

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HASTALARINDA ; LİKİT BİYOPSİ
YÖNTEMİNİN HASTALIK TANISI ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Şebnem ÖZDEMİR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2019

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HASTALARINDA ; LİKİT BİYOPSİ
YÖNTEMİNİN HASTALIK TANISI ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Şebnem ÖZDEMİR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman : Doç. Dr. Naci ÇİNE

KOCAELİ
2019

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

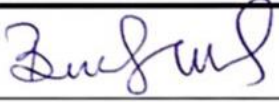



Tez Adı: Meme Kanseri Hastalarında; Likit Biyopsi Yönteminin Hastalık Tanısı Üzerine Etkinliğinin Araştırılması

Tez yazarı: Şebnem ÖZDEMİR

Tez savunma tarihi:

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Naci ÇİNE

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	BURÇAK VURAL	
ÜYE(DANIŞMAN)	NACI ÇİNE	
ÜYE	Penir Sünnetçi Akroyunlu	
ÜYE	Seda Sen Keçeli	

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

/ / 2019

Prof. Dr. Sema Aşkın Keçeli
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Meme Kanseri Hastalarında ; Likit Biyopsi Yönteminin Hastalık Tanısı Üzerine Etkinliğinin Araştırılması

Amaç : Meme kanseri ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Kanseri dokuda meydana gelen genetik değişiklikler farklı yöntemlerle belirlenebilmektedir. Meme kanserinde meydana gelen değişiklikler kanserli dokudan yapılan biyopsilerle saptanabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, tedaviyle eş zamanlı olarak genetik değişikliğin takibinin yapılabilmesi ve tedaviye yardımcı olabilmesidir.

Yöntem : Çalışmamızda, meme kanseri hastalarından alınan periferik kandan cell-free DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan hastaların her biri farklı bir barkod ile işaretlenmiş ve hastalara ait kütüphane oluşturulmuştur. Bu kütüphanenin emülsiyon PCR yöntemi ile çok sayıda kopyası oluşturulmuştur. Elde edilen DNA kopyaları Ion-530 Chip'e yüklenerek Yeni Nesil Dizi Analizi (Next Generation Sequencing- NGS) yöntemiyle PIK3CA, TP53, KRAS, EGFR, ESR1, AKT1, FBXW7, SF3B1, ERBB2 ve ERBB3 genleri dizilenmiştir. Cihazdan alınan veriler TorrentSuite TM Software v5.2.1 ve IonReporter TM Software v5.2 programları ile analiz edilmiştir.

Bulgular : Hastaların % 78,26'sında varyasyon saptanırken % 21,74'ünde varyasyon saptanmamıştır. Varyasyon saptanan hastaların % 83'ünün PIK3CA geninde, % 44'ünün TP53 geninde, % 38,89'unun KRAS geninde, % 33,33'ünün ESR1 geninde, % 27,78'inin EGFR geninde, % 11,11'inin FBXW7 geninde, % 5,55'inin ERBB2 ve % 5,55'inin ERBB3 geninde varyasyon saptanmıştır. AKT1 ve SF3B1 genlerinde varyasyon saptanmamıştır.

Sonuç : Yapılan analizler sonucunda hastalarda saptanan varyasyonlardan bazıları ilaç ilişkili varyant olarak saptanmıştır. Bu hastalara akıllı ilaç tedavisi uygulandığında tedaviye yardımcı olduğu ve prognozda iyileşme olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Meme kanseri, Likit Biyopsi, cfDNA, CTC, Varyasyon, Yeni Nesil DiziAnalizi

ABSTRACT

In Breast Cancer Patients; Investigation of the Effect of Liquid Biopsy on Disease Diagnosis

Objective : Breast cancer is the most common type of cancer among women in our country and the world. Genetic changes in cancerous tissue can be determined by different methods. Changes in breast cancer can be detected by biopsies from cancerous tissue. The aim of this study is to monitor the genetic changes simultaneously with treatment and to help the treatment.

Method : In our study, cell-free DNA was isolated from peripheral blood from breast cancer patients. Each of the patients who were isolated was marked with a different barcode and the library of the patients was formed. Numerous copies of this library were prepared by the emulsion PCR method. The resulting DNA copies were loaded into the Ion-530 Chip and PIK3CA, TP53, KRAS, EGFR, ESR1, AKT1, FBXW7, SF3B1, ERBB2 and ERBB3 genes were sequenced by Next Generation Sequencing (NGS) method. Data from the device were analyzed with TorrentSuite™ Software v5.2.1 and IonReporter™ Software v5.2.

Results : While 78.26% of the patients had variations, 21.74% did not have any variation. Variation was found in 83% in the PIK3CA gene, in 44% in the TP53 gene, in 38,89% in the KRAS gene, in 33,33% in the ESR1 gene, in 27,78% in the EGFR gene, in 11,11% in FBXW7 gene, in 5.55% in the ERBB2 gene and in 5.55% in the ERBB3 gene of the patients with variant. No variation was found in the AKT1 and SF3B1 genes.

Conclusion : As a result of the analyzes, some of the variations in patients were determined as drug-related variants. When smart medication is applied to these patients It was found that it helped treatment and improved prognosis.

Keywords: Breast cancer, Liquid Biopsy, cfDNA, CTC, Variation, Next Generation Sequence Analysis

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik laboratuvarında çalışma şansını bana tanımış olan değerli hocamız Prof. Dr. Hakan Savlı'ya,

Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye ,

Çalışmamızın hasta kabul, deney ve analiz kısmında her konuda yardımcı olan ve her türlü bilgiyi benimle paylaşan değerli arkadaşlarım; Dr. Nilüfer SERTDEMİR'e, Uzm. Biyolog Seda REKA'ya ve Uzm. Biyolog Gülhan DEMİR'e,

Hayatım boyunca aldığım her kararda arkamda duran ve bana her türlü desteği sağlayan canım anne, babama ve ablalarım,

Bu süreçte dönem arkadaşlarım olan ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Ayşegül ŞAHİN'e, Malike İNCE'ye ve Kübra UZUNER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Şebnem ÖZDEMİR

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

31 / 05 / 2019

Şebnem ÖZDEMİR



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÇİZİMLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Meme Kanseri	1
1.2. Meme Kanserinde Evreleme	5
1.3. Meme Kanserinin Genetiği	7
1.3.1. Meme Kanserinde Etkili Olan Genler	7
1.4. Likit Biyopsi	10
1.5. Yeni Nesil Dizileme-Next Generation Sequencing (NGS)	12
2. AMAÇ	13
3. YÖNTEM	14
3.1. KullanılanYöntem	14
3.1.1. cell free DNA İzolasyonu	14
3.1.2. Kütüphane Oluşturma	16
3.1.3. Emülsiyon PCR	20
3.1.4. Yıkama	22
3.1.5. Ion-530 Chip'e Yükleme	24
3.1.6. NGS Sonuçlarının Analizi	25
3.2. Kullanılan Gereçler	25
3.2.1. Çalışma Süresince Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	25
3.2.2. Çalışmamız Süresince Kullanılan Kitler	26
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	41
EKLER	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

% : Yüzde

cm : santi metre

°C : Santigrad

kDa : Kilo dalton

µl : Mikro litre

µM : Mikro molar

ACMG : Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Birliği;

AKT1 : Serine/Threonine kinase 1

AJCC : American Joint Committee on Cancer

cfDNA : Serbest DNA (Cell-Free DNA)

ccfdDNA : Serbest tümör DNA'sı (Circulating Cell-Free Tumor DNA)

CTC : Dolaşımdaki tümör hücreleri (Circulating Tumor Cells)

DCIS : Ductal carcinoma in situ

DNA : Deoksiribonükleik Asit

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

E. coli : Escherichia coli

EGFR : Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

ERBB2-3 : Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2-3

ESR1 : Estrogen Receptor 1

FBXW7 : F-box and WD repeat domain containing 7

FDA : Amerikan İlaç Dairesi

GTPaz : Guanozin Trifosfataz

HR : Hormon Reseptör

HER2 : Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 2

IARC : Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

LB : Likit Biyopsi

LCIS : Lobüler carcinoma in situ

LOD : Limit of detection

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NGS : Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAMI)

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PIK3CA : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

SF3B1 : Splicing factor 3b subunit 1

SIFT : Sorts intolerant from tolerant

TNM : Tümör Nod Metastaz



ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Ülkeler arası kanser grafiği.....	1
Çizim 1.2. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları.....	2
Çizim 1.3. 25-49 yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları.....	3
Çizim 1.4. 50-69 yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları.....	3
Çizim 1.5. 70 ve üzeri yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları.....	4
Çizim 1.6. Meme kanserinin kadınlarda yaşa özel hızları.....	4
Çizim 1.7. Meme kanserinde TNM sınıflandırmasına göre evrelerin gruplandırılması.....	6
Çizim 1.8. ccfDNA'dan mutasyon tespiti.....	11
Çizim 3.1. Install the filled ion one touch reaction filtre.....	21
Çizim 3.2. Filtre'nin yerleştirilmesi.....	21
Çizim 3.3. Recovery tüp.....	22
Çizim 3.4. ES8-well strip box.....	22
Çizim 3.5. Ion-530 chip'e örnek yükleme.....	24
Çizim 4.1. Varyasyon saptanan genlerin dağılımı.....	27
Çizim 4.2. Genlere göre saptanan varyasyon sayısı.....	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

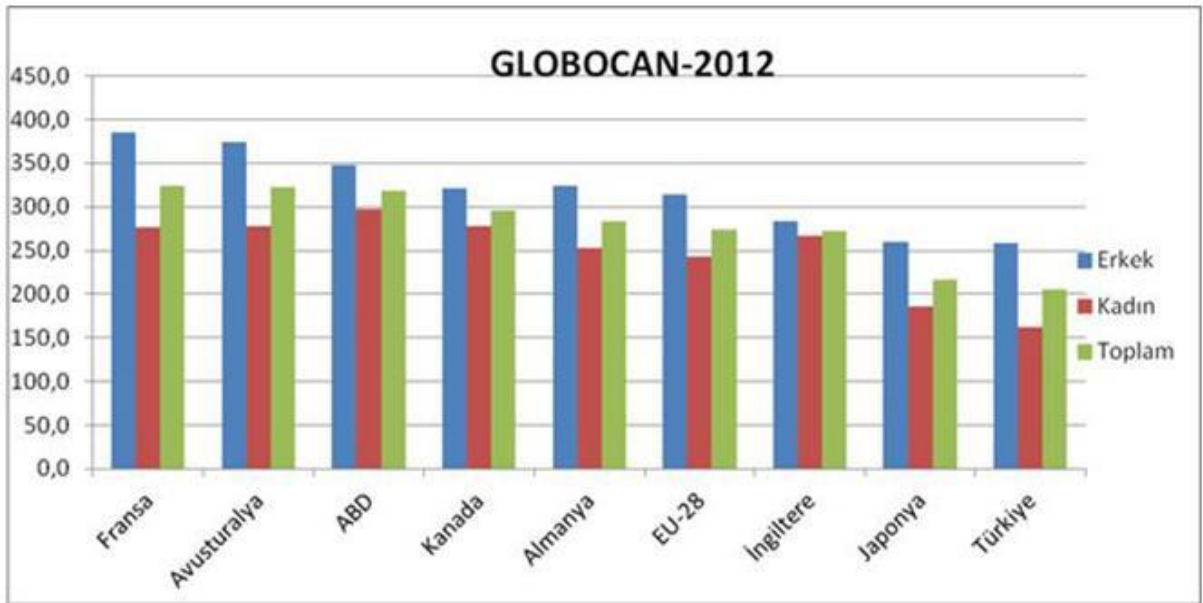
Çizelge 1.1. Ölüme neden olan 5 kanser türü.....	2
Çizelge 3.1. Thermal-Cycler'da PCR bileşenleri.....	16
Çizelge 3.2. Thermal-Cycler'da PCR protokolü.....	16
Çizelge 3.3. Thermal-Cycler'da PCR bileşenleri.....	17
Çizelge 3.4. Thermal-Cycler'da PCR protokolü.....	18
Çizelge 3.5. Real-Time PCR bileşenleri.....	20
Çizelge 3.6. Light-Cycler-480'de Real-Time PCR protokolü.....	20
Çizelge 3.7. Amplifikasyon solüsyon bileşenleri.....	21
Çizelge 3.8. Melt-off solüsyon bileşenleri.....	23
Çizelge 3.9. Solüsyon içeriği.....	24
Çizelge 4.1. TP53 geninde saptanan varyasyonlar.....	29
Çizelge 4.2. PIK3CA geninde saptanan varyasyonlar.....	30
Çizelge 4.3. KRAS geninde saptanan mutasyonlar.....	30
Çizelge 4.4. EGFR geninde saptanan varyasyonlar.....	30
Çizelge 4.5. ESR1 geninde saptanan varyasyonlar.....	31
Çizelge 4.6. ERBB2, ERBB3 ve FBXW7 genlerinde saptanan varyasyonlar.....	31
Çizelge 4.7. Türlerine göre varyasyonlar.....	31
Çizelge 4.8. Hastaların tümünün TP53 geninde saptanan varyasyonlar.....	32
Çizelge 4.9. Hastaların tümünün PIK3CA geninde saptanan varyasyonlar.....	32
Çizelge 4.10. Hastaların tümünün EGFR, KRAS, FBXW7, ERBB2-3 ve ESR1 genlerinde saptanan varyasyonlar.....	33

1. GİRİŞ

1.1. Meme Kanseri

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

Dünya üzerinde kanser istatistiklerini kayıt altına alan 184 ülkenin ve 28 kanser tipinin güncel tahminlerini yürüten Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'n GLOBOCAN projesindeki araştırmalarına göre, 2015 yılında dünya genelinde tanımlanan 14,1 milyon kanser vakasından 8.8 milyonu kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir.



