

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI



KANSERLİ HASTALARDA CELL FREE DNA VE TÜMÖR DOKUSUNDAN  
TELOMER UZUNLUĞU BAKILMASI

**UZMANLIK TEZİ**  
Dr. Mine URFALI

**TEZ DANIŞMANI**  
Prof. Dr. Fatma SILAN

Çanakkale 2017

ÇOMÜ-BAP Proje No: TTU-2015-510

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

KANSERLİ HASTALARDA CELL FREE DNA VE TÜMÖR DOKUSUNDAN  
TELOMER UZUNLUĞU BAKILMASI

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Mine URFALI

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Fatma SILAN

Çanakkale 2017

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: TTU-2015-510

T.C.  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı uzmanlık eğitimi  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Arş. Gör. Dr. Mine URFALI 'nın Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/06/2017

**TEZ KONU BAŞLIĞI**

"Kanserli Hastalarda Cell-free DNA ve Tümör Dokusundan Telomer Uzunluğu  
Bakılması"

Tez Danışman : Prof. Dr. Fatma SILAN

**Tez Jürisi Üyeleri:**

**Adı Soyadı**

Prof. Dr. Fatma SILAN

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Doç. Dr. Haluk AKIN

İmzası  


**ONAY:**

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki  
jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim  
Kurulunun **16.06.2017** tarih ve **29/3.** sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Yücel ACER**

**Dekan**

**Dekan**



## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde deneyimleriyle bana daima rehber olan, uzmanlık tezimin hazırlanmasında bilgisi ve sabrı ile her zaman yanımda olan tez danışmanım kıymetli hocam Prof.Dr. Fatma SILAN'a, uzmanlık eğitimim süresince araştırmalarımda bana farklı açılarla bakmayı öğreten saygıdeğer hocam Prof.Dr. Öztürk Özdemir'e, desteklerinden dolayı değerli meslektaşlarım Dr. Onur YILDIZ'a, Dr. Barış PAKSOY'a, Dr. Taner KARAKAYA'a, çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım sayın Şengül TÜRÜNZ'e, Didem UYSAL'a, Duygu KANKAYA'a, Hülya HAS'a, Gaye ACAR'a, Zeliha GÜLER'e, Merve ORDU'ya, Ece SILAN'a, yardımlarından dolayı arkadaşım Dr. Atilla GÜRGEN'e, katkılarından dolayı Jae-Hong KO'ya, tezimin finansmanına desteklerinden dolayı Çanakkale Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine, her zaman yanımda oldukları için sevgili eşim, hayatımın renkleri kızlarım ve anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mine URFALI

Haziran, 2017

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: TTU-2015-510

## ÖZET

### KANSERLİ HASTALARDA CELL FREE DNA VE TÜRÖR DOKUSUNDAN TELOMER UZUNLUĞU BAKILMASI

**GİRİŞ VE AMAÇ:** Telomer disfonksiyonunun sayısal, yapısal kromozom instabilitesini(CIN) tetiklediği ve türörogenezisde önemli bir etyolojik parametre olduğu bilinmektedir. Kanser hastalarının periferik dolaşımlarındaki serbest DNA(cfDNA) konsantrasyonunun kanser evre ve prognozuyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Klasik biyopsilerin türör dokusunun belirli kısmı hakkında bilgi verdiğini ancak günümüzde kanserin taşıdığı mutasyon ve davranış özelliklerine göre kendi içinde subgruplara ayrıldığını bilmekteyiz. Bu araştırmadaki amacımız kanser hastalarına ait cfDNA telomere uzunluğu sonuçlarının, periferik kan ve solid türör dokulardaki telomere uzunluğu ile karşılaştırılarak özellikle periferik dolaşımdaki cfDNA' nın kanser erken tanı ve tedavi takibinde türör dokusundan yapılacak genetik çalışmalara alternatif non- invaziv etkin bir yöntem olup olmadığını araştırmaktır.

**YÖNTEM:** Çeşitli kanser hastalarına ait(n:40) türör doku, periferik kan ve plazmaörnekleri ve kanser hastalığı bulunmayan kontrol grubu(n:20) periferik kan ve plazmaörnekleri Q-PCR telomere ölçümü çalışmasına alındı. Herbir örneğin telomer uzunluğu; Telomerin(T) ve Singlecopy gene(S) oranı olan T/S ratio( $T/S=2^{-\Delta Ct}$ ) değeri,formülde Ct değerleri yerine koyularak hesaplandı ve her bir örneğin T/S ratiosu referans DNA ya görenormalize edilerek relative T/S ratio( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) değerleri hesaplandı.

**BULGULAR:** Hasta grubun plazma relatif T/S ratio ortanca değerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlendi( $p<0,001$ ). Hasta grubun kendi içinde tam kan örnekleri relatif T/S ratio ortalamasının plazma örnekleri relatif T/S ratio ortalamasından yaklaşık 4,3 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir( $p<0,001$ ). Tamkan relative T/S ratio ortalamasının, Türör doku relative T/S ratio ortalamasından 2,2 kat daha fazla olduğu gözlenmiş olup( $p:0,001$ ), benzer şekilde; Türör doku relative T/S ratio ortalaması Plazma relative T/S ratio ortalamasından 1,8 kat daha yüksek olarak gözlenmiştir( $p:0,002$ )(tam kan> tm dokusu >cfdna).

**TARTIŞMA VE SONUÇ:** CtDNA T/S rasyonundaki T/S ratioya göre daha kısa saptanması, plazma ctDNA'nın, tümör dokusunun homojen bir moleküler markırı olduğu ve saf tümöre ait hücreler içerdii ve kanser tanı ve takibinde moleküler bir markır olabileceğini göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Cellfree DNA, kanser, real-time pcr, telomer



## SUMMARY

**INTRODUCTION AND AIM:** Telomere dysfunction triggers numerical and structural chromosomal instability (CIN) and initiates tumorigenesis. Concentration of ctDNA in the circulation of cancer patients was found to be correlated with cancer stage and prognosis. Classical biopsies give information about parts of tumor tissue, but today we know that the cancer is divided into subgroups according to the mutation and behavioral characteristics it carries. In this study, we aimed to investigate whether the results of cfDNA are compatible with the results of the tissues and to investigate whether CfDNA is an alternative non-invasive method for diagnosis of cancer and genetic studies to be performed from tumor tissue.

**METHODS:** Tumor tissue, peripheral blood and plasma samples of various cancer patients (n: 40) and peripheral blood and plasma samples of the control group without cancer disease were taken into Q-PCR telomere measurement study. The telomeric DNA length, T/S ratios ( $T/S = 2^{-\Delta Ct}$ ) were calculated by substituting the Ct values in the formula and each sample was normalized to the calibrator DNA using  $T/S \text{ ratio}(2^{-\Delta\Delta Ct})$  formula.

**RESULTS:** The plasma relative T/S ratio median value of the patient group was statistically significantly higher than the control group ( $p < 0,001$ ). In the patient group, the plasma relative T/S ratio was approximately 4.3 times higher than the relative T/S ratio of the whole blood samples ( $p < 0,001$ ). The mean T/S ratio of whole blood was 2.2 times higher than the mean T/S ratio of tumor tissue ( $p: 0,001$ ) and similarly tumor tissue relative T/S ratio averages were 1.8 times higher than plasma T/S ratio averages ( $p: 0,002$ ) (whole blood > tumor tissue > cfDNA).

**DISCUSSION AND CONCLUSION:** In cancer, telomere length is shortened due to the high replication ability of the cells. The shorter detection of CtDNA T/S ratio than the tissue T/S ratio suggests that plasma ctDNA is a homogeneous molecular marker of tumor tissue and contains cells of pure metaplasia and may be a molecular marker in cancer diagnosis and follow-up.

**KEYWORDS:** Cellfree DNA, cancer, real-time PCR, telomere

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET .....	iii
SUMMARY .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
TABLolar.....	x
ŞEKİLLER.....	xi
GRAFİKLER.....	xii
<b>1 GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2 GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1 TELOMER NEDİR.....	3
2.1.1 Telomer Yapısı .....	4
2.1.2 Telomerlerin Fonksiyonu .....	9
2.1.3 Telomer Uç Replikasyon Problemi Ve 3' Overhang Oluşumu .....	17
2.1.4 Telomer Ve Kanser.....	23
2.1.5 Telomerin Kanser Tanı Tedavi Ve Takipteki Rolü.....	26
2.1.6 Telomer Uzunluğu Ölçüm Yöntemleri .....	27
2.2 CELLFREE DNA NEDİR? .....	34
2.2.1 CT DNA Kanser .....	36
2.2.2 CELL FREE DNA Tarihçe.....	37
2.2.3 CTDNA'nın Kanserde Kullanım Amaçları .....	37
2.2.4 CELL-FREE DNA Elde Edilmesi Hakkında.....	41
<b>3 YÖNTEM VE GEREÇLER .....</b>	<b>42</b>
3.1 GEREÇLER .....	42
3.1.1 Etik izin .....	42
3.1.2 Örneklem Seçimi ve Çalışmaya Alım Ölçütleri .....	42
3.1.3 Doku ve Kan Örneklerinin Alınması ve Plazmanın Ayırıştırılması .....	42



3.1.4	Cihazlar .....	43
3.1.5	Sarf malzemeler.....	43
3.1.6	Primerler .....	43
3.2	YÖNTEM.....	44
3.2.1	DNA izolasyonu .....	44
3.2.2	Q-PCR Yöntemi ile Telomer Uzunluğu Ölçümü .....	45
3.3	SONUÇLARIN İSTATİKSEL ANALİZİ.....	48
<b>4</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>49</b>
4.1	DNA İZOLASYON SONUÇLARI .....	49
4.2	KATILIMCILARIN KANTİTATİF TELOMER UZUNLUĞU ÖLÇÜMÜ SONUÇLARI .....	49
4.2.1	Katılımcıların Demografik Özellikleri .....	51
4.2.2	Katılımcıların Klinik Özellikleri.....	52
4.2.3	Hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması.....	53
4.2.4	Hasta grubunun özellikleri .....	54
4.2.5	Hasta grubunun yaş ve klinik değerlerinin korelasyonu .....	55
4.2.6	Hasta grubunun kanser tiplerinin plazma, tam kan ve doku relatif T/S ratio açısından karşılaştırılması .....	57
4.2.7	Hasta Grubun Tam Kan, Doku ve Plazma Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması .....	59
<b>5</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>SONUÇ .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>67</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>.....</b>	<b>79</b>

## KISALTMALAR

(MMQ-PCR)	Monochrome multiplex kantitatif PCR
(Q-PCR),	kantitatif PCR
ALT	Alternatif Telomer Uzatma mekanizması
APBns	ALT-ilişkili promyelositik nükleer cisimleri
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia Rad3 Related
ATRX	$\alpha$ -talasemi/mental retardasyon sendrome X-linked
BFB	Breakage-fusion-bridge
BLM	Bloom Sendrom RecQ helikaz like
BRG1(SMARCA4)	Brahma related gene1, SWI/SNF-ilişkili remodelling protein
CDK	Cyclin Dependent Kinaz
cfDNA	Cell free DNA
CHK2	Checkpoint kinaz 2
CST	CTC-STEN1-TEN1
Ct	Döngü Eşiği
CTC	Dolaşımdaki tümör hücreleri
ctDNA	circulating tumor DNA
DAXX	Apoptozis ilişkili protein,death domain associated protein
DDR	DNA hasar cevabı
DNA-PKcs	DNA bağımlı protein kinaz katalitik subunit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EXO1	ekzonükleaz 1
h-TERC,HTERC	insan telomeraz RNA komponenti
h-TERT,HTERT	İnsan telomeraz revers transkriptazı
HP1	heterokromatinprotein1
HPA	Hibridizasyon Protection Assay
İPF	İdiyopatik pulmoner fibrozis
Ku70-Ku80	Ku antijen 70 ve 80-kd subunit, XRCC6-XRCC5

MDC1	Checkpoint 1 mediatörü
MRN	MRE11/RAD50/NBS1 kompleksi
NBS1	Nibrin
NER	nükleotid eksizyon tamir mekanizması
NHEJ	Homolog Olmayan uç uca birleştirme, Non Homolog End Joining
NOLA	Nükleolar protein A ailesi
PCNA	Hücre proliferasyon nükleer antijen, Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polimeraz Zincir reaksiyonu
PNA	peptid nükleik asit
POT1	Protection of telomeres 1
Q-FISH	Kantitatif Floresan İn-Stu Hibridizasyon
RAD51	recombination protein A, recA
RAP1	Represör aktivatör protein 1
RFC1-5	replikasyon faktör C 1-5
RMPR	Mitokondrial RNA yapan Endoribonukleaz RNA komponenti
RNP	Ribonükleoprotein
RTEL1	telomer uzunluğunu regüle edici helikaz 1
SCID	Ağır kombine immün yetmezlik
SLX4;	structure specific endonuclease subunit homolog 4
STELA	Single Telomere Length Analysis
T-SCE	Telomer kardeş kromatidler arası değişim
TCAB1(WRAP53)	telomeraz cajal body protein1, wd repeat-containing protein antisense to tp53
TERRA	Long Non-coding Telomeric Repeat RNA
TIN2	TRF interacting nuclear faktor
TP53BP1	P53 bağlayıcı protein 1
TPP1	POT1 ile etkileşen protein
TRF	terminal restrüksiyon fragmentleri
TRF1, TERF1	Telomerik tekrar bağlayıcı faktör 1
TRF2, TERF2	Telomerik tekrar bağlayıcı faktör 2
WRN	Werner Sendrom RecQ helikaz like
XRCC	X-ray çapraz tamamlama onarımı, X-ray repair cross-complementing

## TABLULAR

Tablo 1. Farklı Organizmalara Ait Telomerik ve RNA Primer Dizileri(27) .....	5
Tablo 2. PCR Çalışması Hazırlığı .....	46
Tablo 3. Telomer Kantitasyon Protokolü .....	46
Tablo 4. Betaglobulin Kantitasyon Protokolü .....	46
Tablo 5. Katılımcıların Sayı ve Cinsiyet Dağılımları .....	52
Tablo 6. Katılımcıların Yaş Dağılımları .....	52
Tablo 7. Katılımcıların Tam Kan ve Plazma Relatif T/S Ratio Değerleri .....	52
Tablo 8. Hastaların Cinsiyetlere Göre Dağılımı .....	53
Tablo 9. Hasta ve Kontrol Grubun Yaş Dağılımları .....	53
Tablo 10. Hasta ve Kontrol Grubun Plazma Telomer Uzunlukları Karşılaştırması .....	54
Tablo 11. Hasta ve Kontrol Grubun Tam Kan Telomer Uzunlukları Karşılaştırması .....	54
Tablo 12. Hasta Grubun Kanser Tipine Göre Dağılımı .....	55
Tablo 13. Hasta Grubun Relatif T/S Ratio Değerleri .....	55
Tablo 14. Hasta Grubun Plazma, Tam Kan ve Doku Relatif T/S Ratio Değerlerinin Yaşa Göre Korelasyonu .....	56
Tablo 15. Kanser Tipine Göre Plazma Örneklerinin Telomer Uzunlukları Karşılaştırması .....	57
Tablo 16. Kanser Tipine Göre Tam Kan Örneklerinin Telomer Uzunlukları Karşılaştırması .....	58
Tablo 17. Kanser Tipine Göre Dokuların Telomer Uzunlukları Karşılaştırması .....	59
Tablo 18. Hastaların Plazma Tam Kan ve Tümör Doku Telomer Uzunlukları .....	59
Tablo 19. Hastaların Plazma Tam Kan ve Tümör Doku Telomer Uzunlukları Karşılaştırması .....	60
Tablo 20. Hastaların Plazma-Tam Kan-Doku Telomer Uzunluklarının İkili Karşılaştırılması .....	60

## ŞEKİLLER

Şekil 1. Telomerik DNA ve Telomer ilişkili bölgelerin büyüklüklerinin şematik gösterimi....	4
Şekil 2. Telomerik proteinler ve T-loop yapısı .....	6
Şekil 3.RAP1 proteininin telomerik ve ekstralomerik fonksiyonları.....	12
Şekil 4. Hücre yaşlanması ve telomer uzunluğu ilişkisi.....	15
Şekil 5. Telomer ve Telomeraz Enzim Kompleksi .....	16
Şekil 6. Telomeraz holoenzim subunitleri .....	18
Şekil 7. Telomeraz ve replikasyon sonu problemi.....	19
Şekil 8. Telomeraz subunit TERTin fonksiyonları .....	20
Şekil 9. ALT oluşum mekanizması.....	22
Şekil 10. Telomer disfonksiyonunun p53 ve RB yollarını aktive etmesi .....	25
Şekil 11. DNA ölçümünde farklı tekniklerin karşılaştırılması .....	28
Şekil 12. Sybr green dye floresan yayma prensibi .....	33
Şekil 13. PCR kantitasyon yöntemlerinin şematik gösterimi .....	34
Şekil 14. CfDNA nın aktif ve pasif olarak kana salınımı .....	36
Şekil 15. CtDNA analizlerinin kanser tedavi ve takibinde kullanımı .....	41
Şekil 16. Telomerik Tekrar Ürünlerinin Amplifikasyon Eğrileri .....	49
Şekil 17. Betaglobulin Gen Ürünlerinin Amplifikasyon Eğrileri .....	50
Şekil 18. Telomer Çalışması Erime Eğrisi Analiz Görüntüsü .....	50
Şekil 19. Betaglobulin Çalışması Erime Eğrisi Analiz Görüntüsü.....	51
Şekil 20. Telomer Çalışmasına Ait Standart Eğri Görüntüsü .....	51
Şekil 21. Betaglobulin Çalışmasına Ait Standart Eğri Görüntüsü.....	51

## GRAFİKLER

Grafik 1. Hastalara ait Tam Kan Telomer uzunluklarının Yaşa Göre Dağılımı.....56



## 1 GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya’da yeni tanı alan kanserli hasta sayısı ve kanserden kaynaklanan ölümler giderek artmaktadır. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2012 verilerine göre Dünya’da 2012 yılında;14,1 milyon yeni kanser vakası görülmüş, 8,2 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiş ve 32,8 milyon yaşayan kanser vakası olduğu bildirilmiştir(1).

Kanser artış hızının bu şekilde devam etmesi durumunda, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2030 yılında toplam 22 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir(2). Kanser artışındaki bu hız, hücresel düzeyde yaklaşım ve etkin tedavi arayışlarını doğurmuştur. Kanser tedavisi için günümüzde en önemli problem tedaviye direnç gelişmesidir. Aynı kanser türünün kişiden kişiye farklılıklar taşıması, her hastanın tedaviye cevabının farklı olması kanserin içinde barındırdığı moleküler farklılık ve dinamik patogeneze bağlı olarak tedaviyle evrimleşme sürecine girip, karşımıza daha güçlü çıkmasıyla açıklanabilir. Yakın gelecekte kanser tedavisinde kişiye özel tanı ve takip protokolleri geliştirilecektir. Yaygın görüşe göre kansere ve metastaza neden olan genetik faktörlerin ortaya konması ve sonrasında genetik değişimlere yönelik geliştirilen tedavilerin uygulanmasının standart protokollerden üstün olduğu düşünülmektedir(3–5).

Telomerler, ökaryotik hücre kromozomlarının uçlarında bulunan, guaninden den zengin tekrarlayan DNA sekanslarından oluşan, genomik stabilite ve replikatif potansiyelden sorumlu nukleoprotein kompleks yapılarıdır. Ayrıca, replikasyon sırasında internal DNA’ nın hasar görmesini engeller. Hücresel hasar veya yaşlanma için, telomer uzunluğunun bir biomarker olarak gösterilmesiyle ilgili çalışmalar artmaktadır(6). Kompansatuar mekanizmaların yokluğunda; her hücre siklusunda end replikasyon problemine bağlı olarak telomerik DNA sekansı progresif olarak kısalır, telomerler kritik kısalığa ulaştınca hücre replikatif senesense girer. Ancak hücrenin taşıdığı mutasyon yüküne

bağlı olarak bölünmeye devam ederse telomer disfonksiyonu ve telomerazın active olmasıyla prokanser hücreler oluşur ve kanserin en önemli özelliği olan sınırsız bölünme yeteneğikazanılmış olur(7). Birçok çalışmada tumor doku ve periferik tam kan telomer uzunluğunun prognoz ve kanser riskiyle ilişkisi saptanmıştır(8). Bertorelle R ve ark. kolorektal kanserli hastalarda yaptığı çalışmada telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesinin kanser gelişimi ve prognozunda etkili olduğunu belirtmişlerdir(9). Yoon HJ ve ark. telomer uzunluğunu gastrik kanserli dokularda, normal mukoza dokularına göre belirgin bir şekilde azalmış bulmuşlardır(10). Yine Duggan ve ark. meme kanserinde telomer uzunluğu ve 5 yıllık mortalite ile bir ilişki saptamazken telomer kısalığının kötü prognozla ilişkisini ortaya koymuşlardır(11).

Cell Free DNA (cfDNA), apoptozis, nekroz ve aktif sekresyon sonucu oluşan dolaşımdaki küçük nükleik asit partikülleridir(12). Dolaşımdaki cfDNA normal şartlarda plazmada düşük konsantrasyonlarda bulunur. CfDNA konsantrasyonunun 1-10 ng/ml<sup>-1</sup> geçmediği bildirilmiştir(13). Gebelik, kanser ve bazı hastalıklarda plazma konsantrasyonu belirgin şekilde artar(14). Bu sebeple; prenatal test, kanser tanı ve izleminde cfDNA'nın önemi gittikçe artmaktadır. CA 19-9, CA 15-3, CEA, PSA gibi kanser nüks ve prognoz izleminde kullanılan tümör markerları, düşük sensivite ve spesifiteye rağmen uzun yıllardır klinik değerlendirmede yer almıştır(15). Bu durum daha spesifik biomarker arayışını gerekli kılmıştır. Birçok çalışma sonucunda ortaya çıkan veriler cfDNA'nın erken tanı, prognostik faktör, tedavi seçimi ve izleminde alternatif biomarker olarak kullanılabileceğini desteklemektedir(16). Dolayısıyla cfDNA' nın biyopsi materyalleri ve tümör dokusundan çalışılan spesifik mutasyonların, metilasyon analizlerinin, mikrosatellit farklılıklarınıninkandan çalışılması olanağını sağlamaktadır(14).

Çalışmamızda kanser hastaları periferik kandan elde edilecek cfDNA' dan telomer analizi yapılacaktır. Bu araştırmadaki amacımız cfDNA telomere uzunluğu sonuçlarının, periferik kan ve solid tümör dokulardaki telomere uzunluğu ile karşılaştırılarak özellikle periferik dolaşımdaki cfDNA' nın kanser erken tanı ve tedavi takibinde tümör dokusundan yapılacak genetik çalışmalara alternatif non- invaziv etkin bir yöntem olup olmadığını araştırmaktır.



## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Telomer Nedir

Telomerler; ökaryotlarda lineer kromozomların uçlarında bulunan ve genleri nükleazlara karşı koruyan özel heterokromatin DNA-protein kompleks yapılarıdır(17). Telomer kelimesi yunancada “telos” (son) ve “mere” (kısım) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur.

İlk defa 1938 de Muller tarafından tanımlanmıştır. Araştırmalarında X radyasyonuna maruz kalan hücre kromozomlarında, terminal bölge delesyon ve inversiyonlarının daha az görüldüğünü, kırık uçlu kromozomların diğer kromozomlarla birleşme eğiliminde olduğunu, ancak kırık olmayan kromozom uçlarının ise birbirleriyle veya diğer kromozomların kırıklarıyla birleşmediğini ve daha kararlı yapıda olduğunu saptamıştır(18). Bundan 3 yıl sonra McClintock (1941) kromozom uçlarında; kromozomların bütünlüğünü sağlayan özel yapıların olduğunu ve bu yapıların kromozom uçlarını çift dal kırıklarına karşı koruduğunu bildirmiştir(19). İlk defa 1973 te Olovnikov her replikasyondan sonra kromozom uçlarından DNA kaybını tanımlamış olup bunun hücre yaşlanmasında rol alabileceğini belirtmiştir. 2009’da da Elizabeth Blackburn ve Carol Greider telomerlerin kromozom uçlarını nasıl koruduğu ve telomeraz enzimiyle nasıl yapılandırıldığını açıklamalarıyla Nobel ödülünü almışlardır(20).

Telomerler; kromozom stabilitesinde, kromozom uçlarının replikasyonlarının tamamlanmasında, telomeraz ile yeniden yapılandırılmasında, DNA hasar cevabının susturulmasında ve gen ekspresyonunda görev almaktadır(21). Yine kromozom terminalerinin füzyon, yıkım ve rekombinasyonunu önleyip, 3’ overhangin eksonükleaz ve ligazlara karşı dayanıklılığı sağlar(22).

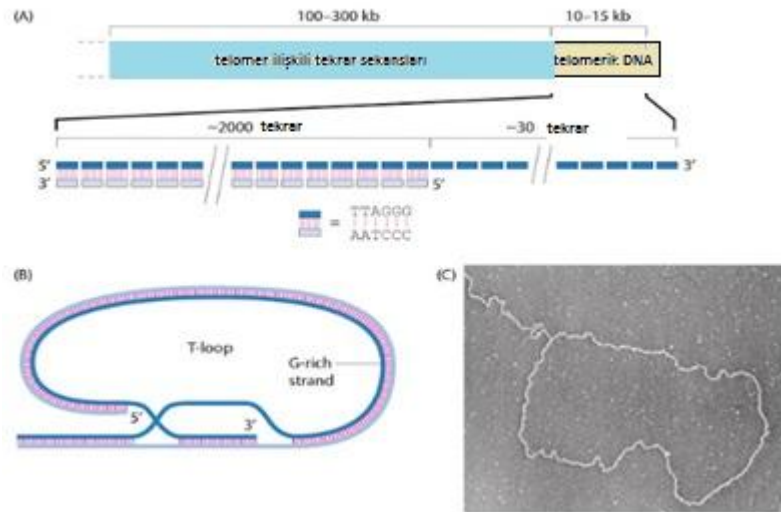
Telomer; interfaz çekirdeğine ait üç boyutlu yapının oluşturulmasında önemli olup yokluğunda disentrik, halkalı vs. gibi dayanıksız kromozom yapıları oluşabilir(23,24). Telomerlerin fonksiyon kaybında, DNA hasar cevabının(DNA

Damage Response-DDR) tetiklenmesine bağlı DNA uçlarının rastgele tamir edilmesi genomik instabilite ve hücresel fonksiyonlarda bozulmaya yol açar(20,21).

### 2.1.1 Telomer Yapısı

İnsan telomerik TTAGGG tekrarlarının sentromerik tarafında 100-300kb uzunluğunda telomer ile ilişkili tekrar bölgeleri(telomere-associated repeat sequences) yer almaktadır. Bu bölgeler evrim sırasında korunmamakla birlikte fonksiyonları henüz tam olarak belirlenememiştir(17).

Telomerik nükleozomlar da diğer nükleozomlar gibi H2A, H2B, H3, H4 ve H1 histonlarını içermektedir. Telomerin subtelomerik bölgelerinin heterokromatin yapısı; içerdiği HP1(heterokromatinprotein1) ve heterokromatin tipte histon proteinleri (histone 3 trimethylated at lysine 9 (H3K9) ve H4K20) ile paketlenmesinden kaynaklanmaktadır(25). Bu bölgelerin epigenetik durumları telomer uzunluğunu regüle eder. Ayrıca heterokromatin bölgelerin kaybı da aşırı uzun telomere neden olmaktadır(26). Telomer yapısı; telomerik DNA ve telomerik proteinler olarak incelenebilir.



Şekil 1. Telomerik DNA ve Telomer ilişkili bölgelerin büyüklüklerinin şematik gösterimi B) T-loop yapısı C)T-loop yapısı elektron mikroskop görüntüsü(17)

### 2.1.1.1 Telomerik DNA

Telomerik DNA sekansları; short tandem tekrarların uzun diziler boyunca yerleşmesiyle oluşur. Sentromerik DNA'ya göre evrim sırasında korunmuş olup, tüm vertebralılarda tekrarlayan hexanükleotid "TTAGGG" yapıları yer alır. Fakat türler arasında tekrar sayısı farklılıkları olabilir. Örneğin tekrar sayısı insanda 10-15kb iken farede 100kb'dır(17). Bazı canlı türlerine ait telomerik DNA sekansları tabloda belirtilmiştir.

