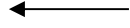
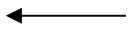


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KODLANAN DNA ÜZERİNDE KRİTİK NOKTADA VAR
OLAN SNP'LERİN mRNA KIRPILMASI ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

SEDA KILIÇ ERCİYAS

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YAZICI**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER GENETİĞİ DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Seda KILIÇ ERCİYAS



İTHAF



Onur Mert Erciyas'a...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana yön veren, yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bilgi, beceri ve deneyimlerinden yarlandığım, değerli danışman hocam Prof. Dr. Hülya YAZICI'ya,

İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Ahmet KIZIR'e,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice BİLGE BECERİR'e

Temel Onkoloji ABD, Kanser Genetiği Bilim Dalı'nda görev yapan sevgili arkadaşlarım Dr. Özge ŞÜKRÜOĞLU ERDOĞAN, Dr. Demet AKDENİZ ÖDEMİŞ, Dr. Şeref Buğra TUNÇER, Dr. Zübeyde YALNIZ KAYIM, M.Sc. Betül ÇELİK, M.Sc. Büşra KURT, Türkan ŞEN FERADOĞLU, Arzu BURNUVA ve isimlerini sayamadığım tüm arkadaşlarıma,

Desteklerini esirgemeyen ailem Erman Utku ERCİYAS, Furkan KILIÇ, Güler KILIÇ, Fahrettin KILIÇ'a ve sevgili oğlum Onur Mert ERCİYAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30484, TDK-2018-30484.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	1
TABLolar LİSTESİ.....	4
ŞEKİLLER LİSTESİ	5
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	9
ÖZET	10
ABSTRACT.....	11
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	12
2. GENEL BİLGİLER	14
2.1. RNA Tipleri	15
2.1.1. Kodlayan RNA'lar	16
2.1.1.1. pre-mRNA (hnRNA).....	16
2.1.1.2. mRNA (messenger RNA)	16
2.1.2. Kodlamayan RNA'lar	16
2.1.2.1. rRNA (Ribozomal RNA)	16
2.1.2.2. tRNA (Transfer RNA).....	16
2.1.2.3. snRNA (Small Nuclear RNA).....	17
2.1.2.4. snoRNA (Small Nucleolar).....	17
2.1.2.5. RNAi (RNA interferans)	17
2.1.2.5.1. miRNA (micro RNA).....	17
2.1.2.5.2. siRNA (Small/Short interfering RNA).....	18
2.2. mRNA Modifikasyonları	18
2.2.1. Olgun mRNA oluşumu:	18
2.2.2. mRNA Kırılması (Splicing):.....	18
2.2.2.1. Alternatif Splicing Çeşitleri	20
2.2.2.2. mRNA Kırılmasının Hastalıklar ile İlişkisi.....	22
2.3. In-Siliko Tahmin Araçları.....	26

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. Hasta Materyali ve Deney	27
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	28
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	29
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu	29
3.2.2. DNA ve RNA İzolasyonu	30
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	30
3.2.4. cDNA Sentezi	31
3.2.5. RT-PCR Reaksiyonu ve Pürifikasyonu.....	32
3.2.6. DTCS Reaksiyonu ve Pürifikasyonu	34
3.2.7. PCR ürünü saflaştırma ve Sanger Dizileme işlemi	34
3.2.8. Dizileme sonuçlarının okunması.....	35
3.2.9. Biyoinformatik Araçlar ile Splicing kontrolü	35
3.2.9.1. Alamut Splicing Tahmin Modülü Kullanımı	35
4. BULGULAR.....	39
4.1. <i>RBI</i> Genindeki c.2489+2T>C Değişikliği	39
4.2. <i>CHEK2</i> Geni c.1556C>T Değişikliği	44
4.3. <i>BRCA1</i> Genindeki c.5152+5G>A Değişikliği	48
4.4. <i>APC</i> Genindeki c.532-1G>A Değişikliği	52
4.5. <i>BRCA2</i> Genindeki c.9117+9C>T Değişikliği (BR1697).....	55
4.6. <i>RBI</i> Genindeki c.1050-2 A>G Değişikliği (R1230).....	58
4.7. <i>BRCA2</i> GENİNDEKİ c.7436-1G>C DEĞİŞİKLİĞİ (BR2541).....	62
4.8. <i>BLM</i> Genindeki c.4076+4T>G Değişikliği	65
4.9. <i>NBN</i> Genindeki c.71A>C Değişikliği (BR3172).....	68
4.10. <i>FANCD2</i> Genindeki c.1278_1278+3delAGTA Değişikliği (BR3214).....	72
4.11. <i>BRCA1</i> Genindeki c.4358-3A>G Değişikliği	75
4.12. <i>CHEK2</i> Genindeki c.921+2T>A (c.792+2T>A) Değişikliği.....	81
4.13. <i>NF1</i> Genindeki c.2351G>C, p.(Trp784Ser) Değişikliği.....	86
4.14. <i>BRCA2</i> Genindeki c.68-7T>A Değişikliği (BR2966)	88
5. TARTIŞMA	91
KAYNAKLAR	98

HAM VERİLER	101
FORMLAR	102
ETİK KURUL KARARI	103
PATENT HAKKI İZNİ	106
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	107
ÖZGEÇMİŞ	108



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.2-1:Kanserde kırılma hatalarına ilişkin örnekler [20]	23
Tablo 2.2-2: Kırılma ile ilgili Bilgi Bankaları [23]	24
Tablo 3.1-1: Hastalara ait Tanı ve Tanı Yaş bilgileri	27
Tablo 3.2-1: PCR Reaksiyonu İçeriği.....	32
Tablo 3.2-2: PCR Koşulları	33
Tablo 3.2-3: Varyantların analizinde kullanılan primer dizileri	33
Tablo 3.2-4: PCR Reaksiyonu İçeriği.....	34



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1-1: Santral Dogma.....	14
Şekil 2.2-1: Splaysozom komplekslerinin oluşumu ve aktif splaysozomun yapısı [14]	19
Şekil 2.2-2: Alternatif Splicing Çeşitleri [15].....	21
Şekil 2.2-3: SpliceDisease Örnek Sonuç Sayfası[23]	24
Şekil 3.2-1: Horizontal agaroz jel elektroforezi düzeneği	31
Şekil 3.2-2: Alamut Programı Splicing Tahmin Ekranı	36
Şekil 3.2-3: Donör ve Akseptör Bölgelerdeki Skorların Karşılaştırma Raporu	37
Şekil 3.2-4: In Siliko Araçların Eşik Değerleri.....	37
Şekil 3.2-5: ESEfinder ve RESCUE-ESE sonuç ekranı	38
Şekil 4.1-1: <i>RBI</i> c.2489+2T>C'nin Ekzonlar Arasındaki Konumu	39
Şekil 4.1-2: <i>RBI</i> genindeki c.2489+2T>C Değişikliğinin Sophia DDM Programı ile Analiz Sonucu.....	39
Şekil 4.1-3: <i>RBI</i> genindeki c.2489+2T>C mutasyonunun RESCUE-ESE ve ESEfinder analiz sonuçları	40
Şekil 4.1-4: SNP öncesi ve sonrasında Donör ve Akseptör bölgelerdeki olası değişiklikler	41
Şekil 4.1-5: R1170 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin % 1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	42
Şekil 4.1-6: R1170 kodlu hastanın RNA üzerinden yapılan dizileme sonucu.....	42
Şekil 4.2-1: <i>CHEK2</i> genindeki c.1556C>T değişikliğinin gen üzerindeki konumu	44
Şekil 4.2-2: <i>CHEK2</i> c.1556C>T için SIFT, Polyphen, MutationTaster gibi in-siliko araçlar tarafından gösterilen risk diyagramı	45
Şekil 4.2-3: <i>CHEK2</i> genindeki c.1556C>T değişikliğinin dbSNP bilgi bankasındaki kaydı.....	45
Şekil 4.2-4: <i>CHEK2</i> genindeki c.1556C>T değişikliğinin EX-SKIP programı ile yapılan analiz sonucu.....	46
Şekil 4.2-5: BR3119 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	47
Şekil 4.2-6: BR3119 kodlu örneğin Sanger ile cDNA dizileme sonucu	47
Şekil 4.3-1: <i>BRCA1</i> c.5152+5G>A'nın konumu	48
Şekil 4.3-2: <i>BRCA1</i> c.5152+5G>A'nın Sophia DDM analiz sonucu	48

Şekil 4.3-3: <i>BRCA1</i> c.5152+5G>A değişikliğine ait in-siliko analiz sonuçları.....	49
Şekil 4.3-4: <i>BRCA1</i> c.5152+5G>A değişikliğine ait RESCUE-ESE, ESEfinder analiz sonuçları.....	50
Şekil 4.3-5: BR1775 Kodlu Hastaya Ait Sanger Dizi Analizi Sonucu.....	51
Şekil 4.4-1: <i>APC</i> genindeki c.532-1G>A değişikliğinin gen üzerindeki konumu.....	52
Şekil 4.4-2: <i>APC</i> genindeki c.532-1G>A değişikliğine ilişkin Sophia DDM analizi sonuçları.....	53
Şekil 4.4-3: PN007 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	53
Şekil 4.4-4: PN007 kodlu örneğin cDNA üzerinden Sanger dizileme sonucu.....	54
Şekil 4.4-5: <i>APC</i> 6. Ekzon 16 Baz Delesyon Bölgesi	54
Şekil 4.5-1: <i>BRCA2</i> genindeki c.9117+9C>T değişikliğinin ekzonlar arasındaki konumu	55
Şekil 4.5-2: <i>BRCA2</i> genindeki c.9117+9C>T değişikliğinin Sophia DDM ile analiz sonucu	55
Şekil 4.5-3: ESEfinder ve RESCUE-ESE sonuçları.....	56
Şekil 4.5-4: BR1697 kodlu hastaya ait RNA üzerinden yapılan Sanger Dizileme Sonucu	57
Şekil 4.6-1: <i>RBI</i> genindeki c.1050-2A>G değişikliğinin gen üzerindeki konumu	58
Şekil 4.6-2: <i>RBI</i> genindeki c.1050-2A>G değişikliğinin Sophia DDM ile analiz sonucu	58
Şekil 4.6-3: Referans Dizi ve Mutasyon Varlığında Donör ve Akseptör Bölge Konumlarının Karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.6-4: R1230 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	60
Şekil 4.6-5: R1230 nolu hastaya ait RNA üzerinden yapılan Sanger Dizileme Sonucu	61
Şekil 4.7-1: <i>BRCA2</i> genindeki c.7436-1G>C değişikliğinin gen üzerindeki konumu	62
Şekil 4.7-2: <i>BRCA2</i> genindeki c.7436-1G>C değişikliğinin Sophia DDM Analiz Sonucu	62
Şekil 4.7-3: Değişiklik (SNP) öncesi ve sonrasında Donör ve Akseptör bölgelerdeki olası değişiklikler.....	63
Şekil 4.7-4: BR2541 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	64

Şekil 4.7-5: BR2541 kodlu hastada <i>BRCA2</i> c.7436-1G>C değişikliğini bulunduran bölgenin Sanger kromatogram görüntüsü.....	64
Şekil 4.8-1: <i>BLM</i> genindeki c.4076+4T>G değişikliğin gen üzerindeki konumu.....	65
Şekil 4.8-2: <i>BLM</i> genindeki c.4076+4T>G değişikliğinin Sophia DDM Analiz Sonucu	65
Şekil 4.8-3: BR2361 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	66
Şekil 4.8-4: BR2361 kodlu hastada <i>BLM</i> c.4076+4T>G değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü	67
Şekil 4.9-1: <i>NBN</i> genindeki c.71A>C değişikliğin gen üzerindeki konumu	68
Şekil 4.9-2: <i>NBN</i> genindeki c.71A>C değişikliğinin Sophia DDM analiz sonucu	68
Şekil 4.9-3: ESEfinder ve RESCUE-ESE Analiz Sonuçları.....	69
Şekil 4.9-4: <i>NBN</i> genindeki c.71A>C değişikliğinin EX-SKIP ile Analiz Sonucu.....	70
Şekil 4.9-5: BR3172 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	70
Şekil 4.9-6: BR3172 kodlu hastaya ait <i>NBN</i> c.71A>C değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü	71
Şekil 4.10-1: <i>FANCD2</i> genindeki c.1278_1278+3delAGTA değişikliğinin gen üzerindeki konumu	72
Şekil 4.10-2: <i>FANCD2</i> genindeki c.1278_1278+3delAGTA değişikliğinin in-siliko tahmin araçlarındaki analiz sonuçları	73
Şekil 4.10-3: BR3214 kodlu hastada <i>FANCD2</i> c.1278_1278+3delAGTA değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü	74
Şekil 4.11-1: <i>BRCA1</i> genindeki c.4358-3A>G değişikliğinin gen bölgesi üzerindeki konumu	75
Şekil 4.11-2: <i>BRCA1</i> genindeki c.4358-3A>G değişikliğinin Sophia DDM Analiz Sonuçları	76
Şekil 4.11-3: <i>BRCA1</i> genindeki c. 4358-3A>G değişikliğin ESEfinder ve RESCUE-ESE Analiz Sonucu.....	77
Şekil 4.11-4: <i>BRCA1</i> c.4358-3A>G ait ClinVAR Database Kaydı.....	78
Şekil 4.11-5: <i>BRCA1</i> genindeki c.4358-3A>G değişikliğine ait HGMD Kaydı	78
Şekil 4.11-6: <i>BRCA1</i> genindeki c.4358-3A>G değişikliğinin DNA üzerinde Sanger ile konfirmasyonu	79

Şekil 4.11-7: BR1590 ve BR1630' kodlu hastalarda <i>BRCA1</i> c.4358-3A>G değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü	80
Şekil 4.12-1: <i>CHEK2</i> genindeki c.921+2T>A değişikliğin gen üzerindeki Konumu	81
Şekil 4.12-2: <i>CHEK2</i> genindeki c.921+2T>A değişikliğin Sophia DDM Analiz Sonucu (Ref: NM_001005735)	81
Şekil 4.12-3: <i>CHEK2</i> genindeki c.921+2T>A değişikliğine ait ESEfinder ve RESCUE-ESE Analiz Sonuçları	82
Şekil 4.12-4: <i>CHEK2</i> genindeki c.921+2T>A değişikliğine ait in-Siliko splicing Analiz Araçları ile alınan Sonuçları	83
Şekil 4.12-5: Hastaya ait farklı cDNA örnekleriyle yapılan PCR sonuçları	84
Şekil 4.12-6: BR3215 kodlu hastada <i>CHEK2</i> c.921+2T>A değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü	85
Şekil 4.13-1: <i>NF1</i> genindeki c.2351G>C değişikliğinin gen üzerindeki konumu.....	86
Şekil 4.13-2: <i>NF1</i> genindeki c.2351G-C değişikliğinin Sophia DDM Analiz Sonucu ..	86
Şekil 4.13-3: NF005 DNA örneği ile c.2351G>C'nin Sanger Konfirmasyonu.....	87
Şekil 4.13-4: NF005 PCR Sonucu (1 numara)	87
Şekil 4.14-1: <i>BRCA2</i> genindeki c.68-7T>A değişikliğinin gen üzerindeki konumu.....	88
Şekil 4.14-2: <i>BRCA2</i> genindeki c.68-7T>A değişikliğinin Sophia DDM'deki Analiz Sonucu	89
Şekil 4.14-3: BR2966 kodlu hastada <i>BRCA2</i> c.68-7T>A değişikliğin sağında ve solundaki ekzonları gösteren Sanger kromatogram görüntüsü	90

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AS:	Alternatif Splicing
BFB:	Bromofenol Blue
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
ESE:	Ekzonik Splicing Enhancer
ESS:	Ekzonik Splicing Silencer
HGMD:	Human Gene Mutation Database
PBS:	Phosphate Buffer Saline
RNA:	Ribonükleik Asit
RBP:	RNA bağlayıcı protein
RNP:	Ribonükleoprotein
RT-PCR:	Reverse transcription polymerase chain reaction
TEB:	Tris-EDTA Buffer

ÖZET

ERCİYAS KILIÇ, SEDA (2020), KODLANAN DNA ÜZERİNDE KRİTİK NOKTADA VAR OLAN SNP'LERİN MRNA KIRPILMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kanser hastalarında yapılan genetik araştırmalar sonucunda DNA üzerinde gözlemlenen bazı mutasyonların, hücredeki tüm mekanizmalarda anahtar rol oynayan proteinler üzerine nasıl etki ettiği bilinmemektedir. Mutasyonların hücresel fonksiyonları nasıl etkilediğini araştıran çalışmalar sonucunda elde edilen bilgileri toplayan online erişimli bilgi bankaları sayesinde hakkında çalışma yapılmış mutasyonları tanıma ve etkilerini tahmin etme şansımız bulunmaktadır. Etkileri henüz araştırılmamış olan varyantların yol açtığı sonuçları tahmin edebilmek için biyoinformatik analiz programları ile in-siliko değerlendirmeler yapılmaktadır ve bu araçlardan elde edilen sonuçlar, mutasyonların klinik önemlerini belirlemede önem taşımaktadır. Biyoinformatik bilimcilerinin ürettiği bilgisayar programları kullanılarak gerçekleştirilen in siliko analizlere ait çıktılar ancak RNA kırılma analizleri ile doğrulandıktan sonra kesinleştirilebileceğinden, etkileri henüz tanımlanmamış mutasyonlar ile ilgili araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda, kanser üzerinde etkili genlerde tespit edilmiş ve RNA üzerindeki etkileri bilinmeyen varyantların mRNA'yı nasıl değiştirdiğini ortaya koymak amacı ile 14 varyant incelenmiş ve bunlardan 8 tanesinin RNA üzerine etkisinin olmadığı, 2 tanesinin şüpheli olduğu ve 4 tanesinin (BRCA1 c.5152+5G>A, BRCA1 c.4358-3A>G, APC c.532-1G>A, CHEK2 c.921+2T>A) patojenik olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Splicing, mRNA, Kırılma, Mutasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30484, TDK-2018-30484.

ABSTRACT

Kilic Erciyas, S. (2020), INVESTIGATIONS OF THE EFFECTS OF CRITICALLY LOCATED SNP's ON mRNA SPLICING.

Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology.
Doctoral Thesis. Istanbul.

As a result of genetic tests in cancer patients DNA mutations are detected. It is also necessary to investigate how these mutations affect mRNA and protein. Thanks to online databases that collect information obtained as a result of studies investigating how mutations affect cellular functions, we have the chance to recognize mutations that have been studied and to predict their effects. In order to estimate the results of variants whose effects have not yet been studied, in-silico evaluations are carried out with bioinformatics analysis programs, and the results obtained from these tools are important in determining the clinical significance of mutations. Since the outputs of in-silico analysis performed by using computer programs which are produced by bioinformatics scientists, can only be confirmed after validation with RNA clipping analysis, a new research is required to learn about the mutations whose effects have not yet been identified. In our study, 14 variants, that were detected in genes effective on cancer and whose effects on RNA were unknown, were investigated in order to reveal how variants change mRNA, and as a result, 8 of them are not effective on RNA, 2 of them are suspicious and 4 of them (BRCA1 c.5152 + 5G> A, BRCA1 c.4358-3A> G, APC c.532-1G> A, CHEK2 c.921+2T>A) were found to be pathogenic.

Key Words: Cancer, Splicing, mRNA, cDNA, Mutation

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 30484, TDK-2018-30484.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

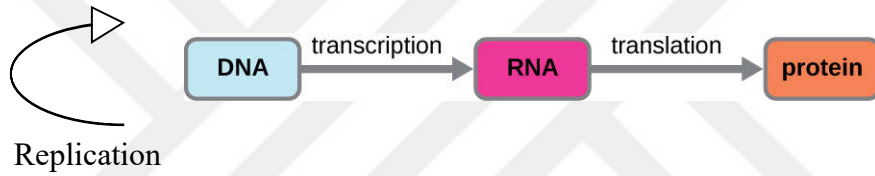
1990-2001 yılları arasında süren insan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte genoma yeni bir bakış açısı kazandırılmış ve genomik dataya ait ilk bilgiler 2001 yılında yayınlanmıştır [1]. İnsan genomu, protein kodlayan ve kodlamayan dizilerden oluşur ve protein kodlayan diziler DNA'nın sadece %1.1'ini oluşturur [2]. 2006'da sonlandırılan projenin başlarında 100.000 civarında olduğu tahmin edilen gen sayısı, yıllar içinde dizileme kalitesinin artması ve gen bulma metodlarının geliştirilmesi ile birlikte gittikçe azalmıştır ve son belirlenen rakamlara göre insan genomu yaklaşık 19.000-20.000 gen içermektedir [1]. İnsanlarda üretilen 90.000 farklı türde protein olmasına rağmen gen sayısının bu şekilde ters orantılı oluşu, insan genlerinin daha karmaşık yollarla ile düzenlendiğini düşündürmektedir. Bu durum transkripsiyon sonrası modifikasyonlar ve alternatif kırılma (alternatif splicing) hipotezleri ile açıklanmaya çalışılmaktadır [3]. Alternatif splicing sayesinde bir hücre aldığı bir sinyale yanıt olarak farklı fonksiyonlara sahip protein varyantları üretebilir. Kompleks yapıdaki ökaryotlarda sentezlenen genlerin yaklaşık %5'inden fazlasının alternatif splicing geçirdiği düşünülmektedir. Nükleusta DNA üzerinden transkripte edilen pre-mRNA'nın %90'ından fazlası intronlardan oluşmaktadır. İnsan dışında diğer canlı türlerinin de evriminde önemli rol oynayan alternatif splicing, tüm dokularda gerçekleştirilmektedir. Ancak vücutta en fazla beyin hücrelerinde oluşturulduğu gösterilmiştir [4]. Genom üzerinde neredeyse her gende bulunan intronlar protein daha doğrusu polipeptid aktarılmamaktadır. Ancak ekzon-intron bağlantısında yer alan özel diziler sayesinde gerçekleştirilen splicing bu dizilerde meydana gelen değişiklikler nedeniyle zaman zaman genin yapısından bir ya da birkaç ekzonun çıkarılmasına ya da intronun gen içinde kalarak protein yapısının değişmesine neden olmaktadır. Bu tür değişiklikler klinikte hastalığın tanısı, tedavi ve riskin belirlenmesi açısından önemlidir. Klinikte uygulanan klinik testler sırasında özellikle ekzon-intron bağlantısında gelişen değişikliklerin gen ürünü üzerinde ne gibi bir etki yaptığının anlaşılması son derece önemlidir. Hücresel fonksiyonları etkileyen bu değişiklikler ya da bir başka deyişle mutasyonlar dünyanın her yerindeki bilim insanları tarafından araştırılmaktadır ve elde edilen sonuçlar online erişimli bilgi bankalarında açıklanarak tüm bilim insanlarının kullanımına sunulmaktadır [5, 6]. Ancak bu tür araştırmaların yapılması rutin uygulamalar sırasında mümkün olmadığından, bilgi bankalarında bulunmayan ve gen

yapısı üzerinde önemli noktalarda olduğu düşünölen yeni bir değışikliğin bir herhangi hastada saptandığı durumlarda hastaya sonuç vermek, onun riskini belirlemek ya da tansını koymak mümkün olmamakta ve klinik uygulama kesintiye uğramaktadır. Bu tür durumların üstesinden gelmek üzere DNA üzerinde meydana gelmiş ve henüz araştırılmamış olan bu değışikliklerinin yol açtığı sonuçları tahmin etmede kullanılmak üzere biyoinformatik analiz programları geliştirilmiştir [7] . Bu programlar kullanılarak yapılan in-siliko değırlendirmeler ile gen üzerinde önemli sayılacak noktalarda meydana gelen değışikliklerin klinik önemi tahmin edilmeye ve bir sonuca gidilmeye çalışılmaktadır [7]. Ancak biyoinformatik bilgisayar programları kullanılarak gerçekleştirilen bu in siliko analizlere ait çıktılarının da deneysel sistemlerde ya RNA kırılma analizleri ile ya da proteinlerin fonksiyon analizlerinin yapılarak doğrulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Sunulan tez çalışması kanserde etkili olduğu bilinen genlerde kliniğimizde rutin uygulamalar esnasında saptadığımız DNA üzerinde ekzon-intron bağlantı bölgeleri gibi genin fonksiyonunu bozabilecek önemli gen bölgelerinde varlığı tespit edilmiş, bilgi bankalarında hakkında herhangi bir bilgi bulunmayan ve in silico algoritmalarından elde edilen bilgilerin de yeterli olmadığı değışikliklerin mRNA üzerindeki etkisini ve buna bağılı olarak genin protein yapısının ve fonksiyonunun nasıl değıştirdiğini ortaya koymak ve klinik anlamı bilinmeyen değışikliklerin anlamını belirlemek amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Biyolojik bir organizmada genetik bilgi akışı “Santral Dogma” ile gerçekleşir. 1957 yılında Crick’in ilk tanımı “Genetik bilginin nükleik asitten nükleik asite aktarılarak proteine transfer edilmesi” şeklinde olmuştur. Santral Dogma teorisine göre kısaca, kendini replike edebilen DNA molekülü RNA’yı (transkripsiyon), RNA molekülü de polipeptid (translasyon) kodlar ve kodlarda depolanan bilgi polipeptid şeklinde ifade edilir (Şekil 2.1-1) [8].

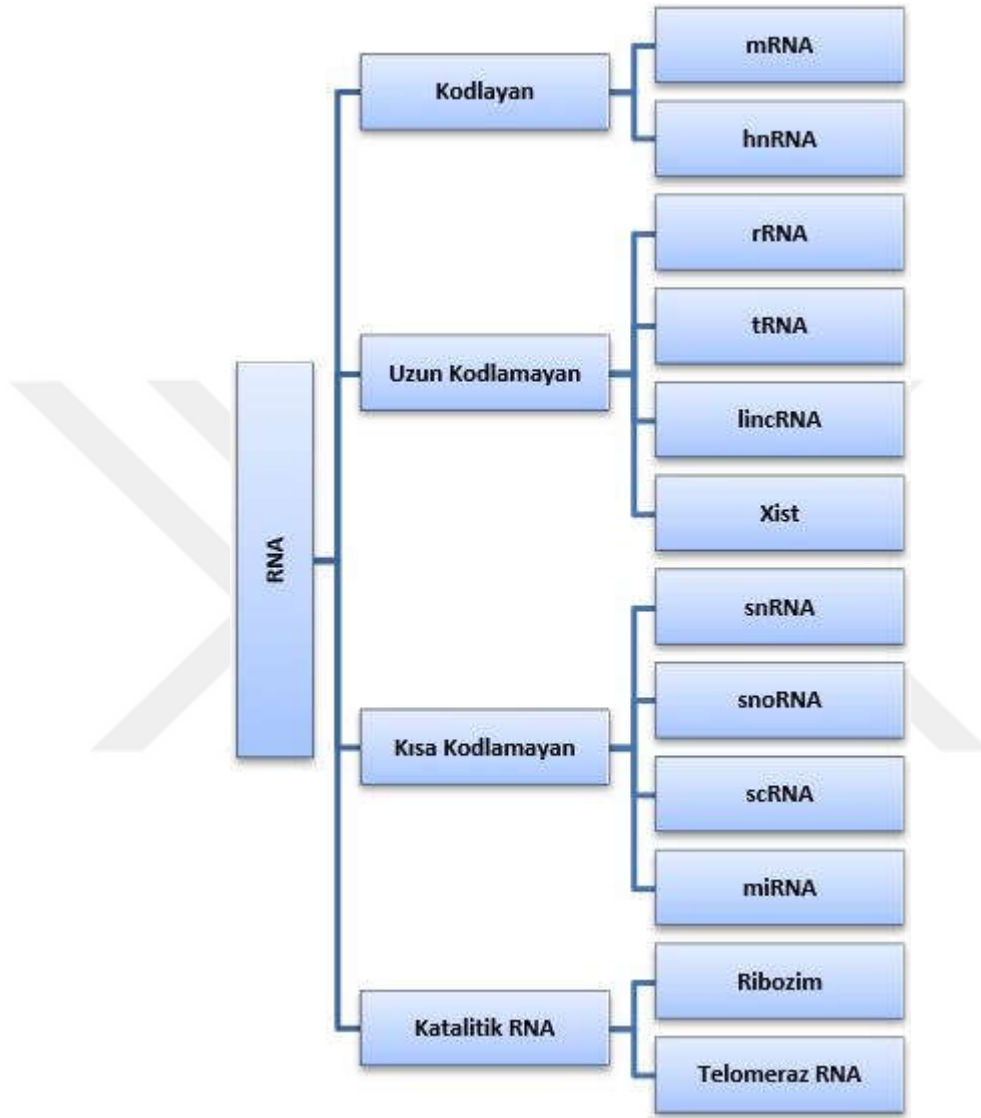


Şekil 2.1-1: Santral Dogma

Ribonükleik Asit (RNA) riboz, fosfat ve bazdan oluşan bir moleküldür. RNA, şifrelenmiş genomik bilginin bir alt çıktısı olarak kabul edilebilir. Bu çıktıların ne olduğunu anlamak genomun fonksiyonlarını anlamamanın temelini oluşturmaktadır. RNA molekülü hücrede genellikle tek iplikli olarak bulunmaktadır. Ökaryotik organizmalarda hücreye spesifik birçok işlevi yerine getiren farklı RNA türleri bulunmaktadır. Tüm RNA’lar öncül bir işlemde geçerek olgun ve fonksiyonel hale gelirler. RNA türlerinin sınıflaması hakkında kesin bir konsensus olmamasına rağmen genel olarak aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilirler [9].

2.1. RNA Tipleri

RNA tipleri şekildeki gibi sınıflara ayrılmıştır (Bkz. Şekil 2.1-2).



Şekil 2.1-2: RNA Tipleri

2.1.1. Kodlayan RNA'lar

2.1.1.1. pre-mRNA (hnRNA)

Ekzon ve intronları içeren, RNA'nın mRNA'ya henüz dönüştürülmemiş haline pre-mRNA ya da heterojen nükleer RNA (hnRNA) denir. RNA'nın sitoplazmaya gidene kadar bulunduğu hali olarak tanımlanmaktadır [10].

2.1.1.2. mRNA (messenger RNA)

mRNA (messenger RNA), DNA'da var olan protein sentezi bilgilerini deşifre etmeye yarayan kodonları taşıyan aracı RNA molekülüdür. Hücredeki bütün RNA moleküllerinin %3-5 kadarı mRNA'dır ve üretildikten sonra görevlerini tamamlayıp hızlıca yıkıma uğrarlar. Olgun hale gelen mRNA sadece kodlayan dizileri içerir yani ekzonları bünyesinde barındırır, kodlamayan diziler olan intronlar ise kırılma (splicing) işlemi ile çıkarılmıştır [11].

2.1.2. Kodlamayan RNA'lar

Kodlamayan RNA'lar, bir proteine ait bilgiyi içermeyen RNA'lardır ve tüm RNA'ların %95-97'sini oluşturmaktadırlar. Protein kodlamadıkları bilinse de farklı işlevleri olduğu bilinmektedir. Kodlamayan RNA'ların yaklaşık %70'ini ise genlerin içinde yer alan intronik diziler oluşturmaktadır [12].

2.1.2.1. rRNA (Ribozomal RNA)

Ribozomun büyük ve küçük alt birimlerini oluşturan RNA türüdür ve bir ribozomun yaklaşık %60'ını oluşturan ana bileşendir. rRNA'nın 28S, 18S, 5.8S, 5S olmak üzere farklı alt türleri bulunmaktadır. Ribozomun küçük alt birimi sadece 18S RNA'dan meydana gelirken büyük alt birimi 28S, 5.8S ve 5S RNA olmak üzere üç farklı rRNA'nın bir araya gelmesi ile oluşmaktadır [12].

2.1.2.2. tRNA (Transfer RNA)

tRNA aminoasitleri sitoplazmadan ribozamun büyük alt birimine taşıyan RNA türüdür. tRNA, mRNA üzerinde yer alan komplementer kodon ile eşleşen antikodon bölgesini içerirler. tRNA'nın taşıdığı aminoasitler polipeptid zincirine eklenir ve polipeptid yada bir başka deyişle protein molekülü meydana getirilir [13].

2.1.2.3. snRNA (Small Nuclear RNA)

snRNA (Small Nuclear RNA) yaklaşık 150nt büyüklüğündedirler. Bu RNA molekülü pre-mRNA'nın işlenmesi, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi, RNA polimeraz II ve telomerlerin korunmasında görev alırlar. Bu RNA'lara örnek olarak yüksek üridin içerikli olan U1, U2, U4, U5 ve U6 gibi RNA'lar verilebilir [12].

2.1.2.4. snoRNA (Small Nucleolar)

Bu RNA molekülleri ilk defa nükleolusta varlığı keşfedilmiş, 60-300nt büyüklüğünde rRNA'ların kimyasal modifikasyonlarına yardımcı olan küçük RNA'lardır. Her snoRNA molekülü hedef RNA'da bir ya da iki modifikasyon için kılavuz görevi görür. Modifikasyonu gerçekleştirmek için snoRNP olarak adlandırılan protein kompleksinde en az dört proteinle birleşirler. snoRNA'lar C/D box ve H/ACA box aileleleri olarak ikiye ayrılırlar [10].

2.1.2.5. RNAi (RNA interferans)

RNAi molekülleri, miRNA veya siRNA molekülleri olarak farklı formlarda bulunmaktadır. Bu moleküller mRNA'ların bozulmasını veya translasyonun inhibisyonunu tetikler. Ayrıca bazı durumlarda farklı miRNA moleküllerinin mRNA aktivasyonuna yol açtığı da bilinmektedir. Özetle, hangi genlerin ne şekilde aktifleneceğini belirlemeye yararlar. Aynı zamanda viral enfeksiyonlar, nörolojik hastalıklar ve birçok kanser türü tedavisi için terapiler geliştirmede kullanılırlar [10].

2.1.2.5.1. miRNA (micro RNA)

MikroRNA'lar hedef mRNA'ların belli bölgelerinde yer alan dizilerle komplementer hale gelerek gen ekspresyonunu düzenlerler. Böylece RNA susturulması ya da transkripsiyon sonrası düzenlemelerde görev yaparlar. Yaklaşık 20-21 nükleotit uzunluğundadırlar. miRNA genleri intronlarda ya da diğer genlerin ekzonlarında bulunabilir. Drosha-Pasha gibi enzimler ile pri-miRNA'dan pre-miRNA'ya dönüştürülerek sitozole taşınır ve Dicer ile aktif miRNA haline dönüştürülürler [10].

