



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEZOTELYOMALI OLGULARA ÖZGÜ GENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN TÜM GENOM ÇAPINDA SNP ARRAY
YÖNTEMİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

TUNÇ TUNCEL

**DANIŞMAN
PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ**

OCAK 2018



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEZOTELYOMALI OLGULARA ÖZGÜ GENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN TÜM GENOM ÇAPINDA SNP ARRAY
YÖNTEMİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

TUNÇ TUNCEL

**DANIŞMAN
PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ**

Bu tez çalışması ESOGÜ BAP B tipi projesi (proje no: 201311035), TUBİTAK 1002 projesi (Proje No: 115S819) projeleri tarafından desteklenmiş ve Sağlık Bakanlığı Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen "Mineral Lifleriyle Çevresel ve Mesleksel Temasın Yol Açtığı Akciğer Patolojilerinin Yönetimine Yönelik İşbirliği Ağı Projesi" kapsamında toplanan hasta verileri ve biyolojik ürünler kullanılmıştır.

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tunç TUNCEL 'in Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak hazırladığı "Mezotelyomalı Olgulara Özgü Genetik Değişikliklerin Tüm Genom Çapında SNP Array Yöntemi Kullanılarak Araştırılması" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek "KABUL" edilmiştir.

18.01.2018

Tarih

Üye : Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye : Prof. Dr. Muzaffer METİNTAŞ

Üye : Prof. Dr. Hülyam KURT

Üye : Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER

Üye : Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22./01./2018 tarih ve 1156./...5673.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

Özet

Malign Mezotelyoma (MM) genellikle plevra ve peritondan köken alan agresif ve nadir görülen bir kanserdir. MM için en önemli risk faktörü asbest maruziyetidir. Asbestin hücreye verdiği hasarı açıklayan çeşitli mekanizmalar öne sürülmüş olmasına rağmen, henüz konu hakkında genel kabul gören bilgiler oluşmamıştır. Asbest maruziyeti kimi temaslıda kansere, kimi temaslı da benign plevral veya akciğer hastalıklarına yol açmaktadır. Çalışmamızda bu durumun altında yatan genetik temeli nedeni araştırmak amacıyla MM ve Benign Asbest Plörizi' si (BAP) olan bireylerin genomlarını karşılaştırmalı olarak SNP array (Affymetrix/CytoScanHD) ve tüm genom dizileme (Illumina HiSeqX) yöntemleriyle inceledik. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Akciğer ve Plevra Kanseri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde değerlendirilen ve tanısı konan 55 MM'li hastanın plevral tümöründen ve 18 BAP'lı bireyin plevra dokusundan elde edilen DNA, tüm genom SNP array ile tarandı ve iki grup arasındaki kopya sayısı değişimleri Nexus Copy Number 7.5 programı ile analiz edilerek karşılaştırıldı. Böylece çalışmamızda MM grubuna özgü anomaliler ve frekansları belirlendi. BAP grubunda ise asbest maruziyetine karşı koruyucu etki gösterebilecek NF2 geni segmental kopya sayısı artışları bulundu. Ayrıca, MM hastalarında sarkomatoid histolojik alt tipine özgü farklı genomik anomali kalıbı belirlendi. SNP array analizi sonucu hasta grubunda gözlenen kompleks anomali kalıplarını detaylı incelemek, hastalıkla ilişkili aday nükleotid varyantları saptamak ve array verilerini doğrulamak amacıyla 3 MM'li bireyin tüm genomu dizilendi. Tüm genom dizileme yönteminde SNP array ile belirlenememiş, intra-inter kromozomal yeniden düzenlemeler, chromoanagenesis benzeri oluşumlar ve SKA3-DDX10 gen füzyonu saptanmıştır. Ayrıca aralarında MM yatkınlık geni olarak bilinen BAP1 genindeki yeni frameshift mutasyon ile diğer kanser türleriyle ilişkilendirilmiş bazı patojenik nükleotid varyantları da bulundu. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar asbestin neden olduğu malign ve benign değişikliklerin patogenezi hakkında yeni bilgiler vermektedir.

Anahtar kelimeler: Biyoinformatik, Benign Asbest Plörizisi, Genomik, Kanser Genomu, Malign Mezotelyoma, SNP array, Tüm Genom Dizileme.

Summary

Malignant Mesothelioma (MM) is an aggressive and rare cancer that usually originates from the pleura and peritoneum. The most important risk factor for MM is exposure to asbestos. Although several mechanisms have been proposed to explain the damage that asbestos gives to the cell, there is no generally accepted information about the subject yet. Asbestos exposure leads to cancer in some contacts and in some cases leads to benign pleural or other pulmonary diseases. We scanned genomes of individuals with MM and Benign Asbestos Pleurisy (BAP) by SNP array (Affymetrix / CytoScanHD) and whole genome sequencing (Illumina HiseqX) methods in order to investigate the underlying genetic basis of disease and asbestos damage to human genome. Patients who enrolled Eskişehir Osmangazi University Lung and Pleural Cancers Research Center (APKAM) included to this study and, DNAs extracted from the pleural tumors of the 55 MM patient and the pleural tissue of the 18 BAP individuals. Both MM and BAP genomes was scanned by the whole genome SNP array, and copy number profiles between these two groups analyzed with Nexus Copy Number 7.5 Program. We sequenced 3 MM genomes in order to examine the complex anomaly patterns observed in the patient group, identify candidate nucleotide variants associated with the disease, and to confirm array data. We discovered anomalies and their frequencies specific to MM group. In BAP group, We found NF2 segmental copy number gains that may be a protective effect against asbestos exposure. We found anomalies specific to Sarcomatoid MM. With help of whole genome sequencing; we discovered, intra-inter chromosomal rearrangements, chromoanagenesis-like patterns, and SKA3-DDX10 gene-fusion. Several pathogenic nucleotide variants associated with other cancer types have been found including a new frameshift mutation in the BAP1 gene. The results of our study provide new information on the pathogenesis of malignant, benign changes caused by asbestos.

Key Words: Bioinformatics, Benign Asbestos Pleurisy, Cancer Genomics, Genomics, Malignant Mesothelioma, SNP array, Whole Genome Sequencing.

İçindekiler

1-GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2-GENEL BİLGİLER	5
2.1-Tanım ve Tarihçe	5
2.2-Etiyoloji	5
2.3-Epidemiyoloji	7
2.4-Mezotelyoma	11
2.4.1-Temel Klinik Özellikler.....	11
2.4.2-Patoloji	12
2.4.3-Tanı.....	13
2.4.4-Evreleme	13
2.4.5-Tedavi	14
2.5-Asbestle Uyarılan Karsinogenez.....	17
2.5.1-MPM'de Tümör Süpressör Genlerinin İnaktivasyonu	17
2.5.2-MPM' de onkogenlerin aktivasyonu	18
2.5.3-Asbest Tarafından İndüklenen Genetik/Hücrel Hasar.....	19
2.6-Benign asbestos Plörizisi (BAP).....	22
2.7-SNP Array	22
2.8-Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)	26
3-GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1-Doku Örneklerinin Toplanması Ve DNA izolasyonu.....	28
3.1.1-Çalışma Grubu Ve Biyolojik Örneklerin Eldesi	28
3.2-YÖNTEMLER.....	29
3.2.1-Dokudan DNA İzolasyon Yöntemi	29
3.2.2-Tüm Genom SNP Array Çalışması	31
3.2.3-SNP Array Çiplerin Taranması Sonucu Elde Edilen Ham Verilerin Analizi İçin Kullanılan Programlar	43
3.2.4-Tüm Genom Dizileme Çalışması	48
4-BULGULAR.....	54
4.1-MPM ve BAP Grubunda Bulunan Genomik Anomalilerin Karşılaştırılması	54
4.1.1-MPM 'ye (Malign Gruba) Özgü Olarak Bulunan Genomik Anomali Bölgeleri ve Görülme Sıklıkları	54

4.1.2-BAP'a (Benign gruba) özgü olarak bulunan genomik anomali bölgeleri ve görülme sıklıkları	75
4.2-MPM Grubunda Histolojik Alt Tipe Özgü Genomik Anomali Kalıbının İncelenmesi	76
4.3-MPM Hastalarının SNP Array Sonuçlarında Saptanan Karmaşık Kromozomal Anomali Kalıplarının Tüm Genom Dizileme ile Doğrulanması ve Detaylı İncelenmesi ile Elde Edilen Bulgular	82
4.3.1-MPM SNP Array Verilerinden Elde Edilen Anomalilerin Tüm Genom Dizileme İle Doğrulanmasına Örnek Bulgular	83
4.3.2-MPM' de Heterozigotluk Kayıpları ile İnversiyon ve Kromozomal Parça Değişim İlişkisi	86
4.3.3-MPM' de Chromoanagenesis Benzeri Kompleks Genomik Anomali Kalıpları Gözlemlenen Kromozomların İncelenmesi, İnter- İnter Kromozomal Yeniden Düzenlemeler	88
4.3.4-MPM Genomlarında saptanan SKA3-DDX10 Füzyon geni	92
4.3.5-MPM' de Diğer Kromozomlar Arası Saptanan Parça Değişimleri	92
4.4-MPM Yatkınlığına Neden Olabilecek Aday Nükleotid Değişimleri	97
4.4.1-Nükleotid Varyantlarını Belirlenmesi	97
4.5-MPM' de Sık Heterozigotluk Kaybı (Loss of Heterozygosity) Gözlenen bölgeler	101
4.5.1-Bazı MPM Hastalarında Gözlenen Büyük LOH Bölgeleri	102
5-TARTIŞMA	104
5.1-MPM' de Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri	106
5.1.1-Genomik Kayıplar	106
5.1.2-Genomik Kazanımlar	111
5.1.3-MPM 'de Genomik Anomalilerden Etkilenen Genlerin Görev Yaptıkları Yolaklar ve Biyolojik İşlevleri	112
5.2-MPM Genomlarında Rastlanan Gen Füzyonları	118
5.3-MPM' de Genomik Anomali ve Histolojik Alt Tip Arasındaki İlişki	119
5.4-MPM Genomlarında Gözlenen Kompleks Anomali Kalıbı ve Chromoanagenesis Benzeri Anomaliler	121
5.5-MPM ilişkili olabilecek Aday Nükleotid Varyasyonları	122
5.6-MPM' de Sık Gözlenen LOH (Loss Of Heterozygosity) Bölgeleri	124
6-SONUÇ VE ÖNERİLER	126
7-KAYNAKLAR DİZİNİ	129

Tablo Dizini

Tablo 2.1: Endüstriyel toplumlardaki Mezotelyoma insidansları (B. M. Robinson, 2012).	8
Tablo 2.2: Türkiye’de mezotelyoma epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar.	9
Tablo 3.1: Çalışma grubumuzdaki Malign ve Benign Gruplara özgü bazı özellikler	28
Tablo 3.2: Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerden rastgele seçilen örneklerin NanoDrop Ölçüm değerleri.	31
Tablo 3.3: Affymetrix CytoScan Hd çipleri içerisindeki markerlar ve dağılımları.	32
Tablo 3.4: Hasta örneklerine ait (MPM kodlu) PCR ürünlerinin pürifikasyon sonrası saflık ve konsantrasyon ölçümlerine göre uygun miktar ve kalitede olanlara örnek değerler..	38
Tablo 3.5: Kullanılan örneklerin Nanodrop Sonuçları	49
Tablo 3.6 : Qubit Ölçüm Sonuçları	49
Tablo 4.1: Genomik anomalilerden etkilenen genlerin görev yaptıkları moleküler yollara göre dağılımları.....	70
Tablo 4.2: Genomik anomalilerden etkilenen genlerin görev yaptıkları biyolojik işlevlere göre dağılımları.....	73
Tablo 4.3: Hasta 1 de Kromozomlar arası parça değişimlerinin olduğu genomik koordinatlar ve etkiledikleri gen bölgeleri.....	93
Tablo 4.4: Hasta 2 de Kromozomlar arası parça değişimlerinin olduğu genomik koordinatlar ve etkiledikleri gen bölgeleri.....	94
Tablo 4.5: Hasta 3 de Kromozomlar arası parça değişimlerinin olduğu genomik koordinatlar ve etkiledikleri gen bölgeleri.....	96
Tablo 4.6: Tüm genom dizileme sayesinde saptanan hastalık ilişkili aday nadir nükleotid varyantları	98
Tablo 4.7: Polimorfizm düzeyindeki hastalık ilişkili olabilecek nükleotid varyantları	100
Tablo 4.8: MPM grubundan sık gözlenen LOH bölgeleri ve gözlenme sıklıkları.	101

Şekil Dizini

Şekil 2.1: SNP array deney akış basamakları. (D. Nowak et al., 2009)	23
Şekil 2.2: SNP array sonucu elde edilmiş 9. Kromozomu etkileyen örnek delesyon görüntüleri. Sırasıyla hemizigot (1 kopya delesyon 1 kopya normal), homozigot delesyonlar (2 kopya delesyon) normal kopya sayısı olan 2' nin altında sinyallerin alınması sayesinde tespit edilmiştir. (D. Nowak et al., 2009)	24
Şekil 2.3: SNP array sonucu elde edilmiş 8. Kromozomu etkileyen örnek amplifikasyon görüntüleri. Problardan alınan sinyal normal kopya sayısı olan 2 nin üstünde 3 olarak saptanmıştır. (D. Nowak et al., 2009)	24
Şekil 2.4: DNA kopya sayıları için olası tüm allelik içerikler 1 kopyadan 5 kopyaya kadar numaralandırılmıştır (Popova et al., 2013).	25
Şekil 3.1: İzole edilen DNA'ların jel elektroforezi ile degradasyon kontrollerinin yapılması.....	30
Şekil 3.2: PCR Sonrası Ürünlerinin Büyüklüklerinin Belirlenmesi amacıyla elde edilen Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri.	36
Şekil 3.3: Fragmentasyon Sonrası Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntüleme (FRAG) .	40
Şekil 3.4: Chas 3.1 programında bir hastaya ait CYPCHP dosyasının analizi sonucunda elde edilen genomik anomalilerin tüm genom boyunca görüntülenmesi. (moleküler karyotip)	43
Şekil 3.5: Bir hastaya ait 1. Kromozomdaki bazı genomik anomaliler. Chas 3.1 detaylı analiz kısmında kromozomal bölgelere denk gelen delesyonlar (kırmızı), amplifikasyonlar (mavi), heterozigozite kayıpları (mor) 1. Panelde gözlenmektedir. 2. Panelde ise ilgili kromozomal bölgedeki genler gözlenmektedir (Cancer genes ve ISCA konstitüsyonel genler). Bu sayede saptanan genomik anomalinin hangi genin yapısını etkilediği anlaşılabilir. 3. Panelde ise daha önceki çalışmalardan elde edilmiş kopya sayısı varyasyonları (DGV-DataBase of Genomic Variants) verilmiştir. Bu sayede kendi çalışmamızdan elde ettiğimiz veriyi kolayca literatürle karşılaştırma şansımız olmaktadır. 4. Panelde ise OMIM (Online Inheritance of Man) fenotip Loci bilgisi yer almaktadır. Burada OMIM database i kullanılarak ilgili kromozomal bölgenin hangi hastalık fenotipi ile ilişkilendirildiği bilgisine ulaşabilmekteyiz.....	44
Şekil 3.6: Nexus 7.5 programında CEL dosyalarının analiz ayarları.	45
Şekil 3.7: Nexus Copy Number Discover Edition 7,5 sayesinde elde edilen ve ileride değerlendirmeleri nasıl yaptığımızı açıklamak amacıyla konulan 9. Kromozom küçük kolunun analiz görüntüsü. 1 numaralı panelde Malign Plevral Mezotelyoma grubuna ait (Malign Grup), 2 numaralı panelde ise Benign Asbest Plörizisi grubuna (Benign Grup) ait anomalilerin çeşitleri pozisyonlarına göre gözlenme sıklıkları ile gösterilmiştir. Kromozomal bölgelere göre saptanan anomali sıklığı ve farklılığı, paneller karşılaştırıldığında rahatça gözlenmektedir. Bu örnekte Malign grupta 9p21. Bölgesinde yoğunlaşan delesyonlar gözlenmekte iken Benign grupta aynı bölgede herhangi bir anomali gözlenmemiştir. İki grup arasında istatistiki anlamda farklı anomali sıklığı olan bölgeler "Significant" kısmında anomali tipine (Amplifikasyon mavi, delesyon kırmızı) göre işaretlenmiştir (ör: kırmızı ok işaretinin gösterdiği bölge) . ($p < 0,01$, anomali farklılık eşliği en az %30)	46
Şekil 3.8: 9. Kromozomun kısa kolunda bulunan genomik anomalilerin, Sarkomatoid ve diğer tümör alt tiplerinde görülme sıklıkları ve çeşitleri. Birinci panelde 3 adet sarkomatoid tip MPM hastasının 9. Kromozomunun kısa kolundaki anomalilerin yoğunlaştığı bölgeler ve sıklıkları gözlenmekte, 2 numaralı panelde ise aynı bölgenin diğer histolojik tipli (epiteloid, mixed, bilinmeyen) MPM hastalarındaki genomik anomali sıklıkları görülmektedir. İki grup arasında istatistiki anlamda farklı anomali sıklığı olan bölgeler "Significant" kısmında anomali tipine (Amplifikasyon mavi, delesyon kırmızı) göre işaretlenmiştir (ör: ok işaretinin gösterdiği bölge). ($p < 0,01$, anomali farklılık eşliği en az %30)	47
Şekil 3.9: Pantherdb analizi ekran görüntüsü (http://pantherdb.org/).	48

Şekil 4.1: Çalışmamızda saptanan genomik anomalilerden etkiledikleri genlerin görev yaptıkları moleküler yolaklar. Bu yolaklar içerdikleri gen sayılarına göre Tablo 4.1 'de sırasıyla verilmiştir.....	69
Şekil 4.2: Çalışmamızda bulunan genomik anomalilerden elde edilen genlerin biyolojik işlevlerine göre dağılımları. Bu biyolojik işlevler içerdikleri gen sayılarına göre Tablo 4.2 ' de sırasıyla verilmiştir.....	73
Şekil 4.3: Binding (Bağlanma) işlevlerinde görev yapan genlerin özel görevleri ve sayıları.....	74
Şekil 4.4: Protein bağlanması işlevi daha detaylandırıldığında reseptör bağlanma işlevinde gen sayıları en yüksek olarak bulunmuştur.	74
Şekil 4.5: Reseptör bağlanma aktivitesi daha detaylandırıldığında Sitokin aktivitesi ile ilgili genlerin en fazla sayıda olduğunu görmekteyiz.	75
Şekil 4.6: Tüm Genom dizileme yöntemi ile elde edilmiş, Mezotelyomalı hastaya ait 3. Kromozom görüntüsü. Görüntüde 3p22.1-14.3 bölgesini kapsayan bir delesyon (kırmızı okla gösterilmekte) ve geri kalan tüm kromozom bölgesinde 3 kopya sayısı şeklindeki amplifikasyonlar gözlenmektedir.....	83
Şekil 4.7: Şekil 4.6' daki hastanın yine 3. Kromozomunun SNP array görüntüsü. Bu yöntemle de saptanan kopya sayısı değişimleri aynı miktarda ve aynı kromozomal pozisyonlarda bulunmuştur. Çalışmamıza dahil edilen üç bireyde saptanan majör kromozomal anomaliler (delesyon ve amplifikasyonlar) hepsi bu örnekte verildiği gibi tüm genom sekanslama yöntemiyle de doğrulanmıştır.	83
Şekil 4.8: Şekil 4.6 ve Şekil 4.7' de verilen aynı kromozom anomalilerin tüm genom dizileme sayesinde elde edilen ve kromozom boyu kopya sayısı kazanım (kırmızı noktalar) ve kaybını (mavi noktalar) gösteren MANTA uygulaması analiz sonucu. Yeşil noktalar normal kopya sayısı olan 2 yi göstermektedir.....	84
Şekil 4.9: Bir MPM hastasının 6. Kromozomuna ait kopya sayısı değişimlerini gösteren SNP array görüntüsü.....	84
Şekil 4.10: Şekil 4.9' daki kromozom anomalisinin tüm genom dizileme sonucu elde edilen sonucu. SNP array verisinde olduğu gibi kromozomu etkileyen 3 ve 1 kopya sayıları tüm genom dizileme sonucunda da aynı şekilde saptanmıştır.	85
Şekil 4.11: Şekil 4.9 ve Şekil 4.10' da verilen aynı kromozom anomalilerin tüm genom dizileme sayesinde elde edilen ve kromozom boyu kopya sayısı kazanım (kırmızı noktalar) ve kaybını (mavi noktalar) gösteren MANTA uygulaması analiz sonucu. Yeşil noktalar normal kopya sayısı olan 2'yi göstermektedir.....	85
Şekil 4.12: SNP array verisinden elde edilen 8. Kromozom görüntüsü. Kırmızı okla gösterilen mor dikdörtgen Heterozigotluk kaybı denk gelen bölge olarak SNP array bulgusunda tanımlanmıştır. SNP array verisinde bu bölge normal kopya (2) sayısında gözlenmekle beraber bu bölgede heterozigotluk kaybına neden olacak delesyon veya amplifikasyon saptanmamıştır (kopya sayısı=2 olması nedeniyle, kopya nötr heterozigotluk kaybı). Tüm genom dizileme sayesinde kaynağını önceden çözemediğimiz heterozigotluk kaybına bir inversiyonun neden olduğu bilgisine ulaşmış olduk (Bak Şekil 4.13). İki yöntemde de Kromozomun geri kalan diğer bölgelerinde 3 kopya artışı olarak gözlemlenmektedir.	86
Şekil 4.13: Şekil 4.12 'deki bireyin 8. kromozomuna ait tüm genom dizileme görüntüsü. SNP array verisinde heterozigotluk kaybı olarak tanımlanan bölgenin MANTA analizi sonucu aslında tamamen invert olduğu saptanmıştır ve bu büyük heterozigotluk kaybı bölgesinin nedeninin bu inversiyon olduğu anlaşılmıştır.	86
Şekil 4.14: Bir hastanın tüm genom dizileme tekniğiyle elde edilmiş 14. Kromozom görüntüsü. Kromozomun boyunca gözlenen kopya sayısı artışlarıyla beraber SNP array verilerinde gözlenmeyen 53,782,629 baz çifti büyüklüğünde büyük bir inversiyon saptanmıştır.	87
Şekil 4.15: Şekil 4.14'deki bireyin 14. Kromozomunun SNP array analiz görüntüsü. Tüm genom dizileme verisiyle de uzlaşır şekilde SNP arrayde de kromozom boyunca kopya	

sayısı değişimleri gözlenmektedir. 14q22.3- 14q32.2 bölgelerin tüm genom dizi analizi sayesinde büyük bir inversiyon saptanmıştır.	87
Şekil 4.16: SNP array verisinde saptanan 17,043 kbp büyüklüğündeki heterozigotluk kaybı. Bu boyuttaki bir heterozigotluk kaybının nedeni SNP array verisinde saptanamamıştır. Bu kayba neden olabilecek genomik anomaliler tüm genom dizileme ile Şekil 30'da gösterilmektedir.....	88
Şekil 4.17: Şekil 4.16'daki kromozoma ait tüm genom dizileme görüntüsü. Bu heterozigotluk kaybının nedeninin bölgeye denk gelen delesyonların yanında kromozom 5 ile parça değişiminin neden olabileceğini göstermektedir. Mor okla gösterilen bölgede kırık noktaları gösterilmektedir. Benzer anomaliler aynı hastanın 8-17 ve 6-20 kromozomları arasında da gözlenmiştir.....	88
Şekil 4.18: SNP array verimizden elde edilen 2. Kromozoma ait aday Chromothripsis olayı. Özellikle q koluna lokalize kopya sayısı salınımları ve Heterozigotluk geri kazanımları ile karakterize Chromothripsis kalıbı.....	89
Şekil 4.19: Şekil 4.18'deki kromozomun tüm genom dizileme yöntemiyle elde edilen görüntüsü. Chromothripsis'e neden olan kırık noktaları (delesyonlar) orta paneldeki mavi çizgilerle gösterilmiştir. Tüm genom dizileme sayesinde Chromothripsis'ten etkilenmiş bu kromozomunda ayrıca diğer farklı 3 kromozomla da parça değişimi gerçekleştiği gözlemlenmektedir.	89
Şekil 4.20: Bir hastanın 10. Kromozomuna ait SNP array görüntüsü. Görüldüğü üzere artmış kromozom, artmış kopya sayısı (2 ve 3) ve kopya sayısı salınımlarıyla Chromoanasyntesis özelliği göstermektedir.	90
Şekil 4.21 Şekil 4.20 'deki aynı hastanın tüm genom sekanslamasından elde edilen 10.kromozom görüntüsü. SNP arrayde de saptanan artmış kopya sayılarının yanında kromozom içerisinde iki farklı kromozom arasında gerçekleşen parça değişimleri. Görüldüğü gibi tüm genom sekanslama bu yapıya ek olarak iki farklı kromozom arasında parça değişiminin de olduğunu göstermiştir.	90
Şekil 4.22: Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de görülen 10. Kromozomun tüm genom sekanslama sayesinde elde edilmiş kopya sayısı değişimlerini görülmektedir. Artmış 3 kopya sayıları (kırmızı noktalar), 2 kopya sayısı (yeşil noktalarla ifade edilmiştir) görülmektedir. Bu anomali kalıbı ile Chromoanasyntesis kriterlerine uygunluk göstermektedir. Bu durum akıllara kromozomların sadece münferit anomali kalıpları ve tanımlardan değil daha karmaşık bir yapı sonucu etkilendiklerini göstermektedir.	91
Şekil 4.23: SKA3-DDX10 füzyon görüntüsü. Manta analizi sonucu Kromozom 13'te bulunan SKA3 geninin (A) DDX10 geninin 10 ve 11. İntronları arasına (B) entegre olduğu gözlemlenmektedir.	92
Şekil 4.24: 7. Kromozomun çeşitli bölgelerini etkileyen büyük LOH bölgeleri.	102
Şekil 4.25: 2. Kromozom çeşitli bölgelerini etkileyen büyük LOH bölgeleri.	102
Şekil 4.26: 3. kromozomun çeşitli bölgelerini etkileyen büyük LOH bölgeleri.	103

Simge ve Kısaltmalar Dizini

μ l : Mikro Litre

BAP: Benign Asbest Plörizisi

BAP1: BRCA Associated Protein 1

CNV: Copy Number Variation

IMRT: Intensity modulated radiotherapy

LOH: Loss of Heterozygosity.

Mg: Mili gram

MM : Malign Mezotelyoma

MPM: Malign Plevral Mezotelyoma

NF2: Neurofibromatosis type II

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

SNP: Single Nükleotide Polimorphism

SV40 : Simian Virüs 40

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

IMIG: International Mesothelioma Interest Group

EPP: Extra Plevral Pnöminektomi

FDA: Food and Drug Administarion

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Malign Mezotelyoma (MM) birincil olarak plevra ve periton mezotel hücrelerin serözal yüzeylerinden köken alan agresif bir neoplasm türüdür (B. W. Robinson & Lake, 2005) (Tsao, Wistuba, Roth, & Kindler, 2009) (Sekido, 2013). MM, daha nadir olarak perikard veya tunika vajinalisin serözal yüzeylerinden de köken alabilmektedir (Panou et al., 2015), (Sekido, 2013) . MM olgularının yaklaşık %80 kadarı plevral kökenlidir ve Malign Plevral Mezotelyoma (MPM) olarak adlandırılmaktadırlar. MM `nın erken teşhisi için etkili radyolojik teşhis yöntemlerinin ve yeterli serum biyobelirteçlerinin olmaması nedeniyle geç evrelerde saptanabilen, sinsi ilerleyiş gösteren bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Sekido, 2013). MM'nin geliştiği vücut boşluklarının anatomik bölgeleri ve karakteristikleri yüzünden, malign hücreler hem kolay dağılmakta hem de dağıldığı bölgeye yerleşebilmektedir. MM, patolojik olarak epiteloid, bifazik ve sarkomatoid olmak üzere üç ana histolojik alt tipten oluşmaktadır (Husain et al., 2009). Bu alttiplere ek olarak MM `nin bazı nadir histolojik varyantları da bulunmaktadır (Sekido, 2013). MM'da genel olarak konvansiyonel tedaviye cevap alınamamasının yanında prognoz da kötü seyretmektedir (Sekido, 2013). Hastaların teşhisini takiben mediyon sağkalımları, cisplatin ve pemetrexed kombinasyonlu yeni tedavi yaklaşımlarına rağmen 9-12 ay arasında değişmektedir (Vogelzang et al., 2003). Bazı yeni moleküler hedefli ilaçların, hastalığın kısıtlı stabilizasyonunu sağladığı gözlemlenmiştir fakat şuanda bu ilaçların hiçbiri standart tedavi olarak önerilmemektedir (Jakobsen & Sørensen, 2011), (Sekido, 2013).

MM için tanımlanan majör risk faktörleri asbest ve yine bir mineral fiber olan erionit maruziyetidir. Asbestin yanında, nadir de olsa diğer mineral fiberlerine ve tıbbi amaçlı x-ray maruziyetinin de hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Field & Withers, 2012). Bunlara ek olarak, bazı çalışmalar Simian Virus 40 (SV40) kontaminasyonunun kofaktör olarak MM gelişiminde rol oynayabileceğini öne sürmektedir. (Kroczyńska et al., 2006; Middendorf et al., 2011).

MM vakalarının % 80'den fazlasının Asbest maruziyeti nedeniyle olduğu bilinmekle beraber, ne kadar uzun süre asbeste maruz kalınmışsa hastalık riskinin de o kadar arttığı öne sürülmüştür (B. M. Robinson, 2012). Solunum yoluyla vücuda alınan ve akciğer, plevrada biriken asbest fiberlerinin, direk mekanik yolla, biyokimyasal yollarla veya akut immaflammatuar cevapla karsinogenik etki gösterdiği düşünülmektedir. Asbest maruziyeti sebepli akut inflammasyonun kronik oksidatif stresi indüklemesinin yanında, genotoksik lezyonlara, kromozomal aberasyonlara, epigenetik değişimlere neden olduğu düşünülmektedir (Mossman et al., 2011), (Achilli et al., 2007). Ayrıca asbest fiberleri, kromozomlarla fiziksel etkileşime girerek kromozom ayrılmasına ve mitozu direk olarak müdahale edebilmek mitotik hatalara neden olabileceği bildirilmiştir (B. W. Robinson & Lake, 2005).

Asbest maruziyeti, mesleksel temas (endüstri nedenli temas) ve çevresel temas olmak üzere iki temel kategoride incelenmektedir. Mesleksel temas asbest maruziyetlerinin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır (Eurasian). Asbest, birçok batı ülkesinde yasaklanmış olmasına rağmen hala dünyanın belirli bölgelerinde kullanılmaktadır. Bunun yanında bazı gelişmekte olan ülkelerde asbestin endüstriyel kullanımı, üretimi ve ithalatı artan bir hızda yapılmaktadır (Azari et al., 2010; Below, Cox, Fukagawa, Hirvonen, & Testa, 2011), (Brims, 2009). İlk asbest maruziyeti ve MPM teşhisi arasındaki uzun median latensi süresi (bekleme süresi) bulunmaktadır. (Montanaro et al., 2009) (Marinaccio et al., 2007). Bu bilgiyle bağlantılı olarak, MPM insidansının, Batı ülkelerinde 2020 civarıyla pik yapması beklenmektedir (Peto, Decarli, La Vecchia, Levi, & Negri, 1999), (Ismail-Khan et al., 2006), (Pelucchi et al., 2004). Ülkemizde ise yapılan bazı yerel çalışmalar dışında insidans hakkında net bir bilgi henüz verilememektedir. İlk asbest ithalatının yapıldığı 1983 yılından asbest kullanımının yasaklandığı 2010 yılları arasında ülkemize ciddi miktarda asbest girişi yapılmıştır. Yaklaşık 500000 ton asbestin kullanıldığı ürünlerle çalışanların önümüzdeki 30-40 yıl boyunca temaslarının devam edileceği de düşünülmektedir (Komisyonu), (Eurasian). Bu durumda halen çok büyük miktar endüstriyel asbest varlığından söz edilebilir. Ayrıca kayıt dışı asbest kullanımında olduğu düşünülürse önümüzdeki yıllar içerisinde Mezotelyoma açısından ülkemizde büyük bir sorunla karşı karşıya olduğumuz söylenebilir (Eurasian). Ülkemiz coğrafyasında asbestin doğal olarak bulunduğu ve temasının yoğun olduğu iller Sivas, Eskişehir, Kütahya, Bilecik, Yozgat, Diyarbakır'dır (Isik et al., 2001), (Şenyiğit et al., 2000). Bunun yanında Nevşehir-Ürgüp civarındaki köylerde (Karain, Tuzköy, Sarıhıdır) ve buralarda yaşayan köylülerde Erionit ile yoğun temas tespit edilmiştir. Bu köylerde yaşayan insanlar Erionit barındıran kayaları evlerinde yalıtım malzemesi olarak kullanmışlar ve ömürlerinin büyük bir bölümünde erionite maruz kalmışlardır (Y. İ. Baris, 1987), (Eurasian), (M. Metintas, Hillerdal, Metintas, & Dumortier, 2010) (Y. Baris et al., 1978). 1987 yılında bu köylerde tahmin edilen MPM insidansı 100000 ' de 996 olarak bulunmuş ve ölümlerin % 50 den fazlasının MPM nedeni ile olduğu kayıtlara geçmiştir (B. Barış et al., 1995). Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmaya ise tanıları biyopsi örnekleri ile alınmış 506 vaka dahil edilmiştir. Bunlardan 464'ü plevral, 2'si ise peritoneal olarak bildirilmiş, kadın/erkek oranı 0,7 (213-293), yaş ortalaması kadınlarda 55.5, erkeklerde ise 55.8 olarak saptanmıştır. Asbest veya erionit mesleksel teması olmayan vakaların % 6'sı Karain, Tuzköy, Sarıhıdır köylerinden olduğu saptanmıştır (Arslan). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda ülkemizde gerek mesleki gerekse de çevresel asbest ve erionite teması riskinin yüksek olması nedeniyle MM, ciddi bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna karşılık, ağır asbest maruziyetinin olduğu bireylerin sadece %5-%17 arasında değişen oranlarda Mezotelyoma geliştirdikleri rapor edilmiştir (Neri et al., 2008). Bu durumda, hastalık etiolojisinde genetik bir etmenin etkili

olabileceği düşünölmüş ve bu görüő, hastalığın bazı aile bireylerinde birikim göstermesiyle (Neri et al., 2008), (Ascoli et al., 2007; Ugolini et al., 2008) (de Klerk et al., 2013) ve bazı aday-gen ilişkilendirme çalışmalarıyla desteklenmiştir (M Betti et al., 2011; Neri et al., 2008). Örneğin BAP1 (BRCA1-associated protein 1) genindeki mutasyonların Mezotelyoma, Melanoma ve diğer bazı kanser türlerine de neden olabilecek yeni kanser yatkınlık sendromunu ortaya çıkardığı öne sürölmüştür (J. R. Testa et al., 2011). MM yatkınlığına neden olabilecek BAP1 gibi birçok gen mutasyonuna ek olarak Mezotelyoma tümör DNA 'larında daha büyük kromozomal bölgeleri etkileyen anomaliler de bulunmuştur. Bu anomalileri saptama amaçlı birçok sitogenetik çalışma yapılmış olup, özetle 1p, 3p, 6q, 9p, 17p ve 22q gibi bölgeleri etkileyen kopya sayısı değişimleri sık rastlanan anomaliler olarak literatürde yer almıştır (Murthy & Testa, 1999; Pass, Vogelzang, & Carbone, 2006), (Taguchi, Jhanwar, Siegfried, Keller, & Testa, 1993), (J. Testa, Pass, & Carbone, 2001). Sık rastlanan kromozomal anomali bölgelerine rağmen diğer kanser genomlarında da göröldüğü gibi Mezotelyomada da anomali kalıpları heterojenite göstermekte ve hastadan hastaya farklı kalıplara rastlanılmaktadır.

MM' nin nadir rastlanan bir malignensi olmasından dolayı, hastalığın altında yatan moleküler patogenezi bilgisinin (özellikle genetik) diğer sık rastlanan kanser türlerinden elde edilen bilgilere göre geri kaldığı söylenebilir (Sekido, 2013). Bu bilgi azlığından dolayı, MM, genellikle erken dönemde teşhis edilememekle beraber etkin tedavi seçeneklerine de sahip değildir. Sonuç olarak hastalar kısa zamanda kaybedilmektedir. Bu durum araştırmacıları Mezotelyomaya özgü, yeni tanı ve tedavi seçeneklerinin önünü açacak moleküler biyolojik ve genetik belirteçlerin saptanmasına itmektedir. Bu sayede hem asbeste maruz kalmış ve Mezotelyomaya yakalanma riski taşıyan bireyler önceden saptanabilecek, hem de patojenin de aydınlatılmasıyla daha etkin tedaviler geliştirilebilecektir. Bu amacı gerçekleştirmek için öncelikle karmaşık MM kanser genomunun yapısının anlaşılması, etkilenen gen bölgeleri ile bu genlerin görev aldıkları moleküler yolların ortaya çıkarılması gerekmektedir. Ayrıca elde edilen genomik verilerin MM için birincil risk faktörü olan asbest maruziyeti ile olan ilişkisi de incelenmelidir. Sonuç olarak bu kapsamlı inceleme ve araştırma sonucu MM'nin zayıf yönleri anlaşılacağı gibi, tedavi, takip açısından da önemli avantajlar elde edilebilecektir.

Bu güne kadar MM için, hem genetik hem de seruma ait çeşitli belirteçler öne sürölmüş olmasına rağmen, söz konusu belirteçlerin özgüllükleri ve duyarlılıkları hasta kohortlarında farklılık göstermektedir. Konuya genetik açıdan bakıldığında, en büyük sorun olarak kanser genomunun karmaşıklığı ve içerdiği heterojenite karşımıza çıkmaktadır. Aynı kanser tipine yakalanmış hastalarda bile genomik anomali kalıpları önemli oranda değişiklik göstermektedir. Son yıllarda kullanılan genomik teknolojilerin ilerlemesi ve bu teknolojilerden elde edilen verilerin etkin biyoinformatik yaklaşımlarla

yorumlanması sayesinde, MM patojenezi hakkında önemli ipuçları elde edilmektedir. Bununla beraber halen yanıtlanamamış birçok soru işareti bulunmaktadır. Özellikle asbest maruziyeti sonucu gelişen Malign (örneğin MM) ve benign hastalıklarda genomun nasıl hasar gördüğü veya hücreyi malign dönüşümden koruyan genetik faktörlerin olup olmadığı henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu sorunun yanıtını aramak amacıyla bu çalışmamızda asbest maruziyeti sonucu MPM'ye yakalanmış hasta bireylerin plevral tümör dokularından elde edilen DNA'lar ile, asbest maruziyeti sonucu Benign Hastalıklara yakalanmış ve malign bir hastalık gözlenmemiş Benign Plevral Plörizili (BAP) bireylerin plevral dokularından elde edilen DNA'lar tüm genom çapında SNP array yöntemi kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelendi. Bu çalışma esnasında, özellikle MPM'li hastalarda saptanan karmaşık anomali kalıplarını hem nükleotid düzeyinde detaylı incelemek hem de elde edilen SNP array verilerinin doğrulamasını sağlamak için TÜBİTAK 1002 projesi de gerçekleştirildi. Bu proje kapsamında hasta grubundan seçilen üç bireyde tüm genom dizilemesi gerçekleştirildi.

2-GENEL BİLGİLER

2.1-Tanım ve Tarihçe

Malign Mezotelyoma (MM) plevra, periton, perikard ve çok nadir olarak ta tunica vajinalisin mezotel örtüsünden köken alan agresif bir tümör çeşididir (B. M. Robinson, 2012). Bunlar içinden, Malign Plevral Mezotelyoma (MPM), tüm Mezotelyoma olgularının yaklaşık %80' nini oluşturmaktadır (Leigh, Davidson, Hendrie, & Berry, 2002),(Price & Ware, 2009). MM, patolojik olarak epiteloid, bifazik ve sarkomatoid olmak üzere üç ana histolojik alt tipten oluşmaktadır (Husain et al., 2009). Hastalarda, genellikle, nefes darlığı, göğüs duvarı ağrısı ve plevral efüzyon gibi şikâyetler görülmektedir (Committee, 2007). Hastalığın teşhisi genellikle ilerlemiş evrelerde yapılabilmekte ve tedavi görmeyen hastaların ortalama hayatta kalımları bir yıldan az olmaktadır (Milano & Zhang, 2010), (B. M. Robinson, 2012).

2.2-Etiyoloji

Asbest ve Mezotelyoma arasındaki ilişki çok iyi tanımlanmış olup etiyolojik fraksiyonu %80' nin üzerindedir (J. McDonald & McDonald, 1996). Asbest üretiminin ve ekonomik kullanımından önceki zamanlara bakıldığında gerçekten de hastalığın çok daha nadir gözleendiği bildirilmiştir (Strauchen, 2011), (Mark & Yokoi, 1991). Asbest ve Mezotelyoma arasındaki bağlantı ilk olarak 1960 yılında Wagner ve arkadaşları tarafından (Wagner, Sleggs, & Marchand, 1960), Güney Afrika, Western Cape'te crocidolite asbeste maruz kalan 33 bireyde gösterilmiştir. Bu bilginin doğrulanması, 1965-75 arası yapılan 8 vaka kontrol çalışmasında gerçekleştirilmiş, maruziyet ve relatif risk oranları 2.3 ve 7.0 olarak bildirilmiştir (J. C. McDonald, 2010). Yine McDonald 43 kohort çalışmasını özetleyerek, asbest maruziyeti ile orantısız ölüm oranlarının 2,5 ile 102,3 arasında değiştiğini gösteren bir çalışma yayınlamıştır (C. McDonald, 2008).

Asbest, Serpentin ve Amfibiole olmak üzere iki ana form olarak tanımlanmaktadır. Tek Serpentin tipi "Chrysolit" (Beyaz Asbest) olarak adlandırılmaktadır. Bu asbest endüstride kullanılan asbestin yaklaşık %95'nin oluşturmaktadır (Virta, 2006),(B. M. Robinson, 2012). Amfibiol grubu ise Amosit, Crocidolit, Tremolit ve Anthophylit 'ten oluşmaktadır (Cancer, 2012). Bu grup daha düz, iğne şeklinde, kolay dağılır ve ufalanabilir özellikleriyle chrysolit'ten ayrılmaktadırlar. Amfibiolardan, Amosit (kahverengi asbest) ve Crocidolite (mavi asbest) endüstriyel ölçekte en fazla kullanılan asbest çeşitleridir. Ana asbest fiberleri arasından özellikle Chrysolit'in kansere neden olup olmadığı hala tartışmalıdır. Hodgson ve Darnton, 17 kohort üzerinde ortalama kümülatif (biriken) maruziyet üzerinde çalışmışlar ve sırasıyla Chrysolit, Amosit ve Crocidolit risk oranlarını 1:100:500 olarak

saptamışlardır (J. T. Hodgson & Darnton, 2000). Bazı görüşlerde Chrysolit' in aslında bir karsinojen olmadığı ve Chrysolit maruziyeti gözlenen olgularda onkojenezin, aslı nedeninin Amfibiol (Tremolit) kontaminasyonu sonucu olduğunu öne sürülmektedir (Britton, 2002). Epidemiyolojik literatür gözden geçirildiğinde, Chrysolit'in malign potansiyeli hakkında tartışmalı sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Kanarek, 2011), (Yarborough, 2006). Aynı zamanda hastaların akciğerlerinde biriken fiberler ilgili çalışmalarda hem Amfibiolün hem de tek başına Chrysolit fiberlerinin yüksek olasılık oranına (odds ratio) sahip risk oluşturduğuna dair bulgular da mevcuttur (J. C. McDonald, 2010). Elde edilen kanıtlara dayanarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) her tip asbestin insanlarda kansere neden olduğu kararını almıştır (Organization, 2009). Mezotelyomada asbeste ilk maruziyet ile teşhis zamanı arasındaki süre uzundur. Güney Gallerdeki ve Avusturalyadaki araştırmacılar 1972-2004 arası teşhis edilmiş cinsiyetten bağımsız olgularda ortalama latensi süresini 42,8 yıl olarak hesaplamışlardır. Buna ek olarak peritoneal Mezotelyomanın anlamlı olarak plevral Mezotelyomadan daha kısa bir latensi süresine sahip olduğunu bildirmişlerdir (Hyland, Ware, Johnson, & Yates, 2007; B. M. Robinson, 2012). İtalya'da yapılan ikinci bir çalışmada ise 1993-2001 arası incelenen 2,554 olguda ortalama latensi süresi 44,6 yıl olarak bulunmuş ve dikkat çekici bir bulgu olarak ta mesleki maruziyeti olan vakalarda daha kısa bir latensi süresi olduğunu rapor edilmiştir (Marinaccio et al., 2007). Latensi süresi ile asbest maruziyeti süresi veya maruziyet derecesi ile ters bir orantı olduğu belirlen bazı kanıtlar bulunmaktadır (B. M. Robinson, 2012). İngiliz tersane işçilerini kapsayan bir seri üzerinde yapılan çalışmada Hilliard ve arkadaşları, işçileri asbeste maruziyetlerine göre devamlı ve aralıklı maruziyet olarak kategorize etmişler ve yoğun asbeste maruz kalan bireylerin daha kısa bir latensi süresine sahip olduğunu görmüşlerdir (Hilliard, Lovett, & McGavin, 2003). Bu bulguları destekler nitelikte sonuçlar alınan diğer bir çalışmada ise, asbeste maruziyetin çok ağır olduğu yalıtım işçilerinin de latensi sürelerinin 20-30 yıl arasında olduğu rapor edilmiştir (C. Bianchi & Bianchi, 2007). Kısa veya uzun süre asbest maruziyetinin Mezotelyoma gelişimi ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, asıl hastalık riskinin doz bağımlı olduğu belirtilmiştir (B. M. Robinson, 2012). Bu bilgiye örnek olarak, asbest maruziyetinin yoğun olduğu bir popülasyon olan Batı Avustralya asbest maden kasabası Wittenoom da yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar verilebilir. Bu kasabada yaşayan yoğunluk ve süre açısından yüksek asbest maruziyetine sahip insanlarda hastalık gelişimi oranlarının da yüksek olduğu görülmüştür (Hansen, De Klerk, Eccles, William Musk, & Hobbs, 1993),(Armstrong, de Klerk, Musk, & Hobbs, 1988). Norveçte yapılan bir çalışmada hem yalıtım hem de asbest-çimento işçilerinin çalışma süre uzunluklarının da benzer bir şekilde Mezotelyoma riskini arttırdığı bulunmuştur (Ulvestad, Kjærheim, Martinsen, Mowe, & Andersen, 2004), (Ulvestad et al., 2002). Ülkemiz Kapadokya bölgesinde bulunan köylerde fazla sayıda Mezotelyoma olgusunun gözlenmesi ve konu hakkında çalışılması

ile asbest dışında da diğer bir etiyolojik faktörün olduğu ortaya çıkmıştır (Artvinli & Barış, 1979). Bu bölgede yine asbest gibi fibröz mineral olan erionit, köylülerin akciğerlerinde bulunmuş ve hayvan modellerinde de çalışılarak karsinojenik bir ajan olduğu ortaya konulmuştur (Yang, Testa, & Carbone, 2008). Buna ek olarak etkilenmiş ailelerde yapılan pedigri analizleri sonucu bu bölgelerde otozomal dominant kalıtım özelliği gösteren genetik yatkınlık faktörünün olabileceği önerilmiş, bu sonuca bağlı olarak ta hastalık patojenizinde potansiyel bir gen-çevre etkileşiminin olabileceği düşünülmüştür (Roushdy-Hammady, Siegel, Emri, Testa, & Carbone, 2001). Günümüzde çalışmalar bu yatkınlık geninin saptanmasına yoğunlaşmıştır. Bu konu kapsamında bazı yeni aday genler önerilmiş fakat henüz kesin bir sonuca ulaşılamamıştır.

Bir DNA virüsü olan, Simian virüs 40 (SV40), Malign Mezotelyoma gelişime neden olan bir kofaktör olarak önerilmektedir. İnsanların SV40 ile enfeksiyonunun, 1970'lerin sonlarına doğru yapılan yapılan polio aşlarına kontaminasyonları sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir (Cutrone et al., 2005). SV40'ın tümör süpressör genlerini inaktive ettiği ve hayvan çalışmalarıyla onkojenik potansiyelinin olduğu gösterilmiştir (Cicala, Pompetti, & Carbone, 1993). Bu virüsün özellikle insan Mezotelyoma örneklerinde mezotel hücrelerinde konakladığı gözlenmiştir (Hirvonen et al., 1999). Tüm bu bulgulara rağmen SV40'ın insan Mezotelyoma insidansındaki rolü henüz netleşmemiştir (B. M. Robinson, 2012).

2.3-Epidemiyoloji

Dünya Çapında Mezotelyoma insidansı 20. Yüzyılın ortalarından itibaren yükselmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 1994 ve 2008 yılları arası Mezotelyoma ölüm oranları incelendiğinde yaşa bağlı ölüm oranı bir milyonda 4,9 kişi, yaş ortalaması 70, erkek kadın oranı 3,6:1 olarak açıklanmıştır (B. M. Robinson, 2012). Ülkeler arasında da Malign Mezotelyoma insidasının heterojenite gösterdiği görülmektedir (Tablo 2.1). Ülkemizde ise bazı yerel çalışmalardan elde edilen özet Tablo 2.2' de verilmektedir.

Tablo 2.1: Endüstriyel toplumlardaki Mezotelyoma insidansları (B. M. Robinson, 2012).

Ülke	Yıl	Olgu	İnsidans	Erkek/Kadın	Beklenen pik	Tahmini Gelecek olgular	Tahmini Periyot
Avusturalya	2008	661	29	4:1	2014-2021	6500 (Clements et al., 2007)	2004-2060
Birleşik Krallık	2009	2560	29	4:9:1	2011-2015	65000 (J. Hodgson, McElvenny, Darnton, Price, & Peto, 2005)	2002-2050
ABD	2009	-	10	4.6:1	2000-2005	85000 (J. Hodgson et al., 2005)	2008-2054
İtalya	2004	-	24	2.6:1	2015-2024	800/yıl (Marinaccio et al., 2005)	2012-2024
Japonya	2007	1068	8+-	3.5:1	2027	66,000 (Myojin, Azuma, Okumura, & Uchiyama, 2012) (Murayama, Takahashi, Natori, & Kurumatani, 2006)	2003-2050

Tablo 2.2: Türkiye’de mezotelyoma epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar (Eurasian).

Çalışma yeri	Yıl	Hız	Çalışma Özelliği	Kaynak
İzmir	2001	E:0,7/100bin K:0,3/100bin	Genel Popülasyon	(Fidaner, Eser, & Parkin, 2001)
Karain	1975-1978	11 ölüm	Erionit temaslı 575 kişi	(Y. Baris et al., 1978)
Karain/Tuzköy	1979-2003	%44.5	Erionite teması	(Y. I. Baris & Grandjean, 2006)
Karain		E:639/10000 K:1267/100000	Erionite Temaslı mortalite	(M. Metintas et al., 2010)
Eskişehir		E:114,8/100000 K:159,8/100000	Asbest teması	(S. Metintas, Metintas, Ucgun, & Oner, 2002)
Diyarbakır		22,8/100000	Genel Popülasyon	(Şenyiğit et al., 2000)
Maden, Ergani, Çüngüş, Çermik, Siverek	1990-1999	42,9/1000000	Asbest temaslı mortalite	(Senyigit, Dalgic, Kavak, & Tanrikulu, 2004)
Karağlı, Isparta	2005	1/132	Asbest temaslı 132 kişide mortalite	(Sahin, Ozturk, Songur, Bircan, & Akkaya, 2009)
Çaparkayı/Çankırı	1988	4/425	Asbest temaslı 425 kişide mortalite	(Y. Barış et al., 1988)
Hekimhan, Arguvan/Malatya	2005	E:1,45/100000 K:7,46/100000	Asbest temaslı mortalite	(Hasanoglu, Yildirim, Ermis, Kilic, & Koksall, 2006)
Sivas	2010	3 olgu	2970 olguda prevalans	(Bayram et al., 2013)

Ulusal veri girdileri güvenilir düzeyde olan ülkeler olan Avusturalya, Birleşik Krallıktan elde edilen verilerde, 2009 yılı için yaş standartize insidansın her iki popülasyon için bir milyon kişide 29 olduğu bildirilmiştir. Avusturalyada, erkek olgular çok sayıda olmakta, yeni teşhis olan bireylerin %75’inden fazlasının 65 yaş ve üstü olduğu kayıt altına alınmıştır. Karşılaştırmalı hastalık dağılımının Birleşik Krallıkla daha belirgin yapıldığı görülmektedir. Erkeklerde insidansın 1980 yılından beri 5 kat arttığı ve yaşa özgü insidansın erkeklerde 80-84 yaş aralığında, kadınlarda ise 75-79 yaş arasındaki pik

yaptığı görülmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde, National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) programı veritabanı analizlerine göre daha çok yaşlı erkeklerden oluşan ve her yıl 2500-3000 vakanın ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir. SEER verilerine göre 2000-2005 yılları arasından itibaren, yeni Mezotelyoma vakalarının ortaya çıkışında bir plato evresi ve nihai düşüşün olduğu görülmektedir (Price & Ware, 2009),(Price & Ware, 2004). Avrupanın büyük bir kesimini kapsayan ham insidans verilerine göre her yıl milyonda 10-20 vakanın olduğu rapor edilmiştir (C. Bianchi & Bianchi, 2007). Rapor edilmemiş vakalar yüzünden Global Mezotelyoma insidansının anlamlı ölçüde ölüm kayıtlarından daha yüksek olduğu düşünülmektedir (B. M. Robinson, 2012). Park ve arkadaşları kümülatif asbest kullanımı ve hastalık insidansı arasındaki ilişkiyi kullanarak asbest tüketiminin olduğu ülkelerdeki henüz rapor edilmemiş Mezotelyoma vakalarının tahminini yapmışlardır (Park et al., 2011). Rusya, Kazakistan, Çin, Hindistan ve Tayland gibi ülkelerde 2008 kadarki 15 yıllık süreçte yaklaşık 39000 vakanın ortaya çıkabileceğini "Gizli hastalık yükü" (Hidden burden of disease) adı verilen bir algoritma ile tanımlamışlardır. Bu vaka sayısına ek olarak gelişmekte olan ülkelerdeki yetersiz ölüm kayıtları ve 1994 yılına kadar plevral malignansiler için geçerli ICD kodlarının olmayışı yüzünden gerçek Mezotelyoma insidansının olduğundan daha düşük olarak görüldüğünü düşünülmektedir (Okello, Treasure, Nicholson, Peto, & Møller, 2009), (Camidge, Stockton, & Bain, 2006), (B. M. Robinson, 2012).

Ülkelerde asbest maruziyet haritalarının çıkarılması insidans ve ölüm oranında bölgeler arası değişiklik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. İtalya'da hastalığın daha çok asbest-çimento fabrika, tersane, rafineri ve petrokimyasal endüstri bölgelerinde yoğunluk gösterdiği bildirilmiştir (Fazzo et al., 2012). Benzer bir şekilde Birleşik Krallık'ta da yüksek Mezotelyoma ölüm oranlarının, gemi yapımının yoğun olduğu bölgeler olan Barrow-in-Furness, Plymouth, Portsmouth, Tyneside and Tyneside and Southampton 'da yoğunlaştığı kaydedilmiştir (McElvenny, Darnton, Price, & Hodgson, 2005). SEER veritabanından elde edilen verilerde de hastalığa yakalanma oranlarında bölgesel farklılıklar göze çarpmaktadır. Gemi endüstrisinin yoğun olduğu bölgeler olan Hawaii ve Seattle Puget Sound'ta sırasıyla milyonda 4.5 ve 23.3 olan bir insidans aralığı bildirilmiştir. İkincil çevresel maruziyete bağlı bazı yüksek insidans kümelenmeleri de tanımlanmıştır (B. M. Robinson, 2012). Ülkemizde bazı köyler (S. Metintas et al., 2002), Yeni Kaledonya (Baumann et al., 2011) milyonda 1000 gibi yüksek insidansa sahip bölgelerin bulunduğu bildirilmiştir. Malign Mezotelyoma için kabul edilmiş bir etiyolojik faktör olarak asbestin mesleki maruziyeti, epidemiyolojik literatürde genişçe yer bulmaktadır (B. M. Robinson, 2012). Genel görüşe göre bu konuda hastalığın üç dalgası tanımlanmıştır. Birinci dalgada asbest ürünlerinin üretiminde çalışan ham asbest madencileri yer almaktadır. Bu konuda Wittenoom işçileri yakından takip edilmiştir. Berry ve arkadaşları 6908 Wittenoom çalışanından oluşan bir kohortta 50 yıllık bir takip süreci

sonucu elde edilen verilerle bir çalışma yayınlamış, Mezotelyoma ölüm oranlarının erkeklerde % 4,7 ve kadınlarda %3.1 olduğu belirlemiştir. Bu kohortta ölüm nedenlerinin erkeklerde % 10, kadınlarda ise % 8 Malign Mezotelyoma kaynaklı olduğunu saptamışlardır (Berry et al., 2012). Hastalığın ikinci dalgası ise, endüstride asbest ürünlerini kullanan işçileri etkilemektedir. Bu mesleki maruziyeti olan gruba; marangozlar, boru tesisat işçileri, ordu mensupları, gemi yapımında çalışan işçiler ve yalıtım işçilerini dahil edilmiştir (B. W. Robinson & Lake, 2005). Üçüncü grup içinse 1990 yılından itibaren değişen çeşitli risk grupları tanımlanmaktadır. Bu gruptaki bireylerin asbest maruziyetlerinin bilinmeyen, kısa ve çok düşük seviyede olduğu düşünülmektedir (Huncharek, 1992). Bu gruba daha çok mesleki olmayan maruziyetler, evsel maruziyet (asbest çalışanlarının aileleri), asbest endüstrisinin yarattığı hava kirliliği sonucu maruziyet, veya ev gibi yaşadığı ortamda maruziyeti olanlar girmektedir (Hillerdal, 1999). Ayrıca Batı Avusturya'da ev tamir ve bakımı esnasında asbeste maruz kalma yüzünden hastalık insidansının arttığı belirtilmektedir (Olsen et al., 2011). İtalyada da, 1993-2001 yılları arasında bu tip mesleki olmayan maruziyetin tüm olguların % 8.3'ünden sorumlu olduğu bildirilmektedir. Bu tip maruziyetin ABD'de şuan sunulan olguların % 30'u ile ilişkilendirilmiş ve bu oranın daha da artacağı tahmin edilmektedir (B. M. Robinson, 2012; B. W. Robinson & Lake, 2005).

2.4-Mezotelyoma

2.4.1-Temel Klinik Özellikler

Mezotelyoma ile ilişkili işaretler ve semptomlar diğer benign veya malign intratorasik hastalıklarda da gözlenebildiği için göreceli olarak non-spesifik olarak nitelendirilmektedirler (Mott, 2012). Çoğu hastanın öksürük şikâyeti vardır ve bu tek başına nonproduktiftir. Bulgular arasında nefes darlığı sık görülmektedir. Göğüs duvarı ağrısı göreceli olarak Mezotelyoma'ya daha özgüdür ve genellikle lokal bir ağrı olarak tanımlanmaktadır. Genellikle el muayenesi ile yumuşak doku şişkinliği ve kütle saptanmaktadır. Azalmış solunum sesleri beraber perküsyon'da alınan titreşimsiz ses plevral bir efüzyonu işaret etmektedir. Bazı hastalarda splint gelişir buna ilaveten aynı tarafa doğru skolyoz da görülür. Plevral efüzyonlar sıktır ve %60 oranda sağ taraflı gözlenmektedir. Yüzde 5'lik kısımda ise bilateral efüzyonlar gözlenebilmektedir. Plevral plaklar da sol tarafta gözlenir, 5 hastadan 1'inde Kronik asbestozis karakterize bibazilar fibrosis'in geliştiği de gözlenir. Bilgisayarlı tomografi (BT) 'de plevral temelli nodülerite gözlenebilmektedir. Manyetik Rezonans (MR) görüntüleme ise diyafram veya mediastinal yapılara invazyonun gözlenmesini sağlayabilir ki bu durum pre-operatif değerlendirme için önem arz etmektedir. Mezotelyoma hipermetabolik bir karakterde olduğu için Positron Emission Tomography (PET) görüntüleme

hem evreleme hem de tedavi sonrası takip için faydalıdır. İdeal olarak PET taramasını takiben Plörodezi prosedürü yapılması önerilmektedir çünkü plörodezin yaratacağı inflammatuar reaksiyon flude oksiglukoz aktivitesini etkileyebilir ve bu durumda yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir. Ameliyat öncesi PET evrenin düşük görünmesine sebep olabilmesinin yanında, uzak metaztazların belirlenmesinde faydalıdır (Flores, Akhurst, Gonen, Larson, & Rusch, 2003), (Mott, 2012). Mezotelyoma ile birlikte çeşitli paraneoplastik sendromlar da tarif edilmiştir. Bunlara hiperkalsemi, hipoglisemi, otoimmün hemolitik anemi, hiper pıhtılaşma durumları ve yaygın intravasküler pıhtılaşma örnek verilebilir. Bu sendromlar nonspesifik olup birtakım malignitelerle de görülebilir (Mott, 2012).

2.4.2-Patoloji

Mezotelyoma teşhisi zor bir hastalıktır. Biyopsiden elde edilen doku miktarı genellikle çok azdır ve Mezotelyoma ile diğer plevra kaynaklı maligniteleri birbirinden ayıran gerekli testleri gerçekleştirmek için yeterli olmayabilir. Bunun yanında histolojik çeşitlilik de teşhisi zorlaştıran diğer bir unsurdur. En çok gözlenen histolojik tip epiteloid tiptir ve genellikle en iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Diğer bir alt tip olan Sarkomatoid Mezotelyoma karakteristik olarak iç morfolosine sahip bir varyanttır kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Çoğu zaman, karışık epiteloid ve sarkomatoid histolojiler görülebilir. Plevral sıvının veya kör plevra biyopsisinin, sitolojik analizi ile elde edilen doku sınırlıdır ve bu durum sağlıklı bir analizin yapılmasını kısıtlar. Plevral sıvının elde edildiği durumlarda büyük hacimli koleksiyonların elde edilmesi ve tanısal doğruluğu artırmak için bir sitospin analizinin yapılması önerilmektedir. Plevral nodüllerin doğrudan görülebilmesini sağlayan torakoskopik biyopsinin en iyi verimi verdiği belirtilmektedir. İmmünohistokimyasal boyama, Mezotelyomayı akciğer kökenli adenokarsinomlardan veya diğer metastatik kanser türlerinden ayırmak için önemlidir. Calretinin Mezotelyomada yaygın olarak pozitifdir ve bildirilen duyarlılığı % 95, özgüllüğü % 87'dir (Yaziji et al., 2006), (Mott, 2012). Trombomodulin, % 92'lik bir özgünlüğe sahip olmakla birlikte duyarlılığı % 68'den daha azdır. Mezotelyomla ilişkili antijenlere yönelik diğer kullanışlı antikolar ise, Mezotelin, Sitokeratin 5, Wilms tümör-1 geni ürünü ve HBME-1 ve nonmezotelik antijenler olan Lewis-Y kan grubu (antikor BG8), MOC-31, BerEp4, CD15 ve karsinoembriyonik antijen ailesidir (Mott, 2012). International Mesothelioma Interest Group (IMIG)' e dahil 16 uzman patolog tarafından Mezotelyoma tanısı koyma ve adenokarsinoma gibi diğer tümörlerden ayırt etme için en az % 80 veya daha fazla duyarlılık gösteren bir histokimyasal belirteçler paneli oluşturmuştur (Husain et al., 2009). Bu yaklaşımın kullanılması sayesinde Mezotelyoma teşhisini % 95 başarıyla yapabileceği öne sürülmüştür. Kalan %5'lik kısmın ise dokunun yeterli

olmadığı durumlar, elde edilen dokuda tümör hücresi bulunmaması gibi durumları içermektedir (Mott, 2012).

