

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKCİĞER KANSERİNDE MOLEKÜLER TEDAVİ HEDEFLERİNİN SAPTANMASI
AMAÇLI VE YENİ NESİL DİZİLEME TABANLI TANI KİTİ

Tevfik Hatipoğlu

ARALIK

2016

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKCİĞER KANSERİNDE MOLEKÜLER TEDAVİ HEDEFLERİNİN SAPTANMASI
AMAÇLI VE YENİ NESİL DİZİLEME TABANLI TANI KİTİ

Tevfik Hatipoğlu

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. F. Ajlan TÜKÜN

ARALIK

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Tevfik Hatipoğlu

İmzası

ONAY

Prof. Dr. F. Ajlan Tükün danışmanlığında Moleküler Biyolog Tevfik Hatipoğlu tarafından hazırlanan bu çalışma Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye:.....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Akciğer Kanserinde Moleküler Tedavi Hedeflerinin Saptanması Amaçlı Ve Yeni Nesil
Dizileme Tabanlı Tanı Kiti

Tevfik Hatipoğlu

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. F. Ajlan Tükün

Akciğer kanseri tüm dünyada kanser nedenli ölümler arasında erkeklerde birinci kadınlarda ikinci sırada yer almaktadır. Her yıl dünya genelinde yaklaşık 1,5 milyon ölüme neden olan akciğer kanseri küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak %80'ini oluşturmaktadır. KHDAK tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yanında son yıllarda moleküler düzeyde hedefe yönelik tedavi yöntemleri gelişmektedir. KHDAK tedavisinde yol gösterici olan mutasyonların tek seferde ve az miktarda DNA örneği ile saptanması bu nedenle önem kazanmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı küçük hücreli dışı akciğer kanseri için moleküler tedavi hedefi olan mutasyonların tümünün tanınmasına yönelik yöntem geliştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda; gen bölgelerinin çoğaltılmasına yönelik primerler tasarlanmış ve belirlenen mutasyon bölgelerinin multipleks PCR yöntemi ile çoğaltılması ve barkodlama işlemi sonrasında yeni nesil dizileme platformu Illumina MiSeq ile dizileme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak KHDAK ile ilişkili olan EGFR, KRAS, AKT1, HER2, PIK3CA, BRAF, MEK1 ve ALK genlerinde bulunan nokta mutasyonların genomik DNA üzerinden ve ALK, ROS1 ve RET genlerinin oluşturdukları füzyonların mRNA'dan elde edilecek cDNA üzerinden multipleks PCR yöntemi ile saptanmasını sağlayacak yeni nesil dizileme tabanlı tanı yöntemi geliştirilmiştir.

2016, 53 sayfa

Anahtar kelimeler: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri; Yeni Nesil Dizileme; EGFR; KRAS; AKT1; HER2; PIK3CA; BRAF; MEK1; ALK; ROS1; RET

ABSTRACT

MSc Thesis

Next Generation Sequencing Based Diagnosis Kit for Determining The Molecular Targets of Therapy in Lung Cancer

Tevfik Hatipoğlu

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. F. Ajlan Tükün

Lung cancer is the leading cause of cancer death among men and the second among women worldwide. Each year lung cancer causes 1.5million deaths. Lung cancer is classified as small cell lung cancer and non small cell lung cancer. About %80 of lung cancer are non small cell lung cancer (NSCLC). In the treatment of NSCLC, the molecular targeted therapy approach is developing in recent years in addition to the surgical, radiotherapy and chemotherapy approaches. For this reason determining the NSCLC related mutations all at once with a small amount of DNA sample is gaining importance.

The aim of this thesis is to develop a novel method in order to screen the target mutations in molecular therapy of non small cell lung cancer. With this perspective primers were designed in order to amplify these gene regions, and after amplification with multiplex PCR method and barcoding process, sequencing was performed with the next generation sequencing platform Illumina MiSeq. As result, a diagnosis method based on next generation sequencing that determines the NSCLC related point mutations of EGFR, KRAS, AKT1, HER2, PIK3CA, BRAF, MEK1 and ALK genes from genomic DNA and fusions of ALK, ROS1 and RET genes from mRNA originated cDNA has been developed.

2016, 53 pages

Keywords: Non small cell lung cancer; Next generation sequencing; EGFR; KRAS; AKT1; HER2; PIK3CA; BRAF; MEK1; ALK; ROS1; RET

TEŞEKKÜR

“Akciğer Kanserinde Moleküler Tedavi Hedeflerinin Saptanması Amaçlı Ve Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Tanı Kiti” konulu tez çalışmasının seçiminde, yürütülmesinde, sonuçlandırılmasında ve sonuçlarının değerlendirilmesinde maddi ve manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Prof.Dr. F.Ajlan TÜKÜN’e teşekkür ederim. Yapılan analizlerde her türlü yardımı yapan, zaman harcayan, emek veren, tecrübesini paylaşan hocam Yrd.Doç.Dr. Kıvanç BİLECEN’e teşekkür ederim. Tez çalışması boyunca bana verdiği destek ve yardımlarından dolayı değerli laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışması boyunca her zaman yanımda olduklarını hissettiğim aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı’nın 0575.STZ.2013-2 kod numarası ile SANTEZ projeleri kapsamında sağladığı desteklerle gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	2-İ
ÖZET	2-ii
ABSTRACT	2-iv
İÇİNDEKİLER.....	2-vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	2-viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	2-ix
SİMGELER DİZİNİ.....	2-x
1 GİRİŞ.....	2-1
2 KURAMSAL TEMELLER	2-2
2.1 KANSER.....	2-2
2.1.1 AKCİĞER KANSERİ	2-2
2.1.2 TEDAVİ HEDEFİ GENLER	2-3
2.2 YENİ NESİL SEKANSLAMA	2-12
2.3 MULTİPLEKS PCR.....	2-12
3 GEREKÇE VE AMAÇ.....	3-13
4 MATERYAL VE YÖNTEM.....	4-14
4.1 MATERYAL.....	4-14
4.2 YÖNTEM.....	4-15
4.2.1 PRİMER TASARIMI	4-18
4.2.2 DNA İZOLASYONU	4-22
4.2.3 PRİMERLERİN VALİDASYONU.....	4-22
4.2.4 MULTİPLEKS PCR	4-25
4.2.5 BARKODLAMA.....	4-27
4.2.6 PURİFİKASYON	4-28

4.2.7	SEKANSLAMA	4-29
4.2.8	DİZİNİN ANALİZİ	4-30
4.2.9	MULTİPLEKS PCR VALİDASYONU	4-30
5	<u>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	5-31
5.1	PRİMERLERİN VALİDASYONU	5-31
5.2	MULTİPLEKS PCR VALİDASYONU.....	5-32
5.3	MULTİPLEKS PCR OPTİMİZASYONU.....	5-32
5.4	AMPLİKON OKUMA SAYILARI VE VARYASYON KATSAYILARI	5-37
6	<u>TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	6-43
6.1	TARTIŞMA	6-43
6.2	SONUÇ	6-47
7	<u>KAYNAKLAR</u>	7-49
8	<u>EKLER.....</u>	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
8.1	EK1:BAŞLIK 1.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
8.2	EK2:BAŞLIK 2.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
9	<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	8-53
10	<u>TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR.....</u>	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. EGFR sinyal yolağı	2-4.
Şekil 2.2. EGFR geninin kromozomal yerleşimi (Dierking & Schmidtke, 2014)	2-3.
Şekil 2.3. KRAS geninin kromozomal yerleşimi (9)	2-5.
Şekil 2.4. AKT1 geninin kromozomal yerleşimi (9)	2-6.
Şekil 2.5. HER2 geninin kromozomal yerleşimi (9)	2-7.
Şekil 2.6. PIK3CA geninin kromozomal yerleşimi (9)	2-7.
Şekil 2.7. BRAF geninin kromozomal yerleşimi (9)	2-8.
Şekil 2.8. MEK1 geninin kromozomal yerleşimi (9)	2-9.
Şekil 2.9. ALK geninin kromozomal yerleşimi (9)	2-9.
Şekil 2.10. ROS1 geninin kromozomal yerleşimi (9)	2-10.
Şekil 2.11. RET geninin kromozomal yerleşimi (9)	2-11.
Şekil 5.1. Pleks 1 primerleri ile tekli olarak çoğaltılan nokta mutasyonu bölgelerinin jel görüntüsü	5-31.
Şekil 5.2. Pleks 2 primerleri ile tekli olarak çoğaltılan nokta mutasyonu bölgelerinin jel görüntüsü	5-32.
Şekil 5.3. Multipleks olarak çoğaltılan nokta mutasyonu bölgelerinin jel görüntüsü	5-32.
Şekil 5.5. Multipleks PCR ile standart koşullarda amplikon okuma sayıları	5-33.
Şekil 5.6. Multipleks PCR ile düşük primer konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları	5-33.
Şekil 5.7. Multipleks PCR ile yüksek primer konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları	5-34.
Şekil 5.8. Multipleks PCR ile düşük MgCl ₂ konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları	5-34.
Şekil 5.9. Multipleks PCR ile yüksek MgCl ₂ konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları	5-35.
Şekil 5.10. Multipleks PCR ile düşük dNTP konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları	5-35.
Şekil 5.11. Multipleks PCR ile yüksek dNTP konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları	5-36.
Şekil 5.12. Multipleks PCR ile düşük PCR tamponu konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları	5-36.
Şekil 5.13. Multipleks PCR ile yüksek PCR tamponu konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları	5-37.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Kullanılan sarf malzemeler ve kullanım yerleri	4-14.
Çizelge 4.2. Kullanılan cihazlar	4-15.
Çizelge 4.3. Nokta mutasyonları	4-17.
Çizelge 4.4. Füzyon mutasyonları	4-18.
Çizelge 4.5. Nokta mutasyonu için çoğaltılacak bölgeler, primer çiftleri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün boyları	4-19.
Çizelge 4.6. füzyon mutasyonları için çoğaltılacak bölgeler, primer çiftleri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün boyları.....	4-20.
Çizelge 4.7. Mutasyon bölgelerini çoğaltmak için PCR'da kullanılan kimyasallar	4-23.
Çizelge 4.8. Mutasyon bölgelerini çoğaltmak için PCR'da kullanılan ısı döngüsü.....	4-24.
Çizelge 4.9. Mutasyon bölgelerini çoğaltmak için multipleks PCR'da kullanılan kimyasallar	4-26.
Çizelge 4.10. Mutasyon bölgelerini çoğaltmak için multipleks PCR'da kullanılan ısı döngüsü	4-26.
Çizelge 4.11. Barkodlama için PCR'da kullanılan kimyasallar	4-27.
Çizelge 4.12. Barkodlama için PCR'da kullanılan ısı döngüsü	4-28.
Çizelge 5.1. Multipleks PCR ile standart koşullarda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları.....	5-38.
Çizelge 5.2. Multipleks PCR ile düşük primer konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları.....	5-38.
Çizelge 5.3. Multipleks PCR ile yüksek primer konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları.....	5-39.
Çizelge 5.4. Multipleks PCR ile düşük MgCl ₂ konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları.....	5-39.
Çizelge 5.5. Multipleks PCR ile yüksek MgCl ₂ konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları.....	5-40.
Çizelge 5.6. Multipleks PCR ile düşük dNTP konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları.....	5-40.
Çizelge 5.7. Multipleks PCR ile yüksek dNTP konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları.....	5-41.
Çizelge 5.8. Multipleks PCR ile düşük PCR tamponu konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları	5-41.
Çizelge 5.9. Multipleks PCR ile yüksek konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları	5-42.

SİMGELER DİZİNİ

KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
AKT1	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1
ALK	Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
HER2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
MEK1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha
RET	Ret Proto-Oncogene
ROS1	ROS Proto-Oncogene 1 , Receptor Tyrosine Kinase
DNA	Deoksiribonükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
cDNA	Komplementar DNA
FISH	Fluoresan in situ hibridizasyon
RT-PCR	Gerçek zamanlı PCR
TKI	Tirozin kinaz inhibitörü



1 GİRİŞ

Kanser gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sağlık sorunlarında önde gelen hastalıklardandır. Kanser tedavisinde kanserin türü, hastalığın hangi aşamada teşhis edildiği, metastaz yapıp yapmadığı gibi olgular belirleyici olmaktadır. Cerrahi yöntemler, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler uygulamada faydalı sonuçlar verse de özellikle ileri aşama kanser olgularında tedavi sınırlı olarak sağlanmaktadır. Gelişmekte olan moleküler yöntemler ile kanser tedavisinde kişiye yönelik uygulamalar ön plana çıkmaktadır. Kişiye yönelik uygulamalarda hastalığın ayırt edici yönlerinin biyobelirteçler ile tanımlanabilmesi, mevcut olan ilaçlardan kişiye yönelik en iyi seçimin yapılabilmesi, seçilen ilacın yarar ve risk değerlendirmesi ile dozunun optimize edilmesi ve ilacın etkinliği ve toksisitesinin tespiti gibi konular gündeme gelmektedir (1).

Kanser nedenli ölümlerde akciğer kanseri en önde gelen kanser türlerindedir. İleri evre akciğer kanserinde kemoterapi en temel tedavi yaklaşımlarından birisi olsa da moleküler hedefli tedaviler bu hastalarda gelişen yeni moleküler çalışmalar ile önem kazanmaktadır. Bu tedavi yaklaşımının uygulanabilirliğinde hastalıkla ilişkili mutasyonların değerlendirilmesi için uygulanan dizileme yöntemi belirleyici olmaktadır. Sanger dizileme yöntemi yaygın bir yöntem olarak kullanılmasına karşın klonal mutasyonlar için düşük duyarlılıktadır. Gelişmekte olan yeni nesil dizileme platformları ise çoklu paralel dizileme özellikleri ile bu alanda yeni olanaklar sağlamaktadır. Tümör dokudan alınan sınırlı miktardaki biyopsi örneğinden çok sayıda mutasyon bölgesinin yüksek çözünürlükte taranabilmesi ile kişiye yönelik en etkili ilacın seçiminde yardımcı olmaktadır (2).

Moleküler tanı yöntemleri ile tümör dokusunda kanser oluşumunda yer alan moleküler yolların belirlenmesi ve ilaç hedefi olabilecek veya bu yolları etkileyebilecek mutasyonların saptanması da tedavi yöntemlerinde belirleyici olmaktadır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, kanser dokusunda ekspresyonu değişen pek çok gen olmasına karşın bu çalışma kapsamında ilaç hedefi olan ve tedavide belirleyici olan genlerdeki mutasyonlar için tanı yöntemi geliştirilmiştir. Bu mutasyonlar arasında EGFR, KRAS, AKT1, FGFR1, HER2, PIK3CA, BRAF, MEK1 gibi genlerde yer alan nokta mutasyonları ve ALK, ROS1 ve RET genlerinin oluşturduğu füzyonlar bulunmaktadır(3).

2 KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser

Vücut içerisinde bulunan canlı hücreler normal yaşam döngüsü içerisinde büyürler ve bölünerek yeni hücreleri oluştururlar. Bu aşamalar vücudun tüm organlarında farklı mekanizmalar sayesinde kontrol altında gerçekleşir. Kanser, bu kontrolün bozulması ve hücrenin sürekli bölünerek çoğalması sonucu oluşur. Kanser hücreleri ilk geliştikleri yerlerden metastaz ile farklı yerlere yerleşebilir ve burada da çoğalmaya devam edebilir. Kanser hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde önemli bir hastalık yükü teşkil etmektedir. Kanser sıklığı, nüfusun artması ve yaşam süresinin uzaması ile birlikte artış göstermektedir. Sigara yanı sıra ekonomik gelişmişlik ile birlikte artan obezite, sedanter yaşam ve değişen üreme alışkanlıkları gibi risk faktörleri de sıklığın artmasına yol açmaktadır. GLOBOCAN verilerine göre 2012 yılında dünya genelinde yaklaşık 14,1 milyon yeni kanser vakası görülürken, kansere bağlı yaklaşık 8,2 milyon ölüm gerçekleşmiştir. Kanserden kaynaklanan yük yıllar içinde az gelişmiş ülkeler yönünde bir değişim göstermiştir. Mevcut kanser vakalarının %57'sini ve kansere bağlı ölümlerin %65'ini az gelişmiş ülkeler oluşturmaktadır (4).

2.1.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri küçük hücreli ve küçük hücreli dışı olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri de histolojik türlerine göre skuamoz hücreli karsinoma, büyük hücreli karsinoma ve KHDAK'ın yarısından fazlasını oluşturan adenokarsinoma olmak üzere üç alt gruba ayrılır(5).

Akciğer kanserinin en önemli etiyolojik nedeninin sigara olduğu pek çok araştırmada gösterilmiştir. Sigara dışında akciğer kanserine yol açan diğer çevresel faktörler arasında radyoizotoplar, hardal gazı, radon gazı, asbest, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nikel, kadmiyum, inorganik asit, klorometil eter ve formaldehit bulunmaktadır(6).

GLOBOCAN verilerine göre 2012 yılında, dünya genelinde yaklaşık 1.824.700 yeni akciğer kanseri vakası görülürken yaklaşık 1.589.900 akciğer kanseri nedeni ölüm gerçekleşmiştir. Görülen yeni vakaların 1.241.600'ünü erkekler oluştururken 581.300'ünü kadınlar oluşturmaktadır. Gerçekleşen ölümlerin ise 1.098.700'ünü erkekler oluştururken 491.200'ünü kadınlar oluşturmaktadır. Bu rakamlara göre görülen yeni kanser vakalarında ve kanser nedeni ölümlerde akciğer kanseri erkeklerde birinci sırada yer alırken,

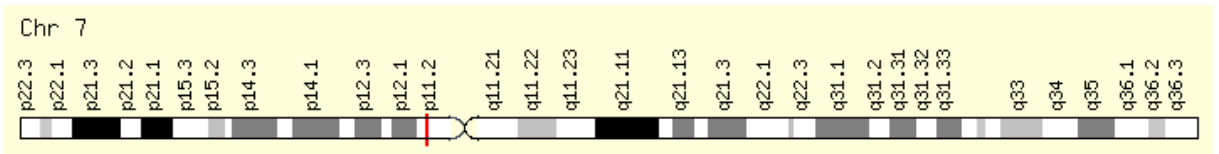
kadınlarda görülen yeni kanser vakalarında meme ve kolon kanserinden sonra üçüncü sırada, kanser nedenli gerçekleşen ölümlerde ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Gelişmiş ülkelerde görülen yeni kanser vakalarında akciğer kanseri erkeklerde 490.300 vaka ile prostat kanserinden sonra ikinci sırada yer alırken kadınlarda 267.900 vaka ile meme ve kolon kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Gerçekleşen kanser nedenli ölümlerde ise, gelişmiş ülkelerde, akciğer kanseri erkeklerde 416.700 ve kadınlarda 209.900 ölüm ile diğer kanser türleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde erkeklerde 751.300 yeni vaka ile akciğer kanseri birinci sırada yer alırken, kadınlarda 315.200 vaka ile meme ve serviks kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Kanser nedenli ölümlerde ise gelişmekte olan ülkelerde akciğer kanseri erkeklerde 682.200 ölüm ile birinci sırada yer alırken kadınlarda 281.400 ölüm ile meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır(4).

Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi verilerine göre akciğer kanseri Türkiye’de erkeklerde %27,7 gibi bir oranla en sık görülen birinci kanser türüken, kadınlarda %7,2 ile meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Akciğer kanserinde 5 yıllık sağ kalım oranı %9-20 arasındadır(7). Son yıllarda hastaya saptanan mutasyonlara göre kişiye özel tedavilerin uygulanması, 5 yıllık sağ kalım oranlarında olumlu sonuçlar alınmasını sağlamaktadır (8).

