

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ  
İLE İNCELENMESİ: BİYOİNFORMATİK ARAÇLAR VE VERİTABANLARI**

**Ali Yavuz ÇAKIR**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2019**



© 2019 [Ali Yavuz ÇAKIR]

## TEZ ONAYI

Ali Yavuz ÇAKIR tarafından hazırlanan " Prostat Kanseri ile İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile İncelenmesi: Biyoinformatik Araçlar ve Veritabanları " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK  
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Aytül BAYRAKTAR SOFU  
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Mümin POLAT  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Şule Sultan UĞUR

.....

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Ali Yavuz ÇAKIR**



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Kanser .....	3
2.2. Prostat Kanseri.....	3
2.3.1. BRCA1 ve BRCA2 Genleri .....	4
2.3.2. MLH1 Geni.....	5
2.3.3. APC Geni .....	6
2.3.4. ATM Geni .....	6
2.3.5. CHEK2 Geni.....	7
2.3.6. EPCAM Geni.....	8
2.3.7. HOXB13 Geni.....	8
2.3.8. MSH2 Geni.....	9
2.3.9. MSH6 Geni.....	10
2.3.10. NBN Geni.....	10
2.3.11. PMS2 Geni.....	11
2.3.12. TP53 Geni .....	11
2.3.13. BRIP1 Geni .....	12
2.3.14. FANCA Geni.....	12
2.3.15. PALB2 Geni .....	13
2.3.16. RAD51C Geni .....	13
2.3.17. STK11 Geni.....	14
2.3.18. GREM1 Geni.....	14
2.3.19. RAD51D Geni.....	15
2.3.20. HNF1B-rs4239217, rs757210, rs3760511, rs4794758, rs3744763, rs11649743, rs4430796, rs2005705, rs7405696, rs7501939.....	15
2.3.21. WT1 Geni .....	16
2.3.22. EHBP1 Geni.....	16
2.3.23. EPHB2 Geni.....	17
2.3.24. FGFR4 Geni.....	17
2.3.25. IGF2 Geni.....	18
2.3.26. ITGA6 Geni .....	18
2.3.27. MSMB Geni-rs10993994 .....	19
2.3.28. PLXNB1 Geni-rs140699424 .....	19
2.3.29. AKT1 Geni.....	20
2.3.30. CDKN2A Geni.....	20
2.3.31. ELAC2 Geni.....	20
2.3.32. RNASEL Geni .....	21
2.3.33. AR Geni .....	21
2.3.34. MSR1 Geni .....	22

2.3.35. BARD1 Geni.....	22
2.3.36. MUTYH Geni .....	23
2.3.37. POLD1 Geni.....	23
2.3.38. POLE Geni.....	23
2.4. Yeni Nesil Dizileme .....	24
3. MATERYAL VE METOD.....	26
3.1. MATERYAL.....	26
3.1.1. Çalışma Grubu .....	26
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	26
3.1.3. Yeni Nesil Dizileme Kiti İçeriği.....	27
3.1.4. Yeni Mutasyonların Sanger ile Doğrulanmasında Kullanılan Primerler .....	27
3.1.5. Elektronik Veritabanları ve Biyoinformatik Araçlar .....	28
3.2. METOD.....	32
3.2.1. Fragmantasyon .....	32
3.2.2. Manyetik Bead İle Saflaştırma.....	32
3.2.3. Uç Onarma(End Repair) .....	33
3.2.4. Manyetik Bead İle Saflaştırma.....	33
3.2.5. Adenin Ekleme(A-Tailing) .....	33
3.2.6. Manyetik Bead İle Saflaştırma.....	33
3.2.7. Adaptör Ligasyonu ve User Uygulaması.....	34
3.2.8. Manyetik Bead İle Saflaştırma.....	34
3.2.9. Dual Index .....	35
3.2.10. Manyetik Bead İle Saflaştırma.....	35
3.2.11. Hibridizasyon.....	36
3.2.12. Streptavidin Bead ile Yıkama.....	37
3.2.13. Post-Capture PCR .....	37
3.2.14. Manyetik Bead İle Saflaştırma.....	38
3.2.15. Cihaza Yükleme .....	38
3.2.16. Biyoinformatik Analiz.....	38
3.2.16.1. FASTQC- Kalite Kontrol .....	39
3.2.16.2. Ham Veri Hizalama.....	39
3.2.16.3. Hizalanan Verilerde Varyant Bulma .....	40
3.2.16.4. Anotasyon .....	40
3.2.16.5. Varyant Filtreleme ve Patojenisite Sınıflandırması.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. Varyantların Populasyon Allel Frekansları .....	42
4.2. İn-Sliko Veritabanı Skorları .....	42
4.3. Patojenisite Sınıflandırması .....	43
4.4. Yeni Mutasyonların Sanger Dizileme ile Doğrulanması .....	60
4.5. Tüm Varyantların Varyant Tiplerine Göre Dağılımı .....	63
KAYNAKLAR .....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	77

## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ: BİYOİNFORMATİK ARAÇLAR VE VERİTABANLARI**

**Ali Yavuz ÇAKIR**

**Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK**

Prostat kanseri, yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkili yaygın bir hastalıktır. Yüksek insidansa rağmen hastalığın oluşumundaki moleküler ve genetik olaylar tam olarak aydınlatılamamıştır. Yeni nesil dizileme, kanserin moleküler patogenezi hakkında yeni bilgiler sunmaktadır. Çalışmamızda, literatürde prostat kanseri ile ilişkilendirilmiş genlerden bir panel oluşturup, tüm ekzon, ekzon-intron bağlantı noktaları taranarak; SNP, mutasyon, küçük insersiyon ve delesyonların biyoinformatik veritabanları yardımı ile anlamlandırılması hedeflenmiştir.

Bu amaç doğrultusunda; prostat kanseri tanısı almış 21 olgu çalışmaya dahil edilmiş olup, hastalık ile ilişkilendirilen 39 genin tüm ekzon bölgeleri ve ekzon-intron bağlantı noktaları prob tabanlı kit kullanılarak yeni nesil dizileme platformu Illumina MiSeq ile dizilenmiştir. Saptanan yeni mutasyonlar Sanger dizileme yöntemi ile doğrulanmıştır. Elde edilen veriler elektronik veritabanları kullanılarak değerlendirilmiştir.

Yapılan çoklu gen paneli dizilemesi sonucunda; AR (c.1174C>T), AR (c.1406\_1420del), BRIP1 (c.139C>G), ELAC2 (c.1621G>A), FANCA (c.2574C>G) genlerinde Clinvar veritabanı girdilerine göre patojenik mutasyon; APC (c.497C>G), APC (c.3887C>A), BRCA2 (c.2918C>G), CHEK2 (c.722-10T>C), FANCA (c.1638A>C), ITGA6 (c.182+11\_182+15delAGACCinsGGACT) genlerinde ise yeni mutasyonlar tespit edilmiştir. Ayrıca klinik önemi bilinmeyen (VUS) ve veritabanlarında çok düşük frekansa sahip olan varyantlar da tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz bulgular; Türk toplumunda prostat kanserinin genetik patogenezinin anlaşılmasında, mutasyon sıklıklarının belirlenmesinde, genotip-fenotip korelasyonlarının ortaya konulmasında önemli rol oynamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Yeni Nesil Dizileme, Biyoinformatik, Prostat Kanseri, Veritabanları.

**2019, 77 sayfa**

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### INVESTIGATION OF GENES ASSOCIATED WITH PROSTATE CANCER BY NEXT GENERATION SEQUENCING: BIOINFORMATICS TOOLS AND DATABASES

Ali Yavuz ÇAKIR

Süleyman Demirel University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Bioengineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK

Prostate cancer is a common disease associated with high mortality and morbidity. Despite the high incidence, the molecular and genetic phenomena of the disease have not been fully elucidated. Next generation sequencing provides new information about the molecular pathogenesis of cancer. In our study, by creating a panel of genes associated with prostate cancer in the literature, all exon, exon-intron junctions were scanned; SNP, mutation, small insertions and deletions are aimed to be interpreted with the help of bioinformatics databases.

In accordance with this purpose; 21 patients diagnosed with prostate cancer were included in the study. All exon regions and exon-intron junctions of 39 genes associated with the disease were sequenced with the next generation sequencing platform "Illumina MiSeq" using a probe-based kit. The new mutations detected were confirmed by Sanger sequencing method. The data obtained were evaluated using electronic databases.

As a result of multiple gene panel sequencing; pathogenic mutation according to Clinvar database entries found in AR (c.1406\_1420del), AR (c.1174C>T) BRIP1 (c.139C> G), ELAC2 (c.1621G> A), FANCA (c.2574C> G) genes; new mutations have been identified in APC (c.497C> G), APC (c.3887C>A) BRCA2 (c.2918C> G), CHEK2 (c.722-10T>C), FANCA (c.1638A>C), ITGA6 (c.182+11\_182+15del AGACCinsGGACT) genes. Additionally, variants with unknown clinical significance (VUS) and very low frequency in the databases were also detected.

Our findings; It plays an important role in understanding the genetic pathogenesis of prostate cancer in Turkish population, determining mutation frequencies in population and revealing genotype-phenotype correlations.

**Keywords:** Next Generation Sequencing, Bioinformatics, Prostate Cancer, Databases

**2019, 77 pages**



## TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Dr.Öğr.Üyesi Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK'e, Akademi'de ilerlememi sürekli öğütleyen ve destek veren kıymetli annem Hatice ÇAKIR ve babam Mesut ÇAKIR'a, çalışmamın her anında desteklerini esirgemeyen İntron Sağlık kurucu ve yöneticisi Serhat DEMİRKOL, kıymetli çalışma arkadaşlarım Emine GÜLER ÇELİK ve Bahar TALAY'a, biyoinformatik çalışmalarda kendimi geliştirmek için araştırmacı olarak bulunduğum, İtalya-Ferrara Üniversitesi'nden Prof. Stefano VOLINIA'ya bana kattığı etik, biyoinformatik ve bilim anlamındaki derin bilgilerden ötürü teşekkür ederim.

Ali Yavuz ÇAKIR  
ISPARTA, 2019



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. BRCA1 geninin sitogenetik lokasyonu: 3p22.2 - GRCh38.....	4
Şekil 2.2. BRCA2 geninin sitogenetik lokasyonu: 13q13.1- GRCh38.p12.....	4
Şekil 2.3. MLH1 geninin sitogenetik lokasyonu: 3p22.2 - GRCh38.p12.....	5
Şekil 2.4. APC geninin sitogenetik lokasyonu: 5q22.2- GRCh38.p12.....	6
Şekil 2.5. ATM geninin sitogenetik lokasyonu: 11q22.3.....	6
Şekil 2.6. CHEK2 geninin sitogenetik lokasyonu: 22q12.1.....	7
Şekil 2.7. EPCAM geninin sitogenetik lokasyonu:2p21.....	8
Şekil 2.8. HOXB13 geninin sitogenetik lokasyonu:17q21.32.....	8
Şekil 2.9. MSH2 geninin sitogenetik lokasyonu: 2p21-p16.3.....	9
Şekil 2.10. MSH6 geninin sitogenetik lokasyonu: 2p16.3.....	10
Şekil 2.11. NBN geninin sitogenetik lokasyonu: 8q21.3.....	10
Şekil 2.12. PMS2 geninin sitogenetik lokasyonu:7p22.1.....	11
Şekil 2.13. TP53 geninin sitogenetik lokasyonu:17p13.1.....	11
Şekil 2.14. BRIP1 geninin sitogenetik lokasyonu:17q23.2.....	12
Şekil 2.15. FANCA geninin sitogenetik lokasyonu:16q24.3.....	12
Şekil 2.16. PALB2 geninin sitogenetik lokasyonu:16p12.2.....	13
Şekil 2.17. RAD51C geninin sitogenetik lokasyonu:17q22.....	13
Şekil 2.18. STK11 geninin sitogenetik lokasyonu: 19p13.3.....	14
Şekil 2.19. GREM1 geninin sitogenetik lokasyonu:15q13.3.....	14
Şekil 2.20. RAD51D geninin sitogenetik lokasyonu: 17q12.....	15
Şekil 2.21. HNF1B geninin sitogenetik lokasyonu: 17q12.....	15
Şekil 2.22.WT1 geninin sitogenetik lokasyonu: 11p13.....	16
Şekil 2.23. EHBP1 geninin sitogenetik lokasyonu:2p15.....	16
Şekil 2.24. EPHB2 geninin sitogenetik lokasyonu: 1p36.12.....	17
Şekil 2.25. FGFR4 geninin sitogenetik lokasyonu: 5q35.2.....	17
Şekil 2.26. IGF2 geninin sitogenetik lokasyonu: 11p15.5.....	18
Şekil 2.27. ITGA6 geninin sitogenetik lokasyonu: 2q31.1.....	18
Şekil 2.28. MSMB geninin sitogenetik lokasyonu: 10q11.22.....	19
Şekil 2.29. PLXNB1 geninin sitogenetik lokasyonu: 3p21.31.....	19
Şekil 2.30. AKT1 geninin sitogenetik lokasyonu: 14q32.33.....	20
Şekil 2.31. CDKN2A geninin sitogenetik lokasyonu: 9p21.3.....	20
Şekil 2.32. ELAC2 geninin sitogenetik lokasyonu: 17p12.....	20
Şekil 2.33. RNASEL geninin sitogenetik lokasyonu: 1q25.3.....	21
Şekil 2.34. AR geninin sitogenetik lokasyonu: Xq12.....	21
Şekil 2.35. MSR1 geninin sitogenetik lokasyonu: 8p22.....	22
Şekil 2.36. BARD1 geninin sitogenetik lokasyonu: 2q35.....	22
Şekil 2.37. MUTYH geninin sitogenetik lokasyonu: 1p34.1.....	23
Şekil 2.38. POLD1 geninin sitogenetik lokasyonu: 19q13.33.....	23
Şekil 2.39. POLE geninin sitogenetik lokasyonu: 12q24.33.....	23
Şekil 3.1. DNA-seq Analysis Pipeline. National Cancer Institute (NCI).....	39
Şekil 3.2. VCF dosyası içeriği.....	40
Şekil 4.1. APC Geni c.497C>G IGV Görüntüsü.....	60
Şekil 4.2. APC Geni c.3887C>A IGV Görüntüsü.....	60
Şekil 4.3. BRCA2 Geni c.2918C>G IGV Görüntüsü.....	61
Şekil 4.4. CHEK2 Geni c.722-10T>C IGV Görüntüsü.....	61
Şekil 4.5. FANCA Geni c.1638A>C IGV Görüntüsü.....	61

Şekil 4.6. ITGA6 Geni c.182+11_182+15delAGACCinsGGACT IGV Görüntüsü....	62
Şekil 4.7. APC Geni c.497C>G Sanger Görüntüsü.....	62
Şekil 4.8. BRCA2 Geni c.2918C>G Sanger Görüntüsü .....	62
Şekil 4.9. Tüm varyantların, Varyant tiplerine göre dağılımı .....	63
Şekil 4.10. Tüm varyantların, genlere göre yüzdelik dağılımı.....	64



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	27
Çizelge 3.2. Yeni Nesil Dizileme Kiti İçeriği .....	27
Çizelge 3.3 Doğrulama primerleri .....	28
Çizelge 3.4. Temel Biyoinformatik Veritabanları .....	28
Çizelge 3.5. Anotasyon İçin Kullanılan Biyoinformatik Veritabanları.....	29
Çizelge 3.6. Kullanılan Biyoinformatik araçlar ve Programlar.....	31
Çizelge 3.7. Patojenisite Hesaplamaya Yardımcı Veritabanları .....	31
Çizelge 3.8. Fragmentasyon .....	32
Çizelge 3.9. Dual İndex.....	35
Çizelge 3.10. Hibridizasyon.....	36
Çizelge 3.11. Post Capture PCR.....	37
Çizelge 4.1. Varyantlar ve allel frekansları .....	44
Çizelge 4.2. Varyantların in-siliko tahmin skorları.....	51
Çizelge 4.3. Varyant İn-Siliko Patojenisite Skorlandırma Tablosu .....	56
Çizelge 4.4. Varyantların Patojenisite Sınıflandırma Tablosu .....	56

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

NGS	Next Generation Sequencing
YDS	Yeni Nesil Dizileme
CDS	Coding Sequence
Bç	Baz Çifti
PCR	Polimerase Chain Reaction
FASTQ	Raw Data
BAM	Binary Alignment Map Dosyası
SAM	Sequence Alignment Map Dosyası
VCF	Variant Vall Format
BED	Browser extended format
GWAS	Genome Wide Association Studies



## 1. GİRİŞ

Erkeklerde prostat kanseri yaşa ve cinsiyete bağılı olarak, dünyada en fazla görülen ikinci kanser türüdür ve her sene 1.1 milyon prostat kanseri teşhisi konulmaktadır (King vd., 2015). Bu yüksek insidansa rağmen prostat kanserinin etyolojisi ve risk faktörleri konusundaki bilgiler sınırlıdır. Prostat kanserinin gelişim mekanizması tam olarak ortaya konulamamış olsa da; biyolojik, genetik, genomik instabilite ve epigenetiğin de aralarında olduğu etyolojik faktörlerin hastalığın gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir (Konaç ve Sözen, 2014).

Kalitsal prostat kanserinin genetik temeli çok az anlaşılmıştır. Ailede prostat kanseri öyküsü, kalıtsal germline mutasyonlar ile birlikte tüm kanserlerin yaklaşık %9'unu ve 55 yaşın altındaki erkeklerde %45'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir (Keetch vd., 1996; Carter vd., 1992). Prostat kanserinin gelişimi, henüz tanımlanmamış çevresel ve genetik faktörlerden etkilense de, genetik çalışmalar özellikle prostat kanseri riski ile ilişkili olabilecek gen anormalliklerini ortaya koymaktadır (Kral vd., 2011).

Biyolojik araştırmalar, organizmaların kompleks mekanizmalarını anlamada temel yapılarıdır. Günümüzde, NCBI, Pubmed ve diğer veritabanlarını eşliğinde kullanılan biyoinformatik metodlar, büyük gen panellerini incelemek ve sonuçları detaylı olarak incelememize olanak sağlayan elverişli uygulamalardır. Biyoinformatik tarama yaklaşımları, mutasyon tarama ve Genom-Wide çalışmalarda, araştırmacılara alternatif bir yol olarak popülerlik kazanmaktadır. Yeni Nesil Dizileme öncesi dönemde, aynı anda sadece bir veya birkaç gen çalışılabilir iken, Yeni Nesil Dizileme teknolojileri ile binlerce geni aynı anda çalışarak kısa sürede oluşturulan verinin anlamlandırılması yapılabilmektedir.

İnsan genomu üzerindeki bilgimiz hala yetersiz düzeyde olup, dünya genelindeki verilerin anlamlandırılması amacı ile birçok farklı veritabanı geliştirilmiştir. Bu veritabanları ile SNP, ekspresyon ve post-transkripsiyonel çıktılar kolay bir şekilde değerlendirilebilmektedir. Ham verilerin anlamlandırılmasında; alel frekansları için; 1000Genome, EXAC, ESP ve

GnomAD, in siliko tahminleri için SIFT, PolyPhen2, PROVEAN, GERP ve DANN skorları, patojenisite sınıflandırması için; Clinvar, Varsome ve Franklin gibi veritabanları kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, literatürde prostat kanseri ile ilişkilendirilmiş genlerden yeni nesil dizileme tabanlı genetik yatkınlık tarama kiti geliştirerek, ailesel ve kalıtsal prostat kanseri olma riski taşıyan bireylerde bulunan mutasyonların tümünün belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda; hedeflenen genlerin çoğaltılabilmesi için prob tabanlı çalışma yapılmış ve yeni nesil dizileme platformu Illumina MiSeq ile 39 genin tüm kodlayan ekzon, ekzon-intron bağlantı noktalarının dizileme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda, prostat kanseri ile ilişkili olan “*AKT1, APC, AR, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDKN2A, CHEK2, EHBP1, ELAC2, EPCAM, EPHB2, FANCA, FGFR4, GREM1, HNF1B, HOXB13, IGF2, ITGA6, MLH1, MSH2, MSH6, MSMB, MSR1, MUTYH, NBN, PALB2, PLXNB1, PMS2, POLD1, POLE, RAD51C, RAD51D, RNASEL, STK11, TP53, WT1*” genlerinde bulunan SNP, mutasyon, küçük insersiyon ve delesyonların taraması yapılarak çıkan sonuçların mutasyon veritabanları yardımı ile anlamlandırılması hedeflenmiştir.

## **2. KAYNAK ÖZETLERİ**

### **2.1. Kanser**

Kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan, hücrelerin kontrolsüz bölünerek çoğalması ile meydana gelen kompleks bir hastalıktır. Bilinen 100'den fazla kanser türü olmasına ve belli tipteki kanserler için olabildiğince standart yaklaşımlar geliştirilmesine rağmen kanser aynı zamanda kişisel bir hastalıktır (Baykara, 2016).

Kanser, genetik ve epigenetik değişiklikleri kapsayan çok aşamalı bir süreç sonucu dominant ve resesif mutasyonların somatik hücrelerde birikmesiyle oluşan bir somatik genetik hastalıktır. Mutasyonlar kalısal olabilir ya da somatik hücrelerde kendiliğinden ya da çevresel faktörlerin etkisiyle kazanılmış olabilir (Ekmekçi, 2006).

### **2.2. Prostat Kanseri**

Prostat, erkeklerde spermi besleyen ve taşıyan seminal sıvıyı üreten küçük ceviz biçimli bir bezdir. Prostat kanseri prostatta ortaya çıkan bir kanser türüdür. Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen solid doku kanseridir (Tefekli, 2012). Prostat kanseri yavaş büyür ve başlangıçta ciddi zararlar veremeyeceği prostat bezi ile sınırlanabilir. Bununla birlikte, bazı prostat kanseri türleri yavaş büyüyüp minimal tedavi veya hiç tedaviye ihtiyaç duymayabilirken, diğer tipler agresiftir ve hızla yayılabilmektedir.

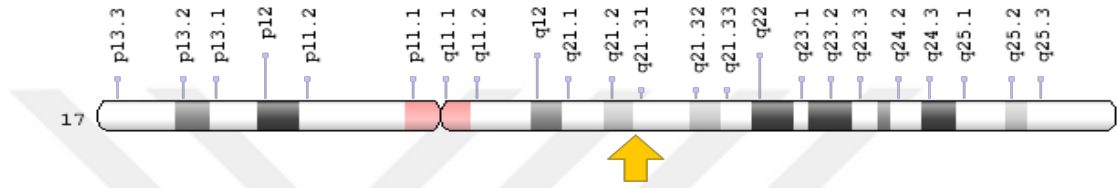
Prostat kanseri genetiğinde en güçlü belirteç, aile öyküsüdür. Kanseri türleri içerisinde prostat kanserinde bulunan germline mutasyonların oranı tüm kanserlere oranla %9 ve 55 yaşın altındaki erkeklerde %45 olarak belirtilmiştir (Zhang vd., 2003). Herediter prostat kanseri, tüm olguların yaklaşık %10'undan daha azını oluşturmaktadır. Prostat kanserinin başlaması, gelişmesi ve istilasında rol oynayan moleküler yolların çoğu sporadiktir (Konaç ve Sözen, 2014).



### 2.3. Hedeflenen Genler

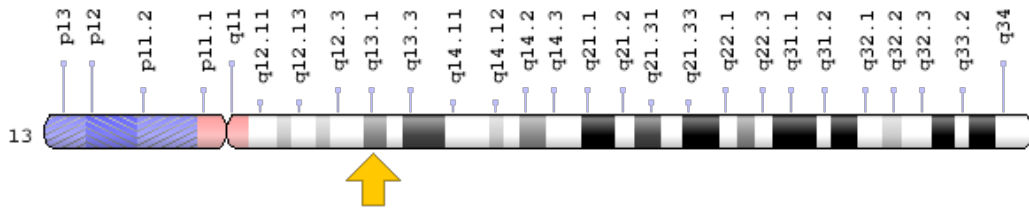
Bu bölümde, prostat kanseri ile ilişkilendirilmiş germline mutasyonları içeren genler, lokasyonları, işlevleri ve bu genlerin hastalık ile ilişkisini değerlendiren çalışmalara değinilecektir. Prostat kanseri ile ilişkilendirilmiş genlere ait bilgiler Ensembl veritabanından alınmıştır (Ensembl Genom Veritabanı, 1999).

#### 2.3.1. BRCA1 ve BRCA2 Genleri



Şekil 2.1. BRCA1 geninin sitogenetik lokasyonu: 3p22.2 - GRCh38.

