

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özge SÖNMEZLER

**KANSERDE LİKİT BİYOPSİ VE YENİ NESİL DİZİLEME
METODUNUN KLİNİK LABORATUVAR
UYGULAMALARINA ENTEGRASYONU**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANSERDE LİKİT BİYOPSİ VE YENİ NESİL DİZİLEME
METODUNUN KLİNİK LABORATUVAR UYGULAMALARINA
ENTEGRASYONU**

Özge SÖNMEZLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez ... /... /2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

.....
Dr. Öğr. Üyesi Atıl BİŞGİN
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
ÜYE

.....
Doç. Dr. Sevcin TUĞ BOZDOĞAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa Gök
Enstitü Müdürü**

**Bu çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2017-9755**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirilerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri kanundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KANSERDE LİKİT BİYOPSİ VE YENİ NESİL DİZİLEME METODUNUN KLİNİK LABORATUVAR UYGULAMALARINA ENTEGRASYONU

Özge SÖNMEZLER

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Atıl BİŞGİN
Yıl: 2018, Sayfa: 73
Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Atıl BİŞGİN
: Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
: Doç. Dr. Sevcan TUĞ BOZDOĞAN

Yeni nesil dizileme yöntemi, moleküler tanıda ve rutin klinik laboratuvar uygulamalarında gün geçtikçe artan uygulama alanlarıyla ön plana çıkmaktadır. Bu doğrultuda likit biyopsi çalışmaları, kanser hastalarının sağaltımında yüksek hassasiyet oranı nedeniyle hem tanısal hem de prognostik açıdan bilgi verici bir metot olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu sebeple, yeni nesil teknolojiler ile likit biyopsinin moleküler genetik tanı amaçlı rutin klinik uygulamalara entegrasyonu büyük bir gereklilik halini almıştır. Bu sayede kanser tanısının ve tedaviye hedef olabilecek yolların daha hızlı belirlenebilmesi, daha güvenilir bir hasta takibi sağlanması mümkün olmakta; tekrarı gereken çalışmalarda invaziv işlemler ile elde edilen çalışma materyalinin yeniden temininde yaşanan sorunların ve tümör heterojenitesi probleminin önüne geçilmesi ile hastaya yalnızca lokalize tümör örneğine yönelik tedavilerden de öte daha kapsamlı ve efektif tedavi seçenekleri sunulmasına olanak sağlanabilmektedir. Likit biyopsi materyali ile yapılan yeni nesil dizileme ilişkili literatür bilgisi çok sınırlı olmakla beraber, gelişen teknoloji ile gerek araştırma gerekse rutin klinik çalışmalarında ihtiyaç duyulan tecrübe ve bilgi birikimine sahip uygulayıcı merkez eksiği ön plana çıkmaktadır. Bu yöntemin rutin klinik laboratuvar uygulamalarına entegrasyonunu sağlamak amacı ile Çukurova Üniversitesi AGENTEM laboratuvarlarında uygulanmakta olan tümör paneli, likit biyopsi materyali ile çalışılarak bu teze olanak sağlanmıştır. Bu tez çalışması ile her geçen gün önemini ve gerekliliğini arttıran yeni nesil dizileme yönteminde likit biyopsi materyalinin kullanımı ile yöntemsel ve biyoinformatik verilerin literatürle paylaşılması, ülkemizde bir ilk olarak da rutin sağlık hizmetlerinde bu uygulamanın kullanılması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Likit biyopsi, yeni nesil dizileme, serbest tümör DNA'sı, kanser tanısı

ABSTRACT

MSc THESIS

INTEGRATION OF LIQUID BIOPSY INTO THE CLINICAL LABORATORY APPLICATIONS BY NGS IN CANCER

Özge SÖNMEZLER

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOG

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Atıl BİŞGİN
Year: 2018, Page: 73
Jury : Asst. Prof. Dr. Atıl BİŞGİN
: Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
: Assoc. Prof. Dr. Sevcin TUĞ BOZDOĞAN

Next Generation Sequencing (NGS) is gaining recognition as the latest advance in molecular testing and its clinical laboratory applications. Thus, NGS techniques in liquid biopsy have been demonstrated to play emerging roles in cancer diagnostics in the manner of disease prognosis. And so, integration of liquid biopsy studies into the clinical laboratory applications of daily routine had become a necessity. By the virtue of liquid biopsy, the determination of the potential treatment targets rapidly through the metastasis and the primary tumor sites in the right clinical context resulting a more comprehensive treatment is possible. It also helps to overcome the re-sampling difficulties that require an invasive procedure with the problem of tumor heterogeneity. However not only the literature in liquid biopsy within the next generation sequencing is yet increasing, also the laboratories with competencies and experience in this novel technology is still limited.

Cukurova University AGENTEM provides an opportunity to do this thesis for liquid biopsy testing by NGS via the multi-gene tumor panel to integrate this technique into the routine clinical laboratory applications and bioinformatics. This thesis is aimed to utilize the next generation sequencing by liquid biopsy in cancer, and to implement into the cancer diagnostics.

Keywords: Liquid biopsy, next-generation sequencing, cell-free tumor DNA, cancer diagnostics

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Kanser tanı ve tedavisinde daha hassas, güvenilir ve hızlı sonuçlar elde edilebilmesi ihtiyacı, bu alanda likit biyopsi materyalleri kullanılarak periferik dolaşımda serbest halde bulunan tümör DNA'ları ile çalışılmasına ortam hazırlamıştır.

Özellikle düşük sağ kalım süresine sahip kanser türlerinde yüksek spesifisite ile hızlı sonuçlar almak için likit biyopsi çalışmalarının gelişen teknolojiye entegre edilebilmesi gerekmektedir. Bu sayede daha sağlıklı bir hasta takibi ve her bireyin taşıdığı spesifik genetik değişiklikleri hedefleyen tedavi seçeneklerinin belirlenebilmesi mümkün olabilecektir. Yeni nesil dizileme yöntemi ile az miktarlarda DNA elde edilebilen parafinize doku ve likit biyopsi örneklerinden güvenilir ve yüksek miktarlarda veri elde edilmesini sağlanabilir. Ancak yeni nesil dizileme yöntemi ile yapılan çalışmalarda doku eldesi, dokuya erişimin tekrarı ve tümör heterojenitesi gibi problemler nedeniyle likit biyopsi materyalinin kullanımı gündeme gelmiştir. Bu nedenle hasta için zor olan invaziv işlemleri en aza indirilebilmek, daha kolay ve hızlı bir materyal temini sağlayabilmek için likit biyopsi materyali çalışmaları önerilmektedir. Likit biyopsi sayesinde, tek bir alanda lokalize olmuş tümöre dair edinilen bilgilerin yanında, metastaza dair de bilgiler edinmek mümkündür. Buna ilaveten tedavi altındaki hastaların aldıkları tedaviye yanıtın incelenmesi, hastalığın prognozunun daha sık aralıklarla takip edilebilmesi ve metastaz riskinin belirlenebilmesi likit biyopsi aracılı olabilmektedir. Bu açıdan likit biyopsi materyalinin yeni nesil dizileme gibi klinik laboratuvar uygulamalarının en güncel ve en güvenilir teknolojisi ile entegre edilmesi zorunluluk haline gelmiştir.

Rutin uygulamalara entegrasyonda likit biyopsi materyalinden tümöre ait DNA eldesinden başlayarak tüm süreci içine alan bir iş akışı söz konusu olduğundan, alanında tecrübe ve yeterli bilgi birikimi olan merkez ve uygulayıcı

zorunluluğu göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında dünya genelinde en sık rastlanılan kanser türü olan akciğer kanserinde, hastaların sağaltımının iyileştirilmesi adına önemli katkılar sağlayacağı düşünülen bu yöntemin rutin klinik laboratuvar uygulamalarına entegrasyonunu sağlamak amacıyla, solid tümör kanserlerinde tedavi duyarlılığı ve dirençliği ile ilişkilendirilmiş 12 genden (*KRAS*, *NRAS*, *KIT*, *BRAF*, *PDGFRA*, *ALK*, *EGFR*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *ERBB3*, *ESR1* ve *RAF1*) oluşan tümör paneli yeni nesil dizileme yöntemi ile çalışılmıştır. Çukurova Üniversitesi Adana Genetik Hastalıklar Tanı ve Tedavi Merkezi (AGENTEM) laboratuvarlarında rutin olarak uygulanmakta olan bu tümör paneli ve merkez altyapısında bulunan yeni nesil dizileme sistemleri bu tez çalışmasına olanak sağlamıştır.

Bütün bu bilgiler ışığında, özellikle kanserde oldukça umut vaat eden likit biyopsi ve yeni nesil dizileme yöntemlerinin birlikte kullanımı genetik tanı laboratuvarları açısından büyük önem arz etmektedir. Bu sayede geniş kapsamlı ve hassas bir çalışma ile etkinliği yüksek, bireye özgü sağlık hizmetinin kanser hastalarına verilebilmesi mümkün olabilecektir. Her iki yöntemin birlikte klinik uygulamalarda kullanılmasına yönelik evrensel literatür oldukça sınırlı olup, Türkçe kaynak ise bulunmamaktadır. Bu çalışma ile kanser tanı ve tedavisinde yeni nesil dizileme yöntemi ile likit biyopsi materyali kullanımının avantajları belirlenerek bu materyalin rutin kullanımda yer bulması adına, ulusal ve uluslararası literatüre katkı sağlanarak ülkemizdeki diğer laboratuvarlar için de bir kaynak sağlanmış olacaktır. Elde edilen yüksek miktarda verinin doğru bir şekilde yorumlanabilmesi ve likit biyopsinin rutin çalışmalara entegre edilebilmesi açısından bu tezin bir kılavuz görevi görmesi ve başka merkezlerce faydalanılabilir bir kaynak olması hedeflenmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında, her geçen gün artan değer ve kullanım alanlarına sahip yeni nesil dizileme yöntemi ile likit biyopsi materyalinin kanser alanında rutin klinik uygulamalara entegrasyonu konu alınmış olup elde edilen bilgilerin diğer araştırmacılar ile paylaşarak bu alandaki yeni çalışmalar için bir yol gösterici olması hedeflenmiştir. Bu çalışmanın her aşamasında bana rehberlik eden, lisansüstü öğrenimim boyunca kendisinden birbirinden kıymetli sayısız bilgiler edindiğim saygıdeğer danışman hocam Dr. Atıl BİŞGİN'e, her sorumda aynı sabırla benimle çözüm arayan çalışma arkadaşım İbrahim BOGA'ya, ne tür zorluklarla karşılaşsak karşılaştık bana bir arada kalmayı ve pes etmemeyi öğreten, ekip olmayı önce onlardan öğrendiğim canım çekirdek aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
3. MATERYAL ve METOT	15
3.1. Materyal	15
3.2. Metot	16
3.2.1. Likit Biyopsiden ccfDNA İzolasyonu	17
3.2.2. FFPE dokudan gDNA İzolasyonu	20
3.2.3. Yeni Nesil Dizileme İş Akışı	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Likit biyopsi örnekleme ile farklı tip biyolojik örnek toplama tüplerinden elde edilen ccfDNA'lar karşılaştırıldı	37
4.2. Likit biyopsi materyali ile FFPE doku örneklerinden elde edilen genetik materyal miktarları karşılaştırıldı	38
4.3. Farklı tip biyolojik örnek toplama tüplerinin yeni nesil dizileme ürün miktarları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi	39
4.4. Likit biyopsi çalışmaları ile FFPE doku çalışmaları sonucu elde edilen yeni nesil dizileme ürün miktarları karşılaştırıldı	40
4.5. Yeni nesil dizileme için gerekli çalışma sonucunu etkilemeyen minimum ccfDNA konsantrasyonu belirlendi	41

4.6. İki farklı tip biyolojik örnek tüpünden elde edilen ccfDNA'ların hedef bölge amplifikasyonları kalite kontrolleri karşılaştırıldı.....	42
4.7. Farklı materyallerden elde edilen DNA'ların hedef bölge amplifikasyonları ve kütüphane hazırlıkları sonucu elde edilen DNA kalite ve miktarları karşılaştırıldı.....	43
4.8. Yeni nesil dizileme sonucu sekans ve döngü kalite skorları değerlendirildi.....	43
4.9. Yeni nesil dizileme sonrası varyant kalite kontrolleri yapıldı	45
4.10. Biyoinformatik analizler gerçekleştirildi.....	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
5.1. Likit biyopsinin elde edilme kolaylığı ile toplam çalışma süresi üzerindeki avantajları belirlendi	55
5.2. İki farklı biyolojik örnek toplama tüpünden elde edilen ccfDNA konsantrasyonları arasındaki fark anlamlı olarak tespit edilmiş olup yüksek ccfDNA konsantrasyonuna sebep olan etkenler belirlendi.....	56
5.3. Likit biyopsi ve FFPE dokulardan elde edilen DNA konsantrasyonları arasındaki anlamlı farkın çalışmanın diğer aşamaları üzerinde etki etmediği tespit edilerek farklı materyal türlerindeki değişken konsantrasyonların sebepleri belirlendi	56
5.4. İki farklı biyolojik örnek toplama tüpü ile yapılan çalışmaların sonucunda son ürün miktarları eşdeğer olarak gözlendi.....	57
5.5. FFPE doku materyali eldesi sağlanamayan veya bu materyallerden yeterli DNA miktarı elde edilemeyen hastalar üzerinden likit biyopsi materyalinin önemi vurgulandı.....	57
5.6. Her iki materyal türü ile yapılan yeni nesil dizileme sonunda çalışma kaliteleri standart değerlerin üzerinde tespit edildi.....	58
5.7. Varyant analizleri ile “gerçek varyant”lar okuma kirliliklerinden ayırt edilerek çalışma sonuçlarının güvenilirliği artırıldı	59

5.8. Varyant analizlerinde likit biyopsi ve FFPE dokularında dikkat edilmesi gereken noktalar belirlenerek likit biyopsi çalışmalarında varyant analizleri için daha etkin yol belirlendi.....	59
5.9. Başlangıç materyallerinin biyoinformatik analizler üzerindeki etkileri belirlenerek likit biyopsinin avantajları tespit edildi	60
5.10. Doğru biyoinformatik analizler aracılığıyla etkin klinik raporlama gerçekleştirildi	60
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	71



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Hedef zenginleştirme aşamasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyon protokolü.....	23
Çizelge 3.2. Kütüphane oluşturulması aşamasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyon protokolü.....	26
Çizelge 3.3. Klonal amplifikasyon aşamasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyon protokolü.....	28
Çizelge 4.1. Aynı hastaya ait A ve B markası biyolojik örnek toplama tüplerine alınan likit biyopsilerden elde edilen ccfDNA konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	38
Çizelge 4.2. Aynı hastaya ait likit biyopsiden elde edilen ccfDNA ve FFPE dokulardan elde edilen gDNA konsantrasyonları çizelgede listelenmiştir. FFPE dokulardan elde edilen gDNA konsantrasyonu sonucu önceki çalışmalarda belirtilen standart eşik değerinin altında kalan örnekler * ile işaretlenmiştir.....	39
Çizelge 4.3. Yeni nesil dizileme sonucu farklı tip biyolojik örnek toplama. tüplerinden elde edilen toplam ürün miktarları.	40
Çizelge 4.4. Yeni nesil dizileme sonucu aynı hastaya ait likit biyopsi materyali ve FFPE doku örneklerinden elde edilen toplam ürün miktarları.....	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Tez çalışması iş akış şeması	3
Şekil 1.2. Likit biyopsi materyallerinden ccfDNA izolasyon şeması.....	4
Şekil 1.3. Çalışmada kullanılan yeni nesil dizileme sisteminin (GeneReader NGS Sistemi) iş akış şeması.....	5
Şekil 3.1. Uluslararası standartlara uygun şekilde hazırlanmış rapor örneği (Likit biyopsi materyali).....	35
Şekil 3.2. Uluslararası standartlara uygun şekilde hazırlanmış rapor örneği (FFPE doku materyali)	36
Şekil 4.1. Likit biyopsi (sol) ve FFPE doku (sağ) çalışmalarına ait kalite skorları grafik üzerinde gösterilmiştir. Kalite skorunun 25'in üzerinde olması dizilemenin düzgün yapıldığını göstermektedir.....	44
Şekil 4.2. Likit biyopsi (sol) ve FFPE doku (sağ) çalışmalarına ait okuma kalite skoru grafikleri gösterilmiştir. Döngü skorunun çalışma boyunca 25'in altına inmemesi, okumaların dengeli olduğunu göstermektedir.	44
Şekil 4.3. Likit biyopsi çalışmasına yönelik varyant analizinde kullanılan ara yüzden alınan likit biyopsi çalışmasına yönelik analiz sayfası görüntü örneği şekilde verilmiştir. Varyanta ait değerler bit Çizelge şeklinde verilmektedir. Şekil 4.3.a'da kalite kontrol ve analizler sonucunda biyoinformatik analizlere aktarılabacak olan varyantlar, şekil 4.3.b'de ise düşük kalite veya hedef bölge dışında olarak nitelendirilen varyantlar gösterilmektedir.	47
Şekil 4.4. FFPE doku çalışmasına yönelik varyant analizi ara yüzü sayfası görüntü örneği şekilde verilmiştir. Şekil 4.4.a'da kalite kontrol ve analizler sonucunda biyoinformatik analizlere aktarılabacak olan varyantlar, şekil 4.3.b'de ise düşük kalite veya hedef bölge dışında olarak nitelendirilen varyantlar gösterilmektedir. Şekil	

4.4.b’de seçili varyant değerlendirmeler sonucu biyoinformatik analizlere aktarılmak üzere ‘confirmed as valid’ olarak kullanıcı tarafından işaretlenmektedir.	48
Şekil 4.5. Varyant analizinde kullanılan ara yüze ait dizi görüntüleyicisi (Track Viewer). Yeşil okumalar “forward”, kırmızı olanlar ise “reverse” okumaları göstermektedir.	49
Şekil 4.6. Biyoinformatik analizlerinde kullanılan QCI Interpret analiz aracının ara yüzü görülmektedir. Örnek olarak kullanılan görsel, likit biyopsi çalışmasına aittir. Bu pencerede, varyant bilgileri, sınıflandırmaları, allel frekansları başta olmak üzere varyant ve klinik etkisine dair pek çok bilgiye ulaşılabilir.	50
Şekil 4.7. FFPE doku çalışmasına ait QCI Interpret analiz aracının ara yüzü. Bu pencerede varyant bilgileri, sınıflandırmaları, allel ve somatik frekanslar gibi bilgilere ulaşılabilir.	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
gDNA	: Genomik DNA
ccfDNA	: Serbest DNA (Circulating Cell-Free DNA)
ctDNA	: Serbest Tümör DNA'sı (Circulating Tumor DNA)
dNTP	: Deoksi Nükleozit Trifosfat
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
FFPE	: Formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü (Formaline Fixed Paraffin Embedded)
NGS	: Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)
CTC	: Dolaşımdaki tümör hücreleri (Circulating Tumor Cells)
DTC	: Dissemine tümör hücreleri (Disseminated Tumor Cells)
MAPK	: Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinases)
PI3K	: Phosphatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz
STAT	: Transkripsiyon aktifleştirici ve sinyal dönüştürücü (Signal Transducer and Activator of Transcription)
Ng	: Nanogram
Pg	: Pikogram
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
µm	: Mikrometre
bp	: Baz Çifti (Base Pair)
kb	: Kilobayt



1. GİRİŞ

Likit biyopsi kavramı 1948 yılında ortaya atılmış olup 2000’li yıllara kadar bilim dünyasında yeteri kadar ilgi çekememiştir (Mandel, 1948). Son on yıl içinde likit biyopsi kavramı detaylı olarak açıklanmış ve likit biyopsinin kullanım alanlarına yönelik çalışmalar gittikçe artmaya başlamıştır. Günümüzde likit biyopsi hem araştırma hem de rutin klinik çalışmalarda klinik laboratuvar uygulamalarına önemli katkılar sağlamaktadır (Chu, 2017; Qin, 2016).

Likit biyopsi, tanım olarak periferik kandan elde edilen serbest tümör DNA’sı ile tümör hücrelerini kapsamaktadır. Somatik hücreler çevresel ve/veya genetik faktörlerin etkisi ile normal yapılarını onarılamayacak şekilde kaybettikleri zaman bu hücrelerin akıbeti iki yönde olabilir: apoptoz veya kanserleşme.

Apoptoz giden hücreler büzüşüp nükleusu parçalanır, hücre içeriği fagosite edilerek sindirildikten sonra kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Daha sonra DNA fragmanları olarak dolaşıma karışır.