2.1.2 Tedavi Hedefi Genler

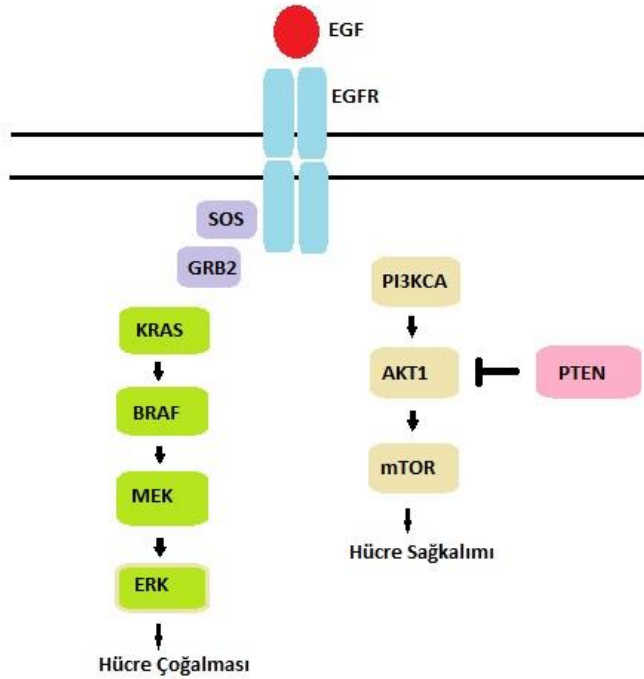
Akciğer kanserinin tedavisinde cerrahi girişim, radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Kemoterapi klasik tedavi yöntemi olmasına karşın moleküler hedeflere yönelik tedaviler etkinliğinin klasik tedavilere göre daha yüksek olması ve yan etkilerinin daha az olması nedeni ile tercih edilmektedir. Bu bölümde, KHDAK’de moleküler hedef olarak bugüne kadar tanımlanmış olan mutasyonların yer aldığı genler ve işlevlerine değinilecektir.

2.1.2.1 EGFR



Şekil 2.1. EGFR geninin kromozomal yerleşimi (9).

EGFR geni kromozom 7'nin p11.2 bölgesinde yer alır. *EGFR* geni 28 ekzon ile 1210 amino asit uzunluğundaki transmembran EGFR proteinini kodlar. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) EGFR/ERBB1, HER2/ERBB2/NEU, HER3/ERBB3 ve HER4/ERBB4'ü içeren tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir (10). Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), EGFR'ye bağlandıktan sonra, MAPK sinyal yolağını ve PI3K-Akt sinyal yolağını aktive eder. Hücrenin çoğalmasında, yaşamasında, farklılaşmasında, apoptozunda ve motilitesinde rol oynar (11). Kanser neovaskülarizasyonunda, invazyonunda ve metastazında etkili olduğu bilinmektedir.



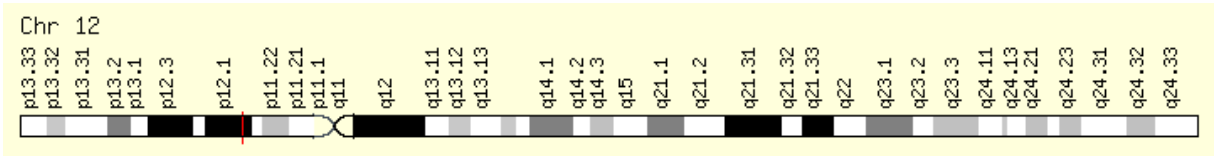
Şekil 2.2. EGFR sinyal yolağı

EGFR genindeki mutasyonlar beyaz ırk KHDAK hastalarının %10'u ve sarı ırk KHDAK hastalarının %40'ında görülmektedir (12). *EGFR* mutasyonları sigara içmeyenlerde, adenokarsinoma histolojik yapısında ve kadınlarda daha yaygındır (13). *EGFR* mutasyonu, *KRAS* ve *ALK* gibi diğer KHDAK onkogen mutasyonları ile birlikte görülmez. Klinik önemi olan mutasyonlar *EGFR* geninin tirozin kinaz bölgesini kodlayan 18-21. ekzonları arasında bulunur. *EGFR* mutasyonları ile KHDAK arasındaki bağlantının oldukça net olarak gösterilmesi nedeniyle *EGFR*'nin rutin analizi klinik uygulamada tedavi stratejisini belirlemektedir (14). Klinik önemi olan *EGFR* mutasyonları *EGFR* proteininin kinaz

aktivitesini artırır ve EGFR mutasyonu olan tümörlerde EGFR'ye özgü Tirozin kinaz inhibitörü (TKI) ilaçların etkinliğini sağlar. En sık görülen *EGFR* mutasyonları ekzon 19 delesyonları ile ekzon 21 L858R nokta mutasyonudur. *EGFR* mutasyonu olan olgularda ekzon 19 delesyonu yaklaşık olarak %45 oranında ve ekzon 21 L858R nokta mutasyonu %41 oranında görülmektedir (15). Diğer daha az rastlanan ve EGFR kinaz aktivitesini arttıran mutasyonlar %5'ten az görülür ve bunlar ekzon 18'de yer alan G719S/C/A ile S720F, ekzon 20'deyen alan V765A, T783A, S768I ve ekzon 21'de yer alan L861Q/R mutasyonlarıdır (16). *EGFR* genindeki diğer bazı mutasyonlar ise ilaç direncine neden olan mutasyonlardır. En yaygın ilaç direnci mutasyonu ekzon 20'deki T790M nokta mutasyonudur ve EGFR TKI direnci kazanan KHDAK hastalarının %50'sinde görülür. Daha az görünen direnç mutasyonları ekzon 20 D770_N771 insersiyon mutasyonlarını ve ekzon19 D761Y, ekzon 20 V769T ve ekzon 20 N771T nokta mutasyonlarını içermektedir (17).

EGFR hedefli ilaçlar EGFR'nin kinaz bölgesine bağlanarak kinaz aktivitesini inhibe ederler. Gefitinib, erlotinib, icotinib ilk nesil EGFR TKI ilaçlardır ve bu inhibitörler EGFR kinaz bölgesine geri dönüşümlü bağlanır (18). Afatinib, dacomitinib, neratinib ikinci nesil EGFR TKI ilaçlardır. Bu ilaçlar ErbB ailesinden pek çok reseptör hedefe karşı aktiftir ve kinaz bölgesine geri dönüşümsüz bağlanırlar (16).

2.1.2.2 KRAS



Şekil 2.1. KRAS geninin kromozomal yerleşimi (9).

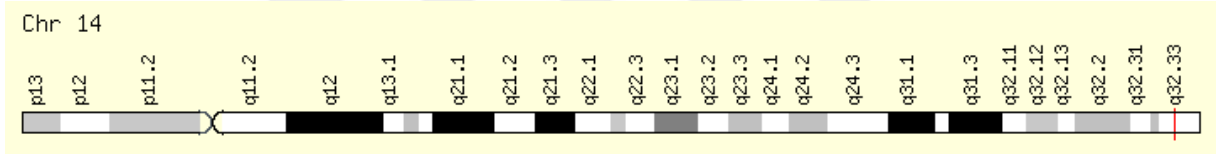
KRAS geni 12. kromozomun p12.1 bölgesinde yer alır. *KRAS* geni 6 ekzon ile 189 amino asit uzunluğundaki *KRAS* proteinini kodlar. Kristen Rat Sarkoma Viral Onkogen Homolog (*KRAS*) küçük bir GTPaz olup RAS proto-onkogen ailesinin (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) bir üyesidir. PI3K-Akt yolağını aktive eder ve EGFR ve diğer çeşitli büyüme faktörleri ile indüklenen MAPK sinyal yolağının alt basamaklarında yer alır. Hücre çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalmasının düzenlenmesinde rol alır (19).

KRAS nokta mutasyonları KHDAK hastalarında en sık rastlanan onkogenik mutasyonlardır ve adenokarsinomada ve sigara içenlerde görülme sıklığı %5-30'dur (20). KHDAK

tümörlerinde *KRAS* mutasyonlarının %97'si ekzon 2'deki kodon 12 ve 13'te görülür ve RAS GTPaz fonksiyonunu değiştirerek RAS sinyalini aktif moda kilitler (21). Transversiyon mutasyonları (G'den T'ye veya G'den C'ye) çoğunlukla sigara içenlerde (%30-40) görülürken tranzisyon (G'den A'ya) mutasyonları çoğunlukla sigara içmeyenlerde (%15) görülür (22). EGFR TKI'ne karşı direnci olan vakaların %25-35'i aktive edici *KRAS* mutasyonunu taşır ve EGFR'nin alt basamaklarını aktive ettiği için tek ajanlı EGFR TKI'ya karşı direnç oluşmasına yol açar (19). Daha az rastlansa da KHDAK tümörlerinde kodon 61'de de aktive edici mutasyonlar oluşabilir.

KRAS terapötik hedef olarak önemli kabul edildiği için *KRAS*'a yönelik klinik çalışmalar yapılmıştır. Geliştirilmiş olan inhibitörlerden bazıları *KRAS* sinyalizasyonunun alt basamakları olan RAF, MEK ve ERK için umut verici olsa da *KRAS* için henüz ilaç geliştirilmemiştir, ancak diğer tirozin kinaz inhibitörlerine direnç gelişmesine yol açtığı için tedavi kararında önemlidir (23).

2.1.2.3 AKT1



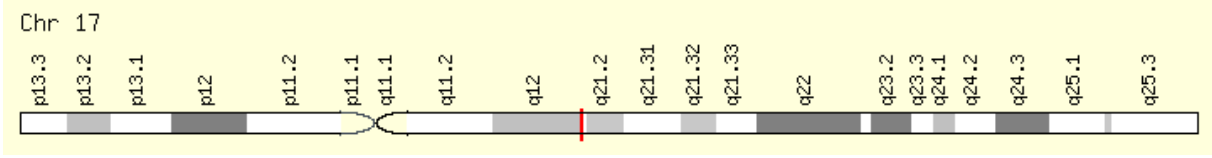
Şekil 2.2. *AKT1* geninin kromozomal yerleşimi (9).

AKT1 geni 14. kromozomun q32.33 bölgesinde yer alır. *AKT1* geni 13 ekzon ile 480 amino asit uzunluğundaki AKT1 proteinini kodlar. Aynı zamanda Protein Kinaz B (*PKB*) olarak da bilinen *AKT* geni serin treonin protein kinaz B'yi kodlar. PI3K-Akt sinyal yolağına aracılık eder (24). Bu yolak hücre çoğalmasında, hayatta kalımında, farklılaşmasında, tutunmasında ve motilitesinde işlev görür(19).

AKT1 mutasyonları KHDAK'ta ender bulunur ve görünme sıklığı %1'dir. *AKT1* mutasyonları skuamoz hücreli karsinomada daha yaygındır (25). *ALK* mutasyonları *ALK* yeniden düzenlenmesi veya *EGFR* mutasyonları gibi diğer sürücü (driver) onkogen mutasyonlar ile birlikte görülmemektedir. *AKT1*'in plekstrin homoloji bölgesindeki E17K mutasyonu, PI3K'den bağımsız olarak PI3K-Akt yolağının otonomi kazaması ile sonuçlanır ve *AKT1* mutasyonu görülen KHDAK hastalarının %88'inde görülür (22).

AKT hedefli inhibitör ilaçlar faz 2 klinik deneme aşamasındadır (26).

2.1.2.4 HER2



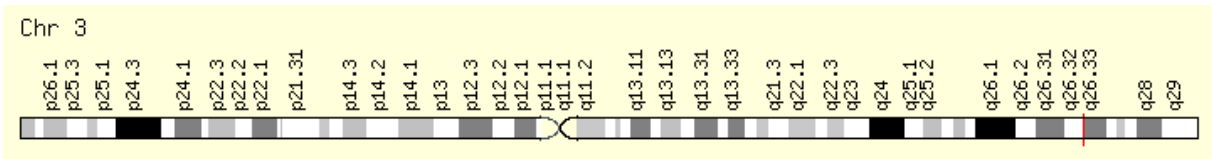
Şekil 2.3. *HER2* geninin kromozomal yerleşimi (9).

HER2 geni 17. kromozomun q12 bölgesinde yer alır. *HER2* geni 27 ekzon ile 1255 amino asit uzunluğundaki transmembran *HER2* proteinini kodlar. *HER2*, ERBB ailesine ait bir transmembran reseptör tirozin kinazdır. *HER2* proteininde ligand bağlanma bölgesi bulunmamaktadır ve diğer bir ligand bağlanmış ERBB ailesi üyesi reseptörle heterodimer oluşturarak MAPK ve PI3K-Akt ileti yolağını aktive eder (27).

Aktive edici *HER2* mutasyonları KHDAK vakalarının %2'sinde görülür (28). En yaygın mutasyonlar ekzon 20'deki kinaz bölgesinde yer alan 3 ile 12 baz çifti uzunluğundaki kalıp kaydırmayan insersiyonlardır (29). *EGFR* gibi *HER2* mutasyonları da sigara içmeyen, kadın, Asyalı ve adenokanser histopatolojisinde yaygındır (30). *HER2* mutasyonları diğer *EGFR*, *KRAS* ve *ALK* gibi sürücü mutasyonlar ile birlikte bulunmamaktadır.

HER2 mutasyonu saptanmış KHDAK vakalarının neratinib, afatinib, dacomitinib gibi seçici TKI'lere ve trastuzumab gibi monoklonal antikörelere duyarlı olduğu gösterilmiştir (31).

2.1.2.5 PIK3CA



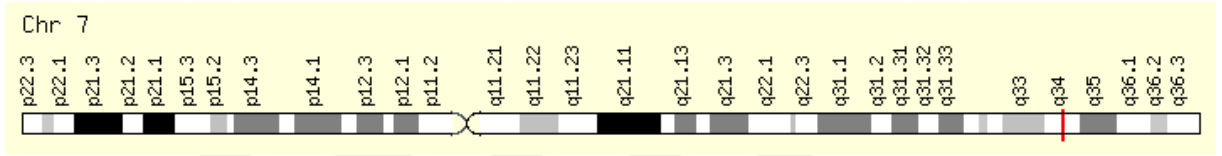
Şekil 2.4. *PIK3CA* geninin kromozomal yerleşimi (9).

PIK3CA geni kromozom 3'ün q26.3 bölgesinde yer alır. *PIK3CA* geni 20 ekzon ile 1068 amino asit uzunluğundaki PI3K proteinin p110 α katalitik alt ünitesini kodlar. *PIK3CA* (Phosphatidylinositol -4, 5- Biphosphate 3- Kinase Catalytic Subunit Alpha) bir hücre içi lipid kinazdır. *PIK3CA*, *EGFR*'nin alt iletim hedefi ve diğer çeşitli büyüme faktörlerinin iletim yollarının aracısıdır. Hücre büyümesinde, çoğalmasında, farklılaşmasında, motilitesinde ve yaşamasında yer alır (22).

PIK3CA mutasyonları KHDAK vakalarının %1-3'ünde bulunur ve skuamoz hücreli kanser histopatolojisinde, adenokarsinomadan daha sık görülür (30). *PIK3CA* mutasyonları *EGFR*, *KRAS* veya *ALK* gibi diğer sürücü mutasyonlar ile beraber görülebilirler (19). *PIK3CA*'nın aktive edici nokta mutasyonları ve amplifikasyonu *PIK3CA*'nın otonomi kazanması ile sonuçlanır. *PIK3CA*'da en sık karşılaşılan mutasyonlar helikal bölgesini kodlayan ekzon 9'da ve kinaz bölgesini kodlayan ekzon 20'de bulunur (22). *PIK3CA* mutasyonu taşıyan KHDAK vakalarının yaklaşık olarak %9'unda E542, %28'inde E545 ve %15'inde H1047 mutasyonu görülür (30).

PIK3CA'yı hedef alan çoklu inhibitörler klinik geliştirme aşamasındadır.

2.1.2.6 BRAF



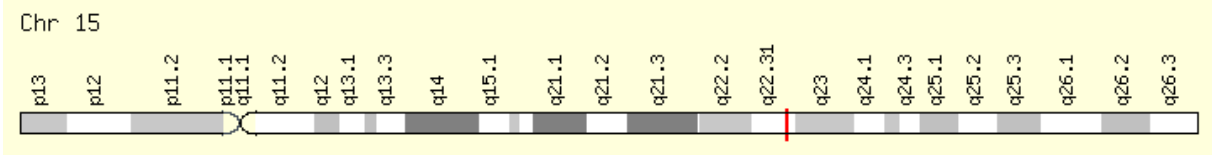
Şekil 2.5. *BRAF* geninin kromozomal yerleşimi (9).

BRAF geni kromozom 7'nin q34 bölgesinde yer alır. *BRAF* geni 18 ekzon ile 766 amino asit uzunluğundaki *BRAF* proteinini kodlar. *BRAF* (V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B) bir sitoplazmik serin treonin protein kinazdır. *KRAS* iletimin alt basamaklarını aktive eder. Hücre çoğalmasında, farklılaşmasında, transkripsiyonel düzenlenmesinde ve yaşamasında yer alır (32).

BRAF'ın aktive edici mutasyonları KHDAK vakalarının yaklaşık olarak %3'ünde bulunur (33). *BRAF* mutasyonları kinaz aktivitesinde artışa neden olur ve yaygın olarak adenokanser histopatolojisinde ve sigara içmeyenlerde görülür (30). *BRAF* mutasyonları *EGFR* ve *KRAS* sürücü onkogen mutasyonlar ile birlikte bulunmamaktadır (22). En sık görülen V600E aktive edici mutasyonu ekzon 15 tarafından kodlanan kinaz bölgesi içerisinde yer alır ve *BRAF* mutasyonu olan KHDAK vakalarının %50'sini oluşturur. Bunun ardından %39 ile ekzon 11 tarafından kodlanan G-loop bölgesindeki G469A mutasyonu ve %11 ile yine ekzon 15 tarafından kodlanan kinaz bölgesinde yer alan D594G mutasyonu gelir (19).

BRAF mutasyonları, özellikle V600E mutasyonu, melanoma olgularının yarısında bulunduğu için *BRAF* terapötik bir hedef olmuştur ve *BRAF*'a yönelik ilaçlar klinik kullanımdadır (22).

2.1.2.7 MEK1



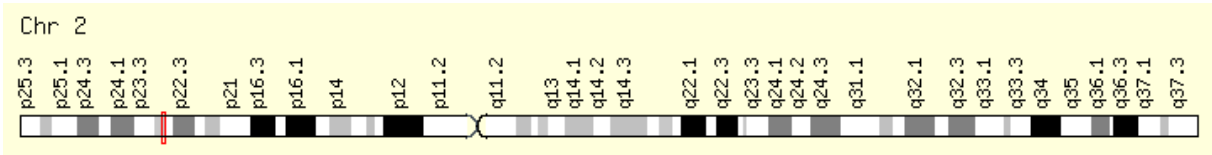
Şekil 2.6. *MEK1* geninin kromozomal yerleşimi (9).

MEK1 (MAP2K1, mitogen activated protein kinase 1) geni kromozom 15'in q22.31 bölgesinde yer alır. *MEK1* geni 11 ekzon ile 393 amino asit uzunluğundaki MAP2K1 proteinini kodlar. MEK1 bir serin treonin protein kinazdır. MAP kinaz ileti yolağının temel aracı durumundadır (34). Hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ve transkripsiyonel düzenlenmesinde yer alır.

MEK1 mutasyonları KHDAK vakalarının yaklaşık olarak %1'inde yer alır. MEK1 mutasyonları adenokanser histopatolojisinde daha yaygındır ve diğer sürücü onkogen mutasyonları ile birlikte bulunmaz (35). KHDAK'ta tespit edilen *MEK1* mutasyonları yaygınlıkla ekzon 2'de bulunur ve MEK1 kinaz aktivitesinin artması ile MAPK ileti yolağının otonomi kazanmasına yol açar. Q56P, K57N ve D67N tespit edilen mutasyonlardır.