BRCA1 geni 3. kromozomun p22.2 bölgesinde yer alır (Şekil 2.1.). BRCA1 geni 24 ekzonu ile 1884 aminoasit uzunluğunda olan BRCA1 proteinini kodlar. Aynı zamanda BRCC1, FANCS, PPP1R53, RNF53 isimleri ile de anılan bu gen tümör baskılayıcı gen grubundandır.

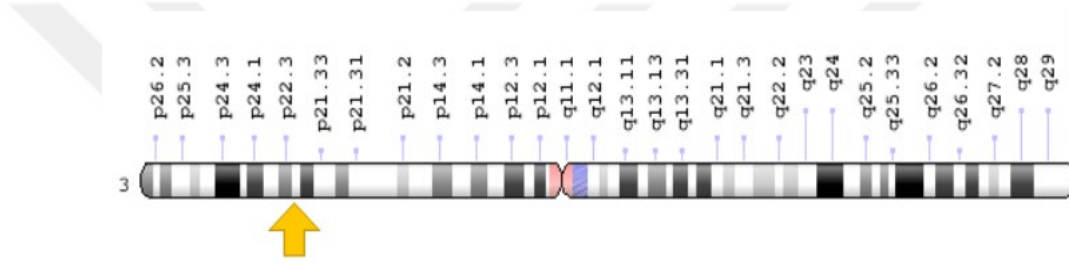


Şekil 2.2. BRCA2 geninin sitogenetik lokasyonu: 13q13.1- GRCh38.p12.

BRCA2 geni 13. kromozomun q13.1 bölgesinde yer alır (Şekil 2.2.). BRCA1 geni 27 ekzonu ile 3418 aminoasit uzunluğunda olan BRCA2 proteinini kodlar (Transcript ID=ENST00000380152.7). Aynı zamanda BRCC2, FACD, FAD, FAD1, FANCD isimleri ile de anılan bu gen tümör baskılayıcı gen grubundandır.

BRCA1 ve BRCA2 genleri, genetik kararlılığın korunmasında önemli fonksiyonlar içeren, tümör baskılayıcı genlerdir (Yoshida ve Miki, 2004). BRCA1 ve BRCA2 genleri otozomal dominant kalıtım paterni ile karakterize edilir ve bu genlerde heterozigot germline mutasyon barındıran bireyler, alkilleyici ajanlar, iyonlaştırıcı radyasyon, reaktif oksijen türleri veya kimyasal mutajenler tarafından indüklenen ikinci bir hasarın sonucu olarak fonksiyonel olan alleli kaybetme riski altındadır (Evers vd., 2010). BRCA1 ve BRCA2 genlerinde oluşan mutasyonların prostat kanserine olan etkileri sırasıyla, %0.44 ve %1.2 olarak belirtilmiştir (Leongamornlert vd., 2012).

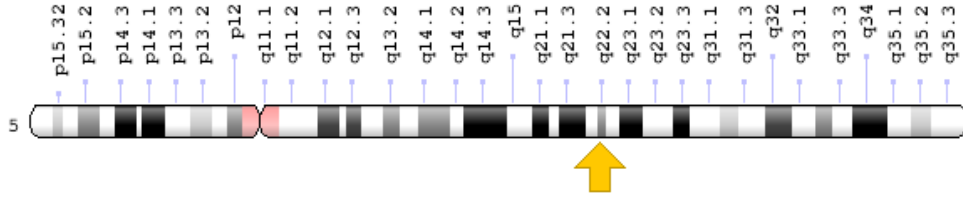
### 2.3.2. MLH1 Geni



Şekil 2.3. MLH1 geninin sitogenetik lokasyonu: 3p22.2 - GRCh38.p12.

MLH1 geni 3. kromozomun q22.2 bölgesinde yer alır (Şekil 2.3.). MLH1 geni tarafından kodlanan protein, DNA onarım mekanizmasının bir parçası olan MutL alpha yapısını oluşturabilmek için, PMS2 endonükleaz geni ile heterodimerize olabilir. MutL alpha, MutS beta ve diğer etken proteinler tarafından bağlandığı zaman, MutL alpha yapısının PMS2 bileşeni, DNA uyumsuzluklarının yakınında tek iplikli bir kokuşa neden olur ve ekzonükleaz parçalanması için giriş noktası sağlar. Ayrıca bu gen tarafından kodlanan protein, DNA hasar sinyallerine dahildir ve MutL gamma yapısını oluşturmak için DNA hasar onarım proteini MLH3 ile heterodimer yapı oluşturabilir. Fredriksson vd.(2006), bu gende oluşan mutasyonları ve prostat kanseriyle olan ilişkisini belirtmişlerdir.

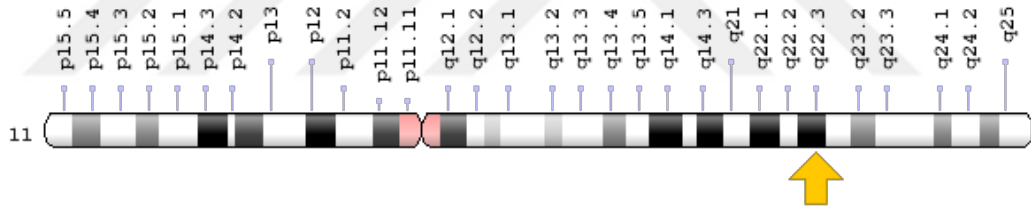
### 2.3.3. APC Geni



Şekil 2.4. APC geninin sitogenetik lokasyonu: 5q22.2- GRCh38.p12.

APC geni 5. kromozomun q22.2 bölgesinde yer alır (Şekil 2.4.). APC geni 16 ekzonu ile 2843 aminoasit uzunluğunda olan “WNT sinyal yolağı APC düzenleyicisi” proteinini kodlar (Transcript ID= ENST00000257430.9). Aynı DP2, DP2.5, DP3, PPP1R46 isimleri ile de anılan bu gen tümör baskılayıcı gen grubundandır. Watanabe vd.(1996), APC geni mutasyonlarını prostat kanseri ile ilişkilendirmiştir.

### 2.3.4. ATM Geni



Şekil 2.5. ATM geninin sitogenetik lokasyonu: 11q22.3

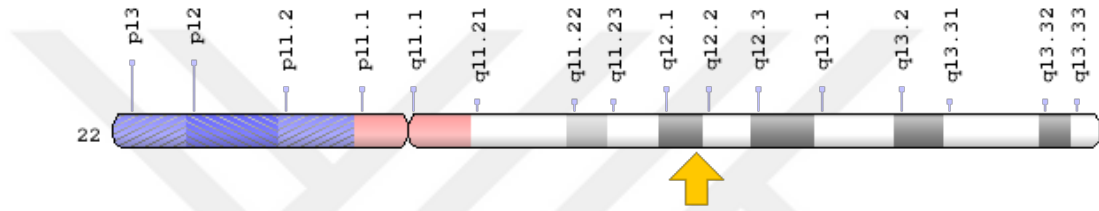
ATM geni 11. Kromozomun q22.3 bölgesinde yer alır (Şekil 2.5.). ATM geni 63 ekzonu ile 3056 aminoasit uzunluğunda olan ATM serine/threonine kinase proteinini kodlar. Aynı zamanda ATA, ATC, ATD, ATDC, TEL1, TELO1 isimleri ile de anılan bu gen DNA onarım ve hücre bölünmesinde rol almaktadır.

ATM proteini sinir sistemi ve bağışıklık sistemi de dahil olmak üzere birçok vücut sisteminin normal gelişimi ve aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bu protein, hasar görmüş DNA iplikçiklerini tanımlamada hücrelere yardım eder. DNA farklı ajanların etkisiyle (zehirli kimyasalla, radyasyon vb.) hasar görebilir veya hücre bölünmesi esnasında, kromozomlar arasında genetik

materyali değişimi yapılırken, doğal olarak oluşabilir. ATM proteini, hasar görmüş DNA'yı düzelten enzimleri aktive ederek DNA onarımını koordine eder.

ATM genindeki germline mutasyonlar prostat kanseri (PCa) ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada ATM geninde bulunan mutasyonların, çalışmaya katılan prostat hastalarının %0,41' inde görüldüğü belirtilmiştir (Na vd. 2016).

### 2.3.5. CHEK2 Geni

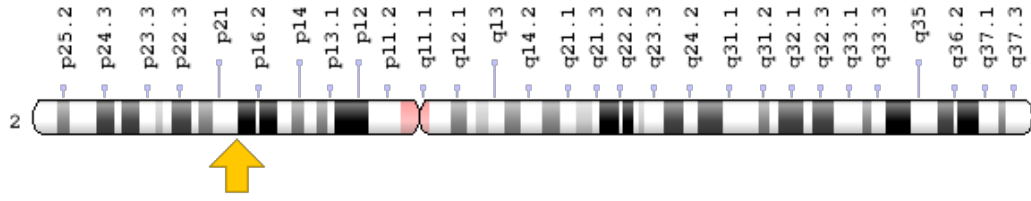


şekil 2.6. CHEK2 geninin sitogenetik lokasyonu: 22q12.1

CHEK2 geni 22. Kromozomun q12.1 bölgesinde yer alır (şekil 2.6.). CHEK2 geni 16 ekzonu ile 586 aminoasit uzunluğunda olan Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Kinaz 2 proteinini kodlar (ENST00000382580.6). Aynı zamanda CDS1, CHK2, HuCds1, PP1425, RAD53 isimleri ile de anılan bu gen tümör supresor genidir ve hücrelerin hızlı bir şekilde veya kontrolsüz olarak büyüyüp, bölünmesini engelleyerek hücre bölünmesini düzenler.

DNA hasarıyla karşılaşılması durumunda CHEK2 proteini TP53'de dahil olmak üzere birçok farklı protein ile etkileşime geçer. Bu proteinler hücre bölünmesini durdurarak, hücrenin hatayı onaracağına mı yoksa kontrollü bir şekilde hücrenin ölümünü (apoptoz) gideceğini belirler. Bu işlem mutasyona uğramış veya hasar görmüş DNA'lı hücrelerin bölünmesini engelleyerek tümörlerin gelişmesini önler. CHEK2 geninde görülen bazı mutasyonlar, prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Wang vd., 2015)

### 2.3.6. EPCAM Geni

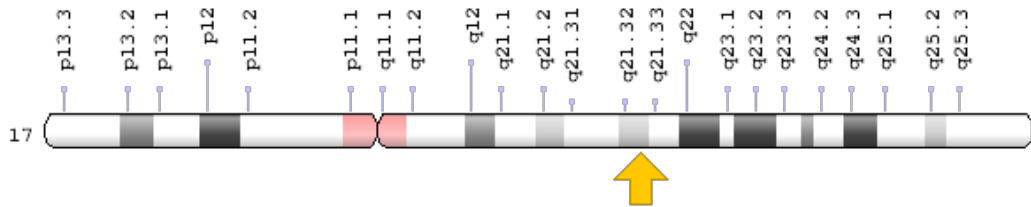


Şekil 2.7. EPCAM geninin sitogenetik lokasyonu:2p21

EPCAM geni 2. kromozomun p21 bölgesinde yer alır (Şekil 2.7.). EPCAM geni 10 ekzonu ile 342 aminoasit uzunluğunda olan epitel hücre adezyon molekülü proteinini kodlar (ENST00000405271.5.6). Aynı zamanda 17-1A, 323/A3, CD326, CO-17A, EGP-2, EGP34, EGP40, ESA isimleri ile de anılan EpCAM proteini, vücudun yüzeylerini ve boşluklarını kaplayan hücreler olan, epitel hücrelerinde bulunur ve hücrelerin birbirine yapışmasına yardımcı olan epitel hücreleri çevreleyen zarı kaplar (hücre yapışması).

Ek olarak, hücre zarındaki protein, hücre dışından hücre çekirdeğine sinyallerin iletilmesine yardımcı olan hücre içi yapı olan (EpICD) adı verilen bir parçayı serbest bırakarak belirli bir yerde kesilebilir. EpICD, çekirdeğe gider ve hücre büyümesi ve bölünmesi (çoğalması), olgunlaşması (farklılaşması) ve hareketi (göçü) ile ilgili birkaç genin aktivitesini düzenleyen bir kompleks oluşturan, diğer proteinlerle birleşir. Bu aşamalar hücre ve dokuların doğru gelişimi için önemli süreçlerdir. EPCAM geninde bulunan germline mutasyonların prostat kanserinde etkin olabileceği belirtilmiştir (Bryant Furlow, 2017).

### 2.3.7. HOXB13 Geni



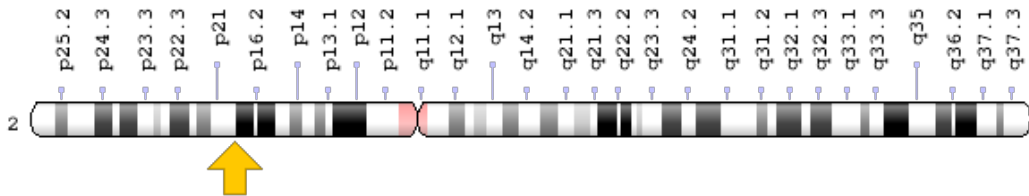
Şekil 2.8. HOXB13 geninin sitogenetik lokasyonu:17q21.32

HOXB13 geni 17. Kromozomun q21.32 bölgesinde yer alır (Şekil 2.8.). HOXB13 geni 2 ekzonu ile 284 aminoasit uzunluğunda olan epitel hücre adezyon

molekölü proteinini kodlar (ENST00000290295.7). Homeobox protein Hox-B13 isimleri ile de bilinen HOXB13 proteini, DNA'nın belirli bölgelerine bağlanarak diğer genlerin aktivitesini düzenleyen bir transkripsiyon faktördür. HOXB13 proteininin cildin gelişiminde ve korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Aynı zamanda tümör baskılayıcı olarak da işlev görür ve hücrelerin çok hızlı veya kontrolsüz bir şekilde büyümesini ve bölünmesini engeller.

HOXB13 genindeki en az iki mutasyon prostat kanseri riski ile ilişkilendirilmiş olup, bu mutasyonları taşıyan erkeklerde de hastalığın daha agresif olduğu görülmüştür. Prostat kanseri ile ilişkili HOXB13 gen mutasyonları, HOXB13 proteininin MEIS etkileşimli bölgelerini değiştirmektedir. Araştırmacılar, protein yapısını değiştiren bu mutasyonların, HOXB13 proteininin DNA ile etkileşimlerini düzenleme yeteneğini bozabileceğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, proteinin tümör baskılayıcı işlevi bozulmakta ve prostat kanserine yol açabilecek kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanmaktadır (NIH- Ulusal Sağlık Enstitüsü, 1979, Amerika).

### 2.3.8. MSH2 Geni

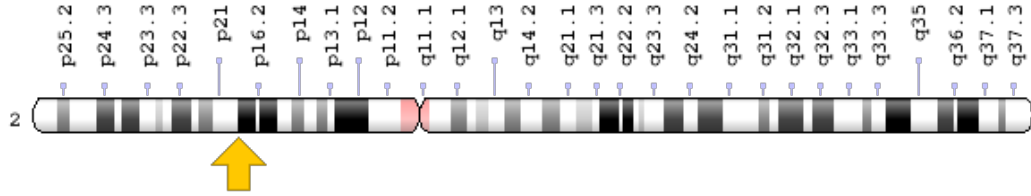


Şekil 2.9. MSH2 geninin sitogenetik lokasyonu: 2p21-p16.3

MSH2 geni 16. kromozom p kısa kolunun 21-16 bölgeleri arasında yer alır (Şekil 2.9.). MSH2 geni 2 ekzonu ile 934 aminoasit uzunluğunda olan MutS homolog 2 proteinini kodlar (ENST00000233146.6.7). COCA1, HNPCC, HNPCC1 isimleri ile de bilinen MutS homolog 2 proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. Bu protein, hücre bölünmeye hazırlanırken DNA kopyalandığında, DNA üzerinde yapılan hataların düzeltilmesine yardımcı olur. Bu protein MSH3 ve MSH6 proteinleri ile birleşerek, kompleks yapı oluşturur. Bu yapı DNA replikasyonu esnasında, DNA üzerinde oluşan değişimleri tespit eder. Bu gende oluşan

mutasyonların, prostat kanserinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Das vd., 2019).

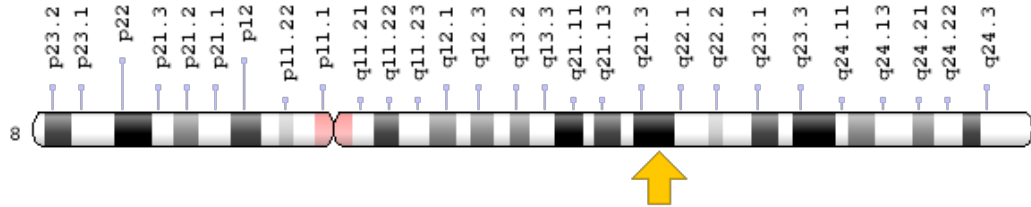
### 2.3.9. MSH6 Geni



Şekil 2.10. MSH6 geninin sitogenetik lokasyonu: 2p16.3

MSH6 geni 2. Kromozom p kısa kolunun 16.3 bölgesinde yer alır (Şekil 2.10.). MSH6 geni 10 ekzonu ile 1360 aminoasit uzunluğunda olan MutS homolog 6 proteinini kodlar (ENST00000234420.9). GTBP ismi ile de bilinen MutS homolog 6 proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. MMR kompleksinin bir üyesi olan bu gende bulunan germline varyantların, prostat kanseri üzerinde etkisi olabileceği belirtilmiştir (Nicolosi vd., 2019).

### 2.3.10. NBN Geni

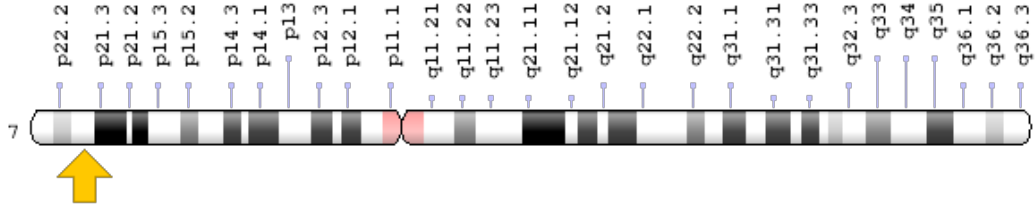


Şekil 2.11. NBN geninin sitogenetik lokasyonu: 8q21.3

NBN geni 8. Kromozom q kolunun 21.3 bölgesinde yer alır (Şekil 2.11.). NBN geni 16 ekzonu ile 754 aminoasit uzunluğunda olan Nibrin proteinini kodlar (ENST00000265433.7). AT-V1, AT-V2, ATV, NBS, NBS1 isimleri ile de bilinen Nibrin proteini, DNA hatalarının onarımı da dahil olmak üzere, birçok hücrel kritik fonksiyonda önemli rol oynar. Nibrin MRE11A ve RAD50 genleri tarafından üretilen proteinlerle etkileşime geçerek büyük bir protein kompleksi oluştururlar. Nibrin proteini MRE11A ve RAD50 proteinlerini hücre nükleusuna taşıyıp, DNA hasarının olduğu bölgeyi göstererek, kompleksin aktivitesini

düzenler. Bazı kalıtsal NBN mutasyonları zayıf prognoz prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Cybulski vd., 2013).

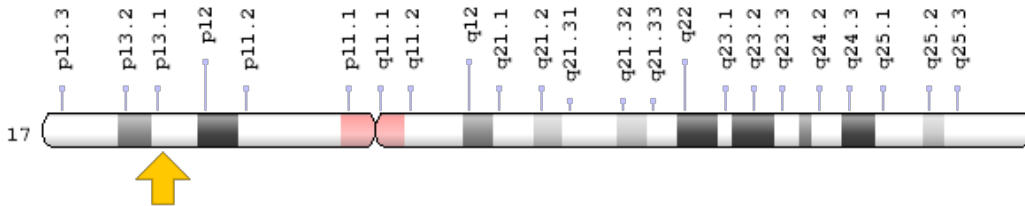
### 2.3.11. PMS2 Geni



Şekil 2.12. PMS2 geninin sitogenetik lokasyonu:7p22.1

PMS2 geni 7. kromozom p22.1 bölgesinde yer alır (Şekil 2.12.). PMS2 geni 15 ekzonu ile 862 aminoasit uzunluğunda olan PMS1 homolog 2 proteinini kodlar (ENST00000265849.12). HNPCC4, MLH4, PMSL2 isimleri ile de bilinen PMS1 homolog 2 proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. Bu gen DNA onarımında önemli bir rol oynamaktadır. MLH1 geni ile kompleks oluşturur. Bu kompleks DNA replikasyonu esnasında yapılan hataları onarmada görevli proteinleri koordine etmektedir. PMS2 geninde bulunan bazı mutasyonların Prostat kanseri oluşumunda etkili olduğu belirtilmiştir (Kathleen vd., 2017).

### 2.3.12. TP53 Geni

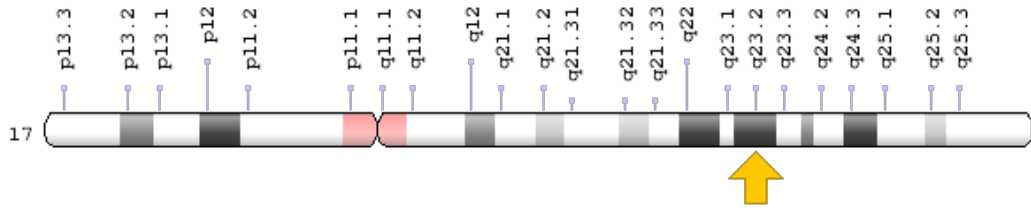


Şekil 2.13. TP53 geninin sitogenetik lokasyonu:17p13.1

TP53 geni 17. kromozom p13.1 bölgesinde yer alır (Şekil 2.13.). TP53 geni 10 ekzonu ile 354 aminoasit uzunluğunda olan Tümör Protein 53 isimli proteini kodlar (ENST00000610292.4). LFS1, p53 isimleri ile de bilinen TP53, tümör baskılayıcı bir proteindir. TP53 geninde oluşan mutasyonlar, prostat kanseri de dahil olmak üzere birçok kalıtsal kanser tipi ile ilişkilendirilmiştir (Ecke vd. 2010).



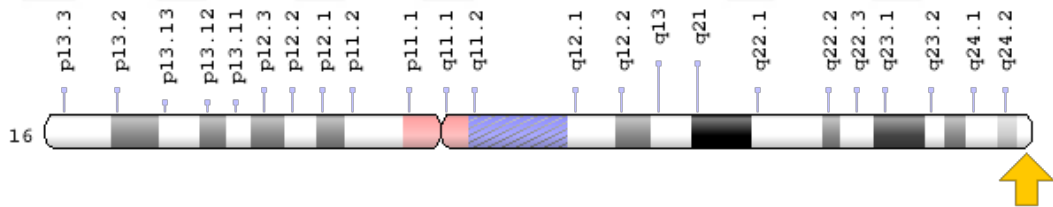
### 2.3.13. BRIP1 Geni



Şekil 2.14. BRIP1 geninin sitogenetik lokasyonu:17q23.2

BRIP1 geni 17. kromozom q23.2 bölgesinde yer alır (Şekil 2.14.). BRIP1 geni 20 ekzonu ile 1249 aminoasit uzunluğunda olan BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 proteinini kodlar (ENST00000259008.6). BACH1, FANCI, OF isimleri ile de bilinen BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 proteini, RecQ DEAH helikaz gen ailesinin bir üyesidir ve BRCA1 ile etkileşime geçer. Bu kompleks çift sarmal kırık tamirinde rol oynar. Kote-Jarai vd.(2009) yaptığı çalışmada ortaya çıkan bazı mutasyonlar, prostat kanserine yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir.

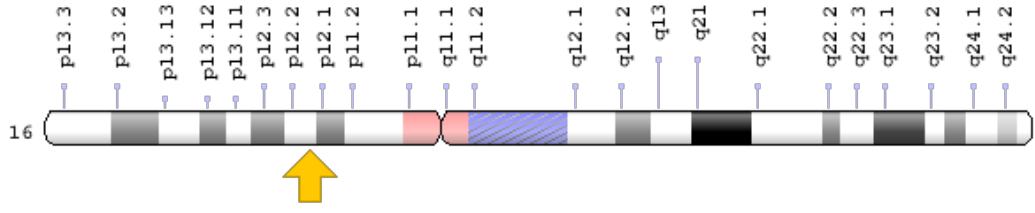
### 2.3.14. FANCA Geni



Şekil 2.15. FANCA geninin sitogenetik lokasyonu:16q24.3

FANCA geni 16. kromozom q24.3 bölgesinde yer alır (Şekil 2.15.). FANCA geni 43 ekzonu ile 1455 aminoasit uzunluğunda olan FA complementation group A proteinini kodlar (ENST00000389301.8). FA-H, FAA, FACA, FAH, FANCH isimleri ile de bilinen PMS1 homolog 2 proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. Bu gende gerçekleşen germline mutasyonlar genel olarak Fankoni Anemisi ile ilişkilendirilmesine rağmen, Wilkes vd(2017) bu gende gerçekleşen mutasyonların FANC protein kompleksine zarar verdiği ve bunun sonucunda, DNA'ya hasar veren ajanlara karşı hassaslığın arttığı belirtilmiştir.