Kanserleşen hücreler ise sınırsız büyüme ve proliferasyon özelliği kazanarak tümör oluşumuna yol açar. İmmün sistem hücreleri tarafından tanınabilen kanser hücreleri ise nekroz yolu ile ortadan kaldırılır. Bu nekroz sürecinde osmotik basınç etkisi ile hücreler patlar ve enflamasyon meydana gelir. Apoptozda olduğu üzere nekrozda da DNA fragmentasyonu gerçekleşir. Ancak apoptoz sonucu meydana gelen DNA fragmanları nekroza göre daha büyüktür (Elmore, 2007; Zhivotosky, 2001).

Yeni nesil dizileme (YND) yöntemi son yıllarda özellikle moleküler tanıda altın standart olarak kabul görmeye başlamıştır. Oldukça hassas ve güvenilir bir yöntem oluşu her geçen gün artan kullanım alanları ile ön plana çıkmasını sağlamış ve dünya genelinde yaygınlaşmasına ortam hazırlamıştır (Reinecke, 2015). Bunun yanında YND yöntemi, özellikle kanser tanısında ve tedaviye hedef yolların belirlenmesinde etkili bir araç olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kamps, 2017). Düşük miktarda genetik materyalden de yüksek

miktarda bilgi elde edilmesi nedeniyle moleküler genetik tanıda vazgeçilmez bir yöntem halini almıştır.

Hastalıkların tanısından tedavisine yön verebilecek, prognozunu etkileyebilecek tüm genetik değişimlerin tespit edilmesi ancak yeni nesil dizileme yöntemi ile mümkün olabilmektedir. Bu yöntem, hem daha hassas, güvenilir ve hızlı sonuçlar elde edilebilmesine hem de çoklu gen panellerinin çalışılabilmesine imkân sağlaması sayesinde üstün hale gelmiştir.

Kanser ilişkili çalışmalarda sıklıkla kullanılan materyal, formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) doku örnekleridir. Doku örnekleri çeşitli biyopsi yöntemleri ile girişimsel işlemler aracılığıyla temin edilebilmektedir. Yalnızca belli bir bölgeden elde edilebilen FFPE doku örneklerinden metastazlar hakkında bilgi sağlanamaması ve bazı kimyasal ön işlemlere maruziyet nedeniyle bu örneklerden genomik materyal eldesindeki kalite düşüklüğü, çalışılan testin sonucunu doğrudan etkileyebilecek faktörlerdir (Do, 2015). Bundan da öte çalışma yeni nesil dizileme çalışması için tümör doku kesitinin tümör yüzdesi, nekroz skoru ve doku orijini gibi tümör heterojenitesine yol açan durumlarda çalışma kalitesini etkileyebilmektedir. Kimi zaman da hastalığın lokalizasyonu materyal teminine uygun olmayabilir. Tedavi altındaki hastalarda ise materyalin yeniden elde edilmesi mümkün olamayabilmektedir. Bütün bu problemler, invaziv işlemleri en aza indirecek yeni bir yöntem arayışını doğurmuştur. Günümüzde yeni nesil teknolojilerin sunduğu imkânlar doğrultusunda bu ihtiyaca likit biyopsi çalışmaları ile yanıt verilebilmektedir. Likit biyopsi ile materyal eldesi daha kolay olup, tümör heterojenitesi sorunu da aşılabilmektedir (Vendrell, 2017).

Kanser hücreleri sınırsız bölünme ve proliferasyon özelliği nedeniyle normal hücrelerden çok daha hızlı şekilde klonal olarak birbirinden farklı karakteristik özellik gösteren hücre grupları oluşturmaktadır. Bunun sonucunda metastaz ile sekonder tümörler oluşmaktadır (Eccles, 2007). Likit biyopsi materyali ile çalışmak, var olan primer ve primer ilişkili sekonder tümörlere yönelik geniş

kapsamlı veri eldesini, böylelikle de invaziv girişimi en aza indirmeyi sağlamaktadır (Heitzer, 2015).

Likit biyopsi materyalinden yapılan moleküler çalışmalar kanser hastaları için olası tedavi yanıtının ve direncinin öngörülebilmesi sayesinde uygulanacak tedavi için protokolün tamamen bireye özgü olmasına imkân vermektedir. Ayrıca hastalığın tedavisi ve seyri sırasında değişen tümör genotipi hastaların sağaltımı açısından önemlidir. Likit biyopsi çalışmasının YND aracılığı ile gerçekleştirilmesi özellikle iyi klinik laboratuvar uygulamaları açısından hasta yararına bir seçimdir.

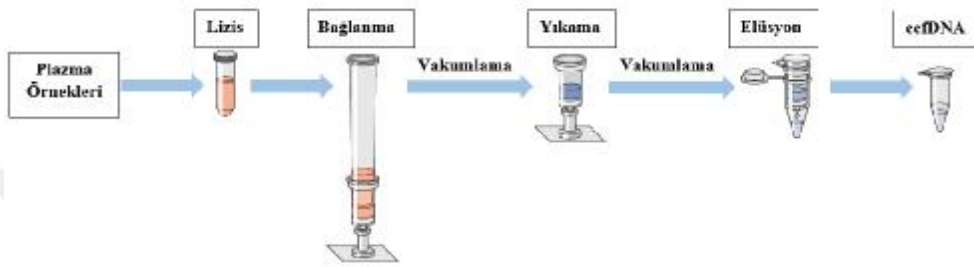
Kanser olgularında likit biyopsiden izole edilen serbest tümör DNA'sı ve FFPE doku örneklerinden izole edilen genomik DNA ile YND yöntemi aracılığıyla tedaviye yönelik tasarlanmış çoklu gen paneli çalışması yapılmıştır. Likit biyopsinin rutin klinik laboratuvar uygulamalarına entegrasyonu ile hem tümöre ait genetik bilginin elde edilmesi hem de zaman ve iş gücü kaybının önlenmesi hedeflenmiştir. Buna ilaveten, likit biyopsiden serbest tümör DNA'sı ve FFPE doku örneklerinden genomik DNA izolasyonundan başlayarak biyoinformatik analizler sonucunda yapılan klinik raporlamaya kadar olan tüm iş akışı gözden geçirilerek likit biyopsi materyalinin YND yöntemi ile rutin klinik uygulamalarda etkin bir biçimde kullanımını sağlamak amaçlanmıştır.



Şekil 1.1. Tez çalışması iş akış şeması

Bu tez çalışmasında iş akışı, genetik materyal eldesine yönelik DNA izolasyonları yapılması ile başlamıştır. Likit biyopsi materyallerinden ccfDNA ve FFPE doku örneklerinden gDNA izolasyonu yapılmıştır. Likit biyopsiden ccfDNA izolasyonu, 2 farklı tipteki biyolojik örnek toplama tüplerine alınan periferik kandan plazma örneklerinin ayrılması, lizis, vakumlama sistemi aracılığı ile filtreye

bağlanma ve yıkamaların yapılması ile ardından elüsyon işlemi sonrası saf ccfDNA eldesini kapsamaktadır (Şekil 1.2.). FFPE doku örneklerinden gDNA izolasyonu ise en kaliteli gDNA elde etmek adına önceki çalışmalarda yöntemsel optimizasyonları tamamlanmış metot ile gerçekleştirilecektir (Boga, 2017).

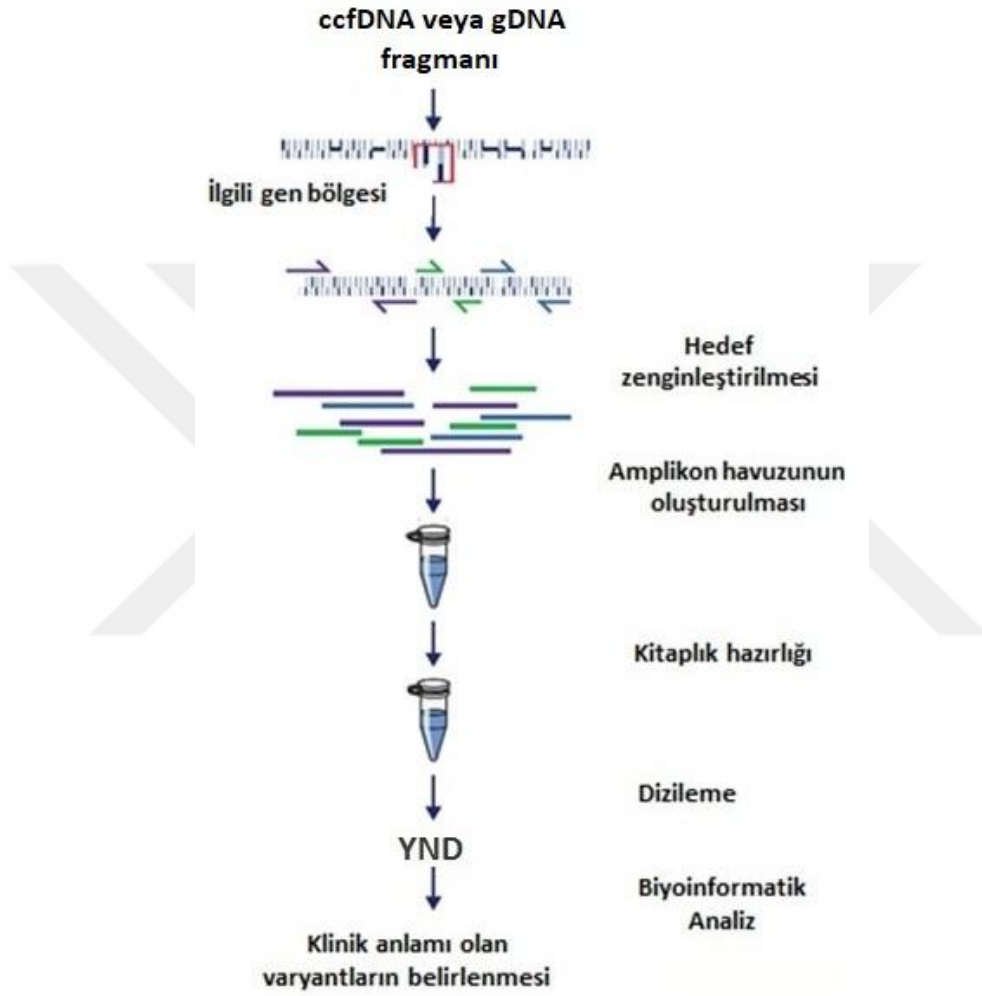


Şekil 1.2. Likit biyopsi materyallerinden ccfDNA izolasyon şeması

Çalışmamızda yeni bir YND sistemi kullanılmış olup çalışma prensibi; hedef bölgelerin zenginleştirilmesi ve eklenen evrensel nükleotid dizileri ile boncuklara iliştilmesi, boncuklara tutturulan DNA'ların çoğaltılması, “flowcell” adı verilen dizileme çiplerine yüklenmesi ve eş zamanlı olarak boncuk üzerindeki DNA parçalarının sekanslanmasıdır. Dizileme işlemi floresan bağlı nükleotidler aracılığı ile gerçekleştirilir. “Flowcell”e iliştilmiş olan boncuklar üzerindeki DNA fragmentleri, floresan bağlı nükleotidler ile eşleşen bölgeler içerir. Nükleotidler bu dizilere bağlanır ve her yeni bağlanmada yüksek çözünürlüklü fotoğrafları çekilir. Cihaz, floresanın rengine göre bağlanmış olan nükleotidi tespit eder ve bu şekilde dizi ortaya konur (Qiagen, 2015). Yeni nesil dizileme sonucunda elde edilen verilerin kalite kontrolleri yapılır.

Çoklu gen panellerinde biyoinformatik analizleri yaparken hastaların kliniği ile beraber değerlendirilerek klinik açıdan anlamlı olan varyantların ve bu varyantların kliniğe ne gibi etkilerinin olabileceğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu açıdan yapılan analizlerde, hastaya ait elde edilebilecek bütün bilgiler değer kazanmakta ve raporlanacak olan sonucu etkileyebilmektedir. Biyoinformatik

analizler ile varyant analizleri tamamlanarak elde edilen sonuçlar uluslararası kriterlere uygun olacak şekilde klinik rapora dönüştürülür.



Şekil 1.3.Çalışmada kullanılan yeni nesil dizileme sisteminin (GeneReader NGS Sistemi) iş akış şeması

Yeni nesil dizileme, tüm genetik çalışmaların temelini oluşturacak nitelikte hassas ve geliştirilebilir bir yöntemdir. Kanser hakkında pek çok bilgi sunulmasına imkân veren likit biyopsi materyalinin, yeni nesil dizileme metodu aracılığı ile rutin çalışmalarda kullanılması kaçınılmaz hale gelmiştir. Bu sayede kişiye özgü

tedaviler daha spesifik ve kapsamlı bir şekilde belirlenerek hastalara daha etkili ve güvenilir bir sağlık hizmeti sunulabilmektedir (Falk, 2017).

Bu tez çalışmasında likit biyopsi materyalinin yeni nesil dizileme yöntemi ile klinik laboratuvar uygulamalarına entegrasyonu amacıyla ÇÜ AGENTEM'e rutin tetkik için yönlendirilen akciğer kanseri tanısı almış hastalarda geniş kanser paneli (Actionable Insight Solid Tumor Panel, Qiagen) kullanılmıştır. Akciğer kanseri, dünya genelinde cinsiyet gözetmeksizin en sık rastlanılan kanser türüdür (Ridge, 2013). Gerek sağ kalım süresi gerekse tedaviye yanıtın düşüklüğü nedeniyle rutin ve bireye özgü takip gerektiren bir hastalıktır. Bu özelliklerinden dolayı, hastanın genetik bilgileri ışığında tedaviye olası yanıtın değerlendirilmesi hastalar için oldukça önemlidir. Özellikle hastalığın hızlı seyri nedeniyle de yapılan moleküler genetik tetkiklerin hızı da hastalığın sağaltımında ilgili branş hekimlerine yol göstericidir. Bütün bu nedenlerle, bu tez çalışmasında akciğer kanserli hastalardan alınan likit biyopsi örnekleri ile çalışılmış ve likit biyopsi materyalinin yeni nesil dizileme metoduna entegrasyonu sağlanmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan çoklu gen panelinde solid tümörler açısından önem arz eden 12 gen çalışılmıştır. Bu genler; *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *PIK3CA*, *NRAS*, *PDGFRA*, *KIT*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ESR1*, *BRAF* ve *RAF1* olup bu genlerdeki varyantlar tanı ve/veya tedaviye yanıt, hastalık seyri gibi konularda bilgi vericidir. Varyantların kanser tipleri ve hastalığın prognozuna yönelik etkileri biyoinformatik analizler aracılığı ile belirlenmekte ve hastaların sağaltımında önemli bilgiler sağlamaktadır.

Panelde çalışılan genlerden;

KRAS, RAS yolağını düzenleyerek hücrenin sağ kalımını sağlayan membran ilişkili G proteinini kodlayan onkogenik bir gendir. Pankreas kanserinde % 69,3, kolon kanserinde % 30,7 ve safra yolu tümörlerinde % 22,3 oranında somatik değişimler gösterdiği bildirilmiştir (Brose, 2002; Pylayeva-Gupta, 2011; Riely, 2008). Bu değişimler küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında kötü

prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Mascaux, 2005). Literatürde çeşitli tedavilere direnç oluşturduğu gösterilmiştir (Ahronian, 2015).

NRAS geni, tıpkı *KRAS* gibi RAS yolağını düzenleyerek hücrenin sağ kalımını sağlayan membran ilişkili G proteinini kodlayan onkogenik bir gendir. Melanomalarda % 18, tiroid kanserinde % 6,3, kolorektal kanserinde % 5,3 oranında somatik değişimler bildirilmiştir ve bazı tedavilere direnç oluşumuna sebep olduğu rapor edilmiştir (Cox, 2014; Vaughn, 2011). Miyelodisplastik sendromda ise somatik değişimler kötü prognoz kriteri olarak gösterilmiştir (Bejar, 2014).

BRAF, MAPK yolağını düzenleyerek hücre sağ kalımını etkileyen bir protein kodlayan onkogendir. Tiroid kanserinde % 51,5, melanomalarda % 36,5, kolon kanserinde % 13,3 oranında somatik değişim gösterdiği bildirilmiş olup kolorektal kanser hastalarındaki değişimler kötü prognostik olarak gösterilmiştir (Basolo, 2010; Ciampi, 2005; Davies, 2002; De Roock, 2011; Van Cutsem, 2014). Ayrıca, bazı tedavilere düşük yanıt ve artmış direnç ile ilişkilendirilmiştir (Ahronian, 2015).

RAF1, *BRAF* gibi MAPK yolağını düzenleyerek hücre sağ kalımını etkileyen bir protein kodlayan onkogendir. Melanomalarda % 3,4, kolon kanserinde % 2,9 oranında değişimler rapor edilmiştir. Ayrıca *RAF1* p.S257L mutasyonu kolon ve cilt kanseri tiplerinde en sık görülen mutasyondur (COSMIC).

EGFR, RAS ve PI3K yolaklarını düzenleyerek hücrenin sağ kalımında rol alan tirozin kinaz reseptörünü kodlayan onkogenik bir gendir. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde % 36, gliomalarda % 8,6, meme kanserinde % 2 somatik değişimler bildirilmiş olup, *EGFR* mutasyonu olan hastaların bazı tedavilere karşı artmış direnç ve bazı tedavilere ise duyarlılık gösterdiği rapor edilmiştir (Gainor, 2013; Grandis, 2004; Hirsch, 2005; Kris, 2003; Miller, 2004; Pao, 2004; Shigematsu, 2005). *EGFRvIII* allelindeki değişimler glioblastoma hastalarında kötü prognoz kriteri olarak bildirilmiştir (Shinojima, 2003).

PDGFRA, PI3K yolağını düzenleyerek hücrenin sağ kalımında rol alan tirozin kinaz kodlayan onkogenik bir gendir. Gastrointestinal stromal tümörlerde % 11,6, küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde % 4,9, melanomalarda % 1,4 oranında somatik değişimler görülmüş olup gastrointestinal stromal tümörlü hastalarda iyi prognoz kriteri olarak bildirilmiştir (Corless, 2005; Heinrich, 2003).

KIT, STAT yolağını düzenleyerek hücrenin sağ kalımında rol alan tirozin kinaz kodlayan onkogenik bir gendir. Gastrointestinal stromal tümörlerinde % 56,3, akut miyeloid lösemilerde % 8,5, melanomalarda % 6,4 oranında somatik değişimler bildirilmiştir (Antonescu, 2011; Boissel, 2006; Cammenga, 2005; Heinrich, 2003). Bu gendeki değişimler, akut miyeloid lösemili hastalarda düşük sağ kalım ve kısa hastalıksız yaşam süresiyle, gastrointestinal stromal tümörlü hastalarda ise düşük sağkalım oranı ile ilişkilendirilmiştir (Care, 2003; Heinrich, 2003). Bu gendeki değişimlerin bazı tedavilere artmış direnç oluşturduğu da rapor edilmiştir (Katayama, 2012).

ALK, apoptoz yolağını düzenleyerek hücrenin sağ kalımında etkin tirozin kinaz kodlayan onkogenik bir gendir. Nöroblastomalarda % 8, kolon kanserinde % 7,4, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde % 6 oranında somatik değişimler bildirilmiş olup *ALK* geninde mutasyonu olan hastalarda bazı tedavilere karşı artmış ilaç direnci rapor edilmiştir (Chen, 2008; George, 2008; Katayama, 2012; Koivunen, 2008; Kwak, 2010; Lin, 2009; Lipson, 2012; Shinmura, 2008).

ERBB2, PI3K yolağını düzenleyerek hücrenin sağkalımında etkin tirozin kinaz kodlayan onkogenik bir gendir. Gastrik kanserlerde % 3,5, özafageal kanserlerde % 2,7, meme kanserinde % 1,7 oranında somatik değişim rapor edilmiş olup bu gende mutasyonu olan hastalarda bazı tedavilere karşı artmış ilaç direnci bildirilmiştir (Burstin, 2005; Gravalos, 2008; Planchard, 2015; Yoon, 2012; Yu, 2013)

ERBB3, PI3K yolağını düzenleyerek hücrenin sağ kalımında etkin tirozin kinaz kodlayan onkogenik bir gendir. Gastrik kanserlerde % 10,6, kolon kanserinde

% 6,5, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde % 2,5 oranında somatik değişimler bildirilmiştir (COSMIC).

ESR1, transkripsiyonel regülasyonu etkileyerek hücrenin yaşamını etkileyen, hücre içi reseptör kodlayan onkogenik bir gendir. Meme kanserinde % 7,1, kolon kanserinde % 5,5, gliomalarda % 2 oranında somatik değişimler rapor edilmiştir (Jeselsohn, 2015; Parsons, 2008).