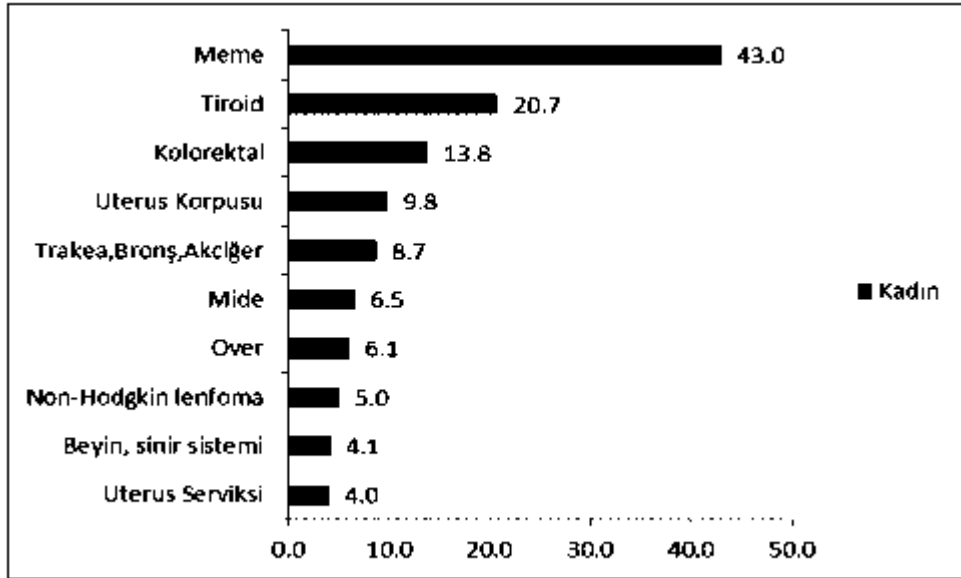
Çizim 1.1. Ülkeler arası kanser grafiği

Tüm dünyada 2004 yılında kanser nedeniyle ölüm 7,4 milyon ölümdür ve bu tüm ölümlerin %13'ünü oluşturmaktadır. Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) verilerine göre kanserden ölümlere en çok neden olan 5 kanser türü ise sırasıyla akciğer, mide, kolorektal, karaciğer ve meme kanseridir.

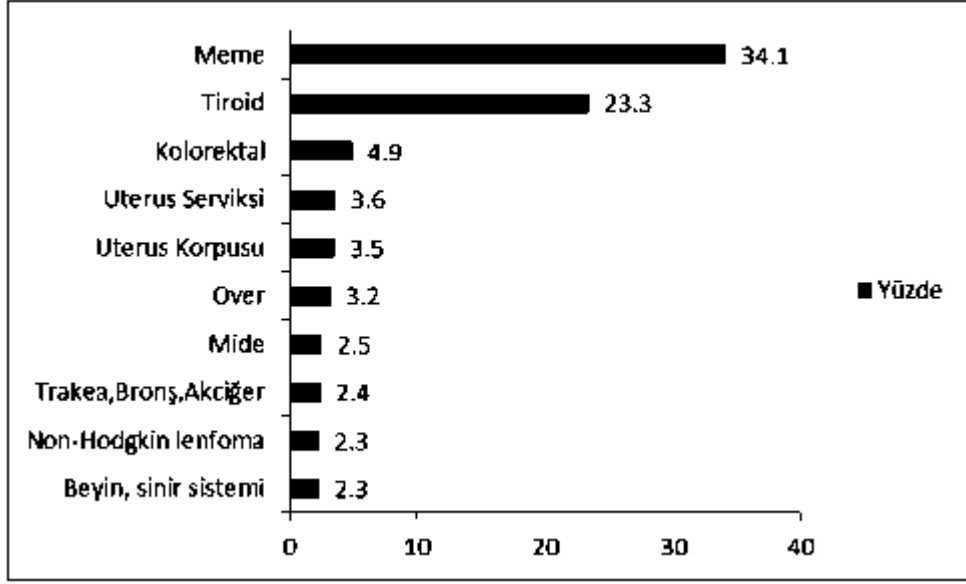
Çizelge 1.1. Ölüme neden olan 5 kanser türü

1	Akciğer	(1.3 milyon ölüm / yıl)
2	Mide	(803 000 ölüm / yıl)
3	Kolorektal	(639 000 ölüm / yıl)
4	Karaciğer	(610 000 ölüm / yıl)
5	Meme	(519 000 ölüm / yıl)

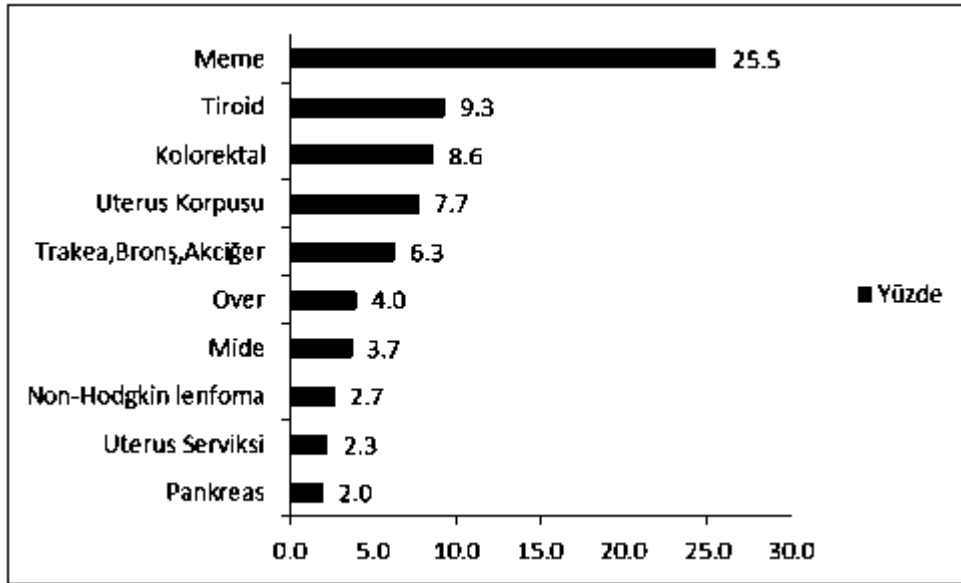
Meme kanseri, dünyada ve ülkemizde kadınlarda en sık görülen ve en sık 2. mortalite nedeni olan bir kanser çeşitidir. Ülkemizde kadınlardaki insidansı 43/100.000'dir. Türkiye Sağlık Bakanlığı'nın 2016 istatistik verilerine göre tüm kanser hastalarının yaklaşık %25'ini kapsamaktadır ve her yıl yaklaşık 15.000 kadın meme kanserine yakalanmaktadır.



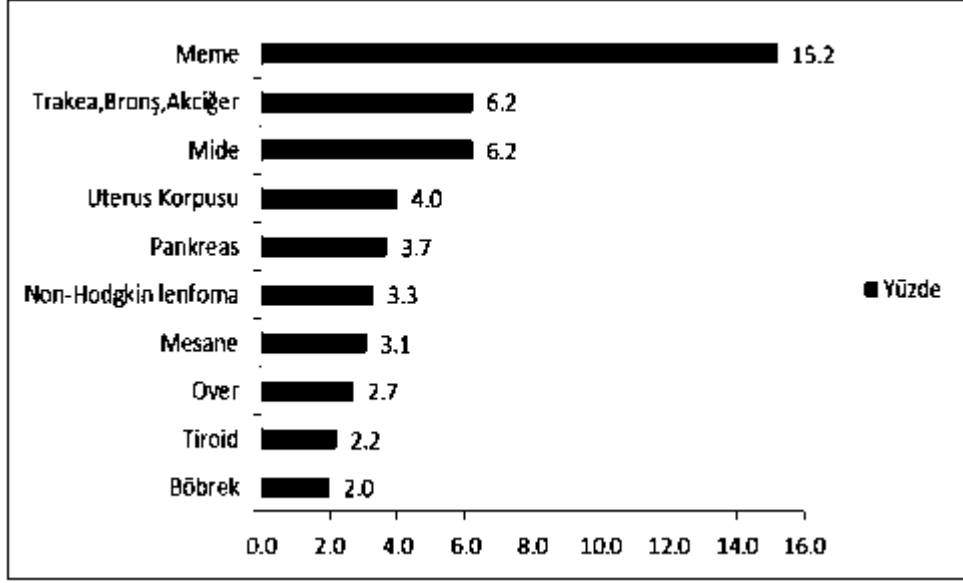
Çizim 1.2. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları



Çizim 1.3. 25-49 Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları

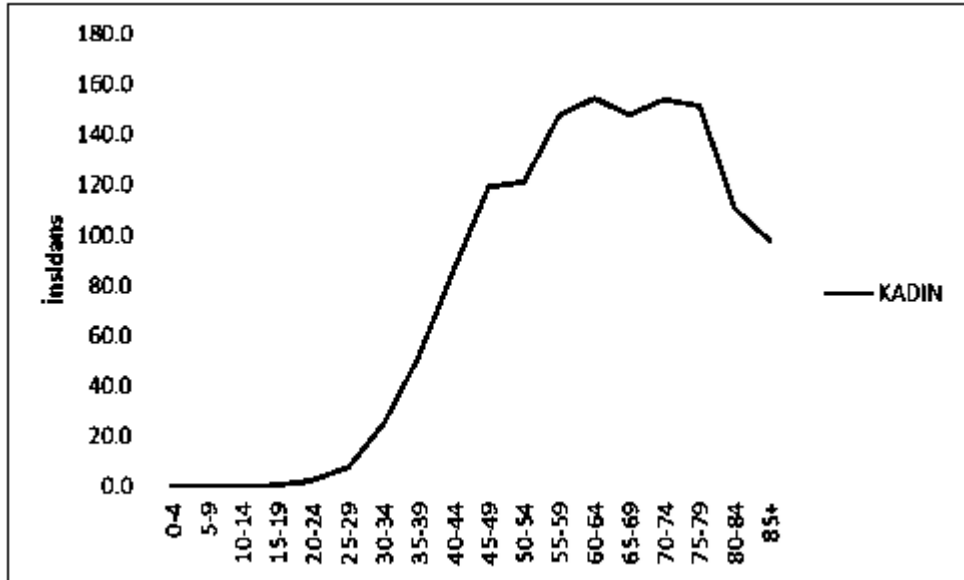


Çizim 1.4. 50-69 Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları



Çizim 1.5. 70 ve Üzeri Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları

Türkiye Birleşik Veri Tabanı'nın 2014 verilerinde de (Çizim 1.3., Çizim 1.4. ve Çizim 1.5.) görüldüğü üzere 25-70 yaş ve üzeri kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir.



Çizim 1.6. Meme Kanserinin Kadınlarda Yaşa Özel Hızları

Çizim 1.5.te de görüldüğü gibi meme kanserinin kadınlarda görülme hızı 25-50 yaşları arasında artış göstermektedir.

1.2. Meme Kanseri Evreleme

Meme kanserlerinde evreleme klinik ve patolojik olarak yapılmaktadır. Klinik evreleme için günümüzde, hemen her yerde UICC (Union International Contre Cancere) ve AJCC (American Joint Committee on Cancer)'nin biçimlendirdiği TNM sistemi kullanılmaktadır (Smith ve Willis 1971).

Tümör evreleme sistemleri kişinin kanserinin yayılımı ve ciddiyeti hakkında belli standartlara göre bilgi edinilmesini sağlamaktadır. TNM Evreleme Sistemi'nde tümörleri sınıflamak için kullanılan kriterlerde ; primer tümörü T, koltukaltı lenf bezlerini N, uzak metastazları ise M temsil etmektedir. Daha önceden tanımlanmış kriterlere göre bu üç özellik belirlenip kombine edilerek, tümör için son TNM Evresi hesaplanmaktadır. Tümör evresi meme kanserli hastalarda tedaviye yön veren önemli bir prognostik faktördür. Yeni teknikler geliştikçe kanser evrelemesinde doğruluk artabilmekte ve hastalığın genişliği daha doğru olarak belirlenebilmektedir (Ferahman 2006).

Evre 0 : Carcinoma in situ denilmektedir.

Lobüler carcinoma in situ (LCIS) :Lobüldeki anormal hücelere karşılık gelmektedir. Bu anormal hüceler yüksek riskin işaretçisidir. Bu durum LCIS olan kadının, ileride her iki memesinde de yayılabilen kanser olma riskinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir.

Ductal carcinoma in situ (DCIS) : Kanaldaki kanser öncesi durumdur. DCIS aynı zamanda intraductal carcinoma olarak ta adlandırılır. Anormal hüceler, kanalın dışına çıkıp etrafındaki meme dokusuna yayılmamıştır. Fakat bazen DCIS tedavi edilmezse yayılabilen kanser olur.