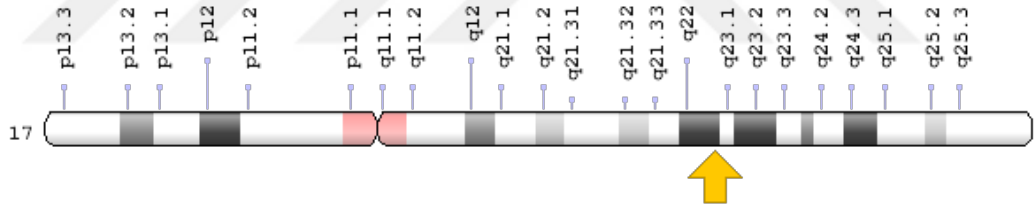
### 2.3.15. PALB2 Geni



Şekil 2.16. PALB2 geninin sitogenetik lokasyonu:16p12.2

PALB2 geni 16. kromozom p12.2 bölgesinde yer alır (Şekil 2.16.). PALB2 geni 13 ekzonu ile 1186 aminoasit uzunluğunda olan “BRCA2 partner ve lokalize edici” proteinini kodlar (ENST00000261584.8). FANCN, FLJ21816 isimleri ile de bilinen “BRCA2 partner ve lokalize edici” proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. Pakkanen vd. (2009), yaptıkları çalışma ile Finlandiya popülasyonunda PALB2 mutasyonlarının meme ve prostat kanserinde etkin olabileceği belirtilmiştir.

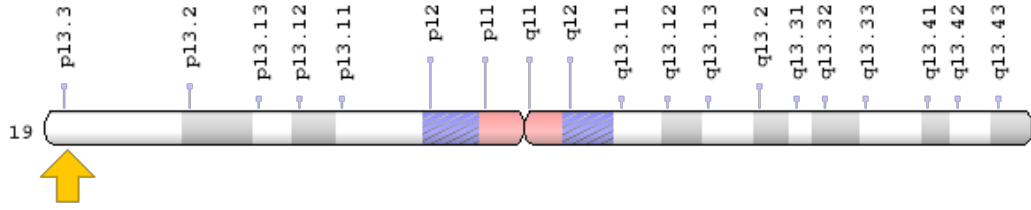
### 2.3.16. RAD51C Geni



Şekil 2.17. RAD51C geninin sitogenetik lokasyonu:17q22

MSH2 geni 17. kromozom q22 bölgesinde yer alır (Şekil 2.17.). MSH2 geni 9 ekzonu ile 376 aminoasit uzunluğunda olan RAD51 paralog C proteinini kodlar (ENST00000337432.9). FANCO, RAD51L2 isimleri ile de bilinen RAD51 paralog C proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. Bu gende oluşan mutasyonlar, RAD51C geninin kodladığı DNA tamir proteininde hasarlar meydana getirir. Potugari vd., 2018, RAD51C mutasyonlarının prostat kanserinde etkili olabileceğini belirtmişlerdir.

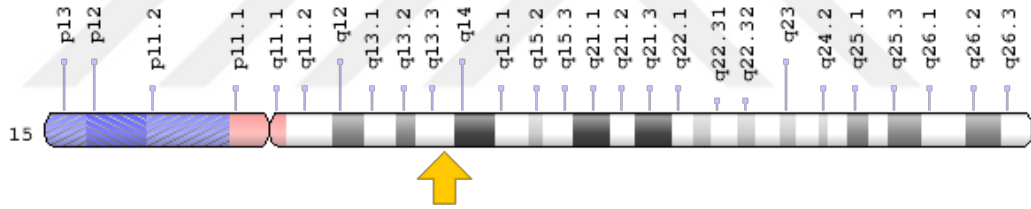
### 2.3.17. STK11 Geni



Şekil 2.18. STK11 geninin sitogenetik lokasyonu: 19p13.3

STK11 geni 19. kromozom p13.3 bölgesinde yer alır. STK11 geni 10 ekzonu ile 433 aminoasit uzunluğunda olan serine/threonine kinase 11 proteinini kodlar (ENST00000326873.11). LKB1, PJS isimleri ile de bilinen serine/threonine kinase 11, DNA onarımında önemli rol oynar. STK11 geninde oluşan mutasyonların prostat kanserine yol açabileceği literatürde belirtilmiştir (Gloria Su vd., 1999).

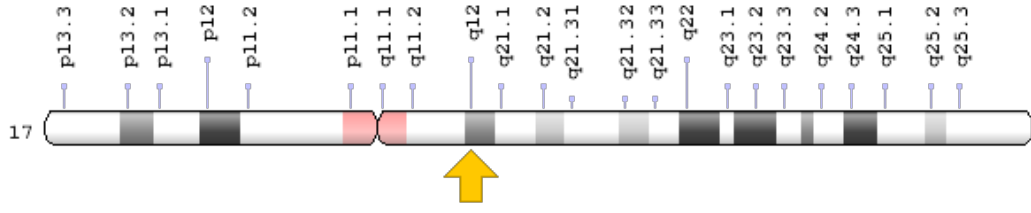
### 2.3.18. GREM1 Geni



Şekil 2.19. GREM1 geninin sitogenetik lokasyonu:15q13.3

GREM1 geni 15. kromozom q13.3 bölgesinde yer alır (Şekil 2.19.). GREM1 geni 2 ekzonu ile 184 aminoasit uzunluğunda olan gremlin 1 proteinini kodlar (ENST00000651154.1). CKTSF1B1, CRAC1, DAND2, DRM, HMPS, gremlin isimleri ile de bilinen gremlin 1 proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. Reid vd., (2018), yaptıkları çalışmada prostat kanseri tanı kitlerinde GREM1 geninin bulunması gerektiğine işaret etmişlerdir.

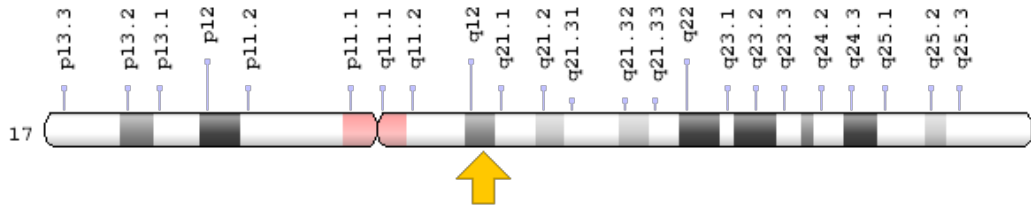
### 2.3.19. RAD51D Geni



Şekil 2.20. RAD51D geninin sitogenetik lokasyonu: 17q12

RAD51D geni 17. Kromozom q12 bölgesinde yer alır (Şekil 2.20.). RAD51D geni 10 ekzonu ile 348 aminoasit uzunluğunda olan RAD51 paralog D proteinini kodlar (ENST00000337432.9). HsTRAD, R51H3, RAD51L3, Trad isimleri ile de bilinen RAD51 paralog D proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. RAD51D geninin bir kopyasında bulunan mutasyonlar, çeşitli kanser tiplerinin gelişmesine yol açabilir. Pelttari vd.,(2012) ekibi tarafından, bu gende bulunan mutasyonların meme, yumurtalık ve prostat kanseri ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.

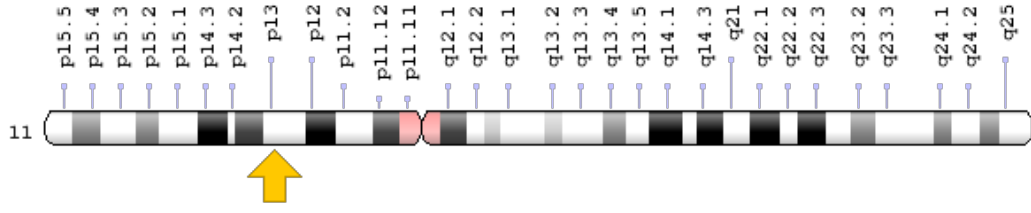
### 2.3.20. HNF1B-rs4239217, rs757210, rs3760511, rs4794758, rs3744763, rs11649743, rs4430796, rs2005705, rs7405696, rs7501939



Şekil 2.21. HNF1B geninin sitogenetik lokasyonu: 17q12

HNF1B geni 17. kromozom q12 bölgesinde yer alır (Şekil 2.21.). HNF1B geni 9 ekzonu ile 557 aminoasit uzunluğunda olan HNF1 homeobox B proteinini kodlar (ENST00000617811.5). HNF1beta, LFB3, MODY5, TCF2, VHNF1 isimleri ile de bilinen HNF1 homeobox B proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. Berndt vd.(2011), yaptıkları genom boyu ilişkilendirme çalışması ile, HNF1B geninin belli lokuslarında görülen mutasyonların prostat kanseri ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.

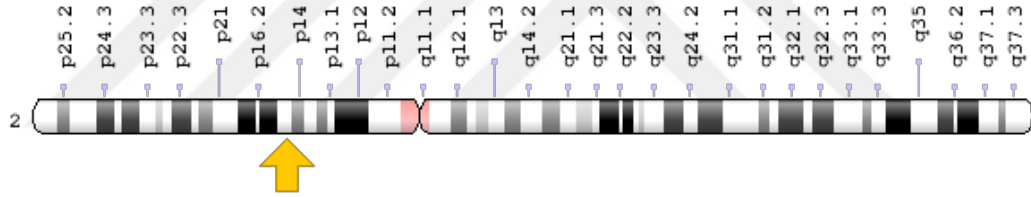
### 2.3.21. WT1 Geni



Şekil 2.22.WT1 geninin sitogenetik lokasyonu: 11p13

MSH2 geni 11. kromozom p13 bölgesinde yer alır (Şekil 2.22.). MSH2 geni 10 ekzonu ile 522 aminoasit uzunluğunda olan “Wilms tumor 1” proteinini kodlar (ENST00000452863.8). WT1 proteini ürogenital sistemin normal gelişiminde önemli rol oynar. Tycko vd. (2007), WT1 geni mutasyonlarının prostat kanseri yolağında etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

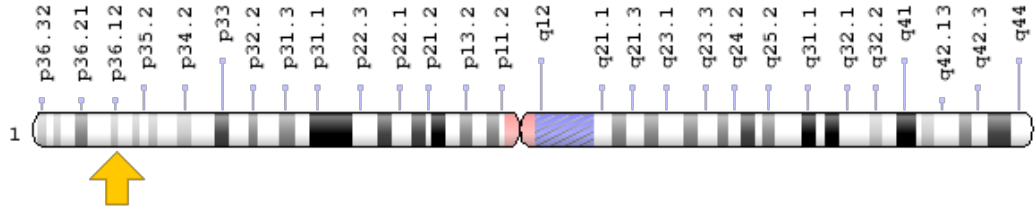
### 2.3.22. EHBP1 Geni



Şekil 2.23. EHBP1 geninin sitogenetik lokasyonu:2p15

EHBP1 geni 2. Kromozom 2p15 bölgesinde yer alır (Şekil 2.23.). EHBP1 geni 25 ekzonu ile 1231 aminoasit uzunluğunda olan EH domain binding protein 1proteinini kodlar (ENST00000263991.9). KIAA0903, NACSIN isimleri ile de bilinen EH domain binding protein 1 proteini, DNA onarımında önemli rol oynar. Mamidi vd. (2019 ), yaptıkları çalışmada, EHBP1 ve çeşitli genlerde bulunan germline ve somatik değişimlerin prostat kanserinde biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini belirtmişlerdir.

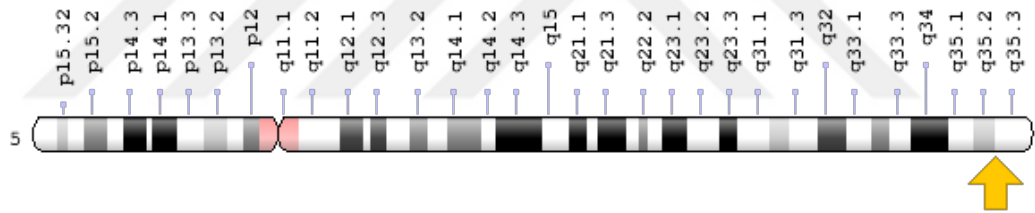
### 2.3.23. EPHB2 Geni



Şekil 2.24. EPHB2 geninin sitogenetik lokasyonu: 1p36.12

EPHB2 geni 1. kromozom p36.12 bölgesinde yer alır (Şekil 2.23.). EPHB2 geni 17 ekzonu ile 1055 aminoasit uzunluğunda olan EPH receptor B2 proteinini kodlar (ENST00000400191.7). Dong (2005), çalışmasında, Afrikan-Amerikan popülasyonunda yapılan kalıtsal prostat kanseri çalışmasında, EPHB2 geninde bulunan bazı mutasyonları bu grupla ilişkilendirmiştir.

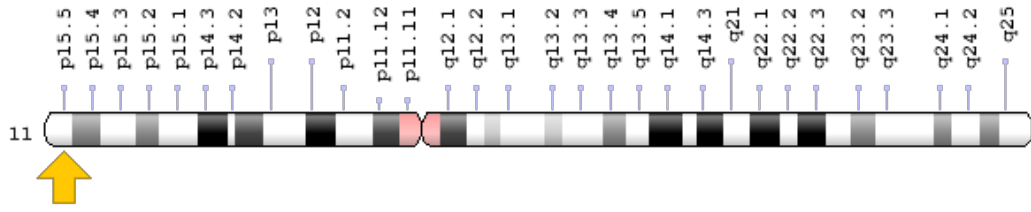
### 2.3.24. FGFR4 Geni



Şekil 2.25. FGFR4 geninin sitogenetik lokasyonu: 5q35.2

FGFR4 geni 5. kromozom q35.2 bölgesinde yer alır (Şekil 2.25.). EPHB2 geni 18 ekzonu ile 802 aminoasit uzunluğunda olan fibroblast growth factor receptor 4 proteinini kodlar (ENST00000292408.9). Ho vd.(2010), yaptıkları çalışmada; FGFR4 geni 388. Aminoasit bölgesinin glisinden arginine dönüşümünün, bazı prostat kanserli örneklerde bulunduğunu ve bu kanser grubu ile ilişkili olabileceğini belirtmiştir.

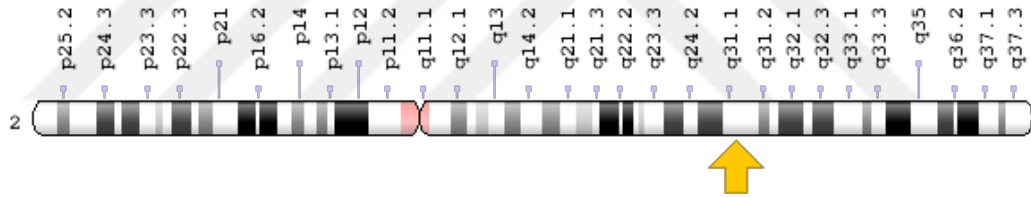
### 2.3.25. IGF2 Geni



Şekil 2.26. IGF2 geninin sitogenetik lokasyonu: 11p15.5

IGF2 geni 11. kromozom p15.5 bölgesinde yer alır (Şekil 2.26.). IGF2 geni 5 ekzonu ile 236 aminoasit uzunluğunda olan insulin benzeri büyüme faktörü 2 proteinini kodlar (ENST00000434045.6). Livingstone, 2013, yaptıkları çalışmada IGF2 mutasyonlarını bu kanser ile ilişkilendirilebileceğini belirtmiştir.

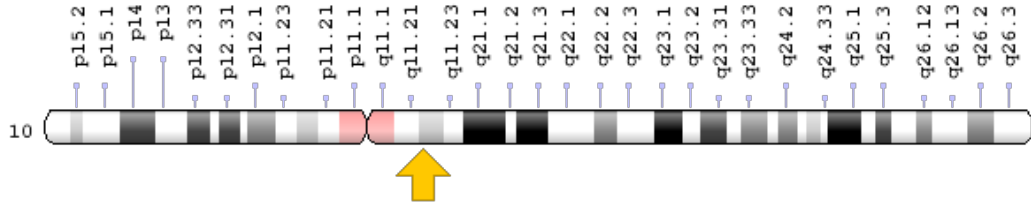
### 2.3.26. ITGA6 Geni



Şekil 2.27. ITGA6 geninin sitogenetik lokasyonu: 2q31.1

ITGA6 geni 2. kromozom q31.1 bölgesinde yer alır (Şekil 2.27.). ITGA6 geni 25 ekzonu ile 1091 aminoasit uzunluğunda olan integrin subunit alpha 6 proteinini kodlar (ENST00000409080.6). ITGA6 Geni, integrin alfa zincir protein ailesinin bir üyesini kodlar. ITGA6, MAPK-Erk yolağı ve hücre bağlantı organizasyonlarında etkindir. Mamidi vd. (2019), çeşitli somatik ve germline mutasyonların prostat kanserinin agresifliği üzerindeki etkisine dair yaptıkları çalışmada, ITGA6 geninde bulunan bazı germline mutasyonların, agresiflik üzerinde etkisi olduğu belirtilmiştir.

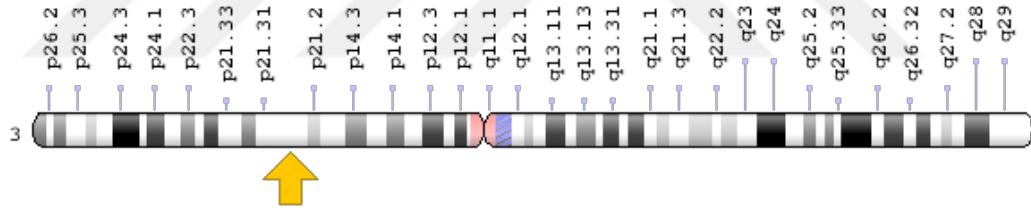
### 2.3.27. MSMB Geni-rs10993994



Şekil 2.28. MSMB geninin sitogenetik lokasyonu: 10q11.22

MSMB geni 10. kromozom q11.22 bölgesinde yer alır (Şekil 2.28.). MSMB geni 4 ekzonu ile 114 aminoasit uzunluğunda olan microseminoprotein beta proteinini kodlar (ENST00000582163.3). Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları ile genomun farklı bölgelerinde bulunan mutasyonlar ile hedeflenen hasta grupları arasında ilişkilerin kurulması kolaylaşmıştır. Eeles vd. (2008), genom boyu ilişkilendirme çalışmaları ile MSMB geninde yer alan bazı mutasyonların prostat kanseri riskini oluşturduğunu gözlemlemiştir.

### 2.3.28. PLXNB1 Geni-rs140699424

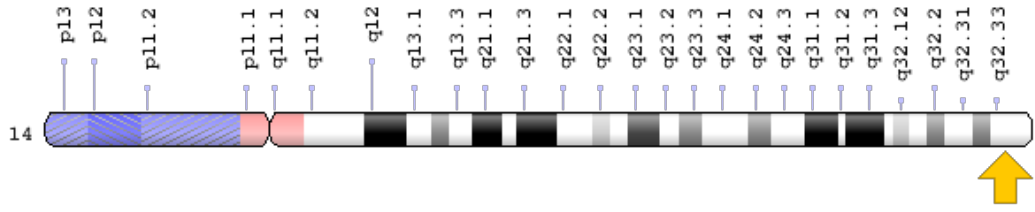


Şekil 2.29. PLXNB1 geninin sitogenetik lokasyonu: 3p21.31

PLXNB1 geni 3. Kromozom p21.31 bölgesinde yer alır (Şekil 2.29.). PLXNB1 geni 38 ekzonu ile 7308 aminoasit uzunluğunda olan plexin B1 proteinini kodlar (ENST00000358536.8). Tüm ekzom dizileme verilerin incelenmesi sonucunda, klinik ile ilişkili birçok genin aynı anda dizilemesi yapılabilmektedir. Johnson vd. (2015), yaptıkları çalışmada birçok tüm ekzom verisi elde etmiş ve buldukları sonuçlar içerisinde bulunan, rs140699424 dbSNP numaralı missense varyantın prostat kanseri üzerinde etkili olabileceği belirtilmiştir.



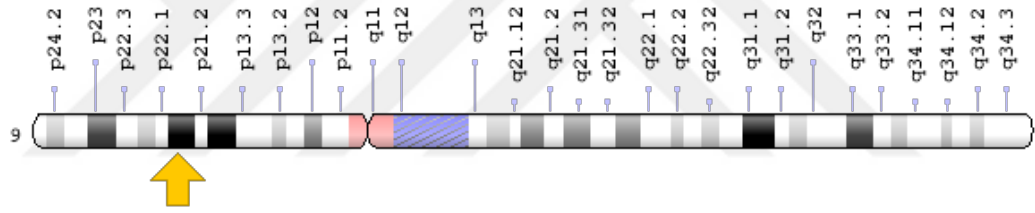
### 2.3.29. AKT1 Geni



Şekil 2.30. AKT1 geninin sitogenetik lokasyonu: 14q32.33

AKT1 geni 14. kromozom q32.33 bölgesinde yer alır (Şekil 2.30.). AKT1 geni 13 ekzonu ile 480 aminoasit uzunluğunda olan AKT serine/threonine kinase 1 proteinini kodlar (ENST00000554581.5). FitzGerald ve arkadaşlarının (2018) 12,082 prostat kanseri örneğinden elde ettikleri çalışmada, AKT1 genindeki mutasyonların prostat kanserinde etkili olabileceği belirtilmiştir.

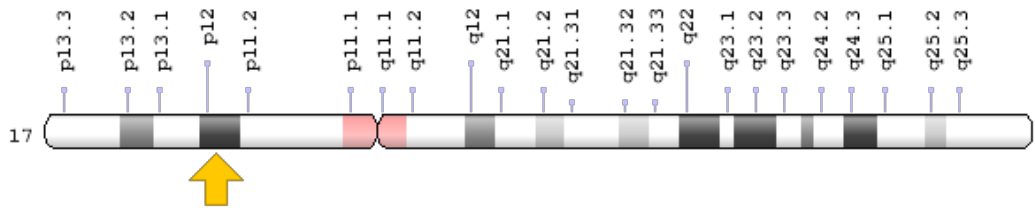
### 2.3.30. CDKN2A Geni



Şekil 2.31. CDKN2A geninin sitogenetik lokasyonu: 9p21.3

CDKN2A geni 9. kromozom p21.3 bölgesinde yer alır (Şekil 2.31.). CDKN2A geni 3 ekzonu ile 156 aminoasit uzunluğunda olan siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A proteinini kodlar (ENST00000304494.9). Pencik vd. (2015), çalışmalarında prostat kanserli örneklerin CDKN2A geninde mutasyonlar saptamışlardır.

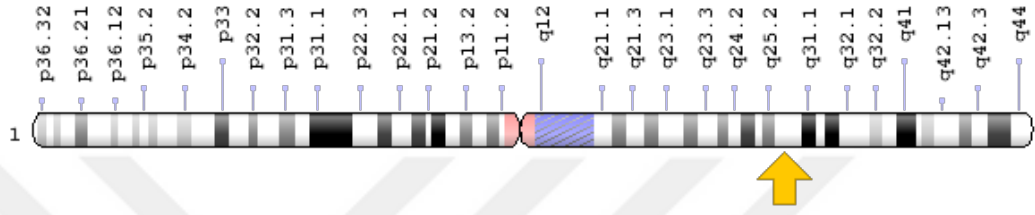
### 2.3.31. ELAC2 Geni



Şekil 2.32. ELAC2 geninin sitogenetik lokasyonu: 17p12

ELAC2 geni 17. kromozom p12 bölgesinde yer alır (Şekil 2.32.). ELAC2 geni 24 ekzonu ile 826 aminoasit uzunluğunda olan elacC ribonuclease Z 2 proteinini kodlar (ENST00000338034.9). Wang vd.(2001), çalışmalarında, ELAC2 geninde oluşan varyantların prostat kanserine genetik yatkınlığa sebep olabileceği bildirilmiştir.