PIK3CA, PI3K yolağını düzenleyerek hücrenin sağkalımında rol alan lipid kinaz kodlayan onkogenik bir gendir. Endometriyal kanserlerde % 28,4, meme kanserinde % 27,9, safra kesesi kanserinde % 18,7 oranında somatik değişim rapor edilmiştir (Cizkova, 2012; Kandoth, 2013; Kompier, 2010). Ayrıca, Cowden Sendromu tip 5 gibi hereditör neoplastik sendromlarda germ-line mutasyonlar bildirilmiştir. Bu gendeki değişimler, evre I-III kolorektal kanser hastalarında düşük sağkalım oranı ile ilişkilendirilmiştir (De Roock, 2011).

Bütün bu bilgiler ışığında, özellikle kanserde oldukça umut vaat eden likit biyopsi ve yeni nesil dizileme yöntemlerinin birlikte kullanımı genetik tanı laboratuvarları açısından büyük önem arz etmektedir. Bu sayede geniş kapsamlı ve hassas bir çalışma ile etkinliği yüksek, bireye özgü sağlık hizmetinin kanser hastalarına verilebilmesi mümkün olabilecektir. Her iki yöntemin birlikte klinik uygulamalarda kullanılmasına yönelik evrensel literatür oldukça sınırlı olup, Türkçe kaynak ise bulunmamaktadır. Elde edilen yüksek miktarda verinin doğru bir şekilde yorumlanabilmesi ve likit biyopsinin rutin çalışmalara entegre edilebilmesi açısından bu tezin bir kılavuz görevi görmesi ve başka merkezlerce faydalanılabilir bir kaynak olması hedeflenmektedir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Moleküler kanser tanısında likit biyopsinin yeni nesil dizileme yöntemi aracılı kullanımına ilişkin literatür bilgisi oldukça sınırlıdır. Likit biyopsi üzerine ise ulusal literatürde herhangi bir kaynak bulunmamakla beraber uluslararası literatürde tüm gelişmeler son birkaç yıl ile sınırlı kalmaktadır.

Likit biyopsi kavramı ilk olarak Mandel P. ve arkadaşları tarafından 1948’te ortaya atılmıştır. Her ne kadar Stroun, M. ve arkadaşları 1989’da kanser hastalarında hücre dışında serbest bulunan nükleik asitlerin kanser hücrelerindeki nükleik asitler ile benzer özellikler taşıdığını ortaya koysa da yeteri kadar çalışma yapılmamıştır.

1994 yılına gelindiğinde Vasioukhin V. ve arkadaşları kemik iliğinde RAS mutasyonları pozitif DNA fragmanları tespit etmiş ve malign hastalıklarda plazmadaki serbest DNA miktarının arttığını bildirmişlerdir.

1996’da Nawroz H. ve arkadaşları periferik kanda miRNA ve mikrosatellit değişimlere sahip serbest DNA’nın daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

2005 yılında Mori T. ve arkadaşları metastatik melanoma vakalarında serumdaki serbest DNA’larda kanser ilişkili genlerin metile hallerinin varlığını tespit etmiş ve bunların tedavi yanıtı üzerindeki olası etkilerini bildirmişlerdir.

Bu bilginin kanser çalışmalarına uyarlanması ise tümör klonalitesi ile metastatik hücrelerin araştırılması ve dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC) tespiti ile başlamıştır.

2007 yılında Eccles S. ve arkadaşları kansere ait klonal hücrelerin ve dolaşıma dökülen metastatik tümör hücrelerinin tespiti ve mutasyonların saptanması ile de hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin uygulanabileceğini ancak bu alanda daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç olduğunu belirtmiştir.

2008 yılında Pantel K. ve arkadaşları tarafından, kemik iliğinde dissemine ve dolaşımdaki tümör hücrelerinin (DTC ve CTC) tespit edilebilirliği

gösterilmiştir. Bu çalışma sayesinde metastatik hücrelerin biyolojik ve karakteristik özellikleri anlaşılabilmiştir.

Schwarzenbach H. ve arkadaşları da 2011 yılında dolaşımdaki DNA, mRNA ve microRNA'ların kanser belirteçleri olarak tümör yükünü oluşturdıklarını ve kanser gelişimi ile doğrudan ilişkili olduklarını göstermişlerdir.

2013 yılında Crowley E. ve arkadaşları kanser tanısında, alternatif bir yöntem olarak likit biyopsinin kullanılmasının avantajlarını listelemişler ve hastalığın prognozuna yönelik bilgiler sağlayabileceğini belirtmişlerdir. Aynı yıl Elshimali Y. I. ve arkadaşları kanser vakalarında likit biyopsinin erken dönemde parafinize doku çalışmalarına olan üstünlüğünün ve hasta takibindeki avantajlarının kolaylaştırabileceğinin üzerinde durmuştur.

2015 yılında Gingras I. ve arkadaşları, 2016 yılında da Qin Z. ve arkadaşları likit biyopsi ile yapılan moleküler analizlerin parafinize doku çalışmalarından daha etkin olabileceğini belirtmiş, sadece primer tümör dokusu değil metastatik dokulara yönelik de bilgiler sunabileceğini belirterek rutin klinik çalışmalarda likit biyopsinin uygulanması savını ortaya atmışlardır.

2016 yılında Bennet C. W. ve arkadaşları serbest tümör DNA'sı ile hasta takibi yapılmasının önemini vurgulamış, kanser tanı ve tedavi sürecinde yönetsel standardizasyonun gerekliliğini savunmuşlardır.

2016 yılında Malapelle U. ve arkadaşları yeni nesil dizileme sistemlerinin kanser tanısındaki önemi üzerinde durarak likit biyopsi materyali ile çalışmanın yönetsel avantajlarını göstermiştir.

2017 yılında Vendrell J. A. ve arkadaşları akciğer kanserli hastalarda serbest tümör DNA'sını farklı metotlar ile çalışarak karşılaştırmışlardır. Aynı yıl Caswell D. R. ve arkadaşları likit biyopsi materyali ile çalışmanın tümör heterojenitesi sorununu en aza indirmek için iyi bir yöntem olabileceği üzerinde durmuşlardır.

2017 yılında Kamps R. ve arkadaşları kanser tanısında yeni nesil dizileme yönteminin yüksek güvenilirliğini vurgulamışlardır.

Son olarak 2017 yılında Boga İ. tarafından yapılan tez çalışmasında yeni bir yeni nesil dizileme sistemi olan GeneReader NGS sisteminin validasyonu ve FFPE doku örneklerine yönelik yöntemsel ve sistemsel optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan yeni nesil dizileme sistemine (GeneReader NGS System) ve kullanılan panele yönelik literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Likit biyopsi materyali ile pek çok farklı metot aracılı yapılan çalışmalar olsa da son yıllarda altın standart olarak kabul görmüş olan YND yöntemi çalışmaları çok az sayıdadır. Özellikle klinik laboratuvar uygulamalarında, likit biyopsi materyalinin kullanımına yönelik kılavuz olarak kullanılabilecek detaylı bir yayın bulunmamaktadır. Bahsedilen YND sistemi ile yapılan bu tez çalışması ise başlangıç materyalinin likit biyopsi olması özelliği ile ulusal ve evrensel literatürde bir ilk niteliğindedir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, Çukurova Üniversitesi Adana Genetik Hastalıklar Tanı ve Tedavi Merkezi'ne (ÇÜ AGENTEM) başvuran farklı evrelerdeki akciğer kanserli hastaların likit biyopsi ve FFPE doku örneklerinden yeni nesil dizileme ile çalışılmıştır. Bu hastalardan 8 tanesinin periferik kanlarından 10 mL likit biyopsi materyalleri 2 farklı tip biyolojik örnek toplama tüplerine alınmıştır. Ayrıca 28 hastanın hem likit biyopsi materyalleri aynı alınmış hem de çeşitli girişimsel işlemler aracılığı ile elde edilmiş biyopsi materyallerinden parafinize doku [Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE)] örnekleri temin edilmiştir. Toplanan başlangıç materyallerinden Çukurova Üniversitesi AGENTEM'de rutin olarak kullanılmakta olan kanser paneli ile çalışılmak üzere gDNA (genomik DNA) ve ccfDNA (Circulating Cell-Free DNA) elde edilerek rutin kullanıma entegrasyonu hedeflenmiştir.

Serbest DNA'lar, apoptoz veya nekroza uğramış hücrelerden periferik kana dökülürler. Kanser varlığında, dolaşımda yer alan serbest DNA konsantrasyonunun daha yüksek olması beklenmektedir (Szpechcinski, 2015). Ancak likit biyopsi çalışmaları, ccfDNA elde edilme güçlü ve konsantrasyonunu etkileyebilecek farklı parametrelerin varlığı dolayısıyla çalışılacak moleküler test türüne göre optimizasyon ve entegrasyona ihtiyaç duymaktadır. Kanser ilişkili yeni nesil dizileme çalışmalarında sıklıkla periferik kan ve FFPE doku örnekleri başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber doku eldesinin zorluğu, yapılan çalışmanın tekrarının zorluğu ve YND çalışmasında dokudan elde edilen DNA kalitesinden kaynaklanan sorunlar, likit biyopsinin başlangıç materyali olarak kullanılmasını bir ihtiyaç haline getirmiştir. Likit biyopsi, bireyin taşıdığı spesifik genetik değişimler doğrultusunda tedaviye yönelik güncel protokollerin belirlenebilmesinde kullanılabilmesi ve daha iyi bir hasta/hastalık takibi ile hastalara daha iyi bir sağlık hizmeti sunulmasını mümkün kılmıştır.

Bu tez çalışması için, ÇÜ AGENTEM'e başvuran akciğer kanseri tanısı almış 36 hastadan likit biyopsi örnekleri alınarak ÇÜ AGENTEM'de rutin olarak kullanılmakta olan solid tümör kanser paneli ile çalışılmıştır. Ancak likit biyopsi çalışmalarında DNA izolasyonu diğer materyallerden yapılan izolasyona göre daha az standardize haldedir. Ayrıca kan veya doku materyali ile yapılan çalışmalarda elde edilen gDNA miktarı ile likit biyopsi çalışmalarından elde edilen serbest tümör DNA'sı konsantrasyonunun karşılaştırılmasına yönelik bir literatür bilgisi bulunmamakla birlikte likit biyopsi çalışmalarında elde edilen DNA miktarı daha düşük olması beklenmektedir. Bu da izolasyon yönteminin, çalışılacak metot ve protokole göre standardize edilmesini zorunlu kılmaktadır. Elde edilmesi hedeflenen ccfDNA moleküllerinin apoptoz veya nekroz sonucu fragmente olması beklendiğinden çalışma kalitesini ve çalışma sonundaki analizleri doğrudan etkileyebileceği göz önünde unutulmamalıdır.

Bu çalışmada, likit biyopsi için özel olarak üretilmiş, serbest DNA'ların stabilize olmasını sağlayan içeriğe sahip 2 farklı tipte tüpler kullanıldı. Biyolojik örnek toplama tüplerinin DNA konsantrasyonu üzerindeki etkisini tespit edebilmek adına 2 farklı biyolojik örnek toplama tüpünde hastaların periferik kan örnekleri toplandı. Tüpler, serbest DNA izolasyonu aşaması gerçekleşene kadar plazmaları ayrılmadan, en fazla 7 gün süre ile örnekler doğrudan güneşe ve herhangi bir mekanik etkiye maruz kalmayacak şekilde oda sıcaklığında (23°C) muhafaza edildi. Serbest DNA izolasyonu sonrasında DNA konsantrasyonları karşılaştırılarak sonucun anlamlılığı değerlendirildi.

Farklı başlangıç materyallerinin DNA izolasyonu, yeni nesil dizileme ve biyoinformatik analizler üzerindeki etkilerini araştırmak üzere likit biyopsi materyallerinin yanında FFPE doku örnekleri de çalışmaya dahil edildi.

3.2. Metot

Yapılan tez çalışmasında, kanser panelinin rutin klinik laboratuvar uygulaması, likit biyopsi ve doku materyallerinin temini, likit biyopsilerden

plazmanın ayrılması, plazmadan serbest DNA, doku örneklerinden genomik ve serbest tümör DNA'sı izolasyonu, izole edilen uygun kalite ve miktardaki DNA'lardan hedef bölge zenginleştirilmesi, çalışma kütüphanelerinin oluşturulması, klonal amplifikasyon ve yeni nesil dizilemeden meydana gelmektedir. Ardından veri analizi ile çalışma kalitesinin tayini ve hastaların klinik öyküleri doğrultusunda varyant analizi ile varyantların biyoinformatik olarak yorumlanması yapılmaktadır.

Çalışmada kullanılan yeni YND sisteminde dizileme cihazın yüklenecek hasta örneklerini içeren "flowcell"ler, çalışılan materyal türü gen paneli ilişkili olarak likit biyopsiler için 8, FFPE doku örnekleri için ise 10 hasta kapasitelidir. Tez çalışmasında bu nedenle likit biyopsi için 8'er ve FFPE doku örnekleri için 10'ar hastalık grupları halinde uygulama yapılmıştır.

3.2.1. Likit Biyopsiden ccfDNA İzolasyonu

Akciğer kanseri tanılı 36 hastadan 8'inin likit biyopsi örnekleri, 10 mL periferik kandan olacak şekilde 2 farklı tipteki biyolojik örnek toplama tüplerine alındı. Diğer 28 akciğer kanseri hastasının 10 mL periferik kanları A marka biyolojik örnek toplama tüplerine alındı. ccfDNA izolasyonu, Circulating Cell-Free DNA izolasyon kiti (Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit) kullanılarak, vakumlu sistem yardımı ile (Qiagen QIAvac 24 Plus) gerçekleştirildi. İşlem sonunda likit biyopsilerden ccfDNA elde edildi ve konsantrasyon tayinleri florometrik DNA ölçüm cihazı (Qubit 3.0, ThermoFisher) ile yapıldı. Yeterli DNA konsantrasyonuna sahip örnekler bir sonraki aşamaya aktarıldı.

- Plazmaları ayrılmak üzere, biyolojik örnek tüplerinde bulunan likit biyopsi örnekleri, 3000 rpm'de, +4°C'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant olarak ayrılan 4 mL plazmalar, pellete değmeden dikkatlice alınarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.

- Liyofilize halde bulunan 310 µg taşıyıcı RNA'ya (cRNA, carrier RNA) 1550 µL AVE tamponu eklenerek çözündürülmesi sağlandı. Tüp cRNA tamamen çözünene dek vortekslendi ve ardından kısa santrifüj yapıldı. Elde edilen çözündürülmüş cRNA, her bir çalışma grubunda kullanılacak miktara göre (45 µL) alikotlandı. Alikotlanan cRNA kullanılabilecek şekilde saklanmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.
- Bir çalışma grubu için (8 örnek) 28,2 mL ACL tamponu ile daha önceden çözündürülen 45 µL cRNA, 50 ml'lik santrifüj tüpünde birleştirildi.
- Yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmış olan her bir 4 mL plazma örneği üzerine 400 µL proteinaz K (QIAGEN Proteinase K) ve 3,2 mL ACL-cRNA karışımı eklendi. Tüpler 30 sn. boyunca vortekslenerek homojen hale getirildi. Homojenize edilen tüpler hiç bekletilmeden, önceden hazırlanarak 60°C'ye ayarlanmış olan su banyosuna yerleştirildi. 30 dk. inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası tüplerdeki lizatlara 7,2 mL ACB tamponu eklendi. Tüpler 15-30 saniye vortekslenerek homojen hale getirildi. Homojenize edilen tüpler 5 dk. buz üzerinde bekletilerek soğumaları sağlandı.
- Vakum sistemi kurulmak üzere her örnek için bir adet elüsyon kolonu (QIAampMini column), bir adet konektör (VacConnector) ile vakum valfi (VacValves) ve 20 mL hacmindeki uzatma tüpleri birleştirilerek sıkıca vakumlu sisteme yerleştirildi.
- 50 ml'lik santrifüj tüplerinde bulunan örnekler dikkatlice her örnek için vakumlu sisteme yerleştirilmiş olan alan 20 ml'lik farklı uzatma tüplerine aktarıldı. Vakum pompası açılarak tüm örneklerin tamamen vakumlanması sağlandı. Vakumlanma işlemi tamamlandıktan sonra vakum kapatılarak uzatma tüpleri sistemden çıkarıldı. Elüsyon kolonları üzerine her bir solüsyondan sonra yeniden vakumlama yapılacak şekilde sırasıyla 600 µL ACW1 tamponu, 750 µL ACW2 tamponu ve 750 µL saf etanol eklendi. Tamponlar eklenirken sıvının kolon membranını kaplayacak şekilde,

filtreye değmeden bırakılmasına dikkat edildi. Yıkama aşamaları tamamlandıktan sonra vakum sistemi kapatıldı. Elüsyon kolonları, kapakları kapatılarak temiz birer 2 mL koleksiyon tüplerine alındı. Kullanılan valf ve konektörler atıldı.

- Koleksiyon tüpleri 14000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilerek kalan solüsyon artıkları uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası elüsyon kolonları 2 mL'lik yeni koleksiyon tüpüne alındı ve önceden 56°C'ye ayarlanmış olan ısıtıcıda 10 dk. kurumaya bırakıldı. Kuruyan elüsyon kolonları 1,5 mL'lik yeni elüsyon tüplerine alındı ve üzerlerine membranı kaplayacak şekilde, oda sıcaklığına getirilmiş 40 µL AVE tamponu eklendi. Tüplerin kapakları kapatılarak 3 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler maksimum devirde 1 dk. santrifüj edilerek ccfDNA elüsyonu gerçekleştirildi.
- İzolasyonu tamamlanan örneklerin ccfDNA konsantrasyonu ölçümleri florometrik DNA ölçüm cihazı ile yapıldı. Konsantrasyon ölçümü için standartlar (2 adet) ile her örnek için 199 µL çalışma solüsyonu ve 1 µL florokrom karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Solüsyon vortekslenerek homojen hale getirildi ve kısa santrifüj yapıldı. Daha sonra hazırlanan çalışma solüsyonundan örnekler için 198 µL, standartlar için 190 µL alınıp 500 µL'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldı. Tüplere dağıtılan solüsyonların üzerine örneklerden 2 µL, standartlardan 10 µL eklenerek her bir tüp 200 µL'ye tamamlandı. Örnekler ve standartlar eklendikten sonra vorteks ve kısa santrifüj yapıp 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda önce standart okumaları yapılarak cihaz ayarlandı. Ardından örnekler sırayla cihaza yerleştirildi ve ng/µL cinsinden ccfDNA konsantrasyonları belirlendi.

Konsantrasyonu yeterli olan örnekler, hedef zenginleştirilmesi için çalışmanın bir sonraki aşamasına aktarıldı.

3.2.2. FFPE dokudan gDNA İzolasyonu

gDNA izolasyonu, FFPE DNA izolasyon kiti (Qiagen GeneReader FFPE kiti) kullanılarak, izolasyon cihazında (Qiagen QIAcube) yapılmıştır. Bu aşamada FFPE materyalinden genomik DNA elde edilip, elde edilen genomik DNA florometrik DNA ölçüm cihazı (Qubit 3.0, ThermoFisher) ile ölçülerek, yeterli DNA elde edilen örnekler bir sonraki aşamaya aktarıldı.

- Parafine gömülü olarak gelen örnekler, izolasyon aşamasında önce deparafinize hale getirildi. 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpünde bulunan parafinize blok kesitlerine, deparafinizasyon solüsyonundan 160 µL aktarılıp 10 saniye (sn.) süre ile vorteks ve kısa santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası, daha önceden ısıtılmış olan ısı bloğunda 56°C'de 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler, bloktan çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi bekledi. Oda sıcaklığında mumsu veya katı yapısı devam eden örnekler 30-80 µl daha deparafinizasyon solüsyonu eklendi ve inkübasyon aşaması tekrarlandı.
- Örnekler, kit içerisinde bulunan RNaz içermeyen su, FTB solüsyonu ve proteinaz K eklendi. Her örnek için tüpe 55 µL RNaz içermeyen su, 25 µL FTB solüsyonu ve 20 µL proteinaz K eklendi. Vorteks ve ardından kısa santrifüj yapıp ve 56°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler önceden ısıtılmış olan ısı bloğunda 90°C'de 1 saat daha inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örnekler kısa santrifüj yapılarak işlem sonunda iki fazlı bir görüntü oluşması sağlandı. Alttaki berrak faz yaklaşık 100 µl olacak şekilde başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Aktarılan berrak fazın üzerine 115 µL RNaz içermeyen su ve kit içerisinde bulunan UNG enziminden 35 µL eklendikten sonra örnekler, vorteks ve kısa santrifüj yapıldı. 50°C'de 1 saat inkübe edildi ve inkübasyon sonrasında kısa

santrifüj yapıldı. Sonraki işlemlere otomatik izolasyon cihazında devam edildi.