**Tablo 1. Farklı Organizmalara Ait Telomerik ve RNA Primer Dizileri(27)**

Organizma	Telomerik Diziler	RNA Primer Dizileri	RN
Tetrahymena	TTGGGG	CAACCCCAA	
<i>Euploies</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAACC	
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAACC	
Human	TTAGGG	CUAACCCUAAC	
Mouse	TTAGGG	CCUAACCCU	
<i>S. cerevisiae</i>	TG(1-3)	CACCACCCACACAC	
<i>K. lacis</i>	TTTGATTAGGTATGT- GGTGTCCGA	UCAAUUUCCGUACACC- AAUACCUAAUCAA	

(TTAGGG)<sub>n</sub> dizileri insan telomerinde 10-15kb büyüklüğündedir ve total DNA'nın yaklaşık %0,003 ünü oluşturmaktadır(18).

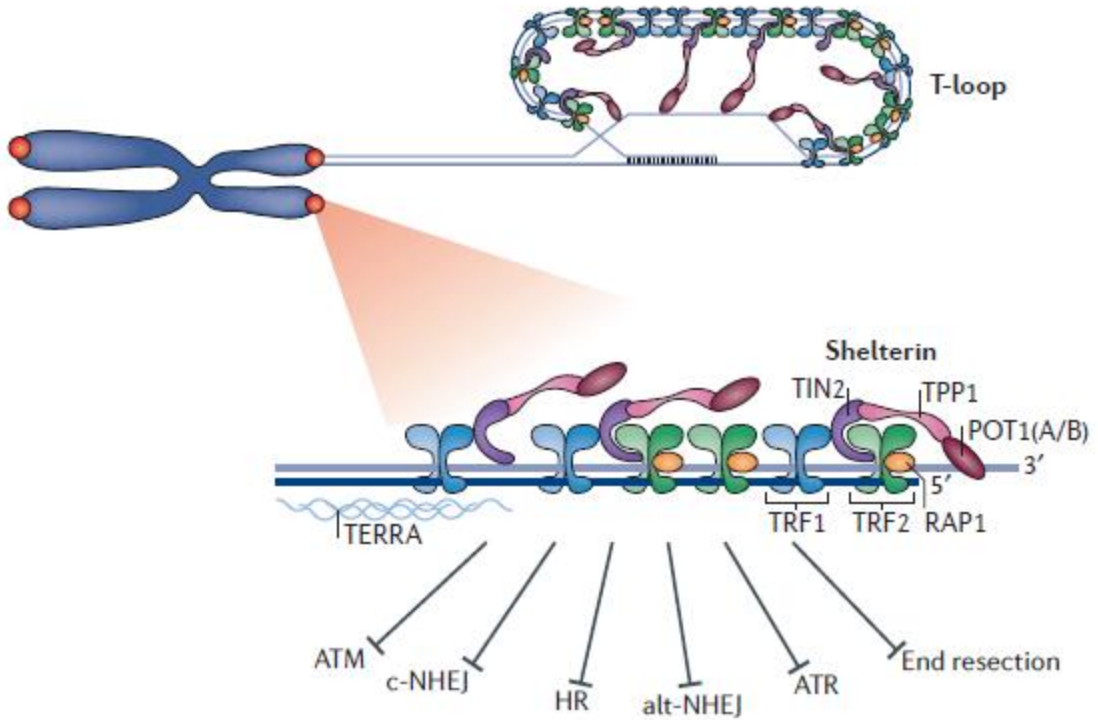
Telomerik tekrarlar DNA sarmalının bir ipliğinde G açısından zengin(G-rich strand) karşı ipliğinde ise C açısından zengindir(C-rich strand). Telomer uçlarında G-rich iplikler 3' ucunda 150-200 nükleotid daha uzundur. Bu seviyede telomer bağlayıcı proteinler kendi üzerine katlanarak T-ilmek(T-loop) yapısını oluşturur. G-rich tek iplik geriye dönüp çift iplikli telomer dizisinde C-rich dala birleşerek ikinci bir ilmek yapısı olan D-ilmek(Displacement-loop) formasyonunu oluşturur(27). T-loop formasyonu kromozom uçlarını koruyan, genomun stabilitesinden sorumlu özel yapılardır. Eğer kromozom telomerini kaybederse; diğer kırık kromozomlarla birleşir, yeni bir rekombinasyona katılır veya degrade olur(17).

### 2.1.1.2 Telomerik Proteinler

Telomerik DNA'yı tanıyıp, ona bağlanan ve birçok komponenti olan protein komplekse telozom(veya shelterin) adı verilir. Altı subuniti olan bu

protein kompleksi telomerleri anormal DDR ye karşı korur. Telomerik tekrar bağlayıcı faktör 1(telomere repeat binding faktor 1-TRF1 veya TERF1) ve Telomerik tekrar bağlayıcı faktör 2(telomere repeat binding faktor 2-TRF2 ve TERF2) çift ipliğe, TIN2(TRF interacting nuclear faktor) ise TRF1 ve TRF2 arasında yer alıp bir ucuyla tek ipliğe bağlanan POT1-TPP1(Protection of telomeres 1-POT1 ile etkileşen protein) heterodimerine bağlanır. Represör aktivatör protein 1 (RAP1) ise telomerlere TRF2 aracılığı ile bağlanır(28). Tek ve çift iplik proteinlerinin katlanma motiflerinden kaynaklanan yapıları nedeniyle, DNA ya bağlanma spesifiteleri farklıdır. Myb-like/homeodomain motif içerenler çift iplik DNA'ya sensitif iken OB-fold motif yapısındakiler tek ipliğe sensitiftirler(29).

Bu komponentte çift iplik TTAGGG tekrarlarına bağlanan TRF1, TRF2 ve TIN2 proteinleri telomerazın bağlanmasını engelledikleri için telomerin negatif düzenleyicileri olarak da adlandırılırlar. Telomer bağlayıcı proteinlerden POT1 ve TPP1 ise tek iplik TTAGGG tekrarlarına bağlanarak terminal DNA yı korur. POT1 ve TPP1 de telomerin pozitif düzenleyicileri olarak adlandırılır(17).



**Şekil 2. Telomerik proteinler ve T-loop yapısı(28)**

Bu proteinlerin telomer için iki önemli fonksiyonu vardır; telomer hemostazı ve telomerik DNA uçlarının korunması. Ancak son zamanlarda bu proteinlerin telomeraz ve DNA tamir yollarıyla ilişkileri üzerine odaklanılmıştır. Vertebrata evriminde tek bir genin duplikasyonu sonucu TRF1 ve TRF2 nin oluştuğu ve zamanla özelleşip yeni ve farklı biyokimyasal özellikler kazandıkları öngörülmektedir(29). Temel olarak TRF1 proteini telomer uzunluğu hemostazıyla ilişkiliyken, TRF2 proteini 3'terminal DNA'nın ayrılması ve uygunsuz DNA hasar cevabını önleme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir(30). TRF1 ve TRF2 proteinlerinin hareketli ve dimerik Myb-like üniteye sahip olmaları vertebralılarda telomerik loopun oluşmasını sağlar(31). Ayrıca, insan telomer proteini POT1 DNA yapılarının gevşemesini ve TPP1 ile birlikte telomeraz enziminin primer uzamasını aktive eder(32).

TRF1 proteini telomerlerdeki replikasyonu asiste eden en önemli shelterin proteindir. TRF1, Bloom Sendromu RecQ helikaz(BLM; Bloom Sendromu RecQ helikaz like) ve telomer uzunluğunu regüle edici helikazlarının(RTEL1) sekonder yapılarını açarak replikasyonu düzgün gerçekleştirmelerini sağlar. Farelerde TRF1 delesyonu fragil telomerlerin veya telomerlere yakın fragil bölgelerin oluşumunu artırır. Bu da telomer replikasyonunda defektlere yol açar(21).

Önceki çalışmalarda fare germ hücrelerinde, mayoz spesifik telomer kompleks'in (shelterin protein kompleks yerine geçer), telomerlerin nükleer membrana tutunmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir(28,33).

Hücre siklusunun S fazında TRF2 direkt olarak telomer RTEL1' e bağlanarak T-loop ilmeğinin açılmasını ve replikasyon çatallının ilerlemesi sağlar. TRF2 azalması veya fonksiyon kaybında T-loop açılmaz ise loop ilmeği eksizye edilerek(persistent T-loop excision) replikasyonun ilerlemesi sağlanır. Bu yol telomer halkalarının(T-circles) oluşmasını ve hızlı telomer kısalmasını sağlar. Bu yol yapı spesifik endonükleaz homolog subunit 4(SLX4; structure specific endonuclease subunit homolog 4) tarafından yönetilir. İnsan SLX4 ünde TRF2

nin bağlandığı b6lgelerin bulunması TRF2 nin telomer hemostazında uzun telomerler için bu yolağı kullandığını d6ř6nd6rmektedir(34,35).

Yine TRF2 proteini T-loopu Xray apraz tamamlama onarımı(XRCC3, X-ray repair cross-complementing 3) ve Nibrin(NBS1) aracılı eksizyondan korur. Telomerin XRCC3 ile kırılması 6zellikle erkek germ h6crelerinde olmak 6zere uzun telomere sahip normal h6crelerde g6r6l6r(36).

Shelterin kompleksi fonksiyonları bozulduğunda, telomer uçlarının korunamamasına bağlı olarak, DDR yolaklarının aktive olur ve buna bağlı apoptozis, senensens veya bazı h6crelerde genomik instabilite meydana gelir. Telomer uzunluğu kritik kısıalığa ulaşan h6crelerde Shelterin proteinleri fonksiyonlarını kaybeder(28).

### **2.1.1.3 Diğer Telomerik Yapılar**

Artık telomerlerdeki DNA-protein kompleksinde fonksiyonel RNA yapılarının da varlığı kabul edilmektedir. RNA polimeraz II tarafından sentezlenen ve telomer etrafını saran, telomerik kromatin olarak da adlandırılan bu transkript yapılara Long Non-coding Telomeric Repeat RNA(TERRA) denilmektedir(37). TERRA nın downreg6le olmasının; telomeraz aktivitesini arttırarak kanser oluşumunda rol oynadığı d6ř6n6lmektedir(38).

Ayrıca TERRA yapıları telomerik kromatin yapının en 6nemli d6zenleyicilerinden biridir. SUV39H1'e bağlanarak trimetil histon(H3K9) seviyesini arttırarak heterokromatin yapının yoğunlaşmasını sağlar. TERRA seviyesi azalırsa telomerlerin korunması bozulur ve f6zyonlar meydana gelir(34).

Telomerik tekrarlar replikasyon çatalı ilerlemesini yavaşlatan, stabil kuadroplex(G4) DNA yapıları şeklinedirler.

Telomer proteom kompleksinde telomer proteinleri dışında; DNA hasar fakt6rleri(Ku ve MRN(MRE11/RAD50/NBS1 kompleksi)), n6kleazlar(SLX4,

Apollo), helikazlar(Bloom Sendrom RecQ helikaz like(BLM)ve Werner Sendrom RecQ helikaz like(WRN)) ve kromotin modifiye ediciler( $\alpha$ -talasemi/mental retardasyon sendrome X-linked(ATRX)) yer almaktadır(28).

### **2.1.2 Telomerlerin Fonksiyonu**

Telomerlerin fonksiyonları temel olarak; kanser gelişimini önlemek ve replikatif senesestir. Telomerlerin fonksiyonları; hücrelerin taşıdığı mutasyonlara, hücre tipine göre telomeraz ekspresyonuna ve DNA tamir yollarındaki defektlere bağlı olarak bu iki nokta arasında değişir(39).Telomer disfonksiyonu yaşlanma ve genomik instabiliteye bağlı malign hücre transformasyonu ile sonuçlanır(40).

İnsan kromozom uçlarında bulunan TTAGGG tekrarları shelterin adı verilen 6 özel proteine bağlanarak kromozomları çift dal kırıklarına karşı korur ve telomeraz aktivitesini regüle eder(40). Kromozom telomerlerinin aşırı kısalması; telomerik proteinlerin de azalmasına bağlı olarak, DNA hasar cevap mekanizmasını uyarır ve bu uçların çift dal kırıkları olarak algılanmasını sağlar(34). Telomere bağlanan proteinler normal miktardayken; kromozomların uçlarını kapatarak, DNA tamir mekanizmalarının buraları kırık olarak tanımlayıp tetiklenmesini önlerler. Bu kırıklar telomerik DNA sekans dizisinin karışmasına(telomerik ve subtelomerik bölgelerin rekombinasyona katılmasına bağlı) ve telomerik proteinlerin tükenmesine bağlı olarak, telomerlerin temel yapısının değişmesine ve telomer hemostazını bozulmasına sebep olur(39).

#### **2.1.2.1 DNA Hasar Cevabının(DDR) Durdurulması**

T-loop formasyonu; telomerleri DDR ve telomer füzyonlarından korur. Ancak hücre bölünmesi sırasında T-loop yapılarının açılması, replikasyon sırasında telomerleri koruyan farklı mekanizmaların da olduğunu desteklemektedir(34).

Hücreler, DNA tek veya çift iplik kırıklarını iki sinyal yolağıyla tespit ederler; Ataksi Telenjektazi Mutant(ATM;Ataxia Telangiectasia Mutated) ve Ataksi Telenjektazi Rad3 ilişkili(ATR;Ataxia Telangiectasia Rad3 Related) kinaz

bağımlı yolaklar. Bu yolaklar uyarıldığında hücre siklusu durdurulur. Eğer mümkünse hasar onarılır ancak onarılamaz ise hücre yaşlanma veya apoptozise girer(28).

DDR sinyal yolağını başlatan ATM, telomerler tarafından TRF2 aracılığı ile baskılanır. TRF2 inhibisyonu ise ATM yolağını aktive eder. TRF'nin ATM bağımlı yolakları nasıl inhibe ettiği tamamı ile anlaşılammış olup kompleks bir mekanizmadır. TRF 2 hücre bölünmesinin S fazında, ATM sinyalizasyon kaskadını direkt olarak bir kinaz enzimi gibi inhibe edip, telomerlerin korunmasını gerçekleştirir. Telomer disfonksiyonunun en önemli göstergesi olan kromozom uç uca birleşmeleri sonucu oluşan disentrik kromozomlar hücre döngüsünde anafaz köprü oluşmasını ve kromozom instabilitesini tetikler. TRF 2 proteininin azalması kromozom uçlarını klasik homolog olmayan uç uca birleştirme(cNHEJ) için bir substrat haline getirir(28,40,41).

Aynı şekilde ATRnin telomerler üzerindeki aktivitesi POT1 tarafından bloke edilir. POT1 in tek iplik DNA ya olan afinitesinin, ATR sinyal yolağı aktivasyonu için gerekli replikasyon protein A(RPA) dan daha yüksek olması bu yolağı suprese eder. Yeterli POT 1 varlığında RPA telomerlere bağlanamaz(28).

#### **2.1.2.2 DNA Hasar Onarım Yolaklarının Durdurulması**

Ökaryotik hücreler DNA çift sarmal kırıklarını iki yolak üzerinden onarır.

-Homolog Rekombinasyon (HR)

-Homolog Olmayan uç uca birleştirme(NHEJ, Non Homolog End Joining); bu yol hataya eğilimli bir onarım biçimidir ve iki tipi vardır:

- Klasik NHEJ(cNHEJ)
- Alternatif NHEJ(alt-NHEJ)

Homolog rekombinasyon, hücre döngüsü G2/S fazında salınımı artan rekombinasyon protein A(Rad51,recombination protein A) tarafından başlatılır. NHEJ'de ise DNA bağımlı protein kinaz katalitik subunit (DNA-PKcs), Ku antijen 70 ve 80-kd subunit(Ku70-Ku80) ve XRCC4 rol oynar(39).



Tüm kromozomların uçlarında kilobazlarca tekrarlayan DNA yapılarının olması telomerleri homolog rekombinasyon için eşsiz substratlar yapar. Ancak kardeş kromatidler arası(T-SCE) veya diğer kromozomlarla oluşan bu rekombinasyon telomer uzunluğu hemostazını bozar ve kromozom füzyonlarına neden olur. Shelterin componentleri(TRF2 ve RAP1) ve Ku70-Ku80 kompleksi telomerleri homolog rekombinasyondan korur(34).

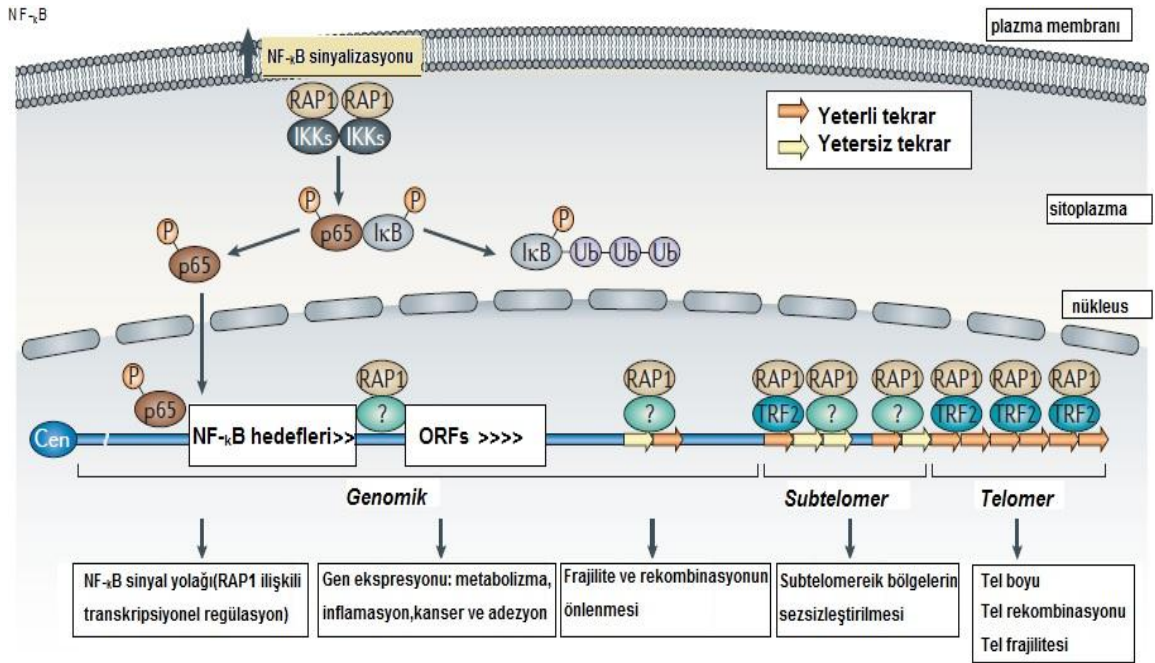
CNHEJ yolağında Ku70-Ku80 kompleksi kilit öneme sahip olup depleasyonu, telomerik tekrarların hızlı bir şekilde kaybı ile sonuçlanır. TRF2, Ku70-Ku80 heterotetramizasyonunu önleyerek cNHEJ yolağının aktifleşmesini bloke eder(34). Memeli hücrelerinin mitoz sırasında cNHEJ yolaklarının tamamen kapalı olmasının nedeni henüz bilinmemektedir(28).

Alt-NHEJ'in tümörögenезisin erken evrelerinde disfonksiyonel telomer oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Nitekim kanser hücrelerinde, telomer birleşme noktaları incelendiğinde, mikrohomolojilerin sıklığı ve büyük delesyonların varlığı Alt-NHEJ'in sorumlu olduğunu göstermektedir. Hücre bölünmesinin G2/S fazında ATM ve ATR sinyal yolaklarının tümünün aktifleşmesi, shelterin kompleksinin kaybı ile gerçekleşmektedir. Nitekim TRF2 ve TPP 1 in co-depleasyonu durumunda, Alt-NHEJ aktivitesinin tetiklendiği gösterilmiştir(28,34).

DNA tamir mekanizmasının bozulduğu Werner sendromu ve DNA hasar cevabının bozulduğu Ataksi Telenjiektazi gibi prematür yaşlanma sendromlarında telomer uzunluğu hızla kısalır ve hücreler senesense girerler. AT ve WS hastalarında uç uca birleşmeler sık görülür. Werner sendromunda kısalan telomerlere bağlı olarak, mozaik değişken translokasyonlar karakteristiktir(39). Bu da telomer kısalmasının direk olarak yaşlanma ile ilişkisini desteklemektedir.

Shelterin komponenti olan RAP1 subtelomerik bölgelerdeki genlerin transkripsiyonel regülasyonu veya susturulması ile ilişkilidir. Aynı zamanda

nükleer faktör- $\kappa$ B aracılı yolda modulator olarak görev yapmaktadır(40). Rap1 proteini sadece telomere bağlanmayıp (TTAGGG)<sub>2</sub> tekrarlarının bulunduğu non-telomerik bölgelerde de bulunur. 2,11 ve 17. kromozomların non-koding bölgelerinde bulunan TTAGGG tekrarlarına bağlandığı gösterilmiş olup, bu bölgelerin frajilite ve rekombinasyonunu önlemede görevli olduğu düşünülmektedir(42).



**Şekil 3.RAP1 proteininin telomerik ve ekstralomerik fonksiyonları(40)**

Ağır kombine immün yetmezlikte(SCID) DNA bağımlı protein kinaz(DNA-PK) enziminde eksiklik mevcuttur. Kombine SCID fare hücre kültürlerinde telomerler uzunluklarının normalden çok uzun(10 kat) saptanmasının, DNA-bağımlı protein kinaz(DNA-PK) enziminin katalitik alt ünitesine ait(DNA-PKcs) mutasyona bağlı geliştiği düşünülmüştür. Ve katalitik alt ünitenin direk veya indirek telomer uzunluğu regülasyonunda yer aldığı düşünülmektedir(41).

Telomerlerin kısalması; subtelomerik bölgelerde H3K9 trimetilasyonunu, H3, H4 asetilasyonunu artırıp, DNA metilasyonunu azaltarak, defektif bir heterokromatin yapısına neden olur(25). Bununla birlikte telomer kısalmasına bağlı subtelomerik bölgelerin hipometilasyonu heterokromatin yapıların kaybına,

buda telomerik DNAlar arasındaki rekombinasyonda(Telomerlerin Alternatif Uzatılması;ALT gibi.) artışa neden olduğu saptanmıştır(43). Bu telomerlerin subtelomerik bölger için düzenleyici olduğunu göstermektedir.

Memeli telomerleri primidinden zengin yapılarından dolayı UV radyasyona daha sensitiftir. UV irritasyonu sonrası oluşan siklobutan primidin dimerleri nükleotid eksizyon tamir mekanizması(NER) ile tamir edilir. TRF1 ve TRF2 shelterin komponentleri, NER mekanizmasını baskılayarak, telomer boyunu regüle eder(40). Bu da telomerlerin tümör süpresör özelliklerini desteklemektedir.

Mayoz 1 profazı leptoten evresinde kromozom telomerleri bir araya gelerek kromozom uçlarının nukleus zarına tutunup belirli bir pozisyonda kalmasını sağlar(44).

Telomerlerin farklı hücrelerde; telomeraz ekspresyonuna, genetik mutasyonların seviyesine ve DNA tamir mekanizmalarının hasarına bağlı olarak replikatif yaşlanmayı uyarması ve kanser gelişimini desteklemesi gibi değişen rolleri de bulunmaktadır(39).

### **2.1.2.3 Hücre Yaşlanması Ve Telomer**

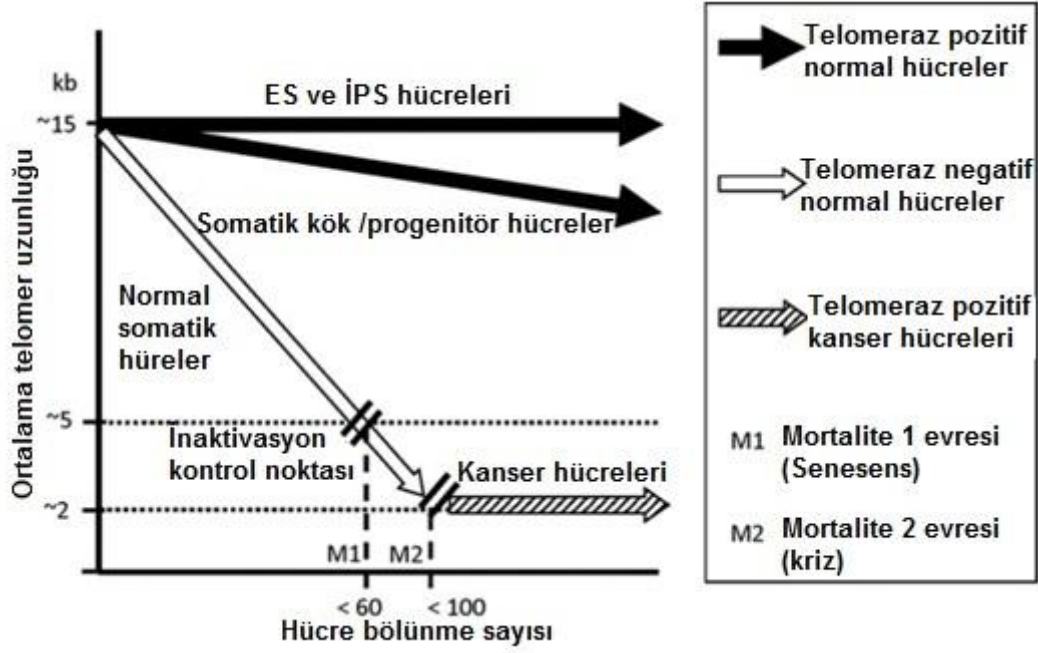
Kromozom uçlarındaki bu özel yapıları oluşturan telomerik DNA'nın her hücre siklusunda kayba uğrayarak yeniden sentez edilebilmesine 'Telomer Dinamiği' denmektedir(45). Her hücre bölünmesi sırasında telomer uzunluğunda, DNA polimerazın uzama için 3'OH gruna gerek duymasından kaynaklan 50-100bp bir kısalma meydana gelir. İnsan somatik hücrelerinde telomer dinamiği negatif olup her hücre siklusunda sentez edilen telomerik DNA, kaybedilenden azdır(45). Telomeraz her bölünmede telomerleri yeniden yapılandıran özel RNA ve enzim sistemidir.

1973 te Olovkinov telomer uzunluğunun replikasyon limiti ve hücre yaşlanması ile ilişkili olabileceğini tespit etmiş ancak telomer fonksiyon ve

yapısı ile ilgili bilgiler 1990 yılında Harley tarafından ortaya konmuştur(46). Yaşlanma ve ölüm iki evrede meydana gelir.

Uzun süreli kültürlerde normal insan fibroblastlarının yaklaşık 60-80 hücre bölünmesi sonunda bölünmeyi durdurup, yaşlanma sürecine(replikatif senesence) girdiğini Leonard Hayflick çalışmalarında gözlemiştir(47). Mortalite 1(M1) evresi; olarak adlandırılan bu evrede telomerler kritik boya ulaşırlar. Bu nokta Hayflick limiti(proliferatif blok) olarak adlandırılır. Ancak telomerler fonksiyonel olup koruyucu T-loop yapısı füzyonları önleyecek kadar TRF2 proteini içermektedir(34). Bu noktada hücrede p53 geni devreye girer ve Cyclin Dependent Kinaz (CDK) oluşumu baskılanarak hücre G0 fazına geçmesi sağlanır veya G1-S geçisi önlenir(48).