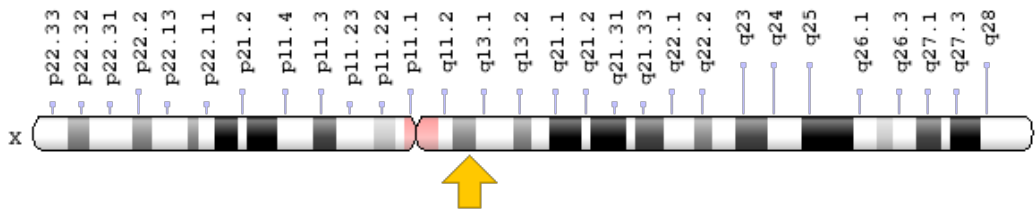
### 2.3.32. RNASEL Geni



Şekil 2.33. RNASEL geninin sitogenetik lokasyonu: 1q25.3

RNASEL geni 1. Kromozom q25.3 bölgesinde yer alır (Şekil 2.33.). RNASEL geni 7 ekzonu ile 741 aminoasit uzunluğunda olan ribonuclease L proteinini kodlar (ENST00000367559.7). Alvarez-Cubero vd.(2016), yaptıkları çalışmada, RNASEL geninin prostat kanserinde etkin rol alabileceğini ve bu gende bulunan polimorfizmlerin hastalığa sebep olabileceğini belirtmişlerdir.

### 2.3.33. AR Geni

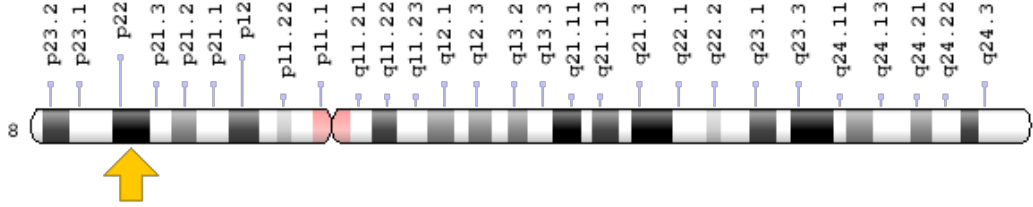


Şekil 2.34. AR geninin sitogenetik lokasyonu: Xq12

AR geni X kromozomunun q12 bölgesinde yer alır (Şekil 2.34.). AR geni 8 ekzonu ile 920 aminoasit uzunluğunda olan androgen receptor proteinini kodlar (ENST00000374690.9). AR geninde oluşan somatik ve germline değişimlerin, farklı popülasyonlarda prostat kanseri ile olan ilişkisi

bilinmektedir. Sribudiani vd. (2018), yaptıkları çalışma ile prostat kanseriyle ilişkilendirilen çeşitli bulgular elde etmişlerdir.

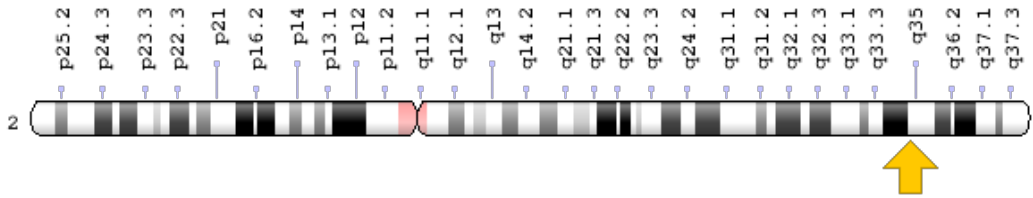
### 2.3.34. MSR1 Geni



Şekil 2.35. MSR1 geninin sitogenetik lokasyonu: 8p22

MSR1 geni 8. kromozom p22 bölgesinde yer alır. MSR1 geni 10 ekzonu ile 451 aminoasit uzunluğunda olan “Makrofaj temizleyici reseptör 1” proteinini kodlar (ENST00000262101.10). MSR1 geni polimorfizmlerinin prostat kanserinde etkin rol alabileceği belirtilmiştir (Alvarez vd., 2016).

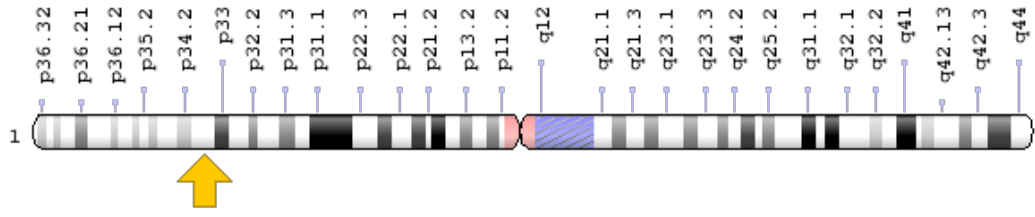
### 2.3.35. BARD1 Geni



Şekil 2.36. BARD1 geninin sitogenetik lokasyonu: 2q35

BARD1 geni 2. kromozom q35 bölgesinde yer alır (Şekil 2.36.). BARD1 geni 11 ekzonu ile 777 aminoasit uzunluğunda olan BRCA1 associated RING domain 1 proteinini kodlar (ENST00000260947.9). Reid vd.(2017), çalışmalarında, DNA tamir yolağında bulunan BARD1 genindeki değişimlerin prostat kanseri üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir.

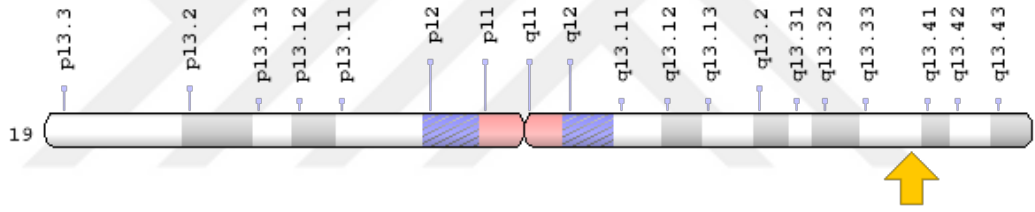
### 2.3.36. MUTYH Geni



Şekil 2.37. MUTYH geninin sitogenetik lokasyonu: 1p34.1

MUTYH geni 1. kromozom p34.1 bölgesinde yer alır (Şekil 2.37.). MUTYH geni 16 ekzonu ile 546 aminoasit uzunluğunda olan mutY DNA glikozilaz proteinini kodlar (ENST00000672818.1). Hart vd., (2015), çalışmalarında prostat kanseriyle ilişkili belirtilen genlere ek olarak, MUTYH geninde patojenik germline mutasyonlar gözlemlenmiştir.

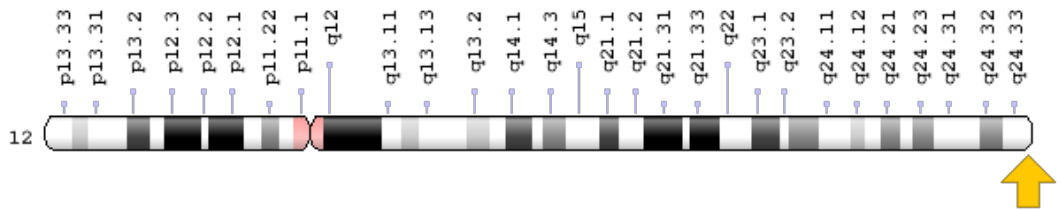
### 2.3.37. POLD1 Geni



Şekil 2.38. POLD1 geninin sitogenetik lokasyonu: 19q13.33

POLD1 geni 19. kromozom q13.33 bölgesinde yer alır (Şekil 2.38.). POLD1 geni 27 ekzonu ile 1133 aminoasit uzunluğunda olan DNA polimerase delta 1, catalytic subunit proteinini kodlar (ENST00000595904.6). Wang vd(2019), çalışmalarında, POLD1 geninde oluşmuş mutasyonlar, prostat kanserli örneklerde gözlemlenmiştir.

### 2.3.38. POLE Geni



Şekil 2.39. POLE geninin sitogenetik lokasyonu: 12q24.33

POLE geni 12. kromozom q24.33 bölgesinde yer alır (Şekil 2.39.). POLE geni 49 ekzonu ile 7840 aminoasit uzunluğunda olan “DNA polimeraz epsilon, katalitik altbirimi” proteinini kodlar (ENST00000320574.9). Wang vd., (2019), çalışmalarında, POLE geni mutasyonlarının prostat kanserli örneklerde de bulunduğunu bildirmişlerdir.

## 2.4. Yeni Nesil Dizileme

Yeni Nesil Dizileme sistemleri, Sanger vd.(1977) tarafından tanıtılan Sanger sekanslama yönteminden 30 sene sonra, daha yüksek çıktılı veriler elde edebilmek amacı güdülerek ortaya çıkmıştır. Yeni Nesil Dizileme sistemlerin önceki sistemlerden farkı; birçok örneği yüksek çıktılı olarak ve daha düşük maliyetle çalışabilme imkanı vermesidir (Park ve Kim, 2016).

İnsan Genom Projesinin içerisinde çalışılmış olan J. C. Venter ‘in genomunun dizilenmesi Sanger Dizileme yöntemi ile yaklaşık 15 sene sürmüş ve 1 milyon Dolar’ dan fazla bir maliyet ile karşılaşılmıştır. Günümüzde Yeni Nesil Dizileme yöntemleri ile birçok insanın genomu aynı anda ve aynı çalışma içerisinde 2 günden kısa bir sürede çok daha düşük maliyetler ile dizilenebilmektedir.

Çalışmamızda İllumina Miseq Yeni Nesil Dizileme sistemleri kullanıldı. Bu sistem çift taraflı okumalara izin veren, 300 nükleotit uzunluğuna kadar okuma sağlayan, çalışma süresi 8 ila 24 arasında süren yaygın kullanıma sahip bir Yeni Nesil Dizileme cihazıdır.

Tez çalışmamızda ‘Target capture’ adı verilen kütüphane hazırlama metodu kullanıldı. Hazırlanan kütüphanenin Miseq cihazının kartuşuna eklenmesinden sonra, cihaz kendi içerisinde bir dizi işlem gerçekleştirir. İlk aşama olarak hazırlanmış kütüphanenin içerdiği DNA fragmanları, kütüphane hazırlarken uçlarına eklenmiş adapterler sayesinde, cihazın içerisinde bulunan ‘Flow Cell’ ‘in yüzeyine yapışır. Yüzeye yapışan 100-300 nükleotid uzunluğundaki fragmanlar, Flow Cell üzerinde köprü amplifikasyonu ile çift yönlü okumaya dönüşürler. İlk sekanslama döngüsü 4 renkli reversible terminatörler, primerler ve DNA polimeraz eklenmesi ile başlar. Bu maddelerin eklenme sebebi, polimeraz ile yeni amplifikasyonlar başlatıp, florasan işaretli bazlar okumamıza

eklendiğinde Miseq cihazının içeriğinde bulunan lazer ışığı ile eklenen bazı görüntülemektir. Lazer çalıştıktan sonra, her kümeden yayılan flüoresan yakalanır ve ilk baz belirlenir. Her döngüde bir baz olmak üzere, DNA fragmanının baz sekansını belirlemek için, sekanslama döngüleri birçok kez tekrarlanır ve cihaz nihayetinde 100 ila 300 baz arasındaki fragmanların okumasını tamamlar.



### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. MATERYAL**

“Prostat Kanseri ile İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile İncelenmesi: Biyoinformatik Araçlar ve Veritabanları” isimli bu tezin çalışmalarına başlamadan önce Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı’ndan 11.03.2019 tarihli ve 2019/92 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır.

##### **3.1.1. Çalışma Grubu**

Çalışmaya Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniğine başvuran yaşları 45-85 arasında olan, prostat kanseri(PKa) tanısı almış 21 vaka dahil edildi. Üroloji polikliniğine başvuran hastalarda çalışma kriterlerini sağlayan gönüllüler randomize olarak çalışmaya alındı. Prostat kanseri dışında malignitesi olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmaya dahil edilecek olan tüm kişiler araştırma hakkında sözlü ve yazılı olarak ayrıntılı olarak bilgilendirildi ve çalışmayı kabul edenlerden “bilgilendirilmiş gönüllü olur” yazısı alındı.

Çalışmaya dahil edilen hastalardan EDTA’lı tüplere 4cc kan alınarak DNA izolasyonu yapıncaya kadar +4C’de saklandı. Çalışma grubu tamamlandığında periferik kandan DNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen DNA’lar yeni nesil dizileme yöntemiyle çalışılana kadar -80C’de saklandı.

##### **3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar**

Çalışmada kullanılan ekipmanlar çizelge 3.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

<b>Ekipman</b>	<b>Marka/Model</b>
Thermal Cycler	Thermo/Simpliamp
Qubit fluorometer	Thermo/Qubit 3.0 Fluorometer
Santrifüj	Biosan Combispin/ fvl-2400N
Vorteks	Nüve/NF200
Mikropipet setleri	Brand
Manyetik stand	Özel Üretim
Kit	Celemics/Prostate Cancer Risk Panel
Termal çalkalayıcı	Biosan/TS-100c
Nanodrop	Maestro Nano/MN-913
PCR Tüpleri	BoenMed/VQIR
Saf Su Cihazı	Thermo/Barnstead
Yeni Nesil Dizileme Cihazı	Illumina/Miniseq
Bilgisayar	Dell/Precision Tower 3620 İşletim sistemi: Linux Ubuntu

### 3.1.3. Yeni Nesil Dizileme Kiti İçeriği

Yeni Nesil Dizileme kitinin içeriği çizelge 3.2' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Yeni Nesil Dizileme Kiti İçeriği

<b>Kit İçeriği</b>	<b>Marka/Model</b>
Celemics DNA purification bead	CeleMag Clean-up Bead
Celemics Streptavidin bead	CeleMag Streptavidin Bead
CLM Polymerase Amplification Kit	Kapa Hifi Master Mix
Nuclease-free water	Sigma Aldrich

### 3.1.4. Yeni Mutasyonların Sanger ile Doğrulanmasında Kullanılan

#### Primerler

Yeni Nesil Dizileme ile yapılan çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz 6 yeni mutasyon, Sanger Dizileme yöntemi ile doğrulanmıştır. Doğrulama için kullanılan primerler çizelge 3.3.'te belirtilmiştir.



Çizelge 3.3 Doğrulama primerleri

Primer Adı	TM (°C)	Primer Dizisi
ITGA6-c.182+11_182+15delAG ACCinsGGACT_F	62.4	5'-CGGGGCTCCCACGTC-3'
ITGA6-c.182+11_182+15delAG ACCinsGGACT_R	63.9	5'-CTGGGTGCGCCTCGG-3'
FANCA-c.1638A>C_F	59.7	5'-TGGTTTGCTTTGCATACTCATAA-3'
FANCA-c.1638A>C_R	57.6	5'-ACTCTGCCACACAGTAACCC-3'
CHEK2-c.722-10T>C_F	57.46	5'-TTCAGAGTGATGCTTATAGTTCCA-3'
CHEK2-c.722-10T>C_R	57.92	5'-TTCACAAGAGGCGATCACTG-3'
BRCA2-c.2918C>G_F	59.38	5'-ACTTGACTTGTGTAACGAACCC-3'
BRCA2-c.2918C>G_R	60.62	5'-GGACCTAAGAGTCCTGCCCA-3'
APC-c.497C>G_F	57.43	5'-AGGTCATTGCTTCTTGCTGA-3'
APC-c.497C>G_R	59.11	5'-CAGGCCTAAAGTTGGGTAAAACA-3'
APC-c.3887C>A_F	59.82	5'-GGCAGAATCAGCTCCATCCA-3'
APC-c.3887C>A_R	60.11	5'-TGAGTGGGGTCTCCTGAACA-3'

### 3.1.5. Elektronik Veritabanları ve Biyoinformatik Araçlar

Çalışmamızda kullandığımız biyoinformatik yazılımlar, biyoinformatik araçlar ve elektronik veritabanları Çizelge 3.4., Çizelge 3.5., Çizelge 3.6. ve Çizelge 3.7.' de bildirilmiştir.

Çizelge 3.4. Temel Biyoinformatik Veritabanları

Web Adresi	Tanımlama
Ensembl Genome Browser <a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>	Omurgalılar ve diğer ökaryotik türler için referans genom veritabanı
GeneCards <a href="http://www.genecards.org">http://www.genecards.org</a>	Genler ile ilişkilendirilmiş, genomik, transkriptomik, proteomik, genetik, klinik ve fonksiyonel verileri içeren veritabanı

Çizelge 3.5. Anotasyon İçin Kullanılan Biyoinformatik Veritabanları

Web Adresi	Tanımlama
Ensembl Genome Browser <a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>	Omurgalılar ve diğer ökaryotik türler için referans genom veritabanı
GeneCards <a href="http://www.genecards.org">http://www.genecards.org</a>	Genler ile ilişkilendirilmiş, genomik, transkriptomik, proteomik, genetik, klinik ve fonksiyonel verileri içeren veritabanı
dbSNP <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/</a>	Türler içerisinde ve farklı türler için genetik değişimleri içeren, ortak kullanıma açık tek nükleotid değişim veritabanıdır. NCBI ve NHGRI tarafından oluşturulmuş ve güncel olarak hizmet vermektedir.
Human Genome Variation Society <a href="http://www.hgvs.org">http://www.hgvs.org</a>	DNA, RNA ve protein dizilerinde bulunan varyantlarla ilgili bilgileri rapor etmek için kurulmuş uluslararası standart olarak kabul edilen adlandırma
1000 Genomes <a href="http://www.1000genomes.org">http://www.1000genomes.org</a>	Ocak 2008'de başlatılan 1000 Genom Projesi, insan genetik çeşitliliğinin detaylı kataloğunu oluşturmak için başlatılmış uluslararası bir araştırma projesi ve veritabanıdır.
ESP- Exome Sequencing Project <a href="https://evs.gs.washington.edu/EVS/">https://evs.gs.washington.edu/EVS/</a>	7000 örnekten fazla tüm ekzom verisini içeren ESP veritabanı, genetik dönüşümlerin kalp, akciğer ve kan fenotipine etkisini incelemek amacı ile NHLBI tarafından kurulmuştur. Proje tarafından oluşturulan tüm dizi verileri dbGap içerisine depolanmaktadır.
ExAC- The Exome Aggregation Consortium <a href="http://exac.broadinstitute.org/">http://exac.broadinstitute.org/</a>	Çeşitli geniş ölçekli sekanslama projelerinden çıkan sonuçları toplamak ve topluluklara hizmet etmek amacı ile oluşturulmuş veritabanı
GnomAD- The Genome Aggregation Database <a href="https://gnomad.broadinstitute.org">https://gnomad.broadinstitute.org</a>	GRCh38 referans genomuna hizalanmış 71,702 örneğin, tüm genom dizileme çalışmalarından çıkan 602M SNV ve 105M İn-Del dönüşümlerini içeren veritabanı

Çizelge 3.5. Anotasyon İçin Kullanılan Biyoinformatik Veritabanları(devam)

<p>Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen2)  <a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a></p>	<p>PolyPhen2, basit fiziksel ve karşılaştırmalı hesaplamalar ile amino asit değişimlerinin insan proteinlerinin fonksiyonu ve yapısına olabilecek muhtemel etkilerini tahmin etmeye yarayan bir araçtır.</p>
<p>SIFT- Sorting Intolerant From Tolerant  <a href="https://sift.bii.a-star.edu.sg">https://sift.bii.a-star.edu.sg</a></p>	<p>SIFT, bir amino asit dönüşümünün, dizi homolojisine ve amino asitlerin fiziksel özelliklerine dayanarak protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini tahmin eden bir veritabanıdır.</p>
<p>PROVEAN- Protein Variation Effect Analyzer  <a href="http://provean.jcvi.org">provean.jcvi.org</a></p>	<p>PROVEAN Bir amino asit dönüşümünün veya indelin, bir proteinin biyolojik fonksiyonu üzerinde etkisi olup olmadığını öngören bir yazılım aracı. PROVEAN, önemli olduğu tahmin edilen nonsinonim veya indel değişimleri filtrelemek için kullanışlıdır.</p>
<p>GERP- Genomic evolutionary rate profiling  <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar</a></p>	<p>Genomik Evrimsel profillemeye skoru, pozisyon spesifik olarak farklı türlerin aynı pozisyonundaki alelleri karşılaştırıp homoloji olarak skorlandırma değeridir. Bu algoritma 35 memeli türünde tarama yapar.</p>
<p>DANN  <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/</a></p>	<p>Genetik varyantları ve özellikle de kodlayıcı olmayan varyantları anote ederek patojenisite sınıflandırılmasını yapmak için kullanışlıdır.</p>

Çizelge 3.6. Kullanılan Biyoinformatik araçlar ve Programlar

Web Adresi	Tanımlama
Integrative Genomics Viewer (IGV) <a href="http://www.broadinstitute.org/igv/">http://www.broadinstitute.org/igv/</a>	Integrated Genome Browser(IGV), gen modelleri, hizalanmış NGS okumaları ve Mikroarray'den gelen veriler dahil olmak üzere genomik veri setlerinde, varyant tipleri(SNP, İN-DEL vs.) ve verilerin çeşitli özelliklerini (Okuma sayıları, Kalite skorları vs.) görselleştirmede kullanılan açık kaynaklı bir genom tarayıcısıdır.
Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) <a href="https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep">https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep</a>	VEP, varyantların (SNP, insersiyon, delesyon, CNV, yapısal varyantlar vs.) genler, transkriptler, protein sekansı ve ayrıca düzenleyici bölgeler üzerindeki etkisini belirler.
Burrows-Wheeler Aligner (BWA) <a href="http://bio-bwa.sourceforge.net">http://bio-bwa.sourceforge.net</a>	BWA, sekans verilerini, insan genomu gibi büyük referans genomlara hizalamayı sağlayan bir yazılım paketidir.

Çizelge 3.7. Patojenisite Hesaplamaya Yardımcı Veritabanları

Web Adresi	Tanımlama
Franklin <a href="https://franklin.genoox.com">https://franklin.genoox.com</a>	Yapay zeka teknolojisi tarafından yönlendirilen Franklin, halka açık popülasyon, hastalık, sekans veri tabanları ve yayınlanmış literatürden gelen verileri birleştiren ve makine öğrenmesi yöntemi ile bir ACMG sınıflandırması yapan ücretsiz kullanıma açık veritabanı.
Varsome <a href="https://varsome.com">https://varsome.com</a>	Varsome, Varyant bilgileri içeren, veri toplayıcı ve varyantlara dair farklı veritabanlarını keşfetmemize olanak sağlayan bir aracı platformdur.
Clinvar <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>	ClinVar, tıbbi açıdan önemli varyantlar ve fenotipler arasında kurulmuş ilişkileri içeren raporlara ücretsiz erişim sağlayan bir platformdur.

## 3.2. METOD

### 3.2.1. Fragmentasyon

Hasta sayısına göre Fragmentaz ve Buffer mix yapılarak Hasta başına 4 µL dağıtıldı. Sonrasında DNA eklenerek spin atıldı ve PCR'da 37°C'de 25dk inkübe edilerek 5 µL EDTA (0,5 M) eklendi (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.8. Fragmentasyon

DNA	16 µL
10X Fragmentase Reaction Buffer	2 µL
dsDNA Fragmentase	2 µL

### 3.2.2. Manyetik Bead İle Saflaştırma

- 2mL lik konik tüplere hasta sayısı kadar örnek numaraları yazılıp her örnek için 45 µL Bead dağıtıldı.
- Üzerine inkübasyondan alınan DNA ürünleri (25 µL) eklendi.
- Tüpler manyetik standı yerleştirilip sıvı şeffaf olduğunda süpernatant atıldı.
- Tüpler manyetik stand üzerindeyken her tüpe 500 µL Etanol (%80) eklenerek 30 sn bekledikten sonra alkol atıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.
- Kalan alkolü temizlemek için spin yapılarak 10 µL pipetle tüm alkol temizlendi.
- Alkol tamamen uzaklaşınca kadar beklendi.
- Stand üzerindeyken 52 µL nuclease-free su eklendi.
- Standı tekrar yerleştirilip şeffaflaşınca standtan çıkartmadan 2 µL alınarak QUBIT (HS) ölçümü yapıldı.
- Tüpler standtayken içindeki süpernatant (50 µL) alınarak doğrudan sonraki adımdaki END REPAIR tüplerine eklendi.

### 3.2.3. Uç Onarma(End Repair)

- Her tüpe 50 µL nuclease free water eklenerek üzerine bir önceki adımdan gelen 50 µL süpernatant eklendi.
- PCR cihazında kapak açık olarak 20°C'de 30 dk. inkübe edildi.

