasyona göre hastalığın ciddiyeti saptanarak endoskopik taramalar arası intervaller olguya göre düzenlenmektedir.[46] Sadece gastrik ve duodenal adenomların tanısı için değil, MAP hastalarında görece yaygın gözlenen Barrett özofagus tanısı için de üst gastrointestinal sistemin endoskopik değerlendirilmesi uygun görülmektedir.[119] Ayrıca yıllık fizik muayene, tiroid ultrasonografisi ve bir dermatolojist tarafından cilt muayenesi öneriler arasındadır. NCCN tarafından 2022 yılında güncellenen kolorektal kanser rehberinde gastrik kanser ve endometrium kanseri açısından artmış risk belirtilmekle birlikte hasta yönetiminde değişiklik önerilmemiştir. Meme kanseri açısından yıllık ya da 2 yılda bir olacak şekilde kadınlarda 45 yaşından itibaren ve erkeklerde genetik tanıyı müteakiben bazal meme muayenesi farklı yayınlarda öneriler

arasında geçmektedir.[23,32,116] Over kanseri erken tanısına yönelik 3 ay veya 1 yıl aralıklarla 45 yaşından itibaren serum CA125 düzeyi ve transvajinal ultrason ile değerlendirme ve mesane kanseri açısından bazal ürolojik muayene yine tavsiyeler arasındadır.[23,32]

Heterozigot taşıyıcı birey saptanması durumunda takip önerileri aile öyküsünde KRK bulunmasına göre değişmektedir. Etkilenmemiş ancak heterozigot patojenik *MUTYH* gen varyantı taşıyan bireyin birinci derece yakınındaki KRK tanı yaşından 10 yıl önce veya 40 yaşından itibaren kolonoskopik tarama programına dahil edilmesi önerilir.[15] Öte yandan çeşitli kanser tipleri için risk artışı heterozigot vakalarda da ifade edilmekle birlikte, NCCN rehberinde klinik yönetimde farklılık önerilmemektedir. Pozitif aile öyküsü ya da yüksek riskli etnik gruba ait olma durumunda meme ve üst gastrointestinal sistem için bazal klinik muayene tavsiye edilmektedir.[32]

Özetle *MUTYH* ilişkili kalıtsal tümör sendromları tanısının genetik tetkikler için standart yaklaşımın eksikliği ve saptanan *MUTYH* değişimlerinin düşük frekansı nedeniyle kolay olmadığı görülmektedir.[32] Klinik ilişkilendirme çalışmaları ve meta-analiz sonuçları çoğaldıkça hastalığın daha net değerlendirilmesi ve taşıyıcı olguların klinik yönetimlerinde kanıta dayalı verilerin varlığında rehber önerileriyle takip ve tarama programlarının geliştirilmesi mümkün olacaktır. Şu an için *MUTYH* genindeki germline patojenik varyantın monoallelik kalıtılması durumunda kansere yönelik genetik danışmanlık verilirken ailelerin kendi içinde malign öykü yüküne göre değerlendirilmesi ve bireye yönelik kümülatif bir risk tahmini oluşturularak tarama ve takip programına alınması uygun görülmektedir.

### 2.1.9. Tedavi Araştırmaları

Sporadik vakalara nazaran MAP hastalarındaki KRK'lerin prognozu daha iyidir.[60] Artmış sağkalımın nedeninin *MUTYH* ilişkili tümör sendromlu hastalarda karsinogenez sürecinde gözlenen yüksek oranda immun yanıt artışının olabileceği ifade edilmektedir. Ancak aynı zamanda bu aktiflenmiş immun sistemin oluşturduğu selektif seçimden kaçan klonlar tümör büyümesini destekliyor görünmektedir.[60] MAP karsinomlarında HLA-1 reseptör ekspresyon kaybının sık görülen bir olay olması,

anti-tümör yanıtın varlığını desteklemektedir.[134,135] Ayrıca MAP hastalarında gözlenen bu durum ve beraberindeki yüksek oranda tümör lenfosit infiltrasyonu terapötik bir seçenek olarak immunoterapinin kullanılabileceğini düşündürmektedir.[136] Biallelik patojenik *MUTYH* alleli taşıyan bir KRK hastasının önceki kemoterapi başarısızlığından sonra PD-1 inhibitörü olan nivolumab'a olumlu yanıt vermesi bu kanıyı destekler niteliktedir.[136]

MAP hastaları için kullanılabileceği ifade edilen bir diğer ajan selektif ve geri dönüşümsüz bir şekilde RAS GTPaz inhibisyonu yapan sotorasib'dir.[32] *MUTYH* ilişkili tümörlerde gözlenen spesifik imza profili bu anlamda tedavi açısından yol gösterici olabilir. Özellikle atipik MAP hastalarının tanısı için tümör materyalinden *KRAS* c.34G>T mutasyonunun bir ön tarama testi olarak önerilmesi, bu mutasyonun bir teranostik uygulama ajanı olarak kullanımı olup olmayacağı sorusunu gündeme getirmektedir.[60] Bununla birlikte, şu an için *MUTYH* ilişkili kanser sendromlarında kanıtlanmış ve onaylanmış bir tedavi ajanı mevcut değildir.

### 2.1.10. İlişkili Diğer Klinikler

Neoplastik olmayan hastalıklarda tanımlanan *MUTYH* genindeki değişimler, bu genin insan hastalıklarında 'oyun kurucu' bir rolünün olduğunu düşündürmektedir.[18,32] Şiddetli hücresel stres koşullarında bu proteinin fonksiyonel işlevinde değişkenlik olmasının farklı nörodejeneratif hastalıklara zemin hazırlayabileceği belirtilmektedir.[18] Nitekim Alzheimer, Huntington ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda artmış oksidatif stres ve 8-oxoG varlığı ayırt edici niteliklerden biridir.[137–139] Ölçümünde metodolojik kısıtlamalar olmasına rağmen üriner 8-oxoG seviyelerinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili prognostik öneminin olduğu ve kardiyak olaylarda bağımsız bir prediktör belirteç olarak kliniklerde kullanılabileceği ifade edilmektedir.[140] Akut serebral enfarktüste ise oksidatif beyin hasarını gösteren bir biyobelirteç olarak üriner 8-oxoG düzeylerinin longitudinal ölçümünün serebrovasküler olay sonrası inmenin ciddiyetini yansıtan bir potansiyeli mevcuttur.[141,142]

Beklendiği üzere, oksidatif hasar sonrası artan 8-oxoG düzeylerinin tetiklemesiyle OG tamir yolağında bulunan glikozilazların gen ekspresyon

profillerinde farklılık oluşması nörodejeneratif hastalıkların, kardiyovasküler ve serebrovasküler olayların patogeneziyle bağlantılı bulunmuştur.[78,141] Bu anlamda *MUTYH* geninin bu hastalıklarda da belirleyici rolü olduğunun gösterilmesi şaşırtıcı değildir. Ayrıca yüksek oranda artmış 8-oxoG varlığında, *MUTYH* ekspresyonunun tek zincir kırıkları birikimi sonucu nükleer ortamda PARP aktivasyonuyla apoptoza ve/veya mitokondriyal ortamda kalpain aktivasyonuyla nekroza neden olarak hücre ölümüne yol açmasının nörodejeneratif sürecin sebeplerinden biri olduğu ifade edilmektedir.[143]

Bunlara ek olarak inflamatuar süreçle karakterize romatoid artrit ve osteoartrit gibi hastalıklarla ilişkili *MUTYH* geninde tek nükleotid polimorfizmleri belirlenmiştir.[144,145] Bir başka inflamatuar antite olan ülseratif kolit için ise, fare modelinde oksidatif hasar karşısında bağırsak bütünlüğünün korunmasında MutY proteininin koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir.[146]

Bütün bunlar oksidatif hasar karşısında hücresel kırılganlığın önemini vurgularken, *MUTYH* geninin farklı klinik tablolarla ile net ilişkisi bilinmemekte ve henüz gizemini korumaktadır.

## 2.2. Derin Fenotipleme Kavramı ve Kanserde Kullanımı

Fenotip, bir hücre veya organizmanın sahip olduğu genotipin çevreyle etkileşiminden kaynaklanan gözlemlenebilir özellikleridir.[147] "Derin" ifadesi ise yüksek teknoloji alanında "geniş kapsamlı ve eksiksiz olarak elde edilen bilginin işlenmesi" anlamında kullanılmaktadır.[148] Bu kapsamda derin fenotipleme ise bir bireyin sahip olduğu "bütün" gözlemlenebilir özelliklerin toplanması ve işlenmesi anlamına gelmektedir.

Genomik alanda verilerin logaritmik olarak artmasıyla birlikte hem verilerin işlenmesi hem de fenotipik bağlamda değerlendirilmesi için niceliksel bağlantıların kurulduğu biyoinformatik yaklaşımlar genetik analizlerin kaçınılmaz bir parçası haline gelmiştir. Bu minvalde çok sayıda fenotipik bulgu, genomik veri ile istatistiki ve ilişkisel olarak anlamlılık çerçevesinde değerlendirilebilmektedir.[149–152] Elde edilen bulguların anlamlı bir bağlamda sayısal ifadesi özgüllüğü yükseltmekte ve genomik verinin klinikte prediktif, prognostik ya da terapötik etkisini ortaya

çıkarmaktadır.[150,153] Ölçülebilir verilerin işlenmesi sonucu sadece hastalıkla ilgili bilgi değil, bilimsel bir "sağlık" datasının da oluşturulabileceği öne sürülmektedir.[154,155]

Bütüncül analizler sayesinde spesifik bir genomik değişikliğin pleiotropik yansımasını saptamak mümkün olmaktadır.[156] Ancak bu amaçla 2003 yılında dile getirilen İnsan Fenom Projesi rutin klinik uygulamada standardizasyonun eksikliği nedeniyle verimli olamamaktadır.[1] Bunun önüne geçmek için gözlenilen bulguların ortak bir tıbbi dil ile tanımlanmasına yönelik fenotipik kelime dağarcığı HPO tarafından derlenmektedir.[157]

Geleneksel yaklaşımlara kıyasla derin fenotipleme ile çok fazla sayıda ve çeşitli bulgu bir arada değerlendirilmekte ve daha önce şüphelenilmemiş moleküler süreçler birbirleriyle ilişkilendirilmektedir.[156,158] Bu yaklaşım insan vücudunu iç içe geçmiş ağlarla birbirine bağlı entegre bir biyolojik sistem olarak değerlendirmektedir.[159] Bunun neticesinde bir hastalığın farklı boyutları gösterilebilmektedir.[154,160] Böylelikle bir hastalığı alt sınıflara ayırarak, hasta için mevcut olan en iyi bakımın sağlanması amaçlanmaktadır.[159,161,162] Ancak hastaya dair elde edilen bilgilerin bilimsel bir bakışla işlenmesi her zaman mümkün olmamakta ve veriler doğru orantılı bir şekilde bilimsel ilerlemeye yol açmamaktadır.[160] Fenotipteki çeşitliliğe göre hastanın mevcut durumuyla kurulan varyant bazlı ilişkinin istatistiki gücü, tek ve spesifik bir bulgu varlığında kuvvetlenmekte iken çok sayıda ve değişken bulgular ile zayıflamaktadır.[148] Özellikle kompleks bir hastalık söz konusu olduğu zaman ara fenotipler nedeniyle hastalığın gidişatının lineer bir seyir izlemediği görülmektedir.[163] Biyolojik sistemlerin dinamikliği ise değerlendirilen parametrenin zamansal ve mekansal değişkenlik göstermesine sebep olmaktadır.[148] Bu dinamikliği izleyebilmek için anlık ölçümlerin yerine longitudinal bir seyirde olgunun fizik muayene bulguları, biyokimyasal testleri, görüntüleme sonuçları, elektrofizyolojik çıktıları (EKG, EEG ve EMG vb), histopatolojik verileri ve omik datası (mevcut olan genom, transkriptom, proteom, metabolom, mikrobiyom ve expozom verileri) ile sürecin izlemi önerilmektedir.[159,164–166] Kanser hastaları için ise çeşitli fenotipik parametrelerin klinik değerlendirmeye dahil edilmesi tümör spesifik yapıya dair bilgi sağlamaktadır.[159,167] TCGA Pankanser Projesi'nin çabaları sayesinde tümör moleküler profillemesi kanserde rutin bir uygulama haline gelmektedir.[168,169] Moleküler

sınıflandırmaların entegrasyonu ile farklı kanser tiplerinde prognostik ve prediktif bilgi elde edilebilmektedir.[170,171] Ayrıca bu hastalar çeşitli hedefli tedavi ajanları için aday olabilmektedir.[172,173] Yolakların aydınlatılması, refrakter ya da nüks kanserler için yeni tedavi ajanı geliştirilmesinin önünü açmaktadır.[173–175] Derin fenotipleme çalışmalarından gelen verilerin birikimi ile organizmadaki çeşitli ağların nasıl bağlantılı olduğu anlaşıldıkça kansere dair belirsizliklerin azalacağı düşünülmektedir.[159]

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. Hasta Seçimi

Retrospektif tanımlayıcı olarak tasarlanan bu tez araştırması için Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 03.05.2023 tarihli 2023/14-19 numaralı kararıyla etik kurul onayı alındı (EK-1).

Tez çalışması Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Dahili Bilimler Onkoloji Bilim Dalı'nda yürütüldü. Bu amaçla Ocak 2018-Ocak 2023 tarihleri arasında Tıbbi Onkoloji Polikliniğinden çeşitli kanser tanılarıyla tarafımıza yönlendirilen ve genetik tetkiki planlanan hastalar tarandı. Dahil edilme kriterlerini karşılayan ve dışlama kriteri bulunmayan hasta ve yakınları çalışmaya alındı (Tablo 2). Tıbbi Genetik ve Tıbbi Onkoloji poliklinik hasta dosyaları ile Hastane Arşiv ve Tıbbi İstatistik Hizmetleri ve Probel Hastane Bilgi Yönetim Sistemi sistem kayıtları geriye dönük olarak incelendi.

**Tablo 2.** Dahil Edilme ve Dışlama Kriterleri

| Dahil Edilme Kriterleri | Dışlama Kriterleri |
|---|---|
| 1. Kalıtsal kanser ön tanısıyla genetik analizi yapılmış ve *MUTYH* geninde patojenik, muhtemel patojenik ve klinik önemi bilinmeyen gen varyantı tespit edilmiş olgular<br>2. Aile taraması veya segregasyon analizi amaçlı değerlendirilen indeks olgunun aile üyeleri | 1. Yüksek penetranslı bir başka kanser yatkınlık geninde patojenik ya da muhtemel patojenik değişimi olan<br>2. Dosya kayıtları eksik olan<br>3. Genetik analizi tamamlanmamış |

Genetik etiyoloji düşünülerek polikliniğimize yönlendirilen bütün hastalar gerekli değerlendirmeden geçirilerek test öncesi genetik danışmanlık verilmekte ve kalıtsal kanser sendromlarına yönelik 30 genden oluşan Kalıtsal Kanser Risk Paneli (Tablo 4) ile yeni nesil dizileme önerilmektedir. Tetkiki kabul edip yazılı onam imzalayan olguların genetik tetkikleri 31 Temmuz 2022 tarihine kadar tüm aşamalarıyla Dokuz Eylül Üniversitesi Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi'nde (DEGEDEM) çalışılmıştır. Tetkikler 1 Ağustos 2022 sonrasında ise hizmet alımı ile gerçekleştirilmektedir. Elde edilen bütün verilerin klinik analizleri DEÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapılmaktadır. Tetkik sonuçları genetik

danışmanlık eşliğinde teslim edilmekte olup saptanan varyanta ilişkin gerekli görülürse aile taraması ve segregasyon analizi ya da ileri inceleme için ek tetkik planlanmaktadır.

### 3.2. Verilerin Toplanması

Dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet, primer kanser tipi, lokalizasyonu, doku tipi ve histopatolojik özellikleri, kanserin evresi ve derecesi, tanı yaşı, tanımlanan risk faktörleri, ECOG ('Eastern Cooperative Oncology Group') performans skoru, uygulanan tedavi ve hastalığın seyri, varsa ikincil malignite durumuna dair bilgiler, kolonoskopi sonuçları, eşlik eden hastalıklar, dismorfik bulgular, özgeçmiş ve soygeçmiş bilgileri ile genetik tetkik sonuçları Tıbbi Genetik ve Tıbbi Onkoloji hasta dosyaları ile Hastane Tıbbi İstatistik ve Arşivi ve Probel Hastane Bilgi Yönetim Sistemi kayıtları taranarak toplandı. Toplanan veriler veri kayıt formuna (EK-2) işlenerek değerlendirildi. Yanlış anlamlı klinik önemi bilinmeyen varyantların değerlendirilmesi için hesaplamalı yapısal biyoloji araçları kullanılarak seçilmiş kohorttaki *MUTYH* geninde saptanan varyantların protein stabilitesi üzerindeki etkileri ve ΔΔG ölçümleri yapıldı. Bu ölçümler literatürden toplanan benign ve patojenik *MUTYH* varyantları ile karşılaştırıldı. Proteinin fonksiyonel domainleri üzerindeki yerleşimleri belirlendi. Elde edilen verilerden genotip-fenotip bilgilerini içeren çeşitli tablo ve grafikler oluşturuldu.

### 3.3. Arşiv Genetik Verilerinin Elde Edilme Metodu

#### 3.3.1. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Polikliniğimizde genetik danışmayı müteakiben moleküler tetkik için onam veren tüm olgulardan DNA izolasyonu için toplam 4 ml periferik kan örneği EDTA'lı tüplere alınarak genetik laboratuvarına ulaştırılmaktadır. Teslim alınan örnekler sistem üzerinden kontrol edilip en az 3 belirleyici etiket ile laboratuvar hasta listesine kaydedilmektedir.

Saflaştırılmış total genomik DNA elde edilmesi amacıyla spin kolon DNA izolasyon tekniği kullanılmaktadır. Her hastanın 200 µl kanından Qiacube® otomatize DNA izolasyon cihazı (Qiagen, Almanya) ve QIAamp® DNA Blood Mini kiti (Qiagen, Almanya) aracılığıyla genomik DNA elde edilmektedir. Üretici firmanın

protokolünde belirtilen standartlara uygun şekilde kullanılan cihaz, hasta örneği ve diğer solüsyonların eklenmesi ile otomatize olarak çalıştırılmaktadır. Çalışma aşamaları Tablo 3'te özetlenmektedir.

**Tablo 3.** Genomik DNA İzolasyon Aşamaları

- 200 µl periferik kan ile 20 µl proteinaz K ve 200 µl ligasyon buffer solüsyonu, steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne eklenir ve vorteks yardımıyla karıştırılır.
- Tüpler ısı bloğunda 56 °C'de 10 dk inkübe edilir.
- Süre bitiminde örneğe 200 µl etanol (%96-100) eklenir ve 15 sn vortekslenir.
- Tüpteki karışım spin kolona aktarılır ve spin kolon 2 ml'lik temiz toplama tüpüne yerleştirilir.
- Santrifüj cihazında tüpler 6000 xg'de 1 dk çevrilir ve oluşan filtrat atılır.
- 500 µl 'Wash Buffer 1' eklenerek spin kolon yeni bir 2 ml'lik temiz toplama tüpüne yerleştirilir.
- Santrifüj cihazında tüpler 6000 xg'de 1 dk çevrilir ve oluşan filtrat atılır.
- 500 µl 'Wash Buffer 2' eklenerek spin kolon yeni bir 2 ml'lik temiz toplama tüpüne yerleştirilir.
- Santrifüj cihazında tüpler 20000 xg'de 3 dk çevrilir ve oluşan filtrat atılır.
- Spin kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve üzerine 100-200 µl 'Elution Buffer' veya distile su eklenerek 1-5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası santrifüj cihazında tüpler 6000 xg'de 1 dk çevrilir ve spin kolon atılır.
- Elde edilen filtrat içeriğindeki DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu ölçülür.
- Ölçüm sonrası yeterli kalitede saptanan örnekler, alikotlanarak -20°C'de saklanır.

### 3.3.2. DNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi

Laboratuvarımızda izole edilen genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflık ölçümleri için NanoDrop ND1000® Spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmaktadır.

Spektrofotometre gönderilen belirli dalga boyundaki ışığın absorbsiyonunu yapan maddelerin solüsyon içindeki miktarını kantitatif olarak saptamaktadır. Nükleik asitler ve proteinler ışığı sırasıyla 260 ve 280 nm'de maksimum absorbe ettiği için DNA saflığının hesaplanmasında A260/A280 oranı kullanılmaktadır. Genomik DNA

eldesinin yeterli saflıkta kabul edilmesi için bu oran 1,8-2 aralığında olmalıdır. Saflığı ideal aralığın altında kalan örneklerde protein kontaminasyonundan şüphelenilirken, bu değerin üzerindeki solüsyonlarda yüksek miktarda RNA varlığından şüphelenilmektedir. İleri moleküler testler için DNA konsantrasyonu en az 40 ng/µl olmalıdır. DNA konsantrasyonu yetersiz saptanan ya da uygun saflık oranında olmayan örneklerden tekrar DNA izolasyonu yapılmaktadır. Yeterli kalite ve miktarda saptanan örnekler ileri moleküler test için parafilmle kapatılıp DNA saklama kutularında -20°C'de saklanmaktadır.

### 3.3.3. Hedefli Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme tekniklerinin kullanımı, aynı anda çok sayıda genin ve hasta örneğinin ucuz ve hızlı bir şekilde analizini mümkün kılmaktadır. Kanser gibi yüksek allelik heterojenite ve lokus heterojenitesi gösteren hastalıklarda moleküler etiyolojiyi aydınlatmak için çok sayıda geni içeren hedefli panel ile sekanslama tercih edilmektedir. Bu amaçla polikliniğimizde kalıtsal kanser sendromları düşünülen olgulara yönelik Tablo 4'te belirtilen 30 adet geni içeren Kalıtsal Kanser Risk Paneli Paneli çalışılmaktadır.

**Tablo 4.** Kalıtsal Kanser Risk Paneli Genleri

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *APC (ENST00000457016)* | *ATM (ENST00000278616)* | *BARD1 (ENST00000260947)* | *BLM (ENST00000355112)* | *BMPR1A (ENST00000372037)* |
| *BRCA1 (ENST00000471181)* | *BRCA2 (ENST00000544455)* | *BRIP1 (ENST00000259008)* | *CDH1 (ENST00000261769)* | *CDK4 (ENST00000257904)* |
| *CDKN2A (ENST00000498124)* | *CHEK2 (ENST00000382580)* | *EPCAM (ENST00000263735)* | *MLH1 (ENST00000231790)* | *MRE11 (ENST00000323929)* |
| *MSH2 (ENST00000233146)* | *MSH6 (ENST00000234420)* | *MUTYH (ENST00000450313)* | *NBN (ENST00000265433)* | *PALB2 (ENST00000261584)* |
| *PRSS1 (ENST00000311737)* | *PTEN (ENST00000371953)* | *RAD50 (ENST00000265335)* | *RAD51C (ENST00000337432)* | *RAD51D (ENST00000590016)* |
| *SLX4 (ENST00000294008)* | *SMAD4 (ENST00000342988)* | *STK11 (ENST00000326873)* | *TP53 (ENST00000269305)* | *VHL (ENST00000256474)* |

#### 3.3.3.1. YND Islak Laboratuvar Aşamaları

Yeterli kalite parametrelerine sahip olan örneklerden Kalıtsal Kanser Risk Paneli ('Celemics Hereditary Cancer Risk kit', 'Onkorisk') YND kiti kullanılarak kütüphane hazırlanmaktadır. Tüm aşamalarda üretici protokollerine uyulmaktadır. Islak laboratuvar çalışması kısaca; hibridizasyon için kütüphane hazırlığı (DNA

fragmantasyonu, DNA ucu onarımı, A ucu takılması, adaptör ligasyonu, indeks ile işaretleme), prob hibridizasyonu, streptavidin boncuk ile hedef bölgelerin izolasyonu, 'Post-capture' hedef bölge amplifikasyonu ve pürifikasyon adımlarından oluşmaktadır. Bu aşamalar Tablo 5'te detaylıca açıklanmaktadır.

**Tablo 5.** YND Islak Laboratuvar Aşamaları

- DNA Fragmantasyonu: DNA, fragmantaz enzimi ile 37°C'de inkübe edilerek 150-250 baz çifti (bç) uzunluğunda DNA fragmanları elde edilir.
- Pürifikasyon*: Öncesinde 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş olan manyetik boncuk çözeltisi, konik dipli 2 ml'lik tüplere her örnek için DNA volümünün 1,8 katı olacak şekilde dağıtılır. Üzerine DNA fragmanları eklenir. Vorteks ve spin yöntemleri ile homojenizasyon sağlanır ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Süre dolunca tüpler manyetik stant üzerinde bekletilerek (3-5 dk) sıvının şeffaflığı beklenir ve oluşan süpernatant kısım pipetle atılır. Üzerine 500 µL etanol (%80) ilave edilir ve 30 sn bekletilerek pipetaj ile uzaklaştırılır. Bu işlem 2 kez daha tekrarlanır. Örneklere spin yapılır ve 10 µL pipetle temizlenir. Alkolün tamamen evaporasyonu için beklenir. Nükleaz içermeyen su eklenen tüpler stanttan alınır. Vorteks ve spin sonrası 2 dk oda sıcaklığında bekletilir. Tekrar standa yerleştirilip, çözeltinin şeffaflaşması sonrası süpernatant yeni tüplere alınır ve sonraki aşamaya geçilir.
- DNA ucu onarımı: Test kitinde bulunan 'End Repair Mix' üzerine bir önceki basamakta elde edilen DNA ürünü eklenerek 20°C'de 30 dk inkübe edilir.
- Pürifikasyon* adımı tekrarlanır.
- A ucu takılması: Test kitinde bulunan 'A-tailing tüpleri'nin üzerine bir önceki purifikasyon adımından elde edilen DNA ürünü eklenerek 30°C'de 30 dk inkübasyona bırakılır.
- Pürifikasyon* adımı tekrarlanır.
- Adaptör Ligasyonu: Bir önceki pürifikasyondan elde edilen süpernatant ligasyon tüplerine eklenir. Üzerine kitin içerisinde bulunan adaptör eklenerek 15 dk 20°C'de bekletilir. Ardından USER enzimi eklenir ve 37°C'de 15 dk inkübasyona bırakılır.
- Pürifikasyon* adımı tekrarlanır.
- İndeks ile İşaretleme: Evrensel dual indeks seti 'i5 ve i7' olarak adlandırılan sistem kullanılmaktadır. Bir önceki adımdan elde edilen DNA ürünü 'KAPA Library Amplification Mix' ve indeks primerleri ile reaksiyon karışımı oluşturulup PCR cihazına yüklenir ve kullanım kılavuzunda önerilen PCR protokolü uygulanır.
- Pürifikasyon* adımı tekrarlanır.

- Prob Hibridizasyonu: Kit içerisinde bulunan ‘Blok mix ve Hibridizasyon mix’ ile ‘Target Capture’ probları hibridizasyon reaksiyonu için 16 sa 65°C’de inkübe edilir.
- Streptavidin Boncuk ile Hedef Bölgeninin İzolasyonu: Hibridizasyondan sonra elde edilen örnekler streptavidin boncuklar ve kitin içerisinde bulunan yıkama çözeltileri ile seri yıkama işleminden geçirilerek hedef DNA kütüphanesi oluşturulur.
- Hedef Bölgenin Amplifikasyonu: Oluşturulan hedef DNA kütüphanesi universal PCR primerleri ile amplifiye edilir.
- Son kez pürifikasyon* adımı tekrarlanır.
- Yürütme öncesi hedef bölgeleri seçilmiş, indekslenmiş kütüphanenin konsantrasyon kontrolü yapılır.

Kütüphane hazırlama basamakları tamamlandıktan sonra indekslenmiş örnekler tek bir tüpte birleştirilerek Nextseq500® (Illumina, ABD) cihazı kartuşuna yüklenmektedir. Reaksiyon kartuşu ve ‘flow cell’ cihaza yerleştirilerek sekanslama yapılır. Bu süreç sonunda ham veri ‘FASTQ’ formatında elde edilmektedir.

#### 3.3.3.2. YND Verilerinin Biyoinformatik Analizi

Hedefli YND sonucunda elde edilmiş ‘FASTQ’ formatındaki ham veriler SEQ (Genomize, Türkiye) programı aracılığıyla UCSC veri tabanının Şubat 2009 yılında güncellenen “GRch37/hg19” insan referans genom dizisiyle hizalanarak sıralama, varyant çağırma ('variant calling'), güvenilirlik skorlaması ve varyant anotasyonu aşamalarından geçirilmektedir. SEQ platformu hizalama ve sıralama için Burrows-Wheeler-Aligner programını, varyant çağırma için optimize edilmiş haplotip temelli FreeBayes programını otomatize olarak kullanmaktadır. Güvenilirlik skorlamasında primer ve sekonder kaplam eşiği, alternatif/allel oranı eşiği, iplikçik bias değeri eşiği ve heterozigot varyantlar için her iki iplikçikteki alternatif/allel oranı parametreleri baz alınmakta ve yetersiz etiketi alan varyantlar değerlendirmeye alınmamaktadır. Bu biyoinformatik işlemler sonrasında hedeflenen gen bölgelerinde en az %98 kaplam ile minimum 20X derinlikte ‘VCF’ formatında veri elde edilmesi amaçlanmaktadır.

#### 3.3.3.3. YND Verilerinin Klinik Analizi

Saptanan varyantların patojenite yorumu ACMG’nin 2015 yılında yayınlanan kılavuzu ve ClinGen önerileri esas alınarak sırasıyla; benign, muhtemel benign, klinik önemi bilinmeyen, muhtemel patojenik ve patojenik olarak yapılmaktadır.[42,176] Bu

kılavuza göre varyantın patojenite sınıflandırması için kullanılan 28 kanıt kodu çeşitli parametrelerden oluşmaktadır. Bunlar;

• Varyantın tipi (anlamsız, yanlış anlamlı, dur kodonu oluşturan, vb.),

• Varsa daha önce bildirilmiş aynı aminoasit değişiminin patojenitesi,

• Varsa daha önce bildirilmiş aynı kodon değişikliğinin patojenitesi,

• de novo olup olmaması veya hastalığın ailede segregasyona uğrayıp uğramadığı,

• Bilinen fonksiyonel çalışmasının olup olmaması,

• Toplum minör allel frekansı (GnomAD[177], ExAC, ESP[178], 1000Genomes[179], GME Variome ve Turkish Variome, vb) ve merkez içi frekansı,

• Varsa yapılmış vaka-kontrol çalışmalarındaki frekansları,

• Protein üzerinde mutasyonel `hotspot' bir noktada yer alıp almaması,

• Biallelik olup olmaması,

• Protein uzunluğu üzerindeki etkisi,

• 'in silico' tahmin araçlarının skorları (Yanlış anlamlı değişimler için REVEL[180], MetaLR[181] ve MetaRNN[182] skorları ile kırpılma bölgesi değişimleri için ADA, RF [183] ve MaxEntScan[184] skorları) ve

• Uluslararası veri tabanlarındaki verileridir. Ayrıca araştırılan gen ve/veya hastalık için kanıt kodlarının kullanım gücü değişkenlik gösterebilmektedir.[42] Dolayısıyla varyant yorumu için her zaman güncel öneriler dikkate alınmalıdır.

Raporlanacak tüm varyantlar bütünleştirici genomik görüntüleyici (IGV, 'İntegrative Genomic Viewer') yazılımı aracılığıyla incelenmektedir. Varyantların yorumlanmasında SEQ platformunun yanısıra Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enstitüsü'ne ait ClinVar veritabanı, Varsome (Saphetor, İsviçre), Franklin (Genoox, ABD), VarSeak (JSI, Almanya) ve NGS Cloud (Pairend, Türkiye) analiz platformlarından yararlanılmaktadır.

Bütün genetik testlerin klinik değerlendirilmesi DEÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapılmaktadır. Patojenik, muhtemel patojenik ve klinik önemi bilinmeyen olarak yorumlanan varyantlar hastaların mevcut klinik durumu ve aile hikayesi göz

önünde bulundurularak değerlendirilmekte ve literatür eşliğinde genotip-fenotip korelasyonu belirlenmektedir.

Bu tez çalışması için 31 Temmuz 2022 tarihe kadar bütün aşamaları DEGEDEM'de gerçekleşen moleküler analiz raporlarına bölüm arşivinden ulaşıldı ve *MUTYH* geninde varyant saptanan hastalar seçildi. Patojenik, muhtemel patojenik ve klinik önemi bilinmeyen varyantlar listelendi. Güncel varyant yorumu için listelenen varyantlar veri tabanları ve belirtilen platformlarda yeniden gözden geçirildi. Bilinen varyantların araştırılması için dbSNP, HGMD Public, LOVD veri tabanları kullanıldı. Literatür bilgisi PubMed, OMIM, LitVar ve Google Scholar aracılığıyla tarandı. Aynı aşamalar 1 Ağustos 2022 tarihinden sonra hizmet alımıyla çalışılan olguların sonuçları için uygulanarak değerlendirme gerçekleştirildi.

### 3.3.4. Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyon Analizi

Hedeflenmiş bir nükleik asit dizisinin komplementeri olan iki farklı probun hedef bölge üzerinde ardışık hibridizasyonunu müteakiben ligasyon sonrası prob amplifikasyonu ile herhangi bir genin delesyon/duplikasyon analizi yapılabilmektedir. Bu tetkik, hibridizasyon sonrası probların ligasyonu ve PCR reaksiyonu sonucu kopya sayısı değişikliklerini tek bir reaksiyonda saptamaya olanak sağlayan çoklu ligasyona bağlı prob amplifikasyon (MLPA, 'Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) analizidir.[185,186]

Polikliniğimizde heterozigot patojenik *MUTYH* varyantı taşıyan bireylerin karşı allellerinin delesyon/duplikasyon analizinde SALSA® MLPA® P071-D1 *MSH6-MUTYH* prob karışımı kullanılmaktadır.