Evre I : Metastaz yapan meme kanserinin başlangıç safhasıdır. Bu evrede tümör 2 cm'den fazla geniş olmayıp kanser hüceleri metastaz yapmamıştır.

Evre IIA : Memede tümör yoktur, ancak koltuk altındaki lenf bezlerinde kanser vardır; veya tümör 2 cm veya daha küçüktür ve koltuk altındaki lenf bezlerine yayılmıştır; veya tümör 2-5 cm arasındadır ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmamıştır.

Evre IIB : Tümör 2-5 cm arasındadır ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmıştır; veya 5 cm'den büyüktür ancak koltuk altı lenf bezlerine yayılmamıştır.

Evre IIIA : Memede tümör yoktur ancak koltuk altı lenf bezlerinde birbirine veya çevre dokulara yapışık tümör vardır; ya da tümör 5 cm'den daha küçük veya 5 cm' den daha büyüktür ve çevre dokulara veya birbirine yapışık koltuk altı lenf bezlerine yayılmıştır.

Evre IIIB : Tümör herhangi bir boyutta olabilir ve memeye komşu dokulara (deri veya göğüs duvarı, kaburgalar veya göğüs duvarındaki kaslar) ve meme içerisindeki lenf nodlarına veya kolun altındaki lenf nodlarına yayılmıştır.

Evre IIIC : Kanser köprücük kemiği altındaki ve komşu boyun boyunca uzanan lenf nodlarına yayılmıştır ve kanser kolun altındaki ve meme içerisindeki lenf nodlarına ve memeye komşu dokulara yayılabilir. Evre IIIC ameliyat olabilir ve ameliyat olamaz olarak ikiye ayrılmaktadır.

Evre IV : Uzak metastatik kanserdir. Kanser vücudun diğer bölgelerine metastaz yapmıştır.



Meme Kanseriinde TNM Evrelemesi AJCC 2010

Evre 0	Tis N0 M0	Evre IIIA	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
Evre IA	Tmic N0 M0 T1 N0 M0	Evre IIIB	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0
Evre IB	T0 Nmic M0 Tmic Nmic M0 T1 Nmic M0	Evre IIIC	T1-4, N3 M0
Evre IIA	T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0	Evre IV	Herhangi bir T, Herhangi bir N, M1
Evre IIB	T2 N1 M0 T3 N0 M0		

Çizim 1.7. Meme kanserinde TNM sınıflandırmasına göre evrelerin gruplandırılması

1.3. Meme Kanserinin Genetiği

Kanser, basit bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilmektedir. “Kontrolsüz çoğalma”, esas özellik olmakla birlikte, kanser hücresinin diğer biyolojik özelliklerinden bazıları; hücre kültürlerinde kontakt inhibisyondan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyarılara gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilmesidir (Weaver ve Hedrick 1997).

Kanser oluşumuna neden olan genetik değişikliklerin görüldüğü bazı gen grupları vardır. Onkogenler Normal hücresel gen olarak bilinen proto-onkogenlerin genetik değişimlere uğramasıyla türetilen genlerdir. Onkogenler fonksiyon kazandıran mutasyonlar ile; hücre proliferasyonunu inaktif ederek, apoptozisi engelleme, ekspresyon seviyelerindeki kantitatif farklılıkların ortaya çıkmasıyla malign transformasyonu gerçekleştirmektedir (Dickson ve diğ. 1996). Tümör süpresör genler ise hücre siklusu kontrolü ve DNA’da oluşan hasarı onarmak yoluyla tümör oluşumunu engellemeye çalışan gen grubudur. Tümör süpresör genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı ile kontrolsüz hücre bölünmesi, anormal hücre büyümesi ve hatalı apoptozis olayları ortaya çıkmaktadır (Ahmed ve diğ. 2006).

Meme kanseri ile ilişkili olan ve likit biyopsi testinde incelenen 10 adet gen bulunmaktadır. Bunlar AKT1, ESR1, SF3B1, EGFR, FBXW7, TP53, ERBB2, ERBB3, KRAS, PIK3CA genleridir.

1.3.1. Meme Kanserinde Etkili Olan Genler

PIK3CA Geni : Sitogenetik lokasyonu 3. kromozomun uzun kolunda 26.32 pozisyonunda lokalizedir (3q26.32) ve 179,148,114 ile 179,240,093 baz çifti içermektedir.

PIK3CA geni fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) diye adlandırılan enzimin bir alt ünitesi olan p110 α proteininin yapımı için talimat sağlar. Diğer alt üniteler (farklı genler tarafından üretilen) enzim aktivitesini düzenlerken p110 α proteini PI3K etkisi yaptığından katalitik alt ünite olarak adlandırılır.

PI3K sinyalizasyonu hücre büyümesi ve çoğalmasını, hücre taşınımı, yeni protein üretimini, hücre içi madde taşınımını ve hücrenin hayatta kalmasını kapsayan çoğu hücre aktivasyonu için önemlidir. Çalışmalar, PI3K sinyalizasyonunun çeşitli hormonların

düzenlenmesini kapsamış olabildiğini ve yağ hücresinin olgunlaşmasında rol oynayabildiğini gösterir.

EGFR Geni : EGFR geni, 7p12 kromozom bölgesinde lokalizedir ve 28 ekzon içerir. EGFR proteini 1186 aminoasitten oluşur, 170 kDa büyüklüğünde transmembran bir glikoproteindir. EGFR transmembran proteini üç bölümden oluşur; ligandların tanınması ve bağlanmasını sağlayan bir ekstraselüler bölgesi (ekzon 1-16), 12 hidrofobik özelliğe sahip membran (ekzon 17) içinde diğer reseptörlerle ilişkileri sağlayan transmembran bölgesi (ekzon 18-28) (Miller 2008).

KRAS Geni : Ras gen ailesinin bir üyesi olan Kras geni, Kirsten Rat Sarkoma (Ki-veya K-Ras) viral onkogen homologudur (Adjei 2001). Kras geni, 12. kromozomun 12p12.1 bölgesinde lokalizedir ve 6 ekzondan oluşmaktadır. Küçük bir GTPaz olan Kras proteini, 21 kDa'dan ve 189 aminoasitten oluşmaktadır. Kras hücre zarında sitoplazmik bölgesinde lokalize bir proteindir. Kras geninde kodon 12 ve 13, GTP'nin bağlandığı "P-loop"da yer almaktadır. Kodon 61'in lokalizasyonu ise, Ras regülatörlerinin ve efektörlerinin bağlanmasını kontrol eden "switch II" bölgesidir. "switch I" ve switch II" bölgeleri GDP/GTP duyarlı bölgelerdir. Kras proteininin G domaini, yüksek düzeyde korunmuştur. Çok değişkenli bölge ise, aminoasit rezidülerinin membran lokalizasyonunu kontrol etmektedir (Wicki ve diğ. 2010).

p53 Geni : p53 proteini transkripsiyon faktörü işlevine sahip 393 amino asitten oluşan bir proteindir. p53, 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yaklaşık 20 kb'lık bir alana yayılmış 11 ekzondan oluşan bir gen tarafından kodlanmaktadır. p53 proteini DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının düzenlenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücreyel olayda rol almaktadır. p53, bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşerek gerçekleştirmektedir. p53, hücre döngüsünün G0 /G1 evresinde rol alan birçok siklin bağımlı kinazın işlevini engelleyen p21 proteininin ifadesini, p21WAF2/Cip1 geninin transkripsiyonunu uyararak düzenlemekte ve böylece p21 proteini aracılığı ile hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurmaktadır.

p53 ayrıca DNA tamiri ve DNA sentez mekanizmasında ve programlı hücre ölümünde rol alan bazı proteinlerin transkripsiyonlarını da düzenlenmektedir (Haris 1996).

ERBB2-ERBB3 Genleri : c-erbB-2 (HER2/neu) Onkogen olan v-erB geni, kuşlara ait bir eritroblastosis virüsüdür, ve tavuklarda eritroblastosis ve sarkomların oluşumunu indükler. Tirozin kinaz aktivitesine sahip, 170 kilodalton ağırlığındaki glikoprotein olan “Epidermal Growth Factor” (EGF) reseptör geninden ortaya çıkmıştır (Neville ve diğ. 1991). v-erB geni ile ilişkili olan c-erbB-2 geni ilk kez etil-nitrosoüre ile indüklenerek oluşturulan, sıçan nöroblastomalarında transforming onkogen olarak tariflendiği için “neu” diye adlandırılmıştır (Evans 1994). İnsanda ise v-erB geniyle ilişkili olan 17 nolu kromozomun q21’de yerleşmiş olan c-erbB-2 geni bulunmuştur (Akıyama 1986). ERBB3 geni ise 12. Kromozomun uzun kolunun 13.2 pozisyonunda lokalizedir.

c-erbB-2 (HER-2/neu) geni, büyüme faktör reseptörleri ile yakın ilişkili, dört kişilik bir ailenin elemanıdır. Her biri yüzey reseptörlerinin aracılığı ile hücre membranındaki tirozin kinaz reseptörünün ligandlarına bağlanır. Bu ligandlara “neu differentiation” veya “heregulin” adı verilir. c-erbB-2, Klas I büyüme faktör reseptör tirozin kinaz ailesinden 185-kilodalton ağırlığındaki transmembran proteinini kodlar. Hücre membranında bulunan transmembran protein tirozin kinaz reseptörü, N- uç ekstrasellüler ligand bağlayıcı alan, tek transmembran α helix ve kinaz aktivitesi olan sitozolik c- uç bölgesinden oluşur. Bu reseptörlerin en büyük özellikleri, ligandın bağlanmasıyla dimer oluşturmalarıdır. Bu yolla reseptörün otofosforilasyonu oluşur. Reseptör fosforilasyonu, hedef proteinlerinin fosforilasyonuna yol açar ve hücre içi sinyal ileti yolları tetiklenmiş olur. Artmış reseptör ekspresyonu genin amplifikasyonuna neden olur. Genin amplifikasyonu, c-erbB-2 haberci RNA ve P185 proteinin aşırı ekspresyonuna yol açar. Artmış olan bu protein ekspresyonu immünohistokimyasal yöntemle, tümör hücresinde yoğun hücre membranının boyanması şeklinde izlenir (Jeffrey ve diğ. 1999).

ESR1 Geni : Bu gen 6. kromozomun uzun kolunun 25.1 ve 25.2 pozisyonları arasında yer almaktadır. Ayrıca 151,654,148 ile 152,129,604 baz çiftinden oluşmaktadır.

Bu gen bir östrojen reseptörünü, hormon bağlanması, DNA bağlanması ve transkripsiyonun aktivasyonu için önemli olan birkaç alandan oluşan bir ligand-aktive edilmiş transkripsiyon faktörü kodlamaktadır. Bu protein östrojen reseptörüyle homodimer veya heterodimer form olabilen nükleusa lokalizedir. Östrojen ve onun reseptörleri cinsel gelişim ve üreme işlevi için önemlidir ayrıca kemik gibi diğer dokularda da rol oynamaktadır. Östrojen reseptörleri ayrıca meme kanseri, endometriyal kanser ve osteoporozu da içeren patolojik süreçlerde de rol oynamaktadır. Alternatif promotör kullanımı ve alternatif splicing, düzinelerce transkript varyantıyla sonuçlanır, ancak bu varyantların çoğunun doğal tam uzunluğu belirlenememiştir.

AKT 1 Geni : 14. kromozomun uzun kolunun 32.33 pozisyonunda yer almaktadır ve 104,769,349 ile 104,795,743 baz çiftinden oluşmaktadır. AKT1 geninde sık gözlenen mutasyonlar E17K ve E49K mutasyonlarıdır. E17K mutasyonları aynı zamanda meme kanseri, kolorektal kanser ve overyan kanserlerde etkili bulunmuştur. Bu mutasyonlar tek başına ya da tandem olarak mesane tümörlerinde gözlenebilmektedirler (Carpten ve diğ. 2007).

AKT1 geni tarafından kodlanan serin-threonin protein kinaz serundan yoksun primer ve ölümsüzleştirilmiş fibroblastlarda katalitik olarak inaktiftir. AKT1 ve ilgili AKT2, trombosit kaynaklı büyüme faktörü tarafından aktive edilir. Aktivasyon hızlı ve özeldir ve AKT1'in pleckstrin homolog domainindeki mutasyonlar ile baskılanır. Aktivasyonun fosfatidilinositol 3-kinaz ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Gelişmekte olan sinir sisteminde AKT, uyarılmış nöronal sağkalım büyüme faktörünün kritik bir aracıdır. Sağkalım faktörleri, apoptozun bileşenlerini fosforile edip etkisiz hale getiren aktif serin / threonin kinaz AKT1 ile transkripsiyondan bağımsız bir yolda apoptosizi baskılayabilir. Bu gendeki mutasyonlar Proteus sendromuyla ilişkilendirilmektedir. Bu gen için alternatif olarak eklenmiş çoklu transkript varyantları bulunmuştur.