### 3.2.4. Manyetik Bead İle Saflaştırma

- 2mL lik konik tüplere hasta sayısı kadar örnek numaraları yazılıp her örnek için 180 µL bead dağıtıldı.
- İnkübasyondan alınan DNA ürünleri (End repaired) (100 µL) eklendi.
- Tüpler manyetik stand üzerindeyken her tüpe 500 µL Etanol (%80) eklenerek 30 sn bekledikten sonra alkol atıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.
- Kalan alkolü temizlemek için spin yapılarak 10 µL pipetle tüm alkol temizlendi.
- Alkol tamamen uzaklaşınca kadar beklendi.
- Stand üzerindeyken 52 µL nuclease-free su eklendi.
- Standa tekrar yerleştirilip şeffaflaşınca standtan çıkartmadan 2 µL alınarak QUBIT (HS) ölçümü yapıldı.
- Tüpler standtayken içindeki süpernatant (50 µL) alınarak doğrudan sonraki adımdaki END REPAIR tüplerine eklendi.

### 3.2.5. Adenin Ekleme(A-Tailing)

- Her tüpe bir önceki adımdan gelen süpernatant (50 µL) eklendi.
- PCR cihazında kapak açık olarak 20°C'de 30 dk. inkübe edildi.

### 3.2.6. Manyetik Bead İle Saflaştırma

- 2mL lik konik dipli tüplere hasta sayısı kadar örnek numaraları yazılıp her örnek için 90 µL bead dağıtıldı.
- Üzerine inkübasyondan alınan DNA ürünleri (A-tailed) (50 µL) eklendi.
- Tüpler manyetik standda yerleştirildi.

- Sıvı şeffaf olduğunda süpernatant atıldı.
- Tüpler manyetik stand üzerindeyken her tüpe 500 µL Etanol (%80) eklendi. 30 sn bekledikten sonra alkol atıldı.
- Kalan alkolü temizlemek için spin yapılarak 10 µL pipetle tüm alkol temizlendi.
- Alkol tamamen uzaklaşınca kadar beklendi
- Stand üzerindeyken 52 µL nuclease-free su eklendi.
- Standa tekrar yerleştirilip şeffaflaşınca standtan çıkartmadan 2 µL alınarak QUBIT (HS) ölçümü yapıldı.
- Tüpler standtayken içindeki süpernatant (42 µL) alınarak doğrudan sonraki adımdaki Ligasyon Mix tüplerine eklendi.

### **3.2.7. Adaptör Ligasyonu ve User Uygulaması**

- Her tüpe 10 µL Adaptör eklendi.
- Her tüpe bir önceki adımdan gelen süpernatant (40 µL) eklenerek vorteks yapıldı.
- PCR cihazında kapak açık olarak 20°C'de 30 dk. inkübe edildi.
- İnkübasyon dolunca her bir tüpe 3 µL USER eklendi.
- PCR cihazında kapak açık olarak 37°C'de 15 dk. inkübe edildi.

### **3.2.8. Manyetik Bead İle Saflaştırma**

- 2mL lik konik dipli tüplere hasta sayısı kadar örnek numaraları yazılıp her örnek için 50 µL bead dağıtıldı.
- Üzerine inkübasyondan alınan DNA ürünleri (Adapter ligated) (53 µL) eklendi.
- Tüpler manyetik standda yerleştirilerek sıvı şeffaf olduğunda süpernatant atıldı.
- Tüpler manyetik stand üzerindeyken her tüpe 500 µL Etanol (%80) eklendi. 30 sn bekledikten sonra alkol atıldı.

- Kalan alkolü temizlemek için spin yapılarak 10 µL pipetle tüm alkol temizlendi.
- Alkol tamamen uzaklaşınca kadar beklendi.
- Stand üzerindeyken 30 µL nuclease-free su eklendi.
- Standa tekrar yerleştirilip şeffaflaşınca standtan çıkartmadan 2 µL alınarak QUBIT (HS) ölçümü yapıldı.
- Süpernatantın 15 µL'si sonraki adım olan index adımında kullanıldı. 15 µL si -20°C'de yedek olarak saklandı.

### 3.2.9. Dual İndex

Dual İndex aşaması çizelge 3.9'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.9. Dual İndex

Adapter ligated library (Önceki adımdan gelen)	15 µL
Dual index primer 501-508	5 µL
Dual index primer 701-712	5 µL
KAPA Library Amplification Mix	20 µL

### 3.2.10. Manyetik Bead İle Saflaştırma

- 2mL lik konik tüplere hasta sayısı kadar örnek numaraları yazılıp her örnek için 50 µL bead dağıtıldı.
- Üzerine inkübasyondan alınan DNA ürünleri (Adapter ligated) (50 µL) eklendi.
- Tüpler manyetik standı yerleştirilerek sıvı şeffaf olduğunda süpernatant atıldı.
- Tüpler manyetik stand üzerindeyken her tüpe 500 µL Etanol (%80) eklendi. 30 sn bekledikten sonra alkol atıldı.
- Kalan alkolü temizlemek için spin yapılarak 10 µL pipetle tüm alkol temizlendi.
- Alkol tamamen uzaklaşınca dek beklendi



- Tüpler stanttan alınarak 7  $\mu\text{L}$  nuclease-free su eklendi ve pipetaj yaparak beadler çözüldü.
- Süpernatant (7  $\mu\text{L}$ ) PCR tüplerine alınarak, kalan tüpler atıldı.
- QUBIT (BR)/Nanodrop ölçümü yapıldı. 100ng/ $\mu\text{L}$  üzerinde çıkanlar hibridizasyon adımına alındı.

### 3.2.11. Hibridizasyon

Her hasta için 3 ayrı tüp hazırlandı (Çizelge 3.10.).

Çizelge 3.10. Hibridizasyon

1- BLOCK MİKS		1- HİBRİDİZASYON MİKS		2- CAPTURE LİB	
Block#1	2,5 $\mu\text{L}$	HYB Buffer#1	25 $\mu\text{L}$	Target cap lib prob#1	6 $\mu\text{L}$
Block#2	2,5 $\mu\text{L}$	HYB Buffer#2	1 $\mu\text{L}$	Target cap lib prob#2	1 $\mu\text{L}$
Block#3	0,6 $\mu\text{L}$	HYB Buffer#3	13 $\mu\text{L}$	Total	7 $\mu\text{L}$

- Block mix tüplerine hasta başına 5,6  $\mu\text{L}$  dağıtıldı. Üzerine önceki index adımından gelen DNA ürünü (yaklaşık 5  $\mu\text{L}$ ) eklendi.
- Hibridizasyon mix tüplerine hasta başına 49  $\mu\text{L}$  dağıtıldı.
- Target capture prob tüplerine mix yapmadan 6  $\mu\text{L}$  Target Prob1 ve 1  $\mu\text{L}$  Target prob2 dağıtıldı.
- ✓ Tüm tüpler hazırlandıktan sonra PCR cihazına geçilerek Cihaz 95°C'ye yükselince Block miks tüpleri cihaza yerleştirildi.
- ✓ Sıcaklık 65°C'ye düşünce Hibridizasyon miks tüpleri cihaza yerleştirilerek 3 dakika inkübasyon yapıldı.
- ✓ Target cap tüpleri cihaza yerleştirildi.

Sonra hızlı bir şekilde kapak açılarak önce 2'den 3'e 13  $\mu\text{L}$  alınıp sonra 1'den 3'e 9  $\mu\text{L}$  alındı.

### 3.2.12. Streptavidin Bead ile Yıkama

- Streptavidin beadler Wash buffer ile yıkandı. Bunun için örnek başına 50 µL streptavidin bead konularak üzerine 200 µL Wash buffer1 eklendi.
- Şeffaf olunca süpernatant atıldı. İşlem 3 kez tekrarlandı.
- Son aşamada süpernatant atıldıktan sonra tekrar 200 µL Wash buffer1 ile çözülüp üzerine PCR'da hibridizasyon adımında duran örnek eklendi.
- İnkübasyon süresi dolunca spin yapılarak manyetik standı yerleştirildi.
- Süpernatant atılarak 500 µL Wash buffer2 eklendi.
- İnkübasyon süresi dolunca spin yapılarak manyetik standı yerleştirildi.
- 500 µL Wash buffer3 (65°C'de önceden ısıtılan) eklendi.
- 65°C'de 10 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi dolunca spin yapılarak manyetik standı yerleştirildi.
- 30 µL nuclease-free water eklenerek vorteks yapıldı.
- Elde edilen streptavidin bead'li örneklerin 15 µL'si sonraki Post-PCR adımında kullanılırken, kalan 15 µL'si yedek olarak -20°C'de saklandı.

### 3.2.13. Post-Capture PCR

Post-Capture PCR aşamaları çizelge 3.11'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.11. Post Capture PCR

Streptavidin bead bağlı DNA	15 µL
Nuclease-free water	5 µL
Post-Capture PCR Forward Primer	2,5 µL
Post-Capture PCR Reverse Primer	2,5 µL
KAPA Library Amplification Mix	20 µL
Toplam Hacim	45 L

### 3.2.14. Manyetik Bead İle Saflaştırma

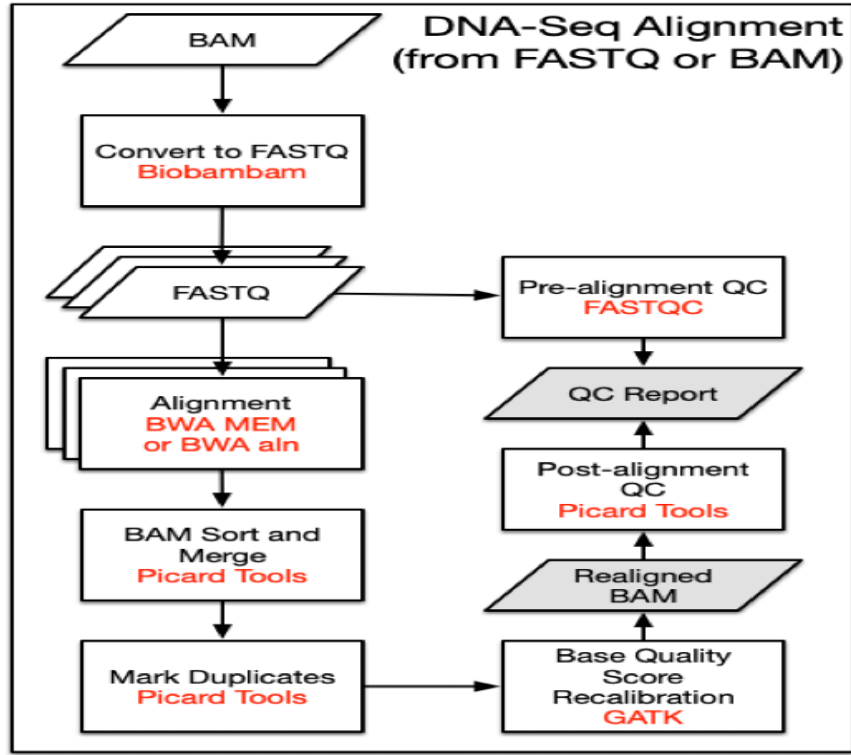
- 2mL lik konik tüplere hasta sayısı kadar örnek numaraları yazılıp her örnek için 90 µL bead dağıtıldı.
- Üzerine inkübasyondan alınan DNA ürünleri (Post-captured) (50 µL) eklendi.
- Tüpler manyetik standı yerleştirilerek sıvı şeffaf olduğunda süpernatant atıldı.
- Tüpler manyetik stand üzerindeyken her tüpe 500 µL Etanol (%80) eklenerek 30 sn bekledikten sonra alkol atıldı.
- Kalan alkolü temizlemek için spin yapılarak 10 µL pipetle tüm alkol temizlendi.
- Alkol tamamen uzaklaşınca kadar beklendi.
- Stand üzerindeyken 10 µL nuclease-free su eklendi.
- Süpernatant (10 µL) PCR tüplerine alınarak -20°Cde saklandı ve kalan tüpler atıldı.
- Qubit (BR)/Nanodrop ile ölçüm yapıldı.

### 3.2.15. Cihaza Yükleme

Kütüphane hazırlama kitleri ile hazırlamış olduğumuz örnek havuzu 4nm'a getirilerek Illumina protokolleri uygulanarak cihaz ve kartuş çeşidine uygun konsantrasyonda yüklendi.

### 3.2.16. Biyoinformatik Analiz

Yeni Nesil Dizileme sonucunda elde edilecek veri, işlenmemiş ham veri halindedir. Mutasyon ve diğer değişimlerin listelenebilmesi için bir dizi dosya çevirimi ve biyoinformatik analiz yapıldı.



Şekil 3.1. DNA-seq Analysis Pipeline. National Cancer Institute (NCI)

### 3.2.16.1. FASTQC- Kalite Kontrol

Örneklerin Yeni Nesil Dizileme cihazına yüklenmesinden 20 saat sonrasında, örneklerimize ait ham FASTQ verileri elde edildi. Cihazdan FASTQ formatında elde ettiğimiz ham veri öncelikle Şekil 3.1. 'de belirtilen FastQc programı ile değerlendirilerek verinin kalite kontrolü sağlandı (Toplam okuma sayıları, GC miktarları, adaptör dizileri, tekrarlayan diziler).

### 3.2.16.2. Ham Veri Hizalama

Li H ve Durbin R (2009) ekibinin ürettiği BWA (Burrow Wheeler) algoritması kullanılarak, ham Fastq datalarının içerisindeki okumalar Hg19 referans genomuna hizalandı. Oluşan BAM formatındaki dosyadan PICARD TOOLS içeriğindeki markduplicates aracı yardımı ile PCR duplikasyonları çıkarıldı. BAM dosyasının üzerinde kalite skoru 15'in altında olan bazlar elendi. DePristo M

vd.(2011) geliştirdikleri GATK(Genome Analysis Toolkit) biyoinformatik aracı içerisinde bulunan, İndel realignment ve diğerk çeşitli özelliklerden faydalanıldı.

### 3.2.16.3. Hizalanan Verilerde Varyant Bulma

Hedeflenmiş genler ve rs bölgeleri için oluşturduğumuz BED dosyası ve FreeBayes aracı eşliğinde Variant-Calling aşamasına geçildi. Bu aşamadan sonra VCF(Variant Calling Format) dosyaları elde edildi. BAM dosyası içerisinde bulunan “Match”, “Mismatch” ve “Gap” bölgeleri, varyant bulma algoritması ile gerçek bir dönüşüm olup olmadığı ele alındı. Şekil 3.2.’de ele alınan bir VCF dosyası temel olarak varyantın;

- Genom Pozisyonu
- Referans Allel
- Dönüştüğü Allel
- Dönüşümün okuma derinliği
- Kalite Skoru bilgilerini içermektedir.

```
##fileFormat=VCFv4.3
##fileDate=20090805
##source=myImputationProgramV3.1
##reference=file:///seq/references/1000GenomesPilot-NCBI36.fasta
##contig=<ID=20,length=62435964,assembly=B36,md5=f126cdf8a6e0c7f379d618ff66beb2da,species="Homo sapiens",taxonomy=x>
##phasing=partial
##INFO=<ID=NS,Number=1,Type=Integer,Description="Number of Samples With Data">
##INFO=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Total Depth">
##INFO=<ID=AF,Number=A,Type=Float,Description="Allele Frequency">
##INFO=<ID=AA,Number=1,Type=String,Description="Ancestral Allele">
##INFO=<ID=DB,Number=0,Type=Flag,Description="dbSNP membership, build 129">
##INFO=<ID=H2,Number=0,Type=Flag,Description="HapMap2 membership">
##FILTER=<ID=q10,Description="Quality below 10">
##FILTER=<ID=s50,Description="Less than 50% of samples have data">
##FORMAT=<ID=GT,Number=1,Type=String,Description="Genotype">
##FORMAT=<ID=GQ,Number=1,Type=Integer,Description="Genotype Quality">
##FORMAT=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Read Depth">
##FORMAT=<ID=HQ,Number=2,Type=Integer,Description="Haplotype Quality">
#CHROM POS ID REF ALT QUAL FILTER INFO FORMAT NA00001 NA00002 NA00003
20 14370 rs6054257 G A 29 PASS NS=3;DP=14;AF=0.5;DB;H2 GT:GQ:DP:HQ 0|0:48:1:51,51 1|0:48:8:51,51 1|1:43:5:..
20 17330 . T A 3 q10 NS=3;DP=11;AF=0.017 GT:GQ:DP:HQ 0|0:49:3:58,50 0|1:3:5:65,3 0|0:41:3
20 1110696 rs6040355 A G,T 67 PASS NS=2;DP=10;AF=0.333,0.667;AA=T;DB GT:GQ:DP:HQ 1|2:21:6:23,27 2|1:2:0:18,2 2|2:35:4
20 1230237 . T . 47 PASS NS=3;DP=13;AA=T GT:GQ:DP:HQ 0|0:54:7:56,60 0|0:48:4:51,51 0|0:61:2
20 1234567 microsat1 GTC G,GTCT 50 PASS NS=3;DP=9;AA=G GT:GQ:DP 0|1:35:4 0|2:17:2 1|1:48:3
```

Şekil 3.2. VCF dosyası ieriği

### 3.2.16.4. Anotasyon

Son aşamada, elde edilen VCF formatlı dosyalar Ensembl veritabanının kendi programı VEP (Variant Effect Predictor) eşliğinde anlamlandırıldı ve çıkan sonuçlar farklı veritabanları eşliğinde değerlendirildi.

### **3.2.16.5. Varyant Filtreleme ve Patojenisite Sınıflandırması**

Anotasyonu yapılan datalar, VEP (Variant Effect Predictor)- Filtreleme özelliği kullanılarak, varyant filtrelemeleri yapılmıştır. Bu aşamada, popülasyon veritabanlarında %5 üzerinde olan varyantlar direk filtrelenmiştir.

Filtrelenen dönüşümler, Farklı veritabanları eşliğinde(Clinvar, 1000Genome, EXAC, GnomAD, ESP, Varsome, Franklin, dbSNP), Richard vd.(2015) belirttiği ACMG sınıflandırmasını dikkate alarak, klinik olarak değerlendirilmiş ve sonuç elde edilmiştir.



## 4. BULGULAR

Projemizde çalışılan 21 örneğin herbirinde 300 ila 700 arasında çeşitli varyant ve İN-DEL değişimler görülmüştür. Analizlerimizde hedeflenen genlerin tüm ekzonları ve ekzon-intron bağlantı noktalarından 25 baz'lık bölge, 20 ve üzeri okuma olarak kaplanmıştır. Varyantların patojenisiteleri hesaplanırken, toplumsal alel frekansı %5 ve üzeri olan varyantlar analizlere dahil edilmemiştir. Filtreleme sonucunda 79 farklı dönüşüm elde edilmiştir. Bu varyantlar çeşitli veritabanları ve platformlar eşliğinde, patojenisite sınıflandırmasına dahil edilmiştir.

### 4.1. Varyantların Populasyon Allel Frekansları

Çalışma bulgularımızda yer alan değişimlerin anlamlandırılmasında, öncelik olarak, populasyon veritabanları kullanılmıştır. Günümüzde NGS çalışmalarının artması ve tüm genom-ekzom çalışmalarının sıklığı neticesinde çeşitli populasyon veritabanları kurulmuştur. Çalışmamızda bulduğumuz varyantların populasyon sıklıklarını görmek için gnomAD, ExAC, ESP6500 ve 1000Genomes veritabanları kullanılmıştır. Populasyon frekansı %5 olarak filtrelenerek kalan varyantlar analize dahil edilmiştir. Herbiri farklı hastada olmak üzere; APC (c.497C>G), APC (c.3887C>A), BRCA2 (c.2918C>G), CHEK2 (c.722-10T>C), FANCA (c.1638A>C) ve ITGA6 (c.182+11\_182+15delAGACCinsGGACT), bölgelerinde yeni mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar IGV platformunda incelenerek yanlış pozitiflik durumu ekarte edilmiştir. IGV'de okumalar, baz kalite skorları, MAPQ skorlarına bağlı olarak analiz edilmiş, kaplamalar kontrol edildikten sonra bu bölgeler Sanger dizileme ile doğrulamak için çalışılmıştır. Elde ettiğimiz varyantlar ve veri tabanlarındaki allel frekansları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

### 4.2. İn-Sliko Veritabanı Skorları

Mutasyon ve diğer genetik bulguların analiz edilmesinde yardımcı olabilecek bir diğer metod in-siliko veritabanlarının kullanılmasıdır. Populasyon veritabanları

ve Clinvar girdilerinin olmadığı koşullarda, in-siliko tahmin programları, bulguların anlamlandırılmasında kullanılmaktadır. Çizelge 5.3' de elde ettiğimiz verilerin in-siliko platformlar aracılığı ile patojenisitesi analiz edilmiştir. İn-Siliko platformların mutasyon patojenisite skorlandırmasında kullandığı aralıklar çizelge 4.2'de belirtilmiştir.

### **4.3. Patojenisite Sınıflandırması**

Elde edilen mutasyon ve diğer genetik değişimlerin incelenmesi ve hastalığa etkisinin saptanabilmesi amacı ile, ACMG (American College of Medical Genetics) sınıflandırılması kullanılmıştır (Richards vd., 2015). Buna göre; AR (c.1406\_1420del), AR (c.1174C>T) BRIP1 (c.139C>G), ELAC2 (c.1621G>A), FANCA (c.2574C>G) , bölgelerindeki varyantlar Franklin, ClinVar veya VarSome veritabanlarında “patojenik/muhtemel patojenik mutasyon” olarak bildirilmiştir. Çizelge 4.4' de elde ettiğimiz verilerin ACMG sınıflandırılması kullanan platformlar aracılığı ile patojenisitesi analiz edilmiştir.