2.1.2.5.2. siRNA (Small/Short interfering RNA)

Dicer tarafından uzun RNA'dan asimetrik şekilde kırpılmış 20-25 baz çifti uzunluğunda çift iplikli RNA parçalarıdır. Dicer'in siRNA'ları oluşturması sonrasında diğer proteinlerle etkileşim gerçekleşerek RISC kompleksi oluşması sağlanır. RISC kompleksinin bir parçası olan siRNA artık hedef mRNA'sına bağlanabilir hale gelmiştir. Bağlandıktan sonra mRNA kesilir ve bozulmuş olur, böylece proteine dönüşmez. siRNA'lar hücreye transfeksiyon yolu ile verilebilirler ve potansiyel bir terapötik ajan olarak dikkat çekmektedirler. siRNA kullanımı bir genin ekspresyonunu durdurmak için en iyi yöntemdir [10].

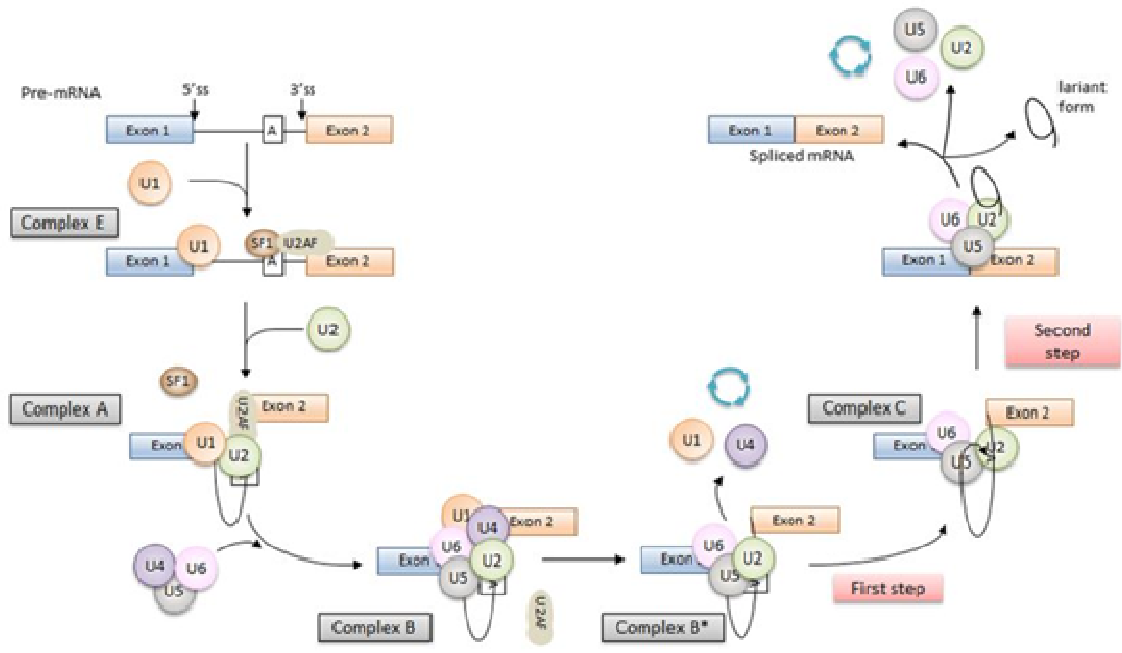
2.2. mRNA Modifikasyonları

2.2.1. Olgun mRNA oluşumu:

Primer transkriptin 5' ucuna 5'-5'-trifosfat bağı ile bir guanozin nükleotidi eklenir ve bu guanozin metillenerek 7-metilguanozin başlığı oluşturulur. Primer transkriptin 3'-ucuna da 200-250 adet adenozin eklenerek poliadenilasyon gerçekleşir ve poli-A-kuyruğu sentez edilmiş olur. Bu modifikasyonlar RNA'nın stabilizasyonunu sağlamakta olup, RNA'yı degradasyona dayanıklı hale getirerek nükleer transportun doğru bir şekilde gerçekleştirilmesini kolaylaştırmaktadırlar. Ardından pre-mRNA'dan intron bölgelerinin uzaklaştırılmasını sağlayan kırılma (splicing) işlemi başlatılır [10].

2.2.2. mRNA Kırılması (Splicing):

Genellikle genler DNA üzerinde anlatımı yapılmayan bölgeler ile birlikte kodlanmış olarak bulunurlar. Bununla beraber genomumuzda kodlanmayan bölgesi olmayan bir başka deyişle kırılmaya ihtiyaç duyulmayan çok az sayıda gen bulunmaktadır. Olgun mRNA'yı meydana getirebilmek için çoğunlukla intronların kırılması gerekecek şekilde transkripsiyon gerçekleştirilir ve transkriptler üretilir. Öncü mRNA'dan intronların çıkarılmasıyla olgun transkriptlerin oluşması alternatif kırılma ile gerçekleşir (Bkz. Şekil 2.2-1).



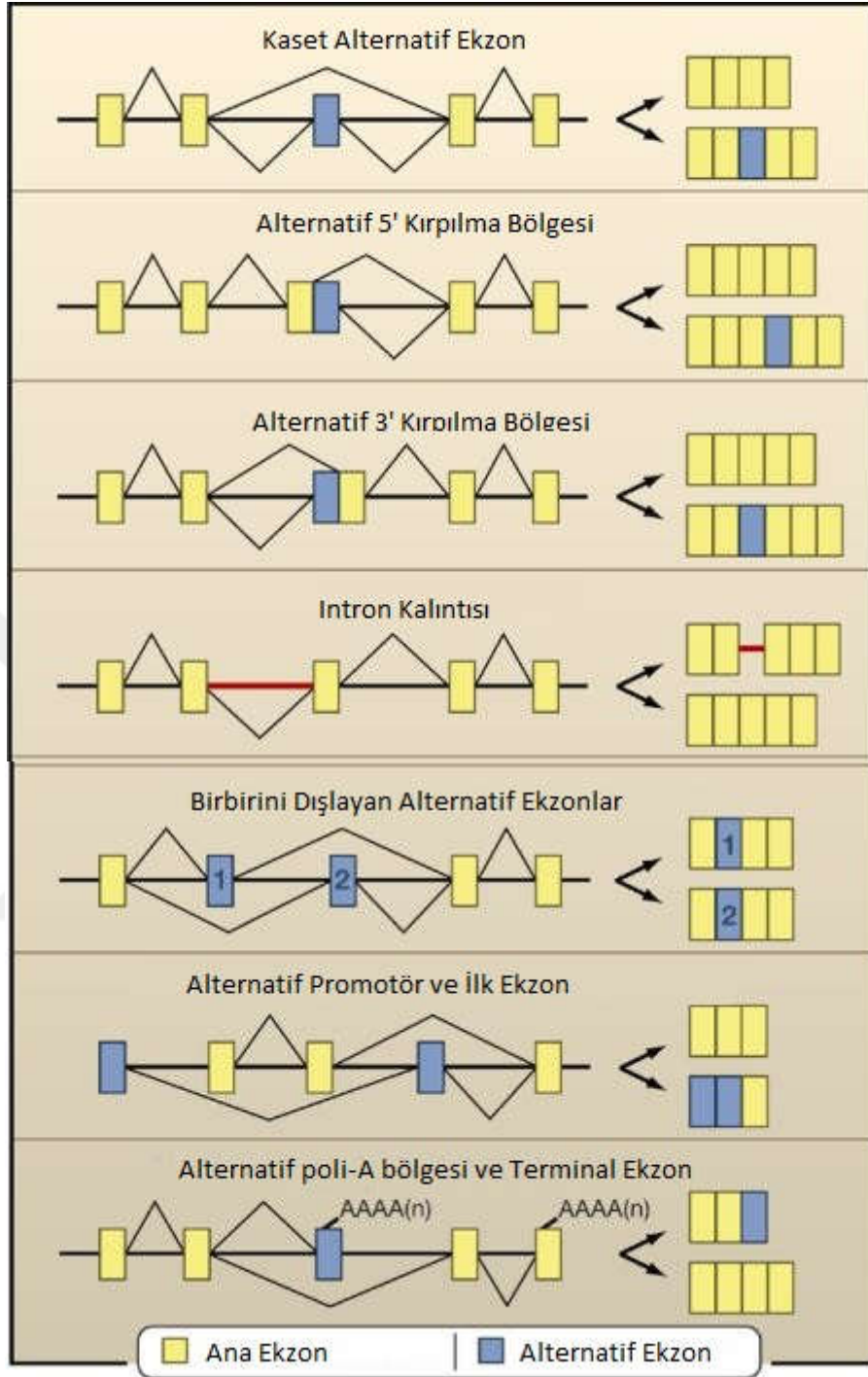
Şekil 2.2-1: Splaysozom komplekslerinin oluşumu ve aktif splaysozomun yapısı [14]

Gerekli proteinin translasyonu için hazırlanacak mRNA'nın transkripte edilmesi ve ilgili proteini oluşturması, ekzon ve intron bağlantı bölgelerini tanıyan konsensus diziler ve regülatör dizilerin varlığına bağlıdır. Splicing iki aşamada gerçekleştirilir, ilk aşamada ekzon-intron bağlantı noktaları tanınır, ikinci aşamada da intronlar atılarak ekzon uçları birleştirilir. Intronların sonunda bulunan iki nükleotid ile bunların yakınlarındaki diziler çok iyi korunmuştur ve çoğunlukla GT ile başlayıp AG ile sonlanırlar. Bu iki diziden başka dallanma bölgesini belirleyen dizi de önem taşır ve bu dizi AG bazlarına en fazla 40 nükleotid kadar uzaklıkta bulunur. Bu üç diziden başka kırılma güçlendirici (splicing enhancer) ya da kırılma susturucu (splicing silencer) diziler de kırılma işlemini etkilemektedir. Dallanma bölgesindeki Adenin bazı, donör kırılma noktasındaki UG bazları ile kement (Lariat) oluşturur ve akseptör kısımdaki AG dinükleotid bölgesinden ayrılarak intron aradan çıkarılır. RNA kırılması splaysozom (spliceosome) adı verilen büyük bir RNA-protein kompleksi ile birlikte gerçekleştirilir. Splaysozomun yapısında beş tip snRNA ve elliden fazla protein bulunmaktadır. İki tip splaysozom vardır, biri klasik GT-AG intronlarına bağlanan GU-AG splaysozomu ve diğeri daha nadir olan AT-AC minör AU-AC splaysozomudur. Splaysozom oluşumu U1 isimli snRNP'nin intronun 5'-ucundaki diziyi, SF1'in dallanma bölgesini ve U2AF heterodimeinin 3'AG'yi ve poli-primidin bölgesini

tanınması ile başlar. Bu bağlanmalar sonucunda E kompleksi oluşur. ATP'den bağımsız olan E kompleksinde SF1 molekülü U2 ile yer değiştirir ve SF1 ayrılarak E kompleksinden A kompleksine dönüşüm gerçekleşir. Ardından U4/U6-U5 snRNP'leri eklenerek B kompleksi meydana gelir. Aktif olarak görevini yapacak son kompleks ise C kompleksidir ve U1 ile U4 snRNP'lerinin yer değiştirmesi ile kırılmayı katalizlemeye başlar (Bkz. Şekil 2-2). Splicing aktivatörleri ve inhibitörleri genellikle E ve A komplekslerini hedef alarak çalışırlar. Majör tip, AT-AC tipi ve trans tip gibi üç tipte olan splaysozomlar üç farklı şekilde kırılma gerçekleştirirler. AT-AC splaysozomunun bağlandığı ortak diziler diğer iki türün bağlandığı dizilerden farklıdır ve üç tipin benzer tek noktası U5 snRNP'dir [11].

2.2.2.1. Alternatif Splicing Çeşitleri

Yedi farklı alternatif splicing türü olduğu bilinmektedir (Bkz. Şekil 2.2-2). “Kaset Alternatif Ekzon” olarak adlandırılan splicing türü, araya giren bir ekzon atlanarak ya da dahil edilerek iki farklı protein izoformunun oluşturulduğu bir splicing türüdür ve tüm alternatif splicing olaylarının 1/3'ini oluşturur. 5' ve 3' bölgeleri ile ilişkili olan alternatif splicing türlerinde farklı donör ve akseptör bölgeler kullanıldığından olgun mRNA üzerinde farklı ekzon sıralaması oluşturulmaktadır. Intronlardan biri kırılmadan ekzonlar arasında kaldığında buna “İntron Kalıntısı” adı verilmektedir. Bu olay hastalıklarla yaygın olarak ilişkili olan ve anormal bir splicing olayıdır. Bu tür oluşan splicing türünde çoğunlukla erken oluşan stop kodonlar ile RNA molekülü sonlanması gereken noktadan daha önce sonlanır ve üretilen polipeptid zinciri tam olarak görevini yapamaz ya da inaktif haldedir. Birbirini dışlayan alternatif ekzonlar şeklinde splicing gerçekleştiğinde ise, iki ekzondan ya biri ya da diğeri son üründe var olacak şekilde kırılma işlemi gerçekleştirilir ve iki ekzon aynı anda mRNA'da bulunmamaktadır. Alternatif promotör olan splicing senaryosunda promotörlerin biri ana promotör bölge iken diğeri indüklenebilir promotör bölgedir ve ikisinin farklı zamanda kullanımı ile ortaya niteliksel ve niceliksel olarak farklı gen ekspresyonları ortaya çıkarılır. Aynı şekilde alternatif poli-A bölgelerinin kullanımı da birden fazla farklı transkript oluşumunu sağlamaktadır [15].



Şekil 2.2-2: Alternatif Splicing Çeşitleri [15]

2.2.2.2. mRNA Kırılmasının Hastalıklar ile İlişkisi

mRNA kırılma bozuklukları önemli bir hastalık nedenidir ve alternatif transkriptler kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Genetik hastalıkların %50'sinden fazlasında kırılma bozuklukları görülür. Bazen bir splice bölgesini yok etmeyen ya da yenisini oluşturmayan mutasyonlar psödo-splice bölgelerini aktive ederek kırılmayı inhibe edebilirler. Kırılma bölgeleri yakınındaki mutasyonlar, ekzonların anormal şekilde eklenmesi ya da çıkarılması şeklinde sonuçlanabilir [14]. Kanser ile ilişkili olan alternatif kırılma, kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını teşvik etmek için anormal fonksiyonlara sahip çeşitli proteinlere yol açar ve kanser ile ilişkili olan 15.000'den fazla gen izoformunu tanımlanmıştır [16].

Kırılma bozukluklarının en yaygın görülen türü, kırılma bölgelerini belirleyen dizilerde meydana gelen mutasyonlar ya da bu dizileri susturucu (silencer) ya da güçlendirici (enhancer) gibi regülatör elemanlardaki mutasyonlarla ilişkilidir ve bu mutasyonlar çoğunlukla mutasyondan sonra gelen ekzonun atlanarak mRNA transkriptinde yer almaması ya da bazen çift ekzonun atlanması şeklinde sonuçlara yol açmaktadır.

İntronun sınırlarının tanımlanması genellikle ek yeri bölgelerinin yakınında bulunan spesifik ekzonik ya da intronik dizi bileşenleri ile etkileşime giren Serin-Arginin ve heterojen nükleer RNP'ler (hnRNP'ler) gibi RNA bağlayıcı proteinlerin (RBP'ler) işbirliğini gerektirir.

Ekzon delesyolarının yarısından fazlası protein trunkasyonuna sebep olarak kısalmış proteinlerin meydana gelmesine sebep olur. Örneğin kolon kanseri hastalarında yapılan *APC* geni testlerinde intronda tespit edilen c.531+2_531+3insT insersiyonunun 4. Ekzonun atlanmasına neden olduğu gösterilmiştir. *HRPT2* geninde meydana gelen IVS2+1G>C mutasyonu 5'-Splice bölgesi mutasyonlarına örnek olarak verilebilir ve 2.Ekzon'un atlanmasına yol açarak hiperparatiroidizm-çene tümör sendromuna sebep olmaktadır. Yine aynı gende meydana gelen IVS1+1G>A mutasyonu, 1. Ekzonun kısmi delesyonuna yol açarak Ailesel Primer Hiperparatiroidizm hastalığı ile birlikte tanımlanmıştır. *RBI* geninde IVS8-10T>C noktasında meydana gelen mutasyon poliprimidin bölgesini bozarak 9. Ekzon'un atlanmasına neden olmuştur ve retinoblastoma tanılı hastalarda görülmektedir. *FANCA* geninde c.710-5T>C

konumunda meydana gelen mutasyon 8.Ekzon'un atlanmasına sebep olarak Fanconi Anemi gelişimine neden olmaktadır. Nörofibromatozis Tip 1 genindeki (*NF1*) bozukluklar öncelikle cilt ve sinir sistemini etkileyen otozomal dominant hastalıklar meydana getirmektedir ve *NF1* c.655-2A>G missense mutasyonunun ekzon 7 delesyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen Survivin geni kırılması esnasında çıkarılamayan intronların tümörigenezi teşvik ettiği bildirilmiştir. (Bkz. Tablo 2-1) [6, 11, 17-22].

Tablo 2.2-1:Kanserde kırılma hatalarına ilişkin örnekler [20]

Gen	Kırılma Bozukluğu	Kanser Türü
<i>BRCA1</i>	Ekzon 18'in atlanması	Meme Kanseri
<i>PTEN</i>	İntron 3 ve 5'in kırılmaması	Meme Kanseri
<i>APC</i>	Ekzon 4'ün atlanması	Kolon Kanseri
<i>NF1</i>	Alternatif 5' ve 3' kırılma bölgeleri	Nörofibromatozis Tip 1
<i>SURVIVIN</i>	İntronun çıkarılamaması	Tümörigenezi teşvik ederek çeşitli kanser türleri ile bağlantılıdır.
<i>HRPT2</i>	Ekzon 2'nin atlanması	Çene tümörleri
<i>RBI</i>	Ekzon 9'un atlanması	Retinoblastoma
<i>FANCA</i>	Ekzon 8'in atlanması	Fanconi Anemi

RNA kırılması, çok sayıda RNA bağlayıcı protein ve bunların arasındaki karmaşık etkileşim ağını içeren kompleks mekanizmalar tarafından düzenlenir. mRNA oluşturulurken meydana gelen kırılma hatalarının hastalıklar için yaygın bir neden olduğu farkedilmiştir. Hastalıklar ve mutasyonlar arasındaki ilişkileri bütünleştiren “SpliceDisease” isimli veritabanı, literatür ışığında RNA kırılması ve hastalıklar hakkındaki bilgileri entegre etmektedir. Bu sayede kanser ve diğer hastalıklar ile mRNA kırılması ilişkisini kolayca araştırabilmemizi sağlamaktadır. Bu bilgi

bankasında gen dizisinde meydana gelen nükleotit değişiminin gen üzerindeki yeri, ilgili Pubmed ID numarası, kırılma hataları ile hastalık ilişkileri birleştirilerek sunulmaktadır (Bkz. Şekil 2.2-3) [23]. SpliceDisease'e ek olarak, mRNA kırılma hatalarının çeşitlerine özel veritabanları da oluşturulmuştur. Örneğin, sadece 5' ya da 3' bölgelerdeki kırılma hatalarını gösteren DBASS5' ve DBASS3' bilgi bankaları bulunmaktadır [24]. Kırılma ilişkili diğer bilgi bankaları ve adresleri Tablo 2.2-2'de görüldüğü gibidir.

[illegible]

Sekil 2.2-3: SpliceDisease Örnek Sonuç Sayfası[23]

Tablo 2.2-2: Kırpılma ile ilgili Bilgi Bankaları [23]

Bilgi Bankası	Adres	Tanım
HGMD	www.hgmd.org	Human Gene Mutation Database, hastalıkla ilişkili ya da hastalıkların ardında yatan mutasyonlar hakkındaki literatür bilgilerini veren bilgi bankasıdır.
DBASS3	www.dbass.org.uk	3' kırılma bozukluklarını gösteren bilgi bankasıdır.
DBASS5	www.dbass.org.uk	5' kırılma bozukluklarını gösteren bilgi bankasıdır.
ASDB	http://cbcg.nersc.gov/asdb	Alternatif Splicing geçiren genlerin bilgi bankasıdır.
Aspedia	http://combio.snu.ac.kr/aspedia/	İnsan genlerindeki alternatif kırılma olayları için düzenlenmiş kapsamlı bir bilgi bankasıdır.
ISIS	http://isis.bit.uq.edu.au/	170.000 üzerinde splaysozomal intron hakkında bilgi içerir.

RNA Kırılma mekanizması bozulduğunda hastalığa neden olabilmektedir. Kanseri hastalığı da dahil olmak üzere, hücre tipine, gelişim evresine ve hastalık durumuna bağlı olarak kırılma farklı şekillerde meydana gelmektedir. Kanseri hücrelerinde metastaz son derece aktif bir olaydır ve metastazların alternatif splicing sonucunda meydana gelen genom değişkenliği ile hücre büyümesini ve hayatta kalma mekanizmalarını teşvik edici bir neden olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, kanseri hücrelerinin bölünmeyi ve/veya metastazlarını sürdürmek için alternatif kırılma çeşitliliği üretmeleri mümkündür. Hatta kanseri hücrelerinin alternatif kırılmayı kullanarak hücrelerin metastaz potansiyellerini ve invazifliğini arttırabildiği düşünülmektedir. Bu nedenle, alternatif splicing olaylarının tümörigenezin tüm aşamalarında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir [4]. Normal ve kanserli hücrelerde alternatif splicing varyantlarını biyobelirteçler olarak belirleme ve farklılaştırma becerimiz, tüm kanserlerin daha iyi anlaşılmasına ve tedavi edilmesine yardımcı olacaktır [20]. 2008 yılında Thorsen ve ark. [25], doku ve tümöre özgü alternatif kırılmayı incelemek için GeneChip Human Exon 1.0 ST dizisini kullanarak farklı evrelerde kolon, mesane ve prostat kanserlerinden oluşan 102 normal ve kanser doku örneğinde tüm genom ekspresyonunu araştırmışlardır. Bu araştırmacıların yaptıkları çalışmada kolon, mesane ve prostatta ait normal ve kanser doku örnekleri arasında Alternatif Kırılma ile oluşturulmuş 2069 farklı aday molekül saptanmıştır. Ardından bu moleküllerin oluşturulmasından sorumlu olabilecek 115 ekleme olayını, RT-PCR ve sekanslama kullanılarak doğrulamaya çalışılmışlar ve bu bölgelerin içinden 10 olayı başarıyla doğrulamışlardır. Ardından, normal ve tümör doku örneklerinden oluşan bağımsız bir örnek setinde ($n = 81$) yine RT-PCR kullanarak bu 10 olayı incelediler ve *ACTN1*, *CALD1*, *COL6A3*, *LRRFIP2*, *PIK4CB*, *TPM1* ve *VCL* olmak üzere 7 farklı gende tümöre spesifik varyant olduğunu belirlediler. Doğrulanmış tümöre özgü varyasyonların normal ve kanser dokularını ve bazı durumlarda farklı tümör aşamalarını ayırt etmede tutarlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada *ACTN1*, *CALD1* ve *VCL* genlerinde saptanan ve bir alt grup olarak nitelendirilen tümöre-spesifik splicing varyasyonlarının kolon, mesane ve prostat olmak üzere her üç organda da gözlenmiş olması kanserle ilgili genel splicing olaylarını varlığını da kanıtlamıştır [25].

2.3. In-Siliko Tahmin Araçları

Fonksiyonel testler gerçekleştirmenin zor ve zahmetli olduğu durumlarda in siliko tahminler yapabilecek programlar kullanarak ekzon-intron bağlantı noktalarında değişimler olup olmayacağı tahmin edilebilmektedir [10]. Bu araçlar ile ilgili bilgiler Bölüm 3.2.9’da anlatılmaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta Materyali ve Deney

Çalışmada kanser hastalığı ve aile hikayesi nedeni ile 2015-2019 yılları arasında genetik test yaptırmak için İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Kanser Genetiği Polikliniği'ne başvurmuş, Meme, Bilateral Meme, Retinoblastoma, Bilateral Retinoblastoma, Over, Over+Rektum ve Nörofibromatozis gibi kanser türlerine sahip kişilerin periferik kan örneklerinden elde edilen lenfosit hücreleri kullanılmıştır. Çalışmaya ait deneyler Temel Onkoloji Anabilim dalı, Kanser Genetiği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir ve hastaların numunelerinde saptanan değişikliklerin kırılma hatası yapıp yapmadığı araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastalar ilgili gönüllü onam formunu okuyup imzalamışlardır ve çalışma öncesinde İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

Tablo 3.1-1: Hastalara ait Tanı ve Tanı Yaş bilgileri

Hasta Kodu	Tanı	Tanı Yaşı
R1170	Retinoblastoma	9 aylık
BR3119	Meme Ca.	25 y.
BR1775	Meme Ca.	49 y.
PN004	Kolon Ca.	48 y.
BR1697	Meme Ca.	34 y.
R1230	Bilat. Retinoblastoma	5 ay
BR2541	Bilat. Meme Ca.	44 y.
BR2361	Meme Ca.	31 y.
BR3172	Meme Ca.	33 y.
BR3214	Meme Ca.	28 y.
BR1590	Over Ca.	55 y.
BR1630	Over Ca.	35 y.

BR3215	Meme Ca.	35 y.
NF005	Nörofibromatozis	12 y.
BR2966	Over+Rektum Ca.	39 y.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Gliserol	[MERCK]
Magnezyum Klorür	[THERMO FISHER]
Borik Asit	[MERCK]
Trisma Base	[MERCK]
Bromfenol Blue	[SIGMA]
Sodyum Asetat (CH ₃ COONa)	[MERCK]
Etidyum Bromür	[SIGMA]
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	[THERMO FISHER]
DNA Ladder	[FERMENTAS]
EDTA	[SIGMA]
Agaroz	[SIGMA]
Dream Taq Polimeraz	[THERMO FISHER]
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	[ZYMO RESEARCH]
Primerler	[OLIGOMER]
Fikol	[SIGMA]
PCR Ürünü Saflaştırma Kiti	[SIGMA]
Dizi Analizi Kiti	[BECKMAN COULTER]
Separation Jel	[BECKMAN COULTER]
Separation Buffer	[BECKMAN COULTER]

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Derin Dondurucu (-30°C)	[SANYO]
Dizi Analizi Cihazı	[BECKMAN COULTER]
Etüvler (37°C ve 56°C)	[NÜVE]
İyonize Su Üretim Cihazı	[LABCONCO]
Jel Dökümantasyon Sistemi	[BRL]
Magnetik Karıştırıcı	[NÜVE]
Mikrodalga Fırın	[ARÇELİK]
Mikropipetler	[GILSON]
NanoDrop Spektrofotometre	[THERMO SCIENTIFIC]
pH metre	[GILSON]
Soğutmalı Ependorf Santrifüj	[HERAEUS]
SpeedVac Konsantratör	[LABCONCO]
Thermal Cycler	[BIORAD]
Ultra Derin Dondurucu (-80°C)	[SANYO]
Vorteks	[FINEPCR]
Yatay Agaroz Jel Elektroforez Sistemleri	[BIORAD]

3.2. Yöntem

3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

EDTA içeren tüplere alınan 10mL tam kan örnekleri, öncelikle 1 Hacim / 1 Hacim oranında %0,9'luk NaCl içeren izotonik ile sulandırıldı. Ardından kan örneği 2mL fikol içeren 15mL'lik Falcon tüplere yüklendi. Falcon tüpler oda sıcaklığında sallanan sepet tip rotor içinde 1500 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında eritrositler en alt fazda, plazma ise en üstte fazda ayrışırken, orta fazda lenfositler halka şeklinde ayrıştırıldı. Orta fazda yer alan lenfositler pastör pipet yardımı ile toplanarak temiz bir tüpe aktarıldı. Ardından lenfositler Phosphate Buffer Saline (PBS) çözeltisi ile yıkandı. 10mL PBS tamponu hücre pelleti üzerine eklendi ve

pipetaj yapılarak hücreler çözülür ve oda sıcaklığında 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjleme işlemi ile hücreler tekrar çöktürüldü ve PBS'ten uzaklaştırılarak öncelikle ilk 24 saat -80°C'de donduruldu, ardından uzun süreli saklamak üzere azotlu saklama tanklarına aktarıldı.

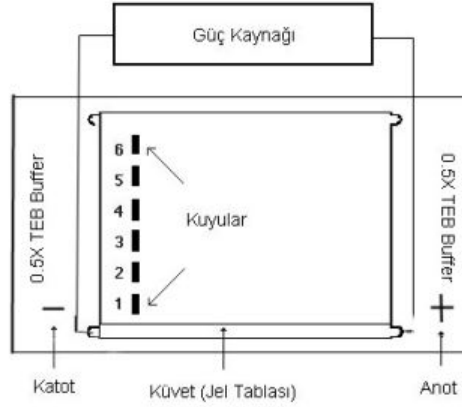
3.2.2. DNA ve RNA İzolasyonu

Periferik kandan izole edilen lökositler, kullanılan kit içindeki parçalama solüsyonu ile pipetlendi (Lysis Buffer). Lizat DNA filtresine aktararak santrifüjlendi ve DNA'nın filtreye tutunması sağlandı. Tüpün altında kalan sıvının içindeki RNA'yı çöktürmek için etanol eklendi ve yavaşça pipetlenerek tüm karışım RNA filtresine aktarıldı, santrifüjlendi. DNA ve RNA filtreleri yıkama solüsyonları ile yıkanarak santrifüjlendi, üzerlerine ayrıştırma solüsyonu eklenerek filtredeki DNA ve RNA'nın çözünmesi sağlandı. Filtrelerin altına ependorf tüpler konarak son santrifüj yapıldı, DNA ve RNA tüplere indirildi, kalite ölçümleri ve takip eden deneylerin yapılması için hazır hale getirildi.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Kit ile elde edilen DNA örneklerinden 1µL, RNA örneklerinden 3µL alınarak 5µL Bromofenol Blue (BFB) yükleme tamponu ile karıştırıldı ve agaroz jele yüklendi. Güç kaynağı 150V'a ayarlanıp elektroforez başlatıldı ve 25dk boyunca yürütüldü. Elektroforez işlemi sonucunda DNA ve RNA batları UV altında görüntülendi. DNA ve RNA'nın sağlam olduğu belirlendikten sonra DNA örnekleri -30°C de, RNA örnekleri ise alikotlanarak -80°C'de saklanmak üzere kaldırıldı. PCR reaksiyonu sonrasında amplifikasyon kontrolleri %1 Agaroz Jel'de yürütülerek yapıldı.

- %1 Agaroz Jel Hazırlanması
 - 2,5 gr Agaroz
 - 250 mL 0,5X TEB Buffer
 - %5 Etidyum Bromür (10mg/mL)



Şekil 3.2-1: Horizontal agaroz jel elektroforezi düzeneği

3.2.4. cDNA Sentezi

Reverse transkriptaz enzimi (RT), mRNA'yı baz alarak komplementer DNA'yı (cDNA) oluşturan RNA-bağımlı bir DNA polimeraz enzimidir. cDNA sentezi, reverse transkriptaz enzimi ile oluşturulan bir reaksiyonudur. Çalışmada, cDNA sentezi için kiti "TAKARA PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit" kullanıldı. cDNA oluşturma işlemi aşağıda belirtilen kit kullanım uyarılarına uygun olarak gerçekleştirildi.

cDNA reaksiyonu için, tablodaki miktarlar kullanılarak ilk karışım hazırlandı.

Oligo dT Primer (50 μ M)*	1 μ L
dNTP Mixture (10 mM her biri)	1 μ L
Kalıp RNA	≤ 5 μ g (total RNA) or ≤ 1 μ g (mRNA)
RNase-içermeyen dH ₂ O	10 μ L' ye tamamla

- 1- Karışım 65°C'de 5 dakika inkübe edilir ve ardından hemen buza alınır.

2- İkinci karışım tablodaki içeriğe göre hazırlanır ve üzerine eklenir.

5X PrimeScript Buffer	4 µL
RNase İnhibitörü	20 Ünite
PrimeScript RT	100 to 200 Ünite
RNase-içermeyen dH ₂ O	20 µL' ye tamamla

3- Hazır olan karışım 30°C'de 10 dakika, 42°C'de 30-60 dakika boyunca inkübe edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen cDNA -20°C'de saklandı.

3.2.5. RT-PCR Reaksiyonu ve Pürifikasyonu

Reaksiyonu gerçekleştirmek için 0,2 mL tüp içine cDNA'lar Taq polimeraz enzimi, dNTP, MgCl, Forward ve Reverse Primerler, dH₂O, enzime ait buffer ve ilgili gen bölgesine özgü primerlerle (Tablo 3.2-3) birlikte Tablo 3.2-1'de görülen içeriğe ve Tablo 3.2-2'de görülen koşullara göre termal döngü cihazı kullanılarak çoğaltıldı.