SALSA® P071-D1 lot numaralı kitin içeriğinde 130 ile 500 nükleotid arasında amplifikasyon ürünü oluşturan 48 adet prob bulunmaktadır. Bu probların 15 tanesi *MSH6*, 11 tanesi *MUTYH*, 5 tanesi *EPCAM* ve 3 tanesi de *MSH2* genini hedeflemektedir. Ayrıca *MUTYH* geni için ENST00000450313.1:c.536A>G ve ENST00000450313.1:c.1187G>A değişimleri varlığında sinyal oluşturan 2 adet spesifik mutasyon probu bulunmaktadır. Elde edilen çıktının bireydeki normalizasyonunu sağlamak amacıyla Lynch sendromu ve MAP hastalarında görülen

çeşitli kanser türlerinde nispeten kopya sayısı stabil bölgeleri hedefleyen 12 adet referans prob içermektedir. Kalite kontrolü için ise 64 ile 105 nükleotid arasında kontrol fragmanı oluşturan 9 adet prob bulunur.

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda her bir MLPA çalışmasında olgu grubuna en az 3 adet kontrol örneği dahil edilmektedir. Kontroller daha önce polikliniğimizde değerlendirilerek aile öyküsünde herediter kanser sendromu yatkınlığı bulunmayan ve malignite dışı bir tablo ile yönlendirilmiş olgulara ait DNA örneklerinden seçilmektedir. Seçilen kontrol örneklerinde aynı izolasyon yönteminin kullanılmış olmasına dikkat edilmektedir.

#### 3.3.4.1. MLPA Islak Laboratuvar Aşamaları

MLPA ıslak laboratuvar çalışması kısaca; DNA denatürasyonu, hibridizasyon, ligasyon, PCR ve kapiller elektroforez aşamalarından oluşmaktadır. Bu aşamalar Tablo 6'da detaylıca açıklanmaktadır.

**Tablo 6.** MLPA Islak Laboratuvar Aşamaları

| |
|---|
| • DNA örneklerinden 5'er µl (100 ng DNA) alınarak 200 µl lik PCR tüplerine aktarılır. |
| • Tüpler Thermal Cycler cihazında 98°C'de 5 dk bekletilerek DNA denatürasyonu sağlanır. |
| • Denatürasyon sonrası örnekler oda sıcaklığında soğutulur. |
| • 25°C'deki DNA örneğinin üzerine 1,5 µl 'SALSA® MLPA® P071-D1 *MSH6-MUTYH* Probe Mix' ile 1,5 µl MLPA Buffer eklenir ve pipetaj yapılarak homojenize edilir. |
| • Elde edilen örnekler 95°C'de 1 dk inkübasyonun ardından 60 °C'de 16-18 saat hibridizasyona bırakılır. |
| • Hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 karışımı (25 µl steril su, 3 µl Ligaz-65 Buffer A, 3 µl Ligaz-65 Buffer B, 1 µl Ligaz-65) ilave edilir ve 54°C'de 15 dk inkübasyona bırakılır. |
| • Ardından ligaz inaktivasyonu için 98°C'de 5 dk bekletilir. |
| • Ligasyon ürünlerini içeren strip tüplerine, 10'ar µl hazırlanan polimeraz karışımından (7,5 µl steril su, 2 µl SALSA PCR primer, 0,5 µl SALSA polimeraz) eklenerek pipetaj yapılır. |

- PCR döngüleri; “95°C’de 30 sn denatürasyon, 60°C’de 30 sn annealling, 72°C’de 60 sn ekstansiyon aşamaları ile 35 döngü ve son ekstansiyon aşaması 72°C’de 20 dk” olacak şekilde amplifikasyon işlemi başlatılır.
- PCR bitiminde elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 0,7 µl alınarak ABI 3130 cihazı yükleme tüplerine aktarılır ve üzerlerine 0.3 µl internal size standart ile 9 µl formamid eklenir. Karışım pipetaj yapılarak homojenize edilir.
- Daha sonra bu örnekler 80°C’de 2 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlanır.
- Bu işlem sonrası örnekler buz üzerinde birkaç dakika bekletilir. Ardından ABI 3130 cihazına yüklenerek uygun protokolde yürütülür.

#### 3.3.4.2. MLPA Veri Analizi

Çoklu ligasyona bağlı prob amplifikasyonu sonucu elde edilen ham verilerin analizi için Coffalyser.Net yazılımı güncel versiyonu kullanılmaktadır. Her bir kontrol ve hasta örneği için kalite parametreleri ve üretici firmanın belirlediği değerler doğrultusunda kopya sayısı değişimleri analiz edilmektedir. Bu değerler sonucu örneklerin yorumlanmasında kullanılan oranlar Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7.** MLPA Yorumlanmasında Kullanılan Oranlar

| Kopya Sayısı Değişimi Yorumu | Final Oran*<br>(FR, ‘Final Ratio’)* |
|---|---|
| Normal | 0,80<FR<1,20 |
| Homozigot delesyon | FR=0 |
| Heterozigot delesyon | 0.40<FR<0.65 |
| Heterozigot duplikasyon | 1.30<FR<1.65 |
| Heterozigot triplikasyon/Homozigot duplikasyon | 1,75<FR<2,15 |
| Bilinmeyen kopya sayısı | Diğer bütün değerler |

*Eski ürün açıklaması sürümlerinde kullanılan dozaj oranları (DQ, ‘dosage quotient’), Coffalyser.Net yazılımındaki terminoloji ile uyumlu olması için FR ile değiştirilmiştir.

Bilgiler https://www.mrcholland.com/product/P072/1171 sayfasından alıntıdır.

## 3.4. Protein Yapısında Varyantların Modellenmesi

Hücrenin temel fonksiyonel ünitesi olarak işlev gösteren proteinlerde yapısal özelliklerin bilinmesi oldukça önemlidir. Evrimsel süreçte proteinlerin sekonder ve

tersiyer yapıları genellikle birincil yapılarından daha iyi korunmaktadır.[187] Tersiyer yapı formasyonunu oluşturan kimyasal ve fiziksel kuvvetlerin aynı zamanda moleküler etkileşimleri ve enzimatik aktiviteyi yönettiği bilinmektedir.[188,189] Bu minvalde proteinin yapısı veya işlevi denildiğinde karşılıklı olarak birbirine bağlı benzer kavramlar akla gelmelidir.[190]

Herhangi bir proteinin yapısının belirlenmesi, işlevsel mekanizmasının anlaşılmasında olduğu kadar proteinin fonksiyon bozukluğu ile giden hastalıklarda patogenezin aydınlatılmasında ve tedavinin geliştirilmesinde de yardımcı olmaktadır. Hastalıkların patogenezinde biyokimyasal ve fiziksel parametrelerde farklılıklar yaratarak tuz köprülerinin ve hidrojen bağlarının bozulmasıyla protein fonksiyonunu etkileyebilmesi nedeniyle sinonim olmayan SNV'lerin etkisi önemli bir araştırma alanıdır.[41,189,191]

Spesifik bir fenotip için hasar yapıcı SNV'leri nötr olan değişimlerden deneysel olarak ayırt etmek yoğun emek gerektirmektedir. İn silico yöntemler, bir veri havuzundan olası adayların seçilmesinde ve önceliklendirilmesinde yardımcı olarak hastalığa neden olan mutasyonların belirlenmesinde olanak sağlayabilmektedir.[39] Yapısal tahmin araçları ile araştırılan herhangi bir mutasyonun bir proteinin moleküler modeli üzerinde yarattığı stabilite değişikliğini serbest enerji değişimi üzerinden ölçmek ve yapıdaki değişimin etkisini değerlendirmek olasıdır.[41]

Yapısal biyolojik araçlar proteinin modellenmiş yapısı üzerinde belli bir pozisyondaki aminoasit değişiminin termodinamik etkisini teorik olarak hesaplar. Tahmin sonuçları modellemede seçilen 3 boyutlu yapının kalitesi, enerji hesaplamasında kullanılan kuvvet alanı veya ampirik formüller ve çalışılan biyolojik sistemin karmaşıklığından etkilenmektedir.[192] Kullanılan her bir aracın kendi gücü ve sınırlılığı mevcut olmakla birlikte, farklı yaklaşımların kombinasyonları ile prediksiyonu geliştirmek mümkündür.[193,194] Bu kombinasyon, yalnızca tahmini $\Delta\Delta G$ ölçümleri üzerinden cebirsel bir ortalama alınarak kantitatif olarak değil; aynı zamanda termodinamik açıdan dengeli ('stabilizing') veya dengesiz ('destabilizing') yönde etkili şeklinde yapıdaki değişimlerin ikili sınıflandırması ile kalitatif olarak da

yapılabilir.[193] İkili sınıflandırma hesaplanan ΔΔG değerinden daha önemli görünmektedir.[195]

ΔΔG değerleri için, arka planda farklı fonksiyonlar işleterek çıktı veren bu programlardan gelen sonuçları aritmetik bir ortalamaya tabii tutmak olası değildir. Ayrıca gerçek termostabilite değeriyle arasındaki zayıf nicel ilişki nedeniyle ΔΔG değerlerine bakarak yorumda bulunmak tahmin sonucunu geliştirmeyebilir. Elbette bu araçlardan temin edilen ΔΔG değerleri termostabilite değişimi ile uyumlu bir eğilim göstermektedir; ancak detaya inildiğinde kesin bir değer hesaplanmamaktadır.[196]

Bu tez çalışmasında yapısal biyolojik araçlarla yanlış anlamlı değişimlerin termodinamik etkisi araştırıldı. Farklı enzim sistemlerinde 3 aracın kullanımı ile elde edilen sonuçlarda 3/3 fikir birliğinin sağlanmasının spesifiteyi %90 oranında arttırdığı görülmektedir.[193] Spesifitenin artması amaçlanarak 3 farklı araç yardımıyla hesaplamalar yapıldı. Kombine sonuçlar, her bir araçtan gelen verinin bağımsız olarak da kontrol edilmesini gerektirmektedir.[194] Bu nedenle patojenite yorumu önceden belirlenmiş benign ve patojen yanlış anlamlı varyantlar literatür madenciliği ile taranarak programlardaki analizlere dahil edildi.

**Tablo 8.** Modelleme Hesaplamalarına Dahil Edilen Varyantlar

| Sınıflandırma | *HGVSc* | *Genomik Pozisyon* | *Lokasyon* | *SNP_ID* | *HGVSp* |
|---|---|---|---|---|---|
| P1 | c.325C>T | chr1:45799108 | (Exon 3) | rs765123255 | p.Arg109Trp |
| P2 | c.391T>A | chr1:45798840 | (Exon 5) | rs730881832 | p.Trp131Arg |
| P3 | c.470C>T | chr1:45798624 | (Exon 6) | rs777184451 | p.Pro157Leu |
| B1 | c.601A>G | chr1:45798335 | (Exon 8) | rs587782258 | p.Met201Val |
| P4 | c.713A>G | chr1:45798138 | (Exon 9) | rs1057517765 | p.Asn238Ser |
| P5 | c.721C>T | chr1:45798130 | (Exon 9) | rs34126013 | p.Arg241Trp |
| P6 | c.733C>T | chr1:45798118 | (Exon 9) | rs200495564 | p.Arg245Cys |
| P7 | c.820C>T | chr1:45797951 | (Exon 10) | rs769237459 | p.Arg274Trp |
| P8 | c.847A>G | chr1:45797924 | (Exon 10) | rs876659676 | p.Met283Val |
| P9 | c.857G>A | chr1:45797914 | (Exon 10) | rs730881833 | p.Gly286Glu |
| B2 | c.1014G>C | chr1:45797505 | (Exon 12) | rs3219489 | p.Gln338His |
| B3 | c.1013A>G | chr1:45797506 | (Exon 12) | rs199742231 | p.Gln338Arg |
| P10 | c.1163T>C | chr1:45797356 | (Exon 12) | rs1060501335 | p.Leu388Pro |
| P11 | c.1214C>T | chr1:45797201 | (Exon 13) | rs529008617 | p.Pro405Leu |
| P12 | c.1477G>T | chr1:45796229 | (Exon 15) | rs587782228 | p.Val493Phe |

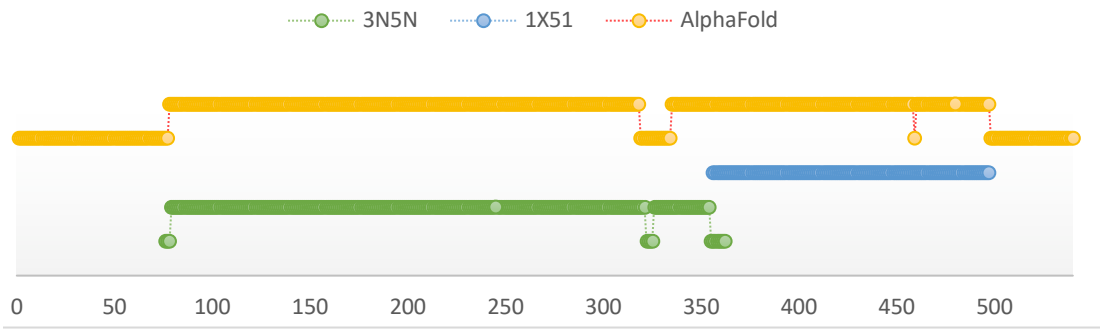
Dahil edilen varyantların patojenite yorumları için patojenik varyantlar için P, benign varyantlar için B kısaltması kullanılmıştır.

MUTYH proteininin 3 boyutlu yapısı uzunluğu 546 aminoasitten oluşan izoform 1 için proteinlerin yapısını yüksek doğrulukla tahmin eden yapay zeka tabanlı AlphaFold uygulamasından elde edildi.[197,198] Bu model farklı iki deneysel yöntemden gelen verilere dayalı olarak; 76 ve 362. aminoasit dizisinin yapı bilgisi X-ışını kırınım metoduyla elde edilen yapı (PDB ID: 3N5N) ile 356 ve 497. aminoasit dizisinin yapı bilgisi ise nükleer manyetik rezonans metoduyla elde edilen yapının (PDB ID: 1X51) entegre edilmesiyle oluşturulmuştur.[199,200]

AlphaFold'dan gelen modelde güvenilirlik skoru rezidü başına 70 ve üzeri olan bölgeler yüksek doğrulukla tahmin edilmektedir. Ek olarak AlphaFold modeli Ramachandran analizi ile değerlendirildiğinde; bu yapıdaki tüm rezidülerin %96,9'u tercih edilen bölgedeyken, %98,8'inin izin verilen bölgede yerleştiği ve yalnızca 5 aminoasitin (Ser323, Cys329, Ala330, Pro331, Asn332) aykırı değere sahip olduğu gözlenmektedir (EK-5).

Aşağıdaki şekillerde bahsi geçen yapılar aminoasit pozisyonuna göre şematize edilmiştir ve 3 boyutlu yapıda görsellenmiştir.

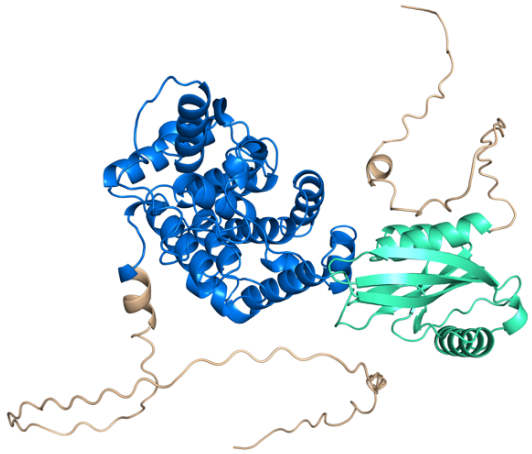
*Şekil 7. MUTYH Yapılarının Karşılaştırılması*




Deneysel yöntemle elde edilen 3N5N ve 1X51 ile AlphaFold'dan elde edilen tahmini yapı izoform-1 üzerinde şematize edilmiştir. Renkler "Yeşil: 3N5N, Mavi: 1X51 ve Sarı: AlphaFold" yapılarını ifade etmektedir. Y ekseninde AlphaFold yapısında güvenilirliği yüksek olan bölgeler yukarıda, düşük olanlar aşağıda; 3N5N yapısında ise gözlenmeyen segmentler aşağıda olacak şekilde temsil edilmiştir. AlphaFold yapısındaki güvenilirlik skorunun deneysel yöntemlerden gelen bilgilerle karşılık gelen aminoasit pozisyonunlarında yükseldiği göze çarpmaktadır.

*Şekil 8. Seçilen AlphaFold MUTYH Protein Yapısı*

Renkler "Koyu Mavi: 3N5N, Yeşil: 1X51, Bej: Güvenilirlik skoru düşük bölgeleri" temsil etmektedir



Seçilen AlphaFold modelinde güvenilirlik skoru düşük olan bölgeler (Ekzon 1,2 ve 16) silinerek oluşturulan yapı, daha önce mus musculusta dsDNA ile etkileşimi X-ışınımı kırınım metoduyla deneysel olarak saptanan yapı ile (PDB ID: 7EF8) hizalanarak fare MutY proteini bu modelden silindi. Böylelikle insan MutY AlphaFold yapısı ile dsDNA etkileşim modeli elde edildi. Oluşturulan bu model, HADDOCK internet sunucusu aracılığıyla enerjetik olarak minimize edildi.[201,202] En iyi HADDOCK skorlu yapı olan "cluster 6" nihai model olarak seçildi (EK-7). Bu nihai model, yanlış anlamlı varyantlarla birlikte kullanılacak yapısal biyoloji araçlarına yüklendi. Modelin seçiminde izlenen yol haritası Tablo 9'da verilmiştir.

Son basamakta araçların her birinden gelen ΔΔG ölçümleri ve termodinamik etki tahmini sonuçlarından tablolar oluşturuldu.

Her ne kadar tez çalışmasına dahil edilen patojenik, benign ve klinik önemi bilinmeyen yanlış anlamlı bütün varyantların termodinamik denge değişimlerinin tahmini hedeflenmiş olsa da bazı varyantlar güvenilirliği düşük bölgede yerleştiği için oluşturulan modelde temsil edilmemiştir ve bu varyantların hesaplamaları yapılamamıştır.

**Tablo 9.** Model Oluşturulurken İzlenilen Yol Haritası

| |
|---|
| 1. İnsan MUTYH protein yapısının 546 aminoasitlik (UniProt ID: Q9UIF7) sekans girdisi ile ColabFold kullanarak modellenmesi ve en yüksek ranklı yapının PDB dosya formatında indirilmesi |
| 2. Güvenilirlik skoru düşük olan bölgelerin Pymol aracılığıyla AlphaFold yapısından silinmesi ve kalan yapının PDB dosya formatında kaydedilmesi |
| 3. Mus musculus'ta dsDNA ile etkileşim yapısı gösterilen MutY protein yapısının (PDB ID: 7EF8) PDB formatında indirilmesi |
| 4. İkinci basamakta elde edilen güvenilirliği yüksek bölgelerin temsil edildiği yapı ile 7EF8'in hizalanmasının ardından fare MutY yapısının modelden silinmesi |
| 5. Kalan insan MutY protein modelinin HADDOCK'ta rafine edilmesi ve en iyi HADDOCK skorlu olan "cluster 6" yapısının analizlerde kullanılması için indirilmesi |
| 6. Elde edilen bu son modelle birlikte yanlış anlamlı varyantların in silico programlara yüklenmesi |

Tez çalışmasında kullanılan hesaplamalı yapısal biyolojik araçlar ve işlevleri Tablo 10'da özet halinde verilmiştir.

**Tablo 10.** Hesaplamalı Yapısal Biyoloji Araçlar ve İşlevleri

| Araç İsmi | İşlev | Ref |
|---|---|---|
| mCSM Protein-DNA | Makine öğrenimi metoduyla grafik tabanlı atom mesafesi modellerinin uygulanması ile serbest enerji değişiminin tahmini | 40 |
| DynaMut2 | Mutasyonun interatomik etkileşimlerle protein dinamiklerinde oluşturduğu serbest enerji değişiminin normal mod analizi ile protein yapısının grafik tabanlı gösterimi üzerinden niceliksel olarak tahmini | 203,204 |
| PremPS | Deneysel çalışmalardan türetilmiş veriler üzerine eğitilmiş doğrusal bir regresyon modelinin uygulanmasıyla mutasyonun protein stabilitesi üzerindeki etkisinin tahmini | 205 |

DynaMut2 ve mCSM programları negatif ΔΔG değerlerini dengesiz etkili olarak, pozitif değerleri dengeli etkili olarak sınıflandırmaktadır. PremPS çıktıları için bu durum tam tersidir.

## 3.5. İstatistiksel Analiz

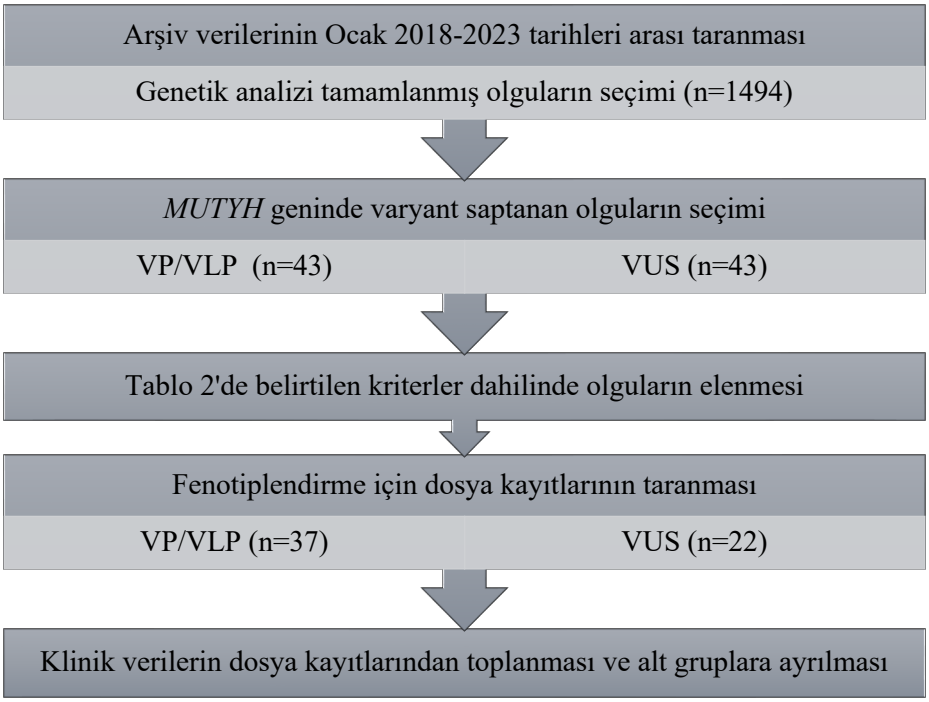
Tez araştırması için elde edilen fenotipik, genomik ve modelleme sonucunda elde edilen bütün veriler için hasta bazlı ve/veya varyant bazlı excell tabloları oluşturuldu. Olgu kümesindeki varyanta özgün alt grup analizleri ile klinik tanıların anlamlılık analizleri gerçekleştirilmedi. Biallelik ve monoallelik varyantı taşıyan KRK

tanılı olguların istatistiki değerlendirilmesinde SPSS-24 (SPSS INC., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Ayrıca klinik bulgular ile varyant arasındaki ilişki tanımlayıcı istatistiksel yöntemler (ortalama, standart sapma, medyan, sıklık ve oran) kullanılarak incelendi.

# 4. BULGULAR

Retrospektif tanımlayıcı bir araştırma olarak tasarlanan bu tez çalışması için, Ocak 2018 ile Ocak 2023 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Tıbbi Genetik Polikliniğine herediter kanser ön tanısı ile yönlendirilen ve moleküler genetik tetkikleri tamamlanmış olguların dosya ve arşiv kayıtları incelendi. Genetik analizi tamamlanmış toplam (n=1494) olgu verisi içerisinden *MUTYH* geninde patojenik ya da muhtemel patojenik varyant taşıyan olgular ile aile yakınları (n=43) ve klinik önemi bilinmeyen varyant saptanan olgular (n=43) teze dahil edilme kriterleri kapsamında değerlendirilmeye alınmıştır. Klinik değerlendirme yapılırken bias olmaması adına dahil edilme kriterlerine uyan ve dışlanma kriteri barındırmayan olgular tez araştırması kapsamına alındı. Patojenik ve muhtemel patojenik varyant taşıyan malignite tanılı 29 olgu ve 8 aile üyesini barındıran toplam 28 farklı aile ve klinik önemi bilinmeyen varyant taşıyan malignite tanılı 22 olgu değerlendirilmiştir. Hasta seçiminde izlenen yol haritası Şekil 9'da özetlenmiştir.

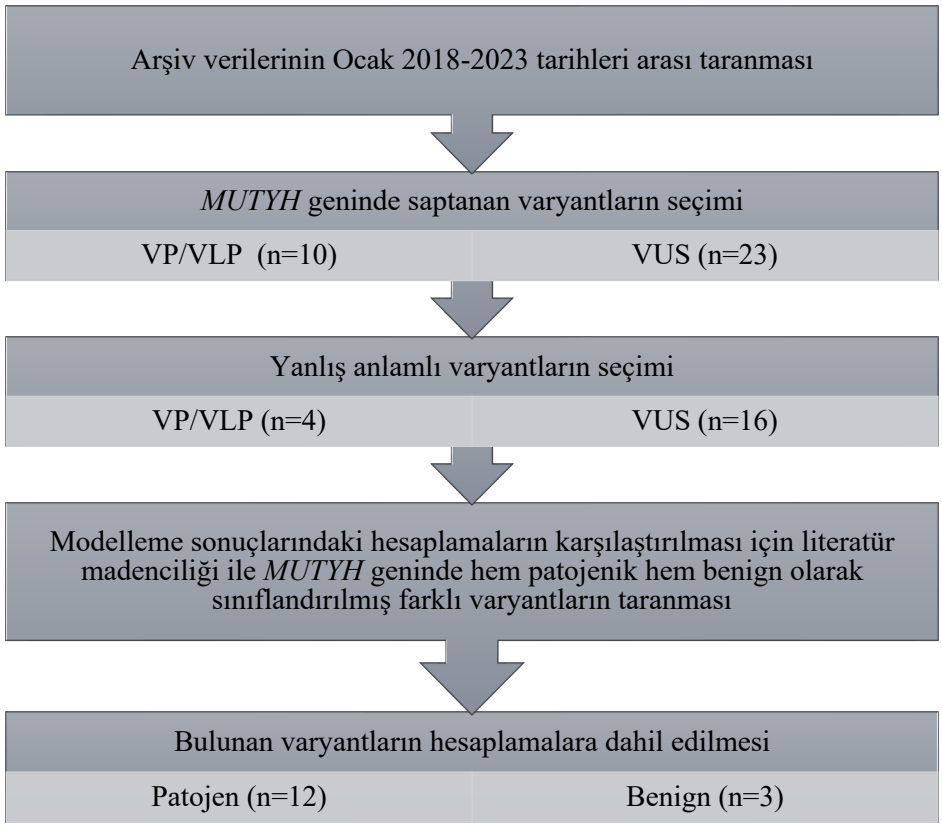
*Şekil 9. Hasta Seçiminde İzlenen Yol Haritası*




Hesaplamalı yapısal biyoloji araçlarının kullanımı için ise herhangi bir dışlama kriteri uygulanmamış olup *MUTYH* geninde saptanan patojenik ve muhtemel patojenik toplam 4 farklı yanlış anlamlı varyant ile klinik önemi bilinmeyen toplam 16 farklı

yanlış anlamlı varyant için bilgisayar temelli yapısal biyolojik araçlar kullanılarak entropi hesaplamaları yapıldı. Ayrıca modelleme hesaplamalarının kıyaslanması için ClinVar veritabanında bulunan ya da fonksiyonel çalışmaları yapılmış patojenik ve benign varyantlar analizlere dahil edildi. Tez araştırması için varyant tespitinde izlenen yol haritası Şekil 10'da özetlenmiştir.

*Şekil 10. Modelleme Varyantlarının Seçiminde İzlenen Yol Haritası*




## 4.1. Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri

Herediter kanser sendromu ön tanısıyla yönlendirilen patojenik veya muhtemel patojenik varyant taşıyan olguların mevcut yaş ortalaması 53,32 (37-53 aralığında)'dır. Cinsiyet dağılımı %62,16 kadın (n=23) ve %37,84 erkek (n=14) şeklinde olup 1,64 kat fazla kadın cinsiyeti temsil edilmektedir. Patojenik veya muhtemel patojenik varyant taşıyan malignite tanılı olguların (n=29) kanser tanı yaşları ortalaması ise 46,27±11,64 (medyan 44; en küçük 30, en büyük 73)'dır. Cinsiyet dağılımı bu grupta %68,96 kadın (n=20) ve %31,03 erkek (n=9) şeklinde olup kanser tanılı olgular içinde kadın cinsiyeti 2,22 kat fazla temsil edilmektedir. Klinik açıdan alt gruplara ayrılarak kanser tipleri değerlendirildiğinde %41 meme kanseri (n=12), %28 KRK (n=8), %17 endometrium

veya over kanseri (n=5) ve 3 hastada multiple kanser öyküsü şeklindedir (Şekil 11). Çoklu kanser primerine sahip hastaların klinik özellikleri aşağıda belirtilmiştir:

- Olgu 1: 52 yaşında erkek hasta. 44 yaşında taşlı yüzük hücreli mide adenokanseri tanısı ve 46 yaşında rektosigmoid bölge yerleşimli KRK tanısı mevcut. Olguda homozigot ENST00000450313.1:c.884C>T değişimi saptandı.
- Olgu 9: 84 yaşında kadın hasta. 73 yaşında sol meme invaziv duktal karsinom tanısı ve 81 yaşında berrak hücreli endometrium kanseri tanısı mevcut. Olguda heterozigot ENST00000450313.1:c.884C>T değişimi saptandı. Karşı allele yönelik kopya sayısı değerlendirmesi için MLPA analizi normal sonuçlandı.
- Olgu 14: 71 yaşında kadın hasta. 48 yaşında endometrium kanseri, 62 yaşında sağ memede invaziv solid papiller kanser tanısı ve 64 yaşında sigmoid kolon yerleşimli KRK tanısı mevcut. Olgunun yapılan analizinde heterozigot ENST00000450313.1:c.1437_1439del değişimi saptandı. Karşı allele yönelik kopya sayısı değerlendirmesi için MLPA analizi normal sonuçlandı.

Ayrıca 9, 14 ve 24 numaralı olgularda primer malignitelerine eşlik eden tiroid papiller karsinom tanıları da bildirilmiştir. Sınıflandırılmayan diğer kanser tipi olarak olgu 7'de 31 yaşında trokanter majör posterior yerleşimli parosteal osteosarkom tanısı mevcuttur ve moleküler analizinde heterozigot ENST00000450313.1:c.884C>T değişimi saptanmış olup bu değişimin mevcut kliniği açıklamadığı düşünülerek ileri incelemesi planlanmıştır.

Klinik tanılar alt gruplara ayrılarak kendi içinde değerlendirilmeye tabii tutulmuştur. Buna göre; KRK tanılı olguların tanı yaş ortalaması 43,12±12,88 (medyan 37; en küçük 30, en büyük 63) şeklinde olup cinsiyet dağılımında 8 kat yüksek erkek temsili gözlenmektedir. Lokasyon olarak %62,5 sol kolon (n=5), %37,5 sağ kolon (n=3) tutulumu görülmektedir. olguda sağ kolon tutulumuBütün olgular immunohistokimyasal boyama ile MSS saptanmıştır. Yalnızca olgu 12'de tümör dokusunda *KRAS* kodon 12'de G12C değişimi saptanmıştır. Olguların başvuru anı ECOG skorları değerlendirildiğinde 0-1 arasında değiştiği ve performans skorlarının

iyi olduğu gözlenmektedir. Bu tanı grubunda homozigot veya bileşik heterozigot *MUTYH* gen varyantı taşıyan olguların tanı yaş ortalaması 37,16±7,78'dir. Bu sonuca göre KRK tanılı hastaların tanı yaşı, her iki allelin de hasara uğramış olması ile zigosite fark etmeksizin *MUTYH* geninde patojenik ya da muhtemel patojenik varyant taşıyan grup arasında anlamlı fark göstermektedir (p değeri < 0.001). Senkron tümör ile iki ayrı bölgeden tanı alan olgu 12 ile peritonitis karsinomatoza tablosu geliştiren olgu 19, tanı sonrası 5 yıl içerisinde exitus olmuşlardır.

KRK tanılı olgu 5 ve 13'ün birinci derece yakınları aile taraması kapsamında değerlendirilerek *MUTYH* geninde patojenik değişim saptanması üzerine kolonoskopiye yönlendirilmiştir. Bu aile üyelerinin özellikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 11.** Aile Taraması Kapsamında Değerlendirilen Bireyler

| ON | Sex | Yaş | HGVSc | Zigosite | Kolonoskopik öykü (Yaş) |
|---|---|---|---|---|---|
| 5-1 | K | 67 | ENST00000450313.1:c.884C>T | Het. (MLPA: Normal) | Normal (63) |
| 5-2 | E | 68 | ENST00000450313.1:c.884C>T | Het. (MLPA: Normal) | NA |
| 13-1 | K | 66 | ENST00000450313.1:c.734G>A | Het. (MLPA: Normal) | NA |
| 13-2 | E | 65 | ENST00000450313.1:c.734G>A | Het. (MLPA: Normal) | NA |
| 13-3 | E | 46 | ENST00000450313.1:c.734G>A | Het. (MLPA: Normal) | Tübüler adenom polipektomi (39) |
| 13-4 | K | 42 | ENST00000450313.1:c.734G>A | HOMO. | Tübüler adenom polipektomi (36) |
| 13-5 | E | 33 | ENST00000450313.1:c.734G>A | Het. (MLPA: Normal) | Normal (30) |
| 13-6 | E | 30 | ENST00000450313.1:c.734G>A | HOMO. | Çoklu tübüler ve villöz adenom polipektomi (23 ve 28) |

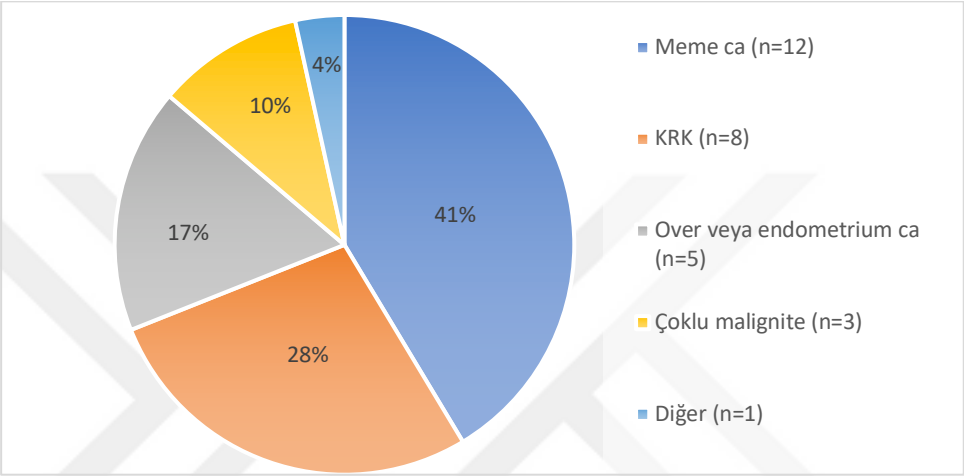
ON: Olgu numarası, HGVSc: 'Human Genome Variantion Society coding DNA', HOMO: Homozigot, Het: Heterozigot, NA: 'Non-Available'

Meme kanseri tanılı 12 kadın olgunun tanı yaşı ortalaması 46,25±10,09 (medyan 44; en küçük 33, en büyük 72)'dur. Olgu 22 ve 26 hariç immunohistokimyasal boyama ile hastaların hepsinde hormon reseptörleri pozitif saptanmıştır. Ancak olgu 22 ve 26'da hem hormon reseptörleri negatif, hem CerbB2 boyaması pozitif saptanmıştır.

