

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİKİT BİYOPSİDE GLİOBLASTOMA MULTİFORME GENETİK  
BİYOBELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Büşra KAYA**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**

**TEMMUZ 2022**

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİKİT BİYOPSİDE GLİOBLASTOMA MULTİFORME GENETİK  
BİYOBELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Büşra KAYA  
(195309003)**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**

**TEMMUZ 2022**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195309003 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Büşra KAYA, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "LİKİT BİYOPSİDE GLİOBLASTOMA MULTİFORME GENETİK BİYOBELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**  
Bezmialem Vakuf Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Doç. Dr. Emrah YÜCESAN**  
Bezmialem Vakuf Üniversitesi

**Doç. Dr. Ahmet ÖZAYDIN**  
İstanbul Üniversitesi

**Teslim Tarihi** : 26 Mayıs 2022  
**Savunma Tarihi** : 5 Temmuz 2022



*Ailem'e,*

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans programım boyunca beni destekleyen ve yönlendiren, bilgi ve tecrübesi ile katkıda bulunan sayın danışman hocam Prof. Dr. Fahri Akbaş'a,

Tez çalışmam için hasta numunelerini sağlayarak, bilgi ve tecrübesi ile önemli katkılarda bulunan sayın Prof. Dr. Mustafa Aziz Hatiboğlu hocama,

Hayatımın her anında bana inanan ve destekleyen, varlıkları ve sevgileri ile güç bulduğum anneme ve kardeşime, varlığını tüm kalbimle hissettiğim canım babama, hayattaki yol arkadaşım, dostum, bir diğer güç kaynağım olan sevgili eşime teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2022

Büşra Kaya  
(Moleküler Biyolog)

## 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 olmadığını beyan ederim.

Büşra Kaya  
İmza

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ	ii
BEYAN	iii
İÇİNDEKİLER	ivv
KISALTMALAR	vi
SEMBOLLER	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ixx
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	15
2. GENEL BİLGİLER	17
2.1 Gliomlar	17
2.2 Glioblastoma multiforme (GBM)	17
2.2.1 GBM sınıflandırılması ve sinyal yolları	18
2.2.2 Teşhis	21
2.2.3 Tedavi	21
2.2.4 Prognoz ve psödoprogresyon (yalancı ilerleme)	22
2.2.5 Kan beyin bariyeri (KBB)	23
2.2.6 GBM'de moleküler belirteçler	24
2.3 Likit biyopsiler	25
2.3.1 Eksozomlar	27
2.3.2 miRNA	27
2.3.3 TEP	28
2.3.4 CTC	29
2.3.5 cfDNA ve ctDNA	29
2.3.5.1 GBM hastalarında yapılan ctDNA çalışmaları	31
2.3.5.2 GBM'de ctDNA tespitinin önemi	32
2.3.5.3 ctDNA tespitinde kullanılan teknolojiler	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1 Gereç	35
3.1.1 Cihazlar	35
3.1.2 Kimyasallar ve ticari kitler	36
3.1.3 Paneldeki gen listesi	37
3.2 Yöntem	37
3.2.1 Örneklerin toplanması	38
3.2.2 cfDNA izolasyonu	39
3.2.3 Taze doku izolasyonu	41
3.2.4 Qubit ile DNA ölçümü	42
3.2.5 63 genlik panel çalışması	42

3.2.5.1 Genel bilgiler.....	42
3.2.5.1.1 Fragmantasyon .....	43
3.2.5.1.2 UMI işaretlemesi.....	43
3.2.5.1.3 Hedef zenginleştirme ve final kütüphanesi oluşturma .....	44
3.2.5.1.4 Yeni nesil dizileme.....	44
3.2.5.2 Çalışma protokolü .....	45
3.2.5.2.1 DNA hazırlığı ve kalite kontrolü.....	45
3.2.5.2.2 Fragmantasyon .....	45
3.2.5.2.3 Adaptör ligasyonu .....	46
3.2.5.2.4 Adaptöre bağlanmış DNA'nın QIAseq boncuklarla temizlenmesi .....	47
3.2.5.2.5 Hedef zenginleştirme PCR.....	48
3.2.5.2.6 Zenginleştirme PCR'nın QIAseq boncuklarla temizlenmesi .....	48
3.2.5.2.7 Universal PCR.....	49
3.2.5.2.8 Universal PCR'ın QIAseq boncuklarla temizlenmesi .....	50
3.2.6 Real-time PCR ile kütüphane kantitasyonu .....	50
3.2.7 Kütüphane ürünlerinin dilüsyonu ve megahavuz oluşturma.....	51
3.2.8 Kartuş yükleme ve yeni nesil dizileme .....	52
3.2.9 Biyoinformatik iş akışı.....	53
3.2.10 Analiz .....	56
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>58</b>
4.1 Qubit ölçümleri ve kullanılan indexler .....	58
4.2 Real-time PCR ile kütüphane kantitasyonu sonuçları.....	58
4.3 Normalizasyon .....	59
4.4 Yeni nesil dizileme run özet verileri .....	60
4.5 UMI bağlanma verileri ve coverage değerleri .....	61
4.6 Moleküler analiz.....	64
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>101</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>117</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>120</b>
<b>EKLER 130</b>	
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>135</b>

## KISALTMALAR

<b>GBM</b>	: Glioblastoma Multiforme
<b>YND</b>	: Yeni Nesil Dizileme
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>FDA</b>	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>KBB</b>	: Kan Beyin Bariyeri
<b>cfDNA</b>	: Hüresiz DNA
<b>ctDNA</b>	: Dolaşımdaki Tümör DNA'sı
<b>CTC</b>	: Dolaşımdaki Tümör Hücresi
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>TMZ</b>	: Temozolomid
<b>TCGA</b>	: Kanser Genom Atlası
<b>RTK</b>	: Reseptör Tirozin Kinazlar
<b>LOH</b>	: Heterozigotluk Kaybı
<b>BMEC</b>	: Beyin Mikrovasküler Endotel Hücreleri
<b>FISH</b>	: Floresan In Situ Hibridizasyon
<b>TEP</b>	: Tümör-eğitilmiş Plateletler
<b>QCI</b>	: Qiagen Clinical Insight
<b>COSMIC</b>	: Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu
<b>HGMD</b>	: İnsan Gen Mutasyonu Veritabanı
<b>VCF</b>	: Varyant Çağrısı Formatı
<b>VAF</b>	: Varyant Alel Frekansı
<b>BOS</b>	: Beyin Omurilik Sıvısı
<b>ddPCR</b>	: Damlacıklı Dijital PCR
<b>CNV</b>	: Kopya Sayısı Değişimi
<b>UMI</b>	: Benzersiz Moleküler Tanımlayıcı
<b>SBS</b>	: Sentez Yoluyla Sıralama
<b>ASCO</b>	: Amerikan Klinik Onkoloji Derneği
<b>ACMG</b>	: Amerikan Tıbbi Genetik ve Genom Koleji
<b>CAP</b>	: Amerikan Patologlar Koleji
<b>AMP</b>	: Moleküler Patoloji Derneği
<b>IGV</b>	: Bütünleştirici Genomik Görüntüleyici
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>dk</b>	: Dakika
<b>sn</b>	: Saniye
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>bp</b>	: Baz çifti

**pM** : Pikomolar  
**MSS** : Merkezi Sinir Sistemi

## **SEMBOLLER**

**°C** : Derece Santigrat



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1</b> : Likit biyopsi kullanımının avantaj ve dezavantajları.....	26
<b>Tablo 2.2</b> : ctDNA saptama teknikleri. ....	34
<b>Tablo 3.1</b> : Çalışmada kullanılan cihaz listesi. ....	35
<b>Tablo 3.2</b> : Çalışmada kullanılan kit ve kimyasallar. ....	36
<b>Tablo 3.3</b> : Fragmantasyon PCR programı.....	46
<b>Tablo 3.4</b> : Fragmantasyon PCR protokolü.....	46
<b>Tablo 3.5</b> : Ligasyon protokolü. ....	46
<b>Tablo 3.6</b> : Hedef zenginleştirme PCR protokolü. ....	48
<b>Tablo 3.7</b> : Hedef zenginleştirme PCR programı. ....	48
<b>Tablo 3.8</b> : Universal PCR protokolü.....	49
<b>Tablo 3.9</b> : Universal PCR programı.....	49
<b>Tablo 3.10</b> : ILMN DNA standartı dilüsyon aşamaları.....	50
<b>Tablo 3.11</b> : Örneklerin dilüsyon aşamaları .....	51
<b>Tablo 3.12</b> : Real-time PCR protokolü.....	51
<b>Tablo 3.13</b> : Real-time PCR programı .....	51
<b>Tablo 3.14</b> : Biyoinformatik iş akışında değiştirilebilen parametreler.....	54
<b>Tablo 3.15</b> : Biyoinformatik iş akışında değiştirilemeyen parametreler.....	54
<b>Tablo 4.1</b> : Örneklerin Qubit ölçüm sonuçları ve kullanılan index çiftleri.....	58
<b>Tablo 4.2</b> : Örneklerin real-time kantitasyon sonuçları.....	59
<b>Tablo 4.3</b> : Örneklerin 4nM'e normalize edilmesi. ....	60
<b>Tablo 4.4</b> : Yeni nesil dizileme run özeti. ....	61
<b>Tablo 4.5</b> : Örneklerin ortalama kalite okumaları ve UMI kapsama yüzdeleri.....	61
<b>Tablo 4.6</b> : Moleküler analiz sonucu örneklerde saptanan varyantların listesi.....	82
<b>Tablo 4.7</b> : Çalışmada kullanılan hastaların bilgileri.....	83
<b>Tablo 4.8</b> : Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.....	84
<b>Tablo 4.9</b> : Likit örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları. ....	92
<b>Tablo 4.10</b> : Okuma sayısı kıyaslamasına göre öngörülen CNV analizi sonuçlarını ve mutasyon saptanan genleri gösteren özet tablo.....	100

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1	: GBM sinyal yolları.....	19
Şekil 2.2	: GBM'nin genetik ve moleküler patogenezi. ....	20
Şekil 2.3	: Likit biyopside bulunan ana bileşenler .....	26
Şekil 2.4	: Likit biyopsi ve doku biyopsisinin karşılaştırılması. ....	30
Şekil 3.1	: Çalışmada kullanılan paneldeki gen listesi.....	37
Şekil 3.2	: UMI tabanlı hedef dizileme yöntemi .....	38
Şekil 3.3	: cfDNA izolasyonunda kullanılan QIAvac 24 Plus sistemi.....	40
Şekil 3.4	: Çalışma protokolünün özeti. ....	43
Şekil 3.5	: UMI ile doğru ve yanlış okumaların ayırt edilmesi.....	44
Şekil 3.6	: NextSeq 500/550Dx cihazında dört baz çağrısının görüntüsü.....	45
Şekil 3.7	: Mid Output Kartuş. ....	52
Şekil 4.1	: GBM-1 frekans dağılımı .....	62
Şekil 4.2	: GBM-2 frekans dağılımı.....	62
Şekil 4.3	: GBM-3 frekans dağılımı. ....	62
Şekil 4.4	: GBM-4 frekans dağılımı .....	62
Şekil 4.5	: GBM-5 frekans dağılımı.....	63
Şekil 4.6	: GBM-6 frekans dağılımı .....	63
Şekil 4.7	: GBM-7 frekans dağılımı .....	63
Şekil 4.8	: GBM-8 frekans dağılımı .....	63
Şekil 4.9	: GBM-9 frekans dağılımı .....	63
Şekil 4.10	: GBM-10 frekans dağılımı .....	64
Şekil 4.11	: GBM 1 nolu hastada saptanan mutasyonun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı analiz görüntüsü. ....	65
Şekil 4.12	: GBM 2 nolu hastada saptanan mutasyonların doku ve likit biyopside karşılaştırmalı analiz görüntüsü .....	65
Şekil 4.13	: GBM 3 nolu hastada saptanan mutasyonların doku ve likit biyopside karşılaştırmalı analiz görüntüsü .....	66
Şekil 4.14	: GBM 4 nolu hastada saptanan mutasyonun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı analiz görüntüsü.....	66
Şekil 4.15	: GBM 6 nolu hastada saptanan mutasyonların doku ve likit biyopside karşılaştırmalı analiz görüntüsü .....	67
Şekil 4.16	: GBM 8 nolu hastada saptanan mutasyonların doku ve likit biyopside karşılaştırmalı analiz görüntüsü .....	67
Şekil 4.17	: GBM 10 nolu hastada saptanan mutasyonun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı analiz görüntüsü.....	68
Şekil 4.18	: GBM 1 nolu hastada saptanan TP53 c.817C>T mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	69
Şekil 4.19	: GBM 2 nolu hastada saptanan MET c.1949G>A (solda) ve TP53 c.584T>C (sağda) mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	70

<b>Şekil 4.20</b> : GBM 3 nolu hastada saptanan PTEN c.80-1G>C ( solda) ve TP53 c.746G>A (sağda) mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	71
<b>Şekil 4.21</b> : GBM 4 nolu hastada saptanan EGFR c.1787C>T mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	72
<b>Şekil 4.22</b> : GBM 4 nolu hastada saptanan PTEN c.313T>A mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	73
<b>Şekil 4.23</b> : GBM 4 nolu hastada saptanan TP53 c.1031T>C mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	74
<b>Şekil 4.24</b> : GBM 6 nolu hastada saptanan TP53 c.451C>T mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	75
<b>Şekil 4.25</b> : GBM 8 nolu hastada saptanan JAK2 c.1849G>T mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	76
<b>Şekil 4.26</b> : GBM 8 nolu hastada saptanan PTEN c.802-1G>A mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	77
<b>Şekil 4.27</b> : GBM 10 nolu hastada saptanan PTEN c.212G>A (solda) ve TP53 c.743G>T (sağda) mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.....	78
<b>Şekil 4.28</b> : GBM 3 nolu hastada bazı polimorfizmlerin doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü .....	79
<b>Şekil 4.29</b> : GBM 6 nolu hastada bazı polimorfizmlerin doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü .....	80
<b>Şekil 4.30</b> : GBM 3 nolu hastada EGFR c.2361G>A polimorfizminin (solda) ve GBM 6 nolu hastada ROS1 c.330A>T polimorfizminin (sağda) doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüleri .....	81

# LİKİT BİYOPSİDE GLİOBLASTOMA MULTİFORME GENETİK BİYOBELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

Günümüzde kanser tanısı, evrelemesi ve prognozu için en yaygın kullanılan temel araç solid tümör olmakla birlikte bu yöntem invaziv bir cerrahi biyopsi yöntemidir. Ancak, bir tümör büyüdükçe zamanla değişebilir, yayılır ve kanser önleyici ilaçlara maruz kalır. Hastalık ilk teşhis edildiğinde alınan tümör biyopsileri, kanserin daha sonraki durumunu yansıtmayabilir. Kanser hakkında güncel bilgi almak için tekrarlanan biyopsiler ağrı, enfeksiyon ve kanama gibi olası komplikasyonlara neden olabilir. Vücudun farklı bölgelerine yayılan kanser hücreleri başladığı bölgedeki kanserden farklı olabilir. Bu sebeple, vücudun bir bölgesinden alınan bir tümör biyopsisinin vücuttaki kanseri yeterince temsil etmesi mümkün değildir.

Likit biyopsi, kanda dolaşan tümör hücrelerini veya tümör hücrelerinin DNA parçalarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen invaziv olmayan bir yöntemdir. Kan; dolaşımdaki hücreler, trombositler, hücre dışı veziküller, mRNA, miRNA, protein ve hücre dışı DNA (cfDNA) gibi birçok biyolojik materyal içerir. Kanser hastalarının kanındaki cfDNA'nın bir kısmı da tümör hücreleri tarafından apoptoz, nekroz veya aktif salım yoluyla salınan dolaşımdaki tümör DNA'sını (ctDNA) içerir. Tümörler hacim olarak büyüdükçe ve sayıları arttıkça, ctDNA ve CTC (dolaşan tümör hücreleri) kan dolaşımına salınır. Bu durumda dolaşımdaki kan kullanılıp klinik açıdan önemli olan ctDNA dizisindeki tümöre özgü mutasyonlar, yeni bir kanser biyobelirteç tipi olarak işlev görebilir.

Glioblastoma multiforme (GBM) erişkinlerde en sık görülen beyin tümörüdür. En hızlı seyirli ve ölümcül tümörlerdendir. GBM'nin yüksek heterojenliği, tanıyı ve terapötik müdahaleyi engeller ve doğru hasta sınıflandırmasına ve kişisel tedaviye olanak tanıyan erken tanı için biyobelirteçlerin belirlenmesine ihtiyaç duyar. Tümör ilerlemesinin moleküler profilini tanımlamak için tekrarlanan cerrahi her zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle, likit biyopsi özellikle GBM'leri saptamak, moleküler olarak karakterize etmek için umut verici bir yaklaşımdır. Ayrıca tümörün ilerlemesini yöneterek ve tedaviye yanıtı izleyerek kanserin erken teşhisini

kolaylaştırabilen ve hasta takibini geliştirebilen potansiyel bir klinik faydaya da sahip olduğu düşünülmektedir.

Araştırmamızda hasta (n=10) ve kontrol grubu (n=3), GBM ile önceden ilişkilendirilmiş ve ayrıca ilişkili olabileceği düşünülen 63 gen bölgesi, hotspot ekzon ile ekzon-intron birleşme bölgelerini içeren yeni nesil dizileme paneli (YND) ile incelendi. Panel on gönüllü hastanın solid tümör ve plazmalarında, sağlıklı kontrol grubunun ise plazmalarında Illumina NextSeq 500/550Dx ile gerçekleştirildi. Biyoinformatik iş akışı ve analizleri için QIAGEN Clinical Insight (QCI) yazılımı kullanıldı.

Çalışmada yedi hastanın dokusunda patojenik olduğu bilinen ve/veya novel varyantlar saptandı. Altı hastada TP53, dört hastada PTEN, bir hastada MET, bir hastada EGFR geninde mutasyon saptandı. Yapılan kopya sayısı değişimi (CNV) analizlerinde ise beş hastada EGFR, iki hastada MET, bir hastada PDGFRA, bir hastada KIT, bir hastada RPN2 genlerinde normalin üzerinde okuma sayısı alındı. Hastaların dokusunda saptanan mutasyonlar ve amplifikasyonlar, likit biyopsi örneklerinde tespit edilemedi.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoteknoloji, panel dizileme, biyobelirteç, onkoloji, glioblastoma

# **RESEARCH ON GLIOBLASTOMA MULTIFORME GENETIC BIOMARKERS IN LIQUID BIOPSY**

## **SUMMARY**

Although solid tumor is the most widely used basic tool for cancer diagnosis, staging and prognosis today, this method is an invasive surgical biopsy method. However, as a tumor grows, it can change over time, spread and be exposed to anti-cancer drugs. Tumor biopsies taken when the disease is first diagnosed may not reflect the later status of the cancer. Repeated biopsies to get up-to-date information about cancer can cause possible complications such as pain, infection, and bleeding. Cancer cells that spread to different parts of the body may be different from the cancer in the area where they started. And for this reason, it is not possible for a tumor biopsy taken from a part of the body to adequately represent cancer in the body.

Liquid biopsy is a non-invasive method performed to detect circulating tumor cells or DNA fragments of tumor cells. Blood; Circulating cells contain many biological materials such as platelets, extracellular vesicles, mRNA, miRNA, protein and cell-free DNA (cfDNA). Some of the cfDNA in the blood of cancer patients also includes circulating tumor DNA (ctDNA) released by tumor cells through apoptosis, necrosis or active release. As tumors grow in volume and increase in number, ctDNA and CTC (circulating tumor cells) are released into the bloodstream. In this case, using circulating blood and tumor-specific mutations in the clinically important ctDNA sequence may act as a new type of cancer biomarker.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common brain tumor in adults. It is one of the most rapidly progressing and deadly tumors. The high heterogeneity of GBM hinders diagnosis and therapeutic intervention and needs the identification of biomarkers for early diagnosis that allows accurate patient classification and personalized treatment. Repeat surgery may not always be possible to define the molecular profile of tumor progression. Therefore, liquid biopsy is a promising approach to detect and molecularly characterize GBMs in particular. It is also thought to have a potential clinical benefit, which can facilitate early detection of cancer and improve patient follow-up by managing tumor progression and monitoring response to treatment.

In our study, patients (n=10) and control group (n=3) were examined with a Next generation sequencing panel (NGS), which includes 63 gene regions that were previously associated with GBM and may also be associated, hotspot exon and exon-intron junction regions. The panel was performed with Illumina NextSeq 500/550Dx in the solid tumors and plasmas of ten volunteer patients and the plasmas of the healthy control group. QIAGEN Clinical Insight (QCI) software was used for bioinformatics workflow and analysis.

In the study, known pathogenic and/or novel variants were detected in the tissues of seven patients. Mutations were detected in TP53 gene in six patients, PTEN in four patients, MET in one patient, and EGFR gene in one patient. In the analysis of the copy number variation (CNV), the number of readings above normal in the EGFR genes in five patients, MET in two patients, PDGFRA in one patient, KIT in one patient, and RPN2 genes in one patient were obtained. Mutations and amplifications detected in the tissues of the patients could not be detected in the liquid biopsy samples.

**Keywords:** Biotechnology, panel sequencing, biomarker, oncology, glioblastoma

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

GBM'nin mevcut teşhisi, görüntüleme ve tümör dokusu verilerine dayanır; ancak, bazı zorluklar ve sınırlamalar vardır. Konvansiyonel MRI cerrahiye rehberlik edebilir; ancak, yüksek dereceli gliomalar arasında ayırım yapamaz ve yorumlanması zor olan görüntüleme bulguları sağlayabilir [1]. Tümör dokusu biyopsileri invazivdir ve kolayca tekrarlanamaz. Hastalığın prognozu ile ilgili daha iyi bilgi sahibi olabilmek ve tedavi yanıtlarının izlemek için beyin tümörü aktivitesinin gerçek zamanlı olarak yakalanması gerekir ve bunun içinde invaziv olmayan örnekleme ihtiyacı vardır.

Doku biyopsisi kullanılan geleneksel kanser tanısı ile karşılaştırıldığında, likit biyopsi tümör heterojenliğini değerlendirmek için daha uygundur, daha az invazivdir ve doku biyopsisinden daha kapsamlıdır çünkü tüm tümör bölgeleri kana ctDNA ve CTC salgılar. Bu nedenle, tedavi etkisinin gerçek zamanlı izlenmesine yardımcı olarak kişisel tedavi uygulanmasını daha mümkün kılabilir ve daha iyi prognoz sağlayabilir. Bununla birlikte, tümör morfolojik özellikleri ve mikroçevre doku biyopsisinde daha kolay elde edilebilir. Bu nedenle sıvı biyopsi, GBM hastalarının tanı ve takibini iyileştirmek için ek ve tamamlayıcı veriler sağlamayı amaçlar [2].

Sıvı biyopsilerin kullanımı farklı tümör tiplerinde araştırılmış ve bu yaklaşım meme kanseri, baş-boyun ve akciğer kanseri prognozunda kullanılmıştır. Akciğer kanseri için, örneğin, tümör dokusu sınırlı olduğunda, epidermal büyüme faktörü reseptöründeki mutasyonların varlığını saptamak için kan plazması kullanılabilir [3, 4, 5]. İlk FDA onaylı geniş kapsamlı pan-kanser tanı testi, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, kolorektal kanser, meme kanseri, yumurtalık kanseri ve melanoma dahil olmak üzere birçok solid tümörün varlığını test etmek için likit biyopsi örneğinde ctDNA'nın varlığını kullanır [6].

GBM'de başarıyla kullanılacak sıvı biyopsiler için, tümöre özgü materyalin kan-beyin bariyerini (KBB) geçeceği varsayılır. KBB, besinlerin, vitaminlerin ve diğer moleküllerin beyne erişimini ve değişimini düzenler [7]. Claudin-3, claudin-5,

claudin-12 gibi proteinler ve iskele işlevine sahip diğer transmembran proteinler tarafından belirlenen KBB'nin sıkı bağlantılarının bütünlüğü, sağlıklı bir KBB'nin kalitesini tanımlar ve buna göre bir eksiklik veya claudin-1 veya agrin'deki mutasyon, GBM'deki KBB işlev bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir [7, 8]. GBM, sıkı bağlantıları azaltan, daha geçirgen bir KBB oluşturmaya yardımcı olan, tümörle ilişkili makrofajlar gibi proinflamatuvar bağışıklık hücrelerinin erişimini destekleyen proanjyogenik ve iltihaplı bir mikroçevreyi indükler. Ek olarak, GBM gibi katı tümörlerin tipik bir özelliği olan hipoksi de KBB'nin bozulmasıyla ilişkilidir [9, 10].

Likit biyopsiler hala araştırma aşamasında olsa da, kanser tedavisine cevabın tespiti, iyileştirilmesi ve önlenmesi konusunda ümit vaat etmektedir. Likit biyopsi kavramı kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımını tamamlayabilir ve klinik çalışmalarda hasta seçimi için de yenilikçi bir yol sunmaktadır.

Çalışmamızda, glioblastoma multiforme IV evre hastalarının solid tümör örneklerinde bulunan somatik mutasyonların likit biyopsi örneklerinde de yakalanabilmesi ve yeni

biyobelirteç keşfi öncelikli olarak amaçlanmıştır. Ayrıca saptanan değişkenleri inceleyerek literatüre katkıda bulunmayı da hedeflenmektedir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Gliomlar**

Gliomlar, merkezi sinir sisteminden (MSS) kaynaklanan en yaygın tümör türüdür ve onları oluşturan hücrelere göre sınıflandırılırlar: oligodendrositler, oligodendrogliomalara yol açar, ependimal hücreler ependimomları oluştururlar ve astrositler astrositomları üretirler. Astrositomlar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından histopatolojik kriterlere göre evre I ile IV arasında değişen malignite derecesine göre sınıflandırılır; derece IV tümörlere ayrıca glioblastoma multiforme (GBM) denir. Derece I gliomlar düşük proliferatif potansiyele sahip ve cerrahi prosedürle tedavi edilebilen lezyonlarla ilgilidir, oysa derece II ila IV gliomlar oldukça malign ve invazivdir. Astrositomlar arasında GBM en sık görülen ve ölümcül olanıdır.

Her alt tip, değişen sinyal yollarını yansıtan, tedavi yanıtlarında farklılıklara yol açan ve sonuçta hastanın prognozunu etkileyen önemli genetik değişiklikler gösterir [11].

## 2.2 Glioblastoma multiforme

GBM, küresel insidansı 100.000 kişide 10'dan az olan nadir bir tümör olmasına rağmen, teşhisten sonraki 14-15 aylık sağkalım oranı ile kötü prognozu, hastalığı önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. Tüm yaş gruplarındaki tüm gliomaların %50'sini oluşturur. Her yaşta ortaya çıkabilir, ancak en yüksek insidans 55 ila 60 yaş arasındadır [12, 13, 14]. Malign gliomalar, kansere bağlı ölümlerin %2,5'inin nedenidir ve 15-34 yaş arası kişilerde kanserden ölümlerin en önemli üçüncü nedenidir. Erkeklerde GBM görülme oranı kadınlara göre daha yüksektir [15, 16].

Genellikle tedavi edilemeyen beyin neoplazmalarının etiyolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Altta yatan karsinogenetik nedenler tanımlanamaz. Bugüne kadar yüksek doz iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma, onaylanmış tek risk faktörüdür. Kapsamlı retrospektif kohort verileri, pediatrik popülasyonlarda terapötik intrakraniyal radyasyona maruz kaldıktan sonra, yani hem hastanın yaşına hem de radyasyon dozu/hacimine bağlı olarak açıkça artan glioma riskini göstermektedir. Yetişkinlerdeki veriler daha sınırlıdır, ancak radyasyona maruz kalan belirli gruplarda yoğun risk göstermektedir [17]. Salvati ve ark., akut lenfoid lösemi (ALL) tedavisi gören hastaların GBM geliştirmeye daha yatkın olduğu görülmüştür, bunun, lösemiden veya ALL tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlardan kaynaklanan komplikasyonların bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. GBM ile sigara, diyet risk faktörleri, cep telefonları veya elektromanyetik alan, ciddi kafa travması, mesleki risk faktörleri ve pestisit maruziyeti gibi çevresel faktörler arasında kesin bir ilişki bulunamamıştır [18].

Genetik yatkınlık vakaların sadece %5-10'unda gözlenmiştir. Nörofibromatoz tip 1 ve tip 2, tuberoskleroz dahil olmak üzere nadir görülen genetik bozukluğun artan insidans ile ilişkili olduğu bulunmuştur [19].

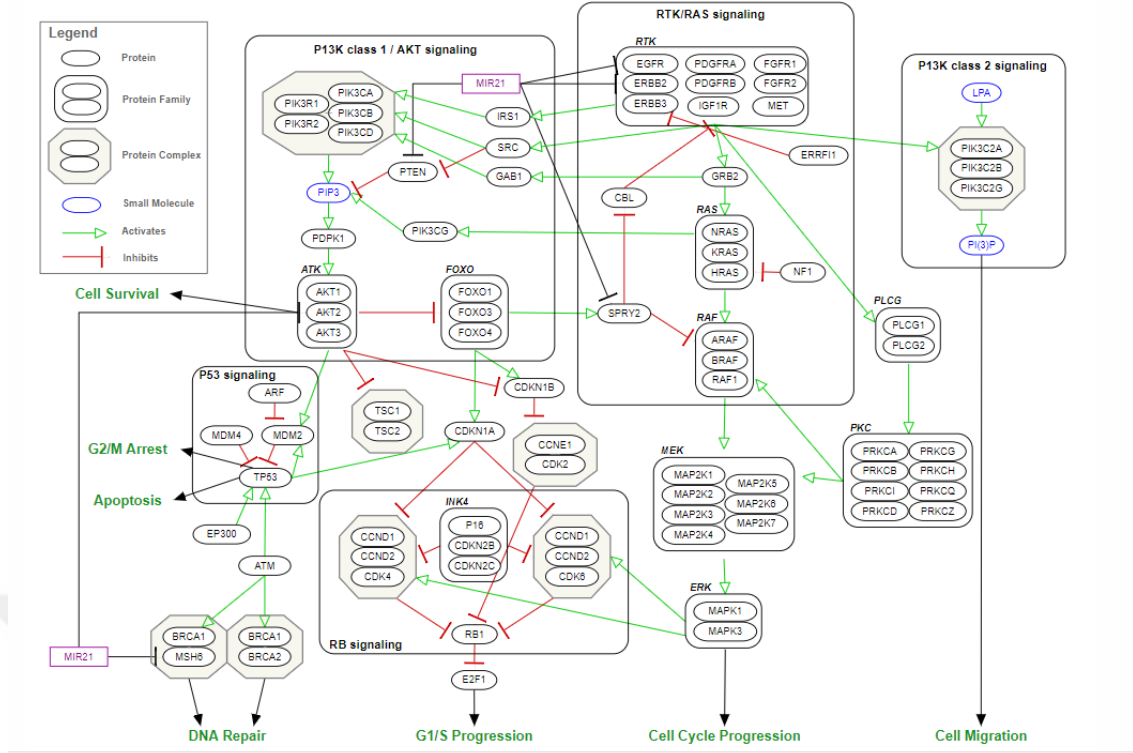
GBM için mevcut terapötik yöntemler, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapinin bir kombinasyonundan oluşur. GBM hastaları tedavilere karşı yüksek oranda direnç ve nüks gösterirler, bu da genel sağkalımın kötü olmasına neden olur. Kullanılan standart kemoterapötik ilaç temozolomid (TMZ) ile bile hastaların medyan sağkalımı ~15 ay gibi kısa bir süredir [20, 21].

GBM tanısı şu anda görüntüleme teknikleri ve doku biyopsilerine dayanmaktadır. Ancak görüntüleme teknikleri, gerçek tümör progresyonunun neden olduğu lezyonları psödoprogresyondan (tümörün ilerlemesini taklit eden ve zamanla kendiliğinden düzelebilen tedaviyle ilişkili lezyonlardan) güvenilir bir şekilde ayırt edemez. Benzer şekilde, doku biyopsileri oldukça invaziv bir prosedür gerektirir, ancak sürekli değişen bir tümörün yalnızca statik bir görüntüsünü yakalayabilir. Buna karşılık, dolaşımdaki biyobelirteçlerin saptanmasını sağlayan sıvı biyopsiler, non-invaziv olma avantajını sağlar, böylece seri örneklemeyle kolaylaştırır ve tedavi boyunca tümördeki potansiyel dinamik değişiklikleri izleme yeteneği sağlar [22, 23, 24].

### **2.2.1. GBM sınıflandırılması ve sinyal yolları**

Kanser Genom Atlası (TCGA), entegre çok boyutlu analizler yoluyla geniş insan tümör kohortlarında kansere neden olan başlıca genom değişikliklerini kataloglamayı ve keşfetmeyi amaçlar. TCGA tarafından incelenen ilk kanser, yetişkinlerde en sık görülen primer beyin tümörü olan GBM'dir [25].

GBM genomundaki yaygın genetik değişikliklerin yüksek oranda üç ana yolda bulunduğu saptanmıştır. Bu yollar; reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler)/RAS/PI-3K, p53 ve RB sinyal yollarıdır [26]. GBM sinyal yolları Şekil 2.1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

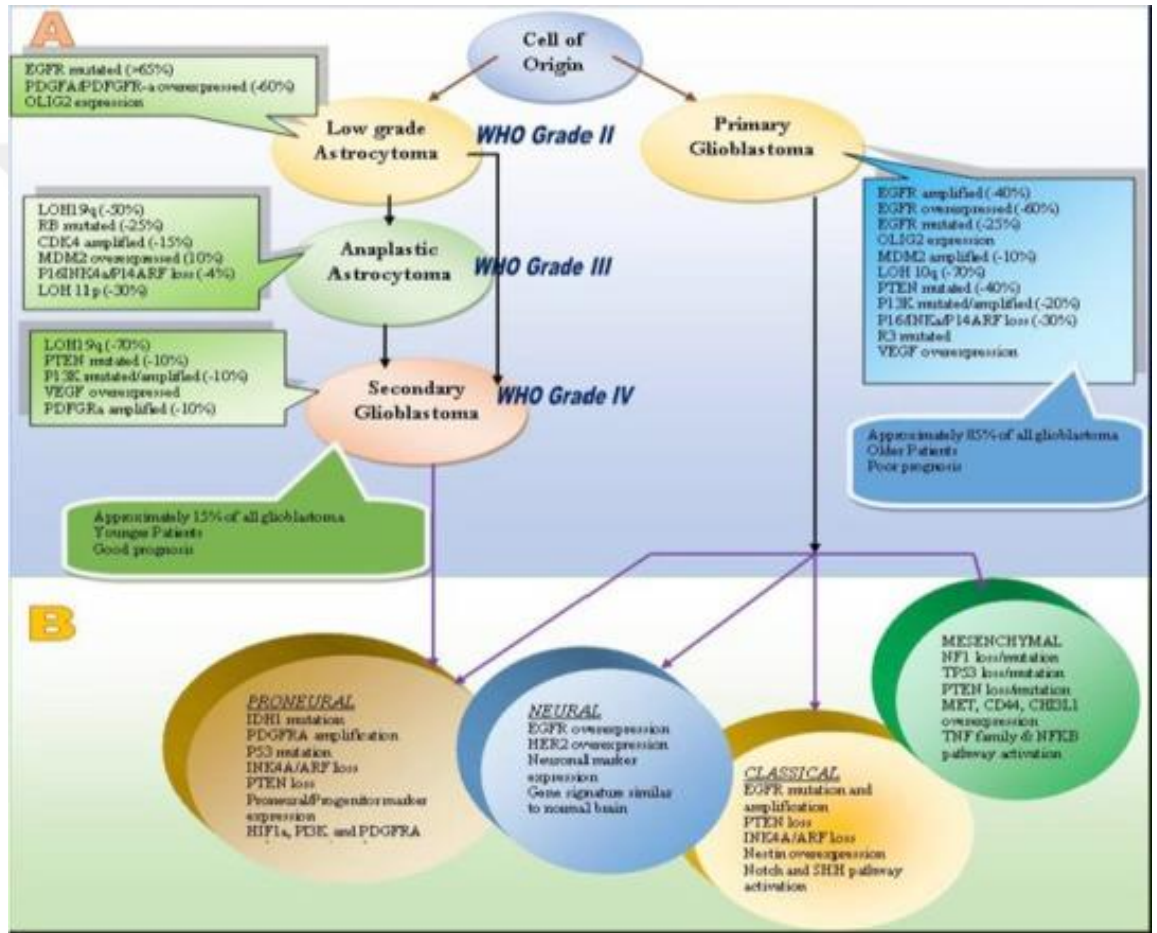


**Şekil 2.1:** GBM sinyal yolları.

Klinik özelliklere göre GBM, birincil ve ikincil olarak sınıflandırılır. Birincil GBM'ler, öncü lezyonun klinik ve histolojik kanıtları olmadan de novo ortaya çıkarlar. İkincil GBM'ler ise önceden var olan düşük dereceli astrositomdan yavaş ilerlerler. Yapılan son çalışmalarda bu klinik tanımların moleküler bağlantıları gösterilmiştir. Birincil GBM'nin ayırt edici değişiklikleri arasında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gen mutasyonu ve amplifikasyonu, fare double minute-2 genin (MDM2) aşırı ekspresyonu, p16'nın delesyonu ve fosfatase ve tensin homologu geninin (PTEN) bulunduğu 10q kromozomunun heterozigotluk kaybı (LOH-loss of heterozygosity) ve TERT promotör mutasyonu yer alır. İkincil GBM'lerin karakteristik özellikleri, trombosit kaynaklı büyüme faktörü A'nın ve trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü alfanın (PDGFA/PDGFRa) aşırı ekspresyonunu, 19q kromozomunun LOH'unu ve retinoblastoma (RB), IDH1 / 2, TP53 ve ATRX mutasyonlarını içerir [17].

Bu bulgulara paralel olarak global gen ekspresyon çalışmalarından GBM'nin transkripsiyonel alt sınıfları da ortaya çıkmaya başlamıştır. The Cancer Genome Atlas Research'ten elde edilen son veriler, GBM'lerin moleküler patogenezi ve gen ekspresyonuna dayalı moleküler sınıflandırmasının klasik, mezencefalik, pronöral ve

nöral alt tipler halinde anlaşılmasını sağlar. Pronöral transkripsiyonel alt sınıfın ayırt edici özellikleri CDK4, CDK6, PDGFRA, MET ve en sık görülen IDH1 mutasyonlarıdır. Klasik alt tip, PTEN ve CDKN2A kaybı ve EGFR amplifikasyonunun ile kategorize edilir. TP53, NF1 ve CDKN2A'nın mutasyonları ve/veya kaybı mezenkimal alt tipin temel özellikleridir. Son alt tip olan nöral alt sınıf için benzersiz bir genetik imza belirlenmemiştir [27, 28, 29]. Şekil 2.2'nin A kısmında birincil ve ikincil GBM ile ilgili anormallikler, B kısmında birincil ve ikincil GBM'lerin alt sınıfları gösterilmiştir.



Şekil 2.2: GBM'nin genetik ve moleküler patogenezi.

Sonuç olarak, karakteristik ve oldukça sık moleküler değişikliklerin tanımlanması bu çeşitliliğin bir kısmını açıklamaya başlamış ve tümör sınıflandırmasında yeni kavramlar sunmuştur. Ayrıca bu çalışmalar, mevcut terapötik stratejilerin iyileştirilmesi ve bu ölümcül malignitenin yönetimi için yeni paradigmalara geliştirilmesi içinde vizyon sağlamıştır.

### 2.2.2 Teşhis

GBM'nin en sık yerleşim yeri serebral hemisferlerdir; bu tümörlerin %95'i supratentoryal bölgede ortaya çıkarken, tümörlerin sadece yüzde birkaçı beyincik, beyin sapı ve omurilikte ortaya çıkar. Tümör genellikle, genellikle beyaz cevherde ortaya çıkan tek, nispeten büyük, düzensiz şekilli bir lezyon ile temsil edilir [30].

GBM'nin ilk teşhisi, tümörü kesin olarak teşhis etmek, derecelendirmek ve karakterize etmek için tümör dokusunun rezeksiyonu veya biyopsisinin ardından beyin görüntüleme ile elde edilir. Şu anda doku biyopsileri GBM teşhisi için altın standart tekniktir. Bununla birlikte, bir beyin tümöründen alınan rezeksiyon veya biyopsi, beyindeki tümör kitlesi içinde ve çevresinde şişme gibi riskler oluşturabilir, hatta hastanın nörolojik fonksiyonlarını etkileyebilir [31]. Dahası, bazı tümörler buldukları yer nedeniyle erişilemez olabilir. Ayrıca, doku biyopsileri bazen tüm tümör kütesinin heterojenliğini tahmin etmede başarısız olabilir ve tümör aktivitesinin gerçek zamanlı bir temsili olmayabilirler [22].

Tümör numuneleri üzerinde, 1p ve 19q kromozom kollarının birleşik kaybı, p53'ün mutasyonu ve/veya ekspresyonu, izositrat dehidrojenaz 1 (IDH1) mutasyonunun varlığı (ekson 4 kodon 132, en yaygın olanı c.395G>A varyantı) ve O6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) hipermetilasyonu gibi epigenetik değişiklikler dahil olmak üzere immünohistokimya ve moleküler analizler kullanılarak daha fazla doğrulayıcı ve tanımlayıcı testler yapılır [20, 32].

### 2.2.3 Tedavi

Cerrahi, standart bakımın ana bileşenidir. Tümör tipine bağlı olarak cerrahi, tümör yükünün azaltılması, nöbetlerin kontrolü, nörolojik defisitinin geri döndürülmesi, lokal terapötik ajanın verilmesi ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi gibi birçok şeyi başarabilir [33]. GBM, cerrahi ile tamamen tedavi edilemeyen lokal olarak çok invaziv bir tümördür ve vakaların yaklaşık %80'inde nüks, genellikle orijinal lezyonun 2-3 cm sınırında meydana gelir [12].

GBM için mevcut terapötik yöntemler, cerrahinin ardından radyoterapi ve/veya kemoterapinin bir kombinasyonunu gerektirir. Temozolomid, GBM'li hastalar için tek standart kemoterapidir. TMZ'nin sitotoksitesinden sorumlu olan temel

mekanizma, DNA'yı guanin üzerinde N7 ve O6 pozisyonunda metillemeektir. DNA'nın metillenmiş guanin için tamamlayıcı bir baz bulmada başarısızlığa ve dolayısıyla DNA'da uzun ömürlü çentiklere yol açmasına neden olur. sonuç olarak G2-M sınırındaki hücre döngüsünü bloke eder ve apoptozu tetikler [34].