Tablo 3.2-1: PCR Reaksiyonu İçeriği

PCR içeriği Dream Taq için	
10X PCR Buffer	5 µL
10mm dNTP Mix	0,5 µL
30mM F Primer	0,5 µL
30mM R Primer	0,5 µL
5U/µL Dream Taq	0,5 µL
cDNA Sample	3,5 µL
dH ₂ O	39.5 µL

Tablo 3.2-2: PCR Koşulları

PCR koşulları			
	PCR Adımları	Sıcaklık (°C)	Süre
	Başlangıç Denatürasyonu	94°C	4dk.
2x Döngü			
	Denatürasyon	94°C	20sn.
	Yapışma	65°C	20sn.
	Uzama	72°C	90sn
2x Döngü			
	Denatürasyon	94°C	20sn.
	Yapışma	60°C	20sn.
	Uzama	72°C	90sn
40x Döngü			
	Denatürasyon	94°C	30 sn
	Yapışma	56°C	30 sn
	Uzama	72°C	180sn
Reaksiyon Sonu 4°C ∞			

Tablo 3.2-3: Varyantların analizinde kullanılan primer dizileri

Hasta Kodu	Gen	Varyant	Gen Ref No	Primer Adı	konumu	5' - 3'	
4.1	R1170	RB1	c.2489+2T>C	NM_000321.2	RBcDNAEX21F RBcDNAEX25R CHEK2EX12F1	c.2190_c.2211 c.2639_c.2660 c.1290_c.1390	TCTTCCTCATGCTGTCCAGGAG CCATCTGCTTCATCTGATCCTT CCCCACCTACTTGGCGCCTG
4.2	BR3119	CHEK2	c.1556C>T	NM_001005735.1	CHEK2EX16R1 CHEK2INT14F1 CHEK2INT14R1	c.1682_1701 c.1505-75_c.1505-55 c.1590+53_c.1590+72	TTCACGGGGCGCGCTTCGCAG CCTGTAAATCTGGCATACTC CTCTGCTCATGTCTCTCAG
4.3	BR1775	BRCA1	c.5152+5G>A	NM_007294.3	BRCA21R1 PTBR16F2	c.5298_c.5317 c.4715_c.4736	TGAAGGGCCCATAGCAACAG CTGATGACCCTGAATCTGATCC
4.4	PN004/7	APC	c.532-1G>A	NM_000038.4	APCEX4F2 APCEX8R2	c.281_c.300 c.805_c.824	GTTCTTATGGAAGCCGGGAA CCAGAAGTTGCCATGTTGAT
4.5	BR1697	BRCA2	c.9117+9C>T	NM_007294.3	PAIN24R1 PAEX25R1 PAIN24R2 PAIN23F1 PAIN22F PAIN22F3 PAEX24R2 PAEX24R1 RB1EX8F2 RB1EX13R2	c.9256+96 c.9392_c.9412 c.9256+47_c.9256+70 c.9115_c.9117+19 c.8954-44 c.8954-55 c.9203 c.9227 c.759_c.777 c.1289_c.1309	TTTGCCAACCTGGTAGCTCCAAC AAGTAAGAAGGCTGATTGG CATAAGAGATTTTAAAGACAATG CCGGTACAAACCTTTCAITGTA TAATCACTTCTTCATTGCA CATTTAAATGATAATCACTTC GATGGCTGAAAGCTGGATCTA CCTATTAGGTCCACCTCAGAAC CAGGCGAGGTGAGAACAGG CCTGTCCCACAGCTTTAGCAA
4.6	R1230	RB1	c.1050-2A>G	NM_000321.2	RBcDNAEX5-6F RBCDNAEX13- RB1EX13R2 RB1EX11F2	c.529 c.1348_c.1329 c.1289_c.1309 c.1050-156_c.1050-	ATCGAACTGCTGGGTGTGT CTCCAAGTTTGTATCGCTGT CCTGTCCCACAGCTTTAGCAA CAGCAGCTGGGTCTATCTATT
4.7	BR2986 / BR2541	BRCA2	c.7436-1G>C	NM_007294.3	BR2P14F1 BR2P16R2	c.7021 c.7620	CGTCAAGAGATACAGAATCC CAGCTGTTTATGAGAACACG
4.8	BR2361	BLM	c.4076+4T>G	NM_001287246.1	BLMcDNAEX19F1 BLMcDNAEX22R1	c.3620_c.3639 c.4192_c.4220	AAGTGTCTCAGAGGGAAGAGA GCTTCGGTGGAGCCATAAT
4.9	BR3172	NBN	c.71A>C	NM_002485.4	NBN5UTRF1 NBNE4-5R1	c.-43_c.-27 c.468_c.490	TTACGCGGTTGCACGTC CACATATTGTTTAAATGTTAACT
4.10	BR3214	FANCD2	c.1278_1278+3delAGTA	NM_033084.3	FANCD2-13F FANCD2-18R BRINT14F1 BRINT14R3	c.1013_c.1034 c.1626_c.1643 c.4358-185_c.4358- c.4395	GCGGTGAGAGCTGTATTATTCT CTGCTGGCTTCATTCTGTTTG CCATTTGGTGCTAGCATCTGTCTG CCATTTGGTGCTAGCATCTGTCTG
4.11	BR1590-BR1630	BRCA1	c.4358-3A>G	NM_007294.3	SEQ1EX13F1 BRCA16R2 CHEK2EX6F1 CHEK2EX6F2	c.4271_c.4294 c.4742_c.4761 c.808_c.830 c.803_c.822	AGCCTTCTAACAGCTACCTTCCA TGACTCTGGGCTCTGTCTT GATCTGACTGTAGATGATCAGTC CTCTTGAAGTGGTGCTCTGT
4.12	BR3215	CHEK2	c.921+2T>A	NM_001005735.1	CHEK2EX10R1 CHEK2EX11R1	c.1068_c.1087 c.1192_c.1216	TCAGGCGTTTATTTCCACC GACAGTCTCTCTTCTTGAGATGACAG
4.13	NF005	NF1	c.2351G>C	NM_000267.3	NF1EX18F2 NF1EX21R1 BR2P2F1 SEQ2EX4R1	c.2086_c.2105 c.2657_c.2676	TGGAACCTGACACTGAAGC GCTGACAGGTGTATCTGCGT GCTAATACGACTCACTATAGGAACAGACCACCATGATGATG
4.14	BR2966	BRCA2	c.68-7T>A	NM_007294.3	SEQ2EX5R1 PAIN15F3 BR2P19R1		AAGTGGACAGGAAACATCATCTGC CAAACCTCCACATACCACTGACT GCAGAGTCTTTTCAGTTTCACACTG CACAAACCACTTTCTCTCA

3.2.6. DTCS Reaksiyonu ve Pürifikasyonu

Her gene bölgesine özgü PCR ürünleri dizileme işlemi reaksiyonu öncesi saflaştırılır. Saflaştırma işlemi High Pure PCR Product Purification Kit ile, firma tarafından bildirilen yöntem kullanılarak saflaştırıldı. Her bir PCR ürünü saflaştırma işleminden sonra saflaştırılmış PCR ürünlerinin kolonda kalıp kalmadığının kontrolü için agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Yeterli miktarda olduğu anlaşılan PCR ürünü daha sonra DTCS reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C de saklandı ya da dierekt olarak kullanıldı. Saflaştırılmış PCR ürünü DTCS reaksiyonuna tabi tutuldu. DTCS reaksiyonu için dizilenecek bölgenin büyüklüğüne göre belli bir miktar PCR ürünü kullanılmaktadır. Buna göre 1kb'lık bir bölgenin dizilenmesi için saflaştırılmış 25ng PCR ürünü kullanıldı. DTCS reaksiyon karışımı Tablo 3.2-4'te belirtildiği şekilde yapıldı.

Tablo 3.2-4: PCR Reaksiyonu İçeriği

Saflaştırılmış PCR ürünü - kilobaz başına	25 ng
DTCS Quick Start Kit master mix:	8.0 µL
Dizileme Primeri 1.6pmol/µL:	2.0 µL
dH ₂ O:	8,3 µL

3.2.7. PCR ürünü saflaştırma ve Sanger Dizileme işlemi

DTCS reaksiyonunun ardından ikinci bir saflaştırma işlemi yapıldı. Bu saflaştırma işlemi sonrası da PCR ürünlerinin varlığı ve dizileme işlemi için yeterliliği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Ardından örnekler dizi analizi işlemi için laboratuvarımızda bulunan Beckman Coulter (CEQ 8000) dizi analizi cihazında dizilenmek üzere hazır edildi. Dizi analizi işlemlerinde DTCS reaksiyonundan hemen sonra, reaksiyon ürünü 1:2:2 oranında glikojen sodyum EDTA-sodyum asetat karışımı ile muamele edilerek reaksiyon durduruldu. Ürüne 60µL %95 soğuk etanol eklenerek 14.000 rpm'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Üst faz atılır, pellete 200µL %70 30 soğuk etanol eklenir ve 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüjlendi. Tüp içindeki alkol pipet yardımıyla toplandı ve tüpün dibinde kalan pellet vakumlu konsantratör yardımı ile alkolün tam olarak uçması için kurutuldu. Kurutulan pellet üzerine 40µL Sample Loading Solution (SLS) tamponu eklenerek çözüldü. Çözülen örnek Beckman Coulter

dizi analizine özel plate'e yüklenerek makineye yerleştirildi. Fragmanların büyüklüğüne uygun programlar seçilerek okunmaya bırakıldı. Makinedeki okuma işleminin ardından Beckman Coulter CEQ 8000 Analysis Software kullanılarak analiz edildi. Analiz edilen örnekler referans gen dizisi ile karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirildi.

3.2.8. Dizileme sonuçlarının okunması

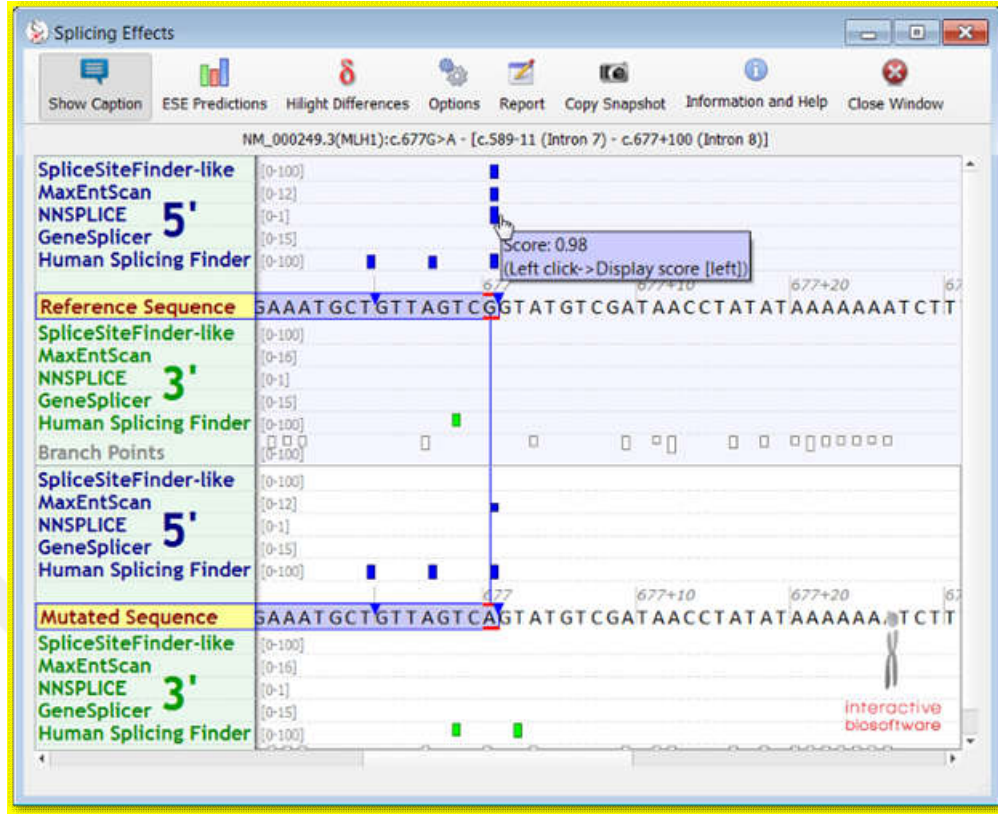
Kapiller elektroforez cihazından alınan dizi analizi dataları, cihaz üzerindeki Genome Analyser ile okundu ve elektroferogram görüntüsü Alamut üzerindeki referans gen dizileri ile karşılaştırılarak kontrol edildi.

3.2.9. Biyoinformatik Araçlar ile Splicing kontrolü

Yeni nesil dizileme yöntemleri ile DNA üzerinde varlığı tespit edilmiş, gen üzerinde meydana geldiği konum nedeni ile mRNA kırılması açısından risk oluşturabileceği tahmin edilen ya da biyoinformatik analiz araçları ile incelenmesinin ardından kırılma hatası oluşturma riskine sahip olduğu tahmin edilen çeşitli mutasyonların (Single Nucleotide Polymorphisms=SNPs) RNA üzerinde değişim yaratıp yaratmadığını ortaya koymak üzere çok farklı biyoinformatik araçlar kullanılmaktadır. Kırılma bölgelerini ve varyantların bu bölgelerde değişikliğe neden olup olmadığını öngörmek için SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, GeneSplicer, NNSPLICE, Human Splicing Finder gibi araçlar kullanılmaktadır. Ekzonik kırılma kolaylaştırıcı (Exonic Splicing Enhancer) bölgelerini tahmin etmek için kullanılan iki temel araç olarak ESEFinder ve RESCUE-ESE kullanılabilir. EX-SKIP isimli araç da mutant allel ile referansı karşılaştırarak "ekzon skipping" ihtimalini değerlendirmektedir. Tüm bu in-siliko araçlar Alamut® Visual ile entegre olarak da çalışmaktadır ve çalışmamızda yapılan hesaplamalarda Alamut® Visual üzerinden kullanılmıştır.

3.2.9.1. Alamut Splicing Tahmin Modülü Kullanımı

Splicing tahmin ekranını açmak için "Splicing Window" butonuna tıklanarak varyant ekranından splaying tahmin ekranına gidilir. Açılan ekran şekildeki gibidir (Bkz. Şekil 3.2-3)



Şekil 3.2-2: Alamut Programı Splicing Tahmin Ekranı

Bu pencerede “wild type” ve mutant dizilere ait tahminler görüntülenmektedir. Mavi kutular ekzonları ifade eder. SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer ve HumanSplicingFinder’den gelen skorlar 5’ donör alanlar için mavi dikey çubuklar, 3’ akseptör alanlar için yeşil dikey çubuklar halinde ifade edilir. Konsensus sinyaller küçük mavi ya da yeşil üçgenler olarak görülmektedir. Her çubuğun yüksekliği karşılık gelen algoritma tarafından hesaplanan maksimum olası puanla orantılıdır. Wildtype ve mutasyona uğramış diziye ait skorların farklarını görüntülemek için „Highlight Differences“ butonu kullanılır ve skorlardaki artış ya da azalmalar belirgin şekilde görünür hale getirilir. Ayrıca bu skor farkları rapor ekranında da görüntülenebilir (Bkz. Şekil 3.2-4). Araçlara ait eşik değerleri Şekil 3.2-5’te gösterildiği gibidir [26].

Donor Sites					
	SSF [0-100]	MaxEnt [0-12]	NNSPLICE [0-1]	GeneSplicer [0-15]	HSF [0-100]
Threshold	≥ 70	≥ 0	≥ 0.4	≥ 0	≥ 65
Exon 15 – c.1190		= 0.46			= 66.69
Exon 15 – c.1203					= 69.57
Exon 15 – c.1278	75.22 $\Rightarrow$ —	7.79 $\Rightarrow$ —	0.96 $\Rightarrow$ —		79.73 $\Rightarrow$ —
Intron 15 – c.1278+2					— $\Rightarrow$ 75.96
Intron 15 – c.1278+6					75.96 $\Rightarrow$ —
Intron 15 – c.1278+57					= 74.63

Natural Splice Site

Acceptor Sites					
	SSF [0-100]	MaxEnt [0-16]	NNSPLICE [0-1]	GeneSplicer [0-15]	HSF [0-100]
Threshold	≥ 70	≥ 0	≥ 0.4	≥ 0	≥ 65
Exon 15 – c.1203					= 84.00
Exon 15 – c.1212					= 67.36
Exon 15 – c.1219					= 67.06
Exon 15 – c.1229					= 80.64
Exon 15 – c.1241					= 75.38
Exon 15 – c.1246					= 78.53
Exon 15 – c.1255					= 83.60
Exon 15 – c.1257					= 74.66
Intron 15 – c.1278+2	= 74.02	4.63 $\Rightarrow$ 6.68 (+44.1%)			77.32 $\Rightarrow$ 77.49 (+0.2%)
Intron 15 – c.1278+6					72.60 $\Rightarrow$ —
Intron 15 – c.1278+12					75.88 $\Rightarrow$ 80.91 (+6.6%)
Intron 15 – c.1278+14					70.19 $\Rightarrow$ 74.10 (+5.6%)
Intron 15 – c.1278+39	= 73.42	= 5.92			= 76.93

Şekil 3.2-3: Donör ve Akseptör Bölgelerdeki Skorların Karşılaştırma Raporu

Splicing Predictions Options

Splice Site Predictions

	5' (Donor)	3' (Acceptor)
☒ SpliceSiteFinder-like	70 [0-100]	70 [0-100]
☒ MaxEntScan	0 [0-12]	0 [0-16]
☒ NNSPLICE	0.4 [0-1]	0.4 [0-1]
☒ GeneSplicer	0 [0-15]	0 [0-15]
☒ Human Splicing Finder	55 [0-100]	55 [0-100]
☒ Branch Points	0 [0-100]	

ESE Predictions

ESEfinder Settings

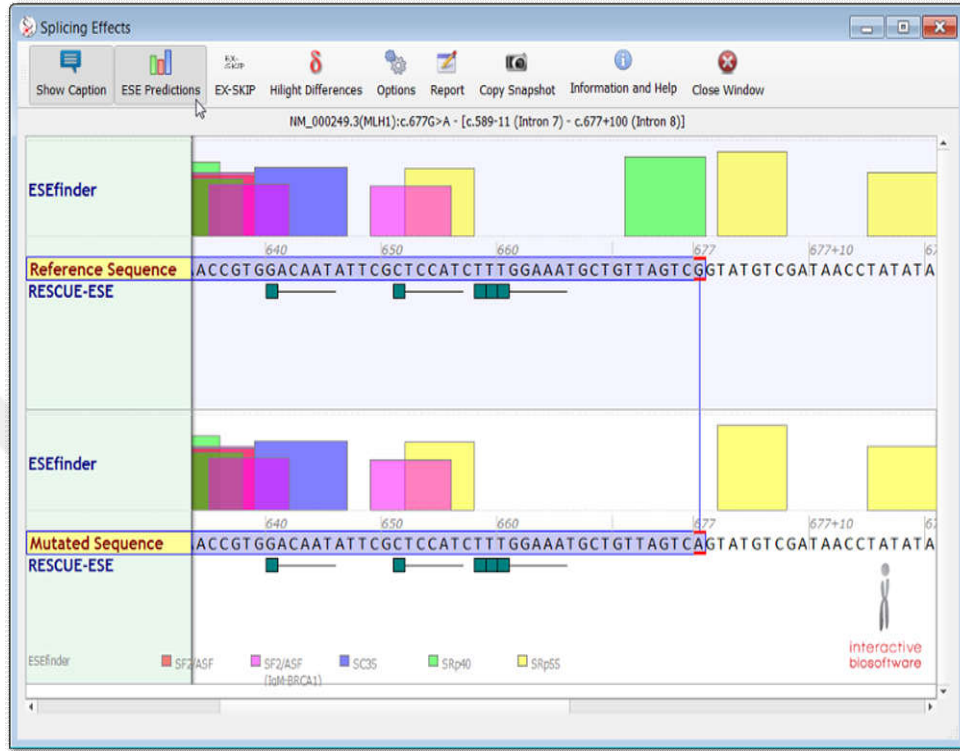
	Threshold	Def. value
☒ SF2/ASF	1.956	Def. value
☒ SF2/ASF (IgM-BRCA1)	1.867	Def. value
☒ SC35	2.383	Def. value
☒ SRp40	2.67	Def. value
☒ SRp55	2.676	Def. value

☒ RESCUE-ESE hexamers (See the [RESCUE-ESE](#) web site.)

Save Options Reset to Default Apply Close

Şekil 3.2-4: İn Siliko Araçların Eşik Değerleri

ESEfinder ve RESCUE-ESE analiz sonuçlarını görmek için “ESE Predictions” butonu kullanılır. ESEfinder sonuçlarını dizinin üzerindeki kutular ile, RESCUE-ESE ise dizinin altındaki küçük kutular ile ifade eder (Bkz. Şekil 3.2-6)

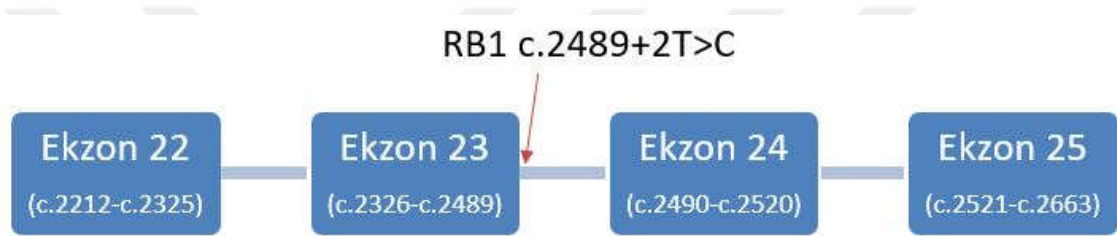


Şekil 3.2-5: ESEfinder ve RESCUE-ESE sonuç ekranı

4. BULGULAR

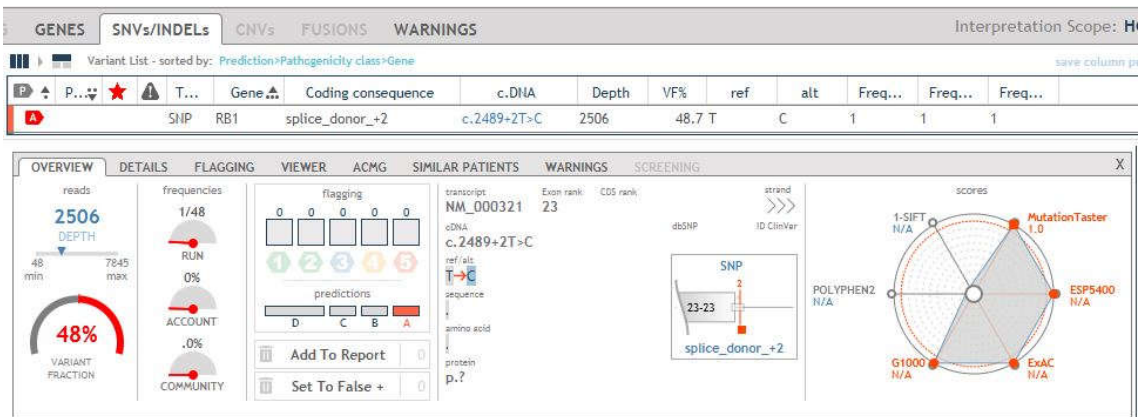
4.1. *RB1* Genindeki c.2489+2T>C Değişikliği

R1170 kodlu hasta, 9 aylıkken Retinoblastoma tanısını alıp, 13 aylıkken kanser genetiği polikliniğine *RB1* gen testi için gönderilmiştir. Hastanın tüm gen *RB1* geni dizilemesi sonucunda *RB1* geninde c.2489+2T>C intronik missense değişikliğine rastlanılmıştır. Bu hastanın dedesinin sağ gözünde sebebi bilinmeyen kısmi görme kaybı haricinde, ailesinde retinoblastoma hastalığı hikayesi bulunmamaktadır. c.2489+2T>C mutasyonu 23. Ekzonun bitiminden 2 baz sonra konumlanmış bir değişikliktir (Bkz. Şekil 4.1-1).



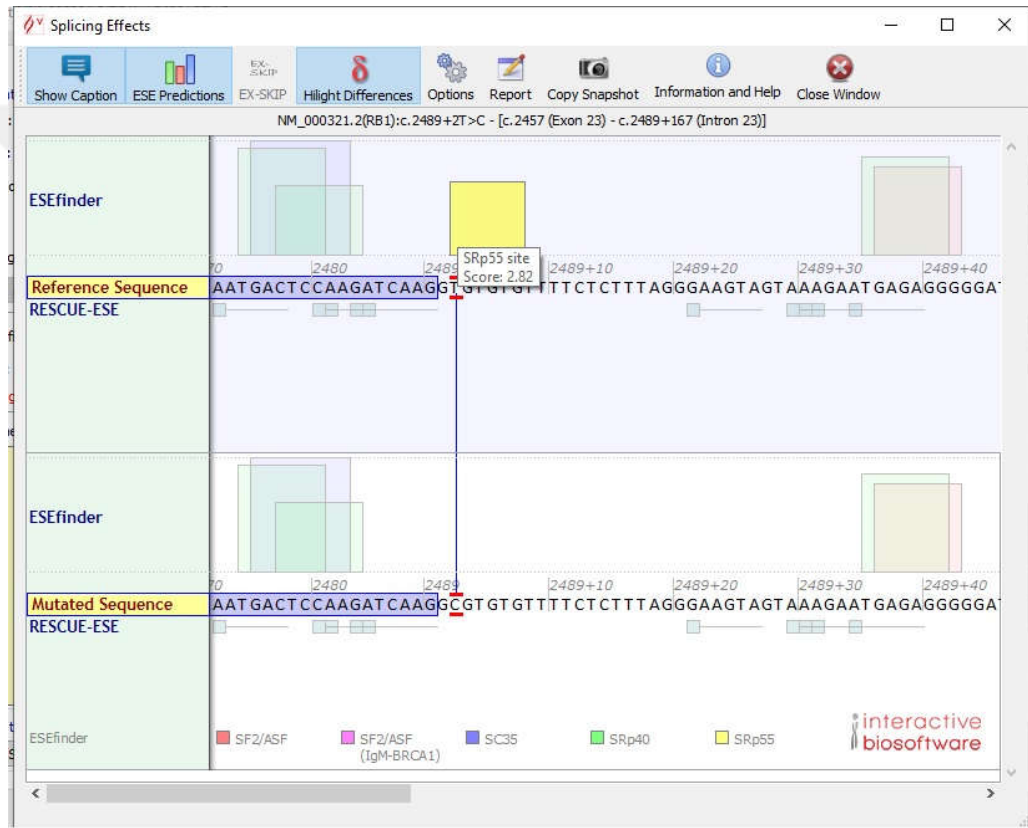
Şekil 4.1-1: *RB1* c.2489+2T>C'nin Ekzonlar Arasındaki Konumu

Tüm *RB1* geni dizileme sonuçlarının analiz edildiği Sophia DDM programında, program kullanıcıları arasında yapılan toplam 13174 testte sadece R1170 kodlu hastanın *RB1* geninde rastlanan c.2489+2T>C'nin patojenik bir mutasyon olabileceği işaret edilmiştir (Bkz. Şekil 4.1-2) [27].



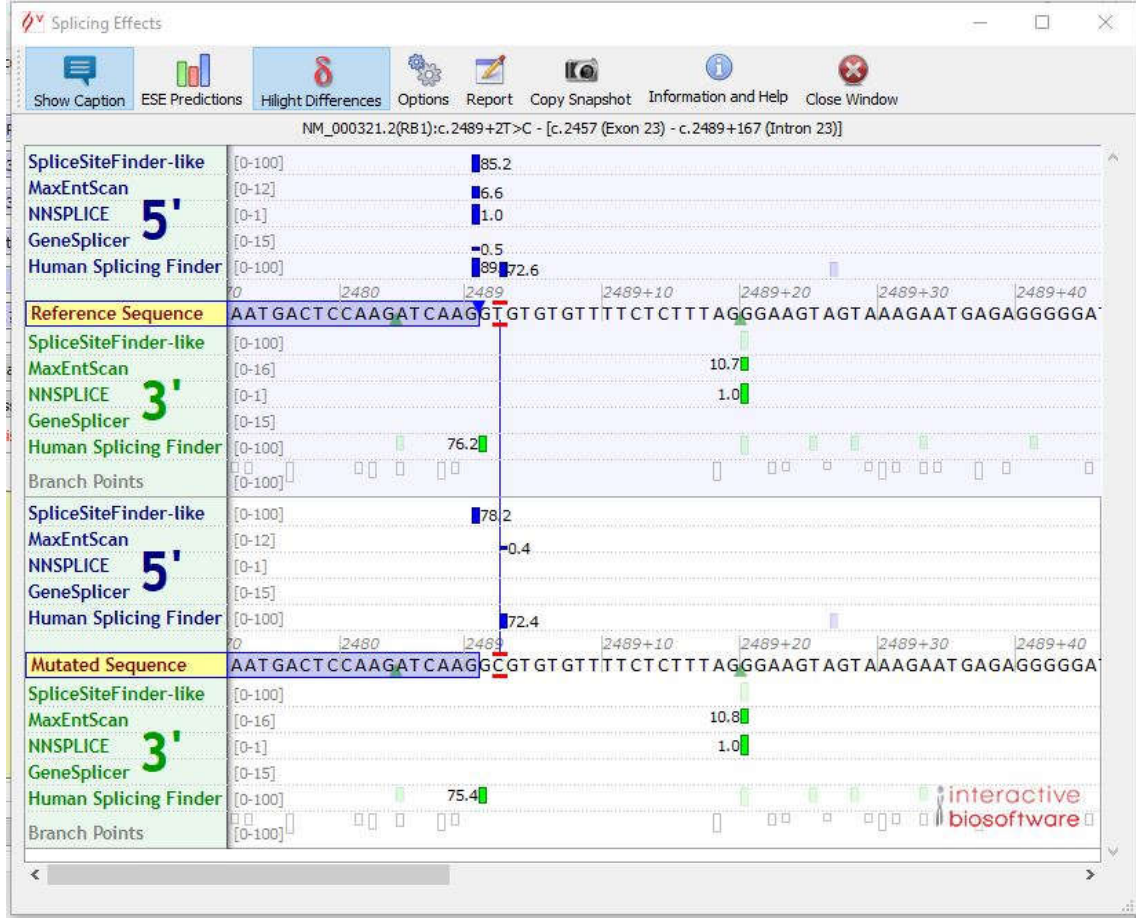
Şekil 4.1-2: *RB1* genindeki c.2489+2T>C Değişikliğinin Sophia DDM Programı ile Analiz Sonucu

SNP'in ileri analizlerini gerçekleştirmek için kullanılan Alamut programı, bu missense mutasyonun mRNA'da kırılma hatasına sebep olarak ekzon 23'ü atlatması olasılığının yüksek olduğu yönünde bir hesapama yapmıştır. Program dahilinde erişim gerçekleştirilen RESCUE-ESE aracının analiz sonuçları normal görülürken, ESEfinder ile yapılan tahmin sonuçlarına göre, normal durumda var olan SRp55 bölgesinin "T" nükleotisinin "C" nükleotidine değişiminin ardından kaybolduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.1-3)[28].



Şekil 4.1-3: RBL genindeki c.2489+2T>C mutasyonunun RESCUE-ESE ve ESEfinder analiz sonuçları

SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSplice, GeneSplicer, Human Splicing Finder gibi diğer beş araç tarafından yapılan analiz sonuçlarına göre donör ve akseptör bölgelerde meydana gelebilecek olası bölge değişiklikler ise Şekil 4.1-4'te gösterildiği gibidir.

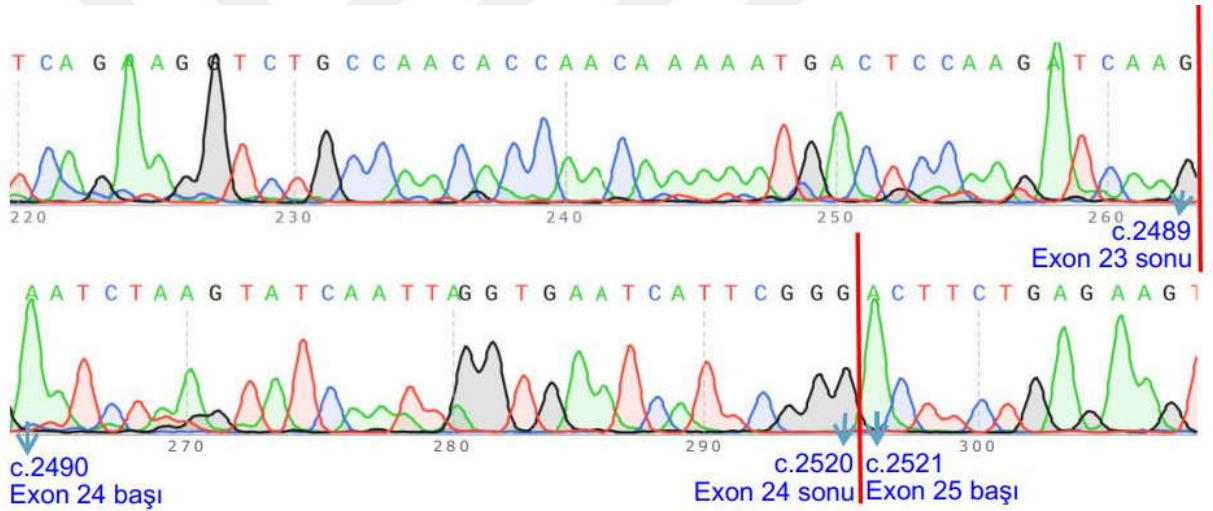


Şekil 4.1-4: SNP öncesi ve sonrasında Donör ve Akseptör bölgelerdeki olası değişiklikler

DNA örneğinde *RB1* geninde c.2489+2T>C taşıyan hastanın RNA'sında bir kırılma hatası meydana gelip gelmediğini görebilmek için RBcDNAEX21F ve RBcDNAEX25R primerleri kullanılarak yapılan cDNA PCR'ı sonucu **Şekil 4.1-5'te** görüldüğü gibi, kontrol örneğindeki bant ile aynı baz uzunluğundadır. Örneğin dizilenmesi sonucunda SNP'in hata gerçekleştirilmesi beklenen ekzon 23-24 ve 25 geçiş bölgelerinde herhangi bir ekzonun atlanmadığı ve bu bölgede dizinin normal olduğu gösterilmiştir (Bkz. **Şekil 4.1-6**).



Şekil 4.1-5: R1170 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin % 1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü



Şekil 4.1-6: R1170 kodlu hastanın RNA üzerinden yapılan dizileme sonucu

Çalışma başladığında incelemeye dahil edilen *RBI* c.2489+2T>C hakkında ClinVar bilgi bankasında “Likely Pathogenic” yani “Zararlı Olabilir” etiketi bulunmakla birlikte tekrarlanan bilgi bankası taramaları sonucunda 2019 yılının Aralık ayında bu etiketin “Patojenik” yani “zararlı” olarak güncellendiği görülmüştür (RCV000532339.3) [29]. Ancak Human Genome Mutation Database (HGMD) isimli bilgi bankasında ise bu mutasyon hakkında herhangi bir kaydına rastlanmamaktadır [30]. Hakkında hala tartışmalı bir durum söz konusu olan bu değişikliğin hastaya ait mRNA üzerinden

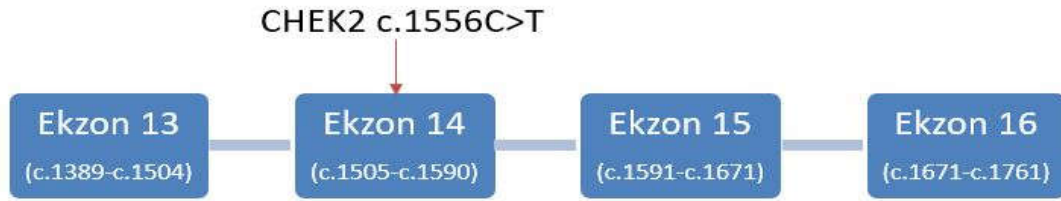
yapılan çalışmalardan çıkan sonuçlarımız doğrultusunda “zararsız” yani “normal” olduğu düşünülmektedir.