2.4.3-Tanı

Mezotelyomanın etkili tanısı uygun doku kalite ve miktarına bağlıdır. Mezotelyoma için geleneksel tanı yöntemlerine, torasentez ile elde edilen plevral sıvı sitolojisi, BT rehberliği ile plevra dokusunun iğne biyopsisi, plevral nodüllerin biyopsi ile doğrudan görselleştirilmesi ve video yardımcı torakoskopi cerrahisi ve açık torakotomi gibi yöntemler örnek verilebilir. Plevral sıvı genellikle kanlı ve eksüdatif, yüksek protein içeriği, özellikle artmış laktaz dehidrogenaz miktarı ve yüksek hücre sayıları ile gözlenir, ancak bu bulgu nonspesifiktir ve plevral sıvı sitolojisinin duyarlılığı düşüktür, tek bir örneklemede % 0, seri örneklemede % 64'dür (Heffner & Klein, 2008; Mott, 2012). BT kılavuzluğunda ince iğne aspirasyonu (FNA) küçük örneklem büyüklüğü ile sınırlıdır, bu da duyarlılığı düşürür ve pnömotoraks riski (% 9.5) ve iğne yolunun tumor seeding riski (% 21) ile ilişkilendirilir (Boutin et al., 1993). Video yardımcı torakoskopi (Video-assisted thoracoscopy) , deneyimli ellerde % 98'lik bir tanısal doğruluğa sahiptir ve simültane plörodez yapılmasını da mümkün kılar. İğne giriş kısmına bu prosedürü takip eden 10-12 gün içinde tümör seeding 'i engellemek amaçlı radyasyon terapisi önerilir. Daha çok evreleme amaçlarına yönelik yöntemler olan Özofagus ultrasonu (EUS), mediastinoskopi ve laparoskopi, diğer tanı prosedürlerine örnek olarak verilebilir (Mott, 2012).

2.4.4-Evreleme

Yıllar içinde Mezotelyoma için çeşitli evreleme sistemleri kullanılmış ve bu sistemlerin neredeyse hepsi plevral mezotelyoma için kullanılmıştır. Peritoneal mezotelyoma kendi evreleme sistemine sahip değildir. Plevral mezotelyoma için kullanılan en eski evreleme sistemi Butchart sistemidir; halen dünyanın bazı yerlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Butchart sisteminin kapsamı histolojik alt tipten bağımsız basit bir tanımlamaya dayanmaktadır. Bu tanımlamaya göre tümörün sadece plevra lokasyonu (Evre I), göğüs duvarı veya mediastinal invazyon (Evre II), peritoneal veya diyafragma penetrasyonu (Evre III) veya uzak metastazlar (Evre IV) olmak üzere belirlenmiştir (Mott, 2012).

Bunun yanında Brigham sistemi cerrahi rezektablite ve lenf nodu tutulumunu tanımlamaya çalışmaktadır. Evre I hastalık nodal yayılım olmadan rezeke edilebilir; Evre II, lenf nodu tutulumu ile rezektabldır; Evre III, göğüs duvarını, kalbi, diyaframı veya karın boşluğunu tutulumu var iken lenf nodu tutulumu olmamaktadır. Evre IV'te ise hastalık uzak metastazlar yapmıştır. Bu sistem şuanda kullanılmamaktadır (Mott, 2012).

Günümüzde IMIG tarafından belirlenen ve en çok kullanılan pratik sistem tümör-nodül metastaz (TNM) sistemidir. Bu sistem şu anda Amerikan Kanser Komitesi tarafından kabul edilen kabul edilmiş bir standarttır (Edge & Compton, 2010; Mott, 2012). İlerlemiş hastalık belirtileri görülen çoğu hasta rezekte edilemeyen olarak kabul edilir (Mott, 2012).

2.4.5-Tedavi

Plevral mezotelyoma tanısı konduktan sonra, bir hastanın cerrahi rezeksiyona uygun olup olmadığını belirlemek için kapsamlı bir evreleme çalışması yapılmalıdır. Bu inceleme, kardiyak durumu ve pulmoner fonksiyon testlerini de içeren tüm rutin analizleri (komorbiditeleri) kapsamalıdır (Mott, 2012).

2.4.5.1-Cerrahi

MM' de 2 tip cerrahi müdahale yapılmaktadır. Bunlar ekstraplevral pnömonektomi (EPP) ve plörektomi/dekortikasyon (P/D) ameliyatlarıdır (Eurasian). Cerrahi müdahale, tıbbi açıdan uygun olduğu düşünülen ve ameliyatı tolere edebilecek, evre I olan hastalar için önerilir. Komorbidite veya kardiyopulmoner fonksiyon bozukluğu nedeniyle opere edilemeyen hastalar (ileri yaş, kötü performans durumu ve önemli komorbiditesi olan kişiler vb.) takip edilir veya kemoterapiye başlanır (Mott, 2012). Evre II-III hastalığı olan hastalara cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi ile trimodality tedavisi önerilmektedir; tıbbi olarak uygun olmayan, IV evre hastalığa sahip olan ve / veya sarkomatoid histoloji gösteren hastalar için tek başına kemoterapi önerilmektedir. Evre IV hastalık olarak kabul edilen ve bu nedenle küçük hücreli dışı akciğer kanserinde rezekte edilemeyen plevral efüzyonlar, başka türlü tedavi için uygun olan Mezotelyoma hastalarında cerrahiye ve agresif trimodal tedaviye mutlak kontraendikasyon değildir. Efüzyonlar, talk pleurodezis (torakoskopik drenajdan sonra steril talk sirkülasyonu) veya sürekli drenaj için bir plevral kateter yerleştirilmesi ile uygulanabilir (Flores et al., 2003), (Arapis et al., 2006), (Aelony & Yao, 2005), (Mott, 2012).

2.4.5.2-Kemoterapi

MPM'li hastaların çoğu hastalığın derecesi veya yetersiz fonksiyonel durum nedeniyle agresif cerrahi için aday değildir. Ameliyat olmaya uygun olmayan veya istemeyen ve kabul edilebilir bir performans durumu olmayan hastalarda, kemoterapi makul bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. Mezotelyoma kemoterapisinde Platin analogları, antimetabolitler (pemetrexed raltitrexed methotrexate, gemsitabin, vinorelbin ve doksorubisin MPM'de % 7-% 20 tek etkili yanıt oranlarına sahiptir (Patel & Dowell, 2016), (Tsao et

al., 2009). Sadece randomize bir çalışma, bu hastalıkta birinci basamak tekli ajan kemoterapisinin sağkalıma etkisini değerlendirmiştir. Bu çalışmada, daha önce tedavi edilmemiş MPM'li hastalarda haftalık vinorelinin en iyi destekleyici bakımla Faz III karşılaştırması düşük hasta kaydı nedeniyle erken kapanmıştır ve bu nedenle çalışmanın gücü düşük bulunmuştur. Ancak vinorelin kolunda progresyonsuz ve genel sağkalımı iyileştirme eğilimi gözlenmiştir (Kroczyńska et al., 2006). Farklı çalışmalarda MPM'de kombine kemoterapi rolü de değerlendirilmiştir. Vogelzang ve arkadaşları cerrahi adayı olmayan 456 MPM hastasında ile cisplatin ve cisplatin+pemetreksed karşısında ve randomize bir Faz III çalışması yapmışlardır. Kombinasyon kolunda median genel sağkalımda (9.1 ayla karşılaştırıldığında 12.1'e, $p = 0.02$) ve progresyonsuz sağkalımda (5.7'ye karşı 3.9 ay, $p = 0.001$) istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme gözlenmiştir (Vogelzang et al., 2003). Bu denemenin sonucunda Cisplatin ve pemetreksed'in kombinasyonu, US Food and Drug Administration (FDA) onayı ile MPM'nin birinci basamak tedavisi olarak kabul edilmiştir ve ABD'de son on yılda tercih edilen bir tedavi rejimi olmuştur. Avrupa'da yapılan benzer bir Faz III çalışmada, tek başına cisplatin ile cisplatin+raltitreksed'in kombinasyonunu karşılaştırılmıştır ve kombinasyon kolunda istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme görülmüştür (11.4'e karşı 8.8 ay, $P = 0.048$). Karboplatin ve pemetreksed kombinasyonu, tedavi edilmemiş MPM'li hastalarda Faz II çalışmalarda da değerlendirilmiştir ve medyan genel sağkalımlar 12.7-14 ay olarak bildirilmiştir (Castagneto et al., 2007; Katirtzoglou et al., 2010). Buna ek olarak, genişletilmiş erişim programının bir parçası olarak cisplatin ve pemetreksed veya karboplatin ve pemetreksed ile tedavi edilen 1.704 hastanın randomize edilmemiş bir karşılaştırmasında, progresyon için median süre (7'ye karşı 6.9 ay) ve 1 yıllık sağkalım oranları (% 63.1 ve % 64) iki rejim arasında benzer bulundu (Santoro et al., 2008). Bu nedenle, karboplatin ve pemetreksed kombinasyonu, cisplatin alamayan hastalar için makul bir alternatif olarak kabul edilmektedir (Santoro et al., 2008). Ek olarak, cisplatin ve gemesitabin kombinasyonu, iki faz II çalışmada değerlendirilmiş ve medyan sağkalımın 9.6 ve 11.2 ay olduğu bildirilmiştir. Bu durum, pemetreksed alamayan MPM hastaları için yararlı bir seçenek olabileceğini düşünülmüştür (A. Nowak et al., 2002), (Van Haarst et al., 2002). MPM'de ikinci basamak kemoterapinin faydası, yalnızca sınırlı ölçüde değerlendirilmiştir. Jassem ve arkadaşları, pemetreksed veya önceden pemetreksed almayan 243 hastayı daha önce tedavi gören MPM hastaları ile randomize olarak karşılaştırdılar. Pemetreksed kolunda progresyon için medyan sürede belirgin bir düzelleme gözlenmişlerdir (1.5 ayla karşılaştırıldığında 3.7, $p = 0.0002$), ancak genel yaşam kalitesi veya yaşam kalitesinde ortalama bir değişiklik açısından bir fark gözlenmemiştir. Jassem ve arkadaşları, genel sağ kalımı iyileştirmedeki bu eksikliğin, iki kol arasındaki kemoterapiye devam etmeme sonucu kaynaklanan dengesizlik nedeniyle olabileceğini öne sürmüşlerdir (Jassem et al., 2008). MPM'de ek ikinci sıra seçenekler arasında vinorelin ve gemesitabin

de bulunur, ancak her ikisi de bu alanda sınırlı aktivite göstermiştir (Jassem et al., 2008; Stebbing et al., 2009). Yakın zamana kadar, MPM'deki moleküler hedefli terapi için yapılan daha önceki çalışmalar başarısız olmuştur (Patel & Dowell, 2016).

2.4.5.3-İmmünoterapi

İmmün modülatör monoklonal antikorlarla bağışıklık kontrol noktalarının hedeflenmesinin, çeşitli solid tümörlere sahip önceden tedavi almış hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir. Bir Faz II çalışmasında, 29 kemoterapi dirençli Malign mezotelyoma hastasında CTLA-4 monoklonal antikor tremelimumab değerlendirilmiştir. Ortalama genel sağkalım 11.3 ay olarak kayıtlı edilmiş ve hastaların % 52'si 23.1 aylık medyan izlemde, hastalığın kontrol altında seyrettiği gözlenmiştir (Calabrò et al., 2015). Tremelimumab son zamanlarda FDA tarafından onay almış olmasına rağmen; AstraZeneca Tremelimumab monoterapisi ile plasebonun karşılaştırıldığı faz 2b takip çalışmasında, Tremelimumab'ın Mezotelyoma (hem plevra hem de periton) için ikinci veya üçüncü basamak tedavi olarak genel sağkalımı iyileştirmediği bildirilmiştir (Patel & Dowell, 2016). Yakın zamanlarda immünoterapi ile birlikte tremelimumab'ın kombine olarak kullanılmasına yönelik araştırmalara ilgi duyulmaktadır. Buna ek olarak, PD-L1'e veya PD1'e yönelik monoklonal antikorlar şu anda MPM'deki Faz I / II çalışmalarında araştırılmaktadır. Önceki prelinik seriler, PD1 ve PD-L1'in önemli bir MPM yüzdesinde ekspres edildiğini ve bu ifadenin daha kötü prognozu olan hastaları tanımlayabileceğini göstermiştir (Cedrès et al., 2015; Mansfield et al., 2014). Alley ve arkadaşları, yakın zamanda, ön tedavi edilen hastalarda, PD1'e karşı monoklonal bir antikor olan pembrolizumab'ın Faz I / II denemesinden erken umut verici sonuçlar bildirmiştir. Çalışmada PD1 ekspres eden 25 hastada toplam 8.6 aylık takipte ortalama yanıt oranı % 28 (7 hasta) ve 6 aylık progresyonsuz sağkalım oranı % 49.4 olarak bulunmuştur (Alley et al., 2015).

2.4.5.4-Radyoterapi

Radyoterapi göğüs duvarındaki kitleleri azaltmak veya ağrıyı hafifletmek için potansiyel olarak yararlıdır, ancak bu yanıtlar geçicidir. Radyoterapi, intratorasik hastalığın primer yöntemi olarak nadiren önemli bir yanıt sergilemiştir ve sağ kalımı iyileştirdiği gösterilmemiştir (Bissett, Macbeth, & Cram, 1991). Yoğunluk modülasyonlu radyoterapi (IMRT), üç boyutlu konformal modelde çeşitli açılarda küçük radyasyon demetleri kullanan gelişmiş bir yöntemdir ve hedefin daha yoğun radyasyona tabi tutulmasını sağlar. EPP'den sonra sıklıkla kullanılır, çünkü ipsilateral hemitoraks yaygın nüks yeridir (Mott, 2012). Radyoterapiyi, genellikle de IMRT'yi, 2003'ten beri standart olarak, plevral biyopsiyi ve tüp drenajını takip eden 2 hafta içinde

seeding'in önlemesi amacıyla yapılması önerilmektedir. Yine de bu tedavinin gerçekten etkili olup olmadığı ya da hayatta kalma üzerine herhangi bir etkisi olup olmadığı tartışmalıdır (Mott, 2012).

2.5-Asbestle Uyarılan Karsinojenez

Mezotelyoma hastalarının yaklaşık % 80'nin asbest maruziyeti öyküsünün olması, asbest maruziyeti ve MM gelişimi arasındaki açık bağlantıyı bizlere göstermektedir (Pass, Vogelzang, Hahn, & Carbone, 2004). Birçok hayvan modellerinde de asbestin kanserojenitesi gösterilmiştir. Bununla birlikte, asbest liflerinin mezotel hücrelerinde doğrudan etki edip etmediği veya dolaylı olarak Mezotelyomaya neden olup olmadığı açık bir şekilde belirlenmemiştir. Asbest liflerinin MPM'ye nasıl neden olabileceği üzerine birkaç makul açıklama öne sürülmüştür (Pass et al., 2004), (B. W. Robinson & Lake, 2005). Böyle bir öneride; asbest fiberlerinin mekanik olarak plevral tahrişe neden olduğu söylenebilir: uzun ve ince asbest lifleri akciğerlere solunması sonucu olarak ard arda mezotel yüzeyi irritasyonu-hasar-onarım döngüsüne yol açarak lokal inflamasyonun uzun sürmesine neden olur (Sekido, 2013). Diğer bir öneri asbest lifleri, mitotik içiğin işlevini bozarak kromozom anomalileri ve anöploidi ile sonuçlanabilecek hasarlarla hücre döngüsünün bozulmasında neden olabilir. Üçüncü bir öneri, asbest tarafından indüklenen reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif azot türlerinin (RNS) DNA hasarına ve DNA dal kırıklarına yol açmasıdır. Son olarak, asbestin, TGF- β ve PDGF gibi sitokin ve büyüme faktörlerini veya NF- κ B ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerini uyardığı bildirilmiştir. Ek olarak sıçan mezotel hücrelerinde crocidolit asbestin epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) otofosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Faux, Houghton, Hubbard, & Patrick, 2000).

2.5.1-MPM'de Tümör Süpressör Genlerinin İnaktivasyonu

İnsan malignitelerinde en çok inaktive olan tümör baskılayıcı genler (TSG'ler) p53 ve p16INK4a / p14ARF'tır. Çoğu MPM'de, p16INK4a / p14ARF'nin sık inaktivasyonunu gösterilirken, bunların sadece % 20-25'inde p53'te mutasyon gözlenmiştir. MPM'nin tümör doku örneklerinin analizi, numunelerin % 70'inden fazlasının P16INK4a / p14ARF'nin downregülasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Cheng et al., 1994; Kratzke et al., 1995). Taniguchi ve ark. MPM hücre hatlarının hemen hemen tümünde p16INK4a / p14ARF geninin bir homozigot delesyonu olduğunu bulmuşlardır. P16INK4a gen ürünü, siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) / Siklin D-RB yolu ile hücre döngüsünü kontrol ederken, p14ARF gen ürünü p53'ü HDM2 inaktivasyonu ile düzenler. Bu nedenle, p16INK4a / p14ARF'nin homozigot delesyonu, hücrede RB ve p53'ün gibi iki önemli tümör baskılayıcı yolunun inaktive olduğunu gösterir (Taniguchi et al., 2007).

Kromozom 22q12 kaybı MPM'de sıklıkla tespit edilmektedir. Başlangıçta NF2 ailesel kanser sendromunun hedef geni olarak tanımlanan nörofibromatoz tip 2 (NF2), aynı zamanda da MPM'deki 22q12 kaybının hedef geni olduğu da gösterilmiştir (C. Bianchi & Bianchi, 2007; Sekido et al., 1995). Nörofibromatoz tip 2 hastalarında sıklıkla vestibüler schwannoma, meningioma ve diğer nöronal malignansiler gelişirken, bu tip kanserlerin sporadik tümörleri de NF2 mutasyonu barındırmaktadır (Baser, 2006). Bununla birlikte, bugüne kadar, NF2 hastalarının MPM'ye karşı daha yüksek yatkınlıkları olduğunu gösteren yayınlanmış bir rapor bulunmamaktadır. NF2 geni, MPM' de homozigot delesyon, nonsense mutasyon veya missense mutasyonu sonucu inaktive olmaktadır. Bianchi ve ark. (C. Bianchi & Bianchi, 2007) ve Sekido ve ark. (Sekido et al., 1995) MPM'lerin yaklaşık % 40'ının NF2'nin genetik mutasyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir; bu % 60 NF2 genetik mutasyonu olmayan MPM olgularının, yaklaşık % 20'sinde NF2'nin downregüle olduğu gösterilmiştir. Toplamda, MPM'lerin % 50-60'ında NF2'nin inaktivasyonu gösterilmektedir. Bir hayvan modelinde, NF2 nakavt farelerden elde edilen hücre hatlarında erken evrede ve daha sık olarak asbest maruziyetinden sonra MPM gelişimi gösterilmiştir (Altomare et al., 2005). Bu çalışmadan elde edilen dikkat çekici bir bulgu olarak, bu tümörler insan MM'ye benzer şekilde, p16Ink4a / p19Arf lokusunun ve bitişik p15Ink4b tümör baskılayıcı geninin lokusunda sık homozigot delesyonları gözlenmiştir. NF2 geni, büyüme-düzenleyici sinyali ileten FERM (four point-one, ezrin, radixin, and moesin) domainli membran-hücre iskeleti proteini ve adaptör protein olan Merlin'i kodlar (McClatchey & Giovannini, 2005). Merlin'in, CD44, ezrin radixin moesin (ERM) proteinleri, p21-aktifleştirilmiş kinaz 1 (PAK1) de dahil olmak üzere çeşitli proteinlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir ve proteinin serin 518'deki fosforilasyon ile tümör baskılayıcı aktivitesini kaybettiği bilinmektedir. Bu serin 518 bölgesi, RAC / PAK1 ve altbirim 1-protein fosfataz 1d'yi (MYPT-1-PP1d) hedef alan miyozin fosfataz ile defosforile edilmektedir (Jin, Sperka, Herrlich, & Morrison, 2006). Merlin'in aktivitesinin hücre adezyonu (adherens kavşağı), hücre-hücre dışı matris adezyonu veya hücre dışı büyüme sinyalleri tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. Merlin'in, invazyon, hücre büyümesi ve MM hücrelerinin hayatta kalma özelliklerini belirleyen anahtar moleküllerden biri olduğu düşünülmektedir (Sekido, 2013).

2.5.2-MPM' de onkogenlerin aktivasyonu

Simian virüsü 40 (SV40), MM gelişimiyle ilişkili olduğu öne sürülen, maymun kökenli, çift dallı bir DNA poliomavirüsüdür (Gazdar, Butel, & Carbone, 2002). 1954-1963 yılları arasında kullanılan çocuk felci aşısı, SV40 ile yaygın şekilde kontamine olduğundan aşılama yüzünden popülasyonunda yaygın şekilde SV40 enfeksiyonu gözlenmiştir. Bununla birlikte, çocuk felci aşısı almayan insanlara bile, SV40 virüs bulaşmış olduğu bulunmuş, fakat bu

kontaminasyonun nasıl gerçekleştiği anlaşılamamıştır. SV40 büyük T ve küçük T antijenlerini ifade etmektedir. Bu büyük T antijeni, p53 ve RB tümör baskılayıcılarını etkisizleştirdiğinden, SV40 enfeksiyonunun patojenik olarak Mezotelyoma gelişiminin birincil mekanizmalarından biri olarak kabul edilmiştir (Sekido, 2013).

Hamsterlardaki SV40'in intraplevral enjeksiyonu, uygulamadan 6 ay sonra Mezotelyoma gelişimine neden olduğu görülmüş ve SV40'in Met, Notch-1 ve telomeraz aktivitesini uyardığı saptanmıştır. Bununla birlikte, SV40 ve MM arasında kuvvetli ilişki gösteren çalışmaların çoğu, sadece basit amplifikasyon temelli PCR tabanlı tahlillerden oluşmaktaydı. Yapılan bazı çalışmalar, bu tür sonuçların, çalışmalarda kullanılan laboratuvarların çoğunda plazmitlerin bulaşması nedeniyle yanlış pozitifliğin ortaya çıkardığı iddia etmişlerdir. (López-Ríos, Illei, Rusch, & Ladanyi, 2004). Sonuç olarak, SV40'in Mezotelyomadaki etkisi tartışmalıdır (Sekido, 2013).

MM'de reseptör tirozin kinaz (RTK) familyasına ait üyelerin aktivasyonu araştırılmıştır. Bunların arasında Met onkogeninin MM primer tümörleri ve hücre dizisinde sıklıkla eksprese edildiği gösterilmiştir (Jagadeeswaran et al., 2006). Hepatosit büyüme faktörü (HGF), Met'in bir ligandıdır ve HGF-MET, mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) ve fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) -AKT kaskadlarında rol oynar. PI3K-AKT kaskadının MM'de de aktive olduğu gösterilmiştir. Pozitif AKT fosforilasyon statüsüne sahip olan MM'lerde, AKT'nin down stream moleküllerinden biri olan fosforlanmış (aktive edilmiş) mTOR'da bulunmaktadır. Bu nedenle, MM'de PI3K-AKT-mTOR sinyal zincirinin aktivasyonunun, yukarıdaki HGF-MET'in aktivasyonu ile uyarıldığı düşünülmektedir (Sekido, 2013). Ek olarak, Akciğer adenokarsinomasında özellikle Asyalı kadınlarda sıklıkla mutasyona uğrayan başka bir RTK olan EGFR'nin, MPM primer tümörlerinin % 56'sında aşırı eksprese olduğu gösterilmektedir. Buna rağmen olgularda hiçbir EGFR mutasyonuna saptanmamıştır (Destro et al., 2006). Malign Mezotelyoma hücre hatları birçok başka büyüme faktörü ve sitokini üretmektedir (Pass et al., 2004). Bu bağlamda, Trombosit türevi büyüme faktörü, TGF- β , insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) derinlemesine incelenmiştir. Buna ek olarak, interlökin IL-6, IL-8, fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler) ve vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF'ler) de dahil olmak üzere anjiyojenik yolları içeren faktörlerin, MM hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Galffy, Mohammed, Nasreen, Ward, & Antony, 1999).

2.5.3-Asbest Tarafından İndüklenen Genetik/Hücresel Hasar

İnsan mezotelyal hücrelerinin asbest sitotoksitesine aşırı duyarlılığı olduğu bilinmektedir. Fakat bu durum "eğer mezotelyal hücreler asbest maruziyetleri sonucu ölüyorlarsa nasıl oluyorda MM gelişimi olmaktadır?" gibi paradoksal bir soruyu da ortaya çıkarmaktadır. Asbest liflerinin MM'ye nasıl neden olduğu konusunda olası birkaç mekanizma vardır. Asbest liflerinin

hücrenin genetik / hücrenel hasarı tetiklediği ve karsinogenez ile ilişkili kronik inflamasyonun ne şekilde oluştuğuna yönelik dört temsilci model öne sürülmektedir (Heintz, Janssen-Heininger, & Mossman, 2010) (Toyokuni, 2009).

- (I) Asbest liflerine maruz kalan mezotel hücrelerindereaktif oksijen türleri nedeniyle DNA hasarı ve DNA dal kırıkları meydana gelir. Asbest liflerini fagosite eden ancak bunları sindiremeyen makrofajlar da bol miktarda reaktif oksijen üretir.
- (II) Asbest lifleri aynı zamanda mezotel hücreleri tarafından da hücre içine alınmaktadır. Asbest lifleri, hücrelere alındığında, mitotik iğciğin fonksiyonunu bozarak hücre döngüsüne ve dolayısıyla mitotik sürece fiziksel olarak müdahale edebilir. Asbest liflerinin kromozomlarla veya mitotik iğlerle etkileşime girmesi, kromozomal yapısal anomalilere ve mezotel hücrelerinin anöploidisine neden olabilir.
- (III) Asbest lifleri, kendi üzerine çeşitli protein ve kimyasal maddelerin ve kanserojenler gibi tehlikeli moleküllerin birikmesine neden olabilir. Asbest lifleri ayrıca önemli hücrenel proteinleri de bağlar ve bu tür proteinlerin eksikliği normal mezotel hücreleri için zararlı olabilir.
- (IV) Asbeste maruz kalmış mezotel hücreleri ve makrofajlar, inflamasyon ve tümör gelişmesine neden olan çeşitli sitokinler ve büyüme faktörlerini serbest bırakır. Bunlara örnek olarak, tümör nekroz faktörü- α , interlökin- 1β , transforme edici büyüme faktörü- β ve trombosit türevli büyüme faktörleri örnek verilebilir (Sekido, 2013).

Ayrıca, Tümör nekroz faktörü- α 'nın, nükleer faktör- κB 'yi aktive ettiği, bunun mezotel hücre sağkalımına yol açtığı da gösterilmiştir (Yang et al., 2006). HMGB1 proteininin asbeste maruz bırakılan mezotel hücrelerinden salındığı ve daha sonra nekrotik hücre ölümü aktive ettiği ve inflamatuvar yanıtı teşvik ettiği gösterilmiştir (Yang et al., 2010) . Asbest veya başka faktörlerin sebep olduğu mezotel hücrelerindeki DNA hasarları, DNA bütünlüğünü korunması için onarılmalıdır. Memeli hücrelerinde, dört büyük DNA hasar onarım sisteminin farklı DNA lezyonlarının onarımından sorumlu olduğu bilinmektedir. Bunlar temel eksizyon onarımı, nükleotid eksizyon tamiri, mismatch onarımı ve rekombinasyon sistemi onarımını (homolog rekombinasyon ve homolog olmayan end joining) içerir (Toumpanakis & Theocharis, 2011). MM'lerdeki DNA tamir sisteminde yer alan genlerin, özellikle de çift iplikçikli kırılma onarımıyla ilgili genlerin belirgin aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (Røe et al., 2010). X-ray cross complementing group 1 DNA onarım proteinlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin MM riskiyle ilişkili olduğu da öne sürülmüştür. Yüksek boy (uzunluk-genişlik)

oranına sahip çok duvarlı karbon nanotüpleri (MWCNT- multiwalled carbon nanotubes-), iğne benzeri şekilleri ve yüksek dayanıklılığından dolayı MM de dahil asbest benzeri patojenite oluşturabileceklerinden endişe duyulmaktadır (Donaldson, Murphy, Duffin, & Poland, 2010). MWCNT 'lerin fareler tarafından solunduklarında, subplevraya doğru göç ettikleri gösterilmiştir (Ryman-Rasmussen et al., 2009). Yüksek kristallik derecesine sahip ince MWCNT'lerin (çap ~ 50nm) in vitro' da mezotel hücre membranını delici etki gösterdikleri, toksisiteyi artırarak inflamasyon gözlemlendiği ve sonuç olarak MM gelişimini indüklediği gösterilmiştir (Nagai et al., 2011). Buna ilave olarak MWCNT'ler tarafından geliştirilen MM'lerde, Cdkn2a / 2b genlerinin sık homozigot delesyonları da gösterilmiştir (Sekido, 2013).

2.5.3.1-Aday MM yatkınlık geni; BAP1 (BRCA1-Associated Protein-1)

Son yıllarda Kromozom 3p21.1'e lokalize BAP1 inaktivasyonunun MM'nin patogeneğinde önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (Bott et al., 2011). Yapılan bir çalışmada 53 MM olgusunun 12'sinde (%23) BAP1 geninde somatik mutasyonlarına rastlanmıştır. Japon MM hastalarından yapılan diğer bir çalışmada ise BAP1 mutasyonlarının daha sık gözlemlendiği bildirilmiştir (Yoshikawa et al., 2012). BAP1, deubikitinleyici enzim sınıflarından biri olan nükleer ubiquitin C-uç hidrolazını kodlayan bir gendir. BAP1, kromatin dinamikleri, DNA hasar cevabı ve hücre döngüsünün ve büyümesinin düzenlenmesi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde görev almaktadır (Eletr & Wilkinson, 2011). Yakın tarihli çalışmalar, host cell factor 1 ve histon proteininin deubikitinasyonun, kromatin modifikasyonunda ve gen ekspresyonunda önemli roller oynayabileceğini göstermektedir. Histon modifikasyonunda, ASXL1 ile etkileşime girerek fonksiyon gösterir. Polycomb repressive deubikitinaz complex adı verilen bu yapı lizin 119'da (H2AK119) Monoubiquitinated histon 2A'nın deubikitinasyonuna aracılık eder. Bu kanıtlara dayanılarak, BAP1'in MM hücrelerinde Polycomb hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rolü olduğu öne sürülmüştür. BAP1'in germline mutasyonları, Mezotelyoma insidansı yüksek olan iki ailede ve bazı ailelerde Uveal melanom da dahil olmak üzere farklı tümör tiplerinde de tespit edilmiştir (J. R. Testa et al., 2011). BAP1'in 31 metastaz yapan Uveal melanomun 26'sında (% 84) sıklıkla mutasyona uğradığı gösterilmiş ve Melanositik tümörleri bulunan iki ailede BAP1'in germline mutasyonu tespit edilmiştir (Wiesner et al., 2011). Somatik BAP1 mutasyonu, berrak hücreli renal karsinomların % 15' inde de bulunmuştur (Peña-Llopis et al., 2012). Bu çalışmalar, BAP1'in çoğu dokuda önemli bir tümör baskılayıcı olduğunu ve onun germline mutasyonlarının Uveal ve Kutanoz Melanom, Mezotelyoma, Melanositik BAP1 mutasyonlu Atipik Intradermal Tümörler ve kansere bağlı birçok sendromda nedensel bir role sahip olabileceğini göstermektedir (Sekido, 2013).

2.6-Benign Asbestos Plörizisi (BAP)

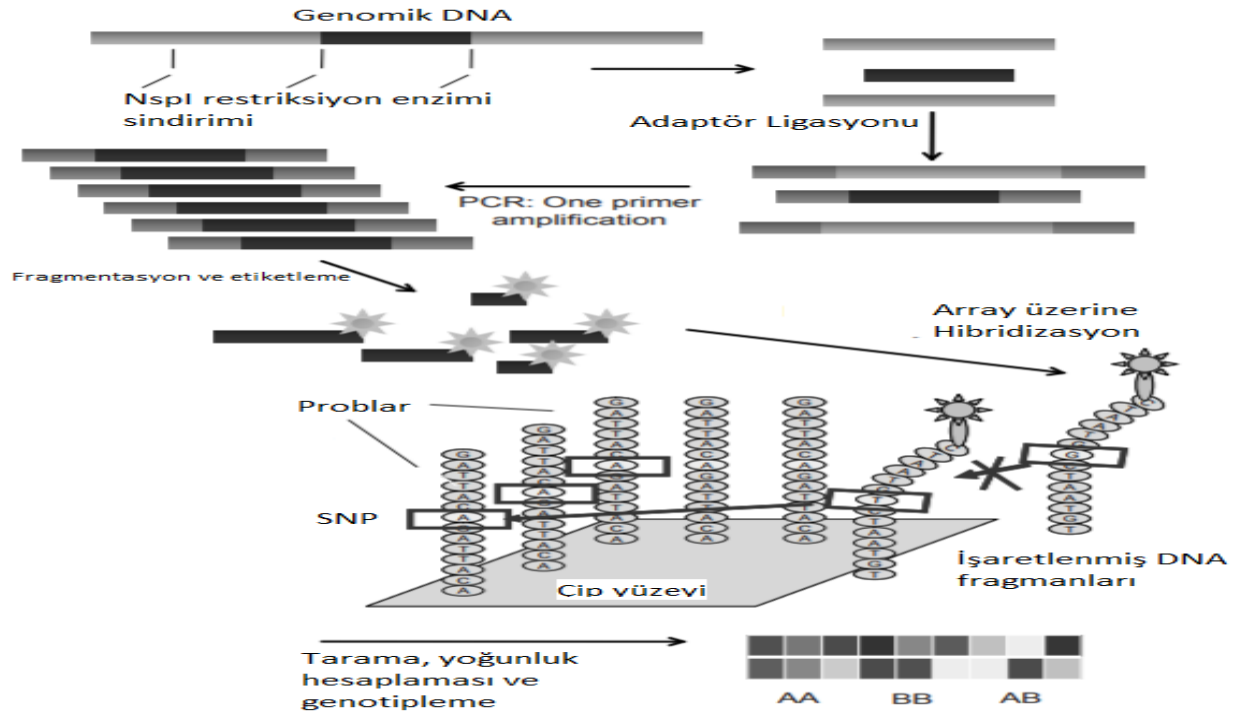
Benign asbest plörizisi, göğüs boşluğu ve akciğerleri saran bir membran olan plevranın asbest maruziyeti sonucu inflamasyonu olarak tanımlanır. Bunun sonucu olarak keskin bir ağrı hissi ve nefes alma zorluğu oluşur. Asbest lifleri, benign ve malign hastalıklara neden olabilecek doğal, henüz net bir şekilde açıklanamayan plevra yönelimine sahiptir. Benign asbest plevra hastalıkları, çalışma grubumuzda da olan benign asbest plözilerinin yanında, plevra plakları, diffüz plevral kalınlaşmaları ve yuvarlak (rounded) atelektaziyi içerir (Light & Lee, 2008). Bu bozukluklar yaygın ve anormal akciğer fonksiyon ve semptomlarına neden olduklarından önemlidirler. Plevranın diğer hastalıklarına benzeyebilir ve tanısız belirsizliğe neden olabilirler. Ayrıca, Benign asbest ilişkili hastalıklar, başta kanser (MPM) olmak üzere plevral hastalıkların patogenezi altında yatan mekanizmaların anlaşılmasına yardımcı olabilir (Chapman, Cookson, Musk, & Lee, 2003).

2.7-SNP Array

Normal insan genomu, her otozomun iki kopyasını (kromozomlar 1-22), kadınlarda seks kromozomunun iki kopyasını (XX) veya erkeklerde cinsiyet kromozomlarının X ve Y (XY) 'lerinin birer kopyasını içerir. Bu iki allel, baba ve anne kökenlidir ve DNA diziliminde yaklaşık % 99.9 aynıdır. İki allel arasındaki fark, genetik bir varyasyon olarak adlandırılır ve özellikle Tek Nükleotid Polimorfizmlerini (SNP- Single Nucleotide Polymorphisms) olarak ifade edilirler. Baba ve anne allellerin özdeş nükleotidleri varsa bir SNP homozigot olarak, baba ve anne allellerin farklı nükleotidlere sahip olması heterozigot olarak ifade edilir. Bir genomdaki SNP durumu, homozigot (iki özdeş nükleotid) veya heterozigot (ayrı nükleotidler) olarak tanımlanır. Küçük allel frekansı (minor allele frequency) en az bir popülasyonda % 1'i aşarsa, tek nükleotid varyasyon SNP olarak belirlenir; aksi takdirde buna varyant veya mutasyon denir. Homozigot SNP'ler iki allelin birbirinden ayrılmasına izin vermediğinden non informatif olarak kabul edilirler (Popova et al., 2013). Şu anda dbSNP veritabanında 30 milyona yakın SNP kayıtlıdır (Sherry et al., 2001). Basitçe SNP array analizleri, bu SNP'lerin genotiplenmesi sayesinde kopya sayısı azalmasının (delesyon) veya artışlarının (amplifikasyon) belirlenmesi şeklinde olur. Kanser genomu anormal genomik içerik ile karakterizedir; yani kromozom sayısı ve yapıları normal durumdan farklıdır. Kopya sayısındaki değişim, iki alelden birinin (ya da her ikisinin birden, homozigot delesyonu) kayıplarından, bir ya da iki allelin birkaç kopyasına kadar kazanımlardan ve kopyanın nötr LOH'den kaynaklanmasına bağlıdır (Uniparental disomi) (Albertson, Collins, McCormick, & Gray, 2003).

SNP'lerin farklı allelleri, SNP arrayler gibi diziye özgü oligonükleotid DNA mikroarrayleri ile saptanabilirler. Gen ifadesi mikroarraylerinin üretilmesine benzer şekilde, farklı SNP allellere homolog dizi özellikli oligonükleotidler,

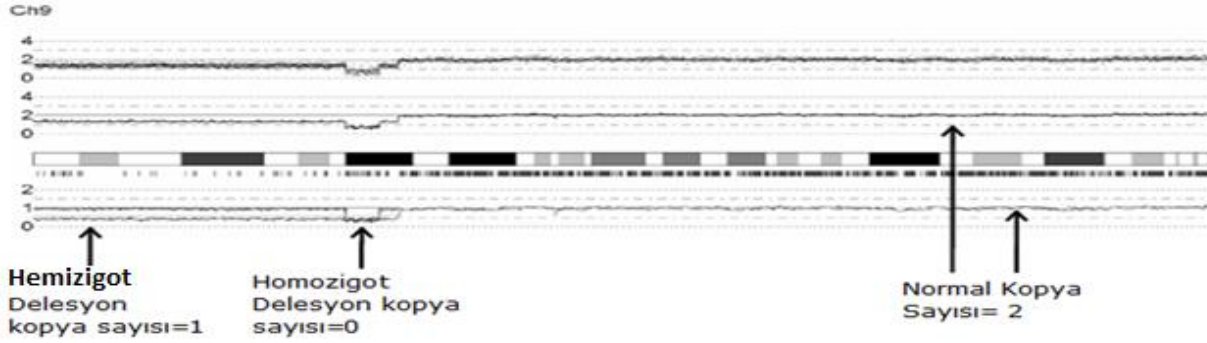
fotolitografik yöntemlerle (örneğin; Affymetrix, Santa Clara, CA, ABD) gen çipleri üzerinde sentezlenebilir (D. Nowak, Hofmann, & Koeffler, 2009). Daha fazla güvenilirlik için, tam baz eşleşmeleri veya sadece birkaç baz mismatch içeren birden fazla farklı prob ile kombine olarak, SNP genotiplenmesi yapılabilir. Bu prob dizilerine hibridize olmak üzere, yüksek derecede saflaştırılmış genomik DNA, restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek parçalara ayrılır ve ardından adaptör ligasyonu gerçekleştirilir. Ardından tek primer ile gerçekleştirilen PCR ile elde edilen PCR ürünlerinden sadece belirli büyüklüğü olanlar seçilir ve reaksiyonlar bu ürünler üzerinden devam eder. Sonraki basamakta bu seçilmiş PCR ürünleri fragmente edilir ve fluorokrom ile işaretlenir. İşaretlenen fragmentler array üzerine hibridize edilirler. Genotiplerine bağlı olarak, fragmanlar, kendi dizilerine karşılık gelen probuna spesifik olarak bağlanırlar. Array üzerindeki bu fragmanlardan kaynak alan flüoresan sinyali, çipe özgü bir tarayıcı ile ölçülür (D. Nowak et al., 2009)(Şekil 2.1).



Şekil 2.1: SNP array deney akış basamakları. (D. Nowak et al., 2009)

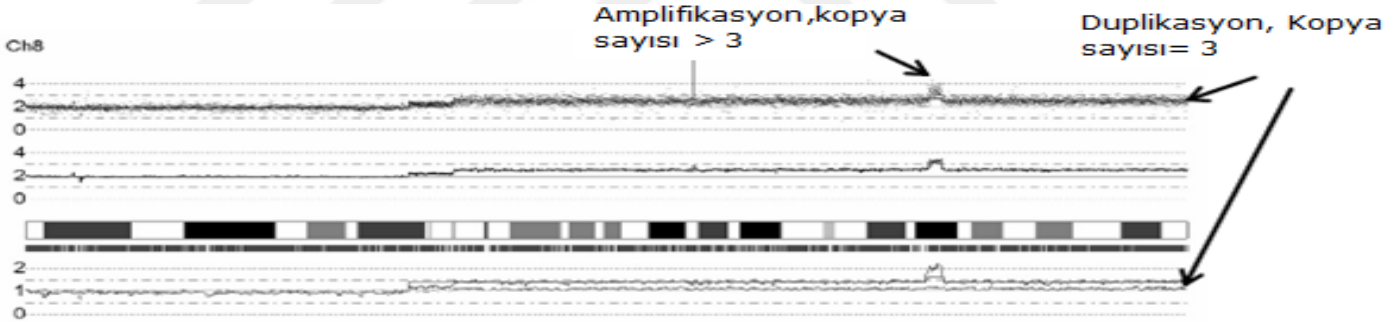
Modern mikroarrayler, bir dizide yaklaşık 1,800,000 SNP'ye kadar polimorfik olmayan kopya sayısı markerını kapsar ve 700 baza kadar hassasiyete indirdikleri için çözünürlükleri mega baz altına kadar düşebilir. SNP arraylerden elde edilen sinyal ölçümleri bizlere iki farklı bilgi türü sunar. Birincisi, tüm SNP'lerin yoğunluk verilerini içeren bir veri kümesidir. İnsan genomu diploid olduğu için yoğunluk değerleri, normalleştirildikten normal kopya sayısı olan ikiye yükseltilir. SNP arraylerle elde edilen genomik

materyalin homozigot olarak delesyonu, kopya sayısında sıfır, heterozigot delesyonu ise 1 kopya sayısı sonucunu doğurur (Şekil 2.2). Basit olarak SNP arrayler sayesinde kopya sayısı tayini bu şekilde yapılır.



Şekil 2.2: SNP array sonucu elde edilmiş 9. Kromozomu etkileyen örnek delesyon görüntüleri. Sırasıyla hemizigot (1 kopya delesyon 1 kopya normal), homozigot delesyonlar (2 kopya delesyon) normal kopya sayısı olan 2' nin altında sinyallerin alınması sayesinde tespit edilmiştir. Şekil kaynak:(D. Nowak et al., 2009)

Amplifikasyonlar ise delesyon tespitinin tam tersi mantıkla problemlerden elde edilen sinyal yoğunluğu fazlalığına göre belirlenir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: SNP array sonucu elde edilmiş 8. Kromozomu etkileyen örnek amplifikasyon görüntüleri. Problemlerden alınan sinyal normal kopya sayısı olan 2 nin üstünde 3 olarak saptanmıştır. Şekil kaynak: (D. Nowak et al., 2009)

Bu kopya sayısı artışları, belirli bir SNP markerı sayesinde ve kopya sayısı markerları aracılığıyla belirlenir. Tüm SNP'lerin genoma eşit olarak dağılmamasından, yeni mikro array platformlarında daha iyi bir kapsama sağlamak amacıyla polimorfik olmayan genomik bölgeler de kullanılmaktadır. Kopya sayısı verisine ek olarak, AA, AB veya BB şeklinde belirli SNPLerin genotip verisi de elde edilebilmektedir. Kopya sayısı verisi ile kombine olarak, SNP genotipleri kullanılarak heterozigotluk kaybı bölgeleri saptanabilir. Bu sayede, uniparenteal dizomi kaynaklı kopya nötr heterozigotluk kayıpları belirlenebilir (D. Nowak et al., 2009). Uniparenteal dizomi, bir alel delesyona uğradığında ve diğeri amplifiye olduğunda homozigot SNP genotiplerinin ortaya çıkması ile gerçekleşebilir. Bu gibi bölgeler delesyonlar sonucu oluşan

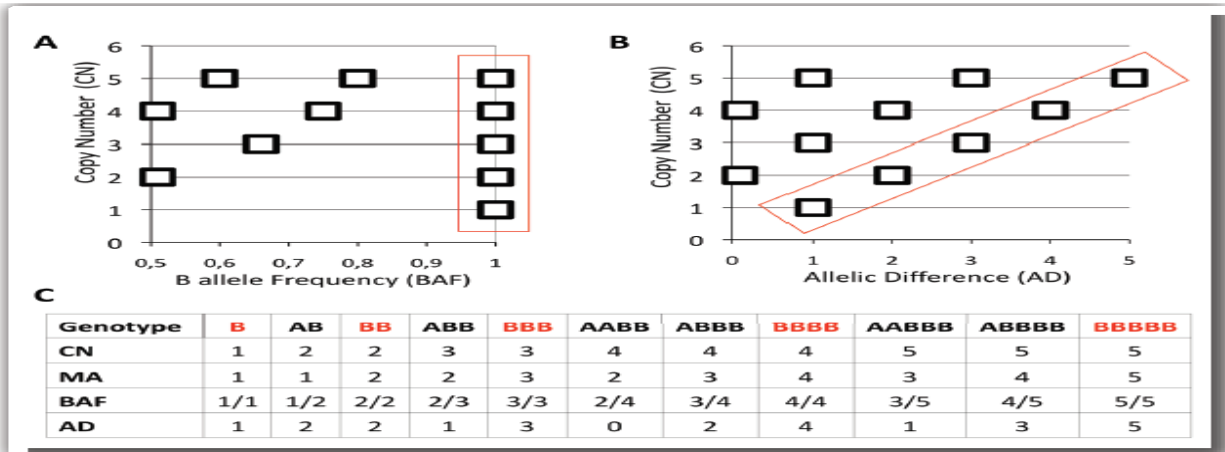
heterozigotluk kaybı bölgeleri gibi kanser araştırmaları için önem arz ederler. Çünkü bu tarz değişime uğrayan bölgeler, bir tümör süpressör genin veya onkogenin normal alelinin kaybolmasına neden olup hücrenin kanserleşmesine neden olabilir. SNP arrayler, bu gibi genomik lezyonları yüksek çözünürlükte tespit edebildikleri için diğer klasik sitogenetik yöntemlere nazaran araştırmacılara büyük avantajlar sağlamaktadır (D. Nowak et al., 2009).

Kanser genomunda kaybedilen veya kazanılan allel, hastanın ebeveyni genotiplendirilmedikçe esasen bilinmemektedir (ebeyn genotiplendirilmesi, tümör genomik çalışmalarında yaygın bir uygulama değildir). Bu nedenle alleller, A ve B olarak olarak belirlenmiştir ve tümör genomundaki allelik içeriğin karakterizasyonu, kopya sayısı (CN) ve majör alel (MA) sayılarını gösterilmesi ile yapılır (örneğin, CN = 3 ve MA = 2, genotip AAB'ye karşılık gelir ve ABB "üçünden iki özdeş allel" olarak tanımlanabilir). Allelik içerik, Major alel sayısının kopya sayısına oranı veya Major alel sayısı ile minör alel sayısı arasındaki farka denk gelen B Allel Frekansı (BAF) veya Allelic Difference (AD) ile tanımlanır. ($MI = CN - MA$) (Popova et al., 2013).

$$BAF = MA/CN = n_B^c/CN,$$

$$AD = MA - MI = n_B^c - n_A^c,$$

Yukarıdaki hesaplamada CN (copy number) kopya sayısı, n_B^c (B alelilinin sayısı), n_A^c (A alellinin sayısı) ile gösterilmektedir (B allel sayıları majör alel sayıları olarak kabul edilmektedir). Genomik durumları iki boyutta verilecek olursa allelik içerik x ekseninde, kopya sayısı y ekseninde yer almak üzere bir kanser genomunda gerçekleşebilecek tüm olası allelik içeriği Şekil 2.4' te gözlenmektedir. Monoallelik genomik durumlar (B, BB, BBB, vs. tablo içinde kırmızı ile işaretlenmiştir) aynı zamanda heterozigotluk kaybı olan bölgeleri gösterilmektedir (Popova et al., 2013).



Şekil 2.4: DNA kopya sayıları için olası tüm allelik içerikler 1 kopyadan 5 kopyaya kadar numaralandırılmıştır (Popova et al., 2013).

Bir kanser genomunda SNP tabanlı teknolojiyle genetik değişikliklerin ölçülmesi, genomdaki birçok SNP lokusundaki allelik içeriğin ölçülmesinden oluşur. Teknoloji, her bir SNP lokusundaki A ve B allel sayısının mükemmel bir ölçümünü sağlayabilseydi, her bir genomik bölge, Şekil 5'te gösterilen genomik durumlardan birine tekabül eden değer çiftleri (CN, MA) ile karakterize edilebilirdi. Ancak henüz böyle bir teknoloji mevcut değildir. SNP array'ler (veya yeni nesil dizileme) tarafından saptanan genetik değişiklikler kopya sayısı varyasyonu (CNV) ve allelik dengesizlik (AI) profilleri olarak temsil etmektedir. Allelik dengesizlik profili, ölçülen profile uygulanan normalizasyona bağlı olarak, allelik içeriği BAF veya AD ile karakterize eder. Bu profiller, teknolojik gürültüden ve deneysel varyasyondan (biyolojik numunenin saklanması ve hazırlanmasından) etkilenir; ayrıca ölçülen tümör numunesi, normal genomun önemli oranda kontaminasyonuna sahiptir. Ölçülen tümör numunesi genellikle tümör ve normal stromal hücrelerin bir karışımıdır. Bu nedenle, ölçülen bağlı varyasyon profillerinin mutlak kopya sayıları ve majör allel sayılarıyla açıklanması sonucu elde edilen sonuçların yorumlanmasında bazı problemler yaşanabilmektedir. Bu yüzden tüm kanser genom analizleri diğer bir tüm genom metodunda doğrulanmalıdır (Popova et al., 2013).

2.8-Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)

Yakın zamanda geliştirilen Yeni nesil dizileme teknolojileri sayesinde gerçekleştirilen tüm genom, tüm ekzom ve tüm transkriptom yaklaşımları ile kanser genomu üzerine en kapsamlı veriler elde edilerek somatik farklılık spektrumları ve tüm alt klonal yapılar aydınlatılabilmektedir. (Greenman et al., 2012) (Meyerson, Gabriel, & Getz, 2010). Yeni nesil dizileme sayesinde kanser genom karakterizasyonu, mutlak kopya sayılarının çıkarılması, nokta mutasyonları ve geniş çaplı kromozomal yeniden düzenlenmeler gibi genomik değişimlerin saptanabilmektedir (Popova et al., 2013).

Yeni nesil dizileme, basitçe, single-end veya paired end okumalardan elde edilen DNA dizi bilgisinin referans bir genoma göre hizalanıp, haritalanması ile gerçekleştirilir. Her genomik pozisyon kısa fragmentlerden oluşan okumalardan (reads) elde edilen dizilerle belirlenir. Genom kapsamındaki, ortalama okuma sayılarından CNV profilleri çıkarılabilir, ayrıca bilinen SNP pozisyonlarını içeren SNP okumaları, BAF profillerinin çıkarılmasını da sağlar (Nielsen, Paul, Albrechtsen, & Song, 2011).

Yeni nesil dizileme, tüm genom karakterizasyonu için güçlü bir araçtır ve onkogeneze neden olan somatik mutasyonların kapsamlı bir şekilde incelenmesini sağlar. Çoğu yeni nesil dizileme yöntemi, platforma özgü DNA fragmanı kütüphanelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonuna dayanır ve bu fragmanlar daha sonra dizilenir. Elde edilen sonuçlar, kanserdeki genomik değişikliklerin tam spektrumunu algılayabilecek kapasiteye ulaşabilir (Daniels et al., 2012).

Yeni nesil dizileme tüm genom, ekzom, transkriptom ve epigenom uygulamalarıyla geniş araştırma olanakları vermesinin yanında çeşitli kanser türlerinde hasta yaklaşımlarını da değiştirmektedir. Bu yeni teknolojinin sonuçları, güncel kanser kaynaklı yolak bilgilerine dönüşecek ve kanserin tanı ve tedavisinde moleküler hedeflerin bulunmasını sağlayacaktır. Kanser türlerinde somatik mutasyonlar yeni nesil dizileme yöntemleri tarafından tespit edilmekte ve birçok geniş çaplı genomik çalışma devam etmektedir. Yeni nesil dizileme sayesinde elde edilen kişiye özel tedavi stratejileri, hastaya faydası az tedavilerin masraflarını ve morbiditelerini önlerken, mevcut tedavilerden de yararlanma olasılığını iyileştirmektedir (Daniels et al., 2012).

Kanserde yeni nesil dizileme ile saptanan aday driver ve passenger mutasyonlar arasında ayırım yapmak, verilerin dikkatle yorumlanmasını gerektirmektedir. Sonuçların yorumlanmasındaki zorluklar, DNA ekstraksiyonunun kalitesi, numune işleme teknikleri ve tümör içeriği için kullanılan numunelerin tiplerinden kaynaklanabilmektedir. Tümör heterojenitesi, onkogenezde yer alan mutasyonları saptamak için analizlerde güçlük yaratabilmektedir. Yeni nesil dizilemenin, bu tür zorlukların aşılmasını sağlayarak elde edilen verilerin, biyolojik ve klinik etkilerinin araştırılmasını kolaylaştıracağı düşünülmektedir (Daniels et al., 2012).

3-GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1-Doku Örneklerinin Toplanması Ve DNA izolasyonu

3.1.1-Çalışma Grubu ve Biyolojik Örneklerin Eldesi

Bu tez çalışmasında, Sağlık Bakanlığı Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen "Mineral Lifleriyle Çevresel ve Mesleki Temasın Yol Açtığı Akciğer Patolojilerinin Yönetimine Yönelik İşbirliği Ağı Projesi" kapsamında toplanan hasta verileri ve biyolojik ürünler kullanılmıştır. Söz konusu proje kapsamında, ESOGÜ Tıp Fakültesi Göğüs hastalıkları Anabilim Dalı'na daha önceki yıllarda müracaat eden hastalardan alınan plevra dokuları kullanılmıştır. Bu dokular, ESOGÜ Akciğer ve Plevra Kanseri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (APKAM) -80°C'de saklanmışlardır. Bu doku örneklerinden, MPM tanısı konulmuş, yaş ortalaması 62,9 olan 55 bireye ait plevral tümör dokusu hasta grubumuzu (Malign grup) oluşturmaktadır. Benign grup içinse, asbest maruziyeti olan fakat hayatlarında MPM gelişimi gözlenmemiş, yaş ortalaması 57,05 olan 18 adet Benign Asbest ilişkili Plörizili (BAP) bireyden elde edilen plevral doku örnekleri kullanılmıştır. Hasta grubu doku örnekleri iğne biyopsisi veya torakoskopik biyopsi yöntemleriyle elde edilmiştir, patolojik olarak tanıları ESOGÜ Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında konulmuştur. Bu tez çalışması ESOGÜ BAP B tipi projesi ile (proje no: 201311035) desteklenmiş, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 80558721/265 sayılı ve 29.08.2013 tarihle etik kurul onayı almıştır. Bu çalışma bünyesinde gerçekleştirilen TÜBİTAK 1002 projesi (Proje No: 115S819), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 80558721/89 sayılı ve 04.03.2015 tarihli etik kurul kararı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.1-Çalışma Grubunu Oluşturan Malign ve Benign Gruplar

Çalışma grubumuzdaki Malign ve Benign Gruplara özgü bazı özellikler (Örnek sayıları, Histolojik tip, yaş, cinsiyet gibi) Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışma grubumuzdaki Malign ve Benign Gruplara özgü bazı özellikler

Hastalık Grubu	Erkek	Kadın
MPM n=55		
<i>Epiteloid</i> n=41	23	18
<i>Miks</i> n=6	2	4
<i>Belirsiz</i> n=5	2	3
<i>Sarcomatoid</i> n=3	1	2
BAP n=18	15	3

3.2-YÖNTEMLER

3.2.1-Dokudan DNA İzolasyon Yöntemi

Malign ve Benign grupların plevral dokularından ticari DNA izolasyon kiti (Invitrogen Purelink Genomic DNA kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) ile dokudan DNA izolasyon prosedürü kullanılarak genomik DNA elde edilmiştir. Kit yönteminde belirtildiği üzere, DNA elde edilecek doku örneklerinin ağırlıkları 25 mg' ı geçmeyecek şekilde ayarlandı. Buzdolabından alınan örneklerin ağırlıkları hassas tartıda kontrol edildikten sonra hızlıca steril bistüri ile daha küçük parçalara ayrıldı.

Memeli Dokusu Lizat Hazırlanışı

1. Su Banyosu 55 C° ye getirildi.
2. Parçalanmış doku steril mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
3. Tüpe 180 µl Purelink Genomik Digestion Buffer ve 20 µl Proteinaz K eklendi.
4. 55 C' deki su banyosunda 1-4 saat süresince ve arada vortex yapılarak inkübasyon yapıldı.
5. Oda ısısında, maksimum hızda, 3 dakika boyunca santrifüj yapıldı, süpernatant yeni, steril mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.
6. 20µl RNAase eklendi, kısa vortexlerle karıştırıldı ve 2 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi.
7. 200 µl Purelink Genomik Lizis/ Binding buffer eklendi, vortex yapıldı.
8. Lizata, 200 µl %96-100 lık ethanol eklendi. 5 saniye boyunca vortexlendi.
9. Hızlıca DNA bağlama aşamasına geçilmiştir.

DNA Bağlama (Binding)

1. Purelink Genomik Lizis/ Binding Buffer ve ethanolle hazırlanmış lizati (yaklaşık 640 µl) spin columnma eklendi.
2. Column'u oda ısısında, 1 dakika, 10000 g' de santrifüj edildi.
3. Spin columnun içinde bulunduğu Collection tüp atıldı ve temiz bir Purelink Collection tüpe koyuldu.
4. Yıkama (Washing) DNA aşamasına geçildi.

Yıkama (Washing)

1. Temiz Collection tüp içindeki column içine 500 µl Wash Buffer eklendi.
2. Column' u oda ısısında, 10000 G'de, 1 dakika santrifüj edildi.
3. Collection tüp atıldı ve spin column temiz bir collection tüpe konuldu.
4. Column içine 500 µl Wash Buffer 2 konuldu.

5. Column' u maksimum hızda (15000 rpm), 3 dakika, oda ısısında santrifüj edildi.
6. Ayırıştırma (Eluting) aşamasına geçildi.

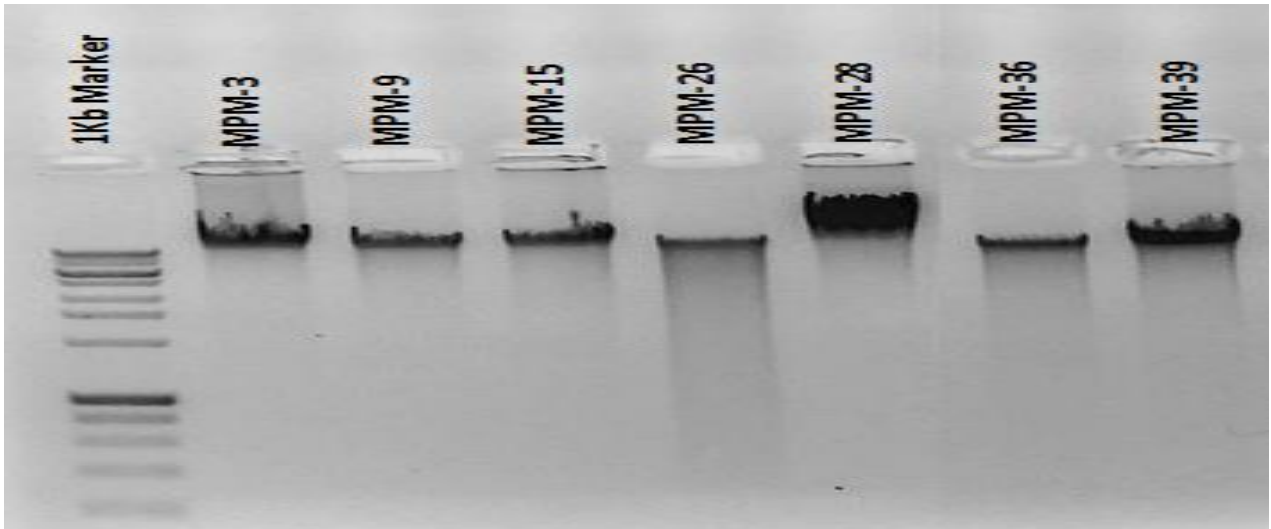
Ayırıştırma (Eluting)

1. Spin Column, steril 1.5 ml 'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
2. Column'a 50µl PureLink Genomik Elution Buffer eklendi.
3. Bir dakika boyunca, oda sıcaklığında bekletildi. Column'u maksimum hızda (15000 rpm), oda sıcaklığında, 1dakika boyunca santrifüj edildi.
4. Daha fazla DNA elde edebilmek için, aynı elution buffer miktarıyla (50µl) ikinci bir elüsyon basamağını yeni ve steril 1,5 µl mikrosantrifüj tüpünde gerçekleştirildi.
5. Column'u maksimum hızda, oda sıcaklığında, 1.5 dakika santrifüj edildi. Elüsyon yapılan iki ayrı 1,5. µl mikrosantrifüj tüpü birleştirildi.

Saklama (Storing) DNA

1. Purifiye edilmiş DNA -20 C° 'de saklandı.

Sürekli çözünme ve dondurma işleminden kaçınmak için DNA' yı 4 C° de saklanabilir. Elde edilen DNA hem jel elektroforezi (Şekil 3.1) ile hem de Nano Drop yöntemiyle miktar ve kalite kontrolleri yapılmıştır (Tablo 3.2). SNP array çalışması için gereken kriterleri sağlayan örnekler çalışmaya dâhil edilmiştir.



Şekil 3.1: İzole edilen DNA'ların jel elektroforezi ile degradasyon kontrollerinin yapılması.

Tablo 3.2: Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerden rastgele seçilen örneklerin NanoDrop Ölçüm değerleri.