MEK1'e karşı selumetinib ve trametinib gibi ilaçların etkinliği gösterilmiştir.

2.1.2.8 ALK



Şekil 2.7. *ALK* geninin kromozomal yerleşimi (9).

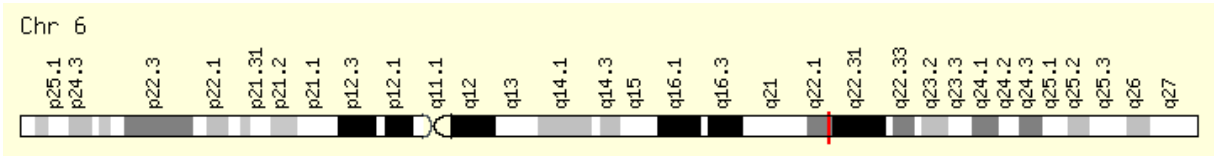
ALK geni kromozom 2'nin 23p bölgesinde yer alır. *ALK* geni 29 ekzon ile 1620 amino asit uzunluğundaki transmembran ALK reseptör tirozin kinaz proteinini kodlar. ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) insulin reseptör tirozin kinaz alt ailesinin bir üyesidir. PI3K-Akt ve MAPK ileti yolağını aktive eder. Hücre apoptozunun inhibisyonu ve hücre çoğalmasının desteklenmesinde yer alır (36).

ALK geni yeniden düzenlenmesi KHDAK hastlarının yaklaşık olarak %3-7'sinde bulunmaktadır (37). Füzyonlar ALK kinaz bölgesinin tamamını içerirken füzyon partneri ALK'nın dimer oluşumuna katkıda bulunur ve kinaz aktivitesinin otonomi kazanması ile

sonuçlanır. *ALK*'nın KHDAK vakalarında en çok karşılaşılan füzyon partneri *EML4*'tür (echinoderm microtubule associated protein-like 4). *EML4-ALK* füzyonu genç, sigara içmeyen ve adenokarsinoma histopatolojisindeki hastalarda daha yaygındır (38, 39). *EML4-ALK* yeniden düzenlemeleri genellikle *EGFR* ve *KRAS* mutasyonları ile birlikte görülmez ve *EGFR*'ye yönelik TKI'lere karşı dirençlidir (40). Bu güne kadar *EML4* ile *ALK*'nın en az 15 farklı füzyon varyantı tespit edilmiş olsa da bunların klinik önemi henüz belli değildir ve daha fazla inceleme gerektirmektedir (41). Bu varyantlar *ALK*'nın 20. ekzonu ile *EML4*'ün ekzon 2(v5), 6(v3a/b/c), 13(v1-v6), 14(v4-v7), 15(v8), 16, 17, 18(v9), 20(v2)'si arasındaki füzyonlarını içerir. KHDAK vakalarında görülen *EML4-ALK* yeniden düzenlenmeleri arasında en sık karşılaşılanları görülme sıklığı %33 ile varyant 1, %29 ile varyant 3a/b, %9 ile varyant 2'dir (12, 42). *ALK*'nın *EML4* dışında görülen diğer füzyon partnerleri TFG ve KIF5B proteinleridir. *EGFR*'de olduğu gibi *ALK* füzyonlarında da ilk tedavi sonrasında ilaç direncine yol açan bazı ikincil mutasyonlar oluşur. En sık gözlemlenen ikincil mutasyonlar L1196M ve G1269A'dır. Diğer daha az gözlemlenenler ise 1151Tins, L1152R, C1156Y, G1202R ve S1206Y'dir (37).

ALK yeniden düzenlenmesinin olduğu kanserlerin, *ALK* kinaz aktivitesine bağımlı olması nedeni ile *ALK* tirozin kinaz inhibisyonuna karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir. *ALK* mutasyonlarına yönelik TKI etkili ilaçlar klinik kullanımdadır.

2.1.2.9 ROS1



Şekil 2.8. *ROS1* geninin kromozomal yerleşimi (9).

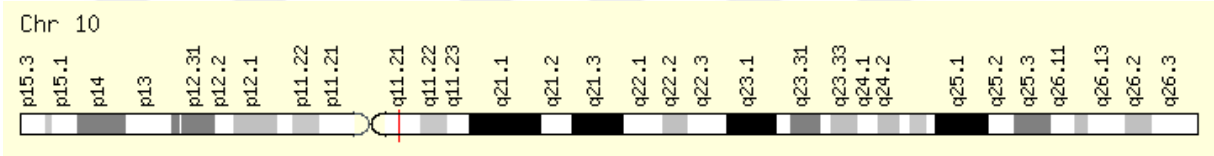
ROS1 geni kromozom 6'nın q22.1 bölgesinde yer alır. *ROS1* geni 43 ekzon ile 2346 amino asit uzunluğundaki *ROS1* integral membran proteinini kodlar. *ROS1* insülin reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. MAPK ve PI3K-Akt yolaklarını aktive eder (19). Hücre büyümesinde ve çoğalmasında rol alır.

ROS1 yeniden düzenlemesi KHDAK vakalarının yaklaşık %2'sinde bulunur (43). *ROS1*'in kinaz bölgesinin *ALK*'nın protein kinaz bölgesi ile yüksek derecede homolojisi vardır ve bir çok partnerle oluşturduğu füzyonları tirozin kinaz bölgesini tam olarak içerir (19). *ALK* yeniden düzenlemesi gibi *ROS1* onkogenik füzyonları da sigara içmeyen, genç ve

adenokarsinoma histopatolojisindeki hastalarda daha yaygın olarak görülür (30, 43). *ROS1* yeniden düzenlemesi; *EGFR*, *ALK* veya *KRAS* gibi sürücü onkogenler ile birlikte görülmemektedir (12). *ROS1*'in füzyon partnerleri olarak *FIG*, *KDEL2*, *TPM3*, *SDC4*, *LRIG3*, *EZR*, *SLC34A2* ve *CD74* tespit edilmiştir (19). Füzyon partnerlerinin *ROS1* füzyonunun dimerleşmesinde rol aldığı ve *ROS1* tirozin kinazın otonomi kazanması ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir.

ALK/MET/ROS1 tirozin kinaz inhibitörü crizotinib'in *ROS1* pozitif hücre hatlarında etkin olduğu gösterilmiş ve ileri evre *ROS1* pozitif KHDAK hastalarında yanıt verdiği raporlanmıştır (30). *ROS1* yeniden düzenlemesi olan KHDAK hastalarında *EGFR*'ye yönelik TKI'lere karşı düşük duyarlılık görülmektedir.

2.1.2.10 RET



Şekil 2.9. *RET* geninin kromozomal yerleşimi (9).

RET geni kromozom 10'un q11.21 bölgesinde yer alır. *RET* geni 20 ekzon ile 1114 amino asit uzunluğundaki *RET* proteinini kodlar. *RET* (Ret proto-oncogene) bir reseptör tirozin kinazdır ve nöral krest gelişiminde yer alır (11, 22). Ligand olarak glial hücre hattından türeyen nörotrofik faktör (*GDNF*) ailesinden hücre dışı ileti molekülleri *RET* reseptörüne bağlanır ve hücre büyümesi ile farklılaşmasını sağlar.

RET füzyonları KHDAK vakalarının yaklaşık olarak %1-2'sinde bulunur (44). *RET* yeniden düzenlemeleri sigara içmeyen, genç, adenokarsinoma histopatolojisindeki hastalarda daha yaygın olarak bulunur (30). Buna ilave olarak *RET* füzyonları diğer bilinen *EGFR*, *KRAS*, *ALK* ve *ROS1* gibi sürücü onkogen mutasyonları ile birlikte görülmezler (44). Bütün bu füzyonlar, füzyon partnerlerinin "coiled coil" bölgesini içerir ve ligandan bağımsız olarak dimerleşmesini ve kinaz aktivitesinde otonomi kazanmasına olanak sağlar (44). En sık gözlenen füzyon partneri %90 görülme sıklığı ile *KIF5B*'dir (45). Diğer tespit edilmiş füzyonlar ise *CCDC6*, *NCOA4* ve *TRIM33*'tür (45).

RET füzyonları FDA tarafından onaylanmış ve tiroid kanseri tedavisinde kullanımda olan vandetanib gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin potansiyel hedefidir (22). Cabozantinib in

vitro koşullarda vandetanibten daha etkili olduğu gösterilmiştir. Sorafenib, sunitinib, ponatinib RET'e karşı etkili olan kinaz inhibitörlerdir (12, 30).

2.2 Yeni Nesil Sekanslama

1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından DNA'nın çift zincir yapısının bulunmasının ardından DNA dizilerinin okunması için farklı yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır (46). İlk olarak DNA dizisinin kimyasal ajanlar ile degradesyonu gibi uzun süre gerektiren pratik uygulaması zor olan ve kısa okumaların yapılabildiği yöntemler geliştirilmiştir (47). Frederick Sanger tarafından geliştirilen ve dideoksinükleotidler ile zincir sonlandırma esasına dayanan yöntem uzun süre DNA dizilemede standart yöntem olarak kullanılmıştır. (48). Sanger DNA dizileme yöntemi ile yaklaşık olarak 50bp ile 900bp arasındaki uzunluktaki DNA zincirleri başarılı bir şekilde dizilenebilmektedir. İnsan Genom Projesinde de kullanılan bu yöntemin ardından DNA sentezi ile dizileme yöntemleri geliştirilmiştir. Yeni nesil dizileme olarak adlandırılan bu yöntemlerin avantajı birden fazla dizinin aynı anda paralel olarak okunabilmesidir. Kanseri ve diğer hastalıklarla ilişkili moleküler yolaklarda yer alan ve klinik olarak önem arz eden mutasyonların analizinde yeni nesil dizileme platformları, az miktarda DNA gerektirmesi, düşük mozaiklik oranına sahip mutasyonların gösterilebilmesine olanak sağlaması ve tek seferde fazla sayıda bölgenin incelenebilmesini sağlaması açısından tercih edilen yöntem olmaktadır (49).

2.3 Multipleks PCR

PCR yönteminin moleküler biyolojide temel yöntemlerden birisi haline gelmesi ile farklı uygulamaları da geliştirilmiştir. DNA polimeraz enziminin kullanımı ile belirli bir DNA bölgesinin çoğaltılmasını esas alan PCR tekniğinin verimi, kullanılan primer çiftinin dizisi, çoğaltılacak DNA bölgesinin uzunluğu ve PCR'da kullanılan kimyasalların konsantrasyonu gibi koşullara bağlı olarak değişmektedir. Multipleks PCR yöntemi aynı reaksiyon içerisinde birden fazla primer çiftinin kullanılması ile birden fazla bölgenin aynı reaksiyon içerisinde çoğaltılması esasına dayanır. Farklı primer çiftlerinin farklı verimde olması nedeni ile reaksiyon sonrasında çoğaltılan her bölgeden aynı verimde ürün elde edilmesi için primer çiftlerinin konsantrasyonu optimize edilmelidir (50). Kullanılan primerlerde barkodlama işlemi için 5' ucuna eklenen yaklaşık olarak 20 bazlık DNA sekansının primere kattığı termodinamik özellikler nedeniyle optimizasyon sürecini sadece primer konsantrasyonlarının ayarlanmasını gerektirecek şekilde kolaylaştırdığı görülmüştür (51).

3 GEREKÇE VE AMAÇ

Akciğer kanserinde klasik olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri uygulanmaktadır. Akciğer kanserinin oluşumunda önem arz eden moleküler yolakların ve bu yolaklarda saptanan mutasyonların belirlenmesi ile bu molekülleri hedef alan ilaçların kullanımı da tedavi stratejisinde belirleyici olmaktadır. Moleküler hedefli tedavide doğru ilacın kullanımı ve tedavinin olumlu sonuç vermesi kanserli dokuda meydana gelen mutasyonların saptanmasını gerektirmektedir. Tümörden tanı amaçlı alınan dokunun miktarının kısıtlı olması tedavi planında yönlendirici olabilecek mutasyonların hepsinin ayrı ayrı saptanması olanağını azaltmaktadır. Bu nedenle tedavi hedefi durumunda olan veya tedavinin belirlenmesinde rol alan tüm mutasyonların aynı doku örneği üzerinde taranması önem arz etmektedir. Bu çalışmada multipleks PCR yöntemi kullanarak küçük hücreli dışı akciğer kanserinde rol alan ve tedavi hedefi durumunda olan genlerdeki mutasyon bölgelerinin yeni nesil dizileme platformuna uygun olacak şekilde tek seferde çoğaltılmasını sağlayan tanı yöntemi geliştirilebileceği öne sürülmektedir.

4 MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 MATERYAL

Geliştirilecek olan tanı yöntemi sırasında kullanılan sarf malzemeleri ve cihazlar çizelge 4.1. ve çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1.Kullanılan sarf malzemeleri ve kullanım yerleri

Adı (Marka)	LOT	Kullanım Yeri / Amacı
Tris	8387H001	Agaroz elektroforez
Borik Asit	A0724965	Agaroz elektroforez
EDTA (SIGMA)	29H001715	Agaroz elektroforez
Agarose (Cleaver Scientific)	14141105	Agaroz elektroforez
GeneRuler 50bp DNA Moleküler Ağırlık Belirteci (ThermoScientific)	00266480	Agaroz elektroforez
6X DNA yükleme boyası (Thermo Scientific)	00277043	Agaroz elektroforez
Taq DNA polymerase (Thermo Scientific)	00294238	PCR
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	00292623	PCR
dATP (Thermo Scientific)	00305704	PCR
dTTP (Thermo Scientific)	00285002	PCR
dGTP (Thermo Scientific)	00304565	PCR
dCTP (Thermo Scientific)	00302221	PCR
Taq PCR buffer (Thermo Scientific)	00303115	PCR
AmPure bead (Agencourt)	14915500	Purifikasyon
Ethanol (EMSURE)	K46525683 516	Purifikasyon

Etidyum Bromid (SIGMA)	68H3640	Agaroz elektroforez
Multiplicom MID primer box 49-96	1509217	Barkodlama
Multiplicom amplification reagent	1507103	Barkodlama
Multiplicom universal PCR mix	1502249	Barkodlama
Multiplicom Taq DNA Polymerase	1503059	Barkodlama

Çizelge 4.2. Kullanılan cihazlar

Adı	Marka
Mini Vorteks	Harmony
Mini Santrifüj	Harmony
Hassas Terazi	Denver Instrument
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Isıtıcı	Biosan
Termal Döngü Cihazı	Applied Biosystems
Yeni Nesil Sekanslama Cihazı	Illumina Miseq
Jel Görüntüleme Cihazı	Alpha Innotech

4.2 YÖNTEM

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde moleküler tedavi hedefi durumunda olan veya uygulanan tedavinin etkinliğinde rol alan proteinleri kodlayan genler ve ilgili mutasyon bölgeleri literatür taraması ile belirlendi (52).

Oluşturulacak tanı yönteminin kapsamında, nokta mutasyonu veya insersiyon ve delesyon içeren 8 gende 16 bölge ele alınırken, füzyon mutasyonu oluşturan 3 genin 12 füzyon partneri ile oluşturduğu 35 füzyon varyantı ele alındı.

Nokta mutasyonu veya insersiyon ve delesyon mutasyonları için genomik DNA dizileri baz alındı. Füzyon mutasyonları, varyantın olduğu intron bölgelerinin uzunluğu ve farklı noktalardan füzyon oluşturabilme olasılığı nedeniyle RNA'dan elde edilecek cDNA dizileri baz alındı.

Oluşturulacak tanı yöntemi ile taranacak bölgeler için primerlerin tasarlanmasında Primer3Plus programı kullanıldı. Primer dimer ve sekonder yapı oluşumları OligoAnalyzer 3.1 programı ile test edildi.

Nokta, insersiyon veya delesyon mutasyonu içeren bölgeler için tasarlanan primerlerin validasyonunda anonim kan örneğinden izole edilen genomik DNA kullanıldı. Füzyon mutasyonları için tasarlanan primerlerin validasyonunda füzyon varyantları dizisine uygun olarak tasarlanan oligonükleotid kalıpları kullanıldı.

Nokta, insersiyon ve delesyon mutasyonları için tasarlanan primerlerin hepsi tekli olarak valide edildi. Füzyon mutasyonları için tasarlanan primerlerden polinükleotidi oluşturulan varyantlar tekli olarak valide edildi. Tekli validasyonu gerçekleştirilen primerler ile mutasyon bölgeleri multipleks PCR ile çoğaltıldı. Multipleks PCR sonrasında her amplikona MID kiti (Multiplicom™) kullanılarak barkod dizisi takmak üzere ikinci bir PCR uygulandı. Barkod dizisi takılan ve aynı DNA örneğine ait olan PCR ürünleri tek tüpte birleştirildi. Birleştirilen PCR ürünleri AmPure Bead kullanılarak purifiye edildi. Ayrı ayrı purifiye edilen PCR ürünlerinin miktarı NanoDrop ile tespit edilerek her amplikondan eşit konsantrasyonda olacak şekilde tek tüpte toplandı. Elde edilen DNA kütüphanesi Illumina Miseq kiti kullanılarak dizileme işlemi gerçekleştirildi.

Elde edilen diziler ve okuma sayıları SeqPilot programı kullanılarak analiz edildi. Hazırlanan plekslerde amplikonların okuma sayılarının dengeli bir dağılım göstermesi için okuma sayıları kullanılarak pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları hesaplandı.

Nokta mutasyonu içeren genler, mutasyonun bulunduğu ekzon ve mutasyonun etkilediği aminoasit aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.3.Nokta mutasyonları

Gen	Ekzon	Mutasyona Uğrayan Aminoasit
<i>EGFR</i>	18	G719, S720
<i>EGFR</i>	19	D761
<i>EGFR</i>	20	V765, S768, V769, D770_N771, N771, T783, T790
<i>EGFR</i>	21	L858, L861
<i>KRAS</i>	2	G12, G13
<i>KRAS</i>	3	Q61
<i>AKT1</i>	4	E17
<i>ALK</i>	22	T1151ins; L1152; C1156; I1171
<i>ALK</i>	23	F1174; L1196; G1202; S1206
<i>ALK</i>	25	G1269
<i>HER2</i>	20	A775_G776ins, G776, P780_Y781, V777_G778ins, M774_A775ins
<i>PIK3CA</i>	9	E542, E545
<i>PIK3CA</i>	20	H1047
<i>BRAF</i>	11	G469
<i>BRAF</i>	15	D594, V600
<i>MEK1</i>	2	Q56, K57, D67

Füzyon mutasyonunu oluşturan genler ve füzyon partnerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.4. Füzyon mutasyonları

Gen	Füzyon Partnerleri
<i>ALK</i>	<i>EML4, TFG, KIF5B</i>
<i>ROS1</i>	<i>SLC34A2, SDC4, CD74, EZR, LRIG3, TPM3, GOPC</i>
<i>RET</i>	<i>KIF5B, CCDC6</i>

4.2.1 Primer Tasarımı

Primer tasarımında; PCR ürününün boyu, primerlerin uzunluğu, primer oligolarının kalıp DNA'ya bağlanma sıcaklığı, primerlerin %GC içeriği, primer çiftlerinin bağlanma sıcaklığı arasındaki maksimum fark, primerlerin diğer primerler ile dimer oluşturma potansiyelleri ve primerlerin ikincil yapı oluşturma potansiyelleri gibi primerlerin yapısal ve termodinamik özellikleri dikkate alındı.

Tasarlanan primerler multipleks PCR yönteminde aynı koşullar içinde reaksiyona gireceği için yukarıda bahsedilen özellikler her primer çifti için yakın değer aralıklarında tasarlandı.