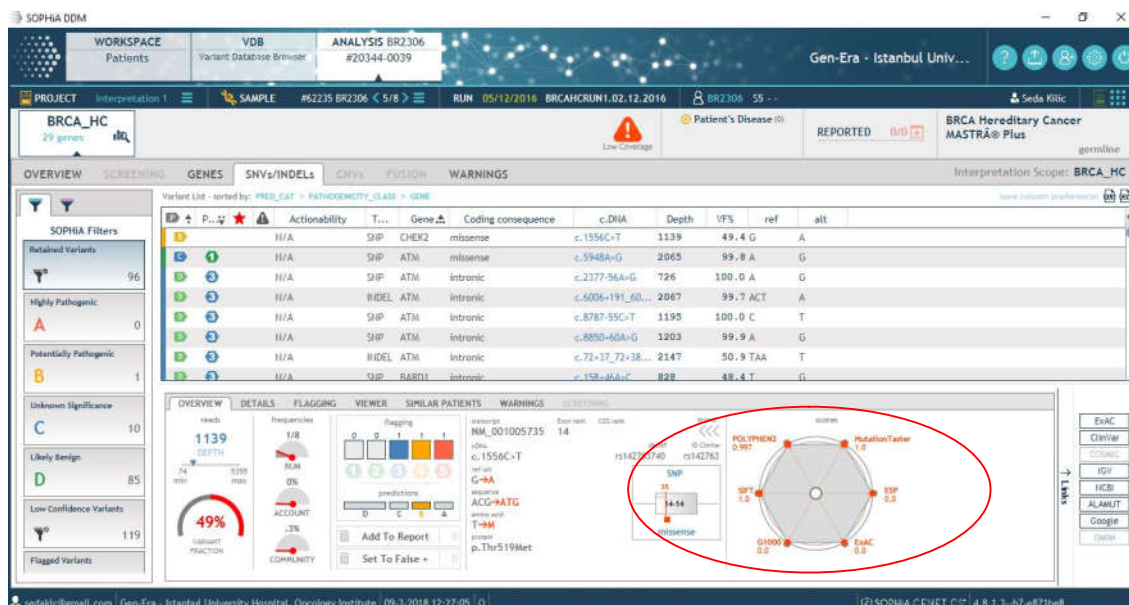
4.2. *CHEK2* Geni c.1556C>T Değişikliği

BR3119 kodlu, 25 yaşında meme kanseri tanısı almış hasta kurumumuzdaki Kanser genetiği polikliniğine rutin uygulama kapsamında genetik analiz yaptırmak için polikliniğimize başvuran hastanın *CHEK2* gen dizilemesi sonucunda c.1556C>T ekzonik missense değişikliğini taşıdığı saptanmıştır. Hastanın dördüncü derece akrabaları arasında 48 yaşında meme kanseri ve 60 yaşında rahim kanseri öyküsü olan iki akrabası olduğu görülmüştür.

CHEK2 c.1556C>T missense değişikliği, 14. ekzonun orta bölgesinde bulunmakta ve 519. Aminoasit olan Threonin'in Metionin'e dönüşmesine neden olmaktadır (**Bkz. Şekil 4.2-1**). Bu missense mutasyon daha önce Sophia DDM kullanıcılarının yaptığı 72526 testte 165 kez bulunmuş ve merkezimizde yapılan 136 testte ilk kez görülmüş olan bir değişiklikti. Sophia DDM'deki verilere göre in-siliko analiz sonuçları söz konusu değişikliğin patojenik olabileceğine işaret ettiğinden incelemeye dahil edildi (**Bkz. Şekil 4.2-2**).

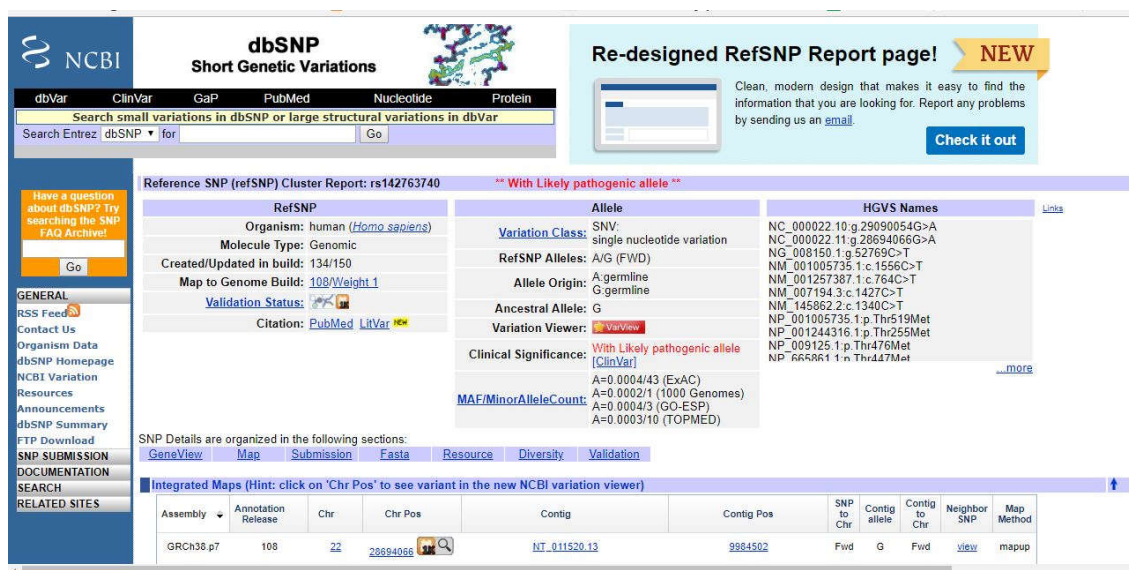


Şekil 4.2-1: *CHEK2* genindeki c.1556C>T değişikliğinin gen üzerindeki konumu



Şekil 4.2-2: *CHEK2* c.1556C>T için SIFT, Polyphen, MutationTaster gibi in-siliko araçlar tarafından gösterilen risk diyagramı

Bilgi bankalarında *CHEK2* genindeki c.1556C>T değişikliği için yapılan aramalarda dbSNP bilgi bankasında “Likely Pathogenic” etiketi olduğu ve ClinVar bilgi bankasında “Conflicting (Çelişkili)” etiketi ile bildirildiği görülmektedir. Minör allel frekansı verileri incelendiğinde oldukça nadir rastlanan bir değişiklik olduğu görülmektedir (**Bkz. Şekil 4.2-3**).



Şekil 4.2-3: *CHEK2* genindeki c.1556C>T değişikliğinin dbSNP bilgi bankasındaki kaydı

CHEK2 genindeki c.1556C>T değişikliğinin EX-SKIP programı ile analizi sonucunda kırılma esnasında mutant allelin normal diziye göre ekzon atlama ihtimalinin daha yüksek olduğu gösterildi (Bkz. Şekil 4.2-4) [31].



EX-SKIP - Results for submitted sequences

Seq	PESS (count)	FAS-ESS hex2 (count)	FAS-ESS hex3 (count)	IIE (count)	IIE (sum)	NI-ESS trusted (count)	NI-ESS all (sum)	PESE (count)	RESCUE -ESE (count)	EIE (count)	EIE (sum)	NI-ESE trusted (count)	NI-ESE all (sum)	ESS (total)	ESE (total)	ESS/ESE (ratio)
WT	0	2	2	12	175.8340	6	-9.9375	10	9	18	303.1823	23	28.7766	22	60	0.37
MUT	1	2	2	13	228.4431	7	-10.8827	10	9	19	318.4764	21	27.2210	25	59	0.42

Allele MUT has a higher chance of exon skipping than allele WT.

Thank you for using EX-SKIP.

Submitted sequences

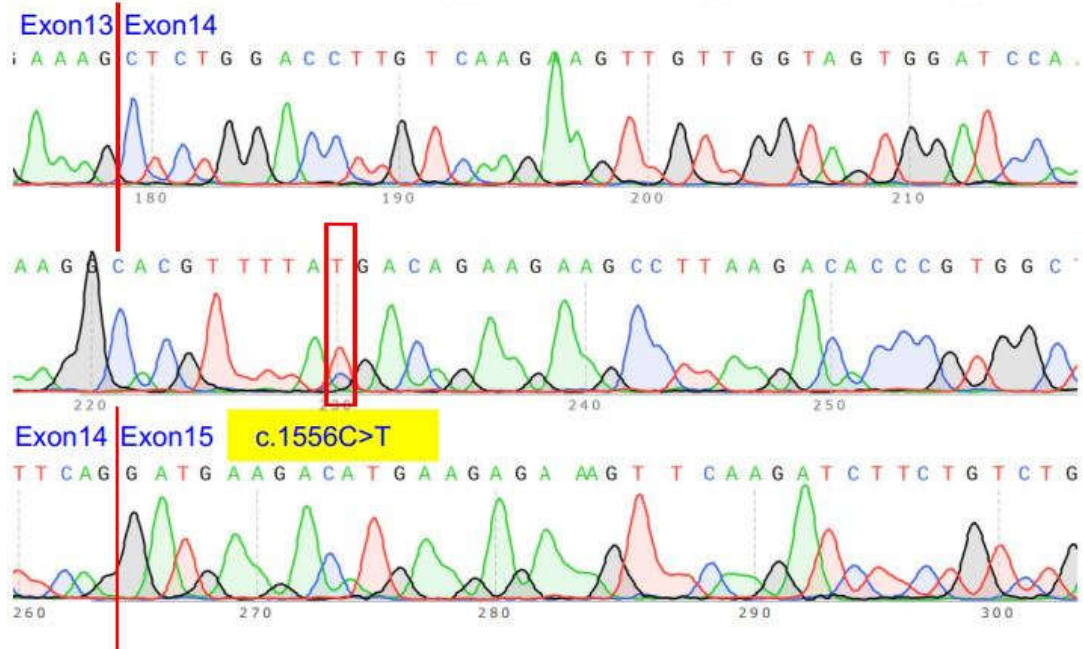
```
>WT
TGTTGGTAGTGGATCCAAAGGCACGTTTACGACAGAAGCCTTAAGACACCGTGCT
>MUT
TGTTGGTAGTGGATCCAAAGGCACGTTTATGACAGAAGCCTTAAGACACCGTGCT
```

Şekil 4.2-4: *CHEK2* genindeki c.1556C>T değişikliğinin EX-SKIP programı ile yapılan analiz sonucu

Bu nedenle söz konusu mutasyonun hastanın RNA'sında bir kırılma hatası meydana getirip getirmediğini göstermek üzere *CHEK2* geninin ilgili bölgesi CHEK2INT14F1 ve CHEK2INT14R1 olarak adlandırılan ve bölgeye özgü primerler kullanılarak Splice error yapıp yapmadığının anlaşılması amacıyla RNA üzerinden dizilendi (Bkz. Şekil 4.2-5). Değişik bölgesi hastaya ait RNA ve buna ilişkin cDNA üzerinden CHEK2EX12F1 ve CHEK2EX16R1 primerlerini kullanılarak önce PCR ile çoğaltıldı ve ardından Sanger dizileme yapıldı. Dizileme işlemi sonucunda ilgili bölgeyi içine alan noktalarda ekzon 12-13-14 ve 15 geçişlerinin normal olduğu belirlendi (Bkz. Şekil 4.2-6).



Şekil 4.2-5: BR3119 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

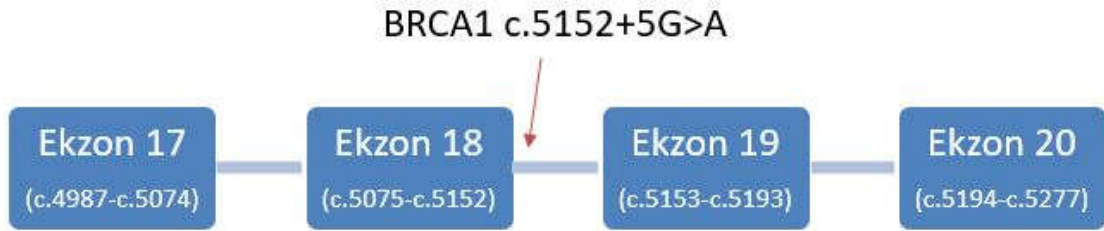


Şekil 4.2-6: BR3119 kodlu örneğin Sanger ile cDNA dizileme sonucu

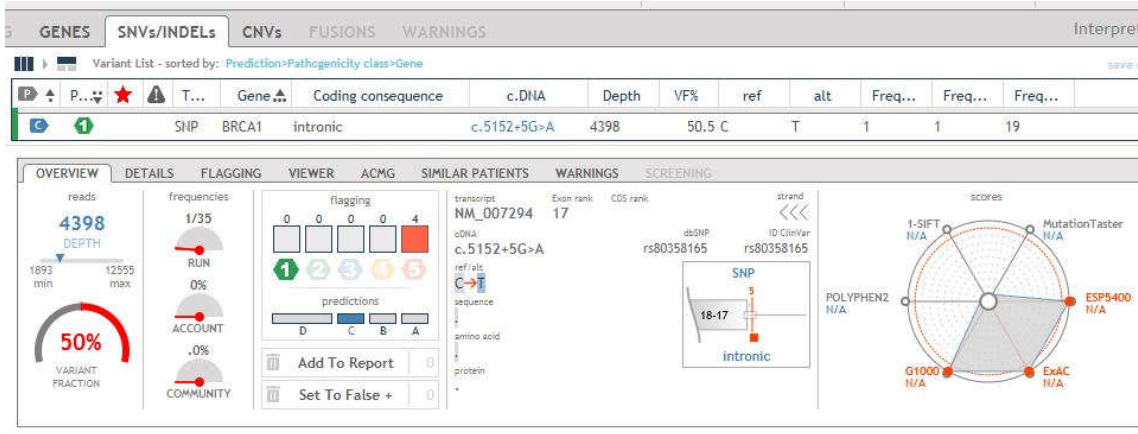
4.3. *BRCA1* Genindeki c.5152+5G>A Değişikliği

BR1775 kodlu, 49 yaşında meme kanseri tanısı almış hastanın *BRCA1* geni dizilemesi sonucunda c.5152+5G>A intronik missense değişikliğine sahip olduğuna belirlenmiştir. Hastanın birinci derece akrabaları arasında bir kişide 30 yaşında meme kanseri, bir kişide sırasıyla 41 yaşında ve 50 yaşında olmak üzere meme kanseri + over kanseri, bir kişide 63 yaşında Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK), ikinci derece akrabaları arasında ise bir kişide 19 yaşında beyin tümörü ile 74 yaşında karaciğer kanseri hikayesine sahip aile öyküsü bulunmaktadır.

BRCA1 genindeki c.5152+5G>A missense değişikliği, 18. ekzonun bitiminden sonra 5 baz ileride bulunmaktadır (**Bkz. Şekil 4.3-1**). Laboratuvarımızda gerçekleştirilen 1397 testte sadece bir kez tespit edilen bu missense değişikliğine, tüm Sophia DDM kullanıcılarının gerçekleştirdiği 128474 testte 19 defa rastlanıldığı gösterilmiştir [27]. Nadir görülen bu değişikliğe ait in-siliko analizlere ait sonuçlar, değişikliğin patojenik olabileceğine dair sonuçlar verdiğinden (**Bkz. Şekil 4.3-2**) söz konusu değişikliğin RNA'da kırılma hatasına yol açıp açmadığı incelendi.

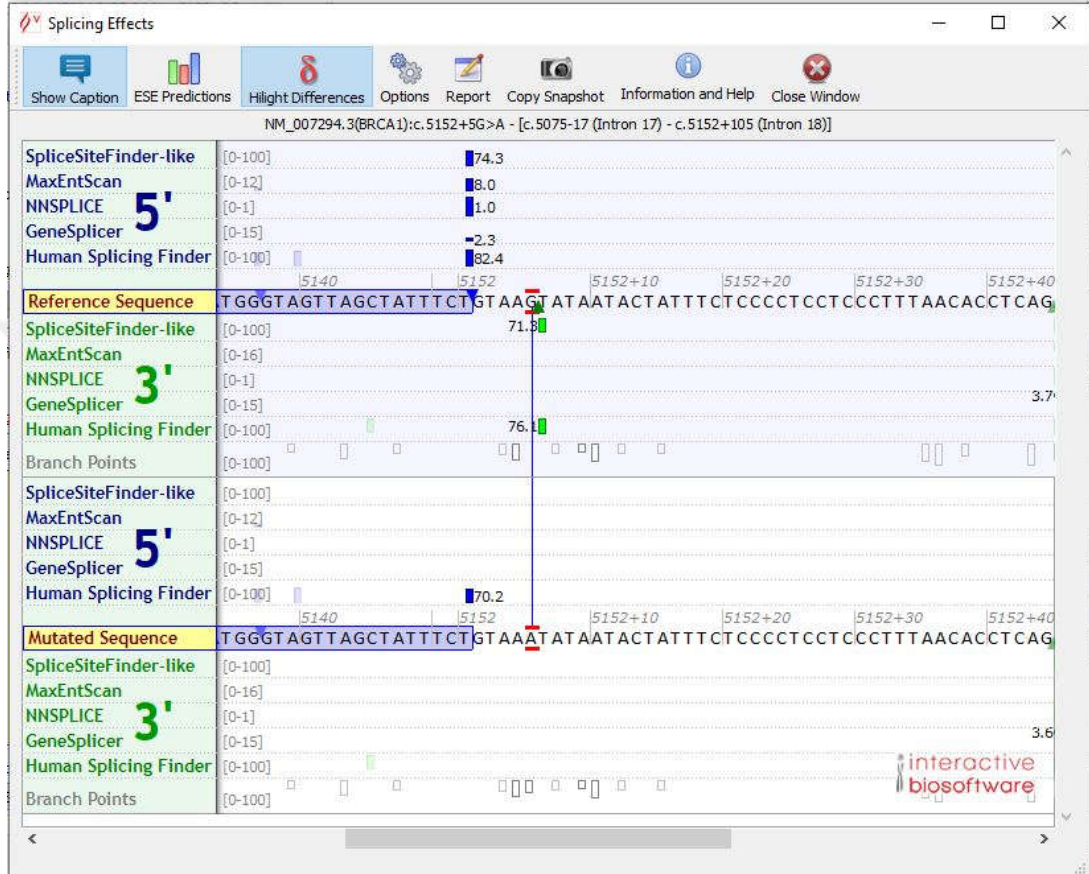


Şekil 4.3-1: *BRCA1* c.5152+5G>A'nın konumu



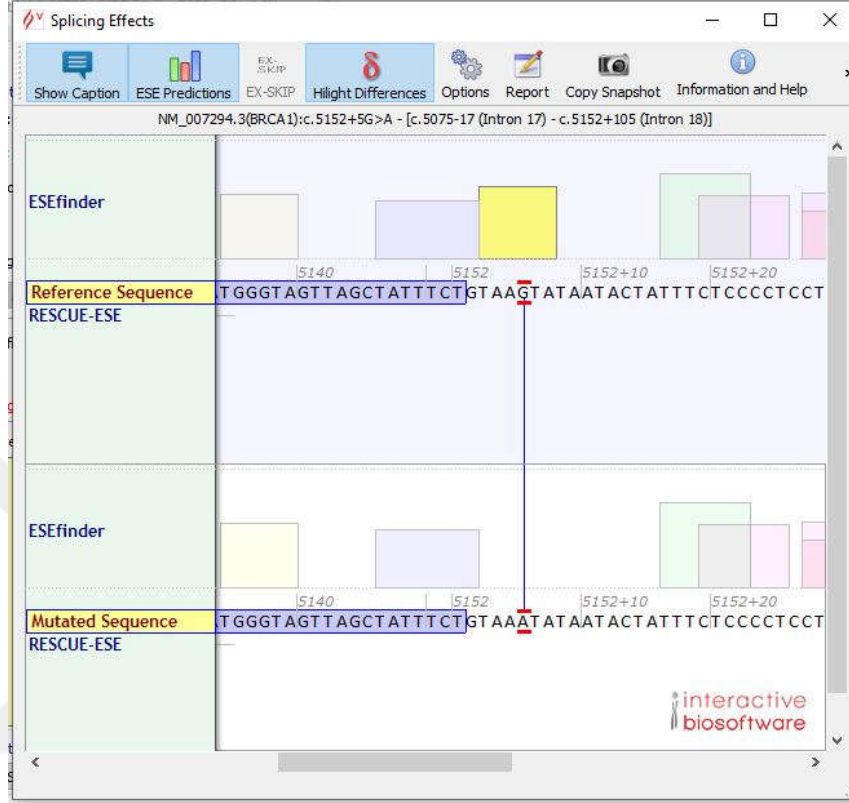
Şekil 4.3-2: *BRCA1* c.5152+5G>A'nın Sophia DDM analiz sonucu

SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSplice, GeneSplicer, Human Splicing Finder gibi diğer beş araç tarafından yapılan analiz sonuçlarına göre donör ve akseptör bölgelerde değişiklikler meydana gelmesi beklenmektedir (Bkz. Şekil 4.3-3).



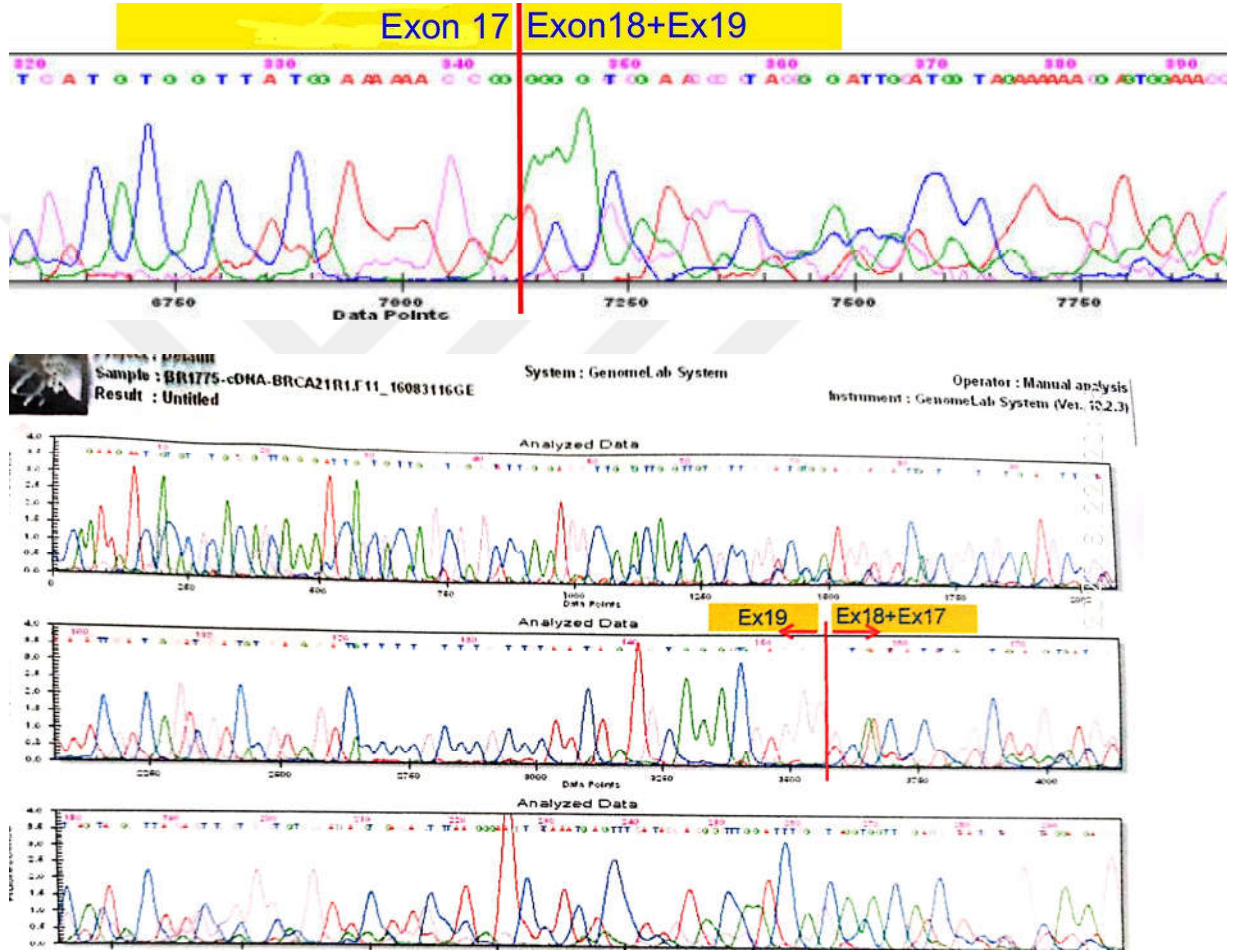
Şekil 4.3-3: *BRCA1* c.5152+5G>A değişikliğine ait in-siliko analiz sonuçları

RESCUE-ESE ile yapılan analiz sonuçları normal görülürken, ESEfinder ile yapılan tahmin sonuçlarına göre, mutasyon olmadığında var olan SRp55 bölgesinin G>A baz değişiminin ardından kaybolduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.3-4) [28].



Şekil 4.3-4: *BRCA1* c.5152+5G>A değişikliğine ait RESCUE-ESE, ESEfinder analiz sonuçları

DNA'sında *BRCA1* c.5152+5G>A taşıyan hastanın RNA'sında bir kırılma hatası olup olmadığını görmek için bu bölge için PTBR16F2 ve BRCA21R1 primerleri tasarlandı ve bu primerler kullanılarak cDNA üzerinden Sanger dizi analizi yapıldı. Dizileme sonucunda söz konusu intronik değişikliğin 18. Ekzonun delesyonuna neden olduğu gösterildi (Bkz. Şekil 4.3-5).

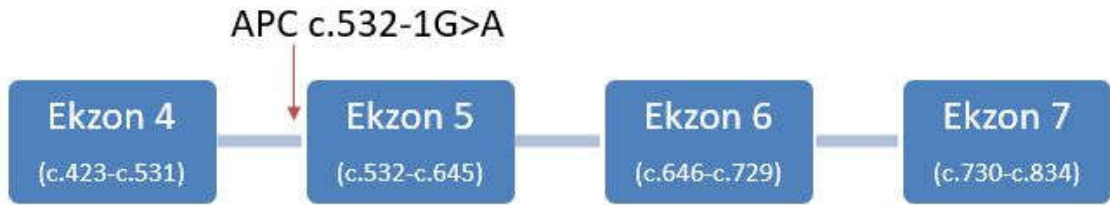


Şekil 4.3-5: BR1775 Kodlu Hastaya Ait Sanger Dizi Analizi Sonucu

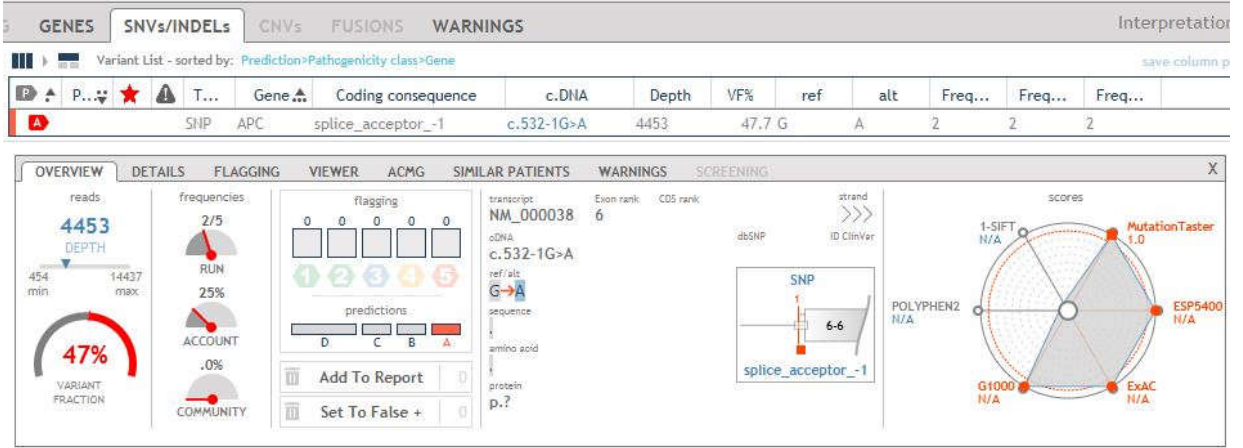
4.4. APC Genindeki c.532-1G>A Değişikliği

PN004 kodlu, 48 yaşında kolon kanseri tanısı almış kadın hastanın birinci derece akrabalarından birinde kolon kanseri (55y), birinde kolon kanseri + akciğer Kanseri (30y), bir diğerinde ise Familal Adenomatöz Polipozis (FAP) sendrom tanısı (40y), ikinci derece akrabalarında Lösemi (4y), Lenfoma (65y), Kolon Kanseri (54y) aile hikayesi bulunmaktadır. Hastaya yapılan *APC* ve *MUTYH* geni dizilemeleri sonucunda *APC* geninde c.532-1G>A intronik missense değişikliğine rastlanılmıştır.

APC genindeki c.532-1G>A değişikliği 5. ekzonun başlangıcında yer almaktadır (Bkz. Şekil 4.4-1). Bu missense mutasyon daha önce Sophia DDM kullanıcılarının yaptığı 52544 test arasında ilk kez bu hastada tespit edilmiş olup çok nadir görüldüğü düşünülen bir değişikliktir [27]. Sophia DDM verilerine göre söz konusu değişikliğin splice akseptör bölgede olabileceği ve in-siliko analiz sonuçlarında patojenik olabileceği yönünde hesaplamaların yapılmış olmasından dolayı değişiklik incelemeye alınmıştır (Bkz. Şekil 4.4-2). Söz konusu değişiklik ESEfinder ve RESCUE-ESE araçları ile incelendiğinde yapılan hesaplamalara göre ilgili değişikliğin proteinin yapısından herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür [28].



Şekil 4.4-1: *APC* genindeki c.532-1G>A değişikliğinin gen üzerindeki konumu

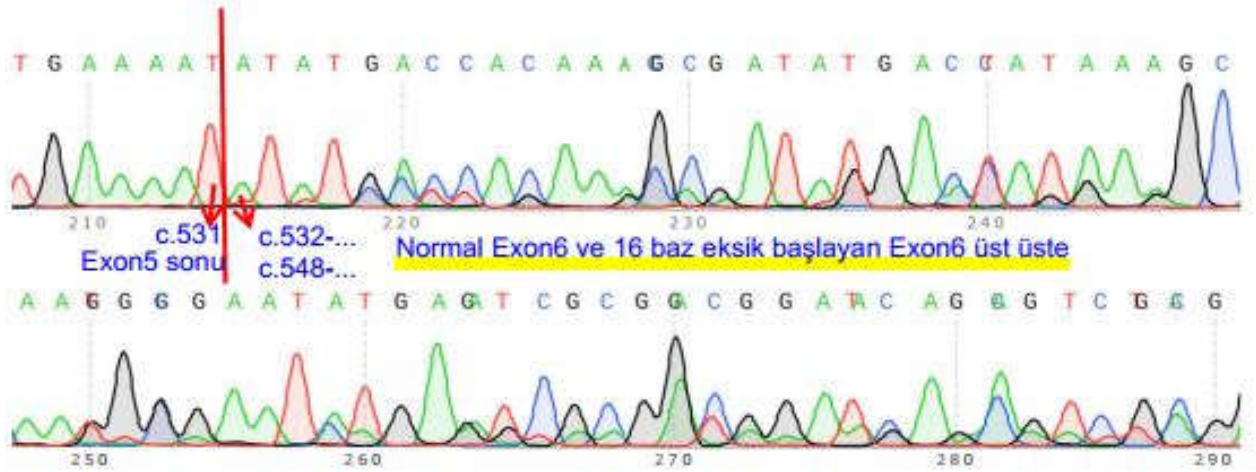


Şekil 4.4-2: APC genindeki c.532-1G>A değişikliğine ilişkin Sophia DDM analizi sonuçları

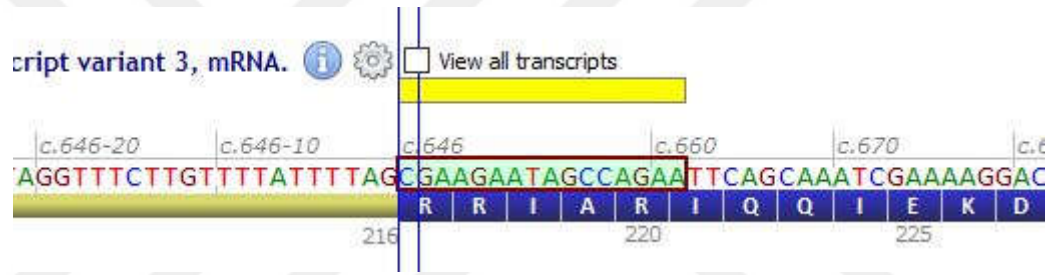
DNA'sında APC c.532-1G>A değişikliği saptanan hastanın RNA'sında kırılma hatası olup olmadığını görmek için gen bölgesine özgü APCEX4F2 ve APCEX8R2 primerleri tasarlanmıştır. İlgili primerler kullanılarak cDNA üzerinden Sanger Dizileme işlemi yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.4-3). Sanger dizileme Analizi sonrasında söz konusu intronik değişikliğin 6. ekzonun ilk 16 bazının delesyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.4-4, Şekil 4.4-5). Bu 16 bazlık delesyonun framesift meydana getirmesi sebebi ile protein p.(Phe178Ilefs*2) noktasında sonlanmakta ve kısa bir protein meydana gelmektedir.



Şekil 4.4-3: PN007 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü



Şekil 4.4-4: PN007 kodlu örneğin cDNA üzerinden Sanger dizileme sonucu

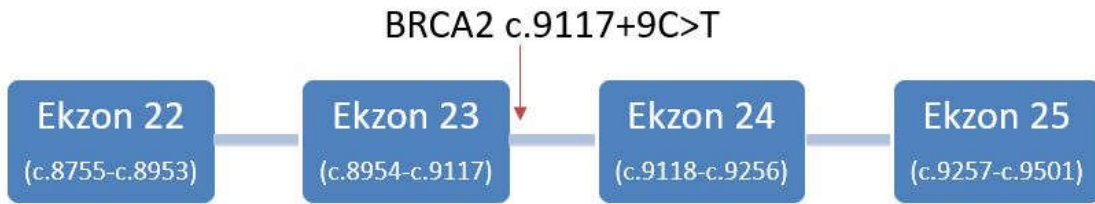


Şekil 4.4-5: APC 6. Ekzon 16 Baz Delesyon Bölgesi

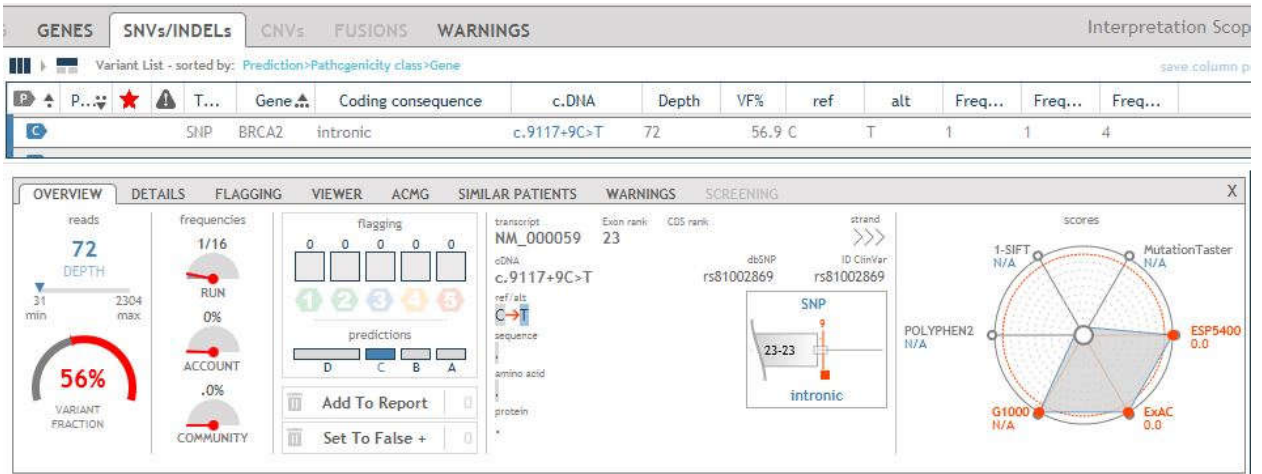
4.5. *BRCA2* Genindeki c.9117+9C>T Değişikliği (BR1697)

BR1697 kodlu, 34 yaşında meme kanseri tanısı almış hastanın birinci derece akrabalarından bir kişide mide kanseri (74y.), bir kişide prostat kanseri (73y.), ikinci derece akrabasında akciğer kanseri (81y.) öyküsü bulunmaktadır. Hastaya yapılan *BRCA1/2* tüm gen dizileme analizi sonucunda *BRCA2* geninde intronik c.9117+9C>T missense değişikliği saptanmıştır.