Ameliyatta, GBM hücrelerinin normal dokuya yüksek invaziv kapasitesi nedeniyle tüm tümör hücrelerini güvenli bir şekilde çıkarmak zordur; sonuç olarak, GBM tümörleri vakaların çoğunda tekrarlar. Tekrarlayan GBM'li hastalarda medyan genel sağkalımı 6,2 aydır [35].

#### **2.2.4 Prognoz ve Psödoprogresyon (yalancı ilerleme)**

Prognostik bilgi elde etmek için tedaviden sonra bir beyin MRI taraması yapılır. İlk MRI taraması yapılan GBM hastalarının %10-30'unda, genellikle tedavinin ilk 12 haftasında psödoprogresyon görülür [36]. Psödoprogresyon ile gerçek progresyon arasında ayırım yapabilmek önemlidir, çünkü klinisyenlerin gereksiz operasyonlar yapmasını ve etkisiz tedaviler uygulamasını önler [24, 31, 36, 37]. Bununla birlikte, şu anda, glioma gerçek ilerlemesini psödoprogresyondan ayırt edecek hiçbir biyobelirteç veya klinik özellik yoktur.

Brandes ve ark., GBM'li 103 hastadan alınan doku biyopsisi örneklerini kullanarak, MRI ilede görüldüğü gibi, MGMT gen promotör metilasyonu olan hastaların (%91), metillenmemiş MGMT'li hastalardan (%41) daha yüksek psödoprogresyon oranlarına sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında hastaların %31'inde yalancı ilerleme saptanmıştır [38].

Kang ve ark. tümör doku bölümlerinde p53 aşırı ekspresyonunun, glioma hastalarından alınan 35 tümör örneğinde psödoprogresyon ile ilişkili olduğunu keşfettiler. P53 overekspresyonu ile başvuran glioma hastalarında, p53 overekspresyonu olmayan hastalara göre psödoprogresyon oranları daha yüksekti. Örnekleri p53 aşırı ekspresyonu göstermeyen toplam 22 hastadan, 14'ü ilerleme göstermedi, biri yalancı ilerleme gösterdi ve yedisi erken ilerleme gösterdi [39].

#### **2.2.5 Kan Beyin Bariyeri (KBB)**

KBB, nöronal ortamı kan yoluyla bulaşan materyallerin çoğundan koruyan oldukça özel bir vasküler arayüzdür ve çoğu zaman BBB terapötikleri dışarda tutar. KBB, moleküllerin ve hücrelerin kan ve beyin arasındaki hareketini düzenlemek için perisitler, astrositler ve nöronlar gibi nörovasküler birimin diğer hücreleri ile uyum içinde çalışan beyin mikrovasküler endotel hücreleri (BMEC'ler) tarafından oluşturulur. BMEC'ler, yapışık bağlantı proteinlerini (VE-cadherin gibi AJ) ve claudins, okludin ve zonula okludens proteini 1 (ZO-1) gibi sıkı bağlantı (TJ) proteinlerini içeren bağlantı kompleksleri ile bağlanan boşluksuz endotel hücreleridir. Bu özellikler, materyalin kandan beyne yayılmasına karşı fiziksel bir bariyer oluşturmaya yardımcı olur. Hidrofilik küçük moleküllerin ve siRNA/mRNA, monoklonal antikolar ve antikor-ilaç konjugatları gibi büyük molekülü biyolojiklerin beyin birikimi bu fiziksel bariyer tarafından önemli ölçüde bloke edilir. KBB tarafından sunulan bu pasif ve aktif bariyer özellikleri, glioma tedavi edilirken terapötik ilaç konsantrasyonlarına ulaşılmasını zorlaştırır. Bu nedenle, glioma tedavisini ve prognozu iyileştirmek için KBB'de ilaç dağıtımını artırmak önemlidir [40, 41].

Glioma gelişiminin erken evrelerinde KBB'de belirgin bir bozulma yoktur; tümör kendi damar sistemi henüz oluşmamıştır ve tümör kütlesi normal beyin damarları tarafından sürdürülür. Glioma ilerledikçe ve şiddetlendikçe, normal damarlardan türetilen endotel hücreleri damar ana yapısından ayrılır ve tümör bölgesi ile ilişkili yeni anjiyojenik noktalar oluşturur. Bu hücreler yeni damarlar oluştururken göç etmeleri gerektiğinden, tümör bölgesine ulaşmak için normal damar yapısını bozarlar. Tümörler normal mikroçevreyi değiştiren birçok farklı molekül salgıladığından, endotel hücre göçü bozulur ve bu bozulma vasküler mimariye yansır. GBM'de, kan damarlarının morfolojik değişiklikleri, açıklıkların oluşumunu ve sıkı bağlantıların bozulmasını içerir. Ayrıca bazal laminanın kalınlığı değişir ve damarlarla ilişkili perisit sayısı kadar perivasküler boşluk da artar [42, 43].

GBM'de KBB bozulması olsa da, çok sayıda çalışma GBM hastalarında bu bozulmanın heterojen olduğunu göstermiştir. GBM'nin heterojen bozulma ve yüksek derecede invaziv doğasının bir sonucu olarak, bozulmamış KBB'nin terapötik ilaçların dağılımını hala sınırlayabildiği durumlarda tümörler, tümör kenarında sağlam bir

KBB'ye sahip alanlarda bulunabilir. Tümör, tümör kenarındaki ve invaziv sınırlardaki nispeten sağlıklı tümör KBB'sinin arkasındaki alanlarda yer aldığından, kısmen etkili ilaç konsantrasyonlarına ulaşamaması nedeniyle birçok yeni glioma terapötikleri klinikte başarısız olmuştur [44].

### 2.2.6 Glioblastomada Moleküler Belirteçler

IDH1/2 mutasyonları artık rutin tanının bir parçasıdır ve IDH mutant glioblastomlar IDH vahşi tipe kıyasla daha iyi prognoza sahip olduklarından, yalnızca tanısız değil aynı zamanda prognostik önem de taşımaktadır [45]. IDH mutasyonunun şu anda oncometabolit 2-hidroksiglutarat birikimi ile progenitör hücreleri çoklu işlemler yoluyla gliomalara yönlendirerek gliomagenizde yer aldığı düşünülmektedir. IDH mutasyonları, glioblastomaların sadece %10'unda mevcuttur, ancak mevcut olduklarında daha iyi sağkalımı gösterirler [46].

MGMT promotör metilasyonu, glioblastoma tedavisinde rutin olarak kullanılan bir kemoterapötik ajan olan alkilleyici ajan temozolomide (TMZ) yanıtın öngörücü bir belirteçdir. MGMT geninin transkripsiyonu, DNA onarım enzimi görevi görürken ve MGMT promotör bölgesinin hipermetilasyonu, genin susturulması ile sonuçlanır, böylece TMZ'nin terapötik etkisini göstermesine izin verir [47, 48].

Aşırı ekspresyon ve mutasyonlar (özellikle EGFRvIII mutasyonu) glioblastomlarda yaygındır ve glioma invazivliğine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Diğer birçok kanser türünde, EGFR sinyalleme sisteminin engellenmesinin kanserle savaşmak için etkili bir yöntem olduğu bulunmuştur; ancak GBM'deki amplifikasyonu şimdiye kadar başarısız olmuştur. Bilinen diğer faktörlerle veya MGMT hipermetilasyonu ile birleştirilen EGFRvIII mutasyonu daha iyi prognozu gösterebilir ve EGFRvIII pozitif tümörler, aşı bazlı yeni deneysel tedaviler için adaylardır [49, 50, 51].

VEGF, gliomalarda aşırı ekspresyon edilir ve şu anda (tekrarlayan) gliomada hedefe yönelik tedavi için uygun olan tek moleküldür. Bir VEGF inhibitörü olan Bevacizumab'ın, daha önce temozolomid ile tedavi edilen hastalarda ikinci progresyona kadar geçen süreyi arttırdığı bulundu [52].

Yukarıda bahsedilen belirteçler, immünohistokimya, FISH veya PCR bazlı yöntemlerle tanımlanır. Klinik uygulamada rutin olarak mevcuttur; ancak bu yöntemler her zaman tümör numuneleri gerektirir ve tedavi yanıtının gerçek zamanlı izlenmesinde, tümör nüksü taramasında veya ayırıcı tanıda kullanılamazlar. Glioblastoma tedavisinde, erken tümör nüksü veya etkisiz tedaviyi işaret edebilen yeni prognostik ve prediktif belirteçlere ciddi bir ihtiyaç vardır [53]. Diğer kanser türlerinde, sıvı biyopsi yöntemlerinin tek bir tedaviden sonra bile tedavi yanıtıyla korele olduğu bulunmuştur [54].

### 2.3 Likit biyopsiler

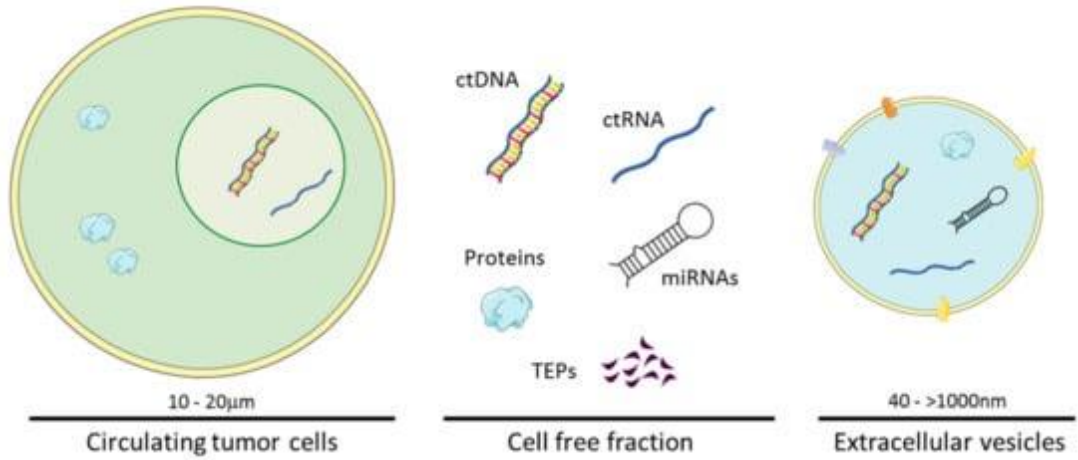
Likit biyopsi, bir hastalığı tanımlamak veya izlemek için kan, idrar, tükürük veya diğer vücut sıvısı örneklerinin kullanıldığı, genellikle biyolojik sıvıdaki küçük nükleik asit fragmanlarını tespit eden minimal invaziv veya invaziv olmayan bir yöntemdir. Likit biyopsi, birçok kanser türünde gelişen bir teşhis ve hasta takibi alanıdır. Dolaşımdaki nükleik asit parçaları, bu belirteçlerin kalite ve miktarını ölçmek için serum, idrar veya beyin omurilik sıvısı dahil olmak üzere farklı vücut sıvılarından çeşitli şekillerde toplanır. Sıvı biyopsi kullanılarak birden fazla nükleik asit türü analiz edilebilir [55]. Likit biyopsi kullanımının avantaj ve dezavantajları Tablo 2.1’de listelenmiştir.

**Tablo 2.1:** Likit biyopsi kullanımının avantaj ve dezavantajları.

<b>Avantajlar</b>	<b>Dezavantajlar</b>
Uygun maliyetli	Standart işletim protokolünün eksikliği
Non-invaziv	Hem sağlıklı hem de tümör hücreleri tarafından salınır
Hızlı	Duyarlı ve spesifik yöntemlerin gerekliliği

Kapsamlı tümör profili	Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar
Minimum ağrı ve risk	Personel mikroçevresi, cfDNA miktarının salınmasını etkileyebilir
Seri değerlendirme	Kanser biyobelirteçi olarak standardize edilmemiş cfDNA/ctDNA konsantrasyonu
Spesifik mutasyonları doğrudan değerlendirebilir	
Birçok biyolojik sıvıda bulunur	
Prognoz, nüks, tedaviye yanıtı değerlendirme potansiyeli	
Minimal rezidüel hastalığın tespiti	
Kanser açısından yüksek riskli popülasyonların değerlendirilmesi	
Erken kanser teşhisinin etkinleştirilmesi	
Tümör heterojenitesinin değerlendirilmesi	

Likit biyopside birincil veya metastatik tümörler tarafından salınan ana bileşenler, dolaşan tümör hücreleri (CTC), hücre dışı DNA (cfDNA), dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA), mikroRNA (miRNA), tümör-eğitilmiş plateletler (TEP) ve eksozomlardır; ilk üç bileşen diğerleri arasında en çok çalışılanlardır [56]. Bu bileşenlerin temsili görüntüsü Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.3:** Likit biyopside bulunan ana bileşenler.

Doku biyopsisi, tümörleri sınıflandırmak ve biyobelirteçleri saptamak için en yaygın kullanılan yöntemdir. Ancak birkaç sınırlaması vardır: invaziv bir yöntemdir; her zaman uygulanabilir veya tekrarlanabilir değildir; ve tek bir bölgeyle ilgili sınırlı bilgi sağlar. Bugün kanserin inanılmaz derecede dinamik bir hastalık olduğu açıktır. Hastalık sırasında, kanserler genellikle daha heterojen hale gelir ve tümörün tedaviye farklı duyarlılık seviyelerine sahip farklı moleküler imzaları barındıran çeşitli hücreleri içerebilir. Bu nedenle, sıvı biyopsiler, çeşitli neoplazm hastalıklarının doğru ve

erken teşhisine yardımcı olabilir, tedaviyi optimize etmek için hastaları sınıflandırabilir ve tümördeki yanıt ve direnç mekanizmalarını izleyebilir. Sıvı biyopsinin invaziv olmayan doğası, hastalığın klonal ve alt klonal varyasyon dinamikleri ile ilgili değişiklikleri izlemek için numunenin sistematik olarak tekrarlanması için izin verir [57].

### **2.3.1 Eksozomlar**

Eksozomlar, hem normal hem de patolojik koşullar altında hücre tarafından salınan küçük zar vezikülleridir. Kandaki konsantrasyonları, tümör ilerlemesi, bağışıklık tepkisinin baskılanması, anjiyogenez ve metastaz ile ilişkilidir. Çeşitli kanser türlerine sahip hastalarda <109 vezikül/ml konsantrasyonlarında saptanabilir. Bu biyobelirteçler, ilaç direnci durumunda bile tanı, tümör tedavisinin değerlendirilmesi ve prognoz için kullanılabilir [58, 59].

Zhao ve ark., hipoksik GBM hücre hattı U87'den türetilen eksozomların, bir in vitro modelde kan-beyin bariyerinin (KBB) geçirgenliğini indükleyerek beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin çoğalmasını desteklediğini bildirmişlerdir [60]. KBB geçirgenliğindeki değişiklikler gliomların farklı evrelerinde görülür, hastalık ilerledikçe bozulma ve geçirgenlik artar. Bu bozulma, normalde bozulmamış KBB'ni geçmeyen gadolinyum gibi bir kontrast madde kullanılarak MRI'de görülebilir. Bununla birlikte, GBM'nin bazı bölgeleri bozulmamış bir KBB'ye sahip olabilir. KBB işlev bozuklukları ve GBM hastalığının ilerlemesi arasındaki ilişkiye rağmen, glioma hücrelerinden türetilen eksozomların sağlam KBB'ni geçtiği ve GBM hastalarının kanında tespit edildiği gösterilmiştir [61, 62, 63, 64]. Bu durum, KBB'nin bozulmadığı durumlarda da eksozomlar tespit edilebildiğinden, sıvı biyopsilerde eksozomların önemini vurgulamaktadır.

### **2.3.2 miRNA**

miRNA'lar, protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unun ekspresyonunu düzenleyen ve belirli koşullar altında onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev gören kodlama yapmayan endojen RNA'lardır; farklı hücresel yolları da düzenleyebilirler ve tümör büyümesi ve tedavi direncinde önemli bir rol oynarlar [57]. miRNA'lar kanda en çok dolaşan serbest moleküllerdir [65]. Ayrıca, saptanabilir miRNA seviyeleri, ilave hücre dışı sıvılarında ve dokularda gözlemlenebilir. Bu nedenle biyolojik sıvı

numunelerindeki değişmiş miRNA ekspresyon paternleri, tümör doku örnekleri ile ilişkilidir ve glioblastom dahil farklı kanser tiplerinin erken tanı, sınıflandırma ve prognoz öngörüsünü iyileştirebilir [66, 67].

Özellikle, büyük bir malign glioma hasta kohortunda küresel bir serum miRNA imzası, kanser hastalarının serumunda normal kontrollere kıyasla yedi serum miRNA (miR-15b, miR-23a, miR-133a, miR-150, miR-197, miR-497 ve miR-548b) seviyesinin azaldığını ortaya koymuştur. Sağlıklı kontrollere kıyasla glioblastoma hastalarından alınan plazma ve doku örneklerinde miR-21'in belirgin upregülasyonu ve miR-128 ve miR-342'nin downregülasyonu bulunmuştur ve bunları teşhis için öngörücü biyobelirteçler olarak kabul etmişlerdir [68]. Ayrıca, yüksek dereceli glioma hastalarında plazmada daha düşük miR-128 ve miR-342 düzeyleri görülmüştür, bu da bu miRNA'ların histopatolojik glioma dereceleri ile pozitif korelasyonunu göstermektedir. Dikkat çekici bir şekilde, cerrahi ve kemo-ışınlama tedavisinden sonra ise normal düzeyde oldukları saptanmıştır, bu da tedaviye yanıt için yararlı biyobelirteçler olabileceklerini düşündürmüştür [69].

### **2.3.3 TEP (Tümör-eğitimli Plateletler)**

Tümör hücreleri plateletlerin mRNA profilini değiştirebildiğinden TEP, tümör büyümesine sistemik ve lokal tepkilerde yer alır. TEP, tümör hücreleri tarafından salınan dolaşımdaki mRNA'yı birleştirebilir ve tümörle ilişkili çözülmüş proteinleri yok edebilir. Plateletler ve tümör hücreleri arasındaki bu etkileşimler, kanser teşhisi ve tümör ilerlemesinin izlenmesi için önemli bir potansiyele sahip olabilir [57].

Glioblastoma hastalarında, EGFRVIII RNA molekülleri bu tür trombositlerden izole edilmiştir [70]. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) bir delesyon mutanıtı olan EGFRvIII, glioblastoma tümörlerinin %30'unda mevcut olduğu düşünölen spesifik bir tümör RNA'sıdır. Merkezi sinir sisteminin bu kötü huylu tümörünün izleri, bu hastalardan alınan plateletlerin RT-PCR'si ile tespit edilebilir. EGFRvIII RNA transkripti %80 duyarlılıkla (EGFRvIII-pozitif tümörlerin 4/5'inde saptandı) ve %96 özgülölikle (EGFRvIII-negatif tümörlerin 25/26'sında negatif) saptandı. Ek olarak, mikroarray analizi, glioblastoma hastaları (n = 8) ve sağlıklı kontroller (n = 12) arasında ayırım yapabilen bir RNA imzası keşfetmişlerdir. GBM hastalarının

TEP'lerinden alınan mRNA dizileme verilerinde, diferansiyel olarak eksprese edilen ilk 30 genden toplam 17'sin de bulunmuştur [71].

### **2.3.4 CTC (Dolaşımdaki Tümör Hücresi)**

CTC'ler, birincil tümörü terk eden ve dolaşıma giren kanser hücreleridir. Bu CTC'lerin bir kısmı uzak bölgeleri istila etme ve metastaza neden olma potansiyeline sahiptir [72]. Tümör içindeki epitelyal mezankimal geçiş, bazı hücrelerin artan hareketlilik ve istila ile ilişkili bir fenotip kazanmasını sağlar [73]. CTC'ler ya tek hücre olarak ya da kümeler halinde bulunur, kümeler halinde bulunanlar daha yüksek metastatik potansiyele sahiptir [74]. CTC'lerin ya rastgele ayrılmış hücreler ya da metastatik tümör alt klonları olduğu varsayılır. Her iki durumda da, birincil tümörün genomik, transkriptomik ve proteomik özelliklerini içerirler ve birincil tümör hakkında bilgi sağlayabilirler [75, 76]. Çoklu kanserlerde yapılan çalışmalar, CTC'ye dayalı teşhis, izleme ve prognoz olasılığını göstermiştir [77, 78, 79].

2018'de Krol ve arkadaşları, GBM'deki CTC kümelerinin ilk kanıtını gözlemledi ve ilerleyici GBM'li 13 hastanın yedisinde (%53,8) CTC'leri tespit edebildi [80]. BAL101553 bileşiğini (bir mikrotübül inhibitörü) test eden açık etiketli bir Faz 1/2a çalışmasında ise, hastalığın ilerlemesi sırasında yedi farklı zaman noktasında kan alındı ve CTC'ler, Parsortix mikroakışkan teknolojisi ile izole edildi. Yazarlar pozitif CTC'leri aşağıdaki kriterlerden en az birini karşılayan hücreler olarak tanımladılar: bunlar en az 9 µm boyutundaydı ve CD45 boyaması için negatifti; EGFR, Ki67 veya mikrotübül ile ilişkili protein EB1 için pozitif ve ayrıca CD45 negatifti [81].

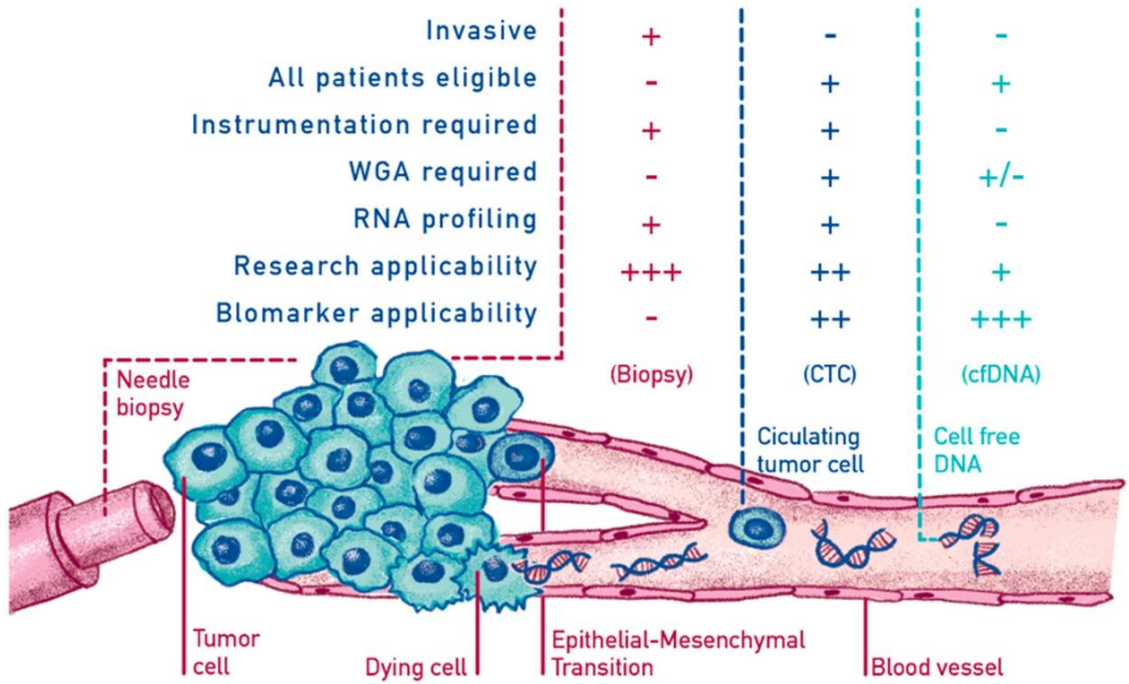
### **2.3.5 cfDNA ve ctDNA**

cfDNA, apoptoz, otofaji, fagositoz veya NETosis olarak adlandırılan düzenlenmiş bir nötrofil hücre ölümü formu gibi hücresel süreçlerin bir sonucu olarak kan dolaşımına salınır [82]. Normal hücreler tarafından salındığında, bu fragmanlar genellikle fagositozla temizlenir ve sonuç olarak sağlıklı bireylerde cfDNA seviyeleri tipik olarak düşüktür [22]. Kanser hastalarında, cfDNA'nın bir kısmı ctDNA'yı içerecektir. ctDNA miktarı değişir ve hastalığın yükünü yansıttığı düşünülmektedir, daha ileri/geç evre hastalarda daha fazla miktarda ctDNA bulunur [83]. ctDNA, birincil tümörün mutasyonel manzarasını yansıtan tümöre özgü mutasyonlar taşıyabilir ve bu nedenle tümör dokusunu invaziv olmayan bir şekilde örneklemek için önemli bir yolu temsil eder [84]. Bununla birlikte, mutanti vahşi tip alellerden ayırt

etmek için gereken hassas algılama teknolojileri ve mutasyonlar için eşiklerin geliştirilmesi (örneğin, değişken alel frekansı (VAF) gibi) gibi ctDNA analiziyle ilgili zorluklar vardır.

ctDNA'nın kısa dolaşım süresi göz önüne alındığında (16 dakika ila 2.5 saat arasında), ctDNA fragmanlarının dinamik ve sürekli izlenmesi, kanser tahmininde önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, ctDNA'nın hızla bozulma eğilimi, doğru tespitini özellikle zorlaştırır [85].

Geleneksel biyopsilerden tümör dokusundaki nükleik asitlerin analizi, tümördeki baskın hücreler hakkında bilgi sağlarken, cfDNA'ya dayalı tümör analizi, tüm tümör bölgeleri hakkında bilgi vericidir. Bu nedenle, likit biyopsiler bir hastanın hastalık yükünü ve ilerlemesini daha doğru ve gerçek zamanlı olarak izlemek için kullanılabilir, böylece farklı tümörlerin heterojenliği tespit edilebilir [86]. Likit biyopsi ve tümör dokusu biyopsisinin farklılıkları ve likit biyopsinin potansiyeli Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



**Şekil 2.4:** Likit biyopsi ve doku biyopsisinin karşılaştırılması.

Ayrıca likit biyopsilerin örnekleme kolaylığı göz önüne alındığında hastaya daha fazla rahatsızlık vermeden tekrarlanan örnekleme sayesinde hastalığın farklı zamanlarında bilgi alınabilmesini mümkün kılar [87]. Bu durum belirli hedefe yönelik tedavilerin kullanımıyla ortaya çıkan ilaç direnci mutasyonları gibi ek genetik değişikliklerin

izlenmesi için güçlü bir teknik olduğunu gösterir. Tekrarlanan örnekleme sayesinde, tedavinin tümörün gelişimine yanıt verecek şekilde ayarlanmasına olanak tanınmış olur [88].

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) hedefli tedavilere direnç, hem akciğer hem de kolorektal kanserlerin tedavisinde bir sorun olmaya devam etmektedir. Taniguchi ve arkadaşları, EGFR T790M varyantının varlığını belirlemek için anti-EGFR tedavisinden sonra nüks yaşayan hastalardan hem doku biyopsisi hem de ctDNA kullanmışlardır [89]. Anti-EGFR tedavilerine direnç, hem doku biyopsisi hem de ctDNA kullanılarak yapılan bir keşif olan KRAS mutasyonlarının ortaya çıkmasıyla da ortaya çıkar [90, 91].

İdrar, dışkı, beyin omurilik sıvısı ve tükürük gibi çeşitli vücut sıvılarında da ctDNA elde etmek mümkündür [92]. Bu nedenle, bu alandaki gelişmeler, kanserli bir hastanın tedavisinin nasıl seçildiğini ve izlendiğini kesinlikle değiştirecektir.

### **2.3.5.1 GBM hastalarında yapılan ctDNA çalışmaları**

ctDNA, birden fazla tümör bölgesinden türetilen DNA'yı yansıtabileceği ve tanısal bir biyobelirteç olarak işlev görebileceği için glioblastoma genomunun kapsamlı bir görünümünü sağlayabilir. Bu mutasyonların bazıları glioblastomayı moleküler olarak sınıflandırmak için kullanıldığından (klasik olanlar EGFR amplifikasyonu, mezenkimal olanlar NF1 ve TP53 mutasyonları veya pronöral alt tiplerle IDH1 mutasyonu ile ilişkilidir), bu sonuçlar ayrıca plazma ctDNA analizinin eyleme geçirilebilir somatik genomik bilgi elde etmek ve glioblastoma hastalarının moleküler profilini veya alt tiplerini ortaya çıkarmak için bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir. Bu aynı zamanda klinik terapötik seçime de rehberlik edebilir. Gerçekten de, BRAF/IDH1/IDH2 mutasyonları, PDGFRA amplifikasyonları ve DNA hasar onarım genlerindeki mutasyonlar, moleküler hedefli tedavi için potansiyel adaylar olarak önerilmiştir [93].

Schwaederle ve ark., farklı tümör tiplerine sahip 171 hastadan toplanan plazma örneklerindeki ctDNA'nın, yeni nesil sekanslama (YND) kullanılarak hedeflenen bir panelde (54 gen panel) analiz edildiği bir çalışma yürüttü. Bu 171 hastanın 33'ünde GBM tanısı vardı (örneklerin %19'unu temsil ediyor). GBM'li hastaların %73'ünde

değişmemiş ctDNA'larında fark edilebilir bir değişiklik yoktu; % 24'ünde bir değişiklik (variant) ve % 3'ünde iki veya daha fazla değişiklik vardı [94].

Bettegowda ve ark., 14 farklı doku tipinden kaynaklanan 136 metastatik tümörün yanı sıra primer beyin tümörlü 41 hastanın (glioma ve medulloblastom) değerlendirilmesini yaptılar. Primer beyin tümörleri, nadiren metastaz yapmalarına rağmen genellikle ölümcül oldukları için bu değerlendirmeye dahil edilmişti. gliomlu 27 hastanın %10'undan azında saptanabilir ctDNA bulundu. Glioma, saptanabilir ctDNA'lı olguların en düşük sıklığına sahip tümör tipiydi [95].

Piccioni ve ark., 222 GBM hastası dahil olmak üzere primer beyin tümörü olan 419 hastayı analiz ettiler ve tüm beyin tümörü hastalarının %50'sinden (GBM hastaları arasında %55) toplanan kan örneklerinde ctDNA mutasyonları tespit ettiler. Yazarlar, saptanabilir ctDNA seviyeleri olan hastalar için, plazma ctDNA analizi sonuçlarının tedavi alternatiflerini takip etmek için uygun bir seçenek sağlayabileceği sonucuna varmışlardır [96].

Wang ve ark., 96 farklı glioma derecelerine sahip hastaların serum ve beyin omurilik sıvısı (BOS) analizini yaptılar, 89 glioma hastasından GBM'si olan 38 hastada (% 42.6), metilasyona özgü PCR kullanarak, MGMT promotöründe metilasyon varlığını saptadılar. Bu analiz, kan numuneleri (serum) yerine BOS kullanıldığında daha yüksek bir duyarlılık gösterdi. MGMT promotör metilasyonu, serum numunelerinde 89 hastanın 19'unda (%21,3) ve 78 hastanın 26'sında (%33,3) BOS kullanılarak tespit edildi. BOS'ta bulunan bu daha yüksek duyarlılık, BOS kullanımının seruma kıyasla bir avantaj sunabileceğini düşündürmektedir [97].

GBM hastalarının kanındaki ctDNA saptama oranları da değişkenlik göstermektedir, bu da GBM'deki ctDNA'yı daha iyi anlamak için daha büyük kohortlarla daha fazla çalışmaya duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır [2].

### **2.3.5.2 GBM'de ctDNA tespitinin önemi**

GBM hastaları genellikle tedaviye direnç geliştirir. Hastaları tedavi süresince seri örnekleme yoluyla izlemek ve spesifik tümör mutasyonlarını ve DNA metilasyon modelindeki değişiklikleri saptamak, tümör davranışını anlamak için değerli olabilir. Bu parametreler GBM hastalarının yönetiminde kullanılan mevcut geleneksel metodolojileri tamamlayabilir. Ayrıca, çok yönlü çalışmalar, tümör ilerlemesinin

izlenmesine veya psödoprogresyonun minimal invaziv bir şekilde tespit edilmesine olanak sağlayacaktır. Farklı biyoakışkan kaynakları karşılaştırıldığında (örneğin, kanda veya BOS'ta saptanan ctDNA) BOS, muhtemelen BOS'un beyne yakınlığı nedeniyle daha temsili görünmektedir. Bununla birlikte, BOS alımı, kan alımına kıyasla çok daha invaziv ve risklidir [2].

### **2.3.5.3 ctDNA tespitinde kullanılan teknolojiler**

ctDNA profillemenin duyarlılığı ve özgüllüğü, karmaşık biyolojik özelliklerle karşı karşıya kalındığında zayıf deneysel koşullardan önemli ölçüde etkilenir. Plazmaki ctDNA'nın eser miktarda bulunması ve bir süre sonra bozulmasının yanı sıra, özellikle kan örneği izole edildiğinde ve santrifüj ile toplandığında ctDNA saptanması daha fazla tehlikeye girer. Yapılan son çalışmalar, santrifüjlemeden sonra plazma ctDNA'sının yaklaşık %50'sinin kaybedildiğini göstermektedir [98, 99, 100]. Mevcut kan saklama yöntemlerine her zaman hemaglutinasyon ve ekstrasvazasyon eşlik eder ve bu da ctDNA tespitini önemli ölçüde engeller. Ayrıca, geliştirilen birkaç ticari kit bulunmaktadır ve bu kitler arasında farklı ekstraksiyon verimlilikleri ve farklı fragman boyutu tercihleri görülmektedir. Dolayısıyla, farklı çalışmalarda ctDNA tespitinin tekrarlanabilirliği ve karşılaştırılabilirliği zorlaşır. Bu nedenle, ctDNA saptama stratejilerinin gelecekteki klinik uygulamalarında ctDNA ekstraksiyonu için kullanılan evrensel bir standart protokolün geliştirilmesi şarttır [101, 102].

Mevcut biyolojik materyalin düşük miktarı nedeniyle plazma örneklerinden ctDNA ölçümü zor olduğundan, dizileme teknolojilerinde iyileştirme gereklidir. Bu anlamda, damlacık tabanlı dijital PCR (ddPCR) veya yeni nesil dizileme tekniklerinin optimizasyonu gibi yeni teknolojilerin geliştirilmesi, ctDNA mutasyonlarının tespiti için duyarlılığı ve özgüllüğü artırmıştır [103, 104, 105]. YND, yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirlik ile bir numunede bulunan çok çeşitli nükleik asitlerin keşfedilmesine izin verirken, ddPCR kullanımı ise bilinen hedef dizilerin, tek bir molekül seviyesinde tespiti ve kantifikasyonuna izin verir. Öte yandan, YND yeni ve bilinmeyen genetik modifikasyonları tespit edebilir ancak sonuçları elde etmek, işlemek veya analiz etmek için daha uzun zamana ihtiyaç vardır; üstelik biyoinformatik uzmanlık gerektirir ve daha pahalıdır [103]. YND ile karşılaştırıldığında, ddPCR deneylerinin kurulumu daha kolaydır, daha hızlıdır, daha yüksek hassasiyet sunar, daha düşük maliyetlidir ve

karmaşık biyoinformatik analiz gerektirmezler. Bununla birlikte, yalnızca bilinen mutasyonların çalışılmasını sağlarlar [106]. ctDNA saptama tekniklerinin özeti Tablo 2.2’de listelenmiştir.

**Tablo 2.2:** ctDNA saptama teknikleri.

teknik	Algılama limiti	Değişiklik Algılama Türü	Avantajlar	Dezavantajları
PCR tabanlı yaklaşımlar (COLD-PCR, PNA <sub>s</sub> -LNA, ARMS, vb.)	%0,1-1	SNV, indeller	Düşük maliyetli; gerçekleştirilmesi kolay	Düşük hassasiyet; Bir seferde sınırlı sayıda çalışılan gen; Genlerin önceden belirlenmesi gerekir
Dijital PCR (ddPCR ve BEAMing)	%0,05 veya daha az	SNV, indels, CNV	Yüksek duyarlılık ve özgüllük; Makul maliyet; gerçekleştirilmesi kolay	Bir seferde sınırlı sayıda çalışılan gen; Genlerin önceden belirlenmesi gerekir
NGS (Derin sıralama, TAM-seq, Safe-Seqs, CAPP-Seq, eSMART, dijital sıralama)	%0,01-2	SNV, indels, CNV, yeniden düzenlemeler	Bir seferde daha fazla genin analiz edilmesini sağlar	Kullanılan NGS platformuna bağlı olarak geniş hassasiyet aralığı (PCR amplikon stratejileri, tüm genom veya ekzom dizilemesinden daha hassas ve daha ucuzdur); Daha yüksek maliyet
SERS-nanotag'ler	%0,01	SNV	Fotoğrafıya karşı azaltılmış duyarlılık; Bant genişlikleri önemli ölçüde daha dardır	Uzun süreli lazer aydınlatması üzerine Raman sinyali bozulması
UltraSEEK	%0,01	SNV, indeller	Düşük maliyet ve düşük DNA girişi	Daha düşük hassasiyet

Birkaç çalışma, kan örneklerinde tümörle ilişkili mutasyonları analiz etmiş ve tanımlamıştır. İlk çalışmada, glioblastoma hastalarının sınırlı bir alt grubunda (%10) IDH1, EGFR, TP53 ve PTEN mutasyonları tespit edilmiştir [103]. Kapsamlı ctDNA analizi ve son derece hassas ve spesifik bir YND testi gerçekleştiren daha yeni çalışmalarda, ilerlemiş glioblastomalı hastalarda ctDNA saptama oranının yaklaşık %50 olduğu saptanmıştır ve gliomlardaki ctDNA saptama oranının derece ve histopatolojiye göre değişebileceğini gösterilmiştir [93, 107]. 33 glioblastoma hastası dahil olmak üzere farklı kanserlere sahip toplam 171 hastadan ekstrakte edilen plazmadan elde edilen ctDNA'da yapılan benzer bir YND analizinde, TP53, EGFR, MET, PIK3CA ve NOTCH1 genlerinde en sık görülen mutasyonlar başarıyla saptanmıştır [94]. Diğer çalışmalarda, NGS teknolojisi kullanılarak saptanan en sık somatik mutasyonlar, ERBB2, MET ve EGFR amplifikasyonları ile birlikte TP53, NF1, EGFR1, MET, APC ve PDGFRA genlerinde gözlenmiştir [93]. Bu sonuçlar, ddPCR veya geliştirilmiş YND gibi daha hassas tekniklerle doğrulanmalıdır; yine de

mutasyona uğramış genlerin spektrumu, TCGA doku analizi ile elde edilene benzerdir [108, 109].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Gereç

##### 3.1.1 Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de yer almaktadır.

**Tablo 3.1:** Çalışmada kullanılan cihaz listesi.

Cihaz adı	Marka	Kullanım amacı
Otomatik pipetler	Gilson	Tüm laboratuvar çalışmalarında kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-20°C)	Samsung	Örnekler, kit ve tampon çözeltilerinin saklanması için kullanılmıştır.
Buzdolabı (+4°C)	Samsung	Örnekler, kit ve tampon çözeltilerinin saklanması için kullanılmıştır.
Vorteks	Biosan	Solüsyon ve mixleri homojen hale getirmede kullanılmıştır.
Santrifüj	Beckman Coulter	İzolasyon protokolünde kullanılmıştır.
QIAvac 24 Plus	Qiagen	cfDNA izolasyon protokolünde kullanılmıştır.
PCR cihazı	Bio-Rad	Panel çalışmasında kullanılmıştır.
Florometre	Qubit	DNA ürünlerinin ölçümlerinde kullanıldı.
Real-time PCR cihazı	Rotor-Gene	Kütüphane ürünlerinin kantitasyonunda kullanıldı.
Yeni nesil dizileme cihazı	Nextseq 500/550Dx	Dizileme işleminde kullanılmıştır.
Bilgisayar	Philips 227E	Real-time PCR sonuçlarını değerlendirme, biyoinformatik iş akışları ve analiz için kullanılmıştır.



### 3.1.2 Kimyasallar ve Ticari Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kit ve kimyasallar Tablo 3.2’de yer almaktadır.

**Tablo 3.2:** Çalışmada kullanılan kit ve kimyasallar.

<b>Kit, Kimyasal adı</b>	<b>Marka</b>	<b>Kullanım amacı</b>
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qiagen	Likit biyopsi örneklerinin izolasyonunda kullanılmıştır.
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	Taze doku örneklerinin izolasyonunda kullanılmıştır.
QUBIT dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen	DNA ürünlerinin konsantrasyonunu ölçmek amacıyla kullanılmıştır.
Distile su	Polifarma	Tüm laboratuvar çalışmalarında kullanılmıştır.
Etanol (99%)	SigmaAldrich	Panel çalışması sırasında manyetik beadlerle birlikte saflaştırma amacıyla kullanılmıştır
NaOH	SigmaAldrich	Kütüphane denatürasyonu için kullanılmıştır.
QIAseq Targeted DNA Custom Panel	Qiagen	Panel çalışmasında kullanılmıştır.
QIAseq Library Quant Assay Kit	Qiagen	Kütüphane kantitasyonu için kullanılmıştır.
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles)	Illumina	Normalize edilmiş kütüphane ürününün dizileme cihazına yüklemesi amacıyla kullanılmıştır.

### 3.1.3 Paneldeki Gen Listesi

Tez çalışmasında kullanılan paneldeki gen listesi Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Tüm ekzonları incelenen genler dışında bulunan diğer genler hotspot bölgeleri içermektedir. Panelin içerdiği primer miktarı 3007’dir.

ABL1	BTK*	EGFR	FGFR2	HNF1A	KIT*	MSH6	PTEN*	SMARCB1
AKT1	CDH1	ERBB2	FGFR3	HRAS	KRAS	MTOR*	PTPN11	SMO
ALK	CDKN2A	ERBB4	FLT3	IDH1	MAP2K1	NOTCH1	RAF1*	SRC
APC	CSF1R(R)	ESR1*	FOXL2	IDH2	MAP2K2*	NPM1	RB1	STK11
AR*	CTNNB1	EZH2	GNA11	JAK2	MET	NRAS	RET	TP53
ATM	DDR2	FBXW7	GNAQ	JAK3	MLH1	PDGFRA	ROS1*	TSC1
BRAF	DNMT3A	FGFR1	GNAS	KDR	MPL	PIK3CA	SMAD4	VHL*

\*Tüm ekzonları incelenen genler.