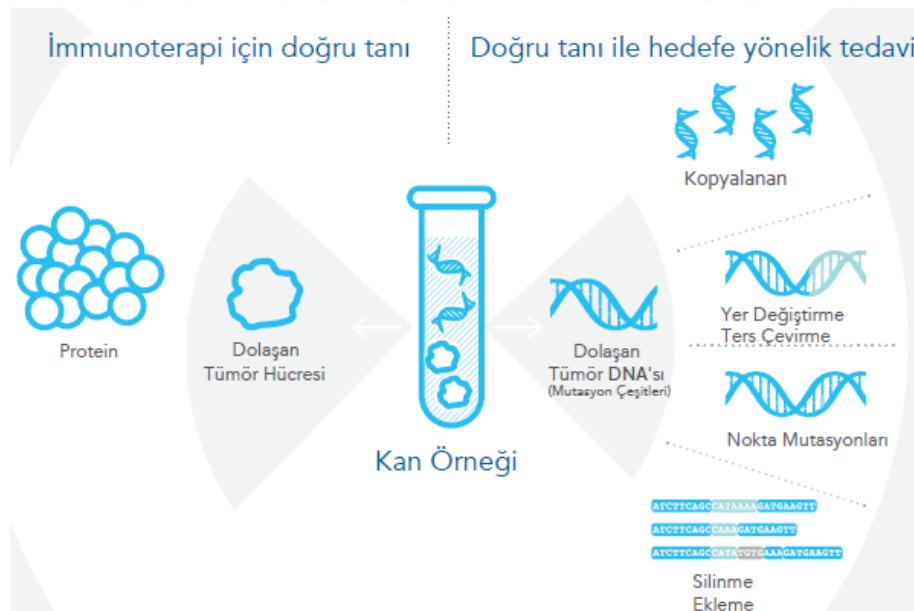
1.4. Likit Biyopsi

Kanser tanısı ve moleküler testler için yapılan girişimsel işlemler, gelişebilecek komplikasyonlar nedeniyle risklidir. Ayrıca bu işlemlerle, primer tümör ya da metastazının biyopsi için uygun bölgede olmaması ya da teknik nedenlerden dolayı her zaman sonuca ulaşmak mümkün olmamakta ve tekrar edilmesi gerekebilmektedir. Ancak hastanın kabul etmemesi gibi sebeplerle çoğu zaman yeni biyopsi de alınmamaktadır. Mutasyon analizi tespitinin başarısız olmasının nedenleri arasında çoğunlukla ilk biyopsi materyalinin az olması ve az olan bu materyalin histolojik ayrımın yapılmasında immünohistokimyasal boyamalar için kullanılmasında yetersiz kalabilmesidir. Bu gibi nedenlerle mutasyon analizinin yapılamaması, hastanın sağ kalımına olumlu etki yapması beklenen hedefleyici tedavileri almasına engel olmaktadır. Bu sorunları aşmak için hızlı, düşük maliyetli, invaziv olmayan ve tedavi sonrası tekrarlanabilecek yöntemlere ihtiyaç vardır. Ayrıca, bireyselleştirilmiş tedavi sonrası hastalığın progresyonu durumunda tedaviye direnç geliştiren yeni mutasyonların saptanması ve başka hedefleyici tedavinin kullanılabilmesi için yeni yöntemler önerilmektedir. Bu yöntemlerden birisi de likit biyopsi testidir (LB).

Sıvı veya sıvı faz biyopsisi olarak da bilinen likit biyopsi, kan gibi solid olmayan biyolojik dokunun örnekleme ve analizidir (Solomon ve diğ. 2014).

Bir tümör kitlesinden ayrılarak kanda serbest olarak dolaşan hücreler dolaşımdaki tümör hücresi (circulating tumor cell-CTC) olarak tanımlanır. Bunlar tek tek ya da birbirlerine tutunmuş küçük hücre grupları şeklinde olabilmektedir. CTC'lerin önemli bir kısmı immünsistem tarafından yıkıma uğratılır ve kanda serbest dolaşan tümör DNA'sı (circulating cell free tumor DNA- ccfDNA) açığa çıkar. Kalan tümör hücreleri genetik özelliklerinin sağladığı üstünlükle organ/doku yerleşkelerine tutunur ve çoğalırlar (metastaz).

Dolaşımdaki tümör hücreleri (circulating tumor cell-CTC), kanda serbest dolaşan tümör DNA'sı (circulating cell free tumor DNA-ccfDNA) ya da dolaşımdaki serbest DNA'lar (cell free DNA-cfDNA) likit biyopsi ile tespit-analiz edilmekte ve prognostik bir model olarak kullanılmaktadır. Ayrıca birçok kanserde FDA tarafından kabul edilmiştir (Crowley ve diğ. 2013). Kanser çalışmalarındaki likit biyopsilerde tümöre ait olan ve dolaşımda serbest olarak bulunan hücre ve/veya diğer genetik materyal kullanılmaktadır ancak bunlardan çoğunlukla kullanılan cfDNA'dır (Karachalio ve diğ. 2015).



Çizim 1.8. ccfDNA'dan mutasyon tespiti

1.5. Yeni Nesil Dizileme-Next Generation Sequencing (NGS)

Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, dizileme yapılabilmektedir. Yapılan bir çalışmada E. coli genomu dört kere, her bir koşmada 400.000 okuma yapılarak de novo dizilenmiş ve sekanslamaların %99.997 ila %99.999 arasında doğrulukla yapıldığı tespit edilmiştir (Margulies ve diğ. 2005).

Yeni nesil DNA dizileme teknolojisi hayal bile edilemeyecek kadar çok bilgi ve yeni yaklaşımlar sağlar. Bütün bunlara rağmen bu kadar çok bilginin depolanması, analizi ve değerlendirmesinde büyük güçlükler vardır. Ayrıca bu yeni sistemin başarılı bir şekilde kullanılması için gelişmiş biyoinformatik analiz araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır.



2. AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, solid biyopsi için materyalin yetersiz gelmesi, direnç gelişimi durumunda biyopsi tekrarının gerekmesi ve tedavi sırasında genetik değişikliklerin eş zamanlı takip edilebilmesi durumlarında yeni bir yöntem olan likit biyopsi (LB) testinin etkinliğinin araştırılmasıdır.

LB noninvaziv bir yöntem olup periferik kandan genetik analiz yapmayı sağlayan bir yöntemdir. Yapılan bu çalışma ile meme kanseri hastalarında farklı varyasyonlar saptanmıştır. Saptanan varyasyonlardan bazılarının ilaç ilişkili varyant olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bilgilerle tedavinin şekillenmesinde klasik kemoterapik ilaçların yerini varyasyona özgü akıllı ilaçların alması amaçlanmaktadır. Ayrıca tanıya yardımcı olmak ve tedaviyi yönlendirmek te bu çalışmanın hedefleri arasında yer almaktadır.

3. YÖNTEM

Bu yüksek lisans tezi çalışmasında Şubat 2018- Mart 2019 tarihleri aralığında, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı'ndan yönlendirilen meme kanseri tanı hastaların klinik ve laboratuvar sonuçları incelenmiş ve hastalığın tanısındaki önemli parametreler hastaların var olan dosyalarından elde edilip retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Hastaların takibinde Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Onkoloji Anabilim Dalı'ndan istenen likit biyopsi testi Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında yapılmıştır.

Bu çalışmada hastalardan alınan periferik kandan cell-free DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan hastaların her biri farklı bir barkod ile işaretlenmiş ve hastalara ait kütüphane oluşturulmuştur. Bu kütüphanenin emülsiyon PCR yöntemi ile çok sayıda kopyası oluşturulmuştur. Elde edilen DNA kopyaları Ion-530 chip'e yüklenerek Yeni Nesil Dizi Analizi (Next Generation Sequencing- NGS) yöntemiyle dizilenmiştir. Cihazdan alınan veriler TorrentSuite TM Software v5.2.1 ve IonReporter TM Software v5.2 programları ile analiz edilmiştir.

3.1. Kullanılan Yöntem

3.1.1. Cell-free DNA İzolasyonu

- Hastadan alınan 30 ml periferik kan hemogram tüpüne alındı.
- Periferik kan 50 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 2000 g, +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi.
- Tüm plazma yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. 16000 g, +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi.
- 10 ml plazma yeni bir santrifüj tüpüne alındı.
- 12,5 ml MagMax Cell Free DNA İsolotion Lysis/Binding Solüsyonu ve 150 µl MagMax Cell Free DNA Magnetic Beads (manyetik boncuk) plazma üzerine eklendi.
- Santrifüj tüpü alt üst edildi ve 10 dakika vorteks yapıldı.
- Falkon DynaMag-50 Magnet (manyetik blok) üzerine yerleştirilip 5 dakika beklendi.

- Süpernatantın tamamı atıldı ve tüp manyetik bloktan alındı.
- Manyetik boncuklar 1 ml MagMax Cell Free DNA Isolation Wash Solüsyonu ile süspanse edildi.
- Tüm süpernatant 1,5 ml'lik PCR tüpüne aktarıldı.
- Tüp DynaMag-2 Magnet (manyetik blok) üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinden alındı, 1 ml %80 lik taze etil alkol ile süspanse edilip 30 saniye vorteks yapıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
- Alkolün tamamen uzaklaşması için 4 dakika kurumaya bırakıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinden alınıp 400 µl 0,1 X TAE buffer eklendi ve 5 dakika vorteks yapıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra DNA'yı içeren süpernatant yeni bir 1,5 ml'lik PCR tüpüne aktarıldı.
- Süpernatanta 500 µl MagMax cell free DNA Isolation Lysis Binding Solüsyon ve 10 µl MagMax Cell Free DNA Magnetic Beads eklenip 5 dakika vorteks yapıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinden alınıp 1 ml MagMax Cell-Free DNA Isolation Wash Solüsyon eklendi ve 30 saniye vorteks yapıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinden alınıp 1 ml %80 lik taze etil alkol eklendi ve 30 saniye vorteks yapıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
- Alkol yıkaması tekrar edildi.
- Alkolün tamamen uzaklaşması için 3-5 dakika kurumaya bırakıldı.
- 15 µl MagMax Cell-Free DNA Isolation Elution solüsyon eklenip 5 dakika vorteks yapıldı.
- Tüp manyetik blok üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra DNA'yı içeren süpernatantın tamamı yeni bir 1,5 ml'lik PCR tüpüne aktarıldı.

- Qubit dsDNA HS Assay Kit ile ölçüm solüsyonu hazırlandı.
- Qubit 3 Fluorometer cihazında DNA konsantrasyonu ölçüldükten sonra tüp -20 °C ye kaldırıldı.
- DNA konsantrasyonunun en az 2 ng/ µl ve üzeri olması gerekmektedir.

3.1.2. Kütüphane Oluşturma

- İzole edilen DNA'lar 1 µl de 50 ng olacak şekilde sulandırıldı.

Çizelge 3.1. Thermal-Cycler'da PCR bileşenleri

Bileşen	Hacim
cfDNA 1-50 ng	X µl
Nuclease-free water	13-X µl
cfDNA panel	2 µl
cfDNA Library PCR Master Mix	15 µl
Total hacim	30 µl

- Plate'e Çizelge 3.1'deki bileşenler sırasıyla eklendi.
- Plate şeffaf kaplama film ile kapatıldı.
- Plate kısa bir vorteks yapıldıktan sonra 300 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Plate thermal-cycler'a yerleştirilerek Çizelge 3.2'deki program çalıştırıldı.

Çizelge 3.2. Thermal-Cycler'da PCR protokolü

	Sıcaklık °C	Süre
bekleme	98	2 dakika
2 döngü	98	30 saniye
	64	2 dakika
	62	2 dakika
	60	4 dakika
	58	2 dakika
	72	30 saniye
bekleme	72	2 dakika
bekleme	4	sonsuz

- Thermal-cycler'dan alınan plate 300 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Şeffaf kaplama film uzaklaştırıldı.
- 45 µl (örnek hacmi x 1.5) Agencourt AMPure XP Reagent (manyetik boncuk) her kuyuya eklenerek plate şeffaf kaplama film ile kapatıldı.
- 15 saniye vorteks yapıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Vorteks ve inkübasyon işlemi tekrar edildi ve plate 300 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Şeffaf kaplama film dikkatlice plate'ten uzaklaştırıldı.
- Plate, DynaMag-96 Slide'a (manyetik stand) alındı ve 5 dakika bekletilip süpernatant dikkatlice atıldı.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye bekletilip süpernatant dikkatlice atıldı.
- Alkol yıkaması tekrar edildi ve süpernatant dikkatlice atıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- Plate manyetik standı alındı.
- Her bir kuyuya 24 µl Low TE Buffer eklendi.
- Plate şeffaf kaplama film ile kapatılarak kısaca vorteks yapıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Plate 300 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Şeffaf kaplama film uzaklaştırıldı ve plate manyetik stand üzerine alınıp 2 dakika bekletildi.
- Plate manyetik stand üzerinde tutulmaya devam edilerek 23 µl süpernatant farklı kuyulara aktarıldı.

Çizelge 3.3. Thermal-Cycler'da PCR bileşenleri

Bileşenler	Hacim
DNA	23 µl
Tag Sequencing BC (#1-48)	1 µl
cfDNA Library Primer P1	1 µl
cfDNA Library PCR Master Mix	25 µl
Toplam hacim	50 µl

- Plate'e sırasıyla Çizelge 3.3'teki bileşenler dağıtıldı.
- Plate şeffaf kaplama film ile kapatılarak 15 saniye vorteks yapıldı ve 1 dakika 300 g'de santrifüj edildi.