Sıra no	Hasta	Miktar ng/µl	260/280 nm
1.	MPM 3	703 ng/µl	1.84 - 1.77 OD
2.	MPM 9	433 ng/µl	1.80 - 1.57 OD
3.	MPM 15	248 ng/µl	1.85 - 2.22 OD
4.	MPM 26	391 ng/µl	1.81 - 1.77 OD
5.	MPM 28	854 ng/µl	1.82 - 2.18 OD
6.	MPM 36	339 ng/µl	1.87 - 1.73 OD
7.	MPM 39	884 ng/µl	1.83 - 1.66 OD
8.	MPM 40	493 ng/µl	1.80 - 1.06 OD
9.	MPM 41	1200 ng/µl	1.78 - 2.04 OD
10.	MPM 42	319 ng/µl	1.87 - 1.67 OD
11.	MPM 46	646 ng/µl	1.85 - 1.97 OD
12.	MPM 69	490 ng/µl	1.83 - 1.59 OD
13.	MPM 312	510 ng/µl	1.87 - 1.74 OD
14.	MPM 1072	1000 ng/µl	1.78 - 1.61 OD
15.	MPM 110	740 ng/µl	1.88 - 1.47 OD

3.2.2-Tüm Genom SNP Array Çalışması

Tüm genom SNP array çalışmasında Affymetrix CytoScan HD çipleri kullanılmıştır. Bu çiplerin bünyesinde bulunan 750,000 polimorfik SNP markerı, 1900000 non-polimorfik CNV (copy number variation) markerı ile toplamda 2.690.000 markerın sağladığı yüksek çözünürlük sayesinde tüm genom çapında tarama yapıldı. Affymetrix CytoScan HD çiplerinde bulunan markerlar, tanımlanmış tüm kanser ilişkili genleri, RefSeq genlerini, X kromozom genlerini ve OMIM genlerini kapsayacak şekilde tasarlanmıştır. Çiplerin marker içeriği ve gen kapsama bilgileri Tablo 3.3' te verilmiştir. Bu sayede çalışmamızda tüm genom çapında yüksek çözünürlükte moleküler karyotipleme yapılmıştır. Çiplerin içeriğinde hem SNP (single nucleotide polymorphism) hem de CNV markerlarının kombine bir şekilde bulunması hem genotipleme hem de kopya sayısı varyasyonlarını, klasik sitogenetik, Array CGH yöntemlerine göre daha yüksek çözünürlükte saptamamıza olanak sağlamıştır. Bu iki farklı marker içeriği sayesinde Heterozigozite kaybı (LOH=Loss Of Heterozygosity) ve Uniparental Dizomi/UPD tarafından etkilenmiş bölgeler saptanabilmektedir. CytoScan HD çipleri, kapsamında bulunan genetik markerların dağılımı ve sayısı özellikle kanser genom taramalarına daha uygun olduğundan bu çalışmada tercih edilmiştir. Tüm genom SNP array çalışma yöntemi, kullanılan kimyasal malzeme ve cihazlar takip eden bölümde verilmiştir.

Tablo 3.3:Affymetrix CytoScan Hd çipleri içersindeki markerlar ve dağılımları.

Kopya Sayısı Analizi için Markerlar	Marker Sayısı
Toplam Kopya Sayısı Marker Sayısı	2696550
Non-polimorfik Markerlar	1953246
SNP Markerlar	743304
Genotiplenebilen SNP Marker Sayısı	749157
Referans Genom	hg19
Otozomal Markerlar	2491915
Psödootozomal Markerlar	4624
Intragenic Markerlar	1410535
Intergenic Markerlar	1286015
Ortalama Markerlar arası boşluk (Spacing) –baz çifti ölçeğinde	Baz çifti
Intragenik(aşağıda verilen genler için)	880
ISCA genleri	384
Kanser Genleri	553
OMIM Morbid Genleri	659
Refseq Genleri	880
Intergenik	1737
Tümünde	1148
Taranan Gen yüzdesi (100 kb başına 25 marker gelecek şekilde)	Kapsama Oranı
Kanser Genleri (n=526) OMIM	%100
X kromozom OMIM Morbid Genleri	%100
RefSeq Genleri (36121)	%96

Affymetrix CytoScan HD çipleri kullanılarak yapılan Tüm genom SNP array çalışma protokolü 9 ana aşamadan oluşur;

Restriksiyon Enzim Kesimi
Bağlanma (Ligasyon)
PCR
PCR saflaştırma (Pürifikasyon)
PCR Ürünlerinin Ölçümü
Parçalanma (Fragmantasyon)
İşaretleme
Hibridizasyon
Yıkama/Boyama/Tarama

3.2.2.1-Restriksiyon Enzim Kesimi

Not: DNA izolasyon basamağında elde edilip – 20 C’de bekletilen DNA ile çalışmaya başlandı. Başlangıç materyali olarak 50ng/µl gDNA (genomik DNA) kullanıldı. DNA stokları Low EDTA TE Buffer ile çözüldü.

Gerekli Malzemeler:

- CytoScan™ Reagent Kit
- *Nsp 1 Enzyme
- *10X Nsp1 Buffer
- *100X BSA
- *Water (Nuclease Free)

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikro santrifüj
- Mikropipet
- Vortex
- Thermal cycler

a) Buz üzerinde yapılan çalışma da uygun miktarlarda tampon, enzim ve BSA ile kesim karışımı hazırlandı. DNA kesim karışımı hazırlandı.

BİLEŞENLER	Miktar (1 reaksiyon için)
Nsp Buffer	2 µL
BSA	0.2 µL
Nsp Enzyme	1 µL
Su	11,55 µ
Toplam	14,75 µL

Genomik DNA (50 ng/μl)	5 μ l
Nsp Digest Master Mix	14,75 μ l
Toplam	19,75 μl

Thermal Cycler Programı: -Digest-

37°C	2 saat
65°C	20 dk
4°C	Hold

Bir sonraki aşamaya geçilmeyecekse örnekler -20°C'de saklanabilir.

3.2.2.2-Bağlanma (Ligasyon)

Gerekli Malzemeler:

-CytoScan™ Reagent Kit

- *T4 DNA Ligase Enzyme
- *10X T4 DNA Ligase Buffer
- * Adaptor, Nsp (50 μ M)

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikro santrifüj
- Mikropipet
- Vortex
- Thermal cycler

a) Buz üzerinde yapılan çalışma da uygun miktarlarda tampon, enzim ve adaptor ile ligate karışımı hazırlandı.

BİLEŞENLER	Miktar (1 reaksiyon)
T4 DNA Ligase Buffer	2.5 μ L
Adaptor Nsp	0.75 μ L
T4 DNA Ligase	2 μ L
Toplam	5.25 μL

b) Hazırlanan karışım toplam 19.75 μ L kesim yapılmış örnek içine eklendi ve aşağıdaki inkübasyon programında ligate reaksiyonu yapıldı.

Thermal Cycler Programı: -Ligate-

16°C	3 saat
70°C	20 dk
4°C	Hold

c) İnkübasyon sonrası örnekler 75µL nuclease-free su ile dilue edildi.

Bir sonraki aşamaya geçilmeyecekse örnekler -20°C'de saklanabilir.

3.2.2.3-PCR

Gerekli Malzemeler:

-CytoScan™ Reagent Kit

*Su (Nuclease Free)

*PCR Primer, 002 (100 µM)

-USB® MagniTaQ™ Multiplex PCR Master Mix (2X)

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikro santrifüj
- Mikropipet
- Vortex
- Thermal cycler

a) Dilue edilmiş ligate ürünü yine buz üzerinde PCR için hazırlandı. PCR için uygun miktarda yapılan karışım bir örnek için dört ayrı reaksiyon olacak şekilde hazırlandı.

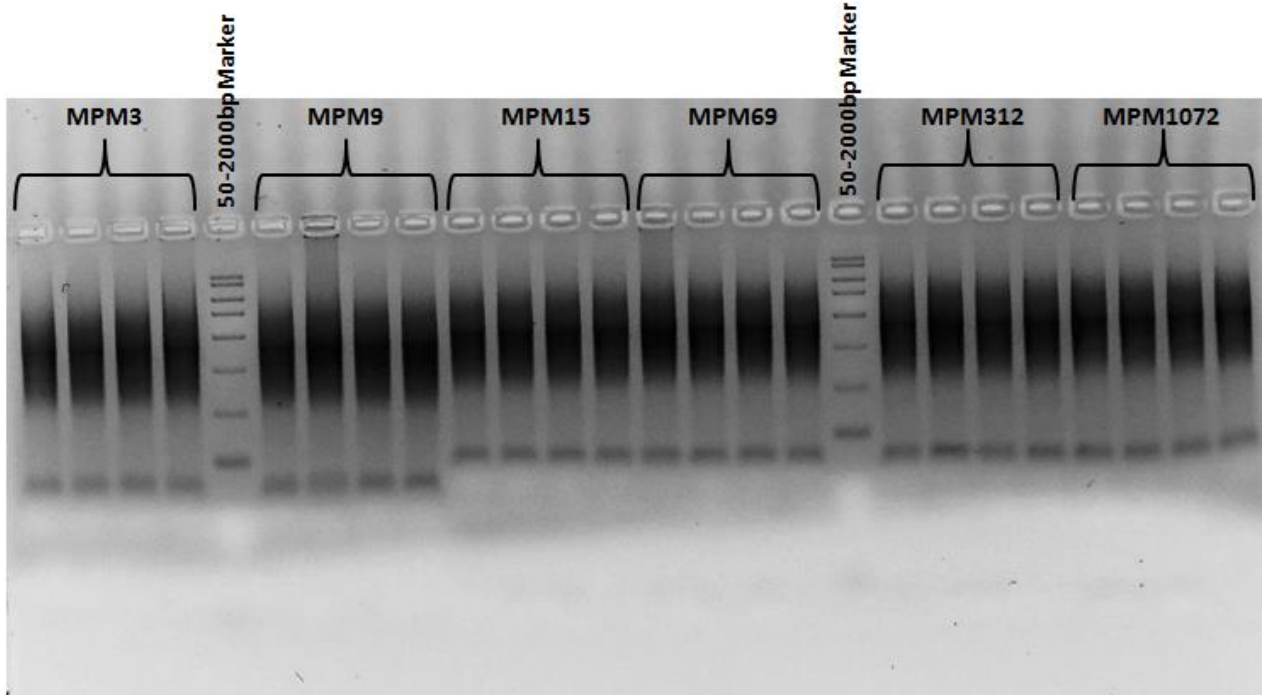
BİLEŞENLER	Miktar (1rxn)
dH₂O	35 µL
USB® MagniTaQ™ Multiplex PCR Master Mix (2X)	50 µL
Primer 002	5 µL
Toplam	90 µL

b) Aşağıda verilen programa uygun PCR işlemi uygulandı.

Thermal Cycler Programı: -PCR-

94°C	3dk	1X
94°C	30 sn	30X
60°C	45 sn	
68°C	15 sn	
68°C	7dk	1X
4°C	Hold	

c) PCR sonrası örnekler %2'lik TBE Agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. 200-1100 bp aralığında ürünler (smear şeklinde) görüntülendi ve bu değerleri taşıyanlarla çalışmada ileriki aşamalara geçildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: PCR sonrası ürünlerinin büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüleri.

3.2.2.4-PCR Pürifikasyon:

Gerekli Malzemeler:

CytoScan™ Reagent Kit

- *Purification Beads
- *Elution Buffer
- *Purification Wash Buffer
- *Water (Nuclease Free)
- Absolute Ethanol

Gerekli Ekipmanlar:

- Magnareck, magnetic stand (Invitrogen)
- Mikro santrifüj
- Mikropipet
- Vortex
- Thermal cycler

- a) Bir örneğe ait dört PCR amplikonu tek bir tüpte toplandı ve 720µL purification beads solüsyonu ile 10dk oda sıcaklığında bekletildi.
- b) Maksimum hızda (12000g) 3dk santrifüj yapıldıktan sonra magnetic stand üzerine alınan örnekten supernatan kısmı atıldı.
- c) Purification Wash Bufferdan 1mL alındı ve pellet şeklinde kalan DNA'ya bağlanmamış haldeki bead ile 2dk karıştırıldı.
- d) Maksimum hızda 3dk santrifüj yapıldıktan sonra magnetic stand üzerine alınan örnekten supernatan kısmı atıldı.
- e) Etanolün tamamen uçtuğundan emin olunduktan sonra 50µl Elution Buffer ile elüsyonu yapıldı ve DNA geri elde edildi.

Bir sonraki aşamaya geçilmeyecekse örnekler -20°C'de saklanabilir.

3.2.2.5-PCR Ürünlerinin Ölçümü:

Gerekli Ekipmanlar:

- Nanofotometre

- a) Pürifiye edilen amplikonların konsantrasyonları nanofotometre ile ölçüldü.

b) Elde edilen PCR ürünü 2500-4000ng DNA içermelidir. Bu sınır dışında kalanlar için PCR aşaması tekrar edildi. Elde edilen değerlere ait birkaç örnek tabloda gösterildi (Tablo 3.4).

Tablo 3.4:Hasta örneklerine ait (MPM kodlu) PCR ürünlerinin pürifikasyon sonrası saflık ve konsantrasyon ölçümlerine göre uygun miktar ve kalitede olanlara örnek değerler.

Örnek No	Hasta No	PURİFİKASYON SONUCLARI (260/280 nm)
1	MPM - 2	3911 ng/µl 1.84 - 2.27 OD
2	MPM - 3	3851 ng/µl 1.83 - 2.26 OD
3	MPM - 9	3663 ng/µl 1.84 - 2.30 OD
4	MPM - 15	3970 ng/µl 1.85 - 2.29 OD
5	MPM - 26	3391 ng/µl 1.82 - 2.31 OD
6	MPM - 28	3532 ng/µl 1.88 - 2.30 OD
7	MPM - 35	3240 ng/µl 1.88 - 2.31OD
8	MPM - 36	3814 ng/µl 1.84 - 2.28 OD
9	MPM - 39	3653 ng/µl 1.87 - 2.33 OD

3.2.2.6-Fragmantasyon:

Gerekli Malzemeler:

- CytoScan™ Reagent Kit**
- *Fragmentation Reagent
- *10X Fragmentation Buffer
- *Water (Nuclease Free)

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikro santrifüj
- Mikropipet
- Vortex
- Thermal cycler

a) Fragmentasyon, enzimatik bir reaksiyon olup zamana ve sıcaklığa duyarlıdır. Bu nedenle tüm çalışma buz üzerinde yapıldı.

b) Kit içindeki Fragment reagentın ünitesine göre aşağıdaki gibi dilüsyonu yapıldı. Purifiye edilen bu karışımdan 10 µL örnek içine konuldu.

BİLEŞENLER	Miktar (2U/µl)
Frag Buffer	158.4 µL
Frag Reagent	7.2 µL
Nuclease-free su	122.4 µL
Toplam	288 µL

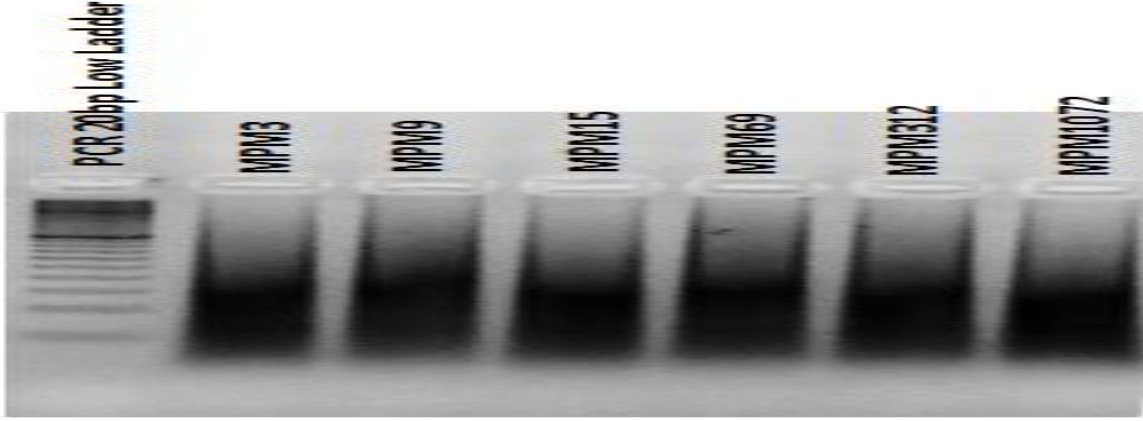
c) Örnek 25-125bp uzunluğunda fragmentlere ayrılmak üzere uygun thermal cycler programında aşağıdaki koşullarda inkübasyona bırakıldı.

Thermal Cycler Programı (Frag)

37°C	35 dk
95°C	15 dk
4°C	Hold

d) İşaretleme basamağına geçilmeden fragmentlerine ayrılmış olan örnek %4'lük TBE Agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 3.5).

e) Örnek bekletilmeden diğer basamağa geçildi.



Şekil 3.3: Fragmantasyon Sonrası Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntüleme (FRAG)

3.2.2.7-İşaretleme

Gerekli Malzemeler:

-CytoScan™ Reagent Kit

- *DNA Labeling Reagent (30 nM)
- *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Enzyme
- *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Buffer

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikro santrifüj
- Mikropipet
- Vortex
- Thermal cycler

a) Uygun miktarlarda Labeling Reagent, TdT Buffer ve TdT kullanılarak reaksiyon için bir karışım hazırlandı ve örneğin üzerine eklendi.

BİLEŞENLER	Miktar (1rxn)
TdT Buffer	14 µL
Labeling Reagent	2 µL
TdT	3.5 µL
Toplam	19.5 µL

b) Thermal cycler programında reaksiyon gerçekleştirildi.

Thermal Cycler Programı -Label-

37°C	4 saat
95°C	15 dk
4°C	Hold

3.2.2.8-Hibridizasyon

Gerekli Malzemeler:

-CytoScan™ Reagent Kit

- *Hyb Buffer Part 1
- *Hyb Buffer Part 2
- *Hyb Buffer Part 3
- *Hyb Buffer Part 4
- *Oligo Control Reagent 0100

Gerekli Ekipmanlar:

- Mikro santrifüj
- Mikropipet
- Vortex
- Thermal cycler
- GeneChip® Hybridization Oven 645

a) Arrayler oda sıcaklığına getirildi.

b) İşaretlenmiş örnek üzerine hibridizasyon karışımı eklendi ve thermal cycler programında inkübasyona bırakıldı.

BİLEŞENLER	Miktar (1rxn)
Hyb Buffer Part 1	165 µl
Hyb Buffer Part 2	15 µl
Hyb Buffer Part 3	7 µl
Hyb Buffer Part 4	1 µl
PCR	2 µl
Toplam	190 µl

Thermal Cycler Programı -Hyb-

95°C	10 dk
49°C	5 dk
49°C	Hold

Hibridizasyondan sonra DNA'nın tek dallı hale gelmesi için kısa bir denatürasyon aşaması gerçekleştirildi (95°C, 10dk).

- c) Hibridizasyon reaksiyonu bittiğinde, arrayler içine denaturasyonu tamamlanmış DNA enjekte edildi ve 18 saat 50°C sıcaklıkta 60rpm rotasyonla inkübasyona bırakıldı.

3.2.2.9-Yıkama/Boyama/Tarama

Gerekli Malzemeler:

-CytoScan™ Reagent Kit

- *Stain Buffer 1
- *Stain Buffer 2
- *Array Holding Buffer
- *Wash A Buffer
- *Wash B Buffer

Gerekli Ekipmanlar:

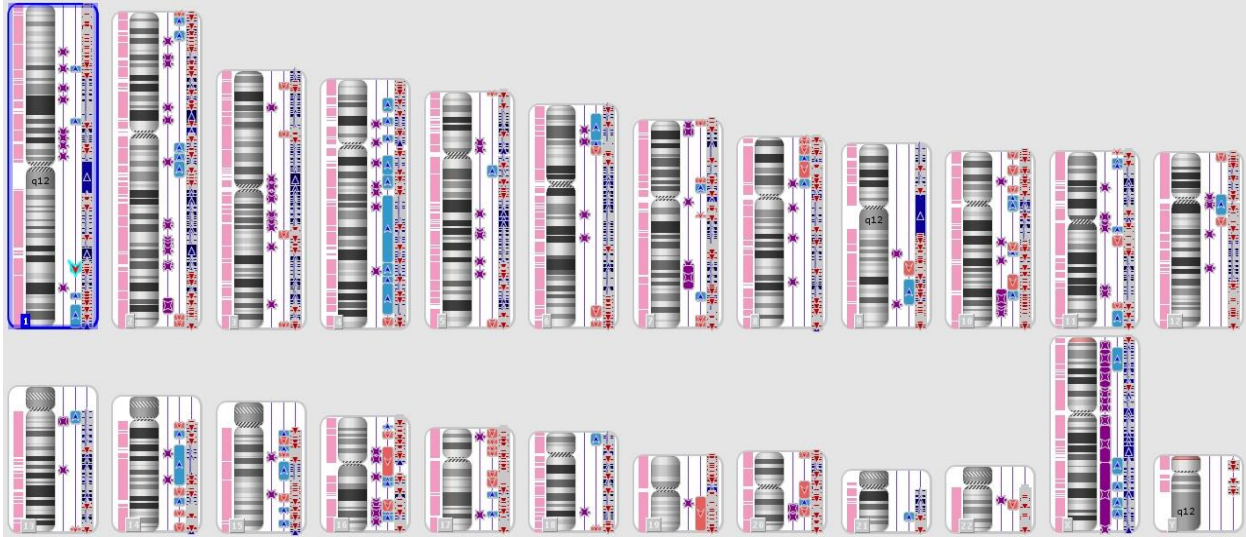
- GeneChip® Fluidics Station 450
- GeneChip® 3000 Scanner 7G

- a) Hibridizasyon tamamlanmadan önce gerekli solüsyonlardan uygun miktarlarda alınarak yıkama ve boyama için hazırlandı.
- b) Yıkama istasyonunda birinci ve ikinci boyama solüsyonları için Stain Buffer 1 ve Stain Buffer 2 den 500µl, son tüpe de Array Holding Bufferdan 800µl konuldu.
- c) Yıkama İstasyonunun uygun yerlerine bu solüsyonlar ve array yerleştirildi. Bilgisayar kontrolündeki yıkama-boyama protokolü başlatıldı.
- d) Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra yine sistem bilgisayarı kontrolünde tarama işlemi yapıldı ve ham veri elde edildi.

3.2.3-SNP Array Çiplerin Taranması Sonucu Elde Edilen Ham Verilerin Analizi İçin Kullanılan Programlar

3.2.3.1-Chromosome Analysis Software (Chas) 3,1

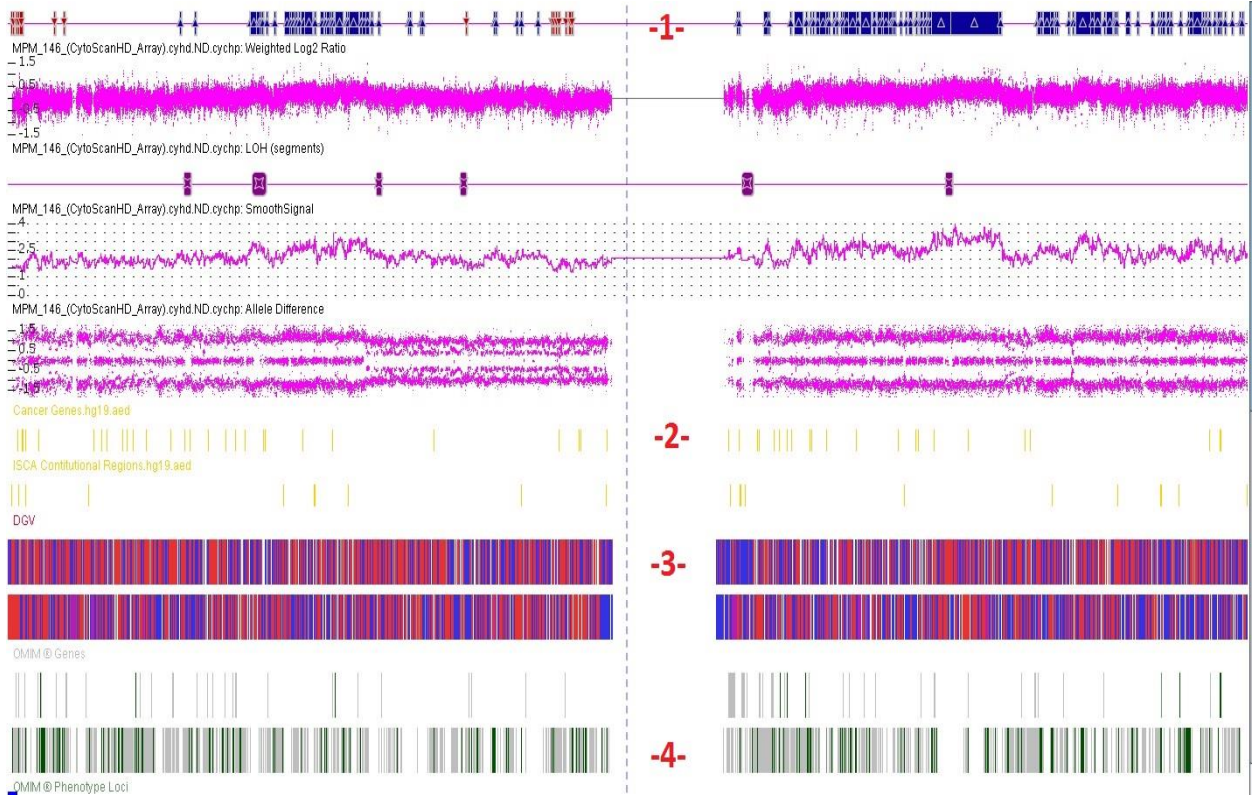
Array çiplerinin tarama işleminden sonra CEL dosya formatında elde edilen ham veriler Chromosome Analysis Software (Chas) 3,1 programında genomik anomalilerin gözlenebilmesi amacıyla Cytoscan HD_Array Diploid Analiz NA33 algoritmi kullanılarak CYPCHP dosyalarına dönüştürüldü. Bu analiz yapılırken CytoScanHD_Array.na33.r2.REF_MODEL modeli referans alınmış, anotasyon içinse, CytoScanHD_Array.na33.annot.db kullanıldı. Bu algoritim, kanser genom çalışmalarında önerilen dosya işlemi algoritmi olarak en uygun yöntem olduğu için seçildi. Hasta ve kontrol bireylerine ait CYPCHP formatına çevrilen dosyalar sayesinde genomik kopya sayısı değişimleri (delesyonlar, amplifikasyonlar) ve heterozigosite kayıpları, 22 otozom ve X,Y kromozomları şeklinde gözlenir hale getirildi (Şekil 3.4). Chas 3.1 programı analizinde referans genom olarak NetAffx Build (hg19)/GRCh37 (Genome Reference Consortium human genome build 37) kullanıldı.



Şekil 3.4: Chas 3.1 programında bir hastaya ait CYPCHP dosyasının analizi sonucunda elde edilen genomik anomalilerin tüm genom boyunca görüntülenmesi. (moleküler karyotip)

Aynı program sayesinde, genomik anomali (Delesyon=kırmızı, Amplifikasyon=mavi, Heterozigozite kaybı=mor) bölgelerine denk gelen kromozomal pozisyonlar ve içerdikleri gen bölgeleri detaylı bir biçimde gösterildi. Ayrıca Chas sayesinde, bu bölgelere ait şu ana kadar hastalıklarla ilişkilendirilmiş lokuslar ve kopya sayısı varyasyonlarıyla ilgili bilgilere literatürleriyle birlikte ulaşılabilmektedir. Bu detaylı analiz sayesinde özellikle kanser ile ilişkilendirilmiş gen bölgeleri yüksek çözünürlükte incelenmekte ve

yapısal anomali görülür hale getirilmektedir (Şekil 3.5). Chas 3,1 programında, Genomik anomalilerin belirlenmesi ve gözlenmesi için eşik değerleri olan, Genomik kazanım (gain), genomik kayıp (loss) için 50 marker ve 400 kb (kilobaz) olarak kabul eden standart segment filtre ayarları seçildi. Heterozigotluk kayıpları (LOH) içinse en az 50 marker ve 3mb (megabaz) büyüklük seçildi.



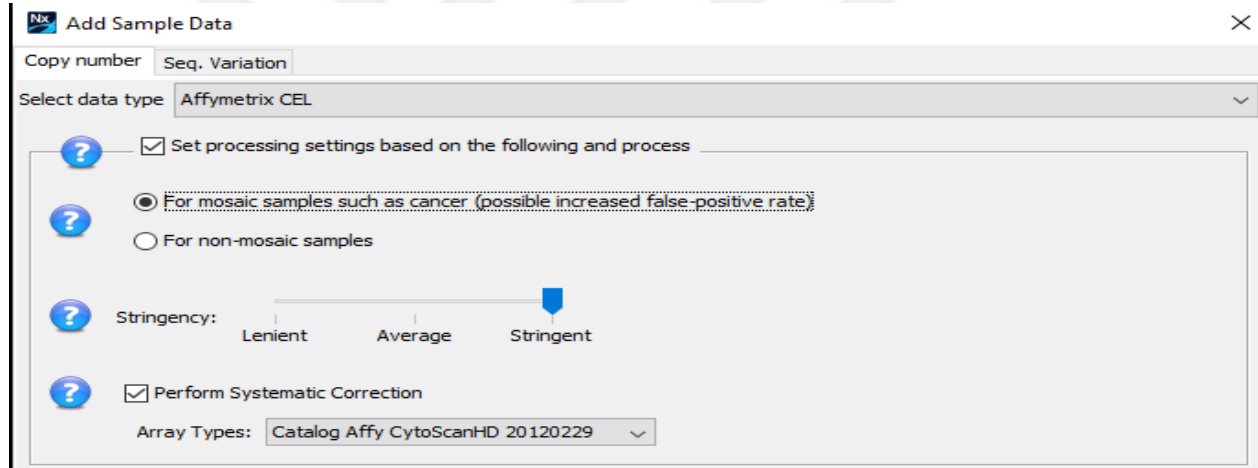
Şekil 3.5: Bir hastaya ait 1. Kromozomdaki bazı genomik anomaliler. Chas 3.1 detaylı analiz kısmında kromozomal bölgelere denk gelen delesyonlar (kırmızı), amplifikasyonlar (mavi), heterozigote kayıpları (mor) 1. Panelde gözlenmektedir. 2. Panelde ise ilgili kromozomal bölgedeki genler gözlenmektedir (Cancer genes ve ISCA constitulal genes). Bu sayede saptanan genomik anomalinin hangi genin yapısını etkilediği anlaşılabilir. 3. Panelde ise daha önceki çalışmalardan elde edilmiş kopya sayısı varyasyonları (DGV-DataBase of Genomic Variants) verilmiştir. Bu sayede kendi çalışmamızdan elde ettiğimiz veriyi kolayca literatürle karşılaştırma şansımız olmaktadır. 4. Panelde ise OMIM (Online Inheritance of Man) fenotip Loci bilgisi yer almaktadır. Burada OMIM veritabanı kullanılarak ilgili kromozomal bölgenin hangi hastalık fenotipi ile ilişkilendirildiği bilgisine ulaşabilmekteyiz.

Chas 3,1 sayesinde genomik anomaliler detaylı bir biçimde görünür hale gelmekte ve incelenebilmektedir. Fakat bu programın, hem Malign hem de Benign gruplar arasındaki anomali sıklıkları ve kalıplarının benzerlik veya farklılıklarının tayin edilmesinde yeterli olmadığı görüldü. Bunun üzerine anomali sıklıklarının ve gruplar arasındaki farklılıkları daha detaylı analizini yapabilecek bir programa ihtiyaç duyuldu. Bu yüzden hem gruplar içinde hem

de arasında detaylı analiz yapılabilmesi için Nexus Copy Number Discovery Edition 7,5 adlı biyoinformatik programı kullanıldı.

3.2.3.2-Nexus Copy Number Discovery Edition 7,5

Nexus Copy Number for Affymetrix Discovery Edition sayesinde, genomik anomaliler malign ve benign grupları birlikte karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu sayede hasta grubunda sık rastlanan genomik anomaliler ile malign, benign grupları birbirinden ayıran genomik anomaliler saptanmıştır. Kanser genomunun heterojenitesi ve içerdiği mosaisizm durumdan dolayı yanlış pozitif sonuçların da elde edilme olasılığı vardır. Bu durumu engellemek için CEL dosyalarından elde edilecek genomik anomali analizinde en sıkı (stringent) ve kanser çalışmalarına en uygun ayarlar kullanıldı (Şekil 3.6).



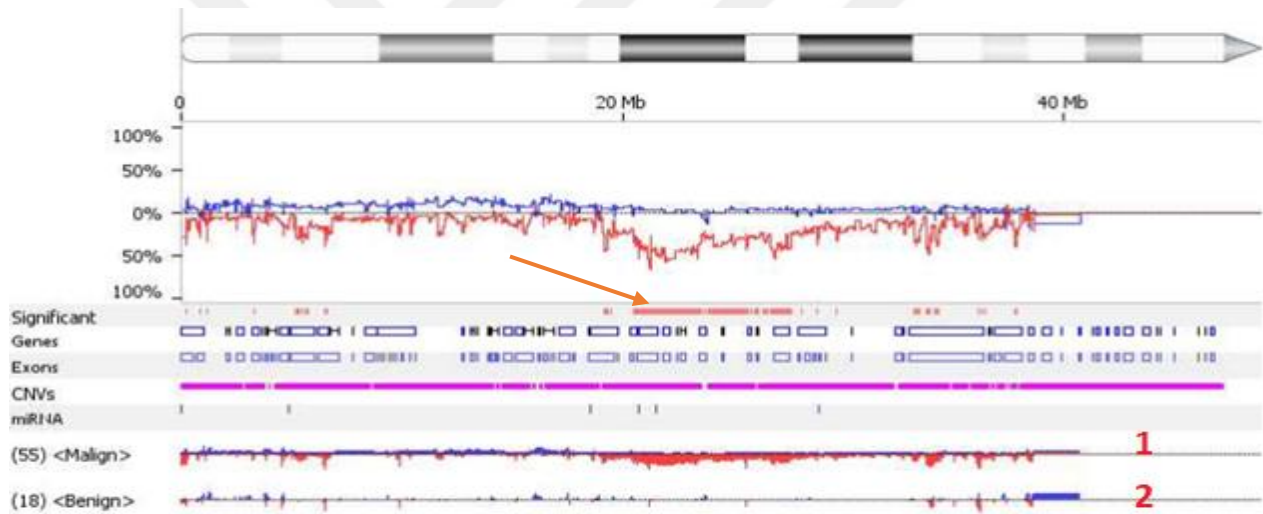
Şekil 3.6: Nexus 7.5 programında CEL dosyalarının analiz ayarları.

Bu programda, kopya sayısı ve alellik değişimlerin hesaplanması için Fast Adaptive States Segmentation Technique (FASST2) and SNP-FASST2 algoritmelerini seçildi.

3.2.3.2.1-Hasta Ve Kontrol Grubunun Karşılaştırmalı Olarak Analiz Edilmesi Sonucu Saptanan Genomik Anomali Sıklıklarının Hesaplanması

Nexus Copy Number Discovery Edition 7,5 programının "Selected Comparison" modülü kullanılarak hasta grubunda (MM n=55) ve Benign grubunda (BAP n=18) saptanan genomik anomali frekansları karşılaştırmalı olarak incelendi ve bunların etkilediği genler belirlendi. Şekil 3.7'de örnekte görüldüğü üzere Malign ve Benign grupta 9. Kromozomun küçük kolunda anomali frekansları ve pozisyonları 1 ve 2 numaralı panelde karşılaştırıldı. Mavi pikler amplikasyonları, kırmızı pikler ise delesyonları gösterilmektedir. Genomik anomali frekansları birbirinden istatistiki açıdan anlamlı olarak

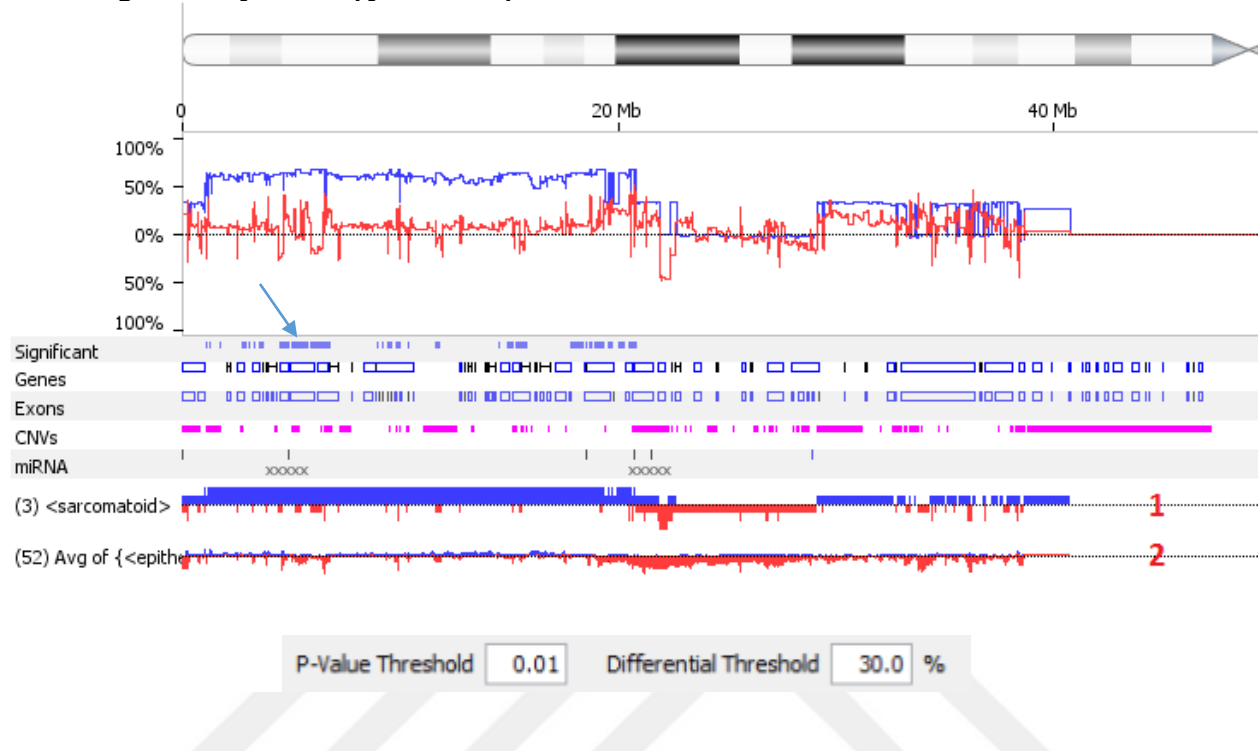
ayrılan bölgeler program yardımıyla saptandı. İki grubun arasındaki genomik anomali frekans fark eşiği %30 olarak belirlendi. (Bu eşik değerine ait minimum örnek: Malign Grupta %30 sıklıkta görülüp Benign grupta %0 sıklıkta gözlenen anomaliler). Program dahilinde genomik frekans farklılığının saptanmasında Fisher exact testi yapıldı, hesaplama sonucunda p değerlerinin <0,01 olan bölgeler anlamlı farklılığın olduğu bölgeler olarak saptandı. Yine program dahilinde FDR (False Discovery Rate) hesaplanarak bir doğrulama yapıldı. Bu istatistiksel kriterlere göre anlamlı farklılık bulunan genomik bölgeler seçildi ve sonuçlar Excel tablosu haline getirildi. Program tarafından anlamlı olarak verilen genomik bölgeler, Excel tablosunda, manuel olarak tekrar kontrol edilerek, SNP array çiplerinin saptama kapasitesinin altında olan küçük genomik bölgeler, sentromer bölgesine denk gelen tekrar sayılarından dolayı anomaliler, düşük marker sayısı ile belirlenmiş anomaliler yanlış pozitif olarak kabul edilerek ve sonuçlardan çıkarıldı.



Şekil 3.7: Nexus Copy Number Discover Edition 7,5 sayesinde elde edilen ve ileride değerlendirmeleri nasıl yaptığımızı açıklamak amacıyla konulan 9. Kromozom küçük kolunun analiz görüntüsü. 1 numaralı panelde Malign Plevral Mezotelyoma gruba ait (Malign Grup), 2 numaralı panelde ise Benign Asbest Plörizisi grubuna (Benign Grup) ait anomalilerin çeşitleri pozisyonlarına göre gözlenme sıklıkları ile gösterilmiştir. Kromozomal bölgelere göre saptanan anomali sıklığı ve farklılığı, paneller karşılaştırıldığında rahatça gözlenmektedir. Bu örnekte Malign grupta 9p21. Bölgesinde yoğunlaşan delesyonlar gözlenmekte iken Benign grupta aynı bölgede herhangi bir anomali gözlenmemiştir. İki grup arasında istatistiksel anlamda farklı anomali sıklığı olan bölgeler "Significant" kısmında anomali tipine (Amplifikasyon mavi, delesyon kırmızı) göre işaretlenmiştir (ör: kırmızı ok işaretinin gösterdiği bölge). ($p < 0,01$, anomali farklılık eşiği en az %30)

Programa eklenen diğer analiz fonksiyonları sayesinde, genomik anomalilerin çeşitli parametrelerle ilişkisi belirlendi. Programın "add factor" özelliği seçilerek ilgili bireyin klinik herhangi karakteristik özelliği girilip, bu özelliğe göre gruplara ayrılıp genomik anomali kalıplarına göre bir analiz de yapılabilmektedir. Biz çalışmamızda, MPM grubunda, tümör alt tiplerine göre

bir gruplama yapıp, bu klinik veriye özgü genomik anomali kalıbı olup olmadığını araştırdık (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: 9. Kromozomun kısa kolunda bulunan genomik anomalilerin, Sarkomatoid ve diğer tümör alt tiplerinde görülme sıklıkları ve çeşitleri. Birinci panelde 3 adet sarkomatoid tip MPM hastasının 9. Kromozomunun kısa kolundaki anomalilerin yoğunlaştığı bölgeler ve sıklıkları gözlenmekte, 2 numaralı panelde ise aynı bölgenin diğer histolojik tipli (epiteloid, mixed, bilinmeyen) MPM hastalarındaki genomik anomali sıklıkları görülmektedir. İki grup arasında istatistiksel anlamda farklı anomali sıklığı olan bölgeler "Significant" kısmında anomali tipine (Amplifikasyon mavi, delesyon kırmızı) göre işaretlenmiştir (ör: ok işaretinin gösterdiği bölge). ($p < 0,01$, anomali farklılık eşiği en az %30)

3.2.3.3-Hasta Grubunda Bulunan Genomik Anomalilerin Etkilediği Genlerin Görev Yaptığı Moleküler Yolakların ve Biyolojik İşlevlerin Bulunması

Hasta grubunda sık gözlenen ve Benign grupta hiç gözlenmeyen hastalıkla ilişkilendirdiğimiz gen bölgelerinin hangi moleküler yolaklarda görev yaptığını belirlemek amacıyla, <http://pantherdb.org/> adresi kullanıldı. Malign gruba özgü genomik anomaliler tarafından etkilenen genler bu siteye girildi ve analizleri yapıldı. Gen isimleri Enter ID kısmına girildi, organizma türü *Homo Sapiens* seçildi ve analiz kısmı pie chart olarak gösterilecek şekilde seçildi (Şekil 3.9).

1. Enter ids and or select file for batch upload. Else enter ids or select file or list from workspace for comparing to a reference list.

Enter IDs: [Supported IDs](#) separate IDs by a space or comma

Upload IDs: [File format](#) Dosya seçilmedi

Please [login](#) to be able to select lists from your workspace.

Select List Type:

- ID List
- Previously exported text search results
- Workspace list
- PANTHER Generic Mapping File
- VCF File Flanking region

2. Select organism.

Homo sapiens

Mus musculus

Rattus norvegicus

Gallus gallus

Danio rerio

3. Select Analysis.

- Functional classification viewed in gene list
- Functional classification viewed in pie chart
- Statistical overrepresentation test Use default settings
- Statistical enrichment test Use default settings

Şekil 3.9: Pantherdb analizi ekran görüntüsü (<http://pantherdb.org/>).

3.2.4-Tüm Genom Dizileme Çalışması

SNP array çalışmamızdan elde edilen verilerin nükleotid düzeyinde daha detaylı analizi için TÜBİTAK 1002 (Proje No:115S819) projesi gerçekleştirildi. Bu proje kapsamında karmaşık anomali kalıbına sahip, kromozomlarında Chromoanagenesis kalıplarına benzer anomaliler taşıyan hastalardan üç tanesi tüm genom dizileme işlemine tabi tutuldu. Tüm genom dizileme yöntemi, yakın zamanda kullanımı artan bir genetik yöntemdir. Bireyin genetik özelliklerinin (varyantların, indel ve SNP'lerinin) tüm genom seviyesinde tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Gerçekleştirilen yöntemde illumina HiSeq X model yeni nesil dizileme platformu kullanıldı. Bu platformlarda yapılan çalışmalar temelde 4 basamakta gerçekleştirilmektedir. Bu basamaklar, Örnek Hazırlama, Kütüphane Hazırlama, Dizileme ve Biyoinformatik Analizden oluşmaktadır.

3.2.4.1-Örnek Hazırlama ve Kalite Kontrol

Yeni nesil dizileme çalışmalarında, yüksek saflıkta ve fragmente olmamış DNA ile çalışılması büyük önem taşımaktadır. Numune kalitesindeki olası kimyasal kontaminasyonlar ve kullanılan DNA numunesinin yapısal bütünlüğü çalışma sonrasında elde edilecek sonuçların niteliğini ve veri miktarını değiştirmektedir. Bu sebeple çalışmada kullanılan DNA numuneleri farklı

kalite kontrol basamaklarından geçirildi. İlk basamakta, DNA numuneleri %5'lik jel elektroforezde yürütülmüş ve jel görüntüleri temel alınarak yapısal bütünlüğünü koruduğu tespit edildi. Sonrasındaki basamakta, DNA'nın kimyasal/protein kontaminasyonunun tespiti için Nanodrop spektrofotometresi (Nanodrop 2000c) ile test edildi. Bu çalışma sonrasında elde edilen DNA konsantrasyonu değerleri istenen seviyelerde (>50 ng/μl) ve kontaminasyonun göz ardı edilebilir seviyede olduğu (260/280= ~1.80,260/280= ~2.00) görüldü (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: Kullanılan örneklerin Nanodrop Sonuçları

İncelenen Örnek	Kons (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm
1-MPM 119	156,3	1,77	1,90
2-MPM 146	176,2	1,90	1,80
3-MPM 284	155,2	1,91	1,91

Nanodrop sonrasındaki çalışmalarda dsDNA'ların gerçek konsantrasyonunun tespiti için Qubit Florometresi kullanıldı. Qubit florometresi fragmente olan nükleotitler yerine sadece dsDNA özellikteki DNA'ların konsantrasyonlarının tespiti için kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda tüm numunelerin gerçek konsantrasyonları hesaplandı. Bu çalışma sonrasında elde edilen DNA konsantrasyonu değerleri istenen seviyelerde (>50 ng/μl) olduğu tespit edildi (Tablo 3.6).

Tablo 3.6 : Qubit Ölçüm Sonuçları

İncelenen Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)
1-MPM 119	71,3
2-MPM 146	83,3
3-MPM 84	72,3

Tüm örneklerin kalite kontrollerinden geçmesi sebebiyle, ek bir saflaştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmadan sonraki basamağa geçilmiştir.

3.2.4.2-Kütüphane Hazırlama

Kütüphane hazırlama basamağında, kullanılan örneklerin yeni nesil dizileme platformuna uygun hale getirilmesi gerçekleştirilmektedir. Çalışma kapsamında, kütüphane hazırlama basamağında "illumina TruSeq Nano DNA" kit kullanılmıştır. Bu aşamada sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlenmektedir.

1. Fragmentasyon
2. Saflaştırma
3. Adaptör Eklenmesi
4. Saflaştırma
5. Normalizasyon

3.2.4.3-Fragmentasyon

İzole edilmiş genomik DNA, genellikle yeni nesil dizileme platformlarının okuma uzunluklarında (~500 bp) daha büyük fragmanlar halinde bulunur. Büyük DNA parçalarının daha kısa parçalara dönüştürülmesi için fragmentasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu işlem, enzimatik veya mekanik yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Enzimatik yöntemlerde fragmentaz, endonükleaz veya transpozaz gibi oligonükleotit zincirinin kırılmasına neden olan enzimler kullanılmaktadır. Mekanik yöntemlerin başında ise sonikatör yer almaktadır. Çalışmada kullanılan illumina TruSeq Nano DNA kitinde fragmentasyon amacıyla mekanik kesim tercih edilmektedir. Öncelikle genomik DNA örnekleri aynı konsantrasyona gelecek şekilde normalize edildi. Bu normalizasyon basamaklarında Qubit ölçümleri esas alınmıştır. Genomik DNA'nın fragmentasyonu sonucunda 350 bp ile 500 bp uzunluk arasında DNA fragmanları alınarak saflaştırma aşamasına geçildi.

3.2.4.4-Saflaştırma

Saflaştırmadan önce fragmentasyon aşamasında elde edilen karışımın içerisine, solüsyon içerisinde kalan çok küçük veya çok büyük DNA fragmanları ve enzim, tampon çözelti gibi kimyasallardan arındırmak amacıyla temizleme işlemine tabi tutuldu. Bu basamakta kit tarafından sağlanan manyetik boncuklar kullanılmaktadır. Bu boncuklar özellikle belirli boyuttaki DNA'lara bağlanmaktadır. Son solüsyon ile karıştırıldığında, DNA ile boncuklar bağlanmakta ve manyetik alan içerisinde çökelti oluşturmaktadır. Süpernatant'ın atılması ve takiben DNA'ın boncuklardan elüsyonu sonucunda saflaştırılmış DNA elde edildi.

3.2.4.5-Adaptör Eklenmesi

Dizileme basamağı öncesinde her bir numunenin cihaz tarafından tanınmasını ve cihaz içinde yer alan çipe (flowcell) bağlanması için fragmente durumdaki DNA'ların uç kısımlarına adaptör denilen oligonükleotitlerin takılması gereklidir. Bu oligonükleotitler, hem örneğe has barkod dizilerini içermekte hem de flowcell'de gömülü olarak bağlı bulunan oligonükleotitlere

bağlanacak DNA dizilerini içermektedir. Dizileme sırasında, tüm verilerden her bir numuneye ait verilerin ayrıştırılması (demultiplexing) bu barkod dizilerdeki farklılıklara göre gerçekleştirildi. Adaptör ekleme işlemlerinde, öncelikle fragmente durumdaki DNA'ların uç kısımlarının tamiri gerçekleştirildi. Bu tamir işleminde Taq polimeraz kullanılır. Tamir sonrasında, ligaz enzimi kullanılarak adaptör dizileri, fragmente DNA'lara eklendi. Flow cell'e bağlanacak fragman sayısını arttırmak için PCR işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemde, primerler adaptör bölgelere bağlanacak şekilde çoğaltma işlemi uygulandı. Bu işlemlerden sonra, ortamda kalan enzim ve diğer kontaminantları uzaklaştırmak için saflaştırma işlemi uygulandı.

3.2.4.6-Normalizasyon

Dizileme platformları, konsantrasyon açısından çok dar aralıktaki bir örnek grubu ile çalışılabilir. Gereğinden yüksek veya düşük konsantrasyondaki DNA'lar, veri kaybına neden olabilir. Ayrıca, numuneler arasında da konsantrasyon açısından bir eşitlik olması, sonuçların karşılaştırılabilirliği açısından önemlidir. DNA konsantrasyonlarının eşitlenmesi için Qubit florometresi kullanılmıştır. Qubit ile ölçülen her bir numune ardından 1.80 pM olacak şekilde seyreltildi, ardından tüm örnekler birleştirildi.

3.2.4.7-Dizileme

Çalışmanın dizileme süreci, illumina HiSeq X yeni nesil dizileme platformu üzerinden gerçekleştirildi. illumina tarafından kullanılan Solexa dizileme yönteminde, DNA fragmanları öncelikle flowcell adı verilen çipler üzerine yerleştirilmekte ve yerleştiği bölgede yüksek doğrulukta sinyal vermek için bölgesel olarak çoğaltılmaktadır (bridge-amplification) ve bunun sonucunda flowcell üzerinde milyonlarca fragman kümeleri (cluster) oluşmaktadır. Flowcell üzerinde oluşan fragman kümeleri, her bir döngüde 1 baz okunacak şekilde dizilenmektedir. illumina tarafından geliştirilen "Sequencing-by-Synthesis" yöntemi ile her döngüde, DNA fragmanları 2 farklı boya ile işaretlenmiş 4 farklı dinükleotide maruz bırakılmaktadır. Her bir döngüde, uygun dinükleotitin bağlanmasını takiben floresans kamera ile o kümenin görseli alınmaktadır. Her bir kümeden gelen görseller birleştirilmekte ve sonuçta ilgili kümelerin ışımaya karakterlerinden nükleotit dizileri çıkarılmaktadır.

3.2.3.8-Tüm Genom Dizileme Biyoinformatik Analiz

3.2.4.8.1-Fastq Oluşturulması

Çalışma sonunda, HiSeq X dizileme platformu okuma verileri, *.bcl formatında oluşturulmaktadır. Bu dosyalar, DNA kümelerinin flow-cell üzerindeki konum ve ID'lerini, ışımaya karakterlerini içermektedir. Bu verilerden Bcl2fastq v.2.1 (illumina) programı kullanılarak *.fastq dosyaları elde edildi. Aynı zamanda, fastq verileri, içerdiği index verilerine göre farklı örneklere ayrıştırıldı (Demultiplexing).

3.2.4.8.2-Kalite Kontrol Basamakları

Kalite kontrol işlemleri, ham fastq verilerinin incelenerek dizileme çalışmasının etkinliğini ölçmede kullanılır. Böylelikle, çalışmada yaşanan herhangi bir sorun ve olası sebepleri hakkında bilgi edinilmiş olur. Çalışmada bu amaçla FASTQC programı (www.bioinformatics.babraham.ac.uk) kullanıldı.

3.2.4.8.3-Okuma Filtreleri & Trimming

Dizileme sürecinde, Fastq okuma verilerindeki düşük kalitedeki bazı okumaları, sonraki analiz basamaklarında yanlış pozitif sonuçlara neden olmaması için, okumalardan çıkarıldı. Kalite filtreleri ve kesim işlemleri için Trimmomatic uygulaması kullanıldı.

3.2.4.8.4-Hizalama

Düzeltilen ham dizi verilerinin insan genomuna hizalanmasında Burrows-Wheeler Aligner (v.0.7.12) programı kullanıldı. Bu program, yeni nesil dizileme platformundan elde edilen yaklaşık 100 bp'lik okumaları insan genom referans dizisine hizalanmasında kullanılmaktadır. Çalışmada referans genom olarak hg19, GRCh37 kullanıldı. Sonrasında, indel bölgelerindeki hizalamaların uygun hale getirilmesi için bölgesel-hizalama (local realignment) gerçekleştirildi. Çalışmada bu amaçla GATK IndelRealigner v3.3,0 kullanıldı. Birleştirme ve hizalama sonrasında GATK (v3.3.0) uygulaması kullanılarak tekrarlı okumaların filtrelenmesiyle okuma sayısı optimizasyonu, bazı kalite rekabirasyonu gerçekleştirildi. Elden edilen *bam ve vcf* dosyaları Golden Helix Genome Browser programı kullanılarak görsel olarak incelendi.

3.2.4.8.5-MANTA Algoritmi İle Yapısal Varyantların (Kopya Sayısı Değişimlerinin) Belirlenmesi

Hizalanmış verilerden, bireydeki mutasyonların tespit edilmesi için son basamakta, GATK (Unified Genotyper) kullanılmıştır. Bu uygulama, hizalanmış okumalarda tek nokta varyantlarının ve indellerin tespitini sağlamaktadır. Tüm genom çalışmalarında 3-4 milyon varyant tespit edildi. Yapısal Varyasyonların Tespiti Hizalanmış verilerinden yapısal varyasyonların tespiti (inversiyon, delesyon, duplikasyon, breaking point) için MANTA (Chen et al., 2015) uygulaması kullanılmıştır. MANTA, paired-end özellikteki dizileme okumalarından yapısal varyantların -structural variants (SVs)- ve indellerin belirlenmesini sağlamaktadır. Bu algoritim somatik mutasyonların (büyük boyutlu yapısal varyasyonların, orta büyüklükteki indellerin ve büyük insersiyonların) tespitini sağlayacak şekilde optimize edildi. Bu uygulamadan elde edilen yapısal varyant bilgileri Golden Helix Genome Browser uygulamasına yüklenerek varyasyonlar görsel hale getirildi.

3.2.4.8.6-Nükleotid Varyantlarını Belirlenmesi

Kanser gelişiminden sorumlu olabilecek nükleotid düzeyindeki varyasyonların bulunması amacıyla Gene Card Suite TGex Web Tabanlı uygulaması kullanıldı. Tüm genom dizileme çalışmasından elde edilen vcf. formatındaki varyant dosyaları bu programa yüklenip analiz edildi. Bu uygulama sayesinde tüm dizileme verilerinden alınan varyasyonlar çeşitli mutasyon hasarı tespit araçları (FATHMM, MutationAssessor Pred, MutationTaster Pred, Polyphen2 HVAR, SIFT Pred vb.) ve kanser mutasyon kataloğu COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) kullanılarak kanserle ilgili mutasyonlar filtrelendi. Ayrıca TGex uygulamasında kanser ilişkili varyantları skora algoritmi olan VarElect eklentisi kullanıldı. Bahsedilen yaklaşımlar ve veritabanları da kontrol edilerek aday varyant listeleri çıkarıldı. Kanser ilişkili en yüksek skora sahip bu varyantlar Mezotelyoma gelişimi veya yatkınlığı açısından aday olarak belirlendi.

4-BULGULAR

Bu tez çalışması dahilinde 55 MPM hastasının plevral tümör dokusu ve 18 BAP'lı bireyin plevral dokusundan DNA elde edilmiş, bu DNA'larda tüm genom SNP array çalışması gerçekleştirilmiştir. Her iki gruptan elde edilen SNP array verisi sayesinde kromozomal anomaliler belirlenmiş, buldukları genomik pozisyon ve sıklıkları açısından karşılıklı olarak incelenmişlerdir. Her iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklı bulunan kromozomal anomaliler ve etkiledikleri gen bölgeleri saptanmıştır. Yine bu çalışma dahilinde TÜBİTAK 1002 projesi (Proje No: 115S819) ile desteklenen bir çalışmayla, hasta grubundan seçilen 3 bireyde tüm genom dizileme yapılmıştır. Tüm genom dizileme sayesinde SNP array ile bulunan anomaliler doğrulanmış hem de SNP array ile belirlenen karmaşık genomik anomali kalıbına sahip bireylerin genomları daha detaylı incelenmiştir. Bunun yanında söz konusu 3 bireyde hastalık gelişimine neden olabilecek aday nükleotid varyantları saptanmıştır. SNP array ve tüm genom dizileme sonucu elde edilen bulgular 6 ana başlık altında ilerleyen bölümlerde verilmiştir.

4.1-MPM ve BAP Grubunda Bulunan Genomik Anomalilerin Karşılaştırılması

MPM ve BAP gruplarında saptanan kromozomal anomalilerin ve kopya sayısı değişimlerinin genomik pozisyonları ve gruplardaki gözlenme sıklıkları karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı, iki gruba özgü anomaliler belirlenmiştir. Bu karşılaştırma Nexus Copy Number Discovery Edition 7,5 programı kullanılarak yapılmıştır. Programda anomali frekansları arasındaki en az fark "difference threshold" %30, p değeri ise 0,01'den küçük olarak seçilmiştir (Örneğin MPM % 30 BAP %0).

4.1.1-MPM'ye (Malign Gruba) Özgü Olarak Bulunan Genomik Anomali Bölgeleri ve Görülme Sıklıkları

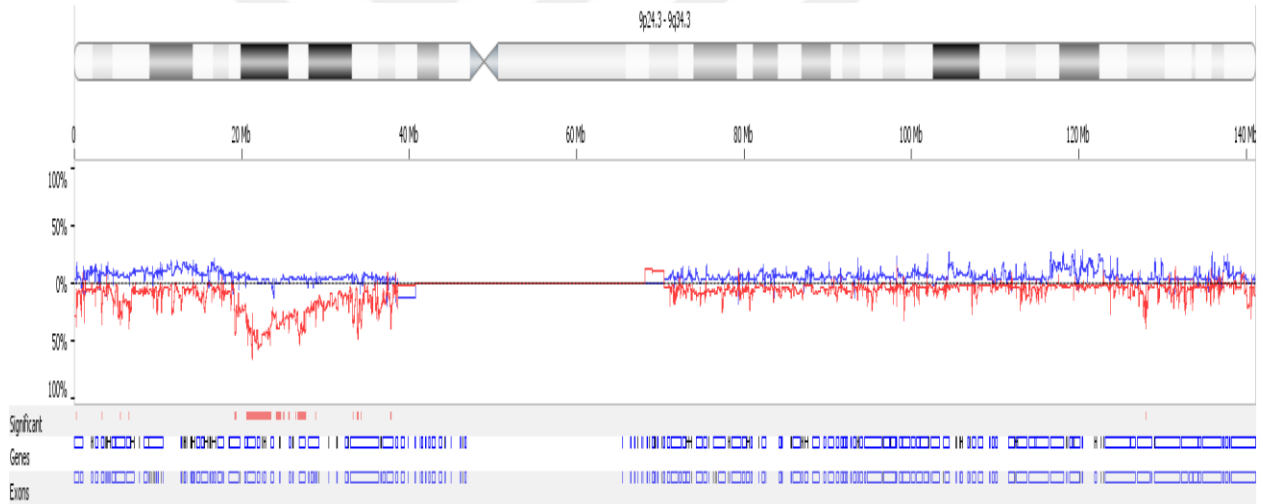
Bu kısımda MPM grubuna özgü genomik anomali kalıpları gösteren kromozomlar malign ve benign grupta görülme sıklıklarına göre listelenmiştir. Sırasıyla 9, 8, 5, 7, 1, 3, 22, 15, 6, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 20 kromozomları olmak üzere 16 kromozom sık anomali gözlenen kromozomlar olarak bulunmuştur. MPM hastalarının kromozomlarını etkileyen anomali kalıplarına bakıldığında en çok 9p kolunda delesyonlarla beraber 8.,5.,7. kromozomlarını etkileyen kopya sayısı artışları göze çarpmaktadır. MPM hastalarında en fazla anomali gözlenen kromozomal bölge %67 frekansla 9p21.3 bölgesi olarak bulunmuştur.

MPM grubuna özgü genomik anomalilerden toplamda etkilenen gen sayısı 619 olarak saptanmıştır. Bunlardan 132 tanesi ise non-coding RNA

(antisense RNA), Long Intergenic Non-Protein Coding RNA, Pseudogene, miRNA gen grubuna girmektedir.

Aşağıda istatistiki olarak anlamlı anomaliler gözlenen kromozomlar, anomali türleri, etkilenen kromozom bölgesi, Malign Grupta görülme (%) yüzdesi, Benign grupta görülme yüzdeleri (%) verilmiştir. Malign grupta, Benign gruba göre anlamlı farklılık bulunan ilgili kromozomlardaki anomali bölgelerine ait ekran görüntüleri ayrı ayrı verilmiştir. İki grup arasında anlamlı olarak farklılık gösteren delesyon veya kopya sayısı artışlarının etkilediği bölgeler yine kromozom görüntülerinde gösterilmektedir. Anlamlı farklılık gösteren delesyonlar kırmızı çizgilerle, kopya sayısı artışları ise mavi çizgilerle belirtilmiştir. MPM grubuna özgü bulunan kromozom bölgeleri, yüzde olarak sıklıkları ve etkilenen genler sırasıyla aşağıda verilmektedir.