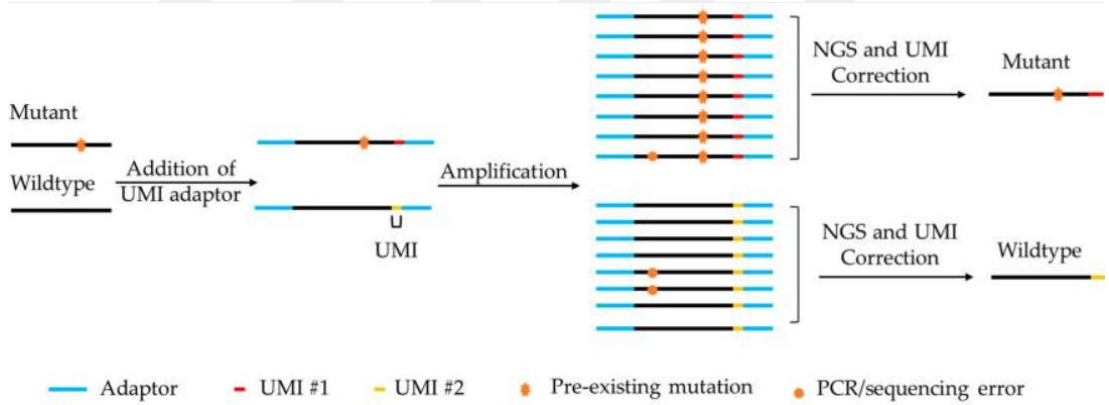
**Şekil 3.1:** Çalışmada kullanılan paneldeki gen listesi.

### 3.2 Yöntem

Glioblastomda, beyin tümöründen türetilen biyolojik materyallerin kana geçişi kan-beyin bariyeri nedeniyle diğer tümörlere kıyasla daha düşüktür. Bu nedenle günümüze kadar çok az çalışma kan örneklerindeki tümörle ilişkili mutasyonları analiz etmiş ve tanımlamıştır. YND tekniklerinin optimize edilerek yeni teknolojilerin geliştirilmesi, bu materyallerdeki mutasyonların saptanması için duyarlılığı ve özgüllüğü arttırmıştır. YND, yeni ve bilinmeyen genetik değişiklikleri tespit edebilen, ancak aynı zamanda sonuçların eldesi, işlenmesi veya analiz edilmesi için daha uzun süre gerektiren pahalı bir yöntemdir. Bu yöntem ile yapılan çalışmalarda, beyin tümöründen kana geçen biyolojik materyallerin birden fazla tümör bölgesinden türetilen DNA'yı yansıtabileceği ve tanısız bir biyobelirteç olarak işlev görebileceği için glioblastoma genomunun kapsamlı bir görünümünü sağlayabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda, elde edilen bulgular bize YND yöntemi ile somatik genomik bilgi elde etme ve glioblastoma multiforme hastalarının moleküler profilini veya alt tiplerini ortaya çıkarma seçeneği olabileceğini düşündürmektedir. Bu aynı zamanda klinik terapötik seçimi de yönlendirebilir.

Çalışmamızı benzersiz moleküler tanımlayıcı (UMI) tabanlı hedef dizileme yöntemi ile yaptık. Hedef zenginleştirme cfDNA'daki mutasyonların, CNV'lerin ve metilasyonların uygun maliyetli, doğru ve hassas tespiti için hedeflenen derin

dizilemenin önemli bir aşamasıdır. Ortak biyoinformatik iş akışları, %2-5 alel frekansına kadar hassas ve spesifik varyant tanımlamasına izin verir. Bu, katı tümör biyopsilerinden somatik mutasyonları belirlemek için sağlam bir metodoloji sağlar. Bununla birlikte, kandaki düşük ctDNA içeriği ve dizileme artefaktları şu anda analitik duyarlılığı sınırlandırmaktadır. PCR tabanlı hedef zenginleştirme, PCR kopyalarını, bir çift PCR primeri tarafından oluşturulan benzersiz parçaların kopyalarından ayırt edemez. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, DNA moleküllerini tek tek etiketlemek için adaptörlere UMI'ler eklenmiştir. UMI'ler, PCR amplifikasyonu tarafından oluşturulan benzersiz fragmanların kopyalarından PCR kopyalarını doğru bir şekilde ayırt edebilir. Böylece gerçek somatik mutasyonların saptanabilmektedir. İlk döngü PCR'den kaynaklanan hataları ortadan kaldırarak ultra nadir varyant çağrısını iyileştirmek için UMI etiketli hedeflenen yeniden sıralama verileri için özel biyoinformatik yazılım paketleri geliştirilmiştir. Moleküler barkodlamanın bir biyoinformatik algoritmasına dahil edilmesi, YND verilerinde mutasyon saptama hassasiyetini önemli ölçüde artırmıştır [110, 111, 112]. UMI tabanlı hedef dizileme yönteminin şematik gösterimi Şekil 3.2'de verilmiştir.



**Şekil 3.2:** UMI tabanlı hedef dizileme yöntemi.

Araştırmamızda, glioblastoma multiforme ile ilişkilendirilmiş ve ilişkili olabileceğini düşündüğümüz genlerin hot spot bölgelerini içeren bir yeni nesil dizileme paneli ile çalıştık. Bu panel gönüllü glioblastoma hastalarının (10 kişi) taze doku ve plazmalarında, sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin (3 kişi) ise plazmalarında çalışıldı.

### 3.2.1 Örneklerin Toplanması

Numunedeki hücresiz DNA'nın bozunmasını artıran veya plazmanın lökositlerden gelen normal DNA ile kontaminasyonunu artıran pre-analitik değişkenler, analitik

başarıyı en çok tehlikeye atanlardır. Mevcut kanıtlar, kandaki ctDNA analizi için optimal numune tipinin plazma olduğunu göstermektedir. Hem serum hem de plazma, tam kanın sıvı, hücre içermeyen kısmından oluşur. Aralarındaki en büyük fark, serumun pıhtılaşma faktörlerinden yoksun olmasıdır.

Aynı kan örneklerinden alınan toplam hücresiz DNA (normal ve ctDNA) konsantrasyonu serumda plazmaya göre daha yüksektir. Kandaki çoğu hücresiz DNA, pıhtılaşma sırasında meydana gelen lökosit lizisinden kaynaklanır. ctDNA'yı seyrelten lökosit lizisinden türetilen normal DNA miktarı, özellikle kan alındıktan hemen sonra lökosit fraksiyonundan ayrılırsa veya kan bir lökosit stabilizatörü içeren toplama tüplerine alınırsa, plazmada çok daha düşüktür [113, 114].

Çalışmamızda PAXgene Blood ccfDNA Tüpü kullandık ve plazmadan YND gerçekleştirdik. Tüp, kanın pıhtılaşmasını önleyen ve çapraz bağlanmayan bir stabilizasyon solüsyonu yoluyla kan hücrelerini doğrudan stabilize eden bir katkı maddesi içerir. Bu, hücre içi DNA'nın plazmaya salınmasını önler ve ccfDNA seviyelerini stabilize eder. Kan alındıktan sonra, PAXgene Blood ccfDNA Tüpünün 8-10 kez yavaşça ters çevirilmesi önerilmektedir. Tüplere doldurulan kan örnekleri, santrifüj ve plazma işlemeye kadar oda sıcaklığında (15–25 ° C) 7 güne kadar stabildir.

Tez çalışmasına gönüllü olarak katılmak isteyen glioblastoma hastalarına “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Hasta Grubu)” doldurulması istendikten sonra, PAXgene Blood ccfDNA tüplerine 10 ml kan örnekleri ve taze doku örneklerinden bir parça alınmıştır. Sağlıklı kontrol grubuna ise “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Kontrol Grubu)” doldurulması istendikten sonra, PAXgene tüplerine 10 ml kan örnekleri alınmıştır. Likit biyopsi örnekleri gönüllülerden alındıktan sonra 7 gün içerisinde izole edildi.

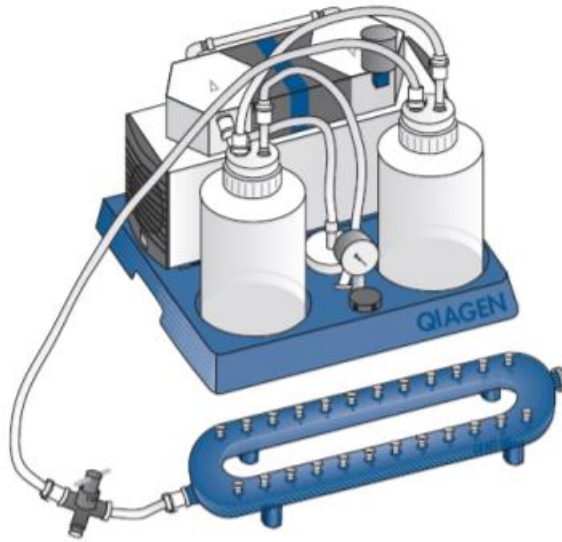
### **3.2.2 ccfDNA izolasyonu**

Tümöre özgü hücre dışı DNA fragmanları ve kandaki mRNA'lar veya maternal kandaki fetal nükleik asitler gibi serbest dolaşan nükleik asitler serum veya plazmada genellikle kısa fragmanlar halinde <1000 bp (DNA) veya <1000 nt (RNA) bulunur. Plazma, serum veya idrar gibi biyolojik sıvılarda serbest dolaşan nükleik asitlerin

konsantrasyonu genellikle düşüktür ve farklı kişiler arasında önemli ölçüde değişir. Plazmada serbest dolaşım DNA için, konsantrasyon insan numunelerinde 1 ila 100 ng / ml arasında değişebilir [115]. Ticari cfDNA izolasyon kitleri, bu sirkülayonlu nükleik asitlerin insan plazması, serum veya idrardan etkili bir şekilde saflaştırılmasını sağlar. Kan plazma örneklerinden, serbest tümör DNA'sı izolasyonu için QIAamp Circulating Nucleic Acid kiti kullanıldı.

İzolasyonun 5 ml'ye kadar numune hacmi ile başlatılması gerekir ve 20 µl ile 150 µl arasındaki esnek elüsyon hacimleri, numune materyalinde düşük miktarlarda bulunan nükleik asit türlerinin konsantrasyonun ayarlanmasına izin verir.

Prosedür 4 adımdan (parçalama, bağlama, yıkama, elute) oluşur ve Şekil 3.3'te gösterilen vakum kanalları içeren bir sistem üzerinde (QIAvac 24 Plus) mini kolonlar kullanılarak gerçekleştirildi.



**Şekil 3.3:** cfDNA izolasyonunda kullanılan QIAvac 24 Plus sistemi.

Aşamalar aşağıdaki gibidir:

- cfDNA kan tüplerine alınan hasta kanları numaralandırıldı ve hangi hastaya ait olduğu bir kağıda yazılarak izolasyon işlemine başlandı.
- cfDNA kan tüpleri 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatanttan 4-5 ml alındı, daha önceden numaralandırılmış steril 50 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı.
- Her bir 4-5 ml örneğe, 400 µl Proteinase K ve 3,2 ml ACL Buffer (1 µg carrier RNA içeren) eklendi, vortekslendi. Karışımın homojen bir şekilde karıştığı gözle kontrol

edildi (Liziz aşamasının etkinliği için iyi karışması önemlidir). Su banyosunda 60 °C’de 30 dk inkübe edildi.

- Nükleik asitlerin kolona tutunabilmesini sağlayan 7,2 ml ACB buffer eklendi, vortekslendi. Karışım 5 dk -20 °C’ de inkübe edildi.
- İnkübasyonundan alınan karışım vakumlu sistemde bulunan kolonlara aktarıldı ve vakum pompası çalıştırıldı.
- 3 kez farklı konsantrasyondaki etanol ile yıkama işlemi yapıldı (Sırasıyla 600 µl ACW1 buffer, 750 µl ACW2 buffer, 750 µl % 96’lık etanol).
- Kolonlar 56°C’de 10 dk inkübe edilerek etanol uzaklaştırıldı.
- Kolonlar temiz 1,5 ml’lik elüsyon tüplerine alındı, 40 µl (önerilen 20–150 µl) AVE Buffer eklendi. Kolonun kapağını kapatılarak oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi.
- 14000 rpmde 2 dk santrifüj edildi. Elüsyon tüpünde kalan DNA Qubit ile ölçüme hazır hale getirildi.

### **3.2.3 Taze doku izolasyonu**

- Doku örneğinden kesit alındı, alınan kesit küçük parçalara bölündü. 1,5 ml ependorfa aktarıldı.
- 180 µl ATL buffer ve 20 µl proteinaz K eklendi, vortekslendi ve doku tamamen parçalanana kadar 56°C’de inkübe edildi.
- İnkübasyon esnasında birkaç kez örnekler vortekslendi.
- İnkübasyondan sonra 200 µl AL tamponu eklendi, homojen bir karışım oluşana kadar vortekslendi ve 70°C’de 10 dakika inkübe edildi.
- 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve vortekslendi.
- Karışım 2 ml’lik toplama tüpü içindeki spin kolona aktarıldı, 6000 x g’de (8000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi.
- Toplama tüpü atıldı ve spin kolon yeni bir 2 ml’lik toplama tüpüne aktarıldı.
- 500 µl AW1 tamponu eklendi ve 6000 x g’de (8000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi.
- Toplama tüpü atıldı ve spin kolon yeni bir 2 ml’lik toplama tüpüne aktarıldı.
- 500 µl AW2 tamponu eklendi ve 20.000 x g’de (14.000 rpm) 3 dakika santrifüjlendi.
- Toplama tüpü atıldı ve spin kolon yeni bir 2 ml’lik toplama tüpüne aktarıldı. 20.000 x g’de (14.000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi.
- Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir 1,5 ml’lik ependorfa aktarıldı.

- 50 µl AE tamponu eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi.

### **3.2.4 Qubit ile DNA ölçümü**

Qubit Florometre ile elde edilen DNA'lar yüksek hassasiyetle ölçülür. Kit konsantre analiz reaktifi, seyreltme tamponu ve önceden seyreltilmiş DNA standartları içerir. Tampon kullanılarak reaktif seyreltilir, sonrasında elde edilen DNA örnekleri eklenir (1 µl ve 20 µl arasında) ve Qubit Fluorometer kullanarak konsantrasyon ölçülür. Tuzlar, serbest nükleotitler, çözücüler veya protein gibi yaygın kontaminantlar iyi tolere edildiğinden DNA miktarı hakkında yüksek hassasiyette bilgi sağlar.

Aşamalar aşağıdaki gibidir:

-cfDNA'lar, taze doku DNA'ları, standart 1 ve standart 2 için 0,5 ml'lik ependorflar hazırlandı.

-Ependorf başı 199 µl tampon ve 1 µl analiz reaktifi olacak şekilde miks hazırlandı.

-Standart 1 ve standart 2 için ayrı ayrı 190 µl miks ve 10 µl standart olacak şekilde eklendi, vortexlendi.

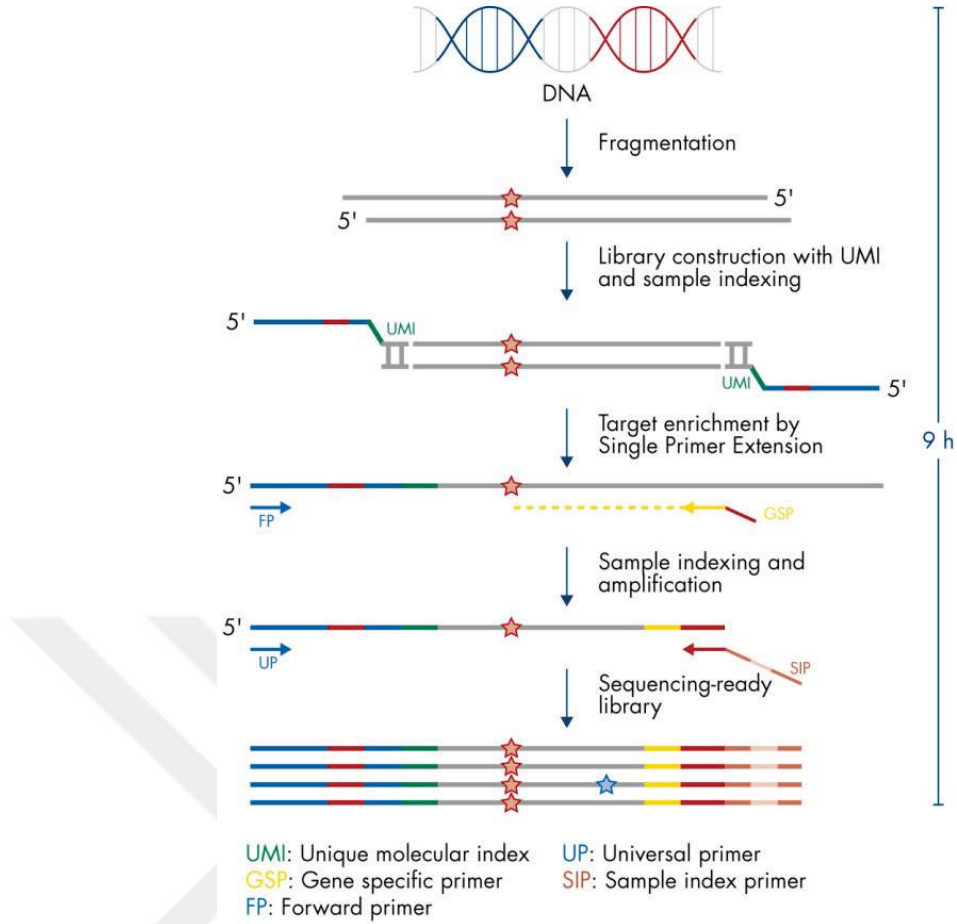
-Hasta DNA'ları için hazırlanan ependorflara ise 198 µl miks ve 2 µl DNA eklendi, vortexlendi.

-30 sn bekledikten sonra Qubit Fluorometer'in dsDNA: High sensitivity özelliği kullanılarak önce standart 1 ve standart 2 konsantrasyonları ölçüldü, sonrasında hasta DNA'larını ölçmek için 2 µl örnek hacmi seçilerek konsantrasyonlar ölçüldü.

### **3.2.5 63 genlik panel çalışması**

#### **3.2.5.1 Genel bilgiler**

DNA'nın yeni nesil dizilimi, somatik mutasyonlar, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), kopya sayısı varyasyonu (CNV) ve küçük insersiyon/delesyonlar dahil olmak üzere genetik varyasyonların tespiti için güçlü bir araçtır. Hedef zenginleştirme teknolojisi, kullanıcıların tüm genom yerine belirli ilgi alanlarını dizilemelerine olanak verir ve bu da dizileme derinliğini ve örnek verimini etkin bir şekilde artırırken maliyeti en aza indirir. Şekil 3.4 uygulanan protokolün özeti niteliğindedir.



Şekil 3.4: Çalışma protokolünün özeti.

### 3.2.5.1.1 Fragmantasyon

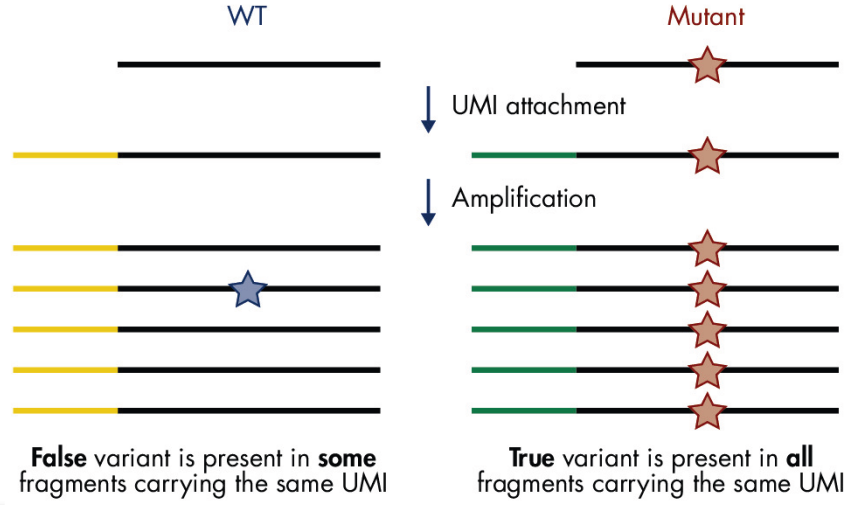
Genomik DNA örneği, kontrollü bir multi-enzim reaksiyon ile fragmente edilir, end-repair yapılır ve A-tail eklenir. Hazır DNA fragmantleri; kullanılacak sekans platformuna spesifik adaptorler (UMI ve sample index içeren) ile 5' uçlarından bağlanır.

### 3.2.5.1.2 UMI işaretlemesi

Hedef zenginleştirme ve kütüphane oluşturma aşamalarından önce her bir DNA molekülü -UMI olarak bilinen- kendine özgü bir sekans yada index ile kaydedilir. Bu tanımlama 12 bazlık random sekans içeren adaptörün (UMI) fragmente DNA ile bağlanması ile gerçekleşir. İstatiksel olarak bu proses adaptör başına 412 farklı işaretlemeye imkan verir ve örnekteki her bir DNA molekülü eşsiz bir UMI sekansı alır. Ayrıca bağlanan bu adaptör ilk örnek indexini de içerir.

Ligasyon sırasında, başlangıç numune popülasyonundaki her molekül ayrı bir UMI ile etiketlenir. UMI'ler, düşük kopyalarda bulunan PCR ile indüklenen artefaktları, düşük

frekanslarda bulunabilen gerçek varyantlardan ayırt etmeye yardımcı olur. Şekil 3.5'te doğru ve yanlış okumaların nasıl ayırt edildiği gösterilmiştir.



**Şekil 3.5:** UMI ile doğru ve yanlış okumaların ayırt edilmesi.

### 3.2.5.1.3 Hedef zenginleştirme ve final kütüphanesi oluşturma

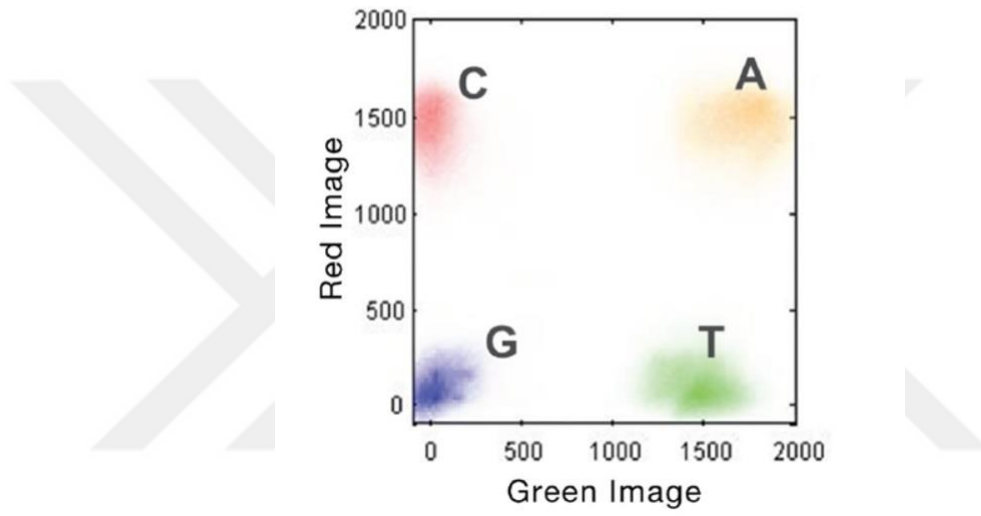
Hedef zenginleştirme, UMI içeren DNA moleküllerinin yeteri kadar zenginleştirildiği aşamadır. Zenginleştirme için; UMI bağlı DNA molekülleri; Adaptöre komplementer 1 bölge spesifik primer ve 1 universal primer ile Targeted PCR ile çoğaltılır. Son olarak; kitaplığı çoğaltmak ve platform spesifik adaptör sekans ve ekstra örnek index'leri eklemek için Universal PCR gerçekleştirilir.

### 3.2.5.1.4 Yeni Nesil Dizileme

Illumina NGS sistemlerinden biri olan NextSeq 500/550Dx'te sekanslama işlemi gerçekleştirilir. Sentez yoluyla sıralama (SBS) olan Illumina sıralama teknolojisi, dünya genelinde yaygın olarak benimsenen YND teknolojisidir ve dünyadaki sıralama verilerinin %90'ından fazlasını oluşturur. Her dNTP eklendiğinde floresan etiketli bir tersinir sonlandırıcı görüntülenir ve bir sonraki bazın dahil edilmesine izin vermek için ayrılır. Bu döngünün tekrarı, DNA şablonunun dizilenmesine yol açar. Nihai sonuç, geniş bir uygulama yelpazesi için doğru veriler sağlayan gerçek taban bazında sıralamadır. Yöntem, tekrarlanan nükleotid dizileriyle (homopolimerler) ilişkili hataları ve cevapsız çağrılarını neredeyse ortadan kaldırır [116].

NextSeq 500/550Dx 2 kanallı SBS olarak bilinen SBS teknolojisinin yeni bir evrimini kullanır. Bu yöntem, orijinal Illumina 4 kanallı SBS teknolojisi ile aynı yüksek veri doğruluğu ile daha hızlı veri üretimi sağlar. 2 kanallı SBS yöntemi, döngü başına 4 yerine yalnızca 2 görüntü gerektirir. Bu, Illumina sistemlerini diğerlerinden ayıran şey,

diğerleri gibi aynı kalite ve doğruluğu sağlarken sıralama ve veri işleme sürelerini hızlandırır. Her baz için ayrı bir boya kullanmak yerine, 2 kanallı SBS, dört baz çağrısını belirlemek için iki floresan boya ve iki görüntü kullanarak nükleotit tespitini basitleştirir. Kırmızı ve yeşil dalga boyu filtre bantları kullanılarak her bir DNA kümesinin görüntüleri alınır. Kırmızı veya yeşil görüntülerde görülen kümeler sırasıyla C ve T bazları olarak yorumlanır. Hem kırmızı hem de yeşil görüntülerde gözlenen kümeler A bazları (sarı kümeler olarak görülür) olarak işaretlenirken, etiketlenmemiş kümeler G bazları olarak tanımlanır. Şekil 3.6'da bazların tanımlanması gösterilmiştir [117].



**Şekil 3.6:** NextSeq 500/550Dx cihazında dört baz çağrısının görüntüsü.

### 3.2.5.2 Çalışma protokolü

#### 3.2.5.2.1 DNA hazırlığı ve kalite kontrolü

Qubit ölçümünden sonra örnekler çalışma alanına alınır. cfDNA örnekleri çalışmada direk kullanıldı. Taze doku DNA'ları son konsantrasyon 10 ng olacak şekilde sulandırıldı.

#### 3.2.5.2.2 Fragmentasyon

Tüm çalışmalar soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi. Başlamadan önce thermalcycler'da Tablo3.3'deki PCR programı kuruldu ve 4°C'de iken durduruldu. Tablo 3.4'e göre miks hazırlandı, 7-8 defa pipetaj yaparak karıştırıldı.

**Tablo3.3:** Fragmentasyon PCR programı.

	Taze doku	cfDNA
4°C	1 dk	1 dk
32°C	24 dk	14 dk

72°C 4°C	30 dk ∞	30 dk ∞
-------------	------------	------------

**Tablo 3.4:** Fragmantasyon PCR protokolü.

	<b>Taze doku</b>	<b>cfDNA</b>
<b>DNA</b>	5 µl (total 50ng)	16,75 µl
<b>Fragmentation Buffer</b>	2,5 µl	2,5 µl
<b>Su</b>	11,75 µl	-
<b>FERA Solution</b>	0,75 µl	0,75 µl
<b>Fragmentation Enzim Mix</b>	5 µl	5 µl
<b>TOTAL</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>

Her bir reaksiyona 5 µl Fragmentation Enzyme Miks'i eklendi, 7-8 defa pipetaj yaparak karıştırıldı (vortekslenmez).

Örnekler thermalcycler'a koyuldu ve programa devam ettirildi.

Program bittiğinde ve blok 4°C'ye geldiğinde, örnekler soğuk blok üzerine alındı.

Derhal adaptör ligasyon kısmına geçildi.

### 3.2.5.2.3 Adaptör ligasyonu

Tabloya göre reaksiyon mikisini hazırlandı. Tüm içerik 10-12 kez yavaşca pipetaj yaparak karıştırıldı. Ligasyon solüsyonu çok viskoz yapıda olduğu için mikse dahil edilmedi, sonradan her bir reaksiyona tek tek eklendi (Ligasyon solüsyonunu eklerken pipet ucunun üstüne kalan miktar sıyrılarak alınmalıdır). Tablo 3.5'te ligasyon protokolü verilmiştir.

**Tablo 3.5:** Ligasyon protokolü.

	<b>Taze doku</b>	<b>cfDNA</b>
<b>Fragmantasyon PCR ürünü</b>	25 µl	25 µl
<b>Ligation Buffer</b>	10 µl	10 µl
<b>*Adaptor (IL-N...)</b>	2,8 µl	0,5 µl
<b>DNA Ligase</b>	5 µl	5 µl
<b>Ligation Solution</b>	7,2 µl	7,2 µl
<b>Su</b>	-	2,3 µl
<b>TOTAL</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>

Her reaksiyon başına tek barkod adaptörü kullanıldı ve kullanılan barkodlar her örnek için not edildi. Thermal cyler'da kapak sıcaklığı kapalı olacak şekilde 20°C'de 15 dakika örnekler inkübe edildi.

### 3.2.5.2.4 Adaptöre bağlanmış DNA'nın QIAseq Boncuklarla Temizlenmesi

Manyetik rack'ın üzerine oturabilecek şekilde olan deep well plate'e ligasyon ürünlerinin hepsi aktarıldı (50 µl). Taze doku örneklerine 50 µl, cfDNA örneklerine 30 µl nukleaz free su eklendi.

Taze doku örneklerinin üzerine 100 µl, cfDNA örneklerine 112 µl QIAseq Beads eklendi, bir kaç defa pipetaj yaparak iyice karıştırıldı.

Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Plate manyetik rack üzerine alındı ve 10 dakika boncukların süpernetanttan ayrılması beklendi. Solüsyon berrak gözüktükten sonra, dikkatlice süpernetant uzaklaştırıldı. Hedef DNA'yı içeren boncuklara temas etmemeye dikkat edildi.

Plate hala manyetik rack üzerindeyken 200µl taze hazırlanmış %80 ethanol eklendi. Plate'i hareket ettirerek boncuklar yıkandı. Dikkatli bir şekilde süpernetant uzaklaştırıldı.

Bir önceki aşama tekrarlandı. Bu aşamada ethanol'ün tamamen uzaklaşması gerekmektedir. Bunun için önce 200 µl lik pipetle sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, geri kalan da 10 µl'luk pipetle uzaklaştırıldı.

Boncukların manyetik rack üzerinde 10 dakika iyice kuruması beklendi.

10 dakika sonunda plate manyetik rack üzerinden alındı ve DNA hedef boncukları 52 µl nukleaz free su ile elue edildi. İyice pipetaj yapıldı. Ve solüsyon berraklaşınca kadar tekrar manyetik rack üzerine alındı.

50µl süpernatantlar, plate'in temiz kısmına aktarıldı.

Taze doku örneklerinin üzerine 50 µl, cfDNA örneklerine 70 µl QIAseq Beads eklendi, bir kaç defa pipetaj yaparak iyice karıştırıldı.

Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Plate manyetik rack üzerine alındı ve 10 dakika boncukların süpernetanttan ayrılması beklendi. Solüsyon berrak gözüktükten sonra, dikkatlice süpernetant uzaklaştırıldı.

Plate hala manyetik rack üzerindeyken 200µl taze hazırlanmış %80 ethanol eklendi. Plate'i hareket ettirerek boncuklar yıkandı. Dikkatli bir şekilde süpernetant uzaklaştırıldı.

Bir önceki aşama tekrarlandı. Bu aşamada ethanol'ün tamamen uzaklaşması gerekmektedir. Bunun için önce 200 µl lik pipetle sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, geri kalan da 10 µl'luk pipetle uzaklaştırıldı.

Boncukların manyetik rack üzerinde 15 dakika iyice kuruması beklendi.

15 dakika sonunda plate manyetik rack üzerinden alındı ve DNA hedef boncukları 12 µl nukleaz free su ile elue edildi. İyice pipetaj yapıldı. Ve solüsyon berraklaşınca kadar tekrar manyetik rack üzerine alındı.

9.4 µl süpernatant temiz bir 0,2'lik PCR tüpüne aktarıldı ve hedef zenginleştirme PCR kurulumuna geçildi.

### 3.2.5.2.5 Hedef zenginleştirme PCR

Tablo 3.6'ya göre reaksiyon hazırlandı ve 7-8 kere pipetaj yaparak karıştırıldıktan sonra çok kısa santrifuj edildi. Tablo 3.7'deki thermalcykler programı kuruldu ve reaksiyon başlatıldı.

**Tablo 3.6:** Hedef zenginleştirme PCR protokolü.

<b>Taze doku - cfDNA</b>	
<b>DNA kütüphanesi</b>	9,4 µl
<b>TEPCR Buffer</b>	4 µl
<b>QIAseq Targeted DNA Custom Panel</b>	5 µl
<b>IL Forward Primer</b>	0,8 µl
<b>HotStar Taq DNA Polimeraz</b>	0,8 µl
<b>TOTAL</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 3.7:** Hedef zenginleştirme PCR programı.

<b>Taze doku - cfDNA</b>	
<b>95°C</b>	13 dk
<b>98°C</b>	2 dk
<b>98°C</b>	15 sn
<b>65°C</b>	15 dk
<b>72°C</b>	5 dk
<b>4°C</b>	5dk
<b>4°C</b>	∞

### 3.2.5.2.6 Hedef zenginleştirme PCR'nin QIAseq Boncuklarla Temizlenmesi

Plate'e PCR ürünlerinin tamamı aktarıldı (20 µl). Taze doku örneklerine 80 µl, cfDNA örneklerine 70 µl nukleaz free su eklendi.

Taze doku örneklerinin üzerine 100 µl, cfDNA örneklerine 108 µl QIAseq Beads eklendi, bir kaç defa pipetaj yaparak iyice karıştırıldı.

Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Plate manyetik rack üzerine alındı ve 10 dakika boncukların süpernetanttan ayrılması beklendi. Solüsyon berrak gözüktükten sonra, dikkatlice süpernetant uzaklaştırıldı.

Plate hala manyetik rack üzerindeyken 200µl taze hazırlanmış %80 etanol eklendi. Plate’i hareket ettirerek boncuklar yıkandı. Dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı.

Bir önceki aşama tekrarlandı. Bu aşamada etanol’ün tamamen uzaklaşması gerekmektedir. Bunun için önce 200 µl lik pipetle sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, geri kalan da 10 µl’luk pipetle uzaklaştırıldı.

Boncukların manyetik rack üzerinde 10 dakika iyice kuruması beklendi.

10 dakika sonunda plate manyetik rack üzerinden alındı ve DNA hedef boncukları 16 µl nukleaz free su ile elue edildi. İyice pipetaj yapıldı. Ve solüsyon berraklaşmaya kadar tekrar manyetik rack üzerine alındı.

13,4 µl süpernatant temiz bir 0,2’lik PCR tüpüne aktarıldı ve universal PCR kurulumuna geçildi.

### 3.2.5.2.7 Universal PCR

Tablo 3.8’e göre reaksiyon hazırlandı ve 7-8 kere pipetaj yaparak karıştırıldıktan sonra çok kısa santrifuj edildi. Tablo 3.9’daki thermalcycler programı kuruldu ve reaksiyon başlatıldı.

**Tablo 3.8:** Universal PCR protokolü.

	<b>Taze doku - cfDNA</b>
<b>Zenginleştirilmiş ürün</b>	13,4 µl
<b>UPCR Buffer</b>	4 µl
<b>HotStar Taq DNA Pol.</b>	1 µl
<b>IL-S5 Index Primer</b>	1,6 µl
<b>TOTAL</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 3.9:** Universal PCR programı.

<b>95°C</b>	13 dk		
<b>98°C</b>	2 dk		
	<b>98°C</b>	15 sn	<b>Taze doku – 21 siklus cfDNA – 23 siklus</b>
	<b>60°C</b>	2 dk	
<b>72°C</b>	5 dk		
<b>4°C</b>	5 dk		
<b>4°C</b>	∞		

### 3.2.5.2.8 Universal PCR’ın QIaseq Boncuklarla Temizlenmesi

Plate’e PCR ürünlerinin tamamı aktarıldı (20 µl). Taze doku örneklerine 80 µl, cfDNA örneklerine 70 µl nukleaz free su eklendi.

Taze doku örneklerinin üzerine 100 µl, cfDNA örneklerine 108 µl QIAseq Beads eklendi, bir kaç defa pipetaj yaparak iyice karıştırıldı.

Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Plate manyetik rack üzerine alındı ve 10 dakika boncukların süpernetanttan ayrılması beklendi. Solüsyon berrak gözüktükten sonra, dikkatlice süpernetant uzaklaştırıldı.

Plate hala manyetik rack üzerindeyken 200µl taze hazırlanmış %80 ethanol eklendi. Plate’i hareket ettirerek boncuklar yıkandı. Dikkatli bir şekilde süpernetant uzaklaştırıldı.

Bir önceki aşama tekrarlandı. Bu aşamada ethanol’ün tamamen uzaklaşması gerekmektedir. Bunun için önce 200 µl lik pipetle sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, geri kalan da 10 µl’luk pipetle uzaklaştırıldı.

Boncukların manyetik rack üzerinde 10 dakika iyice kuruması beklendi.

10 dakika sonunda plate manyetik rack üzerinden alındı ve DNA hedef boncukları 30 µl nukleaz free su ile elue edildi. İyice pipetaj yapıldı. Ve solüsyon berraklaşınca kadar tekrar manyetik rack üzerine alındı.

20 µl süpernatant temiz bir 0,2’lik PCR tüpüne aktarıldı.

### 3.2.6 Real-time PCR ile kütüphane kantitasyonu

Qiaseq Library Quant system kullanarak kütüphane ürünlerimizin, sekans için doğru dilüsyon oranını hesapladık.

ILMN DNA standartı Tablo 3.10’da görüldüğü gibi 5 seri dilüsyon şeklinde seyreltildi.

**Tablo 3.10:** ILMN DNA standartı dilüsyon aşamaları.

Standart	Illumina DNA Standart	Dilüsyon buffer
<b>Std1</b>	5 µl stok DNA	45 µl
<b>Std2</b>	5 µl Std1	45 µl
<b>Std3</b>	5 µl Std2	45 µl
<b>Std4</b>	5 µl Std3	45 µl
<b>Std5</b>	5 µl Std4	45 µl

Örnekler için Tablo 3.11’de gösterildiği gibi 3 dilüsyon hazırlandı. Birinci dilüsyonun amacı 2. ve 3. dilüsyonlar için örnekleri hazırlamaktır, RotorGene’de ölçülmeyecektir.

**Tablo 3.11:** Örneklerin dilüsyon aşamaları.

Dilüsyon	Kütüphane	Dilüsyon buffer
<b>Dilüsyon 1 (1:50)</b>	1 µl	49 µl
<b>Dilüsyon 2 (1:5000)</b>	1 µl (1:50)	99 µl
<b>Dilüsyon 3 (1:50.000)</b>	4 µl (1:5000)	36 µl

Tablo 3.12’de gösterildiği şekilde PCR miksi hazırlandı ve RotorGene tüplerine dağıtıldı. Her standarttan 3 kopya olacak şekilde hazırlandı, 1 adet negatif kontrol hazırlandı. Her örneğin ise 1:5.000 ve 1:50.000 dilüsyonlarından birer kopya RotorGene tüplerine aktarıldı. RotorGene Real-time cihazında Tablo 3.13’teki şekilde program ayarlandı ve örnekler yerleştirildikten sonra reaksiyon başlatıldı.

**Tablo 3.12:** Real-time PCR protokolü.

<b>Su</b>	6,7 µl
<b>SYBR</b>	10 µl
<b>Primer</b>	0,8 µl
<b>Sulandırılmış örnekler / Standard</b>	2,5 µl
<b>TOTAL</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 3.13:** Real-time PCR programı.

<b>95°C</b>	10 dk		
	<b>95°C</b>	15 sn	30 siklus
	<b>60°C</b>	30 sn	
	<b>72°C</b>	2 dk	

Reaksiyon bitiminde örneklerin ct değerleri alındı ve “Illumina Data Analiz Programı \_ 72lik rotor disk” excel tablosuna yerleştirildi. Excel tablosunun “Result” kısmında her örnek için pM cinsinden molar konsantrasyonları elde edildi (Bu konsantrasyon değerlerini nM’a çevirmek için pM değerlerinin 1000’e bölünmesi gerekmektedir). Bu aşamadan sonra kullanılacak cihaza ve kartuşa göre örnekleri gerekli dilüsyonlara getirme aşamasına ve havuz yapımına geçildi.

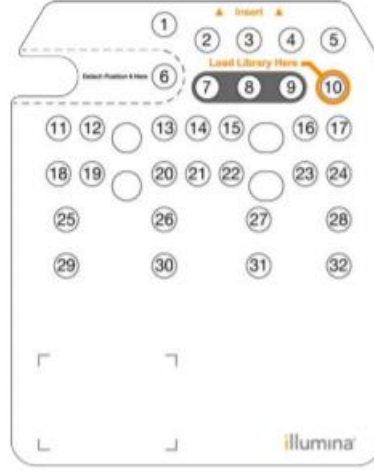
### 3.2.7 Kütüphane ürünlerinin dilüsyonu ve megahavuz oluşturma

Örnekler önce 50 nM (10 µl), daha sonra 4 nM (20 µl) olacak şekilde iki aşamalı olarak dilüe edildi. Örnekler eşit miktarda tek bir tüpte birleştirilerek megahavuz oluşturuldu.

### 3.2.8 Kartuş yükleme ve yeni nesil dizileme

- 0,2 M taze NaOH hazırlandı (20 µl 1N NaOH + 80 µl d-H<sub>2</sub>O). 5 µl megahavuz ve 5 µl 0,2 M NaOH birleştirildi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- 5 dk sonunda miksin üzerine 5 µl Tris-Hcl (pH 7.0, 200mM) ilave edildi.
- 1,5 ml ependorfa 985 µl HT1 ve 15 µl’ye ulaşan megahavuz eklendi ve 20 pM kütüphane solüsyonu elde edildi.

- 20 pM kütüphane solüsyonunu Mid Output Kartuşa yükleyebilmek için 1,5 pM konsantrasyonu olacak şekilde dilüe edildi. Bunun için 1,5 ml ephendorfa 1203 µl HT1 içerisine, bir önceki aşamada HT1 ile dilue edilen megahavuzdan 97 µl eklendi ve tamamı kartuşun 10 numaralı kısmına aktarıldı.
- 2 ml ephendorfa 1994 µl HT1 ve 6 µl QIAseq Read 1 Primer eklendi eklendi ve tamamı Şekil 3.7’de gösterilen kartuşun 7 numaralı kısmına aktarıldı.



**Şekil 3.7:** Mid Output Kartuş.

- Nextseq 500/550 Dx cihazında Local Run Manager’da aşağıdaki parametreler seçilerek çalışma kaydı oluşturuldu.

o Library Prep : Nextera XT V2

o Read Type : Paired End

o Index Read : 2

o Custom Primers : Read 1

o Okuma uzunluğu: 2x150 bp

o Hasta kodları ve indexler girildi

- Illumina Nextseq programında Experiment kısmında, Local Run Manager’dan oluşturulan çalışma kaydı seçildi ve malzemeler yerleştirildikten sonra sekanslama işlemi başlatıldı.