- Otomatik izolasyon cihazı için rotor adaptörler hazırlandı. İzole DNA örneklerinin konulacağı elüsyon tüpleri ve filtreleme işlemlerinin gerçekleşeceği spin kolonlar rotor adaptörlere yerleştirildi. Cihazın örnek kısımlarına 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpünde bulunan deparafinize edilmiş örnekler yerleştirildi ve cihazın işlem sırasında kullanacağı solüsyonlar (AL Buffer, AW1, AW2, ATE, % 96'lık etil alkol ve RNaz A) cihaza yerleştirildi. Son olarak, 200 µL'lik ve 1000 µL'lik pipet uçları cihaza yerleştirilerek, cihaz çalıştırıldı.
- Çalışması biten otomatik izolasyon cihazından elüsyon tüpleri toplandı ve izole edilen DNA'lar kontrol edildi (İzole DNA'lar berrak bir şekilde görülmelidir. Berrak olmayan DNA'lar ile yapılan çalışmalarımız göstermiştir ki bu örnekler, hem konsantrasyon ilişkili hem de saflık ile ilgili sorunlar yaratmıştır). Berrak olmayan izole DNA'lar çalışma dışı bırakıldı ve tekrar izolasyon yapıldı. Böylece, ileriki aşamalarda çalışmada kötü ve/veya yetersiz sonuç alınmasının önüne geçilmiş oldu.
- İzolasyon aşaması tamamlanan örnekler ölçüm aşamasına alındı. Ölçümler DNA ölçüm cihazı ile florometrik olarak yapıldı. Önce, ölçüm yapılacak örnek sayısı kadar çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışma solüsyonu, örnek başına 199 µL çalışma solüsyonu ve 1 µL florokrom karıştırılarak yapıldı. Daha sonra hazırlanan çalışma solüsyonundan 198 µL alınıp 500 µL'lik tüplere konuldu. Üzerine, izole edilen DNA'dan 2 µL eklendi. Örnekler eklendikten sonra vorteks ve kısa santrifüj yapıp, 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda örnekler ölçüm cihazında ölçülüp ng/µL cinsinden değerler kaydedildi.

Önceki çalışmalarda gösterildiği üzere FFPE doku örneklerinden elde edilen 1,5 ng/µL gDNA konsantrasyonu başarılı bir çalışma için yeterli olmaktadır

(Boga, 2017). Bu doğrultuda konsantrasyonu 1,5 ng/μL'nin altında kalan FFPE doku örnekleri çalışma dışı bırakıldı. Konsantrasyonu yeterli olan örnekler, hedef zenginleştirilmesi için çalışmanın bir sonraki aşamasına aktarıldı.

3.2.3. Yeni Nesil Dizileme İş Akışı

3.2.3.1. Hedef zenginleştirme

Hedef zenginleştirme aşaması, elde edilen genomik ve serbest tümör DNA'sından sekans yapılması istenilen bölgenin primer yardımı ile PCR aracılığı ile çoğaltılması, saflaştırılması ve kalite kontrolünün yapılmasını içermektedir.

- Hedef zenginleştirme aşamasında önce konsantrasyonları 2,5 ng/μL'nin üzerinde olan örnekler, DNaz içermeyen su ile 2 mL'lik az bağlanma özellikli mikrosantrifüj tüpünde (LoBind) dilüsyon yapılarak, bütün örneklerin konsantrasyonları 2,5 ng/μL olacak şekilde eşitlendi.
- Çalışmada kullanılan kanser panelinde 12 gen için 4 primer havuzu bulunmaktadır. Bu nedenle her bir örnek için 4 primer havuzu ve reaksiyonları hazırlandı. Böylece, örnek sayısının 4 katı kadar reaksiyon tüpü hazırlanmış oldu. Hazırlanan tüplere dağıtılmak üzere, her örnek için PCR solüsyon karışımı [4,4 μL GeneRead DNaseq Panel 5x PCR Buffer, 1,5 μL GeneRead HotStar Taq DNA Polymerase, 11 μL Primer Mix Pool A1-A4 (2x) ve 0,7 μL DNaz içermeyen su] hazırlandı.
- Daha sonra konsantrasyonları eşitlenmiş izole DNA'lardan 4'er μL reaksiyon tüplerine dağıtıldı. Konsantrasyonu düşük olan örneklerden 10 ng DNA içerecek hacimler hesaplandı ve reaksiyon tüplerine eklendi. Son olarak, PCR gerçekleşmesi için termal döngü cihazına Çizelge 1'deki prosedüre uygun şekilde yükleme yapıldı.
- PCR sonunda, örnekler soğuk blok üzerine alındı. Aynı örneğin 4 farklı primer havuzuna ait tüpleri birleştirildi ve birleştirme sonrası tüplerdeki hacim ölçüldü. Hacimlerin 80 μL'den az olması durumunda, hacim 80

μL 'ye tamamlandı ve 1,5 mL'lik az bağlanma özellikli mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

Çizelge 3.1. Hedef zenginleştirme aşamasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyon protokolü

Zaman	Sıcaklık	Döngü
15 dakika	95°C	1
15 saniye 4 dakika	95°C 60°C	26
10 dakika	72°C	1
Bekleme	4°C	∞

- Hacimleri eşitlenen örnekler, manyetik boncuklar (Agencourt AMPure XP beads) kullanılarak saflaştırıldı. 80 μL hacmindeki örneklerin üzerine, oda sıcaklığına getirilmiş ve homojenize edilmiş manyetik boncuklardan 72 μL eklendi. Böylelikle manyetik boncuk/örnek oranı 9/10 olacak şekilde ayarlandı. Boncukların saklama sıcaklığı +4°C olup, çalışmalarımız göstermiştir ki oda sıcaklığında uzun süre bekletilen boncuklar bozulmakta ve çalışmayı doğrudan olarak etkilemektedir. Aynı şekilde boncuklar çok kısa zamanda dibe çöktüğünden çalışma sırasında boncukların homojenize olup olmaması çalışmayı etkilemektedir. Bu aşamada boncukların 9/10 oranı çok önemlidir. Eğer koyduğumuz oran 9/10'dan büyük olur ise elde etmek istediğimiz amplikonların kaybına, 9/10'dan küçük olur ise istemediğimiz büyük amplikonların yeterince temizlenmemesine ve sekans sırasında veri kaybına sebep olacaktır.
- 72 μL boncuk eklendikten sonra örnekler vorteks ile iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 7,5 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda, tüpler manyetik sporlara konulup tüpün içindeki sıvı berraklaşınca kadar (yaklaşık 5 dakika) beklendi.

- Berraklaşan süpernatanttan (üstte kalan sıvı kısım) 140 µL başka bir 1,5 mL'lik az bağlanma özellikli mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve boncuk içeren tüpler atıldı. 140 µL örneklerimizin üzerine, 128 µL boncuk (orijinal örnek hacmimiz olan 80 µL'ye göre 16/10 oranında) eklendi (Buradaki oranın 16/10'dan farklı olması, istediğimiz amplikonların kaybına sebep olacağından oranın doğru ayarlanması önemlidir). Boncuklar eklendikten sonra, oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyon sonrası, tüpler manyetik spora yerleştirilip sıvının berraklaşması beklendi.
- Sıvı berraklaştıktan sonra süpernatant atıldı ve 400 µL % 80'lik alkol eklenerek istenmeyen moleküllerin temizlenmesi sağlanmış oldu. Alkol ile yıkama sonrası, süpernatant boncuklara dokunmadan tüpten uzaklaştırıldı ve alkol ile yıkama aşaması bir kez daha tekrar edildi.
- Yıkamalar tamamlandıktan sonra, tüplerin ağzı açık bırakılarak boncukların kuruması beklendi. Boncuklar iyice kuruduktan sonra, 28 µL steril su eklenilerek tüpler vortekslendi ve tekrar manyetik spora yerleştirildi. Sıvı berraklaşınca 25 µL süpernatant, boncuk gelmeyecek şekilde 1,5 mL'lik temiz bir az bağlanma özellikli mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Böylelikle saflaştırma işlemi tamamlanmış oldu.
- Saflaştırma sonrası, konsantrasyon ve kalite tayini için jelde yürütme, jel yürütme cihazı kullanılarak (Qiagen QIAxcel) yapıldı. Bu aşamada 50-800 bp'lik boy belirteci ve 15bp/3kb'lik hizalama belirteci kullanıldı. Örnekler, 1/10 oranında seyreltilerek cihaza yüklendi. Çalışma sonrasında örneklerin yaklaşık 149 baz çifti uzunluğunda ve yeterli konsantrasyonda olması gerekmektedir. Doğru uzunlukta olmayan örneklerin saflaştırma aşaması tekrarlandı ya da çalışma dışı bırakıldı. Elde edilen örnek konsantrasyonları yeterli ve doğru uzunlukta olan örnekler kütüphane oluşturulma aşamasına alındı.

3.2.3.2. Kütüphane oluşturulması

Dizilenen DNA'ların sekans cihazı tarafından tanınması ve örneklerin birbirinden ayırt edilmesini sağlamak amacıyla hedef zenginleştirilmesi yapılan, uzunlukları belli olan DNA parçalarına adaptör denilen, dizisi ve sayısı bilinen nükleotid dizileri eklendi. Her örnek tüpüne farklı diziye sahip nükleotid parçaları eklendiğinden her örneğe özgü, dizisi bilinen bir DNA bölgesi oluşturularak her bir örneğin bu bölgeler sayesinde birbirinden ayırt edilmesi sağlanmış oldu. Böylelikle bu çalışmaya özel bir kütüphane oluşturuldu.

- Ölçümü yapılan zenginleştirilmiş DNA'lar, son konsantrasyonu 5 ng/μL olacak şekilde DNaz içermeyen su ile seyreltildi. Daha sonra 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne, her bir örnekten 8'er μL aktarıldı.
- Her bir örneğin üzerine birbirinden farklı adaptörlerden 3,2 μL eklendi. Tüpler vorteks ve kısa santrifüj yapıldı. Bu aşamadan sonra çalışmaya yıkama, çalkalama ve ısı değişimlerini otomatize yapan sistem (QIAcube) ile devam edildi.
- Otomatize sistem için master miks A (MMA) karışımı hazırlandı. Kullanıcıya yönelik hazırlanan protokollerde belirtilen miktarlarda solüsyon karışımı (End-Repair solüsyonu, End-Repair enzim karışımı, Universal Adaptor Q ve RNaz içermeyen su) 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne hazırlandı.
- Master miks C (MMC) karışımı, kullanıcıya yönelik hazırlanan protokollerde belirtilen miktarlarda (Ligation solüsyonu, Ligation + Nick repair enzim karışımı, dNTP ve RNaz içermeyen su) 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne hazırlandı.
- Cihaza konulacak örnek sayısı kadar rotor adaptör, spin kolon ve elüsyon tüpleri hazırlanarak cihaz başlatıldı.
- Otomatize cihazın çalışması bittikten sonra her bir örnekten 17'şer μL, PCR için tüplere aktarıldı.

- PCR için her bir örnek tüpüne kullanıcıya yönelik hazırlanan protokollerde belirtilen miktarlarda solüsyon karışımı (Multiplex PCR Master Mix'ten 25 µL, Primer Mix Library Amplification'dan 1 µL ve RNaz içermeyen sudan 7 µL) eklendi ve termal döngü cihazına Çizelge 2'deki prosedüre uygun şekilde yükleme yapıldı.

Çizelge 3.2. Kütüphane oluşturulması aşamasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyon protokolü

Zaman	Sıcaklık	Döngü
15 dakika	95°C	1
30 saniye	94°C	10
30 saniye	52°C	
30 saniye	72°C	
5 dakika	72°C	1
Bekleme	4°C	∞

- PCR sonrasında örnekler 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Yıkama işlemleri için rotor adaptörler hazırlandı ve tekrar izolasyon cihazına yerleştirildi.
- İzolasyon cihazında çalışma bittikten sonra, elüsyon tüpleri alındı ve jel elektroforez cihazı ile kalite ve konsantrasyon ölçümü yapıldı. Örnekler 1/5 oranında seyreltildi ve cihaza yüklendi.
- Bu kısımda amplikon uzunluğu oldukça önemlidir. Çünkü bu aşamada hedef DNA'ya dizisi ve sayısı belirli nükleotid dizisi eklendiğinden amplikonların istenilenden farklı boyutta olması, işlemin doğru yapılmadığı ve dizilemeyi direkt olarak etkileyebileceği anlamına gelmektedir. Bu nedenle, jel elektroforez çalışması sonunda yaklaşık 252 baz uzunluğunda olan amplikon bölgesi seçildi ve konsantrasyonları belirlendi.

Amplikon boyu ve konsantrasyonu yeterli olan örnekler ile bir sonraki aşama olan klonal amplifikasyon aşamasına geçildi.

3.2.3.3. Klonal Amplifikasyon

Kütüphanesi oluşturulan örnekler, primer yüklenmiş boncuklara bağlanarak PCR ile klonal olarak çoğaltıldılar. Ayrıca bu aşamada boncuk-DNA birleşiminin çevresine lipid bir kılıf oluşturulup lipid damlacık oluşumu sağlandı.

- Jel elektroforez cihazında boyut ve konsantrasyonları belirlenen kütüphanesi oluşturulmuş örnekler, konsantrasyonu 100 pg/μL olacak şekilde, dilüsyon solüsyonu (Buffer D) ile seyreltildi.
- Konsantrasyonu eşitlenmiş örnekler, her “flowcell” için eşit hacimde birleştirilip bir havuz oluşturuldu. Bu havuz için her örnekten 10’ar μL alındı. Hazırlanan havuzdan 4 μL, 496 μL dilüsyon solüsyonuna eklenerek havuz konsantrasyonu 0,8 pg/μL’ye ayarlandı.
- Bu aşamada, primer yüklenmiş PCR boncukları ile çalışmaya devam edilmiştir. Ancak, primer yüklenmiş PCR boncukları, çalışmaya başlamadan önce ön işlemlerden geçirilmiştir. Bu işlemler için, iyice vortekslenen boncuklar az bağlanma özellikli mikrosantrifüj tüpüne, kullanıcıya yönelik hazırlanan protokollerde belirtilen miktarlarda eklenerek manyetik spora yerleştirildi. Manyetik spora yerleştirildikten sonra pellet (boncukların tüp içerisinde küme halinde toplanmış hali) oluşuncaya kadar bekletildi.
- Sonrasında süpernatant atılarak üzerine denatürasyon solüsyonundan 1 mL eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Süre sonunda tekrar manyetik spora konulup süpernatant atıldı. Daha sonra, manyetik spor üzerinde yıkama solüsyonu (750 μL solüsyon T) ile iki defa yıkama işlemi gerçekleştirildi.

- Yıkama sonrası kullanıcıya yönelik hazırlanan protokollerde belirtilen miktarlara göre boncukların üzerine solüsyonlar (solüsyon E ve solüsyon B) eklenip, vorteks ve kısa santrifüj yapıldı. Böylece boncukların ön hazırlığı tamamlanmış oldu.
- Seyreltilen kütüphane havuzu ve boncuklar otomatize cihaza (GeneReader QIAcube) yerleştirildi. Ayrıca, gerekli diğer solüsyonlar (Oil Mix, Master Mix, Primer Mix) ve 96'lık PCR plağı da cihaza yerleştirilerek çalışma başlatıldı.

Çalışma sona erdiğinde 96'lık PCR plağı içerisinde krem rengi bir sıvının olduğu gözlemlendi. Bu da çalışmanın sorunsuz devam ettiğinin bir göstergesi olup, üzeri kapatıldı. Sonrasında Çizelge 3'teki prosedür doğrultusunda termal döngü cihazına yükleme yapılarak işlem başlatıldı.

Çizelge 3.3. Klonal amplifikasyon aşamasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyon protokolü

Zaman	Sıcaklık	Döngü
6 dakika	94°C	1
15 saniye 30 saniye 60 saniye	94°C 57°C 70°C	60
2 dakika	72°C	1
Bekleme	4°C	∞

- PCR sonrası 96'lık PCR plak açılarak otomatize cihaza tekrar yerleştirildi. Ayrıca gerekli diğer solüsyonlar (solüsyon A, solüsyon N), rotor adaptörleri ve zenginleştirme filtresi de (Enrichment colon) cihaza yerleştirilip çalışma başlatıldı.

- Çalışma bitiminde örnekler, cihazın diğer çalışma bloğuna aktarıldı. Ön yıkama işleminden geçirilmiş “Super A Bead”ler, diğer solüsyonlar (solüsyon N, solüsyon T, solüsyon B, zenginleştirme solüsyonu) ve 0,2’lik PCR strip tüpleri de cihaza yerleştirilerek çalışma başlatıldı.
- Super A Bead’in ön yıkama işleminde 15000 g’de 1 dakikalık santrifüj sonrası süpernatanttan 550 µL atılıp, üzerine 550 µL zenginleştirme solüsyonu eklendi. Santrifüj işlemi tekrarlanıp 400 µL süpernatant atılarak tüp içerisinde 200 µL kalması sağlandı.
- Çalışma sonunda 0,2’lik PCR strip tüpleri içerisindeki örnekler homojenize edilerek az bağlanma özellikli mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve klonal amplifikasyon aşaması tamamlandı.

3.2.3.4. Yeni Nesil Dizileme

Bu aşamada, yeterli konsantrasyonda olan örnekler, ön işlemlerden geçirildi. Dizileme cihazına ait solüsyonlar hazırlanıp flowcell’e yükleme yapıldı. Gerekli inkübasyon sonrası, “flowcell”ler cihaza yüklenerek dizileme işlemi gerçekleştirildi.

Klonal amplifikasyon sonrası az bağlanma özellikli mikrosantrifüj tüpüne aktarılan örnekler, manyetik spora yerleştirildi ve pellet oluşumu sağlandı.

- Pellet oluşumu gözlendikten sonra süpernatant atılarak üzerine 500 µL solüsyon E eklendi. Vortekslendikten sonra, renk skalasına göre 100 M üstündeki örnekler çalışmaya dahil edildi. Yeterli konsantrasyondaki örnekler dizileme cihazına yüklenmeden önce ön işlemlere tabi tutuldu.
- Ön işlem olarak öncelikle, sekans primerinden 2 µL alınarak 198 µL solüsyon T ile seyreltili.
- Örnekler manyetik spora yerleştirilip süpernatant atıldı. Örneklerin üzerine seyreltilen sekans primerinden 100 µL eklenerek vortekslendi.

- Örnekler, daha önceden 95°C'ye ısıtılmış olan ısı bloğuna yerleştirilerek 5 dakika süreyle inkübe edildi. Sonrasında 25 °C'ye getirilmiş ısı bloğuna aktararak 10 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler vortekslendi.
- Örnekler, manyetik spora yerleştirilip süpernatant atıldı. Örneklerin üzerine 500 µL solüsyon T eklenerek vortekslendi.
- Örnekler manyetik spora tekrardan yerleştirildi. Süpernatant atıldıktan sonra 500 µL solüsyon P ile iki kez yıkama işlemi yapıldı.
- Yıkamalardan sonra örneklere 17 µL solüsyon P eklendi. Manyetik spordan alınan örneklerin homojenizasyonu sağlandı.
- Oda sıcaklığında olan "flowcell"e hava kabarcığı oluşturmayacak ve taşırmayacak şekilde dikkatlice yükleme yapılarak, 1 saat oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı.
- Dizileme cihazı için gerekli solüsyonların hazırlığına başlandı. İlk olarak Extend A2 ve Pol Extend solüsyonlarından 163'er µL alınarak Extend Premix A1 tüpüne konuldu.
- Extend B2 ve Pol Extend solüsyonlarından 163'er µL alınarak Extend Premix B1 tüpüne konuldu.
- 4,9 mL Cleave Additive 1, Cleavage Solution tüpüne konulduktan sonra hazırlanan tüp tüpler alt üst edilerek homojenize edildi.
- Image Premix solüsyonu eritildi ve alt üst edilerek homojenize edildi.
- Hazırlanan sekans solüsyonları, dizileme cihaz yazılımının önerdiği şekilde yerleştirildi ve "Prime" işlemi yapıldı.
- 1 saatlik inkübasyonu biten "flowcell", 150 µL solüsyon P ile iki defa yıkandı.
- Yıkama işlemi ve cihazdaki "prime" işlemi bittikten sonra "flowcell" cihaza yerleştirilip dizileme işlemi başlatıldı.