Kromozom 9



Delesyonlar

9p21.3 / MPM %67- BAP %0: IFNA7, IFNA10, IFNA16, IFNA17, IFNA14, IFNA22P, CDKN2A, CDKN2B-AS1, FOCAD, IFNA21, IFNA4, MIR31HG, MIR31, IFNW1, MTAP, IFNA6, DMRTA1, LINC01239, KLHL9, IFNA2, IFNA8, MIR491, IFNA1, IFNE, IFNB, IZUMO3, ELAVL2, LOC101929563, IFNA13, IFNA.

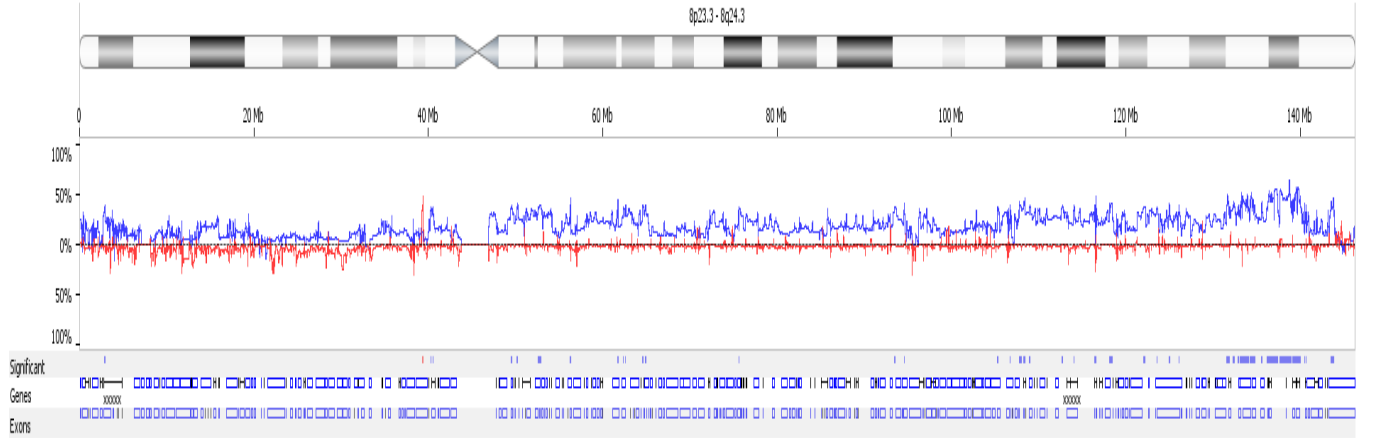
9p21.2/ MPM %54- BAP %0: DOCK8, LOC100506422, PLAA, IFT74-AS1, LRRC19, IFT74, TEK, LINC00032, EQTN, MOB3B, IFNK, C9orf72, CAAP1.

9p13.3/ MPM %40- BAP %0: NFX1, AQP7, AQP3, UBAP1, KIF24, RECK, UBE2R2.

9p22.1/ MPM %43- BAP %0: DENND4C.

9q33.3 / MPM %40- BAP % 0: GAPVD.

Kromozom 8



Kopya Sayısı Artışları

8q24.23 / MPM % 63 - BAP % 0: LOC101927915, KHDRBS3, FAM135B, COL22A1.

8q24.22 / MPM % 50- BAP %0: ADCY8, EFR3A, KCNQ3, HPYR1, LRRC6, TMEM71, TG, NDRG1, ZFAT, LINC01591.

8q23.3 / MPM %47-BAP %0: CSMD3, TRPS1.

8q12.1 / MPM %45-BAP %0: XKR4, CA8.

8q24.11/ MPM %38: RAD21, MIR3610, RAD21-AS1, SLC30A8.

8q23.1 / MPM % 45-BAP %0: ZFPM2, ANGPT1, RSPO2, EMC2, TRHR.

8q22.3/ MPM % 36-BAP %0: NCALD, RIMS2, DCSTAM, DPYS.

8q23.2/ MPM % 34-BAP %0: Gen yok.

8q24.12/ MPM %36--BAP %0: SAMD12, SAMD12-AS1, SNTB1.

8q24.13/ MPM %36-BAP %0: LOC105375734, KLHL38, ANXA13, FER1L6, FER1L6-AS1, SQLE, KIAA0196, NSMCE2.

8q24.3/ MPM %45-BAP %0: KCNK9, PTK2, TSNARE1, ADGRB1, ARC, JRK, PSCA, LY6K, LOC100288181, THEM6.

8p23.2/ MPM %38-BAP %0: CSMD1.

8p11.2/ MPM %36-BAP %0: ZMAT4.

8q11.1/ MPM %30-BAP %0: Gen yok.

8q11.21/ MPM % 40-BAP %0: LOC101929217, LOC101929268, EFCAB1, SNTG1, PXDNL, PCMTD1, ST18.

8q12.2/ MPM % 43-BAP %0: CHD7.

8q12.3/ MPM % 38-BAP %0: CLVS1, ASPH, MIR4470, NKAIN3, LINC01289, LOC102724623.

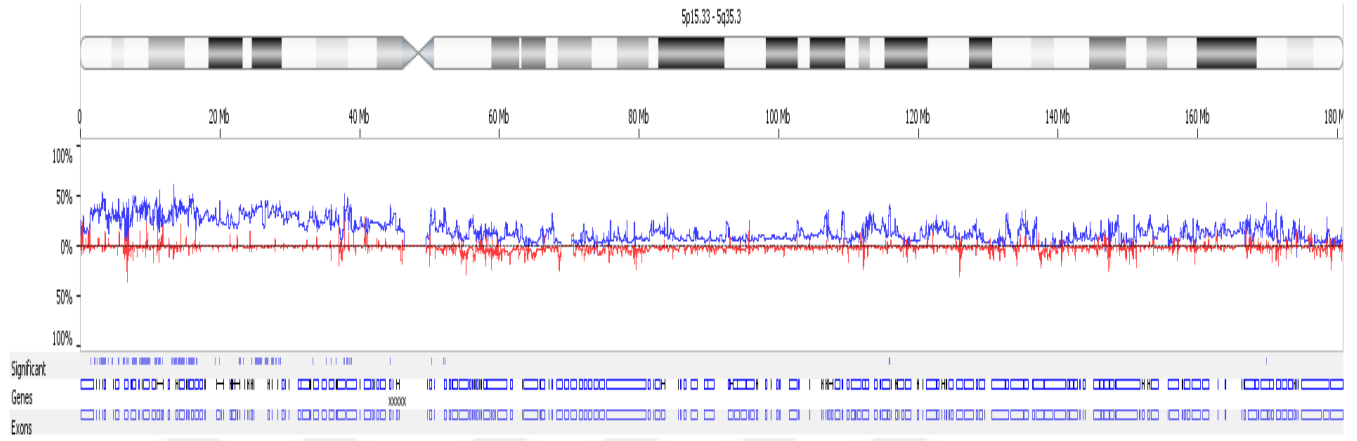
8q13.3/ MPM % 32-BAP %0: EYA1, MSC, MSC-AS1, KCNB2.

8q21.1/ MPM % 36-BAP %0: MIR2052HG, PI15, CRISPLD1.

8q21.2/ MPM % 34-BAP %0: RALYL.

8q22.1/ MPM % 36- BAP %0: LOC102724710, KIAA1429, C8orf37, C8orf37-AS1, GDF6.

Kromozom 5



Kopya Sayısı Artışları

5p15.33 / MPM %36-BAP %0: SLC6A3, LPCAT1, MIR6075, SDHAP3, LOC728613, MRPL36, NDUFS6, LOC101929034, IRX4, CTD-2194D22.4

5p15.2 / MPM % 60-BAP %0: MARCH6, ROPN1L, MIR6131, LOC101929412, ANKRD33B, DAP, CTNND2, LINC01194, DNAH5, TRIO, FAM105A, OTULIN, LOC100130744, ANKH, MIR4637.

5q21.3 / MPM % 34-BAP %0: EFNA5, MAN2A1, LOC100289673

5p15.1 / MPM % 50-BAP %0: MARCH11, LOC101929505, ZNF622, MYO10.

5q35.1 / MPM % 41-BAP %0: KCNIP1, SMIM23, FBXW1.

5p14.3 / MPM %43-BAP %0: CDH18, CDH12.

5p14.2 / MPM % 36-BAP %0: C5orf17, CDH10.

5p14.1/ MPM % 43-BAP %0: LOC340107, CDH9, LINC0102.

5p13.3 / MPM % 32-BAP %0: Gen yok.

5p15.33 / MPM % 50-BAP %0: Gen yok.

5p13.3 / MPM % 38-BAP %0: CDH6, ADAMTS12.

5p13.2 / MPM % 47-BAP %0: PRLR, SPEF2, IL7R, CAPSL, LOC100506406, UGT3A2, SLC1A3, EGFLAM-AS4, EGFLAM.

5p13.1 / MPM % 38-BAP %0: LIFR, LIFR-AS1.

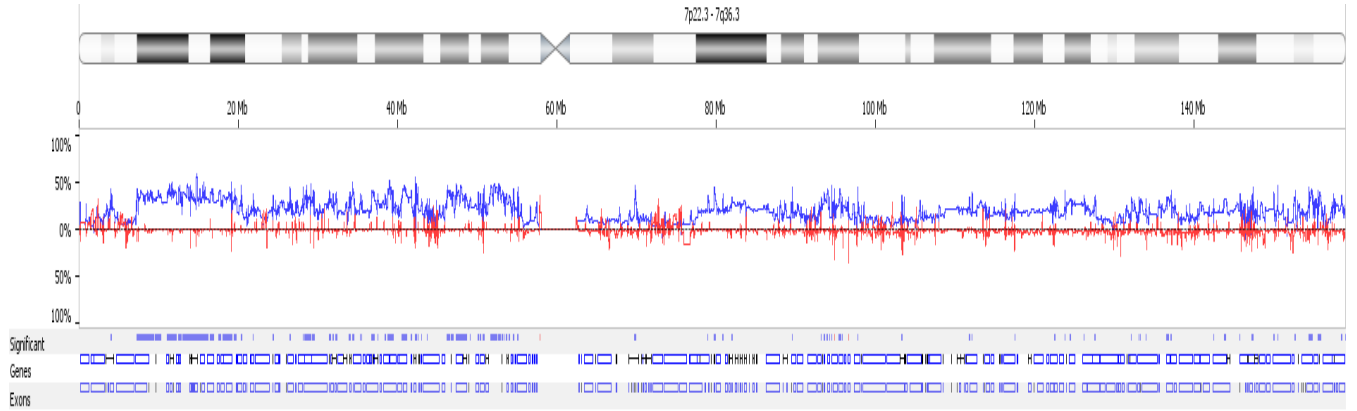
5p12 / MPM % 40-BAP %0: FGF10.

5q11.1 / MPM % 36-BAP %0: ISL1, ITGA1, ITGA2.

5p15.31 / MPM % 49-BAP %0: PAPD7, ADCY2, C5orf49, FASTKD3, MTRR, LOC729506, MIR4458HG, LOC101929284, MIR4636, SEMA5A, CTD-2201E9.1, SNHG18, SNORD123, TAS2R1, LOC285692.

5p15.2 / MPM % 41-BAP %0: LOC285692.

Kromozom 7



Kopya Sayısı Artışları

7p12.2 / MPM % 36-BAP %0: ZPBP, C7orf72, IKZF1.

7p12.3 / MPM % 45-BAP %0: TNS3, LINC01447, LINC00525, C7orf69, PKD1L1, HUS1, SUN3, C7orf57, UPP1, ABCA13.

7p14.1 / MPM % 49-BAP %0: AMPH, VPS41, POU6F2, SUGCT, LINC01450.

7p14.2 / MPM % 38-BAP %0: TBX20, LOC401324, AOA1, ELMO1-AS1, ELMO1.

7p14.3 / MPM % 49-BAP %0: CREB5, TRIL, LOC100506497, CPVL, CHN2, CCDC129, PDE1C, BMPER, NPSR1-AS1.

7p15.1 / MPM %45-BAP %0: CREB5.

7p15.2 / MPM % 43-BAP %0: LOC441204.

7p15.3 / MPM % 36-BAP %0: DNAH11, NPY.

7p21.1/ MPM % 49-BAP %0: SOSTDC1, LRRC72, ANKMY2, BZW2, TSPAN13, AGR2, KCCAT333, LOC101927630, MIR1302-6, HDAC9, TWISTNB, MIR3146, TMEM196, ITGB8.

7p21.2/ MPM % 49-BAP %0: ETV1, DGKB, AGMO, MEOX2, MEOX2-AS1, ISPD-AS1, ISPD.

7p21.3/ MPM % 47-BAP %0: PHF14, THSD7A, SCIN, ARL4A, COL28A1, LOC101927391, MIOS, RPA3, UMAD1, LOC100505921, GLCCI1, ICA1, LOC100505938, NXPH1.

7p22.2 / MPM % 41-BAP %0: SDK1.

7q21.11/ MPM % 41-BAP %0: MAGI2, GNAI1, CACNA2D1.

7q21.13 / MPM % 36-BAP %0: STEAP2-AS1.

7q21.3 / MPM % 41-BAP %0: PPP1R9A, DYNC1I1.

7q31.1 / MPM % 38-BAP %0: DOCK4.

7q31.33 / MPM % 34-BAP %0: POT1, POT1-AS1, GRM8.

7q32.1 / MPM % 34-BAP %0: SND1, SND1-IT1, LRRC4.

7q33 / MPM % 38-BAP %0: EXOC4, SLC35B4, MIR490, LOC349160, CHRM2, DGKI.

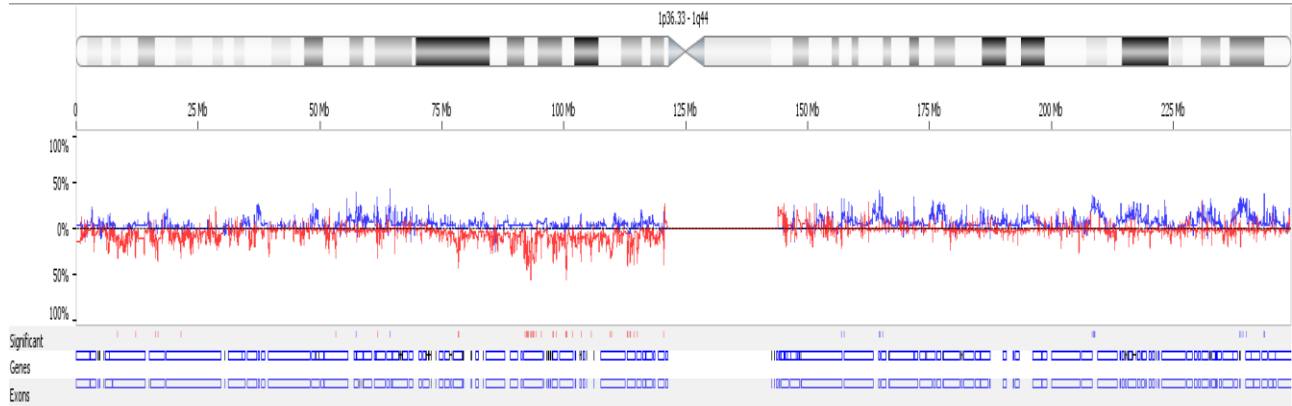
7q35/MPM% 34-BAP %0: CTAGE4, ARHGEF35, LOC101928605, OR2A7, CTAGE8, ARHGEF34P, OR2A1-AS1, OR2A20P, OR2A9P, OR2A42, OR2A1, RNU6-57P, ARHGEF5.

7q36.2 / MPM % 41-BAP %0: DPP6, PAXIP1-AS2, PAXIP1.

7q36.3 / MPM % 38-BAP %0: SHH, ESYT2.



Kromozom 1



Delesyonlar

1p21.2 / MPM % 56-BAP %0: HIAT1, SASS6, LRRC39, DBT.

1p13.3 / MPM % 32-BAP %0: WDR47, TAF13, MYBPHL, SORT.

1p13.2 / MPM % 41-BAP %0: CTTNBP2NL, WNT2B, ST7L, CAPZA1, LRIG2, RSBN1, AP4B1-AS1, PTPN22, TRIM33.

1p36.13 / MPM % 36-BAP %0: MIR5096, SPEN, SPATA21

1p36.12 / MPM % 32-BAP %0: EIF4G3.

1p32.3 / MPM % 32-BAP %0: ZYG11B.

1p31.1 / MPM % 43-BAP %0: FAM73A.

1p22.1 / MPM % 54-BAP %0: GLMN, RPAP2, EVI5, RPL5, SNORD21, SNORA66, FAM69A, MTF2, TMED5, CCDC18, LOC100131564, DR1, FNBP1L, BCAR3, MIR760.

1p21.3 / MPM % 36-BAP %0: SLC44A3, DPYD-AS1, DPYD.

Kopya Sayısı Artışları

1q23.1 / MPM % 30-BAP %0: PEAR1, LRRC71.

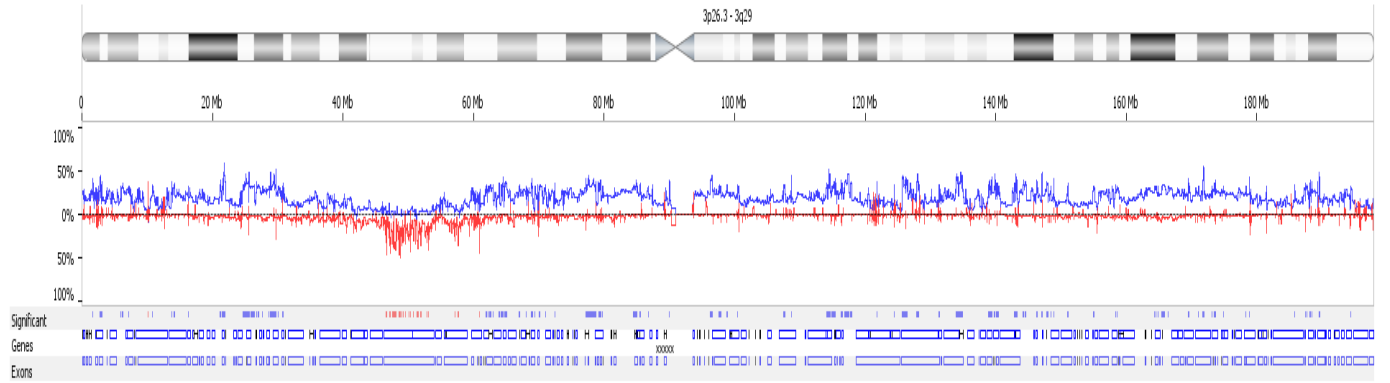
1q32.2 / MPM % 34-BAP %0: PLXNA2.

1q43 / MPM % 34-BAP %0: LINC01139, CHRM3, SDCCAG8, AKT3.

1p32.2 / MPM % 38-BAP %0: C8A, C8B.

1p31.3 / MPM % 41-BAP %0: ROR1.

Kromozom 3



Delesyonlar

3p14.3 / MPM % 36-BAP %0: ARF4, ARF4-AS1, DENND6A.

3p21.1 / MPM % 36-BAP %0: RFT1.

3p21.2 / MPM % 38-BAP %0: DOCK3, MANF, RBM15B, VPRBP.

3p21.31/ MPM % 50-BAP %0: CSPG5, SMARCC1, MAP4, SHISA5, PFKFB4, MIR6823, NCKIPSD, IP6K2, CCDC71, KLHDC8B, C3orf84, CCDC36.

Kopya Sayısı Artışları

3p12.1 / MPM % 38-BAP %0: LINC00971, CADM2.

3p12.3 / MPM % 41-BAP %0: ROBO2, ROBO, LOC101927374.

3p14.1 / MPM % 41-BAP %0: ATXN7, PSMD6-AS2, PSMD6, ADAMTS9-AS1, ADAMTS9, MIR548A2, ADAMTS9-AS2, KBTBD8, FAM19A1, FRMD4B.

3p14.2 / MPM % 32-BAP %0: PTPRG, PTPRG-AS1, CADPS.

3p24.1 / MPM % 45-BAP %0: NEK10, LINC00693, RBMS3.

3p24.2 / MPM % 43-BAP %0: RARB, TOP2B, MIR4442, LINC00692.

3p24.3 / MPM % 40-BAP %0: ZNF385D.

3p25.1 / MPM % 34-BAP %0: TPRXL, CHCHD4, TMEM43, XPC, LSM3, DPH3, OXNAD1.

3p25.3 / MPM % 32-BAP %0: LINC00606, SLC6A11.

3p26.1 / MPM % 30-BAP %0: GRM7.

3p26.2 / MPM % 43-BAP %0: CNTN4.

3q11.2 / MPM % 41-BAP %0: EPHA6, CRYBG3, MINA, GABRR3, OR5AC2, OR5H1.

3q13.31 / MPM % 50-BAP %0: ZBTB20-AS1, ZBTB20, LOC101929754, MIR4796, GAP43.

3q22.2 / MPM % 36-BAP %0: EPHB1.

3q23 / MPM % 38-BAP %0: MRPS22, COPB2, RBP2, LOC100507291, RBP1, NMNAT3, CLSTN2.

3q24 / MPM % 41-BAP %0: SLC9A9, LOC440982, AGTR1.

3q25.1 / MPM % 30-BAP %0: P2RY14, MED12L, GPR87.

3q26.1 / MPM % 32-BAP %0: LINC01324, SLITRK3, LINC01322, BCHE.

3q26.2/ MPM % 40-BAP %0: TERC, ACTRT3, MYNN, LRRC34, LRRIQ4, SAMD7, LOC100128164, SEC62.

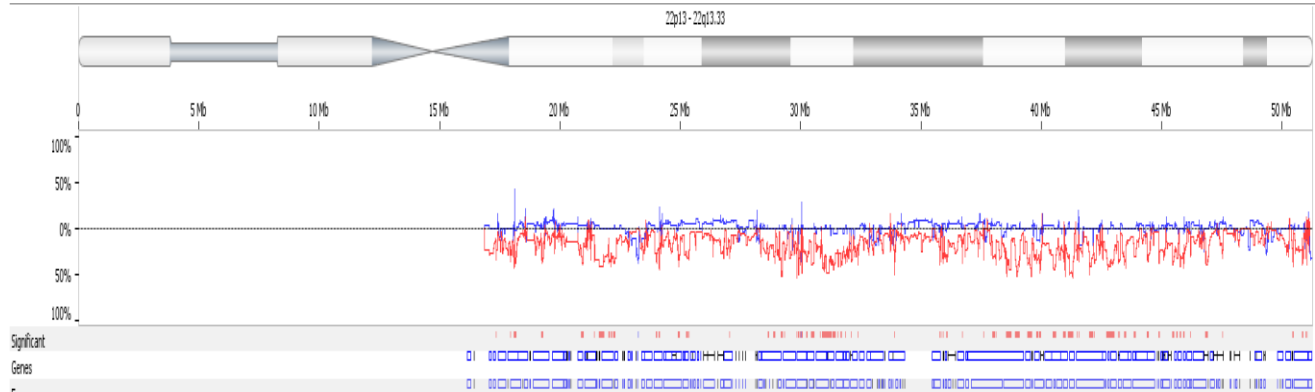
3q26.31 / MPM % 50-BAP %0: TNIK, NLGN1, FNDC3B

3q26.32 / MPM % 30-BAP %0: KCNMB2, KCNMB2-AS1.

3q28 / MPM % 47-BAP %0: LPP, TP63, MIR944, P3H2.



Kromozom 22



Delesyonlar

22q11.21 / MPM % 38-BAP %0: MED15, BCL2L13, CLTCL1, ATP6V1E1, CECR2.

22q11.23 / MPM % 34-BAP %0: GGT1, SNRPD3, UPB1.

22q12.1 / MPM % 30-BAP %0: TTC28.

22q12.2 / MPM % 49-BAP %0: MTMR3, MORC2, TUG1, SLC35E4, DUSP18, SEC14L2, MTFP1, OSBP2, NF2, OSBP2, ASCC2, THOC5, TCN2.

22q12.3 / MPM % 36-BAP %0: APOL6.

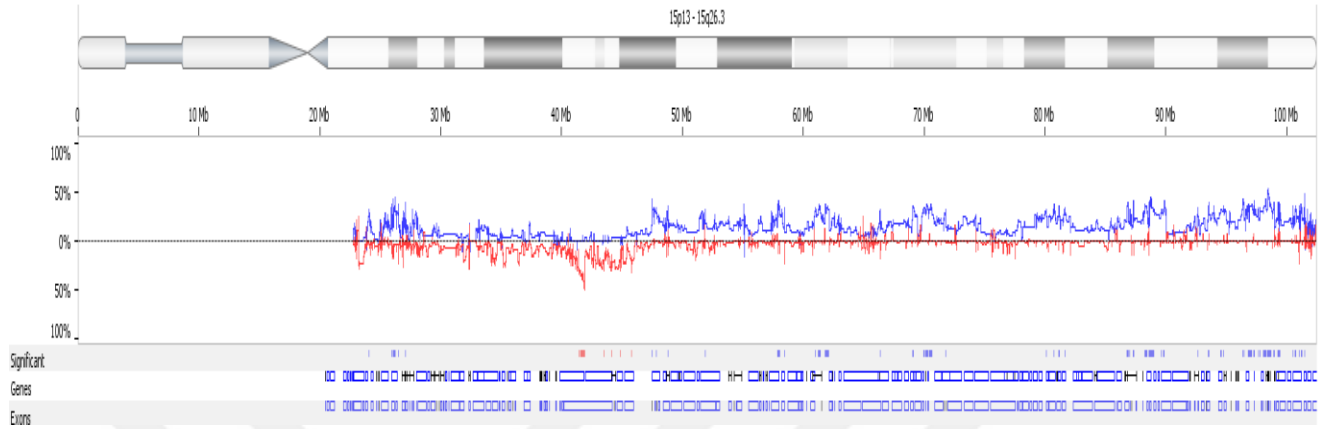
22q13.1 / MPM % 52-BAP %0: FAM227A, GGA1, SH3BP1, LOC101927051, PDXP, DMC1, CBX7, TRIOBP, TNRC6B, MKL1, LOC101927257.

22q13.2 / MPM % 50-BAP %0: MPPED1, EFCAB6-AS1, EFCAB6, SERHL2, RRP7BP, SERHL, RRP7A, SNU13, POLDIP3, RNU12, CYB5R3, ST13, DNAJB7, DESI1, XRCC6, EP300, XPNPEP3, NFAM1, SLC25A17.

22q13.31 / MPM % 43-BAP %0: LDOC1L, PARVB, TBC1D22A, FBLN1.

22q13.33 / MPM % 36-BAP %0: PPP6R2, SBF1, SYCE3.

Kromozom 15



Delesyon

15q15.1 / MPM %36-BAP %0: CHP1, OIP5-AS1, OIP5, NUSAP1, NDUFAF1, TYRO3.

Kopya Sayısı Artışları

15q21.1 / MPM % 32-BAP %0: SEMA6D.

15q12 / MPM % 43-BAP %0: LOC100128714

15q2151.2 / MPM % 30-BAP %0: DMXL2.

15q21.3 / MPM % 40-BAP %0: MYZAP, GCOM1, POLR2M, AQP9.

15q22.2 / MPM % 36-BAP %0: RORA.

15q22.31 MPM % 30-BAP %0: MEGF11.

15q23 / MPM % 32-BAP %0: TLE3, THSD4.

15q25.1 MPM % 36/-BAP %0: ARNT2, CEMIP.

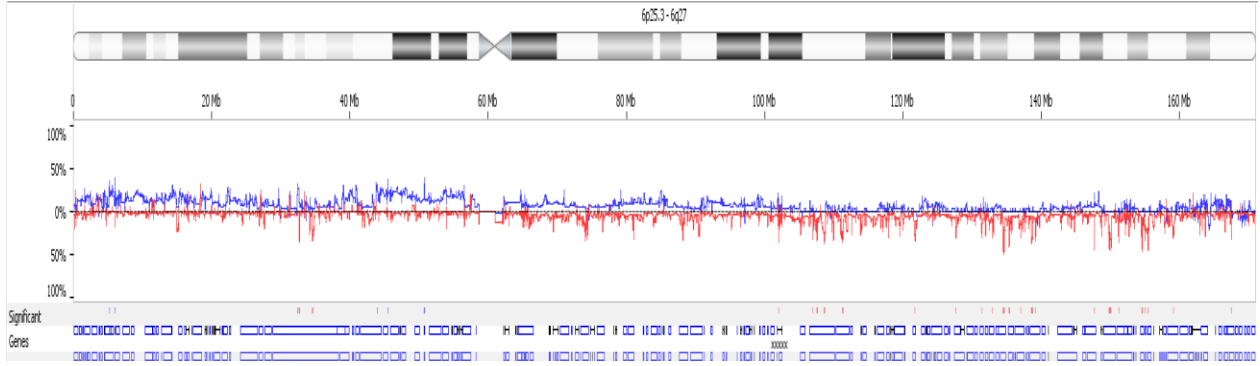
15q25.3 / MPM % 43-BAP %0: AGBL1-AS1, AGBL1, NTRK3, NTRK3-AS1, MRPL46, MRPS11.

15q26.1 / MPM % 30-BAP %0: ABHD2, FANCI, POLG, MIR6766.

15q26.2 / MPM % 30-BAP %0: LINC01581.

15q26.3 / MPM % 36-BAP %0: IGF1R.

Kromozom 6



Kopya Sayısı Artışları

6p12.3 / MPM %38-BAP %0: TFAP2B.

Delesyonlar

6q21 / MPM % 38-BAP %0: LACE1, PDSS2.

6q22.31 / MPM % 34-BAP %0: GJA1.

6q22.33 / MPM % 30-BAP %0: ECHDC1.

6q23.2 / MPM % 50-BAP %0: SGK1, AKAP7.

6q23.3 / MPM % 41-BAP %0: HBS1L, ARFGEF3, HEBP2, MAP3K5.

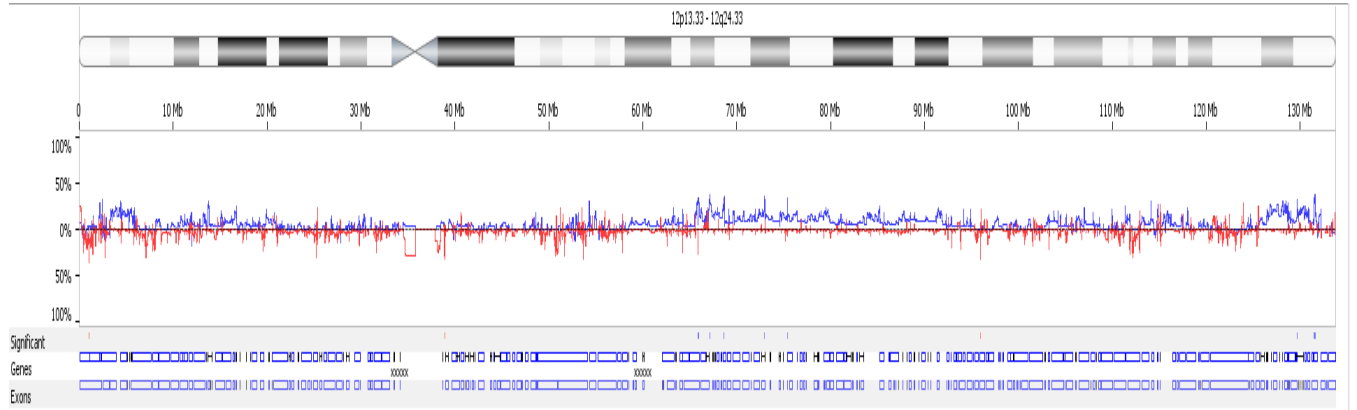
6q24.1 / MPM % 34-BAP %0: ECT2L.

6q25.1 / MPM % 43-BAP %0: NUP43, LATS1.

6q25.2 / MPM % 47-BAP %0: IPCEF1, TIAM2.

6q27 / MPM % 30-BAP %0: Gen yok.

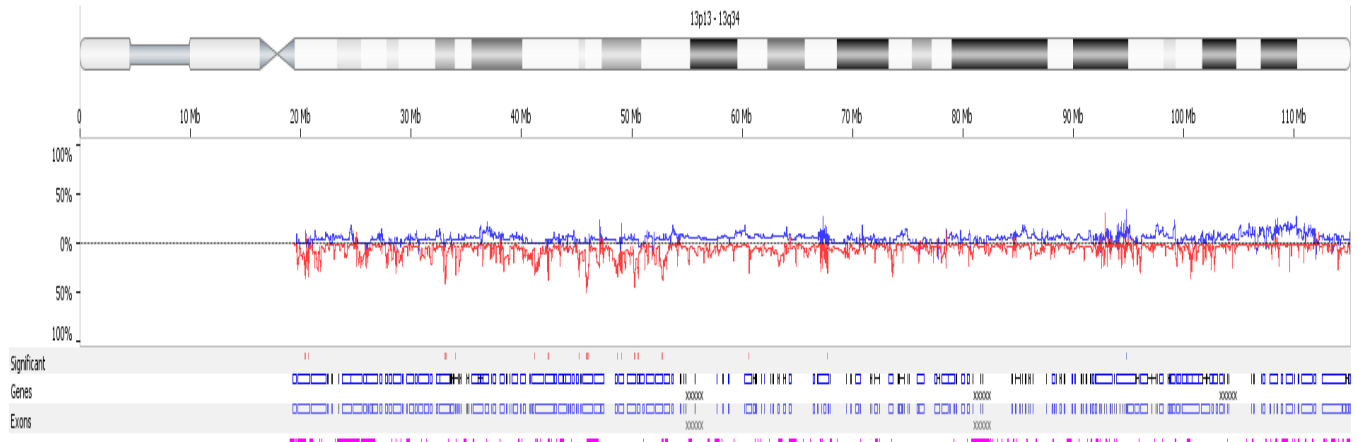
Kromozom 12



Kopya Sayısı Artışları

12q24.33/ MPM % 34-BAP %0: LOC101927735, TMEM132D, ADGRD1.
12q14.3/ MPM % 32-BAP %0: LOC100507065.
12q21.1/ MPM % 34-BAP %0: TRHDE.

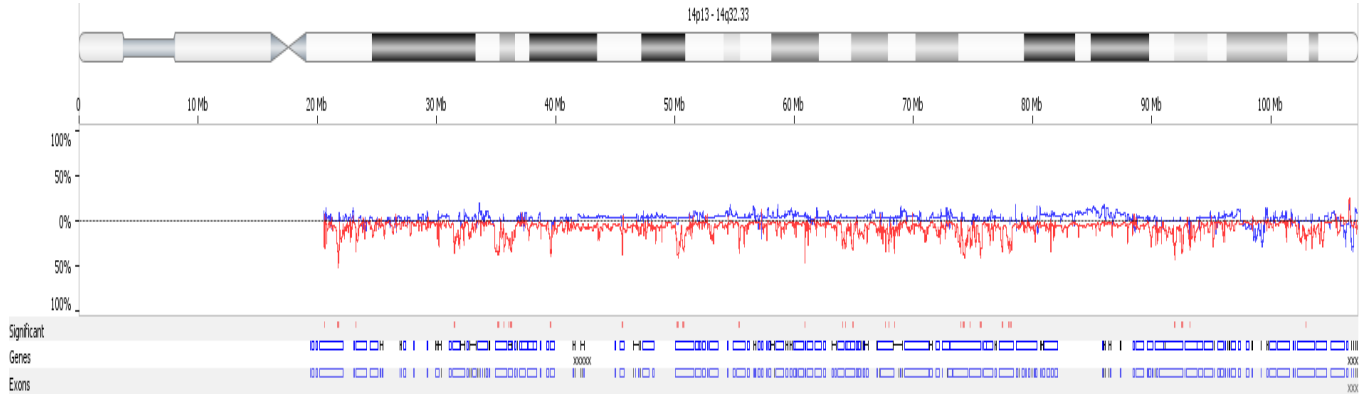
Kromozom 13



Delesyonlar

13q13.1/ MPM % 41-BAP %0: N4BP2L2, MINOS1P1, N4BP2L2-IT2, PDS5B.
13q14.11/ MPM % 34-BAP %0: VWAS.
13q14.13/ MPM % 40-BAP %0: TPT1, SNORA31, TPT1-AS1.
13q14.2/ MPM % 32-BAP %0: KPNA3.
13q14.3/ MPM % 34-BAP %0: MRPS31P5.
13q21.2/ MPM % 30-BAP %0: DIAPH3.

Kromozom 14



Delesyonlar

14q11.2 / MPM % 34-BAP %0: HNRNPC.

14q13.2 / MPM % 30-BAP %0: RALGAPA1.

14q21.2 / MPM % 38-BAP %0: PRPF39, FKBP3

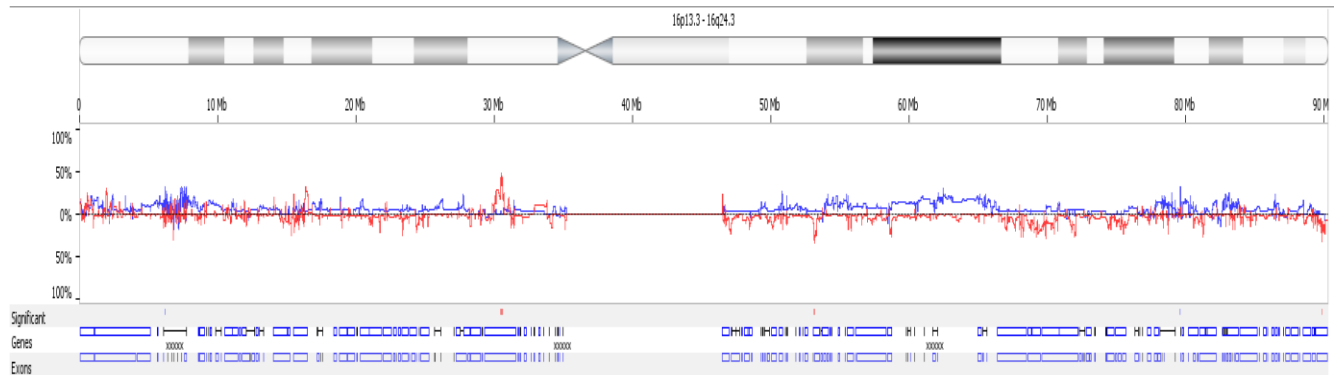
14q21.3 / MPM % 34-BAP %0: SOS2, L2HGDH, MIR4504.

14q23.3 / MPM % 34-BAP %0: FAM71D, MPP5.

14q24.3 / MPM % 38-BAP %0: HEATR4, DNAL1, ABCD4, NEK9, FOS, SNW1, C14orf178, ADCK1.

14q32.12 / MPM % 36-BAP %0: PPP4R3A, TRIP11, ATXN3.

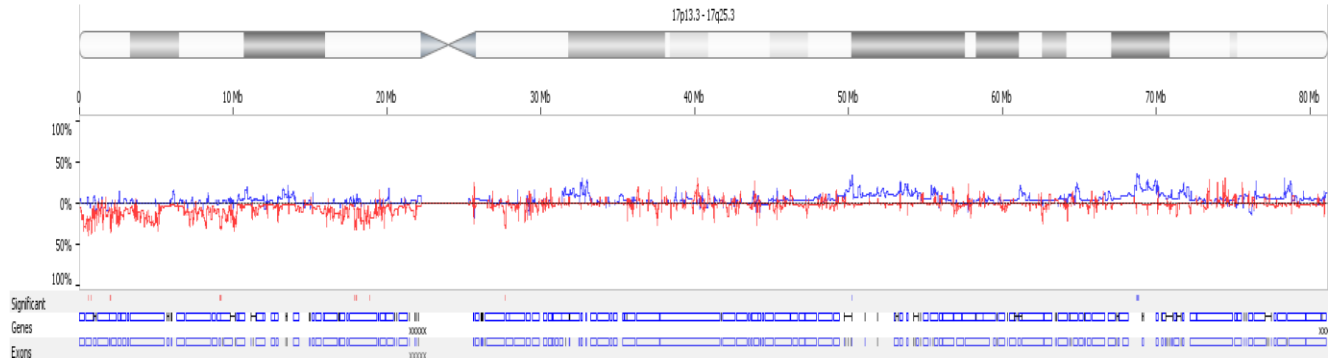
Kromozom 16



Delesyon

16q12.2 / MPM % 34-BAP %0: CHD9.

Kromozom 17



Delesyonlar

17p11.2 / MPM % 32-BAP %0: DRG2, MYO15A, SLC5A10.

17q11.2 / MPM % 30-BAP %0: 5' UTR TAOK1.

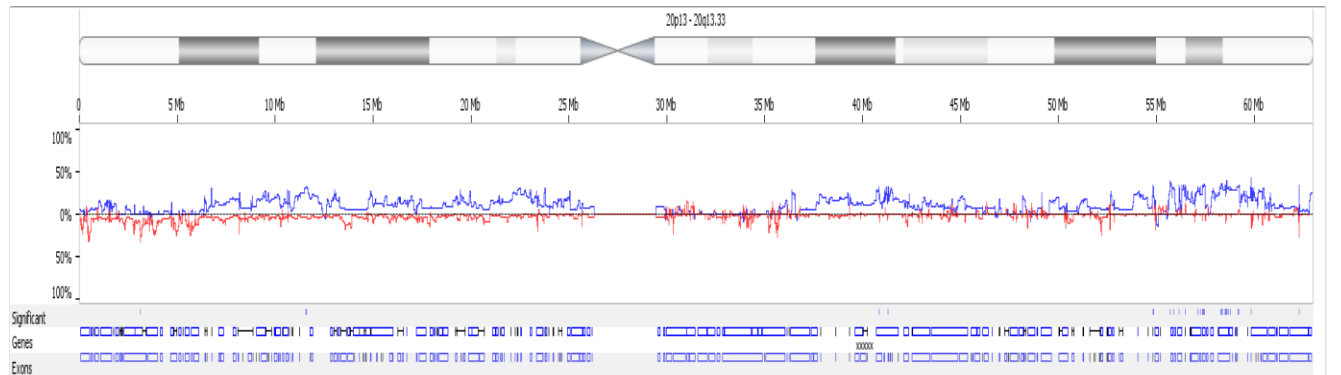
Kopya Sayısı Artışları

17q22 / MPM % 32-BAP %0: CA10.

17q24.3 / MPM % 34-BAP %0: Gen yok.

17p13.1 / MPM % 32-BAP %0: NTN1, STX8.

Kromozom 20



Kopya Sayısı Artışları

20q12 / MPM % 30-BAP %0: PTPRT, LOC101927159.

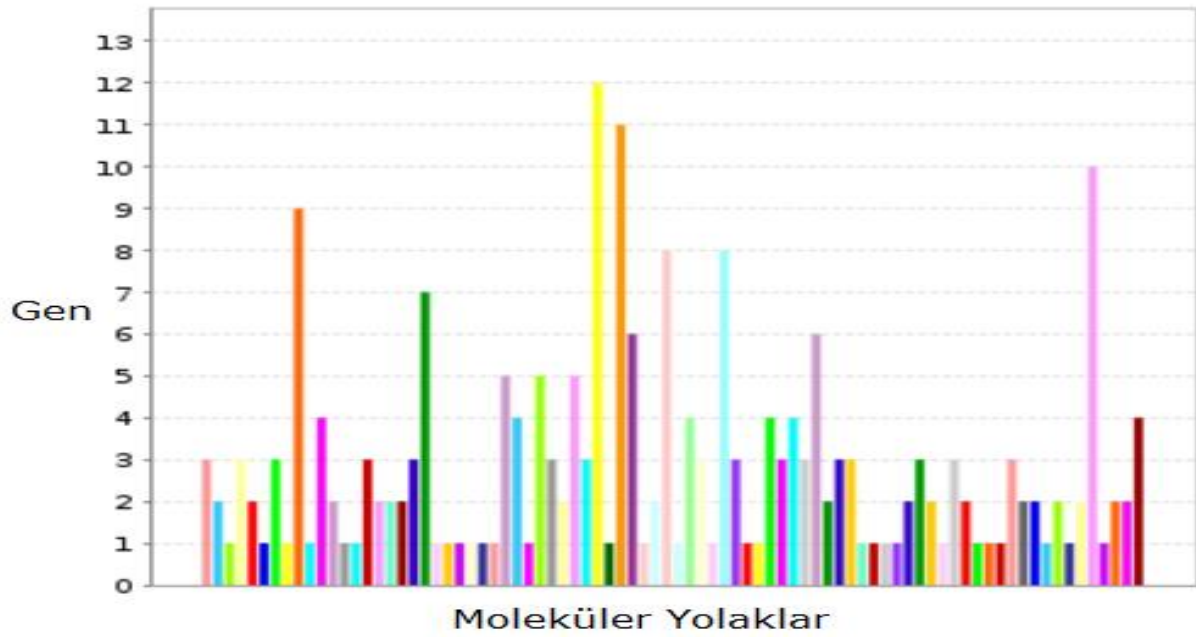
20q13.31 32/ MPM % 30-BAP %0: MIR4532.

20q13.32 / MPM % 30-BAP %0: MIR296, MIR298, GNAS-AS1, GNAS, LOC101927932.

20q13.33 / MPM % 41-BAP %0: CDH26, MIR646HG, CDH4.

4.1.1.1-MPM'ye Özgü Kromozomal Anomalilerin Etkilediği Genlerin Rol Oynadıkları Moleküler Yolaklar

MPM grubunda genomik anomaliler tarafından etkilenen genler liste olarak çıkarılıp www.panterdb.com (Mi, Muruganujan, Casagrande, & Thomas, 2013) internet adresinde rol aldıkları moleküler yolaklar ve biyolojik işlevleri açısından analiz edilmiştir. Analizden henüz işlevleri bilinmeyen genler sistem tarafından değerlendirilmemiştir. Hasta grubundaki genomik anomalilerden etkilenen toplam 619 adet genden panterdb'ye kayıtlı görevleri bilinen 490'nının yolak analizi yapılabilmektedir. Çalışmamızda en fazla etkilendiği bulunan 80 yolak Şekil 4.1 ve Tablo 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1: Çalışmamızda saptanan genomik anomalilerden etkiledikleri genlerin görev yaptıkları moleküler yolaklar. Bu yolaklar içerdikleri gen sayılarına göre Tablo 4.1 'de sırasıyla verilmiştir.

Bu 80 yolak içerisinde MPM'li hastalarda en fazla etkilenmiş olarak belirlenen ilk 4 moleküler yolak aşağıda verilmiştir.

■ [Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway \(P06664\)](#)

■ [Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway \(P00026\)](#)

■ [Wnt signaling pathway \(P00057\)](#)

■ [Angiogenesis \(P00005\)](#)

Tablo 4.1: Genomik anomalilerden etkilenen genlerin görev yaptıkları moleküler yollara göre dağılımları.

No	Moleküler Yolak	Rol oynayan gen sayısı	Toplam gen sayısına oran	Yolaktaki toplam gen sayısına oran
1.	Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway	12	2.4%	5.2%
2.	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway	11	2.2%	4.8%
3.	Wnt signaling pathway	10	2.0%	4.3%
4.	Angiogenesis	9	1.8%	3.9%
5.	Integrin signalling pathway	8	1.6%	3.5%
6.	Huntington disease	8	1.6%	3.5%
7.	Cadherin signaling pathway	7	1.4%	3.0%
8.	Nicotinic acetylcholine receptor signaling	6	1.2%	2.6%
9.	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway	6	1.2%	2.6%
10.	FGF signaling pathway	5	1.0%	2.2%
11.	Dopamine receptor mediated signaling pathway	5	1.0%	2.2%
12.	Endothelin signaling pathway	5	1.0%	2.2%
13.	Apoptosis signaling pathway	4	0.8%	1.7%
14.	p53 pathway	4	0.8%	1.7%
15.	Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	4	0.8%	1.7%
16.	Metabotropic glutamate receptor group III pathway	4	0.8%	1.7%
17.	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	4	0.8%	1.7%
18.	EGF receptor signaling pathway	4	0.8%	1.7%
19.	Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	3	0.6%	1.3%
20.	CCKR signaling map	3	0.6%	1.3%
21.	T cell activation	3	0.6%	1.3%
22.	PI3 kinase pathway	3	0.6%	1.3%
23.	Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	3	0.6%	1.3%
24.	GABA-B receptor II signaling	3	0.6%	1.3%
25.	Interleukin signaling pathway	3	0.6%	1.3%
26.	Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	3	0.6%	1.3%

27.	Opioid proopiomelanocortin pathway	3	0.6%	1.3%
28.	Opioid proenkephalin pathway	3	0.6%	1.3%
29.	Nicotine pharmacodynamics pathway	3	0.6%	1.3%
30.	Enkephalin release	3	0.6%	1.3%
31.	Pyrimidine Metabolism	3	0.6%	1.3%
32.	B cell activation	3	0.6%	1.3%
33.	5HT4 type receptor mediated signaling pathway	3	0.6%	1.3%
34.	5HT1 type receptor mediated signaling pathway	3	0.6%	1.3%
35.	Axon guidance mediated by Slit/Robo	2	0.4%	0.9%
36.	Adrenaline and noradrenaline biosynthesis	2	0.4%	0.9%
37.	VEGF signaling pathway	2	0.4%	0.9%
38.	Transcription regulation by bZIP transcription factor	2	0.4%	0.9%
39.	TGF-beta signaling pathway	2	0.4%	0.9%
40.	Parkinson disease	2	0.4%	0.9%
41.	PDGF signaling pathway	2	0.4%	0.9%
42.	p53 pathway feedback loops 2	2	0.4%	0.9%
43.	p53 pathway by glucose deprivation	2	0.4%	0.9%
44.	Thyrotropin-releasing hormone receptor signaling pathway	2	0.4%	0.9%
45.	Ras Pathway	2	0.4%	0.9%
46.	Opioid prodynorphin pathway	2	0.4%	0.9%
47.	FAS signaling pathway	2	0.4%	0.9%
48.	Histamine H2 receptor mediated signaling pathway	2	0.4%	0.9%
49.	Beta3 adrenergic receptor signaling pathway	2	0.4%	0.9%
50.	Beta2 adrenergic receptor signaling pathway	2	0.4%	0.9%
51.	Beta1 adrenergic receptor signaling pathway	2	0.4%	0.9%
52.	5HT2 type receptor mediated signaling pathway	2	0.4%	0.9%
53.	Axon guidance mediated by netrin	1	0.2%	0.4%
54.	Axon guidance mediated by semaphorins	1	0.2%	0.4%
55.	Ornithine degradation	1	0.2%	0.4%
56.	Alzheimer disease-presenilin pathway	1	0.2%	0.4%
57.	Alpha adrenergic receptor signaling pathway	1	0.2%	0.4%
58.	Ubiquitin proteasome pathway	1	0.2%	0.4%
59.	Toll receptor signaling pathway	1	0.2%	0.4%
60.	Oxidative stress response	1	0.2%	0.4%
61.	Carnitine metabolism	1	0.2%	0.4%

62.	Coenzyme A linked carnitine metabolism	1	0.2%	0.4%
63.	Metabotropic glutamate receptor group II pathway	1	0.2%	0.4%
64.	Synaptic vesicle trafficking	1	0.2%	0.4%
65.	Endogenous cannabinoid signaling	1	0.2%	0.4%
66.	Ionotropic glutamate receptor pathway	1	0.2%	0.4%
67.	Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	1	0.2%	0.4%
68.	Hypoxia response via HIF activation	1	0.2%	0.4%
69.	P53 pathway feedback loops 1	1	0.2%	0.4%
70.	Oxytocin receptor mediated signaling pathway	1	0.2%	0.4%
71.	p38 MAPK pathway	1	0.2%	0.4%
72.	Hedgehog signaling pathway	1	0.2%	0.4%
73.	Succinate to propionate conversion	1	0.2%	0.4%
74.	Salvage pyrimidine ribonucleotides	1	0.2%	0.4%
75.	Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin	1	0.2%	0.4%
76.	Histamine H1 receptor mediated signaling pathway	1	0.2%	0.4%
77.	Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway	1	0.2%	0.4%
78.	DNA replication	1	0.2%	0.4%
79.	Purine metabolism	1	0.2%	0.4%
80.	Cholesterol biosynthesis	1	0.2%	0.4%

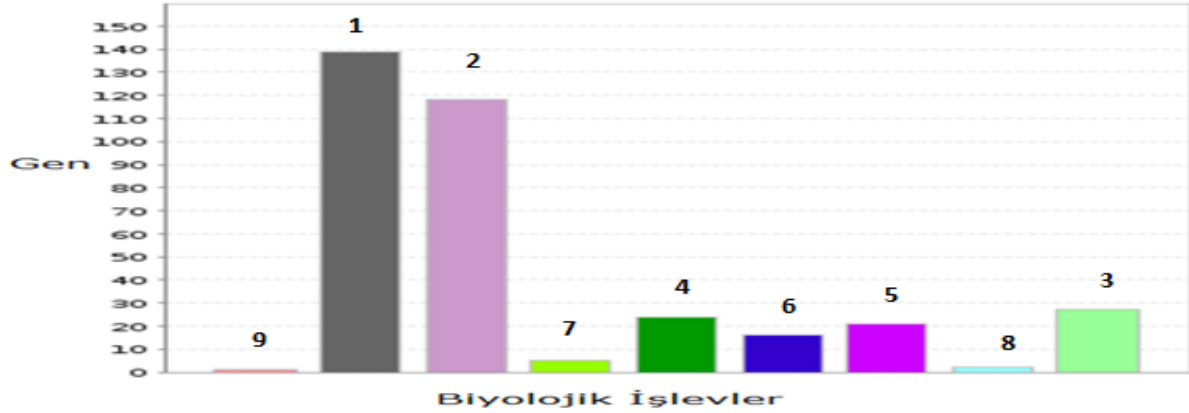
4.1.1.2-MPM'ye Özgü Kromozomal Anomalilerin Etkilediği Genlerin Biyolojik İşlevleri

Çalışmamızda bulunan genomik anomalilerden elde edilen genlerin biyolojik işlevlerine göre dağılımları ve bu biyolojik işlevlerin içerdikleri gen sayıları Tablo 4.2 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2: Genomik anomalilerden etkilenen genlerin görev yaptıkları biyolojik işlevlere göre dağılımları.

	Biyolojik İşlev	Rol oynayan gen sayısı	Toplam gen sayısına oran	Yolaktaki toplam gen sayısına oran
1	binding (bağlanma)	139	28.4%	39.4%
2	catalytic activity (katalitik aktivite)	118	24.1%	33.4%
3	transporter activity	27	5.5%	7.6%
4	receptor activity	24	4.9%	6.8%
5	structural molecule activity	21	4.3%	5.9%
6	signal transducer activity	16	3.3%	4.5%
7	channel regulator activity	5	1.0%	1.4%
8	translation regulator activity	2	0.4%	0.6%
9	antioxidant activity	1	0.2%	0.3%

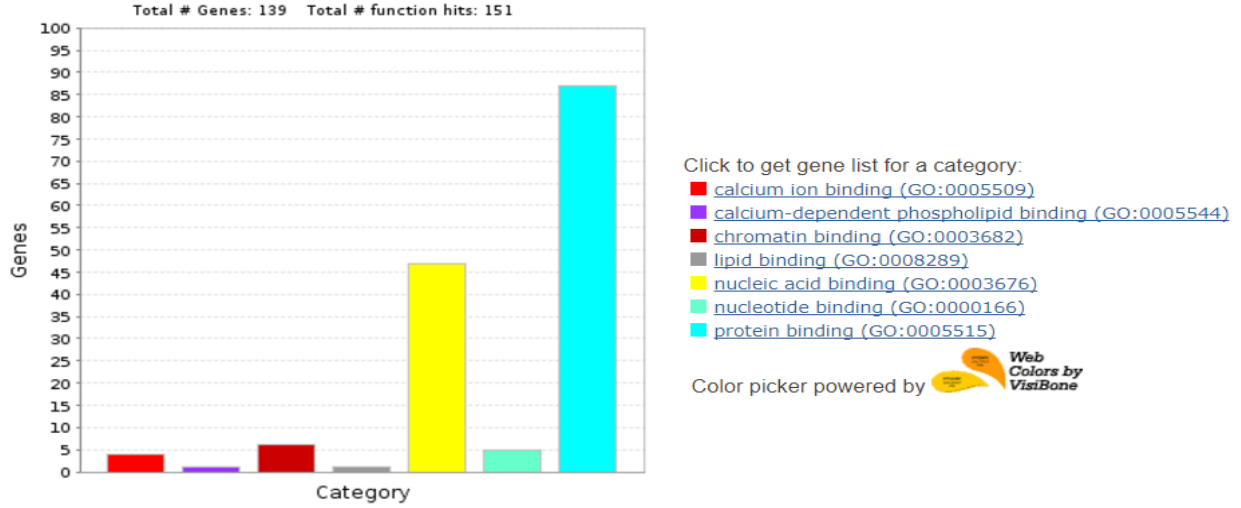
Tablo 4.2 incelendiğinde binding (bağlanma) işlevlerinde rol oynayan genlerin önemli derecede etkilendikleri görülmektedir. Binding (bağlanma) işlevi sırasıyla alt başlıklar altında detaylı incelendiğinde Protein Binding, receptor binding ve sitokin aktivitesinde görev alan genlerin daha çok etkilendikleri görülmektedir. Bu biyolojik işlevlerin hangileri olduğu Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4' te daha detaylı olarak verilmektedir.



Şekil 4.2: Çalışmamızda bulunan genomik anomalilerden elde edilen genlerin biyolojik işlevlerine göre dağılımları. Bu biyolojik işlevler içerdikleri gen sayılarına göre Tablo 4.2 ' de sırasıyla verilmiştir.

Binding (Bağlanma)

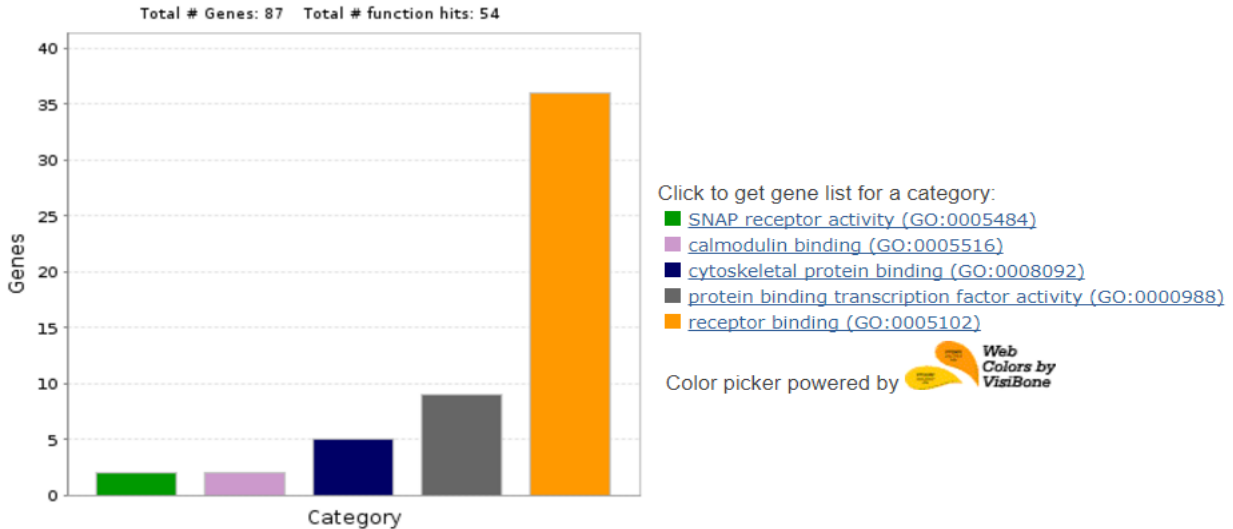
Şekil 4.3 incelendiğinde özellikle Protein binding (protein bağlanma) ile ilgili gen sayısının yüksek olduğu göze çarpmaktadır.



Şekil 4.3: Binding (Bağlanma) işlevlerinde görev yapan genlerin özel görevleri ve sayıları.

Binding/ Protein Binding/Receptor (Bağlanma/Protein Bağlanma/Reseptör Bağlanması)

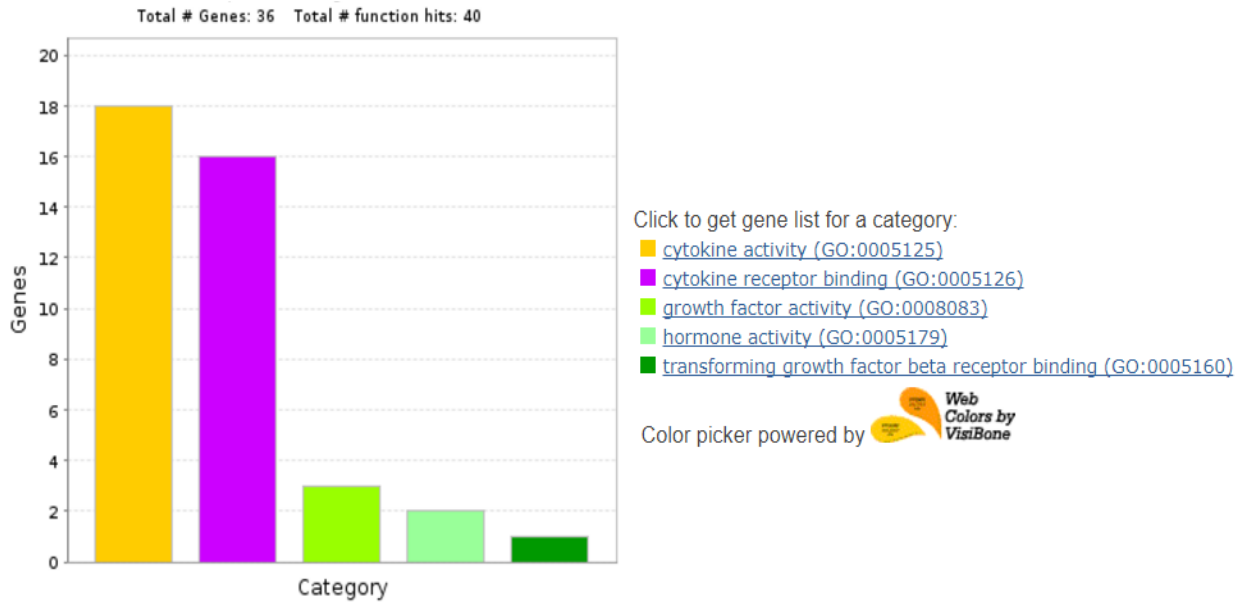
Protein binding işlevi daha detaylandırıldığında reseptör binding işlevinde gen sayıları en yüksek olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Protein bağlanması işlevi daha detaylandırıldığında reseptör bağlanma işlevinde gen sayıları.

Binding/ Protein Binding/Receptor Binding/Cytokine activity

Şekil 4.5' te binding (Bağlanma) biyolojik işlevi içeriklerine göre detaylandırıldığında *sitokin aktivitesi*, *sitokin reseptör* bağlanma aktivitelerinin en çok etkilenen gen grupları olduğu görülmüştür. İlgili bölge genelde MPM ` de en fazla delesyona uğrayan bölge olan 9p21.3 bölgesidir. Bu bölgede, başta IFNA2, IFNA7, IFNA4, IFNA17, , IFNA21, IFNK, IFNA10, IFNA1, IFNB1, IFNA6, IFNE, IFNA16, IFNW1, IFNA8, IFNA14 olmak üzere interferon genlerinin yer aldığı görülmektedir. Bunların yanında bu bölgede ise *PRLR*, *GDF6*, *LIFR* genleri de yer almaktadır.