### **3.2.9 Biyoinformatik iş akışı**

26 saat süren sekanslama işlemi sonrasında, her örneğin FASTQ dosyaları QCI Analyze kullanılarak ikincil analizi gerçekleştirildi. QCI Analyze okuma kalite kontrol miktarlarını ve saptanan varyantları içeren VCF, Excel ve PDF olarak dışa aktarılabilen bir rapor oluşturur.

Varyant tespiti için QCI Analyze yeniden sekanslama analizi iş akışı aşağıdaki adımları kapsar:

-Kalite Kontrol iş akışı, sekans datalarının ve analiz sonuçlarının kalitesini değerlendirmek için önceden tanımlanmış bir eşik kümesi kullanır. Aynı biyolojik fragmandan kaynaklanan özdeş UMI'lere sahip okumalar, tek bir UMI okumasında birleştirilir ve sonraki analizlerin PCR duplikasyonu ve dizileme yanlılığı tarafından ortaya çıkan artefaktan arındırılmasına olanak tanır.

- Girdi okumaları referans genoma hizalanır ve ilk hizalama, eşlenen okumaların hizalanmamış uçlarında tespit edilen insersiyon, delesyon ve değişimlere göre ayarlanır.

- Okumalardaki primer bölgeleri, sonraki analizlerde, aşağı yönlü varyant tespitini etkilememesi için değerlendirmeden çıkarılır.

- Düşük Frekans Varyant Tespiti (The Low Frequency Variant Detection) aracı, hedef bölgelerde bulunan varyantları algılar.

- Bunlar daha sonra önceden tanımlanmış parametrelere göre sıralanır: örneğin, bir eşik değer aralığının (minimum frekans veya minimum ortalama kalite gibi) altındaki değişkenler yanlış pozitif olarak kabul edilir ve sonuçlardan çıkarılır. Ayrıntılı iş akışı parametreleri Tablo 3.14 ve Tablo 3.15'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.14:** Biyoinformatik iş akışında değiştirilebilen parametreler.

Quality control criteria	
Base positions in regions of interest with significant coverage (%)	90
Base positions in regions of interest with minimum coverage (%)	95
Average quality threshold	30
Reads with average quality $\geq$ threshold (%)	80
Variants: reported variants	
Significant UMI coverage threshold	400
SNV/MNV frequency threshold (%)	0.50
Insertions, deletions and replacements frequency threshold (%)	0.50
Variant quality (Qual) filter	50.00
Average base quality (Avg Q) filter	35.00
F/R test filter	1.00E-5
Variants: variants available for review	
Minimum UMI coverage threshold	200
SNV/MNV frequency threshold (%)	0.50
Insertions, deletions and replacements frequency threshold (%)	0.50
Detect variants outside regions of interest	No
Variant quality (Qual) filter	50.00
Average base quality (Avg Q) filter	35.00
F/R test filter	1.00E-5
Report post-filtered variants	false

**Tablo 3.15:** Biyoinformatik iş akışında değiştirilemeyen parametreler.

Remove and Annotate with Unique Molecular Index	
Unique molecular indexed read	Read 2
Number of bases to remove	23
Start position of unique molecular index	0
Length of unique molecular index	12
Common sequence verification	false
Common sequence	Not set
Allowed errors in common sequence	1
Allowed margin in common sequence location	3
Trim read-through common sequence and UMI	true
Part of insert to search for	27
Part of common sequence and UMI to search for	3
Number of errors allowed in match	3
Universal PCR Adapter trimming	
Quality trim	true
Quality limit	0.05
Ambiguous trim	true
Ambiguous limit	2
Trim adapter list	QIAseq DNA trim adapter list ILM
Automatic read-through adapter trimming	true
Remove 5' terminal nucleotides	false
Number of 5' terminal nucleotides	1
Remove 3' terminal nucleotides	false
Number of 3' terminal nucleotides	1
Discard short reads	false
Minimum number of nucleotides in reads	15
Discard long reads	false
Maximum number of nucleotides in reads	1000

**Tablo 3.15 (devam):** Biyoinformatik iş akışında değiştirilemeyen parametreler.

<b>Map Reads to Reference</b>	
References	Homo_sapiens_sequence_hg19
Masking mode	No masking
Masking track	Not set
Match score	1
Mismatch cost	2
Cost of insertions and deletions	Affine gap cost
Insertion cost	3
Deletion cost	3
Insertion open cost	6
Insertion extend cost	1
Deletion open cost	6
Deletion extend cost	1
Length fraction	0.5
Similarity fraction	0.8
Global alignment	false
Auto-detect paired distances	false
Non-specific match handling	Map randomly
<b>Calculate Unique Molecular Index Groups</b>	
Fuzzy match Unique Molecular Indices	Allow one mismatch/deletion/insertion
Exclude ambiguously mapped reads	false
Maximum relative size difference between merged groups	0.1
Always merge singleton groups	true
<b>Remove Ligation Artifacts</b>	
Remove ligation artifacts	true
Minimum mismatches	2
Ligation artifact recognition length	15
Allow mismatch	true
Remove entire Unique Molecular Index	true
Single reads	false
Paired reads	false
Unique Molecular Indexed read	Read 2
Common sequences	ATTGGAGTCCT
Minimum mismatch percentage	50.0
Full length common sequence search limit	23
Minimal partial common sequence length	4
Allow mismatch	true
<b>InDels and Structural Variants</b>	
P-Value threshold	1.0E-4
Maximum number of mismatches	3
Minimum quality score	20
Minimum relative consensus coverage	0.5
Filter variants	false
Minimum number of reads	2
Ignore broken pairs	true
Restrict calling to target regions	CDHS-32416Z-3007_targets_200326_ver1.0
<b>Local Realignment</b>	
Realign unaligned ends	true
Multi-pass realignment	2
Maximum guidance-variant length	200
Force realignment to guidance-variants	false

**Tablo 3.15 (devam):** Biyoinformatik iş akışında değiştirilemeyen parametreler.

Trim Primers of Mapped Reads (QCIA)	
Primer annotation track	CDHS-32416Z-3007_primers_200326_ver1.0
Additional bases to unalign	0
Maximum additional nucleotides	3
Minimum primer overlap fraction	0.7
Remove reads without primer	true
Mispriming events	CDHS-32416Z-3007_mispriming_events_200325_ver1.0
Minimum primer sequence similarity	0.95
Minimum primer overlap fraction (paired end reads)	0.95
Gene-pseudogene track	CDHS-32416Z-3007_gene_pseudogene_200326_ver1.0
Remove short reads with mismatches	true
Remove short reads cutoff threshold	20
Create UMI Reads	
Minimum group size	1
Minimum supporting consensus fraction	0.5
How to handle non-consensus bases in merged reads	Remove
Minimum UMI read length	20
Minimum average quality score	20.0
Maximum percentage of mismatches in UMI read	50.0
Low Frequency Variant Detection	
Required significance (%)	1.0
Ignore positions with coverage above	100000
Restrict calling to target regions	CDHS-32416Z-3007_targets_200326_ver1.0
Ignore broken pairs	true
Ignore non-specific matches	Reads
Minimum read length	20
Minimum coverage	Parameter editable by administrator
Minimum count	2
Minimum frequency (%)	Parameter editable by administrator
Base quality filter	false
Neighborhood radius	5
Minimum central quality	20
Minimum neighborhood quality	15
Read direction filter	false
Direction frequency (%)	5.0
Relative read direction filter	false
Significance (%)	1.0
Read position filter	false
Significance (%)	1.0
Remove pyro-error variants	false
In homopolymer regions with minimum length	3
With frequency below	0.8
Annotate Variants with Unique Molecular Index Info	
Mapping consists of	UMI reads
Minimum size of a Big Unique Molecular Index	2
Minimum consensus % of a Consistent Unique Molecular Index	75
Ignore broken pairs	true
Ignore non-specific matches	true

### 3.2.10 Analiz

QCI Interpret YND iş akışının son adımındır. YND verilerini değerlendiren laboratuvarlar için özel olarak tasarlanmış web tabanlı bir yazılım uygulamasıdır. QCI Interpret, yorumlamayı ve raporlamayı desteklemek için ASCO, ACMG, CAP ve AMP gibi profesyonel kılavuzları, varyantların sınıflandırılması için kullanır.

Örneklerin varyant (VCF) dosyaları yüklendi ve çalıştırmak istediğimiz test türü (somatik) seçilerek analize başlandı. Taze doku ve likit biyopsi örnekleri karşılaştırıldı, sadece taze dokuda bulunup likit biyopside saptanamayan varyantlar incelendi. Saptanan varyantlar IGV programında kontrol edildi.

Varyant analizleri ve literatür taramaları için VarSome veritabanı, ClinVar, COSMIC, dbSNP kullanıldı.



## **4. BULGULAR**

### **4.1 Qubit ölçümleri ve kullanılan indexler**

Qubit ile ölçülen örneklerin ng değerleri Tablo...’de verilmiştir. Likit biyopsi örnekleri protokole uygun şekilde sulandırılmadan direk kullanılmıştır (Her DNA’dan reaksiyona 16,75 µl koyulmuştur). Taze doku örnekleri 10 ng olacak şekilde sulandırıldıktan sonra reaksiyona 50 ng ile başlanmıştır (Her DNA’dan 5 µl).

Çalışma sırasında örnekler arasında index1 ve index2 kombinasyonlarının farklı olmasına dikkat edilmiştir (Tablo 4.1). Böylelikle her örnek cihazda doğru şekilde dizilenmiştir.

**Tablo 4.1:** Örneklerin Qubit ölçüm sonuçları ve kullanılan index çiftleri.

Örnek	Qubit ölçümü (ng)	Index 1	Index 2
GBM-Doku-1	69,4	N701	S502
GBM-Likit-1	0,6	N702	S502
GBM-Doku-2	55	N703	S502
GBM-Likit-2	0,65	N704	S502
GBM-Doku-3	87	N705	S502
GBM-Likit-3	2,12	N706	S502
GBM-Doku-4	49,4	N707	S502
GBM-Likit-4	0,9	N710	S502
GBM-Doku-5	32,8	N711	S502
GBM-Likit-5	1,65	N712	S502
GBM-Doku-6	45,3	N714	S502
GBM-Likit-6	1,34	N715	S502
GBM-Doku-7	41,8	N701	S503
GBM-Likit-7	1,62	N702	S503
GBM-Doku-8	74,8	N703	S503
GBM-Likit-8	0,7	N704	S503
GBM-Doku-9	40,5	N705	S503
GBM-Likit-9	1,39	N706	S503
GBM-Doku-10	46,1	N707	S503
GBM-Likit-10	0,5	N710	S503
KONTROL-Likit-1	1,46	N711	S503
KONTROL-Likit-2	0,8	N712	S503
KONTROL-Likit-3	2,2	N714	S503

#### 4.2 Real-time PCR ile kütüphane kantitasyonu

Yapılan real-time PCR çalışması sonucunda örneklerimizin ct değerleri, konsantrasyon nM değerleri Tablo 4.2’deki gibidir.

**Tablo 4.2:** Örneklerin real-time kantitasyon sonuçları.

Örnek adı	C <sub>T</sub>	Konsantrasyon nM
-----------	----------------	------------------

GBM-1-Doku	9	61
GBM-1-Likit	9,2	63
GBM-2- Doku	8,75	72
GBM-2-Likit	9,77	36
GBM-3- Doku	8,65	105
GBM-3-Likit	9,21	68
GBM-4- Doku	8,6	111
GBM-4-Likit	7,33	226
GBM-5- Doku	8,65	107
GBM-5-Likit	7,38	239
GBM-6- Doku	8,5	119
GBM-6-Likit	7,73	216
GBM-7- Doku	9,28	66
GBM-7-Likit	8,42	127
GBM-8- Doku	8,82	69
GBM-8-Likit	8,43	97
GBM-9- Doku	9,73	51
GBM-9-Likit	8,16	124
GBM-10- Doku	10,06	40
GBM-10-Likit	8,83	102
KONTROL-LİKİT-1	7,67	189
KONTROL-LİKİT-2	8,05	139
KONTROL-LİKİT-3	7,82	174

### 4.3 Normalizasyon

Örnekler sekanslama için son konsantrasyonları 4nM olacak şekilde Tablo 4.3' te gösterilen şekilde sulandırıldı. Konsantrasyonu 50nM üzerinde olan örnekler önce 50nM sonra 4nM olacak şekilde sulandırıldı. Konsantrasyonu 50nM altında olan örnekler direk 4nM olacak şekilde sulandırıldı.

**Tablo 4.3:** Örneklerin 4nM'e normalize edilmesi.

ÖRNEK	Konsantrasyon nM	50nM(10ul)		4nM (20ul)	
		Ornek (ul)	Su (ul)	Ornek (ul)	Su (ul)
GBM-1-Doku	61	8,20	1,80	1,6	18,4
GBM-1-Likit	63	7,94	2,06	1,6	18,4
GBM-2- Doku	72	6,94	3,06	1,6	18,4
GBM-2-Likit	36	–	–	2,222222	17,77778
GBM-3- Doku	105	4,76	5,24	1,6	18,4
GBM-3-Likit	68	7,35	2,65	1,6	18,4
GBM-4- Doku	111	4,50	5,50	1,6	18,4
GBM-4-Likit	226	2,21	7,79	1,6	18,4
GBM-5- Doku	107	4,67	5,33	1,6	18,4
GBM-5-Likit	239	2,09	7,91	1,6	18,4
GBM-6- Doku	119	4,20	5,80	1,6	18,4
GBM-6-Likit	216	2,31	7,69	1,6	18,4
GBM-7- Doku	66	7,58	2,42	1,6	18,4
GBM-7-Likit	127	3,94	6,06	1,6	18,4
GBM-8- Doku	69	7,25	2,75	1,6	18,4
GBM-8-Likit	97	5,15	4,85	1,6	18,4
GBM-9- Doku	51	9,80	0,20	1,6	18,4
GBM-9-Likit	124	4,03	5,97	1,6	18,4
GBM-10- Doku	40	–	–	2	18
GBM-10-Likit	102	4,90	5,10	1,6	18,4
KONTROL-LİKİT-1	189	2,65	7,35	1,6	18,4
KONTROL-LİKİT-2	139	3,60	6,40	1,6	18,4
KONTROL-LİKİT-3	174	2,87	7,13	1,6	18,4

#### 4.4 Yeni nesil dizileme ve run özet verileri

QIAseq Targeted DNA Custom Panel kiti kullanılarak oluşturulan kütüphane NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles) kartuş ve flowcell kullanılarak Illumina Nextseq 500/550 Dx cihazına yüklenmiştir. Yeni nesil dizileme run özeti olarak çalışma kalitesini değerlendirebileceğimiz başlıca parametreler; okuma derinliği (read depth), küme yoğunluğu (cluster density), Q30 kalite skoru (Q30 score), CPU (Cluster passing filter) ve elde edilen veri (estimated yield)'dir. Tablo 4.4'de adı geçen parametreleri içeren run özeti verilmiştir.

**Tablo 4.4:** Yeni nesil dizileme run özeti.

Parametre adı	Parametre değeri
Küme yoğunluğu (cluster density)	174 K/mm <sup>2</sup>
Q30 kalite skoru (Q30 score)	%80.1
%PF (Cluster passing filter)	%93.3

#### 4.5 UMI bağlanma verileri, ortalama kalite okumaları ve frekans dağılımları

QCI Analyze'a hastaların FASTQ dosyaları yüklendikten sonra, her örnek için ön değerlendirme yapıldı. Bütün örneklerin ortalama kalite okumaları önerildiği gibi %80'in üzerindeydi. UMI kapsamı  $\geq 400x$  ve  $\geq 200x$  kriterlerinde önerilen yüzdelere altında kalan 3 örnek vardı; GBM-1-Likit, GBM-2-Likit ve GBM-10-Likit. Bu üç örneğin dışında bütün örneklerin ön değerlendirmeden başarı ile geçtiği görüldü. Örneklerin ortalama kalite okumaları ve UMI kapsama yüzdeleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

**Tablo 4.5:** Örneklerin ortalama kalite okumaları ve UMI kapsama yüzdeleri.

ÖRNEK	Ortalama kalite okumaları $\geq 30$	UMI kapsamı $\geq 400x$ olan ilgili bölgelerdeki baz pozisyonları	UMI kapsamı $\geq 200x$ olan ilgili bölgelerdeki baz pozisyonları
GBM-1-Doku	%90.70	%93.56	%98.81
GBM-1-Likit	%90.65	%2.85	%87.86
GBM-2- Doku	%90.40	%97.98	%98.63
GBM-2-Likit	%90.80	%39.01	%94.84
GBM-3- Doku	%93.89	%98.30	%99.67
GBM-3-Likit	%94	%93.58	%99.43
GBM-4- Doku	%84.06	%99.60	%99.86
GBM-4-Likit	%91.71	%91.28	%99.34
GBM-5- Doku	%84.62	%99.28	%99.83
GBM-5-Likit	%88.86	%93.81	%99.34
GBM-6- Doku	%84.93	%98.58	%98.72
GBM-6-Likit	%86.89	%95.79	%98.26
GBM-7- Doku	%85.48	%99.78	%99.92
GBM-7-Likit	%86.68	%98.98	%99.78
GBM-8- Doku	%87.81	%100	%100
GBM-8-Likit	%89.31	%99.69	%100
GBM-9- Doku	%90.60	%98.35	%98.69
GBM-9-Likit	%89.89	%98.36	%98.71
GBM-10- Doku	%89.85	%97.69	%98.73
GBM-10-Likit	%87.13	%1.02	%77.92
GBM-Likit-Kontrol-1	%90.00	%96.95	%98.57
GBM-Likit-Kontrol-2	%88.78	%98.64	%99.73
GBM-Likit-Kontrol-3	%89.68	%94.48	%99.59

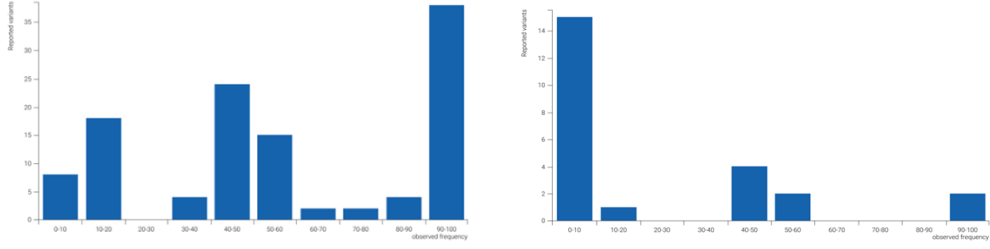
“Ortalama kalite okumaları  $\geq 30$ ” için önerilen :  $\geq\%80$

“UMI kapsamı  $\geq 400x$  olan ilgili bölgelerdeki baz pozisyonları” için önerilen :  $\geq\%90$

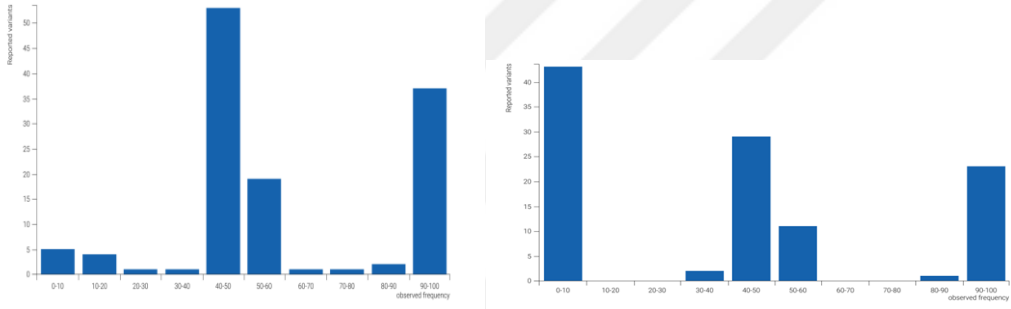
“UMI kapsamı  $\geq 200x$  olan ilgili bölgelerdeki baz pozisyonları” için önerilen :  $\geq\%95$

Doku ve likit biyopsi örneklerinin frekans dağılımlarına bakıldığında, doku örneklerinin tümör yüzdesi bilinmediği için frekans dağılımlarının değişken olduğu görülmüştür. Likit biyopsi örneklerinde ise homozigot ve heterozigot varyant

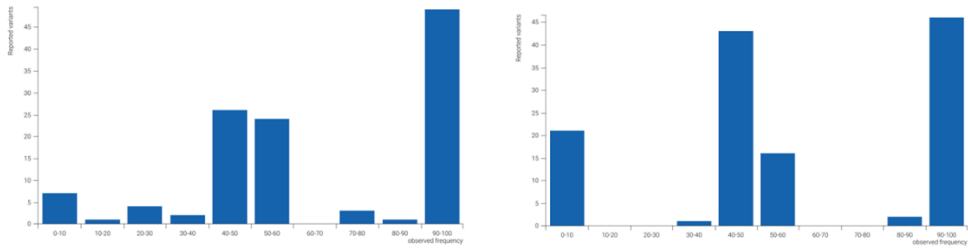
frekanslarının daha net aralıklarda saptandığı gözlenmiştir. Frekans dağılımını gösteren şekillerde soldaki grafik doku örneklerini, sağdaki grafik likit biyopsi örneklerini göstermektedir. Örneklerin frekans dağılım değerleri Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



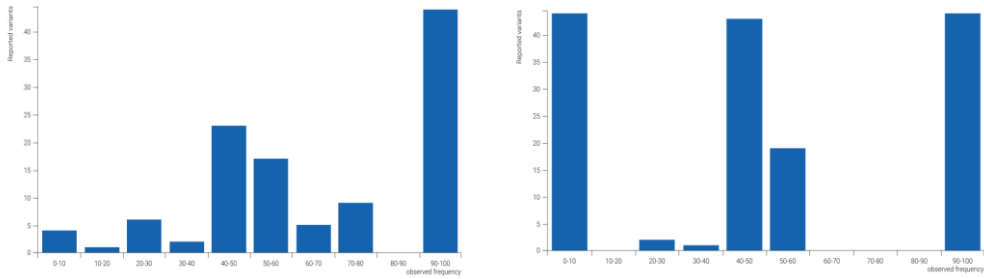
**Şekil 4.1:** GBM-1 frekans dağılımı



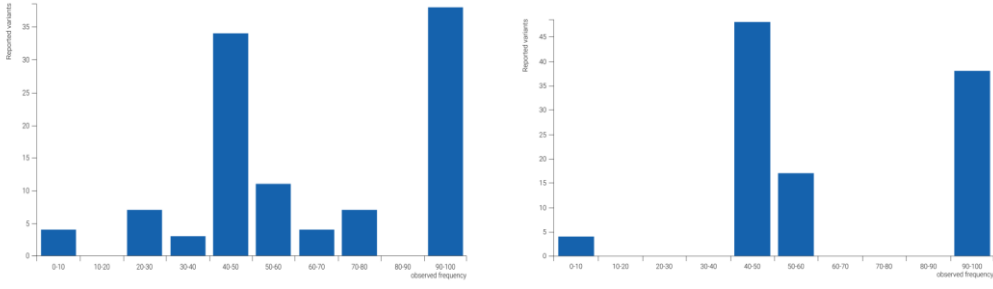
**Şekil 4.2:** GBM-2 frekans dağılımı



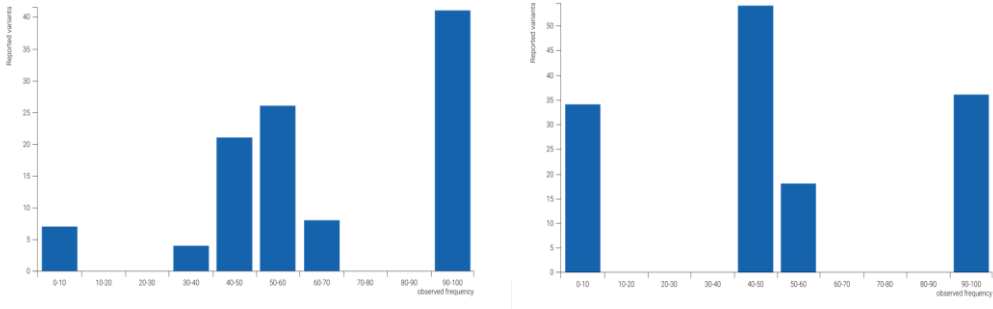
**Şekil 4.3:** GBM-3 frekans dağılımı



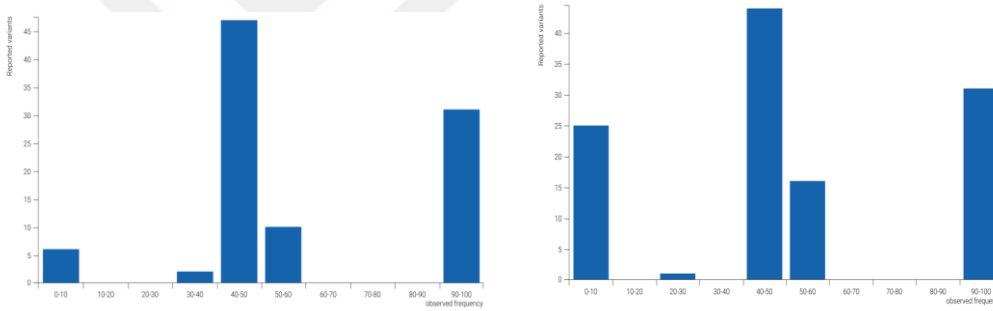
**Şekil 4.4:** GBM-4 frekans dağılımı



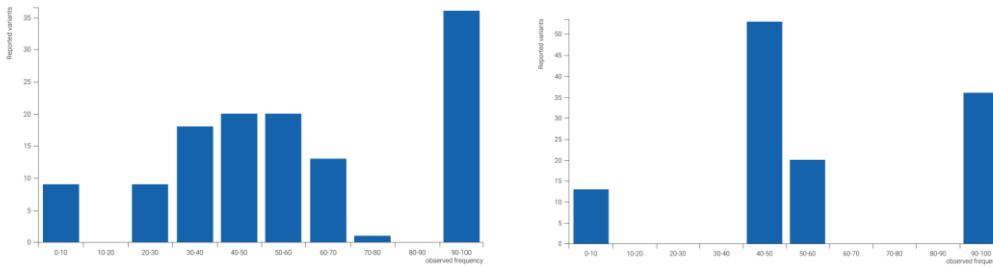
Şekil 4.5: GBM-5 frekans dağılımı



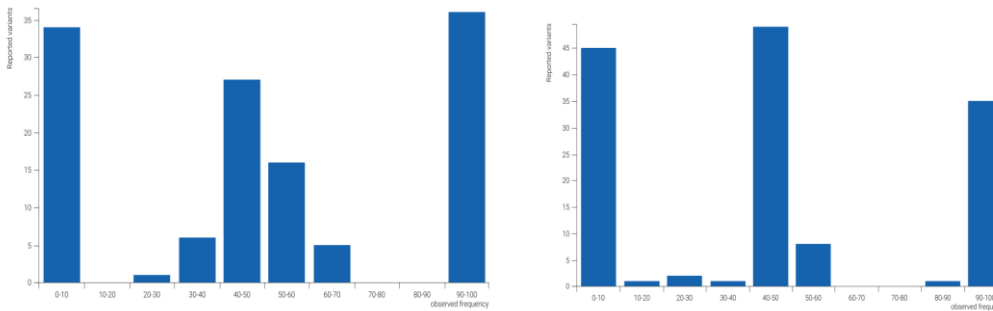
Şekil 4.6: GBM-6 frekans dağılımı



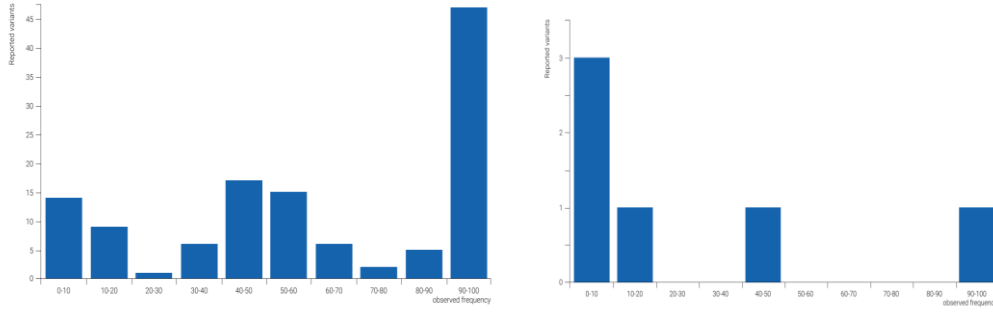
Şekil 4.7: GBM-7 frekans dağılımı



Şekil 4.8: GBM-8 frekans dağılımı



Şekil 4.9: GBM-9 frekans dağılımı



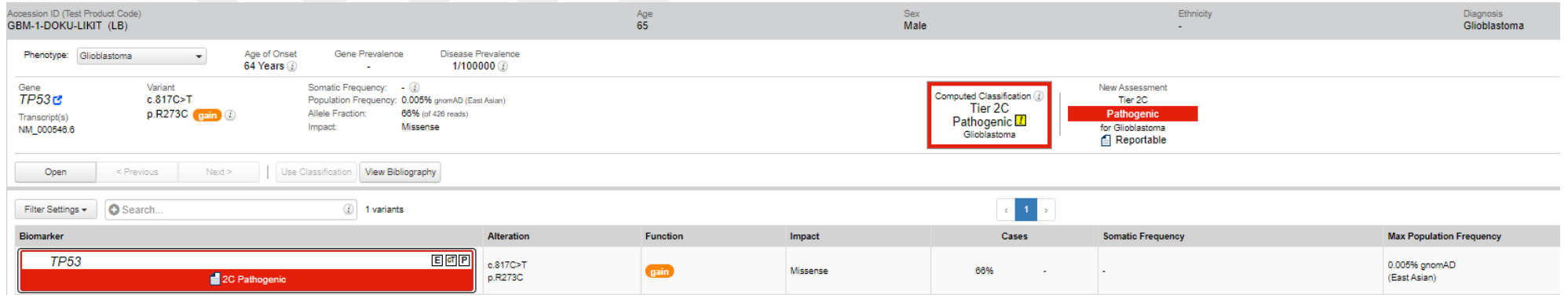
**Şekil 4.10:** GBM-10 frekans dağılımı

QCI Analyze’da örneklerin VCF, Excel ve PDF’leri indirilerek ayrı ayrı klasörlendi ve saptanan varyantların analizi aşaması geçildi.

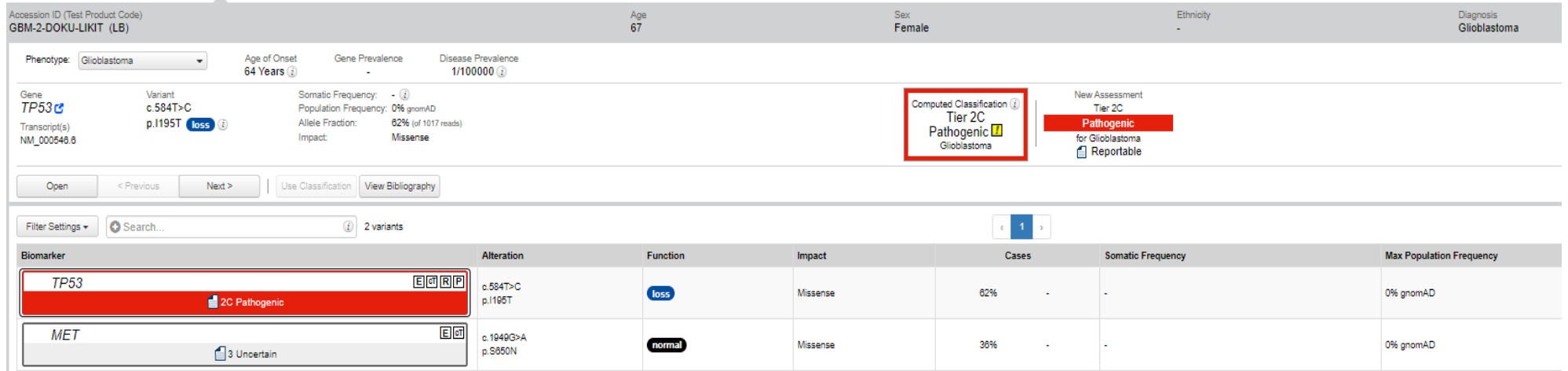
#### **4.6 Moleküler analiz**

QCI Interpret’e örneklerin VCF dosyaları kullanılan panel seçilerek somatik analiz edilmek üzere yüklendi. Her hastanın doku ve likit biyopsi örnekleri birlikte yüklenerek analiz kolaylığı sağlandı. Saptanan varyantların QCI Interpret görüntüleri sırayla gösterilmiştir. Cases kısmında soldaki kısım dokudaki, sağdaki kısım likit biyopsideki frekans %’sini göstermektedir. Eğer varyant saptanmadıysa “-” işareti ile gösterilmektedir. Mutasyon saptanan örneklerin QCI Interpret görüntüleri Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de gösterilmiştir. Mutasyon saptanan örneklerin IGV görüntüleri Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27’de gösterilmiştir. Likit biyopsi örneklerinin germline varyantlarını temsili açısından örnek oluşturması için GBM-3 ve GBM-6 örneklerinde seçilen bazı polimorfizmlerin görüntüleri de Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30’da gösterilmiştir. Yapılan analiz sonrasında saptanan varyantlar ile ilgili bilgiler özet olarak Tablo 4.6’da listelenmiştir. Çalışmada kullanılan hastaların yaş, tanı, evre, radyasyon ve kemoterapi alma durumları ve kanserin nüks etme bilgileri Tablo 4.7’de verilmiştir.

Özellikle CNV analizi yapmamızı sağlayacak olan ve analizi kolaylaştıracak şekilde koşullu biçimlendirme ile renklendirilmiş bütün bölgelerin okuma sayıları, Tablo 4.8’de dokuları, Tablo 4.9’da likit biyopsi örneklerini içerecek şekilde listelenmiştir.



Şekil 4.11: GBM 1 nolu hastada saptanan mutasyonun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü.



Şekil 4.12: GBM 2 nolu hastada saptanan mutasyonların doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü.

Accession ID (Test Product Code)		Age	Sex	Ethnicity	Diagnosis	
GBM-3-DOKU-LIKIT (LB)		59	Male	-	Glioblastoma	
Phenotype:	Glioblastoma	Age of Onset	64 Years	Gene Prevalence	-	
				Disease Prevalence	1/100000	
Gene	Variant	Somatic Frequency:	-	Population Frequency:	0% gnomAD	
<i>PTEN</i>	c.80-1G>C	Allele Fraction:	59% (of 904 reads)	Impact:	Splicing	
Transcript(s)	NM_000314.8					
Open		< Previous		Next >		
Use Classification		View Bibliography				
Filter Settings		Search...		2 variants		
Biomarker	Alteration	Function	Impact	Cases	Somatic Frequency	Max Population Frequency
<i>PTEN</i>	c.80-1G>C	loss	Splicing	59%	-	0% gnomAD
<i>TP53</i>	c.748G>A p.R249K	loss	Missense	52%	-	0% gnomAD

Şekil 4.13: GBM 3 nolu hastada saptanan mutasyonların doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü.

Accession ID (Test Product Code)		Age	Sex	Ethnicity	Diagnosis	
GBM-4-DOKU-LIKIT (LB)		75	Male	-	Glioblastoma	
Phenotype:	Glioblastoma	Age of Onset	64 Years	Gene Prevalence	-	
				Disease Prevalence	1/100000	
Gene	Variant	Somatic Frequency:	-	Population Frequency:	0% gnomAD	
<i>PTEN</i>	c.313T>A p.C105S	Allele Fraction:	45% (of 1008 reads)	Impact:	Missense	
Transcript(s)	NM_000314.8					
Open		< Previous		Next >		
Use Classification		View Bibliography				
Filter Settings		Search...		3 variants		
Biomarker	Alteration	Function	Impact	Cases	Somatic Frequency	Max Population Frequency
<i>PTEN</i>	c.313T>A p.C105S	loss	Missense	45%	-	0% gnomAD
<i>EGFR</i>	c.1787C>T p.P599L	gain	Missense	19%	-	0.008% gnomAD (African)
<i>TP53</i>	c.1031T>C p.L344P	loss	Missense	4.19%	-	0% gnomAD

Şekil 4.14: GBM 4 nolu hastada saptanan mutasyonların doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü.

Accession ID (Test Product Code)  
GBM-6-DOKU-LIKIT (LB)

Age  
69

Sex  
Female

Ethnicity  
-

Diagnosis  
Glioblastoma

Phenotype: Glioblastoma

Age of Onset  
64 Years

Gene Prevalence  
-

Disease Prevalence  
1/100000

Gene  
**TP53**

Variant  
c.451C>T  
p.P151S **gain**

Somatic Frequency: -  
Population Frequency: 0% gnomAD  
Allele Fraction: 92% (of 2021 reads)  
Impact: Missense

Computed Classification  
Tier 2C  
Pathogenic  
Glioblastoma

New Assessment  
Tier 2C  
**Pathogenic**  
for Glioblastoma  
Reportable

Open < Previous Next > Use Classification View Bibliography

Filter Settings Search... 1 variants

Biomarker	Alteration	Function	Impact	Cases	Somatic Frequency	Max Population Frequency
<b>TP53</b> 2C Pathogenic	c.451C>T p.P151S	<b>gain</b>	Missense	92%	-	0% gnomAD

Şekil 4.15: GBM 6 nolu hastada saptanan mutasyonun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü.

Accession ID (Test Product Code)  
GBM-8-DOKU-LIKIT (LB)

Age  
56

Sex  
Male

Ethnicity  
-

Diagnosis  
Glioblastoma

Phenotype: Glioblastoma

Age of Onset  
64 Years

Gene Prevalence  
-

Disease Prevalence  
1/100000

Gene  
**MSH6**

Variant  
c.3261delC  
p.F1088fs\*2 **loss**

Somatic Frequency: -  
Population Frequency: 0.01% gnomAD (Ashkenazi Jewish)  
Allele Fraction: 0.91% (of 2860 reads)  
Impact: Frameshift

Computed Classification  
Tier 2C  
Pathogenic  
Glioblastoma

New Assessment  
Tier 1A  
**Pathogenic**  
for Cancer  
Not Reportable

Open < Previous Next > Use Classification View Bibliography

Filter Settings Search... 3 variants

Biomarker	Alteration	Function	Impact	Cases	Somatic Frequency	Max Population Frequency
<b>PTEN</b> 2C Likely Pathogenic	c.802-1G>A	<b>loss</b>	Splicing	33%	-	0% gnomAD
<b>JAK2</b> 2C Pathogenic	c.1849G>T p.V617F	<b>gain</b>	Missense	2.72% 8.77%	-	0.08% gnomAD (Ashkenazi Jewish)

Şekil 4.16: GBM 8 nolu hastada saptanan mutasyonların doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü.