- Buna göre PCR ürününün boyu kullanılan yeni nesil sekanslama platformuna uygun olarak 320 ile 370 bp arasında olacak şekilde ayarlandı.
- Primerlerin kalıp DNA ile eşleşecek kısmının uzunluğu optimum 20 bp olmak üzere 19 ile 29bp arasında olacak şekilde ayarlandı.
- Primerlerin %GC içeriği optimum 50 olmak üzere 35 ile 65 arasında olacak şekilde ayarlandı.
- Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanma sıcaklığı optimum 65 °C olmak üzere 60 ile 70 °C arasında olacak şekilde ve her primer çiftinin kalıp DNA'ya bağlanma sıcaklıkları arasında maksimum 3 °C olacak şekilde ayarlandı.
- Primerlerin bu yapısal özelliklerinin yanında tasarım aşamasında PCR reaksiyonunda yer alacak olan tek değerli katyonların konsantrasyonları 50 mM, iki değerli katyonların konsantrasyonları 2.5 mM, kalıp DNA'ya bağlanan oligonükleotidlerin konsantrasyonu 100 nM, dNTP konsantrasyonu da 1 mM olacak şekilde düzenlendi.

Yukarıda bahsettiğimiz koşullara uyacak şekilde tüm primerler Primer3Plus programı kullanılarak tasarlandı. Tasarlanan primerler dimer oluşturma ve sekonder yapı oluşturma potansiyelleri OligoAnalyzer 3.1 programı kullanılarak test edildi.

Belirlenen bölgeler ilk PCR ile çoğaltmadan sonra sekanslamaya girmeden önce ikinci bir PCR ile barkodlama işleminden geçeceği için her primerin 5' ucuna ileri primerler için "5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA-3'" ve geri primerler için "5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA-3'" sekansı eklendi.

Nokta mutasyonları ile insersiyon ve delesyon içeren bölgeler için tasarlanan primerlerin sekansları, ve kalıp DNA'ya bağlanma sıcaklıkları ve PCR ürün boyları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. Nokta mutasyonu için çoğaltılacak bölgeler, primer çiftleri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün boyları

Gen_ Ekzon	Primer Çifti	Tm (°C)	Ürün Boyu
<i>BRAF_11</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATGGTAGACGGGACTCGAGTGATGA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATCCCGACTGCTGTGAACAGTTTT-3'	76.9 75.2	342
<i>BRAF_15</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGCCCCAAAAATCTTAAAAGCAGGTT-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCACCATCCAAAAATGGATCCAGACA-3'	74.0 75.0	377
<i>EGFR_18</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACAGTGGAGAAGCTCCCAACCAA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGTGAATTGGTCTCACAGGACCAC-3'	76.3 76.0	354
<i>EGFR_19</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATCACAGCCCCAGCAATATCA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGAGAAAAGGTGGCCTGAGGT-3'	75.5 76.3	360
<i>EGFR_20</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGCAGGCACAGCTTTCTCCAT-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGCGATCTGCACACACCAGTTGA-3'	76.3 76.3	362
<i>EGFR_21</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAAACGTTCCGACCCATAAGTCC-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGGTCCCTGGTGCAGGAAAATG-3'	76.3 76.1	375
<i>KRAS_2</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACAGTCTGCAGTCAACTGGAATTTT-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATCAAAGAATGGTCTGCACCAGTAA-3'	74.9 74.9	385
<i>KRAS_3</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGGTGCACTGTAATAATCCAGACTGTGTTTC-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGCATGGCATTAGCAAAGACTC-3'	76.0 74.2	342
<i>AKT1_4</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATGTGCGTGGCCCTAAGAAACA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCACCCCAAATCTGAATCCCGAGAG-3'	75.5 76.3	367
<i>ALK_22</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATATGAAGGCCAGGTGTCCGGAAT-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGGGACAACAGATTTCCTTGG-3'	76.1 76.3	377
<i>ALK_23</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACCCTGCTGCCATGTTTACAGA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGCTCCTTCCATCCTTGCTCCT-3'	76.3 76.3	373
<i>ALK_25</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATGGCCGTTGACACTCATCTTCC-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATTTAGCCTTCGGGCATGGT-3'	76.1 75.6	380
<i>HER2_20</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGGGTGGTTCACAGAATTGTTGA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGTGGAGGGACTGGGTTTCCCTA-3'	75.3 76.3	359
<i>MEK1_2</i>	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATGACTTGTGCTCCCACTTTGG-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAACCCTGGTCCCCAGGCTTCTAA-3'	76.3 77.2	347

PIK3CA_9	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATGCTTTTCTGTAAATCATCTGTGAA-3'	72.1	341
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAAGGTATGGTAAAAACATGCTGA-3'	72.4	
PIK3CA_20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACGACAGCATGCCAATCTCTTCA-3'	75.3	354
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCACAATCGGTCTTTGCCTGCTGA-3'	75.5	

Füzyon mutasyonları için tasarlanan primerlerin sekansları ve kalıp DNA'ya bağlanma sıcaklıkları ve PCR ürün boyları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Çizelge 4.6. Füzyon mutasyonları için çoğaltılacak bölgeler, primer çiftleri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün boyları (* işaretli primerler alternatif primer olarak tasarlanmıştır)

Gen_Ekzon	Primer Çifti	Tm (°C)	Ürün Boyu
EMLA-ALK 2:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGATGTTTTGAGGCGTCTTGC-3'	74.6	389
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
EMLA-ALK 3:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGGAAGTGGTGAAACAGAAAA-3'	73.5	402
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
EMLA-ALK 6:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAACAAAACAGACAAGCA-3'	73.6	362
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
EMLA-ALK 13:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGACTCAGGTGGAGTCATGCTT-3'	75.5	389
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
EMLA-ALK 14:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACTGGAGGAGGGAAAGACAGA-3'	75.6	387
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
EMLA-ALK 15:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGCAGAAGGAAAGGCAGATCA-3'	74.6	412
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
EMLA-ALK 17:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACCAGGACACTGTGCAGATTT-3'	74.6	384
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
EMLA-ALK 18:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGCAGGTGGTTTGTCTGGAT-3'	74.6	412
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
EMLA-ALK 19:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACCTTCTGGCTGTAGGATCTC-3'	76.4	411
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
EMLA-ALK 20:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAACCTGGTCCAGACAACAAG-3'	75.6	379
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
TFG-ALK 3:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATTGCAATTCAGTGCAGTAGGA-3'	73.5	361
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	
	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
KIF5B-ALK 15:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAACGAGCAGCTGAGATGATG-3'	74.6	399
	Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTTTCAGAGC-3'	76.1	

	Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	75.6	
<i>KIF5B-ALK</i> 17:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAATCTGTCGATGCCCTCAGT-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTGTTTCAGAGC-3' Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	74.6 76.1 75.6	367
<i>KIF5B-ALK</i> 24:20	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATCGCATAAAGGAAGCAGTCA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAATCCAGTTCGTCTGTTTCAGAGC-3' Geri* 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGTCTTCACAGCCACTTGCAG-3'	73.6 76.1 75.6	381
<i>KIF5B-RET</i> 15:11	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAACGAGCAGCTGAGATGATG-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAAGGATCTTGAAGGCATCCAC-3'	74.6 74.6	338
<i>KIF5B-RET</i> 24:11	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATCGCATAAAGGAAGCAGTCA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAAGGATCTTGAAGGCATCCAC-3'	73.6 74.6	320
<i>KIF5B-RET</i> 1:12	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGCCGAGTGCAACATCAAAG-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGATGACATGTGGGTGGTTGA-3'	74.7 74.6	344
<i>KIF5B-RET</i> 15:12	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAACGAGCAGCTGAGATGATG-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGATGACATGTGGGTGGTTGA-3'	74.6 74.6	310
<i>KIF5B-RET</i> 16:12	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGGTGAAACGTTGCAAGCAG-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGATGACATGTGGGTGGTTGA-3'	74.7 74.6	333
<i>KIF5B-RET</i> 18:12	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAATCTGTCGATGCCCTCAGT-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGATGACATGTGGGTGGTTGA-3'	74.6 74.6	450
<i>KIF5B-RET</i> 22:12	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGGGTTTGGAAAGAGACAGTGG-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGATGACATGTGGGTGGTTGA-3'	75.6 74.6	321
<i>KIF5B-RET</i> 23:12	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATGTTCCAGGACCTGGCTACAA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGATGACATGTGGGTGGTTGA-3'	74.6 74.6	366
<i>CCDC6-RET</i> 1:12	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGCAAGAGAACAAGGTGCTGA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA GATGACATGTGGGTGGTTGA-3'	76.3 76.1	384
<i>SLC34A2-ROSI</i> 4:32	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAAGTGGTCAGAGAGAGACACC-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGGACTTCCATGTGCAAACA-3'	74.9 74.9	412
<i>SLC34A2-ROSI</i> 4:34	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAAGTGGTCAGAGAGAGACACC-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGCTCAGCCAACTCTTTGTCT-3'	76.0 74.2	411
<i>SDC4-ROSI</i> 2:32	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGAGTCGATCCGAGAGACTGA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGGACTTCCATGTGCAAACA-3'	75.5 76.3	379
<i>SDC4-ROSI</i> 3:32	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCATCCCCAAGAGAATTCACCC-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGGACTTCCATGTGCAAACA-3'	76.1 76.3	361
<i>SDC4-ROSI</i> 4:34	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACATCCCTGGTGCCTCTAGA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGCTCAGCCAACTCTTTGTCT-3'	74.6 74.6	399
<i>CD74-ROSI</i> 6:32	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACGGAGAACCTGAGACACCTT-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCATGGACTTCCATGTGCAAACA-3'	75.6 74.6	367
<i>CD74-ROSI</i> 6:34	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCACGGAGAACCTGAGACACCTT-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGCTCAGCCAACTCTTTGTCT-3'	75.5 76.3	381
<i>EZR-ROSI</i> 10:34	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAAGAAGGCAGAGAGAGAGCTC-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGCTCAGCCAACTCTTTGTCT-3'	76.1 76.3	338
<i>LRIG3-ROSI</i> 16:35	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGACCAACTTGCCAGCAGATA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGCAGAGTCAGTTTTTCCCGA-3'	76.3 76.3	360
<i>TPM3-ROSI</i> 8:35	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAAGTGTCTGAGCTGGAGGA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGCAGAGTCAGTTTTTCCCGA-3'	76.1 75.6	362
<i>GOPC-ROSI</i> 4:36	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAATAGCTGTTCTCCAGGCTGA-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGGGTTCATTCAGCAGACAA-3'	75.3 76.3	375
<i>GOPC-ROSI</i> 8:36	İleri 5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCAGGTAACCCTGGTGCTAGTTG-3' Geri 5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCAGGGTTCATTCAGCAGACAA-3'	76.3 77.2	385

4.2.2 DNA İzolasyonu

Deneyleerde kullanılacak DNA örneğinin anonimize kan örneklerinden izolasyonu için RTA DNA izolasyon kitine aşağıdaki yöntem uygulandı:

- DNA izolasyonu yapılacak anonimize edilmiş kan örneğinden 200 µl alınarak 1.5ml'lik ependorf tüpün içine aktarıldı.
- Örneğın üzerine 20µl proteinaz K ve 200µl Buffer B eklendi. Tüp orta şiddette vorteks ile karıştırıldı.
- Bu esnada elüsyon tamponu 65°C'de ısı bloğında her örnek için 200µl olacak miktarda ısınmaya bırakıldı.
- Numunenin olduğu tüp ısı bloğu üzerinde 65°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 15 dakikanın sonunda karışımın üzerine 260µl %100'lük EtOH eklenerek tekrar orta şiddette vorteks ile karıştırıldı.
- Karışımın tümü toplama tüpüne yerleştirilen spin kolona aktarıldı. Toplama tüpü içindeki spin kolonu mini santrifüjde 13000 rpm'de 75 saniye döndürüldü. Toplama tüpü içinde biriken sıvı ile birlikte atıldı.
- Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne geçirilerek üzerine 700µl yıkama tamponu I eklendi. Toplama tüpü içindeki spin kolonu mini santrifüjde 13000 rpm'de 75 saniye döndürüldü. Toplama tüpü içinde biriken sıvı ile birlikte atıldı.
- Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne geçirilerek üzerine 700µl yıkama tamponu II eklendi. Toplama tüpü içindeki spin kolonu mini santrifüjde 14000 rpm'de 75 saniye döndürüldü. Toplama tüpü içinde biriken sıvı ile birlikte atıldı.
- Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne geçirilerek mini santrifüjde 14000 rpm'de 75 saniye tekrar döndürüldü. Toplama tüpü içinde biriken sıvı ile birlikte atıldı.
- Spin kolonu 1.5ml'lik üzeri etiketlenmiş olan ependorf tüpe yerleştirildi. Üzerine ısı bloğında bekletilmiş olan elüsyon tamponundan 200µl eklenerek 30 saniye oda sıcaklığında bekletildi.
- Oda sıcaklığında bekleyen spin kolonu mini santrifüjde 14000 rpm'de 75 saniye döndürüldü. Döndürme sonrasında spin kolonu atılarak ependorfta biriken DNA örneği daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

4.2.3 Primerlerin validasyonu

4.2.3.1 PCR

Tasarlanan primerler ile her ampikon ayrı bir reaksiyon tüpünde olacak şekilde aşağıdaki PCR koşullarında çoğaltıldı.

Füzyon mutasyonları için tasarlanan primerlerde kalıp DNA olarak oluşturulan polinükleotitler kullanıldı.

Çizelge 4.7.Mutasyon bölgelerini çoğaltmak için PCR’da kullanılan kimyasallar

Kullanılan kimyasal	Hacim
Taq PCR tamponu (10X)	1.5 µl
dNTP (2.5 mM)	1.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
kalıp DNA (~30ng)	2.0 µl
İleri primer (10 µM)	1.0 µl
Geri primer (10 µM)	1.0 µl
DNA polimeraz 5U	0.15 µl
dH ₂ O	6.35 µl

Çizelge 4.8. Mutasyon bölgelerini çoğaltmak için PCR’da kullanılan ısı döngüsü

PCR programı		
Sıcaklık	Süre	
94 °C denatürasyon	3 dakika	
94 °C denatürasyon	30 saniye	35 döngü
65 °C hibridizasyon	30 saniye	
72 °C uzama	1 dakika 45 saniye	
72 °C final uzama	10 dakika	
4 °C	∞	

PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinden geçirilerek kontrol edildi. Füzyon varyantlarının kontrolü için PCR ürünleri ile birlikte kalıp DNA olarak kullanılan polinükleotitler de elektroforezden geçirilerek bantların şiddeti karşılaştırıldı. PCR ürünleri bir sonraki aşamada kullanıma kadar -20 °C’ta saklandı.

4.2.3.2 Agaroz Jel Elektroforez

Agaroz jel elektroforezi ile görüntülemeler için aşağıdaki protokol uygulandı.

- Ara stok tamponu olarak 5X TBE tamponu için 54gr Tris bazik, 27.5gr borik asit ve 2.72gr EDTA aynı kapta karıştırıldı. Karışım distile su ile 1lt’ye tamamlandı.
- Hazırlanan 5X TBE tamponundan 1X TBE tamponu hazırlamak için 125ml 5X TBE, 500ml distile su ile karıştırıldı.
- %3’lük agaroz jel hazırlamak için beher içinde 4.05gr agaroz, 108ml distile su ve 27ml 5X TBE tamponu ile karıştırıldı. Karışımın olduğu beher mikrodalga fırında homojen bir karışım elde edilinceye kadar ısıtıldı. Mikrodalga fırından çıkarılan beherde, ortalama 60°C’ye gelen karışım içine 7µl EtBr ilave edilip karıştırıldı.
- EtBr eklenen karışım soğumakta iken tarak yerleştirilmiş yatay elektroforez tankının kasetine içinde baloncuk kalmayacak şekilde döküldü. Jel oda ısısında bekletilerek donmaya bırakıldı.

- Elektroforez tankının içi 1X TBE tamponu ile jelin üzerini örtecek seviyeye kadar dolduruldu.
- 1µl DNA moleküler ağırlık belirteci 4µl distile su ve 1µl DNA yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra ilk kuyuya aktarıldı.
- Yürütülecek DNA örnekleri parafilm yüzey üzerinde 1µl (6X) DNA yükleme boyasına 4µl DNA örneği olacak şekilde pipet yardımı ile karıştırıldı ve her bir kuyuya sırasıyla aktarıldı.
- Hazır hale geldikten sonra elektroforez tankı 110V'ta 45dakika boyunca çalıştırılarak DNA örnekleri yürütüldü.
- 45 dakikanın sonunda jelin UV görüntüleyici (Alpha Innotech, FluorChem FC) ile fotoğrafı çekildi.

4.2.4 Multipleks PCR

Nokta mutasyonu için toplam 8 gen ve 16 bölgeyi içeren primerler KHDAK tedavisinde önem arz eden ve görülme sıklığına göre iki pleks oluşturacak şekilde gruplandı. Buna göre *BRAF* ekzon 11, 15; *EGFR* ekzon 18, 19, 20, 21 ve *KRAS* ekzon 2 ve 3 ile birinci pleks, *AKT1* ekzon 4; *ALK* ekzon 22, 23, 25; *HER2* ekzon 20; *MEK1* ekzon 2 ve *PIK3CA* ekzon 9 ve 20 ile ikinci pleks oluşturuldu.

Füzyon mutasyonları *ALK*'nin oluşturduğu füzyon varyantları ile *ROS1* ve *RET*'in oluşturduğu füzyon varyantları iki pleks olacak şekilde gruplandı. Buna göre *ALK*'nin *EML4* ile yaptığı 10 füzyon varyantı, *TFG* ile yaptığı 1 füzyon varyantı ve *KIF5B* ile yaptığı 3 füzyon varyantı birinci pleksi; *RET*'in *KIF5B* ile yaptığı 8 füzyon varyantı, *CCDC6* ile yaptığı 1 füzyon varyantı, *ROS1*'in *SLC34A2* ile yaptığı 2 füzyon varyantı, *SDC4* ile yaptığı 3 füzyon varyantı, *CD74* ile yaptığı 2 füzyon varyantı, *EZR* ile yaptığı 1 füzyon varyantı, *LRIG3* ile yaptığı 1 füzyon varyantı, *TPM3* ile yaptığı 1 füzyon varyantı ve *GOPC* ile yaptığı 2 füzyon varyantı ikinci pleksi oluşturdu.

Nokta mutasyonlar için iki pleks halinde gruplandırılan primerler ile oluşturulan ampliconlar her primerden eşit konsantrasyonda olacak şekilde aşağıdaki koşullarda çoğaltıldı.

Füzyon mutasyonları için aynı pleks içinde aynı füzyon partneri varyantları için ortak olan primerler tüm primerler ile eşit konsantrasyonda alındı. Farklı füzyon partnerleri için ortak olan primerler ise diğer primerlerin konsantrasyonunun füzyon partneri sayısı katı kadar alındı.

Çizelge 4.9. Mutasyon bölgelerini çoğaltmak için multipleks PCR’da kullanılan kimyasallar

Kullanılan kimyasal	Hacim
Taq PCR tamponu (10X)	1.5 µl
dNTP (2.5 mM)	1.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
kalıp DNA (~30ng)	2.0 µl
İleri primer (10 µM)	2.4 µl
Geri primer (10 µM)	2.4 µl
DNA polimeraz 5U	0.15 µl
dH ₂ O	3.55 µl

Çizelge 4.10. Mutasyon bölgelerini çoğaltmak için multipleks PCR’da kullanılan ısı döngüsü

PCR programı	Süre	
Sıcaklık	Süre	
94 °C denatürasyon	3 dakika	
94 °C denatürasyon	30 saniye	35 döngü
65 °C hibridizasyon	30 saniye	
72 °C uzama	1 dakika 45 saniye	
72 °C final uzama	10 dakika	
4 °C	∞	

Nokta mutasyonları için elde edilen PCR ürün boylarının birbirine yakın uzunlukta olması nedeni ile her ampikonun elde edilip edilmediği, her primer çifti ile ayrı reaksiyonlarda ve

aynı koşullarda ikinci bir PCR uygulanarak kontrol edildi. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüledi.