BRCA2 genindeki c.9117+9C>T değişikliği, 23. ekzonun bitiminde yer almaktadır (Bkz. Şekil 4.5-1). Bu missense değişikliğe Sophia DDM kullanıcılarının yaptığı 128474 test arasında 4 kez, kendi hastalarımız arasında ise ilk kez rastlanıldığı görülmüştür [27]. Sophia DDM biyoinformatik analiz aracı bu mutasyon hakkında risk tahmin etmemekle birlikte değişikliğin nadir görüldüğü dikkat çekicidir (Bkz. Şekil 4.5-2). dbSNP bilgi bankasında allele ait MAF skorlarının T=0,000009/1 (ExAc) ve T=0,00008/1 olarak bildirilmesi değişikliğin oldukça nadir olduğunu göstermektedir.

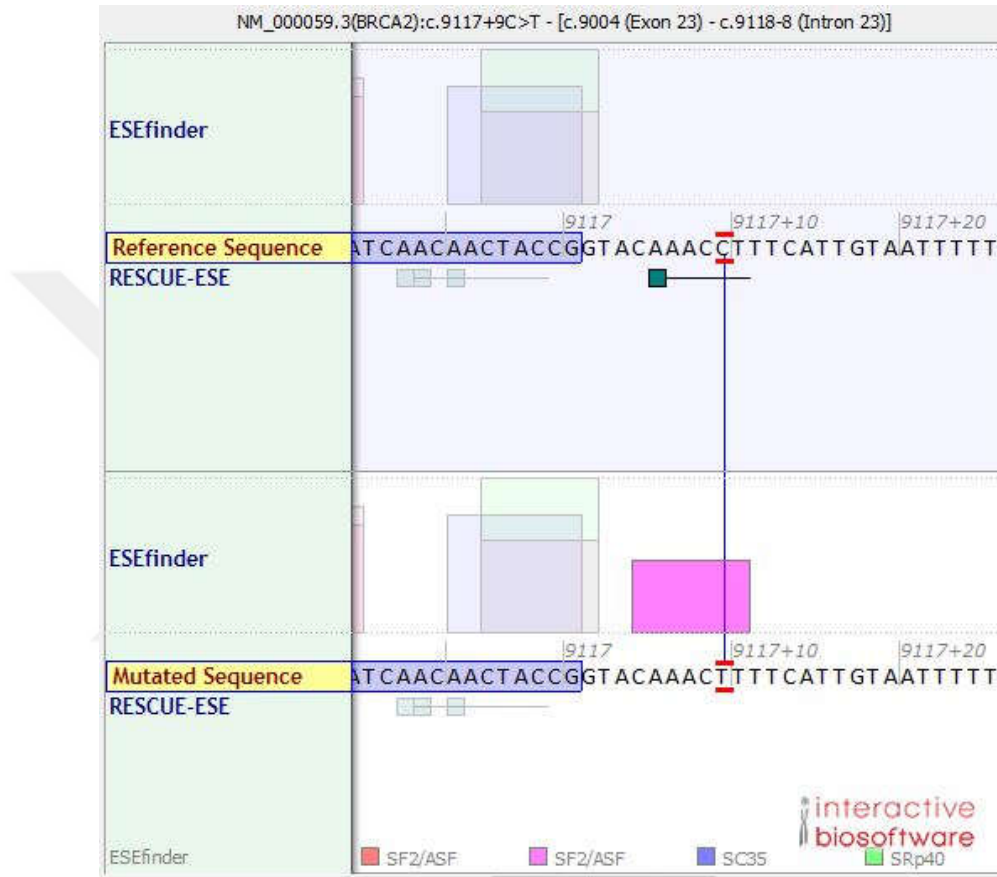


Şekil 4.5-1: *BRCA2* genindeki c.9117+9C>T değişikliğinin ekzonlar arasındaki konumu



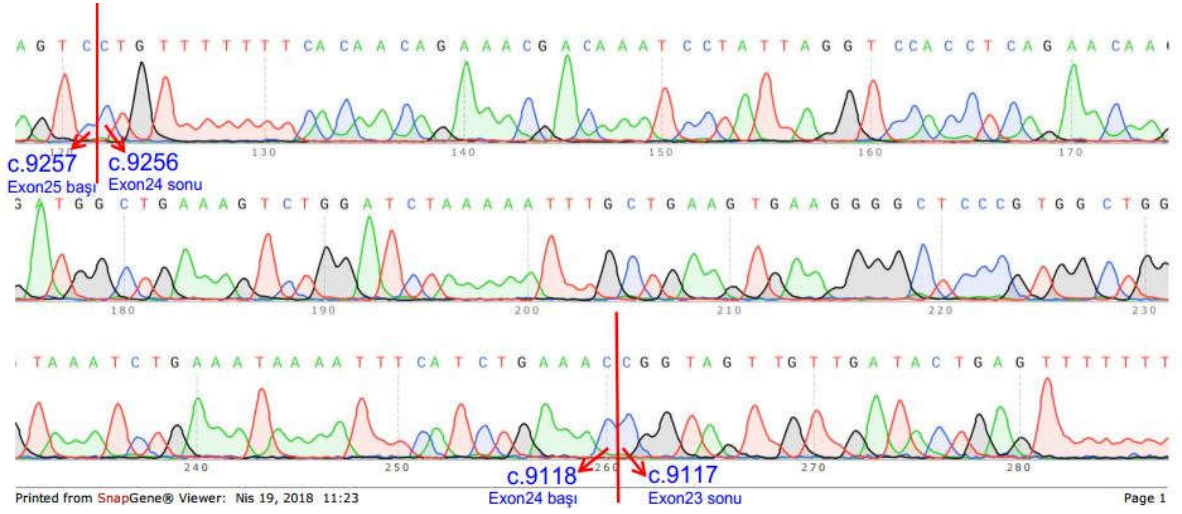
Şekil 4.5-2: *BRCA2* genindeki c.9117+9C>T değişikliğinin Sophia DDM ile analiz sonucu

Söz konusu değişiklik ESEfinder ve RESCUE-ESE ile incelendiğinde, ESEfinder programı referans dizide olmayan bir SF2/ASF bölgesinin aktive olduğunu, RESCUE-ESE programı ise bir ekzonik splicing enhancer (ESE) bölgesinin kaybolduğunu ortaya koymaktadır [28].



Şekil 4.5-3: ESEfinder ve RESCUE-ESE sonuçları

DNA'sında *BRCA2* genindeki c.9117+9C>T değişikliği bulunan hastanın RNA'sında kırılma hatası olup olmadığını görmek için söz konusu bölgeyi içine alan PAEX22F1 ve PAEX25R1 primerleri tasarlandı ve bu primerler kullanılarak cDNA üzerinden Sanger dizileme yapıldı. Sanger dizileme sonucunda ekzon 23-24 ve 25 geçişlerinin normal olduğu ve bu mutasyonun kırılma hatasına yol açmadığı görüldü (Bkz. Şekil 4.5-4).

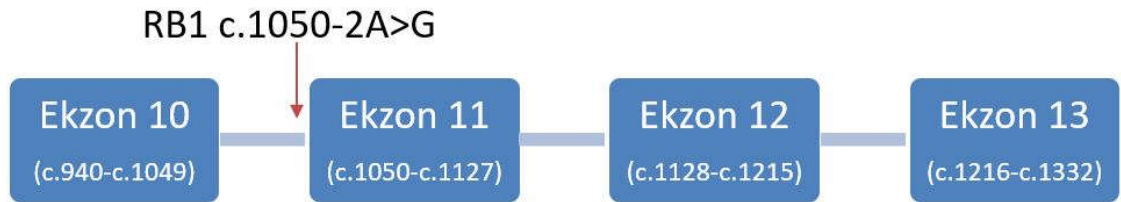


Şekil 4.5-4: BR1697 kodlu hastaya ait RNA üzerinden yapılan Sanger Dizileme Sonucu

4.6. *RB1* Genindeki c.1050-2 A>G Değişikliği (R1230)

R1230 hasta kodlu, 5 aylıkken Bilateral Retinoblastoma tanısı alan hastanın *RB1* geni incelemesi sonucunda intronik c.1050-2A>G değişikliği saptanmıştır. Hastanın ailesinde ikinci derece akrabaları arasında şu an 12 ve 14 yaşlarında olan iki çocuğun göz kürelerinin gelişmeden doğmuş olduğu bildirilmiştir.

c.1050-2A>G değişikliği 11. ekzonun ilk bazından 2 baz öncesinde meydana gelmiştir (**Bkz. Şekil 4.6-1**). Bütün Sophia DDM kullanıcılarının yaptığı 49190 test arasında ve kendi hastalarımız arasında ilk kez görülen bu değişikliğin dbSNP, ClinVar gibi bilgi bankalarında da kaydı bulunmamaktadır. Sophia DDM ve Alamut bu mutasyonun intron 10 akseptör bölgesinde bulunduğunu ve ekzon 11 için kırılma esnasında atlanma riski yaratabileceğini tahmin etmektedir (**Bkz. Şekil 4.6-2**) [27].

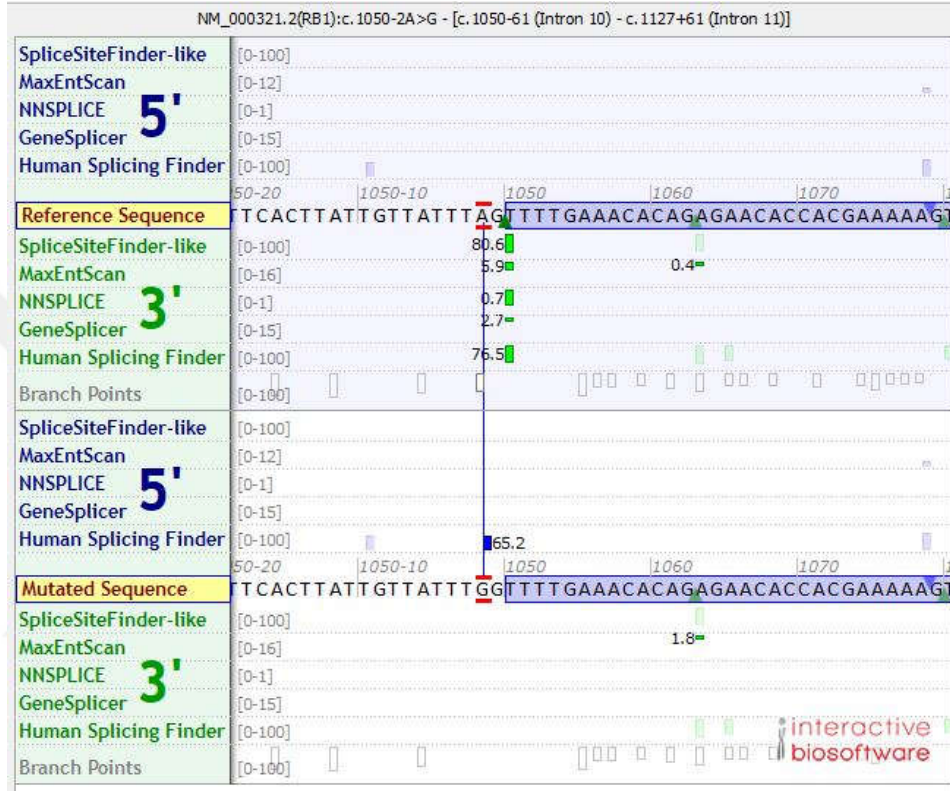


Şekil 4.6-1: *RB1* genindeki c.1050-2A>G değişikliğinin gen üzerindeki konumu



Şekil 4.6-2: *RB1* genindeki c.1050-2A>G değişikliğinin Sophia DDM ile analiz sonucu

SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSplice, GeneSplicer, Human Splicing Finder gibi diğer beş farklı bilgisayar programı tarafından yapılan analiz sonuçlarına göre donör ve akseptör bölgelerde meydana gelebilecek olası bölge değişiklikleri **Şekil 4.6-3**'te de gösterildiği gibi risk varlığına işaret etmektedir.



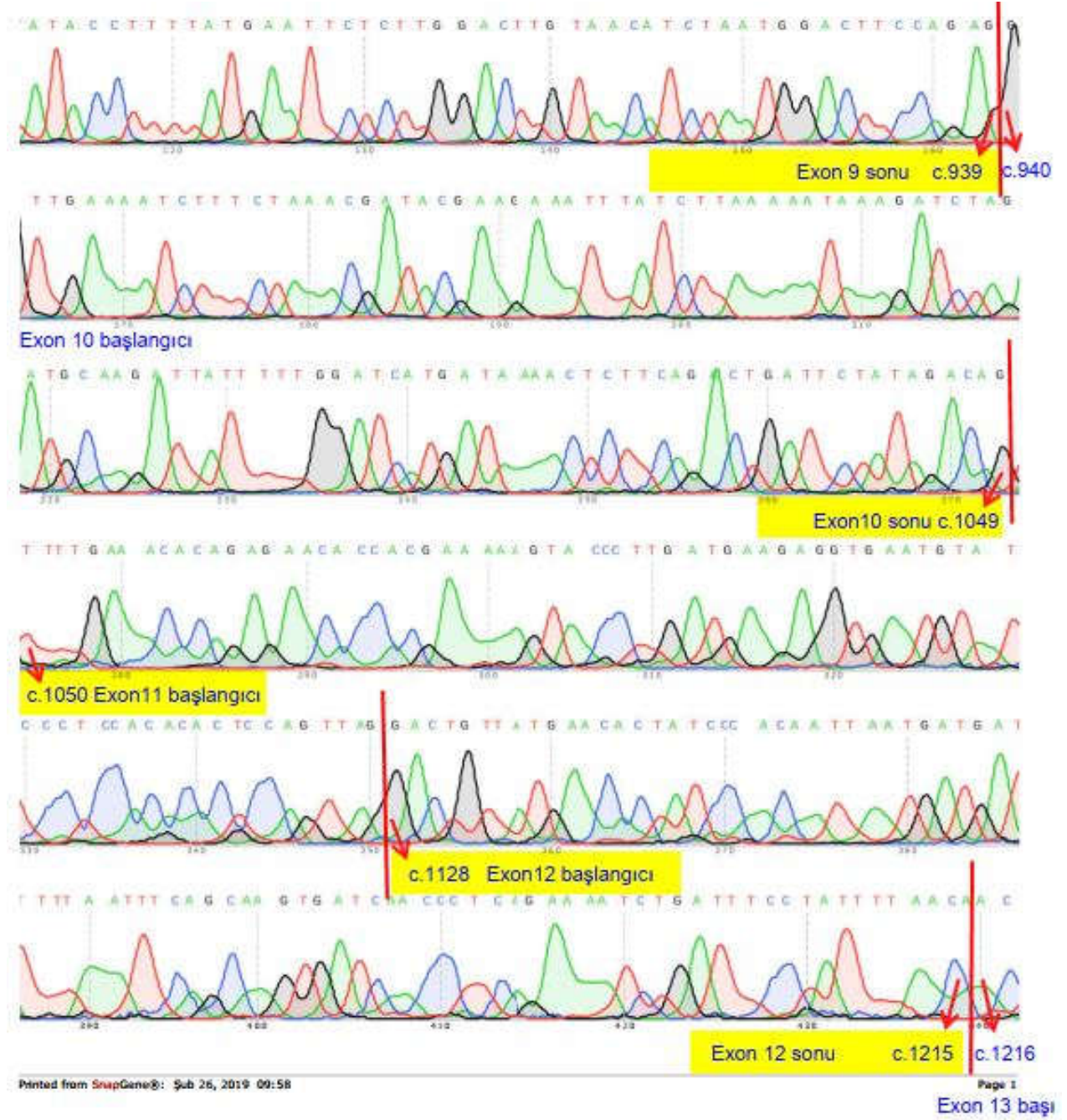
Şekil 4.6-3: Referans Dizi ve Mutasyon Varlığında Donör ve Akseptör Bölge Konumlarının Karşılaştırılması

Kırılma hatasını dizileyerek net şekilde gösteren herhangi bir kaynak bulunmadığından, hastanın ilgili değişiklik bölgesi RNA üzerinden dizilemek için bölgeye özgü RB1EX8F2 ve RB1EX13R2 tasarlandı ve ilgili primerler kullanılarak Sanger dizi analizi yapıldı (Bkz. Şekil 4.6-4).



Şekil 4.6-4: R1230 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

Dizileme sonucunda ekzon 9-10-11- ve 12 geçişlerinin normal olduğu görüldü (Bkz. Şekil 4.6-5).

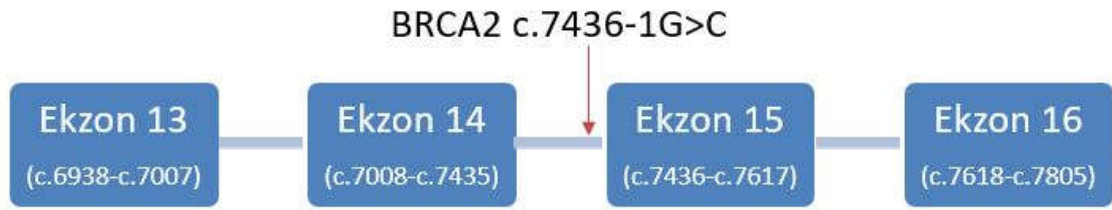


Şekil 4.6-5: R1230 nolu hastaya ait RNA üzerinden yapılan Sanger Dizileme Sonucu

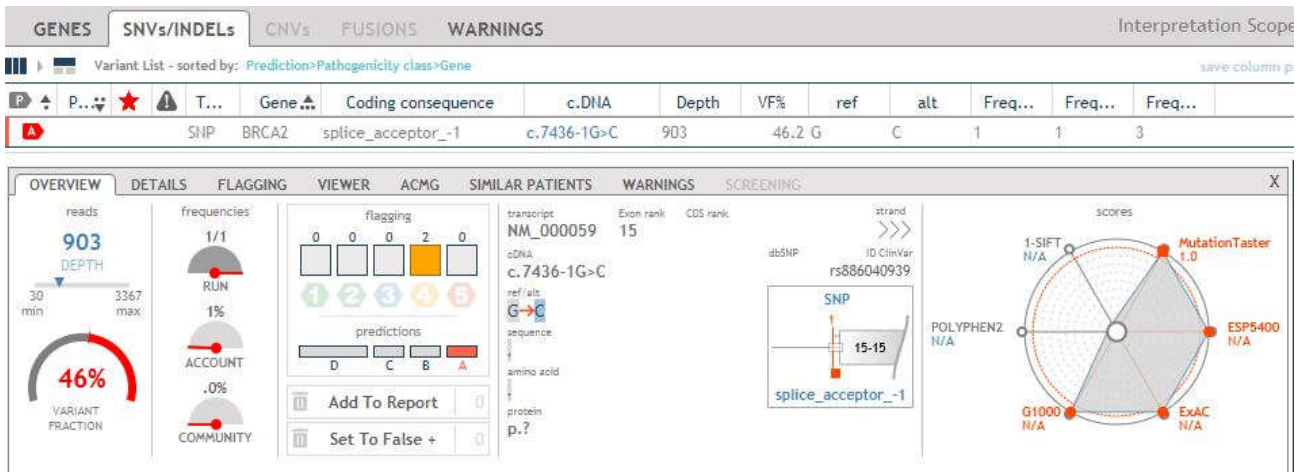
4.7. *BRCA2* GENİNDEKİ c.7436-1G>C DEĞİŞİKLİĞİ (BR2541)

BR2541 kodlu, 44 yaşında bilateral meme kanseri tanısı almış kadın hastanın ikinci derece akrabalarında bir beyin tümörü vakası (49y) ve bir mide kanseri (49y) öyküsü bulunmaktadır. Hastanın *BRCA1/2* dizileme sonucunda *BRCA2* geninde intronik c.7436-1G>C missense değişikliğine rastlanılmıştır.

BRCA2 geninde c.7436-1G>C değişikliği 15. ekzonun başlangıcında bulunmaktadır (Bkz. Şekil 4.7-1). Bu intronik missense değişikliğe bütün Sophia DDM kullanıcılarının yaptığı 128474 test arasında 3 kez, kendi hastalarımız arasında ise ilk kez rastlanılmıştır [27]. Sophia DDM’de söz konusu değişikliğin nadir görülmesi ile birlikte, “splice acceptor” bölgede bulunması nedeniyle risk teşkil edebileceği tahmini yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.7-2). Söz konusu değişiklik dbSNP (rs886040939) ve ClinVar (VCV000267682.1) bilgi bankalarında “Patojenik” olarak etiketlenmiştir.

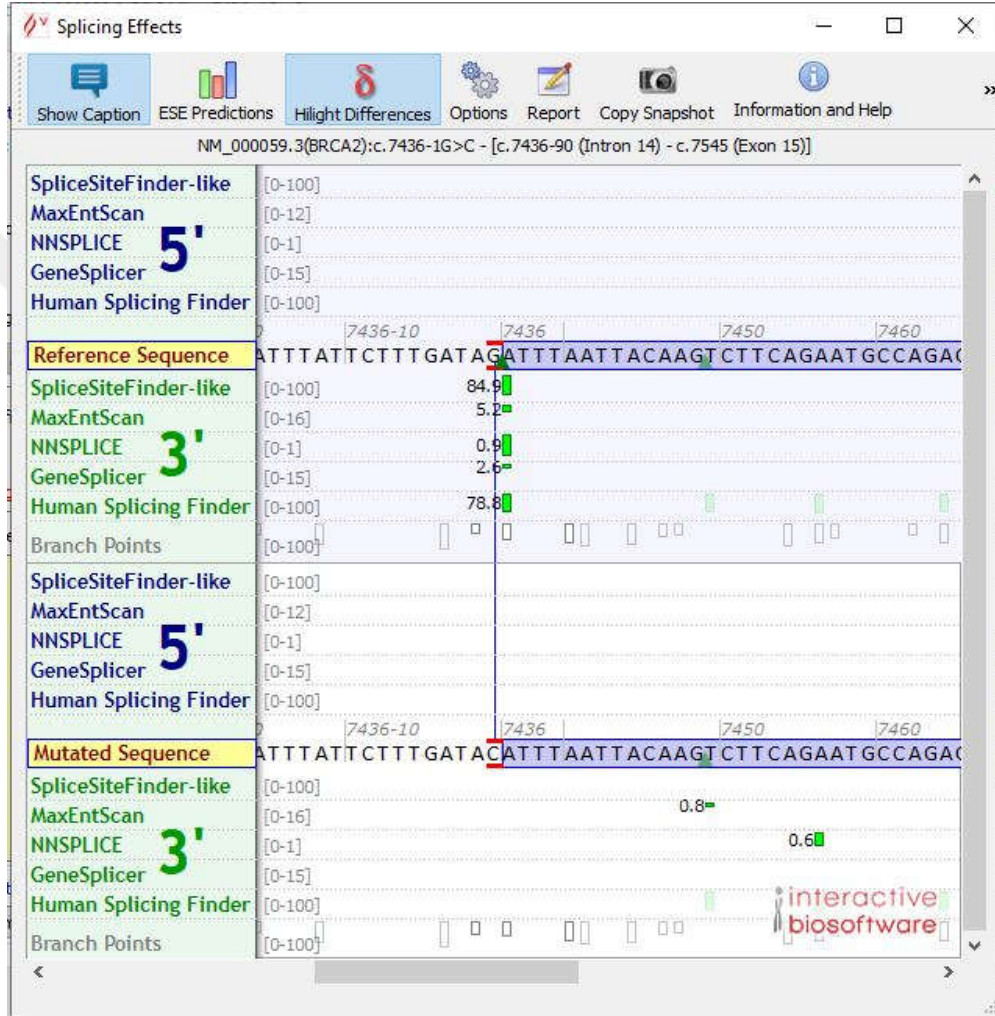


Şekil 4.7-1: *BRCA2* genindeki c.7436-1G>C değişikliğin gen üzerindeki konumu



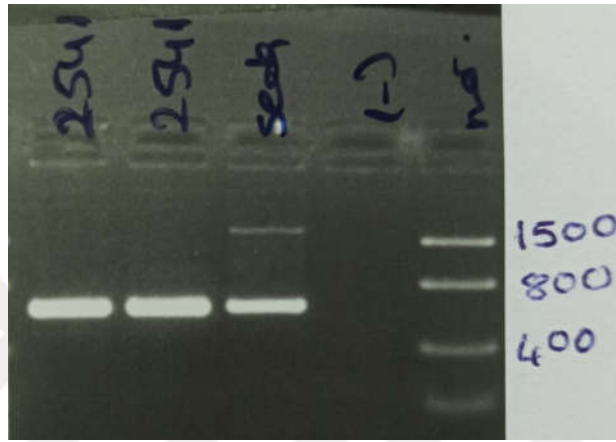
Şekil 4.7-2: *BRCA2* genindeki c.7436-1G>C değişikliğinin Sophia DDM Analiz Sonucu

RESCUE-ESE ve ESEfinder ile yapılan analizlerin sonuçlarına göre ekzonik splicing güçlendirici (Exonic Splicing Enhancer) bölgelerde değişikliğin sebep olabileceği yönünde bir tahmin yapılmamıştır [28]. SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSplice, GeneSplicer, Human Splicing Finder gibi araçlar tarafından yapılan analiz sonuçlarına göre ise, donör ve akseptör bölgelerde değişimlerin meydana gelebileceği öngörülmüştür (Bkz. Şekil 4.7-3)



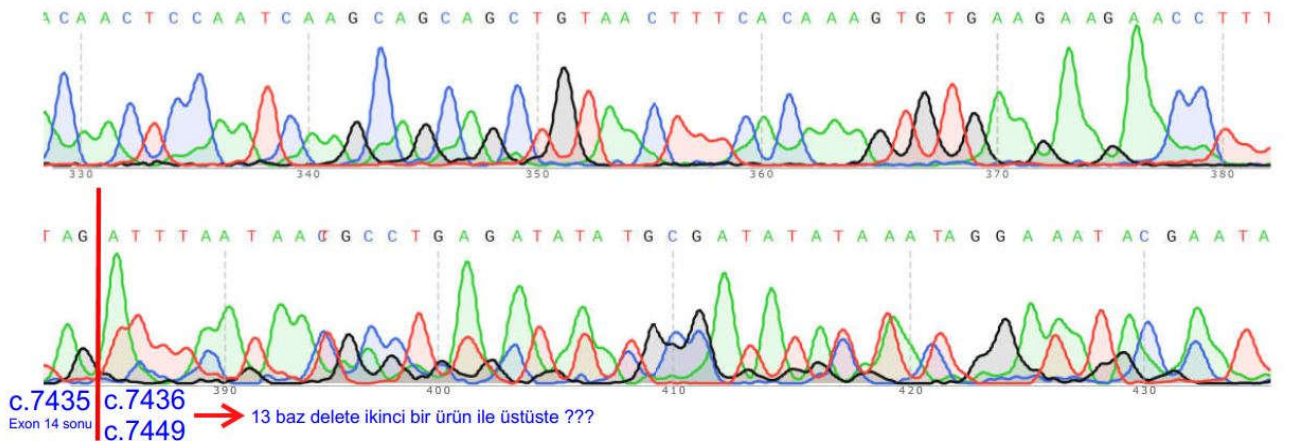
Şekil 4.7-3: Değişiklik (SNP) öncesi ve sonrasında Donör ve Akseptör bölgelerdeki olası değişiklikler

Söz konusu değişiklik ile ilgili tüm bilgiler baraya getirildiğinde kırılma hatasını dizileyerek gösteren bir kaynak bulunmadığı görülmektedir. Bu nedenle söz konusu değişikliğin hasta için öneminin anlaşılması amacıyla c.7436-1G>C değişikliğinin RNA üzerinden Sanger dizi analizi ile incelenmesinin değişiklik hakkında fikir verecektir. Bu bağlamda değişiklik bölgesi içine alan BR2P14F1 ve BR2P16R2 primerleri tasarlanarak ilgili bölge RNA üzerinden Sanger dizi analizi ile dizilendi (Bkz. Şekil 4.7-4)



Şekil 4.7-4: BR2541 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

Hasta RNA örneğinin düşük kalitede olmasından dolayı, dizileme için yapılan birçok deneme sonucunda, ekzon skipping'in gerçekleştiğine dair net okunabilen bir sonuç elde edilemedi (Bkz. Şekil 4.7-5).



Şekil 4.7-5: BR2541 kodlu hastada *BRCA2* c.7436-1G>C değişikliğini bulunduran bölgenin Sanger kromatogram görüntüsü

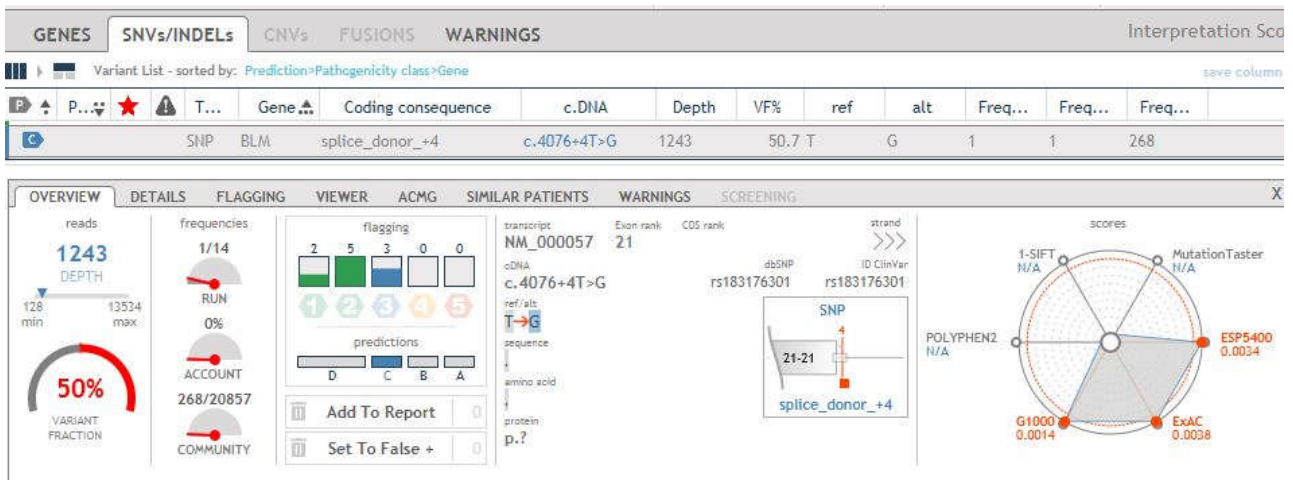
4.8. *BLM* Genindeki c.4076+4T>G Değişikliği

BR2361 kodlu, 31 yaşında meme kanseri kadın hastanın ikinci derece paternal akrabasında bir cilt kanseri vakası (76y), üçüncü derece paternal akrabalarından birinde özafagus kanseri (56y), dördüncü derece paternal akrabasında bir tiroid kanseri (47y) öyküsü bulunmaktadır.

Hasta için yapılan genetik analizler sonucunda *BLM* geninde intronik c.4076+4T>G missense değişikliğine rastlanmıştır. c.4076+4T>G değişikliği 22. ekzonun bitiminde bulunmaktadır (Bkz. Şekil 4.8-1). Bu intronik missense değişiklik Sophia DDM kullanıcılarının gerçekleştirdiği 20857 test arasında %1,3 oranında ve kendi hastalarımız arasında ilk kez görülmüştür. Sophia DDM bu mutasyonun “splice donor” bölgede bulunduğunu ve risk teşkil edebileceğini öngörmektedir (Bkz. Şekil 4.8-2).

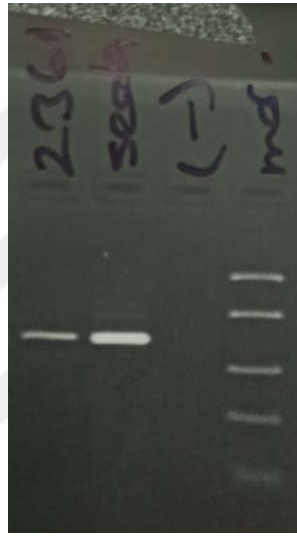


Şekil 4.8-1: *BLM* genindeki c.4076+4T>G değişikliğin gen üzerindeki konumu



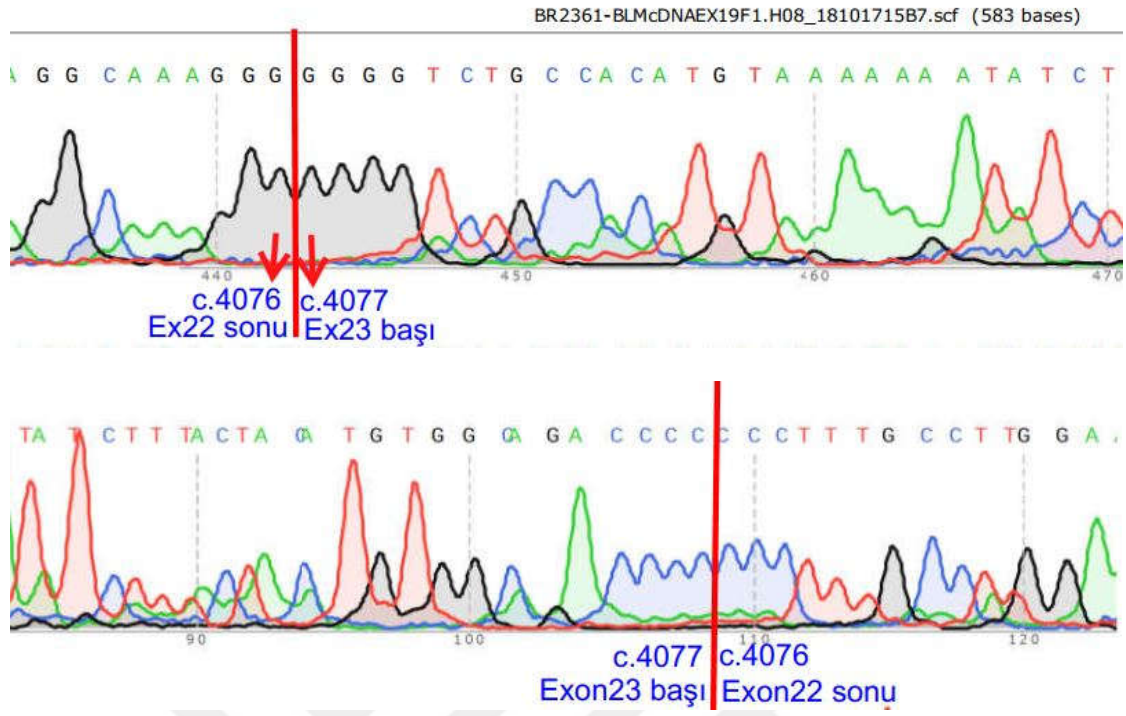
Şekil 4.8-2: *BLM* genindeki c.4076+4T>G değişikliğinin Sophia DDM Analiz Sonucu

MAF skoru $G=0.0014/7$ (1000 Genomes) olarak verilen mutasyon dbSNP (rs183176301) bilgi bankasında “Variant of Uncertain Significance(VUS)” yani “klinik önemi belli olmayan değişiklik” olarak, ClinVar bilgi bankasında ise “Conflicting interpretations of pathogenicity” olarak etiketlenmiştir. ESEfinder, RESCUE-ESE, Splice Site Finder-like, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer, Human Splicing Finder gibi araçlarla incelenmesinin sonunda risk ifade eden çarpıcı bir tahmine rastlanmamıştır.