3.2.3.5. Data Analizi ve Varyant Tespiti

Yukarıda anlatılan uzun ve karmaşık uygulama işlemlerinin hatasız tamamlanması durumunda dahi, elde edilecek sekans verilerinin doğru işlenmemesi durumunda çalışmanın tamamı anlamsız hale gelecektir. Yeni nesil dizileme yönteminde çok miktarda veri elde edilmektedir. Bu sebeple, bu yöntemin en karmaşık ve zorlu kısmı bu yüksek miktardaki verinin doğru bir şekilde analiz edilmesidir (Souilmi, 2015).

Bu tez çalışmasında, data analizi öncesi verilerin kalite kontrolü yapılarak yeterli kalitedeki veriler seçildi. Seçilen veriler ilgili genin referans genomu ile karşılaştırılarak varyant tespiti yapıldı.

Kalite kontrolü aşamasında, tamamlanan dizileme işlemine ait FASTQ formatındaki dosyaların boyutu kontrol edildi. Dosya boyutlarının belirli bir referans aralığı yoktur ancak elde edilen diğer dosya boyutları bu konuda bize bir ipucu sağlamaktadır. Kabaca, doğru tamamlanmış bir dizileme işlemi sonunda dosya boyutu Mb (Megabayt) ile ölçülmelidir.

Kalite kontrolünde esas kullanılacak olan parametreler, sekans işlemi sonunda cihazın oluşturduğu final raporunda bulunmaktadır. Bunlardan ilki, kalite skorudur. Kalite skoru, dizileme kalitelerinin logaritmik bir skala ile sunulması ile oluşur.

Final raporunda kontrol edilmesi gereken bir başka kalite parametresi de elde edilen ürünün kontrol edilmesidir. Bunun için son ürün miktarının likit biyopsi örnekleri için 1 Gb, FFPE doku örnekleri için ise 760 Mb'den az olmaması gerekmektedir. Ayrıca filtrelerden geçen ürünün toplam ürün miktarına oranının her iki materyal türü için de 70 baz çiftinden büyük olması beklenmektedir.

Sekans kalite skoru da final raporunda sunulan başka bir parametredir. Bu parametrede, okumaların sekanslama cihazındaki döngülere göre dağılımı bir grafik ile gösterilmektedir.

Her bir örnekten elde edilen ürün baz çifti sayıları arasında çok büyük bir dengesizlik olup olmaması da kalite kontrolü açısından önemli bir kriterdir. Ancak,

bu değerler arasında kaliteyi belirleyecek sabit bir oran olmadığından, bu değerlendirmede kullanıcının bilgi birikimi ve tecrübesi oldukça önemlidir.

Sekans verileri kontrol edildikten ve bir sorun olmadığı tespit edildikten sonra varyant analizi aşamasına geçildi. Sekanslama cihazı çalışmayı bitirdiğinde, verileri internet ağı üzerinden varyant analiz ara yüzü olarak kullandığımız QCI Analyze'a aktarıldı. Burada, bu ara yüz tarafından genel bir kalite skoru daha verilmektedir.

Aynı ara yüz üzerinde varyant başlığı altında cihazın tespit ettiği bütün varyantlar 3 ana grup halinde sunulur ve kullanıcı analiz etmek istediği varyantları seçer. Bu varyant grupları, varyantın okuma derinliği ve varyantın bulunduğu gen bölgesinin ilgili bölgede olup olmadığı gibi kriterlere göre oluşturulur. Burada kullanıcı bilgi birikimi ve deneyimi ile doğru varyantların dikkatlice seçimi önemlidir.

Dizileme işleminin sorunsuz olduğu kontrol edilip varyant seçimleri titizlik ile yapıldıktan sonra çalışmanın en önemli aşaması olan, seçilen varyantların klinik öneminin değerlendirildiği biyoinformatik analize geçildi.

3.2.3.6. Biyoinformatik Analiz

Varyant analizinde seçilen varyantların, hastada yol açtığı klinik etkiye göre sınıflandırılması ve değerlendirilmesi, ayrıca tedavi sürecine etki edebilecek durumların araştırılması ve hastalığın tanısının kesinleştirilmesi biyoinformatik analizler ile yapılmaktadır (D'Antonio, 2013). Varyantların sınıflandırılmasında ACMG'nin (American College of Medical Genetics and Genomics) 2015 yılında yayımladığı ve bütün dünyaca kabul edilen kılavuzu kullanılmıştır (Richards, 2015).

Bu kılavuza göre varyantlar, 5 ana grup altında değerlendirilmektedir. Bu gruplar, benign [Benign (B)], yüksek olasılıkla benign [Likely Benign (LB)], klinik önemi bilinmeyen [Variant of Uncertain Significance (VUS)], yüksek olasılıkla

patojenik [Likely Pathogenic (LP)] ve patojenik [Pathogenic (P)] olarak sınıflandırılmışlardır.

In-siliko analiz araçları da biyoinformatik analizin önemli bir parçası olup bu tezde, varyantların genel etkileri için CADD ve Mutation Taster; varyantların protein düzeyindeki etkileri için PolyPhen, SIFT, B-SIFT; varyantların bulundukları gen bölgelerindeki korunmuşluk düzeyi için BLOSUM, QCI Inferred Activation, PhyloP; varyantların genlerin kesim bölgelerindeki etkileri için MaxEntScan ve Gene Splicer in-siliko analiz araçları kullanılmıştır.

Değerlendirilen varyantların, çalışılan örneğin biyolojik ve klinik durumuna göre yorumlanması gerekmektedir. Bu tezde çalışılan materyaller somatik mutasyonlar açısından değerlendirilmiştir.

Tespit edilen varyantlar iki yönlü olarak değerlendirildi. Birincil olarak, varyantlar hastanın kliniğinden bağımsız şekilde olası klinik etkileri açısından değerlendirildi. İkincil değerlendirmede de bu varyantlar, hastanın klinik bilgilerinden yola çıkılarak mevcut tedavi protokolleri ve bu tedavilere duyarlılık ya da direnç açısından analiz edildi.

Biyoinformatik analizler yapılırken kullanılan, ticari olarak sunulan bazı analiz araçları bulunmaktadır. Ancak bu araçlar, kullanıcıya sadece bilgilere daha hızlı erişim konusunda katkı sağlamakta olup, bilgilerin analiz edilip değerlendirilmesi ve yorumlanması kullanıcıya kalmaktadır.

Bu analizlerde, QCI Analyze analiz aracı kullanılarak seçilen varyantlar analiz aracına (QCI Interpret) internet ağı üzerinden yüklendi. Bu araç üzerinden yapılan analizler HGMD (Human Gene Mutation Database), COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer), ClinVar, NCBI (National Center for Biotechnology Information), ExAC (The Exome Aggregation Consortium), 1000 Genome Frequency, ESP (Exome Sequencing Project), Ancestry, Ingenuity Knowledge Base, OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) veri bankaları ile karşılaştırmalı olarak yapıldı.

Analizi tamamlanan örneklerin raporlama aşamasına geçildi. Tespit edilen bulgular doğrultusunda, ACMG kılavuzuna göre uluslararası kriterlere uygun olarak raporlama yapıldı.

Rapor formatında hasta bilgilerinin yanı sıra tespit edilen varyantın bulunduğu gen, varyantın HGMD nomenklatürüne uygun olarak yazımı, varsa nükleotid değişimi, varyanta ait transkripti gösteren NM kodu, serbest tümör DNA'sına yönelik varyantın klonalitesi ve genomik DNA'ya ait somatik varyantların yüzdesi belirtildi. Ayrıca varyantın klinik etkileri konusunda da klinik yorum kısmına açıklamalar eklendi.



ÇÜ AGENTEM
 Çukurova Üniversitesi
 Adana Genetik Hastalıklar Tanı ve Tedavi Merkezi



Hastanın Adı/Soyadı:			
Protokol No/TC Kimlik No:			
Materyal Alın Tarihi :	19.12.2017		
Rapor Tarihi:	04.01.2018		
Refere Eden Hekim/Kurum:	ÇÜTF Balcalı Hastanesi		
Klinik Tanı:	Akciğer Ca		
Materyal Türü:	Likit Biyopsi (Serbest Tümör DNA'sı)		
Araştırılan Genler ve Yapılan Çalışmalar:	Yeni nesil dizileme yöntemi (GeneReader NGS Sytems) ile <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>KIT</i> , <i>BRAF</i> , <i>PDGFRA</i> , <i>ALK</i> , <i>EGFR</i> , <i>ERBB2</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>ERBB3</i> , <i>ESR1</i> ve <i>RAF1</i> genleri çalışılmıştır.		
Sonuç:	Gen	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi
Klinik Anlamı Olan Varyantlar:	<i>EGFR</i> (Ekzon 19)	NM_005228.4: c.2235_2249delGGAATTAA GAGAAGC	p.E746_A750del
	<i>EGFR</i> (Ekzon 20)	NM_005228.4: c.2369C>T	p.T790M
Yorum: Yapılan çalışmalarda 2 (iki) farklı klona ait 2 (iki) klonal mutasyon görülmüş olup, öncelik sırasına göre; <i>EGFR</i> geninde p.E746_A750del varyantı tespit edilmiştir. Tespit edilen bu varyant, Gefitinib, Afatinib, Erlotinib" tedavilerine duyarlılığı; "Carboplatin/Paclitaxel ve Carboplatin/Erlotinib" kombinasyon tedavilerine direnç oluşturduğu bildirilmiştir. <i>EGFR</i> geninde p.T790M varyantı tespit edilmiştir. Tespit edilen bu varyantın literatürde "Osimertinib" ilaç tedavi seçeneğine duyarlılığı bildirilmiştir.			
Laboratuvar Notu: Tüm analizler HGMD, COSMIC, 1000 Genome Frequency ve Ingenuity Knowledge Base veri bankaları ile karşılaştırılmış olarak yapılmıştır. Varyant analizlerinde SIFT, BSIFT, PolyPhen-2 ve ClinVar in-siliko analiz yöntemleri uygulanarak ACMG kuralları çerçevesinde raporlama yapılmıştır. Raporlanan varyantlar, tedaviler ve ilişkili klinik çalışmalar hasta için etkinlik veya klinik önem sırasına göre dizilenmemiştir.			


 Dr. Atıl BİŞGİN

Laboratuvar sonuçları, Merkezimiz ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın bilgisi dışında yayımlanamaz.
 Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Balcalı Hastanesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 01130 Balcalı/ADANA
 0322 338 60 60 - 3590

Şekil 3.1. Uluslararası standartlara uygun şekilde hazırlanmış rapor örneği (Likit biyopsi materyali)



ÇÜ AGENTEM
 Çukurova Üniversitesi
 Adana Genetik Hastalıklar Tanı ve Tedavi Merkezi



Hastanın Adı/Soyadı:			
Protokol No/TC Kimlik No:			
Materyal Alın Tarihi:	04/04/2017		
Rapor Tarihi:	17/04/2017		
Refere Eden Hekim/Kurum:	ÇÜTF Balcalı Hastanesi		
Patolojik Tanı:	Adenokarsinom		
Materyal Türü:	Parafinize Doku		
Araştırılan Genler ve Yapılan Çalışmalar:	Yeni nesil dizileme yöntemi (GeneReader NGS Sytems) ile <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>KIT</i> , <i>BRAF</i> , <i>PDGFRA</i> , <i>ALK</i> , <i>EGFR</i> , <i>ERBB2</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>ERBB3</i> , <i>ESR1</i> ve <i>RAF1</i> genleri çalışılmıştır.		
Sonuç:	Gen	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi
Klinik Anlamı Olan Varyantlar:	<i>EGFR</i> (Ekzon 19)	NM_005228.3: c.2235_2249delGGAATTAAGAG AAGC	p.E746_A750del
Yorum: Yapılan çalışmalarda, hastada <i>EGFR</i> geninde tespit edilen p.E746_A750del mutasyonu %84 oranında görülmüştür. Literatürde, tespit edilen bu mutasyonun “Carboplatin/Paclitaxel ve Carboplatin/Erlotinib” kombinasyon tedavilerine direnç oluşturduğu bildirilmiştir. Ayrıca, literatürde bu mutasyonun “Gefitinib, Afatinib, Erlotinib” tedavilerine duyarlılığı bildirilmiştir.			
Laboratuvar Notu: Tüm analizler HGMD, 1000 Genome Frequency ve Ingenuity Knowledge Base veri bankaları ile karşılaştırılmalı olarak yapılmıştır. Varyant analizlerinde SIFT, BSIFT, PolyPhen-2 ve ClinVar in-siliko analiz yöntemleri uygulanarak ACMG kuralları çerçevesinde raporlama yapılmıştır. Raporlanan varyantlar, tedaviler ve ilişkili klinik çalışmalar hasta için etkinlik veya klinik önem sırasına göre dizilenmemiştir.			


 Dr. Atıf Bişgin

Laboratuvar sonuçları, Merkezimiz ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın bilgisi dışında yayımlanamaz.
 Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Balcalı Hastanesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 01130 Balcalı/ADANA
 0322 338 60 60 - 3590

Şekil 3.2. Uluslararası standartlara uygun şekilde hazırlanmış rapor örneği (FFPE doku materyali)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. Likit biyopsi örnekleme ile farklı tip biyolojik örnek toplama tüplerinden elde edilen ccfDNA'lar karşılaştırıldı**

Bu tez kapsamında, likit biyopsi ile elde edilen ccfDNA'nın izolasyon aşamasından yeni nesil dizileme ve klinik raporlamaya kadar olan tüm süreç bir bütün halinde araştırılmıştır. Bu doğrultuda likit biyopsi örnekleme için 2 farklı biyolojik örnek tüpüne periferik kan örnekleri alınarak karşılaştırmalar yapılmıştır. Sonrasında, hastalara ait hem likit biyopsi hem de FFPE doku örnekleri çalışılarak karşılaştırılmıştır. Bütün bu kıyaslamalarda farklı değişkenlerin elde edilen DNA konsantrasyonu üzerindeki etkileri florometrik DNA ölçüm cihazı aracılığıyla belirlenmiştir.

Birbirinden farklı tip biyolojik örnek toplama tüpüne alınan likit biyopsi materyallerinin, üretici firmaların önerisi doğrultusunda 10 mL'den az olmamasına özen gösterilerek, plazma örneklerinden elde edilen ccfDNA konsantrasyonları karşılaştırıldı. A marka biyolojik örnek tüpüne alınan plazma örneklerinden elde edilen ccfDNA konsantrasyonu (ng/μL) B markasından elde edilen konsantrasyonlar ile kıyaslandı. Karşılaştırmalarda A marka biyolojik örnek tüpüne alınan periferik kan örneklerinden elde edilen ccfDNA konsantrasyonunun medyan değeri 2,4 iken (değer aralığı: 1,18-4,07 ng/μL); B markasından elde edilen konsantrasyonların medyan değeri 10,9 (değer aralığı: 2,51-22 ng/μL) olarak belirlendi ve elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$) (Çizelge 4.1).

Her iki farklı tip biyolojik örnek toplama tüpleri de uygun konsantrasyonda genetik materyal elde edilmesi nedeniyle ileri aşamalar için çalışmaya dahil edildi. Burada bu değerlerin veri analizleri ile biyoinformatik analizler üzerindeki etkileri incelendi.

Çizelge 4.1. Aynı hastaya ait A ve B markası biyolojik örnek toplama tüplerine alınan likit biyopsilerden elde edilen ccfDNA konsantrasyonlarının karşılaştırılması

Hasta No	A tüpü (ng/μL)	B tüpü (ng/μL)
1	1,2	22
2	2,5	16,4
3	3,12	6,25
4	2,17	14,6
5	2,26	6,64
6	4,07	7,33
7	2,65	11,1
8	1,18	2,51
Medyan değer:	2,4	10,9

4.2. Likit biyopsi materyali ile FFPE doku örneklerinden elde edilen genetik materyal miktarları karşılaştırıldı

Bunlara ilaveten birebir eşleşen hastalara ait FFPE doku örneklerinden gDNA'lar izole edilerek florometrik ölçüm cihazı ile ng/μL cinsinden DNA konsantrasyonları ölçülüp elde edilen gDNA konsantrasyonları, likit biyopsi örneklerinden elde edilen ccfDNA konsantrasyonları ile kıyaslandı. FFPE materyalinden izole edilen gDNA konsantrasyonu medyan değeri 22 ng/μL (değer aralığı: 0,62-48,1 ng/μL) iken; likit biyopsiden izole edilen ccfDNA konsantrasyonları 12,7 ng/μL (değer aralığı: 0,81-49,7ng/μL) olarak belirlendi. Elde edilen bu sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Üç hastaya ait FFPE doku materyalinden yapılan gDNA izolasyonları sonucunda elde edilen konsantrasyon ölçümleri laboratuvar optimizasyonu ve sistem validasyonu sırasında belirlenen eşik değerinin altında olması nedeniyle ileri çalışmalara dahil edilmemiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Aynı hastaya ait likit biyopsiden elde edilen ccfDNA ve FFPE dokulardan elde edilen gDNA konsantrasyonları çizelgede listelenmiştir. FFPE dokulardan elde edilen gDNA konsantrasyonu sonucu önceki çalışmalarda belirtilen standart eşik değerinin altında kalan örnekler * ile işaretlenmiştir.

Hasta No	ccfDNA (ng/μL)	gDNA (ng/μL)	Hasta No	ccfDNA (ng/μL)	gDNA (ng/μL)
1	3,32	48,1	15	1,01	15,4
2	6,4	54	16	1,2	0,62*
3	2,13	9,66	17	5,45	37,5
4	15,1	55	18	1,31	17,2
5	1,01	20,5	19	3,34	9,34
6	4,11	57	20	1,88	1,17*
7	3,3	9,07	21	4,15	7,76
8	12,3	16,9	22	5,97	12,7
9	46,3	10,2	23	6,13	0,859*
10	16,8	4,66	24	4,4	3,04
11	16,1	7,93	25	3,99	39,1
12	17	43,6	26	8,56	2,34
13	95	36,3	27	1,95	2,75
14	49,7	41	28	6,47	52
ccfDNA medyan değeri: 12,7			gDNA medyan değeri: 22		

4.3. Farklı tip biyolojik örnek toplama tüplerinin yeni nesil dizileme ürün miktarları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi

İki farklı tüpe ait yeni nesil dizileme sonunda A tüpündeki likit biyopsiden elde edilen örneklerin ürün miktarına ait medyan değer 153.418.645 baz iken (değer aralıkları 127.762.020 ile 184.861.466 baz); B tüpündeki likit biyopsilerden elde edilen örneklerin çalışma sonuçları ise 105.386.749-235.417.874 baz aralığında tespit edilmiş olup medyan değeri 165.957.025 olarak belirlendi (Çizelge 4.3.). Bu sonuçlara göre her iki farklı biyolojik örnek tüpünün sekans ürün miktarları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Çizelge 4.3. Yeni nesil dizileme sonucu farklı tip biyolojik örnek toplama tüplerinden elde edilen toplam ürün miktarları.

Hasta No	A tüpü (baz)	B tüpü (baz)
1	184.861.466	191.702.617
2	154.461.095	105.386.749
3	140.070.471	235.417.874
4	152.000.741	201.197.567
5	157.448.166	138.996.622
6	144.586.455	170.692.724
7	166.158.744	119.066.489
8	127.762.020	165.195.557
Medyan değeri:	153.418.645	165.957.025

4.4. Likit biyopsi çalışmaları ile FFPE doku çalışmaları sonucu elde edilen yeni nesil dizileme ürün miktarları karşılaştırıldı

Likit biyopsi materyalleri ver FFPE doku örnekleri çalışmaları kıyaslanan hastalara ait yeni nesil dizileme sonucu elde edilen toplam sekans ürünü miktarları Çizelge 4.4.'te gösterilmiştir. Likit biyopsi materyali çalışmalarına ait ürün miktarı medyan değeri 109.676.004 baz iken (değer aralıkları 2.215.138 ile 240.093.952 baz); FFPE doku örneklerinden elde edilen sonuçlar ise 19.291.250-295.884.737 baz aralığında tespit edilmiş olup medyan değeri 90.399.188 olarak belirlendi (Çizelge 4.4.). Bu sonuçlara göre her iki tip başlangıç materyali ile yapılan yeni nesil dizileme ürün miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$).

Çizelge 4.4. Yeni nesil dizileme sonucu aynı hastaya ait likit biyopsi materyali ve FFPE doku örneklerinden elde edilen toplam ürün miktarları.