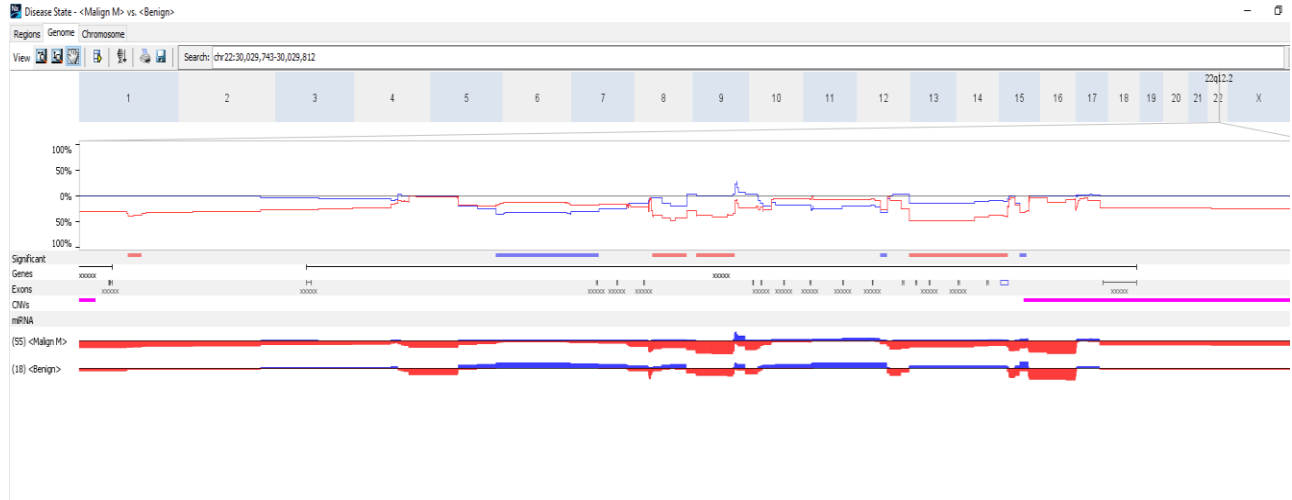


Şekil 4.5: Reseptör bağlanma aktivitesi daha detaylandırıldığında Sitokin aktivitesi ile ilgili genlerin en fazla sayıda olduğunu görmekteyiz.

4.1.2-BAP'a (Benign gruba) özgü olarak bulunan genomik anomali bölgeleri ve görülme sıklıkları

Benign grupta 22. Kromozom q12.2 bölgesinde %38.8 sıklıkla NF2 geninin bir kısmına yoğunlaşmış kopya sayısı artışı olduğu saptanmıştır. Söz konusu bölgedeki kopya sayısı artışı MPM grubunda % 1.8 olarak gözlenmiştir. NF2 geninin bir önceki kısımda (4.1.1) belirtildiği üzere MPM grubunda sık delesyona uğradığı gözlenmektedir.

Kromozom 22



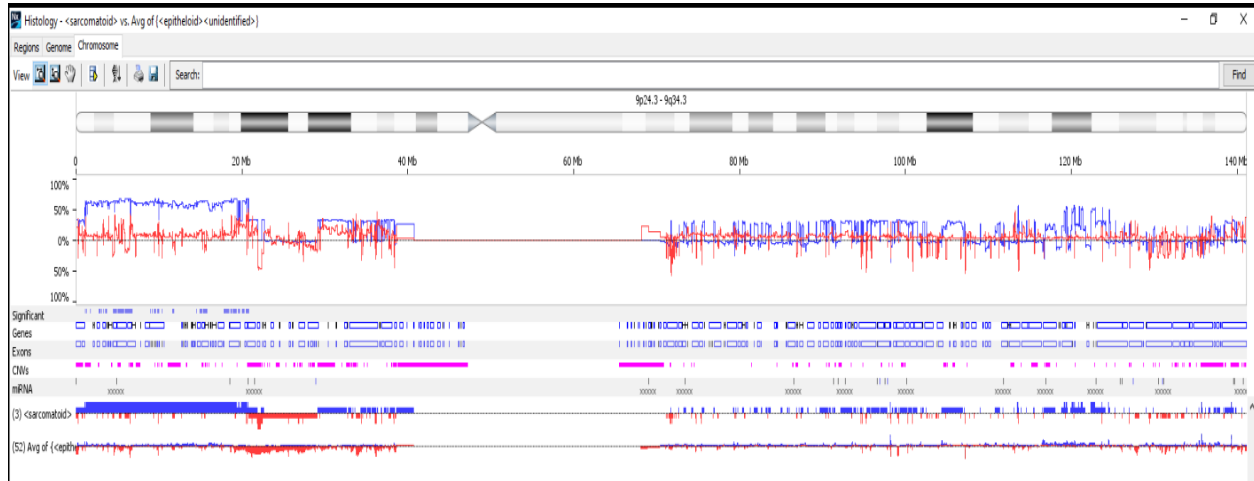
Kopya Sayısı Artışı

22q12.2 / BAP % 38.8 MPM % 1.8: NF2.

4.2-MPM Grubunda Histolojik Alt Tipe Özgü Genomik Anomali Kalıbının İncelenmesi

MPM grubunu oluşturan hastalar tümör histolojik alt tiplerine göre ayrılıp genomik anomali kalıpları karşılaştırıldığında, Sarkomatoid alt tipe sahip bireylerin anomali pozisyonlarının ve frekanslarının diğer alttiplerden (epitelioid n=41, mixed=6, belirsiz=5) farklı olduğu gözlemlendi. Sarkomatoid hasta grubunu oluşturan üç bireyde bu anomali kalıbı diğer alt tiplere göre daha sık gözlemlendi. Başta 9, 7, 18, 16. Kromozomlar olmak üzere 6, 5, 4, 12, 11, 3, 12, 11. kromozomlarda da Sarkomatoid tip için anlamlı fark yaratan anomaliler gözlemlendi. Bu kromozomal bölgelerin, içerdikleri anomali tipleri (delesyon, kopya sayısı artışı), frekansları ve etkiledikleri gen bölgeleri aşağıda verilmiştir. *Sarkomatoid Maksimum Frekans %100- Minimum Frekans %66,6 / Diğer alttiplerin ortalaması = Maksimum Frekans %1,9, Minimum Frekans %0 : p<0,01.*

Kromozom 9



Kopya Sayısı Artışı

9p21.3: FOCAD, MLLT3, FOCAD-AS1,

9p22.1: SLC24A2, SAXO1, RRAGA, SCARNA8, HAUS6, PLIN2, DENND4C, RPS6, MIR3152, ADAMTSL1.

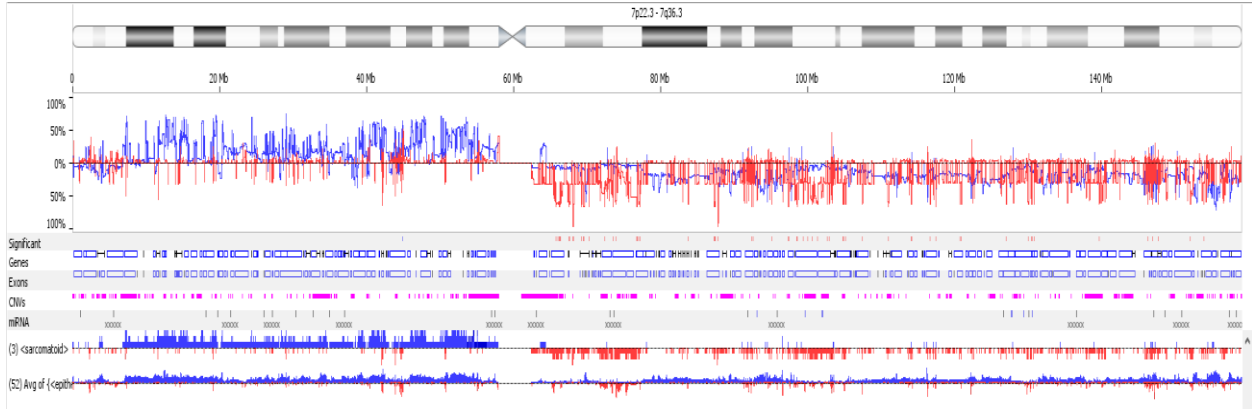
9p22.3: PSIP1, CCDC171, SNAPC3, TTC39B, FREM1, LOC389705

9p23: PTPRD.

9p24.1: KDM4C, GLDC, UHRF2, TPD52L3, KIAA2026, MIR4665, RANBP6, IL33, PLGRKT, CD274, PDCD1LG2, RIC1, ERMP1, INSL4, RLN2, RLN1, PLGRKT, JAK2, RCL1, MIR101-2, CDC37L1-AS1, CDC37L1, AK3, SPATA6L.

9p24.2: KIAA0020, RFX, RFX3, RFX3-AS1

Kromozom 7



Delesyonlar

7q11.21: RABGEF1, KCTD7, LOC100996437, TPST1

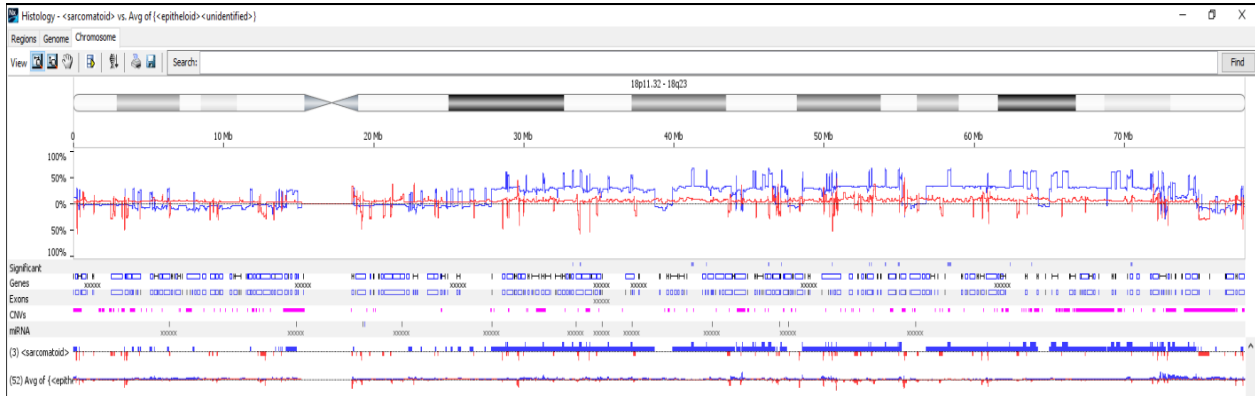
7q11.22: AUTS2.

7q11.23: PTPN12, GSAP, LOC101927243, CCDC146, GTF2IRD1, LIMK1

7q21.12: ADAM22, SLC25A40, RUNDC3B, ABCB1, RUNDC3B

7q21.2: CDK6, ASB4, TRRAP, FBXL13, RINT1, EFCAB10, SRPK2, FOXP2, IMMP2L, ST7, CPED1, CPA5, CPA1, CEP41, TBXAS1, CNTNAP2, KMT2C

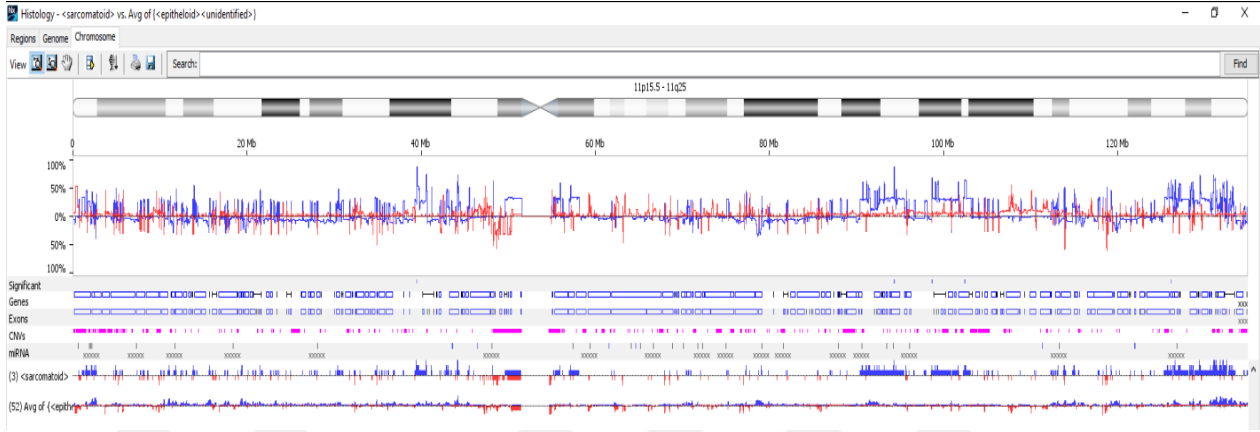
Kromozom 18



Kopya Sayısı Artışı

18q12.2: ELP2, MOCOS, GALNT1

Kromozom 16



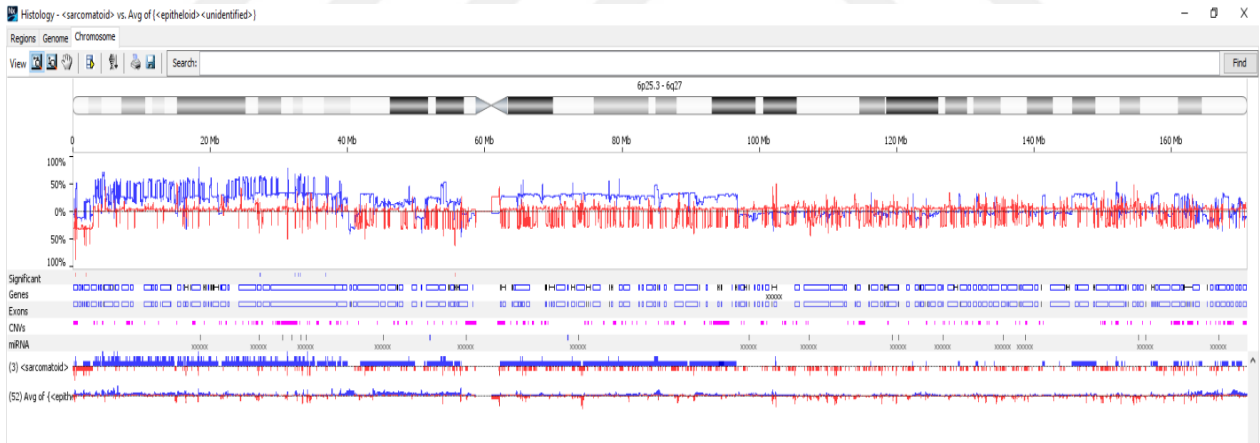
Kopya Sayısı Artışı

16q22.2: CALB2

16q23.2: CDYL2

16q24.2: LOC400553

Kromozom 6



Kopya Sayısı Artışı

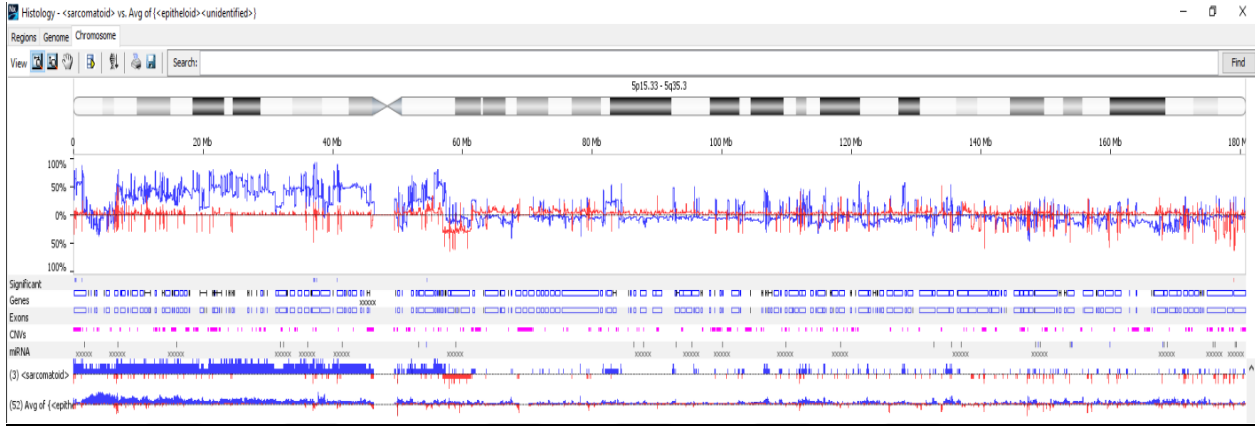
6p12.1: BMP5

6p21.32: COL11A2, RXRB, SLC39A7, HSD17B8, MIR219A1, RING1, HCG25, VPS52, RPS18, B3GALT4, WDR46, C6orf10.

6p22.1: ZNF204P, ZNF391

6p22.2: HMG4

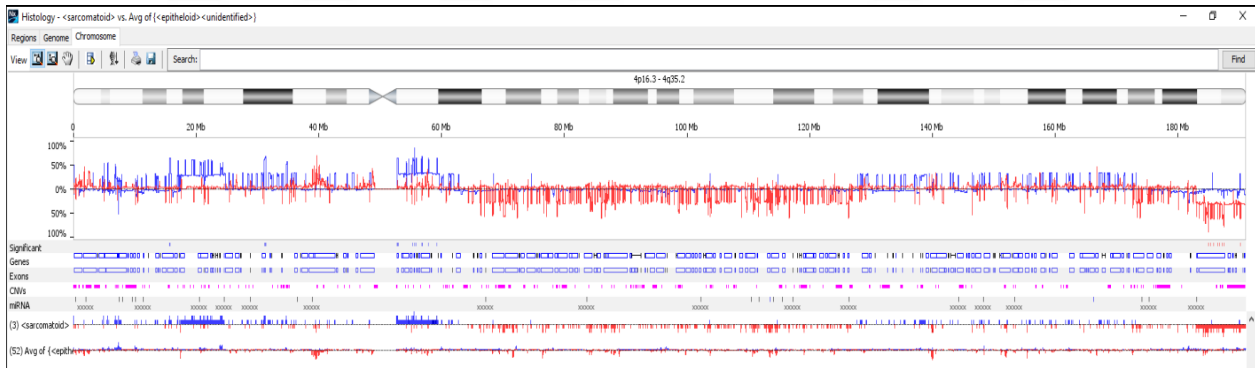
Kromozom 5



Kopya Sayısı Artışı

5p15.33: LRRC14B, CCDC127, SDHA, HRAT5, PDCD6, AHRR

Kromozom 4



Kopya Sayısı Artışı

4p15.1: PCDH7, LOC102723778

4p15.32: FBXL5, FAM200B, BST1, CD38

4q11 - q12: DCUN1D4, LRRC66, SGCB

4q12: POLR2B, EXOC1, KDR, SPATA18

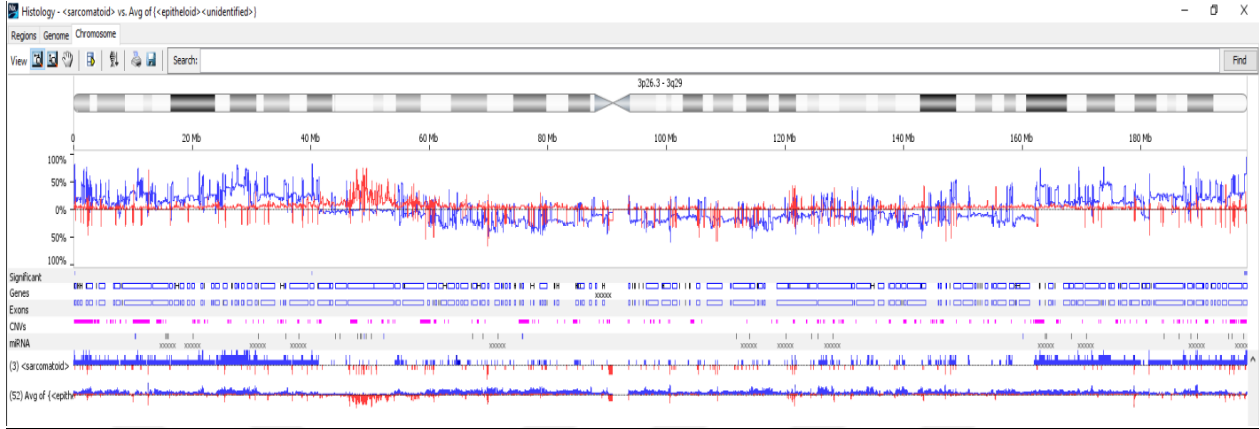
4q29: LRCH3, IQCG, RPL35A, LMLN, LMLN-AS1, FYTDD1, LRCH3

Delesyon

4q35.1: SORBS2, IRF2

4q35.2: FAT1.

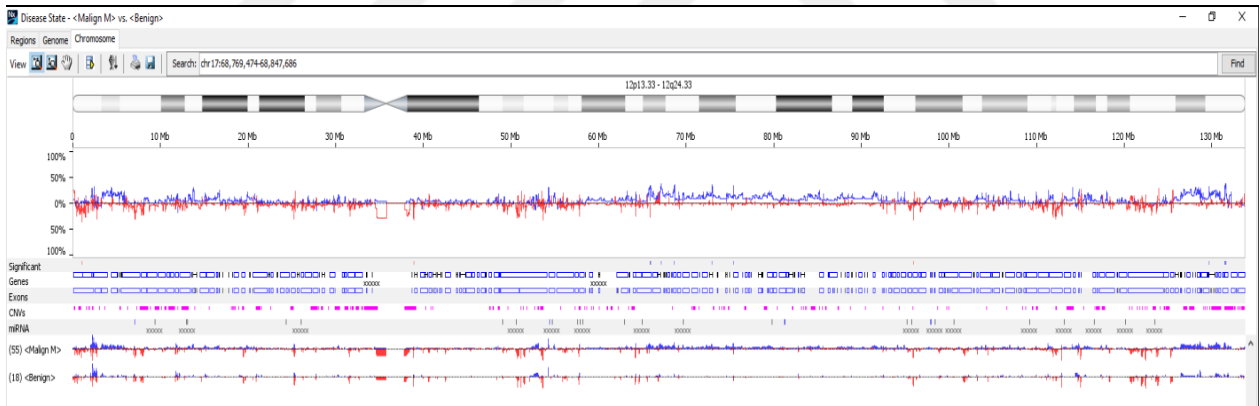
Kromozom 3



Kopya Sayısı Artışı

3q29: LRCH3, IQCG, RPL35A, LMLN, LMLN-AS1, FYTDD1, LRCH3

Kromozom 12



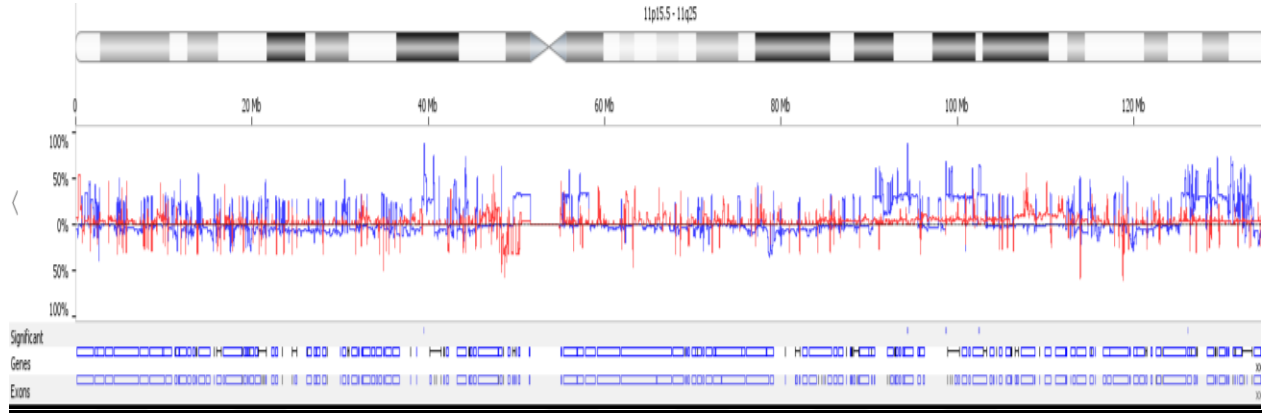
Kopya Sayısı Artışı

12p13.2: ETV6, RNU6-19P, PRH1-PRR4, TAS2R20, PRH1-PRR4, TAS2R19, PRH1, TAS2R3, LOC101928100, KLRK1, KLRC4, KLRC3.

Delesyon

12p13.31: LTBR

Kromozom 11



Kopya Sayısı Artışı

11q24.2: SRPR, FOXRED1, TIRAP.

11q22.2: MMP20, MMP27, MMP8.

4.3-MPM Hastalarının SNP Array Sonuçlarında Saptanan Karmaşık Kromozomal Anomali Kalıplarının Tüm Genom Dizileme ile Doğrulanması ve Detaylı İncelenmesi ile Elde Edilen Bulgular

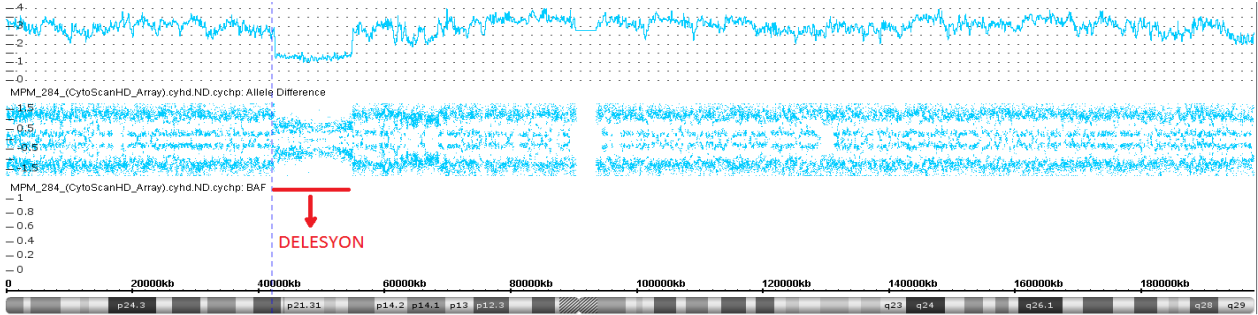
Çalışmamızda MPM olgularında ilk olarak SNP array metoduyla aday Chromomanagenesis (Chromo= kromozom,-anagenesis=yeniden doğuş) terimi altında incelenen Chromothripsis, Chromoplexy ve Chromoanasyntesis benzeri anomali kalıpları saptandı. Bu anomalilerin saptandığı bireylerin genomlarında, söz konusu değişimleri daha iyi anlamak amacıyla aynı hasta grubundan seçtiğimiz 3 tümör DNA'sında tüm genom dizileme tekniği kullanıldı (TUBİTAK 1002 Proje No: 115S819). Bu sayede SNP array verilerimizden elde edilemeyen birçok detaylı bilgiye ulaşıldı. Söz konusu 3 tümör genomundan elde edilen bilgiler, konu hakkındaki güncel literatürlerde belirtilen kıstaslar göz önünde bulundurularak değerlendirildi. Böylece SNP arrayleri yapılmış üç bireyden elde ettiğimiz anomali bilgilerinin farklı bir metodla da doğrulamış bulunmaktayız. Tüm genom dizileme verisi, bizlere, kromozomları etkileyen delesyon ve amplikasyonlara ek olarak, MPM hastalarında kromozomların çok daha kompleks yeniden düzenlenmelerden de etkilendiğini göstermiştir. Ayrıca bu yöntem sayesinde hastalık yatkınlığına neden olabilecek çeşitli patojenik aday nükleotid varyantları da bulunmuştur. Bu SNP array ve tüm genom dizileme çalışmalarından elde edilen bulgular, kombine olarak bu bölümde verilmiştir.

4.3.1-MPM SNP Array Verilerinden Elde Edilen Anomalilerin Tüm Genom Dizileme İle Doğrulanmasına Örnek Bulgular

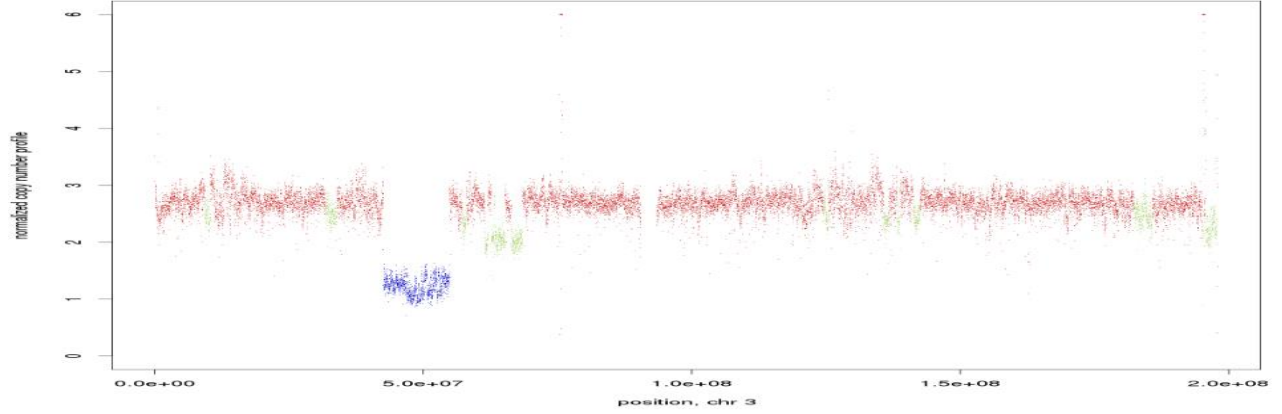
SNP array verilerinden elde edilen amplifikasyon ve delesyon bölgeleri bu çalışmada kullandığımız tüm genom dizileme yöntemiyle doğrulanmış olup iki yöntemde de kopya sayısı artışları ve kayıpları aynı olarak saptanmıştır (Şekil 4.6- Şekil 4.11). Tüm genom dizileme ham verileri, MANTA adı verilen (Chen et al., 2015) algoritması ile incelendiğinde kopya sayısı değişimleri, inter ve intra kromozomal parça değişimleri saptandı.



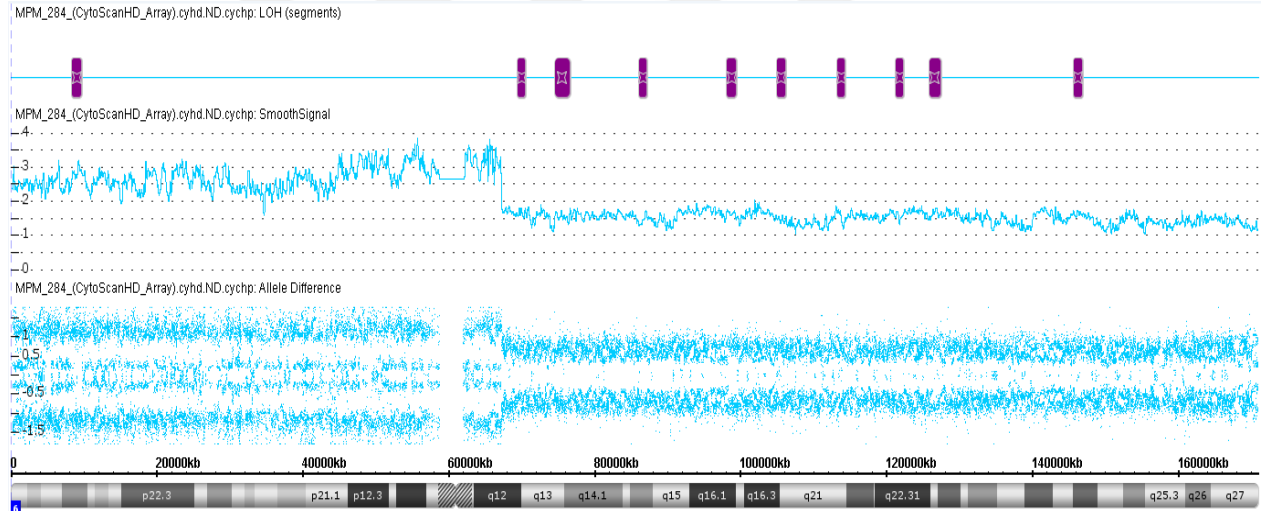
Şekil 4.6: Tüm genom dizileme yöntemi ile elde edilmiş, Mezotelyomalı hastaya ait 3. kromozom görüntüsü. Görüntüde 3p22.1-14.3 bölgesini kapsayan bir delesyon (kırmızı okla gösterilmekte) ve geri kalan tüm kromozom bölgesinde 3 kopya sayısı şeklindeki amplifikasyonlar gözlenmektedir.



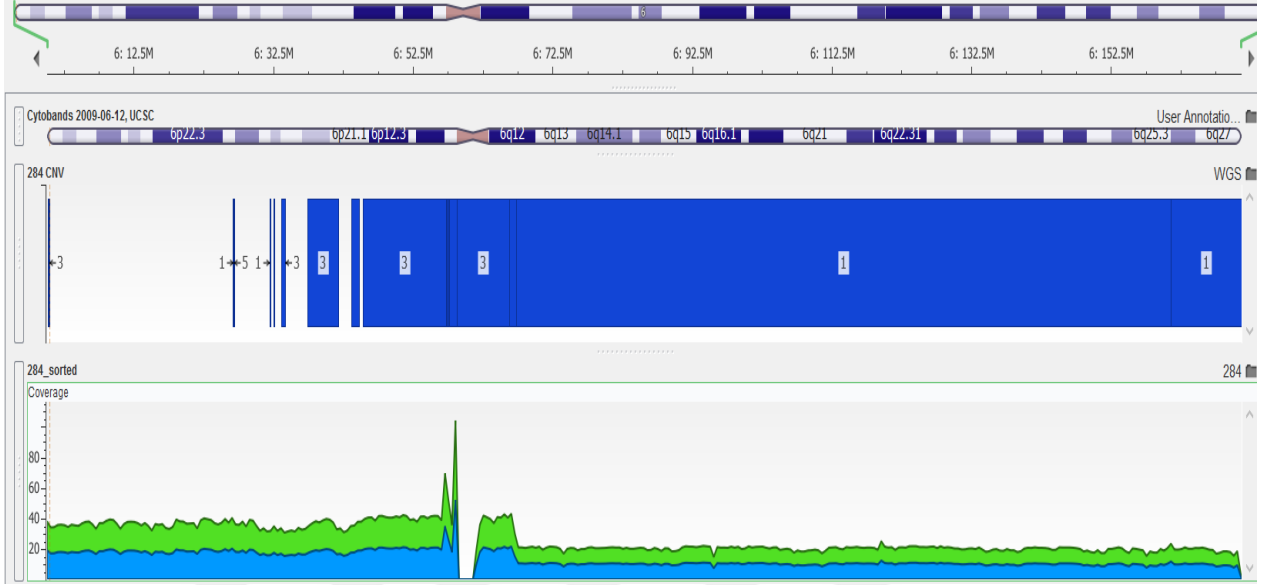
Şekil 4.7: Şekil 4.6`daki hastanın yine 3. Kromozomunun SNP array görüntüsü. Bu yöntemle de saptanan kopya sayısı değişimleri aynı miktarda ve aynı kromozomal pozisyonlarda bulunmuştur. Çalışmamıza dahil edilen üç bireyde saptanan majör kromozomal anomaliler (delesyon ve amplifikasyonlar) hepsi bu örnekte verildiği gibi tüm genom sekanslama yöntemiyle de doğrulanmıştır.



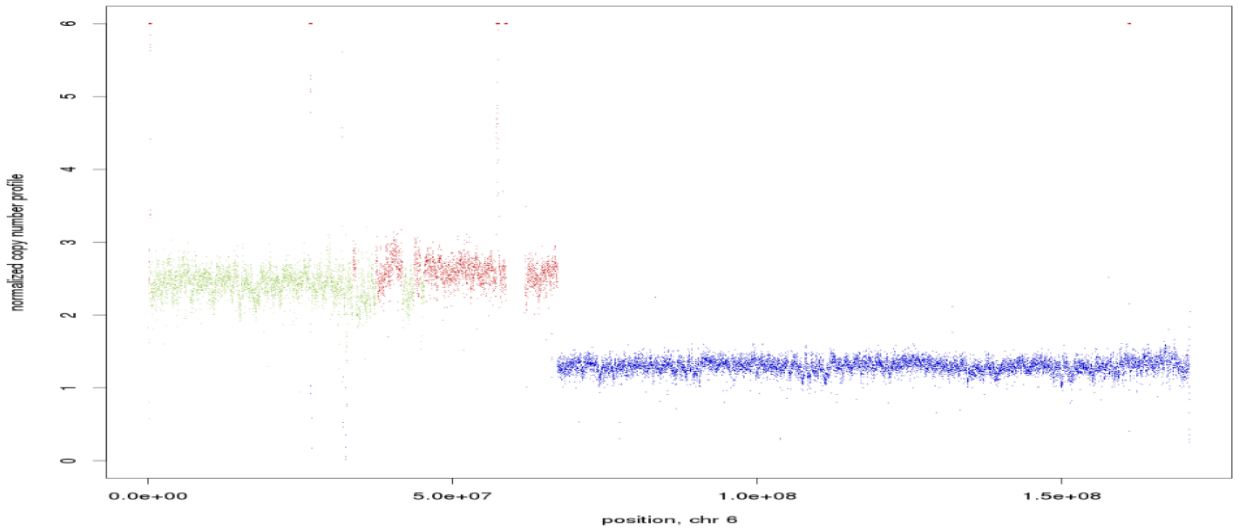
Şekil 4.8: Şekil 4.6 ve Şekil 4.7' de verilen aynı kromozom anomalilerin tüm genom dizileme sayesinde elde edilen ve kromozom boyu kopya sayısı kazanım (kırmızı noktalar) ve kaybını (mavi noktalar) gösteren MANTA uygulaması analiz sonucu. Yeşil noktalar normal kopya sayısı olan 2 yi göstermektedir.



Şekil 4.9: Bir MPM hastasının 6. Kromozomuna ait kopya sayısı değişimlerini gösteren SNP array görüntüsü.



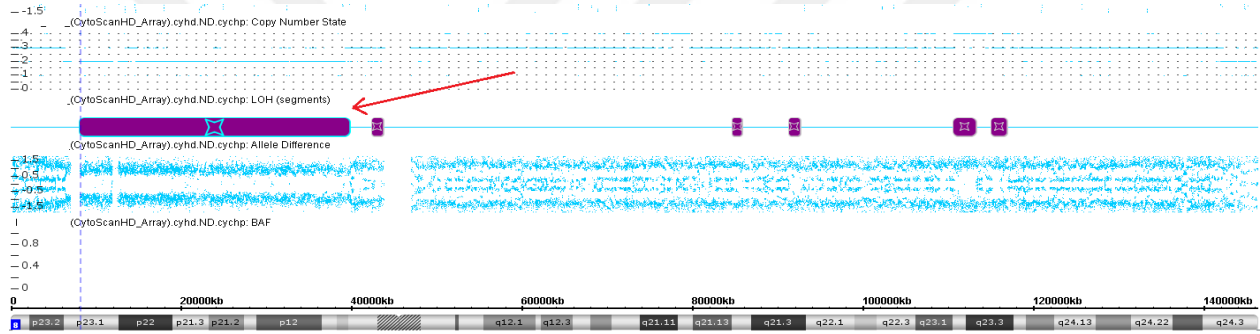
Şekil 4.10: Şekil 4.9' daki kromozom anomalisinin tüm genom dizileme sonucu elde edilen sonucu. SNP array verisinde olduğu gibi kromozomu etkileyen 3 ve 1 kopya sayıları tüm genom dizileme sonucunda da aynı şekilde saptanmıştır.



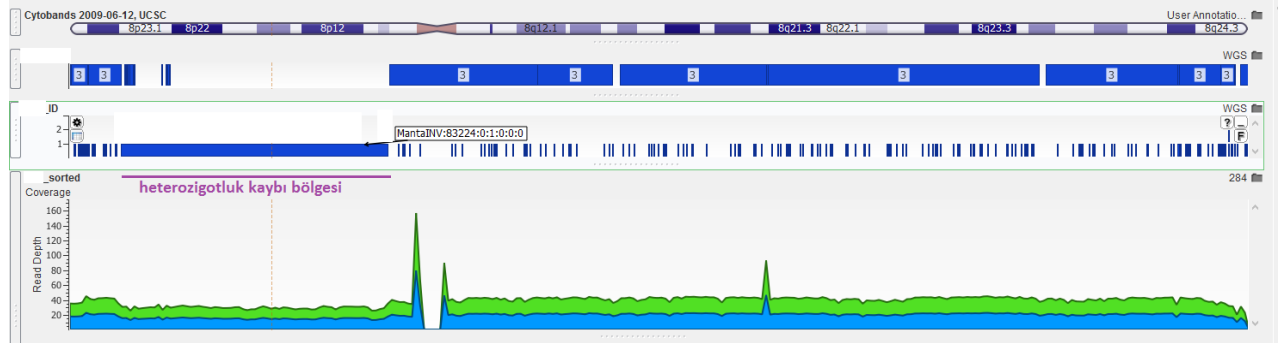
Şekil 4.11: Şekil 4.9 ve Şekil 4.10' da verilen aynı kromozom anomalilerin tüm genom dizileme sayesinde elde edilen ve kromozom boyu kopya sayısı kazanım (kırmızı noktalar) ve kaybını (mavi noktalar) gösteren MANTA uygulaması analiz sonucu. Yeşil noktalar normal kopya sayısı olan 2'yi göstermektedir.

4.3.2-MPM'de Heterozigotluk Kayıpları ile Inversiyon ve Kromozomal Parça Değişim İlişkisi

SNP array tekniğinin kısıtlamaları yüzünden çalışmamızda inversiyon bilgilerine ulaşamamıştık. Tüm genom dizileme elde edilen veriler biyoinformatik MANTA algoritmi (Chen et al., 2015) sayesinde işlenerek çeşitli büyüklüklerde ve kanser gelişimini etkileyebilecek gen gruplarına denk gelen inversiyon bölgeleri de saptandı. Dikkat çekici bir bulgu olarak, inversiyon rastlanan bölgelerin bir kısmının SNP array verilerinde saptanmış heterozigotluk kaybı bölgelerine denk gelmesidir. Bu sayede SNP array verilerinde nedenini saptayamadığımız bazı heterozigotluk kayıplarının nedeninin büyük çaptaki inversiyonlar olduğunu belirlendi (Şekil 4.12, Şekil 4.13).



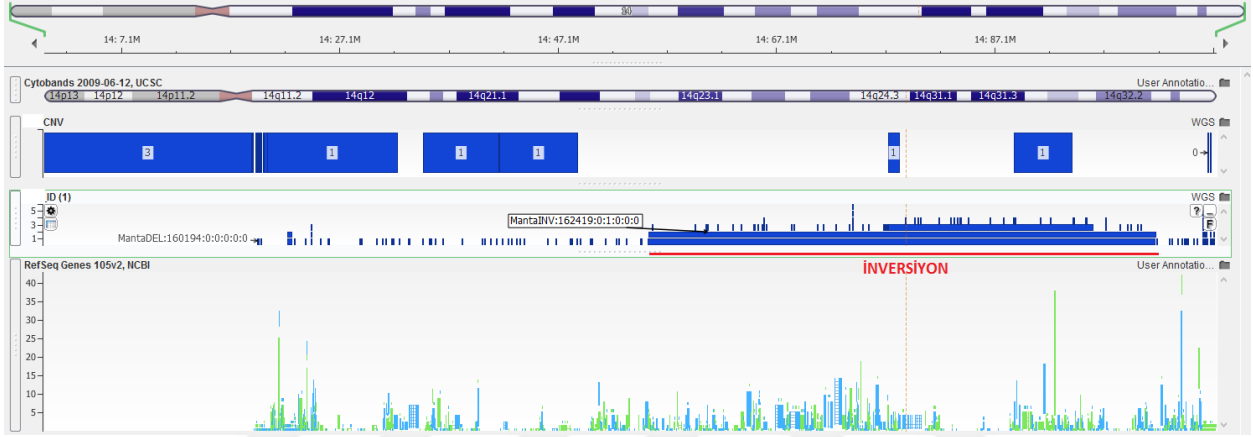
Şekil 4.12: SNP array verisinden elde edilen 8. Kromozom görüntüsü. Kırmızı okla gösterilen mor dikdörtgen Heterozigotluk kaybına denk gelen bölge olarak SNP array bulgusunda tanımlanmıştır. SNP array verisinde bu bölge normal kopya (2) sayısında gözlenmekle beraber bu bölgede heterozigotluk kaybına neden olacak delesyon veya amplifikasyon saptanmamıştır (kopya sayısı=2 olması nedeniyle, kopya nötr heterozigotluk kaybı). Tüm genom dizileme sayesinde kaynağını önceden çözemediğimiz heterozigotluk kaybına bir inversiyonun neden olduğu bilgisine ulaşmış olduk (Bak Şekil 4.13). İki yöntemde de Kromozomun geri kalan diğer bölgelerinde 3 kopya artışı gözlemlendi.



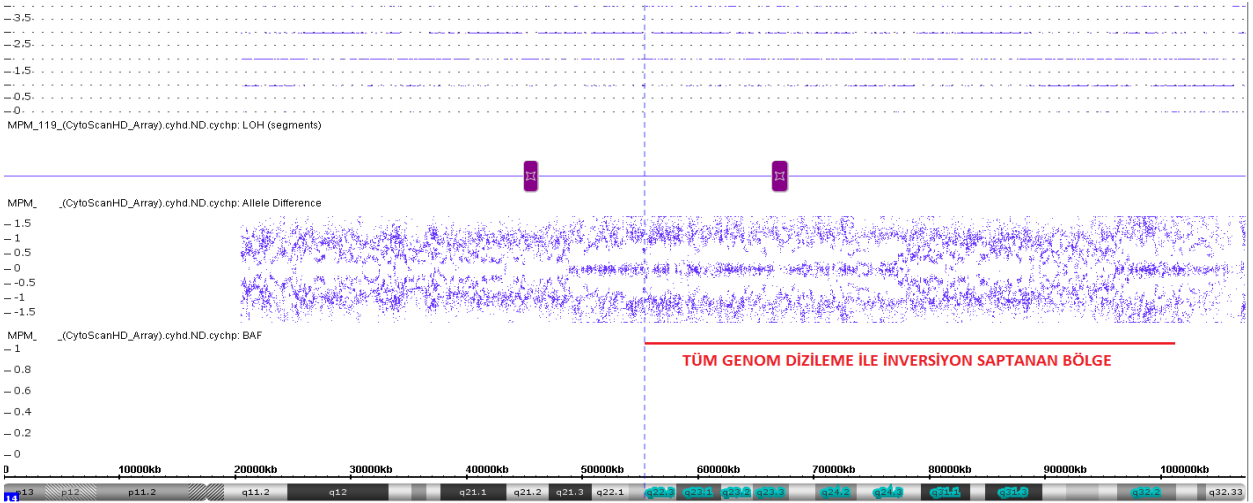
Şekil 4.13: Şekil 4.12 'deki bireyin 8. kromozomuna ait tüm genom dizileme görüntüsü. SNP array verisinde heterozigotluk kaybı olarak tanımlanan bölgenin MANTA analizi sonucu aslında tamamen invert olduğu saptanmıştır ve bu büyük heterozigotluk kaybı bölgesinin nedeninin bu inversiyon olduğu anlaşılmıştır.

Şekil 4.12 ve 4.13' te vurgusu yapılan 8. Kromozomun bu inversiyon bölgesi 31,713 Kbç'lik bir bölgeye denk gelmekte olup toplamda 234 adet geni kapsamaktadır. Bu 234 genden CTSB, MSR1, PCM1, LPL, WRN, WHSCL1 ve FGFR1 gibileri başta olmak üzere birçok diğer kanser türlerinde de rollerinin de olduğu OMIM (Online Inheritance In Man. -www.omim.org) veri bankasından ulaşılmıştır.

Yine kromozom 14'te 53,782,629 bç büyüklüğündeki inversiyon bölgesi belirlenmiştir (Şekil 4.14-Şekil 4.15).

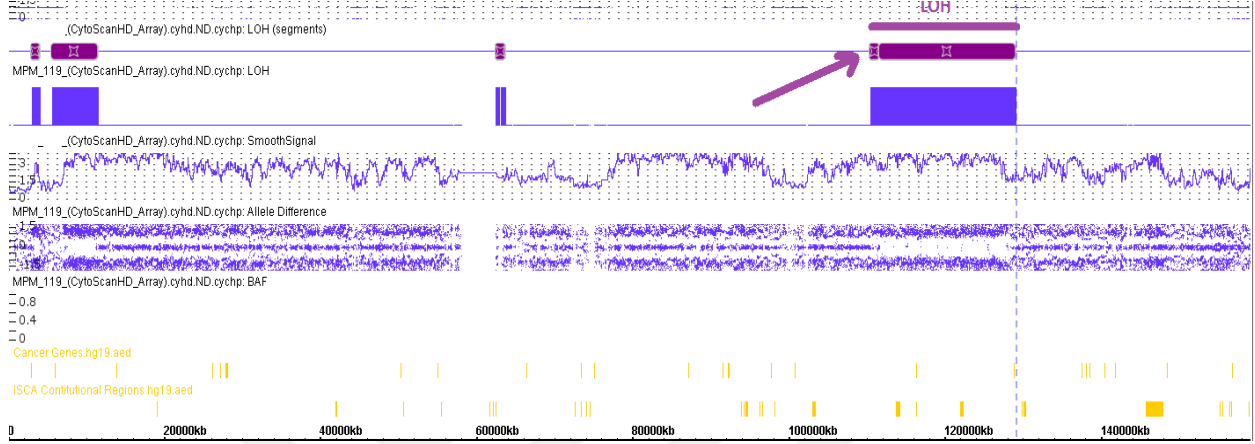


Şekil 4.14: Bir hastanın tüm genom dizileme tekniğiyle elde edilmiş 14. Kromozom görüntüsü. Kromozom boyunca gözlenen kopya sayısı artışlarıyla beraber SNP array verilerinde gözlenmeyen 53,782,629 baz çifti büyüklüğünde büyük bir inversiyon saptanmıştır.

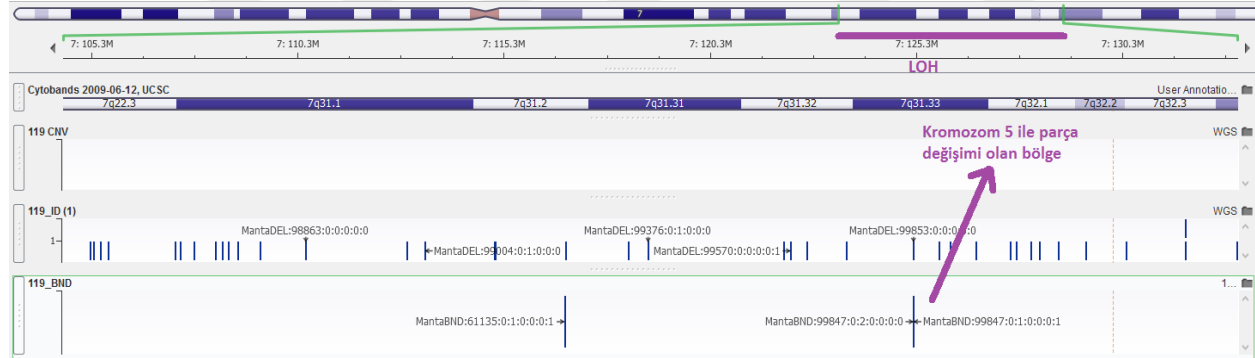


Şekil 4.15: Şekil 4.14 'deki bireyin 14. Kromozomunun SNP array analiz görüntüsü. Tüm genom dizileme verisiyle de uzlaşır şekilde SNP arrayde de kromozom boyunca kopya sayısı değişimleri gözlenmektedir. 14q22.3- 14q32.2 bölgelerin tüm genom dizi analizi sayesinde büyük bir inversiyon saptanmıştır.

Bu büyük inversiyonların yanında, 7. Kromozomda kromozomlar arası parça değişimleri olduğu da tüm genom dizileme sayesinde bulundu (Şekil 4.16-Şekil 4.17).



Şekil 4.16: SNP array verisinde saptanan 17,043 kbp büyüklüğündeki heterozigotluk kaybı. Bu boyuttaki bir heterozigotluk kaybının nedeni SNP array verisinde saptanamamıştır. Bu kayba neden olabilecek genomik anomaliler tüm genom dizileme ile Şekil 4.17’de gösterilmektedir.

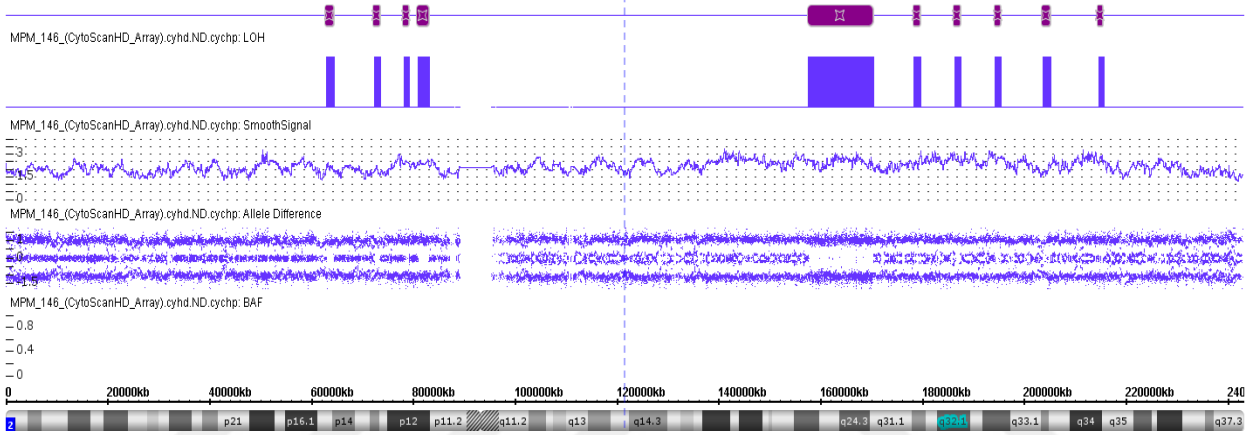


Şekil 4.17: Şekil 4.16’ daki kromozoma ait tüm genom dizileme görüntüsü. Bu heterozigotluk kaybının nedeninin bölgeye denk gelen delesyonların yanında kromozom 5 ile parça değişiminin neden olabileceğini göstermektedir. Mor okla gösterilen bölgede kırık noktaları gösterilmektedir. Benzer anomaliler aynı hastanın 8-17 ve 6-20 kromozomları arasında da gözlenmiştir.

4.3.3-MPM’de Chromoanagenesis Benzeri Kompleks Genomik Anomali Kalıpları Gözlemlenen Kromozomların İncelenmesi, İnter-İnter Kromozomal Yeniden Düzenlemeler

Mezotelyoma kanser genomunun daha iyi anlaşılabilmesi, aday Chromothripsis yapılarındaki yeniden düzenlenme olaylarının saptanabilmesi için tüm genom nükleotid düzeyinde taranarak yeniden düzenlenme bölgeleri detaylandırılmıştır. Bu amacı gerçekleştirmek için SNP array analizleri

yapılmış 3 Mezotelyoma tümör DNA' sında tüm genom dizilenmiştir. Bu 3 birey seçilirken özellikle Chromothripsis kalıbına benzer kompleks genomik anomalileri (Şekil 4.18-Şekil 4.19) bulunduran bireyler özellikle seçilmiştir. Tüm genom dizilemesi, bu kalıpların gözlemlendiği kromozomlarda, bir kromozom içinde Chromothripsis karakterinde gözlenen yeniden düzenlenmelerin yanında, birden fazla kromozom arası parça değişimleri ve daha çok kopya sayısı kazanımlarıyla karakterize Chromoanasythesis benzeri düzenlenmelerin de bulunduğunu göstermiştir. Bu anomaliler tek kromozomu etkilemektedir, bunun yanında, bazı kromozomlar da birden çok anomali kalıbına özgü özellikler gösterdiği de saptanmıştır.

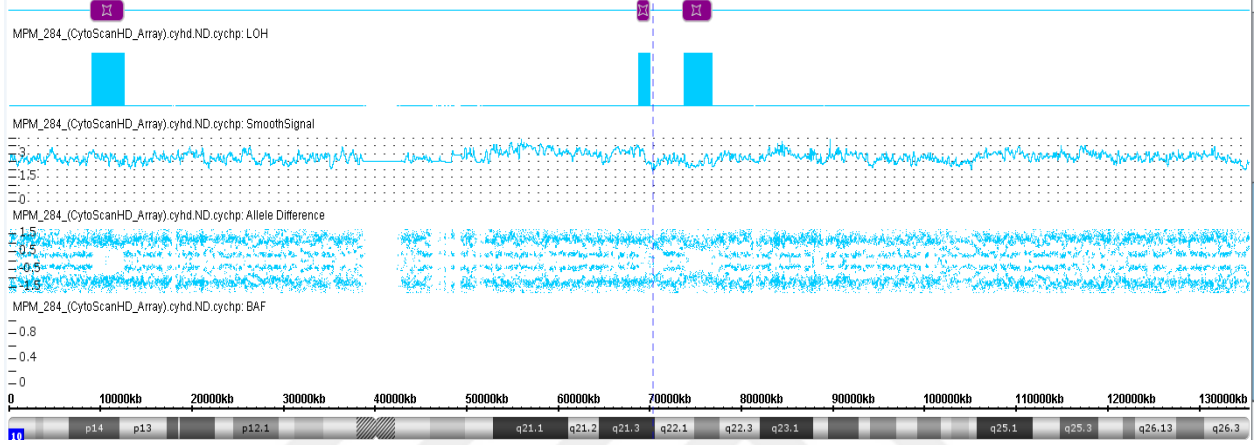


Şekil 4.18: SNP array verimizden elde edilen 2. Kromozoma ait aday Chromothripsis olayı. Özellikle q koluna lokalize kopya sayısı salınımları ve Heterozigotluk geri kazanımları ile karakterize Chromothripsis kalıbı.



Şekil 4.19: Şekil 4.18'deki kromozomun tüm genom dizileme yöntemiyle elde edilen görüntüsü. Chromothripsis'e neden olan kırık noktalar (delesyonlar) orta paneldeki mavi çizgilerle gösterilmiştir. Tüm genom dizileme sayesinde Chromothripsis'ten etkilenmiş bu kromozomunda ayrıca diğer farklı 3 kromozomla da parça değişimi gerçekleştiği gözlemlenmektedir.

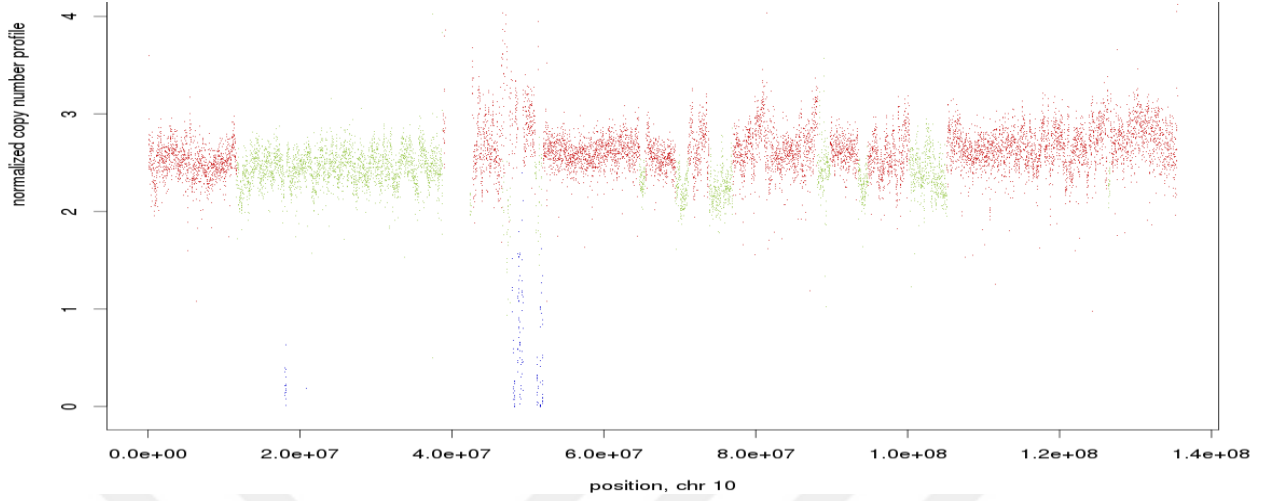
Bu incelediğimiz 3 bireyde, kalıp olarak Chromothripsis'te görüldüğü gibi kopya sayısı salınımlarının gözlemlendiği fakat Chromothripsis'ten farklı olarak, daha çok artmış kopya sayılarıyla karakterize Chromoanasyntesis örneklerine de rastlanılmıştır. SNP array verilerinde Chromothripsis adayı olarak gözlemiş olmamıza rağmen bu anomalilerin daha çok Chromoanasyntesis anomali kalıbına benzediği belirlenmiştir (Şekil 4.20-Şekil 4.22).



Şekil 4.20: Bir hastanın 10. Kromozomuna ait SNP array görüntüsü. Görüldüğü üzere artmış kromozom, artmış kopya sayısı (2 ve 3) ve kopya sayısı salınımlarıyla Chromoanasyntesis özelliği göstermektedir.



Şekil 4.21: Şekil 4.20 'deki aynı hastanın tüm genom sekanslamasından elde edilen 10.kromozom görüntüsü. SNP arrayde de saptanan artmış kopya sayılarının yanında kromozom içerisinde iki farklı kromozom arasında gerçekleşen parça değişimleri. Görüldüğü gibi tüm genom sekanslama bu yapıya ek olarak iki farklı kromozom arasında parça değişiminin de olduğunu göstermiştir.

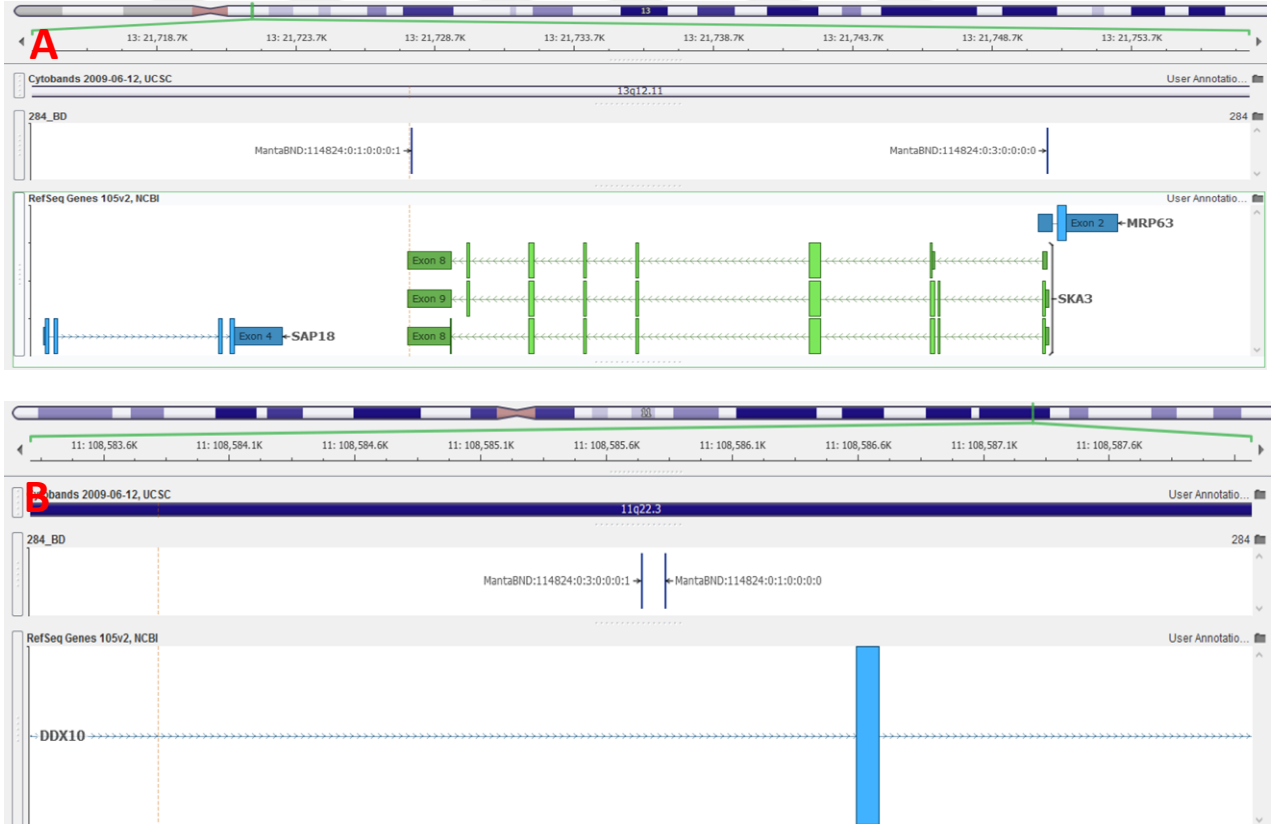


Şekil 4.22: Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de görülen 10. Kromozomun tüm genom sekanslama sayesinde elde edilmiş kopya sayısı değişimlerini görülmektedir. Artmış 3 kopya sayıları (kırmızı noktalar), 2 kopya sayısı (yeşil noktalarla ifade edilmiştir) görülmektedir. Bu anomali kalıbı ile Chromoanasythesis kriterlerine uygunluk göstermektedir. Bu durum akıllara kromozomların sadece münferit anomali kalıpları ve tanımlardan değil daha karmaşık bir yapı sonucu etkilendiklerini göstermektedir.