Şekil 4.8-3: BR2361 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

DNA’sında *BLM* genindeki c.4076+4T>G değişikliği bulunan hastanın RNA’sında kırılma hatası olup olmadığını görmek için ilgili gen bölgesi için BLMcDNAEX19F1 ve BLMcDNAEX22R1 primerleri tasarlandı ve bu primerler kullanılarak cDNA üzerinden Sanger dizileme işlemi yapıldı. Sanger dizileme sonucunda ekzon 22 ve 23 geçişinin normal olduğu ve bu mutasyonun ekzon atlama hatasına yol açmadığı görüldü (**Bkz. Şekil 4.8-4**).

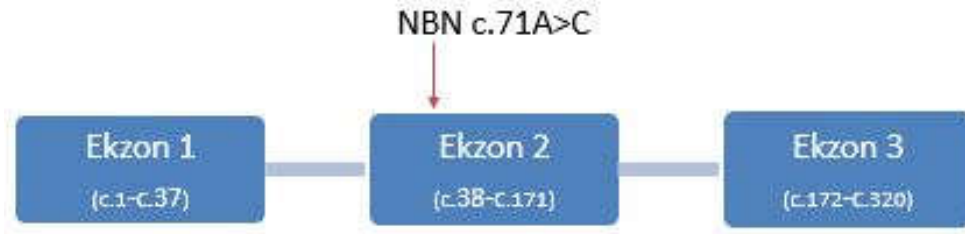


Şekil 4.8-4: BR2361 kodlu hastada *BLM* c.4076+4T>G değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü

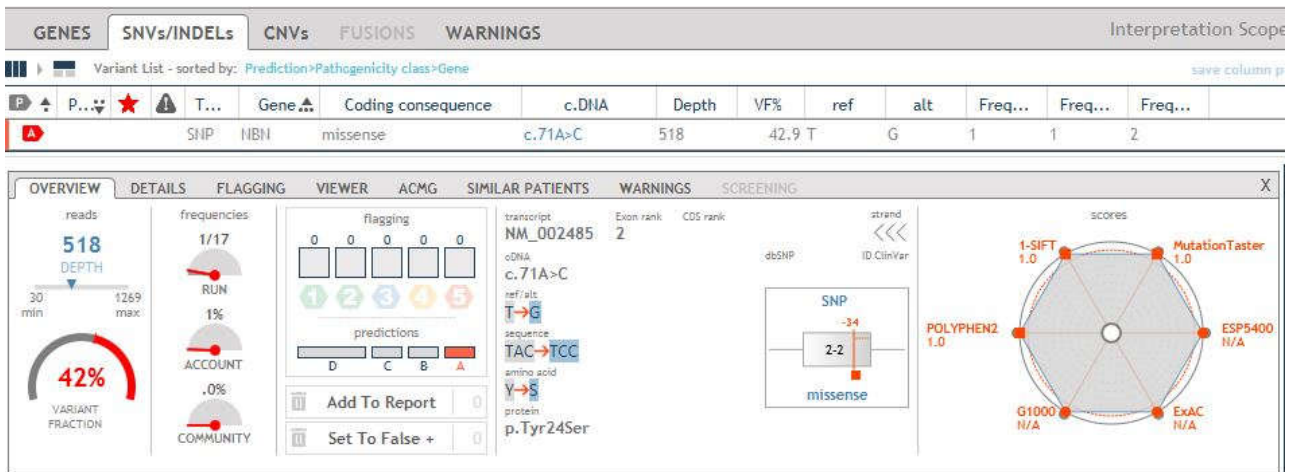
4.9. *NBN* Genindeki c.71A>C Değişikliği (BR3172)

BR3172 kodlu, 33 yaşında meme kanseri tanısı almış kadın hastanın ikinci derece maternal akrabalarından birinde endometrium kanseri (56y) ve bir diğerinde meme kanseri (49y) öyküsü bulunmaktadır.

Hasta için yapılan genetik analiz sonucunda *NBN* geninde c.71A>C p.Tyr34Ser ekzonik missense mutasyonuna rastlanmıştır. c.71A>C, 2. ekzonda bulunmaktadır (**Bkz. Şekil 4.9-1**). Bu mutasyon Sophia DDM kullanıcılarının gerçekleştirdiği 70216 testte 2 kez ve kendi hastalarımız arasında ilk kez görülmüştür. dbSNP, ClinVar ve HGMD gibi önemli bilgi bankalarında bu mutasyona ait kayıt bulunmamaktadır. SIFT, Mutation Taster gibi değişiklik etkisini tahmin eden in-siliko araçlar tarafından “Deleterious” ve “Disease Causing” olarak etiketlenerek bu değişikliğin riskli olabileceği öngörülmüştür (**Bkz. Şekil 4.9-2**).

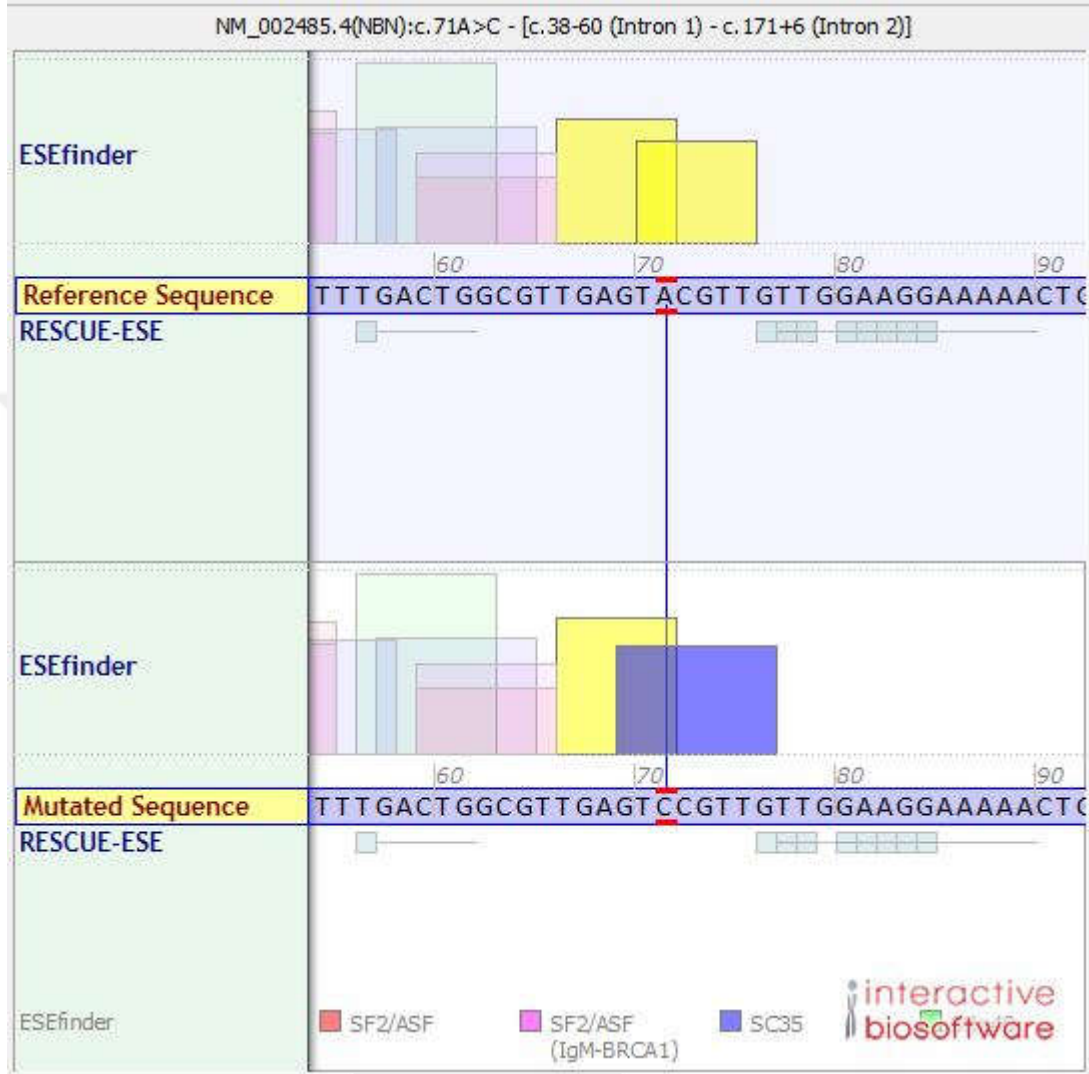


Şekil 4.9-1: *NBN* genindeki c.71A>C değişikliğin gen üzerindeki konumu



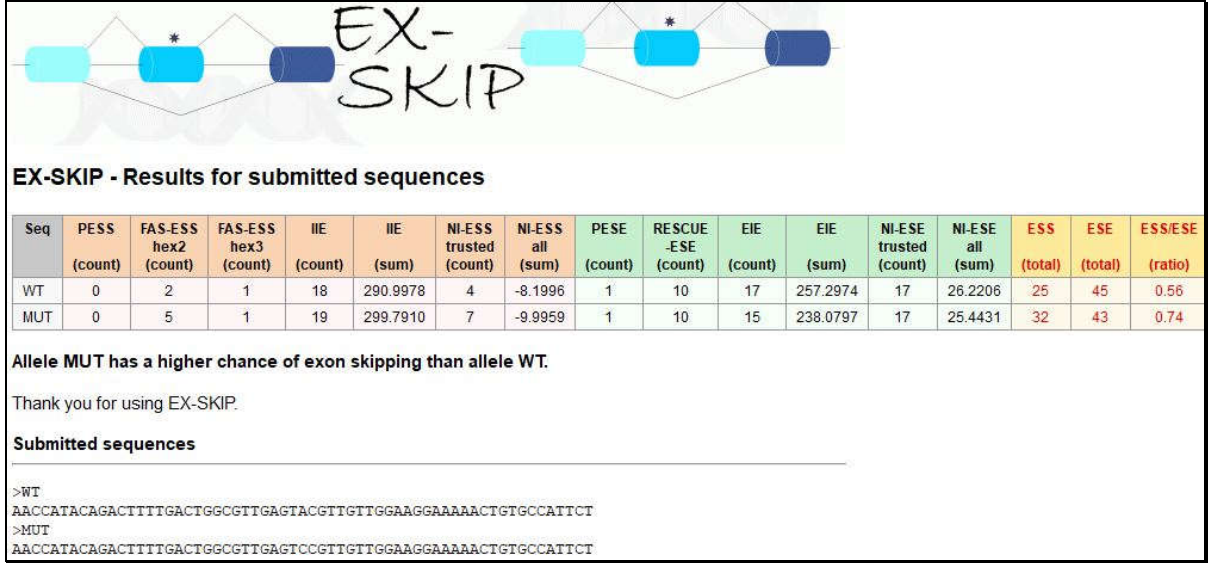
Şekil 4.9-2: *NBN* genindeki c.71A>C değişikliğinin Sophia DDM analiz sonucu

RESCUE-ESE ve ESEfinder ile yapılan analizlerin sonuçlarına göre ekzonik splicing güçlendirici (Exonic Splicing Enhancer) bölgelerde mutasyonun sebep olduğu bir değişim olabileceği tahmin edilmektedir (Bkz. Şekil 4.9-3).



Şekil 4.9-3: ESEfinder ve RESCUE-ESE Analiz Sonuçları

NBN genindeki c.71A>C değişikliğinin EX-SKIP aracı ile analiz edildiğinde, mutant allelin normal diziye göre kırılma esnasında ekzon atlama ihtimalinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.9-4) [31]

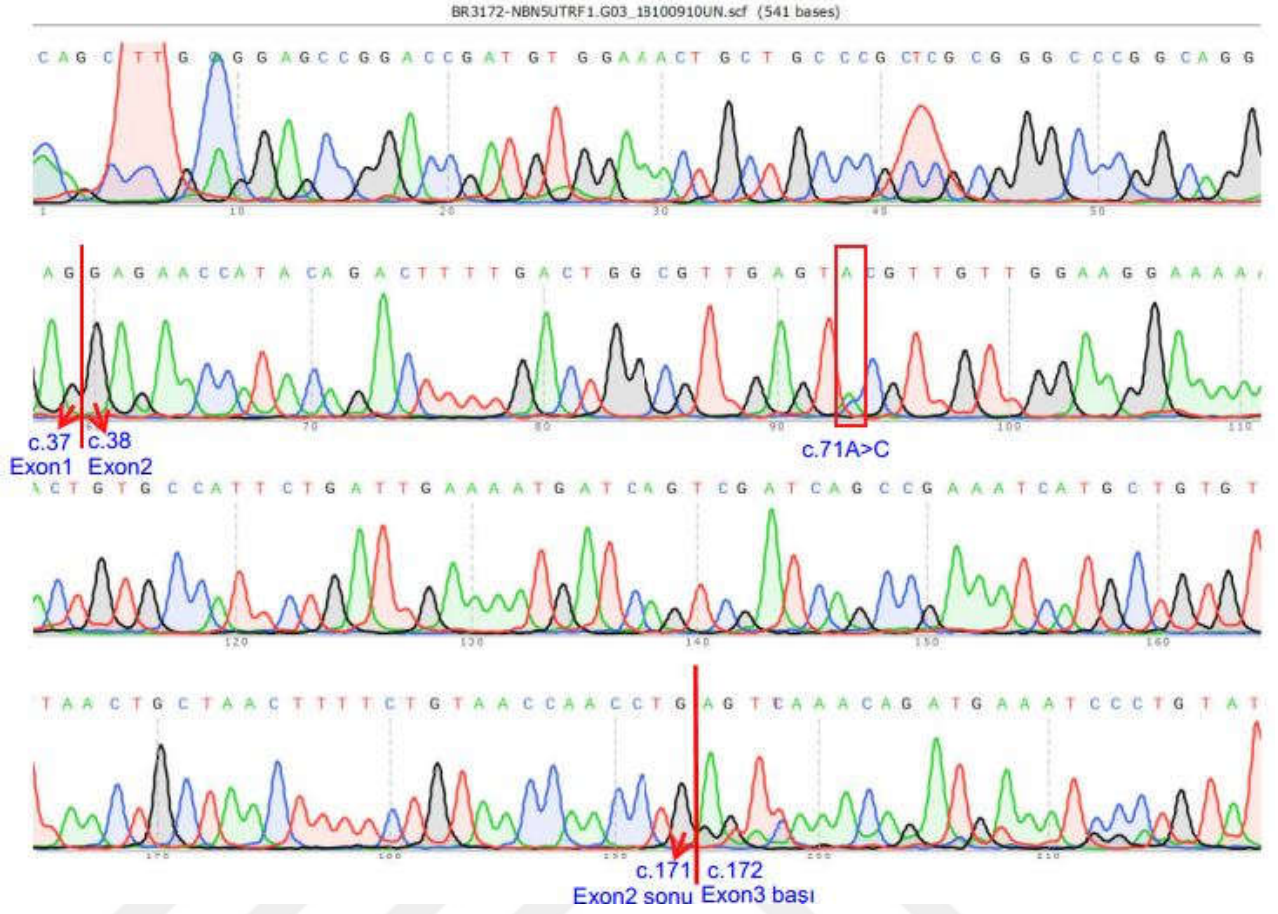


Şekil 4.9-4: *NBN* genindeki c.71A>C değişikliğinin EX-SKIP ile Analiz Sonucu

DNA'sında *NBN* geninde c.71A>C değişikliği saptanan hastanın RNA'sında kırılma hatası olup olmadığını görmek için değişikliğin bulunduğu bölgeye özgü NBN5UTRF1 ve NBNEX4-5R1 primerleri tasarlandı ve ilgili primerler kullanılarak RNA üzerinden Sanger dizileme işlemi yapıldı. Dizileme sonucunda ekzon 1-2 ve 3 geçişlerinin normal olduğu ve bu mutasyonun kırılma hatasına yol açmadığı görüldü (Bkz. Şekil 4.9-5 ve Şekil 4.9-6).



Şekil 4.9-5: BR3172 nolu hastaya ait cDNA üzerinden çoğaltılan bölgenin %1.5 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

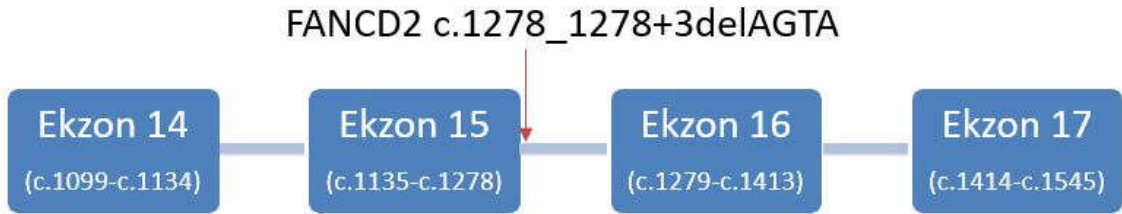


Şekil 4.9-6: BR3172 kodlu hastaya ait *NBN* c.71A>C değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü

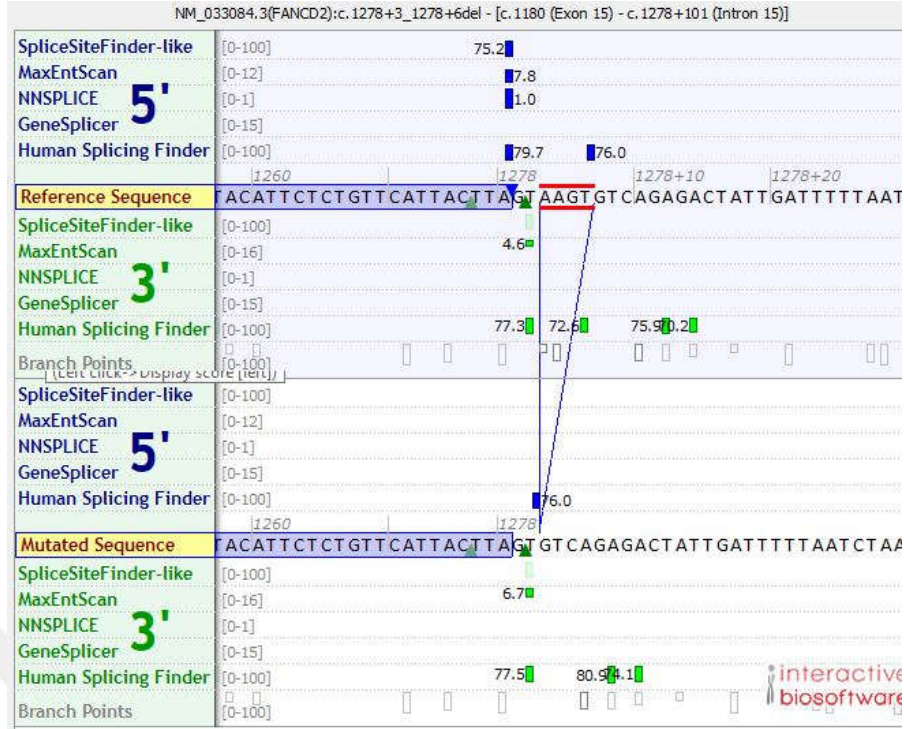
4.10. *FANCD2* Genindeki c.1278_1278+3delAGTA Değişikliği (BR3214)

BR3214 kodlu, 28 yaşında meme kanser tanısı almış kadın hastanın birinci derece akrabasında meme kanseri (28y), ikinci derece maternal akrabasında meme kanseri (33y), üçüncü derece maternal akrabalarından ikisi erken yaş olmak üzere üç meme kanseri (32y, 32y, 54y) ve bir larenks kanseri (46y) öyküsü bulunmaktadır.

Hasta için yapılan genetik testler sonucunda *FANCD2* geninde intronik bölgede c.1278_1278+3delAGTA delesyonu saptanmıştır. Söz konusu c.1278_1278+3delAGTA değişikliği, 15. ekzonun son bazını ve bitişindeki intronun üç bazını içermektedir (Bkz. Şekil 4.10-1). Yaptığımız testler arasında ilk kez rastladığımız bu mutasyon kırpılma donör bölgesinde olabileceğinden incelemeye dahil edildi.

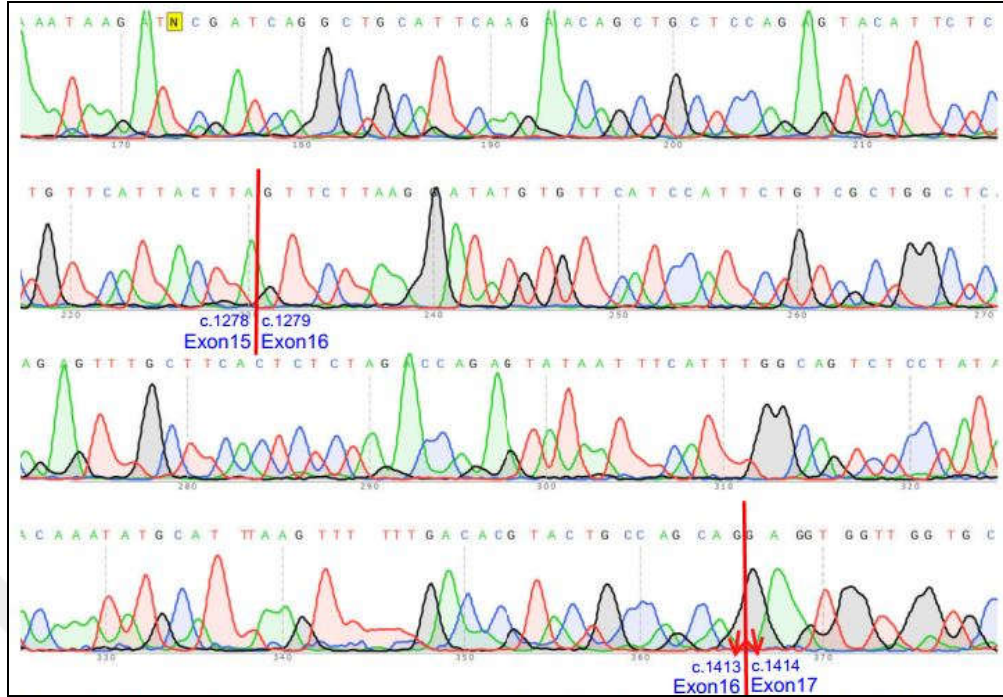


Şekil 4.10-1: *FANCD2* genindeki c.1278_1278+3delAGTA değişikliğinin gen üzerindeki konumu



Şekil 4.10-2: *FANCD2* genindeki c.1278_1278+3delAGTA değişikliğinin in-siliko tahmin araçlarındaki analiz sonuçları

DNA'sında *FANCD2* geninde c.1278_1278+3delAGTA değişikliği saptanan hastanın RNA'sında kırılma hatası olup olmadığını görmek için değişikliğin bulunduğu bölgeye özgü *FANCD2*-13F ve *FANCD2*-18R primerleri tasarlandı ve ilgili primerler kullanılarak RNA üzerinden Sanger dizileme işlemi yapıldı. Dizileme sonucunda ekzon 15-16 ve 17 geçişlerinin normal olduğu ve bu mutasyonun kırılma hatasına yol açmadığı görüldü (**Bkz. Şekil 4.10-3**).



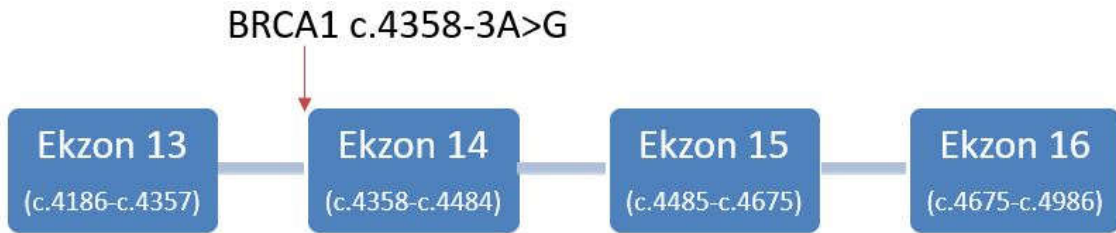
Şekil 4.10-3: BR3214 kodlu hastada *FANCD2* c.1278_1278+3delAGTA değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü

4.11. BRCA1 Genindeki c.4358-3A>G Değişikliği

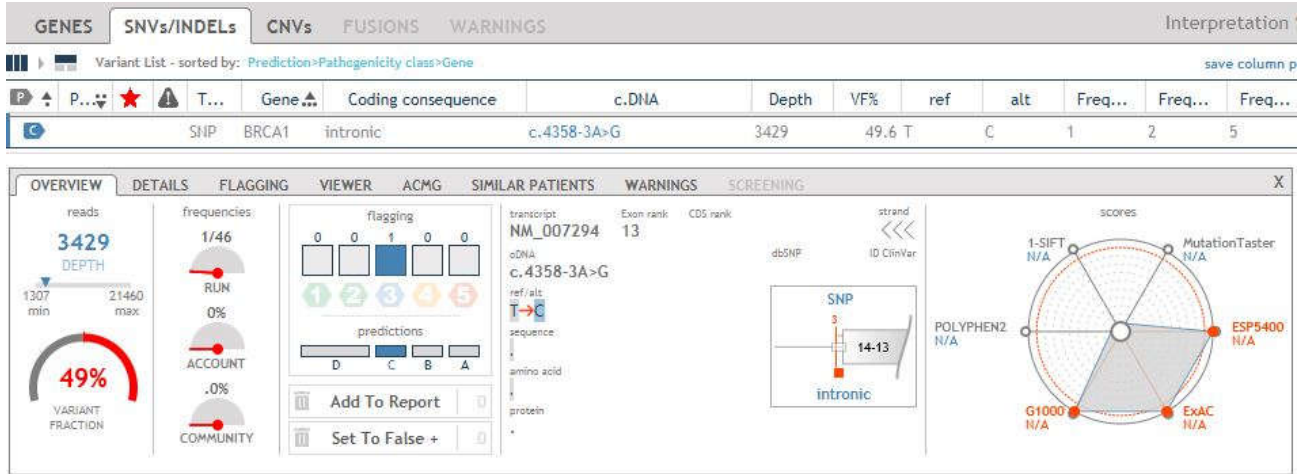
BRCA1 geninde görülen c.4358-3A>G değişikliği kurumumuza başvuran iki farklı hastada rastlanmıştır. Buna göre hastalardan biri BR1590 kodlu 55 yaşında over kanseri tanısı almış hastanın birinci derece akrabalarından bir kişide prostat kanseri (79y) ve bir kişide endometriyum kanseri (56y), ikinci derece maternal akrabalarında over kanseri (60y), kolon kanseri (65y), üçüncü derece maternal akrabalarından bir kişide erken yaşta beyin tümörü (7y), ikinci derece paternal akrabasında oral mukoza tümörü (82y), üçüncü derece paternal akrabasında lenfoma (62y) aile hikayesi bulunmaktadır.

Diğer vaka BR1630 kodlu 34 yaşında over kanseri tanısı almış olan hastadır. Bu hastanın birinci derece akrabasında bir over kanseri (55y), ikinci derece maternal akrabasında over kanseri (63y), ikinci derece paternal akrabasında kolon kanseri (34y), üçüncü derece paternal akrabasında meme kanseri (35y) aile hikayesi bulunmaktadır.

Hastalar için yapılan genetik analizler sonrasında *BRCA1* geninde intronik c.4358-3A>G missense değişikliğine rastlanmıştır. c.4358-3A>G, 13 ile 14. ekzonun arasında ekzon başlangıcına yakın noktada bulunmaktadır (**Bkz. Şekil 4.11-1**). Bu değişikliğe Sophia DDM kullanıcıları tarafından yapılan 128474 test arasında 5 kez ve kendi hastalarımız arasında 2 kez (BR1590 ve BR1630 kodlu hastalarda) rastlanmıştır (**Bkz. Şekil 4.11-2**).

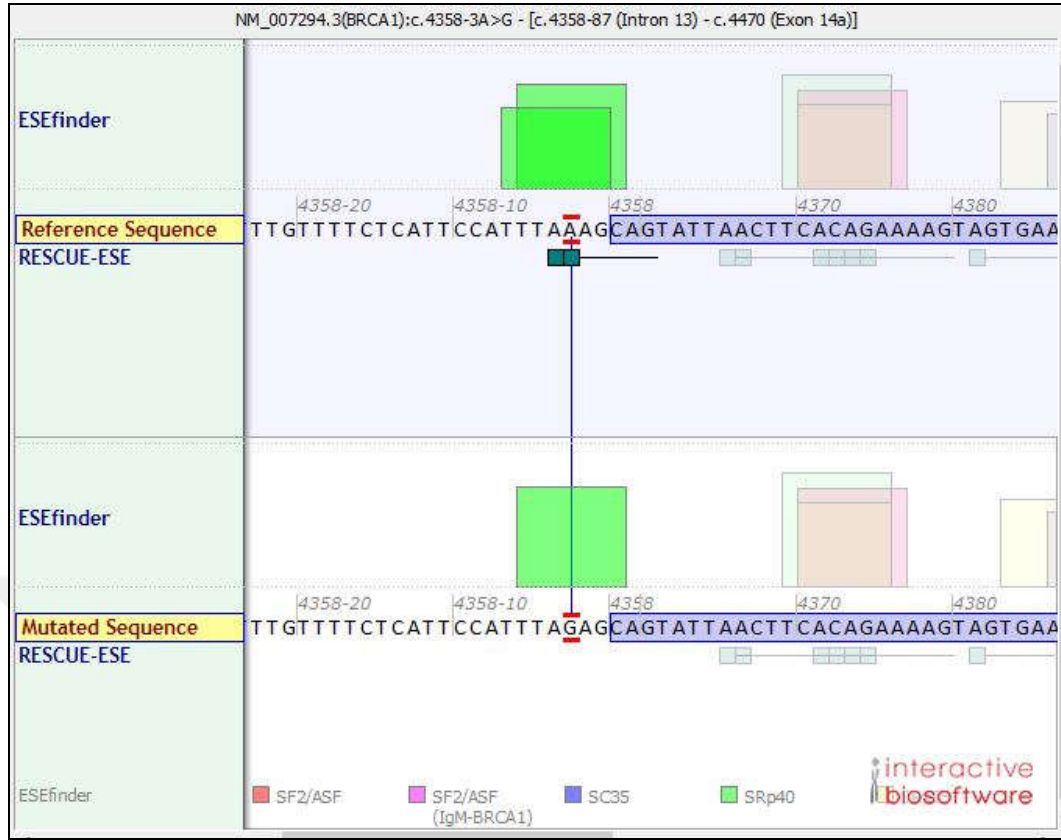


Şekil 4.11-1: *BRCA1* genindeki c.4358-3A-G değişikliğinin gen bölgesi üzerindeki konumu



Şekil 4.11-2: BRCA1 genindeki c.4358-3A>G değişikliğinin Sophia DDM Analiz Sonuçları

dbSNP’de kaydı olmayan değişikliğe ait ClinVar verisi “Variant of Uncertain significance (VUS)” yani “Klinik önemi belli olmayan değişiklik” şeklindedir. Mutasyon, ESEfinder ile incelendiğinde SRp40 bölgelerinden birinin kaybolduğu, RESCUE-ESE ile incelendiğinde iki ESE bölgesinin kaybolduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.11-3).



Şekil 4.11-3: *BRCA1* genindeki c. 4358-3A>G değişikliğinin ESEfinder ve RESCUE-ESE Analiz Sonucu

ClinVar bilgi bankasında (RCV000708678.1) klinik önemi “Variant of Uncertain Significance (VUS)” olarak etiketlenen mutasyonun HGMD bilgi bankasındaki kaydı da “Şüpheli” şeklindedir.

NM_007294.3(BRCA1):c.4358-3A>G AND Hereditary cancer-predisposing syndrome

Clinical significance: Uncertain significance (Last evaluated: Aug 1, 2018)
 Review status: ★ ★ ★ ★

Based on: 1 submission [Details]
 Record status: current
 Accession: RCV000708678.1

Allele description [Variation Report for NM_007294.3(BRCA1):c.4358-3A>G]

NM_007294.3(BRCA1):c.4358-3A>G

Gene: BRCA1:BRCA1 DNA repair associated [Gene - OMIM - HGNC]
 Variant type: single nucleotide variant
 Cytogenetic location: 17q21.31

Şekil 4.11-4: *BRCA1* c.4358-3A>G değişikliğine ait ClinVAR Database Kaydı

HGMD® Professional 2020.1

Gene Mutation Phenotype Reference Batch Advanced | Statistics Information Support | Home Logou

HGMD accession	Reported disease/phenotype	Variant class	Gene symbol	IVS	Donor/Acceptor	Substitution	Location	Feedback
CS199298	Cancer predisposition syndrome	DM?	BRCA1	13	acceptor site	A-G	-3	Feedback

This substitution affects the position 3 nucleotides upstream of the 3' acceptor splice site of intron 13. The splice consensus sequence of Zhang^{*} predicts this nucleotide position to be a C 55-82% of the time[†].
^{*}Zhang (1998), *Hum Mol Genet* 7(5): 919-32. [†]Depending on GC content.