Ancak çeşitli genetik defekt bulunduran (ör; p53 ve pRb defekti olan veya viral onkoprotein bulunduran) hücreler yaşlanmaya rağmen bölünmeye devam ederlerse hücre bir kriz noktasına ulaşır (M2 evresi). Muhtemelen bu kriz noktası telomerlerin çok kısaldığı ve artık kromozom uçlarını koruyamaz hale geldiği noktadır(telomer krizi). Bu noktadan sonra hücre kendini kromozom uçlarında kırıklar oluşturarak homolog veya homolog olmayan birleştirmeler yapar. Bu rastgele birleşmeler; hücrede translokasyonlar, çift centromerli kromozomlar, ring kromozomlar oluşumuyla sonuçlanır ve bu genetik değişimler kromozomal kaos oluşturur.(M2 evresi) Bu noktada çoğu hücre ölür veya 10.000.000:1 hücre ölümsüz olmanın yolunu bulmuştur. Kanser hücreleri bir veya birkaç şekilde telomerlerini onararak bölünmeye devam ederler. Metastatik kanserler telomerlerini, %85-90 oranında telomerazı aktive ederek veya alternatif bir yolla restore ederek çoğalmaya devam ederler(17,22,49).

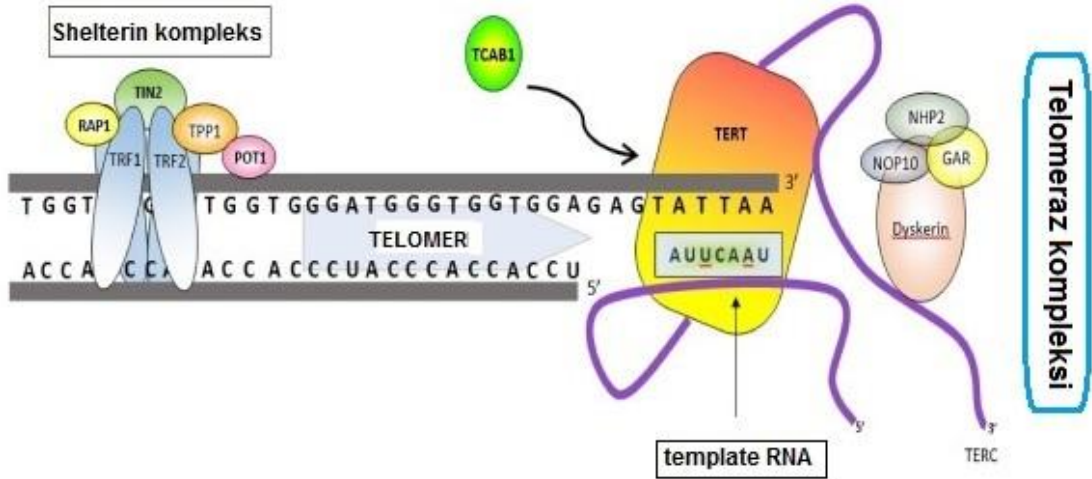


**Şekil 4. Hücre yaşlanması ve telomer uzunluğu ilişkisi(67)**

#### 2.1.2.4 İnsanda Telomer Disfonksiyonu İlişkili Hastalıklar

##### 2.1.2.4.1 Konjenital Diskeratozis

Distrofik tırnaklar, ciltte hiperpigmentasyon ve oral lökoplaki ile karakterize nadir görülen genetik bir hastalıktır. %80 hastada semptomlar 10 yaş civarında kemik iliği yetmezliği(Aplastik anemi) ve diğer fiziki bulgular olarak ortaya çıkar. Prematür yaşlanma, pulmoner hastalıklar, dental anomaliler, özofagus stenozu ve alopesi diğer bulgular arasında yer alır. Otozomal dominant, resesif ve en ağır form olan X linked ressesif geçiş gösterir. Telomeraz enzim kompleksi diskerin(DKC1), insan telomeraz RNA komponenti(h-TERC)veya insan telomeraz revers transkriptazı(h-TERT) ana yapılarında meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşur. Hoyeraal- hreidarsson sendromu(X-linked) mikrosefali, mental retardasyon ve aplastik anemi ile kendini gösterir. Xq28 de bulunan DKC1 geni mutasyonları sonucu oluşur. Bu hastalarda telomerler anormal kısa olup, buna bağlı artmış kromozomal instabilite ve kanser insidansı mevcuttur(40,50).



**Şekil 5. Telomer ve Telomeraz Enzim Kompleksi(22)**

#### 2.1.2.4.2 İdiyopatik Pulmoner Fibrozis

İdiyopatik pulmoner fibrozis(İPF) penetransı değişken otozomal dominant progresif seyirli, tekrarlayan intertisyel pnömoni ile karakterize bir hastalıktır. Hastalarda akciğerde de fibrozis ve inflamasyona bağlı nefes darlığı ve öksürük semptomları görülür. İPF li hastaların tümünde telomer boyu, kendi yaş gruplarına kıyasla aile öyküsü veya telomeraz komponentlerinde mutasyon bulundurmasından bağımsız olarak kısa saptanmıştır(51). Diskeratozis konjenita hastalarında da İPF sıklığı artmıştır. Bu hastalarda telomeraz komponentlerine ait mutasyonlar %15 oranında saptanmıştır(40,50).

#### 2.1.2.4.3 Aplastik Anemi(AA)

Kemik iliği yetmezliği olarak da bilinen ciddi pansitopeni ile karakterize bir kan hastalığıdır. AA li hastaların tümünde telomer boyu ciddi kısalmış olup, hastalarda TERT,TERC, TRF1,TRF2 ve TIN2 mutasyonları saptanmıştır(50).

#### 2.1.2.4.4 Myelodisplastik Sendrom

Orta yaş ve üzerinde görülen genellikle kanda klonal bir grup kan hücresinin displastik özellikte olması ile karakterize(sitopeni), AML riski artmış bir kemik iliği hastalığıdır. Hastalarda TERC ve TERT mutasyonları saptanmıştır. Bu hastalarda da telomer uzunluğu kısalmış olup ileri evre hastalarda erken evreye göre daha kısa bulunmuştur(51).

#### **2.1.2.4.5 Kıkırdak- Saç Hipoplazi Sendromu**

Hipoplastik saçlar, kısa boy, eklem gevşekliği, immün yetmezlik ve intestinal nöronal displazi ile karakterize kanser insidansının(özellikle lenfoma) arttığı bir sendromdur(40).

Yine Akut Myelositik lösemi, Erişkin-T Hücreli lösemi, Kronik myelositik Lösemi, Multiple Myelom Ve Mantle Hücreli lenfomada TERC, TERT gibi telomer ve telomeraz komponentleri mutasyonları bildirilmiştir(22).

#### **2.1.3 Telomer Uç Replikasyon Problemi Ve 3' Overhang Oluşumu**

Ökaryotlarda replikasyon sırasında lineer kromozom uçlarında özel bir sorunla karşılaşılır. 5'->3' yönünde olan replikasyon işlemine DNA polimeraz direk başlayamayıp ve replikasyon için mutlaka serbest bir 3'-OH grubuna gereksinim duyar. RNA primeri DNA polimeraz için bu 3'-OH grubunu sağlar(44). Kesintisiz zincirde DNA replikasyonu kromozom ucuna kadar olurken kesintili zincir 5' ucunda RNA primerleri uzaklaştıktan sonra buranın doldurulması için serbest 3'-OH grubu bulunmamaktadır. End Replikasyon Problemi olarak tanımlanan bu durumda kromozom uçları her bölünmede, RNA primer boyu(8-12 baz) kadar kısalmaktadır(20). Ancak telomerlerde her bölünmede50-200 baz çifti kadar bir kısalma görülür. Bunun sebebinin oksidatif stres olabileceği düşünülmektedir(52).

Telomer replikasyonunu takiben telomer uçlarında 3' overhang oluşumu telomerlerin korunması için en önemli aşamadır. Hücre siklusunun geç S ve G2 fazında meydana gelen bu oluşum birçok faktör tarafından yönetilmektedir. Özellikle shelterin komponenti olan TRF 2 ve POT 1 kritik öneme sahiptir. TRF 2 Apollo nükleazı çağırarak kesintisiz çift sarmal ucunda küçük bir overhang oluşumunu sağlar. Okazaki fragmanları içeren sarmalda ise RNA primerinin uzaklaşması ile küçük overhang oluşur. Daha sonra ekzonükleaz 1 (EXO1) gelerek kesintili ve kesintisiz zinciri kırmaya başlar. CST(CTC-STEN1-TEN1) kompleksi ve EXO1 arasındaki etkileşim ve dengeye bağlı olarak sonunda 50-200 nükleotidlik overhang oluşur(28,34).

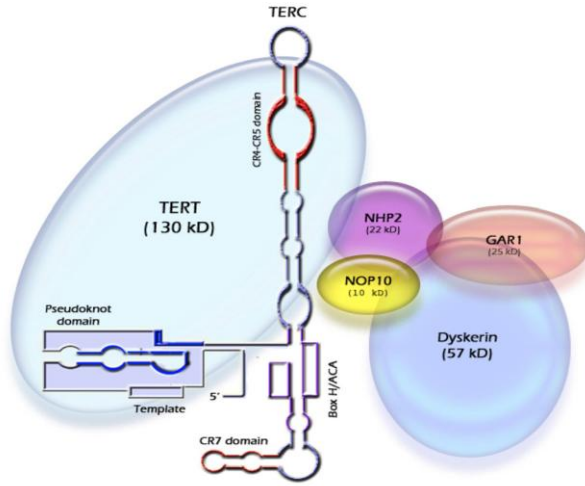
### 2.1.3.1 Telomeraz

RNA polimeraz ve DNA polimerazların uzama için serbest 3'OH grubuna gerek duymalarından kaynaklanan uç-replikasyon problemini çözmek için özel bir revers transkriptaza ihtiyaç duyulur. Telomeraz(RNA bağımlı DNA polimeraz) bu uzamayı sağlar(17). 550 kDa büyüklüğündeki telomeraz enziminin üç komponenti vardır(53).

1-insan telomeraz RNA komponenti(h-TERC/h-TR)

2-insan telomeraz revers transkriptazı(h-TERT/h-TRT/h-EST2)

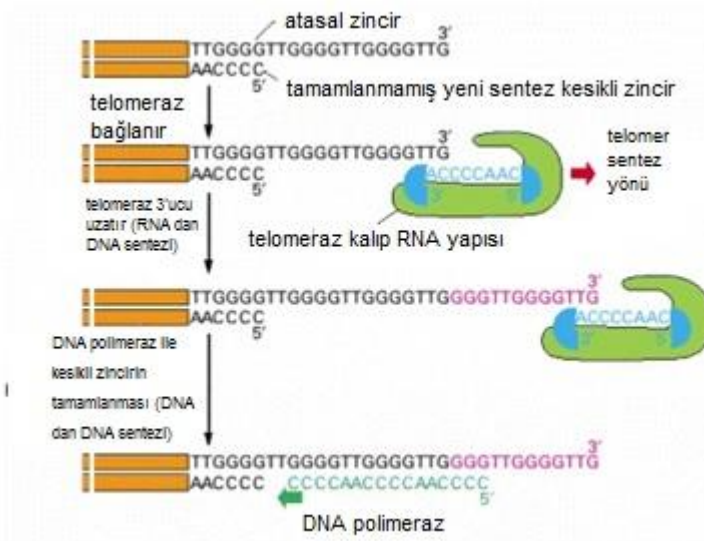
3- insan telomerazı protein komponenti(H/ACA motif binding kompleks) ;diskerin venükleolar protein A(NOLA) ailesi üyeleri NHP2(NOLA2), NOP10(NOLA3), GAR1(NOLA1)



**Şekil 6. Telomeraz holoenzim subunitleri(50)**

Ribonükleoprotein yapıdaki bu enzimin polimeraz fonksiyonunu RNA subuniti TERCve protein subuniti TERTile sağlar. TERC RNA dizisi, telomerik DNA dizisinin komplementeridir(3'-AUCCCAAUC-5') ve kalıp görevi görerek atasal zincirin uzması sağlanır. Atasal zincir yeteri kadar uzadığında DNA polimeraz için yeterli kalıp oluşur ve yeni zincir sentezlenir(20).

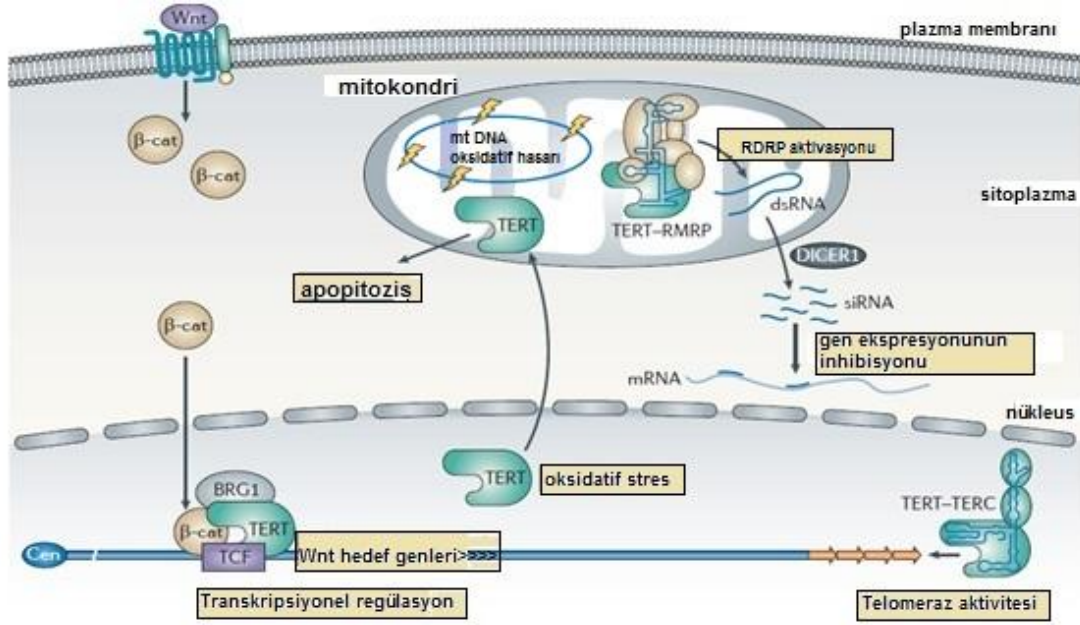




**Şekil 7. Telomeraz ve repkikasyon sonu problemi(54)**

Telomerazın diğer revers transkriptazlardan farkı kendi RNA alt birimini kalıp olarak kullanmasıdır. TERC geni 3 nolu kromozomun uzun kolunda bulunur(3q26.3)ve bu gen hem normal hemde kanserli dokularda eksprese olmaktadır(17). TERT ekspresyonu ise birçok somatik hücrede bulunmamaktadır. Bu sebeple TERT 'in telomeraz aktivasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir(22,53).

TERT telomerden bağımsız olarak Wnt-β katenin sinyal yolağında transkripsiyonel modülatör olarak görev yapar. Hücre membranındaki Wnt reseptörleri uyarıldığında TERT; Wnt transkripsiyon faktör,brahma ilişkili gen 1(BRG1,brahma related gene 1) proteini ile kompleks yapar ve sinyal yolağı hedef gen promoterlarına bağlanarak ekspresyonu regüle ederler. Mitokondride,mitokondrial RNA yapan Endoribonukleaz RNA komponenti(RMPR,RNA Component Of Mitochondrial RNA Processing Endoribonuclease) ile kompleks oluşurup RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesi gösterir, oluşan dsRNAlar endoribonükleaz dicer ile siRNAlara parçalanıp gen ekspresyonunda görev alırlar. Mitokondriyal DNA oksidatif hasarında TERTin apoptozisi nasıl uyardığı henüz netleştirilememiştir(40,55).



**Şekil 8. Telomeraz subunit TERT'in fonksiyonları (40)**

Telomeraz komponenti olan TERT'in overekspresyonunun, p53, p16 ve ARF tümör süpresör genlerinin ekspresyonunu arttırarak kansere direnç oluşturduğu, nöromusküler koordinasyonu arttırdığı, glukoz toleransını arttırdığı, yaşam sürelerini %40 arttırarak antiaging fenotipe neden olduğu TERT-transgenik farelerde gösterilmiştir(40).

İnsanlarda telomer uzunluğu oldukça değişken olup telomeraz aktivitesinin germline, kan, cilt ve intestinal hücreleri haricinde olmadığı kabul edilir. Telomeraz yokluğunda; S fazında telomerik DNA tümüyle replike olamaz ve her bölünmede ortalama 50-150bp kısalır. Telomerin kısalması yaşlanma ve hücre bölünmesinin indirekt bir göstergesidir. Kanser hücreleri bir şekilde telomerazlarını aktive ederek kontrolsüz çoğalmanın yolunu bulmuşlardır(27).

Shelterin telomeraz koordinasyonu hücre tipine göre farklılık gösterir. Embriyonik kök hücrelerdeki telomer uzunluğu kanser hücrelerinden çok daha uzundur(56). Telomeraz komponent mutasyonlarına bağlı gelişen ve prematür stem cell fonksiyon kaybı ile sonuçlanan hastalıklarda telomeraz aktivitesini arttırmanın tedavi seçeneği olabileceği düşünülse de yapılan fare deneylerinde telomerazın kanser gelişimini desteklediği gösterilmiştir. Ancak %40 farede ise

TERT in antiaging etkilerine bağlı; yaşlanmanın geciktiği, nöromüsküler koordinasyonun geliştiği, glukoz intoleransında azalmanın sağlandığı ve epitelyal bariyerlerin iyileştiği gözlenmiştir(57).

Telomer uzunluklarının nasıl algılandığı ve telomeraz seviyesini nasıl tetiklediği merak konusudur. Telomerazın telomere girişi holoenzimintelomeraz kaval body protein1(TCAB1,WRAP53) subunititarafından stimüle edilir. TCAB1 in holoenzimden ayrılmasıyla telomer-telomeraz etkileşimi azalır. TCAB1 telomeraz ile htr-H/ACA(diskerin) subuniti üzerinden bağlantı kurar ve ribonükleoprotein(RNP)' nin hücre içi konsantrasyonu kaval hücreleri tarafından algılanıp, bu bağlantı düzenlenir(53).

Her bir telomerin uzunluğuna göre telomeraz aktivitesinin regüle edilmesi; Shelterin- telomeraz ilişkisi ile sağlanmaktadır(53). Cis regulatuar feedback mekanizmasında TRF1 ve TRF2 nin çift iplik, POT1 in tek iplik üzerindeki yoğunluklarına bağlı olarak telomer uzunluğunun algılandığı ve bunun POT1 e iletildiği daha sonra POT1 inde telomerazın 3' ucuna girişini engellediği düşünülmektedir (30). TPP1 proteinin OB kıvrımında telomeraz ile ilişkili bir yüzü bulunmaktadır(TEL patch). Telomeraz bu yüze bağlanarak telomer içine alınır. TPP1 in de telomerazın aktivasyonunda ve telomer uzunluğunun regüle edilmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (58).

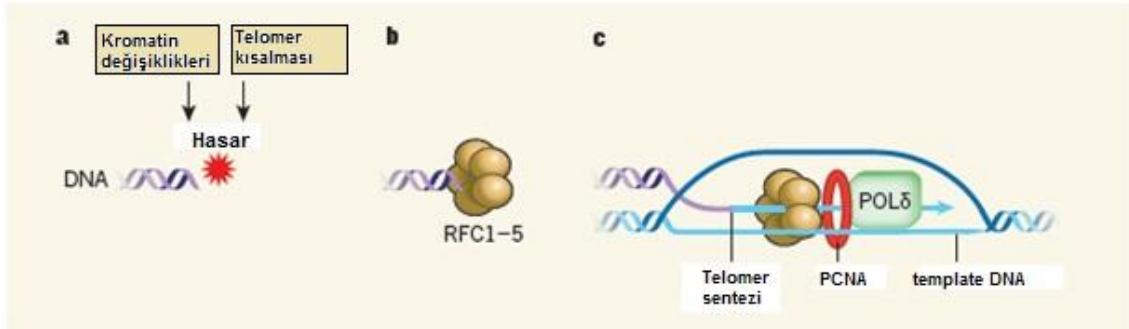
### **2.1.3.2 Alternatif Telomer Uzatma Mekanizması**

Kanser gelişimi sırasında hücreler sınırsız çoğalabilme yeteneğini telomeraz enzimini upregüle ederek veya genellikle homolog rekombinasyona dayanan bir mekanizmayı aktive ederek sağlamaktadır. Alternatif Telomer Uzatma(ALT,Alternative Lengthing of Telomeres) olarak adlandırılan bu mekanizma bir çok telomer fonksiyonunun kontrolünün kaybedilmesi ile sonuçlanır(59).

Telomerlerin uzunluklarını koruyabilmek için homolog rekombinasyonu nasıl gerçekleştirdikleri ile ilgili iki görüş vardır; birincisi eşit olmayan kardeş kromatidler arasında değişimin(T-SCE)olması ikincisi ise telomerik DNA'nın

farklı bir telomerden veya ekstra kromozomal telomerik DNA adı verilen serbest tekrarlayan DNA ait moleküllerden sentez edildiğidir. Kabul gören bu görüşte; ALT nin moleküler temelinde farklı bir DNA polimeraz olduğu Dilley ve ark tarafından açıklanmıştır(60).

ALT nin aktive olması için önce tek ipliğe(overhang) bağlanan POT1 proteini telomerden uzaklaşırken, onun yerine RAD51 proteini tek ipliğe dolmaya başlar ve bu protein(RAD51), homolog rekombinasyon için G-rich overhang ipliğın terminalinin komplementer ipliğe bağlanmasını sağlar; ardından hücre proliferasyon nükleer antijen(PCNA,Proliferating cell nuclear antigen) proteini ve DNA polimeraz  $\delta$  aktivasyonu ile sentez gerçekleşir(61). Çift dal kırıkların tetiklediği telomer sentezinde(break induced telomere synthesis) hasarlı DNA ucuna replikasyon faktör C 1—5(RFC1-5) proteini bağlanır ve bu proteinin, PICNA ve DNA Pol  $\delta$  in doğrudan sentez işlemine girişini sağlayarak telomer sentezini gerçekleştirdiği Dilley ve ark tarafından saptanmıştır(62).



**Şekil 9. ALT oluşum mekanizması(60)**

ALT; telomer uzunluğunu koruyabilmek için telomeraz aktivitesinin olmadığı %10-15 tümör grubunda görülür ve DNA hasarının fazla olduğu, özellikle histon fonksiyonları bozulmuş olan hücreler tarafından kullanıldığı gösterilmiştir(25). ALT nin aktive olduğu telomerlerin, ALT-ilişkili promyelositik nükleer cisimleri(APBns) ile kaplandığı, TERRA ekspresyonunun arttığı ve T-SCE nin arttığı saptanmıştır ve belirteçlerin ALT mekanizmasını başlattığı öngörülmektedir(28,61).ALT hücre tiplerin en önemli belirteci APNB cisimleridir(59).

ALT telomerleri uzunluk bakımından oldukça heterojendir ve subtelomerik bölgelerinde rekombinasyona katılmasından dolayı telomerik DNA sekansı standart tekrarları içermeyebilir(59).

ALT nin nasıl tetiklendiği niye bazı kanser gruplarında görüldüğü henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte TRF2 proteininin azaldığı ve kromatin remodelingten sorumlu histone şaperon ATRX ve apoptozis ilişkili protein(DAXX, death domain associated protein)'in mutant olduğu tümör hücrelerinin ALT yolağını kullandığı düşünülmektedir(36,63).

#### **2.1.4 Telomer Ve Kanser**

DNA yapısı ve kromozomların keşfinden önce Theodor Boveri kanser hücrelerinde, normal hücrelerden farklı olarak ince mikroskopik cisimlerin(kromozomların)anormal dağıldığını gözlemlemiştir. 1930 larda insan hücrelerinde 46 kromozom bulunduğu ve kanser hücrelerinin anormal yapı ve sayıda olduğu gözlemlenmiştir(64).

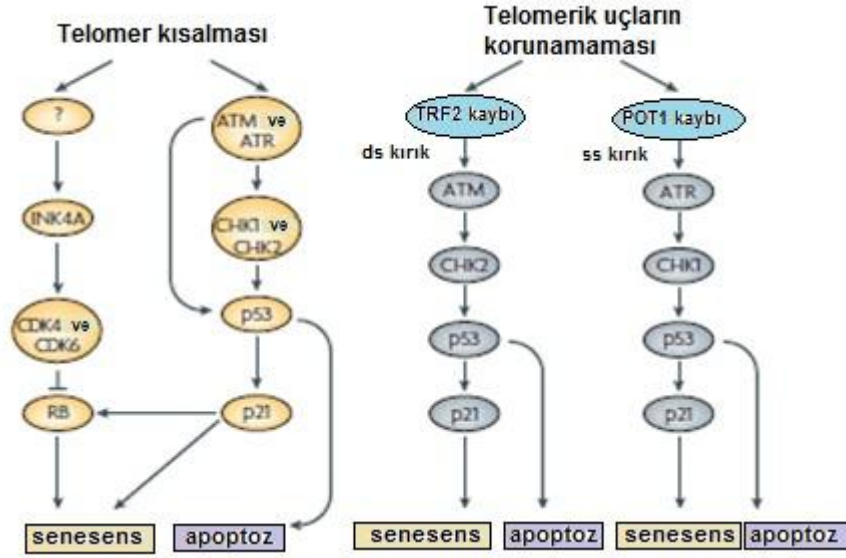
Karsinogenez uzun süre boyunca, hücrelerimizin kontrolsüz çoğalma hali olarak tanımlandı. Ancak günümüzde tümör gelişimi kontrolsüz çoğalmayı sağlayabilmek ve agresif tümörlerdeki gibi hızlı adaptasyonu sağlayabilmek için DDR ve DNA tamir mekanizmalarının down regüle olmasının, genetik ve epigenetik instabilitenin artışının gerekliliği bilinmektedir(65).

Kromozomların telomer hemostazının bozulması genom stabilitesini bozarak, kanser gelişimini destekler. Vertebralıların telomerlerindeki bu tandem tekrar dizileri telomer bağlayıcı proteinler sayesinde T-loop yapısını oluşturarak kromozom uçlarını kapatır. Bu kapanma DNA hasar tamir mekanizmalarının tetiklenmesini önleyerek kromozomları uçlarının füzyonunu engeller. Telomerik DNA hasarı veya telomerik proteinlerinin sayısının azalması bu füzyonları tetikler(39). Birçok kanser tipinde telomer disfonksiyonunun kromozomal instabilitiyi tetiklediği ve tümörögenезisi başlattığı bilinmektedir. Pre-neoplastik hücrelerin hızla çoğalması telomer kısalması ile sonuçlanır ve bu da DDR sinyal yollarını tetikler, bunun sonucunda hücre yaşlanması veya apoptozisi uyarır.

P53 ve/veya RB yollarında defekt olan hücreler bu noktayı atlatırlar ve bölünmeye devam ederlerse shelterin proteinlerin kaybı ve buna bağlı telomer yapısı bozulur(28). Kromozom füzyonları, disentrik kromozomlar, ring kromozomlar oluşur. Tekrarlayan BFB(breakage-fusion-bridge) siklusları FISH yöntemi ile incelendiğinde füzyon böğelerinde telomerik sinyallerin arttığı görülebilir(48). Telomer krizi olarak bilinen bu durumda, uç uca birleşen (end to end fusions) kromozomların %50 sinde telomerik DNA tekrarlarının(TTAGGG)tamamen kaybedildiği bildirilmiştir. Telomer krizinde telomerazı veya ALT yi aktive edemeyen çoğu hücre ölür(28).

Somatik hücrelerde telomerlerin kısılması ve buna bağlı replikatif senesens'in; kontrolsüz hücre çoğalması ve malign transformasyonun önüne geçiyor olması, telomerlerin tümör supresör fonksiyonlarını desteklemektedir. Telomer disfonksiyonu kaynaklı kromozom füzyon ve kırılmaları da tümör supresör bir genin heterozigotluğunu kaybetmesine(LOH) veya bir onkogenin amplifikasyonuna neden olabilir(39). İşte bu noktada telomer disfonksiyonunun pro kanser genotip oluşumunu belirlediği noktadır(48).