Accession ID (Test Product Code)  
GBM-10-DOKU-LIKIT (LB)

Age 52 Sex Male Ethnicity - Diagnosis Glioblastoma

Phenotype: Glioblastoma Age of Onset 64 Years Gene Prevalence - Disease Prevalence 1/100000

Gene TP53 Variant c.743G>A Somatic Frequency: - Population Frequency: 0.002% gnomAD (European) Allele Fraction: 75% (of 953 reads) Impact: Missense

Transcript(s) NM\_000546.6

Computed Classification Tier 2C Pathogenic for Glioblastoma

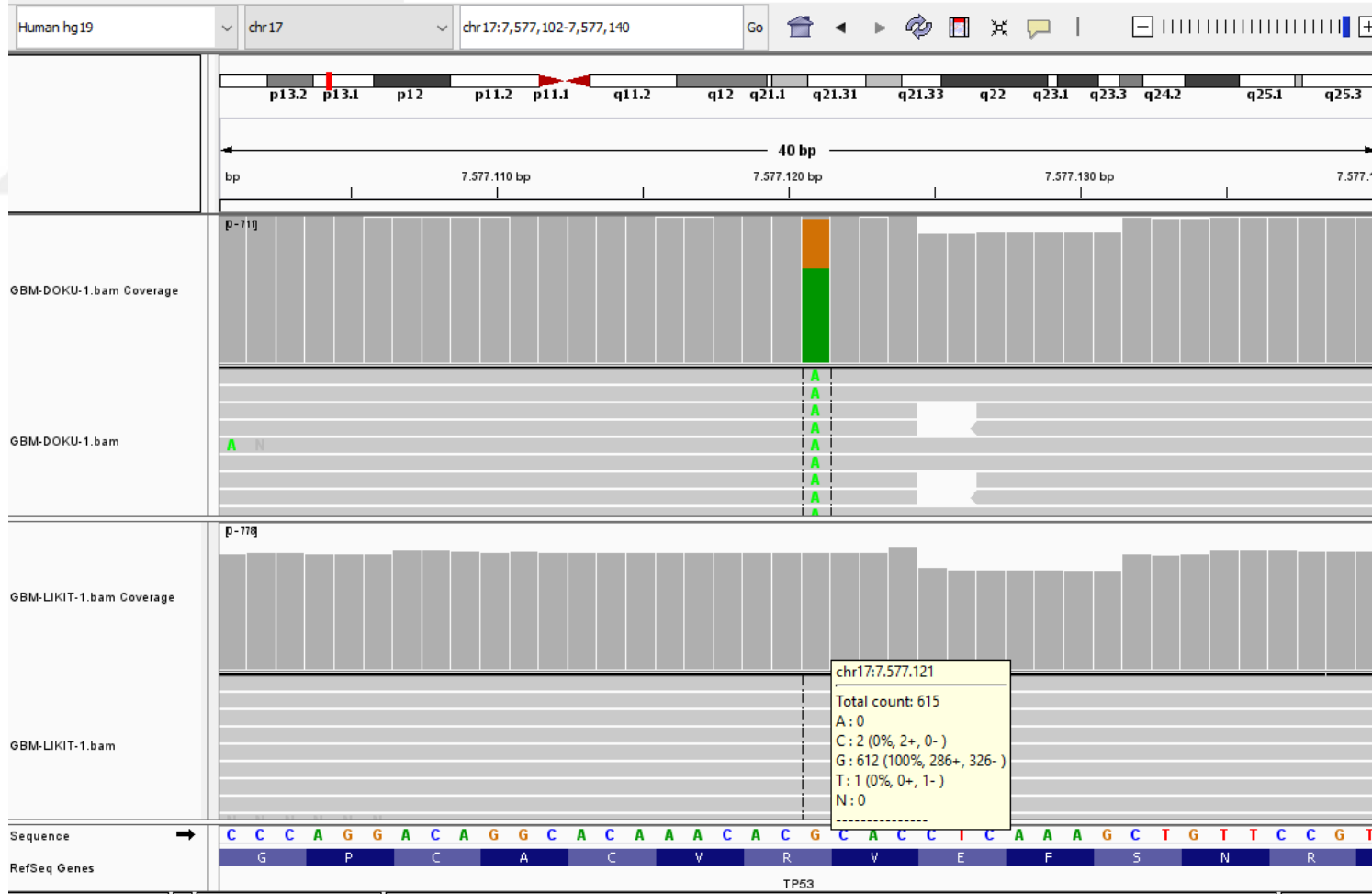
New Assessment Tier 2C Pathogenic for Glioblastoma Reportable

Open < Previous Next > Use Classification View Bibliography

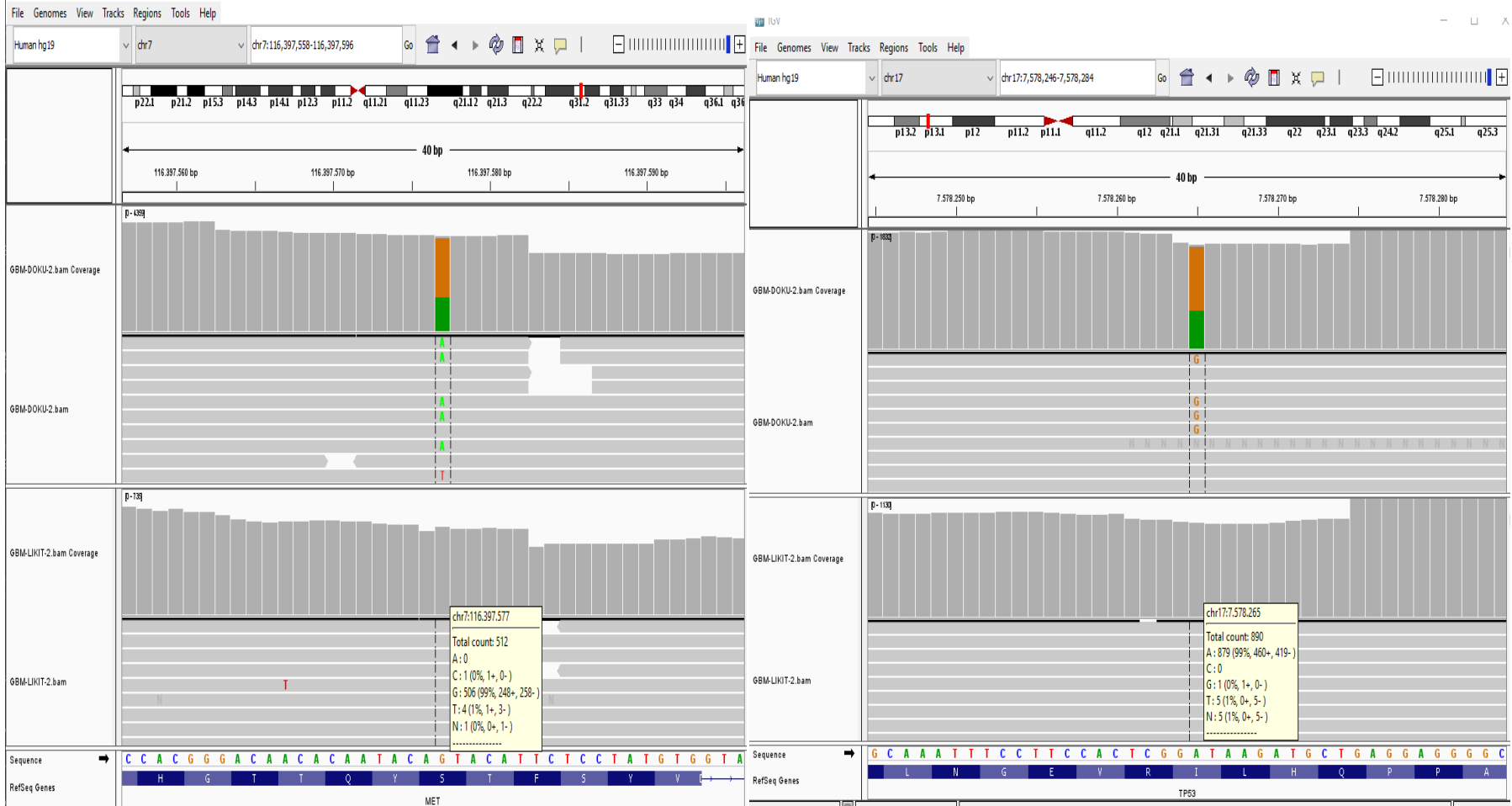
Filter Settings Search... 5 variants

Biomarker	Alteration	Function	Impact	Cases	Somatic Frequency	Max Population Frequency
TP53 2C Pathogenic	c.743G>A p.R248Q	gain	Missense	75% -	-	0.002% gnomAD (European)
PTEN 2C Likely Pathogenic	c.212G>A p.C71Y	loss	Missense	73% -	-	0% gnomAD

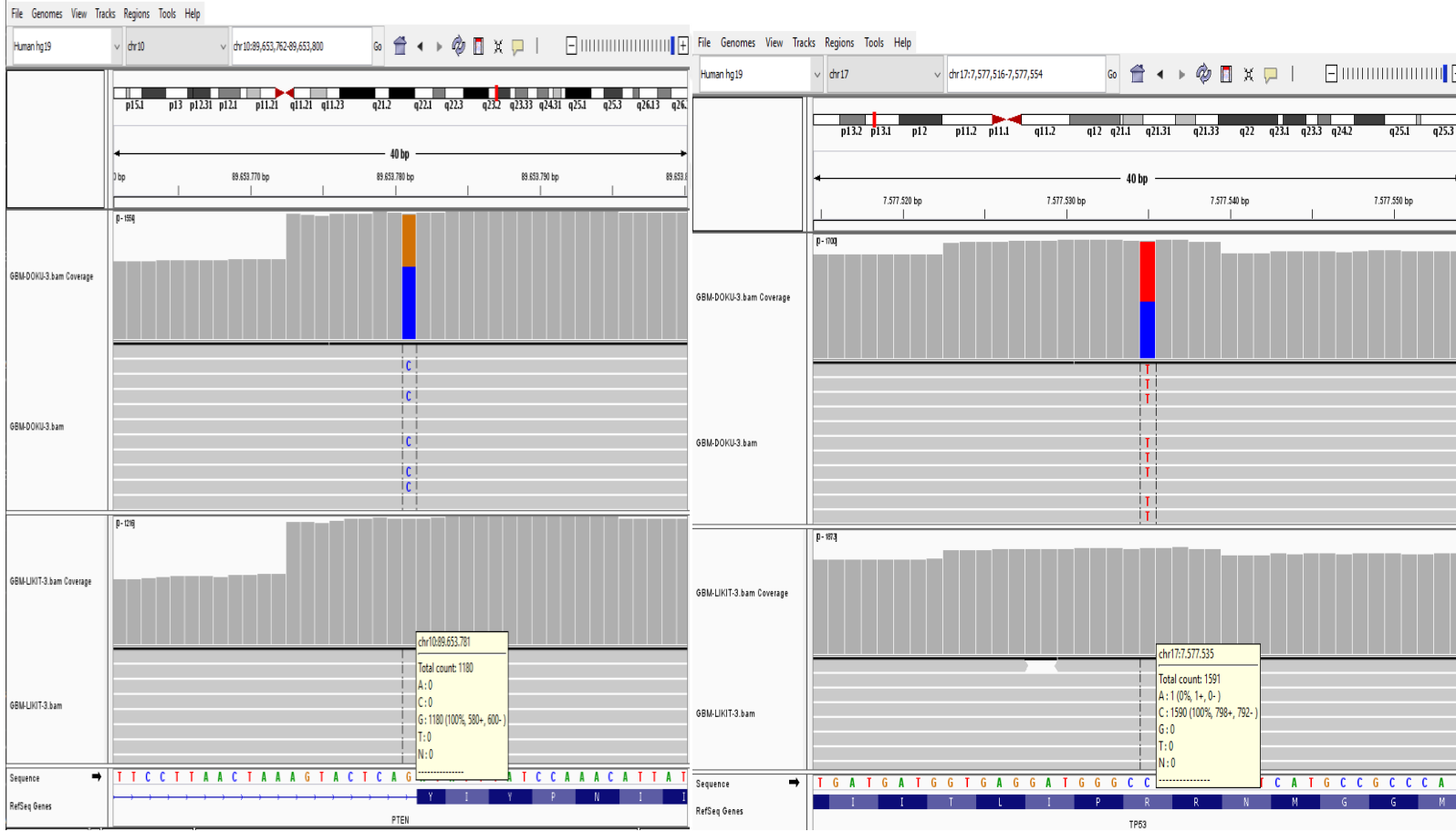
Şekil 4.17: GBM 10 nolu hastada saptanan mutasyonların doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü.



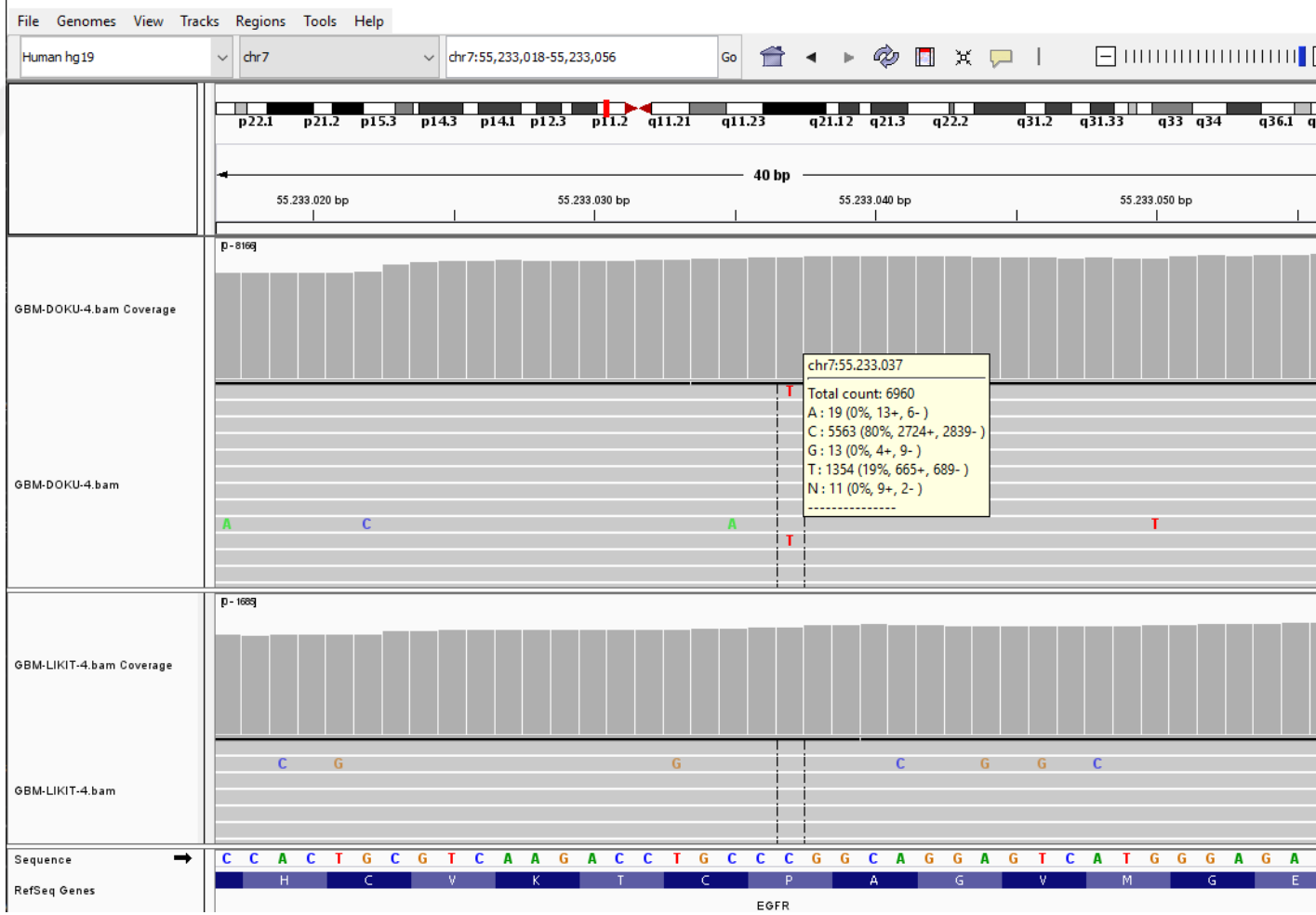
Şekil 4.18: GBM 1 nolu hastada saptanan TP53 c.817C>T mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.



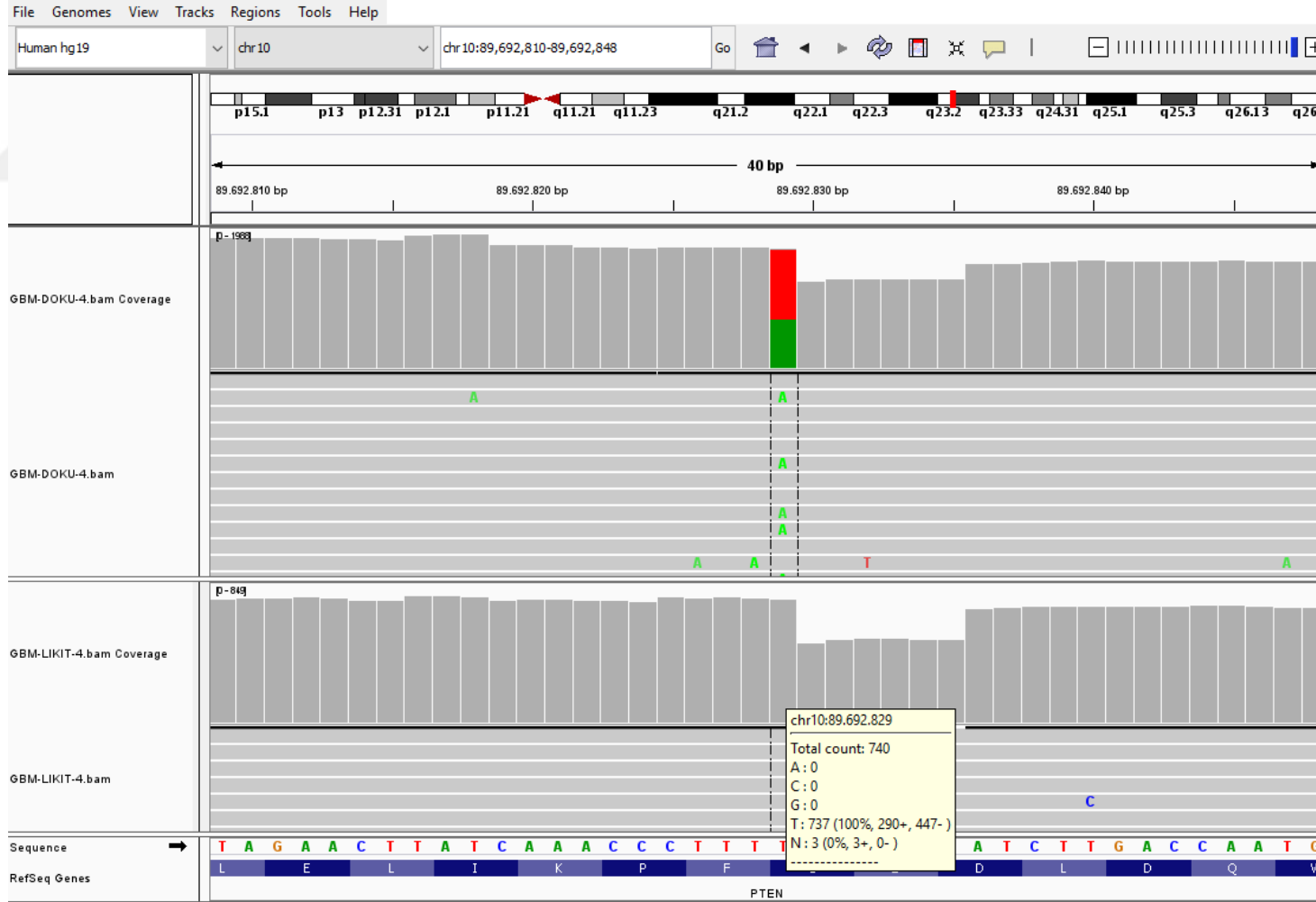
**Şekil 4.19:** GBM 2 nolu hastada saptanan MET c.1949G>A (solda) ve TP53 c.584T>C (sağda) mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.



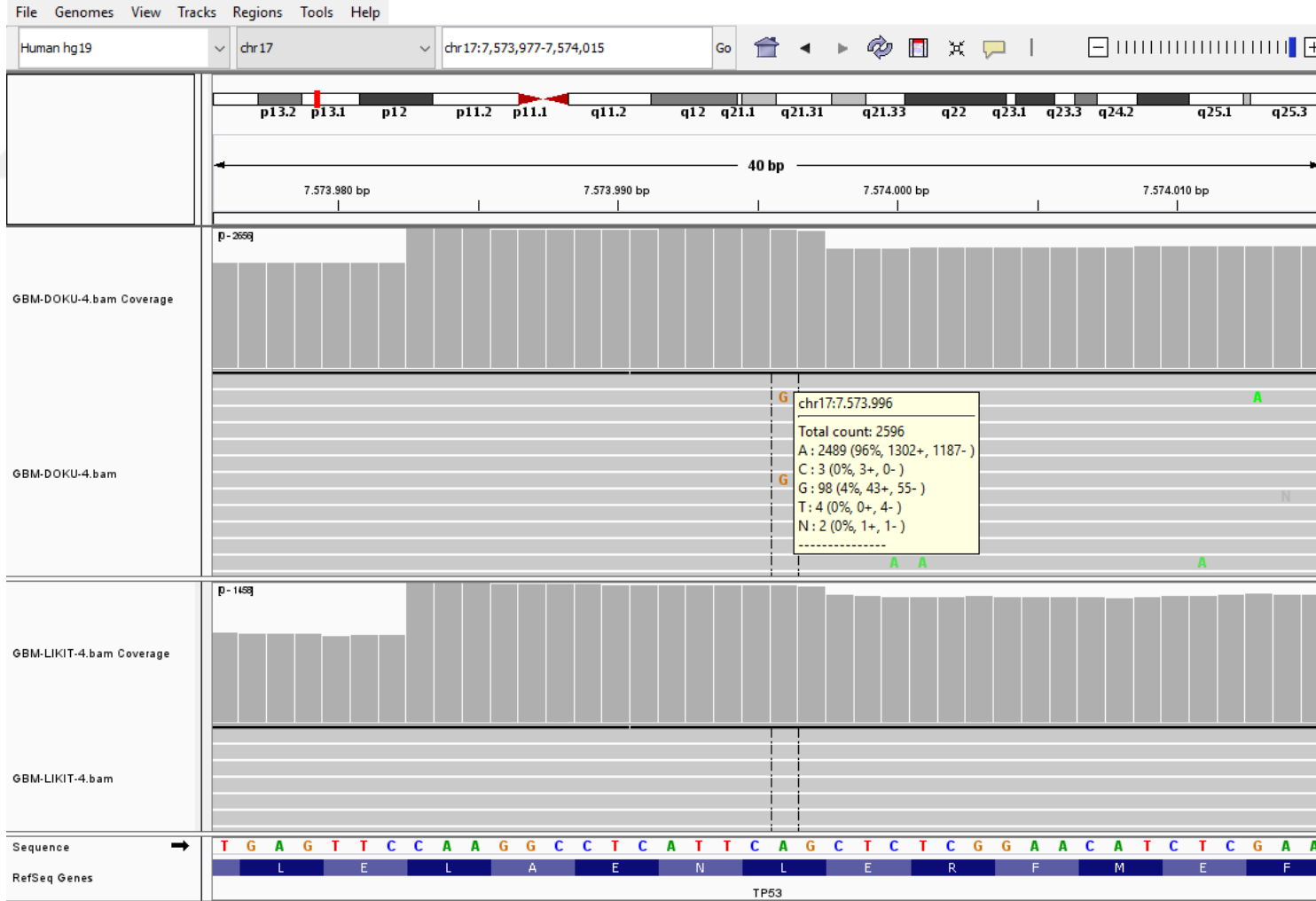
**Şekil 4.20:** GBM 3 nolu hastada saptanan PTEN c.80-1G>C ( solda) ve TP53 c.746G>A (sağda) mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.



Şekil 4.21: GBM 4 nolu hastada saptanan EGFR c.1787C>T mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.

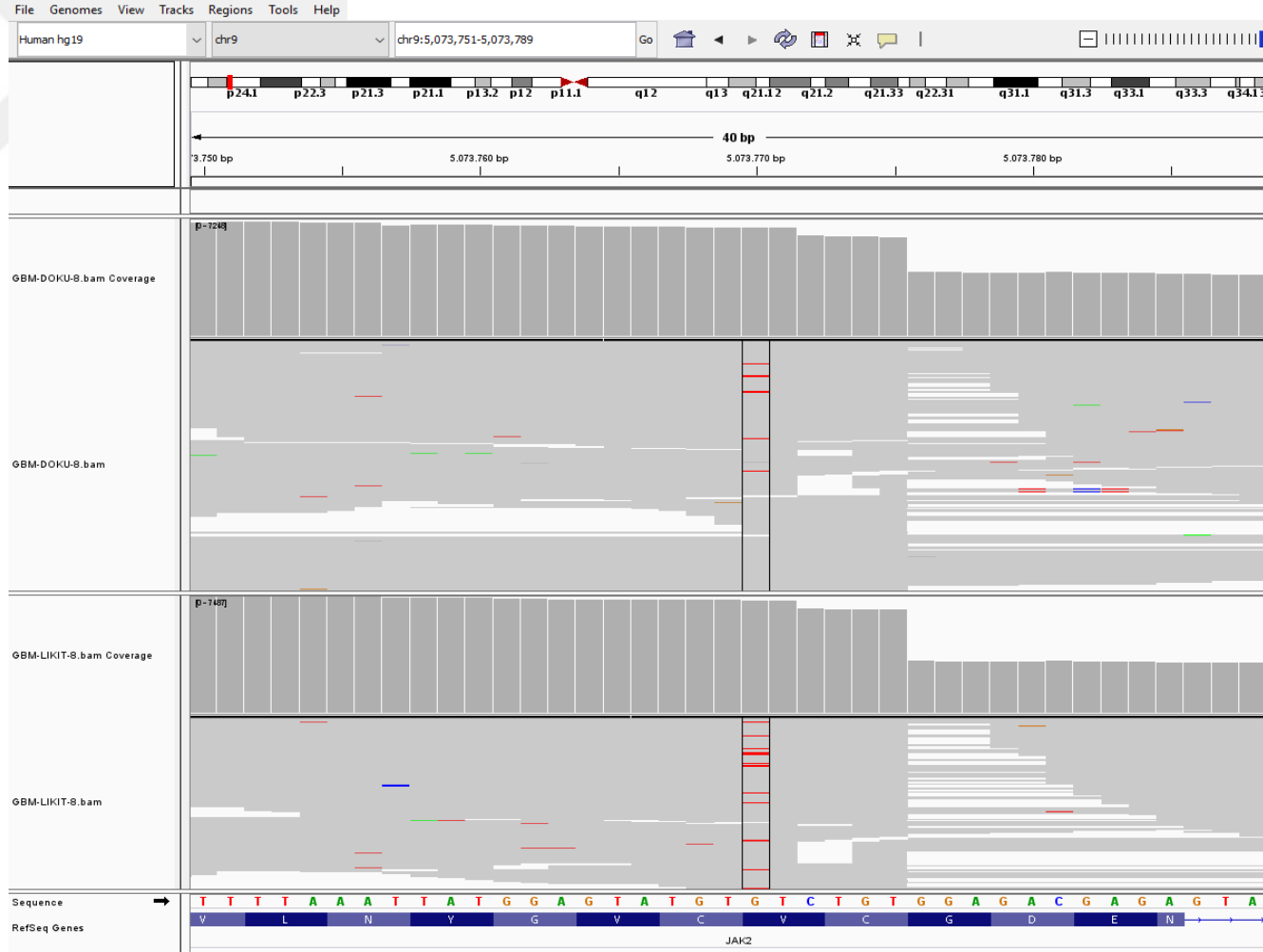


Şekil 4.22: GBM 4 nolu hastada saptanan PTEN c.313T>A mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.

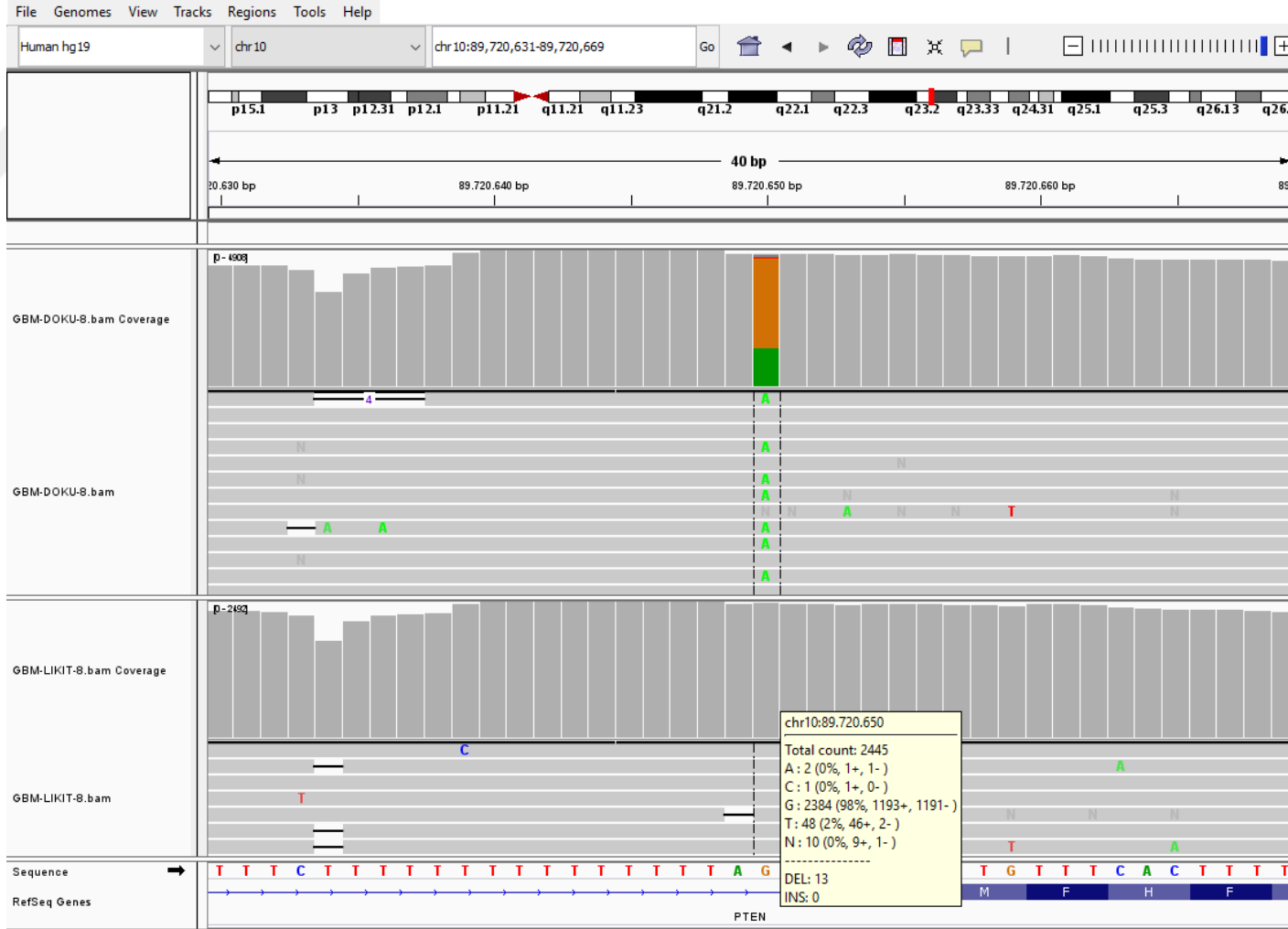


Şekil 4.23: GBM 4 nolu hastada saptanan TP53 c.1031T>C mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.

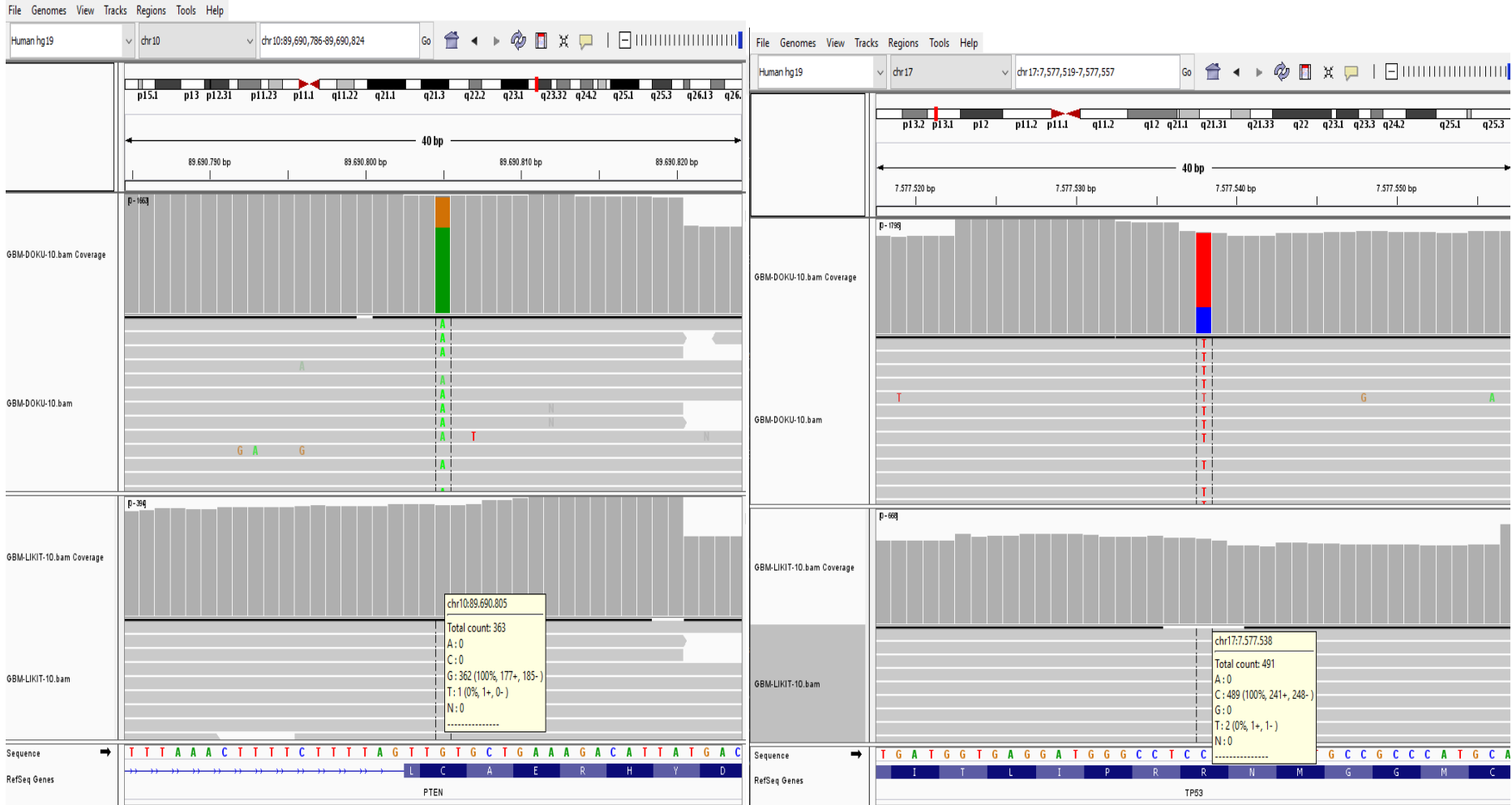




Şekil 4.25: GBM 8 nolu hastada saptanan JAK2 c.1849G>T mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.

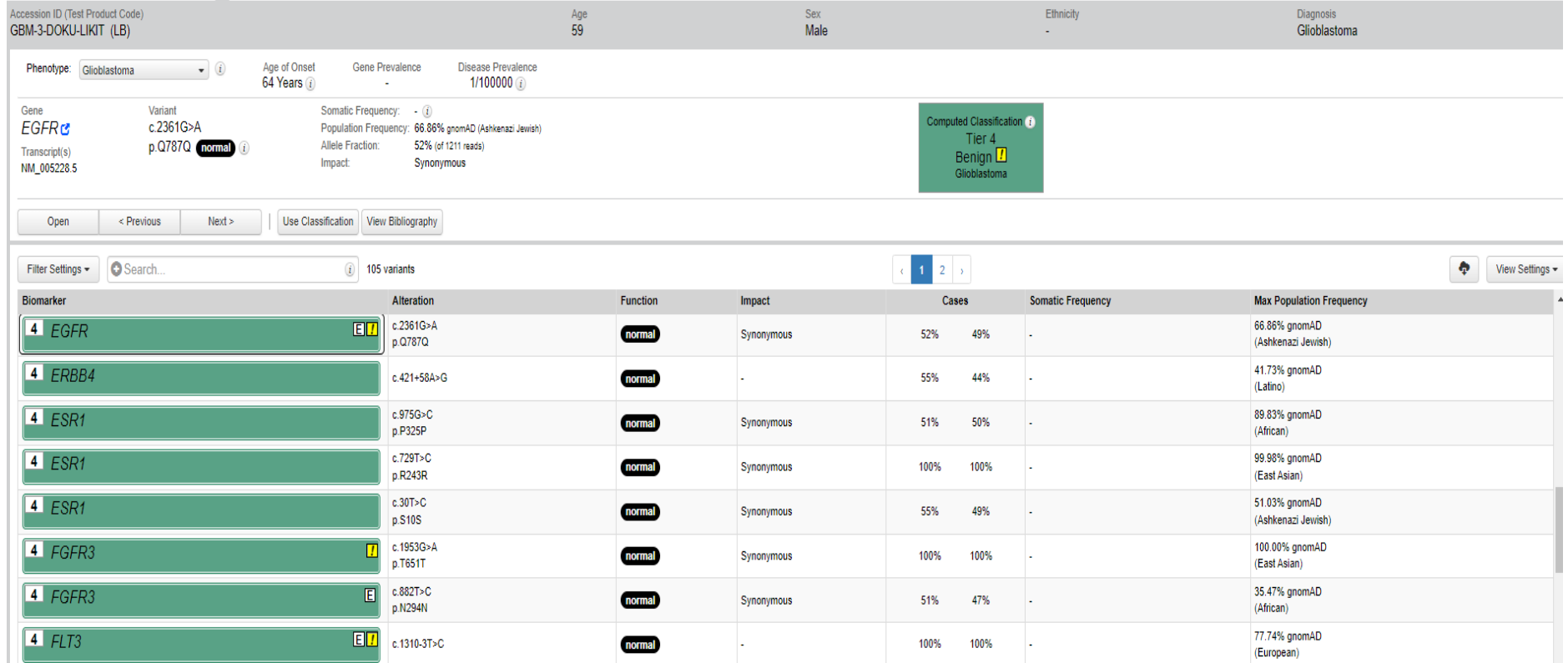


Şekil 4.26: GBM 8 nolu hastada saptanan PTEN c.802-1G>A mutasyonunun doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüsü.



Şekil 4.27: GBM 10 nolu hastada saptanan PTEN c.212G>A (solda) ve TP53 c.743G>T (sağda) mutasyonunun doku ve likit biyopside

## karşılaştırmalı IGV görüntüsü.



Şekil 4.28: GBM 3 nolu hastada bazı polimorfizmlerin doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü.

Accession ID (Test Product Code)  
GBM-6-DOKU-LIKIT (LB)

Age 69 Sex Female Ethnicity - Diagnosis Glioblastoma

Phenotype: Glioblastoma Age of Onset 64 Years Gene Prevalence - Disease Prevalence 1/100000

Gene **ROS1** Variant c.330A>T p.L110L **normal** Somatic Frequency: - Population Frequency: 87.55% gnomAD (African) Allele Fraction: 52% (of 3859 reads) Impact: Synonymous

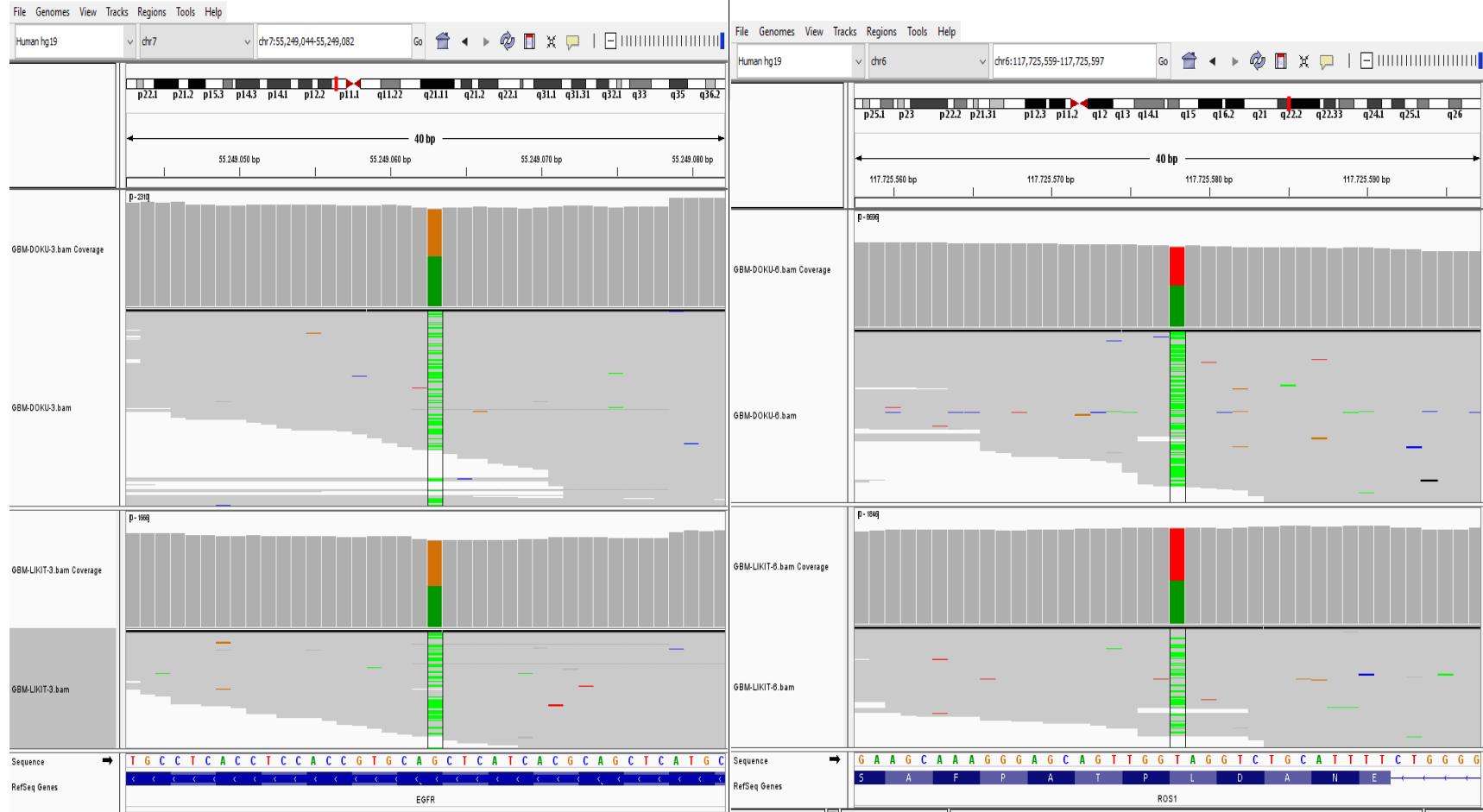
Computed Classification Tier 4 Benign Glioblastoma

Open < Previous Next > Use Classification View Bibliography

Filter Settings Search... 99 variants

Biomarker	Alteration	Function	Impact	Cases	Somatic Frequency	Max Population Frequency
4 ROS1	c.330A>T p.L110L	normal	Synonymous	52% 46%	-	87.55% gnomAD (African)
4 ROS1	c.1971G>A p.E657E	normal	Synonymous	52% 49%	-	13.97% gnomAD (Ashkenazi Jewish)
4 ROS1	c.3840-5T>C	normal	-	98% 92%	-	54.08% gnomAD (Ashkenazi Jewish)
4 ROS1	c.5923-4A>G	normal	-	49% 48%	-	17.44% gnomAD (Ashkenazi Jewish)
4 ROS1	c.6229A>C p.R2077R	normal	Synonymous	53% 49%	-	16.43% gnomAD (Ashkenazi Jewish)
4 ROS1	c.6619G>A p.D2207N	normal	Missense	54% 52%	-	25.23% gnomAD (European)
4 ROS1	c.6664A>C p.K2222Q	normal	Missense	54% 53%	-	25.02% gnomAD (European)
4 ROS1	c.6668C>G p.S2223C	normal	Missense	54% 53%	-	24.90% gnomAD (European)

Şekil 4.29: GBM 6 nolu hastada bazı polimorfizmlerin doku ve likit biyopside karşılaştırmalı QCI Interpret görüntüsü.



**Şekil 4.30:** GBM 3 nolu hastada EGFR c.2361G>A polimorfizminin (solda) ve GBM 6 nolu hastada ROS1 c.330A>T polimorfizminin (sağda) doku ve likit biyopside karşılaştırmalı IGV görüntüleri.