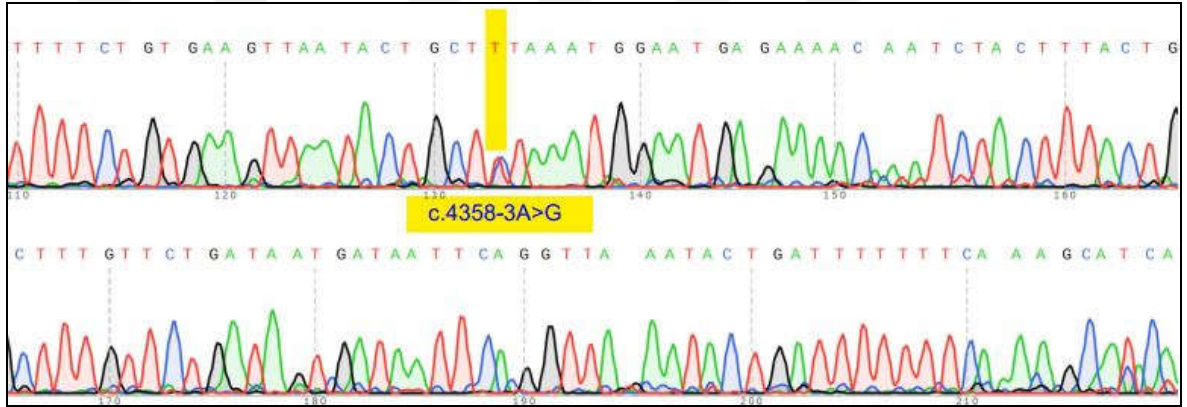
Literature citation	Citation type	Support	Comments/notes
1. Tsaousis (2019) <i>BMC Cancer</i> 19: PubMed: 31159747 Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations.	Primary literature report	📄	Classified as VUS. Suppl. Data

Extra information

Coding strand genomic sequence (GRCh38)	taaagtagattgttttcattccattta(a/g)agCAGTATTAACCTCACAGAAAAGTAGTGA
Genomic coordinate (GRCh38)	chr17:43076617
Genome viewers	UCSC: NCBI MapViewer; NCBI SeqViewer
HGVS nomenclature	NM_007294.3: c.4358-3A>G
Variant Call Format (VCF)	CHROM POS ID REF ALT 17 43076617 CS199298 T C
ClinVar ID	S84507
Clinical significance	Uncertain significance
dbSNP number	No dbSNP ID found
HGMD variant class	Disease causing mutation ?
HGMD computed rankscore	Not available
CpG	No

Şekil 4.11-5: *BRCA1* genindeki c.4358-3A>G değişikliğine ait HGMD Kaydı

BR1590 ve BR1630 kodlu hastaların NGS sonuçlarında görülen c.4358-3A>G mutasyonunun varlığı Sanger Dizileme ile BRINT14F1 ve BRINT14R3 primerleri kullanılarak konfirme edildikten sonra (Bkz. Şekil 4.11-4) aynı bölgenin RNA üzerinden dizilenmesi için bölgeye özgü SEQ1EX13F1 ve BRCA16R2 primerleri tasarlandı ve bu primerler kullanılarak bölge RNA üzerinden tekrar dizilendi. Sanger dizi analizi sonrasında 13. ekzonun son bazı ve 14. ekzonun ilk bazı olan c.4357 ile c.4358 arasında “AG” olmak üzere 2 bazlık bir insersiyonunun varlığı tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.11-5). 2 baz insersiyon sonrası meydana gelecek olan frameshift ile birlikte p.Thr1456Ter noktasında yeni bir stop kodon oluşması ve asıl proteinden kısa bir protein meydana gelmesi beklenmektedir.



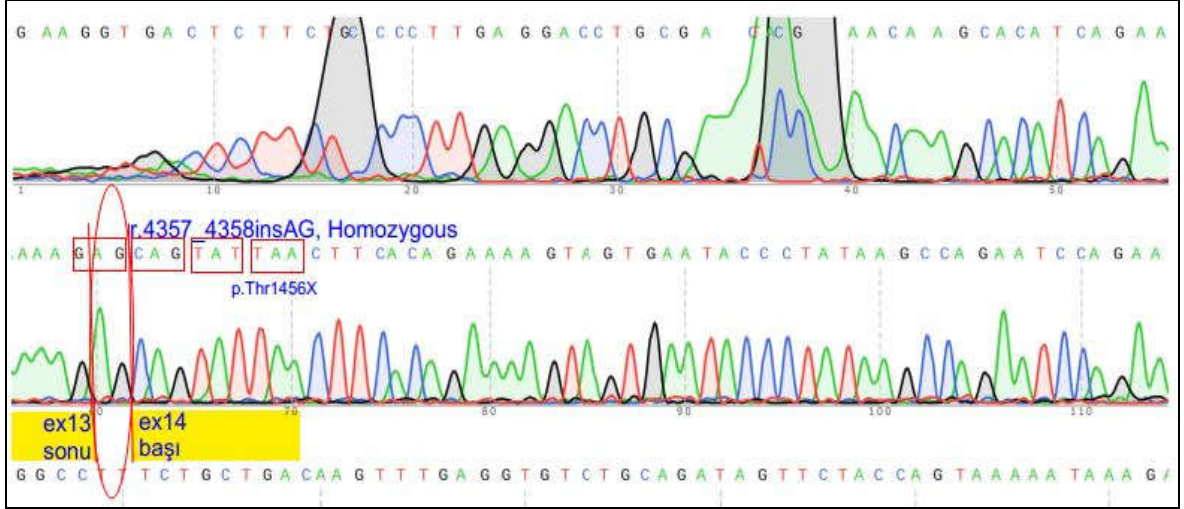
Şekil 4.11-6: *BRCA1* genindeki c.4358-3A>G değişikliğinin DNA üzerinde Sanger ile konfirmasyonu

Referans Dizi: TCAGAA^{AAAG}CAGTATTA^{ACT}

İnsersiyon: TCAGAA^{AAAG}G^{AG}CAGTATTA^{ACTT}

Yeni oluşan stop kodon

p.Thr1456Ter

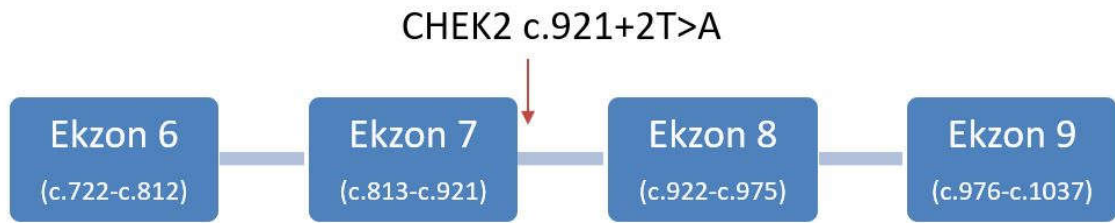


Şekil 4.11-7: BR1590 ve BR1630' kodlu hastalarda *BRCA1* c.4358-3A>G değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü

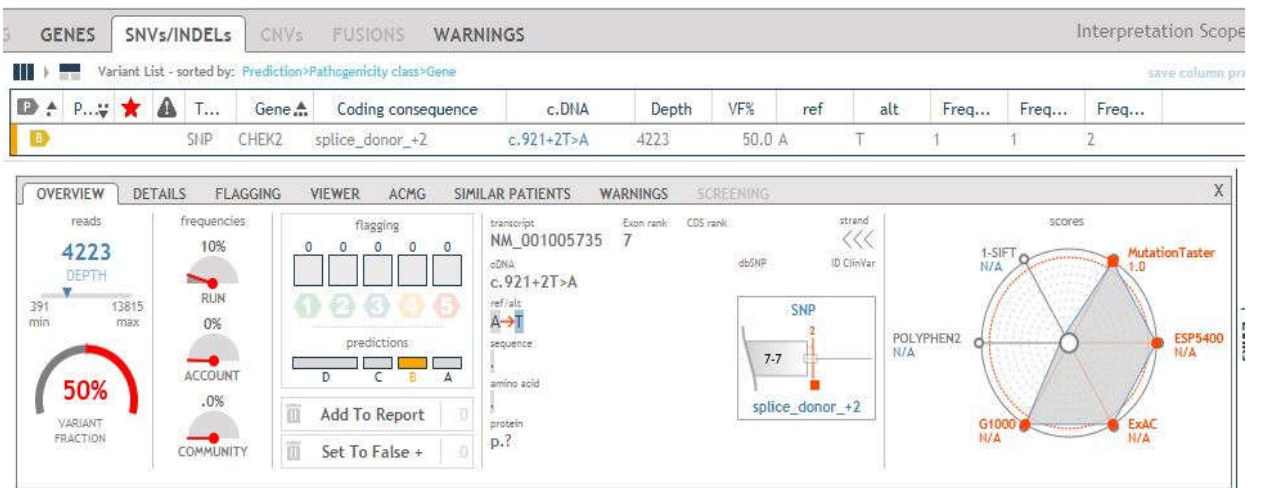
4.12. *CHEK2* Genindeki c.921+2T>A (c.792+2T>A) Değişikliği

BR3215 kodlu Meme Kanseri (35y) tanılı hasta, ikinci derece akrabalarında akciğer kanseri (50y), iki kişide meme kanseri (35y ve 33y), üçüncü derece akrabalarında tiroid kanseri (60y), pankreas kanseri (44y), meme kanseri (50y), prostat kanseri (77y), dördüncü derece akrabalarında meme kanseri (50y), rahim kanseri, lösemi (45y), beşinci derece akrabasında lösemi (5y) aile hikayesine sahiptir.

Yapılan genetik testler sonucunda hastanın *CHEK2* geninde intronik c.921+2T>A değişikliği taşıdığı görüldü. *CHEK2* genindeki c.921+2T>A değişikliği, 7.ekzon ile 8.ekzon arasında 7. ekzonun bitiminden hemen sonra yer almaktadır (Bkz. Şekil 4.12-1). Bu mutasyon Sophia DDM kullanıcıları tarafından yapılan 159233 testte 4 kez ve kendi hastalarımız arasında ise ilk kez görülmüştür (Bkz. Şekil 4.12-2).

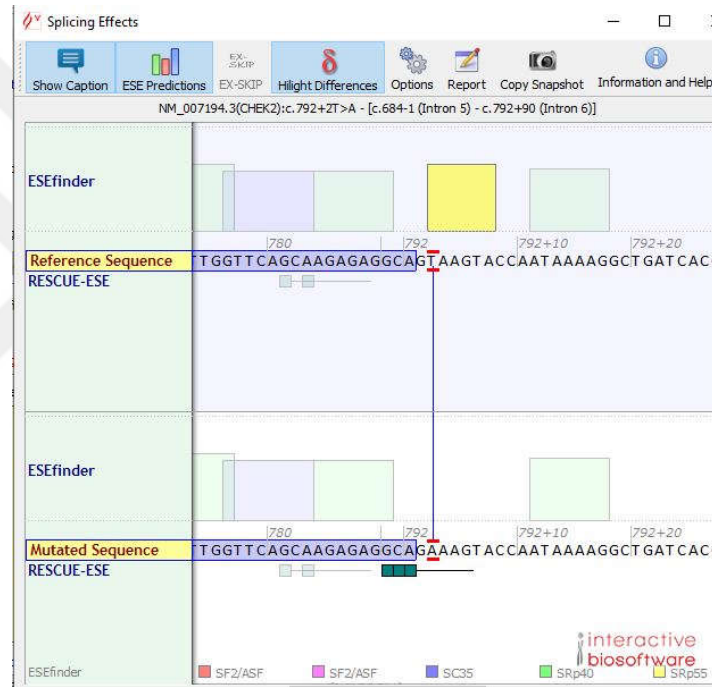


Şekil 4.12-1: *CHEK2* genindeki c.921+2T>A değişikliğin gen üzerindeki Konumu

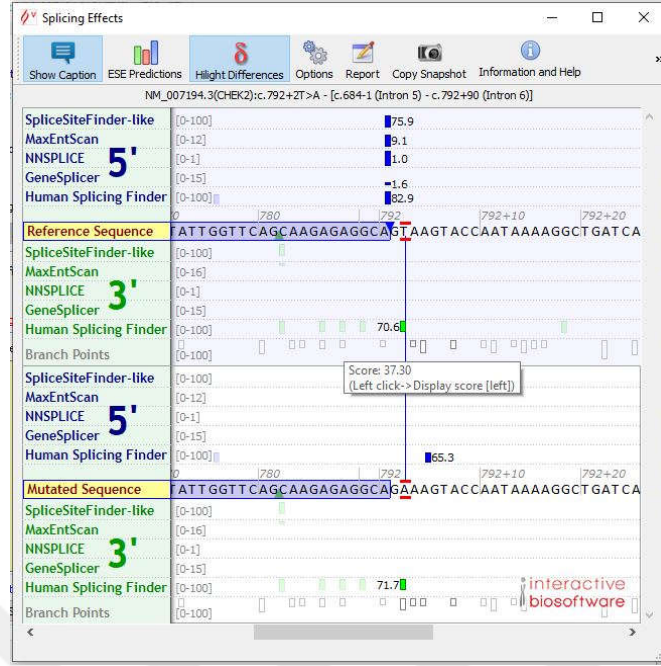


Şekil 4.12-2: *CHEK2* genindeki c.921+2T>A değişikliğin Sophia DDM Analiz Sonucu (Ref: NM_001005735)

Mutasyon hakkında in-siliko analizlere devam edildiğinde, ESEfinder analizi bir SRp55 bölgesinin kaybolduğunu ve RESCUE-ESE aracı ile ise üç yeni ekzonik splicing enhancer (ESE) bölgesinin oluştuğunu gösterilmiştir (**Bkz. Şekil 4.12-3**). SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSplice, GeneSplicer, Human Splicing Finder gibi diğer beş araç tarafından yapılan analiz sonuçlarına göre donör ve akseptör bölgelerde olası değişiklikler beklendiği ve bunların görüntüleri **Şekil 4.12-4**'te gösterildiği gibidir. *CHEK2* genindeki c.921+2T>A değişikliği ile ilgili olarak dbSNP, ClinVAR ve HGMD gibi bilgi bankalarında herhangi bir kayıt bulunmamaktadır.



Şekil 4.12-3: *CHEK2* genindeki c.921+2T>A değişikliğine ait ESEfinder ve RESCUE-ESE Analiz Sonuçları



Gene: CHEK2 - Transcript: NM_001005735.1 - Variant: c.921+2T>A
Analysis range: c.813-45 (Intron 6) - c.921+46 (Intron 7) [199 bps]

Donor Sites

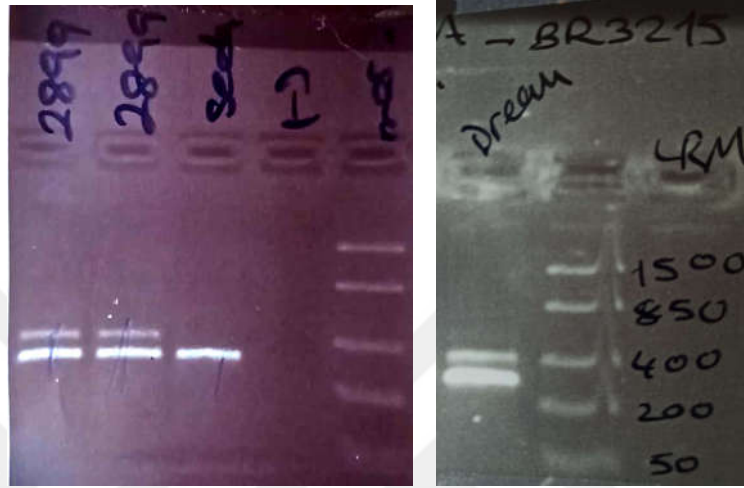
	SSF [0-100]	MaxEnt [0-12]	NNSPLICE [0-1]	Gene Splicer [0-15]	HSF [0-100]
Threshold	≥ 70	≥ 0	≥ 0.4	≥ 0	≥ 65
Exon 7 – c.814					= 71.51
Exon 7 – c.828	= 79.77	= 8.27	= 0.72		= 84.14
Exon 7 – c.856	= 82.06	= 5.58	= 0.93		= 86.80
Exon 7 – c.864					= 65.94
Exon 7 – c.893					= 71.66
Exon 7 – c.904					= 65.34
Exon 7 – c.921 N	75.90 → —	9.07 → —	0.97 → —	1.57 → —	82.91 → —
Intron 7 – c.921+4					— → 65.31

Natural Splice Site

Şekil 4.12-4: *CHEK2* genindeki c.921+2T>A değişikliğine ait in-Siliko splicing Analiz Araçları ile alınan Sonuçları

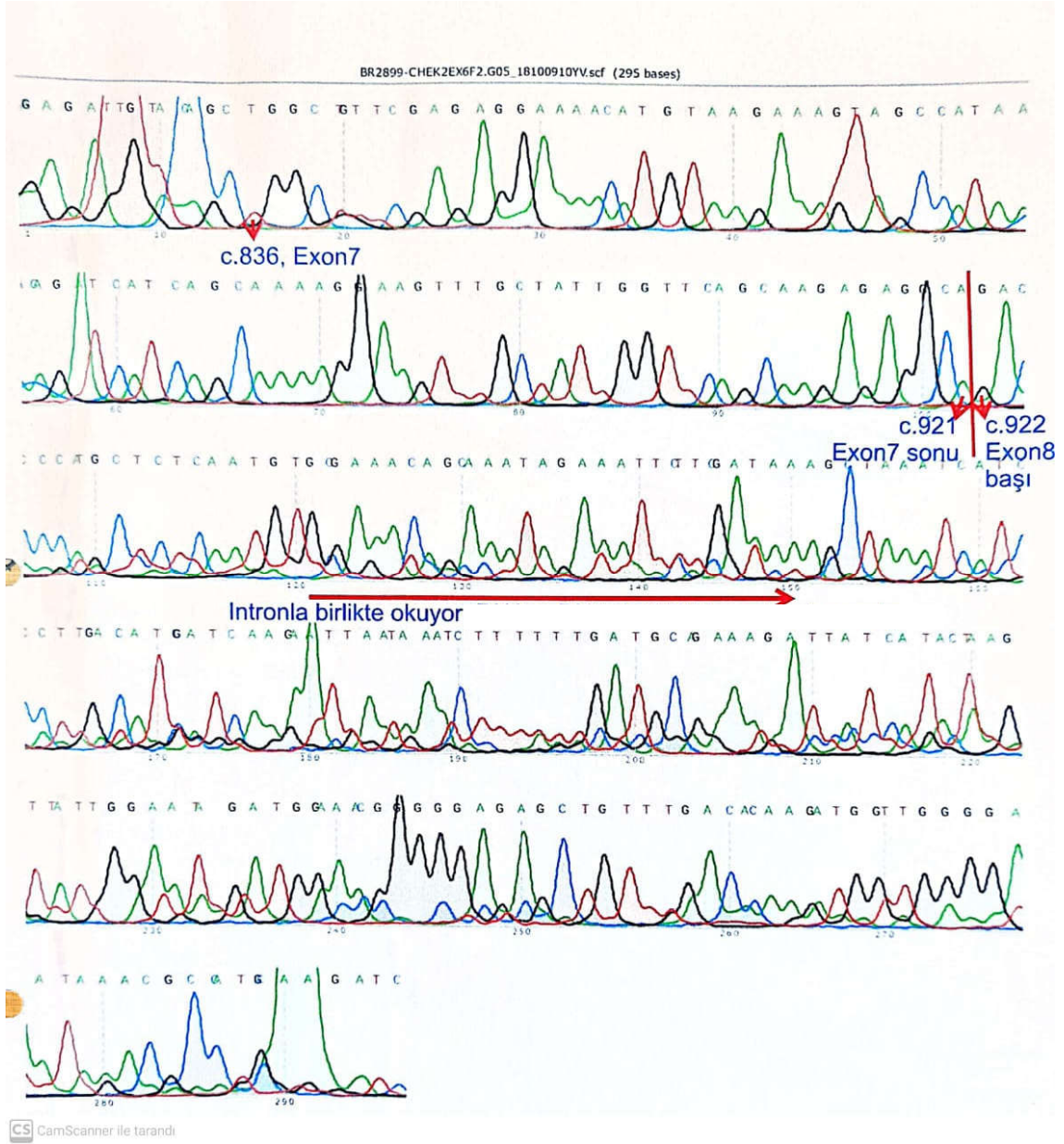
DNA'sında c.921+2T>A mutasyonu bulunan hastanın RNA'sında kırılma hatası olup olmadığını görmek için CHEK2EX6F1, CHEK2EX6F2, CHEK2EX10R1, CHEK2EX11R1 primerleri ile RNA üzerinden Sanger dizileme yapıldı. Hastadan farklı zamanlarda alınan farklı örnekler ile yapılan PCR'ların sonuçları şekildeki gibi kontrol

örneğinden farklıdır (Bkz. Şekil 4.12-5). Hastadan 5. kez alınan kan örneğinden izole edilen RNA'dan yapılan PCR'lerde görülen iki bant, agaroz jelden ayrı ayrı pürifiye edilip Sanger yöntemi ile dizilendi fakat okunabilen bir sonuç elde edilemedi.



Şekil 4.12-5:Hastaya ait farklı cDNA örnekleriyle yapılan PCR sonuçları

Dizileme esnasında 7.ekzondan 8.ekzona geçiş esnasında intronun da okunduğu görüldü. RNA örneğine DNase eklenerek yapılan denemelerde de farklı bir sonuç elde edilemedi, intron kaybolmadı. Hastadan bir çok kez alınan tüm örneklerin denenmesi ve tüketilmesi sonrasında ne daha iyi bir RNA ne de daha iyi bir dizileme sonucu elde edilebildi (Bkz. Şekil 4.12-6). Bu nedenle *CHEK2* c.921+2T>A varyatının yol açtığı sonuçlar net bir şekilde kanıtlanamadı.

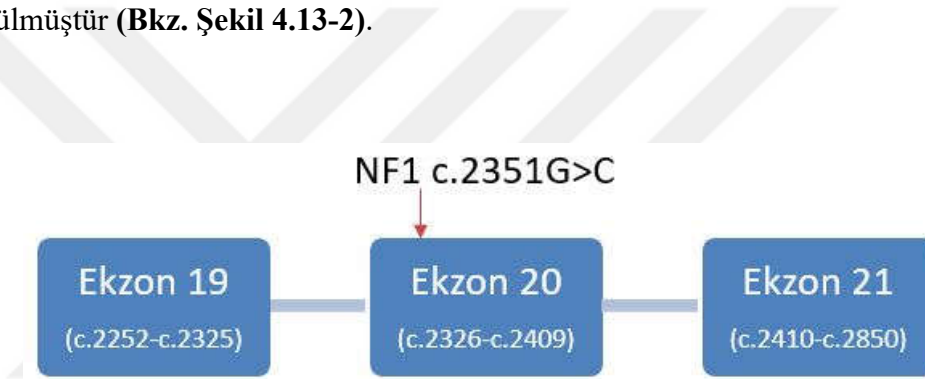


Şekil 4.12-6: BR3215 kodlu hastada *CHEK2* c.921+2T>A değişikliğini içinde bulunduran bölgenin Sanger dizileme kromatogram görüntüsü

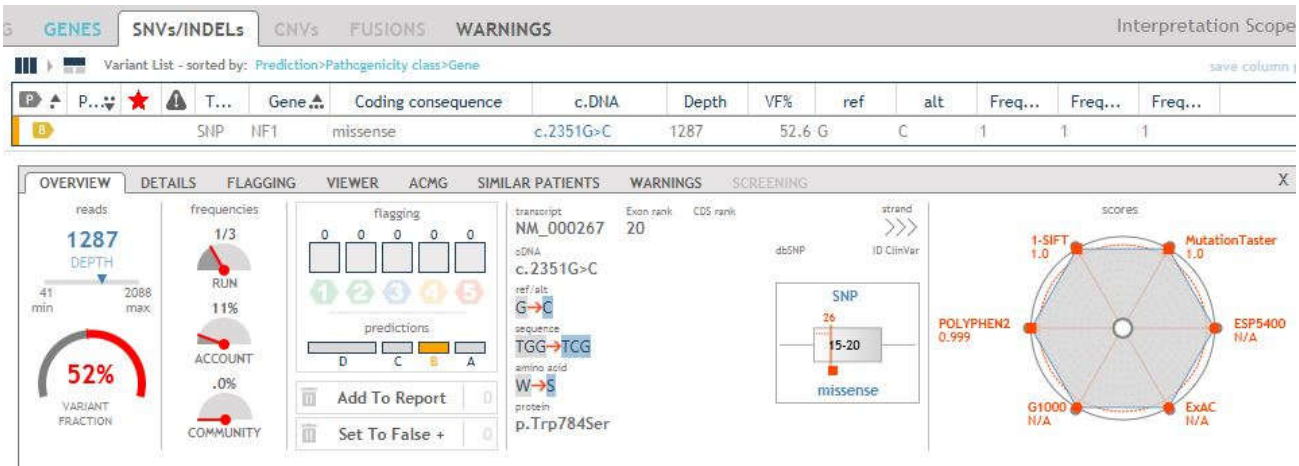
4.13. *NF1* Genindeki c.2351G>C, p.(Trp784Ser) Değişikliği

NF005 kodlu 12 yaşında Nörofibromatozis tanısı almış kadın hastanın dördüncü dereceden akrabasında meme kanseri (37y) aile hikayesi bulunmaktadır.

Hasta için yapılan genetik analizler sonucunda *NF1* geninde ekzonik c.2351G>C missense değişikliğine rastlanmıştır. c.2351G>C değişikliği 20. ekzon üzerinde bulunmaktadır (Bkz. Şekil 4.13-1). Bu ekzonik missense değişiklik Sophia DDM kullanıcılarının gerçekleştirdiği 18749 testte ve kendi hastalarımız arasında ilk kez görülmüştür. ClinVar ve HGMD bilgi bankalarında sırasıyla “Variant of Uncertain Significance (VUS)” ve “Şüpheli” olarak etiketlenen mutasyon, Mutation Taster, SIFT ve POLYPHEN gibi in-siliko araçlar tarafından incelendiğinde riskli olarak öngörülmüştür (Bkz. Şekil 4.13-2).

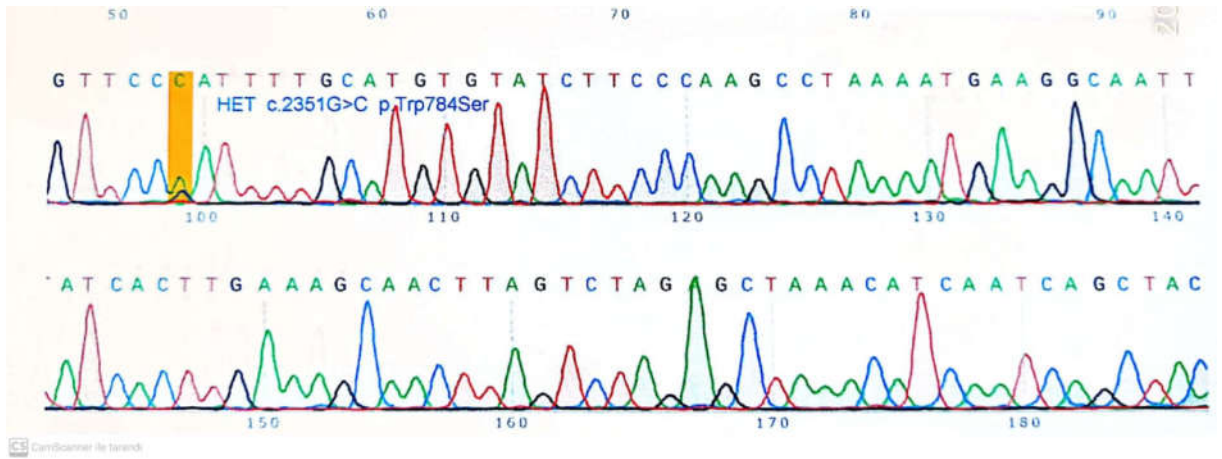


Şekil 4.13-1: *NF1* genindeki c.2351G>C değişikliğinin gen üzerindeki konumu

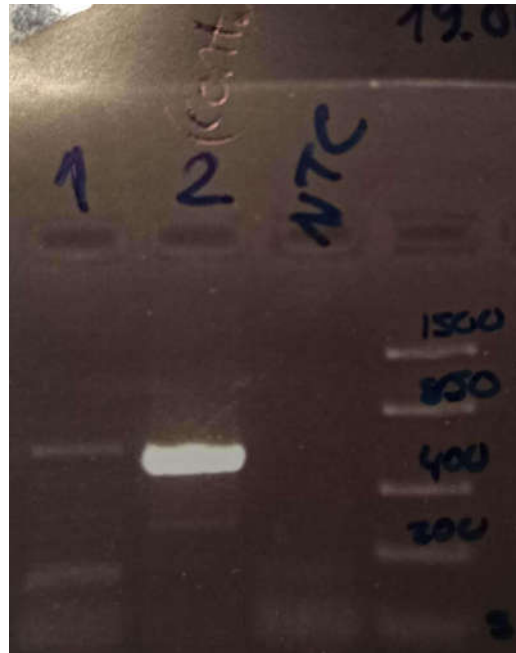


Şekil 4.13-2: *NF1* genindeki c.2351G-C değişikliğinin Sophia DDM Analiz Sonucu

Hastada varlığı NGS ile tespit edilen *NF1* genindeki c.2351G>C değişikliği, ilgili bölgeyi kapsayan NF1INT20R1 ve NF1INT20R1 primerleri tasarlanarak ve bu primerler kullanılarak Sanger dizi analizi ile konfirme edilmiştir (Bkz. Şekil 4.13-3). Fakat kısıtlı olan hasta örneğinden kaliteli bir RNA elde edilemediğinden dolayı cDNA ile NF1EX18F2 ve NF1EX21R1 primerleri kullanılarak yapılan PCR'dan iyi sonuç alınamadığından dizileme işlemi başarısız olmuştur (Bkz. Şekil 4.13-4). Dolayısıyla bu değişikliğin RNA üzerindeki etkisi belirlenememiştir.



Şekil 4.13-3: NF005 DNA örneği ile c.2351G>C'nin Sanger Konfirmasyonu

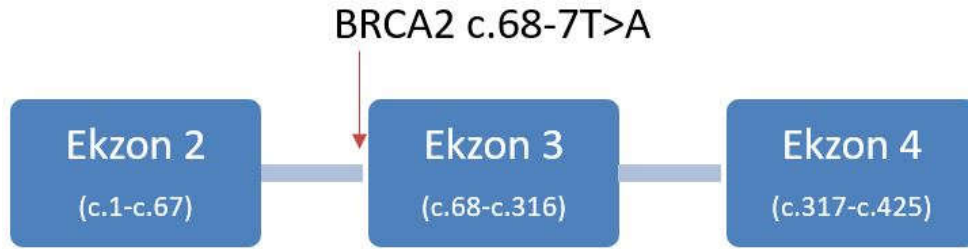


Şekil 4.13-4: NF005 PCR Sonucu (1 numara)

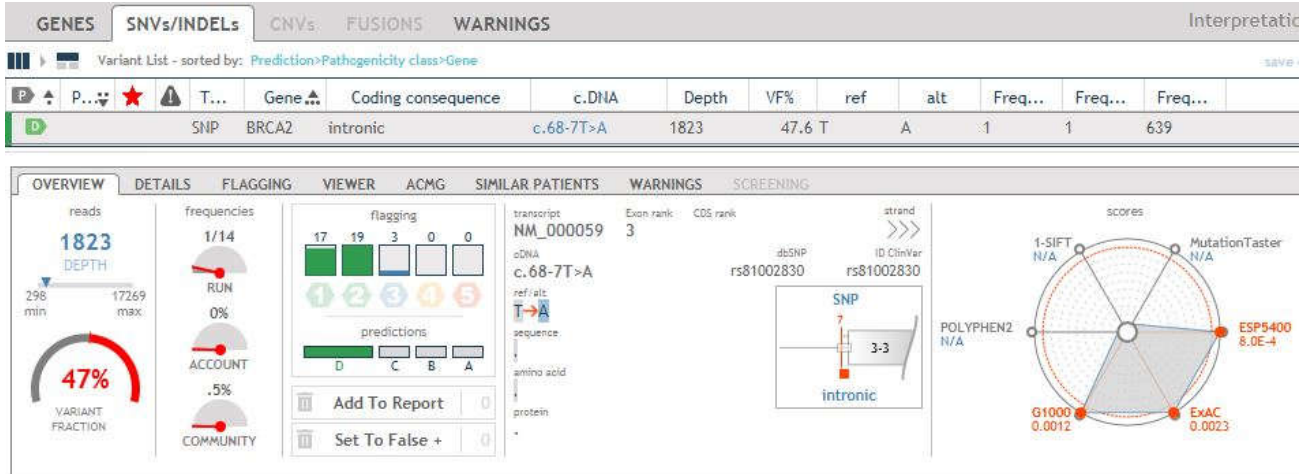
4.14. *BRCA2* Genindeki c.68-7T>A Değişikliği (BR2966)

BR2966 kodlu 39 yaşında over kanseri ile rektum kanseri olmak üzere iki farklı primer tümör tanısı almış hastanın birinci derece akrabalarında bir kişide Mide kanseri ile birlikte pankreas Kanseri, bir diğer akrabasında kolon kanseri ile birlikte rahim ağzı kanseri, ikinci derece akrabasından bir kişide prostat kanseri, üçüncü derece akrabalarından bir kişide mide kanseri ile birlikte pankreas kanseri ve bir diğer kişide lenfoma aile hikayesi bulunmaktadır.

Hasta için yapılan genetik analiz sonucunda *BRCA2* geninde intronik c.68-7T>A missense değişikliğine rastlanmıştır. c.68-7T>A değişikliği, 2.ekzon ile 3.ekzon arasında 3.ekzon başlangıcına yakın konumda bulunmaktadır (Bkz. Şekil 4.14-1). Bu değişiklik Sophia DDM’de yapılan testlerde %0,5 oranında ve kendi hastalarımız arasında ilk kez görülmüştür. Bulunduğu konum nedeni ile risk oluşturabileceği düşünülen değişiklik incelenmeye alınmıştır (Bkz. Şekil 4.14-2).



Şekil 4.14-1: *BRCA2* genindeki c.68-7T>A değişikliğinin gen üzerindeki konumu



Şekil 4.14-2: *BRCA2* genindeki c.68-7T>A değişikliğinin Sophia DDM'deki Analiz Sonucu

Hastada varlığı NGS ile tespit edilen *BRCA2* genindeki c.68-7T>A değişikliği, ilgili bölgeyi kapsayan BR2P2F1 ve SEQ2EX4R1 primerleri kullanılarak Sanger dizi analizi ile konfirme edilmiştir. Hasta cDNA örneği ile yapılan PCR'ların dizilenmesi sonucunda, söz konusu değişikliğin ekzon geçişlerinde herhangi bir hataya sebep olmadığı gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.14-3).