Füzyon mutasyonları için ampikonların elde edilip edilmediğinin kontrolü için PCR ürünleri ile birlikte kalıp DNA olarak kullanılan polinükleotitler de elektroforezden geçirilerek bantların şiddeti karşılaştırıldı

4.2.4.1 Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu Optimizasyonu

Multipleks PCR yöntemi ile çoğaltılan ampikonların PCR optimizasyonu için standart koşul olarak primer validasyonunda kullanılan aynı koşullar kullanıldı.

Standart koşullara ilave olarak primerlerin konsantrasyonu 0.1µM ve 0.3µM, MgCl₂'nin konsantrasyonu 1.2mM ve 1.8mM, dNTP konsantrasyonu 0.9mM ve 1.8mM, PCR tamponunun konsantrasyonu 0.75X ve 3X olacak şekilde değıştirilerek farklı koşulların PCR ürünlerine etkilerine bakıldı. PCR'dan çıkan tüpler barkodlama yapılmak üzere -20 °C'da saklandı.

4.2.5 Barkodlama

Illumina Miseq'te paralel okuma sonrası farklı PCR ürünlerinin ayırt edilebilmesi için Multiplicom'un kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre barkodlama işlemleri yapıldı.

PCR sonrası elde edilen ürünler 98µl PCR gradient su içine 2µl PCR ürünü olmak üzere seyreltildi.

Çizelge 4.11.Barkodlama için PCR'da kullanılan kimyasallar

Kullanılan kimyasal	Hacim
Universal Buffer (multiplicom)	10 µl
Amplification reagent (multiplicom)	10 µl
MID primer p5 (multiplicom)	2.0 µl
MID primer p7 (multiplicom)	2.0 µl
PCR ürünü	1.0 µl
Taq polimeraz (multiplicom)	0.125 µl

Çizelge 4.12. Barkodlama için PCR’da kullanılan ısı döngüsü

PCR programı	Süre	
Sıcaklık	Süre	
98 °C denatürasyon	10 dakika	
95 °C denatürasyon	45 saniye	20 döngü
64 °C hibridizasyon	45 saniye	
68 °C uzama	2 dakika	
72 °C final uzama	10 dakika	
4 °C	∞	

PCR’den çıkan tüpler purifikasyon yapılmak üzere -20 °C’da saklandı.

4.2.6 Purifikasyon

- Her ampikon için pürifiye edilmiş barkodlu PCR ürünleri yaklaşık olarak aynı miktarda olacak oranda pleksler birleştirildi ve vorteksle karıştırıldı.
- 24µl AmPure bead 1.5’lik ependorf tüpe kondu. AmPure beadlerin üzerine birleştirilen PCR ürünlerinden 30µl ilave edilip orta şiddette vorteksle karıştırıldı ve oda ısısında 5 dakika beklemeye bırakıldı.
- Oda ısısında bekletilen karışım manyetik DynaMag üzerine yerleştirilerek 5 dakika oda ısısında bekletildi.
- Tüplerin içinde manyetik beadlerin yüzeye çekilmesinin ardından berrak hale gelen sıvı kısım pipet ile çekilerek atıldı.
- Her tüpün üzerine 200µl %70 taze hazırlanmış EtOH eklendi ve tekrar Dyna Mag üzerine yerleştirildi. Manyetik beadler yüzeye çekilinceye kadar bekletildikten sonra supernatant pipetle çekilerek atıldı.
- Her tüpün üzerine tekrar 200µl %70 taze hazırlanmış EtOH eklendi ve Dyna Mag üzerine yerleştirildi. Manyetik beadler yüzeye çekilinceye kadar bekletildikten sonra supernatant tekrar pipetle çekilerek atıldı. Beadlerin üzerinde kalmış olan nem buharlaşmaya kadar tüplerin kapakları açık olarak bekletildi.

- Beadlerin üzerindeki nem yeterince buharlaştıktan sonra 20µl distile su eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı. Su eklenen beadler DynaMag üzerine yerleştirildikten sonra yüzeye çekilinceye kadar bekletildi.
- Beadler yüzeye çekildikten sonra süpernatant pipetle çekilerek üzeri etiketlenmiş tüplere purifiye edilmiş DNA olarak aktarıldı.

4.2.7 Sekanslama

- Purifiye edilmiş PCR ürünlerinin NanoDrop ile konsantrasyonları ölçüldü.
- Illumina MiSeq ile dizilemede her amplikondan yaklaşık olarak 4nM konsantrasyonda olacak şekilde 1XTE tampon ile seyreltildi.
- MiSeq platformunda dizileme aşamasına girecek olan aynı konsantrasyondaki tüm amplikonlar Illumina MiSeq'in protokolüne göre birleştirildi.

4.2.7.1 MiSeq

Hazırlanmış olan amplikon kütüphanesini sekanslamaya hazırlamak için Illumina MiSeq koşum protokolü uygulandı.

- 10N NaOH seyreltilerek taze 0.2N NaOH hazırlandı.
- Mikrosantrifüj tüpü içerisinde 5µl (4 nM) DNA örneği ile 5µl (0.2N) NaOH birleştirildi. Karışım vorteksle kısaca karıştırılıp 1 dakika boyunca 280xg santrifüj edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika denatüre olması için inkübasyona bırakıldı.
- Denatüre olan 10µl DNA örneği buzları önceden çözülmüş olan 990µl HT1 tamponu ile karıştırıldı ve 1mM NaOH ile 20pM denatüre kütüphane elde edildi ve karışım bir sonraki aşamaya kadar buzda bekletildi.
- 360µl 20 pM denatüre DNA ile 540µl buzları çözülmüş HT tamponu birleştirilerek 8pM'e seyreltildi.

Sekanslama esnasında kullanılmak üzere PhiX kontrol kütüphanesi hazırlandı.

- 2µl (10nM) PhiX kütüphanesi ile 3µl 10mM Tris-Cl ve pH 8.5'te %0.1 Tween 20 ile karıştırılarak 4nM PhiX kütüphanesi hazırlandı.
- 5µl 4nM PhiX kütüphanesi ile 5µl 0.2N NaOH birleştirildi. 2nM PhiX karışımı kısaca vorteks ile karıştırılarak 1 dakika boyunca 280xg santrifüj edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika denatüre olması için inkübasyona bırakıldı.

- Denatüre olan 10µl PhiX kütüphanesi ile buzları önceden çözülmüş olan 990µl HT1 tamponu ile karıştırıldı ve 1mM NaOH konsantrasyonunda 20pM denatüre PhiX kütüphanesi elde edildi.
- 20pM PhiX kütüphanesinden 62.5µl alınarak 37.5µl buzları çözülmüş HT1 tamponu karıştırılarak 12.5µl PhiX kütüphanesi elde edildi.
- Son aşama olarak 33µl 12.5µl PhiX kütüphanesi ile 627µl denatüre DNA örneği birleştirildi ve vorteksle karıştırılarak yüklemeye hazır hale getirildi.

4.2.8 Dizinin Analizi

Birleştirilen ve Illumina MiSeq'e yüklenen DNA örneği SeqPilot (JSI medical systems GmbH, version 4.1.2) yazılımı ile analiz edildi. Elde edilen amplikon sayıları grafik haline getirildi. Her amplikonun okuma sayısı ile pleks içi ve pleksler arası ortalama okuma sayıları hesaplandı. Amplikon okuma sayılarının birbirleri ile uyumuna yine pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları hesaplanarak bakıldı. Pleks içi okuma sayılarının standart sapması hesaplandı ve pleks içi aritmetik ortalamasına bölünerek pleks içi varyasyon katsayıları elde edildi. Aynı şekilde pleksler arası okuma sayılarının tümü alınarak standart sapma hesaplandı ve tüm okuma sayılarının aritmetik ortalamasına bölünerek pleksler arası varyasyon kat sayıları elde edildi.

4.2.9 Multipleks PCR Validasyonu

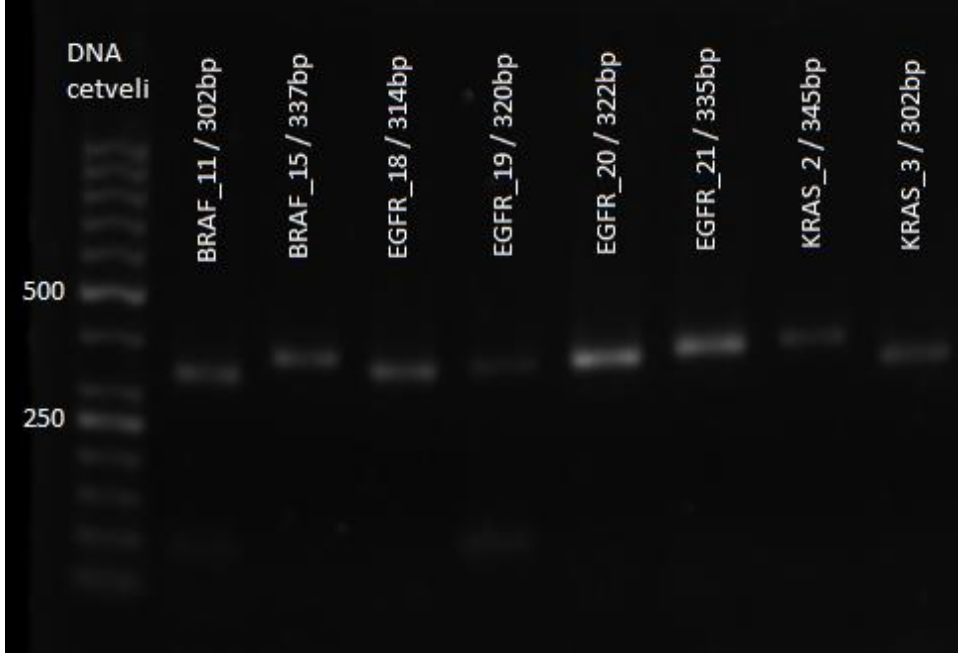
Nokta mutasyonu için tasarlanan primerlerin multipleks PCR validasyonu için EGFR mutasyonu olduğu bilinen anonimize DNA örnekleri kullanıldı.

Füzyon mutasyonları için tasarlanan primerlerin multipleks PCR validasyonu için tasarlanan polinükleotid dizileri kullanıldı.

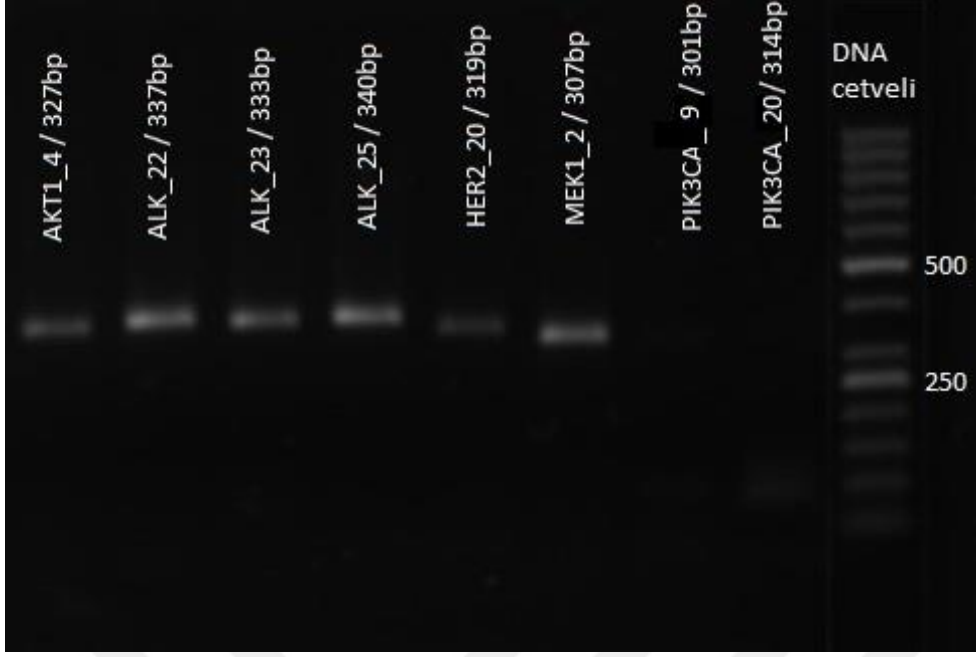
5 ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 Primerlerin Validasyonu

Nokta mutasyonları için tasarladığımız primerlerin multipleks PCR öncesinde istenilen bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığının kontrolü için her primer çifti için ayrı tüplerde PCR uygulandı. Elde edilen PCR ürünlerin %3'lük agaroz jel elektroforezinden sonra UV görüntüleyicide fotoğrafları çekildi.



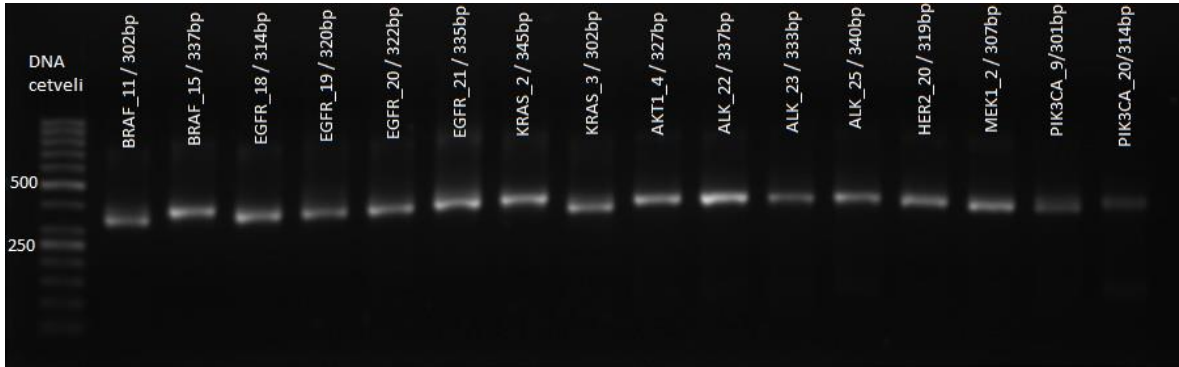
Şekil 5.1. Pleks 1 primerleri ile tekli olarak çoğaltılan nokta mutasyonu bölgelerinin jel görüntüsü



Şekil 5.2. Pleks 2 primerleri ile tekli olarak çoğaltılan nokta mutasyonu bölgelerinin jel görüntüsü

5.2 Multipleks PCR Validasyonu

Multipleks PCR olarak çoğaltılan bölgelerin birbirlerine yakın uzunlukta olması nedeni ile agaroz jel elektroforezinde ayırt etmek mümkün olmadığı için primer çiftleri ayrı ayrı kullanılarak her bölge multipleks PCR ürününden tekrar çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgelerin %3'lük agaroz jel elektroforezinden sonra görüntüleri çekildi.

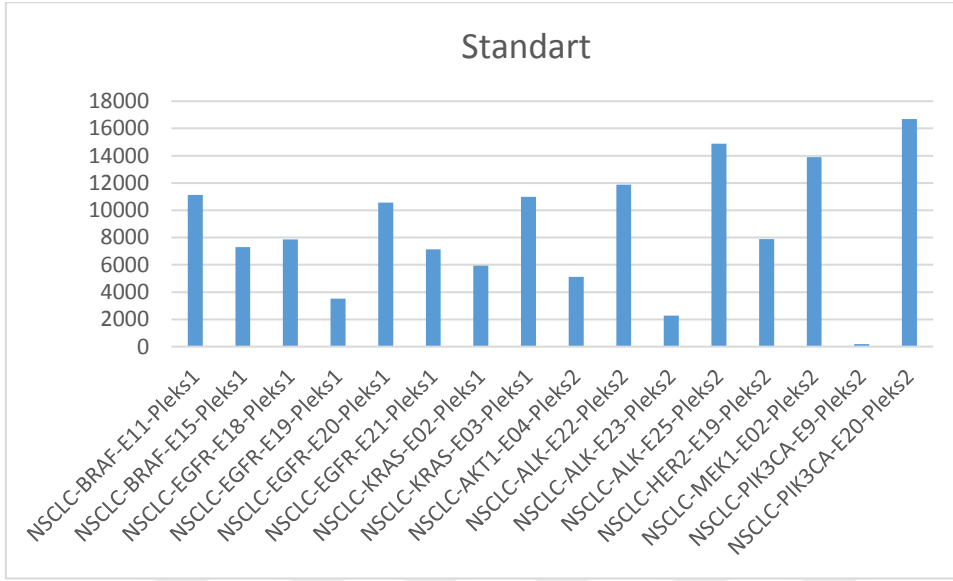


Şekil 5.3. Multipleks olarak çoğaltılan nokta mutasyonu bölgelerinin jel görüntüsü

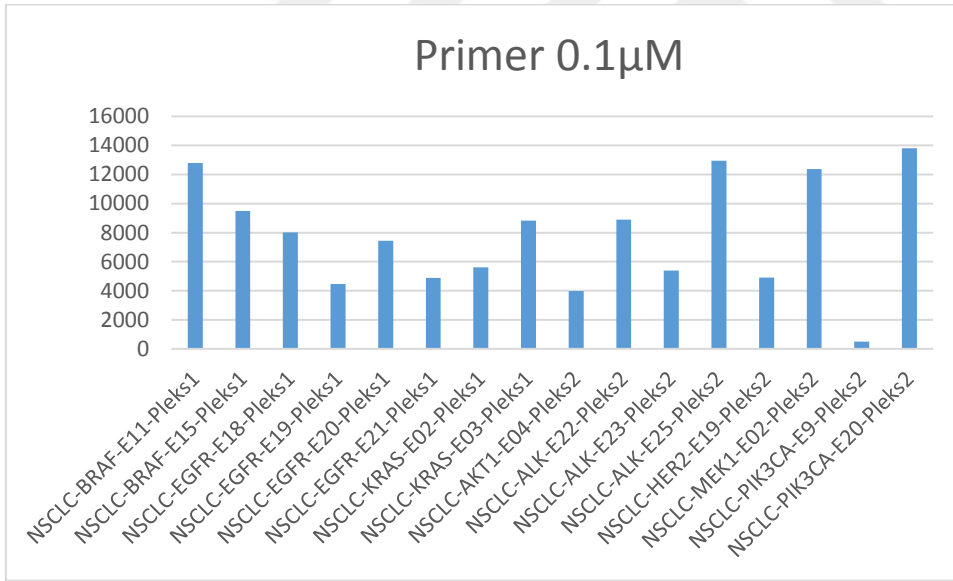
5.3 Multipleks PCR Optimizasyonu

Primerlerin validasyonunda kullanılan PCR koşulları standart olarak kabul edilerek multipleks PCR aşamasında farklı PCR koşulları uygulandı. İlk PCR'dan elde edilen ürünlere ikinci PCR ile barkodlama işlemi yapıldı. Barkodlama işlemi yapılan PCR ürünleri purifiye edilerek birleştirildi ve yüklemeye hazır amplicon kütüphanesi hazırlandı.