Hasta No	Likit Biyopsi	FFPE Doku	Hasta No	Likit Biyopsi	FFPE Doku
1	108.550.638	117.424.578	15	84.524.243	180.542.569
2	88.245.970	89.008.301	16	3.233.470	-
3	110.954.106	41.982.088	17	206.580.460	87.064.998
4	208.018.351	79.835.990	18	206.580.460	87.064.998
5	240.093.952	85.043.730	19	4.717.859	55.110.762
6	233.860.663	60.228.201	20	202.805.359	-
7	171.505,79	116.383.201	21	2.215.138	19.291.250
8	155.687.162	73.987.939	22	5.161.599	55.835.250
9	170.081.388	64.853.129	23	8.965.129	-
10	151.056.643	48.977.931	24	98.721.631	105.289.173
11	211.734.033	67.912.092	25	77.880.214	295.884.737
12	183.247.125	124.748.645	26	17.498.192	28.019.321
13	91.256.381	46.957.958	27	43.847.283	87.259.642
14	138.341.279	74.827.097	28	20.462.262	156.879.682
Likit Biyopsi Medyan değeri:		109.676.004	FFPE Doku Medyan değeri:		90.399.188

4.5. Yeni nesil dizileme için gerekli çalışma sonucunu etkilemeyen minimum ccfDNA konsantrasyonu belirlendi

Literatürde, likit biyopsi materyali için yeni nesil dizilemede çalışmanın kalitesini etkilemeyen minimum ccfDNA miktarının tespitine yönelik çalışma bulunmamaktadır. FFPE doku örneklerinde ise kullanıcıya yönelik hazırlanan kılavuzlarda gereken minimum başlangıç DNA konsantrasyonu 2,5 ng/μL olarak belirtilmiş olup çalışmamızda kullanılan yeni nesil dizileme sisteminin validasyon çalışmalarında bu değerin 1,5 ng/μL'ye kadar düşürülebileceği gösterilmiştir. Bu nedenle likit biyopsi materyal konsantrasyonlarının olası tüm avantaj ve dezavantajlarını belirlemek adına likit biyopsi örneklerinin tamamını çalışmaya dahil edilmiş ve konsantrasyonların çalışma üzerine olan etkileri, YND metodunun bütün aşamaları üzerinden değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler doğrultusunda,

likit biyopsi çalışmalarında gereken minimum başlangıç DNA konsantrasyonu 1 ng/μL olarak belirlenmiştir.

ccfDNA konsantrasyonlarının düşüklüğü yalnızca materyal kalitesini değil aynı zamanda hastanın periferik tümör yükünü de işaret edebilmektedir. Bu düşük DNA konsantrasyonu tek başına çalışmaya elverişsizlik anlamına gelmeyebilir. Buna karşın, yüksek gDNA konsantrasyonuna sahip bir FFPE doku örneği ile düşük DNA konsantrasyonuna sahip bir örnekten hedef zenginleştirilmesi aşamasında benzer oranda verim elde edilebilir. Bu durum, parafinizasyon gibi pek çok ön işlemden geçen FFPE doku örneklerindeki DNA kalitelerinin farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır. Bütün bu nedenlerle çalışmaya başlangıç olacak DNA konsantrasyonlarının yeni nesil dizileme çalışmaları için yeterli olup olmadığına yönelik özgün standart bir eşik değerinin belirlenmesi gereklidir. Elde edilen tüm verinin kontrolleri ve varyantların biyoinformatik analizleri aşamaları bir bütün olarak ele alınmış ve değerlendirmeler bu yönde gerçekleştirilmiştir.

4.6. İki farklı tip biyolojik örnek tüpünden elde edilen ccfDNA'ların hedef bölge amplifikasyonları kalite kontrolleri karşılaştırıldı

Yeni nesil dizileme işlemi sırasında hedef zenginleştirmeleri yapılan örneklerin kalite ve kontrolleri kapiller jel elektroforezi aracılığıyla sağlanmıştır. Bu kalite ve kontroller, polimeraz zincir reaksiyonu sonrası elde edilen amplikon uzunluklarının ve hedef DNA konsantrasyonlarının belirlenmesini kapsamaktadır.

A biyolojik örnek tüpüne ait jel yürütme sonuçları 33,8-104,8 ng/μL aralığında (medyan değeri 66,6 ng/μL) gözlenirken B tüpüne ait sonuçlar 53,9-106,1 ng/μL aralığında (medyan değeri 67,7 ng/μL) bulunmuştur. Yapılan karşılaştırmalar neticesinde elde edilen ccfDNA'ların hedef bölge amplifikasyonları sonunda amplikon uzunlukları ve konsantrasyonları bakımından her iki tüp arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

4.7. Farklı materyallerden elde edilen DNA'ların hedef bölge amplifikasyonları ve kütüphane hazırlıkları sonucu elde edilen DNA kalite ve miktarları karşılaştırıldı

Aynı hastalara ait likit biyopsi materyalinden başlayan çalışmalarda hedef zenginleştirme aşaması sonrası elde edilen amplikon konsantrasyonlarında medyan değeri 71,3 ng/μL olarak belirlenmiş olup FFPE doku örneklerinde bu değer 73,8 olduğu görülmüştür. Her iki grup karşılaştırıldığında likit biyopsi çalışmalarının, FFPE doku örneklerinden yapılan çalışmalarla aynı kalitede olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Kütüphane hazırlığı sonunda kalite kontrol tayini yine kapiller elektroforez cihazı aracılığı ile yapılmıştır. Yürütme sonunda A tüpüne ait sonuçlar 5,2-7,1 ng/μL aralığında (medyan değeri 6,3 ng/μL) gözlenirken B tüpüne ait sonuçlar ise 5,7-8,1 ng/μL (medyan değeri 6,5 ng/μL) bulunmuştur. Bu sonuçlar iki farklı biyolojik örnek toplama tüpünden elde edilen ccfDNA'lar ile oluşturulan kütüphanelerin kalite ve miktarında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ($p>0,05$).

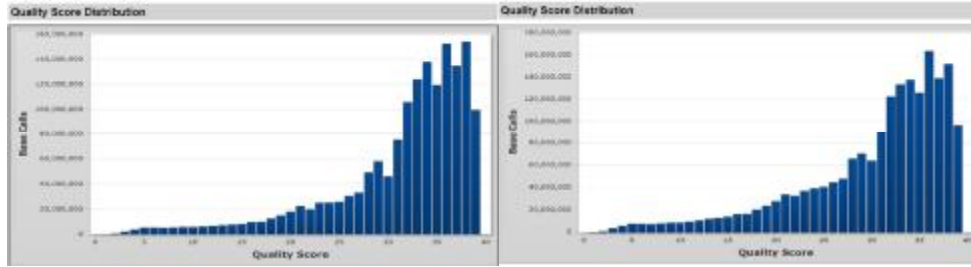
Buna ek olarak, çalışmaya dahil edilen tüm likit biyopsi materyalinden yapılan yeni nesil dizileme iş akışının kütüphane hazırlığı sonrası elde edilen amplikon konsantrasyonlarında medyan değer 5,8 ng/μL olarak belirlenmiş olup FFPE doku çalışmalarında bu değer 6,6 ng/μL olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

4.8. Yeni nesil dizileme sonucu sekans ve döngü kalite skorları değerlendirildi

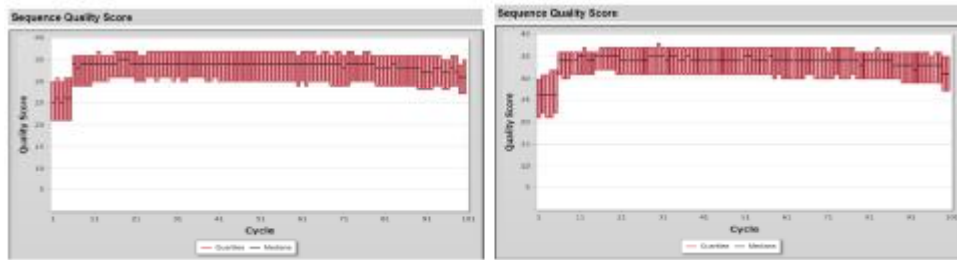
Yeni nesil dizileme işlemi sonunda elde edilen sekans verileri üzerinden çalışmanın kalitesi incelenmiştir. Kalite kontroller hem örnek bazında hem de çalışma içi kontroller olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Yeni nesil dizileme sonucunda sekans kalite skoru verilmekte ve bu skorun sorunsuz bir çalışmada 25'in üzerinde olması beklenmektedir. Skordaki bir sapma, çalışma kalitesinin düşük olduğunu gösterir ve yüksek miktarda yanlış okumanın varlığına işaret eder.

(Şekil 4.1.). Çalışmamıza ait hem likit biyopsi hem de FFPE doku örneklerine ait ortalama kalite skoru ~35 olarak saptanmıştır (Şekil 4.1.). Kalite skoru yorumlanırken örnekler “flowcell”e gruplar halinde yüklendiği için tek bir örnekten kaynaklanabilecek sorunun tüm kalite skorunu etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle kalite kontrollerin, mutlaka örnek bazlı ve dikkatli yapılması gereklidir.

Bir diğer kalite kontrol aşaması ise döngü bazlı okuma kalitesinin incelenmesidir. Çalışma sonucunda alınan sonuç raporunda döngü kalite skoruna ilişkin dağılım bir grafik ile gösterilmektedir. Skor dağılımındaki bir anormallik, cihazın dizileme işlemi esnasında bir problem ile karşılaştığı, cihaz ile ilgili teknik bir sorun olduğu veya sekans için kullanılan solüsyonlar ile ilgili bir sorun olduğu anlamına gelebilir. (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. Likit biyopsi (sol) ve FFPE doku (sağ) çalışmalarına ait kalite skorları grafik üzerinde gösterilmiştir. Kalite skorunun 25'in üzerinde olması dizilemenin düzgün yapıldığını göstermektedir.



Şekil 4.2. Likit biyopsi (sol) ve FFPE doku (sağ) çalışmalarına ait okuma kalite skoru grafikleri gösterilmiştir. Döngü skorunun çalışma boyunca 25'in altına inmemesi, okumaların dengeli olduğunu göstermektedir.

Çalışmaya ait son ürün miktarının 1,5 Gb'den az olması ya da filtrelerden geçen ürünün toplam ürün miktarına oranının 70 baz çiftinden az olması durumunda düşük kalitede bir dizileme yapıldığı düşünülmelidir. Çalışmada likit biyopsi örneklerine ait filtreden geçen ürünün toplam ürün miktarına oranı ~96 baz çifti olarak belirlenirken, bezer olarak FFPE doku örneklerinde bu değer ~97 baz çiftidir. Yapılan çalışmada, likit biyopsi ile moleküler genetik testlerde sıkça kullanılan ve görece olarak daha standardize olan FFPE doku materyali çalışmalarından elde edilen toplam ürün miktarları arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.4.). Çalışma kalitesinin doğru tayin edilebilmesi adına çalışma genelinde yapılan kalite kontroller kadar örnek bazında da bu kontrollerin yapılması ve çalışmadaki örneklerin birbirleri ile kıyaslanması gereklidir.

4.9. Yeni nesil dizileme sonrası varyant kalite kontrolleri yapıldı

Kalite skorlamasından başarı ile geçen örnekler için varyant kaliteleri, varyant analiz ara yüzü aracılığı ile kontrol edilmiştir. Bu analiz ara yüz tarafından verilen genel kalite skoruna göre likit biyopsi çalışmaları için okuma kalitesi değerlerinin %90'ın altında olması, FFPE doku örnekleri içinse %80'in altında olması kalitenin düşüklüğü olarak değerlendirilerek kırmızı ile işaretlenmekte ve bir sonraki analizlere geçmemektedir. Likit biyopsi çalışmalarında %0,5 oranındaki varyantların dahi analiz edilebilmesi için yüksek okuma kalitesi gereklidir. Bu ancak yüksek okuma sayıları ve sekans ürünleri ile bunların analizinde hassas davranılması sayesinde olur. Varyant tespit edilen bölgeler dikkatlice incelenmeli, düşük okuma sayıları elde edilen bölgelerdeki varyantlar ise gerektiğinde okuma kirliliği olarak değerlendirilmelidir. Ancak okuma değerleri gözden geçirilirken hastanın klinik verileri ve FFPE doku örneği ise dokudaki tümöre ait veriler de göz önünde bulundurularak varyant seçimi yapılmıştır. Varyant seçimi yapılırken hastanın klinik bilgileri ile materyal türüne ait bilgilerin değerlendirilmesinin yanı sıra varyantın okuma derinliği, frekansı, okuma yönü ve

farklı yönlerdeki (“forward ve reverse” primer okumaları) okumaların birbirine oranı, varyant ve çevresindeki okumaların kalitesi ile varyantın primer bölgesine olan uzaklığı gibi verilerin de aynı anda incelenmesi gerekmektedir. Her bir varyant için, tüm bu parametreler göz önünde bulundurularak varyant analizleri tamamlanmıştır.

Sonuç olarak, eksik veya hatalı varyant seçimi, sonuç raporlamasının yanlış yapılmasına neden olacağından kritik bir aşamadır. Özellikle likit biyopsi çalışmalarında okuma kirlilikleri gerçek varyantlar ile karıştırılmamalıdır. Gerçekte varyant olmayan bir değişim patojenik olarak değerlendirilmemeli, klinik öneme sahip bir değişim de kirlilik olarak atlanmamalıdır.

Varyant analizi sırasında, belirtilen pek çok parametrenin kontrolü ara yüzdeki dizi görüntüleyici aracılığı ile yapılmıştır. Analiz ara yüzü tarafından gerçek varyant olarak nitelendirilenler tek yönlü okumalar (yalnızca forward veya yalnızca reverse okuma) dizi görüntüleyicide kontrol edildi. Yeterli okuma derinliğine sahip ancak dengeli olmayan okuma kirliliği olarak işaretlenerek analiz listesinden çıkarıldı. Öte yandan, forward veya reverse okuma derinliği ile okuma sayıları ile dengeli olanlar gerçek varyant olarak kabul edilerek biyoinformatik analizlere dâhil edildi. Aynı kontroller analiz ara yüzü tarafından hedef bölge dışı veya yetersiz okuma derinliğinde olan varyantlar (varyant ara yüzündeki ikincil varyant çizelgesi) olarak sınıflandırılan değişimler için de gerçekleştirildi. Bu değişimlerden, daha önce de belirtilen kriterleri sağlayanlar biyoinformatik analizlerde değerlendirilmek üzere “gerçek varyant” olarak kabul edildi. Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.’te, varyant seçiminde kullanılan ara yüz görüntüsü verilmiştir.

Bütün bunlar sonucunda, likit biyopsi ve FFPE doku çalışmalarında görülen varyantlara dair değerlerin farklı yorumlanması gerekliliği görülmektedir. Özellikle somatik varyant analizlerinde varyantın allel fraksiyonu oldukça önemli bir kriterdir. Likit biyopsi çalışmalarında ise allel fraksiyonları daha düşük olmasına rağmen hastanın tümör yükü veya hastalığın evresi ile

ilişkilendirilmektedir. FFPE dokular ile yapılan yeni nesil dizilme sonucu tespit edilen allel fraksiyonları ise kesitin yüzdesi ve nekroz skoru ile ilişkilidir. Bu nedenle her varyantın dizi görüntüleyici üzerinde incelenmesi, yanlış varyantların değerlendirme dışı bırakılmasını sağlamak ve klinik anlamı olabilecek gerçek varyantların analize dahil edilmesi için oldukça önemlidir.

Gene	Type	c. variant	p. variant	Impact	%	Qual	F/R test	Repeat	Count	F Count	R Count	Coverage	Region	Chr	ROI	VCI	Review
ALK	SNV	c.338G>A			51.90	200	1.00	No	3,229	12	3,217	8,222	28449819	2	Yes	Yes	Valid
ALK	SNV	c.2535T>C			96.60	200	1.00	No	19,262	9,849	9,413	18,328	28455267	2	Yes	Yes	Valid
PRKCA	SNV	c.7614537C>G			48.33	200	1.00	No	8,888	3,450	5,438	18,017	179992001	3	Yes	Yes	Valid
PDGFRA	SNV	c.238G>A	p.Gly75Asp	missense	53.68	200	0.96	No	10,838	3,014	7,824	28,196	55121448	4	Yes	Yes	Valid
PDGFRA	SNV	c.1701A>G			95.27	200	1.00	No	15,731	6,625	9,106	15,847	55141855	4	Yes	Yes	Valid
KIT	SNV	c.2586G>C			48.65	200	1.00	No	13,318	5,886	7,432	27,377	55682765	4	Yes	Yes	Valid
ESR1	SNV	c.307C>G			53.30	200	1.00	No	1,581	886	715	2,966	152129777	6	Yes	Yes	Valid
ESPR	SNV	c.474C>T			50.72	200	1.00	No	4,858	1,382	3,476	8,579	55214348	7	Yes	Yes	Valid
ESPR	SNV	c.1562G>A	p.Arg521Lys	missense	43.09	200	1.00	No	2,525	1,088	1,437	5,880	55229255	7	Yes	Yes	Valid
ESPR	SNV	c.2391G>A			98.32	200	1.00	No	11,352	6,327	5,025	11,540	55249603	7	Yes	Yes	Valid
ESPR	Insertion	c.2416_2418insA	p.Arg870fs	frameshift	0.53	200	0.02	Yes	32	6	26	6,072	55249117-55249118	7	Yes	No	Valid
KRAS	SNV	c.48G>A			0.58	200	0.26	No	122	43	79	28,981	25399271	12	Yes	Yes	Valid
KRAS	SNV	c.37G>A	p.Gly13Ser	missense	0.56	98	1.00	No	91	27	64	18,390	25399262	12	Yes	Yes	Valid
KRAS	SNV	c.35G>T	p.Gly12Val	missense	1.89	200	0.17	No	275	96	179	18,282	25399284	12	Yes	Yes	Valid
BRB2	SNV	c.3508C>G	p.Pro1170Ala	missense	51.88	200	1.00	No	2,626	1,043	1,583	5,082	37584837	17	Yes	Yes	Valid

(a)

3.2 Variants available for review

Detected variants that will not be exported to the VCF and uploaded to QCI Interpret. Initially contains: Variants with more than minimum coverage and frequency above the cutoff set for the analysis workflow. Depending on workflow configuration, this table may include variants outside of regions of interest including those with coverage above significant coverage threshold. These variants are assigned the initial review state "Review".