4.3.4-MPM genomlarında saptanan SKA3-DDX10 Füzyon geni

SNP array tekniğinin özelliği nedeniyle kromozomlar arasındaki parça değişimi bilgilerine ulaşamadık. Bu eksikliği telafi etmek amacıyla kullandığımız tüm genom dizileme ve biyoinformatik MANTA algoritmi (Chen et al., 2015) sayesinde çeşitli büyüklüklerde ve kanser gelişimini etkileyebilecek gen gruplarına denk gelen parça değişim bölgeleri saptadık (Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5).

Bütün bu bulgulara ilave dikkat çekici bir bulgu olarak iki hastada SKA3-DDX10 füzyon geni saptanmıştır. Bu füzyonun, SKA3 geninin tamamının DDX10 geninin 10 ve 11 intronları arasına yerleşmesiyle oluştuğu belirlendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: SKA3-DDX10 füzyon görüntüsü. Manta analizi sonucu Kromozom 13'te bulunan SKA3 geninin (A) DDX10 geninin 10 ve 11. İntronları arasına (B) entegre olduğu gözlemlendi.

4.3.5-MPM'de Diğer Kromozomlar Arası Saptanan Parça Değişimleri

Tüm genom dizileme yöntemi sayesinde saptanmış kromozomlar arası parça değişimleri belirlendi (Tablo 4.3-Tablo 4.5).

Tablo 4.3: Hasta 1' de Kromozomlar arası parça değişimlerinin olduğu genomik koordinatlar ve etkiledikleri gen bölgeleri

Kromozom	Kırık Noktası	Birleşme Noktası	Etkilenen Genler
chr1	28515676	chr19:24027942	PTAFR
chr1	72361232	chr2:102912433	NEGR1
chr1	84517939	chrX:76411860	
chr1	109494853	chr3:110413394	
chr1	109495133	chr3:110413395	
chr1	158725872	chr2:148952671	
chr1	164240436	chr2:190999445	
chr1	168420929	chr8:30105890	
chr2	30531334	chr9:17693939	
chr2	30633789	chr9:15722617	
chr2	97212762	chrX:100544818	
chr2	204055414	chr7:140321239	DENND2A
chr2	213785362	chr6:8695409	MIR4776
chr2	213791509	chr6:57037444	
chr2	234090306	chr7:1199813	INPP5D/ZFAND2A
chr3	48251971	chr7:65045606	INPP5D/ZFAND2A
chr3	80325190	chr6:121481644	
chr3	111274086	chr8:128533830	
chr3	134299269	chr6:36913755	
chr3	135170325	chr6:62725842	KHDRBS2
chr3	135170745	chr6:62725775	
chr3	187728890	chr6:93096669	
chr3	187728894	chr6:93097208	
chr4	80894475	chr5:21207714	ANTXR2
chr4	169165063	chr7:116808545	DDX60/ST7
chr5	21573432	chr6:57575919	GUSBP1
chr5	21899871	chr13:61461040	CDH12
chr5	37709720	chr7:8663314	
chr5	37709849	chr7:8663302	
chr6	382459	chr16:33428530	
chr6	16380085	chr17:43582463	ATXN1/3'UTR LRRC37A4P

chr6	16380110	chr17:43582906	ATXN1/3'UTR LRRC37A4P
chr6	57037444	chr2:213791509	BAG2
chr6	123171431	chr15:70839566	
chr6	154216091	chr20:25888637	
chr7	81789163	chr10:60902930	CACNA2D1
chr7	125264207	chr12:74014507	
chr7	125264220	chr12:74014367	
chr8	30145402	chr17:7167959	
chr8	30145623	chr17:7167890	
chr8	34773325	chr12:24116681	
chr8	52730143	chr11:38812669	SOX5
chr9	38243931	chr15:63770031	
chr10	6239046	chr14:20421302	PFKFB3
chr10	6239090	chr14:48867724	
chr11	108585748	chr13:21750661	
chr11	108585765	chr13:21727734	
chr13	44069935	chr15:41871631	ENOX1/3'UTR TYRO3
chr20	11281580	chrX:81651235	

Tablo 4.4: Hasta 2' de Kromozomlar arası parça değişimlerinin olduğu genomik koordinatlar ve etkiledikleri gen bölgeleri

Kromozom	Kırık Noktası	Birleşme Noktası	Etkilenen Genler
chr1	9121449	chr14:93712486	SLC2A5/BTBD7
chr1	28515676	chr19:24027942	
chr1	38241383	chr19:11422016	
chr1	109494853	chr3:110413394	
chr1	109495133	chr3:110413395	
chr1	119401289	chr2:141852927	
chr1	168024580	chr19:24033228	GCSHP5/ZNF254
chr1	168025732	chr19:24033178	GCSHP5/ZNF254
chr1	168420929	chr8:30105890	
chr2	68914955	chr5:64467981	
chr2	116376757	chr9:131458590	
chr3	48251899	chr15:45989680	

chr3	111274086	chr8:128533830	
chr3	146857897	chr4:181955612	
chr3	146857906	chr4:181935947	
chr3	146944652	chr4:182933674	
chr3	146946135	chr4:183059124	
chr3	146950766	chr4:183047571	
chr3	162926572	chr4:182939883	
chr4	128964986	chr17:49977259	
chr4	182859557	chr12:97944358	
chr5	54865800	chr10:75488965	
chr5	64467980	chr2:68914956	
chr5	159349718	chrX:66982804	
chr6	296061	chr16:33331520	
chr6	24684003	chr22:32927895	
chr6	26625794	chr7:68758441	
chr7	81789163	chr10:60902930	
chr7	111053153	chr12:108203264	
chr7	111053752	chr12:108203259	
chr7	125264220	chr12:74014367	
chr8	15289358	chr13:74314062	
chr8	15289367	chr13:74313862	
chr8	52730143	chr11:38812669	
chr8	134972205	chr18:57070998	
chr9	7185577	chrX:93186891	
chr9	20012178	chrX:92270369	
chr9	101477598	chr22:32575912	
chr11	61841813	chr14:81786774	
chr12	56989716	chr15:39994637	
chr12	56990096	chr15:39994621	
chr20	11281580	[chrX:81651235	

Tablo 4.5: Hasta 3' de Kromozomlar arası parça değişimlerinin olduğu genomik koordinatlar ve etkiledikleri gen bölgeleri

Kromozom	Kırık Noktası	Birleşme Noktası	Etkilenen Genler
chr1	28515672	chr19:24027942	PTAFR-ZNF254
chr1	81404771	chr4:104214671	
chr1	84517773	chrX:76411836	
chr1	88972876	chr17:32063905	ASIC2
chr1	109494853	chr3:110413394	
chr1	109495133	chr3:110413395	
chr1	119401333	chr15:51189302	
chr1	168025732	chr19:24033178	ZNF254
chr2	68914955	chr5:64467981	
chr2	194545043	chr14:65447266	CHURC1-FNTB
chr2	225020292	chrX:92696682	
chr2	225020555	chrX:92696685	
chr2	228222546	chr15:93839714	MFF
chr3	89509517	chr7:61778321	EPHA3
chr3	187728890	chr6:93096669	
chr3	187728894	chr6:93097208	
chr4	80894475	chr5:21207714	
chr4	170280992	chr14:52667735	
chr5	54865816	chr10:75489372	BMS1P4
chr5	159349683	chrX:66982794	
chr6	24683988	chr22:32928560	ACOT13/SYN3
chr6	24684003	chr22:32927895	ACOT13/SYN3
chr6	34936541	chr15:41673909	ANKS1A
chr6	154216091	chr20:25888637	
chr7	81789163	chr10:60902930	
chr7	87255768	chrX:97409802	
chr7	111053153	chr12:108203264	
chr7	111053752	chr12:108203259	
chr7	125264220	chr12:74014367	
chr8	15289358	chr13:74314062	KLF12

chr8	15289367	chr13:74313862	KLF12
chr8	52730244	chr11:38812697	
chr9	38243963	chr15:63770035	
chr9	80931888	chr12:2858859	PSAT1
chr9	80932489	chr12:2858881	PSAT1
chr11	61841813	chr14:81786774	
chr11	108585748	chr13:21750661	DDX10/SKA3
chr11	108585843	chr13:21727854	DDX10/SKA3
chr12	2858859	chr9:80931888	
chr12	2858881	chr9:80932489	
chr12	34017338	chr13:48856830	
chr12	56989716	chr15:39994637	RBMS2/FSIP1
chr12	56990096	chr15:39994621	RBMS2/FSIP1

4.4-MPM Yatkinlığına Neden Olabilecek Aday Nükleotid Değişimleri

4.4.1-Nükleotid Varyantlarının Belirlenmesi

Kanser gelişiminden veya yatkinlığından sorumlu olabilecek nükleotid düzeyindeki mutasyonların bulunması amacıyla web tabanlı TGex adlı uygulama kullanıldı (Stelzer, Rosen, et al., 2016). Tüm genom dizileme verilerinden elde edilen ve tüm genom nükleotid varyant bilgilerini içeren vcf. dosyaları TGex uygulamasına yüklenerek özellikle kanser fenotipi ile ilişkili olanları ayırdı. Bu uygulama sayesinde ilgili varyantların FATHMM, COSMIC, MutationAssessor Pred, MutationTaster Pred, Polyphen2, SIFT, CIVIC, 1000 genomes, Clinvar, varsome gibi in silico mutasyon hasar tahmin algoritmeleri ve veri bankaları kullanılarak kanserle ilgili patojenik mutasyonlar filtrelenmiştir. TGex uygulamasının VarElect (Stelzer, Plaschkes, et al., 2016) algoritmi sayesinde varyantlar kanser fenotipi ile skorlanmıştır. Bahsedilen tahmin programları, kanser mutasyon veritabanları ve VarElect algoritminden elde edilen veriler kombine edilerek aday mutasyon listeleri çıkarıldı. Kanser ilişkili en yüksek skora sahip bu varyantlar Mezotelyoma için aday nükleotid varyantları olarak bulgulara eklendi (Tablo 4.6- Tablo 4.7).

Bu bölümde verilen tek nükleotid varyantları, görülme sıklıklarına göre iki grup şeklinde incelendi (Tablo 4.6- Tablo 4.7). İlk grupta nadir sıklıkta rastlanan veya henüz bir veritabanında minör alel frekansı saptanmamış tarafımızdan saptanan nadir varyantlar, ikinci grupta ise polimorfizm niteliğindeki varyantlar gruplandırıldı. İki grupta ta saptanan varyantlar

heterozigot genotiplidir. Bu aday varyantlar seçilirken kanserle ilişkileri, in silico tahmin yöntemleriyle aday patojenik olma durumları ve TGex yüksek VarElect skorları gözönünde bulundurulmuştur. İlgi çekici bir bulgu olarak MPM yatkınlığı ile ilişkilendirilmiş BAP1 genine ait yeni bir frameshift mutasyon 3 no'lu hastada saptandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Tüm genom dizileme sayesinde saptanan hastalık ilişkili aday nadir nükleotid varyantları

Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3
BAP1 (Bueno et al., 2016) 3:52443757 G/A Missense, Splice site region Minor Alel Frekansı: ? COSMIC no: COSM5611451	TGFBR1 9:101891274, C/T, Missense Minor Alel Frekansı: ? COSMIC no :COSM5494494	BAP1 exon4 TA/T 1bp del 3:52442606 FRAMESHIFT Mutasyon Minor Alel Frekansı: ? (Yeni saptadığımız Mutasyon)
HYDIN 16:71101200 T/C Missense Minor Alel Frekansı : % 0.022 COSMIC no: COSM4844501	HYDIN 16:71101200 T/C Missense Minor Alel Frekansı : 0.022 COSMIC no: COSM4844501	HYDIN 16:71101200 T/C Missense Minor Alel Frekansı :% 0.022 COSMIC no: COSM4844501
RB1 13:49050902 T/G Missense Minor Alel Frekansı: ?	PALLD 4:169842725 A/C Missense Minör Alel Frekansı: 0.0020	NBN 8:90990521 T/C Missense Lösemi, aplastik anemi, herediter kanser yatkınlık sendromu ilişkili. Clinvar no: RCV000115797 Minor Alel Frekansı: % 0,16
ERCC4 16:14015940 G/A Missense Minor Alel Frekansı: %0.023	LZTS1 8:20112355 A/G Missense Minor Alel Frekansı :% 0.58 COSMIC no :COSM3734029	TP53 17:7578208 T/C Missense Minor Alel Frekansı: % ? COSMIC no: COSM307279
	GNRHR 4:68619737 T/C Missense Minor Alel Frekansı :% 0,35	KLF6 10:3822362 C/T Missense Minor Alel Frekansı: %0.00081 COSMIC no: COSM1347736
FGFR1 8:38287302, C/T Missense Minor Alel Frekansı : ?	ITGA9 3:37785454 G/A Missense Minor Alel Frekansı : % 0.58 COSMIC no : COSM3780891	RUNX2 6:45514855 ,C/T, Missense Minor Alel Frekansı :% 0.0016
MCC 5:112437438, , Splice Site, Minor Alel Frekansı :% 2,66	KMT2C 7:151880217 C/A Missense Minor Alel Frekansı:% 0.00083	TPTE 21:10921939, C/T Missense Minor Alel Frekansı : % 1.51

PDGFRA 4:55131118, C/T, Missense Minor Alel Frekansı : % 0,49	NFATC1 18:77208844 C/A Missense Minor Alel Frekansı : ?	EWSR1 22:29674030 C/A Missense Minor Alel Frekansı : % 0.0041
ERCC4 16:14015940, G/A, Missense, Minor Alel Frekansı : % 0.023	ABCB8 7:150738224 G/A Missense Minor Alel Frekansı : 0.0041	EWSR1 22:29693915 G/A Missense Minor Alel Frekansı : % 1,30
PDGFD 11:103866813, T/G, Missense , Minor Alel Frekansı : %0.016	B3GNT8 19:41932127 G/A Missense Minor Alel Frekansı: 0,34	CDC25C 5:137621449 T/C Missense Minor Alel Frekansı : 0.0098
CD4 12:6928020, C/T, Missense Minor Alel Frekansı : %0.14	ADAMTSL1 9:18775807 G/A Missense Minor Alel Frekansı :0.0077 COSMIC No: COSM4659714	MLLT10 10:22022785 C/T Missense Minor Alel Frekansı :% 0.00081 COSMIC No : COSM347780
CCNA1 13:37014255, A/G, Missense, Minor Alel Frekansı : %0,14		ABCB4 7:87031444 C/T Missense Minor Alel Frekansı:% 0.00081
FGF5 4:81196113, G/A, Missense Minor Alel Frekansı :% 0.046 COSMIC No : COSM2955136,		DMD X:31224764 C/T, Missense Minor Alel Frekansı %0.0021
ABCA1 9:107599376, A/G, Splice site Minor Alel Frekansı : % 0,55		LGALS2 22:37966678 C/T Missense Minor Alel Frekansı:% 0.0098
TP53I3 2:24302366, , A/T, Missense, Minor Alel Frekansı : ?		ORC1 1:52841222 C/T Missense Minor Alel Frekansı :% 0.046 COSMIC no: COSM5545517
		APOBEC3F 22:39441136 G/A Missense Minor Alel Frekansı :% 0.00081 COSMIC no: COSM1183258
		DIS3 13:73346905 C/T Missense Minor Alel Frekansı : %1.45 COSMIC no: COSM1180113
		PALB2 16:23634293 C/T Missense Minor Alel Frekansı: %2.4

Tablo 4.7: Polimorfizm düzeyindeki hastalık ilişkili olabilecek nükleotid varyantları

Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3
<p>PDE4DIP 1:144875979 G/C Splice site region mut Minor Alel Frekansı: % 19 Bu gendeki mutasyonlar Peritoneum cancer ile ilişkilendirilmiştir.</p>	<p>PDE4DIP 1:144875979 G/C Splice site region mut Minor Alel Frekansı: % 19 Bu gendeki mutasyonlar Peritoneum cancer ile ilişkilendirilmiştir.</p>	<p>PDE4DIP 1:144875979 G/C Splice site region mut Minor Alel Frekansı: % 19 Bu gendeki mutasyonlar Peritoneum cancer ile ilişkilendirilmiştir.</p>
	<p>NQO1 16:69745145 G/A Missense Meme kanseri kemoterapi sonrası kötü sağkalım için patojenik varyant Lösemi için kemoterapi sonrası kötü sağkalım için risk faktörü Minor Alel Frekansı: %27,66 Clinvar erişim no: RCV000018301</p>	<p>NQO1 16:69745145 G/A Missense Meme kanseri kemoterapi sonrası kötü sağkalım için patojenik varyant Lösemi için kemoterapi sonrası kötü sağkalım için risk faktörü Minor Alel Frekansı: %27,66 Clinvar erişim no: RCV000018301</p>
<p>ELAC2 17:12915009 G/A Missense Hereditör Prostat kanseri risk faktörü, patojenik varyant Minor Alel Frekansı: % 29,67 Clinvar erişim no: RCV000005358</p>	<p>ELAC2 17:12915009 G/A Missense Hereditör Prostat kanseri risk faktörü, patojenik variant Minor Alel Frekansı: % 29,67 Clinvar erişim no: RCV000005358</p>	
<p>CCND1 11:69462910 G/A Splice site region Colorectal Kanseri için risk faktörü Clinvar no: RCV000014762 Minor Alel Frekansı: % 45</p>	<p>CCND1 11:69462910 G/A Splice site region Colorectal Kanseri için risk faktörü Clinvar no: RCV000014762 Minor Alel Frekansı: % 45</p>	<p>CCND1 Splice site region 11:69462910 G/A Splice site region Colorectal Kanseri için risk faktörü, Clinvar no: RCV000014762 Minor Alel Frekansı: % 45</p>
<p>RNASEL 1:182554557 C/T Missense Prostat Kanseri için risk faktörü, Clinvar no: RCV000013880 Minor Alel Frekansı: % 35</p>		<p>RNASEL 1:182554557 C/T Missense Prostat Kanseri için risk faktörü, Clinvar no: RCV000013880 Minor Alel Frekansı: % 35</p>
<p>MAP2K3 17:21207834 C/T Missense Minor Alel Frekansı: % 30</p>	<p>MAP2K3 17:21207834 Minor Alel Frekansı: % 30</p>	<p>MAP2K3 17:21207834 Minor Alel Frekansı: % 30</p>

FGFR4 5:176520243 G/A Missense Kanser progression ve tumor cell motility patojenik variant Minor Alel Frekansı: % 32 Clinvar erişim no: RCV000017723	FGFR4 5:176520243 G/A Missense Kanser progression ve tumor cell motility patojenik variant Minor Alel Frekansı: % 32 Clinvar erişim no: RCV000017723	
IGF2R 6:160448324, , C/G, Missense, Minor Alel Frekansı: 14.19	IGF2R 6:160448324, , C/G, Missense, Minor Alel Frekansı: 14.19	
	MSR1 8:16012648 G/C Missense Minor Alel Frekansı: 15,06	MSR1 8:16012648 G/C Missense Minor Alel Frekansı: 15,06
MUC2 11:1081074, T/C, Splice Site, Minor Alel Frekansı : 38.99		MUC2 11:1081074, T/C, Splice Site, Minor Alel Frekansı : 38.99
MUC4 3:195474159 G/A Missense Minor Alel Frekansı : 38.99	MUC4 3:195474159 G/A Missense Minor Alel Frekansı : 38.99	

4.5-MPM'de Sık Heterozigotluk Kaybı (Loss of Heterozygosity) Gözlenen bölgeler

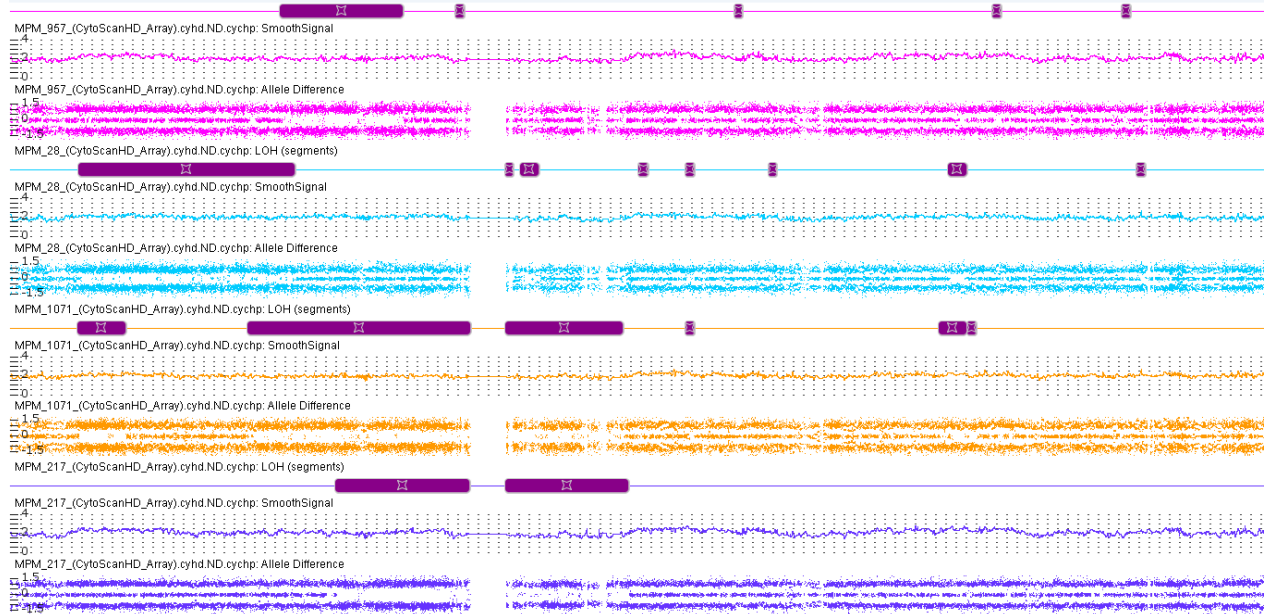
Hastalara ait cyp dosyaları Chas 3.1 programı üzerinden Chas database loader eklentisi ile veritabanına yüklenmiştir. Bu sayede üst üste gelen heterozigotluk kaybı bölgeleri histogram üstünden genomik pozisyonları ve gözlenme sıklıkları belirlendi. Bu histogram sonuçlarına göre sık gözlenen heterozigotluk kaybı bölgeleri Tablo 4.8' de verildi.

Tablo 4.8: MPM grubundan sık gözlenen LOH bölgeleri ve gözlenme sıklıkları.

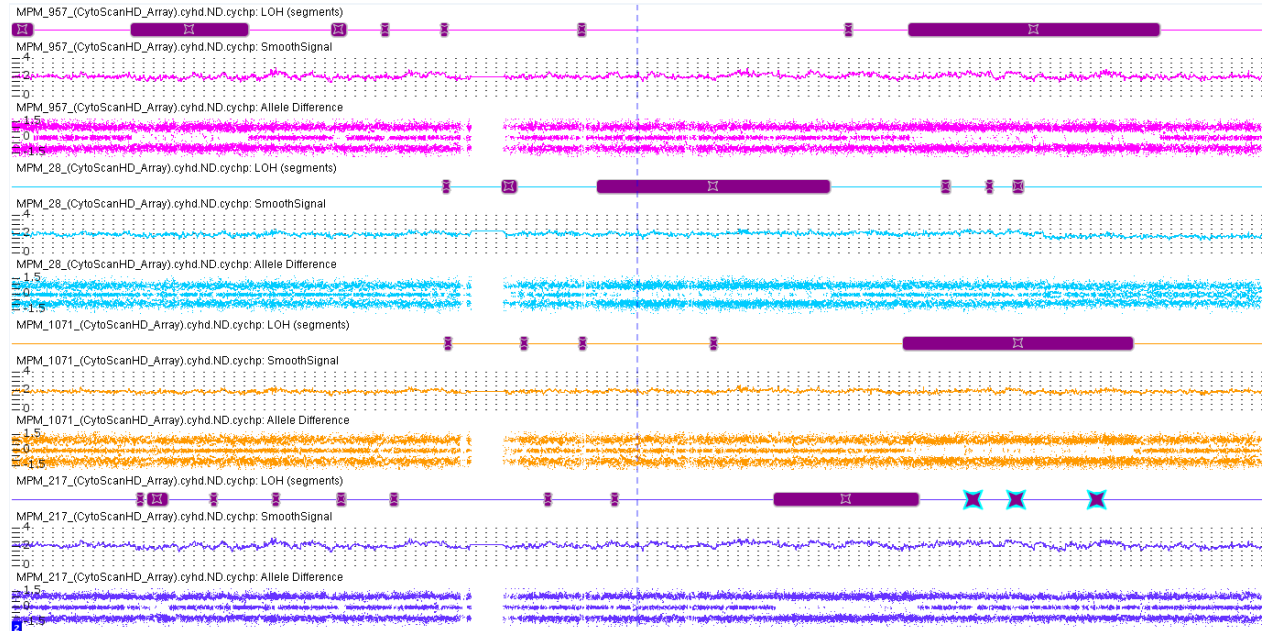
Kromozomal Bölge	Gözlenme Sıklığı
1p32.3	%56
2q32.2	%65
3p21.31	%51
4p15.1	%51
6p22.2	%40
14q23.3	%56
17q23.2	%69

4.5.1-Bazı MPM Hastalarında Gözlenen Büyük LOH Bölgeleri

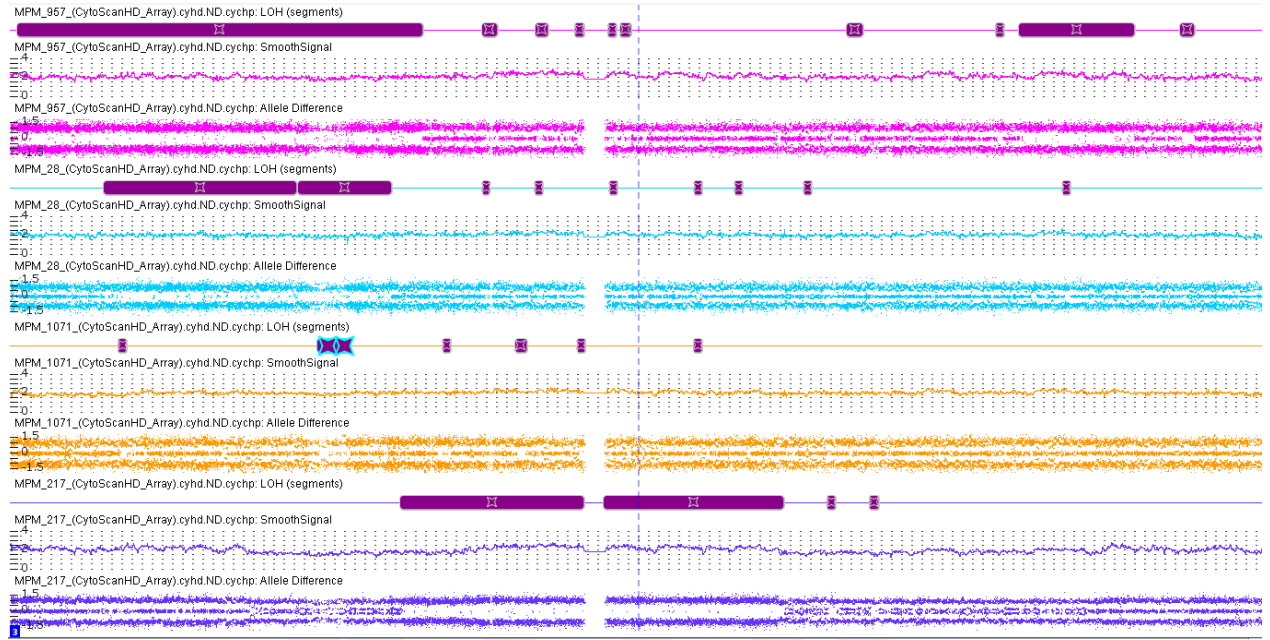
Altı hastanın SNP array verileri incelendiğinde belirli kromozomal bölgelerde büyük LOH bölgelerinin yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.24-Şekil 4.26). Bu LOH'ların nedeni büyük ihtimalle kromozomal yeniden düzenlenme mekanizmaları (büyük translokasyonlar, füzyonlar, inversiyonlar vs.) sorumlu olabilir.



Şekil 4.24: 7. Kromozomun çeşitli bölgelerini etkileyen büyük LOH bölgeleri.



Şekil 4.25: 2. Kromozom çeşitli bölgelerini etkileyen büyük LOH bölgeleri (Mor dikdörtgenlerle işaretlenen bölgeler).



Şekil 4.26: 3. kromozomun çeşitli bölgelerini etkileyen büyük LOH bölgelleri.

5-TARTIŞMA

Kanser, zaman içinde hücrenin maruz kaldığı zararlı çevresel ajanlar (örneğin; karsinojenler) ve biyolojik faktörlerin kombinasyonu ile oluşan mutasyon birikimi ile açıklanmaktadır (Yates & Campbell, 2012). Bu değişimler sonucu onkogen aktivasyonunun ve tümör süpressör genlerin fonksiyonlarının kaybolduğu gözlenebilir. Artan mutasyon birikimi sonucu hücre için kritik kontrol mekanizmalarının bir bir devreden çıkmasıyla genomik instabilite artmakta ve genetik materyal ağır hasar görmektedir. Sonuç olarak sağlıklı bir hücre, normal fonksiyonlarını yerine getiremeyen malign kanser hücrelerine dönüşmektedir. Somatik hasarlara ek olarak, anne ve babadan kalıtılmış değişimler de (germline mutasyonlar) bulunmaktadır ki bunlar hücreyi kanserleşmeye daha yatkın hale getirebilmektedir (Yates & Campbell, 2012). Günümüzde gelişen teknoloji ve bilim insanların yoğun çabaları sayesinde hücrenin kanserleşmesine neden olabilecek birçok gen mutasyonu, kromozomal yeniden düzenlenme mekanizmaları keşfedilmektedir. Bu gibi keşiflerin yanında kansere neden olan çevresel etmenlerin neler olduğu, hücrenin kanserleşmesine nasıl etki ettikleri de araştırılmakta ve bazıları bilimsel olarak kanıtlanmaktadır. Bu çeşit etkileşimlerin saptanması sayesinde kanserin tedavisi için yeni ve etkin hedeflerin bulunabileceği, hem de yeni korunma yöntemlerinin aydınlatılacağı düşünülmektedir.

Kanser gelişiminde bir risk faktörü olan çevresel etmenin bilinmesi, araştırmacılar için bir avantaj olarak kabul edilebilir. Bu kapsamda özellikle çevresel etmen ve gen etkileşimlerin üzerinde durulması ve aydınlatılması gerekmektedir. Primer risk faktörü mineral fiber maruziyeti olan Malign Mezotelyoma için de durum bu şekildedir. Nadir görülen bir kanser türü olması, üzerinde yapılan genetik çalışmaları sınırlandırmış fakat son yıllarda konu hakkında bilgi ve keşifler açısından önemli ivme kazanılmıştır. Çalışmamızda asbest maruziyeti sonucu gelişen MPM'de ve BAP'ta genomun nasıl hasar gördüğü ve hücreyi malign dönüşümden koruyan genetik belirteçlerin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Mezotelyoma genetiği hakkında yapılan çalışmaların başlangıcı 90'lı yıllara dayanmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda belirli kromozomal bölgelerin Mezotelyoma'da sık bir şekilde etkilendikleri saptanmıştır (Cheng et al., 1994; Murthy & Testa, 1999; Taguchi et al., 1993; J. Testa et al., 2001). Günümüze kadar geline süreçte, genomik teknolojilerin çözünürlüklerinin artmasıyla, yeni gen mutasyonları ile yeni kromozomal değişimler keşfedilmektedir. Kanser genomik yapısı bilindiği üzere büyük heterojenite göstermektedir. Aynı kanser tipinde bile hastadan hastaya farklı genomik anomali kalıbı gözlenebilmektedir. Buna karşılık Mezotelyoma için %60-%70 sıklıklarla görülen genomik kopya sayısı değişimleri belirlenmiştir (Björkqvist, Tammilehto, Anttila, Mattson, & Knuutila, 1997). Bunun yanında son yıllarda BAP1 genindeki patojenik nükleotid mutasyonları Mezotelyoma yatkınlığı ile

ilişkilendirilmiştir (J. R. Testa et al., 2011). Mezotelyomadaki genel genomik anomali kalıbına bakıldığında daha çok delesyonların gözleendiği kopya sayısı değişimleri göze çarpmakta fakat son yıllarda bazı kromozom bölgelerinin kopya sayısı artışlarının da önemli sıklıklarda gözleendikleri belirlenmiştir. Bu kromozomal bölgelerde delesyonların önemli tümör süpressörlerin işlev kaybına, kopya sayısı artışlarının da daha çok hücrenin bölünmesini ve invaze olmasını teşvik edecek genleri etkiledikleri görülmüştür (Light & Lee, 2008). Bunların yanında, bir kanser türünde saptanan bir gendeki mutasyonun farklı kanser tiplerinde de gözlenebildiği görülmektedir. Biz de çalışmamızda elde edilen özgün bulguların yanında, bu tip kesişim barındıran sonuçlar da belirledik.

MM, asbest maruziyeti sonucu sonradan kazanılmış birçok somatik genetik değişim ile karakterizedir. Asbest fiberleri sonucu meydana gelen DNA hasarının, insan ve farelerde benzer anomalilere yol açtığı bildirilmiştir (Jean et al., 2011). Mezotelyoma genomlarında, kaotik olarak ifade edilen kompleks kromozomal anomaliler saptanmaktadır (Light & Lee, 2008). Bu kaotik yapı belki de MM'nin agresifliği ile ilişkili olabilir. Bir çalışmada genom çapı kopya sayısı varyasyonu frekansı %55 olarak bildirilmiş (Björkqvist et al., 1997), söz konusu kopya sayısı değişimleri hasta başına 1 ve 8 arasında değişmektedir. Fakat son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda olduğu gibi (Bueno et al., 2016; Fennell, Sharkey, & Busacca, 2016), bizim çalışmamızda da, hasta başına etkilenen genomik değişimlerin yüzlerle ifade edildiğini görmekteyiz. Yüksek çözünürlüklü CGH ve spektral karyotipleme yöntemleri ile tüm genom tarama yapılan bir çalışmada, belirli 10 genomik bölgede 52 tekrarlayan homozigot delesyon ile bunlara ek olarak 36 tekrarlamayan diğer homozigot delesyonlar saptanmıştır. Bu bilgi sayesinde LINGO2, RBFOX1/A2BP1, RPL29, DUSP7, CCSR/FAM190A gibi aday tümör süpressör genler tanımlamıştır (Fennell et al., 2016). Eski tarihli literatürler incelendiğinde, MM genomik kazanımlarının, genomik kayıplara oranla daha az gözleendiği farkedilmektedir (Lindholm et al., 2007), (Pylkkanen et al., 2002). Mezotelyoma genomlarının array CGH ile tarandığı bir çalışma buna örnek olarak verilebilir. Bu çalışmada (n=26) kopya sayısı kayıplarının tümör başına 0 ile 40 arasında değiştiiği saptanmıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan CGH yöntemi, NSLCC ve MPM ayırımını, %77 özgüllük ve % 81 duyarlılıkla ve X, 1, 2p, 4, 8q, 10q, 12p ve 18q kromozomları arasındaki genomik anomali farklılığı belirleyerek yapabilmıştır (Björkqvist et al., 1998). Ailesel MPM olgularının da sporadik olgulara benzer kopya sayısı değişimlerine (1p, 6q, 9p, 13q ve 14q gibi) sahip olduğu görülmüştür (Ascoli et al., 2001). Bu bilgi bizlere, söz konusu kromozomal bölgelerdeki tümör süpressör gen kayıplarının olduğunu işaret etmektedir. Bizim çalışmamızda da ailesel vakalar bulunmakta fakat büyük kromozomal anomali kalıpları arasında ailesel olgularda bir benzerlik saptanmamıştır.

5.1-MPM'de Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri

5.1.1-Genomik Kayıplar

MM'de en sık gözlenen kromozom değişimlerinden biri 9. Kromozomun kısa kolundaki (9p22-pter) DNA kayıplarıdır (Lindholm et al., 2007). Bir çalışmada, 9p22-pter' deki genomik kayıp, 14 MM olgusunun %57'inde gözlenmiştir. Bu bulgu söz konusu kromozomal bölgenin tümörögenezdeki kritik rolünü bir kez daha vurgular niteliktedir (Knuutila et al., 1998). Bir morfoloji çalışmasında 9p21 homozigot delesyonunun çekirdek fazlalığı (*multinucleation*) ve hücrelerin birbirlerini yemesi (*cell in cell engulfment*) gibi olaylara neden olduğunu bulunmuştur, ayrıca bu 9p21 delesyonunun MM hücreleri ile reaktif mezotel hücrelerinin birbirinden ayrılmasını sağladığı bildirilmiştir (Matsumoto et al., 2013). Asbest maruziyeti sonucu gelişen ailesel MM 'lerin tümünde 9p delesyonu bulunmuştur (Musti et al., 2002). Bu da bizlere bu bölgenin asbest maruziyeti sonucu MM gelişimi için çok kritik rol oynadığını göstermektedir.

Primer MM'lerde bulunan benzer sitogenetik anomalilerin çoğu deneysel asbest maruziyeti ile de gösterilmiştir. Örneğin, asbest maruziyeti sonucu MM gelişimi gözlenmiş farede, p16/CDKN2A,p19/ARF ve p15 CDKN2B inaktivasyonu saptanmıştır (Lecomte et al., 2005). Söz konusu bölgeden CDKN2A ve CDKN2B gibi iki önemli tümör süpressör gen kodlanmaktadır. CDKN2A, siklin bağımlı kinaz 4 inhibitörü p16(INK4A), p14(ARF) isimli iki tümör süpressör proteini kodlamaktadır. Bu gen ürünleri alternatif splice edilen aynı mRNA 'dan oluşmaktadırlar (Light & Lee, 2008). ARF knockout farenin, daha hızlı bir şekilde 'asbestle indüklenmiş MPM gelişimi' gösterdiği saptanmıştır (Altomare et al., 2011). Homozigot CDKN2A delesyonu olan hücreler, CDKN2A yeniden ekspresyonu veya TATp16INKA peptidi ile muamele edildiklerinde hücrelerinin yaşayabilirliklerinin azaldığı ve hücre ölümünün arttığı bulunmuştur (Frizelle et al., 2008). Bu durum CDKN2A negatif MM'ler için p16 'nın fenokopi ile uygulanmasının MM için bir tedavi seçeneği olarak uygulanabileceğini işaret etmektedir (Grim et al., 1997). Çalışmamızda da delesyonlardan en çok etkilenen kromozom bölgesi olarak CDKN2A genini de içeren 9p21.3 bölgesi (%67 sıklıkla) bulunmuştur. Bu bulgumuz literatürle uyumlu olup asbestin genoma en çok hasar verdiği ve MM için karakteristik özellik taşıyan kromozomal anomali olarak bulgularımızda yer almaktadır. Çalışmamızda biz de CDK2NA ile birlikte 15 interferon geninin bulunduğu bu bölgenin sık delesyona uğradığını belirledik. Bu durum inteferon gen ailesinin fonksiyon kaybının MPM gelişiminde kritik rol oynadığını göstermektedir.

MM için diğer sık rastlanan kromozomal anomali ise NF2 genini de kapsayan 22q delesyonlarıdır. Yapılan bir çalışmada, primer tümör örneklerinde ve hücre hatlarında NF2'yi de kapsayan çerçeve içi (in frame) delesyonlar, truncating mutasyonlar %53 sıklıkla bulunmuştur. İki örnekte

NF2'de herhangi genomik anomali olmamasına karşın, genin ekspresyonunun bozulmuş olduğu görülmüştür. Bu durumun alternatif splicing mekanizmasındaki bir hatadan meydana gelmiş olabileceği bildirilmiştir (A. B. Bianchi et al., 1995). NF2 ekspresyonunun olmadığı 14 hücre hattında yapılan SSCP (Single-Strand conformation polymorphism analysis) analizi sayesinde her hücre hattının NF2 mutasyonlarına sahip olduğu gözlenmiştir. İki mikrosatellit markerı kullanılarak yapılan analiz sonucu Heterozigotluk kaybı %72 (17/25) sıklıkla bulunmuştur. Çift vuruş (Two-hits) hipotezine uygun olan bu durumda, NF2 alellerinin hem mutasyon hem de kopya sayısı kayıplarıyla inaktive olduğu anlaşılmaktadır (Cheng et al., 1999). Ayrıca bir periton papiller Mezotelyoma olgusunun, NF2 erken somatik mutasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (Nemoto et al., 2012). MM için, aday tümör süpressör genlerin bulunmasına yönelik 22q delesyonlarının incelendiği bir çalışmada, 14 MM olgusunda NF2 geninin 1-16 ekzonlarında nokta mutasyonlar, mikrodelsyonlar/insersiyonlar araştırılmıştır. Araştırmacılar, analizleri sonucu 10. ekzonda 10 bazlık mikrodelsyon saptamışlardır (Schipper et al., 2003). Bu veri NF2' nin MM için önemli bir tümör süpressör gen olduğu bilgisini pekiştirmektedir. Heterozigot NF2 mutasyonu taşıyan bir fare ile wild tip NF2 genine sahip farenin, chrysotil asbeste maruz bırakıldıklarında, mutasyon taşıyıcı olan farenin MM için daha fazla yatkınlık gösterdiği gösterilmiştir (Altomare et al., 2005). Bu oluşturulan tümör modellerinde, sağlam NF2 alelinin ve dolayısıyla bu genden eksprese edilen *Merlin* proteinin kayba uğradığı bulunmuştur. Bu bulgu asbestin direk olarak NF2 mutasyonlarına etki ettiğini göstermektedir (Altomare et al., 2005). Buna karşılık asbestin direk olarak NF2 kaybına neden olup olmadığının araştırıldığı başka bir chrysotil ile uyarılmış fare Mezotelyomasında, NF2 geninin kodlanan bölgesinde herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır (Kleymenova, Bianchi, Kley, Pylev, & Walker, 1997). NF2 ve INK4A/ARF genleri knockout edilmiş farede yapılan bir çalışmada, insan Mezotelyoma'sına çok benzer murin Mezotelyoma gelişimi gözlenmiştir. Bu modelde median sağkalımın 30 hafta olduğu bildirilmiştir (Jongsma et al., 2008).

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak NF2 geninin de içinde olduğu olduğu 22q.12.2 kromozom bölgesinin hasta grubumuzda %49 oranında delesyona uğradığını saptadık. Bu anomalinin yanında, 22. Kromozomun diğer 8 bölgesinde de hastalarımızın büyük çoğunluğunda delesyonlar olduğu saptandı. Bu delesyonların en yoğun olarak saptandığı bölge ise %52'lik sıklıkla FAM227A, GGA1, SH3BP1, LOC101927051, PDXP, DMC1, CBX7, TRIOBP, TNRC6B, MKL1, LOC101927257 genlerinin bulunduğu 22q13.1 bölgesi olarak belirlendi. Bu bulgular, 22. Kromozom delesyonlarının MPM patogenezinde kritik öneme sahip olduğunu bir kez daha göstermektedir. Çalışmamızda saptadığımız, 22. Kromozom delesyonlarının etkilediği NF2 gen kayıplarının yanında, ilginç bir bulgu olarak, Benign grupta NF2 genini etkileyen kopya sayısı artışlarının MPM grubuna kıyasla daha fazla olduğunun

görülmesidir. Eğer bu kopya sayısı artışı, bu genden kodlanan Merlin proteininin miktarının artmasına neden oluyorsa, bu kopya sayısı artışlarının, Benign grubu asbest ilişkili karsinojenezden koruduğu düşünülebilir. Bu bulgunun, fonksiyonel çalışmalarla desteklenip etkisi ortaya konulabilirse, asbeste maruz kalmış ve MPM için risk altındaki bireylere veya MPM hastalarına NF2 proteini temelli koruyucu tedaviler ortaya konulabilir. Literatürde de bu görüşü destekler nitelikte bulgular bulunmaktadır. Örneğin; bazı kanser türlerinde viral vektörler aracılığı ile gerçekleştirilen NF2 overekspresyonu sayesinde, hücre bölünmesinin azaldığı gözlenmiştir (Ikeda, Saeki, Gonzalez-Agosti, Ramesh, & Chiocca, 1999), (Morales, Molina, Hayashi, & Georgescu, 2010). Mezotelyomada ise NF2 reekspresyonunun hücresel çoğalma ve invazyonu engellendiğine (Poulikakos et al., 2006), G1 arresti, siklin D1 ekspresyon düşüşü CDK4 inaktivasyonu ve pRB 'nin defosforilasyonunun meydana geldiği gözlenmiştir (Xiao et al., 2005). Bu bulgular NF2'nin hücreyi kanserleşmekten koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir (de Assis, Locatelli, & Isoldi, 2014).

MM'de delesyonlardan yoğun bir şekilde etkilenen diğer bir kromozom bölgesi 3p21.3'dir. Bu bölgede, MM olgularında sık olarak mutasyona uğradığı saptanan BAP1 geni dikkat çekmektedir (Piris, Mihm, & Hoang, 2015). Son yıllarda, germline BAP1 mutasyonlarının "BAP1 kanser sendromu" na neden olduğu öne sürülmüştür (Carbone et al., 2012). Bu kanser sendromu melanositik BAP1 -mutated atypical intradermal tumors-(MBAITs) olarak bilinen benign atipik melanosit lezyonlarının varlığı ile karakterizedir (Carbone et al., 2012), ayrıca hem plevral hem de peritoneal MM'lerde ve uveal melanomlarda yüksek sıklıkla gözlenmektedir (Bononi, Napolitano, Pass, Yang, & Carbone, 2015). Germline BAP1 mutasyon taşıyıcıları ayrıca diğer malignensiler için de yüksek risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır (Bononi et al., 2015). Bunlara örnek olarak clear renal cell carcinoma, intrahepatic cholangioma, basal cell carcinoma verilebilir (Baumann et al., 2015), (Abdel-Rahman et al., 2011), (Wadt et al., 2015). Şimdiye kadar bilinen tüm germline BAP1 taşıyıcılarının bir veya birden fazla malignensi geliştirdikleri saptanmıştır (Carbone et al., 2013). Diğer bir çalışmada germline mutasyonların yanında, sporadik MM'lerin % 63'ünde BAP1 mutasyonu veya inaktivasyonunun bulunduğu gözlenmiştir (Nasu et al., 2015). Ayrıca epiteloid MM'lerdeki BAP1 inaktivasyonu iki yeni nesil dizileme çalışmasında da saptanmıştır (Guo et al., 2015), (Iacono et al., 2015). Bu iki yeni nesil dizileme çalışması, BAP1 geni inaktive edici mutasyonlarının rastgele gerçekleşen ve nadiren aynı mutasyonlar olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bahsedilen bu çalışmalarda BAP1 mutasyonları yüksek frekanslarda bulunmuştur (Guo et al., 2015), (Iacono et al., 2015). Bu bulgular ışığında, MM olgularında sıklıkla mutasyonlarının saptanması, BAP1 genini MM için aday driver gen olarak karşımıza çıkarmaktadır (Bononi et al., 2015). MM ile olan önemi yüzünden, BAP1' in terapötik potansiyeli hala araştırılmaktadır. Çalışmamız kapsamında tüm genomları dizilenen 3 MM

hastasının ikisinde patojenik karakterde iki farklı BAP1 mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonlardan biri Bueno ve arkadaşları tarafından bulunan missense mutasyon iken (Bueno et al., 2016), diğeri henüz rapor edilmemiş, ilk defa tarafımızdan tanımlanan, BAP1 geninin 4. Ekzonunda yer alan frameshift mutasyondur. Bu mutasyon kodlama çerçevesinin bozularak yanlış protein yapımına neden olmaktadır. SNP array çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda ise 3p21.3 bölgesinin hasta grubumuzun yarısında delesyona uğradığı da bulunmuştur. Bu bölge içinde BAP1 geni de bulunmaktadır. Delesyondan en çok etkilenen genler olarak CSPG5, SMARCC1, MAP4, SHISA5, PFKFB4, MIR6823, NCKIPSD, IP6K2, CCDC71, KLHDC8B, C3orf84, CCDC36 olarak bulunmuştur. Bu bölgenin delesyonu çeşitli kanser tiplerinde de görülmekte ve sıkça kanserle ilişkilendirilmektedir (Kok, Naylor, & Buys, 1997). Bu delesyon dışında çalışmamızda 3 kromozomun p14.3, p21.1, p21.2 gibi bölgelerinin %36-38 arasında delesyona uğradığı bulunmuştur. Dikkat çekici bir bulgu da çalışmamızda, 3. Kromozomda, delesyon gözlenen bu bölgelerin dışında kalan bölgelerde, ciddi anlamda kopya sayısı artışlarının varlığını saptadık. Delesyon dışında kalan bu 22 bölgede 3q26.31 bölgesi gibi %50 sıklıklara varan kopya sayısı artışları gözlenmiştir. MM ile karakterize 3p21.3 bölgesi delesyonlarının yanında, bahsedilen kopya sayısı artışların MM için kritik öneme sahip olduğu belirlenmiştir. Literatür taramasında MM genomlarında 3. Kromozomu bu denli geniş etkileyen genomik kazanımlara rastlanılmamıştır.

MM genomlarıyla yapılan çalışmalarda 11q23 ve 14q genomik kayıplarına da çok rastlanıldığı gözlenmektedir (Light & Lee, 2008). Primer Mezotelyomalardan elde edilen tümör hücre hatlarında DNA kopya sayısı değişimleri incelenmiş 11q23 bölgesindeki fokal delesyonlar saptanmıştır. Bu delesyonunun transkripsiyonel repressör gen olan promiyelositik lösemi zinc finger (PLZF) geninin kaybına neden olduğu belirlenmiştir. Bu bilgi sayesinde, PLZF kaybının, Mezotelyoma hücrelerindeki gen düzenlenmesi ve hücre hayatta kalımını etkilediğini ortaya koymuştur (Cheung et al., 2010). Kromozom 13 ve 14 kayıpları da MM' de sık rastlanan sitogenetik anomalilerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Light & Lee, 2008). Yirmibeş mikrosatellit markerı kullanılarak 13q, 21 markerla da 14q kromozomlarının 30 MM olgusunda incelendiği bir çalışmada, %67 oranında alelik kayıp gözlenmiştir. Ayrıca, 20 hücre hattının 11'inde tüm kromozom büyük delesyonu, 9 'unda ise interstitial delesyonlar gözlenmiştir. Heterozigotluk kaybı analizi 14q'da en az bir markerın, incelenen 30 örneğin 13'ünde (%43) kayba uğradığını göstermiştir. Bu veri, sözkonusu kromozomal bölgelerde MM patogenezi için kritik rol oynayan tümör süpressör genler olduğunu işaret etmektedir (Light & Lee, 2008), (Björkqvist et al., 1999). Yirmi üç mikrosatellit markerı kullanılarak yapılan delesyon haritalaması çalışmasında, 18 MM'nin 14q11.1 ve 14q23-24 bölgelerinin ya heterozigotluk kaybı ya da alellik dengesizlik gösterdiği bulunmuştur (Björkqvist et al., 1999). Biz de hasta grubumuzda, 13. Kromozoma ait altı

bölgenin sık delesyona uğradığı gözlenmiştir. Bu bölgeler arasında %40 sıklıkla delesyonun gözlendiği q14.13 bölgesi başı çekmektedir. Bu bölgede tümör gelişiminde kritik rolleri olan TPT1 (Tumor Protein, Translationally-Controlled 1) geninin lokalize olduğu görülmektedir. Kromozom 14 bulgularımıza baktığımızda ise 7 bölgenin %30-38 sıklığında değişen delesyonlardan etkilendiği bulunmuştur. Kromozom 11 bulgularımızda ise kromozomu etkileyen çeşitli sıklıklarda, heterojen karakterde delesyon ve amplifikasyonlar belirlendi.

Bazı önemli tümör süpressör genlerin bulunduğu kromozom 4 'te ise çeşitli kanser türlerinde bildirilmiş değişimler saptandı. Bu kromozomu etkileyen parsiyel veya bütün delesyonlar MM karyotiplerinde bildirilmiştir (Light & Lee, 2008). Bir çalışmada kromozom 4'ü etkileyen allelik kayıpların % 80 gibi sıklıklarla meydana geldiği gösterilmiştir. Vakaların çoğunda, delesyonların 4q33-34 bölgesinde (%93) 4q25-26 bölgesinde (%65), ve 4p15.1-4p15.3 (%63) sıklıkta gözlendiği bildirilmiştir (Shivapurkar et al., 1999). MM'lerde diğer sık rastlanan bir kromozom anomalisi ise kromozom 6 delesyonlarıdır. MM olgularında sitogenetik analiz yapılan başka bir çalışmada, epiteloïd ve mix alttıplerde 6q delesyonlarının daha sık olduğu belirtilmiştir. Bahsedilen bu delesyonun Mezotelyoma gelişimi ve progresyonunda erken bir olay olduğu öne sürülmüştür (Tibiletti et al., 1996). Bu verilerden farklı olarak, çalışmamızda 6q delesyonlarının %50 ve %47 sıklıkta sırasıyla 6q23.2 ve 6q25.2 bölgelerine yoğunlaştıkları gözlendi. Bu bölgelerde sırasıyla, SGK1, AKAP7 adlı iki kinaz geni bulunmaktadır. Bu genlerin sitokin gen düzenlenmesi ve hücre büyümesi gibi kritik görevler yaptıkları bildirilmektedir (McFarland, Dodge-Kafka, & Schmitt, 2014). Buna ek olarak çalışmamızda 6p kopya sayısı artışlarının sarkomatoid tipte daha çok gözlendiklerini belirledik. Benzer şekilde, 4. kromozom kopya sayısı artışlarının da 11. Kromozom anomali kalıbına göre heterojen bir karakterde olduğu görüldü. Parafine gömülü MM tümörlerinde FISH yöntemi kullanılarak delesyon ve amplifikasyonların araştırıldığı bir çalışmada, 9p21(83%), 14q32 (43%), 22q12 (38%) delesyonlarının yanında, 1p36 (43%) delesyonları da sık bir frekansta bulunmuştur (Takeda et al., 2012). Çalışmamızda 1p delesyonları hem kapsadıkları gen sayısı hem de frekans olarak ciddi bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle 1p21.2 (% 56), 1p22.1 (%54), 1p31.1 (% 43), 1p13.2 (%41) olarak bulunmuştur. Bunların yanında 1p36.13-12 bölgelerinde delesyonlar daha düşük frekansta gözlenirken (%36,%32), q kolunda ise daha çok amplifikasyonların olduğu saptanmıştır.

5.1.2-Genomik Kazanımlar

Kanser genom çalışmalarında sık rastlanan delesyonlar genellikle tümör süpressör inaktivasyonunu, genomik kazanımlar ise kanser gelişiminden sorumlu olabilecek aday onkogenlerin konumlarını bizlere işaret etmektedirler. Bu sebepten dolayı genomik kazanımlar/amplifikasyonlar, en az delesyonlar kadar önemli bulgulardır. Ayrıca onkogenik kazanımların terapötik perspektifte moleküler hedef olarak kullanılabilme potansiyelleri vardır (Light & Lee, 2008). Özellikle MM için tekrar eden kopya sayılarının etkiledikleri genlerinin bulunması ve ilaçlarla hedef alınmasına yönelik kayda değer bir ilerleme henüz yoktur. MM' de bazı kromozom bölgelerinde genomik kazanımlar çeşitli çalışmalarda saptanmıştır. Bir çalışmada MM için genellikle rastlanan kromozomal amplifikasyon, kromozom 1 (cen-qter) de saptanmıştır. Bu kopya sayısı değişimine örneklerin %33'ünde rastlanılmıştır (Björkqvist et al., 1997). Kırk iki MPM hastasına ait parafine gömülü doku bloklarında FISH yöntemi ile kopya sayısı kazanımları araştırılmıştır (Kivipensas et al., 1996). Çalışma sonucunda, 5p15 'te (%48), 7p12'de (%38) ve 8q24'te (%45) oranında amplifikasyonlar bulunmuştur (Light & Lee, 2008), (Kivipensas et al., 1996). Çeşitli genomik kazanımların, Sarkomatoid tipte, epiteloid tipe oranla daha sık gözlemlendiği belirlenmiştir. Bu sıklık Sarkomatoid tipte 8q24 amplifikasyonu %75, epiteloid tipte ise %33 frekansında gözlenmiştir (Kivipensas et al., 1996), (Light & Lee, 2008). Kromozom 5p15.3 bölgesinin MM'lerin %51'inde genomik kazanımlardan etkilendiği rapor edilmiştir (Kivipensas et al., 1996). Başka bir çalışmada, Sarkomatoid tümörler ile epiteloid tümörler karşılaştırıldığında, yine genomik kazanımların sarkomatoid tipte daha sık gözlemlendiği rapor edilmiştir (Jean et al., 2011). Kromozom 7 kazanımları ise Epiteloid Mezotelyoma'larda %19 oranında gözlenirken, Sarkomatoid örneklerde herhangi bir genomik kazanım bulunmamıştır (Schmidt et al., 2002).

Çalışmamızda genomik kazanımların MPM grubunda, 8q, 5p, 7p, 7q, 15q kromozom bölgelerinin yoğunlaştıkları gözlenmektedir. Bu etkilenen bölgeler kapsamında birçok genin kopya sayısının 3 ve 4' e çıktığı, frekanslarının ise %63' lere kadar yükseldiği gözlemlendi (ör; 8q24.23). Bu bölgelerde kopya sayısı artan aday birçok onkogen niteğinde gen olduğu bilinmektedir ve ileride bu genlerin aktivelerini bloke eden tedaviler geliştirilmesi ve bu konuda araştırmalar yapılması MPM tedavisinde yeni ufuklar açabilir.

Çalışmamız hasta grubunda 8. Kromozom kopya sayısı artışları çok yüksek frekansta ve bu kromozomda birçok bölgenin etkilendiği bir kalıpta gözlenmiştir. Başta 8q24.3 (%63) , 8q24.22 (%50), 8q23.3 (%47) bölgeleri olmak üzere, kromozom boyunca 21 bölgede istatistiksel olarak anlamlı kopya sayısı artışları gözlenmiştir. Literatürde genellikle 8q24 bölgesini etkileyen ve yaklaşık %45 frekansında gözlenen kopya sayısı artışlarından bahsedilmektedir (Takeda et al., 2012). Bu verinin bulgularımızla uyumlu

olmasının yanında, biz hasta grubumuzda bu değeri daha yüksek olarak belirledik. Çalışmamızda söz konusu bölge daha detaylı incelendiği zaman 8q24.3 ve 8q24.22 bölgelerinin genomik kopya artışlarından en fazla etkilenen bölgeler olarak öne çıktıkları görülmektedir. Bu kromozomda kopya artışlarının en sık gözlemlendiği bölgelerdeki genlerin, başta heterotrimerik G protein sinyal yolağında, hücre-hücre iletişimde görev aldıkları belirlenmiştir.

Kromozom 5'te ise, 5p15.2 (% 60), 5p15.1 (% 50), 5p15.33 (% 50), 5p13.2 (% 47), 5p15.31 (% 49) bölgeleri başta olmak üzere 17 bölgede anlamlı kopya sayısı artışları saptadık. Yayınlarda özellikle 5p15 ve 5p15.3 bölgesinde % 50'lere varan kopya sayısı artışları bildirilmektedir (Kivipensas et al., 1996), fakat çalışmamızda bu kopya artışlarının, 5p boyunca daha sık bir frekansta ve daha büyük bölgeleri etkilediği gözlemlenmiştir. Bu bölgelerde etkilenen genlerin fonksiyonları incelendiğinde, hücre-hücre iletişimde ve hücre döngüsünde görev aldıkları saptanmıştır.

Kromozom 7'de ise, başta 7p14.1 (%49), 7p14.3 (%49), 7p21.1 (%49), 7p21.2 (%49), 7p21.3 (%47) bölgelerinde ve sıklıklarında yoğunlaşmış kopya sayısı artışları görülmektedir. Bu bölgelerin dışında kromozom boyunca 14 bölgede, kopya sayısı artışları bulunmuştur. Yayınlarda genellikle 7p12 kromozom bölgesinin yaklaşık %38 sıklıkta etkilendiği bildirilmiştir (Light & Lee, 2008). Çalışmamızda ise 7. Kromozomda daha sık bir oranda kopya sayısı artışları bulunmuştur. Sekizinci kromozomda etkilenen gen bölgelerinde olduğu gibi bu kromozomda da kopya sayıları artmış genlerin önemli kısmı, heterotrimerik G protein sinyal yolağında görevli, hücre-hücre iletişimde rol alan genler olduğu göze çarpmaktadır.

5.1.3-MPM'de Genomik Anomalilerden Etkilenen Genlerin Görev Yaptıkları Yolaklar ve Biyolojik İşlevleri

Hasta grubundan elde edilen genomik kazanım ve kayıpların etkilediği gen gruplarının, panterdb/Gene Ontology veritabanı kullanılarak, görev aldıkları moleküler yolak ve biyolojik işlevleri incelendi. Bu analiz sonucu en çok etkilenen moleküler yolaklar olarak, içerdikleri gen sayılarına göre, Gonadotropin-releasing hormon reseptör yolak, Heterotrimeric G-protein uyarı yolağı-Gi alpha ve Gs alpha aracılı yolağı, Wnt sinyal yolağı ve Anjiogenez yolaklarını saptadık. Biyolojik işlev olarak ise sitokin ve sitokin reseptör genlerinin en çok etkilendiklerini belirledik. Söz konusu bu sitokin genleri içerisinde, MPM ` de en fazla delesyona uğrayan bölge olarak 9p21.3 bölgesinden kodlanan interferon genleri IFNA2, IFNA7, IFNA4, IFNA17, IFNA21, IFNK, IFNA10, IFNA1, IFNB1, IFNA6, IFNE, IFNA16, IFNW1, IFNA8, IFNA14 olduğunu gördük.