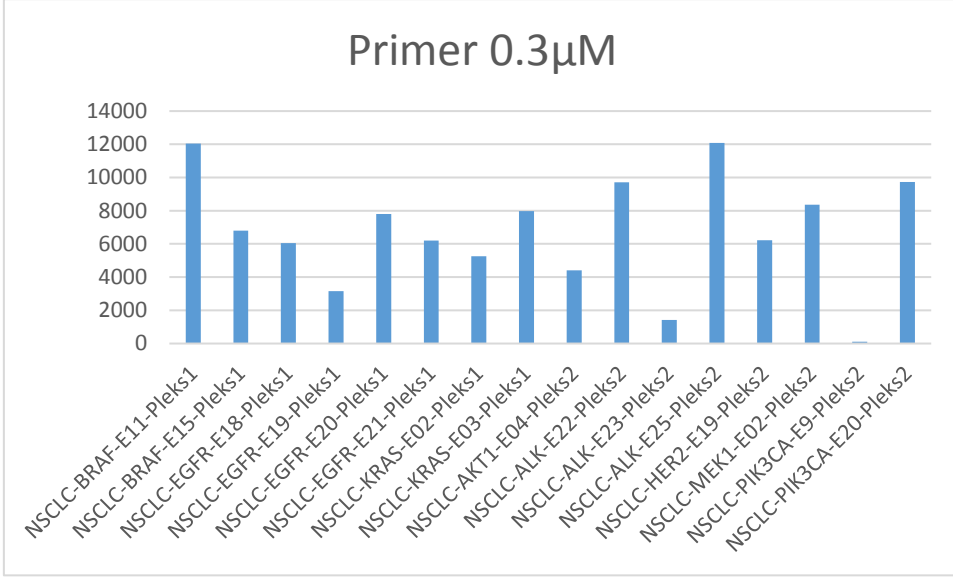
Hazırlanan kütüphane Illumina MiSeq ile dizileme çalışması yapıldı ve elde edilen okuma sayıları SeqPilot programı ile analiz edilerek grafikler çıkartıldı.



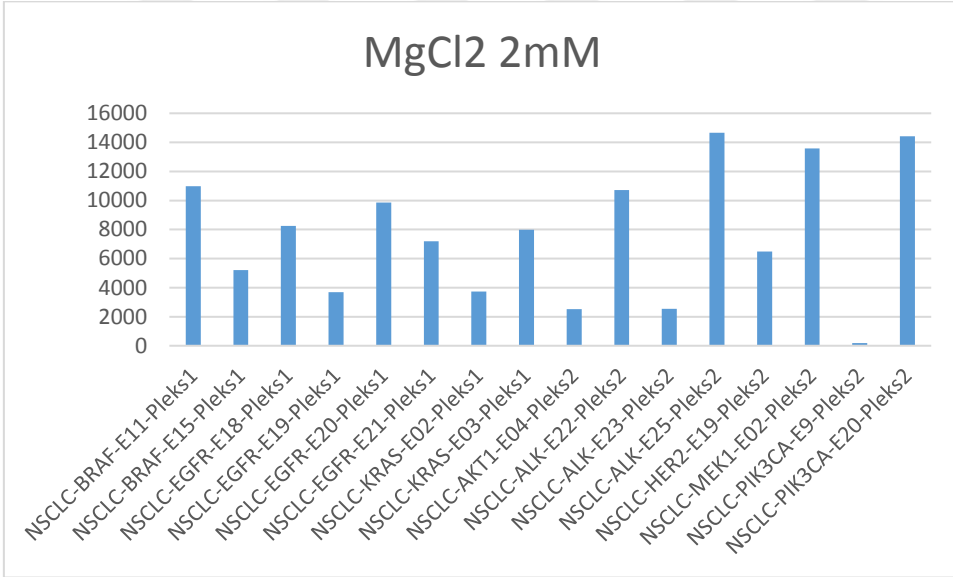
Şekil 5.4. Multipleks PCR ile standart koşullarda amplicon okuma sayıları



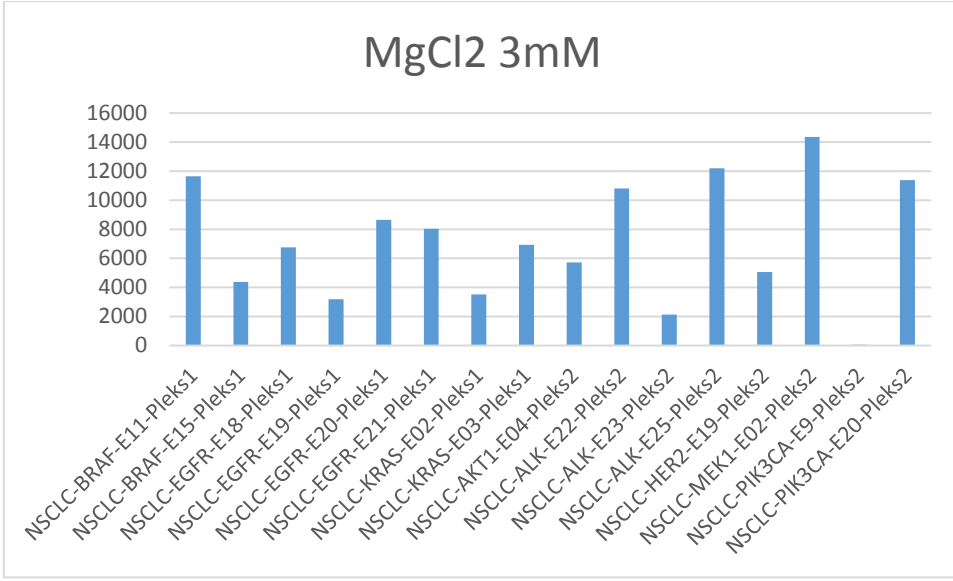
Şekil 5.5. Multipleks PCR ile düşük primer konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları



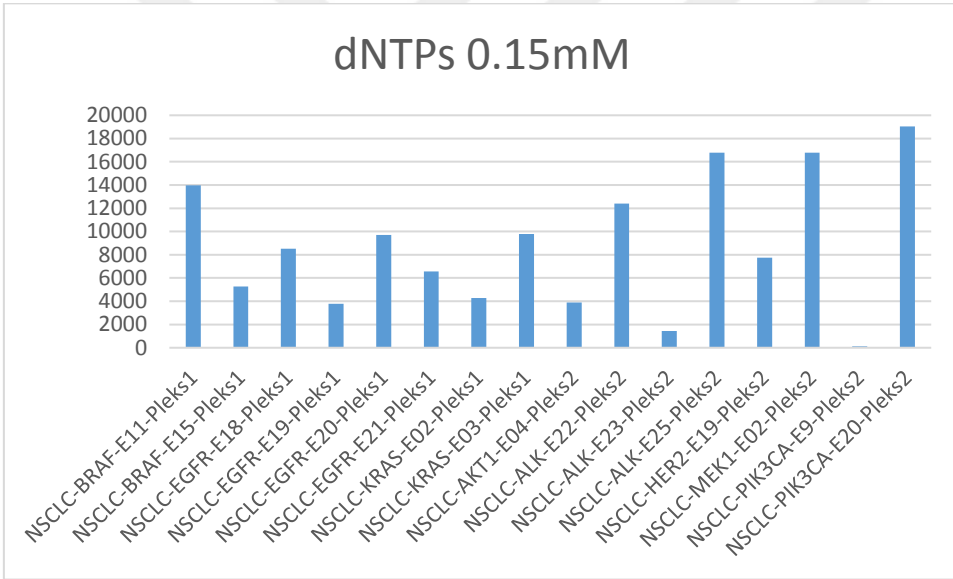
Şekil 5.6. Multipleks PCR ile yüksek primer konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları



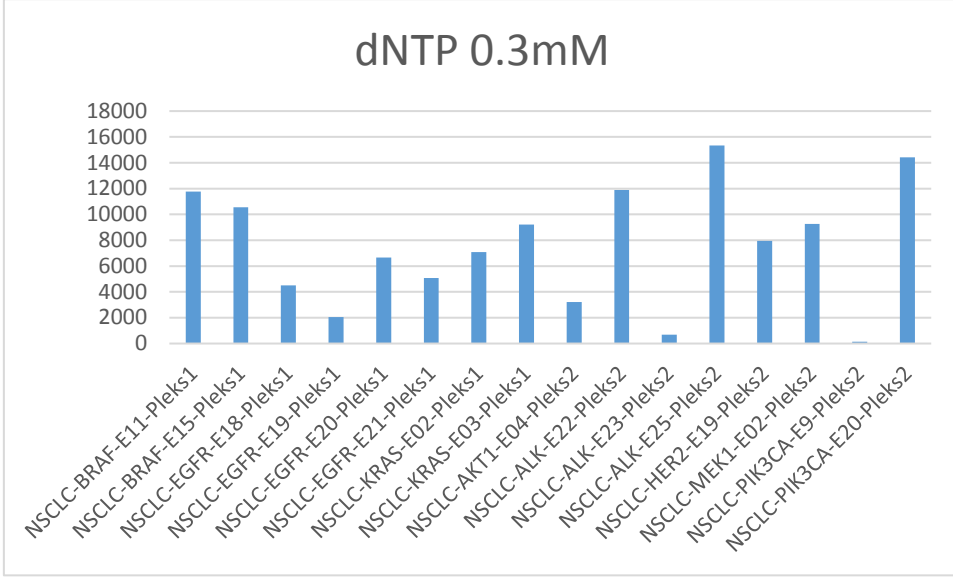
Şekil 5.7. Multipleks PCR ile düşük MgCl2 konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları



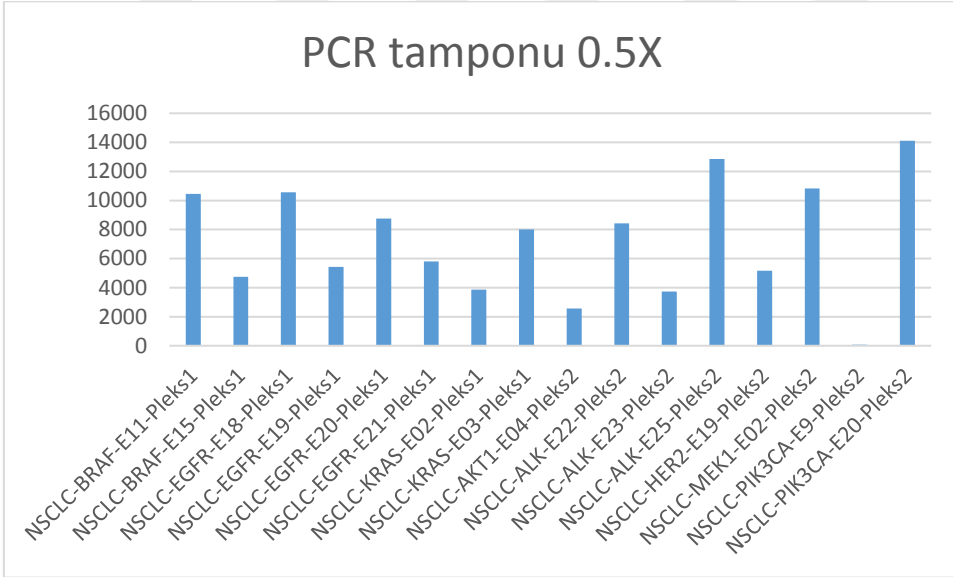
Şekil 5.8. Multipleks PCR ile yüksek MgCl₂ konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları



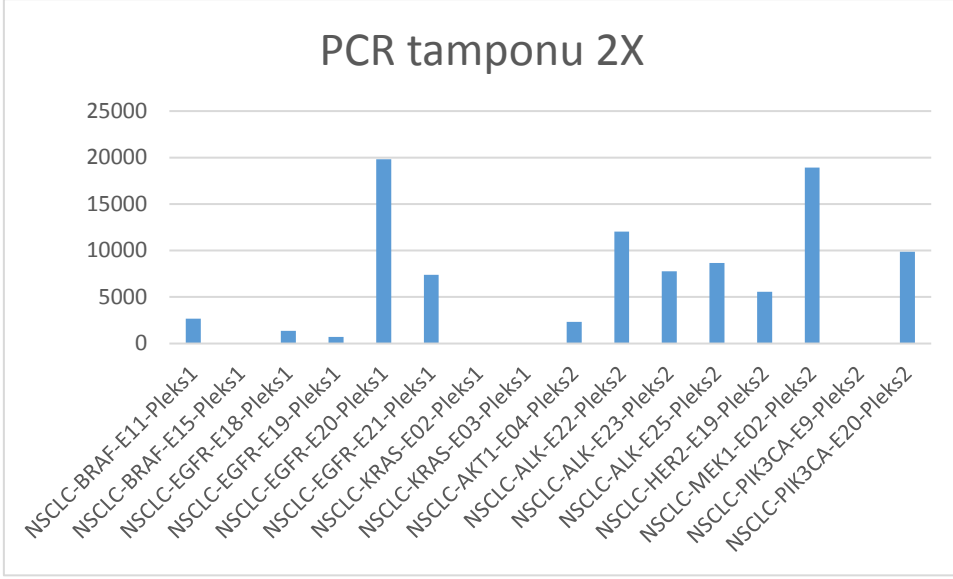
Şekil 5.9. Multipleks PCR ile düşük dNTP konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları



Şekil 5.10. Multipleks PCR ile yüksek dNTP konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları



Şekil 5.11. Multipleks PCR ile düşük PCR tamponu konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları



Şekil 5.12. Multipleks PCR ile yüksek PCR tamponu konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları

5.4 Amplikon Okuma Sayıları ve Varyasyon Katsayıları

Illumina MiSeq ile dizileme çalışması yapılan örneklerin okuma sayıları SeqPilot yazılımı ile analiz edildi. Okuma sayılarının pleks içi ve pleksler arası uyumuna varyasyon katsayıları hesaplanarak bakıldı. Bunun için pleks içi okuma sayılarının aritmetik ortalaması alındı. Pleks içi okumaların standart sapmaları hesaplandıktan sonra ilgili pleksin aritmetik ortalamasına bölünerek varyasyon katsayısı elde edildi. Pleksler arası varyasyon katsayısı de aynı işlemlerle tüm amplikonların okuma sayılarının aritmetik ortalaması alınarak, tüm okumalar ile hesaplanan standart sapmaya bölünerek pleksler arası varyasyon katsayıları elde edildi. Pleks 1 içindeki varyasyon katsayıları 0.40 civarında çıkarken pleks 2 içindeki varyasyon katsayıları 0.70 civarında çıkmıştır. Buna bağlı olarak pleksler arası varyasyon katsayıları 0.60 civarında elde edilmiştir.

Çizelge 5.1. Multipleks PCR ile standart koşullarda amplicon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları

	Pleks No	Hedef Bölge	İleri amplicon sayısı	Geri amplicon sayısı	Toplam amplicon sayısı	Pleks ortalama amplicon sayısı	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalama amplicon sayısı	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı
Standart	1	BRAF-E11	5548	3692	9240	6393.00	2454.53	0.38	6645.63	3758.03	0.57
		BRAF-E15	1649	3616	5265						
		EGFR-E18	3915	1411	5326						
		EGFR-E19	1311	1668	2979						
		EGFR-E20	3503	4535	8038						
		EGFR-E21	2413	3123	5536						
		KRAS-E02	1751	2926	4677						
	KRAS-E03	5426	4657	10083							
	2	AKT1-E04	1526	2360	3886	6898.25	4908.42	0.71	6645.63	3758.03	0.57
		ALK-E22	3914	5389	9303						
		ALK-E23	785	908	1693						
		ALK-E25	7419	2790	10209						
		HER2-E20	3926	912	4838						
		MEK1-E02	6182	5182	11364						
PIK3CA-E9		91	90	181							
PIK3CA-E20	6964	6748	13712								

Çizelge 5.2. Multipleks PCR ile düşük primer konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları

	Pleks No	Hedef Bölge	İleri amplicon sayısı	Geri amplicon sayısı	Toplam amplicon sayısı	Pleks ortalama amplicon sayısı	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalama amplicon sayısı	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı
Primer 0.1µl	1	BRAF-E11	6377	4254	10631	6060.25	2378.37	0.39	6028.50	3123.40	0.52
		BRAF-E15	2143	4680	6823						
		EGFR-E18	3988	1399	5387						
		EGFR-E19	1685	2129	3814						
		EGFR-E20	2539	3029	5568						
		EGFR-E21	1683	2033	3716						
		KRAS-E02	1657	2771	4428						
	KRAS-E03	4365	3750	8115							
	2	AKT1-E04	1218	1844	3062	5996.75	3904.61	0.65	6028.50	3123.40	0.52
		ALK-E22	3004	4043	7047						
		ALK-E23	1868	2185	4053						
		ALK-E25	6459	2380	8839						
		HER2-E20	2458	531	2989						
		MEK1-E02	5543	4625	10168						
PIK3CA-E9		247	244	491							
PIK3CA-E20	5762	5563	11325								

Çizelge 5.3. Multipleks PCR ile yüksek primer konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları

	Pleks No	Hedef Bölge	İleri amplikon sayısı	Geri amplikon sayısı	Toplam amplikon sayısı	Pleks ortalaması	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalaması	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı
Primer 0.3µl	1	BRAF-E11	5995	3931	9926	5443.75	2263.00	0.42	5148.94	2703.20	0.53
		BRAF-E15	1535	3343	4878						
		EGFR-E18	3014	980	3994						
		EGFR-E19	1190	1497	2687						
		EGFR-E20	2674	3152	5826						
		EGFR-E21	2107	2685	4792						
		KRAS-E02	1551	2590	4141						
	KRAS-E03	3956	3350	7306							
	2	AKT1-E04	1341	2019	3360	4854.13	3215.39	0.66	5148.94	2703.20	0.53
		ALK-E22	3269	4266	7535						
		ALK-E23	496	565	1061						
		ALK-E25	6044	2205	8249						
		HER2-E20	3142	636	3778						
		MEK1-E02	3719	3087	6806						
PIK3CA-E9		53	52	105							
PIK3CA-E20	4059	3880	7939								

Çizelge 5.4. Multipleks PCR ile düşük MgCl₂ konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları

	Pleks No	Hedef Bölge	İleri amplikon sayısı	Geri amplikon sayısı	Toplam amplikon sayısı	Pleks ortalaması	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalaması	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı
MgCl ₂ 2mM	1	BRAF-E11	5483	3701	9184	5666.13	2272.79	0.40	5956.19	3596.77	0.60
		BRAF-E15	1178	2589	3767						
		EGFR-E18	4098	1573	5671						
		EGFR-E19	1389	1776	3165						
		EGFR-E20	3267	4322	7589						
		EGFR-E21	2438	3199	5637						
		KRAS-E02	1105	1850	2955						
	KRAS-E03	3950	3411	7361							
	2	AKT1-E04	757	1188	1945	6246.25	4729.04	0.76	5956.19	3596.77	0.60
		ALK-E22	3557	4947	8504						
		ALK-E23	871	1061	1932						
		ALK-E25	7280	2986	10266						
		HER2-E20	3230	816	4046						
		MEK1-E02	6062	5141	11203						
PIK3CA-E9		89	88	177							
PIK3CA-E20	6019	5878	11897								

Çizelge 5.5. Multipleks PCR ile yüksek MgCl₂ konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları

	Pleks No	Hedef Bölge	İleri amplikon sayısı	Geri amplikon sayısı	Toplam amplikon sayısı	Pleks ortalaması	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalaması	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı
MgCl ₂ 3mM	1	BRAF-E11	5813	3842	9655	5246.00	2405.69	0.46	5560.69	3300.92	0.59
		BRAF-E15	991	2174	3165						
		EGFR-E18	3363	1211	4574						
		EGFR-E19	1202	1509	2711						
		EGFR-E20	2943	3570	6513						
		EGFR-E21	2737	3474	6211						
		KRAS-E02	1040	1739	2779						
	KRAS-E03	3430	2930	6360							
	2	AKT1-E04	1728	2655	4383	5875.38	4163.53	0.71	5560.69	3300.92	0.59
		ALK-E22	3626	4751	8377						
		ALK-E23	739	858	1597						
		ALK-E25	6082	2329	8411						
		HER2-E20	2532	562	3094						
		MEK1-E02	6402	5334	11736						
PIK3CA-E9		25	25	50							
PIK3CA-E20	4758	4597	9355								

Çizelge 5.6. Multipleks PCR ile düşük dNTP konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları

	Pleks No	Hedef Bölge	İleri amplikon sayısı	Geri amplikon sayısı	Toplam amplikon sayısı	Pleks ortalaması	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalaması	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı
dNTP 0.15mM	1	BRAF-E11	6961	4612	11573	6110.63	2983.64	0.49	6760.75	4597.32	0.68
		BRAF-E15	1192	2607	3799						
		EGFR-E18	4235	1504	5739						
		EGFR-E19	1411	1785	3196						
		EGFR-E20	3227	4047	7274						
		EGFR-E21	2247	2692	4939						
		KRAS-E02	1262	2113	3375						
	KRAS-E03	4844	4146	8990							
	2	AKT1-E04	1168	1786	2954	7410.88	5951.63	0.80	6760.75	4597.32	0.68
		ALK-E22	4039	5625	9664						
		ALK-E23	499	591	1090						
		ALK-E25	8362	3053	11415						
		HER2-E20	3869	867	4736						
		MEK1-E02	7462	6222	13684						
PIK3CA-E9		62	61	123							
PIK3CA-E20	7946	7675	15621								

Çizelge 5.7. Multipleks PCR ile yüksek dNTP konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları

	Pleks No	Hedef Bölge	İleri amplicon sayısı	Geri amplicon sayısı	Toplam amplicon sayısı	Pleks ortalama amplicon sayısı	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalama amplicon sayısı	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı
dNTP 0.3mM	1	BRAF-E11	5856	3912	9768	5647.25	2776.01	0.49	5782.44	3662.89	0.63
		BRAF-E15	2386	5205	7591						
		EGFR-E18	2242	774	3016						
		EGFR-E19	773	983	1756						
		EGFR-E20	2254	2799	5053						
		EGFR-E21	1725	2236	3961						
		KRAS-E02	2085	3487	5572						
	KRAS-E03	4554	3907	8461							
	2	AKT1-E04	969	1504	2473	5917.63	4582.82	0.77	5782.44	3662.89	0.63
		ALK-E22	3969	5362	9331						
		ALK-E23	236	277	513						
		ALK-E25	7641	2935	10576						
		HER2-E20	3986	887	4873						
		MEK1-E02	4126	3478	7604						
PIK3CA-E9		64	63	127							
PIK3CA-E20	6024	5820	11844								

Çizelge 5.8. Multipleks PCR ile düşük PCR tamponu konsantrasyonunda amplicon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları

	Pleks No	Hedef Bölge	İleri amplicon sayısı	Geri amplicon sayısı	Toplam amplicon sayısı	Pleks ortalama amplicon sayısı	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalama amplicon sayısı	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı
PCR buffer 0.5X	1	BRAF-E11	5211	3497	8708	5708.38	2061.45	0.36	5605.44	3117.82	0.56
		BRAF-E15	1071	2352	3423						
		EGFR-E18	5250	1984	7234						
		EGFR-E19	2039	2618	4657						
		EGFR-E20	2861	3825	6686						
		EGFR-E21	1966	2571	4537						
		KRAS-E02	1144	1914	3058						
	KRAS-E03	3961	3403	7364							
	2	AKT1-E04	764	1199	1963	5502.50	4068.97	0.74	5605.44	3117.82	0.56
		ALK-E22	2702	3881	6583						
		ALK-E23	1271	1551	2822						
		ALK-E25	6381	2547	8928						
		HER2-E20	2562	628	3190						
		MEK1-E02	4792	4049	8841						
PIK3CA-E9		39	39	78							
PIK3CA-E20	5886	5729	11615								

Çizelge 5.9. Multipleks PCR ile yüksek konsantrasyonunda amplikon okuma sayıları ve pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları

	Pleks No	Hedef Bölge	İleri amplikon sayısı	Geri amplikon sayısı	Toplam amplikon sayısı	Pleks ortalama amplikon sayısı	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalama amplikon sayısı	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı
PCR buffer 2X	1	BRAF-E11	1336	899	2235	3080.88	5224.70	1.70	4688.00	5170.91	1.10
		BRAF-E15	0	0	0						
		EGFR-E18	676	254	930						
		EGFR-E19	267	343	610						
		EGFR-E20	6644	8435	15079						
		EGFR-E21	2516	3264	5780						
		KRAS-E02	0	0	0						
		KRAS-E03	7	6	13						
	2	AKT1-E04	702	1093	1795	6295.13	4908.69	0.78			
		ALK-E22	4024	5453	9477						
		ALK-E23	2656	3225	5881						
		ALK-E25	4303	1714	6017						
		HER2-E20	2780	665	3445						
		MEK1-E02	8461	7158	15619						
PIK3CA-E9	0	0	0								
PIK3CA-E20	4119	4008	8127								

6 TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1 TARTIŞMA

Akciğer kanserinin moleküler genetik temellerinin anlaşılması ile tedavi sürecinde kişiye yönelik uygulamaların faydaları da çeşitli çalışmalarda gösterilmeye başlamıştır. Klasik kemoterapi ilaçları ile karşılaştırıldığında, kişide bulunan mutasyona uğramış moleküler hedeflere karşı geliştirilen ilaçlar daha etkin sonuç vermektedir. Bu nedenle moleküler tedavi hedefi durumunda olan veya tedavide yönlendirici olabilecek genlerdeki mutasyonların taranmasında kullanılacak bir tanı yöntemi önem kazanmaktadır (53-55).

Akciğer kanserinde, nokta mutasyonların tespitinde yaygın olarak sanger dizileme ve gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemleri; füzyon mutasyonlarının tespitinde de yaygın olarak fluoresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise multipleks PCR ile çoğaltılan gen bölgelerindeki mutasyon tespiti için Illumina Miseq platformunda yeni nesil dizileme yöntemi geliştirilmiştir (56, 57).

Sanger dizileme yönteminde yaklaşık 900 bp uzunluğundaki diziler okunabilmektedir. Genellikle bu dizilerin yaklaşık 50 bp uzunluğundaki ilk kısmı ve 900bp'in üzerindeki kısımları çoğunlukla okunamamaktadır. Kapiler elektroforez prensibi ile çalışan Sanger dizileme yönteminde 50 bp'den düşük uzunluklar ayırt edilememekte ve 900 bp'den yüksek uzunluklarda sekans PCR'ında kullanılan polimerazın verimi elde edilen sonuçları sınırlandırmaktadır. Bu çalışmada uyguladığımız yöntem ile yaklaşık olarak 300bp uzunluğundaki bölgeleri okuyor olmamıza rağmen sanger dizileme yönteminden üstün olarak yeni nesil sekanslamanın paralel okuma özelliği ile birden fazla bölge ve DNA barkodlama yöntemi ile farklı hastaların DNA örnekleri aynı test uygulaması içinde okunabilmektedir. Ayrıca tümör dokunun heterojenitesi nedeni ile tespit edilemeyen mutasyonlar yeni nesil dizileme yönteminde, paralel okuma özelliği ile yeni nesil dizilemenin test sonucunda elde edilen okuma sayıları içerisinde tespit edilebilmektedir. Buna ilave olarak tüm bölgelerin dizileme çalışması için yaklaşık 30ng gibi düşük miktarda DNA örneği ile çalışma imkanı sağlanabilmektedir(58-60).

Gerçek zamanlı PCR yönteminde önceden belirlenmiş mutasyonlar için hassas sonuçlar elde edilebilmekte ancak dizi okuması gerçekleştirilmediği için önceden belirlenmemiş mutasyonlar tespit edilememektedir. Gerçek zamanlı PCR tekniğinde kullanılan proplar ile primerin tasarlandığı ve mutasyon içeren bölgedeki nükleotid bazlarından kaynaklanan bağlanma sıcaklığındaki değişim sayesinde primer ile komplementer olmayan sekansın

daha geç çoğalması esasına dayanır. Bu yöntemde dizinin okunması gerçekleşmemekte, önceden belirlenmiş olan mutasyonların varlığı ya da yokluğu elde edilmektedir. Yeni nesil sekanslamada ise mutasyon bölgesinin dizisi okunduğu için önceden belirlenmemiş olan yeni mutasyonlar da ortaya çıkarılmaktadır(61, 62).

Füzyon mutasyonları için FISH yöntemi standart tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan ayrılmalı (break apart) probalar ile gen yeniden düzenlenmesi tespit edilebilmekte ancak dizi ve füzyonun olduğu bölge hakkında bilgi vermemektedir. ALK füzyonlarında EML4 füzyon partnerinin yeniden düzenlenmesi *EML4* geninin farklı bölgelerini içermesine karşılık *ALK* geninin kinaz bölgesi füzyonların hepsinde korunmuş durumdadır (63). Bu çalışmada seçilen varyantlar, tasarlanan primerlerle cDNA'dan çoğaltılarak, oluşan füzyonun dizisi hakkında da bilgi sağlayabilmektedir (64).

Dizileme aşamasında Illumina Miseq platformunun kullanıldığı bu çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanserinde tedavi hedefi veya tedavide yönlendirici olabilecek gen bölgelerinin multipleks PCR yöntemi ile çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Multipleks PCR uygulaması normal PCR'da geçerli olan koşulların yanında multipleks PCR'da kullanılan primer çiftlerin birbirleri ile de uyumlu olmasını gerektirmektedir. Her primer çifti reaksiyon tüpünde yer alan dNTP, MgCl₂ gibi kaynakları ortak olarak kullandığı için her primer çiftinin verimliliği birbiri ile dengeli olmalıdır. PCR yönteminin bir çeşidi olan multipleks PCR metodunda birden fazla primer çifti aynı reaksiyon içerisinde kullanılarak önemli ölçüde zaman ve kaynak kazanımı sağlamaktadır (65). Sağladığı avantajlar nedeniyle bu yöntem nokta mutasyonları, polimorfizm, gen delesyonları, niceliksel analizlerde ve mikrobiyolojide tür tespitinde kullanılmaktadır (66).

Multipleks PCR optimizasyonunda primer konsantrasyonlarının kalıp DNA'ya oranı reaksiyon veriminde önemli rol oynamaktadır. Primer konsantrasyonunun kalıp DNA konsantrasyonundan 10⁷ molar fazla olması ve kalıp DNA'dan bağımsız olarak primer konsantrasyonu 0.5µM'dan fazla olmaması PCR ürünlerinin verimini arttırmaktadır. Bizim çalışmamızda bu konsantrasyon her primer için 0.2µM olarak belirlenmiştir. Bu koşulların sağlanmadığı bir reaksiyon ortamında primer dimer oluşma şansı yükselmektedir. Buna bağlı olarak da reaksiyon sonunda beklenmeyen amplifikasyon ürünleri görülebilmektedir. Primer konsantrasyonunun kalıp DNA konsantrasyonuna oranının çok düşük olması ise ürünlerin beklenilenin aksine katlanarak artmamasına neden olmaktadır (67).

Primer dimer oluşumu gibi PCR'ı etkileyen ve özgül olmayan bağlanmaların önlenmesi için primer tasarımında primerin GC içeriği, bağlanma sıcaklığı, kalıp DNA ile eşlenik olması gibi parametrelerin dikkate alınması gerekmektedir (68). Spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçmek için termal döngü öncesinde PCR'a yüksek sıcaklıkta başlanması primer dimer gibi spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesini sağlayabilir (69).

Birden fazla primer çiftinin kullanıldığı multipleks PCR tekniğinde her primer çiftinin ideal olarak eşit verimlilikte olması gerekmektedir. Her primer çiftinin eşit verimlilikte çalışması için bağlanma sıcaklıklarının birbirine mümkün olduğunca yakın olması gerekmektedir. Bağlanma sıcaklığı multipleks PCR içerisinde yer alan primer çiftlerinin verimliliğini etkileyen en önemli parametrelerden birisidir. Tüm primer çiftlerinin reaksiyon içinde bulunan sınırlı miktarda kaynak için birbiri ile yarış içinde olmasından dolayı bağlanma sıcaklığının yaklaşık olarak 4-6⁰C düşürülmesi her primer çiftinin verimliliğinin dengelenmesini sağlayabilir. Bağlanma sıcaklığının yüksek olması durumunda bağlanma sıcaklığı düşük olan primer çiftleri bağlanma sıcaklığı yüksek olan primer çiftlerinin gerisinde kalarak olumsuz olarak etkilenmektedir. Bizim çalışmamızda bağlanma sıcaklığı 65⁰C olarak belirlendi. Ayrıca her primerin kendi içinde veya diğer primerler ile eşlenik dizi bulundurması da o primerin verimini düşüreceği için primerlerin kalıp DNA'da spesifik olarak bağlanacağı bölge dışında eşlenik dizi içermemesi gerekmektedir (70). Çoğaltılacak gen bölgesinin genomik DNA içinde psödogen gibi eşleniği olan bölgelerin olması durumunda o primerin spesifik olarak bağlanması beklenen bölgeyi çoğaltmasında veriminin düşmesine neden olabilir (71). Bizim çalışmamızda da *PIK3CA* geninin ekzon 9 bölgesi ile eşlenik olan psödogen bulunması nedeniyle bu primer çiftinin verimi düşük olduğu gözlemlenmiş ancak dizinin okunması açısından önemli bir engel teşkil etmemiştir.

Kalıp DNA'nın düşük konsantrasyonda olması halinde kalıp DNA'nın özelliklerine bağlı olarak primer çiftlerinin kalıp DNA'da eşleniği olduğu bölgelere bağlanma verimini etkileyebilir. Ayrıca kalıp DNA'da hedef bölge durumunda olan dizinin yakın bölgelerinde bulunan GC içeriği gibi ikincil yapı oluşumunda etkili olan diziler bu bölgeyi hedef alan primerlerin hedef bölgeye erişimini etkilemektedir (72).

Multipleks PCR tek reaksiyonda birden fazla bölgenin çoğaltılması hem zaman hem de kaynak bakımından normal PCR tekniğine göre avantaj sağlamaktadır. Ancak

optimizasyon aşaması tek primer çiftinin kullanıldığı normal PCR tekniğine göre daha fazla parametre içermektedir. Her primer çiftinin konsantrasyonu ilk seferde aynı miktarda olarak optimizasyona başlanmaktadır. Termal döngü koşulları optimize edildikten sonra hala bazı primer çiftlerinin diğerlerine göre daha fazla ürün vermesi durumunda primer konsantrasyonları değiştirilerek optimizasyona devam edilir. Buna göre diğer koşulların optimize edildiği durumda zayıf olan primer çiftlerinin konsantrasyonu artırılır, güçlü olan primer çiftlerinin ise konsantrasyonları azaltılır. Primerlerin son konsantrasyonları 0.04 μ M ile 0.5 μ M arasında olmalıdır. Zayıf primerlerin konsantrasyonu 0.3 μ M ile 0.5 μ M arasında, güçlü primerlerin konsantrasyonu ise 0.04 μ M ile 0.4 μ M arasında olmalıdır. Primer dizisinin 5' ucuna eklenen 20bp'lik bir uzantının multipleks PCR'da termal döngü, bağlanma sıcaklığı gibi reaksiyon koşullarının her primer çifti için aynı olmasını sağlayarak sadece primer konsantrasyonlarının değiştirilmesi ile her bölge için verimli çoğalma sağladığı gösterilmiştir (50, 51). Bizim çalışmamızda da barkodlama işlemi için her primerin 5' ucuna 20bp'lik dizi eklenmesi optimizasyon sürecini kolaylaştırmıştır.

Primer konsantrasyonları dışında reaksiyonda bulunan her bileşenin konsantrasyonunun farklı etkileri vardır. Bunlar arasında MgCl₂ konsantrasyonu hem polimeraz enziminin çalışmasını sağladığı hem de dNTP ve primerlere bağlanması nedeni ile optimizasyon aşamasında ilk düşünülmesi gereken bileşenlerden birisidir. Düşük MgCl₂ konsantrasyonu polimerazın çalışmasını etkileyerek yeterli ürünün oluşmamasına yol açar. Yüksek miktarda MgCl₂ konsantrasyonu ise spesifik olmayan bağlanmalar oluşturarak beklenmeyen ürünlerin oluşmasına neden olabilir. MgCl₂, dNTP'ye bağlandığı için yüksek dNTP konsantrasyonu muhtemelen polimerazın çalışmasını engelleyerek PCR reaksiyonunu durdurabilir. Bu nedenle dNTP konsantrasyonu MgCl₂ konsantrasyonu ile uyumlu olmalıdır. 200 μ M dNTP için yaklaşık 1.5mM ile 2mM arasında MgCl₂ birlikte verimli çalışmaktadır. MgCl₂ dışında diğer önemli bir bileşen ise PCR tamponu içinde yer alan tuz konsantrasyonudur. Uzun PCR ürünü oluşturan primer çiftleri düşük tuz oranında daha iyi çalışırken kısa PCR ürünü oluşturan primer çiftleri yüksek tuz oranında daha iyi çalışmaktadır (50).

Multipleks PCR optimizasyonunda PCR ürünlerinin boylarının farklı olması durumunda termal döngüde bağlanma sıcaklığı ve uzama süresi de etkili olmaktadır. Buna göre uzun ürünlerin diğerlerine göre daha az çoğalması durumunda uzama süresi artırılarak, kısa ürünlerin diğerlerine göre daha az çoğalması durumunda ise bağlanma sıcaklığı düşürülerek çözüm bulunabilir (73). Bizim çalışmamızda tüm primer çiftlerinin PCR ürün

boyları birbirine yakın olduğu için optimizasyon sürecinde ilk kullandığımız bağlanma sıcaklığı ve süresi için 65°C – 30 saniye ve uzama sıcaklığı ve süresi için 72°C – 1 dakika 45 saniye değerleri ile devam edilmiştir.

Multipleks PCR tekniği birden fazla bölgenin aynı anda çoğaltılmasını sağlaması ile pek çok alanda kullanım değeri olan bir teknik olarak öne çıkmaktadır. Kullanılan bu yöntemle mikrobiyolojide birden fazla bakteri, virüs, fungal veya paraziter etken tek bir çalışmada ortaya konulabilmekte, klinik çalışmalarda birbiri ile ilişkili mutasyonlar tek panel içerisinde dizileme çalışması yapılabilmektedir. Bu çalışmada küçük hücreli akciğer kanserinde tedavi hedefi olan veya tedavide yönlendirici olan genlerin ilgili bölgelerini multipleks PCR yöntemi kullanarak çoğaltılması ile yeni nesil dizileme platformuna uygun bir tanı yöntemi geliştirilmiştir.

6.2 SONUÇ

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tedavisinde yönlendirici olabilecek nokta, insersiyon/ delesyon ve füzyon mutasyonları veri bankaları kullanılarak taranmış ve nokta, insersiyon veya delesyon mutasyonu içeren 8 gen, ve füzyon mutasyonu oluşturan 3 gen için ilgili bölgeleri çoğaltacak primerler tasarlanmıştır. Primer tasarımında primerin termodinamik özellikleri dikkate alınarak her primerin aynı koşullar içinde aynı verimde çalışması göz önünde bulundurulmuştur. Primer tasarımında Primer3Plus programından faydalanmış, primer dimer ve sekonder yapı oluşturma potansiyelleri OligoAnalyzer 3.1 programı kullanılarak test edilmiştir. Tasarlanan ileri ve geri primerlerin 5' ucuna barkodlama işlemi için 20bp'lik DNA dizisi eklenmiştir. Her primer çifti multipleks PCR öncesinde çalışıp çalışmadığı ayrı olarak valide edilmiştir. Nokta, insersiyon veya delesyon mutasyonları için tasarlanan primerlerin validasyonunda kalıp DNA olarak anonim kan örneklerinden izole edilen genomik DNA kullanılmıştır. Füzyon mutasyonları için tasarlanan primerlerin validasyonunda kalıp DNA olarak her füzyon partnerinden bir örnek olmak üzere hazırlanan polinükleotidler kullanılmıştır. Tekli validasyonun ardından multipleks PCR ile pleksler halinde gruplandırılan primerlerin birbirleri ile uyumlarına bakılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda kullanılan PCR kimyasalları ile en iyi sonuç veren multipleks PCR koşulları belirlenmiştir. Primer konsantrasyonu, MgCl₂ konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu ve PCR tampon konsantrasyonunun PCR ürünlerine etkilerine bakılmıştır. Barkodlama işlemi için ileri ve geri primerlerin 5' ucuna takılan 20bp'lik DNA dizilerinin ve her amplikonun birbirine yakın uzunlukta olmasının optimizasyon sürecinde primer konsantrasyonu dışında diğer koşulların etkisini azalttığı görülmüştür. Belirlenen

PCR koşulları ile çoğaltılan mutasyon bölgelerine Multiplicom'un MID kitleri kullanılarak barkod DNA uzantıları takılmıştır. Elde edilen ampikon kütüphanesi birleştirilerek Illumina Miseq yeni nesil dizileme platformunda dizileme çalışması yapılmış ve elde edilen veriler SeqPilot programı ile analiz edilmiştir. Elde edilen okuma sayıları pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları hesaplanarak her primer çiftinin diğer primer çifti ile uyumuna bakılmıştır. Analiz sonuçlarına göre pleks1 için, pleks içi varyasyon katsayısı 0.38, pleks2 için pleks içi varyasyon katsayısı 0.71 olarak tespit edilmiştir. Pleksler arası varyasyon katsayısı ise bu sonuçlara bağlı olarak 0.57 olarak tespit edilmiştir.