**Tablo 4.6:** Moleküler analiz sonucu örneklerde saptanan varyantların listesi.

Örnek	Saptanan varyant	VAF / dbSNP	Patojenite
GBM-DOKU-1	TP53 c.817C>T(p.Arg273Cys)	%66 / rs121913343	Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Patojenik, COSMIC: 10659 (MSS)
GBM-LİKİT-1	-	-	-
GBM-DOKU-2	TP53 c.584T>C(p.Ile195Thr) MET c.1949G>A(p.Ser650Asn)	%62 / rs760043106 %36 / rs-	Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Olası patojenik Varsome ACMG: VUS
GBM-LİKİT-2	-	-	-
GBM-DOKU-3	TP53 c.746G>A(p.Arg249Lys) PTEN c.80-1G>C	%52 / rs587782329 %59 / rs786204914	Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Olası patojenik Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Olası patojenik
GBM-LİKİT-3	-	-	-
GBM-DOKU-4	PTEN c.313T>A(p.Cys105Ser) EGFR c.1787C>T(p.Pro596Leu) TP53 c.1031T>C(p.Leu344Pro)	%45 / rs- %19 / rs1477025000 %4.19 / rs121912662	Varsome ACMG: Olası patojenik Varsome ACMG: VUS, COSMIC: 1169666 (MSS) Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Patojenik
GBM-LİKİT-4	-	-	-
GBM-DOKU-5	-	-	-
GBM-LİKİT-5	-	-	-
GBM-DOKU-6	TP53 c.451C>T(p.Pro151Ser)	%92 / rs28934874	Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Olası patojenik, COSMIC: 133656 (MSS)
GBM-LİKİT-6	-	-	-
GBM-DOKU-7	-	-	-
GBM-LİKİT-7	-	-	-
GBM-DOKU-8	PTEN c.802-1G>A JAK2 c.1849G>T(p.Val617Phe)	%33 / rs1257124719 %2.72 / rs77375493	Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Patojenik, COSMIC: 28919 (MSS) Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Patojenik
GBM-LİKİT-8	JAK2 c.1849G>T(p.Val617Phe)	%8.77 / rs77375493	Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Patojenik
GBM-DOKU-9	-	-	-
GBM-LİKİT-9	-	-	-
GBM-DOKU-10	TP53 c.743G>T (p.Arg248Leu)	%75 / rs11540652	Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Olası patojenik, COSMIC: 87196 (MSS)

PTEN c.212G&gt;A (p.Cys71Tyr)

%73 / rs1554897856

Varsome ACMG: Patojenik, Clinvar: Patojenik, COSMIC: 5102 (MSS)

GBM-LİKİT-10

**Tablo 4.7:** Çalışmada kullanılan hastaların bilgileri.

Örnek kodu	Yaş	Tanı	Grade	IDH mutasyonu	Primer/nüks	Radyasyon	Kemoterapi	Komplikasyon	Nüks
GBM-1	66	Glioblastom	4	negatif	primer	evet	evet	yok	yok
GBM-2	68	Glioblastom	4	negatif	primer	evet	hayır	evet	evet
GBM-3	60	Glioblastom	4	negatif	primer	hayır	hayır	yok	yok
GBM-4	75	Glioblastom	4	negatif	primer	hayır	hayır	yok	evet
GBM-5	57	Glioblastom	4	negatif	primer	hayır	hayır	yok	yok
GBM-6	69	Glioblastom	4	negatif	primer	hayır	hayır	yok	yok
GBM-7	63	Glioblastom	4	negatif	primer	evet	evet (radyoterapi eşzamanlı temozolomid)	yok	evet
GBM-8	57	Glioblastom	4	negatif	primer	evet	hayır	yok	evet
GBM-9	61	Glioblastom	4	negatif	primer	evet	hayır	yok	yok
GBM-10	52	Glioblastom	4	negatif	primer	hayır	hayır	yok	yok



**Tablo 4.8:** Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

chr	Target	GBM-DOKU-1	GBM-DOKU-2	GBM-DOKU-3	GBM-DOKU-4	GMB-DOKU-5	GBM-DOKU-6	GBM-DOKU-7	GBM-DOKU-8	GBM-DOKU-9	GBM-DOKU-10
1	MTOR: Exon 58/58	395,43	1.033,24	569,65	1.203,56	634,73	1.886,20	1.279,03	1.776,87	690,91	603,46
1	MTOR: Exon 57/58	488,23	1.286,09	752,06	1.342,65	680,05	2.126,80	1.550,56	2.280,02	775,57	655,14
1	MTOR: Exon 56/58	428,32	1.139,29	664,63	1.180,04	678,59	1.888,00	1.335,55	1.957,04	706,63	578,82
1	MTOR: Exon 55/58	444,35	1.256,68	694,19	1.365,28	657,70	2.034,77	1.395,91	2.109,62	742,90	627,52
1	MTOR: Exon 54/58	411,72	1.088,09	689,46	1.216,54	650,11	1.924,67	1.312,10	1.964,27	616,28	564,22
1	MTOR: Exon 53/58	478,31	1.384,92	789,39	1.349,70	705,26	2.259,84	1.533,49	2.316,93	746,45	671,06
1	MTOR: Exon 52/58	444,33	1.266,04	709,27	1.249,70	633,30	2.023,98	1.420,07	2.095,25	744,53	644,91
1	MTOR: Exon 51/58	476,99	1.205,69	734,94	1.267,43	615,23	2.104,96	1.375,97	2.072,02	645,32	585,50
1	MTOR: Exon 50/58	432,04	1.089,93	629,77	1.148,26	657,48	1.797,75	1.174,77	1.813,82	614,98	540,27
1	MTOR: Exon 49/58	501,64	1.337,64	760,99	1.279,71	645,99	2.154,08	1.508,45	2.395,98	662,94	648,73
1	MTOR: Exon 48/58	530,25	1.387,04	804,37	1.384,53	712,25	2.237,70	1.638,51	2.433,80	754,99	689,70
1	MTOR: Exon 47/58	485,29	1.410,46	831,83	1.298,76	768,32	2.168,19	1.543,44	2.462,84	762,09	661,28
1	MTOR: Exon 46/58	563,93	1.396,10	870,04	1.374,58	736,42	2.278,36	1.565,11	2.490,61	763,84	687,80
1	MTOR: Exon 45/58	510,21	1.413,07	803,48	1.338,59	678,88	2.212,09	1.466,89	2.319,19	744,14	678,39
1	MTOR: Exon 43/58, Exon 44/58	576,42	1.493,29	835,25	1.483,63	779,34	2.333,57	1.623,07	2.505,27	846,66	741,52
1	MTOR: Exon 42/58	478,73	1.236,05	746,14	1.286,54	595,27	2.044,64	1.409,00	2.148,34	728,03	600,39
1	MTOR: Exon 41/58	502,58	1.284,02	801,83	1.310,12	623,52	2.084,89	1.415,36	2.310,17	761,69	626,81
1	MTOR: Exon 40/58	531,35	1.323,99	826,09	1.334,04	667,81	2.260,13	1.470,54	2.284,61	797,54	640,94
1	MTOR: Exon 39/58	502,22	1.421,86	830,12	1.401,85	746,05	2.283,88	1.560,69	2.436,67	768,05	718,32
1	MTOR: Exon 38/58	547,38	1.435,31	935,29	1.485,76	756,64	2.453,83	1.552,76	2.454,00	802,73	688,29
1	MTOR: Exon 37/58	594,08	1.405,39	773,32	1.462,82	693,32	2.369,04	1.592,03	2.330,30	802,48	652,65
1	MTOR: Exon 35/58, Exon 36/58	589,00	1.491,52	873,45	1.523,19	736,47	2.401,47	1.588,41	2.530,48	835,91	742,18
1	MTOR: Exon 34/58	587,78	1.431,22	873,42	1.454,26	663,76	2.356,07	1.596,52	2.386,06	807,62	738,97
1	MTOR: Exon 33/58	495,23	1.339,43	774,32	1.389,09	700,07	2.168,88	1.403,50	2.132,25	762,97	667,32
1	MTOR: Exon 32/58	523,34	1.305,90	777,52	1.459,53	633,99	2.292,16	1.560,91	2.251,32	722,79	653,29
1	MTOR: Exon 31/58	487,27	1.201,62	736,27	1.269,11	582,55	2.200,56	1.420,95	2.148,20	757,92	719,74
1	MTOR: Exon 30/58	559,65	1.588,55	878,33	1.554,25	717,00	2.578,57	1.585,95	2.518,20	986,88	716,97
1	MTOR: Exon 29/58	457,77	1.199,23	692,91	1.241,42	720,42	2.145,14	1.259,84	1.988,32	734,64	635,27
1	MTOR: Exon 27/58, Exon 28/58	648,28	1.653,97	954,65	1.607,44	857,00	2.702,86	1.709,71	2.637,21	851,66	776,90
1	MTOR: Exon 26/58	589,04	1.471,62	885,57	1.443,89	715,05	2.363,60	1.444,57	2.358,86	749,92	678,63
1	MTOR: Exon 25/58	525,09	1.323,88	787,28	1.297,42	663,74	2.328,50	1.465,17	2.341,51	753,65	646,22
1	MTOR: Exon 24/58	520,69	1.315,21	759,78	1.391,92	734,14	2.218,55	1.384,38	2.109,55	761,73	661,59
1	MTOR: Exon 23/58	622,20	1.509,55	844,98	1.556,21	731,40	2.544,73	1.632,99	2.399,95	834,38	727,39
1	MTOR: Exon 22/58	509,02	1.194,76	727,21	1.247,49	631,72	2.112,73	1.421,62	2.094,08	728,58	612,50
1	MTOR: Exon 21/58	543,09	1.455,48	804,70	1.392,80	679,05	2.231,87	1.432,09	2.342,53	805,23	729,86
1	MTOR: Exon 20/58	455,35	1.222,76	700,83	1.235,81	618,07	2.007,12	1.288,92	1.989,05	679,31	563,35
1	MTOR: Exon 19/58	606,64	1.501,48	879,03	1.502,71	780,21	2.502,34	1.643,48	2.567,19	846,83	741,81
1	MTOR: Exon 18/58	588,98	1.321,52	845,34	1.405,11	635,07	2.253,92	1.554,52	2.329,38	754,20	660,97
1	MTOR: Exon 17/58	575,78	1.333,05	854,50	1.364,67	705,21	2.207,85	1.475,78	2.301,97	769,88	688,63
1	MTOR: Exon 16/58	514,34	1.263,05	762,81	1.408,76	764,22	2.159,44	1.487,88	2.247,09	770,48	662,39
1	MTOR: Exon 15/58	528,15	1.171,66	740,52	1.299,32	644,20	2.042,89	1.307,54	1.953,21	722,35	612,96
1	MTOR: Exon 14/58	528,79	1.310,36	711,88	1.269,16	627,91	1.971,65	1.391,52	2.160,21	712,00	642,47
1	MTOR: Exon 13/58	612,65	1.452,68	860,35	1.421,35	773,40	2.358,82	1.617,72	2.512,33	826,01	699,39
1	MTOR: Exon 12/58	601,37	1.483,08	880,36	1.465,37	755,13	2.445,58	1.670,00	2.536,31	838,38	751,30
1	MTOR: Exon 11/58	633,55	1.595,90	892,29	1.419,03	848,91	2.229,65	1.672,61	2.593,82	890,01	809,51
1	MTOR: Exon 10/58	493,16	1.174,65	692,85	1.261,13	646,28	1.951,47	1.396,35	2.168,02	669,37	620,84
1	MTOR: Exon 9/58	598,74	1.438,23	839,42	1.431,20	811,31	2.231,16	1.625,95	2.442,20	787,82	735,96
1	MTOR: Exon 7/58, Exon 8/58	657,94	1.612,44	896,56	1.537,96	870,39	2.486,92	1.779,15	2.746,29	901,83	823,58
1	MTOR: Exon 6/58	529,03	1.282,46	765,57	1.354,63	738,19	2.174,77	1.631,19	2.507,37	773,97	685,48
1	MTOR: Exon 5/58	588,36	1.490,89	850,83	1.415,55	791,25	2.232,81	1.777,37	2.710,34	939,94	760,25
1	MTOR: Exon 4/58	625,52	1.515,86	852,79	1.468,88	860,43	2.362,96	1.838,23	2.728,87	878,39	814,65
1	MTOR: Exon 3/58	508,87	1.196,66	708,50	1.238,03	629,36	2.013,66	1.527,12	2.282,60	787,97	639,54
1	MTOR: Exon 2/58	585,99	1.386,29	869,17	1.329,48	761,86	2.139,66	1.726,04	2.609,90	874,03	718,05
1	MPL: Exon 10/12	526,53	1.192,42	684,49	1.677,65	1.007,83	1.881,81	1.321,69	2.192,35	712,61	635,45
1	IL12RB2: Exon 16/16	522,76	1.413,25	833,40	1.504,81	1.139,20	2.618,53	1.676,58	2.600,41	846,11	779,83
1	NRAS: Exon 4/7	618,24	1.255,72	706,75	1.473,29	1.026,91	2.465,81	1.384,93	2.110,59	900,89	711,16
1	NRAS: Exon 3/7	365,94	806,01	396,91	869,11	672,51	1.487,44	979,35	1.507,53	546,90	442,34
1	NRAS: Exon 2/7	559,49	1.218,64	682,81	1.553,99	912,99	2.465,93	1.737,20	2.155,78	953,10	646,16
1	SPTA1: Exon 51/52	857,13	1.516,75	789,20	1.746,98	1.033,03	3.176,82	1.376,45	2.267,67	928,96	850,82

**Tablo 4.8 (devam):** Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

1	DDR2: Exon 18/19	670,38	1.200,46	705,63	1.402,70	939,38	2.476,58	1.223,49	1.912,74	719,28	667,16
1	ADCY10: Exon 11/33	549,87	1.229,61	690,35	1.446,26	1.059,19	2.395,35	1.372,50	2.129,33	742,20	718,34
1	NPHS2: Exon 8/8	628,03	1.427,89	783,25	1.447,76	1.071,54	2.690,07	1.396,26	2.210,10	772,75	738,51
1	LAMB3: Exon 4/23	755,59	1.546,00	819,29	1.580,77	1.055,21	2.628,39	1.674,18	2.550,86	984,53	865,97
1	IRF6: Exon 5/9	648,79	1.438,18	718,07	1.502,74	984,77	2.651,22	1.497,77	2.270,83	895,23	734,73
1	OBSCN: Exon 10/81	614,19	1.353,56	674,66	1.414,17	990,45	2.189,90	1.438,67	2.192,91	776,73	810,31
2	DNMT3A: Exon 23/23	454,91	1.201,16	616,51	1.241,23	918,75	1.739,29	1.409,80	2.179,46	686,57	511,40
2	ALK: Exon 25/29	676,26	1.559,64	758,18	1.523,77	1.157,52	2.677,49	1.599,20	2.540,46	877,66	759,07
2	ALK: Exon 23/29	655,67	1.469,08	779,83	1.402,75	941,44	2.364,82	1.567,69	2.426,72	837,92	647,31
2	SLC3A1: Exon 1/10	426,02	1.092,94	588,85	1.108,43	903,91	1.791,21	1.215,61	1.894,89	644,15	515,66
2	MSH6: Exon 5/10	506,76	1.312,34	757,12	1.442,82	1.188,68	2.216,17	1.484,94	2.267,18	748,68	593,08
2	FSHR: Exon 1/10	716,56	1.449,86	733,82	1.602,63	1.047,32	2.527,27	1.326,83	2.231,15	843,95	709,73
2	HK2: Exon 16/18	708,48	1.623,60	781,33	1.695,87	1.079,42	2.696,17	1.573,38	2.622,13	991,18	797,14
2	ABCB11: Exon 24/28	826,05	1.497,36	773,62	1.664,67	1.171,05	2.803,88	1.474,20	2.476,05	928,44	709,46
2	LRP2: Exon 29/79	691,26	1.321,33	719,30	1.645,00	997,18	2.703,63	1.402,80	2.155,22	829,11	649,76
2	TTN: Exon 253/312 A	949,84	1.677,34	789,80	1.882,96	1.107,96	3.211,84	1.526,68	2.693,14	1.075,23	824,77
2	TTN: Exon 253/312 B	860,99	1.533,53	732,38	1.635,47	957,41	2.964,63	1.447,67	2.431,94	917,92	713,43
2	IDH1: Exon 4/10	593,43	1.416,34	778,27	1.590,42	1.119,75	2.379,98	1.562,22	2.334,43	911,61	632,97
2	ERBB4: Exon 23/28	692,99	1.254,99	638,27	1.583,48	920,04	2.609,10	1.273,07	2.074,98	936,64	626,34
2	ERBB4: Exon 15/28	771,76	1.593,25	823,27	1.948,56	1.177,61	3.075,50	1.595,44	2.490,26	1.114,43	736,38
2	ERBB4: Exon 9/28	697,03	1.395,46	722,99	1.720,42	1.081,47	2.665,43	1.369,33	2.184,27	958,23	670,65
2	ERBB4: Exon 8/28	739,67	1.466,05	748,03	1.762,81	1.163,98	2.761,62	1.521,54	2.405,24	1.021,76	775,94
2	ERBB4: Exon 7/28	605,93	1.165,38	623,82	1.519,00	948,55	2.352,73	1.227,86	1.970,93	841,25	580,55
2	ERBB4: Exon 6/28	712,46	1.411,87	784,92	1.746,40	1.058,51	2.898,37	1.412,87	2.417,75	1.016,75	690,12
2	ERBB4: Exon 4/28	762,03	1.507,43	739,18	1.805,56	1.094,74	2.989,45	1.472,22	2.349,02	1.076,11	733,65
2	ERBB4: Exon 3/28	961,46	1.777,91	814,75	2.116,30	1.308,56	3.511,86	1.682,41	2.809,76	1.208,68	874,73
2	ABCA12: Exon 43/53	636,61	1.319,65	679,45	1.518,54	1.102,24	2.569,18	1.356,26	2.210,45	842,74	645,23
2	NHEJ1: Exon 8/8	609,23	1.461,80	749,00	1.500,53	1.149,54	2.396,49	1.424,99	2.329,84	843,72	659,07
2	COL4A4: Exon 39/48	592,71	1.350,54	714,16	1.511,82	1.023,41	2.564,98	1.419,57	2.244,85	803,55	615,11
3	SUMF1: Exon 9/9	630,37	1.516,57	1.114,70	1.536,46	1.021,60	2.785,33	1.514,35	2.978,08	824,48	944,94
3	ITPR1: Exon 19/58	615,28	1.391,97	960,82	1.601,03	1.169,60	2.808,53	1.511,16	2.773,04	824,98	942,99
3	VHL: Exon 1/3	281,25	989,42	834,11	1.049,67	879,16	1.466,84	1.645,55	2.569,99	704,70	594,28
3	VHL: Exon 2/3	356,02	1.228,99	1.026,21	1.235,51	1.105,64	1.863,93	1.540,19	3.030,44	776,01	728,51
3	VHL: Exon 3/3	356,80	1.140,65	1.015,20	1.131,22	1.029,66	1.878,40	1.407,32	2.811,85	711,97	672,74
3	RAF1: Exon 15/17, Exon 16/17, Exon 17/17	523,08	1.574,93	1.140,18	1.553,66	1.209,94	2.522,35	1.593,15	3.233,03	836,79	873,30
3	RAF1: Exon 14/17	457,94	1.409,84	1.126,62	1.441,43	1.131,69	2.279,66	1.432,33	2.772,05	799,33	772,28
3	RAF1: Exon 13/17	377,00	1.044,87	853,48	1.256,30	901,50	1.952,22	1.183,95	2.288,78	714,62	649,90
3	RAF1: Exon 12/17	480,20	1.426,11	1.129,94	1.463,14	1.212,80	2.331,72	1.680,75	3.115,39	805,75	772,25
3	RAF1: Exon 11/17	392,13	1.141,43	908,77	1.157,35	1.026,40	1.970,48	1.344,58	2.534,86	724,75	622,61
3	RAF1: Exon 10/17	439,66	1.379,21	1.081,54	1.346,64	1.091,85	2.185,58	1.432,60	2.869,01	789,85	758,94
3	RAF1: Exon 8/17, Exon 9/17	458,17	1.382,48	1.014,11	1.491,68	1.119,72	2.317,60	1.463,32	2.748,35	779,87	719,97
3	RAF1: Exon 7/17	431,61	1.288,35	1.035,53	1.359,00	867,93	2.174,39	1.372,29	2.683,29	764,36	689,87
3	RAF1: Exon 6/17	403,14	1.247,09	1.024,53	1.344,93	1.142,07	2.219,54	1.327,88	2.604,50	743,20	688,51
3	RAF1: Exon 5/17	446,37	1.422,91	1.075,57	1.453,73	1.098,83	2.294,27	1.433,90	2.737,79	795,16	764,61
3	RAF1: Exon 4/17	386,63	1.205,17	874,43	1.304,61	1.008,23	1.992,59	1.259,62	2.435,72	736,50	677,52
3	RAF1: Exon 3/17	373,32	1.168,97	916,93	1.167,25	965,34	1.942,41	1.280,63	2.462,09	674,40	649,41
3	RAF1: Exon 2/17	448,29	1.361,73	1.075,50	1.405,42	1.174,77	2.251,34	1.531,91	3.022,97	820,08	761,29
3	MLH1: Exon 12/19	450,61	958,86	674,33	1.071,83	784,29	1.688,84	1.026,14	1.983,46	516,69	538,70
3	CTNNB1: Exon 3/15	764,87	1.606,04	1.014,77	1.597,19	990,36	2.746,98	1.430,34	2.992,92	935,96	971,71
3	CXCR6: Exon 2/2	879,37	1.918,87	1.258,85	1.699,71	1.166,10	3.138,86	1.791,37	3.651,64	1.093,08	1.185,18
3	FOXL2: Exon 1/1	391,60	1.387,23	624,59	1.155,79	1.026,27	1.684,37	1.472,75	3.134,00	651,99	720,09
3	GYG1: Exon 5/8	437,01	1.338,32	566,45	1.040,03	717,38	1.846,10	1.015,61	1.909,24	538,53	592,72
3	PIK3CA: Exon 2/21	1.006,19	2.287,62	946,14	1.896,12	1.256,34	3.111,70	1.594,38	3.118,87	1.112,27	1.049,45

**Tablo 4.8 (devam):** Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

3	PIK3CA: Exon 5/21	808,75	1.896,67	748,54	1.539,99	1.087,87	2.706,49	1.378,01	2.772,99	896,63	891,45
3	PIK3CA: Exon 7/21	672,16	2.013,46	827,91	1.774,91	1.163,02	2.848,25	1.410,39	2.776,74	913,72	916,32
3	PIK3CA: Exon 8/21, Exon 9/21	804,53	2.304,15	881,58	1.924,24	1.280,63	3.149,71	1.603,76	3.193,78	1.080,21	1.038,92
3	PIK3CA: Exon 10/21	494,60	1.579,57	601,03	1.567,25	1.060,77	2.405,39	1.161,06	2.248,08	751,46	704,79
3	PIK3CA: Exon 14/21	414,95	1.281,84	495,19	1.150,16	717,27	1.942,76	961,62	1.978,44	573,41	557,22
3	PIK3CA: Exon 19/21	575,74	1.715,43	719,37	1.620,65	983,22	2.586,44	1.355,50	2.544,42	870,88	715,57
3	PIK3CA: Exon 21/21	812,18	2.551,17	976,71	2.119,56	1.368,56	3.444,88	1.761,28	3.473,20	1.155,62	1.103,79
4	FGFR3: Exon 7/18	472,60	1.539,81	760,22	1.392,38	1.136,72	1.705,83	1.958,97	3.351,03	838,72	1.000,20
4	FGFR3: Exon 9/18	455,25	1.421,99	787,46	1.390,62	975,05	1.769,37	1.876,36	3.140,00	732,90	903,30
4	FGFR3: Exon 14/18, Exon 15/18	393,15	1.177,95	698,72	1.132,11	863,29	1.421,43	1.543,72	2.561,67	589,79	727,45
4	FGFR3: Exon 16/18	372,92	1.160,36	605,95	1.092,98	813,65	1.347,81	1.460,75	2.381,99	605,74	706,12
4	FGFR3: Exon 18/18	514,81	1.548,22	865,13	1.448,23	1.077,76	1.741,32	1.842,09	3.030,53	767,34	946,00
4	EVC: Exon 8/21	415,26	1.344,87	723,72	1.553,54	1.095,40	2.082,24	1.451,02	2.234,90	849,58	851,66
4	PDGFRA: Exon 12/23	988,95	1.163,57	4.064,79	1.223,78	839,00	1.931,79	1.185,91	1.833,83	679,75	753,90
4	PDGFRA: Exon 14/23	1.142,51	1.280,28	4.499,42	1.409,40	942,75	2.158,91	1.342,93	1.974,63	766,76	841,72
4	PDGFRA: Exon 15/23	993,92	1.276,77	4.067,28	1.461,97	961,70	2.031,74	1.260,33	1.841,86	713,92	819,18
4	PDGFRA: Exon 18/23	1.392,96	1.621,34	5.836,57	1.499,50	1.163,05	2.713,46	1.680,05	2.628,06	995,96	1.000,60
4	KIT: Exon 1/21	1.126,14	1.282,92	4.744,33	1.485,69	1.020,48	2.207,66	1.419,00	2.399,71	763,54	881,23
4	KIT: Exon 2/21	1.845,22	1.878,39	2.344,48	1.956,06	1.267,84	3.169,13	1.714,36	2.832,81	1.026,20	1.223,04
4	KIT: Exon 3/21	1.807,24	1.762,02	2.356,26	1.765,79	1.107,95	2.941,62	1.538,56	2.614,36	1.012,45	1.109,13
4	KIT: Exon 4/21	1.615,81	1.608,56	2.032,18	1.782,91	1.105,33	2.993,39	1.445,84	2.363,91	1.002,11	1.048,12
4	KIT: Exon 5/21	1.673,04	1.705,79	2.009,40	2.005,63	1.200,83	2.901,87	1.530,83	2.445,95	1.085,46	1.088,66
4	KIT: Exon 6/21	1.958,64	1.957,55	2.343,11	2.194,59	1.316,87	3.499,30	1.804,53	2.896,53	1.236,86	1.245,05
4	KIT: Exon 7/21	1.786,98	1.797,63	2.252,31	1.939,97	1.338,11	3.150,15	1.733,38	2.712,73	1.126,07	1.080,41
4	KIT: Exon 8/21	1.633,33	1.645,64	2.038,89	1.699,62	1.088,81	2.872,86	1.376,70	2.334,43	914,37	1.014,12
4	KIT: Exon 9/21	1.992,25	1.980,69	2.238,03	2.011,04	1.210,95	3.300,19	1.586,32	2.646,59	1.076,41	1.165,52
4	KIT: Exon 10/21, Exon 11/21	2.043,76	1.959,01	2.453,75	2.011,64	1.247,03	3.309,11	1.627,65	2.683,00	1.082,09	1.194,96
4	KIT: Exon 12/21, Exon 13/21	2.031,58	1.967,72	2.529,16	2.025,53	1.284,94	3.333,44	1.642,17	2.803,65	1.074,65	1.213,21
4	KIT: Exon 14/21	1.891,42	1.756,11	2.142,57	1.976,04	1.192,85	3.202,25	1.580,82	2.623,11	1.127,08	1.184,74
4	KIT: Exon 15/21	1.781,02	1.730,76	2.123,82	1.848,72	996,19	3.074,50	1.473,97	2.425,84	951,69	989,74
4	KIT: Exon 16/21	1.497,05	1.505,36	1.747,02	1.529,16	1.039,21	2.500,99	1.275,47	2.102,46	867,29	923,26
4	KIT: Exon 17/21	1.723,99	1.747,22	2.069,56	1.877,92	1.143,28	2.853,87	1.440,11	2.372,24	1.048,75	1.101,70
4	KIT: Exon 18/21, Exon 19/21	1.996,02	2.029,26	2.479,54	2.048,91	1.302,12	3.400,67	1.654,29	2.778,83	1.134,96	1.295,50
4	KIT: Exon 20/21	1.600,61	1.540,65	1.905,38	1.683,48	1.048,00	2.869,44	1.433,83	2.362,54	875,09	959,80
4	KIT: Exon 21/21	1.707,70	1.646,72	2.079,95	1.706,39	1.083,91	2.838,08	1.433,39	2.428,15	892,50	1.025,21
4	KDR: Exon 30/30	1.440,89	1.510,82	879,02	1.683,58	1.145,28	2.625,38	1.442,76	2.255,49	801,59	933,19
4	KDR: Exon 27/30	1.350,90	1.410,47	843,89	1.415,51	828,40	2.505,52	1.307,02	2.053,50	763,46	838,45
4	KDR: Exon 26/30	1.303,97	1.453,07	778,37	1.336,80	865,03	2.214,70	1.318,96	1.924,23	736,92	891,09
4	KDR: Exon 21/30	1.469,41	1.506,44	892,90	1.615,71	1.168,72	2.857,51	1.456,08	2.381,53	878,71	989,23
4	KDR: Exon 19/30	1.483,27	1.541,72	844,33	1.556,55	947,11	2.659,36	1.450,54	2.268,43	879,40	937,26
4	KDR: Exon 11/30	1.307,56	1.411,66	764,16	1.519,43	1.027,09	2.482,46	1.401,40	2.073,50	821,58	968,03
4	KDR: Exon 7/30	1.382,84	1.365,45	783,31	1.424,04	948,84	2.325,60	1.276,54	2.122,97	828,90	876,84
4	KDR: Exon 6/30	1.324,25	1.366,90	810,75	1.469,91	983,08	2.315,43	1.351,53	2.081,93	798,66	861,46
4	ARHGAP24: Exon 4/10	601,63	1.430,65	786,56	1.578,62	877,39	2.639,51	1.335,93	2.224,24	848,75	936,39
4	ARHGAP24: Exon 9/10	704,86	1.738,53	854,57	1.774,61	1.154,21	3.086,03	1.629,27	2.697,50	888,06	970,55
4	DSPP: Exon 4/5	383,99	1.195,40	624,11	1.330,06	832,13	2.189,93	1.198,52	1.829,71	716,45	686,51
4	FBXW7: Exon 11/12	834,48	1.601,35	758,53	1.745,63	1.026,51	2.954,37	1.478,63	2.312,42	1.006,34	1.012,38
4	FBXW7: Exon 10/12	693,60	1.363,43	632,71	1.575,80	884,35	2.338,44	1.252,66	2.048,65	801,82	809,70
4	FBXW7: Exon 9/12	745,19	1.476,13	763,05	1.778,60	1.007,83	2.943,18	1.393,63	2.258,54	974,18	955,26

**Tablo 4.8 (devam):** Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

4	FBXW7: Exon 8/12	685,85	1.385,63	711,01	1.603,68	879,26	2.499,49	1.217,53	1.967,50	911,21	813,14
4	FBXW7: Exon 5/12	774,87	1.546,32	766,64	1.905,47	1.111,48	2.980,69	1.423,48	2.349,85	1.047,38	977,99
	DNAH5: Exon										
5	72/79	892,35	1.849,45	876,22	2.047,77	1.145,14	3.202,09	1.641,94	2.645,77	992,39	994,87
	DNAH5: Exon										
5	38/79	671,44	1.415,11	813,88	1.654,86	1.099,46	2.676,15	1.451,04	2.326,47	911,69	839,76
5	IL31RA: Exon 2/15	601,13	1.319,16	731,84	1.322,62	897,43	2.228,89	1.336,97	2.014,37	785,59	705,31
5	VCAN: Exon 8/15	911,89	1.635,58	903,64	1.854,89	1.133,96	2.972,58	1.559,28	2.632,45	1.013,20	953,48
5	APC: Exon 16/16 A	496,57	1.149,32	609,27	1.231,21	858,46	2.014,49	1.210,07	1.918,89	682,12	606,49
5	APC: Exon 16/16 B	628,09	1.356,47	822,86	1.524,64	1.040,58	2.445,37	1.482,22	2.425,05	894,88	778,18
5	APC: Exon 16/16 C	879,02	1.914,37	1.074,97	2.075,69	1.526,14	3.178,03	1.869,30	3.051,09	1.133,12	1.071,23
5	TGFBI: Exon 12/17	738,20	1.546,05	812,27	1.593,05	1.132,98	2.420,81	1.647,68	2.445,36	973,45	802,29
5	SIL1: Exon 4/11	678,29	1.671,72	915,21	1.718,00	1.224,59	2.567,98	1.607,05	2.469,67	795,32	803,30
5	CSF1R: Exon 22/22	656,50	1.528,48	796,95	1.608,44	1.066,80	2.280,48	1.577,43	2.441,43	908,28	771,06
5	CSF1R: Exon 7/22	628,94	1.367,05	665,04	1.222,21	908,47	1.922,63	1.372,55	2.184,09	680,37	699,68
5	NPM1: Exon 11/11	348,09	982,90	538,65	1.269,85	893,79	1.721,27	1.098,82	1.883,14	629,78	628,61
6	ROS1: Exon 43/43	729,99	1.976,82	927,40	1.372,65	1.403,46	3.121,55	1.649,44	2.730,97	1.121,42	1.339,84
6	ROS1: Exon 42/43	577,27	1.617,83	698,54	1.222,34	1.046,04	2.690,61	1.339,87	2.274,66	998,49	1.158,42
6	ROS1: Exon 41/43	631,50	1.721,86	838,04	1.288,03	1.072,10	2.925,52	1.510,81	2.434,01	1.014,94	1.144,88
6	ROS1: Exon 40/43	634,90	1.800,41	881,90	1.311,71	1.233,89	3.054,87	1.536,95	2.539,63	1.002,11	1.213,99
6	ROS1: Exon 39/43	504,90	1.323,35	676,56	1.026,17	966,72	2.357,92	1.190,75	1.907,58	792,32	868,88
6	ROS1: Exon 38/43	580,46	1.642,24	757,34	1.142,86	966,05	2.666,55	1.345,97	2.361,19	956,75	1.071,90
6	ROS1: Exon 37/43	486,00	1.345,68	686,22	1.078,72	935,30	2.391,24	1.218,78	2.067,64	830,73	927,87
6	ROS1: Exon 36/43	647,28	1.832,83	784,70	1.410,63	1.255,14	3.079,37	1.634,14	2.704,84	1.056,21	1.243,67
6	ROS1: Exon 35/43	580,51	1.685,55	756,98	1.276,53	1.116,99	2.646,54	1.371,65	2.371,93	1.015,29	1.126,76
6	ROS1: Exon 34/43	492,92	1.388,72	675,48	1.220,82	961,63	2.416,86	1.290,42	2.118,95	927,14	968,50
6	ROS1: Exon 33/43	619,64	1.692,90	795,29	1.335,38	1.118,80	2.908,11	1.410,51	2.426,44	979,41	1.142,22
6	ROS1: Exon 32/43	570,51	1.605,82	759,67	1.149,89	1.072,24	2.677,20	1.406,80	2.323,30	989,56	1.075,48
6	ROS1: Exon 31/43	502,29	1.451,28	664,17	1.029,46	961,76	2.363,32	1.229,60	2.016,04	844,87	973,04
	ROS1: Exon 29/43,										
6	Exon 30/43	737,77	2.075,48	1.002,32	1.518,77	1.444,12	3.387,44	1.720,55	3.015,73	1.263,95	1.391,67
6	ROS1: Exon 28/43	541,36	1.577,92	728,32	1.318,56	1.179,04	2.723,09	1.355,12	2.168,01	1.008,55	1.068,58
6	ROS1: Exon 27/43	565,93	1.599,44	734,83	1.202,27	1.045,42	2.727,70	1.378,45	2.355,71	1.028,93	1.120,82
6	ROS1: Exon 26/43	551,27	1.625,33	756,32	1.242,54	1.140,27	2.785,08	1.406,68	2.360,71	997,78	1.086,46
6	ROS1: Exon 25/43	697,20	1.901,86	898,59	1.409,21	1.301,69	3.291,66	1.717,41	2.817,81	1.095,01	1.245,33
6	ROS1: Exon 24/43	445,02	1.277,44	582,55	935,84	838,86	2.247,91	1.122,67	1.794,99	795,59	895,66
6	ROS1: Exon 23/43	718,42	1.912,95	891,16	1.404,69	1.286,42	3.136,69	1.662,42	2.701,73	1.156,63	1.291,03
6	ROS1: Exon 22/43	446,48	853,64	629,13	560,24	798,23	2.314,33	1.094,21	1.633,49	602,99	467,80
6	ROS1: Exon 21/43	555,58	1.559,56	761,01	1.226,46	950,59	2.785,01	1.419,07	2.261,17	937,45	1.035,58
6	ROS1: Exon 20/43	611,76	1.592,30	760,83	1.263,83	1.089,17	2.884,76	1.441,81	2.409,66	1.048,45	1.115,11
6	ROS1: Exon 19/43	594,95	1.571,16	807,84	1.268,21	1.198,49	3.019,47	1.500,63	2.471,16	1.118,49	1.169,12
6	ROS1: Exon 18/43	615,10	1.657,47	802,69	1.310,01	1.245,80	2.903,51	1.512,92	2.519,18	1.029,70	1.125,58
6	ROS1: Exon 17/43	457,45	1.328,15	599,13	999,75	903,37	2.300,27	1.202,67	2.014,37	823,47	927,98
6	ROS1: Exon 16/43	613,24	1.869,47	881,33	1.416,72	1.201,76	3.028,66	1.642,04	2.653,69	1.139,05	1.265,32
6	ROS1: Exon 15/43	636,63	1.933,33	948,82	1.378,08	1.307,16	3.266,23	1.689,87	2.778,02	1.103,79	1.303,82
6	ROS1: Exon 14/43	549,71	1.511,78	727,70	1.082,87	999,90	2.577,11	1.327,01	2.144,95	899,58	1.029,15
6	ROS1: Exon 13/43	592,09	1.832,87	822,56	1.145,38	1.145,90	2.875,20	1.556,17	2.596,08	973,60	1.196,45
6	ROS1: Exon 12/43	703,37	2.101,58	1.027,36	1.405,40	1.475,05	3.432,23	1.837,66	3.125,34	1.185,98	1.435,07
6	ROS1: Exon 11/43	476,00	1.385,36	649,58	982,87	848,89	2.364,47	1.199,92	1.894,63	847,69	937,66
6	ROS1: Exon 10/43	567,81	1.615,11	759,29	1.249,93	1.038,80	2.799,20	1.476,04	2.233,70	973,19	1.074,54
6	ROS1: Exon 9/43	517,69	1.509,86	755,43	1.173,43	1.034,67	2.605,96	1.360,32	2.123,77	959,54	1.037,57
6	ROS1: Exon 8/43	437,99	1.194,20	545,01	914,42	887,78	2.131,61	1.179,45	1.971,54	736,37	872,22
6	ROS1: Exon 7/43	561,30	1.753,47	806,19	1.249,51	1.276,39	2.907,16	1.522,67	2.516,74	1.040,47	1.178,81
6	ROS1: Exon 6/43	557,27	1.613,79	765,35	1.151,03	1.176,05	2.641,71	1.452,36	2.451,12	951,60	1.096,82
6	ROS1: Exon 5/43	502,23	1.568,62	666,25	1.059,27	1.126,40	2.508,49	1.376,42	2.317,37	833,06	1.047,35
6	ROS1: Exon 4/43	496,85	1.406,65	729,19	1.092,40	1.024,62	2.572,25	1.313,89	2.172,35	773,78	1.014,82
6	ROS1: Exon 3/43	405,61	1.128,11	557,37	885,57	957,76	2.170,24	1.149,09	1.847,32	751,51	836,09
6	ROS1: Exon 2/43	392,30	1.108,25	598,01	912,60	831,62	2.104,70	1.090,42	1.696,33	735,36	790,10
6	ROS1: Exon 1/43	497,42	1.475,44	811,19	1.217,93	1.161,61	2.760,27	1.492,04	2.261,48	1.030,75	1.024,14
6	GRM1: Exon 8/8	573,20	1.621,77	785,43	1.242,92	1.039,79	2.614,30	1.498,72	2.567,48	958,46	1.065,06
6	ESR1: Exon 3/10	451,09	1.497,59	700,91	961,56	1.089,76	1.978,73	1.278,76	2.460,51	709,93	940,60
6	ESR1: Exon 4/10	501,07	1.603,86	822,08	1.191,82	1.103,97	2.760,90	1.405,58	2.534,44	990,56	1.100,86
6	ESR1: Exon 5/10	545,81	1.703,17	802,03	1.121,17	1.182,83	2.548,55	1.430,86	2.561,07	945,94	1.109,63
6	ESR1: Exon 6/10	549,68	1.696,03	801,20	1.194,93	1.123,43	2.720,51	1.466,73	2.576,54	935,63	1.121,84
6	ESR1: Exon 7/10	532,47	1.564,14	837,08	1.071,82	1.081,04	2.576,17	1.226,87	2.214,97	911,30	1.041,98
6	ESR1: Exon 8/10	569,81	1.779,35	889,82	1.327,26	1.373,07	2.994,48	1.507,18	2.726,33	1.083,55	1.208,03