Hasta grubunda genomik anomalilerden en çok etkilenen moleküler yolak Gonadotropin-releasing hormone reseptör yolağıdır. İnsan

gonadotropin releasing hormon (hGnRH), üreme düzenlenmesinde de önemli bir hormondur. Bununla birlikte, sadece üremede değil tümör hücresi davranışının düzenlenmesinde de etkili olduğu bildirilmiştir (Gründker & Emons, 2017; Gründker et al., 2010; So, Cheng, Poon, & Leung, 2008; Sviridonov et al., 2013). hGnRH hem in vivo hem de in vitro bazı tümör tiplerinde hücre çoğalmasının ve invazyonunun kontrolünde etkili olarak gösterilmiştir (Gründker & Emons, 2017). Ayrıca, bazı vakalarda, anti-onkojenik etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Aguilar-Rojas, Pérez-Solis, & Maya-Núñez, 2016). Bu özellikler, hGnRH / hGnRH reseptörünü (hGnRHR) kanser tedavisi için yeni yaklaşımların saptanmasında ideal bir model olarak karşımıza çıkarmaktadır.

hGnRH reseptörünün fosfotirozin fosfatazi (PTP) aktive ettiği ve büyüme faktörü reseptörlerinin mitojenik sinyal iletimlerinin engelleyerek kanser hücre bölünmesinin azalmasına neden olduğu bildirilmektedir. GnRH tarafından aktive edilen PTP'nin, östrojen için hücre zarına bağlı reseptör olan G-protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) 'i inhibe ettiği rapor edilmiştir. GPER' in ER'nin eksprese edilmediği meme kanserlerinde önemli rolü bildirilmiştir (Gründker & Emons, 2017).

Birkaç rapor (Aguilar-Rojas et al., 2012; Aguilar-Rojas et al., 2016), tümör hücrelerinde hGnRHR'nin ekspresyon düzeyinin, hipofiz veya gonadotrop hücrelerden daha düşük olduğunu göstermektedir. Hem gonadotrop hem de farklı kanser hücresi tiplerinde hGnRH tarafından aktive edilen sinyal iletim yolları tanımlanmıştır. Örneğin prostat tümörleri ve prostat kanseri hücre hatlarının, hGnRH'yi ve hGnRHR'yi ifade ettiği ve yaklaşık % 80 prostat tümöründe hGnRH için bağlanma yerleri sunduğu bildirilmiştir (Qayum, Gullick, Clayton, Sikora, & Waxman, 1990), (Halmos, Arencibia, Schally, Davis, & Bostwick, 2000). İnsan prostat kanseri biyopsisinde gerçekleştirilen testler, bu bağlanma alanlarının spesifik hGnRH reseptörleri tarafından sağlandığını göstermiştir (Fekete, Redding, et al., 1989). Çeşitli çalışmalar, hGnRH / hGnRHR sisteminin malign prostat tümörlerinin hücresel çoğalmasında bir düşüşe yol açtığını göstermiştir (Limonta, Dondi, Moretti, Maggi, & Motta, 1992), (Dondi et al., 1994). Bunu göz önünde bulundurarak, bazı araştırma grupları yıllarca antineoplastik ilaçlar olarak hGnRH'leri kullanmaktadırlar (Redding & Schally, 1981), (Gründker, Nia, & Emons, 2005).

hGnRH / hGnRHR'nin ekspresyonu insan yumurtalık hücrelerinde gösterilmiştir (Choi, Gilks, Auersperg, & Leung, 2006). Farklı hücre hatlarında ve tümör biyopsi örneklerinde gerçekleştirilen radyoligand analizi sonucu, primer yumurtalık kanserlerinin % 70' inde ve aynı zamanda primer endometriyal kanserlerde % 83 oranında bağlanma alanları göstermiştir (Emons, Ortmann, Schulz, & Schally, 1997), (Völker, Gründker, Schmidt, Schulz, & Emons, 2002). Hipofiz tümör hücreleri dışında, hGnRHR sisteminin hücresel fonksiyonunun aydınlatılması birçok araştırmanın hedefidir. Bu raporlar, hem hormon hem de reseptör ekspresyonunun malign hücrelerin

çoğalmasını inhibe ettiğini ileri sürmüştür (So et al., 2008). Aynı zamanda klinik veriler, epitel malign tümörlerinde hGnRH /hGnRHR ekspresyonunun olumlu bir prognostik faktör olarak düşünülebileceğini göstermektedir (Aguilar-Rojas et al., 2016).

Meme kanseri bilindiği gibi en yaygın teşhis edilen kanser türüdür ve kadınlarda kanser ilişkili ölümün ana nedenlerinden biridir. Yaklaşık olarak meme kanserlerinin % 75 ila % 80'i hormona bağlı hem östrojen hem de progesteron reseptörlerini ifade etmektedir (Cheang et al., 2008),(Gründker et al., 2010). Göğüs kanserlerinin yaklaşık % 15-20'si insan epidermal büyüme faktörü reseptör-2 (HER2) 'yi aşırı miktarda eksprese eder ve bu tümörlerin yaklaşık yarısı da steroid hormon reseptörlerini ifade ederler. Ne yazık ki, meme kanserlerinin % 10-15'i östrojen veya progesteron reseptörleri veya HER2 ifade etmemektedir. Bu üçlü negatif meme kanseri, bu reseptörleri hedef alan tedavilerin yetersiz kalmasına neden olmaktadır (Gründker et al., 2010). HGnRH, hipotalamustan gonadotropin sekresyonunu uyarır ve gonadlarda gametogenezin ve steroidogenezin kontrol mekanizmasında rol oynar (Sedgley, Finch, Caunt, & McArdle, 2006). HGnRH ile uyarılan gonadotropin salgısı, antagonistlerle veya agonistlerle sürekli bir uyarı ile engellenebilir ve bu sayede hormon bağımlı neoplazileri tedavi etmek için kullanılacakları öne sürülmektedir (Gründker et al., 2010; Sedgley et al., 2006). Meme kanserlerinin yaklaşık % 50-60'ı hGnRHR'yi ifade eder ve hGnRHR sinyalizasyon aktivasyonunun veya inhibisyonunun hücre büyümesini doğrudan etkileyebileceği ileri sürülmektedir (Fekete, Wittliff, & Schally, 1989), (Morgan et al., 2011). Morgan ve arkadaşları, hGnRH reseptörünün 298 primer meme kanserinde geniş bir aralıkta eksprese edildiğini, ancak en önemlisi, ekspresyonunun üçlü negatif fenotipi olan hastalardan anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir (Morgan et al., 2011).

Şimdiye kadar elde edilen kanıtlar, hGnRHR aktivasyonu ile indüklenen anti-proliferatif yanıtın, hücre döngüsünde apoptoz ve G2 / M arrest ile sonuçlandığını göstermektedir. Bu işlem, MAPK, hücre döngüsü, apoptotik ve hücre iskeleti ile ilgili sinyalizasyonun koordine edilmiş bir model olarak tanımlanmaktadır (Aguilar-Rojas et al., 2012). Bu bilgilerden yararlanılarak hGnRH yolağının Mezotelyoma tedavisi açısından da etkin bir moleküler hedef olarak değerlendirilebileceği göz önünde bulundurulabilir. Biz de çalışmamızda, hGnRH/ hGnRHR sisteminde görev alan ve MPM'de mutasyon, delesyon amplifikasyon gibi genomik anomalilerden etkilenen 12 hedef gen belirledik. Bu moleküler yolakta görev alan genlerden, MAP3K5, ISL1, SOS2, ITGA1, EP300, PRLR, FOS delesyonlara uğramışken, GNAS, GNAI1, IGF1R, SDK1, PTK2 genlerinin amplifikasyona uğradığı saptanmıştır.

Genomik anomalilerden en fazla etkilenen diğer bir önemli yolak ise Heterotrimeric G-protein sinyal yolağı-Gi alpha and Gs alpha aracılı yolağıdır. Gi alfa ve Gs alfa aracılı yolaklar G-protein reseptörünü aktive eden yolaklardır. Bir dizi aktive edilmiş reseptör, Gi alfa veya Gs alfa'dan oluşan

heterotrimerik G-proteinine bağlanır ve bunları harekete geçirirler. Aktive edilmiş, GTP'ye bağlı G alfa altbirimi, onun ortak kökenli beta gama alt biriminden ayrılır ve downstream sinyal moleküllerini etkiler. Gi alfa, G-proteini potasyum kanalları aktive eder ve adenil siklazı inhibe eder. Aksine, Gs alfa adenil siklazı aktive eder (Mi et al., 2013). Birçok farklı G proteine bağlı reseptör (GPCR/G protein-coupled reseptörler) ve heterotrimerik G proteininin eşzamanlı aktivasyonu kanser gibi çeşitli patolojik koşullarda önemli bir rol oynamaktadır. GPCR sinyalinin küçük moleküller tarafından pan-inhibisyonu çeşitli hastalıkları tedavi etmek için yeni bir stratejiyi temsil etmektedir. GPCR sinyal iletimi downstream yolları bazı protein – protein etkileşimlerini tetikleyebilir ve bu etkileşimler sentezlenen küçük moleküller tarafından bloke veya modüle edilebilirler ve bu sayede tedavi amaçlı kullanılabilirler (Freissmuth, Waldhoer, Bofill-Cardona, & Nanoff, 1999). GPCR'ler, ilaç keşif çalışmaları üzerinde çok yüksek bir etkiye sahip en büyük sinyal proteini süper ailesini temsil ederler (Lundstrom, 2006). Hâlihazırdaki ilaç hedeflerinin yaklaşık % 30'u gerçekten GPCR'lerdir ve bunlar son derece önemli hastalık alanlarında denenmektedirler (Overington, Al-Lazikani, & Hopkins, 2006). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, özellikle kanserde (Dorsam & Gutkind, 2007), birçok farklı GPCR'nin birlikte aktivasyonunun önemi gösterilmektedir (Cotecchia, Fanelli, & Costa, 2003). Bu nedenle, bu tür etkileri gözlenen çeşitli GPCR'lerin eşzamanlı blokajından yeni terapötik stratejiler ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (Cotecchia et al., 2003). Çalışmamızda bu yolda görev alan ve hasta grubunda genomik anomalilerden etkilenen gen grupları bulunmuştur. Bunlardan EP300, ADCY2, CLTCL1 delesyona uğramışken, CREB5, GNAS, GNAI1, CHRM2, GRM7, CHRM3, ADCY8, GRM8 genlerinin amplifikasyona uğradığı saptadık.

Wnt uyarı yolağı birçok kanser türünde olduğu gibi MM'de de incelenmiş, kanser gelişimi ve tedavisi açısından önemli potansiyeller barındırmaktadır. Wnt uyarı yollarının kontrolünde bozukluk, kanserde yaygın olarak tarif edilmiş ve tümör gelişiminde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Ilyas, 2005). İki çalışma, Mezotelyomada kanonik Wnt uyarısının aşırı aktif olduğunu göstermiştir (Abutaily, Collins, & Roche, 2003), (Uematsu et al., 2003). Mezotelyoma tümörlerinde, primer tümör kültürlerinde ve hücre hatlarında artmış beta-katenin düzeyleri için immünohistokimyasal kanıtlar da bulunmaktadır (Abutaily et al., 2003; Uematsu et al., 2003).

Yakın tarihli bir çalışmada, MM'de Wnt/Fzd uyarısında görevli bazı gen gruplarının ekspresyon seviyelerinin normalden farklılık gösterdiği ve bu farklılık sonucu, MM hücrelerinin, sitotoksik ilaçlara karşı duyarlılıklarının değişebileceğini öne sürülmüştür (Fox et al., 2013). Yapılan birçok çalışma WNT yolağında görevli bazı genlerin hedef alınarak yeni terapilerin MPM'de denenebileceği görüşünü vurgulamaktadır (Fox et al., 2013; Mazieres et al., 2005; Uematsu et al., 2003). Çalışmamızda ise WNT yolağında görev yapan genlerin delesyon ve amplifikasyonlardan sık olarak etkilendikleri görülmektedir. Bu gen gruplarından seçilecek adaylar MM tedavisi için

moleküler hedef olarak değerlendirilebilirler. Bu gen gruplarından özellikle Cadherin ailesine ait olanlar kanser gelişim ve invazyonu açısından dikkat çekmektedirler. Özellikle, bulgularımızda saptadığımız, WNT sinyal yolağında görevli, cadherin ailesine ait 6 genin (CDH4, CDH6, CDH9, CDH10, CDH12, CDH18) genomik kayıpları dikkat çekmektedir.

Anjiyogenez solid tümörlerin ortak bir özelliğidir. Klinik olarak gözlemlenebilir bir tümörün gelişimi, tümör büyümesini sürdürmek için yeterli bir damar ağına oluşumuna bağlıdır (Ribatti, Nico, Crivellato, Roccaro, & Vacca, 2007). Tümör anjiyogenezi, anjiyojenik moleküllerin salgılanmasıyla uyarılan ve yakındaki damarın endotel hücrelerini durgun durumdan aktif duruma geçmesini teşvik eden bir süreçtir. Buna ek olarak, Anjiyogenik büyüme faktörlerinin uyarılması üzerine aktive edilmiş endotel hücreleri, hücre dışı matrisi parçalar, çoğalır ve göç ederler (Ribatti et al., 2007). Anjiyojenik büyüme faktörleri arasında, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), Plasenta Büyüme Faktörü (PlGF), Trombosit Türevli Büyüme Faktörü (PDGF) ve asidik, bazik Fibroblast Büyüme Faktörleri (sırasıyla FGF-1 ve -2) bulunur. VEGF, anjiyogenezdeki en önemli elemandır (Albonici, Palumbo, & Manzari, 2012; Ono, 2008). Bazı bulgular, MM'nin patogeneziinde asbestin, inflamasyon ve anjiyogenik faktörlerin deregülasyonunu içeren karmaşık bir ağı etkilediğini belirtmektedir (Albonici et al., 2012). Özellikle, anjiyojenik faktörlerin anormal ifadesinin, MM'de önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Bunlar içerisinde tümör neovaskülarizasyonunun uyarılması, vasküler geçirgenliğin artarak plevral efüzyonun oluşması, otokrin tümör hücre büyümesinin desteklenmesi ve son olarak asbest lifleri ile sinerjik olarak inflamasyonun gerçekleşmesi gözlenmektedir. Buna göre, anjiyojenik büyüme faktörlerinin upregülasyonu, mezotel hücre dönüşümü ve MM progresyonunda çok önemli bir olay olduğu düşünülmektedir (Albonici et al., 2012).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla geliştirilecek anti-anjiyojenik ajanların bu faktörleri hedef alacağı ve bu sayede tümör tedavilerinin gerçekleştirileceği düşünülmektedir. Bu kapsamda çoklu büyüme faktörü sinyal yollarının bloke edilerek görev yaptıkları kompleks ağın hedef alınabileceği planlanmaktadır (Cao, Cao, & Hedlund, 2008), (Ikuta et al., 2009), (Lieu, Heymach, Overman, Tran, & Kopetz, 2011). Çalışmamızda anjiyogenezde görev alan ve incelediğimiz hastalarda etkilenmiş 9 adet hedef gen saptanmıştır. Bu genlerden, WNT2B, SOS2, TEK, FOS genleri delesyona uğrarken ve AKT3, ANGPT1, SDK1, PTK2, EPHB1 genlerinin kopya sayıları artmıştır. Bu genlerin anti-anjiyogenik hedefler olarak seçilmesi ve fonksiyonlarının MPM tümör gelişimi açısından incelenmesi MPM tedavisinde yeni ufuklar açabilir.

MPM grubunda en fazla delesyona uğrayan bölge olan 9p21.3, tip 1 interferon genlerinin kümelendiği bölgedir. MPM grubumuzda, bu bölgeden kodlanan interferon tip 1 ailesi genlerinde; interferon alfa grubu IFNA2, IFNA7, IFNA4, IFNA17, IFNA21, IFNA10, IFNA1, IFNA6, IFNA16, IFNA8,

IFNA14 ve IFNK, IFNB1, IFNE, IFNW1 gen delesyonlarının yüksek frekansta gözleendiği bulundu. Dolayısıyla bu bölgede delesyondan etkilenen genlerin biyolojik işlevlerinin MPM patogenezinde büyük öneme sahip oldukları anlaşılmaktadır.

Tip 1 interferon grubundan olan IFN- α proteinleri lökositler tarafından üretilir. Genellikle viral enfeksiyona karşı doğuştan gelen bağışıklıkta görev alırlar. Sentezlerinden sorumlu genler, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17, IFNA21 olarak 13 alt tipte incelenmektedirler (Samarajiwa, Wilson, & Hertzog, 2006). Bunlardan IFN- α gen ürünü protein, özellikle hairy cell leukemia tedavisinde sentetik ilaç formuyla kullanılmaktadır (Samarajiwa et al., 2006).

Araştırmacılar, MM'de kemoterapi direncinin azaltılmasına yönelik, CDDP+Mit-C tedavisine ek diğer ajanların eklenmesiyle (diğer kemoterapötikler, antimetabolitler, immuno terapi, interferon alfa vb) tedavi etkinliğinin nasıl değişeceğini araştırmışlardır. Çeşitli çalışmalarda interferon alfa (IF- α)'nın tedaviye eklenmesinin sağkalım açısından bir fayda sağlamadığı rapor edilmiştir (Upham, Musk, Hazel, Byrne, & Robinson, 1993). Metintaş ve arkadaşları MPM hastalarında CDDP+Mit-C rejimine interferon ekleyerek tedavi ettikleri grup ile destek tedavi verdikleri grubu karşılaştırmışlardır. İki grup arasında sağkalım açısından anlamlı bir fark bulunmazken objektif cevabı olanlarda sağkalım, cevap olmayanlara ve destek tedavi alanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (M. Metintas et al., 1999). Diğer bir çalışmada, immunoterapi (interferon alfa) eklenen grup ile immunoterapi almayan grup karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, tümör cevabında, semptomatik cevapta ve ortalama sağkalımda anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (ECE, ERDAL, KOSKU, & GÜNGÖR). Söz konusu çalışmalarda ve diğer kanser türlerinde klasik rejime ek olarak verilen interferon tipleri veya tek olarak kullanılan interferon alfa (genellikle Interferon alfa-2b) olmak üzere tek tiptir. Oysaki çalışmamızda 9p21.3 bölgesinde kodlanan ve MPM olgularında yüksek sıklıkta delesyona uğrayan interferon lokusunda çeşitli tip 1 interferon genlerinin eksiklikleri bulunmuştur. Bunlar IFNA2, IFNA7, IFNA4, IFNA17, IFNA21, IFNK, IFNA10, IFNA1, IFNB1, IFNA6, IFNE, IFNA16, IFNW1, IFNA8, IFNA14 olmak üzere 15 adet geni kapsamaktadır. İnterferon alfa eksikliklerinin yanında IFNK, IFNB1, IFNE, IFNW1 gibi interferon tiplerinin de eksiklikleri görülmektedir. Bu sonuca dayanarak interferon tedavilerinin tek bir tipe yönelik değil kombine olarak yapılması, terapinin daha etkili olmasını sağlayabilir.

5.2-MPM Genomlarında Rastlanan Gen Füzyonları

Bilindiği gibi driver gen füzyonları birçok kanser tipinde rapor edilmektedir (Klijn et al., 2015). Bueno ve arkadaşları MPM 'de RNA-seq yöntemi kullanarak birçok yeni gen füzyonu bulmuşlardır (Bueno et al., 2016). Tekrarlayan gen füzyonlarının genellikle onkogenik aktivasyonla ilişkili oldukları bilinmektedir, fakat bu çalışmalarında saptanan gen füzyonlarının tümör süpressör genleri de inaktive ettiği ileri sürülmüştür. Çalışmalarında 22 örnekte 43 gen füzyonu bulmuşlardır. NF2 geninde 13, BAP1'de 7, SETD2'de 8, PBRM1'de 7 PTEN 'de 2, 6 füzyon da diğer gen gruplarında bulmuşlardır. Bu füzyonlardan kodlanan genlerin çoğunun fonksiyon bozukluğu gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, MPM'de tümör süpressör genlerin inaktivasyonuna neden olan yeni bir mutasyonel mekanizmayı işaret etmektedir (Bueno et al., 2016).

NSCLC' de EML4-ALK, RET, ROS ve NTRK gibi terapötik olarak müdahale edilebilir gen füzyonları tespit edilmiştir (Kwak et al., 2010; Light & Lee, 2008; Panagopoulos et al., 2013; Shaw et al., 2013; Takeuchi et al., 2012; Vaishnavi et al., 2013). Bu durum örnek alındığında, MM'de de terapötik potansiyeli olabilecek aday füzyon genlerinin araştırılmasının önemi artmaktadır. RNA dizilemesi sayesinde MM' de bulunan bir füzyona örnek t(14;22)(q32;q12) resiprokal translokasyonu sonucu meydana gelen EWSR-YY1 transkript füzyonudur (Light & Lee, 2008; Panagopoulos et al., 2013).

Çalışmamızda tüm genomu dizilenen 3 hastanın ikisinde, MPM'li hastalarda ilk olarak SKA3-DDX10 füzyon geni saptanmıştır. Bu füzyonun, SKA3 geninin tamamının, DDX10 geninin 10 ve 11 intronları arasına yerleşmesiyle gerçekleştiği belirlenmiştir. Söz konusu füzyon hakkında iki adet yayın bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ilkinde hormon reseptör negatif meme kanseri hücrelerinin genomları mate pair dizileme yöntemi incelenmiş olup, 40 adet somatik yapısal değişim bulunmuştur. Bunlardan DDX10 ve SKA3 genleri arasındaki translokasyonunun sık olarak gözlemlendiği vurgulanmıştır (Jiao et al., 2013). Çalışmada saptanan t(11:13)(q22.3,q12.11) translokasyonu SKA3-DDX10 füzyonunu oluşturmaktadır. Bu translokasyon SKA3'ün 5. Ekzonunun, DDX10 geninin 10 ve 11. İtronları arasına yerleşmesi ile oluştuğu bildirilmiştir. SKA3 iğ iplikçisi checkpoint sessizleştirilmesinde görev yaparak, mitozda metafazdan anafaza geçişteki kromozom kohezyonununun gerçekleştirilmesinde görev almaktadır (Daum et al., 2009; Theis et al., 2009). DDX10 ise DEAD-box RNA helikaz proteini kodlamaktadır ve lösemide NUP98-DDX10 onkogen füzyonuyla da bilinmektedir (Daum et al., 2009). DDX10 ve SKA3'ün de aralarında bulunduğu gen düzenlenmeleri, RNA interference-mediated baskılama ile susturulmuştur. Özellikle SKA3/DDX10 inhibisyonunun, meme kanseri hücrelerinin büyümelerini durdurduğu gözlenmiştir. Bu çalışma SKA3/DDX10 değişimlerinin tümör gelişiminde potansiyel rollerinin olduğunu

işaret etmekle beraber, DDX10'nun hücre apoptozunu indükleyen yolları etkilediğini belirtmektedir (Jiao et al., 2013).

Bu füzyonun bir bulgu olarak yer aldığı diğer bir çalışmada ise, araştırmacılar, 1000 genom projesine ait ham genom verilerini, çeşitli veri bankalarına yüklenmiş bazı tümör genomlarını ve mRNA'ları tekrar dizileyip analiz etmişler ve retrotranspozisyon sonucu oluşan kopya sayısı varyantlarını (retroCNV) incelemişlerdir. Analizleri sonucunda, SKA3-DDX10 füzyonunu da saptamışlardır (Schridder et al., 2013). Bu füzyonunun kimerik transkriptlerini aynı bireyden elde edilen lenfoid hücre hattında ve meme kanseri hücre hattında da belirlemişler ve ekspresyonu RT-PCR yöntemiyle ölçmüşlerdir. Çalışmalarında, SKA3 retro CNV'sinin DDX10 geninin 10. ve 11. intronları arasına yerleştiğini saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da tüm SKA3 geninin DDX10 geninin 10 ve 11. intronlarına yerleştiği görülmekle beraber insersiyon ve kırık noktalarının sözkonusu bildirilmiş olan füzyondan farklı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada, araştırmacılar, söz konusu entegrasyon sonucu oluşan transkriptin yeni bir fonksiyona sahip olabileceği öngörüsünde bulunmuşlar, bulgunun hücrede nasıl bir etki gösterdiğini saptamak amaçlı fonksiyonel çalışmaların gerçekleşmesi gerektiğini önermişlerdir (Schridder et al., 2013). Bilindiği gibi füzyon genleri kanserde ilaç hedefi olarak kullanılmaktadır bu yüzden, yeni nesil dizileme yöntemi ile iki MM genomunda saptadığımız SKA3-DDX10 füzyonu sonucu oluşan transkriptin hücredeki etkisinin belirlenip, MM patojenizindeki rolünün aydınlatılması ve yeni ilaç hedefi olarak denenmesi MPM tedavisine katkı sağlayabilir.

5.3-MPM'de Genomik Anomali ve Histolojik Alt Tip Arasındaki İlişki

MM'nin histolojik alt tiplerine özgü CGH analizleri yapıldığında bazı genomik alt tiplere özgü anomali kalıplarının olduğu gözlenmiştir (Krismann, Müller, Jaworska, & Johnen, 2002). Örneğin Sarkomatoid alt tipte anöploid oranının düşük, kopya sayısı artışlarının ise 4 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kromozom 3p14-21 bölgesindeki genomik kayıplara epitelooid MPM'lerde daha sık rastlanırken, sarkomatoid ve bifazik tiplerde bu bölgedeki anomalilerin daha nadir olduğu görülmüştür (Light & Lee, 2008). Histolojik gruplara göre MM hastalarının genomik anomalilerinin incelendiği diğer bir çalışmada, DNA kopya sayısı değişimleri, karakteristik olarak epitelooid MM'lerde delesyonlar 2p21 (15%), 3p14~p21 (33%) şeklinde bulunurken, genomik kazanımlar ise 7q (19%) olarak bulunmuştur (Krismann et al., 2002). Başka bir çalışmada, sarkomatoid MM 'de 7q, 15q ve 18p'de sık delesyonlara rastlanırken, genomik kazanımların ise 5p bölgesinde yoğunlaştığı bulunmuştur (Knuutila et al., 2006). Yine MM olgularının histolojik alt tiplere göre ayrıldığı farklı bir genomik çalışmada (149 epitelooid, 53 sarkomatoid, 3 bilinmeyen), 179 olgu, CGH yöntemi ile, 104 olgu ise aCGH yöntemi ile incelenmiştir. Kromozomlarda saptanan aberasyonların

%20'yi geçen frekanslarla epiteloid alt tip için; -1p21, -9p, -14q, ve -22q bölgelerinde delesyonlar, sarkomatoid alt tip için, -4, , -9p, -13, ve -14q bölgelerinde delesyon, +5p, +8q21 bölgelerinde kopya sayısı kazanımlarının gözleendiği bulunmuştur. Bifazik alt tip için -9p, -14q, and -22q bölgelerinin sık delesyonlara uğradığı görülmüştür (Ombretta et al., 2013). MM moleküler patogenezi ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalardan birinde ise, Bueno ve arkadaşları, histolojik karakterle çeşitli moleküler markerların birbiri ile uyumluluğunu belirten önemli bulgulara ulaşmışlardır. Çalışmalarında çeşitli gen gruplarının ekspresyon kalıpları ile histolojik alt tip ve prognoz ile bağlantılar saptamışlardır. Bu bulgular, ilerleyen yıllarda, MM'nin moleküler tanısında ve tedavisinde genomik anomali kalıplarının ve dolayısıyla gen ekspresyon değışikliklerinin öneminin artacağına işaret etmektedir (Bueno et al., 2016). Biz de çalışmamızda hasta grubuna dahil 3 sarkomaotid MPM genomunda genomik kazanımların diğer alttiplerin (epiteloid, mix ve belirlenemeyen tip) ortalamasına göre daha fazla bulunduğu bir kalıbı saptadık. Genomik kazanımların sarkomatoid tipte daha fazla görülmesi, bu histolojik alt tipin diğer alt tiplere oranla daha agresif ve tedaviye dirençli olmasının nedeni olabileceğini düşündürmektedir. Sarkomatoid tipteki genomik anomaliler, diğer histolojik tiplerde gözlenen anomalilerin ortalamasıyla karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu, Sarkomatoid tipte öne çıkan genomik anomaliler; 9p, 18, 16 kromozom bölgelerindeki kazanımlar ile 7. Kromozom delesyonları olarak belirlendi. Bunların yanında Sarkomatoid tipte, 6, 5, 4, 3, 12, 11. kromozomlarında genomik kazanımlar, 4. ve 12. kromozomlarının belirli bölgelerindeki delesyonların diğer alt tiplere oranla daha fazla görüldü. Çoğu çalışmada (Kivipensas et al., 1996; Knuutila et al., 1998; Ombretta et al., 2013; Takeda et al., 2012) MM genomlarının 9p bölgesinin delesyonlardan etkilendiği görmekteyiz fakat çalışmamızda, sarkomatoid tipe özgü olarak bu delesyonlarının yanında söz konusu bölgeye genomik kazanımların da yoğunlaştığını belirledik. Bu bölgedeki kopya sayısı artan genlerin, nükleobaz sentez metabolizmasında (özellikle pürin metabolizması) ve uyarı iletiminde görev yaptıklarını görmekteyiz. Sarkomatoid tipin diğer MM alt tiplerine oranla daha agresif olmasının sebebi bu kromozomal bölgelerde rastlanan kopya sayısı artışları olabilir. Özellikle sarkomatoid tipte çok sık gözlenen 9p kopya sayısı artışları ve buralarda etkilenen genler, nükleobaz sentezini engelleme temelli kemoterapilerin MM'de neden etkisiz kaldığını açıklayabilir niteliktedir.

Sarkomatoid tipte kopya sayısı artışlarının sık gözleendiği diğer bir kromozom ise kromozom 16' dir. Bu kromozomda yer alan CALB2 geninden kodlanan Calretinin proteini son yıllarda MM' de çok dikkat çeken bir proteindir (Blum & Schwaller, 2013; Christel et al., 2012). Çalışmamızda bu gen bölgesinin Sarkomatoid alt tiplerde kopya sayısı artışlarından anlamlı derecede etkilendiği belirlenmiştir. CALB2, 30-kDa lık EF- hand ailesine dahil kalsiyum bağlayıcı bir proteini kodlamaktadır. Bu protein ayrıca, voltaj kapılı CaV2.1 kalsiyum kanalı ile birlikte Ca21 sensörü olarak görev yaparak

nöronlarda ortak işlev görmektedirler (Christel et al., 2012), (Blum & Schwaller, 2013).

Calretinin bilindiği gibi epitelooid ve mix MM'lerin patolojik teşhisinde kullanılmakta fakat tümörigenezdeki etkisi hakkında çok az bilgi vardır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada Calretinin downregülasyonu lentiviral-mediated short-hairpin RNA ile gerçekleştirildiğinde, MM hücrelerinin in vitroda yaşayabilirliklerinin ve bölünmelerinin azaldığı gözlenmiştir. Bu etki, epitelooid tipin dominant olduğu hücre hatlarında çok kuvvetli gözlenirken, sarkomatoid hücre tiplerinde daha hafif ve gecikmiş olarak gözlenmiştir (Blum & Schwaller, 2013). Sarkomatoid tipte gözlenen bu baskılanma etkisinin yavaşlığı ve diğer tiplere oranla daha yetersiz oluşunun nedeni CALB2 geninin kopya sayısı artışı sonucu, Calretinin protein miktarının muhtemelen artışı nedeniyle olabileceği düşünülebilir. Bu veriler ve bulgumuz ışığında CALB2 aşırı ekspresyonun sarkomatoid tipin diğer histolojik alt tiplere göre daha agresif ve tedaviye daha dirençli olmasına neden olan bir faktör olabileceği düşünülebilir. Bu bulgular Calretininin MM hücreleri üzerindeki önemli etkisini ortaya koymasının yanında, MM için potansiyel, güçlü terapötik bir hedef olarak karşımıza çıkarmaktadır.

5.4-MPM Genomlarında Gözlenen Kompleks Anomali Kalıbı ve Chromoanagenesis Benzeri Anomaliler

Hücrenin, zaman içinde hem doğal, hem de mutajenik ve kanserojenik ajanlara maruziyeti sonucu meydana gelen mutasyon birikimi ile adım adım oluşan bir modele göre kanserleştiği düşünülmektedir (Yates & Campbell, 2012). Ayrıca kanser genomlarında kalıtılan mutasyonel olaylar ve polipoidi gibi değişimler de gözlenmektedir. Son yıllarda, yüksek güvenilirlikteki genomik dizileme teknolojileri sayesinde kanserleşmeye neden olabilecek yeni genomik instabilite fenomenleri de tartışılmaktadır. Bu tip değişimlerin bir veya daha fazla kromozomu etkileyen lokalize ve yüzlerce yeniden düzenlenme formasyonuna sahip karakterde oldukları bildirilmektedir. Bu yeni mutasyonel süreçlerin hücrenin yaşam döngüsünde tek ve bir anda meydana gelen katastrofik bir olay sonucu meydana geldiği de düşünülmektedir (Stephens et al., 2011). Bu genomik yeniden düzenlenme fenomenleri oluşum ve etki mekanizmalarına göre Chromothripsis, Chromoanasythesis, Chromoplexy gibi isimlerle tanımlanmakta ve kromozomların yeniden doğuşu anlamına gelen Chromoanagenesis terimi altında toplanmaktadırlar (Holland & Cleveland, 2012). Çoğu çalışmada, MM genomları kaotik olarak ifade edilmektedir (Light & Lee, 2008). Çalışmamızda, bu kaotik durumun Chromothripsis, Chromoanagenesis ve Chromoplexy kalıplarına benzer özellik taşıyan kromozomal anomalilerin olduğunu saptadık. Çalışmamızda, bu anomalilerin sadece belirli kromozomlara lokalize olarak değil farklı farklı kromozomları rastgele bir şekilde etkilediklerini saptadık. Çalışmamızda belirlediğimiz

Chromoanagenesis benzeri yapıların, hastalığın progresyon ve ya hayatta kalımla bağlantılarının araştırılmasına gereksinim vardır. Çünkü bu tarz şiddetli genomik hasarları taşıyan ve hayatta kalan hücrelerin neredeyse tamamı yeniden organize olmuş genomları sayesinde, hücre popülasyonları içerisinde çok güçlü seleksiyon avantajlara sahip olabilecekleri bildirilmektedir (Rode, Maass, Willmund, Lichter, & Ernst, 2016). Aynı zamanda bu süreç potansiyel olarak normal bir hücreyi kanser hücresine çeviren bir süreç olarak ta tanımlanmaktadır (Rode et al., 2016). Bütün bunlara ilave olarak, çalışmamızda, MM genomlarının, Chromothripsis, Chromoanasyntesis ve Chromoplexy gibi anomalilerin bazı özelliklerini kombine olarak taşıyan, daha karmaşık bir anomali kalıbından etkilendiği gözlemlendi. Çalışmamızdan elde ettiğimiz deneyime ve sonuçlara göre, bu tarz kompleks anomalilerin kesin teşhislerinin yapılabilmesi ve buna göre hasta popülasyonundaki net sıklıklarının belirlenebilmesi için tüm genom SNP array ve tüm genom dizileme yöntemlerinin kombine olarak kullanılmasının en ideal ve doğru sonucu vereceği kanaatine varıldı.

5.5-MPM ilişkili olabilecek Aday Nükleotid Varyasyonları

Şimdiye kadar saptanan Mezotelyoma mutasyonel profilinin, hastalığın sınıflandırma veya tedavi stratejilerini belirlenmesi açısından henüz yeterli olmadığı görülmektedir. Fakat son yıllarda yapılan MM genetik çalışmalarıyla konu hakkındaki bilgilerimiz gün geçtikçe artmakta ve bu sayede mutasyona özgü ilaç araştırmalarının hız kazanabileceğini öngörülebiliriz.

MM'yi tetikleyen genetik değişiklikleri anlamak ve bunların fonksiyonel etkilerini çözümlenmek teşhis, prognoz ve kişisel terapötik yöntemlerin başarıyla geliştirilmesi için kritik önem taşımaktadır. MM nadir gözlenen bir hastalık olduğu için, üzerinde yapılan genomik çalışmalar sınırlıdır ve tipik olarak az sayıda örnek içermektedir (Dong et al., 2009),(Guo et al., 2015). Önceki çalışmalar, genomun birden fazla bölgesini içeren kopya kazanımları ve kopya kayıplarını bildirmektedir. Daha önce MPM 'de CDKN2A, NF2 ve BAP1'deki fonksiyon kaybı mutasyonları bildirilmiştir (Bott et al., 2011) (Cheng et al., 1999). Yine MPM'de BAP1, NF2, TP53, SETD2, DDX3X, ULK2, RYR2, CFAP45, SETDB1 ve DDX51'in önemli ölçüde mutasyona uğradığı bulunmuştur (Alexandrov, Nik-Zainal, Wedge, Campbell, & Stratton, 2013). SF3B1 (~% 2; 4/216) ve TRAF7 (~% 2; 5/216) da dahil olmak üzere çeşitli genlerde tekrarlayan mutasyonlar saptanmıştır. SF3B1 mutant örnekleri, wild tipli tümörlerden farklı bir splicing profilini göstermekte olduğu bulunmuştur (Bueno et al., 2016). Bir çalışmada, asbest maruziyeti olan 93 MPM vakasında 94 germline kanser yatkınlık geninin mutasyon sıklığı incelenmiştir. PALB2, BRCA1, FANCI, ATM, SLX4, BRCA2, FANCC, FANCF, PMS1 ve XPC'de 10 patojen splice varyantı tanımlanmıştır. Bütün bu genler DNA onarım yollarında, çoğunlukla homolog rekombinasyon onarımı ile ilgili olduğu ortaya konmuştur (Marta Betti et al., 2017). Çalışmamızda da,

genomları dizilenen 3 hastada PALB2, BAP1, NBN, ERCC4 gibi DNA tamirinde görev yapan genlerde hatalı protein yapımına neden olabilecek nükleotid değişimleri bulunmuştur. Bu genlerde bizim de belirlemiş olduğumuz bu nükleotid varyantları, medulloblastoma, meme kanseri, kolorektal kanseri, prostat kanseri, lösemi ve diğer kalıtsal kanser türlerinde de bildirilmiştir (Trubicka et al., 2017; Z.-H. Zhang et al., 2012). NBN geninde saptadığımız p.I171V:ATT>GTT değişimi, lösemi ve medulloblastomalarda saptanmış, germline karakterde önemli bir varyanttır (Mosor et al., 2013; Trubicka et al., 2017). Bu varyant popülasyonda çok nadir görülmekle beraber MPM için henüz rapor edilmemiştir. Patolojik etkisinin yanında bu varyant kemoterapi esnasında kötü yan etkilerin gözlenmesiyle ve artmış kromozomal instabilite ile de ilişkilendirilmiştir (Yamamoto et al., 2014) (Trubicka et al., 2017). Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda NBN p.I171V:ATT>GTT varyantının MPM için risk faktörü olup olmadığı daha geniş kohortlarda test edilmelidir.

Çalışmamız dahilinde gerçekleştirilen 3 MPM genomunun dizilenmesi sayesinde, çoğu başka kanser türlerinde de rapor edilmiş fakat MPM'de rapor edilmemiş patolojiniteleri yüksek, popülasyonda çok düşük frekansta gözlenen yada henüz popülasyon ölçümü yapılmamış nükleotid varyantları bulundu. Üç hastanın ikisinde son yıllarda MM yatkınlık geni olarak öne çıkan BAP1 mutasyonları belirlendi. Bu mutasyon BAP1 geninin 4. ekzonunda TA/T değişimi sonucu frameshift mutasyonu henüz COSMIC dahil kanser veribankalarında ve literatürde yer almamaktadır. Kanser gelişiminde sorumlu en çok çalışan genler olan RB1 ve TP53 ` te ise farklı hastalarda MPM'de daha önce saptanmamış birer nadir daha mutasyon bulduk. Bunlar haricinde belirlemiş olduğumuz diğer nadir varyantların çoğunluğu diğer kanser türlerinde de bulunmuş olup MPM için rapor edilmemişlerdir. Bu varyantların MM gelişimi için risk faktörü olup olmadıkları geniş kohortlarda test edilip belirlenmelidir. Yine ilk olarak MPM'de belirlediğimiz HYDIN geninin 71101200 pozisyonunda saptanan T/C Missense varyantı COSMIC veribankasında da COSM4844501 no ile kayıtlı olup ostesarcoma ve serviks kanserinde gözleendiği rapor edilmiştir. Bu gendeki mutasyonlar Primer Silier Diskinezi tip 5 ile ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda sil hareketinin kanser gelişiminde etkisi vurgulanmaktadır (Toftgård, 2009). Özellikle solunum yolunun belirli bölümünde sillerin yabancı ajanlardan temizleme görevinde göz önünde bulundurulduğunda silier disfonksiyonun solunan asbestin temizlenmesinde yetersizliğe yol açabileceği düşünülebilir. Bu silier hareketin asbestin solunum yollarından temizlenmesindeki etkisi araştırmaya açıktır ve bu işlevde görev alan HYDIN gibi genlerin fonksiyonları MPM yatkınlığı açısından incelenebilir. Aynı şekilde mukosilier temizlikte görev alan Mucin ailesine ait MUC2 ve MUC4 genlerinde çeşitli missense karakterde polimorfizmler saptadık. Mucinler solunum yollarında mukus salgılanmasında görev almaktadırlar (Rogers, 2007) ve herhangi bir fonksiyon bozuklukları

mucosilier aktivitenin bozulmasına neden olabilir (Munkholm & Mortensen, 2014).

Çalışmamızda, ayrıca, nadir rastlanan mutasyonların yanında çeşitli kanser tiplerinde patolojik ve/veya hatalı protein yapımına neden olabilecek polimorfizm niteliğinde nükleotid varyantları da bulundu. Polimorfizm niteliğinde olan ve başka kanser türlerinde risk faktörü olarak kabul edilmiş varyantlara örnek olarak genomları dizilenen 3 hastamızda da saptanan CCND1 genindeki missense mutasyon (rs9344) verilebilir. Bu varyant, kolorektal kanser, multipl myeloma, meme kanseri, lenfoma, mesane kanseri gibi kanser türlerinde risk faktörü olarak bildirilmiştir (Driver et al., 2008; Mavaddat, Dunning, Ponder, Easton, & Pharoah, 2009; Song et al., 2008; Wang et al., 2006; Wu et al., 2006) fakat MM için bir kayıt bulunmamaktadır. Diğer önemli bir polimorfik varyant PDE4DIP geninin 144875979 pozisyonunda bulunan splice site bölgesi mutasyonudur. Bu gendeki mutasyonlar periton kanseri ve MM'de (Kanchi et al., 2014), (Lai et al., 2016) rapor edilmiş olup MM içinde aday bir risk faktörü olarak değerlendirilebilir.

Özet olarak, mutasyon ve polimorfizm saptanan genlerin DNA tamiri, hücre bölünmesi kontrolü, p53 yolağı, apoptoz, çeşitli growth faktör aktivitesi, kinaz aktivitesi, immün yanıt ve muko silier aktivite ile ilgili genler olduğu görülmektedir. Bu üç hastadan elde edilen mutasyon profili incelendiğinde genellikle diğer kanser tiplerinde de gözlenmiş, patolojik etkisi vurgulanmış ya da risk faktörü olarak belirlenmiş nükleotid değişimleri göze çarpmaktadır. Bu veriden yola çıkarak MPM'de tek bir yatkınlık geninin neden olduğu yatkınlıktan çok, kritik hücre işlevlerinde görev alan heterojen gen mutasyonlarıyla kombine kanser yatkınlığına neden olan, nadir varyantların veya polimorfizmlerin bulunduğu nükleotid değişimi kalıbından bahsedilebilir. Bu görüşü test etmek ve daha kesin bir kanıya varmak için, saptanan bu mutasyonların ve varyantların geniş hasta-kontrol (asbest temaslı-temassız) serileriyle sıklıklarının belirlenip, fonksiyonel etkilerinin saptanması gerekmektedir. Bu sayede erken teşhis ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri değerlendirilebilir.

5.6-MPM' de Sık Gözlenen LOH (Loss Of Heterozygosity) Bölgeleri

SNP array verileri incelendiğinde, belirli kromozomal bölgelerde LOH bölgelerinin yoğunlaştığı görülmektedir. Bu LOH'ların bazılarının nedeni kopya sayısı değişimleri olmakla beraber, diğer kromozomal yeniden düzenlenme mekanizmaları da (büyük translokasyonlar, füzyonlar, inversiyonlar vs.) sorumlu tutulabilir. Tüm genom dizileme verimize dayanarak bazı LOH bölgelerinin inversiyon nedenli olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca bazı hastalarımızda (n=6) 2, 3, 7 kromozomlarda birikim göstermekle beraber 1, 5, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22 gibi kromozomlarda (örneğin bir

hastada 3p'nin 63,741 kb'lik kısmını etkileyen) çok büyük LOH bölgeleri saptanmıştır. Bu hastaların genom anomali kalıplarına bakıldığında kopya sayısı değişimlerinden çok kromozomları etkileyen büyük kopya nötr LOH (copy nötr LOH) bölgeleri gözlenmiştir. Asbest fiberlerinin fagositoz suretiyle hücre içine alınmalarından sonra hücre bölünmesi esnasında mekanik olarak kromozomlara veya iğ iplikçiklerine etki ederek hatalı kromozom segregasyonuna neden oldukları bildirilmiştir (T. Zhang, Lv, Huang, Ren, & Shi, 2017). Bu durumun yapısal kromozomal anomalilerin yanında anöplodilere neden oldukları rapor edilmiştir. (T. Zhang et al., 2017) Bu büyük kromozomal LOH bölgelerinin asbest fiberlerinin kromozomlara verdiği mekanistik hasarlar sonucu meydana geldiği düşünülebilir.



6-SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda kullandığımız yüksek çözünürlüklü genom tarama teknolojileri sayesinde MPM ve BAP genomlarını karşılaştırarak bu gruptaki genomik değişimleri inceledik. Çalışmamız sonucunda bu iki gruba özgü istatistiki olarak anlamlı kopya sayısı değişimleri bulunmuştur. Çalışmamızda, MPM hastalarının genomlarını yüksek derecede değişime uğratan büyük kromozomal delesyonlar, amplifikasyonlar, heterozigotluk kayıpları ve kompleks yeniden düzenlenme kalıpları saptandı. Bu kromozomal değişimlerin histolojik alt tip gibi bazı klinik özelliklerle ilişkileri de saptanmıştır. Çalışma grubuna dahil 3 MPM genomu dizilenmiş, bu sayede SNP array verileri doğrulanmış, kromozomları etkileyen kompleks anomali kalıbı detaylandırılmış ve aday nükleotid varyasyonları saptanmıştır.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ve öneriler özetlenecek olursa;

- 1) MPM genomlarına özgü yüksek frekansta gözlenen delesyonlar saptanmıştır. Söz konusu delesyonlar birçok gen ve gen grubunun yapısını etkilemiştir. Bu delesyonlara Benign grupta rastlanılmamıştır. Bu delesyonların bir kısmı literatür bilgilerine uygun olmakla beraber, birçoğu MPM ile tarafımızdan ilişkilendirilmiş kromozomal anomaliler ve bunların etkilediği gen bölgeleridir.
- 2) MPM genomlarına özgü yüksek frekansta gözlenen kromozomal amplifikasyonlar saptanmıştır. Bu amplifikasyonlara Benign grupta rastlanılmamıştır. Bu delesyonların bir kısmı literatür bilgilerine uygun olmakla beraber, birçoğu MPM ile tarafımızdan ilişkilendirilmiş kromozomal anomaliler ve bunların etkilediği gen bölgeleridir.
- 3) Benign grupta, NF2 gen bölgesinin bir kısmını etkileyen kopya sayısı artışı saptanmıştır. Bu durumun asbest maruziyeti sonucu gelişebilecek Malign transformasyona karşı koruyucu bir etkiye neden olabileceği öngörülmüştür. Literatür taramasında, söz konusu kopya sayısı artışına, BAP genomlarında rastlanılmamıştır. Benign grupta gözlenen NF2 genini etkileyen kopya sayısı artışının, asbest maruziyeti sonucu gerçekleşen Malign transformasyona karşı koruyucu etkisinin araştırılması gerekmektedir. Bu hipotez doğrulanabilirse, NF2 proteini Mezotelyomaya karşı koruyucu bir ajan veya tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilir.
- 4) MPM grubunda gözlenen delesyon ve amplifikasyonlardan etkilenen genlerin görev yaptıkları moleküler yollar ve biyolojik işlevler saptanmıştır. Bu öne çıkan yollardan WNT yolağı ve anjiyogenez yolağı dışındakiler henüz Mezotelyomada araştırılmamıştır. Biyolojik işlev açısından da başta interferon ailesi olmak üzere sitokin aktivitesinin önemini vurgulamaktayız. Çalışmamızda saptadığımız bu aday yollarda ve biyolojik işlevlerde görev yapan hedef genler ve bunların protein ürünleri fonksiyonel çalışmalarla değerlendirilip tedavi hedefi olarak kullanımları araştırılabilir.

- 5) MPM grubunda sarkomaotid alt tipe özgü farklı bir genomik anomali kalıbının olduğu gözlenmiştir. Bu farklı genomik anomali kalıbından elde edilen bilgi, sarkomatoid tipin teşhisinde ve bu alt tipe özgü farklı tedavi rejimlerini uygulanmasına yönelik araştırmalarda değerlendirilebilir.
- 6) MPM genomlarının Chromoanagenesis anomali kalıbına benzer özellikte kompleks anomalilerden, kromozom içi ve/veya kromozomlar arasında parça değişimlerinden, büyük heterozigotluk kayıplarından ve büyük kromozomal inversiyonlardan etkilendikleri bulunmuştur. Bu karmaşık genomik anomaliler Mezotelyoma'da ilk kez saptanmakta olup, hastalığın agresif ve hızlı ilerleyen bir kanser olması arasındaki ilişki araştırılabilir.
- 7) Tüm genomları dizilene üç MPM hastasının ikisinde SKA3-DDX10 gen füzyonu keşfedilmiştir. Bu füzyon geni MPM için ilk defa saptanmıştır. Bilindiği gibi füzyon genleri ve ürünü olan proteinler çeşitli kanserlerde ilaç hedefi olarak kullanılabilir. Bu yüzden SKA3-DDX10 gen füzyonunun MPM gelişimindeki ve patogenezdaki etkisi fonksiyonel çalışmalarla desteklenip doğrulanabilirse, tedavi hedefi olarak seçilebilir.
- 8) Tüm genomları dizilene 3 MPM hastasının hastalık patogenezinin veya hastalığa yatkınlığına neden olabilecek nadir gözlenen nükleotid varyantları ile çeşitli kanser türleriyle ilişkilendirilmiş nükleotid polimorfizmleri bulunmuştur. Tüm genom dizilemesi yapılan bir hastada son yıllarda MPM yatkınlığından sorumlu tutulan BAP1 geninde daha önce literatürde bildirilmemiş bir frameshift mutasyon keşfedilmiştir. Saptanan çoğu nükleotid varyantı diğer kanser türlerinde de bildirilmiştir. Bu üç hastadan elde edilen mutasyon profili incelendiğinde genellikle diğer kanser tiplerinde de gözlenmiş, patolojik etkisi vurgulanmış nükleotid değişimleri göze çarpmaktadır. Bu veriden yola çıkarak MPM'de bir yatkınlık geninin neden olduğu yatkınlıktan çok, kritik hücre işlevlerinde görev alan gen mutasyonlarıyla birlikte kansere yatkınlık yaratabilecek polimorfizmlerin bulunduğu bir varyasyon kalıbından bahsedilebilir. Özellikle nadir gözlenen, biyoinformatik yöntemlerle patolojik etkileri belirlenmiş, diğer kanser tiplerinde de risk faktörü olarak belirlenen nükleotid varyantları MPM yatkınlığı açısından da önem arz etmektedirler. Bu aday varyantların germline kökenli olanları daha büyük önem taşımaktadır ve geniş MM kohortlarında test edilip hastalıkla ilişkileri belirlenmelidir. Bu sayede yatkınlığına sahip ve risk altındaki bireyler hastalık gelişimi olmadan önce belirlenebilir ve bu mutasyonlara özgü yeni tedavi seçenekleri değerlendirilebilir.
- 9) Bazı kromozomların çok büyük LOH' lardan etkilendiği saptanmıştır. Bu büyük LOH'ların asbestin kromozom yapısına direk bir etkisi sonucu meydana gelip gelmediği araştırılabilir. Asbest maruziyeti ve kromozomal hasar arasındaki bağlantı bu açıdan değerlendirilebilir.
- 10) Kanser genom çalışmalarında aday gen ve kromozomal anomalilerin saptanmasında yöntem olarak yüksek çözünürlüklü SNP array çiplerinin yanında tüm genom dizilemenin kullanılması, hem sonuçların

doğruluğunun arttırılması hem de SNP array tarafından saptanamayacak kadar küçük kromozomal anomali ve nükleotid varyasyonlarının belirlenmesi açısından önemlidir. İki yöntemden de elde edilecek ham verilerin amaca uygun biyoinformatik yöntemlerle analiz edilip sonuçların çıkarılması en uygun yaklaşımdır. Ayrıca genomik anomali kalıplarıyla çeşitli klinik parametrelerin ilişkilerinin karşılaştırılmasının araştırmacıyı önemli sonuçlara götüreceği görülmektedir. Kanseri aday nükleotidlerinin ve kromozomal anomalilerin saptanmasında tümör dokusundan elde edilen DNA ile aynı hastanın kanından elde edilecek DNA'nın da karşılaştırılarak incelenmesi hatta mümkünse aile bireylerinin de bu DNA'larla karşılaştırılması germline özellikteki hastalık yatkınlığına neden olabilecek varyantların saptanmasında en ideal yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır.