Replikatif yaşlanmaya giren hücrelerin moleküler markırlarının DNA çift iplik kırıkları için karakteristik olması, disfonksiyonel telomerlerin DDR mekanizmasını uyardığını desteklemektedir. Bu markırlar fosforile histon protein gama-H2Ax, P53 bağlayıcı protein 1(TP53BP1), nibrin(NBS1), DNA damage checkpoint 1 mediatörü(MDC1) ve checkpoint kinaz 2(CHK2) dir. Bu faktörler doğrudan disfonksiyonel telomerlere bağlanıp, p53 ve RB genlerini uyararak p21 ve INK4A(p16) ekspresyonunun indükler.. Bu da hücreyi S fazına geri getirerek yaşlanmayı başlatır(48). Yine ATM ve ATR yolaklarının da uyarılması; CHK1ve CHK2 aracılığı ile p53 ü uyararak hücreyi yaşlanma veya apoptozise götürür. Bununla birlikte; p53 mutasyonlarının hücrede kanser gelişim basamağını başlattığı bilinmektedir. Telomer kısılmasının çift dal kırığı olarak nasıl algılandığı henüz açıklanamamıştır(48).



**Şekil 10. Telomer disfonksiyonunun p53 ve RB yolaklarını aktive etmesi(48)**

Prekanseroz dokularda ATM ve ATR bağımlı DDR sinyal yollarının uyarıldığı hücre siklus kontrol noktalarının durduğu ve DNA hasar markırlarını ekspresyonunun arttığı açıkça ortaya konmuştur(65).

Jeko ve ark. yakın zamanda yapılan tümör genom mutasyon profillerinde DDR genlerinin tüm kanser tiplerinde sıklıkla mutasyona uğradığını ve DDR sürecinin kanser etiolojisindeki önemini vurgulamışlardır(65).

Güncel çalışmalarda DDR mekanizmalarının yalnızca DNA tamir yollarını aktive etmediği, instabil hücrelerin çoğalmasını da önlediği yani aynı zamanda DNA hasar sağkalım mekanizması olduğu dikkate alınmalıdır(65).

Kanser genom sekanslarının, telomer disfonksiyonu ve genomik instabiliteye neden olan yeni mekanizmalara ışık tutacağı tahmin edilmektedir. Bu çalışmalarda POT1 mutasyonları bir çok kanser tipinde saptanmıştır(ör; kronik lenfositik lösemi, ailesel melanom, gliomlar, mantle hücreli lenfoma, T hücreli lösemi/lenfoma)(28). POT1 in telomer uzunluğunu artırarak telomerde frajilite artışına neden olduğu bildirilmiştir(66).

Kanser hücreleri bu yolları inhibe etmekte kalmayıp, mekanizmayı lehlerine çevirip indüklemektedirler ve kolaylıkla adaptasyon kazanarak karsinogenez ve metastaz aşamalarını hızlıca katederler(65).

Telomerazın telomerlere nasıl girdiği henüz açıklanamasa da shelterin proteinlerinin telomeraz regülasyonunda önemli görevleri olduğu bilinmektedir. Özellikle TPP1 komponentinin telomerazın telomere girişini sağladığı belirtilmekte olup telomeraza yönelik kanser tedavi stratejileri bu proteini hedef almaktadır(40).

Telomeraz, stem cell ve kanser hücrelerinin uzun süreli replikasyon potansiyelleri için mutlaka gereklidir. Bununla birlikte TERT overekspres eden transgenik farelerde spontan tümör insidansında artış saptanmıştır. Kanser hücre senaryosuna göre onkojenik stres altında hücreler kendi proliferasyon limitlerini arttırmaya çalışırlar. Telomer uzunluğu bu bölünme kapasitesi için sınırlayıcı bir faktördür bununla birlikte tüm kanser dokularında çevre sağlıklı dokuya göre telomerler kısadır. Telomeraz aktivitesinin çoğu kanser türünde olmasından dolayı telomerazı hedef alan anti kanser terapilerin de kısaldığı telomerlerle birlikte kanser hücrelerinin bölünme kapasitesini kaybedeceği öngörülmektedir.

### **2.1.5 Telomerin Kanser Tanı Tedavi Ve Takipteki Rolü**

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan birçok kemoterapi ilaçlarının en önemli dezavantajı tümör spesifik olmamalarıdır. Yani kanser hücreleriyle birlikte normal yapıdaki hücreler için de toksik olmalarıdır. Ancak telomeraz aktivitesi sadece kanser hücrelerinde bulunduğundan telomerlerin uzamasını engelleyecek bir adjuvan geliştirildiğinde sistemik yan etkileri az olan ve kanser dokusuna spesifik bir tedavi olacağı düşünülmektedir(67). Telomeraz antagonisti olan GRN163L(imetelstat sodyum)un kanser hücre kültürlerinde etkili olup, hayvan deneylerinde meme ve akciğer kanserinde etkili olduğu gösterilmiştir(48,68).



Birçok tümörde telomeraz aktivitesinin olduğunun gösterilmesiyle, telomeraz aktivitesinin kanser belirleyicisi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir(18).

Telomerlerin moleküler mekanizması anlaşıldıkça yeni anti kanser terapileri geliştirilecektir. Telomerler tarafından indüklenen, hücresel yaşlanma ile tümör gelişimini azaltmak uzun zamandır antikanser terapisi olarak araştırılmaktadır(21).

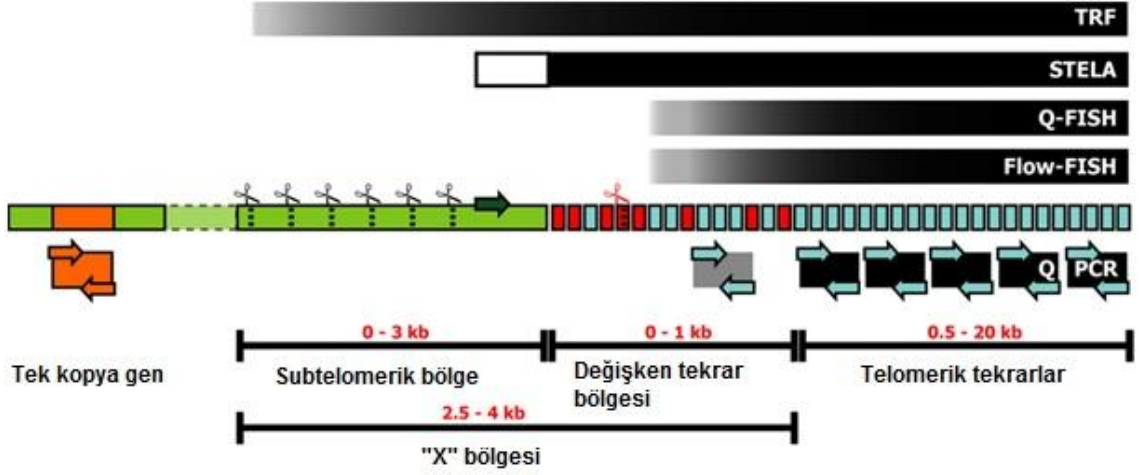
Yine POT1 ve TPP1 aracılığı ile DDR uyarılması ve buna bağlı hücre yaşlanması sağlanabilir. Ancak anti-telomeraz ajanların hedefi olan p53 bağımlı apoptozis veya senesens için mutasyona uğramamış p53 gereklidir Ne varki %50 kanser hücresinde p53 mutasyona uğramıştır(48).

Telomerlerin promoter bölgesine yakın bölgelerde bulunan guanin bakımından zengin dört zincirli yapı G4 DNA(G-tetrad) veya G-kuadrupeks denmektedir. Bu yapının telomeraz enzimini inhibe etmesi nedeni ile kanser tedavisinde G4-DNA(G-tetrad) yapılarını stabilize edip telomeraz aktivitesini durduran bileşikler üstünde önemle durulmaktadır(69).

Telomerlerin disfonksiyonunu senesens yönüne kaydırıp tümörögenезisi azaltmak ilerde kansere karşı tedavi yolu olarak kullanılabilir(48).

### **2.1.6 Telomer Uzunluğu Ölçüm Yöntemleri**

Günümüze kadar telomer uzunluğu ölçüm yöntemleriyle ilgili birçok metod geliştirilmiştir. Herbir metod telomerin farklı bölgelerinin uzunluğunu ölçmekte olup bu nedenle avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Yaşam koşulları, sahip olunan kronik hastalıklar telomer uzunluğunu etkilemektedir. Telomerlerin hastalık risk veya prognozunda kronolojik bir biomarkır olabileceğinin düşünülmesi telomer analizlerinin önemini arttırmıştır.



**Şekil 11. DNA ölçümünde farklı tekniklerin karşılaştırılması(70)**

### 2.1.6.1 Terminal Restrüksiyon Fragment (TRF) Analizi

Ortalama telomer uzunluğu ölçüm yöntemleri içinde geliştirilen ilk yöntem olup altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu prosedür de genomic DNA sık kullanılan restrüksiyon enzimleri ile telomerik ve subtelomerik bölgeler hariç (telomerik ve subtelomerik DNA intakt) fragmanlara ayrılır. DNA terminal restrüksiyon fragmentleri (TRF) olarak adlandırılan bu parçalar agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak, southern blotlama veya telomerik DNA spesifik prob kullanılarak jel hibridizasyon ile görüntülenir. Ölçüm büyüklüğü bilinen bir marker veya dansitometre ile karşılaştırılarak kilobaz olarak değerlendirilir. Bu yöntem bütün kromozomlar için telomer uzunluklarının dağılımını bir örnekte vermektedir(19).

Yöntemin avantajı ucuz ve özel ekipman gerektirmemesidir. DNA'nın uzun süre oda ısısında kalmasından ve çözülüp tekrar dondurma işlemlerinden etkilenmektedir. Diğer yöntem sonuçlarının tahmini kilobaza çevrilmesinde kullanılır. Dezavantajı ise bu yöntemle elde olunan terminal restrüksiyon fragmanleri subtelomerik bölgeleri içerdiği için gerçek telomer uzunluğunu vermez ve subtelomerik bölge polimorfizmleri sonuçları etkilemektedir. Ayrıca kullanılan restriksiyon enziminin farklılığı sonuçların değişmesine neden olur. Yine bu yöntemin diğer bir dezavantajı kısa telomerleri tespit edememesidir. Bu yöntem kullanıldığında sub-telomerik bölgelerin telomer uzunluğunu ne kadar

etkilediği bilinmemekte, ancak kesim için restrüksiyon enzimlerinin bir karışımı kullanılarak bu etkinin azaltılabileceği düşünülmektedir(19,70).

### **2.1.6.2 Kantitatif Floresan İn-Stu Hibridizasyon(Q-FISH)**

Bu metod, telomerik DNA nın (CCCTAA)<sub>3</sub> floresan probları hibridizasyonu sonrası interfaz nükeusu veya metafaz kromozomlarında telomerlerin değerlendirilmesini sağlar. Q-FISH yönteminde telomerik DNA ya yüksek hibridizasyon afinitesi olan sentetik peptid nükleik asit (PNA) probları (CCCTAA) kullanılır. Flerosan sinyal Q-FISH analiz programında standarta(genellikle sentromer) göre relative flerosan unit olarak ölçülür ve 15-20 metafazın değerlendirilmesi yeterli olmaktadır(70).

Bu metodun diğer yöntemlere göre en önemli avantajı metafaz Q-FISH te aşırı kısa veya uzun telomerleri, telomer füzyonlarını veya telomerin tamamen kaybını tespit edebilmesidir. Ayrıca hücre spesifik telomer uzunluğu ölçümüne olanak verir.Dezavantajları ise zaman alan, pahalı ve özel ekipmanlar gerektiren bir yöntem olmasıdır. Diğer yöntemlerden farklı olarak hücre kullanılır. Özellikle metafaz Q-FISH için sadece bölünme kapasitesi olan hücreler değerlendirilebilir ancak interfaz FISH için böyle bir gereksinim yoktur(19).

### **2.1.6.3 FLOW-FISH**

Q-FISHin flow sitometri ile kombine edlip birleştirilmesi ile oluşan bu yöntemde özel flow solüsyonlarda PNA (CCCTAA)<sub>3</sub> flerosan probları ile telomerik DNAları hibridize olan hücreler, laserlerden tek tek geçerek floresan emisyon/sinyal oranı hesaplanır. Bu oran çalışılan hücre popülasyonunun ortalama telomer uzunluğunu verir. Bu yöntemde hücreler sub popülasyonlarına ayrılıp ortama telomer uzunluğu verilebilir, yani hematopoetik hücreler subtiplerine ayrılabilir.Q-FISH'de kullanılan kültür edilmiş hücreler bu yöntem için gerekli olmadığından periferik kandan uygulama yapılabilir(70). Normalizasyon için bir kontrol hücre hattı kullanılır ve hibridizasyon aşamasında oluşabilecek farklılıklar giderilir. Bu yöntemin telomer analiz yöntemleri

arasında, klinik tanı için en kapsamlı ve güvenilir datayı verdiği kabul edilmiştir(71).

#### **2.1.6.4 STELA Yöntemi**

Single TElomere Length Analysis (STELA); TRF ve PCR tabanlı yöntemlerin değerlendirilen materyalin ortama telomer uzunluğunu hesaplamasından ve kritik kısalıktaki telomerlerin değerlendirelememesinden kaynaklanan problemi çözmek için geliştirilen bu yöntem Q-PCR ve ligasyon tabanlı bir yöntemdir. Replikatif yaşlanma ve apoptozis başlatıcı sinyal olarak değerlendirilen kritik kısalıktaki telomerler ölçülebilir. Hedef kromozomun, telomerik DNA sını ölçmek için kromozomun subtelomerik bölgesine spesifik primerler kullanılır ancak subtelomerik bölgelerin kompleks yapısı ve sadece küçük bir grup kromozom telomeri için spesifik primer dizayn edilebilmesi, bu özel kromozom spesifik, aynı zamanda, aynı kromozom farklı kollarına spesifik bu yöntemi sınırlamıştır. Bu yöntem ile XpYp, 2p, 11q, 12q, ve 17p kolları telomer uzunlukları ölçülebilir. Çok uzun telomerler veya telomer kaybı bu yöntem ile saptanamaz. Materyal olarak hücre gerektirmeyip kaliteli DNA gerektirir. Çalışma için özel ekipman gerektirmez. STELA varyant ve telomer bölge tekrarlarını kapsar, ancak primer alanı bilindiği için sub-telomerik uzunluk çıkartılabilir.

#### **2.1.6.5 HPA(Hibridizasyon Protection Assay)**

DNA tabanlı HPA yönteminde ise telomerik tekrarların Alu tekrarlarına oranı hesaplanır. Ancak Alu tekrarlarının kişiden kişiye değişmesi ve saptanan bu oranın kilobaza çevrilmesinin güç olması yöntemin dezavantajlarıdır.

#### **2.1.6.6 Tek Sarmal 3' Overhang Ölçümü**

Overhang assay yöntemleri; absolute uzunluk ölçümü ve rölatif analiz olarak ikiye ayrılabilir. Non denatüre hibridizasyon ve G–iplik HPA Rölatif analiz metodlarında overhangın total telomerik DNA ya rölatif oranı saptanır. Primer ekstensiyon-nick translasyon(PENT),Telomerik-oligonükleotid ligasyon assay(T-OLA), çift sarmal spesifik nükleaz(DSN) ve elektron mikroskobu ile ölçümler ise absolute uzunluk ölçümlerine örnek verilebilir. DSN yönteminde çift sarmal spesifik enzimler ile DNA kesilir ve overhang DNA intact kalır örnekler southern

blotlama ile analiz edilir. Diğer yöntemlerden farklı olarak çok kısa(12nt) overhang uzunluğunun ölçülebildiği bildirilmiştir(72).

#### **2.1.6.7 PCR Tabanlı Teknikler(Q-PCR, MMQ-PCR, aTL Q-PCR)**

Bugüne kadar olan yöntemlerin çalışma için yüksek miktar DNA ya ihtiyaç duyması PCR tabanlı yöntemlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu prosedür; kantitatif PCR(Q-PCR), monochrome multiplex kantitatif PCR(MMQ-PCR) ve absolute telomer uzunluğu kantitasyonunu(aTL Q-PCR) içermektedir(19). Ortalama telomer uzunluğu ölçümlerinde en fazla kullanılan bu yöntem Cawthon tarafından geliştirilmiştir. Geleneksel TRF metodunun yüksek miktar DNA ya ihtiyaç duyması, çalışmanın 2-3 gün sürmesi, subtelomerik restriksiyon bölge polimorfizmleri ve subtelomerik bölgenin uzunluk polimorfizmleri, doğru telomer uzunluğunu ölçümünü kısıtlamaktadır(73).

Q-PCR da temel prensip; 20-40 döngüde spesifik primerler kullanılarak elde edilen DNA sekansı PCR ürünlerinin(amplikon) her döngü sırasındaki miktar artışının ölçülmesidir. Hedef DNA sekansının miktar ölçümü için ya çift zincirli DNA'ya bağlanan fleurosyan boyalar(ör;sybr green) veya fleurosyan işaretli dizi spesifik prob(ör;taq man prob) kullanılmaktadır(19). Hedef DNA ya bağlanan flerosyan boyaların miktarı her döngüde oluşan ürün miktarı ile artış gösterir. PCR ürün miktarı; flerosyan sinyalin yoğunluğu ölçülerek hesaplanır(74).

Cawthon 2002 de uygun primer seti geliştirilip Q-PCR tekniğiyle telomer uzunluğu ölçümünün yapılabileceğini rapor etmiştir(73). Telomerlerin tekrarlayan TTAGGG yapısı primer dizaynını güçleştirmektedir. Telomerik DNA'nın yapısı gereği kullanılan primerler komplementer yapıda olup primer dimerleri oluşarak hedef DNA yerine primer sekansları amplifiye olmaktadır. Cawthon, telomerin C rich ve G rich dallarına bağlanan fakat baz hataları ve uzunluk farkı olan primerler dizayn ederek ve PCR'ın ilk 2 döngüsünde bağlanmayı sağlamak için düşük sıcaklık kullanarak, primer dimerizasyonunun üstesinden gelmiştir(19,70).

Bu metotta ortalama telomer uzunluğu oran olarak verilir(standart olarak oligomer kullanılması hariç) southern blot tekniği kullanılarak ortalama telomer uzunluğu kilobaza çevrilebilir. Ortalama telomer uzunluğunu verdiğinden kromozomlara göre dağılımını veya telomer kaybını göstermez. Ancak subtelomerik bölgeler amplifiye edilmediği için TRF ye göre daha doğru sonuçlar verir. Az miktar DNA çalışma için yeterli olmaktadır. Yine diğer bir avantajı hızlı, ucuz ve yüksek verimlilikte olmasıdır. Büyük epidemiyolojik çalışmalar için idealdir. Ancak gruplar arasında farklılıklar hatta tekrar edilen aynı çalışmada bile farklılıkların olması TRF metodunu üstün kılmaktadır. Aviv 2011 yılındaki çalışmasında coefficient variationı daha iyi anlamak için Q-PCR tabanlı metodlar ile TRF metodlarını karşılaştırarak aynı hastanın farklı zamanlardaki telomer uzunluğunu farklı yöntemlerle ölçmüştür.ve tüm metodlar kendi içinde korelasyon gösterirken birbirleriyle kıyaslandığında Q-PCR varyasyonlarının(%6.45) TRF ye göre(%1.74) daha yüksek olduğu saptanmıştır(75)

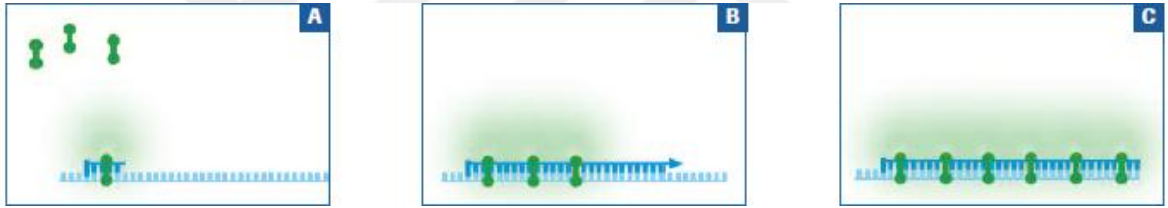
Cawthon' un metodunda telomer uzunluğu, aynı miktardaki DNA'nın telomer tekrarlarının amplifikasyon ürünlerinin(T), tek kopya gen amplifikasyon(S)ürünlerine oranı karşılaştırılarak bulunur. Bulunan T/S ratio değeri ortalama telomer uzunluğunu vermektedir(73). Telomer ve tek kopya gen ayrı tüp veya wellerde çalışılır. T ve S değerleri arasında pipetaj veya DNA miktarında değişiklik kaynaklı hata olmasından dolayı T/S ratio hassaslığı etkilenebilir. Bu etkilenmeyi ortadan kaldırmak için Cawthon ve ark.2009 yılında eski metodu, telomerik(T) ve tek kopya genin(S) aynı tüpte amplifiye olacak şekilde revize etmiştir ve bu metoda Monochrome Multiplex Quantitative PCR(MM Q-PCR) adını vermişlerdir(76).

Cawthon 2002'de yaptığı çalışmada cell-free DNA telomer çalışmalarında kişiler arasındali sentromerik DNA ve Alu tekrarlarının farklı olması sebebiyle; telomerik DNA tekrarlarının tek kopya gene oranlanmasının sentromerik DNA veya Alu tekrarlarına göre daha doğru olacağını

belirtmiştir(73).

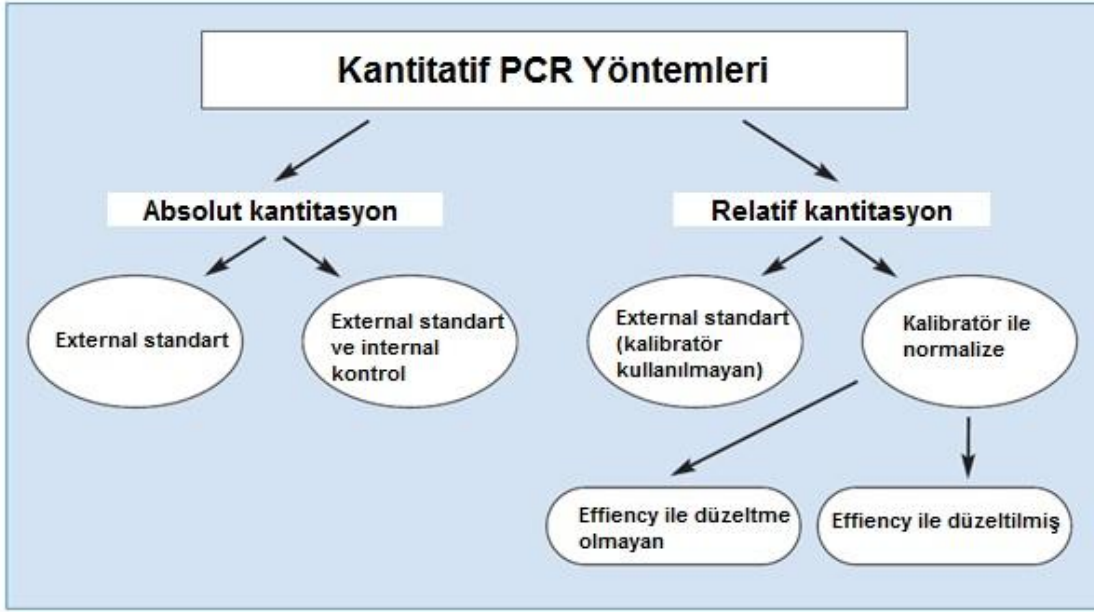
Diğer Q-PCR tabanlı diğer bir adaptasyon metodu ise Absolute Telomer Uzunluğu Q-PCR(aTL Q-PCR) olup bu yöntemde aynı şekilde telomer(T) ve tek kopya gen(S) amplifikasyon ürünleri hesaplanır. Bu metotta farklı olarak Standard eğri uzunluğu bilinen bir oligomer standardı kullanılarak telomer uzunluğu ölçülür(77).

QPCR metodundadikkat edilmesi gereken nokta floresan boya olan SYBR green kullanımındır. SYBR green boyası çift iplik DNA ya bağlandığında floresan yaydığından non-spesifik çift iplik DNA(primer dimerizasyonu gibi)ya bağlanıp yanlış sonuç verebilir. Ancak erime eğrisi analizi kullanılarak bu problem çözülebilir(78).



**Şekil 12. Sybr green dye floresan yayma prensibi (78)**

Q-PCR sonuçları değerlendirilirken Ct (döngü eşiği) veya Cp (geçiş noktası) olarak adlandırılan değerler dikkate alınır. Bu değer, PCR ürünlerin amplifikasyonunun başladığı döngü sayısıdır. Kantitatif PCR' da Absolut ve Relatif Kantitasyon olmak üzere iki çeşit hesaplama metodu kullanılmaktadır.



**Şekil 13. PCR kantitasyon yöntemlerinin şematik gösterimi(79)**

Absolut kantitasyon için, miktarları bilinen standartlar kullanılarak absolut standart eğri oluşturulup ve örneğin miktarı belirlenir. Relatif kantitasyon, relatif standart eğri ve kalibratör kullanılan karşılaştırmalı Ct metodu( $\Delta\Delta Ct$ ) olarak ikiye ayrılır. Her iki analiz yönteminde de sonuçlar oran olarak belirlenir. Relatif standart eğri yönteminde her çalışma için standart eğri oluşturmak gerekirken kalibratör kullanılan karşılaştırmalı Ct metodunda her çalışma için standart eğriye gerek duyulmaz. Relatif kantitasyon telomerik DNA ürününün (T) genomda tek kopya olarak bulunan referans gen (S)'e bölünerek T/S oranı(ratio) hesaplanır(79).

## 2.2 CELLFREE DNA Nedir?

Cell free DNA(cfDNA) ; insan plazma veya serumunda hücre dışı serbest çift sarmal DNA fragment yapıları ile karakterizedir.

Cell free DNA, hücrelerden apoptozis, nekrozis ve aktif sekresyon ile salınmaktadır ve plazma dışında idrar, BOS, tükürük ve plevral sıvıda da bulunmaktadır(80). CfDNA, somatik hücrelere ait; nokta mutasyonları, heterozigotluğun kaybını, mikrosatellit instabilitesini, genlerin metilasyon profil değişimlerini, ve kopya sayısı değişikliklerini saptayabilir(81).



CfDNA'nın dolaşıma nasıl katıldığı konusunda iki ana görüş vardır; aktif ve pasif salınım. Pasif salınım mekanizmasında, apoptik veya nekroze hücrelerden nükleer ve mitDNA'nın hücre destrüksiyonuna bağlı olarak salındığı düşünülmektedir. Aktif salınım mekanizması ise farklı hücre kültürü çalışmalarında rapor edilmiş olup hücrenin spontan olarak DNA sını salgıladığı öne sürülmektedir(82). Diğer bir görüş ise CfDNA fragmanlarının hücre dış yüzeyindeki fosfolipidlere veya düzenleyici proteinlere bağlı olarak bulunduğu(83) ve hücre yüzeyinde bulunan DNA bağlayıcı proteinlerin, DNAaz gibi enzimlerle hidrolize edilmesi durumunda, DNA fragmanlarının dolaşıma salındığı düşünülmektedir(80). Yine özellikle hematopoetik hücreler aktif olarak cfDNA fragmentlerini salgıtmaktadır ve bunun hücreler arası iletişim görevi görmekte olduğu düşünülmektedir(80).