Çizelge 3.4. Thermal-Cycler'da PCR protokolü

	Sıcaklık °C	Süre
bekletme	98	2dk
18 döngü	98	15 sn
	64	15sn
	72	15sn
bekletme	72	5dk
bekletme	4	sonsuz

- Plate Thermal-Cycler'a yerleştirilerek program çalıştırıldı.
- Thermal-cyclerdan alınan plate 300 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Şeffaf kaplama film dikkatlice kaldırılarak her kuyuya 57.5 µl manyetik boncuk eklendi. Plate film ile kapatıldı.
- Plate 15 saniye vorteks yapıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Plate 300 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve film dikkatlice çıkarıldı.
- Plate manyetik standa alındı ve 5 dakika manyet üzerinde bekletildi. Süpernatant pellete dokunmadan dikkatlice atıldı.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklendi. Plate 30 saniye oda sıcaklığında manyetik stand üzerinde bekletildi. Süpernatant pellete dokunmadan dikkatlice atıldı.
- Alkol yıkaması tekrar edildi.
- Plate manyetik stand üzerinde tutulmaya devam edilerek 5 dakika kurumaya bırakıldı.
- Plate manyetik stand üzerinden alınarak her bir kuyuya 50 µl LOW TE Buffer eklendi ve plate şeffaf kaplama film ile kapatıldı.
- Plate kısaca vorteks yapıldı ardından 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

- Plate 300 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından şeffaf kaplama film çıkarıldı.
- Plate manyetik stand alınarak 2 dakika inkübe edildi ve 50 µl süpernatant yeni kuyulara aktarıldı.
- Plate manyetik stand üzerinden alınarak her bir kuyuya 50 µl manyetik boncuk eklendi.
- Plate şeffaf kaplama film ile kapatılarak kısaca vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Plate 300 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından şeffaf kaplama film dikkatlice çıkarıldı.
- Plate manyetik stand alındı ve 5 dakika manyetik stand üzerinde bekletildi. Ardından pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice atıldı.
- Her bir kuyuya 150 µl %80 alkol eklendi. Plate 30 saniye oda sıcaklığında manyetik stand üzerinde bekletilip süpernatant dikkatlice atıldı.
- Alkol yıkaması tekrar edildi.
- Plate manyetik stand üzerinde tutulmaya devam edilerek 5 dakika kurumaya bırakıldı.
- Plate manyetik standın üzerinden alınarak her bir kuyuya 30 µl LOW TE Buffer eklendi.
- Plate şeffaf kaplama film ile kapatılarak kısaca vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Plate 300 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve şeffaf kaplama film çıkarıldı.
- Plate manyetik stand alınarak 2 dakika inkübe edildi ve 28 µl süpernatant aynı plate üzerinde yeni kuyulara aktarıldı.
- Süpernatantın tamamı yeni 0,1'lik PCR tüpüne alındı ve buz aküsü üzerinde bekletildi.
- 68 pM E.coli DH10B Ion Control Library'den 10 kat seri dilüsyon halinde 5 standart hazırlandı.
- Örnek için; 1/100 ve 1/1000 kütüphane dilüsyonları hazırlandı.

Çizelge 3.5. Real-Time PCR Bileşenleri

Bileşenler	96-well plate	384 well plate
2X Taqman master mix	10 µl	5 µl
20X Ion Taqman assay	1 µl	0,5 µl
Toplam hacim	11 µl	5,5 µl

- Çizelge 3.5'deki bileşenler ile PCR karışımı hazırlandı.
- Light Cycler 480 plate'ine standart ve hasta her biri 3 kopya olacak şekilde her bir kuyuya 11'er µl karışım dağıtıldı.
- 1/1000 DNA dilüsyonu 3 kopya olacak şekilde her bir kuyuya 9'ar µl pipetaj yapılarak dağıtıldı.
- Standartlar her biri 3 kopya olacak şekilde her bir kuyuya 9'ar µl dağıtıldı.

Çizelge 3.6. Light-Cycler-480'de Real-Time PCR protokolü

	Sıcaklık	Süre
bekleme	50 °C	2 dakika
bekleme	95 °C	20 saniye
40 döngü	95 °C	1 dakika
	60 °C	20 saniye

- Plate Light-Cycler-480'e yerleştirilerek Çizelge 3.6'daki program çalıştırıldı.
- PCR sonrası çıkan 3 sonucun ortalaması alındı ve dilüsyon katsayısıyla çarpıldı.
- 100 pM'lik ve 8 pM'lik havuz oluşturuldu.

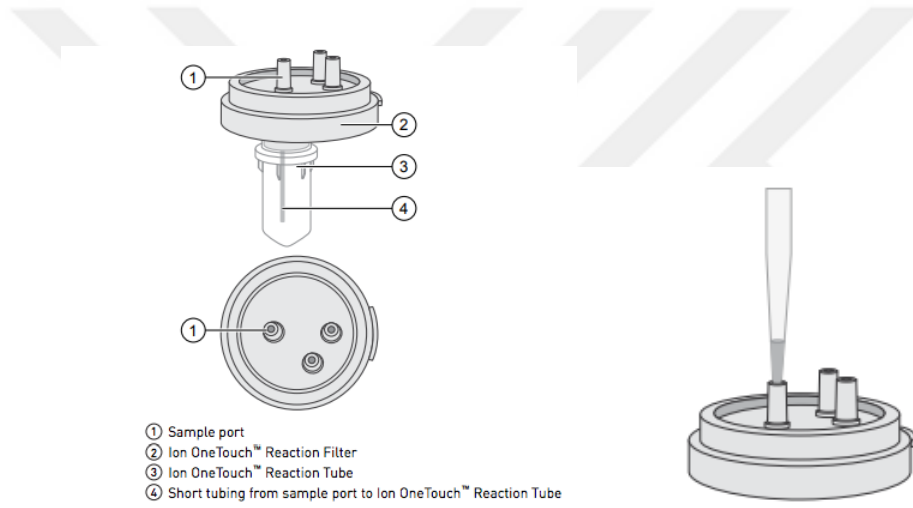
3.1.3. Emülsiyon PCR

- 2 ml Ion S5 Reagent içerisine Çizelge 3.7'deki bileşenler sırası ile eklendi.
- Hazırlanan karışım 5 saniye vorteks yapıldıktan sonra kısaca santrifüj edildi.

Çizelge 3.7. Amplifikasyon Solüsyon Bileşenleri

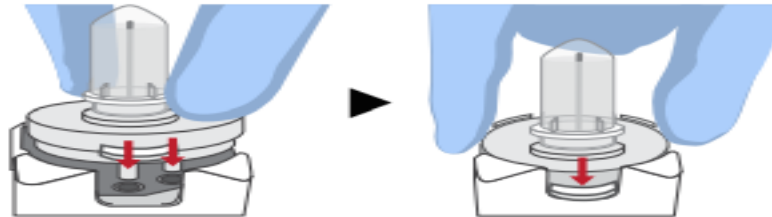
Bileşenler	Hacim
Nuclease free water	80 µl
Ion S5 Enzyme Mix	120 µl
Ion Sphere Particles	100 µl
Dilue library-8 pM	100 µl
Toplam hacim	2400µl

- Amplifikasyon solüsyonu ve 200 µl Ion OneTouch Reaction Oil Çizim 3.1’de gösterildiği şekilde Install The Filled Ion One Touch Reaction Filtrenin örnek portundan yüklendi.



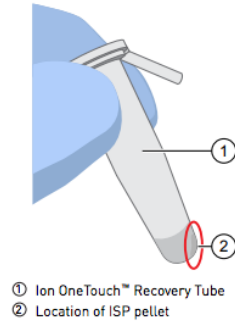
Çizim 3.1. Install The Filled Ion One Touch Reaction Filtre

- Ion One Touch 2 cihazı hazırlandı.
- Filtre Çizim 3.2’de gösterildiği gibi Ion One Touch 2 cihazına yerleştirilip çalışma başlatıldı.



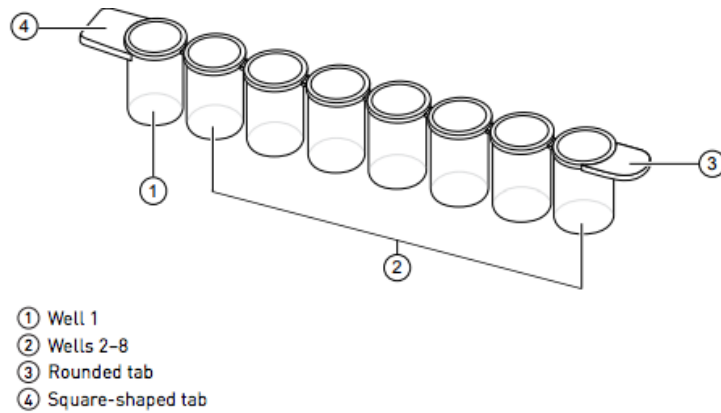
Çizim 3.2. Filtre'nin Yerleştirilmesi

3.1.4. Yıkama



Çizim 3.3. Recovery Tüp

- 2 recovery tüpteki süpernatant 100 µl kalacak şekilde atıldı.
- Pipetaj yapıldıktan sonra tüplerdeki tüm sıvı yeni bir 1,5 ml'lik PCR tüpüne aktarıldı.
- Recovery tüplerin çeperi 100'er µl nülease free water ile yıkanıp tüm sıvı yeni PCR tüpüne eklendi ve üzerine 600 µl nülease free water konuldu.
- PCR tüpü 30 saniye vorteks yapıldıktan sonra 15500 g'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant 20 µl kalacak şekilde atıldı.
- 80 µl ISP Resuspension Solüsyon eklendi. 30 saniye vorteks yapıp 2 saniye santrifüj edildi.
- Pipetaj yapıp 100 µl nin tamamı ES8-Well Strip Box'daki 1. kuyucuğa yüklendi.



Çizim 3.4. ES8-Well Strip Box

- 100 µl Dynabeads MyOne Streptavidin C1 1,5 mL'lik PCR tüpüne koyuldu.
- Tüp DynaMag-2 Magnet (manyetik blok) üzerinde 2 dakika bekleldikten sonra süpernatantın tamamı atıldı.
- Pellet 1000 µl Ion OneTouch Wash Solution ile süspanse ettikten sonra 30 saniye vorteks yapıp 2 saniye santrifüj edildi.
- Tüp manyetik blok üzerinde 2 dakika bekletilip süpernatantın tamamı atıldı.
- Pellete 130 µl MyOne Beads Capture Solution eklendikten sonra 30 saniye vorteks yapıp 2 saniye santrifüj edildi.
- 130 µl nin tamamı ES8-Well Strip Box'daki 2. kuyucuğa yüklendi.
- ES8-Well Strip Box'daki 3. 4. ve 5. kuyucuklara 300'er µl Ion OneTouch ES Wash Solution yüklendi.

Çizelge 3.8. Melt-off Solüsyon Bileşenleri

Bileşenler	Hacim
Tween Solution	280 µl
1 M NaOH	40 µl
Total Hacim	320 µl

- Çizelge 3.8'deki bileşenlerle hazırlanan melt-off solüsyonundan 300 µl ES8-Well Strip Box'daki 7 numaralı kuyucuğa yüklendi.
- 6. ve 8. kuyucuklar boş bırakıldı.
- Ion One Touch ES cihazı hazırlandı ve ES8-Well Strip Box yerine yerleştirildikten sonra çalışma başlatıldı.
- İşlem bittikten sonra ürünü içeren PCR tüpü alınıp 15500 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldıktan sonra 100 µl nülease free water eklenip pipetaj yapıldı.
- 15500 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pelletin rengi kontrol edildi.
- Pellet kahverengi ise tüp manyetik blok üzerinde 4 dakika bekleldikten sonra süpernatantın tamamı yeni bir 1,5 ml'lik PCR tüpüne aktarıldı ve 15500 g'de tekrar 5 dakika santrifüj edildi.
- Pelletin rengi berrak ise son hacim 10 µl olacak şekilde süpernatant atılıp 90 µl nülease free water eklendi.

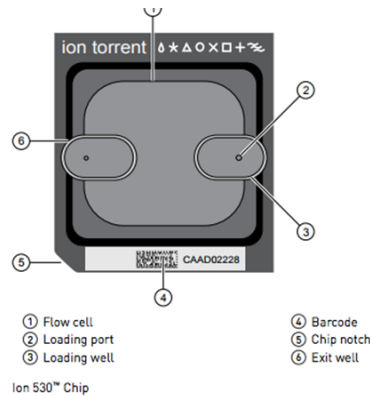
3.1.5. Ion-530 Chip'e Yükleme

- Çizelge 3.9'da gösterildiği gibi annealing buffer ve foaming buffer hazırlandı.

Çizelge 3.9. Solüsyon içeriği

% 50'lik Annealing buffer		Foaming buffer	
%100'lük annealing buffer	500 µl	%50'lik Annealing buffer	900 µl
Nülease free water	500 µl	Foaming buffer	100 µl
Toplam hacim	1000 µl	Toplam hacim	1000 µl

- 100 µl ürün içeren PCR tüpüne 5 µl Control Ion Sphere Partical eklendi.
- 15500 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant 10 µl kalacak şekilde atıldı.
- Tüpe 15 µl %100'lük annealing buffer ve 20 µl sequencing primer eklendikten sonra 10 saniye vorteks yapıp 2 saniye santrifüj edildi.
- 95 °C de 2 dakika 37 °C de 2 dakika Thermal cycle'da bekletildikten sonra oda sıcaklığına gelmesi için beklendi.
- Tüpe 6 µl Ion S5 sequencing polimerase ve 10 µl Ion S5 loading buffer eklendi.
- 10 saniye vorteks yapıp 2 saniye santrifüj edildikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 40 µl örnek Çizim 3.5'te gösterildiği gibi chipin yükleme portuna yüklendi.
- 20 µl örnek yükleme kuyucuğuna pipetlendikten sonra chip 5 dakika santrifüj edildi.