Over veya endometrium kanseri tanılı 5 kadın olgunun tanı yaşı ortalaması 49,2±10,4 (medyan 45; en küçük 39, en büyük 65)'tür. Olgu 28 ve 30 tanı sonrası 3 sene içerisinde exitus olmuştur.

Patojenik veya muhtemel patojenik varyant saptanan olguların klinik tanılarının dağılım grafiği Şekil 11'de gösterilmiştir.

*Şekil 11. P/LP Varyant Saptanan Olguların Klinik Tanılarının Dağılımı*




Malignite tanılı olguların klinik alt gruplara ayrılarak detaylandırılmış özellikleri Tablo 12'de verilmiştir. Çoklu kanser tanısı olan olgu 1, 9 ve 14 bu tablolardaki izole malignite kliniklerine dahil edilmemiştir.

**Tablo 12.** P/LP Varyant Saptanan Malignite Tanılı Olguların Klinik Özellikleri

**1) KRK tanılı olgular**

| ON | Sex-Yaş | HGVSc | Zigosite | Tanı Yaşı | HP Dx | Lokalizasyon | TİL yanıtı | Evre | ECOG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | E-44 | ENST00000450313.1:c.884C>T | HOMO. | 37 | Adenokanser | Çekum | Belirgin | T3N0 | 0 |
| 3 | E-41 | ENST00000450313.1:c.884C>T | HOMO. | 37 | Adenokanser | Rektosigmoid | Yok | T2N0 | 0 |
| 4 | E-49 | ENST00000450313.1:c.884C>T | HOMO. | 32 | Adenokanser | Sigmoid | Hafif-orta | T4bN0 | 0 |
| 5 | E-41 | ENST00000450313.1:c.884C>T | HOMO. | 35 | Müsinöz adenokanser | Rektosigmoid | Hafif-orta | T3N0 | 0 |
| 12 | E-EX | ENST00000450313.1:c.884C>T<br>ENST00000450313.1:c.734G>A | Bil. Het. | 52 | Müsinöz adenokanser | Senkron transvers ve sigmoid | Hafif-orta | T3N1bM0 | 0 |
| 13 | K-39 | ENST00000450313.1:c.734G>A | HOMO. | 30 | Metasenkron adenokanser | Metasenkron çekum ve sigmoid | Hafif-orta<br>Yok | T3N0 | 1 |
| 17 | E-68 | ENST00000450313.1:c.1437_1439del | Het.<br>(MLPA: Normal) | 63 | Adenokanser | İnen kolon proksimali | Yok | T3N1aM0 | 1 |
| 19 | E-EX | ENST00000450313.1:c.1437_1439del | Het.<br>(MLPA: Normal) | 59 | Müsinöz adenokanser | Çıkan kolon | Hafif-orta | T4aN2aM1 | 0 |

ON: Olgu Numarası, HGVSc: 'Human Genome Variantion Society coding DNA', HOMO: Homozigot, Het: Heterozigot, Bil. Het.: Bileşik Heterozigot, HP Dx: Histopatolojik Tanı, NA: 'Non-Available', TİL: Tümör infiltratif lenfosit (40x'de 0-2 lenfosit: Hafif-orta, 3 veya fazla lenfosit: Belirgin, lenfosit saptanmaması: Yok), ECOG: 'Eastern Cooperative Oncology Group' performans skoru

## 2) Meme kanseri tanılı olgular

| ON | Sex-Yaş | HGVSc | Zigosite | Tanı Yaşı | HP Dx | Lokalizasyon | İHK |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | K-53 | ENST00000450313.1:c.884C>T | Het. (MLPA: Normal) | 43 | Multifokal İnv. Lobüler ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 - |
| 8 | K-46 | ENST00000450313.1:c.884C>T | Het. | 42 | İnv. Duktal ca | Sol meme | ER + PR + CerbB2 - |
| 10 | K-47 | ENST00000450313.1:c.884C>T | Het. | 44 | Multifokal İnv. Lobüler ca | Sol meme | ER + PR + CerbB2 - |
| 11 | K-53 | ENST00000450313.1:c.884C>T | Het. | 50 | Müsinöz ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 - |
| 16 | K-54 | ENST00000450313.1:c.1437_1439del | Het. (MLPA: Normal) | 49 | İnv. Duktal ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 + |
| 20 | K-76 | ENST00000450313.1:c.1437_1439del | Het. | 72 | İnv. Lobüler ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 - |
| 22 | K-45 | ENST00000450313.1:c.1187G>A | Het. (MLPA: Normal) | 40 | İnv. Duktal ca | Sol meme | ER - PR - CerbB2 + |
| 23 | K-44 | ENST00000450313.1:c.1187G>A | Het. (MLPA: Normal) | 34 | Taşlı yüzük hücreli İnv. Lobüler ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 - |
| 24 | K-57 | ENST00000450313.1:c.1187G>A | Het. (MLPA: Normal) | 33 | HP Dx: NA Bilateral (Önce sağ meme, 10y sonra sol meme) | | ER + PR + CerbB2 + |
| 25 | K-56 | ENST00000450313.1:c.1187G>A | Het. | 50 | DCIS, atipik hiperplazi | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 - |
| 26 | K-53 | ENST00000450313.1:c.1358_1359del | Het. | 47 | İnv. Duktal ca | Sol meme | ER - PR - CerbB2 + |
| 29 | K-53 | ENST00000450313.1:c.859del | Het. | 51 | Multifokal İnv. Lobüler ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 - |

ON: Olgu Numarası, HGVSc: 'Human Genome Variantion Society coding DNA', Het: Heterozigot, HP Dx: Histopatolojik Tanı, NA: 'Non-Available', DCIS: Duktal Karsinoma insitu, İnv: İnvaziv, ca: kanser ('cancer'), İHK: İmmunohistokimyasal boyama, ER: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü

### 3) Over veya endometrium kanseri tanılı olgular

| ON | Sex-Yaş | HGVSc | Zigosite | Tanı Yaşı | HP Dx |
|---|---|---|---|---|---|
| 30 | K-EX | ENST00000450313.1:c.884C>T | Het. | 54 | Yüksek dereceli over seröz ca |
| 15 | K-49 | ENST00000450313.1:c.1437_1439del | Het. | 43 | Over seröz ca |
| 18 | K-53 | ENST00000450313.1:c.1437_1439del | Het. | 45 | Düşük dereceli over seröz ca |
| 27 | K-46 | ENST00000450313.1:c.453_458dup | Het. | 39 | Senkron endometrium ve over endometrioid adenoca |
| 28 | K-EX | ENST00000450313.1:c.933+3A>C | Het. | 65 | Over seröz ca |

### 4) Sınıflandırılmayan diğer kanser tanılı olgular

| ON | Sex-Yaş | HGVSc | Zigosite | Tanı Yaşı | HP Dx |
|---|---|---|---|---|---|
| 7 | E-35 | ENST00000450313.1:c.884C>T | Het. | 31 | Parosteal osteosarkom |

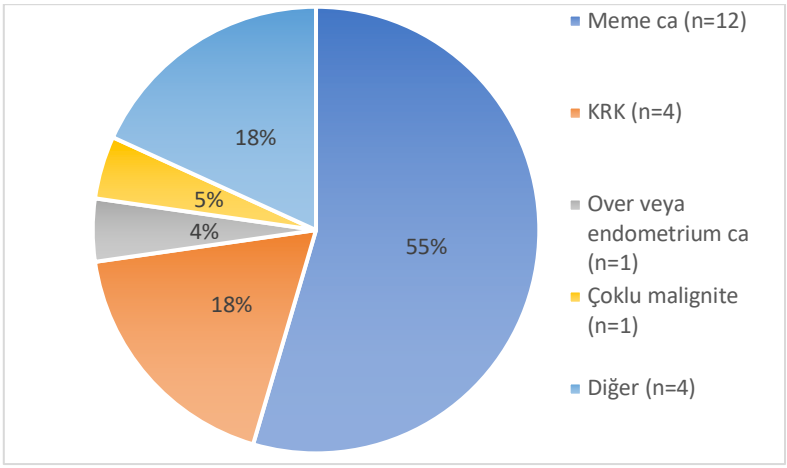
ON: Olgu Numarası, HGVSc: 'Human Genome Variantion Society coding DNA', Het: Heterozigot, HP Dx: Histopatolojik Tanı, ca: kanser ('cancer')

Klinik önemi bilinmeyen *MUTYH* gen varyantı taşıyan malignite tanılı olguların (n=22) mevcut yaş ortalaması 57,04 (31-82 aralığında)'tür. Bu olgu grubunda kanser tanı yaşı ortalaması ise 49,72±13,75 (medyan 47,5; en küçük 27, en büyük 69)'dur. Cinsiyet dağılımına bakıldığında %72,73 kadın (n=16) ve %27,27 erkek (n=6) şeklinde, kadın cinsiyetinin klinik önemi bilinmeyen varyantların saptandığı malignite tanılı grupta 2,67 kat fazla temsil edildiği gözlenmektedir. Bu grup malignite tanıları açısından sınıflandırıldığında %54,54 meme kanseri (n=12), %18,18 KRK (n=4), %4,54 endometrium veya over kanseri (n=1) ve bir hastada multiple kanser öyküsü şeklindedir. Kalan 4 hasta diğer sınıflandırması içerisinde değerlendirilmiştir. Multiple kanser öyküsü olan olgu aşağıda belirtilmiştir:

- Olgu 41: 78 yaşında erkek hasta. 66 yaşında alt dudakta skuamöz hücreli kanser ile aynı yıl primer veya metastatik olduğu ayırt edilemeyen akciğer sol alt lobda skuamöz hücreli kanser tanısı mevcut. Ardından 68 yaşında temporal bölgede bazal hücreli karsinom ve trikoepitelyoma gelişmesi üzerine tetkik edilerek heterozigot ENST00000450313.1:c.925C>T değişimi saptandı.

Ayrıca olgu 34'te primer kanseri olan KRK tanısına eşlik eden tiroid papiller karsinom tanısı da mevcuttur. Bu grupta yer alan olguların klinik tanılarının dağılım grafiği Şekil 12'de gösterilmiştir.

*Şekil 12. VUS Saptanan Olguların Klinik Tanılarının Dağılımı*




Sınıflandırılmayan diğer kanser tipleri ve klinik alt grupların detaylı özellikleri Tablo 13'te verilmiştir. Çoklu kanser tanısı olan olgu 41 bu tablolardaki izole malignite kliniklerine dahil edilmemiştir.

**Tablo 13.** VUS Saptanan Malignite Tanılı Olguların Klinik Özellikleri

### 1) KRK tanılı olgular

| ON | Sex-Yaş | HGVSc | Zigosite | Tanı Yaşı | HP Dx | Lokalizasyon | TİL yanıtı | Evre | ECOG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 34 | K-53 | ENST00000450313.1:c.1258C>A | Het. | 36 | Adenokanser | NA | NA | NA | 0 |
| 38 | K-40 | ENST00000450313.1:c.56G>A | Het. | 28 | Adenokanser | Periampuller bölge | Belirgin | T3N1 | 0 |
| 42 | E-68 | ENST00000450313.1:c.925C>T | Het. | 66 | Müsinöz adenokanser | NA | Hafif-orta | T3N0 | 1 |
| 46 | E-38 | ENST00000450313.1:c.1276C>T | Het. | 35 | Adenokanser | Orta-alt rektum | Yok | T2N0 | 1 |

### 2) Meme kanseri tanılı olgular

| ON | Sex-Yaş | HGVSc | Zigosite | Tanı Yaşı | HP Dx | Lokalizasyon | İHK |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **31** | K-76 | ENST00000450313.1:c.880C>T | Het. | 67 | İnv. Lobüler ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 + |
| **35** | K-55 | ENST00000450313.1:c.1258C>A | Het. | 54 | İnv. Duktal ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 + |
| **36** | K-66 | ENST00000450313.1:c.1258C>A | Het. | 64 | İnv. Meme karsinomu-NOS | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 + |
| **37** | E-74 | ENST00000450313.1:c.56G>A | Het. | 63 | DCIS | Sol meme | ER + PR + CerbB2 - |
| **40** | K-70 | ENST00000450313.1:c.925C>T | Het. | 64 | İnv. Duktal ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 - |
| **43** | K-55 | ENST00000450313.1:c.31C>G | Het. | 46 | İnv. Lobüler ca | Sağ meme | ER + PR + CerbB2 - |
| **44** | K-55 | ENST00000450313.1:c.1276C>T | Het. | 48 | İnv. Duktal ca | Bilateral (Önce sağ meme, 3y sonra sol meme) | ER + PR + CerbB2 + |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **45** | K-43 | ENST00000450313.1:c.1276C>T | Het. | 40 | İnv. Duktal ca | Sol meme | ER + PR + CerbB2 + |
| **47** | K-78 | ENST00000450313.1:c.985G>A | Het. | 69 | İnv. Duktal ca | Sağ meme | ER - PR - CerbB2 + |
| **48** | K-52 | ENST00000450313.1:c.1421G>A | Het. | 44 | Müsinöz ca | Sağ meme | ER + PR - CerbB2 zayıf + |
| **50** | K-59 | ENST00000450313.1:c.593G>A | Het. | 54 | İnv. Duktal ca | Bilateral | ER + PR + CerbB2 - |
| **51** | K-56 | ENST00000450313.1:c.797C>G | Het. | 47 | İnv. Duktal + Müsinöz ca | Sağ meme | ER + PR - CerbB2 - |

### 3) Over veya endometrium kanseri tanılı olgu

| ON | Sex-Yaş | HGVSc | Zigosite | Tanı Yaşı | HP Dx |
|---|---|---|---|---|---|
| **52** | K-49 | ENST00000450313.1:c.715G>A | Het. | 42 | Yüksek dereceli over seröz ca |

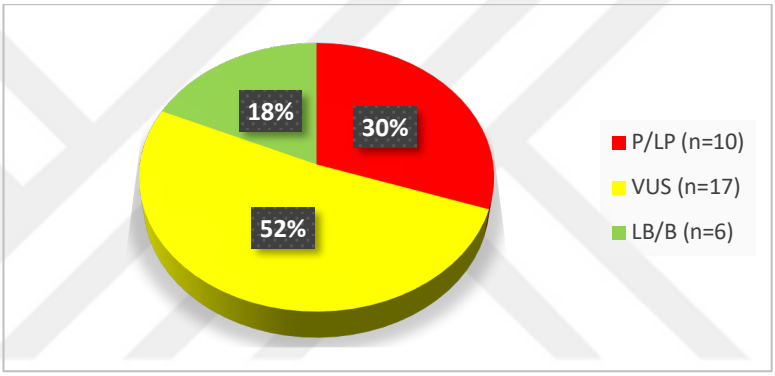
### 4) Sınıflandırılmayan diğer kanser tanılı olgular

| ON | Sex-Yaş | HGVSc | Zigosite | Tanı Yaşı | HP Dx |
|---|---|---|---|---|---|
| **32** | E-66 | ENST00000450313.1:c.880C>T | Het. | 62 | Sol tonsil yerleşimli SCC |
| **33** | K-31 | ENST00000450313.1:c.1258C>A | Het. | 27 | Taşlı yüzük hücreli gastrik adenokanser |
| **39** | K-52 | ENST00000450313.1:c.925C>T | Het. | 33 | Mide antrum yerleşimli nöroendokrin tümör |
| **49** | E-41 | ENST00000450313.1:c.1421G>A | Het. | 39 | Sol adrenal bezde adrenokortikal karsinom |

ON: Olgu Numarası, HGVSc: 'Human Genome Variantion Society coding DNA', Het: Heterozigot, HP Dx: Histopatolojik Tanı, NA: 'Non-Available', TİL: Tümör infiltratif lenfosit (40x'de 0-2 lenfosit: Hafif-orta, 3 veya fazla lenfosit: Belirgin, lenfosit saptanmaması: Yok), ECOG: 'Eastern Cooperative Oncology Group' performans skoru**,** DCIS: Duktal Karsinoma insitu, İnv: İnvaziv, ca: kanser ('cancer'), İHK: İmmunohistokimyasal boyama, ER: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü, SCC: Squamoz hücreli karsinom

*MUTYH* geninde saptanan varyantların patojenite sınıflaması yapılırken ACMG 2015 kanıt kriterleri ClinGen sekans varyant yorumu çalışma grubunun güncel değerlendirme önerileri dikkate alınarak kullanılmıştır.[42,176,206] Bu yorumlamaya göre 7 varyant patojenik ve 3 varyant muhtemel patojenik vasıftadır. Raporlandığı dönemde klinik önemi bilinmeyen değişim olarak yorumlanan 23 farklı varyant yeniden analiz edildiğinde 6 varyant muhtemel benign ya da benign şeklinde yorumlanmıştır ve bu olgular klinik değerlendirmeye dahil edilmemişlerdir. Yeniden analiz ve güncel yorumlama ile allel havuzundaki varyantların patojenite dağılımı Şekil 13'te gösterilmiştir.

*Şekil 13. Varyantların Güncel Yorumlama Sonrası Patojenite Dağılım Oranları*




## 4.2. Varyant Temelli Bulgular

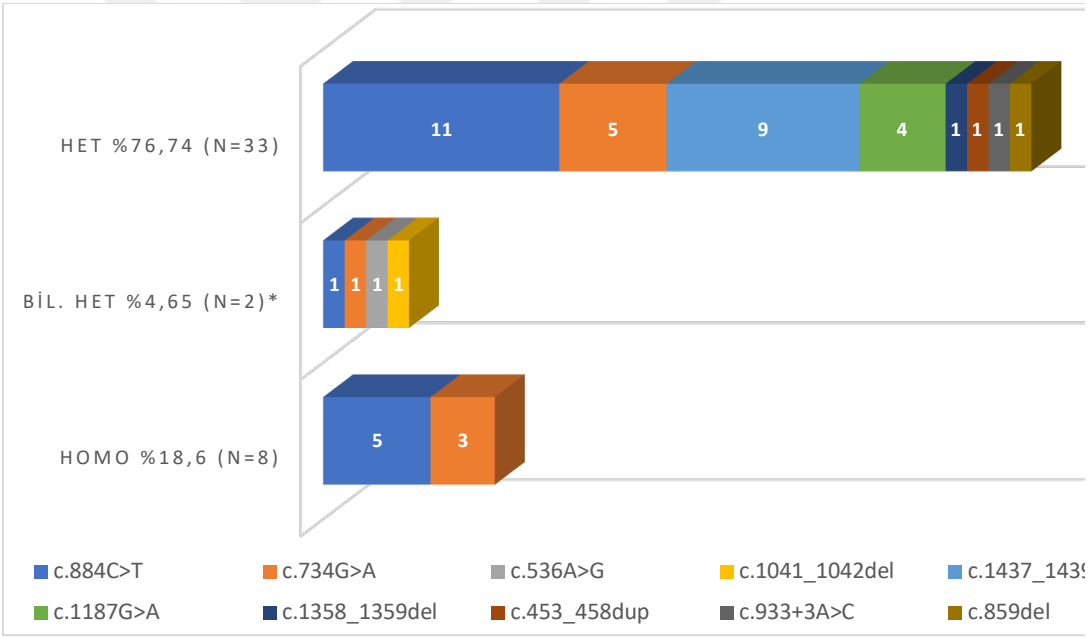
Herediter kanser sendromlarına yönelik kalıtsal kanser risk paneli ile YND yapılan toplam (n=1494) analiz içerisinde *MUTYH* geninde patojenik veya muhtemel patojenik varyant tespit etme oranı %2,88 (n=43)'dir. Sekiz hastada beraberinde yüksek penetranslı bir başka kanser yatkınlık geninde patojenik varyant bulunduğu için bu hastalar *MUTYH* genine dair klinik temelli bulguların değerlendirildiği bölüme dahil edilmemişlerdir; ancak genin frekans bilgisinin toplanması amacıyla allel havuzundaki sayıma dahil edilmişlerdir.

Patojenik veya muhtemel patojenik değişim taşıyan toplam 43 bireyin bulunduğu grupta homozigot (n=8) ve bileşik heterozigot (n=2) varyant saptama oranı sırasıyla %18,60 ve %4,65'tir. Heterozigot patojenik veya muhtemel patojenik varyant taşıyan 33 hasta ise bu grubun %76,74'ünü oluşturarak çoğunluğu temsil etmektedirler. Ayrıca heterozigot olguların ileri incelemesi için 15 olguya karşı allelin

değerlendirilmesi amacıyla delesyon duplikasyon analizi yapılmıştır. Hiçbir olguda delesyon/duplikasyon saptanmamıştır. Mutasyon spesifik prob ile 3 hastada YND ile saptanan ENST00000450313.1:c.1187G>A değişimi MLPA yöntemi ile de gösterilmiştir. Ancak kit ile saptanabilen spesifik mutasyona sahip diğer 2 olgunun; ENST00000450313.1:c.1187G>A değişimini taşıyan olgu 25 ve ENST00000450313.1:c.536A>G değişimini taşıyan olgu 21, MLPA analizi yapılmamıştır. Olgu 21 beraberinde bir başka yüksek penetranslı kanser yatkınlık geninde de değişim barındırdığı için bu tez çalışmasında klinik değerlendirme kapsamı dışındadır.

Toplam 43 olguda saptanan patojenik ve muhtemel patojenik 10 farklı varyantın zigositesi ve varyant bazlı dağılımları Şekil 14'te gösterilmiştir.

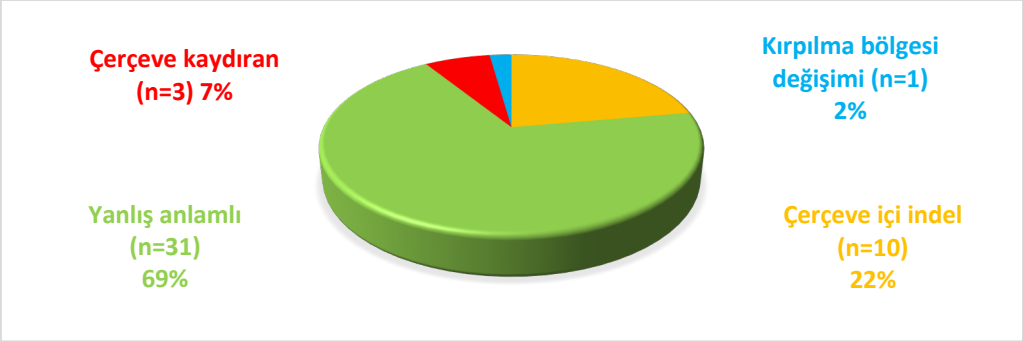
*Şekil 14. P/LP Varyantların Zigositesi*




*Bileşik heterozigot olgulardaki her iki alternatif allel de temsil edilmiştir. Toplamda kırk üç olgu ve aile bireyinden oluşan 45 allelin oluşturduğu total allel havuzundaki P/LP varyantlar belirtilen renklerle gösterilmektedir. N: Kişi sayısı, Het: Heterozigot, Bil. Het: Bileşik heterozigot, Homo: Homozigot

Bileşik heterozigot vakalardaki 2 farklı allelin de dahil edilmesiyle toplam 45 farklı patojenik veya muhtemel patojenik varyantın bulunduğu allel havuzu içinde, varyantların %68,89'u yanlış anlamlı (n=31), %22,22'si çerçeve içi insersiyon veya delesyon (n=10), %6,67'si çerçeve kayması oluşturan (n=3) ve %2,22'si de kırpılma bölgesi değişimi (n=1) tipindedir.

*Şekil 15. P/LP Varyant Tipi Dağılım Grafiği*




Varyantların gen içindeki dağılımı incelendiğinde; %40'ının ekzon 10'da (n=18), %22,22'sinin ekzon 14'te (n=10), %20'sinin ekzon 9'da (n=9), %8,89'unun ekzon 13'te (n=4) ve birer adet ekzon 12, ekzon 7 ve ekzon 5 ile intron 10'da yerleşim gösterdiği görülmektedir. Şekil 16'da saptanan patojenik veya muhtemel patojenik değişimlerin varyant tipine göre gen içindeki yerleşimleri ve genin fonksiyonel domainleri gösterilmiştir.

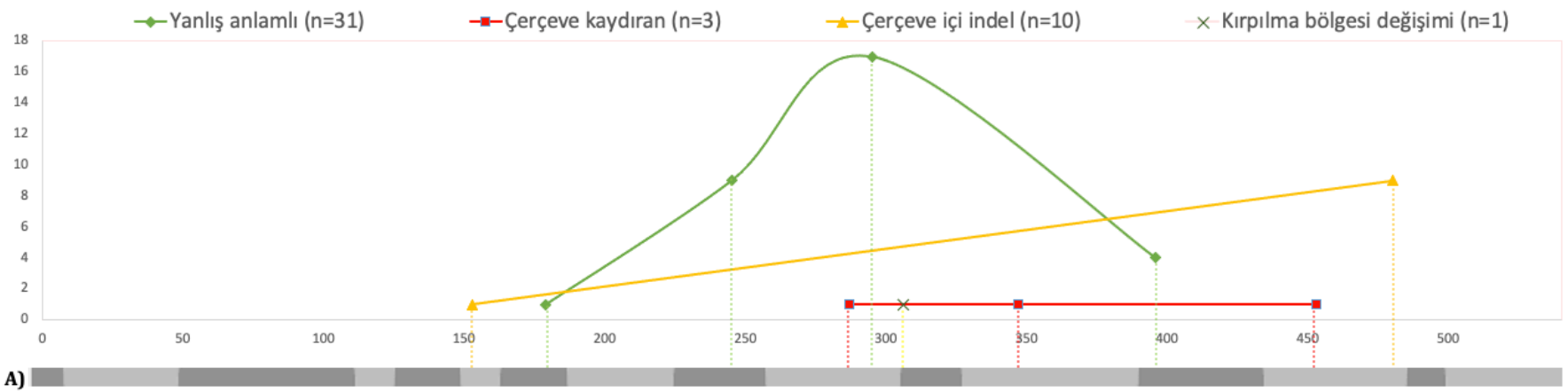
**Tablo 14.** Saptanan P/LP Varyantların Özellikleri

| Allel sayısı | *HGVSc* | *Genomik Pozisyon* | *Lokasyon* | *SNP_ID* | *Mut. Tipi* | *HGVSp* | *Tahmin skorları* | *MAF* | *Kullanılan kanıt kodu* | *Patojenite Yorumu* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***17*** | c.884C>T | chr1:45797887 | (Exon 10) | rs374950566 | Yanlış anlamlı | p.Pro295Leu | 0.95<br>0.98<br>0.9842 | 0.0026%<br>0.1007%<br>0.3549% | PM2, PP3_S, PP5_VS | Patojenik |
| ***9*** | c.734G>A | chr1:45798117 | (Exon 9) | rs140342925 | Yanlış anlamlı | p.Arg245His | 0.93<br>0.94<br>0.8891 | 0.0252%<br>NA<br>0.0626% | PM1, PM2, PM5, PP3, PP5_VS | Patojenik |
| ***9*** | c.1437_1439del | chr1:45796890 | (Exon 14) | rs587778541 | Çerçeve içi indel | p.Glu480del | NA | 0.0326%<br>0.1007%<br>0.1339% | PM2, PM4, PP5_VS | Patojenik |
| ***4*** | c.1187G>A | chr1:45797228 | (Exon 13) | rs36053993 | Yanlış anlamlı | p.Gly396Asp | 0.95<br>0.54<br>0.04205 | 0.4894%<br>0.2518%<br>0.128% | PM2, PM5, PP3 S, PP5_VS | Patojenik |
| ***1*** | c.1358_1359del | chr1:45796970 | (Exon 14) | Novel | Çerçeve kaydıran | p.Tyr453fs | NA | NA | PVS1, PM2 | Muhtemel patojenik |
| ***1*** | c.1041_1042del | chr1:45797476 | (Exon 12) | - | Çerçeve kaydıran | p.Glu347fs | NA | NA | PVS1, PM2, PP5 | Patojenik |
| ***1*** | c.933+3A>C | chr1:45797835 | (Intron 10) | rs587780751 | Kırpılma bölgesi değişimi | - | 1<br>0.87<br>10.82 | 0.0139%<br>NA | PM2, PP3_M, PP5_S | Muhtemel patojenik |
| ***1*** | c.536A>G | chr1:45798475 | (Exon 7) | rs34612342 | Yanlış anlamlı | p.Tyr179Cys | 0.96<br>0.88<br>0.5354 | 0.2501%<br>NA<br>0.0885% | PM1, PM2, PP3_M, PP5_VS | Patojenik |
| ***1*** | c.453_458dup | chr1:45798772 | (Exon 5) | rs876660190 | Çerçeve içi indel | p.Trp152_Met153insIleTrp | NA | 0.0009%<br>NA | PM2, PM4, PP5_S | Muhtemel patojenik |
| ***1*** | c.859del | chr1:45797912 | (Exon 10) | rs761468459 | Çerçeve kaydıran | p.Ala287fs | NA | 0.0033%<br>NA | PVS1, PM2, PP5 | Patojenik |

HGVSc ve HGVSp adlandırmaları sırasıyla "ENST00000450313.1" ve "ENSP00000408176.1" baz alınarak yapılmıştır. Pozisyon bilgisi "GRCh37.p13" referans genomu kullanılarak verilmiştir. Tahmin skorları yanlış anlamlı değişimler için sırasıyla REVEL, MetaLR ve MetaRNN hesaplamalarından; kırpılma bölgesi değişimi için sırasıyla ADA, RF ve MaxEntScan hesaplamalarından faydalanılmıştır. MAF verisi maksimum taşıyıcı sıklığı belirlenecek şekilde GnomAD, ExAC ve 1000Genomes veri tabanlarından ve şayet mevcutsa etnisite ve popülasyon açısından GME Variome ('Greater Middle East') ve TV ('Turkish Variome') veri tabanlarından alınmıştır. Kanıt kodları kullanılırken ClinGen önerileri dikkate alınmış olup farklı kanıt düzeyini ifade etmek için alt çizgi kullanılmıştır.

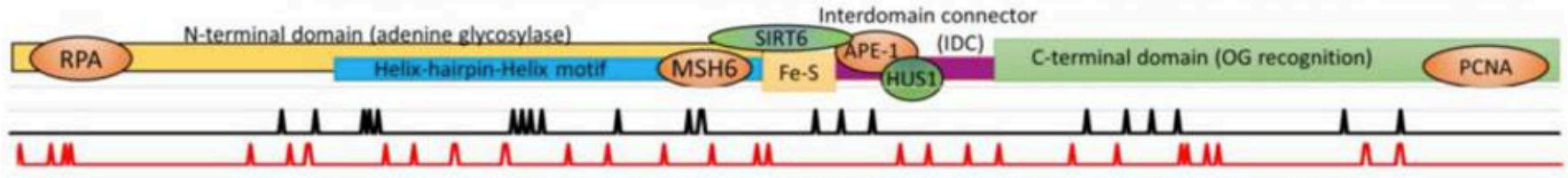
HGVS: 'Human Genome Variation Society' tarafından belirlenen coding DNA ve protein karşılığı, MAF: Minör allel frekansı, NA: 'Non-Available'

*Şekil 16. P/LP Varyantların Gen Üzerindeki Yerleşimleri*




Grafikte X ekseni ile temsil edilen allel sayısı; Y ekseni ile varyantların 549 aminoasit uzunluğundaki izoform 5 (MutYα5) üzerindeki pozisyonları belirtilmiştir. Ayrıca A şekliden sırasıyla 16 ekzonunun dizilimi ve varyantların ekzon yerleşimi gösterilmiştir.