7 KAYNAKLAR

- 1 Marquet P, Longerey PH, Barlesi F, et al. Translational research: precision medicine, personalized medicine, targeted therapies: marketing or science? *Therapie*. 2015 Jan-Feb;**70**(1):1-19.
- 2 Coco S, Truini A, Vanni I, et al. Next generation sequencing in non-small cell lung cancer: new avenues toward the personalized medicine. *Curr Drug Targets*. 2015;**16**(1):47-59.
- 3 Kumarakulasinghe NB, van Zanwijk N, Soo RA. Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Respirology*. 2015 Apr;**20**(3):370-8.
- 4 McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr*. 2016 Mar;**7**(2):418-9.
- 5 Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, Whetton AD. Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments. *Cancer Treat Rev*. 2015 Apr;**41**(4):361-75.
- 6 Ferreccio C, Yuan Y, Calle J, et al. Arsenic, tobacco smoke, and occupation: associations of multiple agents with lung and bladder cancer. *Epidemiology*. 2013 Nov;**24**(6):898-905.
- 7 Ulas A, Tokluoglu S, Kos M, et al. Lung cancer in women, a different disease: survival differences by sex in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;**16**(2):815-22.
- 8 Yang ZY, Liu L, Mao C, et al. Chemotherapy with cetuximab versus chemotherapy alone for chemotherapy-naive advanced non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(11):CD009948.
- 9 Dierking A, Schmidtke J. The future of Clinical Utility Gene Cards in the context of next-generation sequencing diagnostic panels. *Eur J Hum Genet*. 2014 Nov;**22**(11):1247.
- 10 Rowinsky EK. The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med*. 2004;**55**:433-57.
- 11 Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995 Jul;**19**(3):183-232.
- 12 Shames DS, Wistuba, II. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol*. 2014 Jan;**232**(2):121-33.
- 13 Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;**101**(36):13306-11.
- 14 Vallee A, Sagan C, Le Loupp AG, Bach K, Dejoie T, Denis MG. Detection of EGFR gene mutations in non-small cell lung cancer: lessons from a single-institution routine analysis of 1,403 tumor samples. *Int J Oncol*. 2013 Oct;**43**(4):1045-51.
- 15 Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer*. 2006 Jan 15;**118**(2):257-62.
- 16 Roengvoraphoj M, Tsongalis GJ, Dragnev KH, Rigas JR. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. *Cancer Treat Rev*. 2013 Dec;**39**(8):839-50.
- 17 Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Mar;**7**(3):169-81.

- 18 Blackhall F, Ranson M, Thatcher N. Where next for gefitinib in patients with lung cancer? *Lancet Oncol.* 2006 Jun;**7**(6):499-507.
- 19 Zhang X, Zhang S, Yang X, et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. *Mol Cancer.* 2010;**9**:188.
- 20 Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol.* 1993 Apr;**20**(2):105-27.
- 21 Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med.* 2003;**54**:73-87.
- 22 Planchard D. Identification of driver mutations in lung cancer: first step in personalized cancer. *Target Oncol.* 2013 Mar;**8**(1):3-14.
- 23 Cagle PT, Allen TC, Olsen RJ. Lung cancer biomarkers: present status and future developments. *Arch Pathol Lab Med.* 2013 Sep;**137**(9):1191-8.
- 24 Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25;**98**(20):10983-5.
- 25 Malanga D, Scrima M, De Marco C, et al. Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle.* 2008 Mar 1;**7**(5):665-9.
- 26 Yap TA, Yan L, Patnaik A, et al. First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2011 Dec 10;**29**(35):4688-95.
- 27 Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;**2**(2):127-37.
- 28 Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* 2005 Mar 1;**65**(5):1642-6.
- 29 Stephens P, Hunter C, Bignell G, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature.* 2004 Sep 30;**431**(7008):525-6.
- 30 Thomas A, Rajan A, Lopez-Chavez A, Wang Y, Giaccone G. From targets to targeted therapies and molecular profiling in non-small cell lung carcinoma. *Ann Oncol.* 2013 Mar;**24**(3):577-85.
- 31 Domvri K, Zarogoulidis P, Darwiche K, et al. Molecular Targeted Drugs and Biomarkers in NSCLC, the Evolving Role of Individualized Therapy. *J Cancer.* 2013;**4**(9):736-54.
- 32 Leicht DT, Balan V, Kaplun A, et al. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;**1773**(8):1196-212.
- 33 Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;**29**(15):2046-51.
- 34 Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielnny S, Cohen P, Marshall CJ. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell.* 1992 Oct 16;**71**(2):335-42.
- 35 Marks JL, Gong Y, Chitale D, et al. Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2008 Jul 15;**68**(14):5524-8.
- 36 Amin HM, Lai R. Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood.* 2007 Oct 1;**110**(7):2259-67.
- 37 Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2014 Jun;**4**(6):662-73.
- 38 Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2008 Jan;**3**(1):13-7.

- 39 Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10;**27**(26):4247-53.
- 40 Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10;**27**(26):4232-5.
- 41 Choi YL, Takeuchi K, Soda M, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2008 Jul 1;**68**(13):4971-6.
- 42 Iyevleva AG, Raskin GA, Tiurin VI, et al. Novel ALK fusion partners in lung cancer. *Cancer Lett*. 2015 Jun 28;**362**(1):116-21.
- 43 Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;**30**(8):863-70.
- 44 Gainor JF, Shaw AT. The new kid on the block: RET in lung cancer. *Cancer Discov*. 2013 Jun;**3**(6):604-6.
- 45 Drilon A, Wang L, Hasanovic A, et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov*. 2013 Jun;**3**(6):630-5.
- 46 Padmanabhan R, Jay E, Wu R. Chemical synthesis of a primer and its use in the sequence analysis of the lysozyme gene of bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Jun;**71**(6):2510-4.
- 47 Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Feb;**74**(2):560-4.
- 48 Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Biosci Rep*. 1981 Jan;**1**(1):3-18.
- 49 Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Singh RR. Next-Generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer: Advantages and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2015;**7**(4):2023-36.
- 50 Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002;**16**(1):47-51.
- 51 Shuber AP, Grondin VJ, Klinger KW. A simplified procedure for developing multiplex PCRs. *Genome Res*. 1995 Dec;**5**(5):488-93.
- 52 Califano R, Abidin A, Tariq NU, Economopoulou P, Metro G, Mountzios G. Beyond EGFR and ALK inhibition: unravelling and exploiting novel genetic alterations in advanced non small-cell lung cancer. *Cancer Treat Rev*. 2015 May;**41**(5):401-11.
- 53 Mirshahidi HR, Mirshahidi S. Efficacy of crizotinib inhibiting specific molecular pathways in non-small-cell lung carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015 Apr;**15**(4):375-85.
- 54 Parums DV. Current status of targeted therapy in non-small cell lung cancer. *Drugs Today (Barc)*. 2014 Jul;**50**(7):503-25.
- 55 Martinez P, Martinez-Marti A, Navarro A, Cedres S, Felip E. Molecular targeted therapy for early-stage non-small-cell lung cancer: will it increase the cure rate? *Lung Cancer*. 2014 May;**84**(2):97-100.
- 56 Gridelli C, Peters S, Sgambato A, Casaluce F, Adjei AA, Ciardiello F. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat Rev*. 2014 Mar;**40**(2):300-6.
- 57 Mohar B, Smojver Jezek S, Rajkovic Molek K, et al. Detection of an EGFR mutation in cytological specimens of lung adenocarcinoma. *Cytopathology*. 2016 Mar 18.
- 58 Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012 Jul;**5**(7):887-900.
- 59 Cronin M, Ross JS. Comprehensive next-generation cancer genome sequencing in the era of targeted therapy and personalized oncology. *Biomark Med*. 2011 Jun;**5**(3):293-305.

- 60 Deeb KK, Hohman CM, Risch NF, Metzger DJ, Starostik P. Routine Clinical Mutation Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer Using Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2015 Jul;**139**(7):913-21.
- 61 Tuononen K, Maki-Nevala S, Sarhadi VK, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma-superiority of NGS. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013 May;**52**(5):503-11.
- 62 Han JY, Kim SH, Lee YS, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing with conventional sequencing for predicting the responsiveness to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) therapy in never-smokers with lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2014 Aug;**85**(2):161-7.
- 63 Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L, et al. Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and next-generation sequencing for detection of EML4-ALK rearrangement in lung cancer. *Oncologist.* 2015 Mar;**20**(3):316-22.
- 64 Moskalev EA, Frohnauer J, Merkelbach-Bruse S, et al. Sensitive and specific detection of EML4-ALK rearrangements in non-small cell lung cancer (NSCLC) specimens by multiplex amplicon RNA massive parallel sequencing. *Lung Cancer.* 2014 Jun;**84**(3):215-21.
- 65 Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988 Dec 9;**16**(23):11141-56.
- 66 Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl.* 1994 Feb;**3**(4):S65-75.
- 67 Ruano G, Fenton W, Kidd KK. Biphasic amplification of very dilute DNA samples via 'booster' PCR. *Nucleic Acids Res.* 1989 Jul 11;**17**(13):5407.
- 68 Brownie J, Shawcross S, Theaker J, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 1997 Aug 15;**25**(16):3235-41.
- 69 Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* 1992 Apr 11;**20**(7):1717-23.
- 70 Markoulatos P, Samara V, Sifakas N, Plakokefalos E, Spyrou N, Moncany ML. Development of a quadriplex polymerase chain reaction for human cytomegalovirus detection. *J Clin Lab Anal.* 1999;**13**(3):99-105.
- 71 Baker CL, Vaughn CP, Samowitz WS. A PIK3CA pyrosequencing-based assay that excludes pseudogene interference. *J Mol Diagn.* 2012 Jan;**14**(1):56-60.
- 72 Marsolais G, Dubuc R, Bergeron J, Morrey JD, Kelly EJ, Jackson MK. Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *J Vet Diagn Invest.* 1994 Jul;**6**(3):297-301.
- 73 Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques.* 1997 Sep;**23**(3):504-11.

8 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Tevfik Hatipoğlu

Dođum Yeri: Antalya

Dođum Tarihi: 30-04-1984

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eđitim Durumu

Lise: Antalya Yusuf Ziya Öner Fen Lisesi

Lisans: ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik

İş Tecrübesi

Kurumu: Mikrogen

Görevi: Moleküler Biyolog

Yılları:2016

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Kocaeli Üniversitesi 2. Biyoloji Kongresi, “AKCİĞER KANSERİNDE MOLEKÜLER TEDAVİ HEDEFLERİNİN SAPTANMASI AMAÇLI VE YENİ NESİL DİZİLEME TABANLI TANI YÖNTEMİ” isimli poster sunumu.



AKCİĞER KANSERİNDE MOLEKÜLER TEDAVİ HEDEFLERİNİN SAPTANMASI AMAÇLI VE YENİ NESİL DİZİLEME TABANLI TANI YÖNTEMİ



T. Hatipoğlu⁽¹⁾, K. Bilecen⁽²⁾, A. Tükün⁽³⁾

⁽¹⁾Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye

⁽²⁾Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi, Konya, Türkiye

⁽³⁾Ankara Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

GİRİŞ

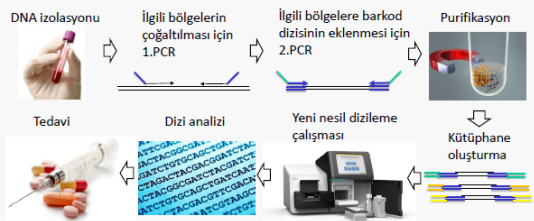
Kanser nedenli ölümlerde akciğer kanseri önde gelen kanser türlerindedir. İleri evre akciğer kanserinde kemoterapi en temel tedavi yaklaşımlarından birisi olsa da moleküler hedefli terapi bu hastalarda, gelişen yeni moleküler çalışmalar ile önem kazanmaktadır. Bu tedavi yaklaşımının uygulanabilirliğinde hastalıkla ilişkili mutasyonların değerlendirilmesi için uygulanan dizileme yöntemi belirleyici olmaktadır. Sanger dizileme yöntemi yaygın bir yöntem olarak kullanılmasına karşın düşük duyarlılıktadır. Gelişmekte olan yeni nesil dizileme platformları ise çoklu paralel dizileme özellikleri ile bu alanda yeni olanaklar sağlamaktadır. Tümör dokudan alınan sınırlı miktardaki biyopsi örneğinden çok sayıda mutasyon bölgesinin taranabilmesi kişiye yönelik etkili ilacın seçiminde yardımcı olmaktadır (1).

Bu çalışmada KHDAK hastalarında moleküler tedavi hedefi durumunda olan gen bölgelerinin yeni nesil sekanslama platformlarında okunmak üzere multipleks PCR yöntemi ile çoğaltılmasını sağlayacak tanı yöntemi geliştirilmiştir.

Gen	Mutasyona Uğrayan Aminoasit	Füzyon Partnerleri
EGFR	G719, S720, D761, V765, S768, V769, D770, N771, T783, T790, L858, L861	
BRAF	G469, D594, V600	
KRAS	G12, G13, Q61	
AKT1	E17	
HER2	A775, G776, P780, V777, M774	
PIK3CA	E542, E545, H1047	
MEK1	Q56, K57, D67	
ALK	T1151, L1152, C1156, I1171, F1174, L1196, G1202, S1206, G1269	EML4, TFG, KIF5B
ROS1		SLC34A2, SDC4, CD74, GOPC, EZR, LRIG3, TPM3, FIG, KDELR2
RET		KIF5B, CDC6, NCOA4, TRIM33

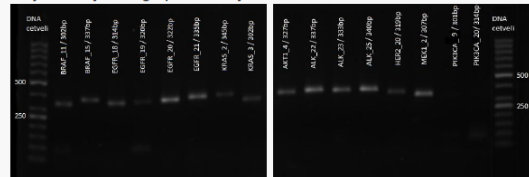
Tablo 1 Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde rol alan genler ve ilgili mutasyonları.

YÖNTEM



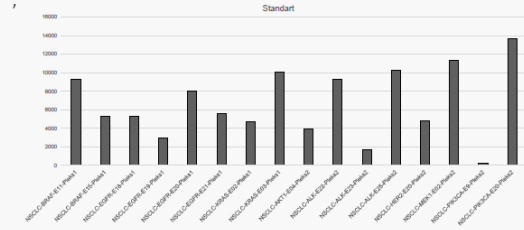
Figür 1 Multipleks PCR kullanarak yeni nesil dizileme tabanlı tanı yönteminde iş akışı

Nokta mutasyonları için anonim kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Tasarlanan primerlerin tekli olarak validasyonları yapılmıştır. EGFR, BRAF, KRAS gen bölgeleri için tasarlanan primerler birinci pleksi, AKT1, HER2, PIK3CA, MEK1, ALK gen bölgeleri için tasarlanan primerler ikinci pleksi oluşturacak şekilde gruplandırılmıştır.



Figür 2 Nokta mutasyonları için çoğaltılan bölgelerin agaroz elektroforez jel görüntüleri.

Füzyon mutasyonları için her gen partneri çiftinden bir varyantı seçilecek polinükleotid dizileri oluşturulmuştur. Tasarlanan primerlerin ilgili varyant ile tekli validasyonu gerçekleştirilmiştir. Varyantlar için tasarlanan primerlerden ALK ile ilgili olanlar birinci pleksi, ROS1, RET ile ilgili olanları da ikinci pleksi oluşturacak şekilde gruplandırılmıştır.



Figür 3 Yeni nesil dizileme ile nokta mutasyonu bölgelerinin okuma sayıları

Barkodlaması yapılan PCR ürünleri Illumina Miseq ile dizileme çalışması yapıldı. Elde edilen okuma sayıları ile pleks içi ve pleksler arası varyasyon katsayıları hesaplandı.

Standart	Pleks No	İlgili Bölge	İleri ampliton sayısı	Geri ampliton sayısı	Pleks ortalama ampliton sayısı	Pleks standart sapma	Pleks varyasyon katsayısı	Test ortalama ampliton sayısı	Test standart sapma	Test varyasyon katsayısı	
1	1	BRAF-E11	5548	3692	9240	6393.00	2454.53	0.38	6645.63	3758.03	0.57
		BRAF-E15	1649	3616	5265						
		EGFR-E18	3915	1411	5326						
		EGFR-E19	1311	1668	2979						
		EGFR-E20	3503	4535	8038						
		EGFR-E21	2413	3123	5536						
		KRAS-E02	1751	2936	4687						
		KRAS-E03	5426	4657	10083						
		AKT1-E04	1526	2360	3886						
		ALK-E22	3914	5389	9303						
2	2	ALK-E23	785	908	1693	6898.25	4908.42	0.71	6645.63	3758.03	0.57
		ALK-E25	7419	2790	10209						
		HER2-E20	3926	912	4838						
		MEK1-E02	6182	5182	11364						
		PIK3CA-E9	91	90	181						
		PIK3CA-E20	6964	6748	13712						

Tablo 2 Illumina Miseq amplicon okuma sayıları ve varyasyon katsayıları.

ÖZET

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde kişiye yönelik ilaç kullanımı hastalığın seyrini önemli ölçüde iyileştirmektedir. Doğru ilacın doğru hastaya verilmesi için moleküler tedavi hedefi durumunda olan proteinlerin ve bunları kodlayan genlerdeki mutasyonların tespiti gerekmektedir. Yeni nesil dizileme platformları ile mutasyon taramasının diğer yöntemlere göre avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar, yeni nesil dizileme platformlarının çoklu paralel okuma yapabilme özelliğine bağlı olarak aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Tümör dokusundan elde edilen yaklaşık 30 ng DNA ile tüm mutasyon bölgeleri taranabilmektedir,
- Tek seferde multipleks PCR ile birden fazla mutasyon bölgesi aynı anda çoğaltılabilmektedir,
- Barkodlama ile birden fazla hastanın dizileme çalışması tek seferde yapılabilmektedir.
- Füzyon mutasyonlarında bilinen füzyon partnerleri ile birlikte dizinin çıkarılması.

Bu çalışmada nokta mutasyon bölgeleri genomik DNA'dan, füzyon mutasyon bölgeleri de cDNA'dan multipleks PCR yöntemi ile çoğaltılarak moleküler tedavi hedeflerinin tanısı için yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

Kaynaklar

1. Coco, S., Truini, A., Vanni, I., Bello, M., Alama, A., Rijavec, E., . . . Grossi, F. (2015). Next Generation Sequencing in Non-Small Cell Lung Cancer: New Avenues Toward the Personalized Medicine. Current Drug Targets CDT, 47-59.