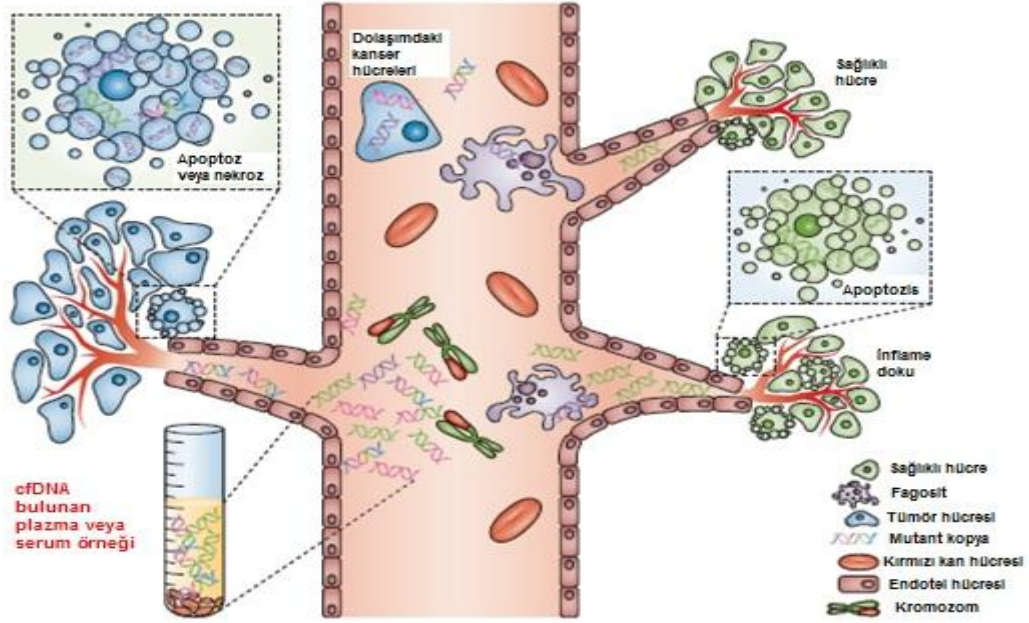
Tümör hücrelerinin DNAlarını nasıl ve neden salgıladığı konusunda farklı görüşler mevcuttur. Bir görüşe göre; kanser hücreleri mutant DNAlarını farklı yerlerdeki şüpheli hücrelerin transformasyonunu sağlamak için salgıladığıdır ve cfDNA aynı zamanda dolaşımdaki kanser hücrelerinden de salınmaktadır(82).

CfDNA fragman boylarının 150-180bp olması, apoptotik hücre ölümüne( nükleozomlar arasından kesilme) bağlı olabileceğini düşündürmektedir(84). Ancak hücre nekrozuna bağlı olduğu düşünülen 21kb uzunluğunda da cfDNA fragmenti saptanmıştır(85).1000 bp üzerindeki cfDNA fragmanlarının dolaşımdaki eksosomlara veya tümör nekrozisine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak yinede bu DNAların orijini net olarak ortaya konamamıştır(86).

CfDNA fragmentleri sağlıklı kişilerde de bulunabilir ancak konsantrasyonunun 1-10 ng/ml<sup>-1</sup> geçmediği bildirilmiştir(13). Kanser, miyokard enfarktüs, Sistemik lupus eritemozus, inme, sepsis, travma, hemodiyaliz ve gebelik cfDNA'nın konsantrasyonunu değiştirmektedir(80,87).

CfDNA'nın dolaşımdaki yarılanma ömrü 16 dakika ile 2,5 saat arasında olup dolaşımdaki nükleazlarca parçalanmaktadır. Plazma ve idrar arasında fragment

boyunun farklı olması idrardaki yüksek nükleaz aktivitesiyle ilişkilendirilmektedir(87).



**Şekil 14. CfDNA nın aktif ve pasif olarak kana salınımı (82)**

### 2.2.1 CT DNA Kanser

CfDNA analizlerinde saptanan mutasyonların kanser için spesifik markırlar olduğunun görülmesiyle cfDNA teriminin yerini circulating tumor DNA(ctDNA) almıştır(87). Ancak diğer hastalıklar için henüz spesifik bir marker bulunamamıştır(80).

CtDNA ve dolaşımdaki tümör hücreleri(CTC); tümör dokusunun ve diğer organlardaki metastazların homojen moleküler bir göstergesi olduğu bildirilmektedir(82).

Dolaşımdaki kanser ve fetüs orijinli cfDNA fragment profilinin normal hücrelere ait cfDNA dan daha kısa olduğu ve bu farklılığın size tabanlı moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ile kanser ve prenatal tanı testlerinde kullanılabileceği bildirilmiştir(86).

Akciğer kanserine spesifik LOH mutasyonlarını saptamada CtDNA analizlerinin biyopsi materyali analizleri kadar yüksek spesifiklikte olduğu saptanmıştır(88).Yine; tp53 geni kodon 249 mutasyonları aflotoksin maruziyetine bağlı gelişir ve bu mutasyon aflotoksin için çok spesifik olup, plazmalarında mutasyon saptanan kişilerde Hepatosellüler kanser gelişeceğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir(81).

### **2.2.2 CELL FREE DNA Tarihçe**

Dolaşımdaki serbest nükleik asitlerin varlığı ilk olarak 1948 de Mandel ve Metais tarafından insan plazmasında keşfedilmiştir(89). Radyoterapi gören kanser hastalarından kan serumlarında cfDNA nın yüksek olduğu ve tümör markır olarak kullanılabileceği 1977 yılında Leon ve ark. tarafından saptanmıştır(90). 1989 da Stroun ve ark. kanser hastalarının plazmalarındaki cfDNA nın orjininin kanser olduğunu ve neoplastik karakter taşıdığını rapor etmiştir(85). 1991 de Sidranfky ve ark. p53 mutasyonuna sahip invaziv mesane kanserli hastaların idrarında cfDNA sında aynı mutasyonu saptamışlardır(91). Sözkonusu çalışma ile likid biyopsinin temelleride atılmıştır(87).

Fetal DNA nın maternal plazmada 1997 yılında saptanması ile cfDNA prenatal tanıda yerini almıştır. Non invaziv prenatal testler (NİPT) 2007 de tanımlanmış olup klinik kullanıma hızla dahil olmuştur. NİPT ile anöploidi, cinsiyet tespiti(cinsiyete bağlı kalıtılan hastalıklar için), monogenik hastalıkların prenatal taraması yapılabilir(87).

### **2.2.3 CTDNA'nın Kanserde Kullanım Amaçları**

Likid biyopsi ile cfDNA ve dolaşımdaki kanser hücrelerinin onkolojideki başlıca kullanım alanları gün geçtikçe artmaktadır.

#### **2.2.3.1 CtDNA'nın Evre Ve Prognoz İle İlişkisi**

Kanser hastalarının dolaşımdaki ctDNA konsantrasyonunun kanser evre ve boyutuyla korelasyonu saptanmıştır. Bilinen kansere spesifik mutasyon kantifikasyonun çalışmalarında Evre 1 hastaların 5ml plazmasındaortalama 10 mutant kopya varken, ileri evre prostat, over,kolon kanseri hastalarının ortalama

5ml plazmasında 100-1000 kopya saptanmış ancak aynı kanser tipi ve evreye ait olan hastaların ctDNA konsantrasyonlarının değişken olduğu görülmüştür(87).

Yine yapılan çalışmalarla ctDNA kanser hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yüksek konsantrasyonda saptanmıştır ancak bunun için bir cut off değeri belirlenememiştir(84).

Yine saptanabilir ctDNAya sahip kolon kanserli hastaların 2 yıl süreli sağkalımları saptanmayanlara göre daha düşüktür(87).

### **2.2.3.2 CtDNA' nın Tanı Ve Erken Tanıdaki Yeri**

Kanserin erken evrede veya metastaz yapmadan saptanması hastanın küratif tedavisini sağlayıp, uzun süreli sağkalımını artırır. cfDNA biyopsi yapılamayan hastalarda tümör dokusuna ait mutasyonları gösterebilir(84). Yapılan çalışmalarda plazmalarında KRAS mutasyonu tespit edilen mesane kanserli hastaların kanser tanısından yaklaşık 2 yıl(20-14ay) öncesine kadar tükürük ve plazmada mutasyonların saptanabildiği gösterilmiştir(81). Yine NIPT testiyle hamile kadınlarda insidental olarak erken evre over kanserleri saptanmıştır(87).

Yine kronik obstrüktif akciğer hastalığı(KOAH) olan hastalarda yapılan çalışmada, dolaşımda CTC saptanan hastaların 1-4 yıl içerisindeki BT kontrollerinde cerrahiye izin veren erken evre akciğer kanserleri saptanmıştır(92).

Evre 1 hastalarda ctDNA saptanma oranı %47 olarak bildirilmiştir. Sensiviteyi artırıp, CtDNA'nın erken tanıda kullanılabilmesi için cfDNA içindeki ctDNA'nın ayrılması veya miktarının artırılması gerekmektedir. CtDNA'nın size farkı veya CTClerin plazmadan özel filtreler ile toplanarak analizlerin yapılmasının spesiviteye çözüm olabileceği düşünülmektedir(87,93).

Ayrıca sağlıklı insanlarda, güneşe maruz kalan bölgelerden yapılan cilt biyopsi örneklerinde düşük de olsa tp53 ve kras mutasyonları saptanmıştır(94).

### **2.2.3.3 CtDNA'nın Primeri Belli Olmayan Kanserdeki Yeri**

Primeri bilinmeyen kanserlerde kanser lokalizasyonunu saptamada ctDNA doku spesifik bilgiler taşıdığı öngörülmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda genotipik mutasyonlara bakılmaksızın, cfDNA'nın protein-DNA etkileşimlerinden hücre tiplerini belirlemede kullanılabileceği ve potansiyel biyopsi materyali olarak kullanılabileceği belirtilmiştir(95). Metilasyon ve nükleozom paternlerinin tümör orijini belirlemede hücre spesifik bilgiler içerdiği saptanmıştır. NIPT testi sırasında farklı kromozom anomalileri olan hastanın, doku spesifik metilasyon profillerinden ctDNA'nın B lenfositlere ait olduğu saptanmış ve hastaya foliküler lenfoma tanısı konmuştur(87).

### **2.2.3.4 CtDNA'nın Kansere Takibindeki Yeri**

Küratif tedavi sonrası, Minimal Rezidüel Hastalık veya rekürrens için cfDNA'nın saptanmasının belirteç olabileceği düşünülmektedir(87). Minimal rezidüel hastalık; küratif tedavi sonrası, morfolojik olarak saptanamayacak veya klinik bulgu vermeyecek kadar düşük sayıda kanser hücrelerinin bulunması olarak tanımlanır. Kanser hücrelerinin uyku haline geçmesi olarak da tanımlanabilir ancak özellikle lösemilerde relaplardan sorumludur(96). Küratif tedavi sonrası CfDNA ile düşük veya yüksek riskli grup ayrımının yapılabileceği, adjuvan tedavilerin yerinde kullanılmasıyla gereksiz tedavilerin önüne geçilebileceği düşünülmektedir(87).

Metastatik meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada CTC ve kanser anjiteni 15-13 (CA15-13) e göre ctDNA'nın kemoterapiye cevabı ve relapsı değerlendirmede en erken ve spesifik belirteç olduğu gösterilmiştir(97).

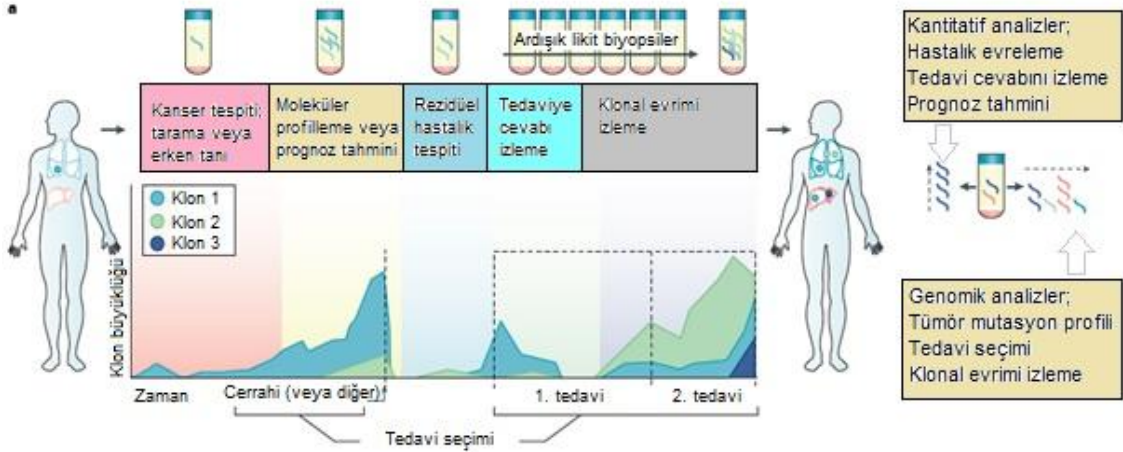
Farklı bir çalışmada erken evre meme kanserli hastaların küratif tedavi sonrası plazmalarında ctDNA saptanmasının metastatik relaps ile ilişkili olduğu ve klinik relapstan yaklaşık 8 ay önce saptanabildiği bildirilmiştir(98).

### 2.2.3.5 CtDNA' nınKanser Tedavisini İzlemede Yeri

CfDNA'nın yarılanma ömrünün çok kısa olması ve doku biyopsilerine göre likit biyopsilerin tekrarlanmasının kolaylığı, kanser tedavisine cevabı izlemede cfDNAyı ideal bir belirteç yapar. Aynı şekilde ctDNA konsantrasyonundaki değişimlerin tedavi etkinliğinin bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir(87). Hatta cfDNA kanserde tedaviye cevabı, en erken değerlendirebilen markır olabileceği düşünülmektedir(99).

Kanser kendi içinde farklı mutasyonlar ile gelişen subgruplar barındırır ve bu grupları çoğalmak için en iyi şekilde kullanmaktadır. Bu derece farklı somatik mutasyonlar barındıran kanserin, tedavi edilirken klonal evrimleşmesine sebep olunabilir(100). Murtaza ve ark yaptığı bir çalışmada metastatik meme kanserli hastanın tekrarlayan tümör ve plazma biyopsilerinde mutasyon profillerinin tedavi ile farklılaştığını, cfDNA'nın bu klonal evrimi tümör dokusuna göre daha iyi yansıttığını belirtmişlerdir(101). Bunun üzerine tedaviye direnç izleminde ctDNA'nın tümör dokusunun klonal evrimini izlemede ve direncin hangi mekanizmayla oluştuğunu göstermede kullanılabileceği bildirilmiştir ve yine ardışık likit biyopsiler aynı anda direnç mutasyonlarını ortaya koyup, farklı bir tedaviye geçilmesine olanak sağlayıp, hastaların duyarlı ve etkin tedavi almasını sağlayabilir(87).

Çok sayıdaki çalışmada, akciğer kanserlerinde tümör doku epidermal büyüme faktörü(EGFR) mutasyon profilinin likit biyopsiler ile korale olmasına dayanarak, US Food and Drug Administration ve European Medicines Agency, biyopsi materyali olmaması durumunda mutasyon analizin plazmadan yapılabileceğini onaylamışlardır(92).



**Şekil 15. CtDNA analizlerinin kanser tedavi ve takibinde kullanımı(87)**

#### 2.2.4 CELL-FREE DNA Elde Edilmesi Hakkında

Bazı kanser ve erken evre hastalıklarda ctDNA miktarı çok düşük olup cfDNA'nın nükleazlarca yıkılması sebebiyle miktarının dahada düşmesi moleküler testlerde özellikle kantitasyon çalışmalarında sonuçların sensitivitesini düşürmektedir(87). Heparinize kanın PCR reaksiyonunu inhibe etmesinden örnekler antikoagülanlı tüplere(EDTA) alınmalıdır(82). İlk santifürj kan alınmasını takiben birkaç saat içinde yapılmalıdır diğer kan hücrelerinin lizis olması cfDNA saflığını bozabilir. Santrifuj sonrası buffy coat germline DNA olarak kullanılabilir. cfDNA eldesi için serum yerine plazma kullanılması daha etkilidir. Serumda da ctDNA vardır ancak serum hazırlanırken diğer kan hücrelerinin lizisine bağlı ctDNA saflığı bozulmaktadır(84,87).

### **3 YÖNTEM VE GEREÇLER**

#### **3.1 GEREÇLER**

##### **3.1.1 Etik izin**

Tez projemiz Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' nun 12.10.2014 tarih ve 21-24 sayılı etik kurul kararı ile onaylanıp(Ek 1), 2015 yılı 4/8 sayılı Fakülte Yönetim Kurulunda uygun görülerek uygulanmıştır. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TTU-2015-510 numaralı proje ile desteklenmiştir.

##### **3.1.2 Örneklem Seçimi ve Çalışmaya Alım Ölçütleri**

Çalışmamıza Ocak 2016- Kasım 2016 tarihleri arasında Çanakkale Devlet Hastanesine kanser hastalığı tanı veya tedavisi için başvurmuş, patolojik kanser tanısı konmuş, tümör örneklerine ulaşılabilen ve çalışmaya katılmayı kabul eden 40 kanser hastası dahil edilmiştir. 1 hastanın tümör doku örneğine ulaşılammıştır ve doku değerlendirmesinde çalışma dışı bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak kanser hastalığı veya şüphesi bulunmayan, yaş ve cinsiyet açısından olabildiğince benzer olan 18 yaş üstü, çalışmaya katılmayı kabul eden 20 kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Toplam çalışma grubu 40 hasta ve 20 kontrol grubu olmak üzere 60 kişiden oluşmaktadır. Bu çalışmaya katılan tüm kişiler, örnekleri alınmadan önce çalışma hakkında bilgilendirilip ve çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarını ve istediklerinde ayrılacaklarını belirten onam formu imzalatıldıktan sonra çalışmaya dahil edildiler.

##### **3.1.3 Doku ve Kan Örneklerinin Alınması ve Plazmanın Ayrıştırılması**

Her bir olgudan ön koldan 8-10 ml venöz kan örneği Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA) içeren tüplere alındıktan sonra yarım saat içinde 3800RPM de 10 dakika santrifüj edilerek plazma ve kan ürünlerine ayrılmıştır. Plazma ve kan örnekleri ayrı kryo tüplere aktarılarak daha sonra kullanılmak üzere -20 Cde saklanmıştır. Doku örnekleri, cerrahi olarak çıkarılan kanser dokusunundan patoloji örnekleri alındıktan sonra kalan materyalin, makroskopik tümör alanından alınmıştır.



### 3.1.4 Cihazlar

- Real Time PCR (Light Cycler 2.0-Roche)
- Otomatik İzolasyon Cihazı (MagNA Pure Compact-Roche)
- Santrifüj (Rotofix 32A- Hettich)
- Mikrosantrifüj ( Mikro 120-Hettich)
- Nanodrop(Nanophotometer, Implen)
- Derin dondurucu(Uğur)
- Isıtıcı blok (Eppendorf)
- Vorteks (IKA Vortex Genius 3)
- Otomatik pipet seti (Eppendorf Research plus 1-10 µl,10-100µl ve 100-1000µl)

### 3.1.5 Sarf malzemeler

- Manuel Nükleik Asit İzolasyon kiti: Qiagen QiAMP DNA Blood Mini Kit, Roche Highpure PCR Template Preparation Kit, Qiagen QiAMP DNA tissue Kit
- MagNA Pure Compact otomatik Nükleik Asit İzolasyon Kiti, Roche
- LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany ref12 239 264 001)
- Human Genomic DNA(Roche,USA ref11 691 112 001)
- Kapiller (Light Cycler Kapiller 20µl)
- EDTA'lı tüp
- 2ml steril ependorf tüpleri
- Steril, filtreli 10 µl,100 µl,ve 1000 µl pipet uçları
- Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

### 3.1.6 Primerler

Çalışmamızda daha önce Richard Cawthon tarafından dizyan edilmiş olan primer setleri kullanıldı(73). Kromozomlarda tek kopya olarak bulunan ve psödogeni bulunmayan betaglobulin geni referens gen olarak seçildi. Primerler standart HPLC yöntemi ile sentez edilerek kuru şekilde teslim alındı.(ThermoFisher-scientific)

Telomere primerleri dizisi;

Tel1;5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'  
Tel2;5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'

Beta globulin primerleri dizisi;

HBG1;5'-GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC-3'  
HBG2;5'-CACCAACTTCATCCACGTTTACC-3'

## **3.2 YÖNTEM**

### **3.2.1 DNA izolasyonu**

#### **3.2.1.1 Plazmadan DNA izolasyonu**

Plazma örneklerinden DNA izolasyon kitlerini ve plazma miktarlarını karşılaştırmak amacıyla aynı plazma örneği 2 farklı miktar(200µl ve 400µl) ve 3 farklı izolasyon kitiyle izole edildip DNA konsantrasyonları karşılaştırıldı ve çalışmaya Highpure PCR Template Preparation Kiti ile devam edilmesine plazma miktarının ise 200 µl olmasına karar verildi. DNA izolasyonu kullanılarak üreticinin kan ve vücut sıvılarından DNA eldesi protokolüne göre gerçekleştirilip, spin kolon yöntemi kullanılmıştır. Farklı olarak son basamakta 25 µl AE buffer eklenmiştir. . DNA konsantrasyonları 5-30ng/µl arasında olacak şekilde dilüe edilip -20<sup>0</sup>C ye kaldırılmıştır.

#### **3.2.1.2 Kandan DNA izolasyonu**

Highpure PCR Template Preparation Kiti kullanılarak üreticinin kan ve vücut sıvılarından DNA eldesi protokolüne göre gerçekleştirilip, spin kolon yöntemi kullanılmıştır. DNA konsantrasyonları 5-30ng/µl arasında olacak şekilde dilüe edilip -20<sup>0</sup>C ye kaldırılmıştır.

#### **3.2.1.3 Dokudan DNA izolasyonu**

Qiagen tissue kiti kullanılarak üreticinin dokudan DNA eldesi protokolüne göre gerçekleştirilip, spin kolon yöntemi kullanılmıştır. DNA konsantrasyonları 5-30ng/µl arasında olacak şekilde dilüe edilip -20<sup>0</sup>C ye kaldırılmıştır.

## **3.2.2 Q-PCR Yöntemi ile Telomer Uzunluğu Ölçümü**

### **3.2.2.1 Standartların Hazırlanması**

Human Genomic DNA standart eğri için, telomere ve betaglobulin çalışmalarında kullanılmak üzere 3 farklı konsantrasyonda PCR çalışmasına alındı.(17.5/35/70ng/µl)

Relatif kantitasyon çalışmalarında hedef ve referans gen Q-PCR çalışması için PCR verimliliği(efficiency) belirtilmelidir. PCR verimliliğini hesaplamak için çalışmaya standart eğri eklenebilir veya daha önce oluşturulan standart eğri çalışmaya import edilir veya verimlilik 2(E=2) olarak ayarlanabilir.

Real-time Q-PCR çalışmalarında maksimum verimlilik elde edilmesi çok önemlidir. Standart eğri ile reaksiyon parametreleri ve verimliliği hakkında bilgi edinilir. Verimlilik düşükse sonuçları etkileyebilir. Özellikle monochrome monoplex çalışmasında Telomer ve Tek Kopya genin farklı yürümlerde değerlendirilmesi, değişkenliği arttırmaktadır. Çalışmalar arası değişkenliği en aza indirmek ve sonuçları diğer yürümlerle standardize etmek için, standartların ng ortalaması çalışmaya kalibratör olarak koyuldu. Tüm çalışmalarda kalibratör olarak Human Genomic DNA(Roche) kullanıldı. Kalibratör ile normalize edilen çalışmalarda her çalışmada standart eğri gerekli değildir. Örneklerin hedef/referans gen ratioları kalibratör hedef/referans gen ratio ile normalize edildiğinden sonuçlar sadece hedef ve referans genin farklı PCR verimliliklerinden etkilenmektedir.bunu ortadan kaldırmak için analiz edilirken PCR verimliliği 2 olarak ayarlanabilir.

### **3.2.2.2 Numunelerin Telomer ve Betaglobulin PCR çalışmasına alınması**

HPLC ile sentez edilen primerler 100 pmol/µl ana stoklar halinde sulandırıldı ve PCR için 10pmol/µl ara stoklar hazırlanarak -20°C'ye kaldırıldı.Numuneler telomer ve betaglobulin primerleri kullanılarak, Tablo 2'deki miktarlara uygun şekilde PCR çalışmasına alındı. Örnekler LightCycler 2.0 (Roche) cihazında çalışıldı.

**Tablo 2. PCR Çalışması Hazırlığı**

PCR Bileşenleri	Miktar
SYBR (10X)	1 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (final konst; 2mM)	0.4 $\mu\text{l}$
Primer F (stok 10pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,3 $\mu\text{l}$
Primer R (stok 10pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,3 $\mu\text{l}$
DNA	30ng
Distile su	10 $\mu\text{l}$ ye tamamlayacak şekilde
TOPLAM	10 $\mu\text{l}$

Çalışmaların, Tablo 3 ve 4'te belirtilen programlar kullanılarak Real-time PCR(Roche Lightcycler2.0) cihazında kantifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler duplike çalışıldı.

**Tablo 3. Telomer Kantitasyon Protokolü**

Programın adı	Hedef sıcaklık (°C)	Kazanma modu	Süre	Siklus	Analiz modu	
Preinkübasyon	95	Yok	10 dk	1	Yok	
Amplifikasyon				25	Kantifikasyon	
	95	Yok	10s			
	58	Yok	1dk			
	72	Tek	10s			
Erime eğrisi	95	Yok	5	1	Erime eğrisi	
	40	Yok	1dk			
	97	Cont	-			

**Tablo 4. Betaglobulin Kantitasyon Protokolü**

Programın adı	Hedef sıcaklık	Kazanma modu	Süre	Siklus	Analiz
---------------	----------------	--------------	------	--------	--------

	(°C)				modu
<b>Preinkübasyon</b>	95	Yok	10 dk	1	Yok
<b>Amplifikasyon</b>				35	Kantifikasyon
	95	Yok	10s		
	56	Yok	15s		
	72	Tek	10s		
<b>Erime eğrisi</b>	95	Yok	5s	1	Erime eğrisi
	40	Yok	1dk		
	97	Cont	-		

### 3.2.2.3 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Yöntemi ile Kantitatif Telomer Uzunluğu Değerlendirilmesi

PCR verimliliği %100 kabul edildiğinde telomer/single copy gene (T/S)oranı şu şekilde hesaplanmaktadır:

$$T/S \text{ ratio} = [2^{Ct(\text{telomer})} / 2^{Ct(\text{beta globin})}]^{-1} = [2^{[Ct(\text{telomer}) - Ct(\text{beta globin})]}]^{-1} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = [Ct(\text{telomer}) - Ct(\text{beta globin})]$$

$$\text{Relatif T/S ratio} = 2^{-(\Delta Ct1 - \Delta Ct2)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_T - \Delta Ct_{\text{kalibratör}}$$

Analizler LightCycler Software 4.1 de kanal 530 da Relative Quantification Monocolor ile analiz edildi.

Her bir örneğin telomer uzunluğu hesaplaması  $\Delta Ct$  [Ct (telomer)/Ct (tek kopya gen)] yöntemi ile telomer(T)-tek kopya gen(S) oranı (T/S ratio) hesaplandı. Örneklerin T/S oranı kalibratör T/S oranı ile normalize edilerek ( $2^{-(\Delta Ct_k \Delta Ct_s)} = 2^{-\Delta\Delta Ct_s}$ ) relatif T/S oranı belirlendi. Sonuçlar kalibratörün  $n$  katı olarak belirlendi. Örneğin telomer Ct değeri 20.94, beta globulin Ct değeri 27.43olan bir hastanın retelif telomer uzunluğu şu şekilde hesaplanır(kalibratör telomer Ct 21.15, kalibratör beta globulin Ct 27.49).

$$T/S \text{ Ratio} = (2^{20.94} / 2^{27.43})^{-1} = 2^{27.43} / 2^{20.94} = 180822629,8 / 2011722,666 = 89,88447205$$

Kalibratör T/S Ratio =  $(2^{21.15} / 2^{27.49})^{-1} = 2^{27.49} / 2^{21.15} = 81,00842201$

Relatif T/S Ratio =  $89,88447205 / 81,00842201 = 1,1$

Sonuç olarak örnek, kalibratörün 1,1 katı olarak saptanmıştır.

### 3.3 Sonuçların İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 19.0 paket programı ile değerlendirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadıklarına bakıldıktan sonra; normal dağılım göstermeyenler için Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. Kategorik özellik taşıyan veriler için ki-kare testi kullanılıp, sayısal değişkenler arasındaki ilişki Spearman'ın korelasyon katsayısı hesaplanarak değerlendirilmiştir.  $P < 0,05$  olduğunda İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma, min ve max değerleri olarak verilmiştir.