Çizim 3.5. Ion-530 Chip'e örnek yükleme

- Foaming buffer köpürtüldükten sonra 100 µl köpük yükleme portuna yüklendi.
- Çıkış portundaki köpükler pipetle atıldı ve 3 kez daha foaming buffer yüklendi.
- Aynı şekilde %50'lik annealing buffer yükleme portuna yüklendi ve çıkış portundaki köpükler pipetle atıldı.
- Chip NGS cihazına yerleştirildi ve çalışma başlatıldı.

3.1.6. NGS Sonuçlarının Analizi

Elde edilen dizi bilgisi Human Genome Build 19 ile eşleştirilmiştir. Meme kanseri panelinde AKT1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ESR1, FBXW7, KRAS, PIK3CA, SF3B1 ve TP53 gen hotspot bölgeleri incelenmiştir. Varyantlar Torrent Suite Sorftware, Ion Reporter ve Oncomine Knowledgebase Reporter programları kullanılarak analiz edilmiştir. Kitin standardize olduğu LOD (limit of detection) değeri minimum 0.05 olarak kabul edilmiştir. Bu değerin üstündeki frekansa sahip varyantlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda ACMG ve Clinvar veri bankaları kullanılarak varyasyon değerlendirmesi ve biyoinformatik analizler yapılmıştır. Klinik olarak anlamlı olan varyasyonlar DANN, SIFT ve mutation taster ile tespit edilmiş ve tüm parametreler göz önünde tutularak incelenmiştir.

3.2. Kullanılan Gereçler

3.2.1. Çalışmamız Süresince Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

- Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal Cyclers (ABD)
- LightCycler® 480 System (Roche, Almanya)
- Ion OneTouch™ ES System (Life Technologies-ABD)
- Ion OneTouch™ 2 System (Life Technologies-ABD)
- Ion S5 Ion Torrent™ Next-Generation Sequencing (Ion Torrent-ABD)
- Qubit -3 DNA Ölçüm Cihazı (Invitrogen-ABD)
- Ion 530™ Chip (Thermo Fisher Scientific-ABD)
- DynaMag™-50 Magnet (Invitrogen-ABD)
- DynaMag™-2 Magnet (Invitrogen-ABD)
- DynaMag™-96 Side Magnet (Invitrogen-ABD)
- Santrifüj (Beckmann Allegra X-12 Coulter, Fransa)
- Çip Santrifüjü (Life Technologies-ABD)

- PCR Tüpleri
- Ion One Touch Recovery Tüp
- Mikro Santrifüj (Sigma, ABD)
- Santrifüj Tüpleri (Nest, Çin)
- Vorteks (Biosan-Letonya Cumhuriyeti)
- Mikropipetler, 10ml, 100ml, 1000ml (Eppendorf, Almanya)
- Mikropipet Uçları (Nest, Çin)
- Light cycler480 Şeffâf Kaplama Film (Roche, Almanya)
- Light cycler480 well plate-96 (Roche, Almanya)
- Buz Dolabı (+4, -20°C) (Arçelik-Türkiye)
- Pastör pipeti (Nest, Çin)

3.2.2. Çalışmamız Süresince Kullanılan Kitleler

- MagMAX™ Cell Free DNA İzolasyon Kit
- Oncomine Breast cfDNA Assay Kit
- Ion S5 OT2 Supplies Kit (Life Technologies-ABD)
- Ion S5 OT2 Solutions Kit (Life Technologies-ABD)
- Qubit® dsDNA HS Assay Kit (İnvitrogen-ABD)
- Agencourt AMPure XP Reagent (Beckmann Coulter-Fransa)
- Dynabeads MyOne Streptavidin (Ion Torrent-ABD)
- Ion 520™& Ion 530™ Loading Reagents OT2 (Ion Torrent-ABD)
- Ion 520™& Ion 530™ OT2 Reagents (Ion Torrent-ABD)

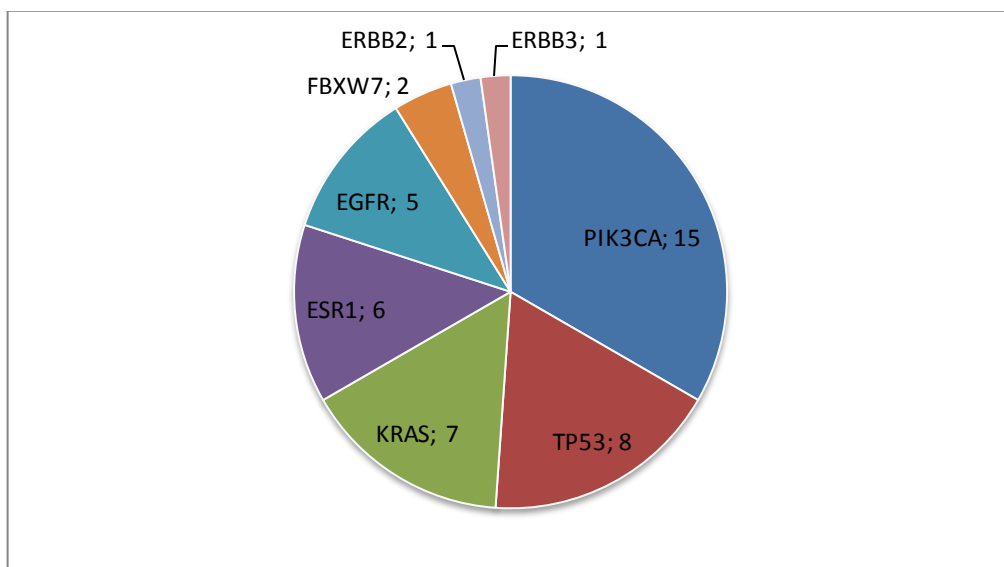
4. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen hastalar, Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'na likit biyopsi testi yaptırmak amacıyla başvuran meme kanseri tanısı almış 25 kadın olup bu kadınların yaş ortalaması 46,06'dır. Çalışmamızdaki hastaların % 16'sı vefat etmiştir.

Likit biyopsi testi ile meme kanseri hastalarında PIK3CA, TP53, EGFR, KRAS, ESR1, ERBB2, FBXW7, ERBB3, SF3B1 ve AKT1 genleri taranmaktadır. Hastaların % 21,74'ünde taranan bu 10 genin hiçbirinde varyasyon saptanmamıştır.

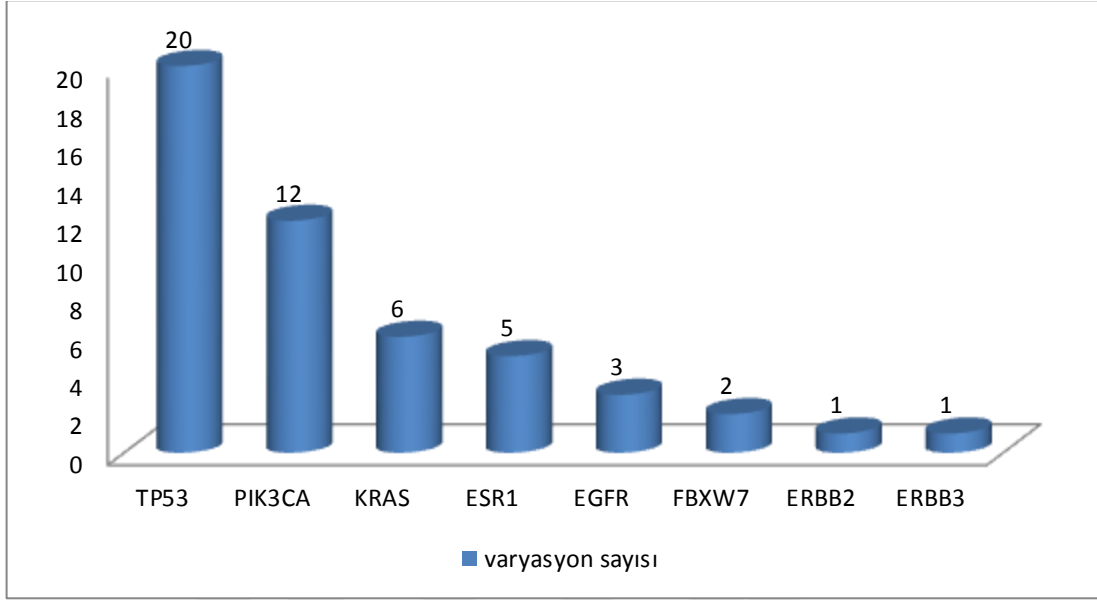
Hastaların % 12'sinde periferik kandan izole edilen cfDNA miktarı 2 ng/ul den az olduğundan testin sonraki aşamalarına geçilememiştir.

Likit biyopsi çalışılan meme kanseri tanılı hastaların % 78,26'sında varyasyon saptanmıştır. En sık varyasyon görülen genler Çizim 4.1 de gösterilmiştir. Varyasyon saptanan hastaların % 83,33'ünün PIK3CA geninde varyasyon bulunmuştur. TP53 genindeki varyasyonlar hastaların % 44,44'ünde görülerek ikinci sırada yer almaktadır. Hastaların % 38,89'unda KRAS geninde, % 33,33'ünün ESR1 geninde, % 27,78'inin EGFR geninde, % 11,11'inin FBXW7 geninde, % 5,55 'inin ERBB2 geninde ve % 5,55' inin ERBB3 geninde varyasyon saptanmıştır. Hastaların AKT1 ve SF3B1 genlerinde hiç bir varyasyon saptanmamıştır.



Çizim 4.1 Varyasyon Saptanan Genlerin Dağılımı

Taranan genlerde farklı sayılarda varyasyon saptanmıştır. Varyasyon sayılarının genlere göre dağılımı Çizim 4.2.'de gösterilmiştir. TP53 geninde görülen varyasyonlar çeşitlilik gösterirken diğer genlerde rastlanan varyasyonlar benzerlik göstermektedir.



Çizim 4.2. Genlere Göre Saptanan Varyasyon Sayısı

Varyasyon saptanan genlerden TP53 geninde 20 farklı varyasyon saptanmıştır. (Çizelge 4.1.) Bu varyasyonlardan 15'i olası patojenik varyant, 4'ü kesin olmayan patojenite ve 1'i patojenik varyanttır. TP53 geninde varyasyon saptanan 8 hastada bu 20 farklı varyasyon eşit dağılım göstermemekte ve her birinde farklı bir varyasyon görülmektedir.

Çizelge 4.1. TP53 Geninde Saptanan Varyasyonlar

Varyasyon	Varyasyonun türü	Hasta sayısı (n)
p.Gly245Ser	olası patojenite	1
p.Arg273His	olası patojenite	1
p.Arg158His	olası patojenite	1
p.Arg273Cys	olası patojenite	1
p.His214Pro	olası patojenite	1
p.Cys141Arg	olası patojenite	1
p.Glu286Gly	olası patojenite	1
p.Cys275Tyr	olası patojenite	1
p.Arg248Trp	olası patojenite	1
p.Met246Val	olası patojenite	1
p.Ser240Gly	olası patojenite	1
p.Ala189Val	olası patojenite	1
p.Tyr220Cys	olası patojenite	1
p.His178Tyr	olası patojenite	1
p.Glu180Gly	olası patojenite	1
p.Val157Ile	kesin olmayan patojenite	1
p.Arg156His	kesin olmayan patojenite	1
p.Gly154Asp	kesin olmayan patojenite	1
p.Pro177Leu	kesin olmayan patojenite	1
p.His178fs	patojenik	1

PIK3CA geninde 12 farklı varyasyon saptanmıştır. (Çizelge 4.2.) Bu varyasyonlardan 11'i olası patojenik, 1'i kesin olmayan patojenitedir. PIK3CA geninde saptanan p.Glu545Lys varyasyonu hastaların % 53,33'ünde bulunmaktadır ve bu gende en sık rastlanan varyasyon olmuştur. p.Met1043Val, p.Gly1049Ser, p.Glu542Lys varyasyonları PIK3CA geninde görülen varyasyonların % 20'sini oluşturmaktadır.

Çizelge 4.2 PIK3CA Geninde Saptanan Varyasyonlar

Varyasyon	Varyasyonun türü	Hasta sayısı (n)
p.Glu545Lys	olası patojenite	8
p.Met1043Val	olası patojenite	3
p.Gly1049Ser	olası patojenite	3
p.Glu542Lys	olası patojenite	3
p.His1047Arg	olası patojenite	2
p.Glu545Gly	olası patojenite	2
p.Gln546Arg	olası patojenite	2
p.Met1043Ile	olası patojenite	2
p.Asn1044Asp	olası patojenite	1
p.Glu453Gln	olası patojenite	1
p.His1047Asn	kesin olmayan patojenite	1
p.Glu453Lys	olası patojenite	1

KRAS geninde 6 farklı varyasyon saptanmıştır. (Çizelge 4.3.). p.Gly12Cys varyasyonu hastaların % 42,86'sında bulunmakta ve bu gende en sık rastlanan varyasyon olmaktadır.