Çizelge 4.1. Varyantlar ve allel frekansları

Bulunan Varyant	Transkript No/rs ID	Localization	gnomAD	ExAC	ESP6500	1000genomes	Rs
<b>AKT1</b>							
c.*6C>T /	NM_001014431.2	Chr14: 105236672	0.0012	0.0015	0.000077	0.0031	rs200508405
<b>APC</b>							
c.445G>C / p.Asp149His	ENST00000257430	chr5: 112775651	-	-	-	-	rs767875993
c.7201C>T / p.Leu2401=	NM_000038.6	chr5: 112178492	0.01		0.011	0.0096	rs2229994
c.497C>G / p.Thr166Ser	ENST00000457016.1	Chr5: 112111400	-	-	-	-	<b>Yeni mutasyon</b>
c.3887C>A / p.Ala1296Glu	ENST00000457016	Chr5: 112175178	-	-	-	-	<b>Yeni mutasyon</b>
c.4365T>C / p.Asn1455=	NM_000038	chr5: 112175656	0.000012	0.000016	-	0.0002	rs568891310
c.7504G>A / p.Gly2502Ser	NM_000038.6	chr5: 112178795	0.02	0.02	0.014	0.0008	rs2229995
<b>AR</b>							
c.237_239delGCA / p.Gln80del	NM_000044.6	chrX: 66765171	0.18	0.1	-	-	rs778920072

Çizelge 4.1. Varyantlar ve allel frekansları(Devamı)

c.1174C>T / p.Pro392Ser	NM_000044.6:	chrX: 66766162	0.0041	0.0051	-	0.0074	rs201934623
c.1406_1420del / p.Gly469_Gly473del	NM_000044.6	chrX: 66766381	0.01	0.0012	-	-	rs768867084
<b>ATM</b>							
c.5558A>T / p.Asp1853Val	ENST00000278616	chr11: 108304736	0.000909	0.0000 08	-	0.0018	rs1801673
c.2922-9_2922-8delTT /	NM_000051.3	Chr11: 108141957	0.0014	0.0273	-	-	rs1491550613
<b>BARD1</b>							
c.1670G>C / p.Cys557Ser	ENST00000260947	chr2: 214752454	0.02384	-	0.002724	0.008	rs28997576
<b>BRCA1</b>							
c.4946T>C / p.Met1649Thr	ENST00000471181	chr17: 43071031	0.000349	-	0.000227	0.0026	rs4986854
<b>BRCA2</b>							
c.5312G>A / p.Gly1771Asp	ENST00000380152	chr13: 32339667	0.000582	-	-	0.0002	rs80358755
c.5744C>T / p.Thr1915Met	ENST00000380152	chr13: 32340099	0.02907		0.005674	0.0086	rs4987117
c.5785A>G / p.Ile1929Va	NM_000059.3	Chr13: 32914277	0.0008	0.0009 5	0.00007	0.013	rs79538375

Çizelge 4.1. Varyantlar ve allel frekansları(Devamı)

c.4258G>T / p.Asp1420Tyr	NM_000059.3	Chr13: 32912750	0.0066	0.0067	0.0039	0.0039	rs28897727
c.2918C>G / p.Ser973Trp	ENST00000544455.1	Chr13: 32911410	-	-	-	-	<b>Yeni mutasyon</b>
c.3516G>A / p.Ser1172=	NM_000059	Chr13: 32912008	0.0027	0.0029	0.0027	0.0016	rs1799952
<b>BRIP1</b>							
c.1935+20_1935+22del	ENST00000259008	chr17: 61780239	-	-	-	-	rs763913233
c.380-17del	ENST00000259008	chr17: 61849273	-	-	-	-	rs545021924
c.139C>G / p.Pro47Ala	NM_032043.2	Chr17: 59937223	0.0002	0.0002	0.0002	-	rs28903098
<b>CDKN2A</b>							
c.442G>A / p.Ala148Thr	ENST00000498124.1	Chr9: 21970916	0.0208	0.0223	0.0225	0.0069	rs3731249
<b>CHEK2</b>							
c.722-14C>T	ENST00000382580	chr22: 28719499	0.005	0.0021	0.00023	0.002	rs145754558
c.623G>A / p.Gly208Asp	NM_001005735	chr22: 29121063	-	-	-	-	rs876660846
c.722-10T>C	NM_001005735.2	Chr22: 29115483	--	--	--	--	<b>Yeni Mutasyon</b>

Çizelge 4.1. Varyantlar ve allel frekansları(Devamı)

<b>EHBP1</b>							
c.2199G>A / p.Glu733=	NM_015252.5	Chr2: 63176075	0.0026	0.0023	0.0027	0.0031	rs111706386
c.2303A>G / p.Tyr768Cys	NM_015252.5	Chr2: 63176179	0.0021	0.0021	0.0018	0.0021	rs140508263
c.2674G>C / p.Ala892Pro	NM_015252.5	Chr2: 63206431	0.000028	0.000033	-	-	rs754583745
c.1976G>A / p.Ser659Asn	NM_015252	chr2: 63175852	0.00047	0.00046	0.00038	-	rs140493234
<b>ELAC2</b>							
c.1621G>A / p.Ala541Thr	ENST00000338034.4	Chr17: 12899902	0.035	0.032	0.028	0.023	rs5030739
c.2376G>A / p.Ala792=	ENST00000338034.4	Chr17: 12896240	0.0003	0.0004	0.0003	0.0004	rs180717697
<b>EPHB2</b>							
c.780C>T / p.Phe260=	NM_004442.7	Chr1: 23111538	0.000016	0.000016	-	-	rs778010315
c.1081A>G / p.Ile361Val	ENST00000400191.7	chr1: 22864990	0.000581	-	-	0.0004	rs56180036
<b>FANCA</b>							
p.Pro1218Leu	NM_000135.4	Chr16: 89809320	-	-	-	-	rs771111655

Çizelge 4.1. Varyantlar ve allel frekansları(Devamı)

c.3031C>T / p.Arg1011Cys	NM_000135	chr16: 89818581	0.00019	0.0001 3	0.000077	-	rs142377616
c.2574C>G / p.Ser858Arg	NM_000135.	chr16: 89833576	0.01	0.01	0.005	0.0093	rs17233141
c.1225+20C>T	NM_000135.	chr16: 89858315	0.00031	0.0002 8	-	0.00059	rs199534742
c.694A>C / p.Arg232=	NM_000135	chr16: 89871703	0.0015	0.0016	0.002	0.0006	rs61757384
c.1638A>C/ p.Gln546His	ENST00000389301	chr16: 89846354	-	-	-	-	<b>Yeni Mutasyon</b>
<b>FGFR4</b>							
c.-53-11C>T	NM_213647.3	Chr5: 176516540	0.014	-	-	0.011	rs3135919
c.1276G>A / p.Gly426Ser	NM_213647.3	Chr5: 176520431	0.00009 6	0.0000 58	0.000077	0.0002	rs55879131
c.-53-14C>G	NM_213647	chr5: 176516537	0.023	-	-	0.014	rs3135918
<b>HNF1B</b>							
c.*99_*100delCGinsAA	NM_000458.4	Chr17: 36047275	--	--	--	--	-
<b>ITGA6</b>							
c.2926C>A / p.Arg976=	NM_001079818	chr2: 173356189	0.00000 4	8E-07	-	-	rs769808745

Çizelge 4.1. Varyantlar ve allel frekansları(Devamı)

c.2247C>G / p.Val749=	NM_001079818	chr2: 173352458	0.006	0.0053	0.006	0.0045	rs61748247
c.182+11_182+15delAGACCinsGG ACT	NM_001079818.1	chr2: 173292709	-	-	-	-	<b>Yeni Mutasyon</b>
<b>MSH2</b>							
c.1666T>C / p.Leu556=	NM_000251.2	chr2: 47698108	0.00042	0.0004 5	0.00058	0.00022	rs61756466
<b>MSH6</b>							
c.2633T>C / p.Val878Ala	NM_000179.2	Chr2: 48027755	0.0106	0.0052	0.0055	0.0039	rs2020912
c.663A>C/ p.Glu221Asp	NM_000179.2	chr2: 48025785	0.0007	0.0006	0.0008	-	rs41557217
c.3151G>A / p.Val1051Ile	NM_000179.2	chr2: 48028273	0.0009	0.0009	0.001	-	rs576269342
c.457+13A>G /	NM_000179.2	Chr2: 48018275	0.005	0.005	0.004	0.004	rs1800933
<b>MSMB</b>							
c.153G>A / p.Glu51=	NM_002443.4	Chr10: 51556794	0.00000 4	0.0000 08	-	-	rs782181735
<b>MSR1</b>							
c.-4-1G>A	NM_138715.3	chr8: 16035502	0.0008	0.0008	0.0006	0.0012	rs33912200
<b>MUTYH</b>							
c.1544C>T / p.Ser515Phe	NM_001128425.1	Chr1: 45795084	0.0085	0.0078	0.011	0.0045	rs140118273
c.2T>C / p.Met1Thr	NM_001128425	chr1:45805925	-	-	-	-	rs865954220

Çizelge 4.1. Varyantlar ve allel frekansları(Devamı)

c.2083T>A / p.Phe695Ile	NM_006231.3	chr12: 133245032	0.011	0.011	0.01125	0.0077	rs5744799
<b>PMS2</b>							
c.1711C>A / p.Leu571Ile	NM_000535.7	chr7: 6026685	0.007	0.0025	0.0057	0.0063	rs63750055
c.706-6_706-4delTTT	NM_000535.7	chr7: 6037058	0.00017	0.0073	-	0.0014	rs567585097
<b>RAD51C</b>							
c.376G>A /p.Ala126Thr	NM_058216.3	chr17: 56772522	0.00351	0.0034 7	0.00461	0.00199	rs61758784
c.572-17G>T	NM_058216	chr17: 56780540	0.004	0.004	0.006	0.0036	rs193023469
<b>RNASEL</b>							
c.196G>A / p.Ala66Thr	NM_021133.4	Chr1: 182555746	0.00011	0.0001 2	-	-	rs745739936
<b>STK11</b>							
c.734+22dupG	NM_000455.4	chr19: 1220736	0.00000 4	-	-	-	rs730881962
<b>TP53</b>							
c.639A>G / p.Arg213=	ENST0000026930 5.4	Chr17: 7578210	0.012	0.012	0.013	0.005	rs1800372
c.604C>T / p.Arg202Cys	ENST0000026930 5	chr17: 7578245	0.00002 8	0.0000 16	-	-	rs587780072

Çizelge 4.1. Varyantlar ve allel frekansları(Devamı)

WT1							
c.381C>G / p.Pro127=	NM_024426.6	chr11: 32456526	0.00009	0.0000 65	-	-	rs771681406
c.1124G>T / p.Arg375Leu	NM_024426.6	chr11: 32417943	0.00002	0.0000 08	-	-	rs554416372

Çizelge 4.2. Varyantların in-siliko tahmin skorları

rs ID	PolyPhen Score	SIFT Score	Provean Score	Gerp Score	DANN Score	Status
rs4986854		0.54-Tolerated	0.59- Nötral		0.18-B	<b>Yeni Mutasyon</b>
rs1800372	0.68			5.28		
rs1491550613	-	-	-	-	-	
rs79538375	0.03-Benin	0.31-Tolerated	-0.49-Nötral		0.22-Benin	
rs117409343	-	-	-	-	-	
rs2229994	-	-	-	-	-	
rs111706386	-	-	-	-2.96	-	
rs140508263	0.07- Benin	0.02- Damaging	-3.31- Damaging	3.59	0.96- Deleterious	
rs754583745	0.01-Damaging	0.01- Damaging	-1.8- Nötral	5.69	1-Deleterious	
rs771111655	-	0.13-Tolerated	-5.54- Damaging	4.84	0.69- Deleterious	



Çizelge 4.2. Varyantların in-siliko tahmin skorları(Devamı)

rs768867084	-	-	-	2.87	-	
rs3135919	-	-	-	-	-	
rs55879131	0.21- Benin	0.54-Tolerated	-0.58- Nötral	4.76	0.97- Deleterious	
rs782181735	-	-	-	-	-	
rs5745068	0.72- Possibly Damaging	0.04- Damaging	-3.7- Damaging	4.809	1-Deleterious	
rs28897727	0.06- Benin	0.03-Damaging	-6.6-Damaging	1.05	0.99- Deleterious	
rs542996664	0.02- Benin	-	-	-	-	-
rs778010315	-	-	-	0.145	-	
BRCA2:c.2918C>G	-	0-Damaging	-5.76- Damaging	4	0.99- Deleterious	<b>Yeni Mutasyon</b>
rs1799952	-	-	-	-0.05	-	
rs5030739	0.14-Benin	0.16- Tolerated	-1.92- Nötral	5.57	0.81- Deleterious	
rs28903098	1-Probably Damaging	0.016- Tolerated	-6.46- Damaging		0.95- Deleterious	
APC: c.497C>G		0.53- Tolerated	0.2- Nötral	5.3	0.9- Deleterious	<b>Yeni mutasyon</b>
rs140118273	0.061- Damaging	0.01- Damaging	-2 - Nötral	0.17	0.94- Deleterious	
rs180717697	-	-	-	-	-	-
rs1800933	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.2. Varyantların in-siliko tahmin skorları(Devamı)

rs28997576	0.015-Benin	0.02- Tolerated		2.02	0.39- Benin	
rs2229995	Benign (0.08)	Tolerated (0.3)	Nötral(0.03)	High Constraint (5.95)	Deleterious (0.98)	-
rs568891310	-	-	-	-0.5649	-	-
rs767875993	Possibly Damaging (0.9)	Damaging (0)	Nötral(0.5358)	High Constraint (5.45)	Deleterious (0.99)	-
rs1801673	Probably Damaging (0.97)	Damaging (0.01)	Damaging(0.783)	High Constraint (5.52)	Deleterious (0.99)	
rs778920072	-	-	-	-	-	
rs201934623	Possibly Damaging (0.59)	Damaging (0.02)	Damaging(0.5809)	Medium Constraint (3.3)	Deleterious (1)	
rs80358755	Benign (0.03)	Tolerated (0.43)	Damaging(0.5598)	Low Constraint (-0.34)	Deleterious (low) (0.72)	
rs4987117	Benign (0)	Tolerated (0.33)	Nötral(0.00196)	Low Constraint (0.62)	Benign (0.06)	
rs763913233	-	-	-	-	-	-
rs545021924	-	-	-	-	-	
rs145754558	-	-	-	-	-	
rs876660846	-	Tolerated (0.08)	Nötral(0.4447)	High Constraint (5.87)	Deleterious (1)	

Çizelge 4.2. Varyantların in-siliko tahmin skorları(Devamı)

rs140493234	Benign (0.03)	Tolerated (0.11)	Nötral(0.2746)	Medium Constraint (4.22)	Deleterious (0.98)	
rs56180036	Benign (0.07)	Tolerated (0.47)	Nötral(0.1285)	High Constraint (5.28)	Deleterious (low) (0.89)	
rs142377616	Possibly Damaging (0.69)	Tolerated (0.25)	Nötral(0.3912)	Low Constraint (-0.18)	Benign (low) (0.36)	
rs17233141	Possibly Damaging (0.82)	Tolerated (0.06)	Nötral(0.4885)	Low Constraint (1.56)	Deleterious (0.93)	
rs576269342	Benign (0.06)	Tolerated (0.51)	Nötral(0.1101)	Medium Constraint (4.18)	Deleterious (low) (0.87)	
rs61757384	-	-	-	-	-	
rs3135918	-	-	-	-	-	
rs769808745	-	-	-	-	-	
rs61748247	-	-	-	-	-	
rs61756466	-	-	-	-	-	
rs41557217	Benign (0.01)	Tolerated (0.16)	Nötral(0.2664)	Low Constraint (-0.72)	Deleterious (0.98)	

Çizelge 4.2. Varyantların in-siliko tahmin skorları(Devamı)

rs33912200	-	-	-	High Constraint (5.36)	Deleterious (low) (0.9)	
rs865954220	-	Damaging (0)	Nötral(0.08653)	Medium Constraint (3.9)	Deleterious (0.99)	
rs587780555	-	-	-	-	-	
rs766602325	-	-	-	-	-	
rs143218866	-	-	-	-	-	
rs1314691032	-	Tolerated (0.64)	Nötral(0.1285)	Low Constraint (-4.57)	Deleterious (low) (0.61)	
rs63750055	Benign (0.02)	Tolerated (0.47)	Nötral(0.1619)	Low Constraint (-3.33)	Deleterious (low) (0.83)	
rs567585097	-	-	-	-	-	
rs138391248	Possibly Damaging (0.86)	Damaging (0)	Damaging(0.8467)	High Constraint (5.27)	Deleterious (1)	
rs5744799	-	Tolerated (0.08)	Damaging(0.6936)	High Constraint (5.89)	Deleterious (0.99)	
rs193023469	-	-	-	-	-	
rs61758784	Benign (0.27)	Damaging (0.03)	Nötral(0.4504)	Medium Constraint (3.35)	Deleterious (1)	
rs730881962	-	-	-	-	-	
rs587780072	Benign (0.05)	Damaging (0.01)	Damaging(0.6378)	Medium Constraint	Deleterious (0.96)	
rs771681406	-	-	-	-	-	
rs554416372	-	Damaging (0)	Damaging(0.9081)	High Constraint (6.17)	Deleterious (1)	

Çizelge 4.3. Varyant İn-Siliko Patojenisite Skorlandırma Tablosu

İn-Siliko Platform	Patojenik	Normal
PolyPhen-2	0.15-1	0-0.15
SIFT	1	0
DANN	1	0
PROVEAN	-14	14

Çizelge 4.4. Varyantların Patojenisite Sınıflandırma Tablosu

Gene Symbol	rs ID	Mutation type	VarSome	Franklin	Clinvar	Fenotip
APC	rs2229995	Missense	B	B	-	-
APC	rs568891310	Missense	LB	LB	LB	Kalıtsal Kanser
APC	rs2229994	Sinonim	B	B	B, LB	Kalıtsal Kanser
APC	c.3887C>A / p.Ala1296Glu	Missense	VUS	VUS	-	-
APC	c.497C>G	Missense	LB	VUS	-	-
APC	rs767875993	Missense	VUS	VUS	VUS	
ATM	rs1801673	Missense	B	VUS	VUS	Kalıtsal Kanser
ATM	rs1491550613	Delesyon	VUS	B	-	--
AR	rs768867084	Delesyon	LB	B	LB	-
AR	rs778920072	Delesyon	VUS	VUS	P, VUS, B	Bulbo-spinal atrophy

Çizelge 4.4. Varyantların Patojenisite Sınıflandırma Tablosu(Devamı)

AR	rs201934623	Missense	B	VUS	P, VUS, B	Partial androgen insensitivity syndrome
AR	rs768867084	Delesyon	LB	B	LB	-
BARD1	rs28997576	Missense	B	B	B, LB	Meme- Kalıtsal Kanser
BRCA1	rs4986854	missense	LB	B	B, LB, VUS	Kalıtsal Kanser
BRCA2	rs28897727	Missense	B	B	B, LB, LP	Meme- Kalıtsal Kanser
BRCA2	rs80358755	Missense	LB	B	B, LB, VUS	Meme- Yumurtalık- Kalıtsal Kanser
BRCA2	rs4987117	Missense	B	B	B, LB, VUS	Meme- Yumurtalık- Kalıtsal Kanser
BRCA2	rs79538375	Missense	LB	B	B, LB, VUS	Kalıtsal Kanser, Meme
BRCA2	c.2918C>G	Missense	VUS	VUS	VUS	Kalıtsal Kanser
BRCA2	rs1799952	Sinonim	LB	B	LB, B	Kalıtsal Kanser
BRCA2	rs28897727	Missense	LB	B	B, LB, LP	Kalıtsal Kanser
BRIP1	rs763913233	Delesyon	VUS	VUS	-	-
BRIP1	rs545021924	Delesyon	LB	B	B, LB	Fanconi anemi- Kalıtsal Kanser
BRIP1	rs28903098	Missense	VUS	VUS	VUS, LB, P	Meme- Kalıtsal Kanser
CHEK2	rs145754558	İntronik	B	B	B, LB	Kolorektal-Kalıtsal Kanser
CHEK2	rs876660846	Missense	LP	VUS	VUS	Hereditary cancer-predisposing syndrome
EHBP1	rs140493234	Missense	VUS	VUS	-	-
EHBP1	rs111706386	Sinonim	LB	VUS	-	-
EHBP1	rs140508263	Missense	VUS	VUS	-	-
EHBP1	rs754583745	Missense	VUS	VUS	-	-
ELAC2	rs5030739	Missense	B	B	P, B	Prostat Kanseri
ELAC2	rs180717697	Sinonim	LB	LB	LB	
EPHB2	rs778010315	Sinonim	VUS	VUS	-	-

Çizelge 4.4. Varyantların Patojenisite Sınıflandırma Tablosu(Devamı)

EPHB2	rs56180036	Missense	LB	LB	-	
FANCA	rs142377616	Missense	LB	VUS	LB	Fanconi anemia
FANCA	rs17233141	Missense	B	B	LB, P, B	Fanconi anemia
FANCA	rs199534742	intronik	VUS	LB	-	
FANCA	rs61757384	Sinonim	LB	LB	B	Fanconi anemia
FANCA	rs771111655	Missense	LB	VUS	-	-
FANCA	c.1638A>C/ p.Gln546His	Missense	VUS	VUS	-	-
FGFR4	rs3135918	İntronik	LB	B	-	
FGFR4	rs3135919	İntronik	LB	B	-	-
FGFR4	rs55879131	Missense	LB	VUS	-	-
ITGA6	rs769808745	Sinonim	VUS	VUS	-	
ITGA6	rs61748247	Sinonim	LB	VUS	VUS	Epidermolysis bullosa junctionalis
ITGA6: c.182+11_182+1 5delAGACC insGGACT	-	İntronik	VUS	VUS	-	-
MSH2	rs61756466	Sinonim	B	B	B,LB	
MSH6	rs41557217	Missense	LB	VUS	VUS,LB,B	Lynch Sendrom,Kalitsal Kanser
MSH6	rs576269342	Missense	VUS	B	VUS,LB,B	Kalitsal Kanser
MSH6	rs1800933	İntronik	B	B	LB,B	Lynch Sendrom-Kalitsal Kanser
MSMB	rs782181735	Sinonim	VUS	VUS	-	-
MSR1	rs33912200	splice_acceptor _variant	VUS	LP	-	
MUTYH	rs865954220	Missense	P	LP	VUS	MYH-associated polyposis

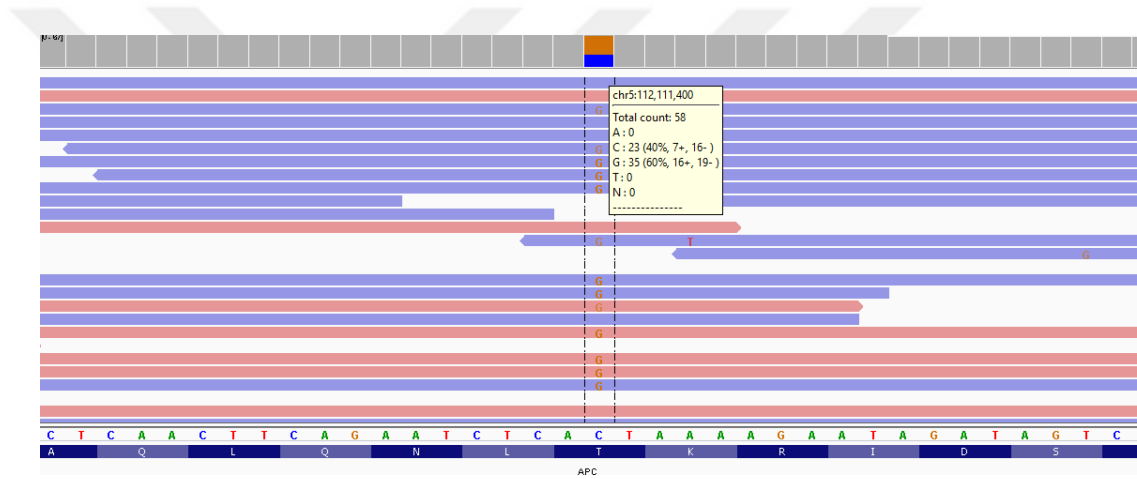
Çizelge 4.4. Varyantların Patojenisite Sınıflandırma Tablosu(Devamı)

MUTYH	rs140118273	Missense	B	B	B, LB	Kalıtsal Kanser
NBN	rs587780555	İnseriyon	LB	VUS	B, LB	MikroSefali, Kalıtsal Kanser
PLXNB1	rs766602325	Splice	VUS	VUS	-	
PLXNB1	rs749556070	Missense	VUS	VUS	-	-
PLXNB1	rs749556070	Sinonim	VUS	VUS	-	-
PLXNB1	rs143218866	İntronik	LB	B	-	-
PLXNB1	rs1314691032	Missense	VUS	VUS	-	-
PMS2	rs63750055	Missense	B	B	B, LB, VUS	Kalıtsal Kanser, Kolon Kanseri
PMS2	rs567585097	İntronik	LB	VUS	B	Kalıtsal Kanser, Kolon Kanseri
POLD1	rs542996664	Sinonim	LB	LB	B, LB	Kolorektal- Kalıtsal Kanser
POLE	rs138391248	Missense	VUS	VUS	VUS	Kolorektal Kanser
POLE	rs5744799	Missense	B	B	B, LB	Kolorektal Kanser, Kalıtsal Kanser
POLE	rs117409343	Splice	B	B		B, LB
POLE	rs5745068	Missense	LB	B	B, LB	Kolorektal- Kalıtsal Kanser
RAD51C	rs193023469	İntronik	B	B	B, LB	Kalıtsal Kanser
RAD51C	rs61758784	Missense	B	B	LB, B	
STK11	rs730881962	İntronik	VUS	VUS	-	-
TP53	rs587780072	Missense	VUS		VUS, LB	Kalıtsal Kanser, Li-Fraumeni Sendromu
TP53	rs1800372	synonymous	B	B	B, LB	Li-Fraumeni sendrom, Kalıtsal Kanser
WT1	rs771681406	Sinonim	VUS	LB	VUS	Wilms Tumor, Drash Sendrom, Meacham Sendrom
WT1	rs554416372	Missense	VUS	VUS	-	-

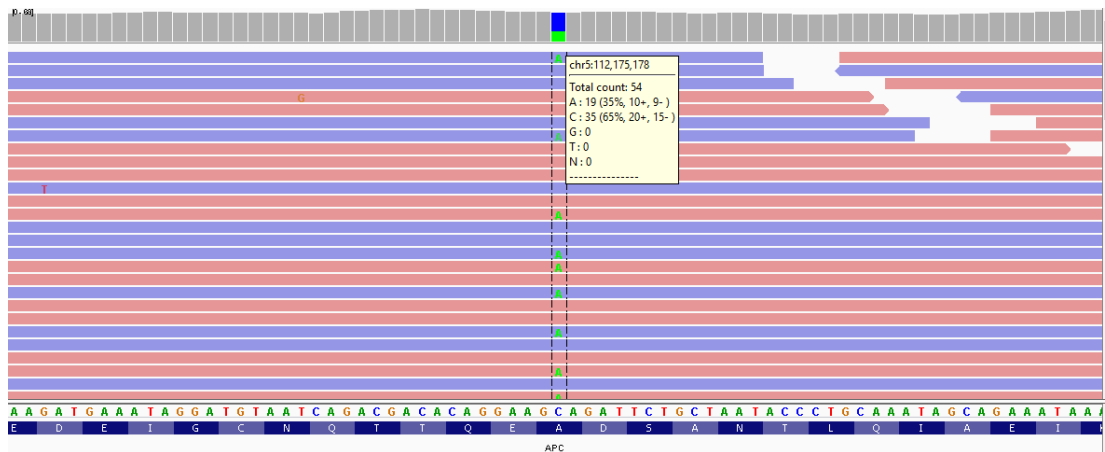


#### 4.4. Yeni Mutasyonların Sanger Dizileme ile Doğrulanması

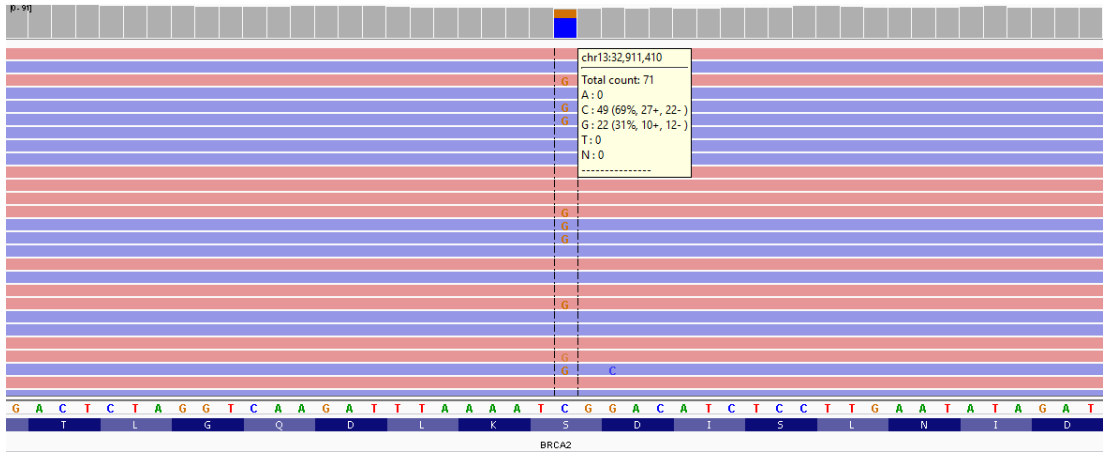
Çalışmamız kapsamında APC (c.497C>G), APC (c.3887C>A), BRCA2 (c.2918C>G), CHEK2 (c.722-10T>C), FANCA (c.1638A>C), ITGA6 (c.182+11\_182+15delAGACCinsGGACT) pozisyonlarında bulunan yeni mutasyonlara ait IGV görüntüleri sırası ile Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da belirtilmiştir. Sanger doğrulama ile sadece APC (c.497C>G) ve BRCA2 (c.2918C>G) bölgelerinde amplifikasyon elde edilmiş olup sırası ile Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de belirtilmiştir.