1 variant

Default sorting

Filter table

Gene	Type	c. variant	p. variant	Impact	%	Qual	F/R test	Repeat	Count	F Count	R Count	Coverage	Region	Chr	ROI	VCI	Review	Comment	Edit
KRAS	SNV	c.175G>A	p.Ala59Thr	missense	0.64	8	0.00	No	48	34	14	7,479	25380283	12	Yes	Yes	Artifact		Edit

(b)

Şekil 4.3. Likit biyopsi çalışmasına yönelik varyant analizinde kullanılan ara yüzden alınan likit biyopsi çalışmasına yönelik analiz sayfası görüntü örneği şekilde verilmiştir. Varyanta ait değerler bir çizelge şeklinde verilmektedir. Şekil 4.3.a'da kalite kontrol ve analizler sonucunda biyoinformatik analizlere aktarılabilecek olan varyantlar, şekil 4.3.b'de ise düşük kalite veya hedef bölge dışında olarak nitelendirilen varyantlar gösterilmektedir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Özge SÖNMEZLER

GENE	TYPE	C. VARIANT	P. VARIANT	IMPACT	%	QUAL	F.R.	POLY	COUNT	FORM.	REVE.	COVER.	ALLELE	REGION	CHR	ROI	VOI	REVIEW
ALK	SNV	c.4472A>G	p.Lys1491Arg	mis-sen.	39.51	200	0.95	No	1,118	576	542	2,830	T>C	29416481	2	Yes	Yes	Valid
ALK	SNV	c.2535T>C			5.19	200	0.00	No	108	17	91	2,082	A>G	29455267	2	Yes	Yes	Valid
FGFR3, PDGFRA	SNV	c.1701A>G			99.37	200	1.00	No	4,900	579	4,321	4,931	A>G	55141055	4	Yes	Yes	Valid
FGFR3, PDGFRA	SNV	c.2472C>T			52.06	200	1.00	No	2,807	2,807	0	5,392	C>T	55152040	4	Yes	Yes	Valid
KIT	SNV	c.2362-TTG>A			37.21	200	0.60	No	2,304	861	1,443	6,192	G>A	55599159	4	Yes	Yes	Valid
ESR1	SNV	c.307>C			97.64	200	1.00	No	1,861	1,178	683	1,905	T>C	152129077	6	Yes	Yes	Valid
EGFR	SNV	c.474C>T			10.21	200	0.19	No	420	0	420	4,114	C>T	55214348	7	Yes	Yes	Valid
EGFR, EGFR-A	SNV	c.2361G>A			53.12	200	1.00	No	1,014	500	514	1,909	G>A	55249063	7	Yes	Yes	Valid
KRAS	SNV	c.53C>A	p.Ala18Asp	mis-sen.	41.40	200	0.00	No	3,630	630	3,000	8,768	G>T	25398266	12	Yes	Yes	Valid
ERBB3	SNV	c.1347T>C			66.47	200	1.00	No	3,761	1,995	1,766	5,658	T>C	56487201	12	Yes	Yes	Valid
ERBB3	SNV	c.3355A>T	p.Ser1119C	mis-sen.	64.85	200	0.93	No	987	101	886	1,522	A>T	56494958	12	Yes	Yes	Valid
ERBB2	SNV	c.1963A>G	p.Ile655Val	mis-sen.	55.47	200	1.00	No	1,358	951	407	2,448	A>G	37879588	17	Yes	Yes	Valid
ERBB2	SNV	c.3508C>G	p.Pro1170Ala	mis-sen.	97.69	200	1.00	No	3,632	0	3,632	3,718	C>G	37884037	17	Yes	Yes	Valid

(a)

GENE	TYPE	C. VARIANT	P. VARIANT	IMPACT	%	QUAL	F.R.	POLY	COUNT	FORM.	REVE.	COVER.	ALLELE	REGION	CHR	ROI	VOI	REVIEW
PIK3CA	SNV	c.1145-54A>C			47.06	200	1.00	No	596	0	596	1,304	A>C	17892...	3	No	No	
ESR1	SNV	c.3795G>C			57.51	200	1.00	No	762	0	762	1,125	G>C	1622...	6	No	No	
KRAS	Del.	c.291-10delT			5.03	200	1.00	Yes	178	0	178	3,536	A>-	253378...	12	No	No	
EGFR	SNV	c.1428A>G	p.Thr474Ala	mis-sense	5.50	200	0.00	No	109	6	103	1,983	A>G	55227...	7	No	No	
ERBB3	SNV	c.3348G>A			30.20	200	0.94	No	494	92	402	1,636	G>A	56494...	12	No	No	Valid
FGFR3, PDGFRA	Ins.	c.2440-50_2440-49insA			37.19	200	0.15	No	472	95	377	1,269	->A	55151...	4	No	No	
KIT	SNV	c.1647+22C>T			10.38	200	0.00	No	133	133	0	1,281	C>T	55593...	4	No	No	
EGFR, EGFR-A	SNV	c.2294G>T>C			5.52	200	1.00	No	125	135	0	2,447	T>C	55249...	7	No	No	
ALK	SNV	c.4454G>A			19.44	200	0.00	No	572	569	3	2,342	C>T	29415...	2	No	No	
EGFR	SNV	c.1438A>T>A>T			57.73	200	1.00	No	2,126	513	1,613	2,150	A>T	55225...	7	No	No	
PIK3CA	SNV	c.1661T>G>A			43.70	200	0.90	No	1,141	1,000	141	2,541	C>A	17892...	3	No	No	
FGFR3, PDGFRA	SNV	c.3222T>C			59.49	200	1.00	No	3,158	1,157	2,001	3,318	T>C	55151...	4	No	No	
EGFR	SNV	c.2703T>C			59.45	200	0.80	No	6,158	5,397	761	6,152	T>C	55255...	7	No	No	

(b)

Şekil 4.4.FFPE doku çalışmasına yönelik varyant analizi ara yüzü sayfası görüntü örneği şekilde verilmiştir. Şekil 4.4.a'da kalite kontrol ve analizler sonucunda biyoinformatik analizlere aktarılabilecek olan varyantlar, şekil 4.3.b'de ise düşük kalite veya hedef bölge dışında olarak nitelendirilen varyantlar gösterilmektedir. Şekil 4.4.b'de seçili varyant değerlendirmeler sonucu biyoinformatik analizlere aktarılabilmek üzere 'confirmed as valid' olarak kullanıcı tarafından işaretlenmektedir.



Şekil 4.5. Varyant analizinde kullanılan ara yüze ait dizi görüntüleyicisi (Track Viewer). Yeşil okumalar “forward”, kırmızı olanlar ise “reverse” okumaları göstermektedir.

4.10. Biyoinformatik analizler gerçekleştirildi

Doğru varyant seçimi sonrası tespit edilen varyantların biyoinformatik analizleri yapılmıştır. Bu analizler ise başta materyal türü ve hastanın klinik tanısı olmak üzere; patolojik tanı, hastanın aldığı ve/veya almakta olduğu tedaviler, hastadan daha önce çalışılmış moleküler genetik test sonuçları, alınan biyopsilere yönelik patoloji raporları incelenerek yapılmaktadır. Yanlış bir biyoinformatik analiz tüm çalışmanın etkinliğini azaltabileceğinden olabileceğinden, bu analizler rutin laboratuvar uygulamalarının en önemli bölümünü oluştururlar.

Biyoinformatik analizleri yapılmak üzere seçilen her varyant, hastaya özgü bir klinik etkiye neden olabilir. Bu nedenle biyoinformatik analizlerin doğru yapılmaması, kaynak ve iş gücünün boşa harcanmasının yanı sıra hastaların sağaltımında yapılacak yönlendirmelerin de yanlış olmasına yol açabilir. Bu nedenle biyoinformatik analizler, bir tecrübe ve bilgi birikimine ihtiyaç duyarken çalışılan sistem, yöntem ve özellikle kullanılan materyal türünü iyi tanımayı gerektirir. Biyoinformatik analizlere yardımcı olabilecek pek çok analiz aracı mevcuttur. Bu çalışmada, internet tabanlı “QCI Interpret” biyoinformatik analiz aracı kullanılmıştır. Aynı hastaya ait likit biyopsi ve FFPE doku çalışmalarına yönelik analiz aracı görüntüsü Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.’de verilmiştir.



Şekil 4.6. Biyoinformatik analizlerinde kullanılan QCI Interpret analiz aracının ara yüzü görülmektedir. Örnek olarak kullanılan görsel, likit biyopsi çalışmasına aittir. Bu pencerede, varyant bilgileri, sınıflandırmaları, allel frekansları başta olmak üzere varyant ve klinik etkisine dair pek çok bilgiye ulaşılabilir.



Şekil 4.7. FFPE doku çalışmasına ait QCI Interpret analiz aracının ara yüzü. Bu pencerede varyant bilgileri, sınıflandırmaları, allel ve somatik frekanslar gibi bilgilere ulaşılabilir.

Likit biyopsi materyali çalışmaları ile FFPE doku çalışmaları analizleri farklılık göstermektedir. Her ne kadar varyantların, materyal türü doğrultusunda klinik etkileri değişmese de elde edilen bilgiler farklı şekilde yorumlanmalıdır.

Likit biyopsi ile yalnızca tek bir lokalize tümöre değil, mevcut tüm tümörlerden periferik kan dolaşımına karışan kanser hücrelerine ait serbest DNA'lara dair veriler toplanabilmektedir. Bu nedenle elde edilen verilerin sonucu daha kapsamlı olmaktadır. Doğru ve detaylı analizler sonucunda hastaya uygun olası tedavi alternatifleri önerilebilir, kanserli hücrelerin direnç göstermesi beklenen tedaviler seçenekleri ortaya konabilir, primer tümör dokusu ve metastatik lezyonlara ait bilgi elde edilebilir. Bu sayede de hastalığın seyri hakkında klinik öneme sahip verilere ulaşılmış olur.

Varyantların yorumlanmasında patojenite sınıflandırmaları oldukça önemlidir. Bu sınıflandırmada, yalnızca analiz aracı tarafından atanan patojenite skoru doğrultusunda yorumlama yapılmamalıdır. Patojenik olarak sınıflandırılan bir varyant, hastanın klinik tanısı ve endikasyonu bakımından farklı bir grupta değerlendirmeyi gerektirebileceği gibi aynı varyant iki farklı hastada iki farklı klinik etkiyi yaratıyor da olabilir. Aynı şekilde, benign olarak sınıflandırılan bir varyantın kanserin türü veya hastanın kliniği ile ilişkilendirilebileceği de unutulmamalıdır. Varyant patojenitelerinin belirlenmesinde diğer bir önemli bir faktör de popülasyon frekansıdır. Bir popülasyonda hastalık yapıcı olarak nitelendirilen bir varyant farklı bir popülasyonda benign olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca hastalığın fenotipi, evresi, hastanın klinik öyküsü vb. parametreler de göz önünde bulundurulmalıdır. Analiz araçlarının kullanıcıya sağladığı faydalar yadsınamaz olsa da tüm verilerin kullanıcı tarafından incelenmesi ve dikkatle yorumlanması hayati önem taşımaktadır.

Doğru bir analiz için ise, varyantların tek başlarına değerlendirmesi de yeterli değildir. Bazı hastalıkların temelinde aynı gendeki birden fazla varyantın olması ya da farklı genlerdeki varyantların birlikteliği etkili olabilir. Hastanın klinik bulguları doğrultusunda, varyant ve klinik ilişkisi araştırılmalı, kümülatif etkiye yol açabilecek durumlar araştırılmalıdır.

Analiz bir bütün olarak değerlendirilmeli, sınıflandırmada patojenik veya benign olarak net bir şekilde yorumlanamayan varyantların yorumlanmasında

uluslararası kuruluşlara ait güvenilirliği onaylanmış veri bankaları ve literatür araştırılmalıdır. Bu varyantlar “Klinik önemi bilinmeyen (VUS, Variant of Uncertain Significance)” olarak adlandırılır ve patojenite tayininde in-siliko analiz araçlarından faydalanmak gereklidir. Bu araçlar, çeşitli algoritmalar yardımı ile tespit edilen genetik değişimin amino asit ve protein üzerine etkisini, genin fonksiyonunda sebep olabileceği olası değişimleri çözümlmeye yardımcı olan tahmin araçlarıdır. Bu sayede varyantın patojenitesinin öngörülmesine yönelik önemli bilgiler elde edilir. Ancak bu bilgilerin doğrudan sonuca yönelik olmadığı, tahmine dayalı olduğu ve analizi yapan kişi tarafından klinik olarak yorumlanması gerektiği unutulmamalıdır. Likit biyopsi çalışmasında elde edilen varyantlar tek bir lokalize tümöre ait olmayabilir. Bu nedenle elde edilmiş olan serbest DNA’ların primer tümör kadar farklı metastazlara da ait olabileceği unutulmamalıdır. Farklı dokularda lokalize olmuş her tümör, primer kanser dokusundan farklı mutasyonlar barındırabilir. Her farklı klon farklı bir metastatik tümöre işaret edebileceği gibi her metastatik tümör de kendi içerisinde birden çok klon barındırabilir. Bu nedenle likit biyopsi çalışmalarında tespit edilen varyantlar bu heterojenite göz önünde bulundurularak klonal olarak değerlendirilir. FFPE doku çalışmalarında ise doğrudan lokalize olmuş tümör materyali ile çalışıldığından tespit edilen varyantlar tespit edildikleri yüzde değeri ile raporlanır.

Sonuç olarak biyoinformatik analiz, tecrübeli bir çalışana bağımlı olan çok yönlü bir süreçtir. Bu nedenle çalışma geneline ait tüm veriler dikkatlice ve her yönüyle incelenmelidir. Aksi halde elde edilen bilgiler yanlış değerlendirilerek hatalı raporlamaya sebep olabilir. Bu hasta ve ilgili branş hekimleri için yanıltıcı olup hasta ve hastalığın sağaltımının doğru bir şekilde yapılamamasına sebep olabilir.

Bu tez çalışmasında biyoinformatik analizlerde pek çok farklı veri bankası (COSMIC, HGMD, ClinVar vb.) ve in-siliko analiz aracı (MutationTaster, PolyPhen, SIFT vb.) kullanılmış ve tespit edilen klinik anlamı olan varyantlar, daha önce de belirtilmiş olan tüm parametreler göz önünde bulundurularak

incelenmiştir. Çalışmasına kullanılan yeni nesil dizileme yöntemi halen güncel ve yeni bir metot olup literatürde bu sistemin kullanıldığı bir likit biyopsi çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışma ile bir ilk olarak likit biyopsi ve FFPE doku çalışmalarının kıyaslanarak likit biyopsi materyalinin klinik laboratuvar uygulamalarındaki etkinliği gösterilmiştir. Ayrıca, likit biyopsinin yeni nesil dizileme yöntemi ile klinik çalışmalara entegre edilmesinde dikkat edilmesi gereken yöntemsel ve materyale ilişkin hususlar vurgulanarak klinik laboratuvarlar için bir kılavuz oluşturulmaya çalışılmıştır.





5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser tanı ve tedavisinde yeni nesil dizileme yöntemi, gün geçtikçe daha etkili ve sık kullanılan bir metot haline gelmiştir. Bu teknolojinin sağladığı olanaklar sayesinde hastalıkları tanı ve tedavisi ile ilgili bilgilere kısa bir sürede erişmek mümkün olmuştur. Moleküler genetik tanıdaki önemini kanıtlamış olan bu yeni yöntem, kansere yönelik olarak likit biyopsi ile bir bütün olarak kullanıldığında hastalara büyük faydalar sağlamaktadır. Likit biyopsi sayesinde hastalık seyrinin ve hastanın takibi kolaylaşmış, bunun yanında likit biyopsi materyali ile sıklıkla uygulanmakta olan diğer yöntemler ve biyolojik materyallerin kullanımından kaynaklanan dezavantajlar giderilmiştir. Bu çalışmada, likit biyopsi ile genetik biliminde önemli bir yer edinen yeni nesil dizileme yöntemi birleştirilerek bu süreçte edinilen bilgi ve tecrübeler aktarılmıştır.

Likit biyopsinin YND yöntemi ile klinik laboratuvar uygulamalarına entegrasyonunu konu alan bu tez kapsamında, yöntemsel tüm iş akışı incelenerek likit biyopsi materyali kullanılmasının her aşama üzerindeki etkileri saptanmış ve bu etkilerin kanser hastalarına yönelik rutin uygulamalardaki avantajları ortaya konmuştur.

5.1. Likit biyopsinin elde edilme kolaylığı ile toplam çalışma süresi üzerindeki avantajları belirlendi

Öncelikle materyal eldesi sürecinde likit biyopsinin, FFPE dokulara göre avantajları üzerinde durulmuştur. Doku örnekleri girişimsel işlem gerektirirken likit biyopsiler hastalığın ilk tanısı anında periferik kandan elde edilebilmiştir. Böylelikle daha test başlamadan oluşabilecek zaman kayıplarının önüne geçilmiştir. Örnek eldesinin kolaylığı ile testin tekrarlanabilirliği sayesinde daha güvenilir bir hasta takibi mümkün olabilmektedir. Ayrıca FFPE doku örneklerinden yapılan çalışmaların en büyük dezavantajlarından doku heterojenitesi ve dokunun yalnızca lokalize olmuş tümöre ait oluşu sorunu giderilmiştir. Materyal eldesindeki

kolaylıklara ek olarak likit biyopsilerden yapılan DNA izolasyonları da dokuya göre daha hızlı olması bakımından avantaj sağlamaktadır. Bu sayede toplam iş akışı süre olarak kısaltılabilmiş, hastanın doğru ve etkin tedaviye bir an önce ulaşabilmesi sağlanmıştır.

5.2. İki farklı biyolojik örnek toplama tüpünden elde edilen ccfDNA konsantrasyonları arasındaki fark anlamlı olarak tespit edilmiş olup yüksek ccfDNA konsantrasyonuna sebep olan etkenler belirlendi

DNA izolasyonu aşamasında, sürenin yanı sıra elde edilen DNA konsantrasyonları da karşılaştırılmış olup 2 farklı biyolojik örnek toplama tüpünden yapılan ccfDNA izolasyonları sonunda konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir. B marka tüpün izolasyon sonunda daha etkili olduğu belirlenmiş olmasına rağmen hedef zenginleştirme amacı ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonları sonucu elde edilen ampliconların konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bir sonraki aşama olan kütüphane oluşturulmasında ise tüpler arası ortaya çıkan ccfDNA konsantrasyonu farkının çalışma sonucu üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür. ccfDNA konsantrasyonun yüksekliği, iki ana nedenle oluşmaktadır. Birincisi izolasyon aşaması sırasındaki lökosit kaynaklı genomik DNA ile kontaminasyonu olup, ikincisi ise hastanın periferik tümör yüküdür. Bu nedenle varyantların biyoinformatik analizleri yapılırken, hastanın tüm klinik bulguları ile birlikte ccfDNA konsantrasyon sonuçları da göz önünde bulundurulmuştur.

5.3. Likit biyopsi ve FFPE dokulardan elde edilen DNA konsantrasyonları arasındaki anlamlı farkın çalışmanın diğer aşamaları üzerinde etki etmediği tespit edilerek farklı materyal türlerindeki değişken konsantrasyonları sebepleri belirlendi

Farklı biyolojik örnek toplama tüplerinin kıyaslanması yanı sıra likit biyopsi materyalleri ile FFPE dokulardan elde edilen DNA konsantrasyonları da

karşılaştırıldığında doku örneklerinden daha yüksek konsantrasyonda DNA elde edildiği görülmüştür. Ancak bu fark, hedef zenginleştirme ve kütüphane oluşturulması aşamalarından elde edilen DNA konsantrasyonlarını etkilememiş olup çalışma kalitesinde olumsuz bir etki yaratmamıştır. Hedef zenginleştirme yapıldığında, izolasyon sonrası daha yüksek konsantrasyonda olan FFPE doku örnekleri ile likit biyopsi arasında fark gözlenmemiştir. FFPE dokuların maruz bırakıldıkları ön işlemlerden dolayı bu materyallerden elde edilen DNA kalitesinin daha düşük, ccfDNA'ların ise herhangi bir ön işlem görmediğinden elde edilen genetik materyalin daha yüksek kalitede olabileceği düşünülmüştür. ccfDNA konsantrasyonundaki göreceli düşüklük ise genetik materyal eldesinin hassaslığı ve hastanın periferik tümör yükü ile ilişkilendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonunda çalışma kalitesini düşürmeyen minimum ccfDNA konsantrasyonu belirlenmiştir. Literatürde serbest tümör DNA'sının kullanıldığı çalışma sayısının az olmakla birlikte yeni nesil dizileme yönteminde minimum bir konsantrasyon değeri belirtilmemiş olup bu veriler ile literatüre katkı sağlanmıştır.

5.4. İki farklı biyolojik örnek toplama tüpü ile yapılan çalışmaların sonucunda son ürün miktarları eşdeğer olarak gözlemlendi

Yeni nesil dizileme sonucunda her iki tüpten yapılan çalışmalarda da elde edilen son ürünler eşdeğer miktarlarda olup çalışma sonunda elde edilen okuma sayıları arasında çalışma sonucunu etkileyebilecek bir fark gözlenmemiştir. Sonuç olarak her iki biyolojik örnek toplama tüpü de bu çalışma için yeterli bulunmuştur.

5.5. FFPE doku materyali eldesi sağlanamayan veya bu materyallerden yeterli DNA miktarı elde edilemeyen hastalar üzerinden likit biyopsi materyalinin önemi vurgulandı

FFPE doku örneklerinden yeterli miktarda gDNA elde edilemeyen 3 (üç) hastadan yalnızca likit biyopsi çalışmaları yapılmış olup bu materyal ile hızlı ve güvenilir sonuçlara ulaşılmıştır. Bu örneklerde olduğu gibi cerrahi işlem

uygulanamayan, uzak doku metastazı ya da invazyonu olan veya doku biyopsisi materyalinden elde edilen DNA miktarı yetersiz olan pek çok hastada likit biyopsi çalışmaları önerilmektedir. Böylece likit biyopsi çalışmalarının yalnızca FFPE doku çalışmalarına alternatif olarak değil rutin klinik uygulamaları ve laboratuvar çalışmalarında da ilk tercih olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur. Materyal eldesi zor olan vakaların yanı sıra, hasta takibi gereken vakalarda da likit biyopsi materyali çalışmaları daha avantajlı olabilmektedir.

5.6. Her iki materyal türü ile yapılan yeni nesil dizileme sonunda çalışma kaliteleri standart değerlerin üzerinde tespit edildi

Sekans aşaması sonucunda çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi, çalışmanın kalite kontrollerinin yapılması ile başlamıştır. Bu doğrultuda kalite kontroller hem örnek bazında hem de çalışma içi ve çalışmalar arası olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Likit biyopsi çalışmalarının kalite skorlarının beklenen değer aralığı içinde tespit edildiği görülmüştür. FFPE doku çalışmalarında da genel kalite kontrollerinin çalışma standartlarında olduğu ancak örnek bazında yapılan kalite kontrollerin değişkenlik gösterdiği gösterilmiştir. Böylelikle işlem görmüş FFPE dokuların kullanımının yalnızca elde edilen DNA miktarı üzerine değil aynı zamanda da DNA kalitesine ve çalışmanın tüm aşamalarına etki edebileceği gösterilmiştir.