*Şekil 17. Genin Fonksiyonel Domainleri*




Genin fonksiyonel domainleri ve buna karşılık gelen ClinVar veritabanında yer alan patojenik ya da muhtemel patojenik yanlış anlamlı (siyah) ve çerçeve kaymasına neden olan (kırmızı) değişimler gösterilmiştir. Bu görsel Raetz ve ark.'dan alınmıştır.[79]

**Tablo 15.** Klinik Önemi Bilinmeyen Varyantların Özellikleri

| Allel sayısı | *HGVSc* | *Genomik Pozisyon* | *Lokasyon* | *SNP_ID* | *Mut. Tipi* | *HGVSp* | *Tahmin skorları* | *MAF* | *Kullanılan kanıt kodu* | *Patojenite Yorumu* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *7* | c.1258C>A | chr1:45797157 | (Exon 13) | rs144079536 | Yanlış anlamlı | p.Leu420Met | 0.45<br>0.8<br>0.03738 | 0.2219%<br>0.5035%<br>0.1802% | PM2, BP6 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **5** | c.925C>T | chr1:45797846 | (Exon 10) | rs138089183 | Yanlış anlamlı | p.Arg309Cys | 0.59<br>0.81<br>0.05993 | 0.0906%<br>NA<br>0.0359% | PM2 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **4** | c.1276C>T | chr1:45797139 | (Exon 13) | rs150792276 | Yanlış anlamlı | p.Arg426Cys | 0.62<br>0.68<br>0.05789 | 0.1457%<br>NA<br>0.1071% | PM2 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **3** | c.880C>T | chr1:45797891 | (Exon 10) | rs199840380 | Yanlış anlamlı | p.Arg294Cys | 0.55<br>0.8<br>0.4036 | 0.0163%<br>NA | PM2 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **3** | c.690+21C>A | chr1:45798225 | (Intron 8) | rs148552450 | Kırpılma bölgesi değişimi | - | NA | 2.8964%<br>NA<br>0.0747% | BA1, BS1, BS2, BP4, BP6_S | Benign |
| **2** | c.56G>A | chr1:45800164 | (Exon 2) | rs587780081 | Yanlış anlamlı | p.Arg19Gln | 0.03<br>0.55<br>0.1132 | 0.0053%<br>NA<br>0.0177% | PM2, BP4 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **2** | c.1421G>A | chr1:45796909 | (Exon 14) | rs764276907 | Yanlış anlamlı | p.Arg474His | 0.44<br>0.53<br>0.9096 | 0.0009%<br>NA | PM2 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **2** | c.797C>G | chr1:45797974 | (Exon 10) | rs750344996 | Yanlış anlamlı | p.Ala266Gly | 0.81<br>0.89<br>0.8302 | 0.0018%<br>NA | PM2, PP3_M | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.1414G>C | chr1:45796916 | (Exon 14) | rs758262369 | Yanlış anlamlı | p.Gly472Arg | 0.57<br>0.14<br>0.2537 | 0.0033%<br>NA<br>0.0531% | PM2 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.1004A>G | chr1:45797515 | (Exon 12) | rs765808018 | Yanlış anlamlı | p.Asn335Ser | 0.02<br>0.02<br>0.04779 | 0.0011%<br>NA<br>0.0366% | PM2, BP4 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.31C>G | chr1:45805896 | (Exon 1) | rs878854188 | Yanlış anlamlı | p.Leu11Val | 0.11<br>0.05<br>0.09791 | NA | PM2, BP4 | Klinik önemi bilinmeyen |

Klinik Önemi Bilinmeyen Varyantların Özellikleri (devamı)

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | c.985G>A | chr1:45797707 | (Exon 11) | rs147718169 | Yanlış anlamlı | p.Val329Met | 0.06<br>0.05<br>0.02465 | 0.0132%<br>0.2014%<br>0.1044% | PM2, BP4 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.593G>A | chr1:45798343 | (Exon 8) | rs1645156886 | Yanlış anlamlı | p.Gly198Glu | 0.38<br>0.74<br>0.2919 | NA | PM2 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.88G>T | chr1:45800132 | (Exon 2) | rs1557492581 | Yanlış anlamlı | p.Ala30Ser | 0.05<br>0.58<br>0.06287 | NA | PM2, BP4 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.715G>A | chr1:45798136 | (Exon 9) | rs759295912 | Yanlış anlamlı | p.Val239Ile | 0.48<br>0.76<br>0.7695 | 0.0201%<br>NA<br>0.0461% | PM1, PM2 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.1476+10T>A | chr1:45796844 | (Intron 14) | - | Kırpılma bölgesi değişimi | - | NA | NA | PM2, BP6 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.667A>G | chr1:45798269 | (Exon 8) | rs200872702 | Yanlış anlamlı | p.Ile223Val | 0.61<br>0.71<br>0.2594 | 0.0554%<br>NA<br>0.0744% | PM2 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.157+13G>A | chr1:45800050 | (Intron 2) | rs755715694 | Kırpılma bölgesi değişimi | - | NA | 0.0131%<br>NA<br>0.0177% | PM2, BP6, BP7 | Muhtemel benign |
| **1** | c.934-9G>A | chr1:45797767 | (Intron 10) | - | Kırpılma bölgesi değişimi | - | 0<br>0.03<br>0.4167 | NA | PM2, BP4, BP6 | Muhtemel benign |
| **1** | c.558G>A | chr1:45798453 | (Exon 7) | rs1448426714 | Sinonim | p.Leu186= | 0.03<br>0.03<br>0.1457 | 0.0054%<br>NA<br>0.0177% | PM2, BP6, BP7 | Muhtemel benign |
| **1** | c.36+11C>T | chr1:45805880 | (Intron 1) | rs2275602 | Kırpılma bölgesi değişimi | - | NA | 2.4801%<br>NA<br>0.7953% | BA1, BS2, BP6_S, BP7 | Benign |
| **1** | c.1323+6T>C | chr1:45797086 | (Intron 13) | rs1060501341 | Kırpılma bölgesi değişimi | - | 0.1<br>0.28<br>1.2328 | NA | PM2, BP4 | Klinik önemi bilinmeyen |
| **1** | c.1601G>A | chr1:45795027 | (Exon 16) | rs3219497 | Yanlış anlamlı | p.Arg534Gln | 0.11<br>0.03<br>0.002156 | 3.8012%<br>0.1007%<br>NA | BA1, BS2, BP4, BP6_S | Benign |

Tablo 14'te yapılan açıklamalar ve kullanılan veri tabanları geçerlidir.

### 4.3. Modelleme Sonuçları

Tez çalışmasına dahil edilen allel havuzundan yanlış anlamlı patojenik ve muhtemel patojenik *MUTYH* varyantlarla (n=4) literatürden dahil edilen patojenik (n=12) ve benign (n=3) yanlış anlamlı varyantların in silico yapısal biyoloji araçlarının yardımıyla hesaplanan ΔΔG değerleri ve protein yapısındaki termodinamik denge üzerinde tahmini sonuçları Tablo 16'da verilmiştir.

**Tablo 16.** Patojenitesi Bilinen Varyantların Protein Modelindeki Sonuçları

| *HGVSc* | *HGVSp* | *PremPS* | *mCSM* | *DynaMut* | *Sonuç* | *Lokasyon* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| c.325C>T | p.Arg109Trp | 0,71 | 0,198 | 0,28 | 1/3 | Sur |
| c.391T>A | p.Trp131Arg | 2,28 | 1,886 | -3,55 | 2/3 | Cor |
| c.470C>T | p.Pro157Leu | 0,96 | 0,015 | -0,61 | 2/3 | Sur |
| c.536A>G | p.Tyr179Cys | 1,39 | 1,034 | 0,79 | 1/3 | Sur |
| c.601A>G* | p.Met201Val | 1,14 | -0,98 | -0,52 | 3/3* | Cor |
| c.713A>G | p.Asn238Ser | 1,13 | -0,662 | 0,35 | 2/3 | Sur |
| c.721C>T | p.Arg241Trp | 0,86 | -4,533 | -1.12 | 3/3 | Cor |
| c.733C>T | p.Arg245Cys | 0,88 | -3,277 | -0,71 | 3/3 | Cor |
| c.734G>A | p.Arg242His | 1,98 | -3,705 | -1,35 | 3/3 | Cor |
| c.820C>T | p.Arg274Trp | 0,66 | -0,756 | -0,42 | 3/3 | Sur |
| c.847A>G | p.Met283Val | 1,9 | -0,556 | -0,85 | 3/3 | Cor |
| c.857G>A | p.Gly286Glu | 1,04 | -1,468 | -0,96 | 3/3 | Cor |
| c.884C>T | p.Pro295Leu | 0,94 | -2,475 | -1,67 | 3/3 | Cor |
| c.1014G>C* | p.Gln338Arg | -0,09 | -0,982 | 0,38 | 1/3* | Sur |
| c.1013A>G* | p.Gln338His | -0,05 | -0,122 | 0,21 | 1/3* | Sur |
| c.1163T>C | p.Leu388Pro | 2,8 | 0,102 | -1,58 | 2/3 | Cor |
| c.1187G>A | p.Gly396Asp | 0,86 | -3,141 | 0,92 | 2/3 | Sur |
| c.1214C>T | p.Pro405Leu | 0,98 | -0,079 | -0,59 | 3/3 | Cor |
| c.1477G>T | p.Val493Phe | 1,21 | -0,303 | -1,1 | 3/3 | Cor |

Kullanılan in silico araca göre değişimin neden olduğu tahmini ΔΔG değerleri tabloda belirtilmiştir. Termodinamik açıdan etkisine göre dengesiz etkili değerler kırmızı, dengeli etkili değerler mavi ile gösterilmiştir.

*Dahil edilen benign varyantlar. Altı çizili varyantlar olgu grubundaki patojenik veya muhtemel patojenik varyantları göstermektedir. Diğer varyantlar literatürden dahil edilen patojenik varyantlardır.

'Sur': Yüzeyde yer alan değişim ('surface'), 'Cor': Proteinin katlanması sonucu içeride yer alan değişim ('core')

Hesaplamalar sonucunda en az 2 programdan gelen termodinamik açıdan dengesiz çıktısı olan varyantlar dikkate alındı. Buna göre 16 adet patojenik varyantın 10 tanesinde 3/3 ve 4 tanesinde ise 2/3 programın fikir birliği ile termodinamik açıdan dengesiz etkisinin olduğu gözlendi. Patojenik varyantlardan iki tanesi (Y179C ve R109W) yalnıca 1/3 fikir birliği ile dengesiz etkili çıktı verdi.

Makine öğrenimi tabanlı yöntemler, eğitim amacıyla kullanılan veri setleri çoğunluk dengesiz etkili mutasyonlardan oluştuğu için dengeleyici mutasyonları tanımlamada daha az doğrulukta olabilmektedir.[207,208] Bu nedenle benign olduğu bilinen 3 varyant için mCSM değerleri hesaplamaya dahil edilmedi. Ayrıca anti-simetrik özelliklerin dahil edilerek 'forward' ve 'reverse' yönelimli ΔΔG hesaplamalarındaki sonuçlara göre PremPS'nin dengeleyici mutasyonlarda daha güvenilir olduğu ifade edilmektedir.[205] Dolayısıyla bu araçtan gelen değerler benign sınıflandırmada öncelikli tutuldu; ancak hem PremPS hem DynaMut2 hesaplamaları göz önünde bulunduruldu. Bu iki araçtan gelen sonuçlar ile protein modeli üzerinde literatürden dahil edilen 3 benign varyantın %66,7'sinin (n=2) termodinamik açıdan dengeli olduğu görülmektedir. Termodinamik açıdan 3/3 dengesiz etkili olarak sınıflandırılan benign varyantın (M201V) ise ClinVar'da yalnızca bir adet muhtemel benign bildirimi bulunduğu görülmektedir. Ancak bu tez çalışmasında yapısal biyolojik araçlara dayanarak klinik önemi bilinmeyen yanlış anlamlı varyantlar için herhangi bir şekilde "benign" sınıflandırması yapılmadı.

**Tablo 17.** Klinik Önemi Bilinmeyen Varyantların Protein Modelindeki Sonuçları

| | *HGVSc* | *HGVSp* | *PremPS* | *mCSM* | *DynaMut* | *Sonuç* | *Lok.* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **4** | c.31C>G | p.Leu11Val | - | - | - | - | - |
| **5** | c.56G>A | p.Arg19Gln | - | - | - | - | - |
| **3** | c.88G>T | p.Ala30Ser | - | - | - | - | - |
| **4** | c.593G>A | p.Gly198Glu | 0,76 | -1,459 | -0,3 | 3/3 | Sur |
| **7** | c.667A>G | p.Ile223Val | 1,03 | 1,048 | -1,1 | 2/3 | Cor |
| **9** | c.715G>A | p.Val239Ile | 0,72 | 0,923 | -0,51 | 2/3 | Cor |
| **9** | c.797C>G | p.Ala266Gly | 1,13 | 1,51 | -1,43 | 2/3 | Cor |
| **5** | c.880C>T | p.Arg294Cys | 0,4 | 0,269 | 0,41 | 1/3 | Sur |
| **3** | c.925C>T | p.Arg309Cys | 0,5 | 0,924 | 0,49 | 1/3 | Sur |
| **8** | c.985G>A | p.Val329Met | 0,23 | -0,754 | -0,47 | 3/3 | Sur |
| **2** | c.1004A>G | p.Asn335Ser | -0,14 | -1,067 | 0,38 | 1/3 | Sur |
| **5** | c.1258C>A | p.Leu420Met | 1,09 | -0,173 | -0,95 | 3/3 | Cor |
| **3** | c.1276C>T | p.Arg426Cys | 0,27 | -0,615 | 0,09 | 2/3 | Sur |
| **5** | c.1414G>C | p.Gly472Arg | 0,47 | 0,394 | -0,7 | 2/3 | Sur |
| **7** | c.1421G>A | p.Arg474His | 1,86 | -0,146 | -0,82 | 3/3 | Sur |
| **5** | c.1601G>A | p.Arg534Gln | - | - | - | - | - |

Kullanılan in silico araca göre değişimin neden olduğu tahmini ΔΔG değerleri tabloda belirtilmiştir. Termodinamik açıdan etkisine göre dengesiz etkili değerler kırmızı, dengeli etkili değerler mavi ile gösterilmiştir.

Soldan ilk sütundaki derecelendirme için sayılar; 1'den 9'a doğru en değişken bölgeden en korunmuş bölgeye doğru evrimsel korunmuşluğu belirtmektedir. Bu değerler ConSurf veri tabanından alınmıştır.

'Sur': Yüzeyde yer alan değişim ('surface'), 'Cor': Proteinin katlanması sonucu içeride yer alan değişim ('core')

Malignite tanılı olgularda saptanan klinik önemi bilinmeyen *MUTYH* varyantları için hesaplanan ΔΔG değerleri ve termodinamik denge üzerindeki tahmini sonuçları Tablo 17'de verilmiştir. Ek olarak, klinik önemi bilinmeyen varyantların evrimsel korunmuşluk skorları (EKS) ConSurf veri tabanından alınarak tabloya işlenmiştir.[209] Korunmuş bir bölgede meydana gelen mutasyonların, doğru protein katlanması üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olduğu ve sonuç olarak işlevselliği daha fazla değiştirdiği varsayılmaktadır.[210] Bu bağlam göz önünde bulundurularak sonuçlar incelenmiştir.

Modelleme sonuçlarına göre; 16 adet klinik önemi bilinmeyen varyantın 4 tanesi oluşturulan modelde temsil edilmediği için değerlendirilemedi. Dört adet klinik önemi bilinmeyen varyantın programların hepsinde termodinamik açıdan dengesiz oldukları gözlendi. Beş varyant ise programların ikisinde dengesiz etkili olarak değerlendirilirken, diğer program sonucuna göre termodinamik açıdan dengeli olarak hesaplandı.

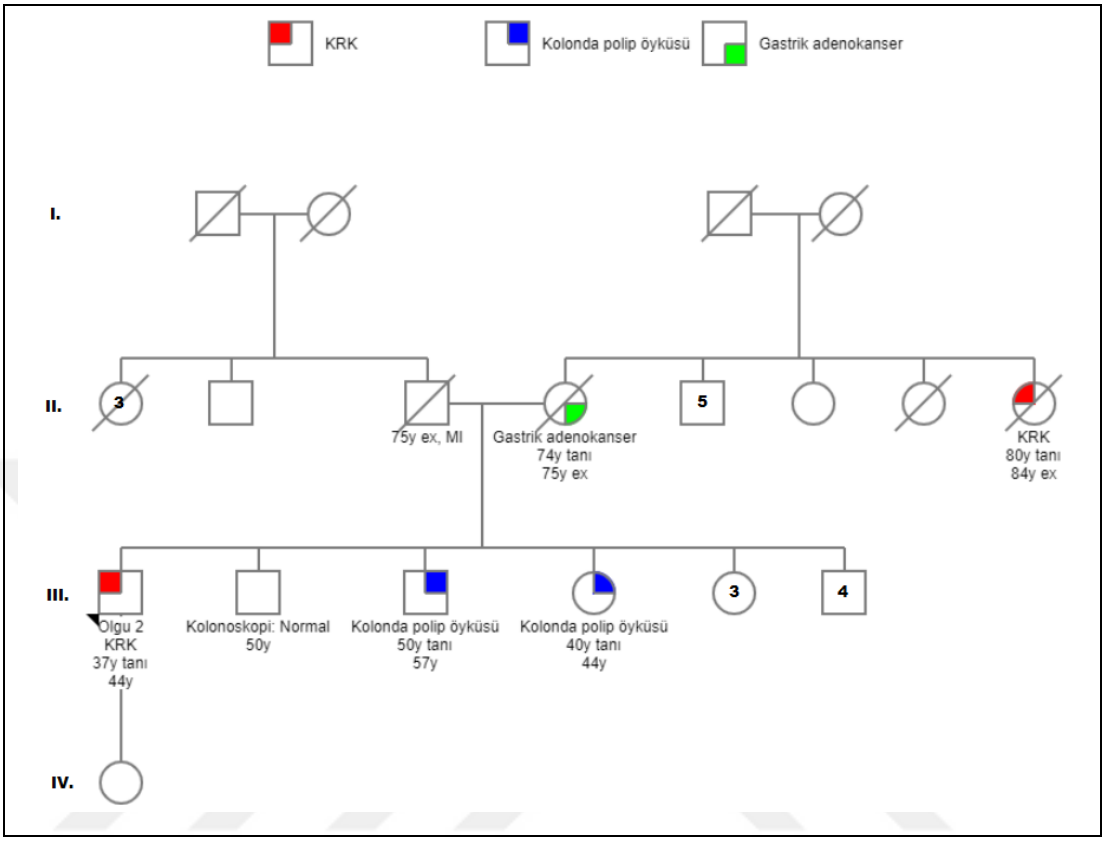
Yapısal termodinamik etki sonucuna göre yorumda bulunmadan önce bu varyantların güncel ClinVar bildirimleri, sekans bilgisine göre hesaplama yapan diğer in silico araçlardan gelen tahmin skorları ve ConSurf veri tabanından elde edilen evrimsel korunmuşluk skorları göz önünde bulunduruldu. ACMG tanı kriterlerini kullanırken özellikle dikkat edilmesi gereken bir husus, sınıflandırmada kullanılan bir kriterin birden fazla kanıt kodu ile fazladan temsil edilerek varyanta gereksiz yere atanan benign ya da patojen vasıfta yorumlandırmalardır. Bu anlamda hali hazırda sekans ya da yapı tabanlı bir in silico araç kullanılırken etki gücünü tek tek değerlendirmek yerine bütüncül bir bakışla hesaba katmak önemlidir. Bu çalışmada da yanlış anlamlı varyantlar, rutin moleküler analizlerde kullanılan parametreler eşliğinde, yapısal modellemeden elde edilen tahmin sonuçları entegre edilerek değerlendirildi.

### 4.4. Olgu Örnekleri

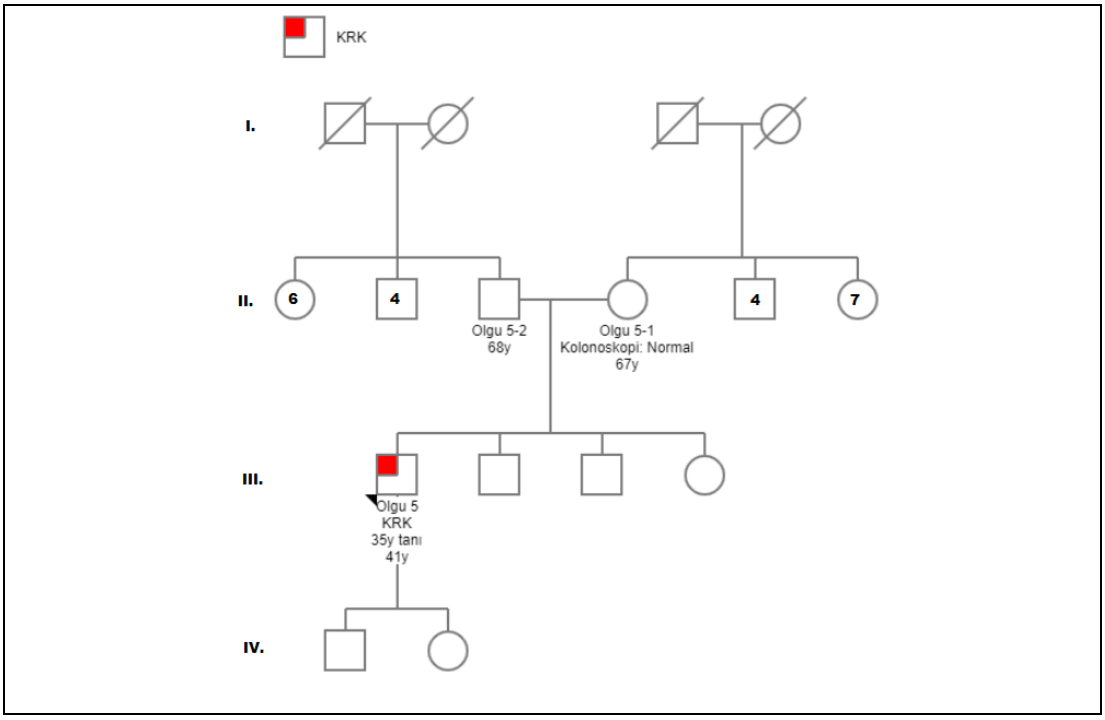
Klinik olarak değerlendirilen hastaların içinden en az 3 kuşak aile öyküsünde herhangi bir malignite tanısı ya da kolonda polip öyküsü bulunan olgular seçilerek aile ağaçları çizilmiştir.

*Şekil 18: Aile Örnekleri*

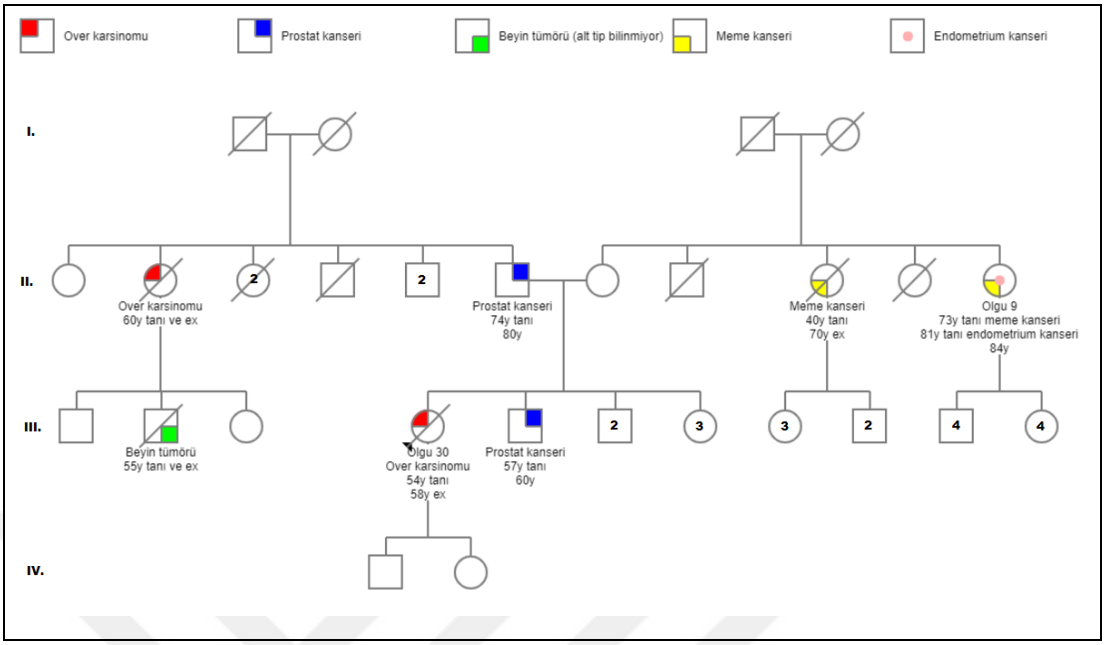
Olgu 2:



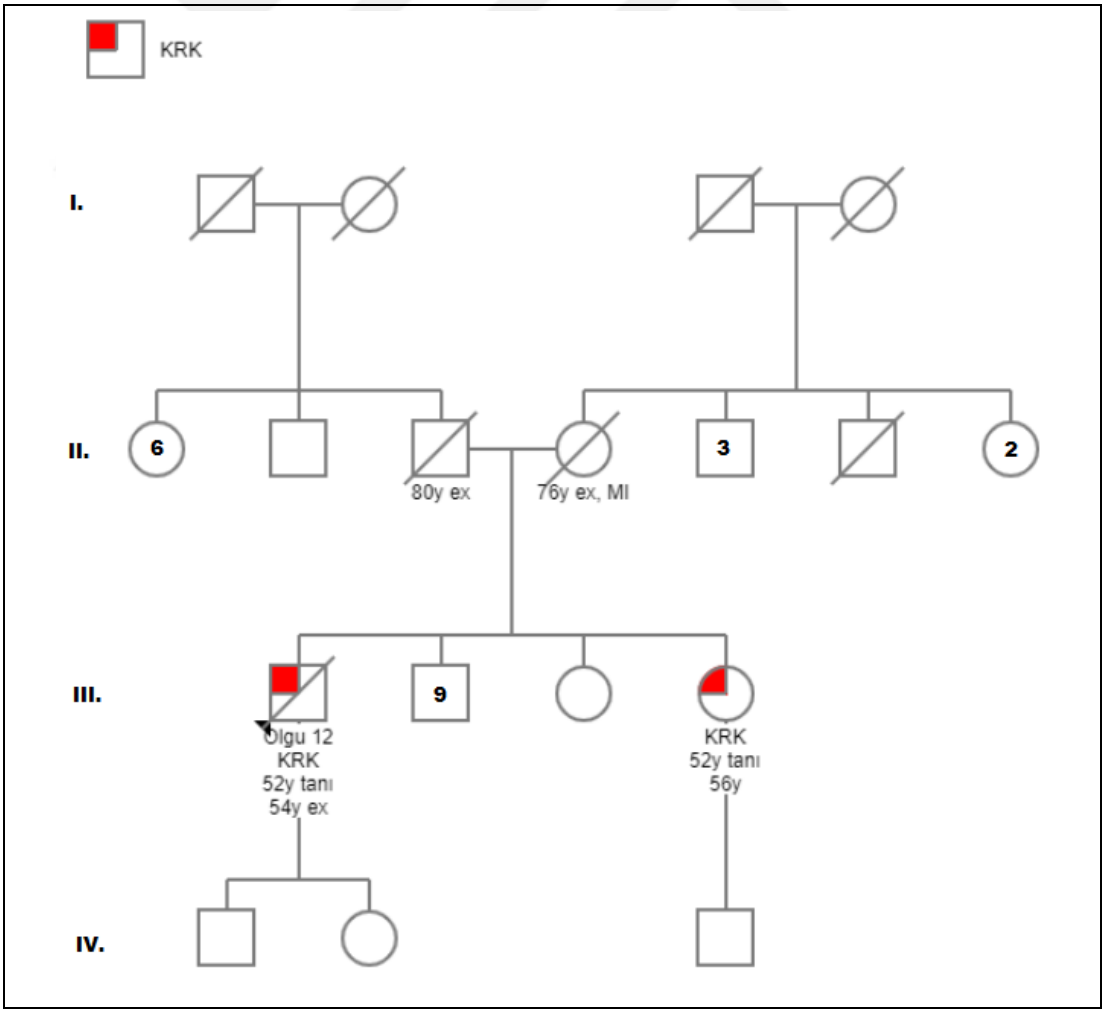

Olgu 5:



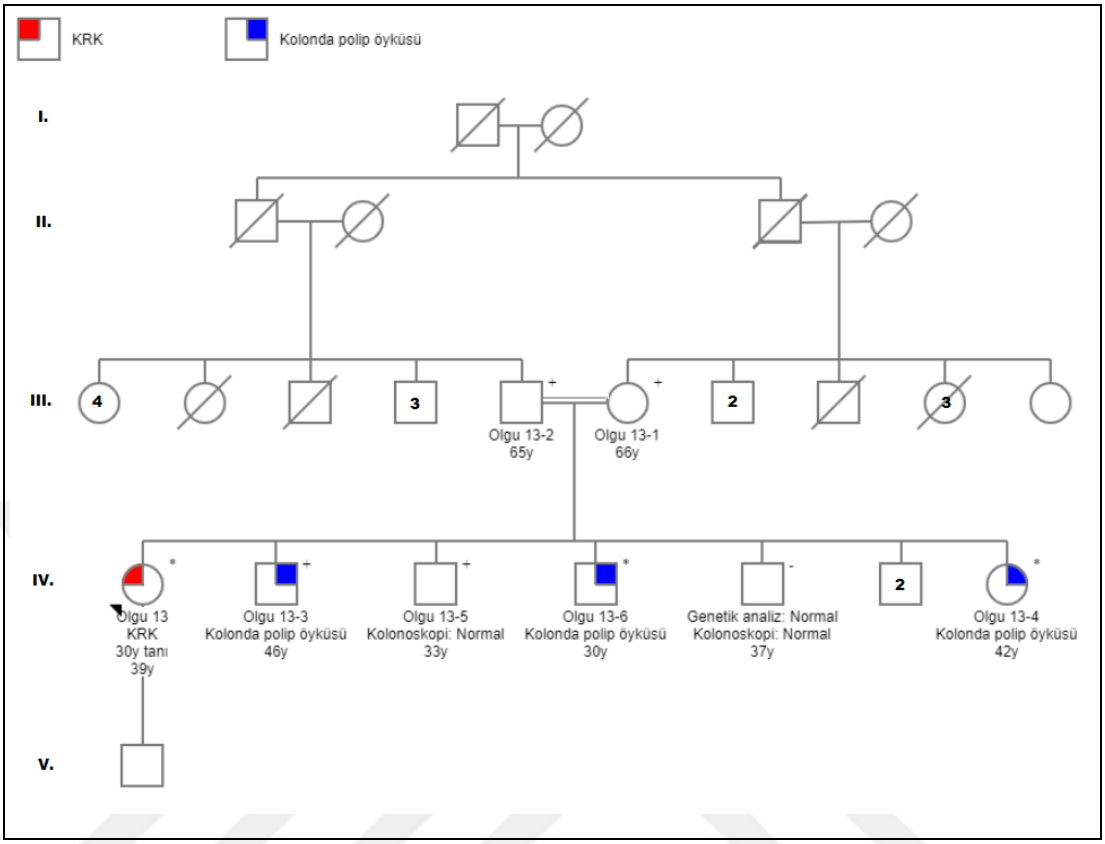
Olgu 9 ve Olgu 30:



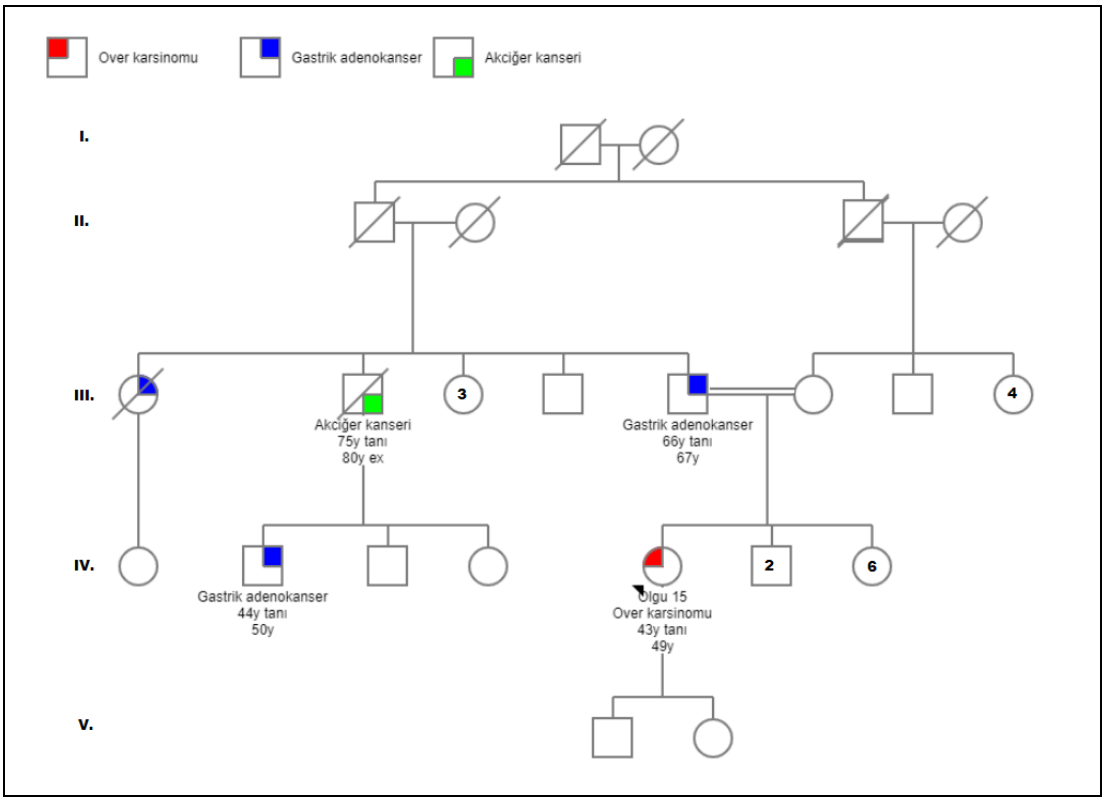

Olgu 12:



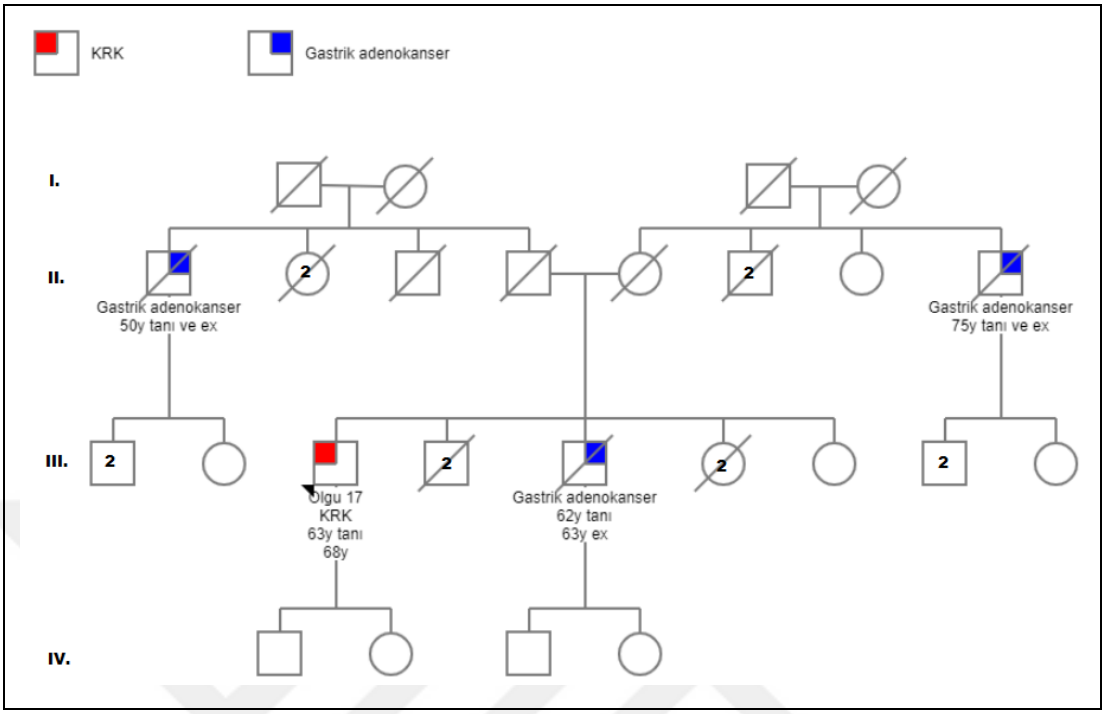
Olgu 13:



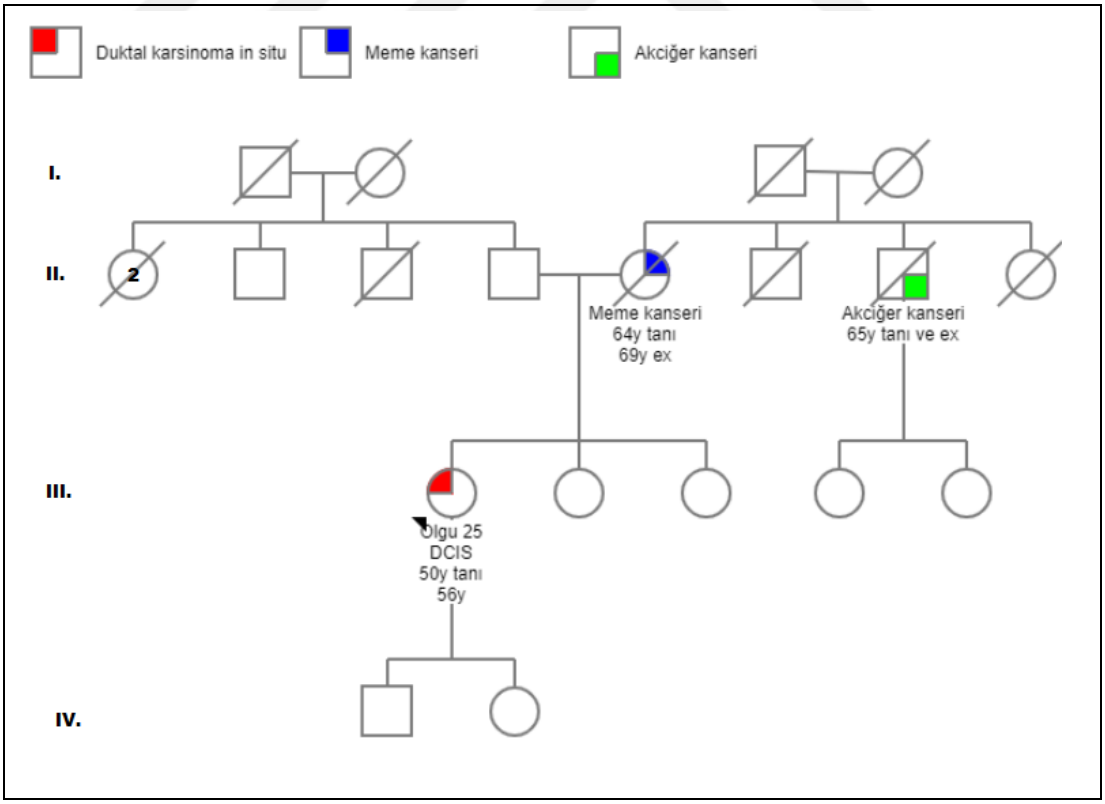

Olgu 15:



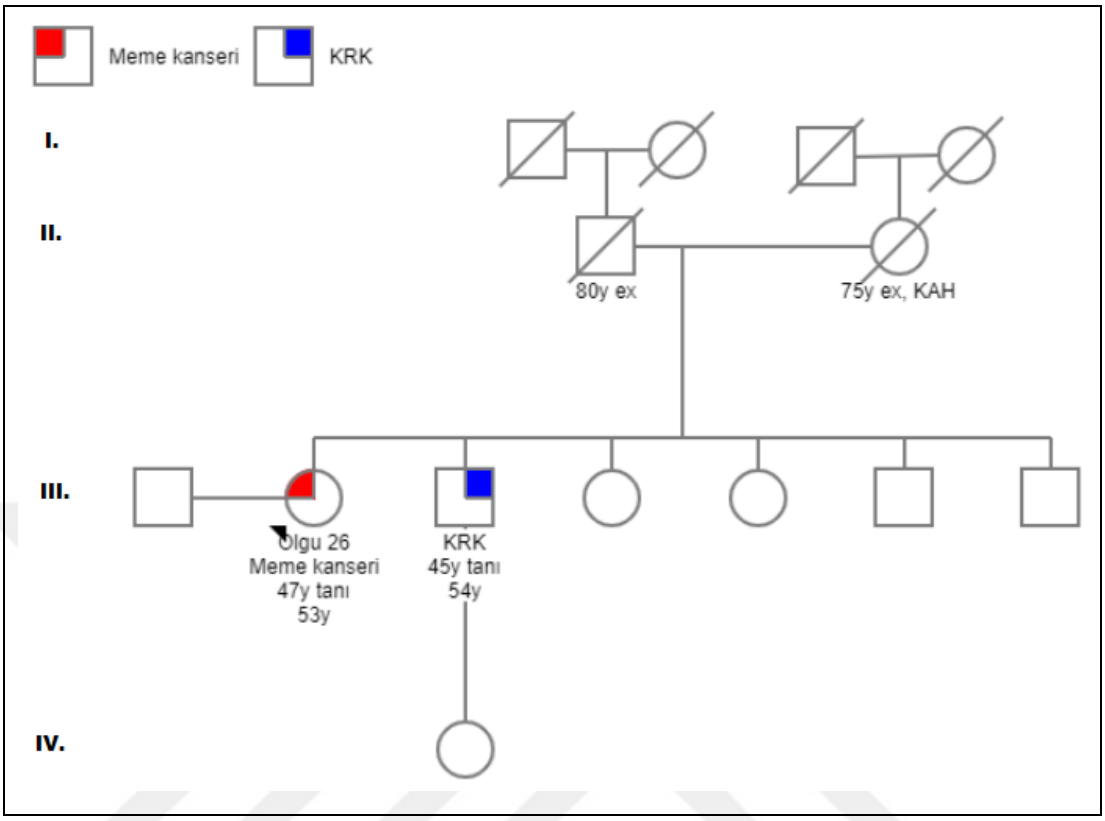
Olgu 17:



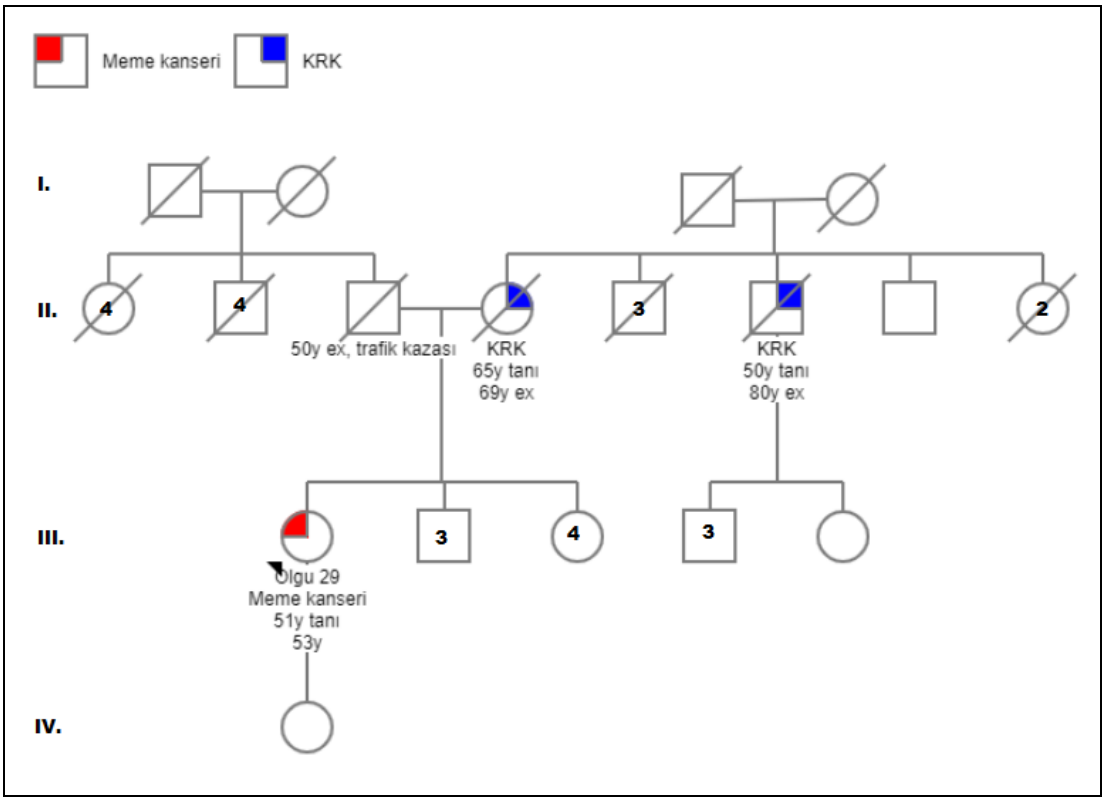

Olgu 25:



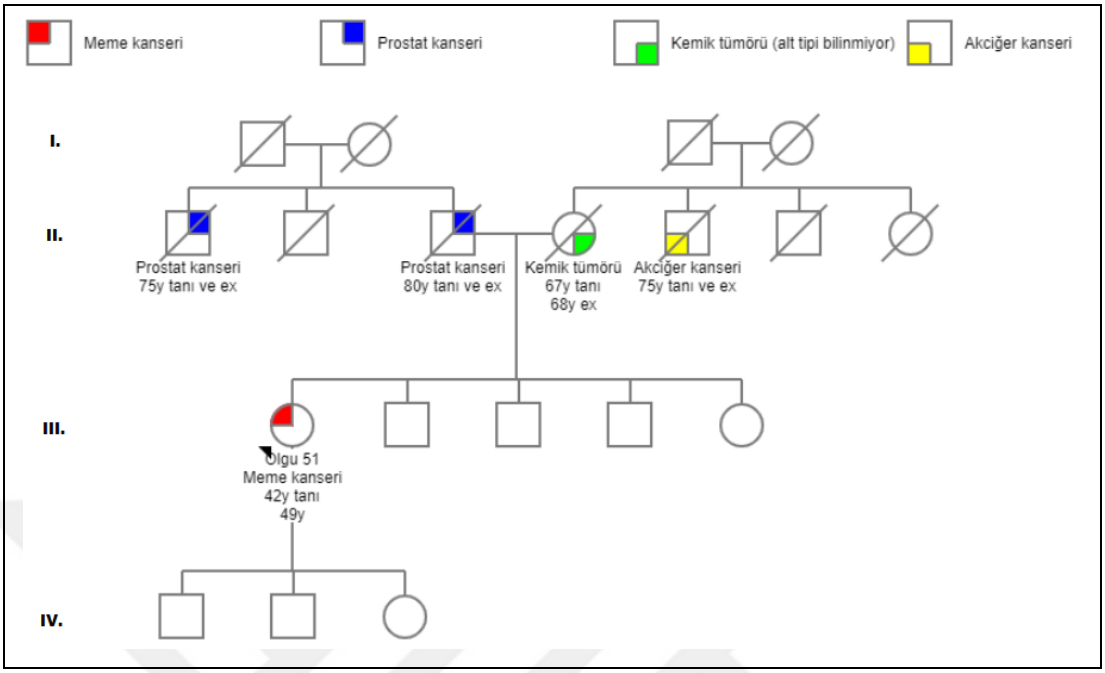
Olgu 26:



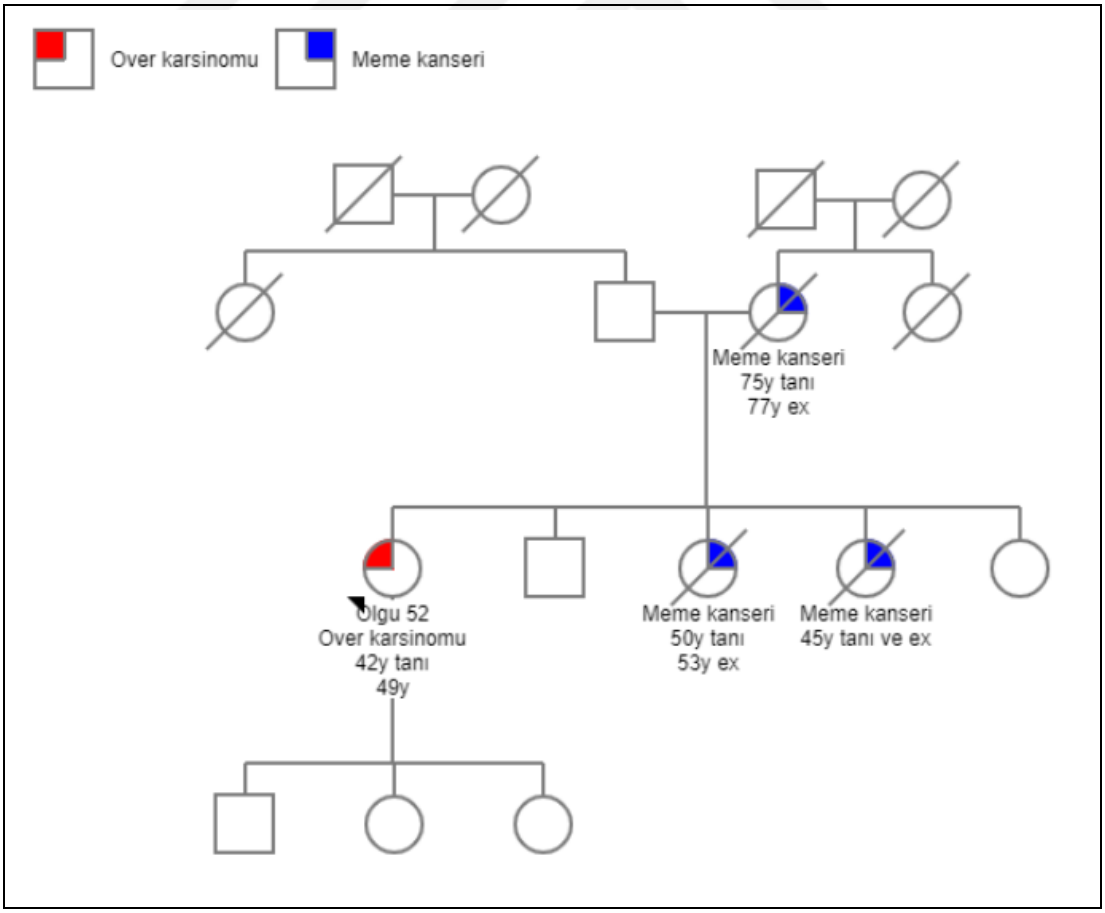

Olgu 29:



Olgu 51:




Olgu 52:



# 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında herediter kanser ön tanısıyla kliniğimize yönlendirilerek moleküler genetik tetkikleri tamamlanmış hastaların (n=1494) içinden patojenik ve muhtemel patojenik *MUTYH* varyantı taşıyan olgular ve aile yakınları (n=43) ile klinik önemi bilinmeyen *MUTYH* varyantı taşıyan malignite tanılı olgular (n=43) genotip ve fenotip ekseninde değerlendirilmiştir. Ayrıca literatürden patojenik ve benign yanlış anlamlı varyantların dahil edilmesiyle elde edilen allel havuzunda yapısal biyoloji araçlarının yardımıyla termodinamik denge değişimleri hesaplanmıştır. Ölçümler neticesinde yapısal modelde termodinamik açıdan dengesiz etkisi gözlenen klinik önemi bilinmeyen varyantların yeniden yorumu yapılmıştır.

Klinik önemi bilinmeyen ENST00000450313.1:c.797C>G varyantının patojenitesinin yeniden yorumunda ACMG'nin "PP3" kanıt kodu destekleyici ('supporting') yerine güçlü ('strong') düzeyinde belirlenmiş ve yapısal modeldeki in silico değerlendirme sonucuna dayanarak bu varyantın muhtemel patojenik olarak yorumlanabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca ENST00000450313.1:c.715G>A, ENST00000450313.1:c.985G>A ve ENST00000450313.1:c.1421G>A varyantları modeldeki termodinamik etkilenim sonucuyla birlikte güncel bilgiler ışığında tartışılmıştır. Elbette protein yapısında termodinamik açıdan dengesiz olduğu tahmin edilen bir varyantın işlevsel bağlamda da yıkıcı etkisinin gözlenmesi gereklidir. Bu tez çalışması sayesinde yapılacak olan fonksiyonel çalışmalara aday varyantlar belirlenmiştir. Ancak bilinmektedir ki fonksiyonel çalışmalarda dahi, bir moleküle ait ΔΔG değerinin hesaplanmasında bizzat deneyin tasarımına özgün kısıtlılıklar oluşmaktadır.[211] Biyolojik bir sistem içerisinde moleküler makinelere ve nasıl çalıştıklarına dair deneysel ya da in silico yaklaşımlarla bilgilendirici ipuçları elde etsek de yaşamsal sürecin eş zamanlı olarak adım adım tam resmini oluşturmak kolay değildir. Nitekim bir proteinin yapısı ile işlevinin tam örtüşmemesinin arkasındaki eksik unsurun moleküler dinamizmin net değerlendirilememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.[212] Atomik ölçekte bir proteinin diğer proteinlerle etkileşim kararlılığı ve özgüllüğü statik bir yapıdan ziyade yapısal dinamizmin sağladığı konformasyonel esneklik ile belirlenmektedir.[213] Bu bağlamda değerlendirildiğinde giderek artan sayıda farklı partnerleri tanımlanan MUTYH proteininin yapısal

değişimlerinde, etkileşim profilini belirlemek açısından ilerleyen dönemlerde moleküler dinamik simülasyonlarının yapılması uygun olacaktır.

Kanıtın bir parçası kabul edilen in silico araçların sonuçları mutlak klinik korelasyon gerektirmektedir.[214] Ancak klinik anlamda etkisi gözlenen yapısal değişime uğramış bir proteinin işlevi, biyolojik yapıya oldukça benzer şekilde modellenmiş bir sistemde çalışılsa dahi daima yapı tabanlı değildir.[215] Yapısal olarak stabiliteyi bozan ancak proteinin yeterli fonksiyon göstermesiyle sonuçlanan değişimler olabileceği gibi; yapısal olarak dengeli ancak fonksiyonel açıdan hasar yapıcı değişimlerin de olabileceği ya da hasar yapıcı bir etki varlığında dahi 'downstream' yolakta bunun telafisinin gerçekleşebileceği de unutulmamalıdır.

Bu tez çalışmasında retrospektif olarak seçilmiş kohortun yalnızca herediter kanser ön tanısıyla kliniğimizde değerlendirilen olgulardan oluşması en önemli kısıtlılıklarından biridir. Her ne kadar modelleme esnasında literatürden benign varyantlar dahil edilmiş olsa da geçerli sonuçlar için sağlıklı bireylerden tespit edilen *MUTYH* varyantlarının dahil edilmesiyle belirlenecek eşik değerlere göre patojenite yorumlamalarının yapılması daha uygun görülmektedir. Yine de translasyonel araştırmalarda bir dayanak noktası oluşturmasının yanı sıra, bu tarz analizlerden elde edilen sonuçların değişen protein yapısındaki mekanik anlayışa dair bir kavrayış oluşturması açısından kanıksanamaz önemleri mevcuttur.[214]

Hasar yapıcı *MUTYH* gen varyantlarının çeşitli kanser tiplerine farklı derecelerde yatkınlık oluşturduğu bilinmektedir.[18,23,32,33,79] MutY proteini için yanlış anlamlı değişimlerin yapısal etkilerine ilişkin fonksiyonel çalışmalar yapılmıştır.[38,132,133] Ancak yapısal modelleme ile bilgisayar temelli bir yaklaşım uygulanarak in silico analiz bugüne dek yapılmamıştır. Bu anlamda çalışmamız oluşturulmuş protein modeli üzerinde benign, patojenik, muhtemel patojenik ve klinik önemi bilinmeyen yanlış anlamlı *MUTYH* gen varyantlarını termodinamik açıdan değerlendiren ilk ve tek çalışmadır. Deneysel olarak insan MutY yapısı henüz tamamen aydınlatılmadığı için kullanmayı tercih ettiğimiz yapı, protein yapılarının tahmininde oldukça başarılı olduğu gözlenen yapay zeka tabanlı AlphaFold uygulamasından elde edilmiştir. Burada gözetilen husus yapısal in silico araçlara modeli yüklemeden önce her bir aminoasit için yapıdaki güvenilirlik skorlarının tek

tek incelenmesidir. Nihayetinde bir dayanak noktası olarak oluşturulan modelin yeterli kalitede olması hedeflenmiştir.

Tahmin programlarından elde edilen sonuçlar yorumlanırken üstü kapalı bir varsayım, araştırılan mutasyonun tek başına meydana geldiği ve diğer faktörlerin normal kaldığı şeklindedir. Ancak realitede bu böyle değildir ve vaka bazında gözlenen çoklu mutasyonları bütüncül etkileri ile değerlendirmek meydan okuyucu olabilmektedir.[183] Bu çalışmadaki klinik değerlendirmeler yalnızca *MUTYH* geni baz alınarak yapılmıştır. Bir başka yüksek penetranslı gende patojenik ya da muhtemel patojenik değişim taşıyan hastalar fenotipik değerlendirmeler aşamasında taraflılık oluşturmaması adına dışlanmıştır. Ayrıca hatırlanması gereken bir diğer nokta moleküler tetkik bölgesinin dışında kaldığı için değerlendirilemeyen mutasyonlar ile yöntemin saptayamadığı değişimler hakkında fikir sahibi olunmadığıdır. Bu da genlerin birbirleriyle epistasis halinde çalıştığı gerçeğini gözden kaçırmaya sebep olabilir. Özellikle kanser gibi multifaktöriyel kalıtımlı bir kliniği değerlendirirken kümülatif etkileşimlerin hesaba katılmasının gerekli olduğu göz önünde bulundurulursa, bu nokta ayrıca önem arz etmektedir. Kişi bazında hassas bir şekilde çevresel, epigenetik ve intergenik bütün değişkenlerin hesaplanması kolay görünmemektedir ve daha sade yaklaşımlarla istatistiki anlamlılık çerçevesinde yol almak bilimsel ilerlemelerin önünü açmaktadır. Bu anlamda varyant bazlı in silico hesaplamalar yapılması ile klinik korelasyon çalışmalarına katkı sağlanacağı umut edilmektedir.

Bir varyantın işlevsel etkisinin değerlendirilmesinde araştırılan aminoasitin yapıdaki pozisyonu oldukça önemlidir. Örneğin; protein etkileşim ara yüzünde bulunan yanlış anlamlı varyantları yorumlamak bu bölgelerin dinamik mimarisi ve benzersiz bağ tercihleri nedeniyle oldukça zahmetlidir.[151,188] Oluşturduğumuz modelde güvenilirlik skoru düşük olan bölgelerin yapıdan çıkarılmasıyla ekzon 1, 2 ve 16 üzerinde yer alan varyantların termodinamik ölçümleri yapılamadı. Doğası gereği esnek (‘flexible’) bir mimari yapı sergilediği için deneysel ya da hesaplamalı yöntemlerce modellenmesi kolay olmayan N-terminal ve C-terminal uçlarda yer alan bu bölgelerin fonksiyonel etkileri ancak hipotetik bağlamda değerlendirilebilmektedir. Protein yapısındaki ‘loop’ bölgeler, genellikle esnek kısımlara aittir ve yapıda

dalgalanmalar (‘fluctation’) yaratarak protein katlanmasında (‘folding’) etkili olabilecekleri düşünülmektedir.[216] Alfa-heliks ve beta-tabakaların aksine ‘loop’ bölgeleri daha büyük genlikte bir dinamizm sergilemektedirler. Nitekim ‘loop’ bölgelerinin sahip oldukları bu dinamizm ile allosterik regülasyona, moleküler tanıma ve sinyal süreçlerine dahil oluşu, bu bölgelerin molekülün işleviyle ilişkili etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.[217] Burada yerleşen spesifik aminoasit rezidülerinin de biyolojik fonksiyonla ilişkili olabilecek farklı eğilimlerde bir dinamik seyir sergilediği gözlenmiştir.[218] Bu tez çalışmasında ‘loop’ bölgelerinde yerleştiği için oluşturulan modelde temsil edilmeyen ve termodinamik etkisi belirlenemeyen varyantların yorumlaması gerçekleştirilemedi ve daha sonraki çalışmalara bırakıldı. Ancak unutulmamalıdır ki post-translasyonel modifikasyonda, protein-DNA bağlanmasında veya protein-protein etkileşimlerinde birçok farklı rolü olabileceği henüz kanıksanamaz durumda olan bu ‘loop’ bölgelerindeki aminoasit dizisinin içeriği önemlidir ve özellikle yanlış anlamlı varyantlar için ilerleyen dönemlerde yeniden değerlendirmeye alınması elzemdir.

Yapısal in silico araçların dengesiz etki tahmini üzerine bir taraflılık sergilediği çeşitli yayınlarda ifade edilmektedir.[195,205,219,220] Bu yüzden sonuçlar değerlendirilirken zemininde farklı parametreleri işleterek çıktı veren bu araçların 3/3 ya da 2/3 fikir birliği olmasına dikkat edildi. Ayrıca hasar yapıcı etkinin tahmininde çoğunlukla protein stabilitesini azaltan değişimler göz önünde bulundurulsa da stabilite artışı ile proteinin yapısal olarak konformasyonel esnekliğini kaybedişi de eşit derecede hasar yapıcı olabilmektedir.[221] Yapıdaki termodinamik etkisi dengeleyici yönde olan değişimlerin patojenite yorumlaması bu tez çalışmasının kapsamı dışında bırakıldı.

Çalışmamızda herediter kanser ön tanısıyla moleküler genetik incelemesi yapılan hastalarda (n=1494) *MUTYH* geninde patojenik ya da muhtemel patojenik varyant taşıma oranı %2,88 olarak hesaplanmıştır. Türkiye’den yayınlanan ve toplam 1254 hastanın kalıtsal kanser açısından değerlendirildiği bir çalışmada bu oran %2,1 olarak saptanmıştır.[222] Yine Türkiye’den toplam 214 hastanın değerlendirildiği bir başka çalışmada ise bu oran %3,2’dir.[223] Toplam 1197 olgunun değerlendirildiği ve Yunanistan, Romanya ile Türkiye’yi kapsayan daha geniş bir coğrafyanın

değerlendirildiği bir başka çalışmada ise herediter kanser tanılı olgularda *MUTYH* geninde patojenik ya da muhtemel patojenik varyant taşıma oranı %2,1'dir.[224] Toplam 1682 olgunun değerlendirildiği Brezilya'dan bir çalışmada ise monoallelik formda *MUTYH* taşıma oranı %2,5'tir.[225] Bu veriler çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu bir eğilim sergilemektedir. Ancak dahil edilen olgu grubunun klinik tanısı spesifiye edildikçe *MUTYH* geninde varyant saptama olasılığı artmakta ve taşıyıcılık yükselmektedir. Örneğin; yalnızca KRK tanısı ile değerlendirilen toplam 136 ve 137 hastadan oluşan farklı olgu gruplarında bu oranın sırasıyla %3,68'e ve %4.4'e çıktığı gözlenmektedir.[226,227] Hatta yalnızca polipozis koli olarak klinik tablo daraltıldığında 27 bireyden oluşan bir olgu grubunda 6 vakanın biallelik formda patojenik *MUTYH* değişimi taşıdığı saptanmış ve taşıyıcılık oranın %22,3'e yükseldiği gözlenmektedir.[228] Dolayısıyla genetik analiz sürecinde varyantların yorumlanması ve önceliklendirmesi için olgunun klinik tanısına yönelik uygun fenotiplendirme ile yol almanın ehemmiyetinin bir kez daha altını çizmek faydalı olacaktır. Ancak moleküler analiz daha önceden bilinmeyen ilişkilerin açığa çıkarılması adına gerçekleştiriliyorsa, bu durumda klinik filtre geniş tutularak kapsamlı bir bakış açısıyla yaklaşılmalıdır.

Bu tez çalışmasında *MUTYH* geninde saptanan varyantların çeşitliliğinden anlaşılacağı üzere (Şekil 14) gendeki değişimlerin dağılımı geniş bir yelpazede yayılım göstermektedir. Her ne kadar en yaygın gözlenen 4 varyant (sırasıyla c.884C>T, c.1437_1439del, c.734G>A ve c.1187G>A) patojenik ve muhtemel patojenik değişimleri içeren allel havuzunda %86,67'lik bir oranla çoğunluğu temsil etse de neredeyse her bir mutasyon tipinde değişim saptanmıştır. Ancak kopya sayısı değişimine yönelik yapılan MLPA analizi yapılan hastaların (n=15) hiçbirinde delesyon/duplikasyon tespit edilmemiştir. Bu durum çalışmanın örneklem küçüklüğünden ya da yalnızca belirli sayıda hastaya ek olarak MLPA analizinin yapılmış olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bu tez çalışmasında oluşturulan allel havuzundaki varyantların çoğunluğunu (n=31, %68,89) yanlış anlamlı varyantlar temsil etmektedir. Bu oran literatürdeki bilgilerle uyumluluk göstermektedir. Ek olarak Türkiye'den yapılan diğer yayınlardaki *MUTYH* gen varyantlarına bakıldığında, yine bu çalışmanın sonuçlarına benzer seyirde bir dağılımın olduğu ve en sık c.884C>T değişimi ile bunu takip eden

c.1437_1439del değişiminin popülasyonda yaygın olarak saptandığı gözlenmektedir.[222,223,226,228] Ayrı ayrı merkezlerden (Ankara, İstanbul ve İzmir) elde edilen bu sonuçlar elbette frekansa ilişkin bir çıkarımda bulunmamıza olanak sağlamaktadır. Ancak varyant spektrumuna dair popülasyon verisi için çok merkezli ve geniş çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca bazı varyantların bu çalışmada yüksek oranda temsil edilmesinin altında farklı sebepler yatıyor olabilir. Örneğin; KRK tanılı olgu 13'te homozigot c.734G>A varyantı saptanması üzerine ailedeki diğer bireylerin taraması gerçekleştirilmiştir. Bu varyant gerçekten de popülasyonda görece yüksek sıklıkta taşınıyor olabilir. Ancak ailenin İzmir'de yaşıyor olması ve moleküler analiz için polikliniğe başvurma olanağına sahip olması ileri genetik incelemeyi mümkün kılmıştır. Yani varyantın allel havuzundaki görece yüksek temsilinin sebebi, değerlendirilen olgu grubu içerisinde seçili aile olarak yüksek oranda temsil edilmiş olması da olabilir.

*MUTYH* geninde daha önce tanımlanmış bir 'hotspot' olmamakla birlikte çeşitli etnik kökene sahip popülasyonlar arasında yaygın gözlenen mutasyonlar tanımlanmıştır.[43–45] Bu çalışmada saptanan varyantların çoğunluğunun (%82,22) sırasıyla 10, 14 ve 9. ekzonlarda yerleşmekte olduğu gözlenmiştir. InterPro veri tabanından kontrol edildiğinde; ekzon 9'un tamamı ve ekzon 10'un bir kısmı HhH motifi ve endonükleaz domainlerine karşılık gelmekle birlikte, 10. ekzonda kodlanan 295 ve 287. aminoasit pozisyonlarındaki değişimler için tanımlanmış bir domain bulunmamaktadır.[229] Ekzon 14 ise nudix hidrolaz domaini içerisinde yerleşmektedir. Bu tez çalışmasındaki malignite tanılı hastalarda yaygın gözlenen değişimlerin, proteinin katalitik ünitesinde bulunan HhH motifinde ve OG tanınmasında rol oynayan nudix tipi domaininde yer alıyor olması; MutY proteininin yeterli işlev göstermesi için enzimin hem hasarlı bölgeyi tanıma fonksiyonunu tam olarak gerçekleştirmesine hem de glikozidik bağın hidrolizi için aktif bölgenin yapısal bütünlüğe sahip olması gerekliliğine bağlanmıştır.