**Tablo 4.8 (devam):** Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

6	ESR1: Exon 9/10	587,15	1.843,92	969,24	1.375,19	1.455,86	2.921,23	1.666,05	2.966,39	1.096,71	1.153,13
6	ESR1: Exon 10/10	571,41	1.785,02	845,14	1.196,83	1.186,04	2.826,05	1.592,05	2.809,59	1.005,14	1.189,05
	SYNE1: Exon										
6	138/146	545,09	1.713,16	879,27	1.158,89	1.261,70	2.799,01	1.633,14	2.771,94	1.038,90	1.194,72
7	BMPER: Exon 6/16	1.135,04	1.582,82	823,93	2.218,75	1.522,53	4.203,93	1.757,46	2.970,32	1.165,66	1.305,17
	ABCA13: Exon										
7	40/62	1.252,88	1.841,23	932,93	2.152,68	1.459,37	4.097,10	1.861,87	3.167,78	1.143,78	1.225,16
7	GRB10: Exon 4/17	1.154,87	1.751,71	872,26	2.189,46	1.437,84	3.911,29	1.950,29	3.349,14	1.140,06	1.240,36
7	EGFR: Exon 3/28	72.293,35	1.468,25	765,18	2.545,64	19.409,30	3.690,22	10.462,39	2.688,92	1.137,35	1.136,93
7	EGFR: Exon 7/28	75.862,61	1.543,60	862,88	2.607,34	5.616,28	3.918,75	5.380,71	2.991,48	991,04	1.117,57
7	EGFR: Exon 15/28	77.575,94	1.619,02	779,52	2.610,94	23.370,83	3.877,43	12.291,89	2.882,75	1.089,04	1.143,50
7	EGFR: Exon 18/28	77.143,19	1.588,23	837,37	2.555,13	23.869,57	3.794,89	12.268,00	2.947,97	1.105,18	1.187,80
7	EGFR: Exon 19/28	81.421,56	1.728,79	932,80	2.803,74	26.179,85	4.068,82	13.501,07	3.190,17	1.159,18	1.331,12
7	EGFR: Exon 20/28	86.851,73	1.929,43	978,92	3.017,38	28.478,40	4.482,83	15.680,72	3.756,96	1.307,17	1.403,83
7	EGFR: Exon 21/28	72.332,67	1.558,04	807,16	2.546,57	23.139,77	3.635,90	13.205,92	2.922,10	1.171,97	1.150,90
7	AP1S1: Exon 5/5	347,53	852,74	507,32	1.320,28	1.044,34	1.739,83	1.478,49	2.303,71	696,08	571,23
7	MET: Exon 2/21	1.536,97	2.241,54	1.157,47	3.171,76	2.022,03	5.331,51	2.201,11	3.936,63	1.681,30	1.676,09
7	MET: Exon 3/21	1.037,22	1.553,46	830,26	2.376,81	1.487,17	4.096,34	1.617,33	2.814,70	1.190,71	1.194,26
7	MET: Exon 4/21	956,52	1.472,74	796,16	2.029,09	1.354,53	3.565,63	1.520,22	2.707,61	1.100,22	1.082,45
7	MET: Exon 5/21	1.020,46	1.518,31	873,51	2.208,50	1.509,24	3.742,04	1.590,69	2.728,14	1.132,34	1.150,94
7	MET: Exon 6/21	1.057,08	1.649,42	914,21	2.403,51	1.686,63	4.167,00	1.732,09	3.030,45	1.190,79	1.305,04
	MET: Exon 7/21,										
7	Exon 8/21	1.196,44	1.702,02	940,96	2.662,21	1.795,49	4.373,87	1.742,71	3.117,70	1.351,53	1.353,80
7	MET: Exon 9/21	1.165,05	1.652,14	884,19	2.390,56	1.582,37	4.177,12	1.727,04	3.139,16	1.303,87	1.330,30
7	MET: Exon 10/21	983,20	1.412,31	795,83	2.074,01	1.420,69	3.724,36	1.505,16	2.577,76	1.106,57	1.077,73
7	MET: Exon 11/21	1.019,88	1.571,49	864,17	2.462,08	1.588,78	4.073,50	1.637,26	2.760,61	1.209,83	1.192,86
7	MET: Exon 12/21	1.042,84	1.589,19	921,09	2.387,68	1.576,09	3.963,81	1.590,00	2.713,53	1.346,30	1.166,21
	MET: Exon 13/21,										
7	Exon 14/21	1.078,77	1.611,88	865,70	2.479,42	1.767,10	4.044,38	1.694,36	2.887,20	1.346,80	1.226,87
7	MET: Exon 15/21	1.102,03	1.739,11	971,27	2.607,15	1.673,35	4.358,45	1.952,42	3.241,29	1.553,53	1.240,02
7	MET: Exon 16/21	1.027,30	1.545,65	835,46	2.749,67	1.820,14	3.835,02	1.782,91	2.724,62	1.424,07	1.132,04
7	MET: Exon 17/21	998,54	1.488,71	863,52	2.322,68	1.637,46	3.769,73	1.631,39	2.702,71	1.298,07	1.069,99
7	MET: Exon 18/21	927,40	1.354,81	708,38	2.093,64	1.399,60	3.272,81	1.532,21	2.552,05	1.191,10	1.030,59
7	MET: Exon 19/21	985,71	1.575,11	848,46	2.331,59	1.763,91	3.792,47	1.670,34	2.847,12	1.277,99	1.126,39
	MET: Exon 20/21,										
7	Exon 21/21	1.026,68	1.628,55	860,02	2.274,46	1.594,04	3.918,64	1.805,31	3.026,43	1.150,83	1.230,98
7	PAX4: Exon 9/9	732,32	1.281,38	694,86	1.321,82	1.132,07	2.820,31	1.501,84	2.416,60	838,49	859,79
7	SMO: Exon 3/12	545,28	1.176,27	661,86	1.182,20	1.207,15	2.384,11	1.539,82	2.387,84	756,67	772,79
7	SMO: Exon 5/12	597,65	1.274,83	685,86	1.310,79	1.238,61	2.849,26	1.644,79	2.737,70	811,52	837,06
7	SMO: Exon 6/12	539,38	1.165,28	681,61	1.147,02	1.215,34	2.549,58	1.559,35	2.404,06	681,05	748,18
7	SMO: Exon 9/12	540,14	1.100,72	621,56	1.092,43	1.001,84	2.180,94	1.439,90	2.381,63	702,75	741,86
7	SMO: Exon 11/12	592,33	1.224,33	685,31	1.206,44	1.265,82	2.432,64	1.628,65	2.737,20	811,64	822,82
7	BRAF: Exon 15/18	723,69	1.224,55	727,06	1.710,84	1.396,76	3.288,63	1.426,20	2.234,29	920,38	875,94
7	BRAF: Exon 11/18	807,29	1.381,09	830,33	1.868,41	1.594,75	3.939,60	1.608,94	2.596,39	1.045,26	1.033,32
7	EZH2: Exon 16/20	1.084,00	1.776,66	954,27	1.970,63	1.724,83	4.322,46	2.013,45	3.293,86	1.216,38	1.249,05
8	FGFR1: Exon 7/18	444,53	1.289,40	784,85	1.314,44	1.062,30	2.039,51	1.597,68	2.432,63	747,56	1.062,31
8	FGFR1: Exon 4/18	490,69	1.440,37	825,05	1.417,95	1.084,85	2.275,92	1.632,56	2.360,15	791,28	1.159,84
8	PDPI: Exon 3/3	569,67	1.378,22	802,19	1.580,07	1.033,41	2.705,59	1.559,51	2.321,05	941,11	1.225,93
8	FZD6: Exon 4/7	658,58	1.538,83	856,59	1.853,17	1.286,74	3.107,29	1.506,57	2.375,52	1.034,91	1.412,67
9	JAK2: Exon 14/25	750,62	942,00	874,77	1.903,28	1.130,83	3.393,82	1.502,67	2.329,14	1.014,81	1.088,55
9	JAK2: Exon 16/25	551,90	765,40	663,10	1.562,02	972,17	2.488,80	1.216,54	1.884,27	822,12	831,00
	CDKN2A: Exon										
9	2/3	126,45	341,64	291,42	574,89	365,22	2.428,42	1.204,86	1.652,84	507,31	1.015,50
9	TEK: Exon 13/23	429,19	870,48	802,53	1.190,61	708,69	2.759,66	1.273,62	2.199,92	940,87	996,88
	TRPM6: Exon										
9	17/39	541,09	1.319,55	837,08	1.491,87	1.104,74	2.506,56	1.430,02	2.288,48	811,66	911,45
9	GNAQ: Exon 5/7	667,14	1.542,65	853,07	1.821,95	1.058,74	2.959,39	1.552,21	2.344,45	1.048,22	1.077,04
9	GNAQ: Exon 4/7	656,06	1.560,32	898,42	1.709,02	1.050,83	2.967,42	1.552,71	2.345,09	919,63	968,41
9	FBP1: Exon 7/7	388,93	1.206,34	748,33	1.161,09	845,15	1.963,36	1.305,79	1.963,71	632,00	739,48
9	TDRD7: Exon 2/17	555,18	1.254,60	742,07	1.279,85	842,75	2.291,66	1.267,72	1.886,86	793,55	829,86
9	ALDOB: Exon 9/9	638,90	1.338,94	761,02	1.447,00	902,59	2.602,59	1.309,83	1.932,72	788,62	937,38
9	ABL1: Exon 4/11	534,50	1.595,18	1.039,34	1.689,79	1.312,63	2.611,04	1.587,11	2.723,51	893,44	948,95
9	ABL1: Exon 5/11	469,35	1.347,60	791,73	1.411,09	993,17	2.095,21	1.277,19	2.284,02	811,73	870,47
9	ABL1: Exon 6/11	584,96	1.699,26	915,65	1.539,10	1.220,67	2.318,81	1.524,16	2.760,15	844,20	1.004,32
9	ABL1: Exon 7/11	443,15	1.271,74	738,63	1.180,92	937,72	1.925,97	1.254,92	2.270,29	708,82	798,25
9	TSC1: Exon 15/23	441,38	1.141,80	735,72	1.169,94	873,21	2.016,93	1.126,96	2.003,56	640,72	734,71
9	ADAMTS13: Ex15	519,29	1.471,40	868,52	1.419,42	1.055,25	2.305,63	1.618,60	2.691,73	795,87	972,77

**Tablo 4.8 (devam):** Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

9	NOTCH1: Exon 34/34	528,65	1.337,61	783,54	1.301,43	1.056,94	1.840,20	1.919,24	2.945,31	823,44	933,91
9	NOTCH1: Exon 27/34	559,29	1.474,73	902,12	1.268,38	984,96	1.841,18	2.091,02	3.316,41	886,29	1.099,92
9	NOTCH1: Exon 26/34	681,36	1.617,19	1.063,02	1.760,19	1.335,08	2.367,65	2.534,20	3.755,82	1.026,19	1.118,88
10	RET: Exon 10/20	505,53	1.022,28	514,41	1.011,28	672,93	1.226,63	1.573,19	2.859,05	696,24	712,06
10	RET: Exon 11/20	573,10	1.235,40	630,53	1.245,95	957,11	1.547,08	1.968,43	3.639,56	869,84	937,80
10	RET: Exon 13/20	532,16	1.063,59	585,74	1.087,27	771,18	1.371,55	1.728,61	3.193,24	822,61	795,96
10	RET: Exon 15/20	422,85	899,24	460,45	998,61	770,33	1.254,81	1.510,53	2.584,20	723,09	718,11
10	RET: Exon 16/20	442,20	990,31	431,24	1.080,18	701,12	1.268,46	1.452,87	2.566,37	719,23	666,25
10	MYPN: Exon 10/20	300,91	764,59	620,08	873,68	592,96	1.150,02	1.195,22	2.085,51	577,01	492,78
10	ASCC1: Exon 13/13	338,72	874,42	677,25	893,19	635,98	1.153,82	1.173,50	2.023,35	659,17	599,74
10	KCNMA1: Exon 4/27	459,18	925,47	678,42	1.095,26	697,99	1.425,31	1.249,27	2.191,78	724,89	657,36
10	CDHR1: Exon 15/17	510,82	1.041,96	763,33	1.083,51	709,02	1.466,93	1.504,79	2.624,99	693,51	723,95
10	PTEN: Exon 1/9	414,12	845,05	634,92	1.243,21	733,25	1.397,52	1.724,76	2.590,75	890,84	666,36
10	PTEN: Exon 2/9	355,62	650,79	524,45	908,19	575,73	1.214,52	964,72	1.593,10	534,29	539,53
10	PTEN: Exon 3/9	453,25	902,18	587,78	1.224,29	775,90	1.472,55	1.163,06	2.082,47	843,07	702,10
10	PTEN: Exon 4/9	397,48	756,74	603,02	1.075,45	568,14	1.334,94	1.098,94	1.884,44	703,10	554,54
10	PTEN: Exon 5/9	380,87	293,29	577,39	985,33	657,77	1.233,92	1.057,66	1.826,50	690,87	593,20
10	PTEN: Exon 6/9	494,50	994,57	725,50	1.168,16	749,23	1.546,58	1.319,23	2.452,50	802,57	725,79
10	PTEN: Exon 7/9	483,03	972,41	708,81	1.265,90	734,14	1.488,04	1.313,40	2.309,39	816,82	690,25
10	PTEN: Exon 8/9	359,30	762,14	521,99	1.110,96	737,76	1.119,91	1.063,75	1.913,17	636,20	563,62
10	PTEN: Exon 9/9	240,17	487,79	331,20	642,96	380,54	812,16	671,65	1.203,78	431,51	363,18
10	PLCE1: Exon 2/33	520,90	1.082,74	800,25	1.328,69	809,28	1.642,93	1.404,70	2.463,49	827,74	742,35
10	CYP17A1: Exon 1/8	251,20	610,15	535,52	751,83	537,34	943,47	1.099,62	1.869,15	507,75	441,73
10	CNNM2: 3' Flanking	328,31	781,45	607,32	797,96	712,10	1.065,95	1.127,47	1.958,39	539,63	539,15
10	COL17A1: Exon 14/56	545,05	995,22	795,80	1.070,89	729,58	1.531,78	1.420,43	2.523,63	729,02	715,23
10	GPAM: Exon 16/22	511,06	918,21	763,50	1.037,04	589,40	1.383,54	1.203,87	2.241,27	677,06	658,50
10	FGFR2: Exon 12/18	408,43	859,53	668,35	959,34	647,91	1.257,73	1.283,71	2.213,43	661,24	612,90
10	FGFR2: Exon 9/18	389,56	832,52	681,04	999,14	666,90	1.337,69	1.283,49	2.298,80	660,17	617,32
10	FGFR2: Exon 7/18	458,26	1.061,46	793,04	1.119,28	822,87	1.474,26	1.470,32	2.634,70	745,25	718,40
11	HRAS: Exon 3/5	361,65	1.051,69	478,14	1.119,38	872,73	808,83	2.148,00	2.802,18	727,32	547,45
11	HRAS: Exon 2/5	309,06	920,26	376,09	1.078,53	861,08	736,30	1.827,92	2.171,86	638,23	463,59
11	ILK: Exon 4/13	583,34	1.497,54	577,77	1.718,61	1.176,93	1.408,01	1.835,59	2.717,34	988,86	760,15
11	SOX6: Exon 7/16	659,35	1.312,17	491,50	1.504,28	859,32	1.486,63	1.239,67	1.707,13	759,37	627,28
11	FSHB: Exon 3/3	573,03	1.152,25	455,27	1.304,35	790,66	1.300,43	1.199,18	1.869,06	731,66	661,07
11	ATM: Exon 8/63	457,12	1.096,36	408,78	1.189,97	834,76	1.087,10	1.042,10	1.659,46	700,06	599,03
11	ATM: Exon 9/63	506,16	1.276,55	509,25	1.480,53	1.105,13	1.428,59	1.327,06	2.149,63	895,26	684,83
11	ATM: Exon 12/63	507,65	1.273,71	499,37	1.579,63	1.066,50	1.385,38	1.347,78	1.887,71	898,39	766,23
11	ATM: Exon 17/63	616,84	1.406,48	603,94	1.501,11	1.026,22	1.455,06	1.537,66	2.193,29	876,74	767,51
11	ATM: Exon 26/63	548,08	1.404,43	580,04	1.691,57	1.122,43	1.512,00	1.445,94	2.216,17	925,29	783,61
11	ATM: Exon 34/63	568,88	1.357,29	513,13	1.524,58	935,01	1.399,60	1.278,15	2.111,53	834,20	674,24
11	ATM: Exon 35/63	569,12	1.388,70	586,92	1.786,62	1.144,97	1.523,57	1.386,54	2.115,25	869,47	732,94
11	ATM: Exon 36/63	646,11	1.564,19	595,62	1.793,67	1.203,14	1.527,54	1.510,83	2.327,16	959,87	761,63
11	ATM: Exon 39/63	460,22	1.160,58	479,67	1.543,62	942,47	1.361,01	1.198,74	1.815,08	772,91	601,84
11	ATM: Exon 50/63	536,24	1.247,21	471,55	1.375,97	989,84	1.393,35	1.230,21	1.967,87	805,02	640,99
11	ATM: Exon 54/63	425,91	1.042,65	424,49	1.350,95	883,74	1.145,72	1.041,79	1.552,03	686,23	538,97
11	ATM: Exon 55/63	552,75	1.405,89	518,49	1.617,63	1.110,08	1.454,34	1.345,20	2.039,49	874,56	681,69
11	ATM: Exon 56/63	500,09	1.205,55	484,59	1.552,92	1.000,25	1.410,94	1.293,00	1.970,19	777,10	643,72
11	ATM: Exon 59/63	476,30	1.188,41	475,38	1.553,72	912,27	1.340,71	1.251,08	1.907,41	749,10	629,10
11	ATM: Exon 61/63	520,63	1.319,79	528,57	1.431,09	1.018,94	1.396,36	1.378,18	2.105,43	785,38	706,08
11	ATM: Exon 63/63	647,97	1.537,94	637,60	1.639,42	1.242,16	1.483,66	1.561,48	2.397,39	854,94	774,97
12	WNK1: Exon 19/28	533,24	1.281,90	698,01	1.446,97	1.041,37	2.482,54	1.442,31	2.679,59	899,69	663,98
12	AICDA: Exon 4/5	459,28	1.143,17	559,45	1.530,16	1.103,16	2.132,69	1.285,88	2.253,24	877,19	614,52
12	KRAS: Exon 4/6	569,41	1.256,47	614,06	1.530,16	911,93	2.399,25	1.187,07	2.271,29	1.002,09	691,82
12	KRAS: Exon 3/6	575,27	1.157,88	624,92	1.435,33	935,23	2.574,58	1.282,91	2.399,09	1.021,81	709,71
12	KRAS: Exon 2/6	638,83	1.342,73	688,14	1.644,84	986,28	2.581,33	1.414,89	2.812,03	1.133,19	735,92
12	SCN8A: Exon 27/27	647,67	1.504,80	769,05	1.514,95	1.195,40	2.373,77	1.601,84	3.092,00	1.035,53	778,54
12	PTPN11: Exon 3/16	398,19	1.093,85	569,37	1.320,02	1.016,32	1.893,99	1.439,28	2.422,79	817,44	608,74

**Tablo 4.8 (devam):** Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

12	PTPN11: Exon 13/16	388,22	1.141,34	610,82	1.285,04	1.022,94	2.001,95	1.447,70	2.486,46	824,76	629,65
12	HNF1A: Exon 3/10	468,28	1.459,05	716,19	1.358,36	1.224,45	2.012,31	1.653,71	3.045,86	847,35	718,21
12	HNF1A: Exon 4/10	459,09	1.308,80	674,24	1.333,58	1.144,67	1.999,59	1.574,39	2.837,64	833,22	756,34
13	FLT3: Exon 20/24	416,63	1.353,37	599,09	954,54	1.134,58	1.229,36	1.494,15	2.813,37	804,51	800,34
13	FLT3: Exon 16/24	386,63	1.085,68	518,79	871,16	1.053,07	1.023,66	1.258,25	2.474,44	720,36	715,81
13	FLT3: Exon 14/24	312,96	1.064,14	443,24	809,14	951,47	931,75	1.233,79	2.266,31	682,51	646,08
13	FLT3: Exon 11/24	338,72	1.088,32	464,99	773,59	873,44	927,80	1.275,13	2.340,53	713,81	639,35
13	RB1: Exon 4/27	509,82	1.219,42	441,50	978,78	928,03	1.225,60	1.153,05	2.147,03	867,44	493,93
13	RB1: Exon 6/27	521,36	1.186,95	454,26	1.309,93	1.229,88	1.274,34	1.268,35	2.257,47	965,57	530,92
13	RB1: Exon 8/27	488,56	1.170,13	465,38	1.101,12	965,82	1.283,45	1.229,84	2.211,19	888,43	488,95
13	RB1: Exon 10/27	490,36	1.213,05	480,53	1.194,48	1.123,89	1.288,45	1.258,49	2.214,36	900,88	508,30
13	RB1: Exon 11/27	380,10	930,48	338,44	860,13	867,61	989,85	1.009,68	1.781,34	667,09	428,57
13	RB1: Exon 14/27	508,27	1.316,93	563,59	1.167,49	1.310,15	1.335,83	1.281,17	2.262,14	891,04	561,29
13	RB1: Exon 17/27	580,46	1.446,78	563,15	1.230,78	1.155,67	1.494,94	1.451,58	2.705,34	1.025,55	555,34
13	RB1: Exon 18/27	495,36	1.213,58	462,85	1.042,14	970,42	1.227,13	1.274,41	2.344,90	904,90	506,35
13	RB1: Exon 20/27	536,98	1.272,64	505,93	994,19	950,96	1.280,83	1.348,08	2.422,24	830,43	503,70
13	RB1: Exon 21/27	591,02	1.271,03	484,54	1.164,27	1.166,80	1.365,54	1.418,88	2.484,38	955,99	561,92
13	RB1: Exon 22/27, Exon 23/27	618,74	1.474,15	578,72	1.200,66	1.157,61	1.399,92	1.476,60	2.761,13	915,19	596,47
14	L2HGDH: Exon 2/10	450,00	1.227,45	488,36	954,78	1.143,83	2.098,04	1.370,59	2.061,41	805,34	530,82
14	SYNE2: Exon 94/116	562,20	1.301,42	487,61	915,70	1.015,80	2.303,69	1.398,24	2.162,02	724,48	576,55
14	LTBP2: Exon 14/36	591,31	1.317,15	480,12	898,87	909,25	1.952,62	1.387,78	2.230,72	731,73	560,42
14	FLVCR2: Exon 1/10	613,99	1.542,43	633,94	1.309,38	1.342,22	2.701,17	1.873,05	2.742,12	926,71	669,34
14	AKT1: Exon 7/15, Exon 8/15	724,00	1.061,54	356,56	604,12	658,64	1.195,98	1.275,71	2.140,44	560,12	476,07
14	AKT1: Exon 4/15	1.118,65	1.548,17	576,31	943,68	1.015,99	1.878,93	1.999,45	3.135,08	880,18	701,58
15	SLC12A6: Exon 22/25	360,99	732,75	468,05	1.301,60	1.055,11	1.828,86	1.336,76	2.032,69	751,65	636,25
15	MAP2K1: Exon 2/11	432,88	874,90	595,80	1.041,42	1.153,73	2.087,87	1.491,66	2.307,67	748,85	745,30
15	MAP2K1: Exon 3/11	380,80	786,74	521,64	892,17	1.135,51	1.965,02	1.474,57	2.206,61	751,08	692,51
15	MAP2K1: Exon 6/11	364,34	715,44	474,07	789,10	859,04	1.582,67	1.324,41	2.018,71	640,17	580,21
15	MAP2K1: Exon 7/11	466,35	880,98	601,58	973,40	1.101,29	2.019,00	1.609,08	2.466,45	791,52	714,20
15	MAP2K1: Exon 11/11	427,70	870,28	549,76	1.050,77	1.144,86	2.156,18	1.515,50	2.307,52	772,35	703,07
15	ACAN: Exon 12/18 A	417,34	795,96	397,74	1.143,01	890,24	1.591,08	1.246,89	2.430,02	614,92	699,80
15	ACAN: Exon 12/18 B	534,74	903,97	544,39	1.461,55	1.162,62	2.066,17	1.534,12	2.972,70	763,82	793,50
15	IDH2: Exon 4/11, Exon 5/11	441,02	960,96	590,95	1.428,92	1.146,18	1.862,46	1.746,87	3.238,76	734,58	798,06
16	CDH3: Exon 7/16	337,17	1.177,29	716,63	742,97	938,75	1.539,62	1.317,90	2.046,37	611,82	555,91
16	CDH3: Exon 15/16	356,63	1.175,19	751,56	760,57	964,41	1.684,65	1.479,42	2.209,22	670,42	574,66
16	CDH1: Exon 3/16	364,37	1.039,82	721,90	773,15	959,71	1.635,14	1.323,98	2.032,68	650,92	513,51
16	CDH1: Exon 8/16	391,48	1.130,55	787,26	768,38	964,40	1.752,09	1.416,80	2.103,27	662,43	579,98
16	CDH1: Exon 9/16	329,72	1.112,51	710,19	789,79	988,90	1.619,82	1.367,18	2.056,49	649,20	534,26
16	AARS: Exon 7/21	422,56	1.285,22	827,47	871,78	1.022,34	1.785,27	1.642,26	2.448,50	740,69	666,51
16	COG4: Exon 5/19	460,12	1.281,46	824,81	877,97	1.013,24	1.807,00	1.442,31	2.217,84	737,12	674,81
17	YBX2: Exon 8/9, Exon 9/9	342,12	896,32	651,44	983,44	1.012,96	1.467,61	1.833,87	3.374,08	887,35	809,15
17	TP53: Exon 11/11	212,18	653,10	405,76	775,79	935,25	1.144,71	1.452,84	2.433,07	663,19	573,63
17	TP53: Exon 10/11	285,66	777,96	540,07	914,56	1.003,71	1.372,19	1.653,65	2.812,22	786,61	647,56
17	TP53: Exon 8/11, Exon 9/11	293,17	844,06	568,53	943,85	1.234,65	1.397,25	1.637,27	2.904,33	799,91	695,00
17	TP53: Exon 7/11	257,98	842,15	589,54	910,14	1.111,14	1.416,25	1.739,22	2.922,13	768,36	670,89
17	TP53: Exon 5/11, Exon 6/11	319,72	812,90	587,80	984,17	1.306,11	1.459,47	1.794,07	3.156,69	826,06	720,91
17	TP53: Exon 2/11, Exon 3/11, Exon 4/11	223,71	595,86	413,52	663,39	930,71	994,31	1.299,82	2.186,14	595,46	553,02
17	MYH3: Exon 34/41	347,84	1.357,70	553,30	1.058,22	1.258,36	1.765,28	1.606,06	2.829,90	798,20	787,49
17	MYH3: Exon 25/41	379,96	1.485,21	617,12	1.073,65	1.218,84	1.904,60	1.623,40	2.994,27	880,92	856,96
17	ERBB2: Exon 8/27	360,78	1.357,93	635,13	892,45	1.129,14	1.624,65	1.800,67	3.068,46	839,97	749,33

**Tablo 4.8 (devam):** Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

17	ERBB2: Exon 19/27	279,70	1.114,50	505,16	773,06	1.020,07	1.302,39	1.449,18	2.659,44	677,60	685,49
17	ERBB2: Exon 20/27	338,17	1.326,45	589,28	867,67	1.113,91	1.503,65	1.708,22	2.888,19	746,50	726,41
17	ERBB2: Exon 21/27	350,12	1.278,55	536,95	799,29	964,34	1.356,71	1.555,24	2.781,53	735,51	693,94
17	ITGA2B: Exon 30/30	261,82	1.032,33	704,28	656,42	897,89	1.109,75	1.318,03	2.490,41	622,10	564,94
17	COG1: Exon 2/14	557,06	1.523,35	950,99	1.506,35	1.216,17	1.690,33	1.903,54	3.366,16	907,04	824,37
17	COG1: Exon 7/14	512,35	1.420,36	947,64	1.479,68	1.120,01	1.624,26	1.620,29	3.060,94	872,14	724,32
18	AFG3L2: Exon 11/17, Exon 12/17	331,17	957,93	467,50	955,21	742,46	1.424,89	1.101,86	1.539,08	530,15	736,44
18	MYO5B: Exon 17/40	888,98	1.901,20	910,09	1.731,64	1.206,46	2.855,97	1.507,38	2.588,66	944,61	1.365,32
18	SMAD4: Exon 3/12	517,95	1.224,73	673,98	1.674,39	1.074,31	2.406,75	1.303,91	1.998,97	841,30	925,18
18	SMAD4: Exon 4/12	468,30	1.151,13	509,25	1.497,58	958,18	2.077,68	1.193,75	1.732,73	819,19	902,06
18	SMAD4: Exon 5/12	615,39	1.262,42	645,25	1.598,83	1.044,68	2.365,14	1.335,15	2.057,70	888,43	1.019,77
18	SMAD4: Exon 6/12	569,74	1.361,18	709,45	1.530,82	987,59	2.294,14	1.361,80	2.120,19	849,93	998,10
18	SMAD4: Exon 8/12	540,95	1.225,71	625,15	1.721,80	1.123,30	2.377,49	1.329,71	2.046,00	798,84	992,35
18	SMAD4: Exon 9/12	607,72	1.466,19	696,40	1.606,61	990,41	2.471,41	1.393,34	2.268,97	893,87	990,91
18	SMAD4: Exon 10/12	582,71	1.387,74	705,68	1.627,95	1.040,79	2.277,82	1.361,31	2.156,04	861,04	1.034,79
18	SMAD4: Exon 11/12	525,42	1.233,73	613,62	1.526,98	896,02	2.035,95	1.169,01	1.886,39	741,55	880,13
18	SMAD4: Exon 12/12	693,54	1.613,12	841,34	1.820,77	1.196,23	2.706,22	1.573,43	2.491,40	955,04	1.175,25
19	STK11: Exon 1/10	769,08	1.186,89	726,56	1.260,33	1.273,40	1.551,36	2.657,66	3.264,51	891,95	788,63
19	STK11: Exon 4/10, Exon 5/10	1.059,36	1.651,41	954,45	1.569,68	1.691,55	1.950,63	2.598,60	4.235,09	964,22	1.050,71
19	STK11: Exon 6/10	796,77	1.220,36	705,59	1.257,13	1.337,77	1.544,27	2.169,35	3.455,16	786,91	929,85
19	STK11: Exon 8/10	946,70	1.531,90	924,67	1.574,37	1.663,23	1.890,12	2.698,55	4.424,09	1.012,33	1.122,15
19	GNA11: Exon 4/7	414,23	1.025,90	708,59	1.054,78	1.093,11	1.362,88	1.718,25	2.952,78	562,93	599,33
19	GNA11: Exon 5/7	343,73	884,62	561,61	994,30	1.118,05	1.321,54	1.602,31	2.728,73	593,14	642,12
19	MAP2K2: Exon 11/11	374,84	1.121,79	667,12	1.077,29	1.278,34	1.482,29	1.678,41	2.962,98	672,71	719,15
19	MAP2K2: Exon 10/11	334,92	941,10	638,02	993,28	1.158,88	1.248,17	1.597,35	2.638,14	565,98	586,61
19	MAP2K2: Exon 9/11	399,75	1.240,78	801,81	1.221,07	1.241,61	1.661,10	1.906,90	3.070,40	669,23	698,12
19	MAP2K2: Exon 8/11	370,84	1.097,56	628,59	1.141,45	1.257,76	1.473,71	1.720,78	2.679,96	675,06	713,61
19	MAP2K2: Exon 7/11	472,59	1.466,98	914,97	1.338,75	1.541,91	1.800,85	2.099,29	3.598,13	773,91	847,98
19	MAP2K2: Exon 5/11, Exon 6/11	195,03	607,63	360,60	556,04	696,49	765,42	980,58	1.679,31	326,42	359,47
19	MAP2K2: Exon 4/11	445,54	1.255,54	854,22	1.349,94	1.476,84	1.716,98	2.003,70	3.347,87	719,77	724,86
19	MAP2K2: Exon 3/11	411,14	1.178,09	746,39	1.305,04	1.602,16	1.679,29	1.920,61	3.116,92	700,30	726,56
19	MAP2K2: Exon 2/11	312,63	984,82	622,72	1.000,40	1.269,42	1.351,76	1.484,52	2.498,94	550,22	606,99
19	MAP2K2: Exon 1/11	141,39	539,16	335,77	513,37	672,73	665,40	1.015,60	1.730,36	539,10	459,06
19	DNASE2: Exon 4/6	524,96	1.242,54	795,59	1.291,23	1.600,21	1.843,37	2.082,01	3.117,34	773,41	712,56
19	CACNA1A: Exon 8/47	333,95	1.096,92	665,48	1.100,76	1.203,94	1.668,34	1.314,20	2.146,53	620,09	636,13
19	CALR3: Exon 8/9	389,66	1.070,63	648,28	1.117,92	1.492,38	1.681,70	1.605,88	2.456,49	728,18	702,37
19	JAK3: Exon 16/24	368,37	1.106,94	693,93	1.182,43	1.376,44	1.592,89	1.677,86	2.739,60	613,64	653,13
19	JAK3: Exon 13/24	247,21	784,04	477,16	795,10	928,05	1.192,29	1.186,44	2.006,80	455,62	489,46
19	JAK3: Exon 4/24	361,36	1.224,78	730,57	1.156,29	1.306,98	1.606,36	1.938,01	3.011,36	663,46	704,04
19	RYR1: Exon 50/106	350,15	1.148,73	708,02	1.106,22	1.373,84	1.587,34	1.448,14	2.461,81	589,54	642,96
20	TGM6: Exon 13/13	555,51	1.411,06	785,99	1.384,03	1.081,23	2.030,50	1.647,85	2.796,35	773,68	719,86
20	FERMT1: Exon 2/15	453,97	757,37	707,48	1.469,67	1.021,60	2.112,26	1.616,27	2.489,75	736,96	689,97
20	RIN2: Exon 8/11	615,78	1.520,11	836,67	1.686,22	1.055,28	2.248,51	1.654,21	2.890,36	977,96	764,19
20	RPN2: Exon 16/17	442,31	7.024,95	718,30	1.176,66	871,75	1.633,57	1.479,19	2.436,31	669,22	545,92
20	SRC: Exon 14/14	423,93	985,45	744,54	1.266,35	982,11	1.617,84	1.763,54	2.781,64	679,71	652,92
20	GNAS: Exon 8/13, Exon 9/13, Exon 10/13	606,41	1.094,03	846,05	1.560,30	1.132,97	2.000,88	1.849,81	3.161,96	983,97	810,55

**Tablo 4.8 (devam):** Doku örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

21	NDUFV3: Exon 3/4	507,76	1.161,48	773,51	1.228,72	987,35	1.916,09	1.578,55	2.794,02	784,82	927,74
21	COL18A1: Exon 17/41	639,02	1.374,38	804,08	1.329,94	986,55	1.791,07	1.839,02	3.429,13	877,03	1.198,66
21	PCNT: Exon 10/47	478,89	1.006,25	656,99	1.162,61	985,05	1.652,72	1.498,48	2.681,97	674,40	933,52
22	SERPIND1: Exon 5/5	479,82	1.401,64	894,35	1.458,99	751,09	2.252,54	1.626,52	2.429,73	654,39	897,22
22	SMARCB1: Exon 2/9	523,65	1.269,86	741,63	1.439,69	754,82	2.060,64	1.672,14	2.399,15	697,93	924,35
22	SMARCB1: Exon 4/9	536,69	1.297,96	756,67	1.340,43	690,81	2.022,55	1.789,22	2.628,19	661,25	903,64
22	SMARCB1: Exon 5/9	485,37	1.172,18	755,16	1.141,35	568,24	1.695,28	1.497,09	2.201,58	536,31	746,43
22	SMARCB1: Exon 9/9	548,72	1.273,70	730,55	1.303,00	643,77	1.924,37	1.712,13	2.602,63	592,61	839,00
22	TMPRSS6: Exon 13/18	496,75	1.356,83	807,09	1.272,26	738,00	1.828,95	1.433,86	2.271,54	517,78	868,66

**Tablo 4.9:** Likit örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

chr	Target	GBM-LİKİT-1	GBM-LİKİT-2	GBM-LİKİT-3	GBM-LİKİT-4	GBM-LİKİT-5	GBM-LİKİT-6	GBM-LİKİT-7	GBM-LİKİT-8	GBM-LİKİT-9	GBM-LİKİT-10
1	MTOR: Exon 58/58	113,32	119,90	370,44	317,11	287,17	318,30	571,46	1.600,75	543,85	82,08
1	MTOR: Exon 57/58	168,31	161,07	526,80	438,68	483,18	547,59	899,99	2.208,16	968,49	178,92
1	MTOR: Exon 56/58	162,27	144,65	452,35	353,59	362,55	373,69	722,50	1.760,90	728,62	104,20
1	MTOR: Exon 55/58	189,14	189,71	510,93	457,68	479,65	485,74	881,65	1.757,70	895,24	167,40
1	MTOR: Exon 54/58	199,10	273,92	465,16	398,25	450,29	539,27	763,62	2.044,33	781,83	140,34
1	MTOR: Exon 53/58	182,27	261,12	556,69	500,57	584,18	591,69	982,03	2.421,68	1.005,00	179,09
1	MTOR: Exon 52/58	182,02	182,76	463,96	421,73	412,46	431,65	793,54	1.763,12	788,53	138,59
1	MTOR: Exon 51/58	185,02	223,74	491,50	403,91	475,07	502,44	784,91	2.136,25	746,19	151,65
1	MTOR: Exon 50/58	134,40	149,62	394,10	320,95	384,83	338,52	599,07	1.640,07	629,07	100,01
1	MTOR: Exon 49/58	171,64	285,50	550,12	490,29	559,69	599,17	900,65	2.155,93	891,27	166,10
1	MTOR: Exon 48/58	196,91	287,47	530,53	480,93	555,23	635,15	932,98	2.197,95	972,50	174,15
1	MTOR: Exon 47/58	206,40	237,60	540,40	439,53	520,51	566,59	959,46	2.049,62	951,17	158,72
1	MTOR: Exon 46/58	204,69	240,73	571,88	483,86	562,07	523,14	908,67	1.961,83	1.032,21	181,02
1	MTOR: Exon 45/58	205,49	235,17	486,41	455,19	506,05	497,46	917,69	1.669,25	958,87	167,04
1	MTOR: Exon 43/58,										
1	Exon 44/58	218,78	277,84	560,39	493,07	568,80	601,62	1.047,22	1.920,58	1.040,17	186,82
1	MTOR: Exon 42/58	177,66	252,05	512,97	428,76	520,75	532,87	896,23	1.903,47	907,70	130,61
1	MTOR: Exon 41/58	191,78	212,04	499,05	413,40	516,29	495,77	895,10	2.006,33	975,20	166,75
1	MTOR: Exon 40/58	177,41	221,56	531,12	472,30	539,07	534,01	891,37	2.301,73	926,63	152,12
1	MTOR: Exon 39/58	219,55	338,89	552,29	508,05	573,69	642,88	946,55	1.933,15	963,64	163,09
1	MTOR: Exon 38/58	201,27	330,47	587,93	510,68	609,00	660,20	1.049,99	2.419,03	1.068,21	182,20
1	MTOR: Exon 37/58	198,98	276,76	555,98	514,23	607,17	667,97	1.013,88	2.361,70	1.003,54	188,66
1	MTOR: Exon 35/58,										
1	Exon 36/58	184,22	266,81	593,41	483,69	558,58	578,82	977,30	2.044,22	1.009,97	188,84
1	MTOR: Exon 34/58	204,65	310,90	588,95	524,13	560,18	582,74	939,22	2.022,61	1.015,84	189,42
1	MTOR: Exon 33/58	177,83	200,08	550,51	439,30	481,81	485,74	850,25	1.669,43	951,87	155,73
1	MTOR: Exon 32/58	192,59	274,47	529,99	492,13	564,44	558,99	947,41	2.308,56	929,76	170,73
1	MTOR: Exon 31/58	166,87	253,47	515,32	467,42	515,67	544,06	888,42	2.052,23	937,90	177,25
1	MTOR: Exon 30/58	205,38	252,05	589,52	507,00	586,27	626,57	1.016,99	2.405,20	1.028,77	167,30
1	MTOR: Exon 29/58	178,23	220,06	515,55	398,07	445,28	500,21	855,32	2.022,68	874,62	141,33
1	MTOR: Exon 27/58,										
1	Exon 28/58	236,30	295,85	615,13	561,52	624,86	628,76	1.123,79	2.065,20	1.163,60	207,51
1	MTOR: Exon 26/58	210,23	300,56	547,17	480,09	567,78	664,83	956,95	2.066,95	967,65	175,04
1	MTOR: Exon 25/58	171,79	197,79	496,08	440,99	505,79	494,76	979,85	2.037,95	991,62	165,87
1	MTOR: Exon 24/58	174,92	170,78	464,26	388,95	410,19	395,09	777,59	1.657,93	815,30	122,87
1	MTOR: Exon 23/58	189,59	258,48	546,49	473,58	556,96	643,16	993,98	2.147,67	997,39	180,56
1	MTOR: Exon 22/58	168,08	205,91	525,55	400,92	484,66	457,20	832,85	1.671,85	896,53	161,35
1	MTOR: Exon 21/58	202,78	260,19	521,96	463,92	526,56	529,45	909,99	1.979,05	951,98	174,80
1	MTOR: Exon 20/58	153,65	192,36	458,18	381,95	421,22	447,09	819,19	2.041,26	875,13	152,90
1	MTOR: Exon 19/58	233,69	297,73	635,00	548,13	635,13	680,07	1.177,29	2.315,81	1.190,83	204,77
1	MTOR: Exon 18/58	200,17	246,28	534,98	458,77	540,36	524,52	1.001,48	1.997,03	972,39	187,16
1	MTOR: Exon 17/58	178,66	228,01	553,82	475,63	529,40	554,52	933,50	2.098,73	891,21	160,68
1	MTOR: Exon 16/58	189,66	192,39	523,97	446,67	489,05	519,98	865,68	2.090,04	924,52	144,80
1	MTOR: Exon 15/58	173,82	170,57	468,18	380,21	426,54	425,89	816,01	1.734,75	842,79	148,63
1	MTOR: Exon 14/58	214,76	268,99	507,26	449,94	548,20	566,48	894,11	2.020,73	936,99	162,16