Likit biyopsi çalışmalarında elde edilen son ürün miktarları daha yüksek hassasiyetli analizler için önem arz etmektedir. Tespit edilen varyantların analiz edilebilmesi için forward ve reverse okumalarının yeterli, toplam okuma sayılarının da yüksek miktarlarda olması gerektiğinden, sekans sonunda elde edilen toplam ürün ve filtreden geçen okuma miktarlarının mümkün olduğunca artırılması gerekliliği belirtilmiştir.

5.7. Varyant analizleri ile “gerçek varyant”lar okuma kirliliklerinden ayırt edilerek çalışma sonuçlarının güvenilirliği artırıldı

Çalışmanın kalite skorları varyant analiz ara yüzü aracılı değerlendirilmesi neticesinde kriterleri sağlamayan varyantlar, analiz dışı bırakılmaktadır. Ancak bu analiz araçlarının yalnızca yardımcı programlar olarak geliştirildiği göz önünde bulundurulmalıdır. Özellikle kalite skoru açısından analiz ara yüzü eşik değerlerinin altında kalan örneklerde çalışma ve varyant kalite kontrollerinin kullanıcı tarafından da bizzat dikkatlice yapılması gereklidir. Bu sayede ara yüz tarafından düşük kalitede olarak gruplandırılan ancak klinik öneme sahip bazı varyantların biyoinformatik analizlere aktarılabilmesi unutulmamalıdır. Buna karşın okuma likit biyopsi çalışmalarında kirlilikleriyle sıklıkla karşılaşabilmekte ve bu kirlilikler gerçek varyant olarak analize alınabilmektedir. Bu nedenle çalışma kalite kontrollerinin hem örnek bazlı hem de çalışmanın bütünü göz önüne alınarak değerlendirilmesinin önemi vurgulanmıştır. Buradan çıkarılacak sonuç, kalite kontrol aşamalarının uygulanmasından yöntemsel bir bilgi birikimi ve tecrübeye sahip bir kullanıcı ihtiyacıdır.

5.8. Varyant analizlerinde likit biyopsi ve FFPE dokularında dikkat edilmesi gereken noktalar belirlenerek likit biyopsi çalışmalarında varyant analizleri için daha etkin yol belirlendi

Likit biyopsilerde allel fraksiyonları FFPE doku çalışmalarından farklılık gösterdiğinden farklı uygulamaya tabi tutulmaları gerekmektedir. Varyant seçimleri yapılırken analiz bir likit biyopsi örneği üzerinden gidiliyorsa çok düşük allel fraksiyonları dahi yakalanabildiğinden klonal ayrımlar da yapılabilmektedir. Klonalitenin yorumlanması sayesinde kanser hastalarında tedavi seçenekleri öncelik sıralamasına sokulabilmekte ve kanser progresyonu üzerindeki etkileri ortaya konabilmektedir. Likit biyopsi çalışması ile farklı klonlara yönelik bilgilerin aynı anda tespit edilebileceği gösterilmiş, bu sayede de heterojenite sorununun

önüne geçilerek hastaya olası bütün tedavi alternatiflerinin geniş bir çerçevede sunulması sağlanmıştır.

5.9. Başlangıç materyallerinin biyoinformatik analizler üzerindeki etkileri belirlenerek likit biyopsinin avantajları tespit edildi

Likit biyopsi çalışmasında hastalığın evresi, hastanın tedavi alıp almadığı; FFPE doku çalışmalarında ise patolojik dokunun tümör yüzdesi ve nekroz skoru, biyopsinin nereden alındığı, hangi ön işlemlerden geçtiği ve hastanın patolojik tanısı çalışma sonucunu etkileyen faktörlerdir. FFPE doku çalışmalarında çalışma sonucunu etkileyebilecek daha çok parametre olması da likit biyopsi çalışmalarının tercih edilmesi için başka bir neden oluşturmaktadır.

Varyant seçimi sonrası yapılan biyoinformatik analizler raporlamanın doğruluğu açısından en az bu varyantların seçimi kadar önemlidir. Yanlış bir yorumlama, ardından hatalı raporlamayı getireceğinden kanser hastalarına faydadan çok zarara yol açabilecek ve hastaları yanlış tedavi seçeneklerine yönlendirebilecektir. Bu çalışmada tüm verilerin, yöntemi ve materyali iyi bilen tecrübeli kullanıcılar tarafından değerlendirilmesi ve biyoinformatik analizlerde pek çok veri tabanı ile farklı farklı in-siliko araçlarından faydalanılması gerekliliği vurgulanmıştır. Ayrıca hiçbir biyoinformatik analiz yazılımının doğrudan sonuca yönelik olmadığı, yalnızca tüm verilerin analizini gerçekleştirecek ekibe destek olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Böylelikle, etkili ve güvenilir analizlerin yapılması için bir kılavuz kaynak oluşturulmaya çalışılmıştır.

5.10. Doğru biyoinformatik analizler ile etkin klinik raporlama gerçekleştirildi

Son basamak olarak, biyoinformatik analizler sonrası doğru bir klinik raporlama yapılması gerekmektedir. Klinik uygulamalarda kılavuz niteliğinde birçok veri tabanı bulunmaktadır. Varyantların sınıflandırılması ve yorumlanması için hem bu veri tabanları hem de in-siliko analiz araçları kullanılmıştır. Raporlama

aşamasında da bu bilgiler hastanın klinik bulguları ile harmanlanmıştır. Tüm raporlamalar uluslararası kriterlere ve standartlara uygun olarak yapılmış olup, klinik anlamı olan varyantlar en güncel uluslararası nomenklatür doğrultusunda adlandırılmış ve böylelikle raporlara evrensel nitelik kazandırılmıştır.

Bu tez çalışması, her geçen gün artan değer ve kullanım alanlarına sahip yeni nesil dizileme yöntemi ile likit biyopsi materyalinin kanser alanında rutin klinik çalışmalara entegrasyonunu sağlamaya yöneliktir. Gerek ülkemizde gerekse dünya genelinde likit biyopsi çalışmalarına yönelim olması, bu tez çalışmasının da alanında bir ilk olacak kılavuz niteliği görmesini sağlayacaktır. Literatüre katkı olarak ise farklı kanser türleri için likit biyopsi ve yeni nesil dizilemenin birlikte kullanılmasının yolunu açıp diğer araştırmacılara örnek oluşturması hedeflenmiştir.



KAYNAKLAR

- Ahronian, L. G., ve ark.; 2015. Clinical Acquired Resistance to RAF Inhibitor Combinations in BRAF-Mutant Colorectal Cancer through MAPK Pathway Alterations. *Cancer Discov*, 4, 5, 358-367.
- Antonescu, C. R.; 2011. The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. *J Pathol*, 2, 223, 251-261.
- Basolo, F., ve ark.; 2010. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases. *J Clin Endocrinol Metab*, 9, 95, 4197-4205.
- Bejar, R.; 2014. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 6, 99, 956-964.
- Bennett, C. W., ve ark.; 2016. Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer. *Oncotarget*, 43, 7, 71013-71035.
- Boga, İ.; 2017. Tümör spesifik mutasyonların tespitinde yeni nesil dizileme yönteminin validasyonu ve genetik varyantların biyoinformatik analizi.172 *Biyoteknoloji Enstitüsü,Çukurova Üniversitesi,Yüksek Lisans Tezi, (yayımlanmamış)*
- Boissel, N., ve ark.; 2006. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia*, 6, 20, 965-970.
- Brose, M. S., ve ark.; 2002. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*, 23, 62, 6997-7000.
- Burstein, H. J.; 2005. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med*, 16, 353, 1652-1654.

- Cammenga, J., ve ark.; 2005. Extracellular KIT receptor mutants, commonly found in core binding factor AML, are constitutively active and respond to imatinib mesylate. *Blood*, 12, 106, 3958-3961.
- Care, R. S., ve ark.; 2003. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol*, 5, 121, 775-777.
- Chen, Y., ve ark.; 2008. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*, 7215, 455, 971-974.
- Chu, D. and B. H. Park; 2017. Liquid biopsy: unlocking the potentials of cell-free DNA. *Virchows Arch*,
- Ciampi, R., ve ark.; 2005. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest*, 1, 115, 94-101.
- Cizkova, M., ve ark.; 2012. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res*, 1, 14, R28.
- Corless, C. L., ve ark.; 2005. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol*, 23, 23, 5357-5364.
- COSMIC. "Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer." from <http://cancer.sanger.ac.uk>.
- Cox, A. D., ve ark.; 2014. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*, 11, 13, 828-851.
- Crowley, E., ve ark.; 2013. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*, 8, 10, 472-484.
- D'Antonio, M., ve ark.; 2013. WEP: a high-performance analysis pipeline for whole-exome data. *BMC Bioinformatics*, 14 Suppl 7, S11.
- Davies, H., ve ark.; 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 6892, 417, 949-954.

- De Roock, W., ve ark.; 2011. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*, 6, 12, 594-603.
- Do, H. and A. Dobrovic; 2015. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem*, 1, 61, 64-71.
- Eccles, S. A. and D. R. Welch; 2007. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*, 9574, 369, 1742-1757.
- Elmore, S.; 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 4, 35, 495-516.
- Falk, A. T., ve ark.; 2017. NGS analysis on tumor tissue and cfDNA for genotype-directed therapy in metastatic NSCLC patients. Between hope and hype? *Expert Rev Anticancer Ther*, 8, 17, 681-685.
- Gainor, J. F., ve ark.; 2013. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 15, 19, 4273-4281.
- George, R. E., ve ark.; 2008. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*, 7215, 455, 975-978.
- Gingras, I., ve ark.; 2015. Liquid biopsy: will it be the 'magic tool' for monitoring response of solid tumors to anticancer therapies? *Curr Opin Oncol*, 6, 27, 560-567.
- Grandis, J. R. and J. C. Sok; 2004. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther*, 1, 102, 37-46.
- Gravalos, C. and A. Jimeno; 2008. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol*, 9, 19, 1523-1529.
- Heinrich, M. C., ve ark.; 2003. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*, 23, 21, 4342-4349.

- Heinrich, M. C., ve ark.; 2003. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 5607, 299, 708-710.
- Heitzer, E., ve ark.; 2015. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*, 1, 61, 112-123.
- Hirsch, F. R., ve ark.; 2005. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, 28, 23, 6838-6845.
- Jeselsehn, R., ve ark.; 2015. ESR1 mutations-a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 10, 12, 573-583.
- Kamps, R., ve ark.; 2017. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci*, 2, 18,
- Kandoth, C., ve ark.; 2013. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 7447, 497, 67-73.
- Katayama, R., ve ark.; 2012. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med*, 120, 4, 120ra117.
- Koivunen, J. P., ve ark.; 2008. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 14, 4275-4283.
- Kompier, L. C., ve ark.; 2010. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One*, 11, 5, e13821.
- Kris, M. G., ve ark.; 2003. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *Jama*, 16, 290, 2149-2158.
- Kwak, E. L., ve ark.; 2010. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 18, 363, 1693-1703.

- Lin, E., ve ark.; 2009. Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Res*, 9, 7, 1466-1476.
- Lipson, D., ve ark.; 2012. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*, 3, 18, 382-384.
- Malapelle, U., ve ark.; 2016. Next generation sequencing techniques in liquid biopsy: focus on non-small cell lung cancer patients. *Transl Lung Cancer Res*, 5, 5, 505-510.
- Mandel, P. and P. Metais; 1948. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*, 3-4, 142, 241-243.
- Mascaux, C., ve ark.; 2005. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*, 1, 92, 131-139.
- Miller, V. A., ve ark.; 2004. Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 6, 22, 1103-1109.
- Mori, T., ve ark.; 2005. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J Clin Oncol*, 36, 23, 9351-9358.
- Nawroz, H., ve ark.; 1996. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med*, 9, 2, 1035-1037.
- Pantel, K., ve ark.; 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 5, 8, 329-340.
- Pao, W., ve ark.; 2004. 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*, 36, 101, 13306-13311.
- Parsons, D. W., ve ark.; 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 5897, 321, 1807-1812.

- Planchard, D., ve ark.; 2015. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann Oncol*, 10, 26, 2073-2078.
- Pylayeva-Gupta, Y., ve ark.; 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*, 11, 11, 761-774.
- Qiagen; 2015. Available from: www.qiagen.com.
- Qin, Z., ve ark.; 2016. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer*, 35,
- Reinecke, F., ve ark.; 2015. Quantitative analysis of differences in copy numbers using read depth obtained from PCR-enriched samples and controls. *BMC Bioinformatics*, 16, 17.
- Richards, S., ve ark.; 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 5, 17, 405-424.
- Ridge, C. A., ve ark.; 2013. Epidemiology of Lung Cancer. *Semin Intervent Radiol*, 2, 30, 93-98.
- Riely, G. J., ve ark.; 2008. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 18, 14, 5731-5734.
- Schwarzenbach, H., ve ark.; 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 6, 11, 426-437.
- Shigematsu, H., ve ark.; 2005. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*, 5, 97, 339-346.
- Shinmura, K., ve ark.; 2008. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer*, 2, 61, 163-169.

- Shinojima, N., ve ark.; 2003. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, 20, 63, 6962-6970.
- Souilmi, Y., ve ark.; 2015. Scalable and cost-effective NGS genotyping in the cloud. *BMC Med Genomics*, 8, 64.
- Stroun, M., ve ark.; 1989. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 5, 46, 318-322.
- Szpechcinski, A., ve ark.; 2015. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer*, 3, 113, 476-483.
- Van Cutsem, E., ve ark.; 2014. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 25 Suppl 3, iii1-9.
- Vasioukhin, V., ve ark.; 1994. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*, 4, 86, 774-779.
- Vaughn, C. P., ve ark.; 2011. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 5, 50, 307-312.
- Vendrell, J. A., ve ark.; 2017. Circulating Cell Free Tumor DNA Detection as a Routine Tool for Lung Cancer Patient Management. *Int J Mol Sci*, 2, 18,
- Yoon, H. H., ve ark.; 2012. Association of HER2/ErbB2 expression and gene amplification with pathologic features and prognosis in esophageal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 2, 18, 546-554.
- Yu, H. A., ve ark.; 2013. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*, 8, 19, 2240-2247.
- Zhivotosky, B. and S. Orrenius; 2001. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 18, Unit 18.13.



ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Adana’da doğdu. İlk ve ortaöğretimini Adana’da tamamladıktan sonra 2011-2015 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde lisans eğitimini aldı. Erasmus programı aracılığı ile 2013-2014 güz döneminde 6 ay süreyle Ulm Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde eğitim gördü. 2015-2017 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Adana Genetik Hastalıklar Tanı ve Tedavi Merkezi’nde moleküler biyolog olarak görev yaptı. 2016 yılında, Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalında Dr. Öğr. Üyesi Atıl Bişgin danışmanlığında yüksek lisans eğitimime başladı. 2017 yılı Nisan ayı itibari ile Çukurova Üniversitesi Adana Genetik Hastalıklar Tanı ve Tedavi Merkezi’nde öğretim görevlisi olarak görev yapmakta.

Uluslararası bilimsel toplantı/kongrelerde yer alan bildirileri;

- Atıl Bişgin, Özge Sönmezler, İbrahim Boga. Validation and implementation of next-generation sequencing in liquid biopsies by a novel NGS platform: Focus on non-small cell lung cancer. 14–18 Nisan 2018, Amerikan Kanser Araştırma Derneği Kongresi [American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting], Şikago, ABD (Poster Bildirisi)
- Atıl Bişgin, Özge Sönmezler, İbrahim Boga. The evaluation of a new NGS system (GeneReader NGS systems) in clinical use of cancer diagnostics: The first report. 27–30 Mayıs 2017, 50. Avrupa İnsan Genetiği Derneği Kongresi [European Society of Human Genetics (ESHG) 50th Annual Meeting], Kopenhag, Danimarka (Poster Bildirisi)
- Atıl Bişgin, İbrahim Boga, Orçun Yalav, Özge Sönmezler. BRCA Mutation Characteristics in a Series of Index Cases of Breast Cancer Independently of Family History. 27–30 Mayıs 2017, 50. Avrupa İnsan

Genetiği Derneği Kongresi [European Society of Human Genetics (ESHG) 50th Annual Meeting], Kopenhag, Danimarka (Poster Bildirisi)

- Aslı Semerci, Özge Sönmezler. β -Amyloid plaque in Human Immunodeficiency Virus. 8-14 Eylül 2014, 1. İnsan Beyin Projesi Okulu (Poster Bildirisi)

Ulusal bilimsel toplantı/kongrelerde yer alan bildirileri;

- Özge Sönmezler, Atıl Bişgin, İbrahim Boga, Sevcan Tuğ Bozdoğan. The significance of liquid biopsy for monitoring and therapy decision of lung adenocarcinoma: a case based review. 7-10 Mart 2018, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2018, Erciyes (Sözlü Bildiri)
- Sevcan Tuğ Bozdoğan, İbrahim Boga, Özge Sönmezler, Atıl Bişgin. Comparison of the cost and laboratory effectivity between next generation sequencing and pyrosequencing in FMF patients. 7-10 Mart 2018, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2018, Erciyes (Sözlü Bildiri)
- Atıl Bişgin, Cem Müjde, İbrahim Boga, Özge Sönmezler, Sevcan Tuğ Bozdoğan. Utilization of comprehensive cancer testing in malign melanoma: Experiences of a genetic diseases diagnosis center. 7-10 Mart 2018, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2018, Erciyes (Sözlü Bildiri)
- Atıl Bişgin, Sinem Özer, Sevcan Tuğ Bozdoğan, İbrahim Boga, Özge Sönmezler. Risk management and genetic counselling in hereditary cancer syndrome diseases: experiences of a high risk clinic. 7-10 Mart 2018, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2018, Erciyes (Sözlü Bildiri)
- İbrahim Boga, Atıl Bişgin, Sevcan Tuğ Bozdoğan, Özge Sönmezler. Newborn screening for Cystic Fibrosis in Turkey: The view from the genetic diseases diagnosis center. 7-10 Mart 2018, Erciyes Tıp Genetik Günleri 2018, Erciyes (Poster Bildirisi)

- İbrahim Boga, Özge Sönmezler, Atıl Bişgin. Tümör Spesifik Mutasyonların Tespitinde Yeni Nesil Dizileme Yönteminin Validasyonu Ve Genetik Varyantların Biyoinformatik Analizi. 5-7 Ekim 2017, VI. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Adana (Sözlü Bildiri)
- İbrahim Boga, Özge Sönmezler, Sevcin Tuğ Bozdoğan, Atıl Bişgin. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi İle Çalışılan Çoklu-Gen Panellerinin Moleküler Tanıdaki Önemi: Ailesel Meme-Over Kanseri. 5-7 Ekim 2017, VI. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi Adana (Sözlü Bildiri)
- Atıl Bişgin, İbrahim Boga, Özge Sönmezler. Next-generation sequencing multi-gene panel for lung cancer in clinical use: A practical perspective. 11-13 Mayıs 2017, Erciyes Tıp Genetik Günleri, Kayseri (Sözlü Bildiri)
- Atıl Bişgin, Özge Sönmezler, İbrahim Boga, Ahmet Rencüzoğulları, Kıvılcım Eren Ateş, Figen Doran, Orçun Yalav, İsmail Cem Eray, Ömer Alabaz, Sevcin Tuğ Bozdoğan. Utilization of multi-gene panels in colorectal cancer: Analysis of clinicopathological findings. 11-13 Mayıs 2017, Erciyes Tıp Genetik Günleri, Kayseri (Sözlü Bildiri)
- Atıl Bişgin, Özge Sönmezler, İbrahim Boga. Tümör Spesifik Mutasyonların Tespitinde Yeni NGS Sistemi (Gene Reader NGS Systems) Validasyonu, Örneklem Optimizasyonları ve Genetik Varyantların Biyoinformatik Analizi. 5-9 Ekim 2016, 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, İzmir (Sözlü Bildiri)
- Özge Sönmezler. Antik Mitokondriyal DNA'da Haplogrup Tayini Ve Pediatrik Akut Myeloid Lösemi İlişkili Polimorfizmlerin İncelenmesi, Bitirme Tezi, 2015, İstanbul Üniversitesi, İstanbul (Poster Sunumu)