Varyant tipi ile klinik ilişkilendirme için; aynı varyanta sahip ve aralarında kan bağı bulunmayan ailelerdeki benzer malignite öyküsü olan olguların uyumu incelenmektedir. Yapılan karşılaştırmalardan doğru sonuçlar elde edebilmek için örneklem grubunun total sayısı önemlidir. Bu tez çalışmasında klinik anlamda

değerlendirilen patojenik ya da muhtemel patojenik *MUTYH* varyantı taşıyan malignite tanılı olgu sayısı (n=29) evreni temsil etmeyeceğinden, varyanta özgü alt grup analizleri yapılmadı ve klinik alt gruplardaki varyant dağılım ağırlığı belirlenmedi. Karşılaştırmalar tüm olgu grubu içerisinde klinik alt grupların oransal dağılımları kullanılarak yapıldı. Buna göre; homozigot ve bileşik heterozigot patojenik ya da muhtemel patojenik *MUTYH* gen varyantı saptanan olguların hepsinde KRK kliniği ya da polipozis tablosu mevcuttur. Bu sonuç otozomal resesif formda tarif edilen yüksek penetranslı MAP antitesi ile uyumludur.[18–20] Heterozigot olguların da dahil edilmesiyle genotip ekseninde yapılan klinik değerlendirmede; %41 ile meme kanseri ilk sırada, ardından %28 ile KRK ve %17 ile over veya endometrium kanserleri sırasıyla yer alarak bu olgulardaki malignite tanılarını oluşturmaktadır (Şekil 11). Daha önceki çalışmalarda *MUTYH* geni ile ilişkisi tariflenen mesane tümörü, bu çalışmadaki seçili kohortta hiçbir hastada temsil edilmemektedir. Bunun sebebi özellikle kolon, meme, endometrium ve over kanserleri için herediter araştırmaya yönelik genetik moleküler incelemelere yönlendirme açısından artmış farkındalık olabilir. Mesane tümörleri için henüz bu farkındalığın olmaması nedeniyle bizim çalışmamızda bu hastalar temsil edilmemiş olabilir. Heterozigot olgularımız arasında meme, over ve endometrium kanseri tanı oranının bu kadar yüksek saptanmasının olası nedenleri ise; örneklem grubumuzun ailesel veya herediter olduğu düşünülen hastalardan oluşuyor olması ve örneklem boyutumuzun küçüklüğü olabilir.

Ek olarak, multiple malignite tanılı olgu 1'de mide kanseri ile KRK birlikteliği ve olgu 9, 14 ve 24'te primer malignite tanılarına eşlik eden tiroid papiller karsinom tanıları literatürle uyumlu bir şekilde seçilmiş kohortumuzda mevcuttur.[23,32,115]

Patojenik ya da muhtemel patojenik *MUTYH* varyantı ile malignite klinikleri değerlendirildiğinde; 2019'da yapılan bir çalışmada vakaların %60,2'sinde KRK tanısı mevcut olup bunu sırasıyla meme kanseri, non-melanom cilt tümörleri ve endometrial kanser tanıları izlemektedir.[131] Amerika popülasyonundaki malignite insidansına dayanarak kümülatif riskin hesaplandığı bir çalışmada ise biallelik taşıyıcılarda erkeklerde mesane tümörleri riski, kadınlarda ise over kanseri riski yüksek saptanmıştır. Monoallelik taşıyıcılar içinse mide kanseri, hepatobiliyer sistem tümörleri, endometriyum kanseri ve meme kanseri orta riskte hesaplanmıştır.[33] Benzer

şekilde patojenik *MUTYH* varyantı taşıyan bireylerle birçok farklı çalışmada mesane tümörleri, meme kanseri, cilt tümörleri, endometriyum veya over kanseri ile değişken derecelerde ilişki gözlenmiştir.[23,32,43] Ancak 2022 yılında yapılan bir çalışmada monoallelik taşıyıcıların KRK, meme kanseri ve endometrial kanser açısından ilişkili olmadığını saptanmıştır.[114] Türkiye'den yapılan bir yayında ise monoallelik *MUTYH* varyant frekansının KRK tanılı hasta (%2.1) ve kontrol grubunda (%1.8) benzer olduğu gözlenmiştir.[230] Bu anlamda heterozigot kalıtımın klinik anlamlılık açısından belirsizliğini korumakta olduğu görülmektedir.

Olgu grubundaki hasta dosyalarının hiçbirinde benign ya da malign cilt bulgusuna rastlanmadı. Çalışma retrospektif seyirde arşiv taraması türünde planlandığı için çok sayıda farklı yayında ifade edilen *MUTYH* ile ilişkili cilt bulgularının hastalarda mevcut olabileceği gerçeği göz önünde bulundurulmalıdır.[23,32,104,106] Bu çalışmada hasta dosyalarındaki mevcut bilgilerin en verimli kullanımı hedeflenmiştir. Ancak bilinmektedir ki retrospektif araştırmalar bunun gibi çeşitli yanlılıklar göstermeye eğilimlidir.

Son olarak; bilginin ışık hızında çoğaldığı bir çağda unutulmamalıdır ki varyantların patojenite yorumları zaman içerisinde değişebilmektedir.[231,232] Bu minvalde rehberler yorumu değişen varyata dair hastayı bilgilendirme açısından etik tartışmalar neticesinde çeşitli önerilerle güncellenmektedir.[231,233,234] 2023 yılındaki bir çalışmaya göre, herediter kanser sendromlarında yeniden sınıflandırmayla klinik olarak anlamlı bir değişim olması durumunda olguların psikososyal etkilenimlerinde farklılıklar gözlenmektedir.[235] Klinik önemi bilinmeyen varyantın patojenik yada muhtemel patojenik vasıfta sınıflandırma yönünde değişimi belirsizliği gidererek aileleri rahatlatmakta ancak tersi durumda olumsuz etkilenimler görülmektedir.[235] Bu açıdan genetik danışmanlık esnasında varyantın yorumunun zaman içerisinde değişebileceği bilgisi hastalarla paylaşılmalıdır. Ancak bir varyantın yeniden analizine yönelik intervaller konusunda belirsizlik halen mevcuttur. Bununla birlikte öneriler her daim güncel olanı takip etmek ve revizyondan geçmek şeklindedir. Bilhassa klinik önemi bilinmeyen değişimlerin yorumlanmasında laboratuvarlar arası veri paylaşımı ve varyantın yorumlanmasında katkılı olabilecek farklı yöntemlerle ek değerlendirmelerin yapılması bir hayli faydalı olmaktadır. Bu minvalde varyant

yorumlanmasında proteomik bir bakış açısı sunan yapısal biyolojik araçların kullanımının da gün geçtikçe artacağı ve klinik kullanıma gireceği ifade edilmektedir.[236]

Saptanan patojenik veya muhtemel patojenik *MUTYH* varyantları ve olguların klinik özellikleri aşağıda sırasıyla tartışılmıştır. ENST00000450313.1:c.1041_1042del ile ENST00000450313.1:c.536A>G değişimlerinin saptandığı olgular dahil edilme kriterlerine (Tablo 2) uymadığı için yanlılık oluşturmaması adına klinik değerlendirmeye tabii tutulmamışlardır ve frekans bilgisi oluşturmak amacıyla yalnızca allel havuzunda temsil edilmişlerdir.

- ENST00000450313.1:c.884C>T değişimi:

Çalışmamızda *MUTYH* geninin 10. ekzonundaki c.884C>T değişimi 5 olguda homozigot, 1 olguda bileşik heterozigot ve 11 olguda heterozigot formda gözlenmiştir. Bu tek nükleotid değişimi sonucu 295. pozisyondaki prolin yerine lösin amino asiti kodlanmaktadır. Bu bölgedeki prolin yüksek derecede korunmuştur (EKS: 9). Allel frekansı değerlendirildiğinde global veri tabanlarında nadir varyant olsa da (<%0.01) 'Turkish Variome' veri tabanında daha sık gözlendiği (%0.35) göze çarpmaktadır. Bu varyant daha önce homozigot ya da bileşik heterozigot formda etkilenmiş bireylerde raporlanmıştır.[237–240] Nitekim fonksiyonel çalışmalar neticesinde, demir-sülfür küme motifinde yerleşen bu değişimin işlevsel etkisi ciddi şekilde etkilenmiş olarak saptanmıştır.[38,241,242] Ayrıca bu varyant yüksek tahmin skorlarıyla (REVEL: 0.95, MetaLR: 0.98) hasar yapıcı olarak sınıflandırılmaktadır. Modellediğimiz yapıda ise termodinamik açıdan 3/3 dengesiz olduğu gözlenmektedir.

Olguların klinik dağılımına bakıldığında multiple kanser tanılı olgu 1 dahil olmak üzere, homozigot formda bu varyantı taşıyan bütün bireylerin KRK tanısı aldığı görülmektedir. Ayrıca bileşik heterozigot olarak bu varyantı taşıyan olgu 12'de de KRK tanısı mevcuttur. Literatürdeki bu varyanta ilişkin yayınlar değerlendirildiğinde etkilenmiş allellerden birinin c.884C>T olması durumunda çoklu polip öyküsü olan ve KRK tanısı alan olgular bildirilmiştir.[239,240,243] Bu durum bizim çalışmamızla uyumludur. Ayrıca kolonda polipozis mevcudiyeti olan ve lösemi tanısı alan bileşik heterozigot bir vaka da raporlanmıştır.[238] Türkiye'den raporlanan FAP olgu serilerine

bakıldığında bu varyantın heterozigot formda bile 4. dekatta 10'dan az sayıda polip varlığı ile tutulum yaptığı bir olgu raporlanmıştır.[228] Oysa bu çalışmada c.884C>T varyantını taşıyan ve kolonoskopiye yönlendirilen 6. dekattaki sağlıklı gruptaki bireyde polip varlığı gözlenmemiştir (Olgu 5-1). Ancak her iki çalışmada da değerlendirilen olgu sayısı çok kısıtlı olduğu için varyanta yönelik polipozis gelişimine dair bir çıkarımda bulunmak olası değildir. Vogt ve ark.'nın yayınında bu varyantı taşıyan hastalarda kolon dışında maligniteye rastlanmamıştır.[23] Bizim çalışmamızda ise mide, meme, endometrium ve over malignitesi olan hastalarda bu varyant saptanmıştır. Ayrıca klinik tanısı parosteal osteosarkom olan olgu 7'de saptanan bu değişim, daha önce *MUTYH* geniyle ilgili herhangi bir ilişki tanımlanmadığı için insidental bir bulgu olarak düşünülmüştür.

- ENST00000450313.1:c.734G>A değişimi:

*MUTYH* geninin 9. ekzonunda yer alan bu değişim 3 olguda homozigot, 1 olguda bileşik heterozigot ve 5 olguda heterozigot formda gözlenmiştir. Bu değişim sonucu, 245. pozisyondaki arginin yerine histidin aminoasiti kodlanmaktadır. FeS motifinde yer alan bu aminoasit türler arasında yüksek derecede korunmuşluk göstermektedir (EKS: 9). Allel frekansı değerlendirildiğinde global veri tabanlarında nadir varyant olsa da 'Iranome' (%0.13) ve 'Turkish Variome' (%0.06) veri tabanınlarında görece sık saptanmıştır. Etkilenmiş bireylerde bu varyantın hem homozigot ve bileşik heterozigot hem heterozigot formda taşındığı raporlanmıştır.[23,237,243] Fonksiyonel çalışmalarda bu varyantın DNA'ya bağlanmada ve glikozilaz aktivitesinde azalma ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.[38,244,245] Tahmin skorlarına göre (REVEL: 0.93, MetaLR: 0.94) hasar yapıcı olarak sınıflandırılmaktadır. Modellediğimiz yapıda ise termodinamik açıdan 3/3 dengesiz olduğu gözlenmektedir.

Bu değişim yalnızca KRK tanıları olan; olgu 12'de bileşik heterozigot formda ve olgu 13'te homozigot olarak saptanmıştır. Her iki olguda da metasenkron ya da senkron özellikli tümör gözlenmesi, bu değişimin polipozis tablosuna yol açarak farklı zamanlarda ve bağırsağın farklı lokasyonlarında karsinogenez sürecini başlatmasına işaret ediyor olabilir. Nitekim aile taraması ile biallelik taşıyıcılık saptanan olgu 13-4 ve olgu 13-6 için sırasıyla üçüncü ve ikinci dekatta başlayan polipozis gelişimi, bu

sürecin erken dönemlerde başladığını gösteriyor olabilir. Ayrıca heterozigot olan olgu 13-3'te de polip varlığı gözlenmesi, bu değişimin heterozigot formunda da klinik tabloya yol açtığını belirten literatür bilgisiyle uyumludur.[23,243] Ancak bir diğer taşıyıcı olan olgu 13-5'te kolonoskopik değerlendirmenin normal olması, polip gelişimi için tetikleyici unsurların varlığıyla klinik tablonun açığa çıkmasını gösteriyor olabilir.

- ENST00000450313.1:c.1437_1439del değişimi:

Bu değişim ardışık 3 nükleotidin silinmesi sonucu okuma çerçevesini etkilemeksizin ekzon 14'te yer alan 480. pozisyondaki glutamik asitin silinmesi ile karakterizedir. Bu tez çalışmasında allel havuzunda toplam 9 vakada ve sadece heterozigot formda gözlenmiştir; ancak 2 vakada beraberinde bir başka yüksek penetranslı kanser yatkınlık geninde patojenik varyant saptandığı için klinik değerlendirmeye 7 hasta dahil edilmiştir. Nudix hidrolaz domaininde yerleşen bu aminoasitin korunmuşluğu yüksektir (EKS: 8). Allel frekansı değerlendirildiğinde global veri tabanlarında nadir varyant olsa da 'GME' ve 'Turkish Variome' (%0.01) veri tabanlarında görece sık saptanmıştır. Yine bu varyantın İtalya veya akdeniz kökenli bir kurucu varyant olabileceği ifade edilmektedir.[23] Etkilenmiş bireylerde hastalıkla segrege olduğu gösterilmiştir.[23,43,121] Fonksiyonel çalışmalarda bu varyantın ciddi şekilde etkilenmiş enzimatik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.[87,244] Çerçeve içi indel şeklinde gözlenen bu mutasyon tipi için sekans ya da yapı tabanlı herhangi bir in silico araç yardımıyla hesaplama yapılmamıştır.

Bu varyantın saptandığı olgulardan olgu 14, 16, 17, 19 ve 20'nin MLPA analizi sonucu herhangi bir delesyon/duplikasyon saptanmamıştır. Ancak olgu 15 ve 18 için karşı allelin kopya sayısına yönelik değerlendirmesi yapılamamıştır. Bu hastalarda bu değişimin heterozigot formda maligniteye sebep olduğunun söylenebilmesi için tümör dokusundan diğer allelin kaybına ya da somatik imza profilinin uygunluğuna yönelik ek tetkik yapılması uygun görünmektedir.

- ENST00000450313.1:c.1187G>A değişimi:

Ekzon 13'te yer alan bu değişim meme kanseri tanılı malignite alt grubundaki 4 hastada sadece heterozigot formda gözlenmiştir. Bu değişim yanlış anlamlı bir

mutasyon tipine yol açarak 396. pozisyondaki glisin yerine aspartik asitin kodlanmasına neden olur. Bu amino asit rezidüsünün evrimsel korunmuşluğu oldukça yüksektir (EKS: 9). Bu değişim görece sık gözlenen nadir bir varyanttır. Kafkas ırkında en yaygın gözlenen değişimlerden biridir ve MAP hastalarında karşı allelde bir diğer patojenik varyantla birlikte vakaların %70-90'ında taşındığı belirtilmektedir.[19,20,33] Fonksiyonel çalışmalarda bu varyantın azalmış glikozilaz aktivitesi olduğu gözlenmiştir.[38,244,246] Tahmin skorlarından biri (REVEL: 0.95) tarafından hasar yapıcı olarak sınıflandırılmaktadır. Modellediğimiz yapıda ise termodinamik açıdan 2/3 dengesiz olduğu gözlenmektedir.

Heterozigot olarak bu değişimin saptandığı meme kanseri tanılı 4 olgudan 3'ünün (olgu 22, 23 ve 24) MLPA analizinde herhangi bir delesyon/duplikasyon gözlenmemiştir ve prob karışımında bulunan mutasyona spesifik prob sayesinde panel dizileme ile saptanan bu değişim MLPA yöntemi ile de gösterilmiştir. Ancak olgu 25'in karşı alleline yönelik kopya sayısı analizi gerçekleştirilmemiştir. Bu değişim için monoallelik kalıtımın KRK ve meme kanserinde rolünün olmadığı ifade edilmektedir.[109,247] Ancak Sefarad Yahudisi kadınlarda meme kanseri için bu değişimin mevcudiyetinde 1,86 kat artmış risk hesaplanmıştır.[248] Bu, bir varyantı değerlendirirken etnik kökenin göz önünde bulundurulmasının önemini gösteriyor olabilir.

- ENST00000450313.1:c.1358_1359del değişimi:

Bu değişimin ardışık iki nükleotidin silinmesi sonucu çerçeve kaymasına neden olarak ekzon 14'te 453. pozisyondaki tirozin amino asitinin serine dönüşmesine ve okuma çerçevesinin bozulmasıyla 78 amino asit sonra sonlanmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Daha önce herhangi bir yayında tanımlanmamış ve popülasyon veri tabanlarında gözlenmemiş olan bu varyant, bu tez çalışmasında yalnızca meme kanseri tanılı olgu 26'da heterozigot formda gözlenmiştir. Bu tirozin rezidüsü için evrimsel korunmuşluk değişken olarak orta derecede görülmektedir (EKS: 5). Ancak bu değişimin nudix hidrolaz domaininde yer alması ve izoform 1'in devamındaki 93 amino asit uzunluğundaki yapısının değişmesi sonucu OG tanınmasında görevli bu

bölgenin etkilenmesiyle olası bir fonksiyonel hasar gelişebileceği öngörülebilir. Nitekim etkilenmiş bir vakada bildirimi yapılmış ve prematür sonlanma kodonuna neden olan c.1359T>G / p.(Tyr453Ter) ile çok sayıda patojenik ya da muhtemel patojenik bildirimi yapılmış ve çerçeve kaymasına neden olan c.1356del / p.(Tyr453IlefsTer14) değişimlerinin bu bölgede bulunduğu görülmektedir. Benzer mutasyon tipinde olan p.(Tyr453IlefsTer14) değişimi için ifade edilen işlev kaybı mekanizmaları; prematür protein trunkasyonu veya nonsense aracılı yıkım (NMD, 'nonsense mediated decay'), bu varyant için de geçerli olabilir.

Olgu 26'nın meme kanseri grubundaki hormon reseptörleri negatif iki hastadan biri olduğu görülmektedir. Ancak bu 'novel' değişime yönelik klinik anlamda bir çıkarımda bulunmaya dair veriler yetersizdir.

- ENST00000450313.1:c.933+3A>C değişimi:

Onuncu intronun 5' ucundaki bu tek nükleotid değişimi, otantik kırpılma bölgesinin kaybıyla ekzon atlamasına ('exon skipping') neden olmaktadır (VarSeak: Class 5, Splice Etkili Varyant). Lenfoblastik hücre hattında yapılan ekspresyon analizlerinde bu varyantın işlevsel olmayan protein sentezine yol açan bir kırpılma kusuruna neden olduğu ifade edilmektedir.[249] Ayrıca in silico hesaplamalara göre (ADA: 1, RF: 0.87, MaxEntScan: 10.82) hasar yapıcı veya patojenik olarak sınıflandırılmaktadır. Allel frekansı değerlendirildiğinde nadir bir varyant olarak gözlenmektedir. Ancak Kuzeydoğu İtalya ve Almanya'da kurucu varyant olabileceği ifade edilmektedir.[249] Ayrıca çok sayıda etkilenmiş bireyde homozigot ya da bir başka patojenik varyantla birlikte saptanmıştır.[23,125,249]

Olgu 28'de heterozigot formda saptanan bu değişimin karşı alleline yönelik delesyon/duplikasyon analizi hasta exitus olduğu için gerçekleştirilememiştir.

- ENST00000450313.1:c.453_458dup değişimi:

Bu değişim 6 nükleotidin duplikasyonuyla çerçeve içi iki amino asitin insersiyonuna, yani 5. ekzonda yer alan 152. pozisyondaki triptofan amino asitiyle 153. pozisyondaki metiyonin arasına izolösin ve triptofan aminoasitlerinin insersiyonuna neden olmaktadır. İnterPro veri tabanında bu bölge DNA glikozilaz

sınırları içerisinde gösterilmektedir. Allel frekansı değerlendirildiğinde nadir bir varyant olarak gözlenmektedir. Fonksiyonel çalışmalarda bağlanma afinitesinde azalma ve glikozilaz aktivitesinde yetersizlik gözlenmiştir.[246] Çok sayıda etkilenmiş bireyde homozigot ya da bileşik heterozigot formda raporlanmıştır.[239,250]

Senkron over ve endometrium kanseri tanılı olgu 27'de heterozigot formda gözlenen bu değişimin karşı alleline yönelik delesyon duplikasyon analizi yapılmamıştır. Aile öyküsünde herhangi bir malignite tanısı yoktur. Ancak olgu 27'nin kendi öyküsünde aynı zamanda 38 yaşından beri düzenli kolonoskopi ile multiple tübüler ve villöz adenom polipektomi varlığı dikkat çekmektedir. Bu değişimin etkilenmiş bireylerde biallelik formda tariflenmiş olması nedeniyle, ancak karşı allelin de değerlendirilmesi sonrası yorumda bulunmanın daha uygun olacağı düşünülmüştür.

- ENST00000450313.1:c.859del değişimi:

Tek nükleotidin silinmesiyle çerçeve kaymasına neden olan bu değişimin ekzon 10 üzerinde yerleşen 287. pozisyondaki alanin amino asitinin proline dönüşmesine ve 32 amino asit sonra sonlanmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla bu varyantın proteinin üretilmemesine ya da güdük protein üretimine yol açtığı düşünülmektedir. Bu pozisyondaki alanin rezidüsünün evrimsel korunmuşluğu oldukça yüksektir (EKS: 9). Ayrıca daha önce bu varyant heterozigot durumda bir olguda tanımlanmıştır.[239] Allel frekansı değerlendirildiğinde oldukça nadir olduğu gözlenmektedir.

Bu değişim meme kanseri tanılı olgu 29'da heterozigot formda gözlenmiştir. Olgu 29'un annesi ve dayısının kolon kanseri tanısı almış olmaları, literatürdeki bu varyantın heterozigot taşıyıcılığında tanımlanmış olguyu akla getirmektedir. Ancak olgu 29'un aile bireyleri hayatta olmadığı için bu yönde bir analiz ile ileri segregasyon değerlendirmesi gerçekleştirilmemiştir.

Patojenik ve muhtemel patojenik varyantlara ek olarak; in silico modelleme ile dengesiz termodinamik yapı gösterdiği için "PP3" kriterinin kanıt düzeyi destekleyici ('supporting') yerine güçlü ('strong') olarak verilerek patojenitesi değişen klinik önemi bilinmeyen *MUTYH* varyantı saptanan olgular aşağıda tartışılmıştır. Ayrıca

patojenite yorumu değiştirilmeden izlem altında tutulması önerilen klinik önemi bilinmeyen *MUTYH* varyantları saptanan olguların klinik özellikleri sırasıyla tartışılmıştır.

- ENST00000450313.1:c.797C>G değişimi:

*MUTYH* geninin 10. ekzonunda bu değişim sonucu, 266. pozisyondaki alanin amino asiti yerine glisin kodlanmaktadır. DNA glikozilaz domaini ve HhH motifinde yer alan bu pozisyondaki alanin yüksek derecede korunmuşluk göstermektedir (EKS: 9). Allel frekansı değerlendirildiğinde bu varyantın oldukça nadir olduğu gözlenmektedir. Bu değişim daha önce bir meme kanseri olgusunda heterozigot formda klinik önemi bilinmeyen değişim olarak raporlanmıştır.[224] Bir vaka-kontrol çalışmasında hem meme kanseri tanılı grupta hem de sağlıklı kontrol grubunda tespit edilmiştir.[251] LOVD veri tabanında atenüe polipozis tablosuna sahip bir hastada faz bilgisi olmaksızın p.Glu466del ile birlikte gözlenmektedir.[35] Tahmin skorlarına göre (REVEL: 0.81, MetaLR: 0.89) hasar yapıcı olarak sınıflandırılmaktadır. Modellediğimiz yapıda ise termodinamik açıdan 2/3 dengesiz olduğu gözlenmektedir.

Bu değişim, tez çalışması için seçilen kohortu oluşturan total allel havuzunda 2 olguda saptanmakla birlikte vakalardan biri dışlanmış ve yalnızca klinik değerlendirme için kriterlere uyan (Tablo 2) meme kanseri tanılı olgu 51 dahil edilmiştir. Literatürde bu varyantın meme kanseri tanılı olgularda bildirildiği gözlenmektedir.[224,251] Olgu 51'in babasında ve amcasında prostat kanseri tanısı mevcuttur. Her ne kadar bu varyanta ilişkin bir bildirim olmasa da *MUTYH* genindeki patojenik ve muhtemel patojenik varyantlar prostat kanserli vakalarda saptanmaktadır.[252]

Karsinogenez süreci söz konusu olduğunda bir varyantın sağlıklı popülasyonda saptanmış olması, maligniteye katkısına dair çıkarımda bulunmamız için yeterli olmamaktadır. Taşıyıcı birey henüz kanseri geliştirmemiş olabileceği gibi, çevresel etkiler ve yaşam tarzı koruyucu bir nitelik sergilemiş olabilir.

Bu varyant için; popülasyonda oldukça nadir bulunması ve sekans ya da yapı tabanlı araçlarda hasar yapıcı veya dengesiz etkisinin gözlenmesi nedeniyle bu tez çalışması kapsamında muhtemel patojenik olabileceği yorumu yapılmıştır. Yapılacak olan fonksiyonel çalışmalarda bu varyantı önceliklendirmek önerilir.

- ENST00000450313.1:c.715G>A değişimi:

Bu değişim ile 239. pozisyondaki valin amino asiti yerine izolösin kodlanmaktadır. DNA glikozilaz domaini ve HhH motifinde yer alan bu pozisyondaki valin yüksek derecede korunmuşluk göstermektedir (EKS: 9). Allel frekansı tüm popülasyonlarda oldukça nadir olmakla birlikte 'Turkish Variome' veri bankasında görece sık temsil edilmektedir. Meme veya prostat kanseri tanılı hastalarda raporlanmıştır.[253–255] Bu varyantı tahmin skorlarından biri (MetaRNN: 0.7675) hasar yapıcı olarak sınıflandırılmakta, diğer ikisi belirsiz sonuç hesaplamaktadır. Modellediğimiz yapıda ise termodinamik açıdan 2/3 dengesiz olduğu gözlenmektedir.

Bu değişim 42 yaşında over seröz karsinomu tanısı alan olgu 52'de heterozigot formda gözlenmiştir. Olgunun aile öyküsünde meme kanseri tanılı ablaları ve annesi olması nedeniyle, bu ailede öncelikli olarak ön tanıda meme-over kanseri tabloları düşünülmüştür. Bu varyant daha önce over kanseri tanılı herhangi bir bireyde saptanmamıştır. Tahmin skorlarından yalnız birinin orta derecede hasar yapıcı sonuç verdiği gözlenmektedir. Bu nedenle bu varyanta yapı tabanlı modele dayanarak "PP3_strong" verilmedi. Ancak fonksiyonel çalışma için aday varyantlardan biri olarak sunuldu.

- ENST00000450313.1:c.985G>A değişimi:

Bu değişim sonucunda 329. pozisyondaki valin yerine metiyonin amino asiti kodlanmaktadır. Ekzon 11 üzerindeki bu valin rezidüsünün evrimsel korunmuşluğu yüksektir (EKS: 8). Popülasyon veri bankalarında nadir bir allel olarak gözlense de GME ve TV verilerine göre orta doğu coğrafyasında daha sık karşılaşılan bir alleldir. Bir vaka-kontrol çalışma sonucuna göre, toplam 60.466 meme kanseri tanılı olgudan 11'inde ve toplam 53.461 sağlıklı kişiden 18'inde bu varyantın taşıyıcılığı saptanmıştır.[251] Ayrıca Lynch sendromu ön tanılı hasta grubunda ve KRK tanılı hastalarda da saptanmıştır.[43,256] Bu tez çalışmasında ise 69 yaşında meme kanseri tanısı alan ve aile öyküsünde herhangi bir özellik taşımayan olgu 47'de saptanmıştır.

Tahmin skorları bu varyant için benign sonuç hesaplamaktadır. Ancak modellediğimiz yapıda termodinamik açıdan 3/3 dengesiz olduğu gözlenmektedir. Programlardan elde edilen ΔΔG değerlerine bakıldığında ise (0.23, -0,754, -0,47)

patojenik etkisi bilinen varyantların değerlerine göre (Tablo 16) değişimin sayısal değeri daha minimal hesaplanmıştır. Bu nedenle bu değişim klinik önemi bilinmeyen vasıfta bırakılmıştır.

- ENST00000450313.1:c.1421G>A değişimi:

Bu değişim sonucunda 14. ekzonda yer alan 474. pozisyondaki arjinin yerine histidin kodlanmaktadır. Nudix hidrolaz domainindeki bu rezidü için evrimsel korunmuşluğu orta derecede yüksektir (EKS: 7). Allel frekansı değerlendirildiğinde bu varyantın oldukça nadir olduğu gözlenmektedir. Daha önce etkilenmiş bir bireyde saptanmamıştır. Tahmin skorlarına göre fikir birliği söz konusu değildir (REVEL: 0.44 ile benign, MetaLR: 0.53 ile belirsiz, MetaRNN: 0.9096 ile patojenik). Modellediğimiz yapıda ise termodinamik açıdan 3/3 dengesiz olduğu gözlenmektedir.

Bu değişim meme kanseri tanılı olgu 48 ve adrenokortikal kanser tanılı olgu 49'da heterozigot formda saptanmıştır. Olgu 48'in ya da olgu 49'un aile öykülerinde herhangi bir özellik yoktur. Olgu 49'un ek olarak, 38 yaşındayken kolonoskopik inceleme sonrası 4 adet tübüler adenom polipektomi öyküsü mevcuttur.

Bu varyant için yapı tabanlı tahmin sonucuna göre bir yorumda bulunulmadı ve klinik önemi bilinmeyen değişim olarak bırakıldı. Ancak olgu 49'un adrenokortikal kanser tanısı ve kolonda polip gelişimi ile klinik birlikteliği bu hasta için tümör dokusundan somatik mutasyon imza profilini çalışmaya yönelik tetkik yapılabileceğini düşündürmektedir. Nitekim adrenokortikal kanser ile germline *MUTYH* varyantlarının ilişkisi bu yöntemle ortaya çıkarılmıştır.[30,31,128] Şayet ilerleyen dönemde olgu 49'un tümör dokusunda "imza 36" saptanırsa, bu çalışmaya dayanarak yapısal biyolojik araçların çıktısı 3/3 dengesiz yönde olduğu için patojeniteye dair farklı yorumlamalar yapılabilir.

ENST00000450313.1:c.1258C>A değişimi; popülasyon veri tabanlarında orta doğu coğrafyasında görece sık olmakla birlikte (GME: %0.5) nadir bir alleldir. Yapılan fonksiyonel çalışmada bu değişim için 'wild' tipte proteine benzer spontan mutasyon oranı göstermekte olduğu saptanmıştır.[38] Tahmin skorları arasında bir mutabakat olmasa da hasar yapıcı yönde bir sonuç bulunmamaktadır (MetaLR: 0,79 ile belirsiz, REVEL: 0.45 ile benign, MetaRNN: 0.03738 ile benign). Modellediğimiz yapıda ise 3/3 termodinamik dengesiz sonuç hesaplanmıştır. Ancak bu bölgedeki lösin

rezidüsü için korunmuşluk ılımlı ve değişken derecededir (EKS:5). Bu bilgiler ışığında, yapısal modeldeki sonuca göre patojenite yorumu açısından bu varyant için bir kriter değişikliği uygulanmamıştır.

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu tez çalışmasında, herediter kanser ön tanısıyla moleküler genetik analizi tamamlanan olgu grubu içerisinden (n=1494) *MUTYH* geninde patojenik ya da muhtemel patojenik varyant taşıyan 43 olgu tespit edilmiştir ve taşıyıcılık oranı %2.88 olarak hesaplanmıştır. Bu oran literatürdeki diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

2. Homozigot ya da bileşik heterozigot formda hasar yapıcı varyant taşıyan tüm olgularda KRK veya kolonda değişken sayıda polip gelişimi gözlenmiştir. Bu durum otozomal resesif olarak tanımlanan yüksek penetranslı MAP fenotipi ile uyumludur.

3. Biallelik formda hasar yapıcı *MUTYH* gen varyantı taşıyan bireylerde KRK tanı yaşı anlamlı olarak düşük (p değeri < 0.001) saptanmıştır.

4. Zigosite fark etmeksizin patojenik ya da muhtemel patojenik değişim saptanan olgu grubu malignite tanıları açısından değerlendirildiğinde; en sık meme kanseri, KRK ve endometriyum kanseri ile over kanseri tanıları gözlenmektedir (Şekil 11). Bu sonuç, literatürde değişken derecelerde risk artışı ile tariflenen çeşitli kanser klinikleri ile uyumludur. Ancak özellikle heterozigot olgular için henüz fikir birliğinin olmaması ve rehberlerde önerilerin bulunmaması nedeniyle, monoallelik değişim saptanan olguları aile öyküsü zemininde vaka bazlı değerlendirmek önerilir.

5. Kopya sayısı değişimi hariç, her bir mutasyon tipinde değişim seçilmiş kohortumuzdaki allel havuzunda temsil edilmektedir (Şekil 15). Literatürle uyumlu bir şekilde varyant çeşitliliğinin yüksek olduğu ve en sık yanlış anlamlı değişimlerin saptandığı görülmektedir. *MUTYH* geninde hiçbir hastada delesyon/duplikasyon saptanmamış olması; örneklem küçüklüğünden veya yalnızca belli sayıda hastaya MLPA analizi yapılmış olmasından kaynaklanıyor olabilir.

6. Türk popülasyonunu dahil eden diğer çalışmalardaki sonuçlarla uyumlu bir şekilde, en sık iki farklı tipte varyantın (c.884C>T ile c.1437_1439del) temsil edildiği görülmektedir (Şekil 14). Bu anlamda çalışmamız, Türkiye'deki herediter kanser ön tanılı hasta grubunda saptanan *MUTYH* varyant frekansına dair bir kesit sunmaktadır ve popülasyon verisi için ileride yapılacak meta-analiz çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

7. Bu çalışma, oluşturulmuş MUTYH protein modeli üzerinde yanlış anlamlı varyantların tahmini termodinamik etki değişiminin hesaplandığı ilk ve tek çalışmadır.

Özellikle klinik önemi bilinmeyen yanlış anlamlı değişimleri yorumlamada, ek bir yöntem olarak başvurulabilecek yapısal biyolojik araçların kullanımına dikkat çekilmesi planlanmıştır.