Çizelge 4.3. KRAS Geninde Saptanan Mutasyonlar

Varyasyon	Varyasyonun türü	Hasta sayısı (n)
p.Gly12Cys	ilaç ilişkili	3
p.Gly12Asp	patojenik	2
p.Gly12Val	olası patojenik	1
p.Gly13Ser	ilaç ilişkili	1
p.Gly12Ser	ilaç ilişkili	1
p.Gly13Asp	ilaç ilişkili	1

EGFR geninde 3 farklı varyasyon saptanmıştır (Çizelge 4.4.). p.Leu858Pro varyasyonu EGFR geninde varyasyon bulunan hastaların % 80'inde bulunarak bu gende en sık rastlanan varyasyon olmaktadır. p.Leu861Pro varyasyonu da hastaların % 40'ında saptanarak EGFR geninde en sık rastlanan ikinci varyasyon olmaktadır.

Çizelge 4.4. EGFR Geninde Saptanan Varyasyonlar

Varyasyon	Varyasyonun türü	Hasta sayısı (n)
p.Leu858Pro	kesin olmayan patojenite	4
p.Leu861Pro	olası patojenite	2
p.Leu858Arg	ilaç ilişkili	1

ESR1 geninde 5 farklı varyasyon saptanmıştır (Çizelge 4.5.). p.Ser463Pro, p.Tyr537Ser, p.Asp538Gly varyasyonları hastaların % 33,33'ünde görülerek ESR1 geninde en sık rastlanan varyasyonlardır.

Çizelge 4.5. ESR1 Geninde Saptanan Varyasyonlar

Varyasyon	Varyasyonun türü	Hasta sayısı (n)
p.Ser463Pro	olası patojenik	2
p.Tyr537Ser	kesin olmayan patojenite	2
p.Asp538Gly	kesin olmayan patojenite	2
p.Tyr537Asn	kesin olmayan patojenite	1
p.Glu380Gln	olası patojenik	1

FBXW7 geninde p.Ser582Pro ve p.Ser582Leu varyasyonları, ERBB2 geninde p.Leu755Ser varyasyonu, ERBB3 geninde ise p.Gly284Arg varyasyonu saptanmıştır.

Çizelge 4.6. ERBB2, ERBB3 VE FBXW7 Genlerinde Saptanan Varyasyonlar

Genler	Varyasyon	Varyasyonun türü	Hasta sayısı (n)
p.FBXW7	Ser582Pro	kesin olmayan patojenite	1
	Ser582Leu	kesin olmayan patojenite	1
p.ERBB2	Leu755Ser	ilaç ilişkili	1
p.ERBB3	Gly284Arg	kesin olmayan patojenite	1

Tüm sonuçlara bakıldığında olası patojenik varyantların tüm varyantların % 60'mı oluşturduğu görülmektedir. Saptanan patojenik varyantlar ise % 4'ünü oluşturarak en az rastlanan varyasyon türü olmuştur (Çizim 4.8.).

Çizelge 4.7. Türlerine Göre Varyasyonlar

	PIK3CA	TP53	KRAS	EGFR	ESR1	FBXW7	ERBB2	ERBB3	toplam %
patojenik varyant		1	1						4
olası patojenik varyant	11	15	1	1	2				60
ilaç ilişkili varyant			4	1			1		12
kesin olmayan patojenite	1	4		1	3	2		1	24

Çizelge 4.8. Hastaların Tümünün TP53 Geninde Saptanan Varyasyonlar

HASTALAR	TP53											
1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	p.Arg248Trp	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	p.Arg273Cys	p.Gly245Ser	p.Tyr220Cys	p.Gly154Asp	p.Arg156His	p.Glu286Gly	p.Cys275Tyr	p.Met246Val	p.Ser240Gly	p.Ala189Val	p.Glu180Gly	p.Cys141Arg
5	p.His214Pro	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8	p.Arg158His	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10	p.His178Tyr	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12	p.Arg273His	p.His178fs	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
13	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
15	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
16	p.Pro177Leu	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
18	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
20	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
21	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
22	p.Val157Ile	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
23	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
24	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
25	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Çizelge 4.9. Hastaların Tümünün PIK3CA Geninde Saptanan Varyasyonlar

HASTALAR	PIK3CA							
1	x	x	x	x	x	x	x	x
2	p.Met1043Val	x	x	x	x	x	x	x
3	x	x	x	x	x	x	x	x
4	p.Glu545Lys	p.His1047Arg	p.Met1043Val	p.Glu545Gly	p.Gly1049Ser	p.Gln546Arg	p.His1047Asn	p.Asn1044Asp
5	p.Glu545Gly	p.Gly1049Ser	x	x	x	x	x	x
6	p.Glu545Gly	x	x	x	x	x	x	x
7	p.Glu545Lys	x	x	x	x	x	x	x
8	x	x	x	x	x	x	x	x
9	p.Glu545Lys	p.His1047Arg	x	x	x	x	x	x
10	p.Glu545Lys	x	x	x	x	x	x	x
11	p.Glu545Lys	x	x	x	x	x	x	x
12	p.Glu545Lys	x	x	x	x	x	x	x
13	x	x	x	x	x	x	x	x
14	p.Glu542Lys	p.Glu453Gln	x	x	x	x	x	x
15	x	x	x	x	x	x	x	x
16	p.Gly1049Ser	p.Gln546Arg	p.Glu542Lys	x	x	x	x	x
17	x	x	x	x	x	x	x	x
18	p.Glu545Lys	x	x	x	x	x	x	x
19	x	x	x	x	x	x	x	x
20	p.Met1043Ile	x	x	x	x	x	x	x
21	p.Glu545Lys	x	x	x	x	x	x	x
22	x	x	x	x	x	x	x	x
23	p.Met1043Ile	p.Met1043Val	x	x	x	x	x	x
24	x	x	x	x	x	x	x	x
25	p.Glu542Lys	p.Glu453Lys	x	x	x	x	x	x

Çizelge 4.10. Hastaların Tümünün EGFR, KRAS, FBXW7, ERBB2-3 ve ESR1 Genlerinde Saptanan Varyasyonlar

HASTALAR	EGFR		KRAS			FBXW7	ERBB2	ESR1		ERBB3
1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	p.Leu858Pro	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	p.Leu861Pro	p.Leu858Pro	p.Gly13Ser	p.Gly12Ser	p.Gly13Asp	p.Ser582Pro	p.Leu755Ser	p.Ser463Pro	x	x
5	p.Leu861Pro	p.Leu858Pro	p.Gly12Asp	x	x	x	x	x	x	x
6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7	x	x	x	x	x	x	x	p.Tyr537Ser	p.Asp538Gly	x
8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9	x	x	x	x	x	x	x	p.Tyr537Ser	x	x
10	x	x	p.Gly12Cys	x	x	x	x	x	x	x
11	x	x	p.Gly12Cys	x	x	x	x	x	x	x
12	x	x	p.Gly12Cys	x	x	p.Ser582Leu	x	x	x	x
13	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
15	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
16	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
18	x	x	x	x	x	x	x	p.Ser463Pro	p.Tyr537Asn	x
19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
20	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
21	x	x	p.Gly12Val	x	x	x	x	p.Asp538Gly	x	x
22	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
23	p.Leu858Arg	x	p.Gly12Asp	x	x	x	x	x	x	x
24	p.Leu858Pro	x	x	x	x	x	x	x	x	x
25	x	x	x	x	x	x	x	p.Glu380Gln	x	p.Gly284Arg

5. TARTIŞMA

Hedefe yönelik tedaviler, son 10 yılda kanser tedavisini belirgin bir şekilde değiştirmiş olsa da, bu tedaviler, tümör heterojenliği, tümörün moleküler evrimi, biyopsilerin maliyetleri, genomik değişime karşı etkili ilaçların eksikliği, moleküler testlerin teknik kısıtlamalarını içeren sorun ve zorlukları beraberinde getirmiştir (Meric-Bernstam ve Mills 2012).

En önemli biyolojik sorunlardan biri tümördeki heterojenitedir. Herhangi bir tedavi ile tedavi edilmiş neredeyse tüm tümörler tümör heterojenliği, klonal evrim ve seleksiyon sonucunda direnç kazanmaktadır. Gerlinger ve arkadaşları özellikle senkronize metastaz kanserli hastalar üzerinde etkili olan multiple tümör baskılayıcı genlerdeki büyük heterojeniteyi gözlemlemiştir. Çoğu durumda, sadece biyopsiler mevcut olduğundan tedavi kararları tek bir tümör biyopsisinin sonuçlarına bağlı olarak verilmektedir (Gerlinger ve diğ. 2012).

Sonuç olarak, ilgili lezyonlar gözden kaçabilmektedir. Ayrıca, çoğu durumda biyopsilerin elde edilmesi zor olmakta ve metastazların genetik yapıları hakkında hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle, tedavi kararları sıklıkla tümörün genetik bileşimi hakkında hiçbir bilgi olmadan verilmektedir. Ayrıca, tümörler evrimleşebilmekte ve alt klonlar, primer tümörle metastaz arasındaki spesifik sapmaların oranı ve düzenindeki farklılıklarla sonuçlanan süreç boyunca ortaya çıkabilmektedir (Kleppe ve Levine 2014).

Bu nedenle, tedaviye bağlı belirteçler tümörün ilerleyişi boyunca değişebildiğinden, birden fazla zaman noktasında belirteç incelemeleri hasta yönetimi için önemli bilgiler sağlayabilmektedir. Tedavi yanıtını izlemek için tümör genomunun seri örneklemesi, kişiselleştirilmiş tedavi için son derece önemli olmaktadır. Hasta için ciddi anlamda zor olabileceğinden ardışık biyopsiler neredeyse imkansız görünmektedir (Robertson ve Baxter 2011).

Bu nedenle yeni noninvaziv bir yöntem hasta takibi yapmakta son derece faydalı olabilmektedir. Biz de bu çalışmamızda likit biyopsi yöntemiyle hedefe yönelik tedaviye yardımcı olmayı amaçlamaktayız.

Meme kanseri erkeklerle karşılaştırıldığında, kadınların yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski yaklaşık 100 kat daha yüksektir (Altekruse ve diğ. 2010). Bizim çalışmamızda da hastalarımızın tamamı kadın olduğundan bu bilgi literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

TP53 geni 17. kromozomun p13-1 bandına yerleşmiştir ve moleküler ağırlığı 53 kD'luk nükleer bir proteini kodlamaktadır. TP53 geninin her iki alleldeki kaybı veya nokta mutasyonları çeşitli tümörlerde ve meme kanserlerinde gösterilmiştir. Meme kanserlerinde Tp53'ün yaklaşık %60'ının nokta mutasyonu şeklinde bulunduğu, bunun birçok kanser tipinde kimyasal kanserojenlerle olduğu ileri sürülmüştür (Sirvent ve diğ. 2001).

Mutant p53 proteinleri çeşitli kanserlerde aşırı ifade edilmektedir. Mutant p53 proteini, normal p53 proteininin inhibisyonuna neden olarak transformasyonda, metastazda ve ilaç dirençliğinde rol oynamaktadır (Goh ve diğ. 2011). P53 mutasyonunun oranı ise kanserin tipine göre değişkenlik göstermektedir. Meme kanserin tipinde TP53 mutasyon oranı % 25'tir (Olivier ve diğ. 2010). Bizim çalışmamızın sonucunda da hastaların % 44'ünün TP53 geninde varyasyon saptanmıştır.

Walerych ve arkadaşları meme kanserinde en çok saptanan mutasyonların, 6. ekzonda bulunan p.Arg248Gln ve 7. ekzonda bulunan p.Arg273His olduğunu söylemişlerdir. Bu değişimler TP53'ün DNA'ya bağlanma özelliğini etkilediğinden "bağlama mutasyonları" olarak adlandırılmaktadır (Walerych ve diğ. 2012). Bu tez çalışmasında da Tp53 geninin 248 ve 273 pozisyonlarında çeşitli varyasyonlar saptanmıştır. Saptanan bu varyasyonlar p.Arg248Trp (n:1), p.Arg273His (n:1) ve p.Arg273Cys(n:1)'dir.

P53 geninde altı hot-spot mutasyon tanımlanmıştır. Altı aminoasit rezidüsünü etkileyen bu mutasyonlar, p53 mutasyonlarının %30'unu oluşturmaktadır. Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 ve Arg282 rezidüleri arasında en çok mutasyon saptanan aminoasitler ise Arg248 ve Arg273'tür (Slee ve diğ. 2004). Yaptığımız çalışmada TP53 geninde çok sayıda varyasyon saptanmış olup bu varyasyonların % 25'i Arg aminoasitinde gözlenmektedir. Bu varyasyonlar Arg273, Arg248, Arg156 ve Arg158'dir.