## 4 BULGULAR

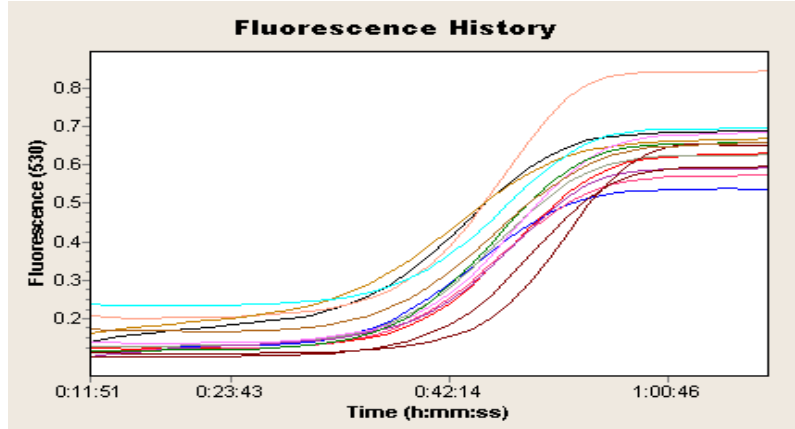
### 4.1 DNA izolasyon sonuçları

40 hasta ve 20 kontrolün kan, plazma ve tümör dokusundan elde edilen DNA'nın saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek amacı ile örnekler nanodrop ile ölçüm yapıldı DNA miktarları 5-30 ng/μl olacak şekilde seyreltildi. Örneklerin saflık derecesini gösteren 260/280 oranının 1.2 ile 1.6 arasında yoğunlaştığı görüldü.

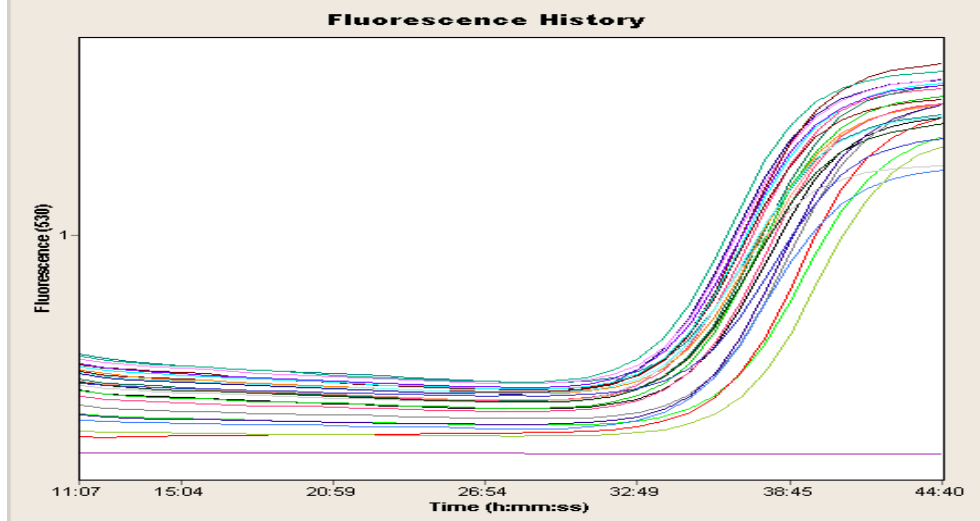
### 4.2 Katılımcıların Kantitatif Telomer Uzunluğu Ölçümü Sonuçları

Q-PCR ile telomer ölçümünde; telomerik tekrarlara primerlerin bağlanıp oluşan ürünlerin kantitasyonu ile telomer uzunluğunun saptanabilmesidir. Telomerik tekrarlar arttıkça bağlanan primer sayısı ve buna bağlı ürün sayısı artacaktır.

Hastalara ait telomer ve betaglobulin çalışması amplifikasyon eğrileri şekil 16 ve 17'de gösterilmiştir.

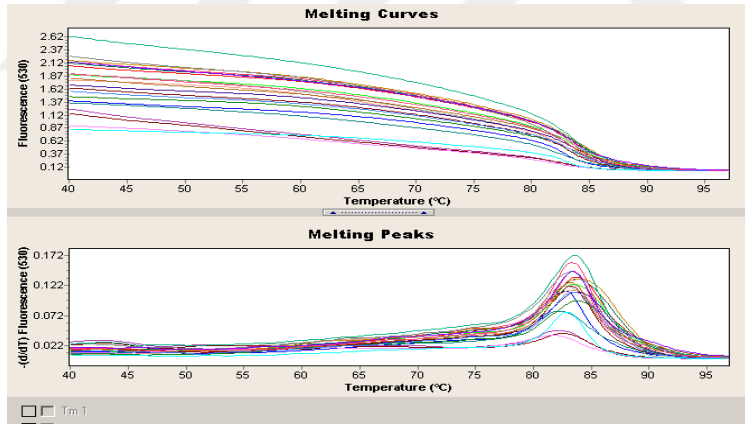


Şekil 16. Telomerik Teakar Ürünlerinin Amplifikasyon Eğrileri



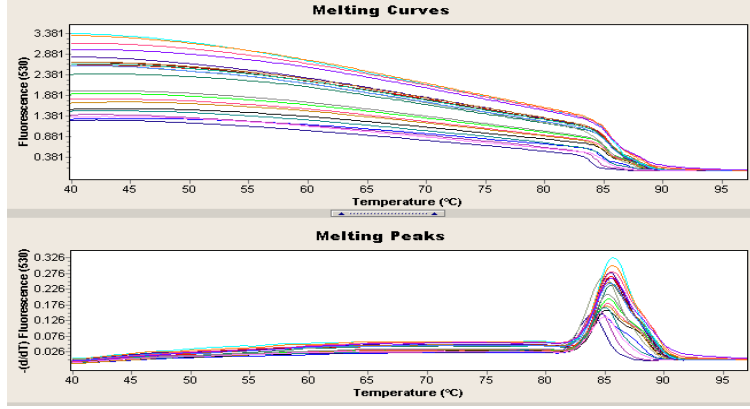
**Şekil 17. Betaglobulin Gen Ürünlerinin Amplifikasyon Eğrileri**

Sybergreen kullanımına ait primer dimerizasyon veya non spesifik bağlanma kontrolü için erime eğrisi analizi sonuçları Şekil18 ve 19 da gösterilmiştir. Tüm örnekler aynı erime noktasında toplanmıştır.



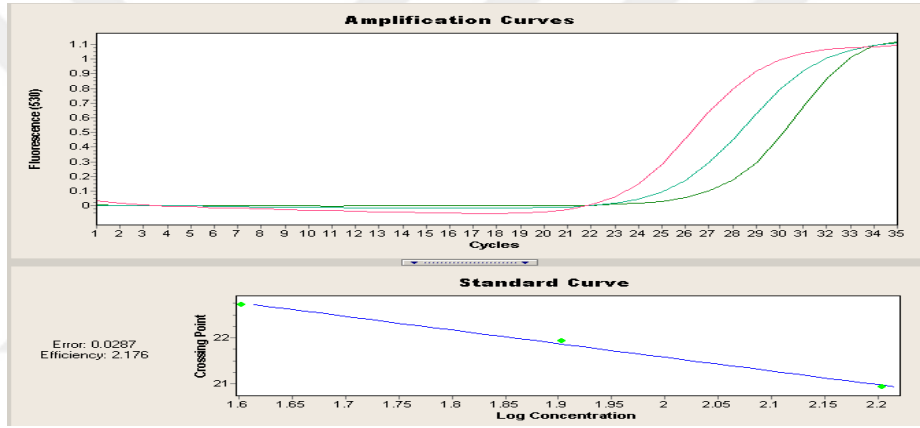
**Şekil 18. Telomer Çalışması Erime Eğrisi Analiz Görüntüsü**



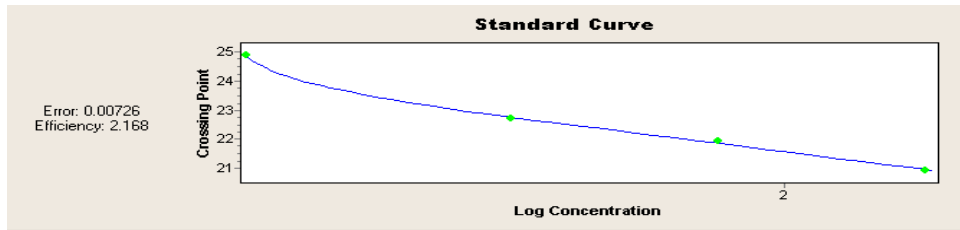


**Şekil 19. Betaglobulin Çalışması Erime Eğrisi Analiz Görüntüsü**

Çalışmalarla ait Standart Eğri ve Görüntüleri Şekil 20 ve 21'de gösterilmiştir



**Şekil 20. Telomer Çalışmasına Ait Standart Eğri Görüntüsü**



**Şekil 21. Betaglobulin Çalışmasına Ait Standart Eğri Görüntüsü**

#### 4.2.1 Katılımcıların Demografik Özellikleri

Katılımcıların %66,7' si (n:40) hasta, %33,3' ü (n:20) kontrol grubu olarak yer almaktadır. Tüm katılımcıların %61,7' si (n:37) kadın, %38,3' ü (n:23) erkektir (Tablo-5).

Tablo 5. Katılımcıların Sayı ve Cinsiyet Dağılımları

	N	%
Katılımcılar		
Hasta	40	66,7
Kontrol	20	33,3
Cinsiyet		
Kadın	37	61,7
Erkek	23	38,3

Katılımcıların tamamının yaş ortalaması  $56,9 \pm 13,7(33-88)$  olduğu gözlenmiştir. (tablo-6-)

Tablo 6. Katılımcıların Yaş Dağılımları

	N	Ortalama	SS	Min-Max
Yaş	60	56,9	13,7	33-88

#### 4.2.2 Katılımcıların Klinik Özellikleri

Katılımcıların plazma relatif T/S ratio ortalaması  $0,32 \pm 0,51(0,02-3,17)$ , tam kan relatif T/S ratio ortalaması  $1,9 \pm 1,7(0,13-11,50)$  olduğu gözlenmiştir. (tablo-7)

Tablo 7. Katılımcıların Tam Kan ve Plazma Relatif T/S Ratio Değerleri

	n	Ortalama	SS	Min-Max
Plazma relatif T/S ratio	60	0,32	0,51	0,02-3,17
Tam kan relatif T/S ratio	60	1,9	1,7	0,13-11,50

#### 4.2.3 Hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması

Katılımcıların ölçüm değerleri açısından hasta ve kontrol grubu değerlendirmesinde kontrol grubunun 20 kişi olması nedeniyle karşılaştırmalarda parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Katılımcıların sayımsal değerlerinin hasta ve kontrol grubu açısından karşılaştırılması ki-kare testi ile yapılmıştır.

Hasta olan grubun %60'ı (n:24) kadın, %40' ı erkek (n:16); kontrol grubunun %65' i kadın, %35' i erkek olup; grupların karşılaştırılmasında cinsiyet sıklıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı gözlenmiştir (p:0,707).

Tablo 8. Hastaların Cinsiyetlere Göre Dağılımı

	Hasta		Kontrol		P
	n	%	n	%	
Cinsiyet					
Kadın	24	60	13	65	0,707
Erkek	16	40	7	35	

Ki kare testi, n:sayı,

#: sütun yüzdesi

Hasta olan grubun yaş ortalaması  $59 \pm 15(33-88)$ , ortanca değeri 58; kontrol grubunun yaş ortalaması  $52,8 \pm 9,5(36-67)$ , ortanca değeri 54,5 olup yapılan karşılaştırmada gruplar arasında yaş ortanca değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı gözlendi (p:0,126).

Tablo 9. Hasta ve Kontrol Grubun Yaş Dağılımları

	n	Ortalama	SS	Ortanca	Min-Max	p
Yaş						
Hasta	40	59,0	15,0	58,0	33-88	0,126
Kontrol	20	52,8	9,5	54,5	36-67	

Mann-Whitney U testi

Hasta olan grubun plazma relatif T/S ratio ortalaması  $0,45 \pm 0,58$ , ortanca değeri 0,26; kontrol grubunun plazma relatif T/S ratio ortalaması  $0,04 \pm 0,03$ , ortanca değeri 0,04 olup yapılan karşılaştırmada hasta olan grubun plazma relatif T/S ratio ortanca değerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ( $p < 0,001$ ).

Tablo 10. Hasta ve Kontrol Grubun Plazma Telomer Uzunlukları Karşılaştırması

	n	Ortalama	SS	Ortanca	Min-Max	P
Plazma relatif T/S ratio						
Hasta	40	0,45	0,58	0,26	0,02-3,17	<0,001
Kontrol	20	0,04	0,03	0,04	0,02-0,13	

Mann-Whitney U testi

Hasta olan grubun tam kan relatif T/S ratio ortalaması  $1,94 \pm 1,96$ , ortanca değeri 1,39; kontrol grubunun tam kan relatif T/S ratio ortalaması  $1,92 \pm 1,09$ , ortanca değeri 1,71 olup yapılan karşılaştırmada gruplar arasında tam kan relatif T/S ratio ortanca değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı gözlemlendi ( $p:0,380$ ).

Tablo 11. Hasta ve Kontrol Grubun Tam Kan Telomer Uzunlukları Karşılaştırması

	n	Ortalama	SS	Ortanca	Min-Max	p
Tam Kan Relatif T/S Ratio						
Hasta	40	1,94	1,96	1,39	0,13-11,50	0,380
Kontrol	20	1,92	1,09	1,71	0,30-4,21	

Mann-Whitney U testi

#### 4.2.4 Hasta grubunun özellikleri

Hasta grubunun %40' ının (n:16) meme, %40' ının (n:16) kolon, %7,5' unun (n:3) mide, %5' inin (n:2) rektum, %2,5' unun (n:1) testis, %2,5' unun (n:1) akciğer, %2,5' unun (n:1) tiroid kanseri olduğu gözlemlendi (Tablo-12).

Tablo 12. Hasta Grubun Kanser Tipine Göre Dağılımı

	N	%
Kanser Türü		
Meme	16	40
Kolon	16	40
Mide	3	7,5
Rektum	2	5
Testis	1	2,5
Akciğer	1	2,5
Tiroid	1	2,5

Doku relatif T/S ratio değeri yalnızca hasta olan grupta ölçülmüş olup 1 hastada ölçülmemiştir. Hastaların ortalama doku relatif T/S ratio değeri  $0,85 \pm 0,48$  olup, ortanca değeri 0,92 olarak ölçülmüştür (Tablo-13).

Tablo 13. Hasta Grubun Relatif T/S Ratio Değerleri

	n	Ortalama	SS	Min-Max
Doku Relatif T/S Ratio	39	0,85	0,48	0,03-2,20

#### 4.2.5 Hasta grubunun yaş ve klinik değerlerinin korelasyonu

Hasta grubundaki katılımcı sayısının 40 olması nedeniyle klinik ve demografik değişkenlerin korelasyonu öncesinde normal dağılıma uygunluk testi yapılmıştır. Yapılan Shapiro-Wilk normal dağılım testine göre yaş ve doku relatif T/S ratio değerlerinin normal dağılıma uyduğu gözlenmekle birlikte plazma ve kan relatif T/S ratio değerlerinin normal dağılıma uymadığı gözlemlendi. Bu nedenden dolayı Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Korelasyon testi sonucunda hasta grubunda yaş ile birlikte kan relatif T/S ratio değerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde negatif yönde orta güçlülükte korelasyonun olduğu gözlemlendi ( $r:-0,467$ ,  $p:0,002$ ). (Grafik 1) Grubun kendi içerisinde plazma,

kan ve doku relatif T/S ratio değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde korelasyon göstermediği gözlemlendi (Tablo-14).

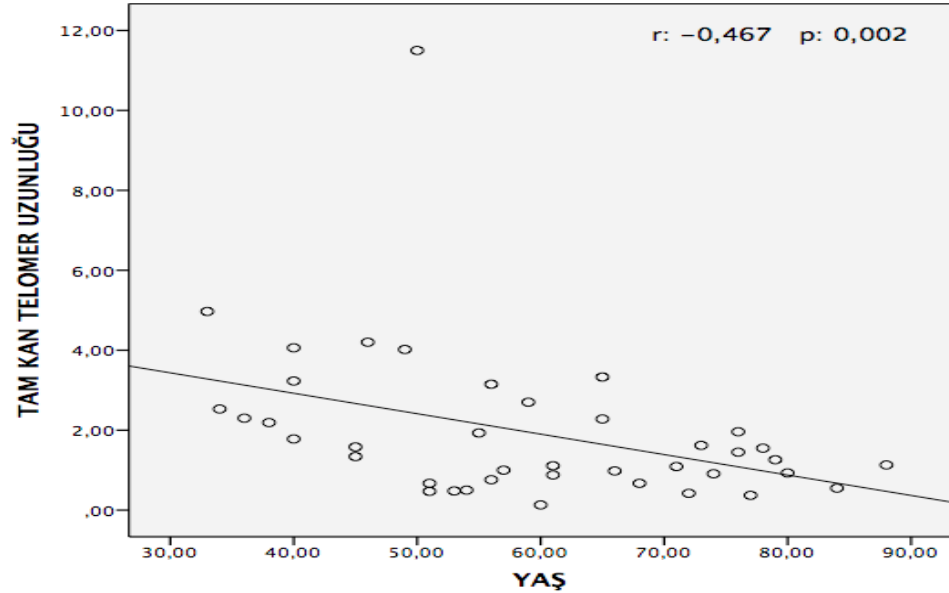
Tablo 14. Hasta Grubun Plazma, Tam Kan ve Doku Relatif T/S Ratio Değerlerinin Yaşı Göre Korelasyonu

	n		Yaş	Plazma Ratio	Kan Ratio	Doku Ratio
Yaş		R	1,000			
	40	p				
Plazma Ratio		R	0,091	1,000		
	40	p	0,578			
Tam Kan Ratio		R	-0,467**	0,002	1,000	
	40	p	0,002	0,990		
Doku Ratio		R	0,162	-0,149	-0,082	1,000
	39	p	0,325	0,365	0,618	

Spearman Korelasyon Testi

\*\* p değeri <0,01

Grafik 1. Hastalara ait Tam Kan Telomer uzunluklarının Yaşı Göre Dağılımı



#### 4.2.6 Hasta grubunun kanser tiplerinin plazma, tam kan ve doku relatif T/S ratio açısından karşılaştırılması

Hasta grubunda meme kanseri olan katılımcıların plazma relatif T/S ratio ortalaması  $0,26 \pm 0,29$ , ortanca değeri 0,08; testis kanseri olan katılımcının plazma relatif T/S ratio ortalaması 0,75, ortanca değeri 0,75; kolon kanseri olan katılımcıların plazma relatif T/S ratio ortalaması  $0,64 \pm 0,76$ , ortanca değeri 0,45; mide kanseri olan katılımcıların plazma relatif T/S ratio ortalaması  $0,64 \pm 0,85$ , ortanca değeri 0,27; akciğer kanseri olan katılımcının plazma relatif T/S ratio ortalaması 0,02, ortanca değeri 0,02; rektum kanseri olan katılımcıların plazma relatif T/S ratio ortalaması  $0,43 \pm 0,58$ , ortanca değeri 0,43; tiroid kanseri olan katılımcının plazma relatif T/S ratio ortalaması 0,02, ortanca değeri 0,02 olup kanser türlerinin ile plazma relatif T/S ratio ortanca değerlerinin karşılaştırılması neticesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı gözlemlendi ( $p:0,155$ ) (Tablo-15).

Tablo 15. Kanser Tipine Göre Plazma Örneklerinin Telomer Uzunlukları Karşılaştırması

	n	Ortalama	SS	Ortanca	Min-Max	p
Plazma Relatif T/S Ratio						
Meme kanseri	16	0,26	0,29	0,08	0,03-0,85	
Testis kanseri	1	0,75	-	0,75	-	
Kolon kanseri	16	0,64	0,76	0,45	0,02-3,17	0,155
Mide kanseri	3	0,64	0,85	0,27	0,04-1,62	
Akciğer kanseri	1	0,02	-	0,02	-	
Rektum kanseri	2	0,43	0,58	0,43	0,02-0,85	
Tiroid kanseri	1	0,02	-	0,02	-	

Kruskal- Wallis Testi

Hasta grubunda meme kanseri olan katılımcıların tam kan relatif T/S ratio ortalaması  $1,90 \pm 1,39$ , ortanca değeri 1,68; testis kanseri olan katılımcının tam kan relatif T/S ratio ortalaması 0,75, ortanca değeri 0,75; kolon kanseri olan katılımcıların tam kan relatif T/S ratio ortalaması  $1,98 \pm 2,63$ , ortanca değeri

1,19; mide kanseri olan katılımcıların tam kan relatif T/S ratio ortalaması  $0,52 \pm 0,13$ , ortanca değeri 0,47; akciğer kanseri olan katılımcının tam kan relatif T/S ratio ortalaması 4,20, ortanca değeri 4,20; rektum kanseri olan katılımcıların tam kan relatif T/S ratio ortalaması  $1,85 \pm 1,20$ , ortanca değeri 1,85; tiroid kanseri olan katılımcının tam kan relatif T/S ratio ortalaması 0,02, ortanca değeri 0,02 olup kanser türlerinin ile tam kan relatif T/S ratio ortanca değerlerinin karşılaştırılması neticesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı gözlemlendi ( $p:0,119$ ) (Tablo-16).

Tablo 16. Kanser Tipine Göre Tam Kan Örneklerinin Telomer Uzunlukları Karşılaştırması

	n	Ortalama	SS	Ortanca	Min-Max	N
<b>Tam Kan Relatif T/S Ratio</b>						
Meme kanseri	16	1,90	1,39	1,68	0,13-4,97	
Testis kanseri	1	2,30	-	2,30	-	
Kolon kanseri	16	1,98	2,63	1,19	0,50-11,50	0,119
Mide kanseri	3	0,52	0,13	0,47	0,42-0,67	
Akciğer kanseri	1	4,20	-	4,20	-	
Rektum kanseri	2	1,85	1,20	1,85	1,00-2,70	
Tiroid kanseri	1	0,02	-	0,02	-	

Kruskal- Wallis Testi

Hasta grubunda meme kanseri olan katılımcıların doku relatif T/S ratio ortalaması  $0,89 \pm 0,60$ , ortanca değeri 0,95; testis kanseri olan katılımcının doku relatif T/S ratio ortalaması 2,30, ortanca değeri 2,30; kolon kanseri olan katılımcıların doku relatif T/S ratio ortalaması  $0,85 \pm 0,34$ , ortanca değeri 0,97; mide kanseri olan katılımcıların doku relatif T/S ratio ortalaması  $0,70 \pm 0,70$ , ortanca değeri 0,66; akciğer kanseri olan katılımcının doku relatif T/S ratio ortalaması 0,47, ortanca değeri 0,47; rektum kanseri olan katılımcıların doku relatif T/S ratio ortalaması  $0,92 \pm 0,57$ , ortanca değeri 0,92 olup kanser türlerinin ile doku relatif T/S ratio ortanca değerlerinin karşılaştırılması



neticesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı gözlemlendi (p:0,940). (Tablo-17).

Tablo 17. Kanser Tipine Göre Dokuların Telomer Uzunlukları Karşılaştırması

	n	Ortalama	SS	Ortanca	Min-Max	p
<b>Doku Ratio</b>						
Meme kanseri	16	0,89	0,60	0,95	0,12-2,20	
Testis kanseri	1	1,01	-	1,01	-	
Kolon kanseri	16	0,85	0,34	0,97	0,07-1,15	0,940
Mide kanseri	3	0,70	0,70	0,66	0,03-1,43	
Akciğer kanseri	1	0,47	-	0,47	-	
Rektum kanseri	2	0,92	0,57	0,92	0,52-1,33	
Tiroid kanseri	1	-	-	-	-	

Kruskal- Wallis Testi

#### 4.2.7 Hasta Grubun Tam Kan, Doku ve Plazma Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması

Katılımcılar arasından hasta olan grubun tam kan relatif T/S ratio ortalaması  $1,94 \pm 1,96$ , ortancası 1,39; doku relatif T/S ratio ortalaması  $0,85 \pm 0,48$ , ortancası 0,92; plazma relatif T/S ratio ortalaması  $0,45 \pm 0,58$ , ortancası 0,26 olup, doku ve plazma ratio değerleri karşılaştırmasında grupların birbirlerinden anlamlı şekilde farklı oldukları gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ) (Tablo-18).

Tablo 18. Hastaların Plazma Tam Kan ve Tümör Doku Telomer Uzunlukları

	n	Ortalama	SS	Ortanca	Min-Max
Tam Kan relatif T/S ratio	40	1,94	1,96	1,39	0,13-11,50
Doku relatif T/S ratio	39	0,85	0,48	0,92	0,03-2,20
Plazma relatif T/S ratio	40	0,45	0,58	0,26	0,02-3,17

Tablo 19. Hastaların Plazma Tam Kan ve Tümör Doku Telomer Uzunlukları Karşılaştırması

	n	Ki-Kare	df	p
Tam Kan-Plazma-Doku	39	30,821	2	<0,001

Friedman Testi

Ayrıntılı değerlendirmede Tam Kan ve plazma örneklerinin relatif T/S ratio değerleri arasında anlamlı farklılık olduğu, tam kan örnekleri relatif T/S ratio ortalamasının plazma örnekleri relatif T/S ratio ortalamasından yaklaşık 4,3 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde tam kan örnekleri relatif T/S ratio ortalamasının doku örnekleri relatif T/S ratio ortalamasından 2,2 kat daha fazla olduğu gözlenmiş olup, tam kan örnekleri relatif T/S ratio ortalamasının istatistiksel olarak anlamlı şekilde doku örnekleri relatif T/S ratio değerinden yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p:0,001$ ). Doku örnekleri relatif T/S ratio ortalaması plazma örnekleri relatif T/S ratio ortalamasından 1,8 kat daha yüksek olarak gözlenmiş olup, doku örnekleri relatif T/S ratio ortanca değeri plazma örnekleri relatif T/S ratio ortanca değerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ( $p:0,002$ ).

Tablo 20. Hastaların Plazma-Tam Kan-Doku Telomer Uzunluklarının İkili Karşılaştırılması

	Z	P
Tam Kan- Plazma	-4,731	<0,001
Tam Kan-Doku	-3,475	0,001
Doku-Plazma	-3,070	0,002

Wicoxon Testi

## 5 TARTIŞMA

Telomerler; ökaryotlarda lineer kromozomların uçlarını saran özel nükleoprotein başlıklardır. Telomerik DNA erozyonu veya telomerik proteinlerin disfonksiyonu sonucu, DDR yolakları aktive olup ve telomerler tamir edilir. Persistan DDR, tümör süpresör özellik olarak görülen replikatif senesensi uyarır. Çeşitli genetik defekt bulunduran (ör; p53 ve pRb defekti olan) hücreler yaşlanmaya rağmen bölünmeye devam ederlerse, telomer disfonksiyonu kaynaklı kromozom füzyon ve kırılmaları meydana gelir. Telomer disfonksiyonu kanserlerde sık görülen, sayısal ve yapısal kromozomal instabilite (CIN) ile sonuçlanır. Kromozomal instabilite karsinogenezisin ilk basamaklarında kilit öneme sahiptir. Yine telomer kısalması tüm genome metilasyonunu etkileyerek onkogen veya tümör süpresör bir genin ekspresyonunu değiştirebilir.

Somatik hücrelerde telomerlerin kısalması ve buna bağlı replikatif senesens'in; kontrolsüz hücre çoğalması ve malign transformasyonunun önüne geçiyor olması, telomerlerin tümör süpresör fonksiyonlarını desteklemektedir. Telomer disfonksiyonu kaynaklı kromozom füzyon ve kırılmaları da tümör süpresör bir genin heterozigotluğunu kaybetmesine (LOH) veya bir onkogenin amplifikasyonuna neden olabilir (39). Bununla da telomer disfonksiyonunun pro kanser genotip oluşumunu belirlediği noktadır.

Telomerlerin kısalması; subtelomerik bölgelerde H3K9 trimetilasyonunu, H3, H4 asetilasyonunu artırıp, DNA metilasyonunu azaltarak, defektif bir heterokromatin yapısına neden olur (25). Bununla birlikte telomer kısalmasına bağlı subtelomerik bölgelerin hipometilasyonu heterokromatin yapıların kaybına, buda telomerik DNA lar arasındaki rekombinasyonda (ALT) artışa neden olduğu saptanmıştır. Telomer kısalması hem epigenetik değişiklikler üzerinden karsinogenezisi tetikleyebilir, mevcut bir tümörün malignitesinde artışa sebep olabilir, ayrıca telomerler arasındaki rekombinasyon da kanserin progresyonunu arttırabilir.