8. Bu tez çalışması sonucuna göre; c.797C>G değişimi öncelikli olarak ve c.715G>A değişimi aday varyant olarak yapılması planlanan fonksiyonel çalışmalara sunulmuştur. Ayrıca c.1421G>A değişimini taşıyan adrenokortikal kanser tanılı olgu 49 için somatik imza profilleme sonrası, bu varyantın da patojenite yorumu için destekleyici yapısal değişim gösterilmiştir.

9. Çalışmamızın en önemli kısıtlılıklarından biri sağlıklı kontrol grubunun olmaması ve yalnızca herediter kanser sendromu ön tanılı olgular arasından seçilmiş bir kohortun değerlendirilmesidir. Ayrıca tetkik seçimi sebebiyle epigenetik etkenler, intronik ve gen dışı DNA dizileri, genomik yapısal değişimler ve çevresel etkiler araştırılmamıştır,

10. Sonuç olarak; herediter kanser sendromlarının patofizyolojisinin aydınlatılmasıyla bir varyantı taşıyan etkilenmiş olgulara yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve henüz etkilenmemiş bireylerin izlem algoritmalarının oluşturulması yönünde gelişme sağlanacaktır. Bu anlamda bu tez çalışmasıyla tümör çeşitliliği bakımından geniş bir dağılımda seyreden *MUTYH* ilişkili kliniklere dikkat çekilmesi amaçlanmıştır. Umuyoruz ki bu çalışmanın sonuçları ile varyant ekseninde değerlendirme ile genotip-fenotip ilişkilerinin incelenmesi ve klinik önemi bilinmeyen yanlış anlamlı varyantların yapısal biyoloji araçlarının yardımıyla yorumlanması yönünde literatüre bir katkı sağlanacaktır.

# 7. KAYNAKLAR


1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).

2. Kumar, V., Abbas, A. & Aster, J. C. *Robbins Basic Pathology*. vol. 10th Edition (Elsevier, 2017).

3. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* **147**, 275 (2011).

4. Karakosta A. *et al.* Genetic models of human cancer as a multistep process. Paradigm models of colorectal cancer, breast cancer, and chronic myelogenous and acute lymphoblastic leukaemia. *J Exp Clin Cancer Res. 24(4)* 505–514 https://www.researchgate.net/publication/51374044_Genetic_models_of_human_cancer_as_a_multistep_process_Paradigm_models_of_colorectal_cancer_breast_cancer_and_chronic_myelogenous_and_acute_lymphoblastic_leukaemia (2005).

5. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**, 563–572 (2002).

6. Balani, S., Nguyen, L. V. & Eaves, C. J. Modeling the process of human tumorigenesis. *Nature Communications 2017 8:1* **8**, 1–10 (2017).

7. Farber, E. & Cameron, R. The Sequential Analysis of Cancer Development. *Adv Cancer Res* **31**, 125–226 (1980).

8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* vol. 144 646–674 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).

9. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).

10. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).

11. Heald, B., Marquard, J. & Funchain, P. Strategies for clinical implementation of screening for hereditary cancer syndromes. *Semin Oncol* **43**, 609–614 (2016).

12. Van Cott, C. Cancer Genetics. *Surg Clin North Am* **100**, 483–498 (2020).

13. Hampel, H., Bennett, R. L., Buchanan, A., Pearlman, R. & Wiesner, G. L. ACMG PrACtiCe Guidelines A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. *GeNetiCS in MediCiNe* **17**, (2014).

14. Dwyer & Mary. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines ® ) Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic. (2023).

15. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines™). Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal. National Comprehensive Cancer Network, Inc. Version 2.2022 — December 7, 2022.

16. Parker, A. R. & Eshleman, J. R. Human MutY: gene structure, protein functions and interactions, and role in carcinogenesis. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2064–2083 (2003).

17. Nakamura, T. *et al.* Structure of the mammalian adenine DNA glycosylase MUTYH: insights into the base excision repair pathway and cancer. *Nucleic Acids Res* **49**, 7154–7163 (2021).

18. Curia, M. C., Catalano, T. & Aceto, G. M. MUTYH: Not just polyposis. *World J Clin Oncol* **11**, 428–449 (2020).

19. Nielsen, M. *et al.* Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients With MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology* **136**, 471–476 (2009).

20. Al-Tassan, N. *et al.* Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nature Genetics 2002 30:2* **30**, 227–232 (2002).

21. Farrington, S. M. *et al.* Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am J Hum Genet* **77**, 112–119 (2005).

22. Lubbe, S. J., Di Bernardo, M. C., Chandler, I. P. & Houlston, R. S. Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with MUTYH mutation. *J Clin Oncol* **27**, 3975–3980 (2009).

23. Vogt, S. *et al.* Expanded Extracolonic Tumor Spectrum in MUTYH-Associated Polyposis. *Gastroenterology* **137**, 1976-1985.e10 (2009).

24. Filipe, B. *et al.* APC or MUTYH mutations account for the majority of clinically well-characterized families with FAP and AFAP phenotype and patients with more than 30 adenomas. *Clin Genet* **76**, 242–255 (2009).

25. Pezzi, A. *et al.* Relative role of APC and MUTYH mutations in the pathogenesis of familial adenomatous polyposis. *Scand J Gastroenterol* **44**, 1092–1100 (2009).

26. Barreiro, R. A. S. *et al.* Monoallelic deleterious MUTYH germline variants as a driver for tumorigenesis. *J Pathol* **256**, 214–222 (2022).

27. Croitoru, M. E. *et al.* Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **96**, 1631–1634 (2004).

28. Dell'Elice, A. *et al.* Filling the gap: A thorough investigation for the genetic diagnosis of unsolved polyposis patients with monoallelic MUTYH pathogenic variants. *Mol Genet Genomic Med* **9**, (2021).

29. Jenkins, M. A. *et al.* Risk of Colorectal Cancer in Monoallelic and Biallelic Carriers of MYH Mutations: A Population-Based Case-Family Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **15**, 312–314 (2006).

30. Viel, A. *et al.* A Specific Mutational Signature Associated with DNA 8-Oxoguanine Persistence in MUTYH-defective Colorectal Cancer. *EBioMedicine* **20**, 39–49 (2017).

31. Thibodeau, M. L. *et al.* Base excision repair deficiency signatures implicate germline and somatic MUTYH aberrations in pancreatic ductal adenocarcinoma and breast cancer oncogenesis. *Molecular Case Studies* **5**, a003681 (2019).

32. Magrin, L. *et al.* MUTYH-associated tumor syndrome: The other face of MAP. *Oncogene 2022 41:18* **41**, 2531–2539 (2022).

33. Win, A. K. *et al.* Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in MUTYH. *Int J Cancer* **139**, 1557 (2016).

34. mutyh - SNP - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp.

35. The MUTYH gene homepage - Global Variome shared LOVD. https://databases.lovd.nl/shared/genes/MUTYH.

36. mutyh[gene] - ClinVar - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=mutyh%5Bgene%5D&redir=gene.

37. mutyh | Gene. https://varsome.com/gene/hg19/mutyh.

38. Komine, K. *et al.* Functional Complementation Assay for 47 MUTYH Variants in a MutY-Disrupted Escherichia Coli Strain. *Hum Mutat* **36**, 704 (2015).

39. Doss, C. G. P. & NagaSundaram, N. Investigating the Structural Impacts of I64T and P311S Mutations in APE1-DNA Complex: A Molecular Dynamics Approach. *PLoS One* **7**, (2012).

40. Pires, D. E. V., Ascher, D. B. & Blundell, T. L. mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics* **30**, 335–342 (2014).

41. Bouafi, H. *et al.* Prediction and Structural Comparison of Deleterious Coding Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms (nsSNPs) in Human LEP Gene Associated with Obesity. *Biomed Res Int* **2019**, (2019).

42. Pejaver, V. *et al.* Evidence-based calibration of computational tools for missense variant pathogenicity classification and ClinGen recommendations for clinical use of PP3/BP4 criteria. *bioRxiv* 2022.03.17.484479 (2022) doi:10.1101/2022.03.17.484479.

43. Ricci, M. T. *et al.* Type and frequency of MUTYH variants in Italian patients with suspected MAP: a retrospective multicenter study. *J Hum Genet* **62**, 309–315 (2017).

44. Nielsen, M. *et al.* Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. *Clin Genet* **71**, 427–433 (2007).

45. Balaguer, F. *et al.* Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case-control, population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**, 379–387 (2007).

46. Sampson, J. R. *et al.* Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* **362**, 39–41 (2003).

47. Out, A. A. *et al.* Leiden Open Variation Database of the MUTYH gene. *Hum Mutat* **31**, 1205–1215 (2010).

48. Gene symbol report | HUGO Gene Nomenclature Committee. https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/7527.

49. Homo sapiens mutY DNA glycosylase (MUTYH), RefSeqGene (LRG_220) on chr - Nucleotide - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008189.1.

50. Slupska, M. M. *et al.* Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* **178**, 3885–3892 (1996).

51. Rouleau, E. *et al.* First large rearrangement in the MUTYH gene and attenuated familial adenomatous polyposis syndrome. *Clin Genet* **80**, 301–303 (2011).

52. Torrezan, G. T. *et al.* Breakpoint characterization of a novel large intragenic deletion of MUTYH detected in a MAP patient: case report. *BMC Med Genet* **12**, (2011).

53. Ohtsubo, T. *et al.* Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res* **28**, 1355–1364 (2000).

54. Takao, M. *et al.* Novel nuclear and mitochondrial glycosylases revealed by disruption of the mouse Nth1 gene encoding an endonuclease III homolog for repair of thymine glycols. *EMBO J* **21**, 3486 (2002).

55. GTEx Portal. https://gtexportal.org/home/gene/MUTYH.

56. Richards, S. *et al.* 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* **17**, 405 (2015).

57. MUTYH mutY DNA glycosylase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=4595.

58. Gene: MUTYH (ENSG00000132781) - Summary - Homo_sapiens - GRCh37 Archive browser 109.

http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000132781;r=1:45794835-45806142.

59. Plotz, G. *et al.* MUTYH gene expression and alternative splicing in controls and polyposis patients. *Hum Mutat* **33**, 1067–1074 (2012).

60. Nielsen, M., Morreau, H., Vasen, H. F. A. & Hes, F. J. MUTYH-associated polyposis (MAP). *Crit Rev Oncol Hematol* **79**, 1–16 (2011).

61. Yoon, S. H. *et al.* MutY is down-regulated by oxidative stress in E. coli. *Free Radic Res* **37**, 873–879 (2003).

62. Markkanen, E., Dorn, J. & Hübscher, U. MUTYH DNA glycosylase: the rationale for removing undamaged bases from the DNA. *Front Genet* **4**, (2013).

63. Ma, H., Lee, H. M. & Englander, E. W. N-terminus of the rat adenine glycosylase MYH affects excision rates and processing of MYH-generated abasic sites. *Nucleic Acids Res* **32**, 4332 (2004).

64. Lee, H. M. *et al.* Hypoxia induces mitochondrial DNA damage and stimulates expression of a DNA repair enzyme, the Escherichia coli MutY DNA glycosylase homolog (MYH), in vivo, in the rat brain. *J Neurochem* **80**, 928–937 (2002).

65. Guan, Y. *et al.* MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily. *Nat Struct Biol* **5**, 1058–1064 (1998).

66. McGoldrick, J. P., Yeh, Y. C., Solomon, M., Essigmann, J. M. & Lu, A. L. Characterization of a mammalian homolog of the Escherichia coli MutY mismatch repair protein. *Mol Cell Biol* **15**, 989–996 (1995).

67. Krokan, H. E. & Bjørås, M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, 1–22 (2013).

68. Nghiem, Y., Cabrera, M., Cupples, C. G. & Miller, J. H. The mutY gene: a mutator locus in Escherichia coli that generates G.C----T.A transversions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2709–2713 (1988).

69. Slupska, M. M., Luther, W. M., Chiang, J. H., Yang, H. & Miller, J. H. Functional expression of hMYH, a human homolog of the Escherichia coli MutY protein. *J Bacteriol* **181**, 6210–6213 (1999).

70. Fromme, J. C., Banerjee, A., Huang, S. J. & Verdine, G. L. Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature* **427**, 652–656 (2004).

71. Takao, M., Zhang, Q. M., Yonei, S. & Yasui, A. Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine:8-oxoguanine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* **27**, 3638 (1999).

72. Parker, A., Gu, Y. & Lu, A. L. Purification and characterization of a mammalian homolog of Escherichia coli MutY mismatch repair protein from calf liver mitochondria. *Nucleic Acids Res* **28**, 3206–3215 (2000).

73. Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K. & Yasui, A. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* **26**, 2917–2922 (1998).

74. Boldogh, I. *et al.* hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs. *Nucleic Acids Res* **29**, 2802 (2001).

75. Yeh, Y. C., Chang, D. Y., Masin, J. & Lu, A. L. Two nicking enzyme systems specific for mismatch-containing DNA in nuclear extracts from human cells. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 6480–6484 (1991).

76. Tsai-Wu, J. J., Liu, H. F. & Lu, A. L. Escherichia coli MutY protein has both N-glycosylase and apurinic/apyrimidinic endonuclease activities on A.C and A.G mispairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8779 (1992).

77. Zharkov, D. O. & Grollman, A. P. MutY DNA glycosylase: base release and intermediate complex formation. *Biochemistry* **37**, 12384–12394 (1998).

78. Banda, D. M., Nuñez, N. N., Burnside, M. A., Bradshaw, K. M. & David, S. S. Repair of 8-oxoG:A Mismatches by the MUTYH Glycosylase: Mechanism, Metals & Medicine. *Free Radic Biol Med* **107**, 202 (2017).

79. Raetz, A. G. & David, S. S. When you're strange: Unusual features of the MUTYH glycosylase and implications in cancer. *DNA Repair (Amst)* **80**, 16–25 (2019).

80. Engstrom, L. M. *et al.* A zinc linchpin motif in the MUTYH glycosylase interdomain connector is required for efficient repair of DNA damage. *J Am Chem Soc* **136**, 7829–7832 (2014).

81. van Loon, B., Markkanen, E. & Hübscher, U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst)* **9**, 604–616 (2010).

82. Michaels, M. L. & Miller, J. H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol* **174**, 6321–6325 (1992).

83. Isidro, G. *et al.* Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum Mutat* **24**, 353–354 (2004).

84. Moriya, M. & Grollman, A. P. Mutations in the mutY gene of Escherichia coli enhance the frequency of targeted G:C-->T:a transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA. *Mol Gen Genet* **239**, 72–76 (1993).

85. Ushijima, Y. *et al.* A functional analysis of the DNA glycosylase activity of mouse MUTYH protein excising 2-hydroxyadenine opposite guanine in DNA. *Nucleic Acids Res* **33**, 672–682 (2005).

86. Mazzei, F., Viel, A. & Bignami, M. Role of MUTYH in human cancer. *Mutat Res* **743–744**, 33–43 (2013).

87. Jansson, K., Blomberg, A., Sunnerhagen, P. & Alm Rosenblad, M. Evolutionary loss of 8-oxo-G repair components among eukaryotes. *Genome Integr* **1**, (2010).

88. Xiao, F. *et al.* Evolutionary Origin of MUTYH Germline Pathogenic Variations in Modern Humans. *Biomolecules* **13**, 429 (2023).

89. Morgan, C. C. *et al.* Colon cancer associated genes exhibit signatures of positive selection at functionally significant positions. *BMC Evol Biol* **12**, 114 (2012).

90. Cheadle, J. P. & Sampson, J. R. Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**, (2003).

91. Lee, S. & Verdine, G. L. Atomic substitution reveals the structural basis for substrate adenine recognition and removal by adenine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18497–18502 (2009).

92. Gu, Y. *et al.* Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J Biol Chem* **277**, 11135–11142 (2002).

93. Shi, G. *et al.* Physical and functional interactions between MutY glycosylase homologue (MYH) and checkpoint proteins Rad9-Rad1-Hus1. *Biochem J* **400**, 53–62 (2006).

94. Zhou, J., Zhou, X. A., Zhang, N. & Wang, J. Evolving insights: how DNA repair pathways impact cancer evolution. *Cancer Biol Med* **17**, 805–827 (2020).

95. Kiwerska, K. & Szyfter, K. DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy—a double-edged sword. *J Appl Genet* **60**, 329 (2019).

96. Lindahl, T. An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3649–3653 (1974).

97. Dallosso, A. R. *et al.* Inherited predisposition to colorectal adenomas caused by multiple rare alleles of MUTYH but not OGG1, NUDT1, NTH1 or NEIL 1, 2 or 3. *Gut* **57**, 1252–1255 (2008).

98. Vodenkova, S. *et al.* Base excision repair capacity as a determinant of prognosis and therapy response in colon cancer patients. *DNA Repair (Amst)* **72**, 77–85 (2018).

99. Sharbeen, G., McCarroll, J., Goldstein, D. & Phillips, P. A. Exploiting Base Excision Repair to Improve Therapeutic Approaches for Pancreatic Cancer. *Front Nutr* **2**, 27 (2015).

100. Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. & Golub, T. R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics 2002 33:1* **33**, 49–54 (2002).

101. Chakraborty, U., Dinh, T. A. & Alani, E. Genomic Instability Promoted by Overexpression of Mismatch Repair Factors in Yeast: A Model for Understanding Cancer Progression. *Genetics* **209**, 439–456 (2018).

102. Sarasin, A. & Kauffmann, A. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: a new hypothesis. *Mutat Res* **659**, 49–55 (2008).

103. Nielsen, M. *et al.* Survival of MUTYH-associated polyposis patients with colorectal cancer and matched control colorectal cancer patients. *J Natl Cancer Inst* **102**, 1724–1730 (2010).

104. Kacerovska, D. *et al.* Cutaneous Sebaceous Lesions in a Patient With MUTYH-Associated Polyposis Mimicking Muir-Torre Syndrome. *Am J Dermatopathol* **38**, 915–923 (2016).

105. Ponti, G. *et al.* BRAF Mutations in Multiple Sebaceous Hyperplasias of Patients Belonging to MYH-Associated Polyposis Pedigrees. *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 1387–1391 (2007).

106. Ponti, G. *et al.* Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations. *Clin Genet* **68**, 442–447 (2005).

107. Nielsen, M. *et al.* Duodenal carcinoma in MUTYH-associated polyposis. *J Clin Pathol* **59**, 1212 (2006).

108. Walton, S. J., Kallenberg, F. G. J., Clark, S. K., Dekker, E. & Latchford, A. Frequency and Features of Duodenal Adenomas in Patients With MUTYH-Associated Polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **14**, 986–992 (2016).

109. Theodoratou, E. *et al.* A large-scale meta-analysis to refine colorectal cancer risk estimates associated with MUTYH variants. *Br J Cancer* **103**, 1875–1884 (2010).

110. Cleary, S. P. *et al.* Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study. *Gastroenterology* **136**, 1251–1260 (2009).

111. Win, A. K., Hopper, J. L. & Jenkins, M. A. Association between monoallelic MUTYH mutation and colorectal cancer risk: a meta-regression analysis. *Fam Cancer* **10**, 1 (2011).

112. De Miranda, N. F. C. C. *et al.* MUTYH-associated polyposis carcinomas frequently lose HLA class I expression - a common event amongst DNA-repair-deficient colorectal cancers. *J Pathol* **219**, 69–76 (2009).

113. Nielsen, M. *et al.* Colorectal carcinomas in MUTYH-associated polyposis display histopathological similarities to microsatellite unstable carcinomas. *BMC Cancer* **9**, 1–15 (2009).

114. Thompson, A. B. *et al.* Monoallelic MUTYH pathogenic variants ascertained via multi-gene hereditary cancer panels are not associated with colorectal, endometrial, or breast cancer. *Fam Cancer* **21**, 415–422 (2022).

115. Pervaiz, M. A., Eppolito, A. & Schmidt, K. Papillary thyroid cancer in a patient with MUTYH-associated polyposis (MAP). *Fam Cancer* **9**, 595–597 (2010).

116. Rizzolo, P. *et al.* Contribution of MUTYH Variants to Male Breast Cancer Risk: Results From a Multicenter Study in Italy. *Front Oncol* **8**, 583 (2018).

117. Saha, T., Smulson, M. & Rosen, E. M. BRCA1 regulation of base excision repair pathway. *http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.13.12084* **9**, 2471–2472 (2010).

118. LaDuca, H. *et al.* A clinical guide to hereditary cancer panel testing: evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients. *Genetics in Medicine* **22**, 407 (2020).

119. Daans, C. G. *et al.* Increased prevalence of Barrett's esophagus in patients with MUTYH-associated polyposis (MAP). *Fam Cancer* **19**, 183–187 (2020).

120. Chen, J. *et al.* Oxidative stress induces different tissue dependent effects on Mutyh-deficient mice. *Free Radic Biol Med* **143**, 482–493 (2019).

121. Halford, S. E. R. *et al.* Germline mutations but not somatic changes at the MYH locus contribute to the pathogenesis of unselected colorectal cancers. *Am J Pathol* **162**, 1545–1548 (2003).

122. Bougatef, K. *et al.* Somatic mutation of MutYH in Tunisian patients with sporadic colorectal cancer. *J Clin Lab Anal* **21**, 372–374 (2007).

123. Van Puijenbroek, M. *et al.* Identification of patients with (atypical) MUTYH-associated polyposis by KRAS2 c.34G > T prescreening followed by MUTYH hotspot analysis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Clin Cancer Res* **14**, 139–142 (2008).

124. Jones, S. *et al.* Increased frequency of the k-ras G12C mutation in MYH polyposis colorectal adenomas. *Br J Cancer* **90**, 1591 (2004).

125. Sampson, J. R., Jones, S., Dolwani, S. & Cheadle, J. P. MutYH (MYH) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* **33**, 679–683 (2005).

126. Oishi, K. *et al.* Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet* **11**, 2961–2967 (2002).

127. Scarpa, A. *et al.* Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature* **543**, 65–71 (2017).

128. Pilati, C. *et al.* Mutational signature analysis identifies MUTYH deficiency in colorectal cancers and adrenocortical carcinomas. *J Pathol* **242**, 10–15 (2017).

129. Sereno, M. *et al.* MYH polyposis syndrome: clinical findings, genetics issues and management. *Clin Transl Oncol* **16**, 675–679 (2014).

130. Castillejo, A. *et al.* Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *Eur J Cancer* **50**, 2241–2250 (2014).

131. Sutcliffe, E. G. *et al.* Multi-gene panel testing confirms phenotypic variability in MUTYH-Associated Polyposis. *Fam Cancer* **18**, 203–209 (2019).

132. Pope, M. A., Chmiel, N. H. & David, S. S. Insight into the functional consequences of hMYH variants associated with colorectal cancer: distinct differences in the adenine glycosylase activity and the response to AP endonucleases of Y150C and G365D murine MYH. *DNA Repair (Amst)* **4**, 315–325 (2005).

133. Chmiel, N. H., Livingston, A. L. & David, S. S. Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: Complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E. coli enzymes. *J Mol Biol* **327**, 431–443 (2003).

134. Dierssen, J. W. F. *et al.* HNPCC versus sporadic microsatellite-unstable colon cancers follow different routes toward loss of HLA class I expression. *BMC Cancer* **7**, 33 (2007).

135. Kloor, M. *et al.* Immunoselective Pressure and Human Leukocyte Antigen Class I Antigen Machinery Defects in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers. *Cancer Res* **65**, 6418–6424 (2005).

136. Volkov, N. M. *et al.* Efficacy of immune checkpoint blockade in MUTYH-associated hereditary colorectal cancer. *Invest New Drugs* **38**, 894–898 (2020).

137. Wang, J., Xiong, S., Xie, C., Markesbery, W. R. & Lovell, M. A. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **93**, 953–962 (2005).

138. Gemba, H., Kyuhou, S. ichi, Matsuzaki, R. ichi & Amino, Y. Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neurosci Lett* **272**, 53–56 (1999).

139. Arai, T. *et al.* Up-regulation of hMUTYH, a DNA repair enzyme, in the mitochondria of substantia nigra in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **112**, 139–145 (2006).

140. Savic-Radojevic, A. *et al.* Novel Biomarkers of Heart Failure. *Adv Clin Chem* **79**, 93–152 (2017).

141. Mariani, E., Polidori, M. C., Cherubini, A. & Mecocci, P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **827**, 65–75 (2005).

142. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C. & Mecocci, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* **39**, 841–852 (2005).

143. Sheng, Z. *et al.* 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair. *J Clin Invest* **122**, 4344–4361 (2012).

144. Kung, Y. J. *et al.* MUTYH Gene Polymorphisms as Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res Int* **2015**, (2015).

145. Zhang, S., Guo, H., Chen, D., Chen, X. & Jin, Q. MUTYH and ORAI1 polymorphisms are associated with susceptibility to osteoarthritis in the Chinese Han population. *J Int Med Res* **46**, 2292–2300 (2018).

146. Casorelli, I. *et al.* The Mutyh base excision repair gene influences the inflammatory response in a mouse model of ulcerative colitis. *PLoS One* **5**, (2010).

147. Herskowitz I. H. *Principles of Genetics.* (Macmillan, 1977).

148. Tracy, R. P. 'Deep phenotyping': characterizing populations in the era of genomics and systems biology. *Curr Opin Lipidol* **19**, 151–157 (2008).

149. Lussier, Y. A. & Liu, Y. Computational approaches to phenotyping: high-throughput phenomics. *Proc Am Thorac Soc* **4**, 18–25 (2007).

150. Riggs, E. R., Jackson, L., Miller, D. T. & Van Vooren, S. Phenotypic information in genomic variant databases enhances clinical care and research: The international standards for cytogenomic arrays consortium experience. *Hum Mutat* **33**, 787–796 (2012).

151. Wang, X. *et al.* Three-dimensional reconstruction of protein networks provides insight into human genetic disease. *Nat Biotechnol* **30**, 159 (2012).

152. Savova, G. K. *et al.* DeepPhe: A Natural Language Processing System for Extracting Cancer Phenotypes from Clinical Records. *Cancer Res* **77**, e115–e118 (2017).

153. Wright, J. T. & Herzberg, M. C. Science for the Next Century: Deep Phenotyping. *J Dent Res* **100**, 785 (2021).

154. Price, N. D. *et al.* A wellness study of 108 individuals using personal, dense, dynamic data clouds. *Nat Biotechnol* **35**, 747–756 (2017).

155. Chen, R. *et al.* Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell* **148**, 1293–1307 (2012).

156. Gershon, E. S. *et al.* Genetic Analysis of Deep Phenotyping Projects in Common Disorders. *Schizophr Res* **195**, 51 (2018).

157. Köhler, S. *et al.* The Human Phenotype Ontology in 2017. *Nucleic Acids Res* **45**, D865–D876 (2017).

158. Bycroft, C. *et al.* The UK Biobank resource with deep phenotyping and genomic data. *Nature* **562**, 203–209 (2018).

159. Yurkovich, J. T., Tian, Q., Price, N. D. & Hood, L. A systems approach to clinical oncology uses deep phenotyping to deliver personalized care. *Nat Rev Clin Oncol* **17**, 183–194 (2020).

160. Kohane, I. S. Deeper, longer phenotyping to accelerate the discovery of the genetic architectures of diseases. *Genome Biol* **15**, 1–3 (2014).

161. Robinson, P. N. Deep phenotyping for precision medicine. *Hum Mutat* **33**, 777–780 (2012).

162. Delude, C. M. Deep phenotyping: The details of disease. *Nature 2015 527:7576* **527**, S14–S15 (2015).

163. Tracy, R. P. Emerging relationships of inflammation, cardiovascular disease and chronic diseases of aging. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3**, S29–S34 (2003).

164. Paquette, A. G., Hood, L., Price, N. D. & Sadovsky, Y. Deep phenotyping during pregnancy for predictive and preventive medicine. *Sci Transl Med* **12**, (2020).

165. Dorsey, E. R. *et al.* Deep Phenotyping of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* **10**, 855–873 (2020).

166. FitzGerald, G. *et al.* The future of humans as model organisms. *Science* **361**, 552–553 (2018).

167. Vries, N. De *et al.* PO-260 Deep phenotyping of colorectal cancers by high-dimensional mass cytometry reveals tumor-specific immune landscapes. *ESMO Open* **3**, A328–A329 (2018).

168. McLendon, R. *et al.* Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061 (2008).

169. Weinstein, J. N. *et al.* The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* **45**, 1113–1120 (2013).

170. Laganà, A. *et al.* Precision Medicine for Relapsed Multiple Myeloma on the Basis of an Integrative Multiomics Approach. *JCO Precis Oncol* **2018**, 1–17 (2018).

171. Liu, Y. *et al.* Comparative Molecular Analysis of Gastrointestinal Adenocarcinomas. *Cancer Cell* **33**, 721-735.e8 (2018).

172. Joo, W. D., Visintin, I. & Mor, G. Targeted cancer therapy--are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas* **76**, 308–314 (2013).

173. Waarts, M. R., Stonestrom, A. J., Park, Y. C. & Levine, R. L. Targeting mutations in cancer. *J Clin Invest* **132**, (2022).

174. Pérez-Herrero, E. & Fernández-Medarde, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* **93**, 52–79 (2015).

175. Hong, Y., Nam, S. M. & Moon, A. Antibody-drug conjugates and bispecific antibodies targeting cancers: applications of click chemistry. *Arch Pharm Res* **46**, (2023).

176. Richards, S. *et al.* 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* **17**, 405–424 (2015).

177. gnomAD. https://gnomad.broadinstitute.org/.

178. Exome Variant Server. https://evs.gs.washington.edu/EVS/.

179. 1000 Genomes | A Deep Catalog of Human Genetic Variation. https://www.internationalgenome.org/.

180. Ioannidis, N. M. *et al.* REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet* **99**, 877–885 (2016).

181. Dong, C. *et al.* Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet* **24**, 2125–2137 (2015).

182. Li, C., Zhi, D., Wang, K. & Liu, X. MetaRNN: Differentiating Rare Pathogenic and Rare Benign Missense SNVs and InDels Using Deep Learning. *bioRxiv* 2021.04.09.438706 (2021) doi:10.1101/2021.04.09.438706.

183. Jian, X., Boerwinkle, E. & Liu, X. In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome. *Nucleic Acids Res* **42**, 13534–13544 (2014).

184. Yeo, G. & Burge, C. B. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* **11**, 377–394 (2004).

185. Os, P. G. C. E. Van & Schouten, J. P. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) for the detection of copy number variation in genomic sequences. *Methods Mol Biol* **688**, 97–126 (2011).

186. Stuppia, L., Antonucci, I., Palka, G. & Gatta, V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci* **13**, 3245–3276 (2012).

187. Modi, T. *et al.* Protein folding stability and binding interactions through the lens of evolution: a dynamical perspective This review comes from a themed issue on Folding and binding. *Curr Opin Struct Biol* **2021**, 207–215 (2020).

188. Cohen, M., Reichmann, D., Neuvirth, H. & Schreiber, G. Similar chemistry, but different bond preferences in inter versus intra-protein interactions. *Proteins* **72**, 741–753 (2008).

189. Kulshreshtha, S., Chaudhary, V., Goswami, G. K. & Mathur, N. Computational approaches for predicting mutant protein stability. *J Comput Aided Mol Des* **30**, 401–412 (2016).

190. Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. (Macmillan, 1999).

191. Rose, G. D. & Wolfenden, R. Hydrogen bonding, hydrophobicity, packing, and protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 381–415 (1993).

192. Nussinov, R., Tsai, C. J., Shehu, A. & Jang, H. Computational Structural Biology: Successes, Future Directions, and Challenges. *Molecules* **24**, (2019).

193. Dotsenko, A. *et al.* Testing and improving the performance of protein thermostability predictors for the engineering of cellulases. *J Bioinform Comput Biol* **21**, (2023).

194. King, R. D. *et al.* Is it better to combine predictions? *Protein Eng* **13**, 15–19 (2000).

195. Pancotti, C. *et al.* Predicting protein stability changes upon single-point mutation: a thorough comparison of the available tools on a new dataset. *Brief Bioinform* **23**, 1–12 (2022).

196. Potapov, V., Cohen, M. & Schreiber, G. Assessing computational methods for predicting protein stability upon mutation: good on average but not in the details. *Protein Eng Des Sel* **22**, 553–560 (2009).

197. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature 2021 596:7873* **596**, 583–589 (2021).

198. Varadi, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* **50**, D439–D444 (2022).

199. Luncsford, P. J. *et al.* A Structural Hinge in Eukaryotic MutY Homologues Mediates Catalytic Activity and Rad9–Rad1–Hus1 Checkpoint Complex Interactions. *J Mol Biol* **403**, 351–370 (2010).

200. wwPDB: 1X51. https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00001x51.

201. Van Zundert, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol* **428**, 720–725 (2016).

202. Honorato, R. V. *et al.* Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. *Front Mol Biosci* **8**, (2021).

203. Rodrigues, C. H. M., Pires, D. E. V. & Ascher, D. B. DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res* **46**, W350 (2018).

204. Rodrigues, C. H. M., Pires, D. E. V. & Ascher, D. B. DynaMut2: Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. *Protein Sci* **30**, 60–69 (2021).

205. Chen, Y. *et al.* PremPS: Predicting the impact of missense mutations on protein stability. *PLoS Comput Biol* **16**, (2020).

206. Biesecker, L. G. & Harrison, S. M. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genetics in Medicine 2018 20:12* **20**, 1687–1688 (2018).

207. Worth, C. L., Preissner, R. & Blundell, T. L. SDM—a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Res* **39**, W215 (2011).

208. Pandurangan, A. P., Ochoa-Montaño, B., Ascher, D. B. & Blundell, T. L. SDM: a server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Res* **45**, W229–W235 (2017).

209. Ashkenazy, H. *et al.* ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res* **44**, W344 (2016).

210. Pandurangan, A. P., Ascher, D. B., Thomas, S. E. & Blundell, T. L. Genomes, structural biology and drug discovery: combating the impacts of mutations in genetic disease and antibiotic resistance. *Biochem Soc Trans* **45**, 303 (2017).

211. Sanavia, T. *et al.* Limitations and challenges in protein stability prediction upon genome variations: towards future applications in precision medicine. *Comput Struct Biotechnol J* **18**, 1968 (2020).

212. Hensen, U. *et al.* Exploring protein dynamics space: the dynasome as the missing link between protein structure and function. *PLoS One* **7**, (2012).