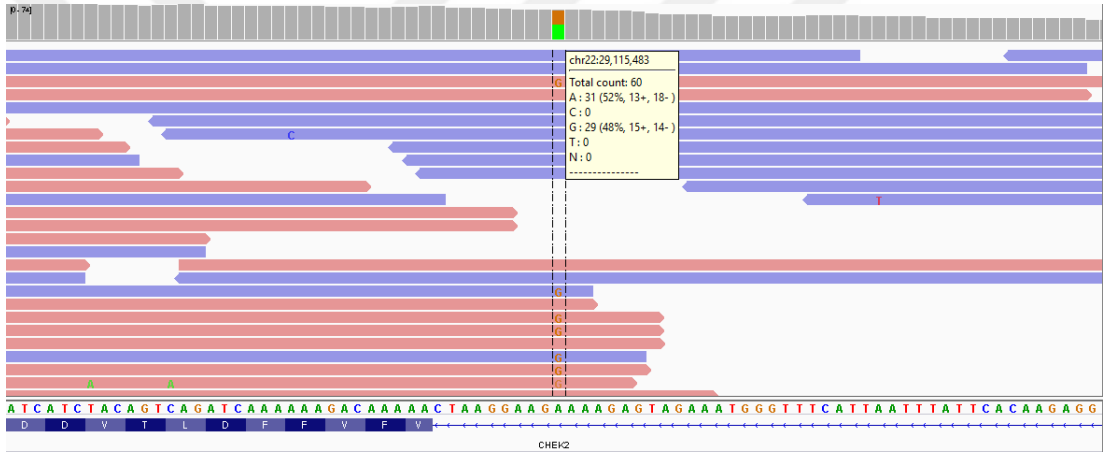
Şekil 4.1. APC Geni c.497C>G IGV Görüntüsü



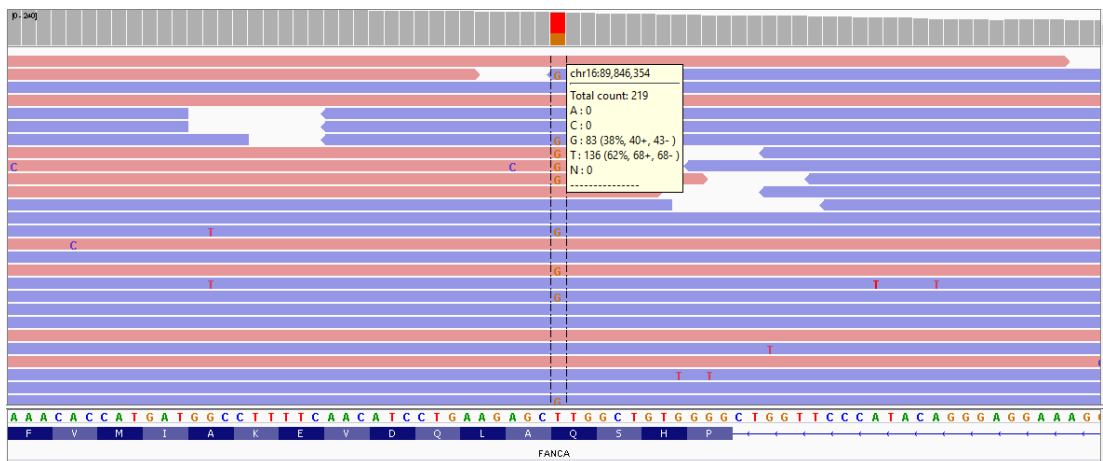
Şekil 4.2. APC Geni c.3887C>A IGV Görüntüsü



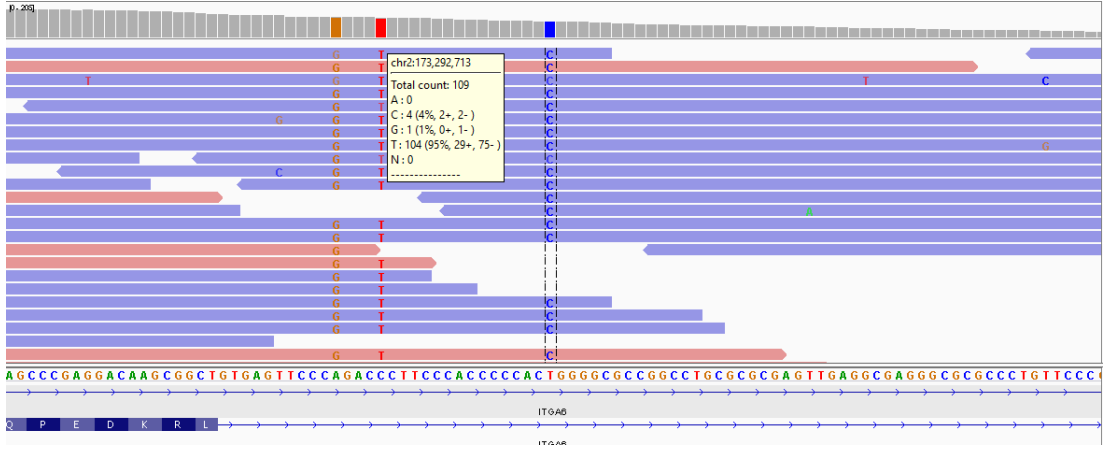
Şekil 4.3. BRCA2 Geni c.2918C>G IGV Görüntüsü



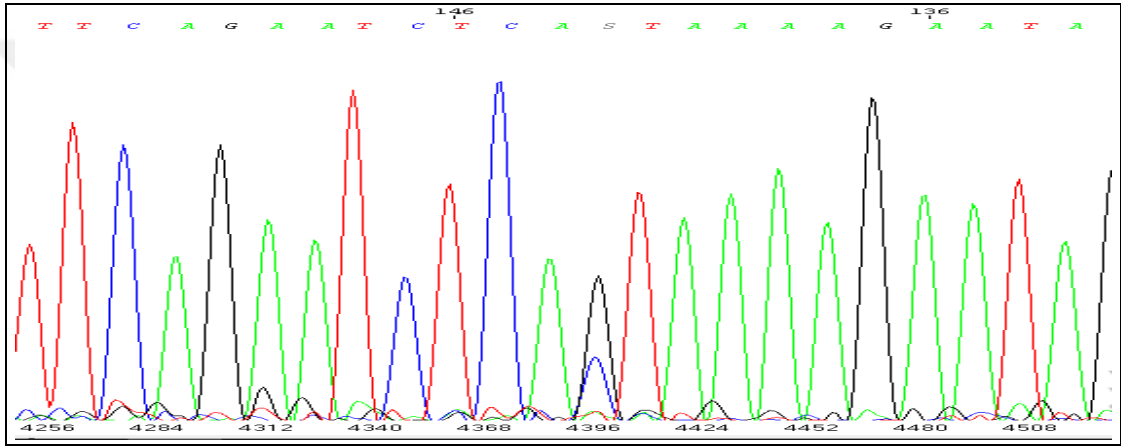
Şekil 4.4. CHEK2 Geni c.722-10T>C IGV Görüntüsü



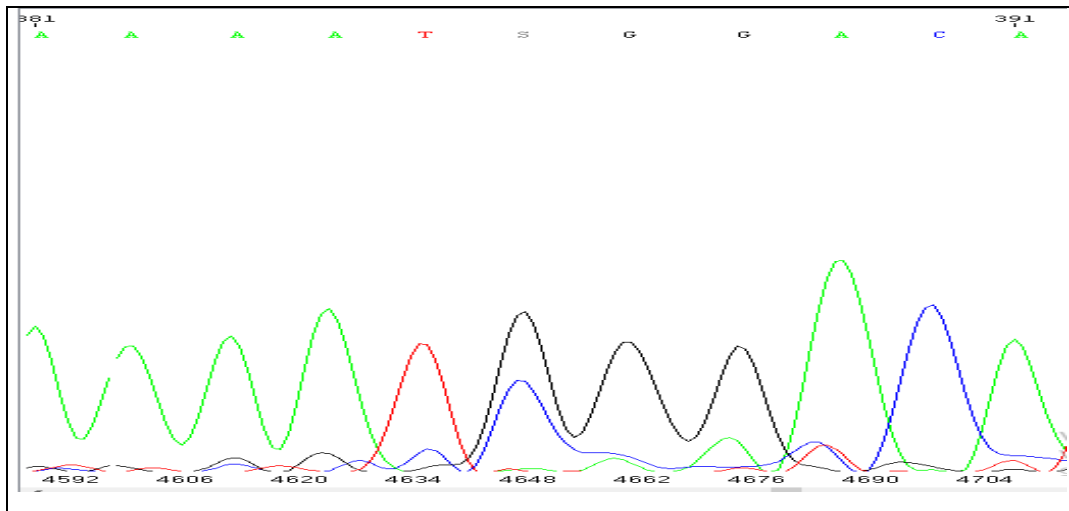
Şekil 4.5. FANCA Geni c.1638A>C IGV Görüntüsü



Şekil 4.6. ITGA6 Geni c.182+11\_182+15delAGACCinsGGACT IGV Görüntüsü



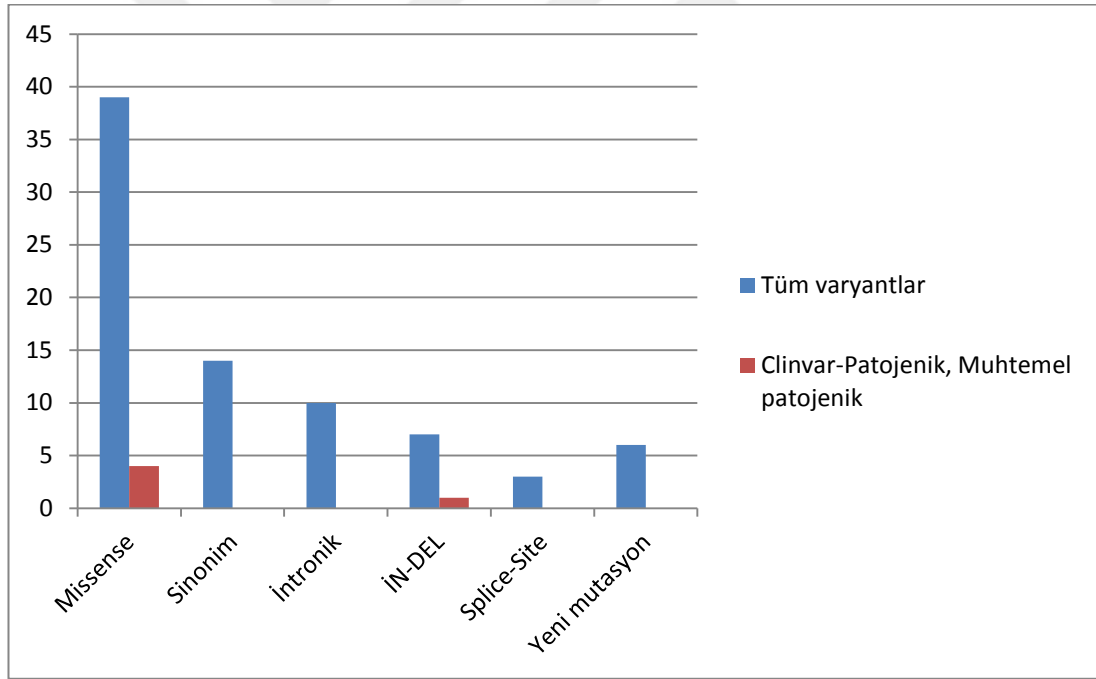
Şekil 4.7. APC Geni c.497C>G Sanger Görüntüsü



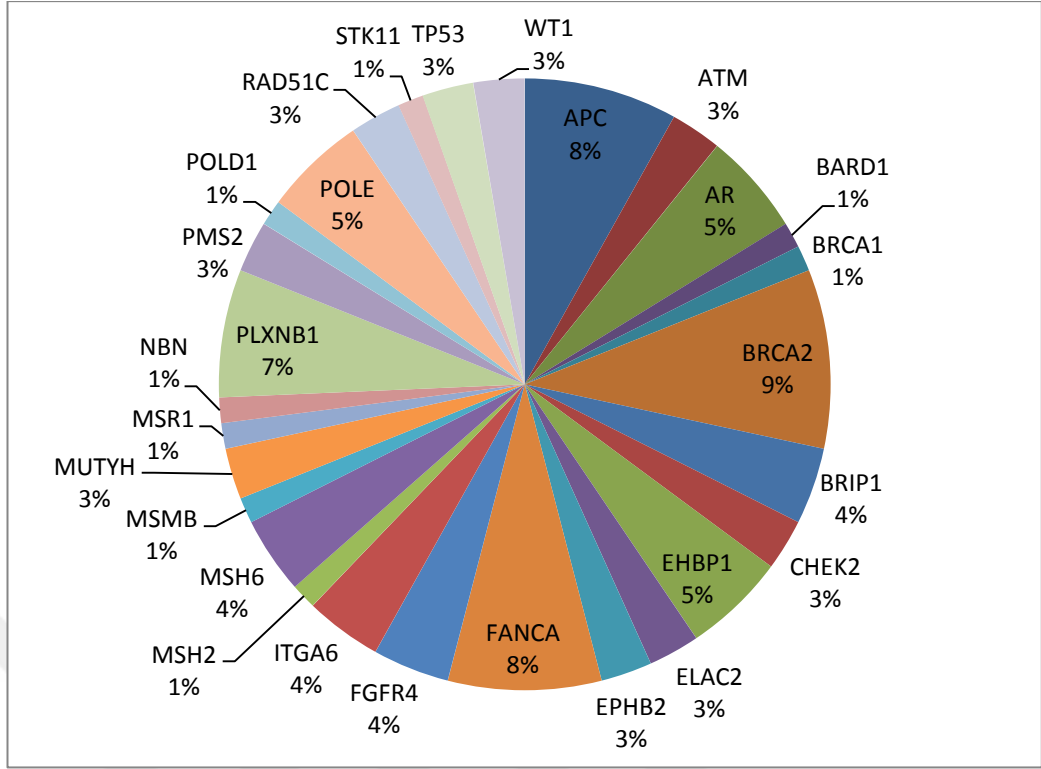
Şekil 4.8. BRCA2 Geni c.2918C>G Sanger Görüntüsü

#### 4.5. Tüm Varyantların Varyant Tiplerine Göre Dağılımı

Yeni Nesil Dizileme yöntemi ile yapılmış Tez çalışmamızın sonucunda çalışılan 21 Prostat kanserli örnekte, Farklı Populasyonlarda görülme sıklığı %5' in altında olan; 39 Missense, 14 Sinonim, 3 Splice-site, 10 İntronik, 7 İN-DEL ve 6 yeni mutasyon olmak üzere(Şekil 4.9.), mutasyon filtrelememizden geçen toplam 79 dönüşüm elde edilmiştir. Buna göre bulduğumuz tüm varyantların genlere göre yüzde dağılımları; APC %8, ATM %3, AR %5, BARD1 %1, BRCA1 %1, BRCA2 %9, BRIP1 %4, CHEK2 %3, EHBP1 %5, ELAC2 %3, EPHB2 %3, FANCA %8, FGFR4 %4, ITGA6 %4, MSH2 %1, MSH6 %4, MSMB %1, MUTYH %3, MSR1 %1, NBN %1, PLXNB1 %7, PMS2 %3, POLD1 %1, POLE %5, RAD51C %3, STK11 %1, TP53 %3, WT1 %3 şeklindedir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.9. Tüm varyantların, Varyant tiplerine göre dağılımı



Şekil 4.10. Tüm varyantların, genlere göre yüzdelerle dağılımı

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Prostat kanserinin genetik temeline dair birçok çalışma yapılmıştır ve sürekli olarak hastalığın moleküler genetiği hakkındaki bilgi artmaktadır. Bunun sonucu olarak patojenik kalıtsal varyantlar eşliğinde klinik yönetim önem kazanmaktadır. Prostat kanserine genetik katkısı olduğu düşünülen farklı faktörler vardır. Bunlar; prostat kanseri olan birinci dereceden akrabalar, erken başlangıçlı prostat kanseri (yaş<55) olanlar ve prostat ve diğer kanser türlerinden aile öyküsü bulunanlardır (Keetch DW. vd., 1996; Carter BS. Vd., 1992).

Diğer karmaşık hastalıklarda olduğu gibi, prostat kanserinin genetik kalıtımına, nadiren meydana gelen ancak yüksek penetranslı veya daha düşük riskler oluşturan yaygın olarak oluşan varyantlar tarafından katkıda bulunur. Prostat kanseri ile ilgili güncel çalışmalarda, prostat kanserinin aileden gelen varyantlar neticesinde oluşma ihtimali %37.5 olarak belirtilmiştir. Bu varyantların %6'sı nadir meydana gelen varyantlar ve %31.5'i MAF değeri %1'den büyük olan yaygın gözlenen varyantlardır (Benafif vd., 2018). Bağlantı analizleri, genom boyu ilişkilendirme (GWAS) çalışmaları ve olgu-kontrol çalışmaları yapılarak, genom üzerindeki çeşitli gen ve kromozomal bölgeler, prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir (National Cancer Institute). Günümüzde yayınlanan en geniş çaplı GWAS çalışmasında, 63 yeni Prostat kanseri ile ilişkilendirilmiş loci tanımlanarak tanımlı bölge sayısı 167'ye yükselmiştir. PrCa'nın ailesel göreceli riskinin yaklaşık %31,5'i 167 bilinen varyant ile açıklanabilir. Yaklaşık %6'sı, BRCA2 ve HOXB13 gibi nadir fakat daha yüksek risk varyantları ile açıklanabilir. PrKa'nın kalıtsal genetiğini daha iyi anladıkça, bu bilgiyi PrKa için tarama programlarına dahil edilebilecek genetik profiller üretmek için kullanabileceğiz (Schumacher vd., 2018).

Bu tez çalışmasında; prostat kanseri tanısı almış 21 hastada, hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen AKT1, APC, AR, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDKN2A, CHEK2, EHBP1, ELAC2, EPCAM, EPHB2, FANCA, FGFR4, GREM1, HNF1B (rs4239217, rs757210, rs3760511, rs4794758, rs3744763,

rs11649743, rs4430796, rs2005705, rs7405696, rs7501939), HOXB13, IGF2, ITGA6, MLH1, MSH2, MSH6, MSMB, MSR1, MUTYH, NBN, PALB2, PLXNB1, PMS2, POLD1, POLE, RAD51C, RAD51D, RNASEL, STK11, TP53, WT1 genleri yeni nesil dizileme yöntemi ile tüm ekzon, ekzon-intron bağlantı noktaları (25 bp'e kadar) dizilenmiştir. Dizileme sonucunda ortaya çıkan SNP, mutasyon, küçük insersiyon ve delesyonlar biyoinformatik veritabanları yardımı ile anlamlandırılmıştır. Sonuç olarak, farklı populasyonlarda görülme sıklığı %5' in altında olan; 39 adet missense, 14 adet sinonim, 3 adet splice-site, 10 adet intronik, 7 adet İN-DEL ve 6 adet yeni mutasyon olmak üzere, mutasyon filtrelememizden geçen toplam 79 adet dönüşüm elde edilmiştir. Yeni mutasyonlar, APC (c.497C>G), APC (c.3887C>A), BRCA2 (c.2918C>G), CHEK2 (c.722-10T>C), FANCA (c.1638A>C) ve ITGA6 (c.182+11\_182+15delAGACCinsGGACT) gen bölgelerinde tespit edilmiştir. Ayrıca AR (c.1174C>T), AR (c.1406\_1420del), BRIP1 (c.139C>G), ELAC2 (c.1621G>A), FANCA (c.2574C>G) genlerinde Clinvar veritabanı girdilerine göre patojenisitesi patojenik/muhtemel patojenik mutasyon olan 5 varyant saptanmıştır.

Nicolosi vd, (2019), 3607 prostat kanseri öyküsüne sahip örnek ile yaptıkları çalışmada, 620 örnekte germline kalıtmalı patojenik varyant elde etmiştir. Varyant pozitif örneklerde, yaşa bağlılık görülmemiştir. Çalışma içerisinde taranan genlerde, en sık patojenik varyanta sahip 10 gen; BRCA2, %4,74; CHEK2, %2,88; ATM, %2,03; MUTYH, %2,37; APC, %1,28; BRCA1, %1,25; HOXB13, %1,12; MSH2, %0,69; TP53, %0,66 ve PALB2, %0,56 olarak belirtilmiştir. Çıkan varyantların sadece %1,74'ü DNA onarım genlerinde meydana gelmiştir. Çalışma içerisinde taranan BRCA2 geninde; 164 patojenik ve 75 VUS varyant, CHEK2 geninde 95 patojenik ve 71 VUS, ATM geninde 65 patojenik ve 160 VUS, MUTYH geninde 55 patojenik ve 77 VUS, BRCA1 geninde 43 patojenik ve 38 VUS, HOXB13 geninde 30 patojenik, APC geninde 30 patojenik ve 76 VUS varyant gözlemlenmiştir. Çalışmamızın kapsamında taranan BRCA2, CHEK2, ATM, MUTYH, APC, BRCA1, HOXB13, MSH2, TP53 ve PALB2 genlerinde; 7 BRCA2 (%8,82), 2 CHEK2 (%2,52), 2 ATM(%2,52), 2 MUTYH (%2,52), 5 APC (%6,32) ve 1 BRCA1 (%1,26), 1 MSH2 (%1,26) ve 2

TP53 (%2,52) mutasyonu saptanmıştır. HOXB13 ve PALB2 genlerinde, varyant filtrelemesinden sonra hedef bölgede mutasyon saptanmamıştır. Dönüşüm gözlenen genlerden BRCA2 geninde; Clinvar raporlarında belirtilmiş 1 muhtemel patojenik ve Franklin platformuna göre 1 VUS variant, CHEK2 geninde; Clinvar raporlarına göre 1 VUS, ve Varsome platform sonuçlarına göre 1 muhtemel patojenik, APC geninde; Varsome platform sonuçlarına göre 1 VUS, ATM geninde; Franklin ve Clinvar raporlarına göre 1 VUS, BRCA1 geninde; Clinvar raporlarına göre 1 VUS, MUTYH geninde; Clinvar ve Varsome platform sonuçlarına göre 1 patojenik, TP53 geninde; Varsome ve Clinvar raporlarına göre 1 VUS variant bulunmuştur. Elde ettiğimiz dönüşümlerin oranlarının, Piper Nicolosi vd (2019) yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermesi, taranan genlerin, bir prostat kanseri genetik yatkınlık testinde bulunması gerektiğine işaret etmektedir.