Fosfatidilinositol-4,5- bifosfat -3-kinaz alt ünite alfa (PIK3CA) geni fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)'in 110 α -katalitik alt ünitesini kodlamaktadır. Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) heterodimer yapıda bir lipit kinazdır ve epitelial hücrelerin sinyalleşmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Economopoulou ve diğ. 2015). Adamczyk ve ark. yapmış oldukları ön çalışmada, adjuvan ortamda trastuzumab ile tedavi edilen HER-2-pozitif meme kanserli hastalarda PIK3CA mutasyon durumunun, PTEN ve androjen reseptör ekspresyonunun metastazsız sağkalım için prognostik değerini analiz etmişlerdir. PIK3CA mutasyon durumunun metastatik hastalar ve neoadjuvan trastuzumab tedavisi için bir belirleyici faktör olarak daha değerli olduğu görülmüştür (Adamczyk ve diğ. 2015). Board ve

arkadaşlarının yaptıkları çalışmada tedavi yanıtı ve hastalık prognozu ile ilgili somatik mutasyonların da cfDNA'da tespit edilebildiği görülmüştür. Tümör dokusundakilere uygun mutasyon oranları, tümör baskılayıcı gen TP53'te ve PI3K sinyal iletim yolunda önemli bir rol oynayan PIK3CA'da bulunmuştur (Board ve diğ. 2010). Bu sonuçlar, ctDNA'nın bir yandan primer tümörün özelliklerini yansıttığı hipotezini desteklerken, diğer yandan primer tümörden farklı olan metastazların özelliklerini göstermektedir (Madic ve diğ. 2010).

Ruth E. Board ve arkadaşlarının metastatik meme kanseri hastalarında PIK3CA mutasyonu incelemesi yaptıkları çalışmalarında 43 meme kanseri numunesinin 10'unda PIK3CA (% 23) mutasyonu tespit etmişlerdir. Bu 10 tümör dokusundan 2'si p.H1047R, 1'i p.H1047L, 5'i p.E545K ve 2'si p.E542K mutasyonlarıdır.

Metastatik meme kanserli hastalarının 46'sının plazma kaynaklı cfDNA'sından yapılan incelemede 13'ünde (% 28) PIK3CA mutasyonları tespit etmişlerdir. Bu 13 hastada tespit edilen mutasyonların 4'ü p.His1047Arg, 2'si p.His1047Leu, 6'sı p.Glu545Lys ve 1'i p.Glu542Lys mutasyonlarıdır. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar Ruth ve arkadaşlarının sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bulduğumuz sonuçlarda hastaların 13'ünde (%83,33) PIK3CA varyasyonu saptanmıştır. p.Glu545Lys 8 hastada (% 53,33), p.Glu542Lys 3 hastada (% 20) ve p.His1047Arg 2 hastada (%15,38) görülmüştür.

Meme kanseri hastalarında hormon reseptör (HR) pozitif olanlarda bir diğer önemli hedef östrojen reseptörü α (ESR1) 'dir (Yager ve Davidson 2006). Endokrin tedaviye dirençle ilişkili olan artmış ESR1 mutasyon oranları, özellikle metastatik meme kanserinde bulunmuştur (Merenbakh LK ve diğ. 2013). Bu mutasyonlar tümör dokusuna ek olarak, aynı zamanda ctDNA'da da saptanmıştır (Wang ve diğ. 2016). Chandarlapaty ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada hormon reseptör (HR) pozitif, HER2 negatif metastatik meme kanseri olan 541 hastanın ctDNA'sını p.Tyr537Ser ve p.Asp538Gly mutasyonları açısından analiz etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda hastaların 156'sında (% 28.8) bu iki mutasyondan en az birini saptamışlardır (Chandarlapaty ve diğ. 2016). Yaptığımız bu çalışmada hastaların 6'sında (%33,33) ESR1 geni varyasyonları saptanmıştır. Bu varyasyonlar p.Ser463Pro, p.Tyr537Ser, p.Asp538Gly, p.Tyr537Asn ve p.Glu380Gln'dir. Bizim çalışmamızda da varyasyon saptanan hastaların % 22,22'sinde p.Tyr537Ser ve p.Asp538Gly varyasyonları saptanarak Chandarlapaty ve arkadaşlarının çalışmasına benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Hücre membran reseptörü olan EGFR ailesi; EGFR, HER2, HER3 ve HER4'den oluşur. EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Bu aileye ait üyeler transfosforilasyon sonucu bir seri etkileşimler ile heterodimerler oluşturarak farklı protein ailelerinin aktivasyonunu düzenlemektedirler. Bu yol ile nükleusta transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu artar ve hücre bölünmesi uyarılır. Kanseri hücrelerinde EGFR gen amplifikasyonunun gözlenmesi onun onkogen olduğunun göstergesidir. Hormona bağımlı ve bağımsız meme kanseri hücre soyları karşılaştırıldığında ER yokluğu ve yüksek EGFR düzeyleri gözlenmektedir. Meme tümörlerinde yüksek EGFR düzeyleri, ER'den bağımsız olarak kötü prognozla ilişkisini gösterir. Meme kanserlerinde EGFR amplifikasyon bulgularına karşılık herhangi bir mutasyon bildirilmemiştir (Klijn ve diğ. 1992).



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzde kanserin erken tanısı ve tedavisi için çok sayıda çalışmalar yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında LB testi ile NGS yöntemi kullanılarak meme kanseri için önemli olan 10 gen bölgesi taranmış ve analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda hastalarda anlamlı sayılan varyasyonlar saptanmıştır. Bu varyasyonlar arasında ilaçla ilişkili varyasyonlar da bulunmaktadır. Ancak hala literatürde ilaçla ilişkilendirilmemiş varyasyonlar da saptanmıştır. Elde edilen verilerle LB'nin meme kanseri tanılı hastalarda tanı ve tedaviye yardımcı bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz. Gelecekte LB ile ilgili araştırmaların artmasıyla da LB'nin kanserin tanısı, tedavisi ve takibinde önemli bir rol oynayacağını düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- Adamczyk A, Niemiec J, Janecka A, ve diğ. Prognostic value of PIK3CA mutation status, PTEN and androgen receptor expression for metastasis-free survival in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab in adjuvant setting. *Pol J Pathol*.2015;66:p. 133-141.
- Adjei A. Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst*.2001; 93: 1062-74.
- Altekruse S, Kosary C, Krapcho M ve diğ. SEER cancer statistics review, Bethesda, MD: *National Cancer Institute*. 2010; 1975-2007.
- Akiyama T, Sudo C, Ogawara H ve diğ. The product of the human c-erbB-2 gene: A 185- Kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 1986; 232:1644.
- Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 2016; 93823.
- Board RE, Wardley AM, Dixon JM ve diğ. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120: 461–467.
- Carpten JD, Faber AL, Horn C. A Transforming Mutation in Pleckstrin Homology Domain Of AKT1 İn Cancer. *Nature volume*. 2007;448:439–444.
- Chandarlapaty S, Chen D, He W ve diğ. Prevalence of ESR1 mutations in cell-free DNA and outcomes in metastatic breast cancer: a secondary analysis of the BOLERO-2 clinical trial. *JAMA Oncol*.2016; 2: 1310–1315.
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F ve diğ. Liquid biopsy: monitoring of cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*.2013;10: 472-484.
- Economopoulou P, Dimitriadis G, ve Psyrri A. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev*. 2015. 41(1): p. 1-8.
- Evans TR J, Rowlands MG, Law M ve diğ. Intratumoral oestrone sulphatase activity as a prognostic marker in human breast carcinoma. *Br J Cancer*.1994; 69: 555-561.
- Ferahman M. Meme Kanserinde Güncel TNM Evrelemesi. 2006; 54:87-91.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S ve diğ. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 ;366:883–92.
- Goh A.M, Coffill C.R ve Lane D.P. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*.2011;223(2): p. 116-26.
- Haris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Nat Can Inst*.1996; 88(20): 1442-55.
- Karachalio N, Mayor C, Molina MA ve diğ. Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Annals of Translational Medicine*.2015;3: 36.
- Kleppe M ve Levine RL. Tumor heterogeneity confounds and illuminates: assessing the implications. *Nat Med*.2014;20:342– 4.
- Madic J, Kiiälainen A, Bidard FC ve diğ. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int J Cancer*.2015; 136: 2158–2165.
- Margulies M, Egholm M, Airman WE ve diğ. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80.
- Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A ve diğ. D538 G mutation in estrogen receptor-alpha: a novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res*. 2013; 73: 6856–6864.

- McCann AH, Dervan PA, O'Regan M ve diğ. Prognostic significance of c-erbB-2 and Estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 3296.
- Meric-Bernstam F, Mills GB. Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.*2012;9:542– 8.
- Miller VA. EGFR mutations and EGFR tyrosine kinase inhibition in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol Nurs.* 2008; 24(1): 27-33.
- Neville AM, Price KN, Gelber RD ve diğ. Axillary node micrometastases and breast cancer. *The Lancet.* 1991; 337: 110.
- Olivier M, Hollstein M ve P. Hainaut. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2010. 2(1): p. a001008.
- Robertson EG, Baxter G. Tumour seeding following percutaneous needle biopsy: the real story. *Clin Radiol.* 2011;66:1007–14.
- Slee EA, O'Connor DJ ve Lu X. To die or not to die: how does p53 decide. *Oncogene.*2004;12;23(16): p. 2809-18.
- Solomon BJ, Mok T, Kim DW ve diğ. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2167-77.
- Ross JS ve Fletcher J. Her-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol.*1999; 112(Suppl):53. 6.
- Sirvent JJ, Fortunato MA, Olona M ve diğ. Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *A study of 192 patients Histol Histopathol.*2001;16 (1):99-106.
- Smith JB ve Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol.* 1971; 231(25): 235-7.
- Walerych D, Napoli M ve diğ. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis.*2012; 33(11): p. 2007-17.
- Wallis YL ve Macdonald F. Oncogens. *J Clin Pathol: Mod Pathol*, 1999; 52: 55. 7.
- Wang P, Bahreini A, Gyanchandani R ve diğ. Sensitive detection of mono and polyclonal ESR1 mutations in primary tumors, metastatic lesions and cell free DNA of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.*2016; 22: 1130–1137.
- Weaver RF, Hedrick PW ve diğ. Genes and Cancer. *Genetics.*1997; 482-503.
- Wicki A, Herrmann R ve Christofori G. Kras in metastatic colorectal cancer. *Swiss Med Wkly.* 2010; 140: 13112.
- Yager JD ve Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med.*2006; 354: 270–282.

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

Şebnem ÖZDEMİR

İstanbul-1994

Türkiye Cumhuriyeti

Bekar

Yeşilkent mah. Ozanlar cad. 58.sok no:29 Avcılar/İSTANBUL

2. Eğitim Bilgileri

2000-2008 : Cumhuriyet İlköğretim Okulu (Avcılar/ İstanbul)

2008-2012 : Gümüşpala Lisesi (Avcılar/ İstanbul)

2012-2016 : Şeyh Edebalı Üniversitesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik (Bilecik)

Stajlar :

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi- Tıbbi Biyoloji ABD

Gebze Teknik Üniversitesi-Moleküler Biyoloji ve Genetik

Yabancı Dil : İngilizce

3. Ünvanı

2012-... : Moleküler Biyolog

4. Mesleki Deneyimler

Hücre Kültürü

Postanal Kromozom Analizi

FISH

Real-time PCR

NGS

Cf-DNA izolasyonu

Likit Biyopsi

5. Bilimsel Etkinlikler

Naci Çine, Malike İnce, **Şebnem Özdemir**, Ayşegül Şahin, Nilüfer Sertdemir, Gülhan Demir, Seda Reka, Pelin Balçık Erçin, Hakan Savlı. *Akciğer Kanserinde NGS Tabanlı Likit Biyopsi Yönteminin Etkinliği ve Kişiyeye Yönelik Tedavi Yaklaşımlarındaki Önemi*. Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, 2019-Kocaeli

6. İş Deneyimleri

Kocaeli Üniversitesi-Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji-Sitogenetik Laboratuvarı
(Nisan 2017-Temmuz 2017)

Kocaeli Üniversitesi-Tüp Bebek Ünitesi-Androloji ve Embriyoloji Laboratuvarı
(Temmuz 2017-Mayıs 2018)

Kocaeli Üniversitesi- Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji-Moleküler Genetik Laboratuvarı (Mayıs 2018-Haziran 2019)

EK 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
	Telefon	0262 303 74 50
	Faks	0262 303 74 63
	E-Posta	gokaetikurul@kocaeli.edu.tr

Başvuru Bilgileri	Araştırmanın Adı	Meme Kanseri Hastalarında; Likit Biyopsi Yönteminin Hastalık Tanısı Üzerine Etkinliğinin Araştırılması			
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2019/99			
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Doç. Dr. Naci ÇİNE			
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji AD			
	Destekleyici				
	Araştırmanın Türü	Yüksek Lisans Tezi			
	Araştırmaya Kabulün Merkezler	Tek Merkezli	Çok Merkezli	Ulusal	Uluslararası
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama
		Başvuru Dilekçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Başvuru Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırmanın Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dosya ve görüntü kayıtları gibi retrospektif arşiv taraması
	Araştırma Protokolü	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırma Bütçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Literatür Örneği	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Taahhütname	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	İzin Belgeleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başhekimlik Onayı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Özgeçmişler	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay Sonuç	09.04.2019/KOGOEK01.3	1/2

Karar Bilgileri	Karar No: <u>KÜ GOKAEK 2019/1707</u> Proje No: 2019/99 Tarih: <u>12.07/2019</u>
	Doç. Dr. Naci ÇİNE sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

Etik Kurul Üyeleri

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlgili		Toplantıda Bulunma		İmza
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyoistatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Semih Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> H	
Dr. Öğretim Üyesi Aslıhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	
Dr. Öğretim Üyesi Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> K	<input type="checkbox"/> E	<input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> H	

* Gerekeçe ve öneriler:

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay formu	09.04.2019/KOGOEK03.2	2/2