213. Karaca, E., Prévost, C. & Sacquin-Mora, S. Modeling the Dynamics of Protein–Protein Interfaces, How and Why? *Molecules* **27**, (2022).

214. Khan, M. A. & Varma, A. K. In silico and structure-based assessment to classify VUS identified in the α-helical domain of BRCA2. *J Biomol Struct Dyn* (2022) doi:10.1080/07391102.2022.2148127/SUPPL_FILE/TBSD_A_2148127_SM7659.PDF.

215. Sacquin-Mora, S. & Prévost, C. When Order Meets Disorder: Modeling and Function of the Protein Interface in Fuzzy Complexes. *Biomolecules* **11**, (2021).

216. Rahban, M. *et al.* Thermal stability enhancement: Fundamental concepts of protein engineering strategies to manipulate the flexible structure. *Int J Biol Macromol* **214**, 642–654 (2022).

217. Sun, P. D., Foster, C. E. & Boyington, J. C. Overview of Protein Structural and Functional Folds. *Curr Protoc Protein Sci* **35**, 17.1.1-17.1.189 (2004).

218. Papaleo, E. *et al.* The Role of Protein Loops and Linkers in Conformational Dynamics and Allostery. (2016) doi:10.1021/acs.chemrev.5b00623.

219. Li, B., Yang, Y. T., Capra, J. A. & Gerstein, M. B. Predicting changes in protein thermodynamic stability upon point mutation with deep 3D convolutional neural networks. *PLoS Comput Biol* **16**, (2020).

220. Gong, J., Wang, J., Zong, X., Ma, Z. & Xu, D. Prediction of protein stability changes upon single-point variant using 3D structure profile. *Comput Struct Biotechnol J* **21**, 354–364 (2022).

221. Pires, D. E. V. *et al.* Exploring Protein Supersecondary Structure Through Changes in Protein Folding, Stability, and Flexibility. *Methods Mol Biol* **1958**, 173–185 (2019).

222. Özdemir, Z. *et al.* Uncommon variants detected via hereditary cancer panel and suggestions for genetic counseling. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **827**, 111831 (2023).

223. Arslan Ates, E., Turkyilmaz, A., Alavanda, C., Yildirim, O. & Guney, A. I. Multigene Panel Testing in Turkish Hereditary Cancer Syndrome Patients. *Medeni Med J* **37**, 150–158 (2022).

224. Tsaousis, G. N. *et al.* Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations. *BMC Cancer* **19**, (2019).

225. de Oliveira, J. M. *et al.* The genetics of hereditary cancer risk syndromes in Brazil: a comprehensive analysis of 1682 patients. *Eur J Hum Genet* **30**, 818–823 (2022).

226. Erdem, H. B. & Bahsi, T. Spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations in Turkish colorectal cancer patients: a single center study. *Turk J Med Sci* **50**, 1015–1021 (2020).

227. Peterlongo, P. *et al.* Increased frequency of disease-causing MYH mutations in colon cancer families. *Carcinogenesis* **27**, 2243–2249 (2006).

228. Ateş, E. A. *et al.* Mutation Spectrum of Familial Adenomatous Polyposis Patients in Turkish Population: Identification of 3 Novel APC Mutations. *The Turkish Journal of Gastroenterology* **33**, 81 (2022).

229. Paysan-Lafosse, T. *et al.* InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res* **51**, D418–D427 (2023).

230. Akcay, I. M. *et al.* Germline pathogenic variant spectrum in 25 cancer susceptibility genes in Turkish breast and colorectal cancer patients and elderly controls. *Int J Cancer* **148**, 285–295 (2021).

231. Deignan, J. L. *et al.* Points to Consider in the Reevaluation and Reanalysis of Genomic Test Results: A Statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* **21**, 1267 (2019).

232. Mighton, C. *et al.* Variant classification changes over time in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in Medicine* **21**, 2248–2254 (2019).

233. David, K. L. *et al.* Patient re-contact after revision of genomic test results: points to consider—a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine* **21**, 769–771 (2019).

234. Carrieri, D. *et al.* Recontacting patients in clinical genetics services: recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet* **27**, 169–182 (2019).

235. Wedd, L. *et al.* Exploring the impact of the reclassification of a hereditary cancer syndrome gene variant: emerging themes from a qualitative study. *J Community Genet* **14**, 307–317 (2023).

236. Diwan, G. D., Gonzalez-Sanchez, J. C., Apic, G. & Russell, R. B. Next Generation Protein Structure Predictions and Genetic Variant Interpretation. *J Mol Biol* **433**, (2021).

237. Yanus, G. A. *et al.* Spectrum of APC and MUTYH germ-line mutations in Russian patients with colorectal malignancies. *Clin Genet* **93**, 1015–1021 (2018).

238. Croitoru, M. E. *et al.* Germline MYH mutations in a clinic-based series of Canadian multiple colorectal adenoma patients. *J Surg Oncol* **95**, 499–506 (2007).

239. Aretz, S. *et al.* MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* **119**, 807–814 (2006).

240. Lejeune, S. *et al.* Low frequency of AXIN2 mutations and high frequency of MUTYH mutations in patients with multiple polyposis. *Hum Mutat* **27**, 1064 (2006).

241. Brinkmeyer, M. K. & David, S. S. Distinct functional consequences of MUTYH variants associated with colorectal cancer: Damaged DNA affinity, glycosylase activity and interaction with PCNA and Hus1. *DNA Repair (Amst)* **34**, 39–51 (2015).

242. Ali, M. *et al.* Characterization of mutant MUTYH proteins associated with familial colorectal cancer. *Gastroenterology* **135**, 499 (2008).

243. Jones, N. *et al.* Increased colorectal cancer incidence in obligate carriers of heterozygous mutations in MUTYH. *Gastroenterology* **137**, (2009).

244. Ruggieri, V. *et al.* Loss of MUTYH function in human cells leads to accumulation of oxidative damage and genetic instability. *Oncogene* **32**, 4500–4508 (2013).

245. Grasso, F. *et al.* Genetic instability in lymphoblastoid cell lines expressing biallelic and monoallelic variants in the human MUTYH gene. *Hum Mol Genet* **23**, 3843–3852 (2014).

246. Molatore, S. *et al.* MUTYH mutations associated with familial adenomatous polyposis: functional characterization by a mammalian cell-based assay. *Hum Mutat* **31**, 159–166 (2010).

247. Fulk, K. *et al.* Monoallelic MUTYH carrier status is not associated with increased breast cancer risk in a multigene panel cohort. *Fam Cancer* **18**, 197–201 (2019).

248. Rennert, G. *et al.* MutYH mutation carriers have increased breast cancer risk. *Cancer* **118**, 1989–1993 (2012).

249. Pin, E. *et al.* MUTYH c.933+3A>C, associated with a severely impaired gene expression, is the first Italian founder mutation in MUTYH-Associated Polyposis. *Int J Cancer* **132**, 1060–1069 (2013).

250. Papp, J. *et al.* Contribution of APC and MUTYH mutations to familial adenomatous polyposis susceptibility in Hungary. *Fam Cancer* **15**, 85–97 (2016).

251. Dorling, L. *et al.* Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. *N Engl J Med* **384**, 428 (2021).

252. Kwon, D. H. M., Borno, H. T., Cheng, H. H., Zhou, A. Y. & Small, E. J. Ethnic disparities among men with prostate cancer undergoing germline testing. *Urol Oncol* **38**, 80.e1-80.e7 (2020).

253. Zhu, H. *et al.* Genetic Variants in Patients With a Family History of Pancreatic Cancer: Impact of Multigene Panel Testing. *Pancreas* **50**, 602–606 (2021).

254. Kwong, A. *et al.* Germline Mutation in 1338 BRCA-Negative Chinese Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer Patients: Clinical Testing with a Multigene Test Panel. *J Mol Diagn* **22**, 544–554 (2020).

255. Sung, P. L. *et al.* The frequency of cancer predisposition gene mutations in hereditary breast and ovarian cancer patients in Taiwan: From BRCA1/2 to multi-gene panels. *PLoS One* **12**, (2017).

256. Yurgelun, M. B. *et al.* Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Suspected Lynch Syndrome. *Gastroenterology* **149**, 604e20-613.e20 (2015).

# 8. EKLER

## EK-1 Etik Kurul Onayı

| KARAR BİLGİLERİ | Karar No:2023/14-19 | Tarih:03.05.2023 |
|---|---|---|
| | Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan'ın sorumlusu olduğu **"MUTYH Varyantlarının Derin Fenotipleme ve Bilgisayar Temelli Yapısal Biyoloji Araçları ile Değerlendirilmesi"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. | |

**ETİK KURUL BİLGİLERİ**

| | |
|---|---|
| **ÇALIŞMA ESASI** | Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi<br>İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu |

**ETİK KURUL ÜYELERİ**

| Unvanı/Adı/Soyadı | Uzmanlık Alanı | Kurumu | Cinsiyet | Araştırma ile İlişkili mi? | | İmza |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan) | Kardiyoloji | DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü | Erkek | E ☐ | H ☒ | |
| Prof.Dr. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı) | Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı | DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü | Kadın | E ☐ | H ☒ | |
| Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan | Moleküler Tıp | Sağlık Bilimleri Enstitüsü | Erkek | E ☒ | H ☐ | Katılmadı. |
| Prof.Dr. Suna Asilsoy | Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları | DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü | Kadın | E ☐ | H ☒ | |
| Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın | Göğüs Hastalıkları | DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı | Kadın | E ☐ | H ☒ | |
| Prof.Dr. Özgür Er | Endodonti A.D. | Diş Hekimliği Fakültesi | Erkek | E ☐ | H ☒ | |
| Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin | Halk Sağlığı | DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı | Kadın | E ☐ | H ☒ | |
| Doç.Dr.Seher Özyürek | Muskuloskeletal Fizyoterapi | DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi | Kadın | E ☐ | H ☒ | |
| Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay | Tıbbi Farmakoloji | DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı | Kadın | E ☐ | H ☒ | |
| Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney | Halk Sağlığı Hemşireliği | Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği | Kadın | E ☐ | H ☒ | |
| Doç.Dr. Şule Özbilgin | Anesteziyoloji ve Reanimasyon | DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü | Kadın | E ☐ | H ☒ | |
| Doç.Dr.Tolga Şahin | Spor Yönetim Bilimleri | Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi | Erkek | E ☐ | H ☒ | |
| Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna | Tıbbi Biyokimya | Sağlık Bilimleri Enstitüsü | Kadın | E ☐ | H ☒ | |

Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan çalışmada sorumlu araştırmacı olduğu için çalışma görüşülürken toplantıda bulunmamıştır.

**EK-2 Veri Kayıt Formu**

*MUTYH* Gen Varyantı Saptanan Olgular için Veri Kayıt Formu

| | |
|---|---|
| Olgu No: | Aile No: |
| Doğum Tarihi: | Cinsiyet: |
| Tanı: | |
| Anamnez (Her primer malignite tanısı için ayrı ayrı doldurulacaktır.)<br>• Tanı yaşı<br>• Kanserin lokalizasyonu<br>• Histopatolojik sonucu<br>• Evresi ve derecesi<br>• ECOG performans skoru<br>• Uygulanan tedavi/ler<br>• Kür-Nüks-Direnç durumu | |
| Fizik muayene ve dismorfik bulgular: | |
| Özgeçmiş:<br>• Ek hastalık öyküsü<br>• Geçirilmiş operasyon/travma<br>• Mevcut kanser için tanımlanan risk faktörleri (sigara, menarş yaşı, parite durumu, OKS kullanım öyküsü, menopoz yaşı, aspirin kullanımı, beslenme tarzı, obezite…)<br>• Kolonoskopi sonuçları | |
| Soygeçmiş:<br>• (En az 3 kuşak aile üyelerinin kanser tanı ve tanı yaşı, exitus nedeni ve yaşı ile değerlendirilmesini içeren aile öyküsünün alınması ve pedigri çizimi) | |
| Saptanan *MUTYH* varyantı: (Her varyant için ayrı ayrı doldurulacaktır.)<br>• Referans transkript | |

- Kromozomal pozisyonu
- Saptanan değişim (varsa SNP_ID)
- Bulunduğu ekzon/intron
- Zigositesi
- Mutasyon tipi
- Proteine etkisi
- ACMG sınıflandırması ile yorumu
- Biyolojik araçla değerlendirilmesi
- Metrik ölçümleri

**EK-3 Türler Arası Protein Sekanslarının Hizalanması**

Literatürde geçen farklı türlerdeki MutY aminoasit pozisyon bilgileri, Cluster Omega v.1.2.4 multiple sekans hizalama aracı yardımıyla insan izoformlarındaki aminoasit yerleşimleri saptanmıştır.

```
MutYIP83847I366IGeobacillus     ------------------------------------------------------------  0
Q99P21I515IMus                  --------------MKKLQASV-RSHKKQPANHKRRRTRALSSSQAKPS-----------  34
Q9UIF7-F1I546IHuman             MTPLVSRLSRLWAIMRKPRAAVGSGHRKQAASQEGRQKHAKNNSQAKPSACDGMIAECPG  60
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        MTPLVSRLSRLWAIMRKPRAAVGSGHRKQAASQEGRQKHAKNNSQAKPSACDG-------  53


MutYIP83847I366IGeobacillus     --------------------MTRETERFPAREFQRDLLDWFARERRDLPWRK--------  32
Q99P21I515IMus                  SLDGLAKQKREELLQASVSPYHLFSDVADVTAFRSNLLSWYDQEKRDLPWRNLAKEEANS  94
Q9UIF7-F1I546IHuman             APAGLARQPEEVVLQASVSSYHLFRDVAEVTAFRGSLLSWYDQEKRDLPWRRRAEDEMDL  120
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        ----LARQPEEVVLQASVSSYHLFRDVAEVTAFRGSLLSWYDQEKRDLPWRRRAEDEMDL  109
                                                    :   .  *: .**.*: :*:******.

MutYIP83847I366IGeobacillus     DRDPYKVWVSEVMLQQTRVETVIPYFEQFIDRFPTLEALADADEDEVLKAWEGLGYYSRV  92
Q99P21I515IMus                  DRRAYAVWVSEVMLQQTQVATVIDYYTRWMQKWPKLQDLASASLEEVNQLWSGLGYYSRG  154
Q9UIF7-F1I546IHuman             DRRAYAVWVSEVMLQQTQVATVINYYTGWMQKWPTLQDLASASLEEVNQLWAGLGYYSRG  180
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        DRRAYAVWVSEVMLQQTQVATVINYYTGWMQKWPTLQDLASASLEEVNQLWAGLGYYSRG  169
                                **  * ***********:* *** *:  :::::*.*: **.*. :** : * *******

MutYIP83847I366IGeobacillus     RNLHAAVKEVKTRYGGKVPDDPDEFS-RLKGVGPYTVGAVLSLAYGVPEPAVDGNVMRVL  151
Q99P21I515IMus                  RRLQEGARKVVEELGGHMPRTAETLQQLLPGVGRYTAGAIASIAFDQVTGVVDGNVLRVL  214
Q9UIF7-F1I546IHuman             RRLQEGARKVVEELGGHMPRTAETLQQLLPGVGRYTAGAIASIAFGQATGVVDGNVARVL  240
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        RRLQEGARKVVEELGGHMPRTAETLQQLLPGVGRYTAGAIASIAFGQATGVVDGNVARVL  229
                                *.*: ..::*  . **::*   : :.  * *** **.**: *:*:.    .***** ***

MutYIP83847I366IGeobacillus     SRLFLVTDDIAKPSTRKRFEQIVREIMAYENPGAFNEALIELGALVCTPRRPSCLLCPVQ  211
Q99P21I515IMus                  CRVRAIGADPTSTLVSHHLWNLAQQLVDPARPGDFNQAAMELGATVCTPQRPLCSHCPVQ  274
Q9UIF7-F1I546IHuman             CRVRAIGADPSSTLVSQQLWGLAQQLVDPARPGDFNQAAMELGATVCTPQRPLCSQCPVE  300
```

```
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        CRVRAIGADPSSTLVSQQLWGLAQQLVDPARPGDFNQAAMELGATVCTPQRPLCSQCPVE  289
                                .*:  :  * :.  . :::  :.::::   .** **:* :**** ****:** *  ***:

MutYIP83847I366IGeobacillus     AYCQAFAEGVAEELPVKMKKT-----------------------------------AV  234
Q99P21I515IMus                  SLCRAYQRVQRGQLS---ALPGRPDIEECALNTRQCQLCLTSSSPWDPSMGVANFPRKAS  331
Q9UIF7-F1I546IHuman             SLCRARQRVEQEQLLASGSLSGSPDVEECAPNTGQCHLCLPPSEPWDQTLGVVNFPRKAS  360
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        SLCRARQRVEQEQLLASGSLSGSPDVEECAPNTGQCHLCLPPSEPWDQTLGVVNFPRKAS  349
                                : *:*  .    :*                                            *

MutYIP83847I366IGeobacillus     KQVP----LAVAVL----ADDEGRVLIRKRDSTGLLANLWEFPSCETDGADGKEKLEQM-  285
Q99P21I515IMus                  RRPPREEYSATCVVEQPGAIGGPLVLLVQRPDSGLLAGLWEFPSVTLEPSEQHQHKALLQ  391
Q9UIF7-F1I546IHuman             RKPPREESSATCVLEQPGALGAQ-ILLVQRPNSGLLAGLWEFPSVTWEPSEQLQRKALLQ  419
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        RKPPREESSATCVLEQPGALGAQ-ILLVQRPNSGLLAGLWEFPSVTWEPSEQLQRKALLQ  408
                                :: *     *..*:    * .   :*: :* .:****.******   : ::  ::   :

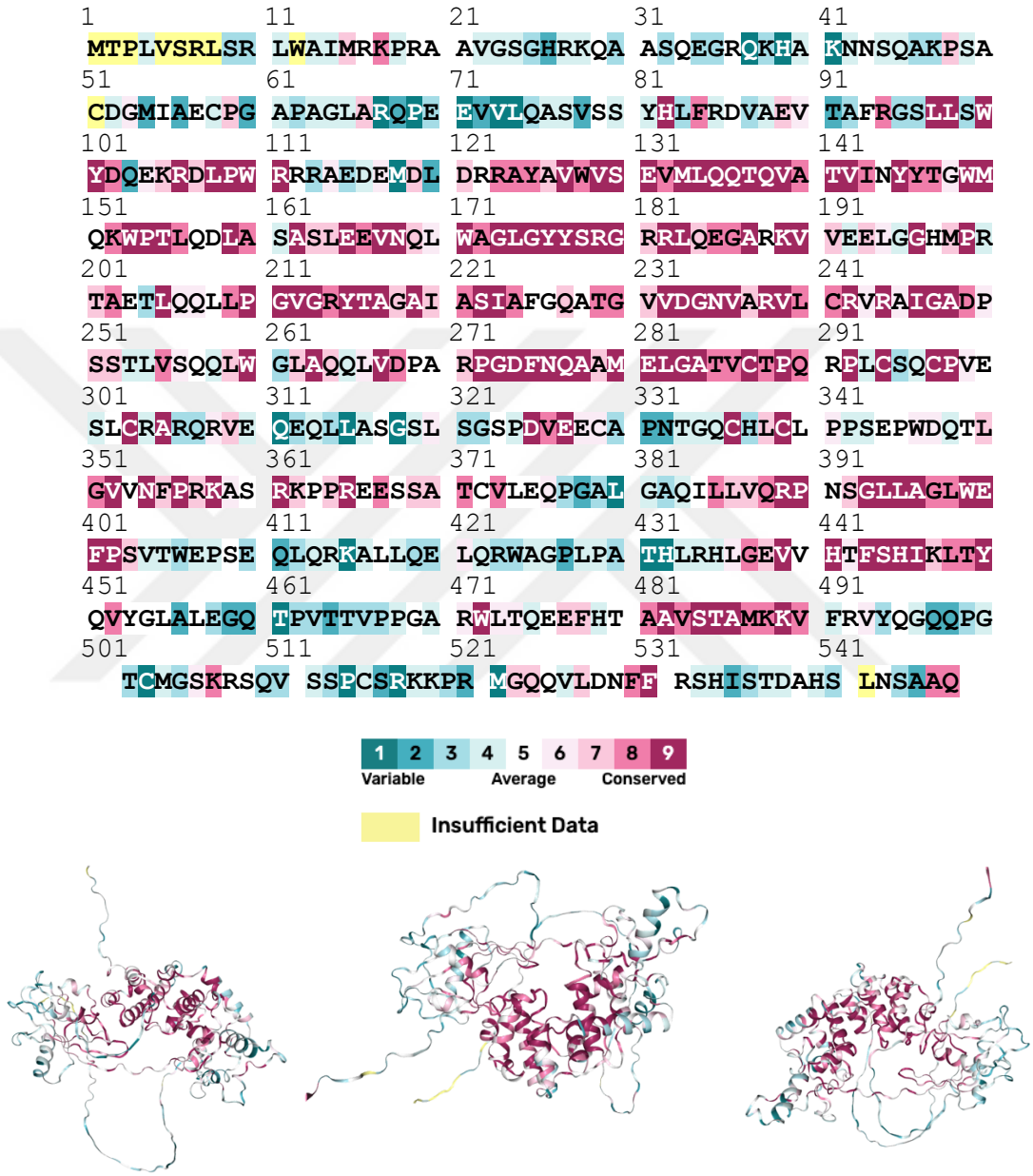
MutYIP83847I366IGeobacillus     -VGEQYG-LQVELTEPIVSFEHAFSHLVWQLTVFPGRLVHGGPVEE---PYRLAPEDELK  340
Q99P21I515IMus                  ELQRWCGPLPAIRLQHLGEVIHIFSHIKLTYQVYSLALD-QAPASTAPPGARWLTWEEFC  450
Q9UIF7-F1I546IHuman             ELQRWAGPLPATHLRHLGEVVHTFSHIKLTYQVYGLALEGQTPVTTVPPGARWLTQEEFH  479
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        ELQRWAGPLPATHLRHLGEVVHTFSHIKLTYQVYGLALEGQTPVTTVPPGARWLTQEEFH  468
                                 : .  * * .   . : .. * ***:     *:   *    *.       *    :*:

MutYIP83847I366IGeobacillus     AYAFPVSHQRVWREYKEWASGVRRPD----------------------------------  366
Q99P21I515IMus                  NAAVSTAMKKVFRMYEDHRQGTRKGSKRSQVCPPSSRKKPSLGQQVLDTFFQRHIPTDKP  510
Q9UIF7-F1I546IHuman             TAAVSTAMKKVFRVYQGQQPGTCMGSKRSQVSSPCSRKKPRMGQQVLDNFFRSHISTDAH  539
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        TAAVSTAMKKVFRVYQGQQPGTCMGSKRSQVSSPCSRKKPRMGQQVLDNFFRSHISTDAH  528
                                  *. .: ::*:* *:    *.   .

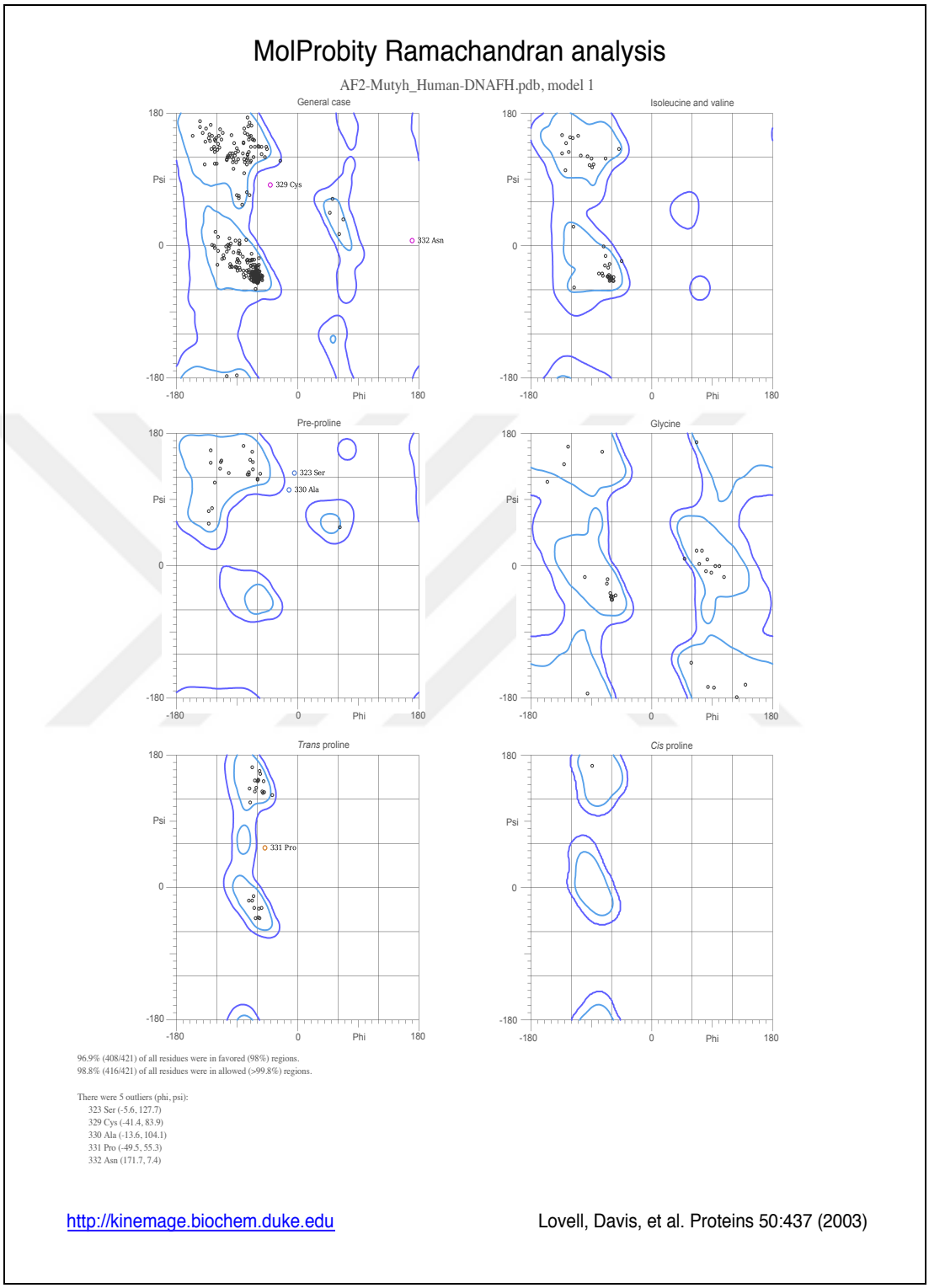
MutYIP83847I366IGeobacillus     -------366
Q99P21I515IMus                  NSTTQ--515
Q9UIF7-F1I546IHuman             SLNSAAQ546
MUTYHIQ9UIF7-3I535IHuman        SLNSAAQ535
```

**EK-4 Filogenetik Korunmuş Bölgelerin Görsellenmesi**

Bu amaçla 546 aminoasit uzunluğundaki (UniProt ID: Q9UIF7) insan MUTYH proteini ConSurf sunucusu kullanılarak görsellendi.

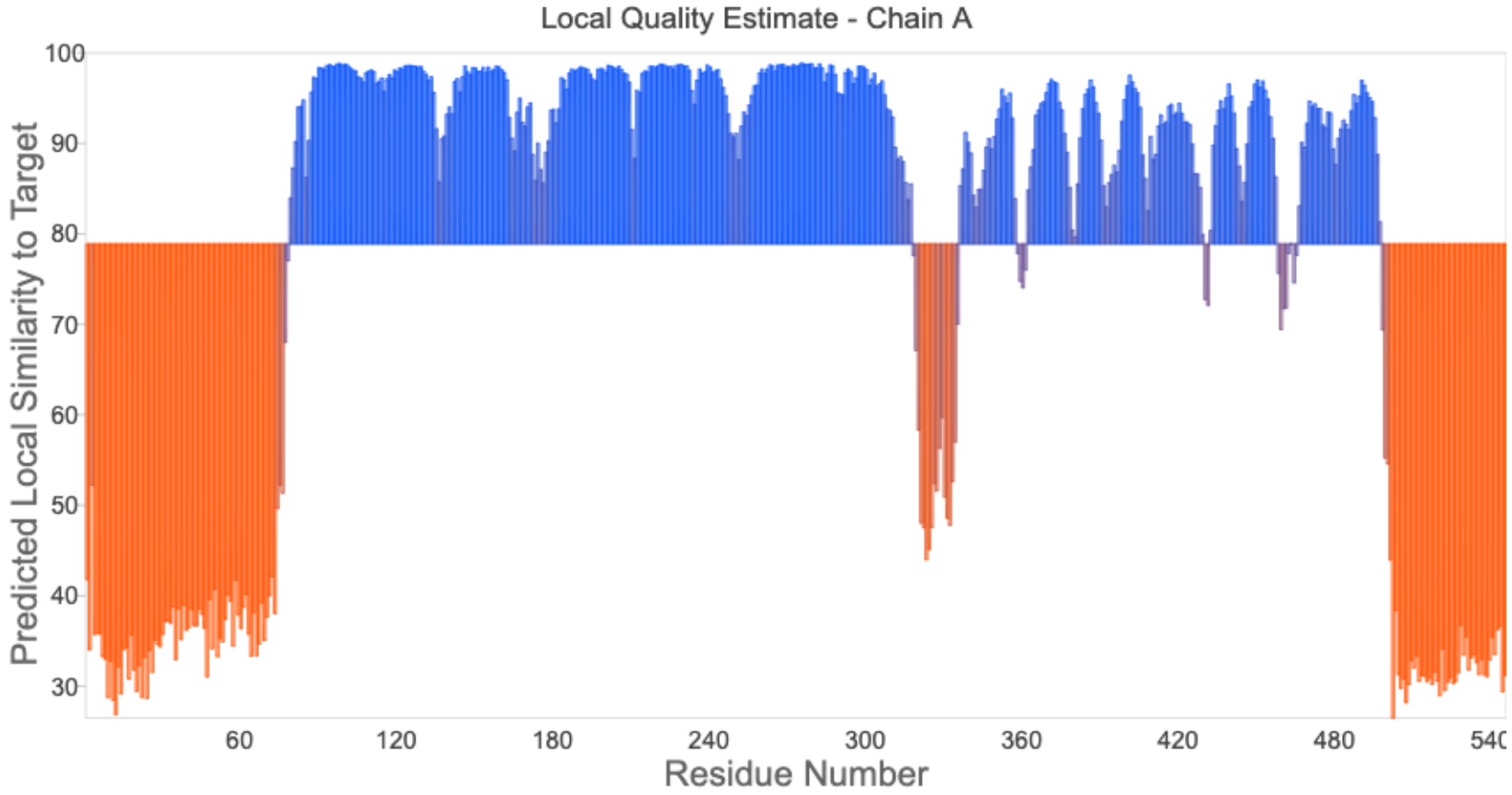


## EK-5 Modellenen Yapının Ramachandran Analizi



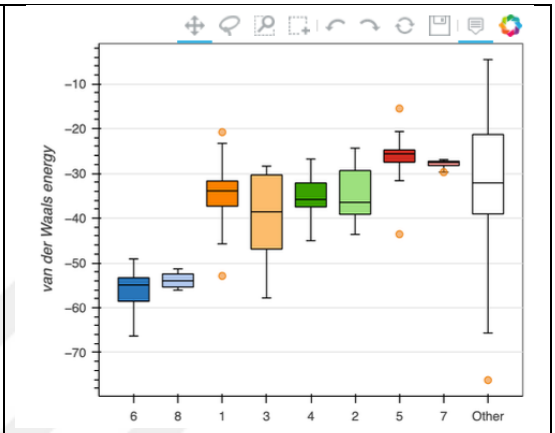
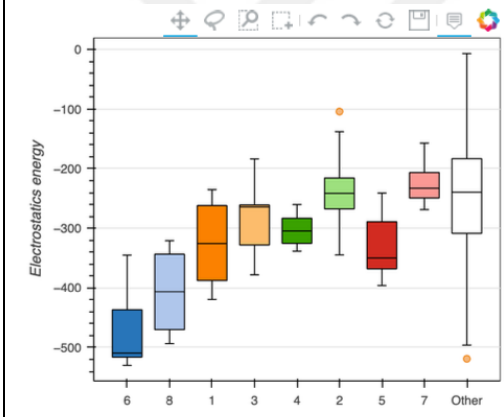
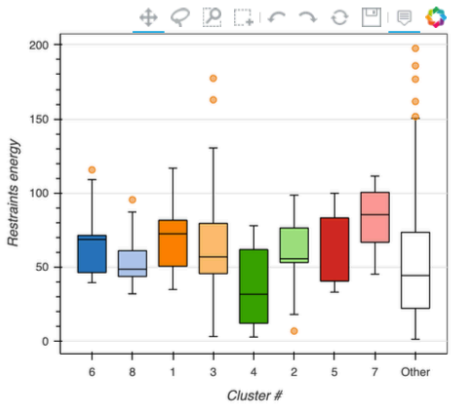
**EK-6 Modelde Bölgesel Kalite Değerlendirmesi**

AlphaFold'dan elde edilen AF-Q9UIF7-F1-v4 (2022-06-01) modeli için ortalama güvenirlik değeri 78.90 olup rezidü yerleşimine göre değerlendirme aşağıda verilmiştir.



**EK-7 Modelin Enerjetik Olarak Rafine Edilmesi**

Oluşturulan model enerjetik olarak HADDOCK'ta rafine edilerek en iyi skorlara sahip 'cluster' yapısı ('cluster 6') seçildi. Aşağıda HADDOCK v2.4 sonuçları verilmiştir.

<table>
<tr>
<td>Cluster 6:<br>HADDOCK score: -122.1 +/- 8.3<br>Cluster size: 5<br>RMSD from the overall lowest-energy structure: 1.2 +/- 0.8<br>Van der Waals energy: -56.8 +/- 6.4<br>Electrostatic energy: -498.1 +/- 36.2<br>Desolvation energy: 27.6 +/- 3.3<br>Restraints violation energy: 67.4 +/- 29.8<br>Buried Surface Area: 2072.9 +/- 156.3<br>Z-Score: -1.7</td>
<td>
</td>
</tr>
<tr>
<td>
</td>
<td>
</td>
</tr>
</table>