Yu vd. (2011), yaptıkları çalışmada, FGFR4 geni 388. aminoasit pozisyonundaki Glisin'den Arjinin'e olan germline değişikliğin, tümör invazyon ve hareketliliğini arttırdığını ve ERK, SRF aktivasyonu ile prostat kanserindeki agresiflikle ilişkili bir dizi ekspresyon değişikliğini arttırdığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda bu değişiklik görülmemiş olup, p.Gly426Ser missense dönüşümü gözlemlenmiştir. Gözlenen bu dönüşümün Franklin- ACMG hesaplayıcı algoritmasındaki karşılığı VUS olarak bildirilmiş olup, prostat kanseri genetik yollarında rol alabileceği düşünülmektedir.

Berndt vd. (2011), 10.272 prostat kanserli ve 9123 kontrol grubu örnekleri ile yaptıkları Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları sonucunda, HNF1B geninde bulunmuş rs4430796, rs7405696, rs4794758, rs1016990 ve rs3094509' dbSNP numaralı varyantlar prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamız kapsamında, HNF1B geninde varyant filtrelemesini geçen bir dönüşüme rastlanmamıştır.

Xu vd. (2010), çalışmalarında ELAC2 genindeki Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmlerini taşıyan bireylerin, normal alleli taşıyan bireylere oranla daha sık prostat kanseri ile karşılaşılması sonucunda bu dönüşümlerin prostat



kanseri riskini arttırdığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda toplumsal alel frekansı %3 olarak belirtilen Ala541Thr dönüşümünün prostatlı çalışma örneklerimizde gözlemlenmiş olması, bu dönüşümün kanser üzerinde etkili olabileceğini gözler önüne sermektedir.

Pritchard vd. (2016), 692 metastatik prostat kanserli örnekte, 20 DNA tamir mekanizmasında rol alan geni tarayarak 84 patojenik germline mutasyon elde etmişlerdir. Çalışmada taranan NBN geninde 2 (%3), RAD51C geninde 1 (%1,5), PMS2 geninde 2 (%3), BRIP1 geninde 1 (%1,5), BARD1 ve MLH1 genlerinde ilişkili bir mutasyon bulunamamıştır. Çalışmamız kapsamında filtrasyon sonucu elde edilen 79 varyant içerisinde, BRIP1 geninde 3 (%3,8), NBN geninde 1(%1,26), RAD51C geninde 2 (%2,53), PMS2 geninde 2 (%2,53), BARD1 geninde 1 (%1,26) ve MLH1 geninde mutasyon bulunamamıştır.

Wilkes vd. (2017), çalışmalarında, genel olarak Fanconi Anemisi ile ilişkilendirilen FANCA geninin, prostat kanseri ile ilişkili olabileceği bildirmiş ve S1088F dönüşümünün üzerinde durmuşlardır. Örneklerimiz içerisinde bu dönüşüme sahip birey bulunmamakla birlikte filtrelemelerden geçen 6 varyant bulunmuştur. FANCA geninde bulduğumuz p.Gln546His dönüşümü çeşitli veritabanları tarafından VUS olarak bildirilmiş ve prostat kanseri üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. FANCA geni 18. Ekzon c.1638 pozisyonunda bulduğumuz A>C dönüşümü; dbSNP ve diğer veritabanları tarafından tanımlanmamış olup, hiçbir popülasyon veritabanında bilgi bulunmamaktadır.

Su vd. (1999), yaptıkları çalışmada Peutz-Jeghers sendromunda etkili STK11/LKB1 geninde bulunan germline ve somatik kalıtmı mutasyonları incelemişlerdir. Çalışmada otozomal dominant kalıtmı Peutz-Jeghers sendromunun, kanserin gelişmesi ve ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir. Çalışmamız kapsamında örneklerimizde taradığımız STK11 geninde 'rs730881962' dbSNP numaralı varyant bulunmuş ve çeşitli ACMG sınıflandırması yapan platform ile incelenmiştir. Platform raporlarında bu dönüşüm 'VUS' olarak sınıflandırılmıştır.

Wang vd (2019) yaptıkları çalışma içerisinde çeşitli kanser tiplerine sahip 47.721 örnekte POLE ve POLD1 genini incelemiştir. Çalışma sonucuna göre; 4129 prostat kanserli örneğin 74'ünde (%1,8) POLE ve POLD1 mutasyonları saptanmıştır. Çalışmamız kapsamında, POLE ve POLD1 genlerinde varyant filtresini aşan 5 mutasyon bulunmuş olup, POLE geninde bulunan 'rs138391248' dbSNP numaralı varyant çeşitli platformlar tarafından 'VUS' olarak sınıflandırılmıştır.

Bu tez çalışması, prostat kanseri ve hastalıkla ilişkili birçok genin çoklu panel şeklinde yeni nesil dizileme yöntemi ile dizildiği ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. İlk defa bu çalışmada gözlenen APC (c.497C>G), APC (c.3887C>A), BRCA2 (c.2918C>G), CHEK2 (c.722-10T>C), FANCA (c.1638A>C) ve ITGA6 (c.182+11\_182+15del AGACC insGGACT) genlerinde tespit edilen yeni mutasyonlar literatüre katkı sağlamıştır. Birçok olguda saptamış olduğumuz klinik önemi bilinmeyen varyantların (VUS) klinik öneminin daha iyi anlaşılması için daha fazla olgu gruplarında çalışılarak allel frekanslarının elede edilmesi ve fonksiyonel çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Ayrıca çalışmamızda kullandığımız yeni nesil dizileme yöntemi ile kanserin moleküler mekanizmalarından büyük insersiyon/delesyonlar, epigenetik modifikasyonlar, kopya sayısı değişiklikleri saptanamamakta, bunun için MLPA yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. ClinVar girdilerine göre patojenik/muhtemel patojenik olarak tanımlanan varyantların hastalık oluşturma riskinin kesin olarak ortaya konulabilmesi için segregasyon analizlerinin ve fonksiyonel çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda dizilemiş olduğumuz genler, ülkemizde prostat kanserinde ilk defa bir arada çalışıldığından, hastalığın genetik patogenezinin anlaşılmasında, mutasyonların frekansları ve genotip-fenotip ilişkilerinin ortaya konulmasında yeni ve değerli bilgiler elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Adina Brett, Sony Pandey, Gail Fraizer, 2013. The Wilms' Tumor Gene (WT1) Regulates E-Cadherin Expression and Migration of Prostate Cancer Cells. *Molecular Cancer*, 12(3).
- Alvarez-Cubero, M. J., Pascual-Geler, M., Martinez-Gonzalez, L. J., Ruiz, M. E., Saiz, M., Cozar, J. M., Lorente, J. A. (2016). Association Between RNASEL, MSR1, And ELAC2 Single Nucleotide Polymorphisms And Gene Expression in Prostate Cancer Risk. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 34(10).
- Andrews S. (2010). Fastqc: A Quality Control Tool For High Throughput Sequence Data. Erişim tarihi: 22.10.2019.  
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Baykara, O., 2016. Kanser Tedavisinde Gncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 5 (3), 154-165
- Benafif S, Kote-Jarai Z, Eeles RA; 2018. PRACTICAL Consortium. A Review of Prostate Cancer Genome-Wide Association Studies (GWAS). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 27(8):845-857.
- Berndt, S., Sampson, J., Yeager, M., Jacobs, B. K., Wang, Z., Hutchinson, A., Chung, C., Orr, N., Wacholder, S., Chatterjee, N., Yu, K., Kraft P., Spencer H., Michael J., 2011. Large-Scale Fine Mapping of the HNF1B Locus and Prostate Cancer Risk. *Human Molecular Genetics*, 20(16), 3322-3329.
- Carter, B.S., Beaty, T.H., Steinberg, G.D., Childs, B., Walsh, P.C. (1992). Mendelian Inheritance of Familial Prostate Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(8), 3367–3371.
- Clinvar Veritabanı. Erişim Tarihi: 10.01.2019.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
- Cybulski, C., Wokołorczyk, D., Kluźniak, W., Jakubowska, A., Górski, B., Gronwald, J., Lubiński, J. (2012). An Inherited NBN Mutation is Associated with Poor Prognosis Prostate Cancer. *British Journal of Cancer*, 108(2), 461–468.
- Das, S., Salami, S. S., Spratt, D. E., Kaffenberger, S. D., Jacobs, M. F., & Morgan, T. M. (2019). Bringing Prostate Cancer Germline Genetics into Clinical Practice. *Journal of Urology*, 202(2), 223–230.
- dbSNP Mutasyon Veritabanı. Erişim tarihi: 11.10.2019  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

- Depristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Daly, M.J. (2011). A Framework For Variation Discovery and Genotyping Using Next-Generation DNA Sequencing Data. *Nature Genetics*, 43(5), 491–498.
- Dong, J.-T. (2006). Prevalent Mutations in Prostate Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(3), 433–447.
- Ecke TH., Schlechte HH., Schiemenz K., Sachs MD., Lenk SV., Rudolph BD., Loening SA., 2010. TP53 Gene Mutations in Prostate Cancer Progression. *Anticancer Research*, 30(5), 1579-1586.
- Eeles, RA., Kote-Jarai Z., Giles, GG., Olama, AA., Guy, M., Jugurnauth, SK., Mulholland, S., Leongamornlert, DA., Edwards, SM., Morrison, J., Field, HI., Southey, MC., Severi, G., Donovan, JL., Hamdy, FC, Dearnaley, DP., Muir, KR., Smith, C., Bagnato, M., Ardern-Jones, AT., Hall, AL., O'Brien, LT., Gehr-Swain, BN., Wilkinson, RA., Cox, A., Lewis, S., Brown, PM., Jhavar, SG., Tymrakiewicz, M., Lophatananon, A., Bryant, SL., 2008. Multiple Newly Identified Loci Associated With Prostate Cancer Susceptibility. *Nature Genetics*. 40(3), 316-321.
- Ekmekçi A, 2006. Gen Genetik Değişim ve Hastalıklar. Gazi Kitabevi. 217-218 s., ANKARA.
- Ensembl Genom Veritabanı, 2019. Erişim Tarihi: 15.05.2019. <https://www.ensembl.org/>
- Evers, B., Helleday, T., Jonkers, J. (2010). Targeting Homologous Recombination Repair Defects İn Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(8), 372–380.
- Furlow, B., Current Guidelines Miss Relevant Germline Mutations in Prostate Cancer. Erişim Tarihi: 26.07.2019. <https://www.cancernetwork.com/news/current-guidelines-miss-relevant-germline-mutations-prostate-cancer>
- Franklin-The Future of Variant Interpretation. Erişim Tarihi: 10.10.2019. <https://franklin.genoox.com>
- Fredriksson H, Ikonen T, Autio V, Matikainen MP, Helin HJ, Tammela TL, Koivisto PA, Schleutker J., (2006). Identification of germline MLH1 alterations in familial prostate cancer. *European Journal of Cancer*, 42(16):2802
- Fitzgerald, L.M., Zhao, S., Leonardson, A., Geybels, M.S., Kolb, S., Lin, D.W., Stanford, J.L. (2018). Germline Variants in IL4, MGMT And AKT1 are Associated With Prostate Cancer-Specific Mortality: An Analysis of 12,082 Prostate Cancer Cases. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 21(2), 228–237.

- Garrison, E. (2015). Vcflib. Erişim tarihi: 22.10.2019.  
<https://github.com/vcflib/vcflib>
- Garrison, E., Marth, G., 2012. Haplotype-based variant detection from short read sequencing. arXiv, 1207.3907.
- Genecards (1997). Erişim Tarihi: 10.10.2019  
<http://www.genecards.org>
- Hart, S.N., Ellingson, M.S., Schahl, K., Vedell, P.T., Carlson, R.E., Sinnwell, J. P., Kohli, M. (2016). Determining The Frequency Of Pathogenic Germline Variants From Exome Sequencing in Patients With Castrate-Resistant Prostate Cancer. *BMJ Open*, 6(4).
- Ho, C.K.M., Anwar, S., Nanda, J., & Habib, F.K. (2009). FGFR4 Gly388Arg Polymorphism And Prostate Cancer Risk in Scottish Men. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 13(1), 94–96.
- Human Genome Variation Society. Erişim tarihi: 27.05.2019  
<http://www.hgvs.org>
- Livingstone C., 2013. IGF2 and Cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 20(6), R321–R339.
- Lynch HT, Kosoko-Lasaki O, Leslie SW, Rendell M, Shaw T, Snyder C, D'Amico AV, Buxbaum S, Isaacs WB, Loeb S, Moul JW, Powell I. 2016. Screening For Familial and Hereditary Prostate Cancer. *Int J Cancer*. 138(11):2579-91.
- Johnson, A.M., Zuhlke, K.A., Plotts, C., Mcdonnell, S.K., Middha, S., Riska, S.M., Cooney, K.A. (2014). Mutational Landscape Of Candidate Genes in Familial Prostate Cancer. *The Prostate*, 74(14), 1371–1378.
- Kathleen A.C., 2017. Inherited Predisposition to Prostate Cancer: From Gene Discovery to Clinical Impact. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 128, 14–23.
- Keetch D.W., Humphrey P.A., Smith D.S., Stahl D., Catalona, 1996. Clinical and Pathological Features Of Hereditary Prostate Cancer. *The Journal of Urology*, 155(6), 1841-1843.
- King, A., Evans, M., Moore, T., Paterson, C., Sharp, D., Persad, R., Huntley, A. (2015). Prostate Cancer and Supportive Care: A Systematic Review and Qualitative Synthesis of Mens Experiences and Unmet Needs. *European Journal of Cancer Care*, 24(5), 618–634.
- Konaç, E., Sözen S. (2014). Prostat Kanserinin Tanı ve Tedavisinde Moleküler Biyolojinin Kullanım Alanları. *Üroonkoloji Bülteni*, 13:228-235.

- Kote-Jarai, Z., Jugurnauth, S., Mulholland, S., Leongamornlert, D.A., Guy, M., Edwards, S., Eeles, R. (2009). A Recurrent Truncating Germline Mutation in The BRIP1/FANCI Gene and Susceptibility to Prostate Cancer. *British Journal of Cancer*, 100(2), 426–430.
- Kuntzer, J., Eggle, D., Klostermann, S., Burtscher, H. (2010). *Human Variation Databases*. Database, 2010 Jul 17;2010:baq015.
- Leongamornlert, D., Mahmud, N., Tymrakiewicz, M., Saunders, E., Dadaev, T., Castro, E., Kote-Jarai, Z. (2012). Germline BRCA1 Mutations Increase Prostate Cancer Risk. *British Journal of Cancer*, 106(10), 1697–1701.
- Li, H., Durbin, R. (2009). Fast and Accurate Short Read Alignment With Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760.
- Li, J., Doyle, M.A., Saeed, I., Wong, S. Q., Mar, V., Goode, D. L., Tohill, R.W. (2014). *Bioinformatics Pipelines for Targeted Resequencing and Whole-Exome Sequencing of Human and Mouse Genomes: A Virtual Appliance Approach for Instant Deployment*. PLoS ONE, 9(4).
- Mamidi, T.K.K., Wu, J., Hicks, C. (2019). Interactions between Germline and Somatic Mutated Genes in Aggressive Prostate Cancer. *Prostate Cancer*, 2019, 1–11.
- Mclaren, W., Gil, L., Hunt, S.E., Riat, H.S., Ritchie, G.R.S., Thormann, A., Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17(1).
- Kral, M., Rosinska, V., Student, V., Grepl, M., Hrabec, M., Bouchal, J. Genetic Determinants Of Prostate Cancer: A Review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011 Mar;155(1):3-9.
- Mutation taster in-siliko tahmin programı. Erişim tarihi: 13.10.2019. <http://www.mutationtaster.org/>.
- National Library of Medicine, Identification of Prostate Cancer Genes. Erişim tarihi: 13.10.2019. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00342784>
- Na, R., Zheng, S., Han, M., Yu, H., Jiang, D., Shah, S., Isaacs, W. (2017). Germline Mutations In ATM And BRCA1/2 Distinguish Risk For Lethal And Indolent Prostate Cancer And Are Associated With Early Age At Death. *European Urology Supplements*, 16(3).
- NIH( National Institute of Health). Prostat kanseri ile ilişkili genler. Erişim tarihi : 10.06.2019 <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/prostate-cancer#genes>
- SIFT in-siliko tahmin programı. Erişim tarihi: 13.10.2019 <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>.

- Nicolosi, P., Ledet, E., Yang, S., Michalski, S., Freschi, B., O'Leary, E., Sartor, O. (2019). Prevalence of Germline Variants in Prostate Cancer and Implications for Current Genetic Testing Guidelines. *JAMA Oncology*, 5(4), 523.
- Pakkanen, S., Wahlfors, T., Siltanen, S., Patrikainen, M., Matikainen, M. P., Tammela, T. L. J., & Schleutker, J. (2009). PALB2 Variants In Hereditary And Unselected Finnish Prostate Cancer Cases. *Journal Of Negative Results In Biomedicine*, 15;8:12.
- Park, S. T., & Kim, J. (2016). Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *International Neurourology Journal*, 20(Suppl 2).
- Pelttari, L. M., Kiiski, J., Nurminen, R., Kallioniemi, A., Schleutker, J., Gylfe, A., Nevanlinna, H. (2012). A Finnish Founder Mutation In RAD51D Analysis: In Breast, Ovarian, Prostate, And Colorectal Cancer. *Journal of Medical Genetics*, 49(7), 429–432.
- Pencik, J., Schleder, M., Gruber, W., Unger, C., Walker, S. M., Chalaris, A., Kenner, L. Vd. (2015). STAT3 Regulated ARF Expression Suppresses Prostate Cancer Metastasis. *Nature Communications*, 22;6:7736.
- Picard      Biyoinformatik      araçları.      Erişim      tarihi:      13.09.2019.  
<http://broadinstitute.github.io/picard>.
- Potugari, B. R., Engel, J. M., & Onitilo, A. A. (2018). Metastatic Prostate Cancer in a RAD51C Mutation Carrier. *Clinical Medicine & Research*, 16(3-4), 69–72.
- Pritchard, C. C., Mateo, J., Walsh, M. F., De Sarkar, N., Abida, W., Beltran, H., Nelson, P. S. (2016). Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*, 375(5), 443–453.
- Prostate cancer - Genetics Home Reference - NIH. Erişim tarihi: 21.09.2019  
<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/prostate-cancer>.
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). Bedtools: A Flexible Suite Of Utilities For Comparing Genomic Features. *Bioinformatics*, 26(6), 841–842.
- Reid, R., Digiovanni, M., Bernhisel, R., Brown, K., Saam, J., & Lancaster, J. (2018). Inherited Germline Mutations In Men With Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 36(6\_suppl), 357–357.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, WW., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, HL., 2015. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for

the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 17(5):405-24.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467.

Schumacher FR, Al Olama AA, Berndt SI, Benlloch S, Ahmed M, Saunders EJ, Dadaev T, Leongamornlert D, Anokian E, Cieza-Borrella C, Goh C, Brook MN, Sheng X, Fachal L, Dennis J, Tyrer J, Muir K, Lophatananon A, Stevens VL, Gapstur SM, Carter BD, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM Jr, Batra J, Chambers S, Moya Broeck T, Larkin S, Townsend PA, Aukim-Hastie C, Gago-Dominguez M, Castelao JE, Henderson BE, Kote-Jarai Z, Haiman CA, Eeles RA vd., (2018). Profile Study; Australian Prostate Cancer BioResource (APCB); IMPACT Study; Canary PASS Investigators; Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3); PRACTICAL (Prostate Cancer Association Group to Investigate Cancer-Associated Alterations in the Genome) Consortium; Cancer of the Prostate in Sweden (CAPS); Prostate Cancer Genome-wide Association Study of Uncommon Susceptibility Loci (PEGASUS); Genetic Associations and Mechanisms in Oncology (GAME-ON)/Elucidating Loci Involved in Prostate Cancer Susceptibility (ELLIPSE) Consortium. *Nature Genetics*, 50(7), 928-936.

Sribudiani Y., Marwan DW., Aulanni'am A., Widodo MA., Purnomo BB., Panigoro R., Utomo AB., 2018. Germline Mutations and Polymorphisms of Androgen Receptor in Prostate Cancer Patients: Frequency and Results of in Silico Analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(8), 2241-2254.

Su GH, Hruban RH, Bansal RK, Bova GS, Tang DJ, Shekher MC, Westerman AM, Entius MM, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE, 1999. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol.* 154(6):1835-40.

Tefekli, A. H., 2012. Prostat Kanserinde Yeni Belirteçler ve Phi Skoru. *Türk Üroloji Seminerleri.* 3, 61-69.

Tycko, B., Li, C.-M., & Buttyan, R. (2007). The Wnt/Beta-Catenin Pathway in Wilms Tumors and Prostate Cancers. *Current Molecular Medicine*, 7(5), 479–489.

Varsome The Human Genomics Community. Erişim Tarihi: 10.10.2019. <https://varsome.com/>



- Xu B, Tong N, Li JM, Zhang ZD, Wu HF. (2010). ELAC2 polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis based on 18 case-control studies. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 13(3):270-7.
- Wang, F., Zhao, Q., Wang, Y.-N., Jin, Y., He, M.-M., Liu, Z.-X., & Xu, R.-H. (2019). Evaluation of POLE and POLD1 Mutations as Biomarkers for Immunotherapy Outcomes Across Multiple Cancer Types. *JAMA Oncology*, 5(10), 1504.
- Wang L., McDonnell SK., Elkins DA., Slager SL., Christensen E., Marks AF., Cunningham JM., Peterson BJ., Jacobsen SJ., Cerhan JR., Blute ML., Schaid DJ., Thibodeau SN., 2001. Role Of HPC2/ELAC2 In Hereditary Prostate Cancer. *Cancer Research*, 61(17), 6494-6497.
- Watanabe, M., Kakiuchi, H., Kato, H., Shiraishi, T., Yatani, R., Sugimura, T., Nagao, M., (1996). APC Gene Mutations in Human Prostate Cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 26(2), 77-81.
- Wilkes, D. C., Sailer, V., Xue, H., Cheng, H., Collins, C. C., Gleave, M., Rickman, D. S. (2017). A Germline FANCA Alteration That Is Associated With Increased Sensitivity To DNA Damaging Agents. *Molecular Case Studies*, 3(5).
- Yoshida K, Miki Y., 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science* 95(11):866-71.
- Yu, W., Feng, S., Dakhova, O., Creighton, C. J., Cai, Y., Wang, J., ... Ittmann, M. (2011). FGFR-4 Arg<sup>388</sup> enhances prostate cancer progression via extracellular signal-related kinase and serum response factor signaling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(13), 4355-4366.
- Yue Wang, Bo Dai ve Dingwei Ye, 2015. CHEK2 Mutation And Risk Of Prostate Cancer: A Systematic Review And Meta-Analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 28(9), 15708-15715.
- Zhang, K., Salzman, S., Reding, D., Suarez, B., Catalona, W. and Burmester, J., 2003. Genetics of Prostate Cancer. 1(1), 21-28.

1000Genome Veritabanı. Erişim tarihi: 10.01.2019

<http://www.internationalgenome.org/>

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ali Yavuz ÇAKIR

Doğum Yeri ve Yılı : Ağlasun/BURDUR, 1992

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce-B2, İtalyanca-B1, Almanca-A2

E-posta : a.yavuzcakir@gmail.com

### Eğitim Durumu

Lise : Isparta Mürşide Ermumcu Anadolu Öğretmen Lisesi, 2010

Lisans : İstanbul Bilgi Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü (İngilizce), 2017

### Mesleki Deneyim

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel  
Tıp Araştırma Enstitüsü  
Stajyer

Haziran-Ağustos 2015

SDÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bölümü  
Stajyer

Ağustos-Eylül 2016

İzmir Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi  
İllumina Miseq Eğitimi

Mayıs 2017

Genomize  
Biyoinformatik Stajyeri

Temmuz 2017

İntron Sağlık  
Biyoinformatik Uzmanı

Eylül 2017-Ocak 2019

Ferrara Üniversitesi-Stefano Volinia's Lab  
Araştırmacı

Ocak 2019-Temmuz 2019



T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı


Sayı : 72867572.050.01.04- 39477  
Konu : Etik Kurul Kararı

11-03-2019

Sayın Dr. Öğr. Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Sorumlu araştırmacı olduğunuz "Prostat Kanseri ile İlişkili Genlerin Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile İncelenmesi: Biyoinformatik Araçlar ve Veritabanları" isimli çalışmanızın kurulumuz tarafından uygun görüldüğüne ilişkin 05/03/2019 tarih ve 92 sayılı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı yazımız ekinde gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

  
Prof. Dr. Mekin SEZİK  
Başkan

Eki : Etik Kurulu Kararı (2 Sayfa)