7-KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Rahman, M. H., Pilarski, R., Cebulla, C. M., Massengill, J. B., Christopher, B. N., Boru, G., . . . Davidorf, F. H. (2011). Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *Journal of medical genetics*, jmedgenet-2011-100156.
- Abutaily, A., Collins, J., & Roche, W. (2003). Cadherins, catenins and APC in pleural malignant mesothelioma. *The Journal of pathology*, 201(3), 355-362.
- Achilli, A., Olivieri, A., Pala, M., Metspalu, E., Fornarino, S., Battaglia, V., . . . Pennarun, E. (2007). Mitochondrial DNA variation of modern Tuscans supports the near eastern origin of Etruscans. *The American Journal of Human Genetics*, 80(4), 759-768.
- Aelony, Y., & Yao, J. F. (2005). Prolonged survival after talc poudrage for malignant pleural mesothelioma: case series. *Respirology*, 10(5), 649-655.
- Aguilar-Rojas, A., Huerta-Reyes, M., Maya-Núñez, G., Arechavaleta-Velásco, F., Conn, P. M., Ulloa-Aguirre, A., & Valdés, J. (2012). Gonadotropin-releasing hormone receptor activates GTPase RhoA and inhibits cell invasion in the breast cancer cell line MDA-MB-231. *BMC cancer*, 12(1), 550.
- Aguilar-Rojas, A., Pérez-Solis, M. A., & Maya-Núñez, G. (2016). The gonadotropin-releasing hormone system: Perspectives from reproduction to cancer. *International journal of oncology*, 48(3), 861-868.
- Albertson, D. G., Collins, C., McCormick, F., & Gray, J. W. (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nature genetics*, 34(4), 369.
- Albonici, L., Palumbo, C., & Manzari, V. (2012). Role of inflammation and angiogenic growth factors in malignant mesothelioma *Malignant Mesothelioma: InTech*.
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Campbell, P. J., & Stratton, M. R. (2013). Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. *Cell reports*, 3(1), 246-259.
- Alley, E. W., Schellens, J. H., Santoro, A., Beckey, K., Yuan, S. S., Cheng, J., . . . Molife, L. (2015). *Single-agent pembrolizumab for patients with malignant pleural mesothelioma (MPM)*. Paper presented at the Journal of Thoracic Oncology.
- Altomare, D. A., Menges, C. W., Xu, J., Pei, J., Zhang, L., Tadevosyan, A., . . . Chudoba, I. (2011). Losses of both products of the Cdkn2a/Arf locus contribute to asbestos-induced mesothelioma development and cooperate to accelerate tumorigenesis. *PloS one*, 6(4), e18828.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Altomare, D. A., Vaslet, C. A., Skele, K. L., De Rienzo, A., Devarajan, K., Jhanwar, S. C., . . . Testa, J. R. (2005). A mouse model recapitulating molecular features of human mesothelioma. *Cancer research*, 65(18), 8090-8095.
- Arapis, K., Caliandro, R., Stern, J., Girard, P., Debrosse, D., & Gossot, D. (2006). Thoracoscopic palliative treatment of malignant pleural effusions. *Surgical Endoscopy And Other Interventional Techniques*, 20(6), 919-923.
- Armstrong, B., de Klerk, N. H., Musk, A., & Hobbs, M. (1988). Mortality in miners and millers of crocidolite in Western Australia. *British journal of industrial medicine*, 45(1), 5-13.
- Arslan, S. Jou r.
- Artvinli, M., & Barış, Y. İ. (1979). Malignant mesotheliomas in a small village in the Anatolian region of Turkey: an epidemiologic study. *Journal of the National Cancer Institute*, 63(1), 17-22.
- Ascoli, V., Aalto, Y., Carnovale-Scalzo, C., Nardi, F., Falzetti, D., Mecucci, C., & Knuutila, S. (2001). DNA copy number changes in familial malignant mesothelioma. *Cancer genetics and cytogenetics*, 127(1), 80-82.
- Ascoli, V., Cavone, D., Merler, E., Barbieri, P. G., Romeo, L., Nardi, F., & Musti, M. (2007). Mesothelioma in blood related subjects: report of 11 clusters among 1954 Italy cases and review of the literature. *American journal of industrial medicine*, 50(5), 357-369.
- Azari, M. R., Nasermoaddeli, A., Movahadi, M., Mehrabi, Y., Hatami, H., Soori, H., . . . Ramazni, B. (2010). Risk assessment of lung cancer and asbestosis in workers exposed to asbestos fibers in brake shoe factory in Iran. *Industrial health*, 48(1), 38-42.
- Baris, Y., Sahin, A., Ozesmi, M., Kerse, I., Ozen, E., Kolacan, B., . . . Göktepelı, A. (1978). An outbreak of pleural mesothelioma and chronic fibrosing pleurisy in the village of Karain/Urgüp in Anatolia. *Thorax*, 33(2), 181-192.
- Baris, Y. İ. (1987). *Asbestos and erionite related chest diseases*: Department of Chest Diseases, Hacettepe Univ., School of Medicine.
- Baris, Y. I., & Grandjean, P. (2006). Prospective study of mesothelioma mortality in Turkish villages with exposure to fibrous zeolite. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(6), 414-417.
- Barış, B., Demir, A. U., Shehu, V., Karakoca, Y., Kisacik, G., & Barış, Y. (1995). Environmental fibrous zeolite (erionite) exposure and malignant tumors other than mesothelioma. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 15(2-4), 183-189.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Bariş, Y., Artvinli, M., Sahin, A., Bilir, N., Kalyoncu, F., & Sebastien, P. (1988). Non-occupational asbestos related chest diseases in a small Anatolian village. *British journal of industrial medicine*, 45(12), 841.
- Baser, M. E. (2006). The distribution of constitutional and somatic mutations in the neurofibromatosis 2 gene. *Human mutation*, 27(4), 297-306.
- Baumann, F., Buck, B. J., Metcalf, R. V., McLaurin, B. T., Merkler, D. J., & Carbone, M. (2015). The presence of asbestos in the natural environment is likely related to mesothelioma in young individuals and women from Southern Nevada. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(5), 731-737.
- Baumann, F., Maurizot, P., Mangeas, M., Ambrosi, J.-P., Douwes, J., & Robineau, B. (2011). Pleural mesothelioma in New Caledonia: associations with environmental risk factors. *Environmental health perspectives*, 119(5), 695.
- Bayram, M., Dongel, I., Bakan, N. D., Yalçın, H., Cevit, R., Dumortier, P., & Nemery, B. (2013). High risk of malignant mesothelioma and pleural plaques in subjects born close to ophiolites. *CHEST Journal*, 143(1), 164-171.
- Below, J. E., Cox, N. J., Fukagawa, N. K., Hirvonen, A., & Testa, J. R. (2011). Factors that impact susceptibility to fiber-induced health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 14(1-4), 246-266.
- Berry, G., Reid, A., Aboagye-Sarfo, P., De Klerk, N., Olsen, N., Merler, E., . . . Musk, A. (2012). Malignant mesotheliomas in former miners and millers of crocidolite at Wittenoom (Western Australia) after more than 50 years follow-up. *British journal of cancer*, 106(5), 1016-1020.
- Betti, M., Casalone, E., Ferrante, D., Aspesi, A., Morleo, G., Biasi, A., . . . Righi, L. (2017). Germline mutations in DNA repair genes predispose asbestos-exposed patients to malignant pleural mesothelioma. *Cancer letters*.
- Betti, M., Ferrante, D., Padoan, M., Guarrera, S., Giordano, M., Aspesi, A., . . . Ruffini, E. (2011). XRCC1 and ERCC1 variants modify malignant mesothelioma risk: a case-control study. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 708(1), 11-20.
- Bianchi, A. B., Mitsunaga, S.-I., Cheng, J. Q., Klein, W. M., Jhanwar, S. C., Seizinger, B., . . . Testa, J. R. (1995). High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), 10854-10858.
- Bianchi, C., & Bianchi, T. (2007). Malignant mesothelioma: global incidence and relationship with asbestos. *Industrial health*, 45(3), 379-387.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Bissett, D., Macbeth, F., & Cram, I. (1991). The role of palliative radiotherapy in malignant mesothelioma. *Clinical oncology*, 3(6), 315-317.
- Björkqvist, A.-M., Tammilehto, L., Anttila, S., Mattson, K., & Knuutila, S. (1997). Recurrent DNA copy number changes in 1q, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q and 22q detected by comparative genomic hybridization in malignant mesothelioma. *British journal of cancer*, 75(4), 523.
- Björkqvist, A.-M., Tammilehto, L., Nordling, S., Nurminen, M., Anttila, S., Mattson, K., & Knuutila, S. (1998). Comparison of DNA copy number changes in malignant mesothelioma, adenocarcinoma and large-cell anaplastic carcinoma of the lung. *British journal of cancer*, 77(2), 260-269.
- Björkqvist, A.-M., Wolf, M., Nordling, S., Tammilehto, L., Knuutila, A., Kere, J., . . . Knuutila, S. (1999). Deletions at 14q in malignant mesothelioma detected by microsatellite marker analysis. *British journal of cancer*, 81(7), 1111.
- Blum, W., & Schwaller, B. (2013). Calretinin is essential for mesothelioma cell growth/survival in vitro: a potential new target for malignant mesothelioma therapy? *International journal of cancer*, 133(9), 2077-2088.
- Bononi, A., Napolitano, A., Pass, H. I., Yang, H., & Carbone, M. (2015). Latest developments in our understanding of the pathogenesis of mesothelioma and the design of targeted therapies. *Expert review of respiratory medicine*, 9(5), 633-654.
- Bott, M., Brevet, M., Taylor, B. S., Shimizu, S., Ito, T., Wang, L., . . . Reva, B. (2011). The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21. 1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nature genetics*, 43(7), 668-672.
- Boutin, C., Rey, F., Gouvernet, J., Viallat, J., Astoul, P., & Ledoray, V. (1993). Thoracoscopy in pleural malignant mesothelioma: a prospective study of 188 consecutive patients. Part 2: Prognosis and staging. *Cancer*, 72(2), 394-404.
- Brims, F. (2009). Asbestos--a legacy and a persistent problem. *Journal of the Royal Naval Medical Service*, 95(1), 4.
- Britton, M. (2002). *The epidemiology of mesothelioma*. Paper presented at the Seminars in oncology.
- Bueno, R., Stawiski, E. W., Goldstein, L. D., Durinck, S., De Rienzo, A., Modrusan, Z., . . . Chirieac, L. R. (2016). Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nature genetics*, 48(4), 407-420.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Calabrò, L., Morra, A., Fonsatti, E., Cutaia, O., Fazio, C., Annesi, D., . . . Altomonte, M. (2015). Efficacy and safety of an intensified schedule of tremelimumab for chemotherapy-resistant malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(4), 301-309.
- Camidge, D., Stockton, D., & Bain, M. (2006). Factors affecting the mesothelioma detection rate within national and international epidemiological studies: insights from Scottish linked cancer registry-mortality data. *British journal of cancer*, 95(5), 649-652.
- Cancer, I. A. f. R. o. (2012). *Review of Human Carcinogens: Metals, Arsenic, Dusts and Fibres*: World health organization.
- Cao, Y., Cao, R., & Hedlund, E.-M. (2008). R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *Journal of molecular medicine*, 86(7), 785-789.
- Carbone, M., Ferris, L. K., Baumann, F., Napolitano, A., Lum, C. A., Flores, E. G., . . . Krausz, T. (2012). BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *Journal of translational medicine*, 10(1), 179.
- Carbone, M., Yang, H., Pass, H. I., Krausz, T., Testa, J. R., & Gaudino, G. (2013). BAP1 and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 13(3), 153.
- Castagneto, B., Botta, M., Aitini, E., Spigno, F., Degiovanni, D., Alabiso, O., . . . Buosi, R. (2007). Phase II study of pemetrexed in combination with carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM). *Annals of oncology*, 19(2), 370-373.
- Cedrès, S., Ponce-Aix, S., Zugazagoitia, J., Sansano, I., Enguita, A., Navarro-Mendivil, A., . . . Felip, E. (2015). Analysis of expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *PloS one*, 10(3), e0121071.
- Chapman, S. J., Cookson, W. O., Musk, A. W., & Lee, Y. G. (2003). Benign asbestos pleural diseases. *Current opinion in pulmonary medicine*, 9(4), 266-271.
- Cheang, M. C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S. K., . . . Nielsen, T. O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical cancer research*, 14(5), 1368-1376.
- Chen, X., Schulz-Trieglaff, O., Shaw, R., Barnes, B., Schlesinger, F., Källberg, M., . . . Saunders, C. T. (2015). Manta: rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications. *Bioinformatics*, 32(8), 1220-1222.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Cheng, J. Q., Jhanwar, S. C., Klein, W. M., Bell, D. W., Lee, W.-C., Altomare, D. A., . . . Testa, J. R. (1994). p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer research*, 54(21), 5547-5551.
- Cheng, J. Q., Lee, W. C., Klein, M. A., Cheng, G. Z., Jhanwar, S. C., & Testa, J. R. (1999). Frequent mutations of NF2 and allelic loss from chromosome band 22q12 in malignant mesothelioma: Evidence for a two-hit mechanism of NF2 inactivation. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 24(3), 238-242.
- Cheung, M., Pei, J., Pei, Y., Jhanwar, S. C., Pass, H. I., & Testa, J. R. (2010). The promyelocytic leukemia zinc finger gene, PLZF, is frequently downregulated in malignant mesothelioma cells and contributes to cell survival. *Oncogene*, 29(11), 1633.
- Choi, J.-H., Gilks, C. B., Auersperg, N., & Leung, P. C. (2006). Immunolocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and type I GnRH receptor during follicular development in the human ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(11), 4562-4570.
- Christel, C. J., Schaer, R., Wang, S., Henzi, T., Kreiner, L., Grabs, D., . . . Lee, A. (2012). Calretinin regulates Ca²⁺-dependent inactivation and facilitation of CaV2.1 Ca²⁺ channels through a direct interaction with the α 12.1 subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39766-39775.
- Cicala, C., Pompetti, F., & Carbone, M. (1993). SV40 induces mesotheliomas in hamsters. *The American journal of pathology*, 142(5), 1524.
- Clements, M., Berry, G., Shi, J., Ware, S., Yates, D., & Johnson, A. (2007). Projected mesothelioma incidence in men in New South Wales. *Occupational and environmental medicine*, 64(11), 747-752.
- Committee, B. T. S. S. o. C. (2007). BTS statement on malignant mesothelioma in the UK, 2007. *Thorax*, 62(Suppl 2), ii1.
- Cotecchia, S., Fanelli, F., & Costa, T. (2003). Constitutively active G protein-coupled receptor mutants: implications on receptor function and drug action. *Assay and drug development technologies*, 1(2), 311-316.
- Cutrone, R., Lednicky, J., Dunn, G., Rizzo, P., Bocchetta, M., Chumakov, K., . . . Carbone, M. (2005). Some oral poliovirus vaccines were contaminated with infectious SV40 after 1961. *Cancer research*, 65(22), 10273-10279.
- Daniels, M., Goh, F., Wright, C. M., Sriram, K. B., Relan, V., Clarke, B. E., . . . Fong, K. M. (2012). Whole genome sequencing for lung cancer. *Journal of thoracic disease*, 4(2), 155.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Daum, J. R., Wren, J. D., Daniel, J. J., Sivakumar, S., McAvoy, J. N., Potapova, T. A., & Gorbsky, G. J. (2009). Ska3 is required for spindle checkpoint silencing and the maintenance of chromosome cohesion in mitosis. *Current Biology*, 19(17), 1467-1472.
- de Assis, L. V. M., Locatelli, J., & Isoldi, M. C. (2014). The role of key genes and pathways involved in the tumorigenesis of Malignant Mesothelioma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1845(2), 232-247.
- de Klerk, N., Alfonso, H., Olsen, N., Reid, A., Sleith, J., Palmer, L., . . . Musk, A. (2013). Familial aggregation of malignant mesothelioma in former workers and residents of Wittenoom, Western Australia. *International journal of cancer*, 132(6), 1423-1428.
- De Rienzo, A., Archer, M. A., Yeap, B. Y., Dao, N., Sciaranghella, D., Sideris, A. C., . . . Dal Cin, P. S. (2016). Gender-specific molecular and clinical features underlie malignant pleural mesothelioma. *Cancer research*, 76(2), 319-328.
- Destro, A., Ceresoli, G., Falleni, M., Zucali, P., Morengi, E., Bianchi, P., . . . Alloisio, M. (2006). EGFR overexpression in malignant pleural mesothelioma: an immunohistochemical and molecular study with clinico-pathological correlations. *Lung Cancer*, 51(2), 207-215.
- Donaldson, K., Murphy, F. A., Duffin, R., & Poland, C. A. (2010). Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 5.
- Dondi, D., Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M., Garattini, E., & Motta, M. (1994). Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on human androgen-independent prostate cancer cell line DU 145: evidence for an autocrine-inhibitory LHRH loop. *Cancer research*, 54(15), 4091-4095.
- Dong, L., Jensen, R. V., De Rienzo, A., Gordon, G. J., Xu, Y., Sugarbaker, D. J., & Bueno, R. (2009). Differentially expressed alternatively spliced genes in malignant pleural mesothelioma identified using massively parallel transcriptome sequencing. *BMC medical genetics*, 10(1), 149.
- Dorsam, R. T., & Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 7(2), 79.
- Driver, K. E., Song, H., Lesueur, F., Ahmed, S., Barbosa-Morais, N. L., Tyrer, J. P., . . . Dunning, A. M. (2008). Association of single-nucleotide polymorphisms in the cell cycle genes with breast cancer in the British population. *Carcinogenesis*, 29(2), 333-341.
- ECE, F., ERDAL, N., KOSKU, M., & GÜNGÖR, G. İnterferonun malign mezotelyoma olgularında sağkalıma etkisi.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, 17(6), 1471-1474.
- Eletr, Z. M., & Wilkinson, K. D. (2011). An emerging model for BAP1's role in regulating cell cycle progression. *Cell biochemistry and biophysics*, 60(1-2), 3.
- Emons, G., Ortmann, O., Schulz, K.-D., & Schally, A. V. (1997). Growth-inhibitory actions of analogues of luteinizing hormone releasing hormone on tumor cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 8(9), 355-362.
- Eurasian, P. MALIGN PLEVRAL MEZOTELYOMA TÜRKİYE STANDARTLAR REHBERİ.
- Faux, S. P., Houghton, C. E., Hubbard, A., & Patrick, G. (2000). Increased expression of epidermal growth factor receptor in rat pleural mesothelial cells correlates with carcinogenicity of mineral fibres. *Carcinogenesis*, 21(12), 2275-2280.
- Fazzo, L., De Santis, M., Minelli, G., Bruno, C., Zona, A., Marinaccio, A., . . . Comba, P. (2012). Pleural mesothelioma mortality and asbestos exposure mapping in Italy. *American journal of industrial medicine*, 55(1), 11-24.
- Fekete, M., Redding, T. W., Comaru-Schally, A. M., Pontes, J. E., Connelly, R. W., Srkalovic, G., & Schally, A. V. (1989). Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, prolactin, and epidermal growth factor in rat and human prostate cancers and in benign prostate hyperplasia. *The Prostate*, 14(3), 191-208.
- Fekete, M., Wittliff, J. L., & Schally, A. V. (1989). Characteristics and distribution of receptors for [d-trp6]-luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *Journal of clinical laboratory analysis*, 3(3), 137-147.
- Fennell, D. A., Sharkey, A. J., & Busacca, S. (2016). Genetics of Malignant Pleural Mesothelioma. *Malignant Pleural Mesothelioma: Present Status and Future Directions*, 155.
- Fidaner, C., Eser, S., & Parkin, D. (2001). Incidence in Izmir in 1993–1994: first results from Izmir Cancer Registry. *European journal of cancer*, 37(1), 83-92.
- Field, R. W., & Withers, B. L. (2012). Occupational and environmental causes of lung cancer. *Clinics in chest medicine*, 33(4), 681-703.
- Flores, R. M., Akhurst, T., Gonen, M., Larson, S. M., & Rusch, V. W. (2003). Positron emission tomography defines metastatic disease but not locoregional disease in patients with malignant pleural mesothelioma. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 126(1), 11-15.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Fox, S. A., Richards, A. K., Kusumah, I., Perumal, V., Bolitho, E. M., Mutsaers, S. E., & Dharmarajan, A. M. (2013). Expression profile and function of Wnt signaling mechanisms in malignant mesothelioma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 440(1), 82-87.
- Freissmuth, M., Waldhoer, M., Bofill-Cardona, E., & Nanoff, C. (1999). G protein antagonists. *Trends in pharmacological sciences*, 20(6), 237-245.
- Frizelle, S. P., Kratzke, M. G., Carreon, R. R., Engel, S. C., Youngquist, L., Klein, M. A., . . . Kratzke, R. A. (2008). Inhibition of both mesothelioma cell growth and Cdk4 activity following treatment with a TATp16INK4a peptide. *Anticancer research*, 28(1A), 1-7.
- Galffy, G., Mohammed, K. A., Nasreen, N., Ward, M. J., & Antony, V. B. (1999). Inhibition of interleukin-8 reduces human malignant pleural mesothelioma propagation in nude mouse model. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 11(4), 187-194.
- Gazdar, A. F., Butel, J. S., & Carbone, M. (2002). SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nature Reviews Cancer*, 2(12), 957-964.
- Greenman, C. D., Pleasance, E. D., Newman, S., Yang, F., Fu, B., Nik-Zainal, S., . . . Edwards, P. A. (2012). Estimation of rearrangement phylogeny for cancer genomes. *Genome research*, 22(2), 346-361.
- Grim, J., D'Amico, A., Frizelle, S., Zhou, J., Kratzke, R. A., & Curiel, D. T. (1997). Adenovirus-mediated delivery of p16 to p16-deficient human bladder cancer cells confers chemoresistance to cisplatin and paclitaxel. *Clinical cancer research*, 3(12), 2415-2423.
- Gründker, C., & Emons, G. (2017). The Role of Gonadotropin-Releasing Hormone in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Frontiers in Endocrinology*, 8.
- Gründker, C., Föst, C., Fister, S., Nolte, N., Günthert, A. R., & Emons, G. (2010). Gonadotropin-releasing hormone type II antagonist induces apoptosis in MCF-7 and triple-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast cancer research*, 12(4), R49.
- Gründker, C., Nia, A. H., & Emons, G. (2005). Gonadotropin-releasing hormone receptor-targeted gene therapy of gynecologic cancers. *Molecular cancer therapeutics*, 4(2), 225-232.
- Guo, G., Chmielecki, J., Goparaju, C., Heguy, A., Dolgalev, I., Carbone, M., . . . Pass, H. I. (2015). Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma. *Cancer research*, 75(2), 264-269.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Halmos, G., Arencibia, J. M., Schally, A. V., Davis, R., & Bostwick, D. G. (2000). High incidence of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH receptor gene expression in human prostate cancers. *The Journal of urology*, 163(2), 623-629.
- Hansen, J., De Klerk, N. H., Eccles, J. L., William Musk, A., & Hobbs, M. S. (1993). Malignant mesothelioma after environmental exposure to blue asbestos. *International journal of cancer*, 54(4), 578-581.
- Hasanoglu, H. C., Yildirim, Z., Ermis, H., Kilic, T., & Koksai, N. (2006). Lung cancer and mesothelioma in towns with environmental exposure to asbestos in Eastern Anatolia. *International archives of occupational and environmental health*, 79(1), 89-91.
- Heffner, J. E., & Klein, J. S. (2008). *Recent advances in the diagnosis and management of malignant pleural effusions*. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.
- Heintz, N. H., Janssen-Heininger, Y. M., & Mossman, B. T. (2010). Asbestos, lung cancers, and mesotheliomas: from molecular approaches to targeting tumor survival pathways. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 42(2), 133-139.
- Hillerdal, G. (1999). Mesothelioma: cases associated with non-occupational and low dose exposures. *Occupational and environmental medicine*, 56(8), 505-513.
- Hilliard, A., Lovett, J., & McGavin, C. (2003). The rise and fall in incidence of malignant mesothelioma from a British Naval Dockyard, 1979–1999. *Occupational Medicine*, 53(3), 209-212.
- Hirvonen, A., Mattson, K., Karjalainen, A., Ollikainen, T., Tammilehto, L., Hovi, T., . . . Carbone, M. (1999). Simian virus 40 (SV40)-like DNA sequences not detectable in Finnish mesothelioma patients not exposed to SV40-contaminated polio vaccines. *Molecular carcinogenesis*, 26(2), 93-99.
- Hodgson, J., McElvenny, D., Darnton, A., Price, M., & Peto, J. (2005). The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *British journal of cancer*, 92(3), 587-593.
- Hodgson, J. T., & Darnton, A. (2000). The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Annals of occupational hygiene*, 44(8), 565-601.
- Holland, A. J., & Cleveland, D. W. (2012). Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nature medicine*, 18(11), 1630-1638.
- Huncharek, M. (1992). Changing risk groups for malignant mesothelioma. *Cancer*, 69(11), 2704-2711.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Husain, A. N., Colby, T. V., Ordóñez, N. G., Krausz, T., Borczuk, A., Cagle, P. T., . . . Gibbs, A. R. (2009). Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 133(8), 1317-1331.
- Hyland, R. A., Ware, S., Johnson, A. R., & Yates, D. H. (2007). Incidence trends and gender differences in malignant mesothelioma in New South Wales, Australia. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 286-292.
- Iacono, M. L., Monica, V., Righi, L., Grosso, F., Libener, R., Vatrano, S., . . . Volante, M. (2015). Targeted next-generation sequencing of cancer genes in advanced stage malignant pleural mesothelioma: a retrospective study. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(3), 492-499.
- Ikeda, K., Saeki, Y., Gonzalez-Agosti, C., Ramesh, V., & Chiocca, E. A. (1999). Inhibition of NF2-negative and NF2-positive primary human meningioma cell proliferation by overexpression of merlin due to vector-mediated gene transfer. *Journal of neurosurgery*, 91(1), 85-92.
- Ikuta, K., Yano, S., Hanibuchi, M., Goto, H., Li, Q., Wang, W., . . . Uehara, H. (2009). E7080, a multi-tyrosine kinase inhibitor, suppresses the progression of malignant pleural mesothelioma with different proangiogenic cytokine production profiles. *Clinical cancer research*, 15(23), 7229-7237.
- Ilyas, M. (2005). Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *The Journal of pathology*, 205(2), 130-144.
- Isik, R., Metintas, M., Gibbs, A., Metintas, S., Jasani, B., Öner, Ü., . . . İşiksoy, S. (2001). p53, p21 and metallothionein immunoreactivities in patients with malignant pleural mesothelioma: correlations with the epidemiological features and prognosis of mesotheliomas with environmental asbestos exposure. *Respiratory medicine*, 95(7), 588-593.
- Ismail-Khan, R., Robinson, L. A., Williams, C. C., Garrett, C. R., Bepler, G., & Simon, G. R. (2006). Malignant pleural mesothelioma: a comprehensive review. *Cancer control*, 13(4), 255.
- Jagadeeswaran, R., Ma, P. C., Seiwert, T. Y., Jagadeeswaran, S., Zumba, O., Nallasura, V., . . . Puntoni, R. (2006). Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma. *Cancer research*, 66(1), 352-361.
- Jakobsen, J. N., & Sørensen, J. B. (2011). Review on clinical trials of targeted treatments in malignant mesothelioma. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68(1), 1-15.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Jassem, J., Ramlau, R., Santoro, A., Schuette, W., Chemaissani, A., Hong, S., . . . Manegold, C. (2008). Phase III trial of pemetrexed plus best supportive care compared with best supportive care in previously treated patients with advanced malignant pleural mesothelioma. *Journal of Clinical Oncology*, 26(10), 1698-1704.
- Jean, D., Thomas, E., Manié, E., Renier, A., De Reynies, A., Lecomte, C., . . . Giovannini, M. (2011). Syntenic relationships between genomic profiles of fiber-induced murine and human malignant mesothelioma. *The American journal of pathology*, 178(2), 881-894.
- Jiao, X., Hooper, S. D., Djureinovic, T., Larsson, C., Wärnberg, F., Tellgren-Roth, C., . . . Sjöblom, T. (2013). Gene rearrangements in hormone receptor negative breast cancers revealed by mate pair sequencing. *BMC genomics*, 14(1), 165.
- Jin, H., Sperka, T., Herrlich, P., & Morrison, H. (2006). Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature*, 442(7102), 576-579.
- Jongsma, J., van Montfort, E., Vooijs, M., Zevenhoven, J., Krimpenfort, P., van der Valk, M., . . . Berns, A. (2008). A conditional mouse model for malignant mesothelioma. *Cancer cell*, 13(3), 261-271.
- Kanarek, M. S. (2011). Mesothelioma from chrysotile asbestos: update. *Annals of epidemiology*, 21(9), 688-697.
- Kanchi, K. L., Johnson, K. J., Lu, C., McLellan, M. D., Leiserson, M. D., Wendl, M. C., . . . Kandoth, C. (2014). Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nature communications*, 5, 3156.
- Katirtzoglou, N., Gkiozos, I., Makrilia, N., Tsaroucha, E., Rapti, A., Stratakos, G., . . . Syrigos, K. N. (2010). Carboplatin plus pemetrexed as first-line treatment of patients with malignant pleural mesothelioma: a phase II study. *Clinical lung cancer*, 11(1), 30-35.
- Kivipensas, P., Björkqvist, A.-M., Karhu, R., Pelin, K., Linnainmaa, K., Tammilehto, L., . . . Knuutila, S. (1996). Gains and losses of DNA sequences in malignant mesothelioma by comparative genomic hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics*, 89(1), 7-13.
- Kleymenova, E. V., Bianchi, A. A., Kley, N., Pylev, L. N., & Walker, C. L. (1997). Characterization of the rat neurofibromatosis 2 gene and its involvement in asbestos-induced mesothelioma. *Molecular carcinogenesis*, 18(1), 54-60.
- Klijn, C., Durinck, S., Stawiski, E. W., Haverty, P. M., Jiang, Z., Liu, H., . . . Liu, J. (2015). A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nature biotechnology*, 33(3), 306-312.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Knuutila, S., Armengol, G., Björkqvist, A.-M., El-Rifai, W. e., Larramendy, M. L., Monni, O., & Szymanska, J. (1998). Comparative genomic hybridization study on pooled DNAs from tumors of one clinical-pathological entity. *Cancer genetics and cytogenetics*, *100*(1), 25-30.
- Knuutila, A., Jee, K. J., Taskinen, E., Wolff, H., Knuutila, S., & Anttila, S. (2006). Spindle cell tumours of the pleura: a clinical, histological and comparative genomic hybridization analysis of 14 cases. *Virchows Archiv*, *448*(2), 135-141.
- Kok, K., Naylor, S. L., & Buys, C. H. (1997). Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Advances in cancer research*, *71*, 27-92.
- Komisyonu, Ö. İ. İMALAT SANAYİNDE DÖNÜŞÜM.
- Kratzke, R. A., Otterson, G. A., Lincoln, C. E., Ewing, S., Oie, H., Geradts, J., & Kaye, F. J. (1995). Immunohistochemical analysis of the p16INK4 cyclin-dependent kinase inhibitor in malignant mesothelioma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *87*(24), 1870-1875.
- Krismann, M., Müller, K. M., Jaworska, M., & Johnen, G. (2002). Molecular cytogenetic differences between histological subtypes of malignant mesotheliomas: DNA cytometry and comparative genomic hybridization of 90 cases. *The Journal of pathology*, *197*(3), 363-371.
- Kroczyńska, B., Cutrone, R., Bocchetta, M., Yang, H., Elmishad, A. G., Vacek, P., . . . Carbone, M. (2006). Crocidolite asbestos and SV40 are cocarcinogens in human mesothelial cells and in causing mesothelioma in hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(38), 14128-14133.
- Kwak, E. L., Bang, Y.-J., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Solomon, B., Maki, R. G., . . . Costa, D. B. (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, *363*(18), 1693-1703.
- Lai, J., Zhou, Z., Tang, X.-J., Gao, Z.-B., Zhou, J., & Chen, S.-Q. (2016). A tumor-specific neo-antigen caused by a frameshift mutation in BAP1 is a potential personalized biomarker in malignant peritoneal mesothelioma. *International journal of molecular sciences*, *17*(5), 739.
- Lecomte, C., Andujar, P., Renier, A., Kheuang, L., Abramowski, V., Mellotte, L., . . . Jaurand, M.-C. (2005). Similar tumor suppressor gene alteration profiles in asbestos-induced murine and human mesothelioma. *Cell cycle*, *4*(12), 1862-1869.
- Leigh, J., Davidson, P., Hendrie, L., & Berry, D. (2002). Malignant mesothelioma in Australia, 1945-2000. *American journal of industrial medicine*, *41*(3), 188-201.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Lieu, C., Heymach, J., Overman, M., Tran, H., & Kopetz, S. (2011). Beyond VEGF: inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis. *Clinical cancer research*, 17(19), 6130-6139.
- Light, R. W., & Lee, Y. G. (2008). *Textbook of Pleural Diseases Second Edition*: CRC Press.
- Limonta, P., Dondi, D., Moretti, R. M., Maggi, R., & Motta, M. (1992). Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(1), 207-212.
- Lindholm, P., Salmenkivi, K., Vauhkonen, H., Nicholson, A., Anttila, S., Kinnula, V., & Knuutila, S. (2007). Gene copy number analysis in malignant pleural mesothelioma using oligonucleotide array CGH. *Cytogenetic and genome research*, 119(1-2), 46-52.
- López-Ríos, F., Illei, P. B., Rusch, V., & Ladanyi, M. (2004). Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *The Lancet*, 364(9440), 1157-1166.
- Lundstrom, K. (2006). Latest development in drug discovery on G protein-coupled receptors. *Current Protein and Peptide Science*, 7(5), 465-470.
- Mansfield, A. S., Roden, A. C., Peikert, T., Sheinin, Y. M., Harrington, S. M., Krco, C. J., . . . Kwon, E. D. (2014). B7-H1 expression in malignant pleural mesothelioma is associated with sarcomatoid histology and poor prognosis. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(7), 1036-1040.
- Marinaccio, A., Binazzi, A., Cauzillo, G., Cavone, D., De Zotti, R., Ferrante, P., . . . Mensi, C. (2007). Analysis of latency time and its determinants in asbestos related malignant mesothelioma cases of the Italian register. *European journal of cancer*, 43(18), 2722-2728.
- Marinaccio, A., Montanaro, F., Mastrantonio, M., Uccelli, R., Altavista, P., Nesti, M., . . . Gorini, G. (2005). Predictions of mortality from pleural mesothelioma in Italy: A model based on asbestos consumption figures supports results from age-period-cohort models. *International journal of cancer*, 115(1), 142-147.
- Mark, E. J., & Yokoi, T. (1991). Absence of evidence for a significant background incidence of diffuse malignant mesothelioma apart from asbestos exposure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 643(1), 196-204.
- Matsumoto, S., Nabeshima, K., Kamei, T., Hiroshima, K., Kawahara, K., Hata, S., . . . Tsujimura, T. (2013). Morphology of 9p21 homozygous deletion-positive pleural mesothelioma cells analyzed using fluorescence in situ hybridization and virtual microscope system in effusion cytology. *Cancer cytopathology*, 121(8), 415-422.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Mavaddat, N., Dunning, A. M., Ponder, B. A., Easton, D. F., & Pharoah, P. D. (2009). Common genetic variation in candidate genes and susceptibility to subtypes of breast cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 18*(1), 255-259.
- Mazieres, J., You, L., He, B., Xu, Z., Twogood, S., Lee, A. Y., . . . Jablons, D. M. (2005). Wnt2 as a new therapeutic target in malignant pleural mesothelioma. *International journal of cancer, 117*(2), 326-332.
- McClatchey, A. I., & Giovannini, M. (2005). Membrane organization and tumorigenesis—the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes & development, 19*(19), 2265-2277.
- McDonald, C. (2008). *Epidemiology of work related diseases*: John Wiley & Sons.
- McDonald, J., & McDonald, A. (1996). The epidemiology of mesothelioma in historical context. *European Respiratory Journal, 9*(9), 1932-1942.
- McDonald, J. C. (2010). Epidemiology of malignant mesothelioma—an outline. *Annals of occupational hygiene, 54*(8), 851-857.
- McElvenny, D. M., Darnton, A. J., Price, M. J., & Hodgson, J. T. (2005). Mesothelioma mortality in Great Britain from 1968 to 2001. *Occupational Medicine, 55*(2), 79-87.
- McFarland, H., Dodge-Kafka, K., & Schmitt, J. (2014). CaM kinase activation and cancer cell growth are controlled by AKAP7 (613.4). *The FASEB Journal, 28*(1 Supplement), 613.614.
- Metintas, M., Hillerdal, G., Metintas, S., & Dumortier, P. (2010). Endemic malignant mesothelioma: exposure to erionite is more important than genetic factors. *Archives of environmental & occupational health, 65*(2), 86-93.
- Metintas, M., Ozdemir, N., Uçgun, I., Elbek, O., Kolsuz, M., Mutlu, S., & Metintas, S. (1999). Cisplatin, mitomycin, and interferon- α 2a combination chemoimmunotherapy in the treatment of diffuse malignant pleural mesothelioma. *CHEST Journal, 116*(2), 391-398.
- Metintas, S., Metintas, M., Uçgun, I., & Oner, U. (2002). Malignant mesothelioma due to environmental exposure to asbestos: follow-up of a Turkish cohort living in a rural area. *CHEST Journal, 122*(6), 2224-2229.
- Meyerson, M., Gabriel, S., & Getz, G. (2010). Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics, 11*(10), 685-696.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., & Thomas, P. D. (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature protocols, 8*(8), 1551-1566.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Middendorf, P., Zumwalde, R., Castellan, R., Harper, M., Wallace, W., Stayner, L., . . . Sullivan, P. (2011). Asbestos fibers and other elongate mineral particles: state of the science and roadmap for research. *NIOSH Current Intelligence Bulletin* 62.
- Milano, M. T., & Zhang, H. (2010). Malignant pleural mesothelioma: a population-based study of survival. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(11), 1841-1848.
- Montanaro, F., Rosato, R., Gangemi, M., Roberti, S., Ricceri, F., Merler, E., . . . Pascucci, C. (2009). Survival of pleural malignant mesothelioma in Italy: A population-based study. *International journal of cancer*, 124(1), 201-207.
- Morales, F. C., Molina, J. R., Hayashi, Y., & Georgescu, M.-M. (2010). Overexpression of ezrin inactivates NF2 tumor suppressor in glioblastoma. *Neuro-oncology*, 12(6), 528-539.
- Morgan, K., Meyer, C., Miller, N., Sims, A. H., Cagnan, I., Faratian, D., . . . Langdon, S. P. (2011). GnRH receptor activation competes at a low level with growth signaling in stably transfected human breast cell lines. *BMC cancer*, 11(1), 476.
- Mosor, M., Ziółkowska-Suchanek, I., Nowicka, K., Dzikiewicz-Krawczyk, A., Januszkiewicz-Lewandowska, D., & Nowak, J. (2013). Germline variants in MRE11/RAD50/NBN complex genes in childhood leukemia. *BMC cancer*, 13(1), 457.
- Mossman, B. T., Lippmann, M., Hesterberg, T. W., Kelsey, K. T., Barchowsky, A., & Bonner, J. C. (2011). Pulmonary endpoints (lung carcinomas and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 14(1-4), 76-121.
- Mott, F. E. (2012). Mesothelioma: a review. *The Ochsner Journal*, 12(1), 70-79.
- Munkholm, M., & Mortensen, J. (2014). Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clinical physiology and functional imaging*, 34(3), 171-177.
- Murayama, T., Takahashi, K., Natori, Y., & Kurumatani, N. (2006). Estimation of future mortality from pleural malignant mesothelioma in Japan based on an age-cohort model. *American journal of industrial medicine*, 49(1), 1-7.
- Murthy, S. S., & Testa, J. R. (1999). Asbestos, chromosomal deletions, and tumor suppressor gene alterations in human malignant mesothelioma. *Journal of cellular physiology*, 180(2), 150-157.
- Musti, M., Cavone, D., Aalto, Y., Scattone, A., Serio, G., & Knuutila, S. (2002). A cluster of familial malignant mesothelioma with del (9p) as the sole chromosomal anomaly. *Cancer genetics and cytogenetics*, 138(1), 73-76.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Myojin, T., Azuma, K., Okumura, J., & Uchiyama, I. (2012). Future trends of mesothelioma mortality in Japan based on a risk function. *Industrial health, 50*(3), 197-204.
- Nagai, H., Okazaki, Y., Chew, S. H., Misawa, N., Yamashita, Y., Akatsuka, S., . . . Yasui, H. (2011). Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 108*(49), E1330-E1338.
- Nasu, M., Emi, M., Pastorino, S., Tanji, M., Powers, A., Luk, H., . . . Kanodia, S. (2015). High incidence of somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology, 10*(4), 565-576.
- Nemoto, H., Tate, G., Kishimoto, K., Saito, M., Shirahata, A., Umemoto, T., . . . Kigawa, G. (2012). Heterozygous loss of NF2 is an early molecular alteration in well-differentiated papillary mesothelioma of the peritoneum. *Cancer genetics, 205*(11), 594-598.
- Neri, M., Ugolini, D., Dianzani, I., Gemignani, F., Landi, S., Cesario, A., . . . Bonassi, S. (2008). Genetic susceptibility to malignant pleural mesothelioma and other asbestos-associated diseases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 659*(1), 126-136.
- Nielsen, R., Paul, J. S., Albrechtsen, A., & Song, Y. S. (2011). Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics, 12*(6), 443-451.
- Nowak, A., Byrne, M., Williamson, R., Ryan, G., Segal, A., Fielding, D., . . . Robinson, B. (2002). A multicentre phase II study of cisplatin and gemcitabine for malignant mesothelioma. *British journal of cancer, 87*(5), 491-496.
- Nowak, D., Hofmann, W.-K., & Koeffler, H. P. (2009). Genome-wide mapping of copy number variations using SNP arrays. *Transfusion Medicine and Hemotherapy, 36*(4), 246-251.
- Okello, C., Treasure, T., Nicholson, A. G., Peto, J., & Møller, H. (2009). Certified causes of death in patients with mesothelioma in South East England. *BMC cancer, 9*(1), 28.
- Olsen, N. J., Franklin, P. J., Reid, A., de Klerk, N. H., Threlfall, T. J., Shilkin, K., & Musk, B. (2011). Increasing incidence of malignant mesothelioma after exposure to asbestos during home maintenance and renovation. *Med J Aust, 195*(5), 271-274.
- Ombretta, M., Elisa, B., Alfonso, C., Alessandra, B., Rudy, F., Luciano, M., . . . Stefano, L. (2013). Comparative Genomic Hybridization Studies on Mesothelioma Show a Parallel Fate of 1p21-1p22 and 9p21 Bands and a Chromosomally Stable Sub-Group. *American Journal of Medical and Biological Research, 1*(4), 149-158.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Ono, M. (2008). Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Science*, 99(8), 1501-1506.
- Organization, W. H. (2009). Elimination of asbestos-related diseases. Geneva: WHO, 2006.
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nature reviews Drug discovery*, 5(12), 993-996.
- Panagopoulos, I., Thorsen, J., Gorunova, L., Micci, F., Haugom, L., Davidson, B., & Heim, S. (2013). RNA sequencing identifies fusion of the EWSR1 and YY1 genes in mesothelioma with t (14; 22)(q32; q12). *Genes, Chromosomes and Cancer*, 52(8), 733-740.
- Panou, V., Vyberg, M., Weinreich, U., Meristoudis, C., Falkmer, U., & Røe, O. (2015). The established and future biomarkers of malignant pleural mesothelioma. *Cancer treatment reviews*, 41(6), 486-495.
- Park, F.-K., Takahashi, K., Hoshuyama, T., Cheng, T.-J., Delgermaa, V., Le, G. V., & Sorahan, T. (2011). Global magnitude of reported and unreported mesothelioma. *Environmental health perspectives*, 119(4), 514.
- Pass, H. I., Vogelzang, N., & Carbone, M. (2006). *Malignant Mesothelioma: Pathogenesis, Diagnosis, and Translational Therapies*: Springer Science & Business Media.
- Pass, H. I., Vogelzang, N., Hahn, S., & Carbone, M. (2004). Malignant pleural mesothelioma. *Current problems in cancer*, 28(3), 93-174.
- Patel, S. C., & Dowell, J. E. (2016). Modern management of malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 7, 63.
- Pelucchi, C., Malvezzi, M., La Vecchia, C., Levi, F., Decarli, A., & Negri, E. (2004). The Mesothelioma epidemic in Western Europe: an update. *British journal of cancer*, 90(5), 1022-1024.
- Peña-Llopis, S., Vega-Rubín-de-Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavía-Jiménez, A., Wang, S., . . . Spence, P. (2012). BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nature genetics*, 44(7), 751-759.
- Peto, J., Decarli, A., La Vecchia, C., Levi, F., & Negri, E. (1999). The European mesothelioma epidemic. *British journal of cancer*, 79(3-4), 666.
- Piris, A., Mihm, M. C., & Hoang, M. P. (2015). BAP1 and BRAFV600E expression in benign and malignant melanocytic proliferations. *Human pathology*, 46(2), 239-245.
- Popova, T., Boeva, V., Manié, E., Rozenholc, Y., Barillot, E., & Stern, M.-H. (2013). Analysis of somatic alterations in cancer genome: from SNP arrays to next generation sequencing.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Poulidakos, P., Xiao, G., Gallagher, R., Jablonski, S., Jhanwar, S., & Testa, J. (2006). Re-expression of the tumor suppressor NF2/merlin inhibits invasiveness in mesothelioma cells and negatively regulates FAK. *Oncogene*, 25(44), 5960.
- Price, B., & Ware, A. (2004). Mesothelioma trends in the United States: an update based on Surveillance, Epidemiology, and End Results Program data for 1973 through 2003. *American Journal of Epidemiology*, 159(2), 107-112.
- Price, B., & Ware, A. (2009). Time trend of mesothelioma incidence in the United States and projection of future cases: an update based on SEER data for 1973 through 2005. *Critical reviews in toxicology*, 39(7), 576-588.
- Pylkkanen, L., Sainio, M., Ollikainen, T., Mattson, K., Nordling, S., Carpen, O., . . . Husgafvel-Pursiainen, K. (2002). Concurrent LOH at multiple loci in human malignant mesothelioma with preferential loss of NF2 gene region. *Oncology reports*, 9(5), 955-959.
- Qayum, A., Gullick, W., Clayton, R., Sikora, K., & Waxman, J. (1990). The effects of gonadotrophin releasing hormone analogues in prostate cancer are mediated through specific tumour receptors. *British journal of cancer*, 62(1), 96.
- Redding, T., & Schally, A. (1981). Inhibition of prostate tumor growth in two rat models by chronic administration of D-Trp6 analogue of luteinizing hormone-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6509-6512.
- Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A., & Vacca, A. (2007). The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*, 21(1), 44.
- Robinson, B. M. (2012). Malignant pleural mesothelioma: an epidemiological perspective. *Annals of cardiothoracic surgery*, 1(4), 491-496.
- Robinson, B. W., & Lake, R. A. (2005). Advances in malignant mesothelioma. *New England Journal of Medicine*, 353(15), 1591-1603.
- Rode, A., Maass, K. K., Willmund, K. V., Lichter, P., & Ernst, A. (2016). Chromothripsis in cancer cells: an update. *International journal of cancer*, 138(10), 2322-2333.
- Røe, O. D., Anderssen, E., Sandeck, H., Christensen, T., Larsson, E., & Lundgren, S. (2010). Malignant pleural mesothelioma: genome-wide expression patterns reflecting general resistance mechanisms and a proposal of novel targets. *Lung Cancer*, 67(1), 57-68.
- Rogers, D. F. (2007). Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respiratory care*, 52(9), 1134-1149.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Roushdy-Hammady, I., Siegel, J., Emri, S., Testa, J. R., & Carbone, M. (2001). Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey. *The Lancet*, 357(9254), 444-445.
- Ryman-Rasmussen, J. P., Cesta, M. F., Brody, A. R., Shipley-Phillips, J. K., Everitt, J. I., Tewksbury, E. W., . . . Andersen, M. E. (2009). Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nature nanotechnology*, 4(11), 747-751.
- Sahin, U., Ozturk, O., Songur, N., Bircan, A., & Akkaya, A. (2009). Observations on environmental asbestos exposure in a high risk area. *Respirology*, 14(4), 579-582.
- Samarajiwa, S. A., Wilson, W., & Hertzog, P. J. (2006). Type I interferons: genetics and structure. *The Interferons: Characterization and Application*.
- Santoro, A., O'brien, M. E., Stahel, R. A., Nackaerts, K., Baas, P., Karthaus, M., . . . Liu, Y. (2008). Pemetrexed plus cisplatin or pemetrexed plus carboplatin for chemo-naïve patients with malignant pleural mesothelioma: results of the International Expanded Access Program. *Journal of Thoracic Oncology*, 3(7), 756-763.
- Schipper, H., Papp, T., Johnen, G., Pemsel, H., Bastrop, R., Müller, K.-M., . . . Schiffmann, D. (2003). Mutational analysis of the nf2 tumour suppressor gene in three subtypes of primary human malignant mesotheliomas. *International journal of oncology*, 22(5), 1009-1017.
- Schmidt, S., Weidemann, H., Müller, K., Krismann, M., Langrehr, J., & Neuhaus, P. (2002). Low malignant epithelioid peritoneal mesothelioma: successful treatment with surgical therapy alone. *Hepato-gastroenterology*, 49(44), 366-370.
- Schrider, D. R., Navarro, F. C., Galante, P. A., Parmigiani, R. B., Camargo, A. A., Hahn, M. W., & de Souza, S. J. (2013). Gene copy-number polymorphism caused by retrotransposition in humans. *PLoS genetics*, 9(1), e1003242.
- Sedgley, K. R., Finch, A. R., Caunt, C. J., & McArdle, C. A. (2006). Intracellular gonadotropin-releasing hormone receptors in breast cancer and gonadotrope lineage cells. *Journal of endocrinology*, 191(3), 625-636.
- Sekido, Y. (2013). Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*, bgt166.
- Sekido, Y., Pass, H. I., Bader, S., Mew, D. J., Christman, M. F., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (1995). Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer research*, 55(6), 1227-1231.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Senyigit, A., Dalgic, A., Kavak, O., & Tanrikulu, A. C. (2004). Determination of environmental exposure to asbestos (tremolite) and mesothelioma risks in the southeastern region of Turkey. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 59(12), 658-662.
- Shaw, A. T., Kim, D.-W., Nakagawa, K., Seto, T., Crinó, L., Ahn, M.-J., . . . Blackhall, F. (2013). Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(25), 2385-2394.
- Sherry, S. T., Ward, M.-H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, 29(1), 308-311.
- Shivapurkar, N., Virmani, A. K., Wistuba, I. I., Milchgrub, S., Mackay, B., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (1999). Deletions of chromosome 4 at multiple sites are frequent in malignant mesothelioma and small cell lung carcinoma. *Clinical cancer research*, 5(1), 17-23.
- So, W. K., Cheng, J. C., Poon, S. L., & Leung, P. C. (2008). Gonadotropin-releasing hormone and ovarian cancer: a functional and mechanistic overview. *The FEBS journal*, 275(22), 5496-5511.
- Song, H., Hogdall, E., Ramus, S. J., DiCioccio, R. A., Hogdall, C., Quaye, L., . . . Greenberg, D. (2008). Effects of common germ-line genetic variation in cell cycle genes on ovarian cancer survival. *Clinical cancer research*, 14(4), 1090-1095.
- Stebbing, J., Powles, T., McPherson, K., Shamash, J., Wells, P., Sheaff, M. T., . . . Steele, J. P. (2009). The efficacy and safety of weekly vinorelbine in relapsed malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*, 63(1), 94-97.
- Stelzer, G., Plaschkes, I., Oz-Levi, D., Alkelai, A., Olender, T., Zimmerman, S., . . . Nudel, R. (2016). VarElect: the phenotype-based variation prioritizer of the GeneCards Suite. *BMC genomics*, 17(2), 444.
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., . . . Mazon, Y. (2016). The genecards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Current protocols in bioinformatics*, 1.30. 31-31.30. 33.
- Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., Mudie, L. J., . . . Stebbings, L. A. (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *cell*, 144(1), 27-40.
- Strauchen, J. A. (2011). Rarity of malignant mesothelioma prior to the widespread commercial introduction of asbestos: The Mount Sinai autopsy experience 1883–1910. *American journal of industrial medicine*, 54(6), 467-469.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Sviridonov, L., Dobkin-Bekman, M., Shterntal, B., Przeddecki, F., Formishell, L., Kravchook, S., . . . Yao, Z. (2013). Differential signaling of the GnRH receptor in pituitary gonadotrope cell lines and prostate cancer cell lines. *Molecular and cellular endocrinology*, 369(1), 107-118.
- Şenyiğit, A., Babayiğit, C., Gökirmak, M., Topcu, F., Asan, E., Coşkunsel, M., . . . Ertem, M. (2000). Incidence of malignant pleural mesothelioma due to environmental asbestos fiber exposure in the southeast of Turkey. *Respiration*, 67(6), 610-614.
- Taguchi, T., Jhanwar, S. C., Siegfried, J. M., Keller, S. M., & Testa, J. R. (1993). Recurrent deletions of specific chromosomal sites in 1p, 3p, 6q, and 9p in human malignant mesothelioma. *Cancer research*, 53(18), 4349-4355.
- Takeda, M., Kasai, T., Enomoto, Y., Takano, M., Morita, K., Kadota, E., . . . Nonomura, A. (2012). Genomic gains and losses in malignant mesothelioma demonstrated by FISH analysis of paraffin-embedded tissues. *Journal of clinical pathology*, 65(1), 77-82.
- Takeuchi, K., Soda, M., Togashi, Y., Suzuki, R., Sakata, S., Hatano, S., . . . Uehara, H. (2012). RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nature medicine*, 18(3), 378-381.
- Taniguchi, T., Karnan, S., Fukui, T., Yokoyama, T., Tagawa, H., Yokoi, K., . . . Hida, T. (2007). Genomic profiling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization shows frequent non-random chromosomal alteration regions including JUN amplification on 1p32. *Cancer Science*, 98(3), 438-446.
- Testa, J., Pass, H., & Carbone, M. (2001). Molecular biology of mesothelioma. *Principles and practice of oncology*, 1937-1943.
- Testa, J. R., Cheung, M., Pei, J., Below, J. E., Tan, Y., Sementino, E., . . . Trusa, S. (2011). Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nature genetics*, 43(10), 1022-1025.
- Theis, M., Slabicki, M., Junqueira, M., Paszkowski-Rogacz, M., Sontheimer, J., Kittler, R., . . . Poser, I. (2009). Comparative profiling identifies C13orf3 as a component of the Ska complex required for mammalian cell division. *The EMBO Journal*, 28(10), 1453-1465.
- Tibiletti, M. G., Bernasconi, B., Furlan, D., Riva, C., Trubia, M., Buraggi, G., . . . Frigerio, L. (1996). Early involvement of 6q in surface epithelial ovarian tumors. *Cancer research*, 56(19), 4493-4498.
- Toftgård, R. (2009). Two sides to cilia in cancer. *Nature medicine*, 15(9), 994-996.
- Toumpanakis, D., & Theocharis, S. E. (2011). DNA repair systems in malignant mesothelioma. *Cancer letters*, 312(2), 143-149.
- Toyokuni, S. (2009). Mechanisms of asbestos-induced carcinogenesis.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Trubicka, J., Žemojtel, T., Hecht, J., Falana, K., Piekutowska-Abramczuk, D., Płoski, R., . . . Ciara, E. (2017). The germline variants in DNA repair genes in pediatric medulloblastoma: a challenge for current therapeutic strategies. *BMC cancer*, *17*(1), 239.
- Tsao, A. S., Wistuba, I., Roth, J. A., & Kindler, H. L. (2009). Malignant pleural mesothelioma. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(12), 2081-2090.
- Uematsu, K., Kanazawa, S., You, L., He, B., Xu, Z., Li, K., . . . Jablons, D. M. (2003). Wnt pathway activation in mesothelioma. *Cancer research*, *63*(15), 4547-4551.
- Ugolini, D., Neri, M., Ceppi, M., Cesario, A., Dianzani, I., Filiberti, R., . . . Mutti, L. (2008). Genetic susceptibility to malignant mesothelioma and exposure to asbestos: the influence of the familial factor. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *658*(3), 162-171.
- Ulvestad, B., Kjærheim, K., Martinsen, J. I., Damberg, G., Wannag, A., Mowe, G., & Andersen, A. (2002). Cancer incidence among workers in the asbestos-cement producing industry in Norway. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 411-417.
- Ulvestad, B., Kjærheim, K., Martinsen, J. I., Mowe, G., & Andersen, A. (2004). Cancer incidence among members of the Norwegian trade union of insulation workers. *Journal of occupational and environmental medicine*, *46*(1), 84-89.
- Upham, J., Musk, A., Hazel, G., Byrne, M., & Robinson, B. (1993). Interferon alpha and doxorubicin in malignant mesothelioma: a phase II study. *Internal Medicine Journal*, *23*(6), 683-687.
- Vaishnavi, A., Capelletti, M., Le, A. T., Kako, S., Butaney, M., Ercan, D., . . . Pilling, A. B. (2013). Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nature medicine*, *19*(11), 1469-1472.
- Van Haarst, J., Baas, P., h Manegold, C., Schouwink, J., Burgers, J., De Bruin, H., . . . Van Meerbeeck, J. (2002). Multicentre phase II study of gemcitabine and cisplatin in malignant pleural mesothelioma. *British journal of cancer*, *86*(3), 342-345.
- Virta, R. L. (2006). *Worldwide asbestos supply and consumption trends from 1900 through 2003*: US Geological Survey Reston, VA.
- Vogelzang, N. J., Rusthoven, J. J., Symanowski, J., Denham, C., Kaukel, E., Ruffie, P., . . . Manegold, C. (2003). Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *Journal of Clinical Oncology*, *21*(14), 2636-2644.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Völker, P., Gründker, C., Schmidt, O., Schulz, K.-D., & Emons, G. (2002). Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *American journal of obstetrics and gynecology*, *186*(2), 171-179.
- Wadt, K. A. W., Aoude, L., Johansson, P., Solinas, A., Pritchard, A., Crainic, O., . . . Sunde, L. (2015). A recurrent germline BAP1 mutation and extension of the BAP1 tumor predisposition spectrum to include basal cell carcinoma. *Clinical genetics*, *88*(3), 267-272.
- Wagner, J., Sleggs, C., & Marchand, P. (1960). Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *British journal of industrial medicine*, *17*(4), 260-271.
- Wang, S. S., Cozen, W., Severson, R. K., Hartge, P., Cerhan, J. R., Davis, S., . . . Chanock, S. J. (2006). Cyclin D1 splice variant and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Human genetics*, *120*(2), 297-300.
- Wiesner, T., Obenauf, A. C., Murali, R., Fried, I., Griewank, K. G., Ulz, P., . . . Wolf, I. (2011). Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nature genetics*, *43*(10), 1018-1021.
- Wu, X., Gu, J., Grossman, H. B., Amos, C. I., Etzel, C., Huang, M., . . . Dinney, C. P. (2006). Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes. *The American Journal of Human Genetics*, *78*(3), 464-479.
- Xiao, G.-H., Gallagher, R., Shetler, J., Skele, K., Altomare, D. A., Pestell, R. G., . . . Testa, J. R. (2005). The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, inhibits cell proliferation and cell cycle progression by repressing cyclin D1 expression. *Molecular and cellular biology*, *25*(6), 2384-2394.
- Yamamoto, Y., Miyamoto, M., Tatsuda, D., Kubo, M., Nakagama, H., Nakamura, Y., . . . Ohta, T. (2014). A rare polymorphic variant of NBS1 reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability. *Cancer research*, *74*(14), 3707-3715.
- Yang, H., Bocchetta, M., Kroczyńska, B., Elmishad, A. G., Chen, Y., Liu, Z., . . . Testa, J. R. (2006). TNF- α inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- κ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(27), 10397-10402.
- Yang, H., Rivera, Z., Jube, S., Nasu, M., Bertino, P., Goparaju, C., . . . Pass, H. I. (2010). Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(28), 12611-12616.

KAYNAKLAR (DEVAM EDİYOR)

- Yang, H., Testa, J. R., & Carbone, M. (2008). Mesothelioma epidemiology, carcinogenesis, and pathogenesis. *Current treatment options in oncology*, 9(2), 147-157.
- Yarborough, C. M. (2006). Chrysotile as a cause of mesothelioma: an assessment based on epidemiology. *Critical reviews in toxicology*, 36(2), 165-187.
- Yates, L. R., & Campbell, P. J. (2012). Evolution of the cancer genome. *Nature reviews. Genetics*, 13(11), 795.
- Yaziji, H., Battifora, H., Barry, T. S., Hwang, H. C., Bacchi, C. E., McIntosh, M. W., . . . Gown, A. M. (2006). Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity. *Modern Pathology*, 19(4), 514-523.
- Yoshikawa, Y., Sato, A., Tsujimura, T., Emi, M., Morinaga, T., Fukuoka, K., . . . Matsumoto, S. (2012). Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Science*, 103(5), 868-874.
- Zhang, T., Lv, L., Huang, Y., Ren, X., & Shi, Q. (2017). Chromosome nondisjunction during bipolar mitoses of binucleated intermediates promote aneuploidy formation along with multipolar mitoses rather than chromosome loss in micronuclei induced by asbestos. *Oncotarget*, 8(7), 11030.
- Zhang, Z.-H., Yang, L.-S., Huang, F., Hao, J.-H., Su, P.-Y., & Sun, Y.-H. (2012). Current evidence on the relationship between two polymorphisms in the NBS1 gene and breast cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(11), 5375-5379.

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Tunç Tuncel
Doğum tarihi ve yeri : 05.12.1983
Uyruğu :Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu :Evli
İletişim adresleri :Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp
Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Eskişehir/TÜRKİYE

Eğitim Durumu

İlk Öğrenim: Hamdullah Suphi İlköğretim Okulu: 1990-1995
Orta Öğrenim: Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi: 1995-1999
Lise Öğrenim: Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi: 1999-2002
Üniversite: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat
Fakültesi Biyoloji: 2003-2007.
Y.Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Genetik Anabilim Dalı: 2007-2010.
Doktora: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyoloji Anabilim Dalı (Bitiş:18.01.2018).

Mesleki Deneyim : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı- Araştırma Görevlisi (1 Şubat 2011-2
Şubat 2018)

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: Tıbbi Biyoloji Ve Genetik
Derneği.

Yayımlar:

1) Özdemir M, Saydam F, Kurt E, Değirmenci İ, Tuncel T, Çilingir O, Güneş H.V, Artan S: Is there a genetic predisposition for Turkish patients with sarcoidosis in the 329 bp region containing BTNL2 rs2076530 polymorphism? Turkiye Klinikleri J Med Sci (2014) 44: 590-594, doi:10.3906/sag-1306-16.

2) Ozbayer C, Kurt K, Ozdemir Z, Tuncel T, Moheb Saadat S, Burukoglu D, Senturk H, Degirmenci İ, Gunes HV Gastroprotective, cytoprotective and antioxidant effects of Oleum cinnamomi on ethanol induced damage Cytotechnology 2014 Cilt/Sayı No: 66, (3) Sayfa No: 431-441.

3) Degirmenci I,Ozdemir M, Kurt E, Tuncel T, Saydam F, et al. (2015) Sequencing of a 306 bp Region of the ANXA11 Gene Containing the rs1049550 Polymorphism for Sarcoidosis Susceptibility in Turkish

Patients. Gene Technology 4:131. doi: 10.4172/2329-6682.1000131, Gene Technology, 2015

4) Tuncel T, Metintaş M, Yağcı E, Ak G, Metintaş S, Güneş H V, Investigation of the MMP2 and MMP9 Gene Polymorphisms in Malignant Mesothelioma and Other Pleural Diseases, Allied Academies Journals, Biomedical Research. Biomedical Research 2017; 28 ,(20): 8670-8674.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1)Kurt H, Özbayer C, Değirmenci İ, Burukoğlu D, Moheb Saadat S, Üstüner M.C, Özdemir Köroğlu Z, Tuncel T, Güneş H. V, İndomethazine Bağlı Oluşan Gastrik Mukozal Hasar Üzerine Hypericum Perforatum Yağının Koruyucu Etkisi.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

1)Tuncel T, H. Kurt, C. Özbayer, S. Moheb Saadat, Z. Özdemir, D. Burukoğlu, İ. Değirmenci, H V. Güneş. Investigation of The Effectiveness of Oleum Cinnamomum Zeylanicum on Alcohol Induced Liver Injury, 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signalling and TRP Channels. Volume 4, Number 1, 26-29 June 2012. (Poster Sunumu).

2)Tuncel T, Özdemir M, Kurt E, Saydam F, Çilingir O, Güneş H.V, Artan S, Değirmenci İ: Sequencing of 306 bp region including ANXA11 rs1049550 polimorphism for sarcoidosis susceptibility in Turkish Patients: European Human Genetics Conference 2013 June 8-11, Paris, France. (Bildiri).

3)Z. Özdemir, C. Özbayer, H. Kurt, S. Moheb Saadat, Tuncel T, MC Üstüner, D. Burukoğlu, İ. Değirmenci, HV. Güneş. The Protective and Antioxidant Effect of Hypericum perforatum on Indomethacin- Induced Renal Damage, 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signalling and TRP Channels. Volume 4, Number 1, 26-29 June 2012 (Poster Sunumu).

4)S. Moheb, H. Kurt, C. Özbayer, Z. Özdemir, Tuncel T, İ. Değirmenci, MC Üstüner, HV. Güneş, Efficacy Of The St John's Wort oil on oxidative stress induced by indomethacin on mucosal damage, 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signalling and TRP Channels. Volume 4, Number 1, 26-29 June 2012 (Poster Sunumu).

5)Tuncel T, Ak G, Değirmenci İ, Güneş H.V, Metintaş M, Chromothripsis-like patterns in mesothelioma tumor genomes Cancer Genomics Conference EMBL 1-4 November 2015, Heidelberg, Germany. (Poster Sunumu).

6) Tuncel T, Metintaş M, Ak G, Değirmenci İ, Güneş H.V, Whole genome approaches reveal complex genomic rearrangements on a Mesothelioma tumor genome: preliminary findings of a cohort study, ESHG 2016, European Journal of Human Genetics, Volume 24 E-Supplement, Sayfa 267, Mayıs, 2016, Barcelona, İspanya. (Poster Sunumu).

7) Tuncel T, Ak G, Metintaş S, Değirmenci İ, Güneş H.V, Metintaş M, Compared High-Resolution Whole-Genome Screening of Mesothelioma and Benign Asbestos Pleurisy, International Mesothelioma Interest Group Conference 2016 Abstract Kitabı, Sayfa 145, Birmingham, Birleşik Krallık. (Poster Sunumu).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1) Tuncel T, Müslümanoğlu H, Kutlay Ö, Aslan H, Özdemir Muhsin: Sporadik ve Kalıtsal Meme Kanseri Olgularında BRCA1 ve BRCA2 Genlerindeki Duplikasyon ve Delesyonların MLPA Tekniği ile İncelenmesi Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011, 31(6) Suplemen 1: 65-66. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 27-30 Ekim 2011/ Antalya. (Poster Sunumu)

2) M. Özdemir, F. Saydam, E. Kurt, İ. Değirmenci, Tuncel T, O. Çilingir, S.Artan, HV. Güneş. Butyrophilin-like 2 (BTNL2) geni rs2076530 polimorfizmi sarkoidozlu Türk hastalarda genetik bir risk faktörü müdür? 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi Bilimsel Program ve Bildiri Özetleri Kitabı- Sayfa 113. 19-23 Aralık 2012.

3) Kurt H, Özdemir Z, Özbayer C, Moheb Saadat S, Burukoğlu D, Tuncel T, Şentürk H, Güneş HV, Değirmenci İ: Investigation of The Effectiveness of Hypericum perforatum Oil on Drug Induced Liver Damage. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011, 31(6) Suplemen 1: 133-134. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011 / Antalya.

4) Özbayer C, Kurt H, Özdemir Z, Moheb Saadat S, Tuncel T, Değirmenci İ, Güneş HV, Üstüner MC: The Protective Effects of Cinnamon Oil on Mucosal Damage in Ethanol Induced Experimental Ulcer Model. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011, 31(6) Suplemen 1: 134-134. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011 / Antalya.

5) Kurt H, Özbayer C, Tuncel T, Moheb Saadat S, Özdemir Z, Burukoğlu D, Değirmenci İ, Üstüner MC, Güneş HV: The Antioxidant Effect of Oleum Cinnamomum zeylanicum on Free Radicals Produced by Acute Renal Injury. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011, 31(6) Suplemen 1: 135-135. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011 / Antalya.

6) Tuncel T, Ak G, Yağcı E, Değirmenci İ, Güneş H.V., Metintaş M, Mezotelyoma İle Matriks Metalloproteinaz 2 C1306T Ve Metalloproteinaz 9 C1562T Polimorfizmleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27 - 30 Ekim 2015. Fethiye, Ölüdeniz, Türkiye. (Poster Sunumu)

Ulusal bilimsel toplantılarda sözlü bildiriler:

- 1) Tuncel T, Metintaş M, Ak G, Güneş H V, Malign Mezotelyoma ve Benign Asbest Plörizilerinin Karşılaştırmalı Genom Çapı Taranması, XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27 - 30 Ekim 2017. Fethiye, Ölüdeniz, Türkiye.

Projeler:

- 1) ESOĞÜ D tipi BAP Projesi: Mezotelyoma ile Matriks Metalloproteinaz 2 C1306T ve Metalloproteinaz 9 C1562T polimorfizmleri arasındaki ilişkinin incelenmesi. (Başarıyla Bitirildi)
Proje Kodu: 201411D04
Başlangıç: 14.02.2014 Bitiş: 29.04.2015
Görevi: Yardımcı Araştırmacı.
- 2)ESOGÜ B tipi BAP Projesi : Mezotelyomalı Olgulara Özgü Genetik Değişikliklerin Tüm Genom Çapında SNP Array Yöntemi Kullanılarak Araştırılması. (Başarıyla Bitirildi)
Proje Kodu: 201311035.
Başlangıç: 07.06.2013- Bitiş: 09.02.2016
Görevi: Yardımcı Araştırmacı.
- 3)TUBİTAK Hızlı Destek Projesi (1002): Mezotelyomalı Hastaların Tümör Genomlarında Tüm Genom SNP Array Yöntemi Kullanılarak Keşfedilen Kompleks Genomik Anomalilerin Yeni Nesil Sekanslama Metodu ile Doğrulanması ve Nükleotid Düzeyinde Karakterize Edilmesi. (Başarıyla Bitirildi).
Proje Kodu: 115S819
Kabul: 30/06/2015- Bitiş: 01/09/2016
Görevi: Araştırmacı/Uzman.
- 4) ESOĞÜ B tipi BAP Projesi: Kemoterapi alan Malign Mezotelyomalı Hastalarda Prognoz Biyobelirteçlerinin Tespit ve Doğrulama Çalışması. (Başarıyla Bitirildi).
Proje Kodu: 201511033.
Kabul: 15/05/2015 Bitiş: 15/05/2017.
Görevi: Araştırmacı/Uzman.

Yurtdışı Proje:

Genetic Alterations in Mesothelioma in Turkey, Cappadocia region. (Proje Danışmanı: Prof. Dr. Michele Carbone). 1 Mayıs 2014- 31 Ekim 2014.(6 ay) University of Hawaii Cancer Center, Amerika Birleşik Devletleri. Görevi: Exchange Visitor Scholar (Burslu Değişim Ziyaretçi Araştırmacı) 2014

Burslar

University of Hawaii Cancer Center, Amerika Birleşik Devletleri. Exchange Visitor Scholar(Burslu Değişim Ziyaretçi Araştırmacı)Mayıs 2014–Kasım 2014

Ödüller

EMBL Advanced Training Centre Corporate Partnership Programme Fellowship.

Sözlü Konferans veya Seminerler

- 1) Malign Mezotelyoma ve Benign Asbest Plörizilerinin Karşılaştırmalı Genom Çapı Taranması, XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27 - 30 Ekim 2017. Fethiye, Ölüdeniz, Türkiye.
- 2) ESOGÜ Tıbbi Biyoloji Bölüm Seminerleri.

Katıldığı Uluslararası Kongreler

- 1)4.th International Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signalling and TRP Channels, 2012, Isparta.
- 2)European Human Genetics Conference 2013 June 8-11, Paris, France.
- 3)Cancer Genomics Conference EMBL 1-4 November 2015, Heidelberg, Germany.
- 4)European Human Genetics Conference 2016 May 21-24, Barcelona, Spain.

Kurslar ve Eğitim Programları

- 1) Bioinformatics Methods for Cancer Biology Theoretical and Practical Workshop, HÖAD.
- 2) Biyoinformatik Omik veri Analiz Yöntemleri ve Kişisel Tıp Uygulaması Kursu. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği.
- 3) Moleküler Biyolojide Yeni Teknolojiler Kursu, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği.
- 4) Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, ESOGÜ, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu.
- 5) Başarılı Sunum Yapma Teknikleri, 2013, ESOGÜ.
- 6)TUBİTAK Sağlık Bilimleri Alanında 2237 Araştırma Projesi Hazırlama Eğitimi, 27-29 Nisan 2017, Antalya.