5. TARTIŞMA

Klinik rutin çalışmalarda tespit edilen etkisi belirsiz bazı genetik değişiklikler klinik pratiğimizde hastaya kesin sonuç vermemizi ve tam rapor yazmamızı engellemektedir. Test sonucunda saptanan varyanta çok nadir rastlanıyorsa ya da ilk defa tarafımızdan tespit edilmiş işe, hasta için tam bir klinik ilişkilendirme yapılamamaktadır. Bu gibi durumlarda Pubmed taraması, ilgili bilgi bankaları ve in silico algoritmalar kullanılarak söz konusu değişikliğin genin fonksiyonunu nasıl etkileyeceği tahmin edilmekte ve bu doğrultuda hasta raporu tamamlanmaya çalışılmaktadır. Ancak tüm bu durumlar hastaya kesin sonucu vermeyi engellemektedir. Bu tür durumlarda özellikle ekzon-intron bağlantılarında var olan değişikliklerin hastaya ait mRNA üzerinden incelenilmesi o hastaya ait tam sonucun verimesinde en önemli uygulamalar arasındadır. Ancak rutin uygulama sırasında saptanan bu değişikliklerin ya da varyantların araştırılması mümkün değildir. Bu nedenle bu tür varyantların araştırılması, DNA-RNA düzeyinde yaptıkları olası değişiklikler araştırma kapsamında değerlendirilmektedir. Söz konusu tez çalışmasında, klinik uygulamalar sırasında karşılaştığımız 14 farklı değişiklik hastaya ait RNA materyali üzerinden araştırılarak nadir görülen bu varyantların RNA üzerinde yaptıkları etkiler araştırılmıştır.

RBI genindeki c.2489+2T>C varyantı 23. Ekzonun bitiminden iki baz sonra bulunduğundan, Sophia DDM ve Alamut programları tarafından splice donör bölgede olarak bildirilmiştir ve kırılma hatasına yol açabileceği öngörülmüştür. Genom bilgi bankaları tarafından minör allel frekansı belirtilmemiş olan bu varyantın Sophia DDM kullanıcıları arasında yapılan testlerine bakıldığında görülme oranı %0,7 olarak hesaplanmıştır. Nadir görülen bu varyantın HGMD bilgi bankasında kaydı bulunmamakla birlikte ClinVAR bilgi bankası tarafından 2019 yılında “Patojenik” olarak etiketlenmiştir (RCV000532339.3). Patojenisite kanıtı olarak ClinVAR tarafından kanıt olarak gösterilen 6 yayın bulunmaktadır. Bu kanıtlardan Barbarosa ve ark.[32], Ottaviani ve ark.[33], Chaussade ve ark. [34] ve Richter ve ark. [35] tarafından yapılmış ilk dört çalışmada IVS23+2 yerine IVS23+1’den bahsedilmiştir. Bu iki varyant lokasyonunun yakınlığı nedeni ile benzer değerlendirildiği düşünülmektedir, fakat hastalarda buldukları asıl varyant c.2489+1 konumundadır. Beşinci kanıt olan Taylor ve

ark.'nın yaptığı çalışmada da Ekzon 23'te bulunan bir nonsense mutasyon ile ilgili bilgi verilmiştir [36]. Son kanıt da ACMG kriterlerini kanıt göstermektedir [37]. Tüm bu kanıtları ortak olarak değerlendirdiğimizde, ClinVAR bilgi bankasının bu varyantı patojenik olarak değerlendiriyor olmasının şüpheli olabileceği düşünülmektedir. Bu varyantın ortaya çıkardığı kırılma hatasının somut bir kanıtının bulunmadığı görülmektedir. Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz ilgili gen bölgesinde dizileme sonuçlarının normal olması sebebi ile bu varyantın ekzon dizilimine etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Özetle benzer verilerden yola çıkarak ClinVAR bilgi bankasında patojenik olarak değerlendirilen bu değişikliğin hastaya ait numunelerde incelendiğinde patojenik olmadığı tarafımızca kanıtlanmıştır.

CHEK2 genindeki c.1556C>T varyantının minör allel frekansı dbSNP'te (rs142763740) yaklaşık %0,03 olduğu belirtilmiştir. dbSNP'in oldukça nadir olarak gösterdiği MAF değerlerine karşılık Sophia kullanıcıları arasında yapılan testler sonucunda görülme yüzdesi %0,22, kendi hastalarımız arasında görülme yüzdesi %0,73 olarak bulunmuştur. ClinVAR bilgi bankası verilerine göre ilgili değişiklik "Likely Pathogenic" ve "Variant of Uncertain Significance(VUS)" olarak değerlendirilmiştir. Bu iki değerlendirme birbirinden farklı olup hastaya net sonuç verilmesini engellemektedir. Aynı değişiklik için HGMD bilgi bankası verileri incelendiğinde p.(Thr476Met) varyantının "Patojenik" olarak bildirildiği görülmektedir. HGMD bilgi bankasında bu değişikliğe ait kanıt olarak verilen literatürler arasında Desrichard et al. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada söz konusu değişiklik in-siliko algoritmalarla göre değerlendirilmiştir ve buna göre değişiklik SIFT2 algoritmasında Deleterious, Polyphen2 algoritmasında Probably Damaging, Proposed Diagnosis algoritmasında Probably Deleterious olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada total proteinin fosforilleme yeteneği de incelenmiş ve kinaz aktivitesinin eksik olduğu gösterilerek bunun sebebinin ilgili değişiklik olduğu belirtilmiştir. Buna bağlı olarak çalışmada ilgili değişikliğin patojenik olduğu, in-siliko araştırmalar ile in-vitro araştırmaların sonuçlarının uyumlu olduğu bildirilmiştir [38]. Diğer yayınlar incelendiğinde Roeb et al. ve arkadaşlarının [39] yaptıkları çalışmada da söz konusu değişikliğin yine in-siliko algoritmalarla değerlendirildiği ve aynı sonuçların elde edildiği görülmüştür. 2019'da Delimitsou et al. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da ilgili değişikliğin Mutation Taster algoritmasına göre: "Disease Causing" yani "Hastalık Yapıcı" olduğunu ancak in-vivo sonuçların ise net olmadığı bildirilmiştir [40]. Söz konusu değişiklik ile ilgili HGMD'de

verilen toplam 15 yayının içinde, ilgili mutasyonun etkisine ilişkin kinaz aktivitesinden bahseden yayın dışında somut bir kanıt görülmemektedir. Yaptığımız in silico araştırmaların sonucunda Ex-SKIP analiz sonuçları mutant allelin splicing esnasında ekzon atlama ihtimalinin yüksek olduğu görülmüştür. RNA üzerinden yaptığımız dizileme çalışması sonucunda söz konusu c.1556C>T p.(Thr476Met) değişikliğin ekzon geçişlerinde herhangi bir atlamaya neden olmadığı tarafımızca kanıtlanmıştır.

BRCA1 genindeki c.5152+5G>A varyantı, yaptığımız testler arasında %0,07 oranında, Sophia DDM kullanıcılarının yaptığı testler arasında %0,15 oranında görülmektedir. dbSNP bilgi bankasında MAF skoru belirtilmediğinden bu oranlar görülme sıklığı açısından bilgi verici olmaktadır. SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSPLICE ve GeneSplicer araçları ile yapılan in-silico incelemeler varyant öncesi ve sonrası skor hesaplarını karşılaştırarak donör-akseptör bölgelerde değişiklikler olabileceğine işaret etmişlerdir. ESEfinder ile yapılan inceleme sonucunda da bir SRp55 ESE bölgesinde kayıp meydana gelebilme olasılığı gösterilmiştir. Hasta RNA'sı ile dizileme çalışmamız sonucunda söz konusu değişikliğin Ekzon 18 delesyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımızla uyumlu olan verilerin Campos et al. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da bildirildiği görülmüştür [41].

APC genindeki c.532-1G>A varyantının MAF skoru dbSNP bilgi bankasında belirtilmemiştir. Elimizdeki veriler ile yapılan yüzde hesabında Sophia DDM kullanıcıları arasında görülme sıklığı %0,002 olan varyant, MutationTaster incelemesine Patojenik olmaya aday bir varyant gibi görünürken, ESEfinder ve RESCUE-ESE araçları ile inceleme sonuçları normal bulgular vermiştir. ClinVAR bilgi bankasında "Patojenik" olarak etiketlenen bu varyant ile ilgili bölgenin çalışmamızdaki hasta RNA'sı dizilenmesi sonucunda 6. Ekzon başlangıcında 16 bazlık bir delesyonun gelişmesine neden olduğu tespit edilmiştir. *APC* geninde c.532_547del olarak isimlendirdiğimiz bu mutasyonun p.Phe178Ilefs*2 lokasyonunda frameshift meydana getirerek erken bir stop oluşturması beklenmektedir. Lagarde et al. 2010 yılında 863 hastada yaptığı çalışmada 2 hastada bu mutasyonu gördüğünü bildirmiş ancak nasıl bir etkisi olduğu hakkında bilgi vermemiştir [42]. ClinVAR bilgi bankasının kanıt olarak gösterdiği Wallis YL. et al. 1999 ve Nykamp et al. 2017 ve HGMD'nin kanıt gösterdiği Xiong et al. 2015 yayınlarında bu mutasyona ait spesifik bir bilgiye rastlanmamıştır. Yapılan literatür incelemesinde bu intronik missense değişikliğin 16 bazlık delesyona

neden olduğuna ilişkin bir bilgi ve bulgu daha önce bildirilmemiş olup ilk kez tarafımızdan literatüre kazandırılmıştır.

BRCA2 genindeki c.9117+9C>T varyantı 23. Ekzon bitiminde bulunmaktadır. dbSNP tarafından görülme sıklığı %0,008 olarak belirtilen varyantın Sophia DDM’de yapılan testler arasında görülme oranı %0,003 olarak nadirliği ile dikkat çekmektedir. ClinVAR bilgi bankasında “Likely Benign” olarak etiketlenmiş olan bu varyantın RNA üzerindeki etkisini görmek için yapılan dizileme sonuçlarımıza göre ekzon geçişlerinin normal olduğu ve varyantın herhangi bir kırılma hatasına yol açmadığı izlenmiştir. Bulgularımızın Spearman ve ark.’nın çalışması ile uyumlu olduğu görülmüştür [43].

RB1 genindeki c.1050-2A>G varyantı 11.ekzondan hemen önce bulunmaktadır. MutationTaster incelemesi sonucuna göre “Deleterious” olarak görünen varyantın SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer ve Human Splicing Finder incelemeleri sonucunda donör/akseptör bölgelerde değişiklik meydana gelebileceği ve kırılma hatası oluşturabileceği öngörülmüştür. Sophia DDM tarafından splice hatası yapabileceği öngörülerek patojenik işaretlenen varyant, LOVD ve HGMD bilgi bankasında Shimizu et al.’u kaynak göstermiştir fakat yayında bu varyantın sadece tespit edildiği belirtilerek amino asit üzerindeki etkisini gösterecek bir çalışma yapılmamıştır [44]. Kırılma bozukluğunun meydana gelme şeklini dizi analizi ile görüntüleyebilmek için yaptığımız çalışmalar sonucunda ekzon 9-10-11 ve 12 geçişlerinin normal olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, çalışmamızdan elde edilen sonuç ile literatürdeki bulgular arasında diskordans olduğu görülmektedir. Bu bulgu literatürde, bilgi bankalarında ve in silico algoritma hesaplarındaki sonuçlara göre verilecek bir kararı değiştirecek bir sonuç olması açısından da değerlidir.

Erken yaş meme kanseri tanılı kadın hastada bulunan *BRCA2* c.7436-1G>C intronik varyantına ait MAF skoru dbSNP tarafından belirtilmemiştir. Varyantın Sophia DDM kullanıcıları arasında yapılan testler arasında görülme sıklığı %0,002 olarak hesaplandığından, akseptör bölgede bulunduğu ve MutationTaster tarafından riskli görüldüğünden varyant patojenik olarak sınıflandırılmıştır. ClinVAR bilgi bankasında patojenisiteye kanıt olarak sadece Cambridge Üniversitesi’ne ait mutasyon sınıflama kılavuzu gösterilmiştir [45]. Çalışma başladığında HGMD bilgi bankasında kaydı bulunmayan bu varyant ile aynı noktada meydana gelen bir G>A ve değişimi HGMD’de ‘şüpheli’ kaydı ile, aynı noktadaki bir G>T değişimi ‘patojenik’ kaydı ile

bulunmaktadır [46, 47]. Hasta RNA kalitesi yeterince iyi olmadığından dizileme sonuçlarımız ilgili değişikliğin ekzon atlandığını netlikte gösterecek sonuçlar elde edilemediğinden literatür karşılaştırılması yapılamamıştır.

Erken yaş meme kanseri tanılı kadın hastada görülen *BLM* genindeki c.4076+4T>G varyantı ekzon-intron birleşme bölgesinde bulunduğundan dikkat çekmektedir. 22. ekzonun bitimindeki bu mutasyona ait MAF skoru dbSNP bilgi bankasında % 0.14 olarak belirtilmiş olmasına rağmen Sophia DDM kullanıcıları arasında görülme sıklığı %1,3 olarak hesaplanmıştır. ClinVAR bilgi bankasında patojenitesi hakkında tam karar verilemediği belirtilen bu varyant için 6 yayın “Likely Benign”, 4 yayın “Benign” ve bir yayın da “Variant of Uncertain Significance(VUS)” etiketini kullanmıştır. Varyantın in-siliko araçlarla analizi sonucunda “zararsız” olduğu tahmin edilmiştir. Hakkında somut bir dizileme bilgisi verilmemiş olan varyantın RNA üzerindeki etkisini görebilmek için gerçekleştirdiğimiz dizileme çalışması sonucunda Ekzon 22-23 geçişinin normal olarak gerçekleştiği ve ekzon atlamadığını kanıtlayarak “zararsız” bir varyant olduğu gösterilmiştir.

Erken yaş meme kanseri tanılı hastada saptanan *NBN* genindeki c.71A>C varyantı 2. ekzonda bulunmaktadır. Varyant ile ilgili dbSNP ve ClinVAR bilgi bankaları kaydı bulunmamaktadır. Görülme sıklığı hakkında bilgi edinmek için Sophia DDM üzerindeki verileri değerlendirildiğinde, varyantın yapılan tüm testler arasında %0,003 oranında görüldüğü ve bu nadir varyantın Sophia DDM tarafından patojenik olarak etiketlendiği görülmüştür. MutationTaster, POLYPHEN2, SIFT gibi araçların tehlikeli bir varyant olabileceğine işaret etmesi nedeni ile RESCUE-ESE ve ESEfinder ile analizi gerçekleştirilmiş ve ESEfinder analizi sonucunda varyantın normal ESE bölgelerinde değişikliğe neden olabileceği öngörülmüştür. Bütün bu bilgileri somutlaştırmak için gerçekleştirdiğimiz dizi analizi sonucunda, *NBN* geninde ekzon 1-2 ve 3 geçişlerinin normal sıralı şekilde gerçekleştiği görüntülenmiştir. In siliko araçların tahmin sonuçlarının aksine varyantın “zararsız” olduğu kanıtlanmıştır.

Erken yaş meme kanseri tanılı hastada tespit edilen *FANCD2* genindeki c.1278_1278+3delAGTA delesyonu ClinVAR bilgi bankasında kodu ile “Variant of Uncertain Significance (VUS)” olarak etiketlenmiştir. dbSNP bilgi bankasında “Splice Donor Variant” olarak etiketlenen bu delesyon SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, NNSPLICE ve Human Splicing Finder araçları tarafından riskli olarak analiz edilmiştir.

Delesyonun intron-ekzon bağlantı noktasında meydana gelişi ve risk sonuçları ve göz önünde bulundurularak dizilenen hasta örneğinde ekzon 15-16 ve 17 arasındaki geçişin normal olarak gerçekleştiği ve herhangi bir kırılma hatasına neden olmadığı gösterilmiş, varyantın zararsız olduğu kanıtlanmıştır.

Ailesinde birçok kanser vakası bulunan over kanseri ve erken yaş over kanseri tanılı iki hastada saptanan, dbSNP kaydı bulunmayan ve MAF skoru bilinmeyen *BRCA1* c.4358-3A>G varyantının Sophia DDM testleri arasında görülme oranı %0,004 olarak hesaplanmıştır. Bu nadir varyant MutationTaster, SIFT, POLYPHEN gibi in siliko araçlarda yapılan hesaplamalara göre “zararsız” olarak görülse de RESCUE-ESE ve EFEfinder analizlerine göre splicing hatası meydana getirme olasılığı öngörülmüştür. ClinVAR bilgi bankası bu varyantı “Variant of Uncertain Significance (VUS)” olarak etiketlerken sadece ACMG kılavuzunu kaynak göstermiştir. HGMD bilgi bankasında patojenitesi şüpheli olarak bildirilen bu varyant için Tsaousis et al. ve arkadaşları [48] tarafından yapılan çalışma kaynak gösterilmiş fakat yayında ilgili varyant ile alakalı bir bilgiye rastlanmamıştır. Dizileme sonucumuza göre 13. ekzon ile 14. ekzon arasında iki bazlık bir insersiyon tespit edilmiştir. İki bazlık insersiyonun meydana getirdiği frameshift nedeni ile 1456. Aminoasit olan Treonin’in terminal kodona dönüştüğü ve buna bağlı olarak meydana gelen proteinin kısaldığı tarafımızca kanıtlanmıştır. Anlaşılacağı üzere, zararsız olduğu bildirilen bu değişikliğin yaptığımız çalışma sonrasında frameshift mutasyona neden olarak tüm protein yapısının değiştirdiği ve “zararlı” olduğu gösterilmiştir.

Akciğer kanseri tanısı almış bir hastada tespit edilen *CHEK2* genindeki c.921+2T>A varyantı 7. ekzon ile 8. ekzon arasında ve ekzon-intron bağlantısında bulunduğu için kırılma açısından risk oluşturan bir noktadadır. Sophia DDM testleri arasında görülme oranı %0.003 olan varyanta ait dbSNP ve ClinVAR kaydı bulunmamaktadır. İn-siliko araçlar ile yaptığımız analizlerin sonucuna göre MutationTaster, SSF, MaxEnt, HSF, NNSplice, tarafından tehlikeli bulunan varyant hakkında literatürde daha fazla bilgi bulunmadığından incelemeye alınmıştır. Hastaya ait RNA örneği ile yapılan PCR ürünleri kontrol örneği ile karşılaştırıldığında, hasta örneğinin kontrol örneği gibi tek noktada amplifiye olmadığı ve farklı büyüklükte iki ürün olarak çoğaldığı görüldü. PCR ürününün dizilenmesi sonucunda 7. ekzondan 8. ekzona geçiş noktasında, 8. ekzonun aradaki intronla birlikte okunduğu saptanmıştır. Bu

durum RNA’da intron kalıntısı olduğunu yani kırılma ile çıkarılması gereken intronun çıkarılamamış olduğunu göstermektedir. Özetle *CHEK2* gen dizisinden 7. intronun çıkarılamadığı gösterilmiştir. Ayrıca hastaya ait PCR ürün boyutunun sağlıklı kontrole ait PCR ürününden farklı olması da kırılma hatasına sebep olduğunu kanıtlamaktadır.

12 yaşında Nörofibromatözis tanısı almış hastada bulunan *NFI* c.2351G>C değişikliği hastaya ait RNA materyalinin yeterli olmayışı nedeni ile tam olarak incelenmediğinden varyantın etkisi belirlenememiştir.

Erken yaş tanılı ve iki primer tümörü olan hastada bulunan *BRCA2* c.68-7T>A varyantı 2. ekzon ile 3.ekzon arasında bulunmaktadır. Dizileme çalışmalarımız sonrasında varyantın ekzon geçişlerinde bir hataya sebep olmadığı gösterilmiştir. ClinVAR bilgi bankasında gösterilen kanıtlara göre bu varyant 11 yayın tarafından Benign, 12 yayın tarafından Likely Benign ve 4 yayın tarafından UCV olarak etiketlenmiştir. 2018’de Colombo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada varyantın patojenik olmadığı ve kırılmaya etki etmediği bildirilmiştir [49]. Bu bağlamda söz konusu değişiklik için literatür bilgisi ile bulgularımız arasında konkordans bulunmaktadır.

Özetle, tez çalışması kapsamında 9 farklı gene ait 14 farklı değişiklik incelenmiştir. Söz konusu 14 değişikliğe ilişkin bilgiler literatürde çoğunlukla in silico algoritmalarla göre verilmiştir. Bu bilgilere göre 14 değişikliğin 6 tanesinin patojenik olduğu bildirilmektedir. Ancak bu bildirilen değişikliklere ait kanıtlar detaylı okunduğunda bunların in silico algoritmalarla göre değerlendirildiği anlaşılmaktadır. Hasta bazında deneysel olarak gerçekleştirdiğimiz çalışma sonuçlarımıza göre in silico algoritmalarla göre değerlendirilen bu değişikliklerin sadece 4 tanesinin RNA üzerinde farklılığa yol açarak patojenik olduğu gösterilmiştir. Bu bulguların yayınlanmasından sonra bilgi bankalarındaki eski ve eksik bilgilerin güncellenmesi ile birçok hastanın genetik test sonuçlarının daha doğru şekilde değerlendirilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Chial, H., *DNA sequencing technologies key to the Human Genome Project*. Nature Education, 2008. **1**(1): p. 219.
2. Pennisi, E., *The human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1177-80.
3. Ezkurdia, I., et al., *Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(22): p. 5866-78.
4. Roy, B., L.M. Haupt, and L.R. Griffiths, *Review: Alternative Splicing (AS) of Genes As An Approach for Generating Protein Complexity*. Curr Genomics, 2013. **14**(3): p. 182-94.
5. Sanz, D.J., et al., *A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(6): p. 1957-67.
6. Cartegni, L., S.L. Chew, and A.R. Krainer, *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(4): p. 285-98.
7. Buratti, E., M. Baralle, and F.E. Baralle, *Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(12): p. 3494-510.
8. Crick, F., *Central dogma of molecular biology*. Nature, 1970. **227**(5258): p. 561-3.
9. Djebali, S., et al., *Landscape of transcription in human cells*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 101-8.
10. Strachan, T., A.P. Read, and T. Strachan, *Human molecular genetics*. 4 ed. 2011, New York: Garland Science.
11. Rahman MA, N.F., Masuda A, et al., *Decoding abnormal splicing code in human diseases*. J Investig Genomics, 2015. **2**(1): p. 6-23.
12. Lewin, B., et al., *Lewin's genes X*. 2011, Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett.
13. Reece, J.B., et al., *Campbell biology*. 2014: Pearson Boston.
14. Anna, A. and G. Monika, *Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation*. J Appl Genet, 2018. **59**(3): p. 253-268.
15. Blencowe, B.J., *Alternative splicing: new insights from global analyses*. Cell, 2006. **126**(1): p. 37-47.
16. Chabot, B. and L. Shkreta, *Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease*. J Cell Biol, 2016. **212**(1): p. 13-27.
17. Matlin, A.J., F. Clark, and C.W. Smith, *Understanding alternative splicing: towards a cellular code*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 386-98.
18. Caceres, J.F. and A.R. Kornblihtt, *Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease*. Trends Genet, 2002. **18**(4): p. 186-93.
19. Venables, J.P., *Aberrant and alternative splicing in cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7647-54.
20. Kim, Y.J. and H.S. Kim, *Alternative splicing and its impact as a cancer diagnostic marker*. Genomics Inform, 2012. **10**(2): p. 74-80.
21. Jang, M.-A., et al., *Identification and characterization of NF1 splicing mutations in Korean patients with neurofibromatosis type 1*. Journal of Human Genetics, 2016. **61**(8): p. 705-709.

22. Li, F., *Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis*. Br J Cancer, 2005. **92**(2): p. 212-6.
23. Wang, J., et al., *SpliceDisease database: linking RNA splicing and disease*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D1055-9.
24. Buratti, E., et al., *DBASS3 and DBASS5: databases of aberrant 3'- and 5'-splice sites*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D86-91.
25. Thorsen, K., et al., *Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(7): p. 1214-24.
26. *Alamut Visual*. Interactive Biosoftware: Rouen, France.
27. *Sophia DDM*. 2018, Interactive Biosoftware: France.
28. Fairbrother, W.G., et al., *Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes*. Science, 2002. **297**(5583): p. 1007-13.
29. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D1062-d1067.
30. Stenson, P.D., et al., *Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update*. Hum Mutat, 2003. **21**(6): p. 577-81.
31. Raponi, M., et al., *Prediction of single-nucleotide substitutions that result in exon skipping: identification of a splicing silencer in BRCA1 exon 6*. Hum Mutat, 2011. **32**(4): p. 436-44.
32. Barbosa, R.H., et al., *Screening of RB1 alterations in Brazilian patients with retinoblastoma and relatives with retinoma: phenotypic and genotypic associations*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(5): p. 3184-94.
33. Ottaviani, D., et al., *Spectrum of RB1 mutations in argentine patients: 20-years experience in the molecular diagnosis of retinoblastoma*. Ophthalmic Genet, 2013. **34**(4): p. 189-98.
34. Chaussade, A., et al., *Correlation between RB1 germline mutations and second primary malignancies in hereditary retinoblastoma patients treated with external beam radiotherapy*. Eur J Med Genet, 2019. **62**(3): p. 217-223.
35. Richter, S., et al., *Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(2): p. 253-69.
36. Taylor, M., et al., *Genotype-phenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma*. Hum Mutat, 2007. **28**(3): p. 284-93.
37. Nykamp, K., et al., *Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria*. Genet Med, 2017. **19**(10): p. 1105-1117.
38. Desrichard, A., et al., *CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. R119.
39. Roeb, W., J. Higgins, and M.C. King, *Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(12): p. 2738-44.
40. Delimitsou, A., et al., *Functional characterization of CHEK2 variants in a Saccharomyces cerevisiae system*. Hum Mutat, 2019. **40**(5): p. 631-648.
41. Campos, B., et al., *RNA analysis of eight BRCA1 and BRCA2 unclassified variants identified in breast/ovarian cancer families from Spain*. Hum Mutat, 2003. **22**(4): p. 337.
42. Lagarde, A., et al., *Germline APC mutation spectrum derived from 863 genomic variations identified through a 15-year medical genetics service to French patients with FAP*. J Med Genet, 2010. **47**(10): p. 721-2.

43. Spearman, A.D., et al., *Clinically applicable models to characterize BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance*. J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5393-400.
44. Shimizu, T., et al., *Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis*. Am J Hum Genet, 1994. **54**(5): p. 793-800.
45. Chenevix-Trench, G., et al., *An international initiative to identify genetic modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2 (CIMBA)*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(2): p. 104.
46. Fraile-Bethencourt, E., et al., *Minigene Splicing Assays Identify 12 Spliceogenic Variants of BRCA2 Exons 14 and 15*. Front Genet, 2019. **10**: p. 503.
47. Momozawa, Y., et al., *Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4083.
48. Tsaousis, G.N., et al., *Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 535.
49. Colombo, M., et al., *The BRCA2 c.68-7T > A variant is not pathogenic: A model for clinical calibration of spliceogenicity*. Hum Mutat, 2018. **39**(5): p. 729-741.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 239

Konu: Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK hk.

Tarih : 19.02.2018

Sayın Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK
Onkoloji Enstitüsü

İlgi: Onkoloji Enstitüsünün 08/12/2017 gün ve 461839 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Msc. Bio. Seda KILIÇ' ın yürüteceği 2018/191 dosya numaralı "Kodlanan DNA Üzerinde Kritik Noktada Var Olan SNP'lerin mRNA Kırılması Üzerindeki Etkisinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 09/02/2018 tarih ve 03 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Kodlanan DNA Üzerinde Kritik Nuktada Var Olan SNP'lerin mRNA Kırılması Üzerindeki Etkisinin Araştırılması"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kanser Genetiği			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Kanser Genetiği Bilim Dalı			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz :			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ■	ÇOK MERKEZLİ □	ULUSAL ■	ULUSLAR ARASI □

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Kodlanan DNA Üzerinde Kritik Noktada Var Olan SNP'lerin mRNA Kırılması Üzerindeki Etkisinin Araştırılması"			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	05.02.2018		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	☐	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐			
	SİGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒			
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐			
	İLAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:03	Tarih: 09/02/2018			
	İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Kanser Genetiği Bilim Dalında görevli Prof. Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK' in sorumluluğunda ve Msc. Bio. Seda KILIÇ' ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki *	Katılım **	İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	TOPLANTIYA KATILMADI	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒		
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyostatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		

- * :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KODLANAN DNA ÜZERİNDE KRİTİK NOKTADA VAR OLAN SNP'LERİN MRNA KIRPILMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPÖRÜ

%**2**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**1**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**0**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to TechKnowledge Turkey

Öğrenci Ödevi

<%**1**

2

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

3

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

4

polen.itu.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

Submitted to Düzce Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

adudspace.adu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

www.slideshare.net

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

www.mdpi.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Seda	Soyadı	KILIÇ ERCİYAS
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	18.02.1986
Uyruğu	TC	TC Kim No	52846523656
Email	seda.kilic@istanbul.edu.tr	Tel	05553046169

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. Onkoloji Enst. Temel Onkoloji ABD. Kanser Genetiği Bölümü Doktora Programı	2020
Yük.Lis.	İ.Ü. Onkoloji Enst. Temel Onkoloji ABD. Kanser Genetiği Yüksek Lisans Programı	2011
Lisans	Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü	2009-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Almanca	İyi	İyi	İyi	-	
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi	78,75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	79,35	80,33	80,21

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları

Tuncer, S. B., O. S. Erdogan, S. K. Erciyas, M. A. Saral, B. Celik, D. A. Odemis, G. K. Turkcan and H. Yazici (2020). "miRNA expression profile changes in the peripheral blood of monozygotic discordant twins for epithelial ovarian carcinoma: potential new biomarkers for early diagnosis and prognosis of ovarian carcinoma." *J Ovarian Res* 13(1): 99.

Demirkol Canli, S., E. Dedeoglu, M. W. Akbar, B. Kucukkaraduman, M. Isbilen, O. S. Erdogan, S. K. Erciyas, H. Yazici, B. Vural and A. O. Gure (2020). "A novel 20-gene prognostic score in pancreatic adenocarcinoma." *PLoS One* 15(4): e0231835.

Şükrüoğlu Erdoğan Ö., Kılıç E.S., Bilir A., Buğra T.Ş., Akdeniz Ö.D., Kurul S., et al., "Methylation Changes of Primary Tumors, Monolayer, and Spheroid Tissue Culture Environments in Malignant Melanoma and Breast Carcinoma.", *BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL*, vol.2019, pp.1407167-1407167, 2019

Tuncer, S. B., Akdeniz, D., Celik, B., Kilic, S., Sukruoglu, Ö., Avsar, M., ... Ozer, L.(2019). The expression levels of miRNA-15a and miRNA-16-1 in circulating tumor cells of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *MOLECULAR BIOLOGY REPORTS*, vol.46, 975-980.

Akdeniz, D., Tuncer, S. B., Kebudi, R., Celik, B., Kuru, G., Kilic, S., ... Erdogan, O. S. (2019). Investigation of new candidate genes in retinoblastoma using the TruSight One "clinical exome" gene panel. *MOLECULAR GENETICS & GENOMIC MEDICINE*, vol.7.

Şükrüoğlu Erdoğan Ö., Tuncer S.B., Celik B., Kilic S., Akdeniz D., Bay S.B., et al., "Deletion of RB1, DLEU1 and PCDH8 Genes in an Infant with Bilateral Retinoblastoma, Dysmorphic Features and Developmental Delay", *PEDIATRIC BLOOD & CANCER*, vol.65, pp. S345-S346, 2018

Tuncer B.S., Akdeniz D., Celik B., Kiliç Erciyas S., Şükrüoğlu Erdoğan Ö., Avsar M., et al., "The expression levels of miRNA-15a and miRNA-16-1 in circulating tumor cells of patients with diffuse large B-cell lymphoma", *MOLECULAR BIOLOGY REPORTS*, vol.45, no.1, pp.1003-1009, 2018

Celik B., Şükrüoğlu Erdoğan Ö., Tuncer S.B., Akdeniz D., Kilic S., Bay S.B., et al., "The Investigation of RB1 Promoter Methylation in Patients with Retinoblastoma", *PEDIATRIC BLOOD & CANCER*, vol.65, pp. S645-S646, 2018

Kiliç Erciyas S., Şükrüoğlu Erdoğan Ö., Akdeniz Ödemiş D., Avsar M., Tunçer Ş.B., Aysever Ş., et al., "Selection of BRCA1/2 negative cases using data mining analytical approach for hereditary breast cancer prediction in high risk breast cancer patients", *CANCER RESEARCH*, vol.75, pp.3741-3741, 2015

Yazici H., Kiliç S., Avsar M., Şükrüoğlu Erdoğan Ö., Akdeniz D., Ekenel M., et al., "Investigation of mir-15a/mir-16-1 expression levels in B-cell non-Hodgkin lymphomas.", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol.32, 2014

Yazici H., Avsar M., Şükrüoğlu Erdoğan Ö., Kilic S., Akdeniz D., Tuncer B., et al., "The different roles on metastasis of fibulin-2 gene in lung cancer.", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol.32, 2014

Akdeniz D., Tuncer B.S., Kiliç S., Şükrüoğlu Erdoğan Ö., Kiliç L., Altundag K., et al., "Distribution and frequency of BRCA gene mutations in Turkish population including Balkan Turks", CANCER RESEARCH, vol.74, 2014

Saip P., Akdeniz D., Tuncer B., Kilic S., Şükrüoğlu Erdoğan Ö., Altundag K., et al., "Clinical and pathologic characteristics of ovarian cancer patients with BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish population", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol.32, 2014

Mukaddes AVŞAR SARAL, Nurcan ÇIRAK, Gözde TÜRKCAN, Demet A. ÖDEMİŞ, Şeref Buğra TUNÇER, Seda K. ERCİYAS, Özge Ş. ERDOĞAN, Makbule TAMBAŞ, Hülya YAZICI, Metastatik Akciğer Kanseri Hastalarının Periferik Kanında Yeni Aday Biyomarker: Yüksek DICER1 Ekspresyon Düzeyi. Aydın Sağlık Dergisi. Yıl 2020, Cilt 6 , Sayı 2, Sayfalar 123 – 138.

Türkcan Kuru G., ÖDEMİŞ Akdeniz D., Avşar M., TUNÇER Ş.B., ERCİYAS KILIÇ S. et al. The Association of Pancreatic Cancer and PALB2 Gene Mutations in the Turkish Population. TURKISH JOURNAL OF ONCOLOGY 34(4)

ES Kilic, G Kuru, OD Akdeniz, B Tuncer, SO Erdogan, M Avsar, et al. Regional Distributions of BRCA1 And BRCA2 Gene Mutations In Turkish Hereditary Ovarian Cancer Patients Including Balkan Turks INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER 26, 80-80.

G Kuru, OD Akdeniz, ES Kilic, B Tuncer, SO Erdogan, M Avsar et al. BRCA1 And BRCA2 Gene Mutation Frequency of High Risk Ovarian Cancer Cases In Turkish Population Including Balkan Turks INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER 26, 79-79.