Memeli telomerleri primidinden zengin yapılarından dolayı UV radyasyona daha sensitiftir. Bu durum güneşin ve radyasyonun karsinogenezdeki rolüyle ilişkili olabilir. Ayrıca radyoterapinin sekonder kanser oluşturma riski açısından önemli bir belirteç olabilir. Telomer kısalığı saptanan vakalar radyasyon etkilerine daha fazla maruz kalıyor olabilirler. Bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kanser tanı ve takibinde yeni ve ideal belirteç olan cfDNA, günümüzde artan çalışmalarla birlikte klinik kullanımda hızla likit biyopsi olarak yerini alıp, kanserin eş zamanlı takibini sağlayabileceğini göstermektedir. Plazma, serum ve diğer vücut sıvılarından elde edilebilen cfDNA'nın kanser hastalarında konsantrasyonunun arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (82,84,87,102). Ancak net bir cutoff değeri belirlenmemiştir. Örneğin yüksek ve düşük risk grubunun ayırımında akciğer kanseri için 36.6-117.8 ng/ml, prostat kanseri için ise 5.75-55 ng/ml konsantrasyon değerlerinin kullanılabileceği belirtilse de kişiden kişiye değişken olan bu değerlerin tanı ve takip için uygun olmadığı görülmektedir (103). Yinetümör dokularında görülen mutasyonlar, metilasyon ve mikrosatellit değişimleri tek başına kanser için spesifik değildir (103). Ancak telomerler bu konuda diğer değişkenlere üstün olabilir.

Bu çalışmanın en önemli avantajı ve günümüz literatüründeki diğer çalışmalara üstünlüğü kanser hastalarına ait tümör doku, tam kan ve cfDNA örneklerinin telomer uzunluklarının birbirleriyle karşılaştırılması ve kontrollerde de hem cfDNA hem de tam kan analizlerinin yapılmış olmasıdır.

Çalışmamızda katılımcıların %66,7'si (n:40) kanser tanısı olan hastalardan oluşmaktadır. Cinsiyetler açısından bakıldığında tüm katılımcılar arasında kadınların daha fazla olduğu gözlemlendi (%61,7). Katılımcıların yaş ortlaması ise  $56,9 \pm 13,7$  yıl idi.

### **Vaka Kontrol Karşılaştırması**

Vaka-kontrol grubunun yaş, cinsiyet gibi demografik özellikleri benzerlik göstermektedir. Bu durum kontrol grubunun vaka grubundan demografik olarak

ayrı olmadığını göstermektedir.

Vaka-kontrol karşılaştırmasında çalışmamızda sadece kan ve plazma telomer uzunluğuna bakılmış. Bu değerler arasında bir oran olarak hesaplanan relatif T/S ratio değerleri baz alınmıştır. Vaka grubunun plazma relatif T/S ratio değeri kontrol grubundan anlamlı derecede uzun bulunmuştur (Tablo 10). Birçok çalışmada cfDNA' nın bir kanser biyomarkeri olabileceği gösterilmiştir (104–106). Çalışmamıza benzer olarak Fu ve ark (102), 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada 140 tane HBV ile enfekte olan hepatoselüler (HCC) kanser tanılı hastaların ve 280 tane kanser tanısı almayan HBV ile enfekte olan kontrol grubunun alındığı bir çalışmada serum relatif T/S ratio değerinin kanser hastalarında daha uzun saptamışlardır. Bu çalışmada, ortanca ve aralık değeri de çalışmamıza benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda bundan farklı olarak HCC tanısının yanında farklı kanser türleri ve tümör doku analizleri bulunmaktadır. Örneklem sayısının daha az olması ve farklı kanser türlerinin bulunmasına rağmen bu aralık ve ortanca değerlerinin benzerliği, kanser türlerinden bağımsız olarak telomer uzunluklarının benzer şekilde artabileceği şeklinde yorumlanabilir. Her bir kanser türünden çok sayıda hastanın analiz edileceği yeni araştırmalar, ilerde telomer uzunluğunun kanser tipini belirlemede faydalı olup olamayacağını gösterebilir.

Plazma cfDNA fragmente ve normal kromozomal yapıda olmadığı için Wu ve ark (104), 2015 yılında yaptıkları çalışmada referans gen olarak tek kopya gen yerine SİNE ve LİNE nükleotid sekanslarını kullanarak telomerik cfDNA' yı QPCR yöntemi ile hesaplamışlardır. Vememe kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre telomerik cfDNA' nın daha kısa olduğunu gözlemişlerdir. Bu durumun çalışmamızdan farklı olması SİNE ve LİNE tekrarlarının kişiden kişiye değişmesinden kaynaklanabilir. Cawthon 2002 (73) çalışmasında Alu tekrar sayılarının kişiden kişiye değişmesine bağlı olabilecek hatalı sonuçlara vurgu yapılarak özellikle cfDNA çalışmalarında telomer uzunluğu kantitasyonunun tek kopya gen kullanılarak yapılmasının önerilmesi bizim görüşümüzü destekler niteliktedir.

Çalışmamızda vaka ve kontrol grupları arasında kan relatif T/S ratio değerleri arasında anlamlı farklılığın olmadığı gözlenmiştir (Tablo 11). Çalışmamızdan farklı olarak Chen ve ark. (107), 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada kandaki telomer kısalmasının kolorektal kanseri olan bireylerde prognostik bir faktör olabileceği belirtilmiş, bunun yanında Duggan ve ark. (11), 2014 yılındaki çalışmada periferik kandaki lökositlerden yapılan telomer uzunluğundaki kısalmanın meme kanseri açısından risk faktörü olabileceği belirtilmiş olup bunun tersi olarak Liu ve ark. tarafından (108), 2011 yılında yapılan diğer bir çalışmada HCC tanısı alan hastalarda periferik kandaki telomer uzunluğunun kanser açısından risk faktörü olduğunu ve Gramatges ve ark tarafından (109), 2010 yılında yapılan diğer bir çalışmada göğüs kanseri olan kadınlarda periferik kanda telomer uzunluğu artışının kanser riskini arttırdığı gözlenmiştir. Periferik kandaki telomer uzunluğunun kanserle olan ilişkisindeki farklı görüşler, tam kanın kanseri iyi yansıtmadığının bir göstergesi olabilir. Yine bu durum hasta gurubumuzla kontrol gurubumuzun benzer yaş ve cinsiyette seçilmesi sayesinde olabilir ve kontrol gurubumuzun iyi seçilip, uygun olduğuna işaret etmektedir.

### **Vaka grubu**

Doku telomer uzunluğu değerlerine bakıldığında çalışmamızda sadece vaka grubunda bu değerlere bakılmış olduğundan bu uzunluklar kontrol grubu ile veya hastanın sağlıklı dokuları ile karşılaştırılmamıştır. Çalışmamızda en fazla telomer uzunluğu periferik kandan, ikinci olarak tümör dokusundan, en kısa telomer uzunluğu ise serumdan elde cfDNA olduğu gözlenmektedir (tam kan > tm dokusu > cfdna) (p<0,001). Bu değerler de istatistiksel olarak anlamlı şekilde birbirinden farklılık göstermektedir (Tablo 18, 19). Literatür verilerine bakıldığında özellikle kolorektal kanserle ilgili veriler göze çarpmaktadır. Birçok çalışmada kanser dokularındaki telomer uzunluğunun normal dokulardan daha kısa olduğu gözlenmiştir (9,110–112)

Plazma serum ve diğer vücut sıvılarından izole edilebilen cfDNA, kanser

tanı, takibinde yeni bir biyomarkır olarak yerini almaktadır. Artan çalışmalarla birlikte cfDNA' nın likit biyopsi olarak kullanılabilceği desteklenmektedir. CfDNA' nın konsantrasyon farklılığı ve tümör dokusunda meydana gelen mutasyonları eş zamanlı olarak göstererek tedavinin etkinliğinde ve seçiminde, kanser yükünün belirlenmesinde, relaplarda ve minimal reziduel hastalığın takibinde kullanılabilmesi klasik biyopsiye diğer avantajlarıdır. Her ne kadar, tam kan az miktarda plazma ve cfDNA da içeriyor olsa da DNA nın büyük kısmının lenfositlerden kaynaklandığı ve hastanın kanserinden etkilenmediği anlaşılmaktadır. Tümör dokusundaki telomer tekrar sayısının cfDNA dan daha uzun olması aslında tümör dokusunun sadece kanser hücrelerinden kaynaklanmayıp bir miktar damar, bağ dokusu, normal hücrelerle karışım halinde olmasından ve sadece biyopsi yapılan alan hakkında bilgi vermesinden kaynaklanıyor olabilir. Oysa kanserli hastalarda cell free DNA tüm vücutta (olası metastaz alanları dahil) tümör dokularından sadece kanserli hücrelerden ve nekrotik-apoptotik hücrelerden kaynaklanmaktadır. Bu sonucumuz bize cell free DNA' dan yapılacak genetik analizlerin tümör dokusundan yapılanlara göre daha güvenilir olduğunu ve hastadaki kanserin durumunu daha iyi yansıttığını göstermektedir.

Telomer uzunluğu ve yaş arasındaki ilişki literatürdeki diğer çalışmalara uyumlu olarak periferik kan ile korelasyon gösterirken, tümör doku ve cfDNA ile korelasyon saptanmamıştır. Wu ve ark. meme kanserli hastalarda plazma telomerik DNA tekrarları ile yaş arasında bir ilişki saptamamışlardır(104). Yine Rampazzo ve ark. kolorektal kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada tümör olmayan dokular ile yaş arasında ilişki saptarken tümör dokuları ile yaş arasında ilişki saptamamışlardır (113). Bu da cfDNA' nınorijininin kanser olduğu görüşünü desteklemektedir.

Bizim çalışmamıza benzer olarak Vals-Bautista ve ark.kolon kanserli hastaların doku ve kan telomer uzunluklarını karşılaştırdıkları çalışmalarında tümör dokutelomer uzunluğunu, aynı hastanın normal kolon dokusu ve tam kanına göre kıyasaptamışlardır. Ancak hastalara ait normal kolon dokusu

telomer uzunluğunu da tam kana göre kısa saptamışlar bunun inflamasyona bağlı olarak meydana geldiğini, normal kolon mukozasının da tümör dokusu ile korele olduğunu dolayısıyla kontrol olarak kullanmanın uygun olmayacağını belirtmişlerdir (114).

Farklı kanser türlerinden çok sayıda hastanın analiz edilebildiği daha büyük bir örnekleme çalışması telomer uzunluğundaki değişikliklerin kanser tipini belirlemede, özellikle de primeri bilinmeyen kanserler için faydalı olup olmayacağını öngörmeye faydalı olabilirdi. Çalışmamızın başlıca kısıtlılığı hasta sayısının çok fazla olmaması olmasına rağmen yine de aynı hastanın( ve kontrolün) farklı numunelerinden çalışılmış olması bize değerli veriler sağlamıştır. Diğer bir kısıtlılık faktörü olarak vaka grubunun doku telomer uzunluğunun kontrol grubu veya vaka grubundaki sağlıklı dokularla karşılaştırma yapılmamış olmasıdır, ancak hasta grubunda sağlıklı doku olarak tam kan numunelerinin kullanılması önemli bir karşılaştırma imkanı sağlamıştır. Hastalarımızın hiç birinde kemik iliği metastazı olmadığından periferik kan hücreleri sağlıklı doku olarak değerli veriler sağlamıştır.

## **6 SONUÇ**

Çalışmamızda kanserli hastalarda plazma cfDNA telomer uzunluğunun hastanın tam kan ve tümör dokularından anlamlı şekilde kısa olması kanser biyomarkırı olarak plazma cfDNA' nın kullanılabilceğini, cfDNA analizlerinin tümör doku analizlerinden daha hassas olduğunu göstermektedir.



## 7 KAYNAKLAR

1. WHO GLOBOCAN. (2012). Estimated cancer incidence mortality and prevalence worldwide in 2012.  
Erişim: [[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)]  
Erişim Tarihi: 01.06.2017
2. TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU. Yeni Dünya kanser istatistikleri. (2012).  
Eriřim:[<http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/860-yeni-dunya-kanser-istatistikleri-yayinlandi.html>]  
Erişim Tarihi: 01.06.2017
3. KUMAR, B., SINGH, S., SKVORTSOVA, I. I., KUMAR, V. (2017). Promising Targets in Anti-cancer Drug Development: Recent Updates. *Current medicinal chemistry*. Vol. 24.
4. ARNOLD, D., LUEZA, B., DOUILLARD, J. Y., PEETERS, M., LENZ, H. J., VENOOK, A., CERVANTES, A. (2017). Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomised trials. *Annals of Oncology*.
5. NIKANJAM, M., LIU, S., YANG, J., KURZROCK, R. (2017). Dosing Three- Drug Combinations That Include Targeted Anti- Cancer Agents: Analysis of 37,763 Patients. *The Oncologist*. 22(5): 576-584.
6. ANDREWS, N. P., FUJII, H., GORONZY, J. J., WEYAND, C. M. (2010). Telomeres and immunological diseases of aging. *Gerontology*. 56(4): 390-403.
7. HAHN, W. C., COUNTER, C. M., LUNDBERG, A. S., BEIJERSBERGEN, R. L. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 400(6743): 464.
8. SVENSON, U., ROOS, G. (2009). Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1792(4): 317-323.
9. BERTORELLE, R., RAMPAZZO, E., PUCCIARELLI, S., NITTI, D., DE ROSSI, A. (2014). Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 20(8): 1940-1950.

10. YOON, J. H., SEO, H. S., CHOI, W. S., KIM, O., NAM, S. W., LEE, J. Y., PARK, W. S. (2014). Gastric 1 induces senescence and apoptosis through regulating telomere length in gastric cancer. *Oncotarget*. 5(22): 11695.
11. DUGGAN, C., RISQUES, R., ALFANO, C., PRUNKARD, D., IMAYAMA, I., HOLTE, S., RABINOVITCH, P. (2014). Change in peripheral blood leukocyte telomere length and mortality in breast cancer survivors. *Journal of the National Cancer Institute*. 106(4): 35.
12. JANKU, F., VIBAT, C. R. T., KOSCO, K., HOLLEY, V. R., CABRILLO, G., MERIC-BERNSTAM, F., POOLE, J. C. (2014). BRAF V600E mutations in urine and plasma cell-free DNA from patients with Erdheim-Chester disease. *Oncotarget*. 5(11): 3607.
13. MOULIERE, F., EL MESSAOUDI, S., PANG, D., DRITSCHILO, A., THIERRY, A. R. (2014). Multi- marker analysis of circulating cell- free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Molecular oncology*. 8(5): 927-941.
14. FLEISCHHACKER, M., SCHMIDT, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 1775(1): 181-232.
15. STRONG, V. E., D'AMICO, T. A., KLEINBERG, L., AJANI, J. (2013). Impact of the 7th Edition AJCC staging classification on the NCCN clinical practice guidelines in oncology for gastric and esophageal cancers. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 11(1): 60-66.
16. DE MATTOS-ARRUDA, L., OLMOS, D., TABERNERO, J. (2011). Prognostic and predictive roles for circulating biomarkers in gastrointestinal cancer. *Future Oncology*. 7(12): 1385-1397.
17. STRACHAN, T., READ, A. P. (1996). Human molecular genetics. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*. 28(12): 1418-1418.
18. YILDIZ, M. G., ARAS, S., DUMAN, D. C. Telomerlerin yaşlanma ve kanser ilişkisindeki rolü. (2009). *Türk hijyen ve deneysel biyoloji dergisi*. 66(4): 187-195.
19. MONTPETIT, A. J., ALHAREERİ, A. A., MONTPETIT, M., STARKWEATHER, A. R., ELMORE, L. W., FILLER, K., COLLINS, J. B. (2014). Telomere length: a review of methods for measurement. *Nursing research*. 63(4): 289.

20. MİROĞLU, Y. Y., DIRAMAN, E., EREN, Z., (2011). Telomer ve Telomeraz. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*.4(2): 41–48.
21. FADRİ-MOSKWIK, M., ZHOU, Q., CHAI, W. (2013). Beyond Telomerase: Telomere Instability as a Novel Target for Cancer Therapy. *Journal of molecular and genetic medicine: an international journal of biomedical research*. 7(4).
22. ALLEGRA, A., INNAO, V., PENNA, G., GERACE, D., ALLEGRA, A. G., MUSOLINO, C. (2017). Telomerase and telomere biology in hematological diseases: A new therapeutic target. *Leukemia Research*. 56: 60-74.
23. BLASCO, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews. Genetics*. 6(8): 611.
24. AWE, J. A., XU, M. C., WECHSLER, J., BENALI-FURET, N., CAYRE, Y. E., SARANCHUK, J., MAI, S. (2013). Three-dimensional telomeric analysis of isolated circulating tumor cells (CTCs) defines CTC subpopulations. *Translational oncology*. 6(1): 51N4-65.
25. BENETTI, R., GARCÍA-CAO, M., BLASCO, M. A. (2007). Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nature genetics*. 39(2): 243.
26. SCHOEFTNER, S., BLASCO, M. A. (2009). A 'higher order'of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *The EMBO journal*. 28(16): 2323-2336.
27. GÜZELGÜL, F., AKSOY, K. (2010). Telomeraz Enziminin Tanı ve Tedavide Kullanım Alanı. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 16: 69-87.
28. LAZZERINI-DENCHI, E., SFEIR, A. (2016). Stop pulling my strings—what telomeres taught us about the DNA damage response. *Nature reviews. Molecular cell biology*.17(6): 364.
29. HORVATH, M. P. (2013). Evolution of telomere binding proteins.
30. SMOGORZEWSKA, A., DE LANGE, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annual review of biochemistry*. 73(1): 177-208.
31. STANSEL, R. M., DE LANGE, T., GRIFFITH, J. D. (2001). T- loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *The EMBO journal*. 20(19): 5532-5540.

32. WANG, F., PODELL, E. R., ZAUG, A. J., YANG, Y., BACIU, P., CECH, T. R., LEI, M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*. 445(7127): 506.
33. SHIBUYA, H., SHIGURO, K. I., WATANABE, Y. (2014). The TRF1-binding protein TERB1 promotes chromosome movement and telomere rigidity in meiosis. *Nature cell biology*. 16(2): 145.
34. ARNOULT, N., KARLSEDER, J. (2015). Complex interactions between the DNA-damage response and mammalian telomeres. *Nature structural molecular biology*. 22(11): 859.
35. WILSON, J. S., TEJERA, A. M., CASTOR, D., TOTH, R., BLASCO, M. A., ROUSE, J. (2013). Localization-dependent and-independent roles of SLX4 in regulating telomeres. *Cell reports*. 4(5): 853-860.
36. PICKETT, H. A., CESARE, A. J., JOHNSTON, R. L., NEUMANN, A. A., REDDEL, R. R. (2009). Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t- circles. *The EMBO Journal*. 28(7): 799-809.
37. AZZALIN, C. M., LINGNER, J. (2015). Telomere functions grounding on TERRA firma. *Trends in cell biology*. 25(1): 29-36.
38. SCHOEFTNER, S., BLASCO, M. A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature cell biology*. 10(2): 228.
39. HANDE, M. P. (2006). Orchestration of Telomeres and DNA Repair Factors in Mammalian Cells. In *DNA Repair and Human Disease*. Springer US. pp: 114-127.
40. MARTÍNEZ, P., BLASCO, M. A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature reviews. Cancer*. 11(3): 161.
41. HANDE, P., SLIJEPCEVIC, P., SILVER, A., BOUFFLER, S., VAN BUUL, P., BRYANT, P., LANSDORP, P. (1999). Elongated telomeres in scidmice. *Genomics*. 56(2): 221-223.
42. MARTÍNEZ, P., THANASOULA, M., CARLOS, A. R., GÓMEZ, G., TEJERA, A. M., SCHOEFTNER, S., BLASCO, M. A. (2010). Mammalian RAP1 controls

- telomere function and gene expression through binding to telomeric and extra-telomeric sites. *Nature cell biology*. 12(8): 768.
43. GONZALO, S., JACO, I., FRAGA, M. F., CHEN, T., LI, E., ESTELLER, M. (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nature cell biology*. 8(4): 416.
  44. ATLI, K., AN, B. (2002). Telomer ve hücresel yaşlanma. *Geriatry*. 5: 111-4.
  45. DİKMEN, G., DOĞAN, P. (2003). Telomeraz Ve Kanser. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 23(4): 334-341.
  46. HARLEY, C. B., FUTCHER, A. B., GREIDER, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 345(6274): 458.
  47. HAYFLICK, L. (1991). Aging under glass. *Mutation Research/DNAging*. 256(2-6): 69-80.
  48. DENG, Y., CHAN, S., CHANG, S. (2008). Telomere dysfunction and tumor suppression-the senescence connection. *Nature reviews. Cancer*. 8(6): 450.
  49. NİTTİS, T., GUİTTAT, L., STEWART, S. A. (2008). Alternative lengthening of telomeres (ALT) and chromatin: is there a connection?. *Biochimie*. 90(1): 5-12.
  50. CARROLL, K. A., LY, H. (2009). Telomere dysfunction in human diseases: the long and short of it. *Int J Clin Exp Pathol*. 2(6): 528-543.
  51. ALDER, J. K., CHEN, J. J. L., LANCASTER, L., DANOFF, S., SU, S. C., COGAN, J. D., PHİLLİPS, J. A. (2008). Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(35): 13051-13056.
  52. HOUBEN, J. M., MOONEN, H. J., VAN SCHOOTEN, F. J., HAGEMAN, G. J. (2008). Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress?. *Free Radical Biology and Medicine*. 44(3): 235-246.
  53. HOCKEMEYER, D., COLLİNS, K. (2015). Control of telomerase action at human telomeres. *Nature structural molecular biology*. 22(11): 848.
  54. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWİS, J. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition. New York: Garland Science; 1994
  55. CONG, Y., SHAY, J. W. (2008). Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell research*. 18(7): 725.

56. AUBERT, G. (2014). *Telomere dynamics and aging. Progress in Molecular Biology and Translational Science.*125: 89–111.
57. TOMÁS-LOBA, A., FLORES, I., FERNÁNDEZ-MARCOS, P. J., CAYUELA, M. L., MARAVER, A., TEJERA, A., VIÑA, J. (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell.* 135(4): 609-622.
58. SEXTON, A. N., REGALADO, S. G., LAI, C. S., COST, G. J., O'NEIL, C. M., URNOV, F. D., HOCKEMEYER, D. (2014). Genetic and molecular identification of three human TPP1 functions in telomerase action: recruitment, activation, and homeostasis set point regulation. *Genes development.* 28(17): 1885-1899.
59. CESARE, A. J., REDDEL, R. R. (2013). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells.
60. ROAKE, C. M., ARTANDI, S. E. (2016). DNA repair: Telomere-lengthening mechanism revealed. *Nature.* 539: 35-36.
61. PICKETT, H. A., REDDEL, R. R. (2015). Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres. *Nature structural molecular biology.* 22(11): 875.
62. DILLEY, R. L., VERMA, P., CHO, N. W., WINTERS, H. D., WONDISFORD, A. R., GREENBERG, R. A. (2016). Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature.* 539(7627): 54-58.
63. HEAPHY, C. M., DE WILDE, R. F., JIAO, Y., KLEIN, A. P., EDIL, B. H., SHI, C., OFFERHAUS, G. J. (2011). Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science.* 333(6041): 425-425.
64. BOVERI, T. (1929). The origin of malignant tumors. *Williams Wilkins.*
65. JEGGO, P. A., PEARL, L. H., CARR, A. M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nature Reviews. Cancer.* 16(1): 35.
66. RAMSAY, A. J., QUESADA, V., FORONDA, M., CONDE, L., MARTÍNEZ-TRILLOS, A., VILLAMOR, N., LÓPEZ-GUERRA, M. (2013). POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics.* 45(5): 526.
67. NEUMANN, A. A., REDDEL, R. R. (2002). Opinion: Telomere maintenance and cancer--look, no telomerase. *Nature reviews. Cancer.* 2(11): 879.

68. BUSEMAN, C. M., WRIGHT, W. E., SHAY, J. W. (2012). Is telomerase a viable target in cancer?. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 730(1): 90-97.
69. SMITH, J. S., JOHNSON, F. B. (2010). Isolation of G-quadruplex DNA using NMM-sepharose affinity chromatography. *G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols*. 608: 207-221.
70. AUBERT, G., HILLS, M., LANSDORP, P. M. (2012). Telomere length measurement—Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 730(1):59-67.
71. ALTER, B. P., BAERLOCHER, G. M., SAVAGE, S. A., CHANOCK, S. J., WEKSLER, B. B., WILLNER, J. P., LANSDORP, P. M. (2007). Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood*. 110(5): 1439-1447.
72. ZHAO, Y., SHAY, J. W., WRIGHT, W. E. (2017). Telomere G-Rich Overhang Length Measurement: DSN Method. *Telomeres and Telomerase: Methods and Protocols*. 55-62.
73. CAWTHON, R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*. 30(10): 47-47.
74. DING, C., CANTOR, C. R. (2004). Quantitative analysis of nucleic acids—the last few years of progress. *BMB Reports*. 37(1): 1-10.
75. AVIV, A., HUNT, S. C., LIN, J., CAO, X., KIMURA, M., BLACKBURN, E. (2011). Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic acids research*. 39(20): 1-5.
76. CAWTHON, R. M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic acids research*. 37(3): 21.
77. O'CALLAGHAN, N. J., FENECH, M. (2011). A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biological procedures online*. 13(1): 3.
78. ROCHE DIAGNOSTICS GMBH. (2010). The LightCycler Carousel-Based System. A proven Standard for Real-Time PCR.

Erişim:

[[http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia\\_ch/documents/broschueren/molecular\\_diagnostics/systeme/06-lightcycler-20-system/05344549001\\_EN\\_EA\\_LightCycler-Carousel-Based-System.pdf](http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/molecular_diagnostics/systeme/06-lightcycler-20-system/05344549001_EN_EA_LightCycler-Carousel-Based-System.pdf)].

Erişim Tarihi: 01.06.2017

79. ROCHE APPLIED SCIENCE. Relative quantification. (2001).

Erişim:

[[http://www.core-facility.uni-freiburg.de/qpcrddpccr/lc480obj/rel\\_quant](http://www.core-facility.uni-freiburg.de/qpcrddpccr/lc480obj/rel_quant)]

Erişim Tarihi: 01.06.2017

80. BREITBACH, S., TUG, S., SIMON, P. (2012). Circulating cell-free DNA. *Sports medicine*. 42(7): 565-586.
81. GORMALLY, E., VINEIS, P., MATULLO, G., VEGLIA, F., CABOUX, E., LEROUX, E., AIROLDI, L. (2006). TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study. *Cancer research*. 66(13): 6871-6876.
82. CROWLEY, E., DÍ NICOLANTONIO, F., LOUPAKIS, F., BARDELLI, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature reviews. Clinical oncology*. 10(8): 472.
83. BENNETT, R. M., GABOR, G. T., MERRITT, M. M. (1985). DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA. *Journal of Clinical Investigation*. 76(6): 2182.
84. GORMALLY, E., CABOUX, E., VINEIS, P., HAINAUT, P. (2007). Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 635(2): 105-117.
85. STROUN, M., ANKER, P., LYAUTEY, J., LEDERREY, C., MAURICE, P. A. (1987). Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. 23(6): 707-712.
86. JIANG, P., LO, Y. D. (2016). The long and short of circulating cell-free DNA and the ins and outs of molecular diagnostics. *Trends in Genetics*. 32(6): 360-371.



87. WAN, J. C., MASSIE, C., GARCIA-CORBACHO, J., MOULIERE, F., BRENTON, J. D., CALDAS, C., ROSENFELD, N. (2017). Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature reviews. Cancer.* 1-16.
88. ALLAN, J. M., HARDIE, L. J., BRIGGS, J. A., DAVIDSON, L. A., WATSON, J. P., PEARSON, S. B., WILD, C. P. (2001). Genetic alterations in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung cancer. *International journal of cancer.* 91(3): 359-365.
89. MANDEL, P. (1948). Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Acad Sci Paris.* 142: 241-243.
90. LEON, S. A., SHAPIRO, B., SKLAROFF, D. M., YAROS, M. J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research.* 37(3): 646-650.
91. SIDRANSKY, D., JONES, P. (1991). Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science.* 252(5006): 706.
92. BARDELLI, A., PANTEL, K. (2017). Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer cell.* 31(2): 172-179.
93. GORGES, T. M., PENKALLA, N., SCHALK, T., JOOSSE, S., RIETHDORF, S., TUCHOLSKI, J., VON AHSEN, O. (2015). Enumeration and molecular characterization of tumor cells in lung cancer patients using a novel in vivo device for capturing circulating tumor cells. *Clinical Cancer Research.* 1-36.
94. MARTINCORENA, I., ROSHAN, A., GERSTUNG, M., ELLIS, P., VAN LOO, P., MCLAREN, S., STEBBINGS, L. (2015). High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science.* 348(6237): 880-886.
95. SNYDER, M. W., KIRCHER, M., HILL, A. J., DAZA, R. M., SHENDURE, J. (2016). Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell.* 164(1): 57-68.
96. OZAN, Ü., KALEMKAŞ, F., ALI, R., BUDAK, F., GÖRAL, G., ÖZKOCAMAN, V., TUNALI, A. (2004). Akut lösemilerde minimal residüel hastalığın akım sitometrisi yöntemiyle araştırılması ve relaps ile korelasyonu. 30: 181-187.

97. DAWSON, S. J., TSUI, D. W., MURTAZA, M., BIGGS, H., RUEDA, O. M., CHIN, S. F., RAJAN, S. (2013). Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 368(13): 1199-1209.
98. GARCÍA-MURILLAS, I., SCHIAVON, G., WEIGELT, B., NG, C., HREBIEN, S., CUTTS, R. J., GARRIDO, J. A. (2015). Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Science translational medicine*. 7(302): 302ra133.
99. MARCHETTI, A., PALMA, J. F., FELICIONI, L., DE PAS, T. M., CHIARI, R., DEL GRAMMASTRO, M., MALORGIÒ, F. (2015). Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients. *Journal of Thoracic Oncology*. 10(10): 1437-1443.
100. ROSENTHAL, R., MCGRANAHAN, N., HERRERO, J., SWANTON, C. (2017). Deciphering Genetic Intratumor Heterogeneity and Its Impact on Cancer Evolution.
101. MURTAZA, M., DAWSON, S. J., POGREBNIÁK, K., RUEDA, O. M., PROVENZANO, E., GRANT, J., ALÍ, H. R. (2015). Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nature communications*. 6. 1-6.
102. FU, X., WAN, S., HANN, H. W., MYERS, R. E., HANN, R. S., AU, J., YANG, H. (2012). Relative telomere length: a novel non-invasive biomarker for the risk of non-cirrhotic hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B infection. *European Journal of Cancer*. 48(7): 1014-1022.
103. JUNG, K., FLEISCHHACKER, M., RABIEN, A. (2010). Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clinica Chimica Acta*. 411(21): 1611-1624.
104. WU, X., TANAKA, H. (2015). Aberrant reduction of telomere repetitive sequences in plasma cell-free DNA for early breast cancer detection. *Oncotarget*. 6(30): 29795.
105. LECOMTE, T., BERGER, A., ZINZINDOHOUE, F., MICARD, S., LANDI, B., BLONS, H., LAURENT-PUIG, P. (2002). Detection of free- circulating

- tumor- associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *International journal of cancer*. 100(5): 542-548.
106. BEAU- FALLER, M., GAUB, M. P., SCHNEIDER, A., DUCROCQ, X., MASSARD, G., GASSER, B., WEITZENBLUM, E. (2003). Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor- specific marker in lung cancer patients. *International journal of cancer*. 105(3): 361-370.
107. CHEN, Y., QU, F., HE, X., BAO, G., LIU, X., WAN, S., XING, J. (2014). Short leukocyte telomere length predicts poor prognosis and indicates altered immune functions in colorectal cancer patients. *Annals of oncology*. 25(4): 869-876.
108. LIU, J., YANG, Y., ZHANG, H., ZHAO, S., LIU, H., GE, N., CHEN, Z. (2011). Longer leukocyte telomere length predicts increased risk of hepatitis b virus- related hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 117(18): 4247-4256.
109. GRAMATGES, M. M., TELLÌ, M. L., BALISE, R., FORD, J. M. (2010). Longer relative telomere length in blood from women with sporadic and familial breast cancer compared with healthy controls. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 19(2): 605-613.
110. HASTIE, N. D., DEMPSTER, M., DUNLOP, M. G., THOMPSON, A. M., GREEN, D. K., ALLSHIRE, R. C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 346(6287): 866.
111. ENGELHARDT, M., DRULLINSKY, P., GUILLEM, J., MOORE, M. A. (1997). Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clinical cancer research*. 3(11): 1931-1941.
112. GERTLER, R., ROSENBERG, R., STRICKER, D., WERNER, M., LASSMANN, S., ULM, K., SIEWERT, J. R. (2002). Prognostic potential of the telomerase subunit human telomerase reverse transcriptase in tumor tissue and nontumorous mucosa from patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 95(10): 2103-2111.
113. RAMPAZZO, E., BERTORELLE, R., SERRA, L., TERRÌN, L., CANDIOTTO, C., PUCCIARELLI, S., DE ROSSI, A. (2010). Relationship between telomere

shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *British journal of cancer*. 102(8): 1300.

114. VALLS- BAUTISTA, C., PIÑOL- FELIS, C., REÑÉ- ESPINET, J. M., BUENESTADO- GARCÍA, J., VIÑAS- SALAS, J. (2015). In colon cancer, normal colon tissue and blood cells have altered telomere lengths. *Journal of surgical oncology*. 111(7): 899-904.



## ÖZGEÇMİŞ

**ARŞ.GÖR.DR.Mine URFALI**

[mineoruc@hotmail.com](mailto:mineoruc@hotmail.com)  
[mineurfali@comu.edu.tr](mailto:mineurfali@comu.edu.tr)

**Mobil Tel: 05055717224**  
**(0286) 2200202-2424/2412**

**Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 17100- Çanakkale**

### Öğrenim

<b>Tıp Eğitimi</b>	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi-ESKİŞEHİR
<b>Uzmanlık Eğitimi</b>	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Genetik Anabilim Dalı-ÇANAKKALE

### Görevler

Pratisyen Doktor(2009-2013)	Eskişehir 4 Nolu 112 Acil Sağlık Hizmetleri İstasyonu-ESKİŞEHİR
Araştırma Görevlisi Doktor(2013- Devam Ediyor)	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Genetik Anabilim Dalı-ÇANAKKALE

### PROJELER

<b>Yurtiçi Kurumsal Destekli (YIP-K)</b>	
<b>YIP-K1- Proje Adı:</b> "Kolonorektal KansereEpigenetik Yaklaşım; APC Tumor Supressör Gen Fonksiyonanalizleri" TYL-2014-277	2013-2014 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Fonu (Araştırmacı, Tamamlandı)
<b>YIP-K2- Proje Adı:</b> "İşitme Engelli Olgularda Moleküler Etiyolojik Sebeplerin Araştırılması"TYL-2014-204	2014-2016 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Fonu (Araştırmacı, Tamamlandı)
<b>YIP-K3- Proje Adı:</b> "Kanserli Hastalarda Cell FreeDNA ve Tümör Dokusundan Telomer Analizi" TTU-2015-510	2014-2016 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Fonu (Araştırmacı, Devam ediyor)

<b>RUTİN HİZMETLER</b>		2013-2017 yılları arasında tanı laboratuvarı olarak(Sitogenetik ve Moleküler) verdiği hizmetler
<b>A- Sitogenetik</b>	<b>Adet</b>	
<i>Lenfosit Hücre Kültürü</i>	2100	Karyotip – karyogram analiz
<i>FISH</i>	350	Metafaz ,interfaz analiz
<b>B- Moleküler Genetik</b>	<b>Adet</b>	
<i>FMF</i>	950	Moleküler tanı
<i>CVD</i>	800	Tekrarlı düşük, PTE, SVH, Trombozis, Behçet Sendromu, DVT, MI, Atherosclerosis
<i>Farmakogenetik</i>	140	Warfarin, Coumadine, ve kompleks ilaç detoksifikasyon profil analizleri
<i>Onkogenetik</i>	80	Kras ,EGFR sekans ve Bcr-ABL RT-PCR ile
<i>Prenatal Tanı (QF-PCR)</i>	330	Kromozom 13,18,21,X ve Y STR fragment analizi
<i>CFTR</i>	175	Direkt sekanslama,
<i>İmmunogenetik</i>	800	B5,B27
<i>MLPA</i>	680	Mikrodelesyon subtelomerik kanser vs. panelleri
<i>Diğer</i>	760	Talasemi,TRAPS.CAPS.MVK,Frajl X ,HPV
<b>C- Moleküler-Sitogenetik</b>	<b>Adet</b>	
<i>Array-CGH</i>	160	Değerlendirme, raporlama
<b>D- Poliklinik</b>	<b>Adet</b>	
<i>Poliklinik hasta sayısı</i>	2150	Değerlendirme,takip
<b>İLGİ ALANLARI - LABORATUVAR DENEYİMİ (ARAŞTIRMA ALANI)</b>		
<b>A-Sitogenetik</b>		
A1- Lenfosit hücre kültürü ve kromozom analizi		
A2- Seks kromatin analizi		
A3- Manuel ve otomatik karyotip, karyogram analizler		
A4- GTG, C, NOR bantlama teknikleri		
A5- Mikronukleus, SCE analizleri ve geno – sitotoksiste		
<b>B- Moleküler Sitogenetik</b>		
B1- Direkt, indirekt hibridizasyon teknikleri, CGH ve FISH		
<b>C- Moleküler Genetik</b>		
C1- Elektroforetik teknikler (agaroz)		
C2- Western blot analiz		
C3- PCR, Multiplex PCR, Nested PCR teknikleri		
C4- RSM, RFLP mutasyon ve polimorfizm taramaları		
C5- Genomik DNA izolasyonu (solid, kan, Saç ve diğer dokular) ve DNA dizi analizi		
C6- Epigenetik, DNA metilasyon analizi		
C7- Real Time PCR		
C8- MLPA, Strip Assay		
C9- RT-PCR, QF PCR, Direkt sekanslama		
C10- MikroArray-CGH		

## BİLİMSEL ÇALIŞMALARI

### A- Uluslararası Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- A1.** Silan, F., Yalcıntepe, S., Uysal, D., **Urfali, M.**, Uludag, A., Cosar, E., Çakir Güngör A.N, Ozdemir, O. (2014). High Frequency of Chromosomal Anomalies and a Novel Chromosomal Insertion Associated with Infertility and Recurrent Miscarriages (Reproductive Failure) in West Turkey. *Gene Ther Mol Biol*, 16, 139-148.
- A2.** O Ozdemir, F Silan, **M Urfali**, A Uludag, E Ari, M Kayatas. Variable R. Msp1 fragmentation in genomic DNA due to DNA hypomethylation in CRF patients with MTHFR C677T gene polymorphism: from genetics to epigenetics. *Gene Therapy and Molecular Biology*. 2014; 16, 77-87
- A3.** Gazi E, Barutcu A, Altun B, Temiz A, Bekler A, **Urfali M**, Silan F, Colkesen Y, Ozdemir O Intercellular Adhesion Molecule-1 K469E and Angiotensinogen T207M Polymorphisms in Coronary Slow Flow. *Medical Principle and Practise*. 2014; 1-5
- A4.** Ozdemir O, Kayatas M, Cetinkaya S, Yildirim ME, Silan F, Kucuk Kurtulgan HK, Koksall B, **Urfali M**, Candan F. *BclI* – RFLP profiles for serum amiloid A1 and mutated *MEFV* gene prevalence in chronic renal failure patients requiring long-term haemodialysis . *Renal Failure*. 2014; 14:1-5.
- A5.** Silan F, Gungor CAN, **Urfali M**, Uludag A, Cavus E, Koc E, Ozdemir O. Triploidy/Diploidy Mosaicism, Diandry and Uniparental Isodisomy: Fetus with Omphalocele and Contracted Finger. *Fam Med Sci Res* 2015, 4:4
- A6.** Öztürk Özdemir, Barış Paksoy, Atilla Gürgen, **Mine Oruç**, Onur Yıldız, Diğdem Uysal, Ahmet Uludağ, Fatma Silan. An infertile case of 47, XYY syndrome without autistic spectrum: Cost effective well-define of extra Y chromosome by GTG, C bandings, QF-PCR and FISH analyses. *Cumhuriyet Medical Journal*. 2016; 38(4):355-360
- A7.** Fatma Silan, Onur Yıldız, **Mine Urfali**, Zeliha Guler and Ozturk Ozdemir. A mental and motor retarded dysmorphic case with heterozygous 1p36 deletion: Comparable results from cytogenetic, MicroArray-CGH, FISH and MLPA techniques. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2016; 4(12):490-499
- A8.** Sik E, Ozdemir O, Kurtulgan HK, **Urfali M**, Sen M, Silan F. Hypermethylated promoter profiles for tumour suppressor APC, p53, MSH6 and MGMT genes in CRC tumours. *J. Bio. Res.* 20016; 2 (6):41-47

## BİLDİRİLER

### Uluslararası Kongre ve Bildirileri

- A1.** **M. Urfali**, O. Ozdemir, D. Kankaya, A. Uludag, S. Yalcıntepe, F. Silan. Deleterious mutations in mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 4 and ATPase subunit 6 in two siblings of Leigh Syndrome with progressive motor retardation and loss of visual function. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY P06.26.
- A2.** F. Silan, S. Yalcıntepe, D. Uysal, **M. Urfali**, E. Sık, A. Uludag, E. Cosar, A. N. Cakir Gungor, O. Ozdemir. High frequency of chromosomal anomalies and a novel chromosomal insertion associated with infertility and recurrent miscarriages (Reproductive Failure) in west Turkey. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. P13.16.
- A3.** O. Ozdemir, **M. Urfali**, F. Silan, A. Uludag, E. Ari, M. Kayatas. Variable R. Msp1 fragmentation in genomic DNA due to DNA hypomethylation in CRF patients with MTHFR C677T gene polymorphism: from genetics to epigenetics. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. P16.23. Bu çalışma, "**Fellowship Award**" ile ödüllendirilmiştir.

**A4.** F. Silan, H. Has, **M. Urfali**, A. Uludag, E. Ari, M. Gencer, O. Ozdemir. Premature chromatid separation in a woman with unexplained recurrent pregnancy loss; A case report. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J01.58.

**A5.** F. Silan, A. Uludag, C. Akurut, D. Kankaya, M. Gencer, **M. Urfali**, S. Yalcintepe, O. Ozdemir. Parental identification of aborted materials for chimerism and other molecular etiological parameters by microsatellite STR profiling. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J01.65.

**A6.** F. Silan, N. Topaloglu, **M. Urfali**, C. AKURUT, M. G. K. KOCAK, D. Kankaya, E. ARI, O. Ozdemir. Common MEFV gene mutation profiles in Familial Mediterranean Fever patients in Canakkale Population. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J17.22.

**A7.** Özdemir Ö., Silan F., **Urfali M.**, "BcII - RFLP Profiles For Serum Amyloid A1 And Mutated Mefv Gene Prevalence In Chronic Renal Failure Patients Requiring Long-Term Haemodialysis.", 11. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, 24-27 Eylül 2014, ss.160-160

**A8.** Silan F, Ari E, Uludag A, Yıldız O, İsn B, Paksoy B, **Urfali M.** Ozdemir O. The microdeletion/microduplication profiles in spontaneously aborted fetal materials: *Double blind results of QF-PCR and MLPA techniques.* International Biotechnology Congress. 7-9 May 2015, Bucharest/ROMANIA. **Bu araştırma Poster 3. 'lülü ile ödüllendirilmiştir.**

**A9.** **M Urfali**, F Silan, YZ Tan, F Celiker, Z Guler, O Ozdemir. Alterations in the telomere length distribution of cell-free DNA in human cancer. European Biotechnology Congress, 05-07 May 2016 Riga-LATVIA. Journal of Biotechnology 231, S109

**A10.** Fatma Silan, **Mine Urfali**, Onur Yıldız, Baris Paksoy, Ahmet Uludag, Ozturk Ozdemir. Familial X chromosome translocation, Xq triplication and SHOX gene deletion with short stature; Conflicting results of QF-PCR analysis for Xq segmental triplication. European Human Genetics Conference 2016, E-P13.17 May 21-24 2016, Barcelona/SPAIN

## Bildiriler

### Ulusal Kongre ve Bildirileri

**B1.** **Urfali M**, Silan F, Özdemir Ö, Uludağ A, Kankaya D, Karadeli Ü, Coşar E, Güneş F, Topaloğlu N. Çanakkale Populasyonunda beta-globulin gen profilleri. I. Hematolojik genetik sempozyumu, 2-4 Aralık 2013 İzmir, Bildiri özet Kitabı, s85

**B2.** Şık E, Silan F, Uludağ A, Yalçintepe S, **Urfali M**, Arı E, Özdemir Ö. Çanakkale onsekiz mart üniversitesi tıbbi genetik laboratuvarında saptanan trombofil mutasyonlarının endikasyonlara göre dağılımı. Hematolojik genetik sempozyumu, 2-4 Aralık 2013 İzmir, Bildiri özet Kitabı, s84

**B3.** Uysal D., Özdemir Ö., Silan F., **Urfali M.**, Yalçintepe S., Coşar E., Güngör CA. Tekrarlayan Düşükleri Olan Çiftlerde D16Z2 Lokus Polimorfizminin FISH Yöntemiyle Analizi. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.20, 6-7 Aralık 2013, İstanbul.

**B4.** Silan F., **Urfali M.**, Şık E., Akurut Ç., Özdemir Ö. Kliniğimizde Herediter Trombofil Saptanan 5 Olgu. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.29, 6-7 Aralık 2013, İstanbul.

**B5.** Göveç H., Uysal D., **Urfali M.**, Ari E., Silan F., Özdemir Ö. Sitogenetik Sonuçları Olan Bir Tek Gen Defekti: Prematur Chromatide Separation. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.40, 6-7 Aralık 2013, İstanbul. **En iyi Poster ödülü almıştır**

**B6.** Şık E., Özdemir Ö., Silan F., Kurtulgan HK., Şen M., Uludağ A., **Urfali M.** Aberrantly methylated promoter regions of tumour suppressor APC, p53, MGMT, DAPK1 and MLH3 genes that commonly affected by DNA hypermethylation in colorectal cancer. 11. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s41, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.

**B7.** Özdemir Ö., **Urfali M.**, Yıldız O., Uludağ A., Uysal D., Özkınay F., Silan F. Erkeklerde azospermi, kadında translokasyon taşıyıcılığı saptanan infertilite çifti. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s120, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.



- B8.** Özdemir Ö., Çetinkaya S., Kayataş M., Yıldırım ME., Silan F., Kurtulgan HK., Köksal B., **Urfalı M.**, Candan F. Bcll – RFLP profiles for serum amiloid A1 and mutated MEFV gene prevalence in chronic renal failure patients requiring long-term haemodialysis. 11. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s160, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.
- B9.** **Urfalı M.**, Özdemir Ö., Uysal D., Yıldız O., Onay H., Güngör ANÇ., Özkinay F., Silan F. Aynı ailede boy kısalığının iki farklı genetik etyolojisi. 11. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s81, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.
- B10.** Silan F., Yıldız O., **Urfalı M.**, Ulu MO., Batur Ş., Kankaya D., Özdemir Ö. İzole Malign Periferik Sinir Kılıf Tümörlü hastada *NF1* ve *OMGP* gen delesyonu. 11. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s82, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.
- B11.** Özdemir Ö., **Urfalı M.**, Yıldız O., Uludağ A., Uysal D., Özkinay F., Silan F. Erkeklerde azospermi, kadında translokasyon taşıyıcılığı saptanan infertilite çifti. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s120, 24-27 Eylül 2014, İstanbul.
- B12.** Silan F, Kahveci DO, **Urfalı M**, Paksoy B, Özdemir O. THE PREVALENCE AND HIGH-RISK GENOTYPE DISTRIBUTIONS OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS (HPV) FROM CERVICAL PAP SMEAR IN WOMEN FROM ÇANAKKALE COHORT. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP4, s9. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri
- B13.** Silan F, **Urfalı M**, Ozdemir O, Paksoy B, Uysal D. RECURRENT PREGNANCY LOSS AND PARENTAL CARRIER OF A STRUCTURAL CHROMOSOME TRANSLOCATION: A CASE REPORT OF A MOTHER WITH T(9;13). Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP5, s9. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri
- B14.** Ozdemir O, Paksoy B, Gürgen A, **Oruç M**, Yıldız O, Uysal D, Uludağ A, Silan F. AN INFERTILE CASE OF 47, XYY SYNDROME WITHOUT AUTISTIC SPECTRUM: COST EFFECTIVE WELL-DEFINE OF EXTRA Y CHROMOSOME BY GTG, C BANDINGS, QF-PCR AND FISH ANALYSE. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP6, s10. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri
- B15.** Silan F, Işın B, **Urfalı M**, Yıldız O, Uludağ A, Ozdemir O. A CASE DIRECTLY REQUESTED GENETIC COUNSELLING FROM MEDICAL GENETIC OUTPATIENT CLINIC AND DIAGNOSED MOSAIC KLINEFELTER SYNDROME AFTER KARYOTYPE AND FISH ANALYSES. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP6, s10. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri
- B16.** Silan F, Has H, Işın B, Uludağ A, **Urfalı M**, Yıldız O, Ozdemir O. A MOSAIC TURNER PHENOTYPE WITH SECONDARY AMENORRHEA, INFERTILITY AND NORMAL HORMONAL STATUS THAT DETERMINED BY FISH ANALYSIS. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP6, s10. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri
- B17.** Silan F, Karaağaçlı D, Kuru B, Uludağ A, Paksoy B, **Urfalı M**, Ozdemir O. THE 22Q11.21 DUPLICATION IN A NORMAL INTELLIGENCE CASE WITH PREMATURE OVARIAN FAILURE AND HIGH MYOPIA. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP19, s15. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri
- B18.** Kuru B, Silan F, Uludağ A, **Urfalı M**, Yıldız O, Ozdemir O. "FISHED" OUT THE CORRECT DIAGNOSIS: A CASE OF DIGEORGE SYNDROME WITH MENTAL RETARDATION, SHORT STATURE AND DYSMORPHIC FACIAL FINDINGS. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP20, s15. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri
- B19.** Kankaya D, Silan F, Yıldız O, **Urfalı M**, Güler Z, Ozdemir O. THE MOLECULAR ETHIOLOGICAL PARAMETERS IN PRELINGUAL SENSORINEURAL HEARING LOSS. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP21, s16. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri
- B20.** Silan F, Yıldız O, **Urfalı M**, Ozdemir O. INCREASED POINT MUTATION FREQUENCY IN K-RAS ONCOGENE IN CRC TUMOURS IN ÇANAKKALE POPULATION. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP23, s16. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri

- B21.Urfalı M.**, Silan F, Kuru B, Ozdemir OGENETIC SCREENING FOR CFTR AND AZF REGION OF Y CHROMOSOME MICRODELETIONS IN IDIOPATHIC CASES OF AZOOSPERMIA AND OLIGOZOOSPERMIA: A MOLECULAR AND CYTOGENETIC APPROACHE. Erciyes Medical Genetics, Abstracts, OP33, s20. Medical Genetics and Clinical Applications (with International Participation) 11-13 February, 2016, Kayseri
- B22.Kuru B.** , Silan F. ,Uludağ A. ,**Urfalı M.**, Yıldız, O. , Özdemir Ö. Mental Retardasyon, Kısa Boy ve Dismorfik Yüz Bulguları ile Karakterize DiGeorge Sendromlu Olgu FISH Yöntemi ile Doğru Tanı: Çanakkale Deneyimi. 1. Trakya Üniversiteler Birliği Yüksek Lisans Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale
- B23.Işın B.** , Silan F. , Uludağ A. , **Urfalı M.**,Özdemir Ö. Yenidoğan Döneminde Smith-Magenis Sendromu; Sitogenetik ve Moleküler Genetik Yaklaşım: ÇanakkaleDeneyimi. 1. Trakya Üniversiteler Birliği Yüksek Lisans Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale
- B24.HasH.**, Silan F. Özdemir Ö. Uludağ A. , Paksoy B., **Urfalı M** Her ikisinde de 9. Kromozom Anomalisi Olan Habituel Abortus Çiftinin Trizomi 21'li Fetüs Öyküsü: Çanakkale Deneyimi. 1. Trakya Üniversiteler Birliği Yüksek Lisans Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale
- B25.Güler Z.**, **Urfalı M.**, Silan F., Yıldız O., Özdemir Ö. Periferik Dolaşımda Serbest Fragmente DNA Eldesi ve Klinik Tanıda Yeri ve Önemi: Çanakkale Deneyimi. 1. Trakya Üniversiteler Birliği Yüksek Lisans Öğrenci Kongresi, 29-30 Nisan 2016, Çanakkale
- B26.O Ozdemir**, **M Urfalı**, O Yıldız, F Silan. Mental ve motor geriliği olan dismorfik olguda heterozigot 1p36 delesyonu: Sitogenetik, moleküler sitogenetik ArrayCGH, FISH ve MLPA tekniklerinin heterozigot delesyon saptama etkinliklerinin karşılaştırılması. XII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Official Journal of Turkish Society of medical Genetics Volume 1, Suplemented 1, p120, 05-09 Ekim 2016, Çesme- İZMİR
- B27. F Silan**, **M Urfalı**,O Ozdemir. A case of an infertile man with isodicentric Y Chromosome mosaicism with duplicated SRY, SHOX and deleted AZF regions. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Official Journal of Turkish Society of medical Genetics Volume 1, Suplemented 1, p121, 05-09 Ekim 2016, Çesme- İZMİR
- B28.M Urfalı**, O Ozdemir, O Yıldız, B. Paksoy, F Silan. Fenotipik olarak normal fakat habitüel abortus öyküsü olan bayanda nadir rastlanılan dengeli non-resiprokal 5p; 14p translokasyonu: Dengeli transloke olguların doğru tanısında kromozom analizinin önemi ve MicroArray-CGH yöntemine üstünlüğü. XII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Official Journal of Turkish Society of medical Genetics Volume 1, Suplemented 1, p122, 05-09 Ekim 2016, Çesme- İZMİR

## HOBİLERİ

- 1.Bisiklet
- 2.Doğa Yürüyüşleri

## ÖDÜLLERİ

1. Fellowship Award, European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June Milan, ITALY/2014
2. Eniyi Poster ÖdülüErişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, 6-7 Aralık 2013, İstanbul
- 3.En iyi poster 3'lük ödülü.Uluslararası Biyoteknoloji Kongresi, 7-9 Mayıs 2015 Budapeşte/ROMANIA/2015

EK 1.



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

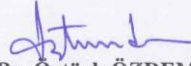
Sayı : KLİ.ARŞ.ETİK.KURUL.BŞK./050.99-216  
Konu : Başvuru İncelemesi

13/11/2014

Sayın Prof. Dr. Fatma SILAN

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz “Kanserli Hastalarda Cell Free DNA ve Tümör Dokusundan Telomer Analizi” başlıklı EK-2014-102 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 12/10/2014 tarih ve 21-24 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

  
Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR  
Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkan

Karar Tarihi :12.11.2014 14:30

Karar No :2014-21

**Karar-24)** EK-2014-102 no’lu araştırma ile ilgili olarak, proje yürütücüsü Prof. Dr. Fatma SILAN’ın göndermiş olduğu dilekçe kontrol edildikten sonra yapılan oylamada “**ETİK KURUL ONAYINI ALIR.**” kararı verilmiştir. ( Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR projede yer aldığından ve Doç. Dr. Coşkun SILAN projede yer alan Prof. Dr. Fatma SILAN’ın eşi olduğundan dolayı bu araştırma önerisi için oy kullanmamışlardır.)