**Tablo 4.9 (devam): Likit örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.**

1	MTOR: Exon 13/58	233,35	338,28	614,13	594,81	679,46	732,75	1.115,08	2.158,52	1.117,22	205,64
1	MTOR: Exon 12/58	227,24	269,59	620,88	527,71	599,75	630,48	1.026,89	2.116,39	1.070,96	172,76
1	MTOR: Exon 11/58	222,21	341,00	601,19	600,98	666,28	670,73	1.129,62	2.097,52	1.211,17	219,16
1	MTOR: Exon 10/58	161,29	216,83	516,49	455,59	488,24	525,27	812,03	1.945,54	802,51	137,63
1	MTOR: Exon 9/58	221,99	309,80	570,61	480,94	583,61	600,93	1.001,03	2.131,76	1.025,97	160,40
1	MTOR: Exon 7/58,										
1	Exon 8/58	241,71	354,75	639,82	604,42	663,11	695,17	1.146,54	2.049,65	1.273,00	229,50
1	MTOR: Exon 6/58	180,03	330,21	565,06	550,08	538,64	619,88	966,26	2.177,97	963,25	185,46
1	MTOR: Exon 5/58	215,24	262,31	547,59	513,21	575,10	640,79	975,90	2.201,06	1.001,59	171,43
1	MTOR: Exon 4/58	229,60	298,77	579,08	538,61	619,05	665,13	1.053,04	2.013,48	1.068,21	178,32
1	MTOR: Exon 3/58	149,24	163,24	464,16	370,95	426,22	408,99	792,98	1.982,51	852,64	136,93
1	MTOR: Exon 2/58	195,36	333,66	574,67	489,53	555,07	619,07	910,29	2.029,01	1.040,40	192,28
1	MPL: Exon 10/12	215,44	311,78	463,50	399,27	488,79	445,64	666,70	2.094,79	731,30	102,22
1	IL12RB2: Exon 16/16	194,13	317,53	583,02	512,24	594,04	735,10	1.215,69	2.760,20	1.091,29	190,50
1	NRAS: Exon 4/7	137,49	168,16	436,39	372,21	431,20	405,27	720,98	1.972,23	801,62	135,68
1	NRAS: Exon 3/7	125,66	114,54	316,79	284,91	270,88	316,40	555,39	1.297,57	665,37	89,91
1	NRAS: Exon 2/7	161,37	202,21	430,82	407,27	491,21	500,51	764,09	2.415,33	712,64	122,77
1	SPTA1: Exon 51/52	167,24	189,46	489,96	418,31	505,41	527,81	967,60	2.111,42	960,50	187,45
1	DDR2: Exon 18/19	160,10	157,79	407,05	340,90	382,36	382,54	668,88	1.993,90	661,60	97,90
1	ADCY10: Exon 11/33	188,60	215,76	455,14	448,02	499,88	602,26	842,66	2.374,33	906,25	160,47
1	NPHS2: Exon 8/8	154,83	242,69	521,64	457,91	528,87	602,86	914,49	2.523,76	950,15	156,98
1	LAMB3: Exon 4/23	159,24	245,45	491,15	456,32	488,39	572,55	908,21	2.636,01	891,32	169,65
1	IRF6: Exon 5/9	184,12	257,65	491,73	455,92	492,04	613,56	889,80	2.722,18	854,43	133,75
1	OBSCN: Exon 10/81	176,49	279,36	482,06	458,70	536,36	641,93	930,27	2.330,95	864,61	179,97
2	DNMT3A: Exon 23/23	166,65	244,60	413,11	400,26	518,68	507,38	756,77	2.481,91	701,12	126,55
2	ALK: Exon 25/29	208,71	257,09	541,95	519,45	638,76	645,89	1.056,93	2.361,75	1.045,57	195,12
2	ALK: Exon 23/29	216,87	347,10	569,91	478,43	616,37	679,96	967,54	2.474,30	931,24	173,72
2	SLC3A1: Exon 1/10	155,40	240,18	425,51	399,19	492,44	522,76	850,06	2.028,13	817,50	145,98
2	MSH6: Exon 5/10	251,10	266,38	541,89	483,96	539,06	554,30	993,15	1.993,07	1.079,78	183,29
2	FSHR: Exon 1/10	167,01	165,56	472,59	376,78	465,06	434,97	777,13	2.088,55	761,57	129,50
2	HK2: Exon 16/18	197,41	238,61	559,49	473,69	569,75	591,49	979,01	2.546,32	892,99	172,22
2	ABC11: Exon 24/28	175,01	221,98	507,43	467,16	479,42	534,46	873,38	2.315,03	935,55	163,46
2	LRP2: Exon 29/79	165,22	203,38	453,90	414,82	478,58	538,45	795,40	2.355,21	774,37	129,78
2	TTN: Exon 253/312 A	174,94	176,14	471,39	435,12	504,60	488,20	838,72	2.360,22	881,49	151,35
2	TTN: Exon 253/312 B	152,17	157,30	414,59	351,75	446,78	400,54	693,27	2.354,06	691,10	117,56
2	IDH1: Exon 4/10	196,75	194,91	489,58	410,48	474,20	440,23	839,00	2.284,39	923,64	165,03
2	ERBB4: Exon 23/28	150,97	147,12	393,32	325,76	386,66	376,13	675,15	2.177,90	739,59	109,78
2	ERBB4: Exon 15/28	167,89	211,00	457,51	452,08	484,62	471,83	830,44	2.523,53	873,90	136,91
2	ERBB4: Exon 9/28	142,66	156,11	414,79	349,51	422,73	389,05	771,89	2.101,58	838,14	123,89
2	ERBB4: Exon 8/28	166,01	154,88	431,72	394,74	453,58	376,41	752,20	2.193,39	808,13	140,75
2	ERBB4: Exon 7/28	119,12	123,04	354,76	320,11	372,84	358,78	725,86	2.078,62	656,17	111,65
2	ERBB4: Exon 6/28	158,28	212,05	479,57	431,90	489,10	486,51	851,82	2.738,27	811,36	134,83
2	ERBB4: Exon 4/28	122,05	90,68	392,11	329,16	387,00	309,74	698,48	2.214,41	708,03	107,96
2	ERBB4: Exon 3/28	176,46	177,66	483,48	411,85	477,34	391,24	903,54	2.503,80	906,80	145,87
2	ABCA12: Exon 43/53	157,61	168,36	469,47	394,57	484,01	469,40	828,31	2.183,96	863,73	131,71
2	NHEJ1: Exon 8/8	172,10	194,10	480,27	421,79	486,61	542,98	852,73	2.246,21	850,11	147,35
2	COL4A4: Exon 39/48	171,01	223,21	474,01	416,61	478,91	525,13	895,55	2.627,86	775,07	134,73
3	SUMF1: Exon 9/9	198,57	240,15	555,00	497,45	567,44	612,10	985,80	2.644,85	1.004,54	176,39
3	ITPR1: Exon 19/58	161,69	200,85	439,94	411,14	410,78	460,14	793,39	1.831,24	775,22	129,55
3	VHL: Exon 1/3	124,96	199,12	379,36	332,34	375,27	358,76	464,25	1.612,27	485,40	77,54
3	VHL: Exon 2/3	185,37	249,47	506,71	439,12	517,89	513,33	811,76	2.179,16	911,20	151,30
3	VHL: Exon 3/3	163,52	192,72	469,42	421,35	497,02	510,15	846,91	2.447,28	812,43	134,49
3	RAF1: Exon 15/17,										
3	Exon 16/17, Exon										
3	17/17	238,22	318,91	597,48	576,50	612,02	664,25	1.081,43	2.160,12	1.105,25	199,54
3	RAF1: Exon 14/17	181,74	192,45	541,21	448,91	505,44	502,93	877,05	2.094,48	893,98	144,36
3	RAF1: Exon 13/17	140,01	139,50	413,51	304,27	407,42	369,10	708,34	1.954,61	680,13	118,44
3	RAF1: Exon 12/17	232,04	270,52	546,96	504,07	567,93	614,38	939,29	2.080,11	947,93	152,32
3	RAF1: Exon 11/17	166,92	211,90	462,52	426,46	446,73	508,32	776,35	2.088,35	779,46	113,80
3	RAF1: Exon 10/17	189,68	245,32	534,33	441,99	499,57	491,76	886,08	1.932,82	950,22	166,99
3	RAF1: Exon 8/17,										
3	Exon 9/17	183,85	243,55	506,52	441,66	490,15	533,96	863,92	1.794,54	877,16	148,77
3	RAF1: Exon 7/17	174,78	263,33	497,45	441,96	472,11	561,98	880,80	2.191,51	923,80	163,47
3	RAF1: Exon 6/17	191,12	181,18	469,80	429,23	442,42	463,78	783,49	2.013,34	820,38	131,63
3	RAF1: Exon 5/17	202,09	188,55	556,55	451,94	451,05	463,98	892,39	2.227,62	961,25	164,58
3	RAF1: Exon 4/17	143,44	171,05	468,31	363,35	412,44	371,02	767,91	1.854,94	798,90	120,19

**Tablo 4.9 (devam): Likit örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.**

3	RAF1: Exon 3/17	161,98	182,32	448,69	412,99	479,58	496,46	811,30	2.238,19	841,66	133,14
3	RAF1: Exon 2/17	203,15	214,40	529,55	466,29	503,85	488,64	964,86	2.111,32	995,63	199,42
3	MLH1: Exon 12/19	189,51	171,55	353,89	328,78	361,08	385,67	624,49	1.639,72	538,87	89,86
3	CTNNB1: Exon 3/15	169,94	174,04	445,45	434,67	489,24	461,69	898,00	2.178,42	928,11	154,91
3	CXCR6: Exon 2/2	187,59	221,79	535,56	497,03	586,58	502,13	1.003,55	2.812,76	1.002,90	189,19
3	FOXJ2: Exon 1/1	157,00	226,49	373,05	335,11	370,49	412,67	553,76	1.671,18	511,15	94,51
3	GYG1: Exon 5/8	140,30	126,23	313,31	290,15	320,73	330,90	557,88	1.602,08	572,47	94,60
3	PIK3CA: Exon 2/21	178,07	188,40	491,11	429,50	449,22	434,73	924,48	2.149,10	995,43	157,16
3	PIK3CA: Exon 5/21	154,25	132,59	410,92	335,62	338,59	325,68	670,73	2.040,03	797,91	127,50
3	PIK3CA: Exon 7/21	164,29	159,73	418,60	363,91	382,51	383,54	679,83	1.974,63	769,22	121,88
3	PIK3CA: Exon 8/21, Exon 9/21	172,28	166,73	491,25	424,48	455,19	374,33	869,47	2.016,03	932,97	152,41
3	PIK3CA: Exon 10/21	109,63	108,78	295,92	254,33	254,97	280,12	537,23	1.453,05	552,43	83,96
3	PIK3CA: Exon 14/21	107,27	112,90	291,99	268,13	271,77	290,69	519,05	1.463,84	526,14	95,51
3	PIK3CA: Exon 19/21	158,65	146,42	360,19	335,22	387,81	363,31	696,14	2.246,08	753,56	127,37
3	PIK3CA: Exon 21/21	219,00	192,83	574,48	476,45	548,30	513,76	994,14	2.441,41	1.123,95	190,51
4	FGFR3: Exon 7/18	243,72	391,36	513,17	488,32	558,64	629,16	900,50	2.078,72	849,47	155,09
4	FGFR3: Exon 9/18	229,49	376,38	495,64	476,44	568,61	635,86	866,94	2.308,67	764,14	152,60
4	FGFR3: Exon 14/18, Exon 15/18	198,10	377,41	469,77	416,98	534,10	591,36	809,95	1.889,36	739,17	156,16
4	FGFR3: Exon 16/18	224,01	336,28	420,62	428,20	488,83	567,06	758,59	1.866,23	690,30	152,85
4	FGFR3: Exon 18/18	264,06	412,24	581,24	496,87	599,70	683,57	866,63	2.516,50	808,05	168,90
4	EVC: Exon 8/21	139,02	168,39	468,94	352,92	491,00	405,71	781,90	2.111,82	746,82	134,35
4	PDGFRA: Exon 12/23	161,55	161,34	424,77	375,13	417,47	407,16	743,09	2.079,77	747,87	128,33
4	PDGFRA: Exon 14/23	136,94	192,11	443,67	374,22	468,36	428,81	771,39	1.942,40	826,44	126,59
4	PDGFRA: Exon 15/23	179,25	180,82	418,55	351,81	380,84	392,58	735,10	1.779,65	714,30	117,57
4	PDGFRA: Exon 18/23	196,65	232,73	556,44	486,11	585,02	517,29	915,62	2.790,14	934,85	155,40
4	KIT: Exon 1/21	188,35	253,71	445,31	433,23	437,63	554,38	737,58	1.916,06	666,91	104,72
4	KIT: Exon 2/21	201,45	247,99	543,51	510,40	596,33	625,65	1.099,75	2.200,58	1.166,31	216,51
4	KIT: Exon 3/21	213,77	291,53	544,66	500,82	594,89	617,22	1.044,50	2.137,66	1.093,88	197,62
4	KIT: Exon 4/21	160,76	181,77	490,53	383,32	448,79	469,89	900,34	2.140,81	866,79	138,37
4	KIT: Exon 5/21	213,56	201,24	547,68	444,19	480,56	497,12	997,91	2.068,72	1.064,25	190,98
4	KIT: Exon 6/21	202,98	222,57	561,25	462,70	542,97	527,03	990,73	2.563,10	987,14	152,30
4	KIT: Exon 7/21	188,70	153,13	482,69	419,96	479,49	451,55	837,99	2.416,58	760,55	124,44
4	KIT: Exon 8/21	170,06	167,01	444,46	384,40	469,88	441,43	807,30	2.046,79	796,62	128,27
4	KIT: Exon 9/21	216,43	215,42	504,61	471,53	527,30	482,99	971,28	2.133,97	1.040,10	175,05
4	KIT: Exon 10/21, Exon 11/21	217,36	245,45	552,33	496,26	526,77	545,45	1.065,04	2.037,55	1.127,50	187,08
4	KIT: Exon 12/21, Exon 13/21	226,79	226,12	581,08	539,02	567,86	610,32	1.094,19	2.068,33	1.184,97	194,67
4	KIT: Exon 14/21	183,04	187,86	490,27	403,80	494,34	455,91	952,72	2.243,27	978,64	173,12
4	KIT: Exon 15/21	166,29	210,29	506,56	457,93	525,23	492,21	1.004,91	2.368,95	1.004,05	143,96
4	KIT: Exon 16/21	168,15	186,93	401,86	346,51	418,79	430,36	792,87	1.640,59	820,11	146,47
4	KIT: Exon 17/21	166,64	159,60	436,20	387,48	446,02	360,71	769,90	2.078,34	891,73	127,43
4	KIT: Exon 18/21, Exon 19/21	235,83	243,96	588,58	509,47	570,56	584,24	1.167,77	2.182,72	1.163,68	185,79
4	KIT: Exon 20/21	191,27	235,16	457,71	459,21	505,42	517,72	968,77	2.165,96	998,19	159,66
4	KIT: Exon 21/21	202,60	218,81	467,58	458,37	508,24	559,99	877,21	2.139,19	924,82	145,64
4	KDR: Exon 30/30	201,69	269,86	507,15	459,33	562,55	548,95	953,58	2.192,86	862,24	159,37
4	KDR: Exon 27/30	172,88	263,65	440,65	391,01	502,03	540,45	879,09	2.395,31	850,42	141,35
4	KDR: Exon 26/30	165,82	199,25	428,76	360,68	403,56	468,57	788,21	1.916,77	782,88	132,47
4	KDR: Exon 21/30	142,23	241,65	487,38	437,90	577,73	546,49	966,67	2.381,41	872,82	156,70
4	KDR: Exon 19/30	171,13	204,44	457,78	415,54	483,53	459,03	809,20	2.294,87	864,55	140,97
4	KDR: Exon 11/30	199,05	163,14	428,42	343,96	441,17	385,01	730,09	1.874,74	795,72	126,91
4	KDR: Exon 7/30	150,94	171,55	439,15	373,99	452,15	440,50	807,30	2.133,85	789,66	151,45
4	KDR: Exon 6/30	158,14	171,74	427,68	350,42	441,40	398,65	737,90	2.208,73	708,08	124,36
4	ARHGAP24: Exon 4/10	165,35	169,34	482,27	417,66	479,66	508,48	814,27	2.377,15	885,15	146,47
4	ARHGAP24: Exon 9/10	206,87	282,13	575,03	540,78	620,94	615,75	1.036,25	2.509,91	1.066,73	186,14
4	DSPP: Exon 4/5	125,40	154,57	360,00	317,77	320,80	370,38	651,29	1.765,07	588,07	99,73
4	FBXW7: Exon 11/12	158,18	136,13	452,94	385,77	433,91	396,12	764,90	2.252,20	856,96	140,91
4	FBXW7: Exon 10/12	176,39	179,99	413,07	384,46	412,09	412,56	733,61	1.818,09	818,53	122,84
4	FBXW7: Exon 9/12	153,63	152,91	450,34	363,26	450,02	424,83	766,47	2.094,62	840,72	140,53
4	FBXW7: Exon 8/12	114,09	115,80	407,75	339,29	405,29	343,09	675,05	2.016,51	707,01	115,82
4	FBXW7: Exon 5/12	152,02	160,11	486,29	386,68	418,48	366,92	837,21	1.961,51	883,16	138,57
5	DNAH5: Exon 72/79	190,02	210,35	503,27	462,66	547,46	553,12	947,71	2.588,53	956,22	162,30

**Tablo 4.9 (devam): Likit örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.**

5	DNAH5: Exon 38/79	161,44	186,70	484,99	401,25	456,70	449,19	880,53	2.478,58	898,85	152,74
5	IL31RA: Exon 2/15	181,63	237,45	470,79	406,24	509,47	495,95	835,16	2.374,81	858,64	153,00
5	VCAN: Exon 8/15	173,54	187,21	477,40	428,01	464,77	471,53	835,95	2.440,32	839,38	166,41
5	APC: Exon 16/16 A	134,54	155,23	369,69	358,85	390,99	377,12	741,24	1.815,47	725,03	127,72
5	APC: Exon 16/16 B	177,12	198,27	483,39	444,16	481,22	445,49	901,70	2.263,68	955,62	160,61
5	APC: Exon 16/16 C	254,98	270,15	631,28	587,80	638,88	589,32	1.199,52	2.271,69	1.257,53	213,55
5	TGFBI: Exon 12/17	180,28	224,31	483,51	468,68	577,13	591,17	896,59	2.590,60	935,66	166,30
5	SIL1: Exon 4/11	237,15	352,05	571,95	510,67	643,05	684,46	1.141,67	2.356,48	1.031,51	185,13
5	CSF1R: Exon 22/22	202,26	258,94	456,97	457,42	524,04	654,94	866,63	2.571,40	812,91	123,48
5	CSF1R: Exon 7/22	174,59	251,48	486,51	451,25	506,63	530,74	811,59	2.136,86	842,20	145,77
5	NPM1: Exon 11/11	136,49	157,76	416,57	339,16	294,77	317,50	624,97	1.680,93	638,62	109,08
6	ROS1: Exon 43/43	221,69	248,55	608,86	532,26	605,29	546,92	1.074,33	2.321,96	1.199,53	200,94
6	ROS1: Exon 42/43	172,69	150,46	445,03	420,76	455,82	376,67	770,37	1.968,12	891,53	133,30
6	ROS1: Exon 41/43	182,78	208,83	524,99	454,41	526,07	437,11	971,16	2.492,44	1.027,08	169,54
6	ROS1: Exon 40/43	194,12	214,73	533,29	492,45	528,88	550,39	1.002,28	2.193,69	1.061,16	185,11
6	ROS1: Exon 39/43	173,66	163,06	422,44	335,05	411,56	373,64	738,32	2.089,39	799,28	121,18
6	ROS1: Exon 38/43	187,11	213,26	477,45	410,76	483,02	456,80	811,23	2.184,31	911,59	147,58
6	ROS1: Exon 37/43	161,45	123,15	400,96	340,18	392,69	376,36	706,17	2.043,68	733,95	109,56
6	ROS1: Exon 36/43	198,03	273,73	473,39	515,80	576,28	553,95	994,51	2.463,80	1.023,29	178,27
6	ROS1: Exon 35/43	171,53	211,46	468,46	452,00	516,03	525,22	927,24	2.190,72	928,06	178,79
6	ROS1: Exon 34/43	148,08	132,56	375,21	341,94	336,40	306,78	669,85	1.935,07	700,00	132,72
6	ROS1: Exon 33/43	209,62	180,80	449,32	405,43	471,13	380,11	811,81	2.182,31	955,92	152,45
6	ROS1: Exon 32/43	183,27	179,93	449,12	370,97	442,55	359,98	783,61	2.127,81	826,47	126,91
6	ROS1: Exon 31/43	157,12	132,85	410,71	345,34	389,85	341,78	733,75	1.765,91	825,62	129,89
6	ROS1: Exon 29/43,										
6	Exon 30/43	230,29	230,92	604,82	547,00	607,56	544,94	1.075,30	2.323,99	1.188,82	209,00
6	ROS1: Exon 28/43	164,69	148,40	422,37	350,58	395,05	320,16	689,65	1.911,51	754,76	120,63
6	ROS1: Exon 27/43	170,23	176,36	469,41	402,32	434,76	407,77	860,51	2.027,14	859,91	130,66
6	ROS1: Exon 26/43	212,55	203,51	473,54	433,96	481,31	479,33	903,47	2.037,10	934,79	167,64
6	ROS1: Exon 25/43	226,63	223,04	587,14	484,55	589,00	499,50	1.012,39	2.430,57	1.086,40	190,96
6	ROS1: Exon 24/43	139,21	126,25	370,20	316,08	334,16	315,23	649,23	1.671,91	690,41	117,22
6	ROS1: Exon 23/43	195,53	216,12	573,53	492,01	508,01	467,51	941,10	2.447,61	1.069,52	191,54
6	ROS1: Exon 22/43	188,28	183,05	407,67	275,93	339,62	417,36	623,72	1.610,57	715,83	90,07
6	ROS1: Exon 21/43	175,09	164,69	469,86	376,28	453,23	373,98	740,60	1.983,30	878,88	128,71
6	ROS1: Exon 20/43	172,91	194,16	468,80	393,92	464,13	428,40	771,42	2.107,47	906,92	168,43
6	ROS1: Exon 19/43	218,83	189,23	467,89	406,49	446,86	451,65	850,48	1.842,77	934,53	162,38
6	ROS1: Exon 18/43	202,79	206,09	550,60	449,82	528,18	468,20	922,92	1.957,54	1.076,95	172,99
6	ROS1: Exon 17/43	137,85	145,03	400,31	333,12	396,94	364,71	704,97	2.158,23	715,17	114,43
6	ROS1: Exon 16/43	179,51	214,14	560,86	471,91	534,64	532,53	960,81	2.380,65	1.069,55	185,01
6	ROS1: Exon 15/43	213,77	236,95	610,01	457,83	601,02	528,56	978,95	2.635,37	1.093,98	187,12
6	ROS1: Exon 14/43	152,07	158,95	465,97	370,46	437,13	384,59	818,99	2.087,77	863,21	129,40
6	ROS1: Exon 13/43	194,63	227,09	536,42	497,81	559,74	521,96	978,41	2.222,97	1.103,95	169,16
6	ROS1: Exon 12/43	233,25	295,96	652,58	627,31	708,03	710,39	1.208,44	2.490,34	1.350,84	238,24
6	ROS1: Exon 11/43	155,72	125,56	398,05	350,90	392,00	341,38	694,46	1.996,36	720,94	119,79
6	ROS1: Exon 10/43	186,38	189,68	488,92	397,21	469,65	415,11	830,06	2.078,42	929,61	141,59
6	ROS1: Exon 9/43	154,63	139,66	458,03	388,30	411,23	321,35	724,78	2.030,72	723,69	110,89
6	ROS1: Exon 8/43	137,44	165,93	386,29	374,50	418,73	418,69	669,65	1.952,60	757,63	118,09
6	ROS1: Exon 7/43	219,92	230,15	535,27	444,70	534,66	516,96	942,39	2.148,54	1.070,95	193,37
6	ROS1: Exon 6/43	174,11	244,58	475,95	461,40	519,59	542,22	929,06	2.363,80	907,27	160,72
6	ROS1: Exon 5/43	189,06	202,58	442,00	402,31	419,44	413,82	792,83	1.924,35	777,01	128,96
6	ROS1: Exon 4/43	143,99	175,42	437,33	385,55	505,81	475,46	806,36	2.280,71	838,53	133,06
6	ROS1: Exon 3/43	139,90	134,10	375,77	318,07	333,43	344,08	680,88	1.960,98	713,72	118,05
6	ROS1: Exon 2/43	142,29	147,82	393,11	344,63	384,57	395,00	733,84	1.982,76	781,32	114,42
6	ROS1: Exon 1/43	174,38	169,77	510,92	416,11	497,46	416,37	813,50	2.427,85	917,44	171,70
6	GRM1: Exon 8/8	169,24	249,12	414,56	455,36	538,78	565,41	837,78	2.702,18	794,47	148,65
6	ESR1: Exon 3/10	193,07	373,73	491,40	477,20	557,40	584,30	795,78	1.533,10	849,06	142,68
6	ESR1: Exon 4/10	206,35	227,52	585,04	500,05	586,55	544,11	993,70	2.487,28	1.114,39	187,96
6	ESR1: Exon 5/10	196,58	270,05	513,49	499,20	544,35	547,86	899,98	2.203,93	1.028,72	158,85
6	ESR1: Exon 6/10	199,99	279,50	535,76	520,89	608,27	628,56	1.038,73	2.125,34	1.090,30	207,32
6	ESR1: Exon 7/10	165,09	230,81	484,57	469,04	530,32	515,28	1.024,34	2.384,70	1.037,43	174,36
6	ESR1: Exon 8/10	213,36	203,54	537,03	452,67	544,47	519,96	955,97	2.396,65	1.063,41	177,61
6	ESR1: Exon 9/10	239,10	343,78	631,30	559,56	714,14	739,45	1.179,74	3.034,54	1.123,77	220,76
6	ESR1: Exon 10/10	231,62	372,04	583,09	519,22	660,85	687,40	1.030,23	2.530,05	1.088,20	169,58
6	SYNE1: Exon 138/146	195,69	284,01	547,09	458,92	668,35	613,13	1.019,39	2.611,40	1.067,62	178,97
7	BMPER: Exon 6/16	186,80	248,57	493,56	454,67	516,08	554,77	908,07	2.544,36	858,69	154,70

**Tablo 4.9 (devam): Likit örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.**

7	ABCA13: Exon 40/62	175,14	298,72	554,37	480,47	572,85	658,44	953,34	2.450,27	882,05	137,55
7	GRB10: Exon 4/17	210,31	305,21	512,86	514,19	673,07	704,49	1.009,59	2.775,74	898,06	162,29
7	EGFR: Exon 3/28	153,36	148,63	409,23	354,89	420,34	405,75	685,21	2.455,68	721,23	111,79
7	EGFR: Exon 7/28	188,81	290,42	447,95	473,73	614,43	629,67	833,33	2.843,05	832,63	156,07
7	EGFR: Exon 15/28	209,08	255,83	494,55	434,05	517,17	561,56	821,38	2.466,02	863,23	138,76
7	EGFR: Exon 18/28	180,18	260,35	486,84	473,32	563,70	611,52	874,29	2.429,68	914,02	161,64
7	EGFR: Exon 19/28	214,86	244,00	576,22	472,09	553,59	534,35	1.004,33	2.548,73	995,14	171,21
7	EGFR: Exon 20/28	254,86	347,05	601,36	579,77	736,64	749,16	1.088,47	3.019,45	1.161,24	216,41
7	EGFR: Exon 21/28	170,49	239,05	490,38	461,42	513,66	546,82	802,02	2.714,06	859,43	146,45
7	AP1S1: Exon 5/5	149,10	186,12	377,05	314,05	373,06	411,02	618,40	1.892,23	611,82	96,61
7	MET: Exon 2/21	235,89	314,28	736,38	627,14	720,12	694,08	1.323,42	2.488,95	1.476,45	247,69
7	MET: Exon 3/21	193,04	203,22	522,02	490,70	521,73	518,73	992,08	2.491,04	1.068,85	179,54
7	MET: Exon 4/21	186,63	180,53	484,65	421,82	464,88	477,44	905,88	2.359,99	942,90	147,25
7	MET: Exon 5/21	205,03	257,37	497,96	451,50	545,39	538,41	892,43	2.124,01	949,78	155,95
7	MET: Exon 6/21	200,92	240,18	550,11	451,51	492,51	506,22	1.014,64	2.103,18	1.045,61	176,91
7	MET: Exon 7/21, Exon 8/21	196,34	194,43	531,68	465,57	502,73	436,44	944,76	2.278,92	989,76	150,42
7	MET: Exon 9/21	210,68	199,52	573,46	486,63	500,27	444,67	1.005,10	2.468,72	1.119,80	175,07
7	MET: Exon 10/21	185,00	166,77	465,97	427,07	455,98	445,02	916,71	2.400,27	933,81	160,03
7	MET: Exon 11/21	193,82	180,22	520,73	441,21	507,15	473,17	897,45	2.334,98	1.037,88	174,69
7	MET: Exon 12/21	189,43	203,01	511,38	453,58	495,35	447,59	888,88	2.275,33	1.003,52	168,68
7	MET: Exon 13/21, Exon 14/21	204,89	192,94	536,46	439,69	493,30	448,02	915,56	2.149,41	1.023,51	157,87
7	MET: Exon 15/21	209,37	239,49	603,45	491,60	552,07	515,38	976,14	2.662,93	1.117,98	186,45
7	MET: Exon 16/21	175,91	132,90	505,76	373,97	392,10	354,78	753,11	2.340,71	873,68	136,01
7	MET: Exon 17/21	175,26	179,34	507,96	443,12	514,23	454,95	939,30	2.264,52	963,22	156,80
7	MET: Exon 18/21	189,87	135,80	454,53	366,65	397,48	326,42	744,41	2.078,13	779,25	125,38
7	MET: Exon 19/21	176,58	175,61	496,24	414,87	489,77	408,11	919,97	2.227,33	980,98	159,40
7	MET: Exon 20/21, Exon 21/21	200,18	244,24	568,33	524,10	557,27	537,92	1.069,19	2.388,67	1.127,58	198,12
7	PAX4: Exon 9/9	172,14	239,46	410,38	360,28	457,30	466,64	738,26	2.564,17	756,03	125,56
7	SMO: Exon 3/12	158,89	284,09	440,31	444,33	513,87	614,65	786,21	2.386,87	765,49	136,36
7	SMO: Exon 5/12	197,81	230,80	474,84	432,91	505,93	597,45	900,47	2.558,74	781,04	138,89
7	SMO: Exon 6/12	137,12	237,00	417,48	362,47	483,33	495,73	691,97	2.275,47	628,72	112,11
7	SMO: Exon 9/12	136,33	213,66	389,71	352,08	409,06	423,37	642,32	2.007,42	594,88	93,28
7	SMO: Exon 11/12	158,63	258,26	494,30	474,10	540,05	588,30	888,76	2.268,29	810,29	154,93
7	BRAF: Exon 15/18	161,09	144,41	441,75	370,91	416,53	404,96	780,80	1.861,86	858,84	131,20
7	BRAF: Exon 11/18	179,64	180,46	476,04	421,85	484,63	491,40	879,03	2.256,15	921,09	158,74
7	EZH2: Exon 16/20	205,71	213,49	556,95	455,18	595,32	518,56	948,09	2.607,58	952,54	160,90
8	FGFR1: Exon 7/18	187,88	314,42	550,55	473,89	580,17	659,71	883,03	2.645,17	920,76	179,55
8	FGFR1: Exon 4/18	188,19	279,95	562,49	487,26	567,55	586,14	1.008,44	2.517,32	909,15	178,87
8	PDP1: Exon 3/3	159,90	174,37	493,97	390,98	475,53	392,43	818,08	2.459,98	850,21	132,69
8	FZD6: Exon 4/7	173,75	172,91	501,95	378,54	445,96	439,53	865,99	2.550,04	899,90	150,10
9	JAK2: Exon 14/25	180,61	178,82	441,20	408,40	427,36	394,59	808,74	2.146,06	811,13	133,25
9	JAK2: Exon 16/25	164,72	126,80	360,22	308,81	317,47	310,40	608,08	1.678,20	669,67	108,02
9	CDKN2A: Exon 2/3	209,87	403,92	508,12	529,67	577,45	701,28	887,42	1.928,34	894,35	162,37
9	TEK: Exon 13/23	158,49	199,87	472,74	370,35	427,09	427,87	879,21	2.275,62	850,60	138,35
9	TRPM6: Exon 17/39	172,65	243,15	483,48	426,98	527,97	572,17	888,55	2.558,33	964,51	172,68
9	GNAQ: Exon 5/7	163,61	197,12	450,91	399,57	444,21	423,30	808,25	2.045,18	838,95	134,86
9	GNAQ: Exon 4/7	184,07	186,10	503,81	449,01	520,27	565,33	836,86	2.472,33	895,83	115,24
9	FBP1: Exon 7/7	150,91	210,26	478,48	401,73	486,90	503,88	808,74	2.384,11	748,11	141,24
9	TDRD7: Exon 2/17	113,51	160,09	401,29	350,03	380,54	421,76	706,63	2.121,68	711,96	113,18
9	ALDOB: Exon 9/9	191,18	182,60	420,13	382,75	479,00	485,42	743,41	2.120,50	807,11	117,49
9	ABL1: Exon 4/11	229,79	352,46	584,99	534,76	676,15	771,41	1.058,24	2.751,92	965,25	161,22
9	ABL1: Exon 5/11	173,66	213,53	487,01	419,35	505,50	508,28	843,93	2.192,75	837,18	143,69
9	ABL1: Exon 6/11	246,81	352,17	647,35	559,01	723,27	700,46	1.119,26	2.200,57	1.173,21	198,16
9	ABL1: Exon 7/11	195,52	268,79	482,29	437,39	536,13	541,29	865,62	2.118,91	913,25	161,55
9	TSC1: Exon 15/23	140,03	155,19	422,20	361,08	406,43	458,33	642,10	2.169,90	641,36	93,18
9	ADAMTS13: Exon 15/29	193,57	277,48	521,55	478,66	598,42	597,30	964,02	2.830,50	916,55	171,39
9	NOTCH1: Exon 34/34	191,92	338,28	466,34	431,16	496,72	579,54	772,43	2.040,09	670,44	132,97
9	NOTCH1: Exon 27/34	243,47	377,47	522,84	457,78	558,27	642,13	875,69	2.192,33	779,87	138,90
9	NOTCH1: Exon 26/34	246,67	401,02	579,96	479,39	626,19	793,09	894,16	3.116,50	684,04	136,92
10	RET: Exon 10/20	210,51	398,61	562,92	490,16	573,81	694,23	965,29	2.618,54	815,28	159,60
10	RET: Exon 11/20	265,90	466,47	657,12	641,60	746,59	866,07	1.191,93	2.847,36	1.099,80	215,77
10	RET: Exon 13/20	188,82	268,32	620,30	491,80	643,25	624,44	996,75	3.000,01	920,18	179,15

**Tablo 4.9 (devam): Likit örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.**

10	RET: Exon 15/20	182,24	319,54	486,47	458,99	586,22	696,15	915,99	2.471,40	828,36	148,69
10	RET: Exon 16/20	190,33	222,36	443,39	431,68	444,53	523,02	829,07	2.501,48	782,40	121,59
10	MYPN: Exon 10/20	155,09	237,90	471,49	443,12	492,11	555,51	827,28	2.105,35	827,27	149,99
10	ASCC1: Exon 13/13	179,56	188,87	510,64	395,53	472,88	420,32	783,39	2.109,07	833,68	150,31
10	KCNMA1: Exon 4/27	183,16	189,23	448,56	350,07	473,08	467,90	804,20	2.180,70	751,67	151,34
10	CDHR1: Exon 15/17	191,93	237,04	582,05	452,53	535,37	558,86	880,25	3.204,76	948,37	161,32
10	PTEN: Exon 1/9	139,71	159,60	422,17	342,90	414,88	392,98	713,88	1.880,79	601,16	99,07
10	PTEN: Exon 2/9	168,43	115,77	343,64	271,67	264,44	260,73	555,11	1.614,06	524,37	86,13
10	PTEN: Exon 3/9	161,57	151,40	411,89	383,58	320,40	334,87	738,43	1.713,51	806,59	129,71
10	PTEN: Exon 4/9	129,69	106,87	378,19	330,31	353,92	307,17	606,07	1.768,49	661,97	100,58
10	PTEN: Exon 5/9	162,95	164,45	405,74	364,62	381,65	382,80	733,37	1.398,60	815,45	146,66
10	PTEN: Exon 6/9	198,24	184,87	491,81	410,26	467,90	415,08	831,68	2.016,87	888,44	159,09
10	PTEN: Exon 7/9	169,96	183,34	458,29	409,04	453,66	428,32	868,37	2.048,21	889,48	163,44
10	PTEN: Exon 8/9	157,59	167,61	403,04	336,63	300,63	325,56	683,37	1.253,13	640,85	119,41
10	PTEN: Exon 9/9	74,49	66,91	248,92	186,20	219,02	218,32	409,99	980,54	394,92	74,16
10	PLCE1: Exon 2/33	159,17	182,84	510,77	441,16	525,82	467,54	879,11	2.447,31	948,28	151,79
10	CYP17A1: Exon 1/8	135,29	177,69	402,18	352,52	397,89	427,88	672,00	1.993,60	603,02	117,80
10	CNNM2: 3' Flanking	170,15	179,05	470,68	399,60	459,96	403,98	746,63	1.817,08	830,69	156,55
10	COL17A1: Exon 14/56	172,14	233,73	534,18	433,75	510,58	573,46	904,65	2.839,15	820,12	137,00
10	GPAM: Exon 16/22	170,99	188,88	485,58	408,01	552,53	465,49	835,54	2.246,85	902,22	169,39
10	FGFR2: Exon 12/18	165,40	152,60	472,41	379,83	496,84	416,79	840,32	2.470,04	828,51	132,34
10	FGFR2: Exon 9/18	177,08	234,82	517,10	446,25	562,85	578,55	957,46	2.537,99	884,45	160,58
10	FGFR2: Exon 7/18	201,19	318,48	569,78	502,90	631,73	637,61	1.054,12	2.387,16	1.034,54	172,12
11	HRAS: Exon 3/5	169,16	271,57	458,25	406,10	434,45	498,19	697,67	2.208,65	630,81	109,52
11	HRAS: Exon 2/5	162,45	260,89	351,23	350,49	408,50	507,09	602,01	1.521,18	499,71	83,00
11	ILK: Exon 4/13	199,00	152,77	493,37	408,11	480,71	456,74	712,74	2.531,16	720,09	112,96
11	SOX6: Exon 7/16	136,08	183,33	416,42	366,63	409,69	443,78	786,06	1.744,81	709,94	126,16
11	FSHB: Exon 3/3	140,62	163,56	374,44	360,78	408,12	379,78	702,54	1.972,79	678,83	124,17
11	ATM: Exon 8/63	148,55	118,05	388,10	332,37	326,00	307,17	666,76	1.649,63	734,62	117,76
11	ATM: Exon 9/63	153,30	155,22	429,19	389,47	399,42	398,97	789,97	2.114,72	879,76	145,29
11	ATM: Exon 12/63	154,01	126,13	432,38	366,33	325,35	346,07	703,59	1.937,59	777,79	119,94
11	ATM: Exon 17/63	186,93	182,81	498,65	454,10	473,90	467,39	877,86	2.412,39	945,97	169,23
11	ATM: Exon 26/63	176,81	173,67	449,50	403,98	444,85	416,51	828,86	2.180,39	921,05	148,05
11	ATM: Exon 34/63	166,16	163,41	454,19	391,14	385,58	365,16	756,55	2.162,27	849,35	138,18
11	ATM: Exon 35/63	174,78	151,86	439,28	362,98	408,41	371,23	790,01	2.073,80	798,85	121,09
11	ATM: Exon 36/63	200,34	197,71	494,90	421,80	465,20	408,60	858,29	2.132,84	978,35	152,38
11	ATM: Exon 39/63	119,66	108,22	359,59	272,73	314,22	278,38	582,99	1.808,98	641,12	104,45
11	ATM: Exon 50/63	154,33	146,56	394,14	345,96	363,34	407,12	730,70	2.165,30	689,13	118,41
11	ATM: Exon 54/63	123,23	107,33	326,50	291,42	305,06	265,94	568,67	1.667,65	591,83	83,33
11	ATM: Exon 55/63	156,56	155,04	417,97	369,38	442,51	365,56	753,13	2.014,21	794,09	126,09
11	ATM: Exon 56/63	161,24	169,05	461,01	403,61	402,56	475,14	794,64	2.221,98	784,71	127,78
11	ATM: Exon 59/63	162,85	135,06	433,92	324,36	391,54	315,77	694,85	2.100,57	667,19	108,65
11	ATM: Exon 61/63	161,81	153,82	470,80	388,52	432,21	409,31	821,47	2.280,31	797,08	121,66
11	ATM: Exon 63/63	207,80	236,32	545,71	477,43	524,64	500,48	998,61	2.481,15	998,10	182,06
12	WNK1: Exon 19/28	181,91	225,07	502,06	451,04	564,59	552,40	905,36	2.411,63	913,45	154,24
12	AICDA: Exon 4/5	200,59	207,03	406,67	356,34	398,66	438,63	760,52	1.452,17	768,26	125,14
12	KRAS: Exon 4/6	159,10	148,76	381,51	349,44	337,42	328,79	726,96	1.729,82	766,40	132,53
12	KRAS: Exon 3/6	134,57	127,36	388,60	336,31	376,84	395,85	647,02	2.276,24	637,69	108,23
12	KRAS: Exon 2/6	144,20	171,85	401,56	345,12	411,06	357,01	729,88	2.212,01	789,62	115,89
12	SCN8A: Exon 27/27	190,14	249,20	591,22	479,71	618,54	667,06	965,56	2.829,41	961,26	179,90
12	PTPN11: Exon 3/16	187,95	221,80	525,64	440,37	491,94	482,13	879,52	2.170,54	952,38	162,18
12	PTPN11: Exon 13/16	182,61	184,49	512,00	424,23	504,80	509,71	848,11	2.390,48	867,55	138,04
12	HNF1A: Exon 3/10	222,92	363,11	620,70	549,51	669,97	712,88	1.082,99	2.370,34	1.140,21	213,04
12	HNF1A: Exon 4/10	223,79	420,36	549,58	549,87	644,39	722,72	991,28	2.209,06	895,27	172,40
13	FLT3: Exon 20/24	198,23	213,99	555,54	472,02	591,54	581,77	964,14	2.555,92	1.013,70	161,61
13	FLT3: Exon 16/24	152,60	189,61	459,91	385,61	475,09	487,14	773,30	2.081,90	842,49	134,89
13	FLT3: Exon 14/24	145,95	156,18	462,46	362,58	402,59	392,18	775,24	1.852,17	793,46	145,47
13	FLT3: Exon 11/24	166,49	195,23	462,98	399,05	476,24	455,25	784,46	2.061,93	834,42	133,68
13	RB1: Exon 4/27	127,14	134,91	373,77	308,60	297,96	281,23	642,43	1.509,97	662,16	110,27
13	RB1: Exon 6/27	128,72	125,23	368,01	292,80	308,16	283,10	594,36	1.583,22	670,50	109,89
13	RB1: Exon 8/27	154,36	176,54	389,23	320,23	348,69	354,29	706,14	1.718,97	685,46	126,73
13	RB1: Exon 10/27	143,31	135,07	389,95	331,91	322,77	318,27	662,96	1.693,52	717,33	125,93
13	RB1: Exon 11/27	105,61	94,84	293,11	266,07	234,51	265,35	462,15	1.288,41	512,48	90,53
13	RB1: Exon 14/27	186,92	290,40	463,56	461,21	384,54	668,43	932,02	1.664,85	921,36	157,67
13	RB1: Exon 17/27	176,04	161,52	478,18	396,12	419,69	380,09	799,50	2.118,18	840,69	140,99

**Tablo 4.9 (devam): Likit örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.**

13	RB1: Exon 18/27	147,77	146,94	368,28	341,25	353,34	331,97	638,96	1.810,78	762,05	116,25
13	RB1: Exon 20/27	151,22	191,56	466,64	370,76	426,72	467,23	802,98	1.877,45	860,50	154,86
13	RB1: Exon 21/27	173,29	149,33	415,69	372,72	316,64	312,60	769,83	1.687,22	774,64	122,45
	RB1: Exon 22/27,										
	Exon 23/27	182,77	167,80	434,66	398,46	426,43	392,72	770,60	1.730,83	856,43	141,48
14	L2HGDH: Exon 2/10	172,86	181,17	436,15	381,50	415,16	438,08	691,13	2.024,97	701,47	114,75
14	SYNE2: Exon 94/116	163,16	188,56	478,71	445,00	538,05	524,44	871,93	2.329,08	862,49	144,41
14	LTBP2: Exon 14/36	166,01	227,20	487,69	415,25	496,97	510,36	846,06	2.334,14	810,24	164,51
14	FLVCR2: Exon 1/10	244,77	313,56	559,78	538,90	679,55	790,08	1.038,15	2.613,49	906,37	136,40
	AKT1: Exon 7/15,										
	Exon 8/15	162,03	218,97	335,92	331,22	370,00	431,18	615,90	1.772,35	596,19	123,59
14	AKT1: Exon 4/15	190,35	277,66	497,47	435,47	551,44	622,57	830,08	2.553,37	768,12	142,67
15	SLC12A6: Exon 22/25	160,06	206,45	415,83	403,68	432,23	514,44	696,94	2.003,66	754,03	123,29
15	MAP2K1: Exon 2/11	220,58	323,28	578,36	466,30	563,79	703,34	1.155,79	2.339,62	1.087,98	201,71
15	MAP2K1: Exon 3/11	194,98	224,68	496,25	485,18	520,77	639,12	935,58	2.370,51	940,41	144,00
15	MAP2K1: Exon 6/11	164,43	234,25	477,38	445,46	531,03	595,25	842,21	2.196,27	814,85	145,39
15	MAP2K1: Exon 7/11	206,75	324,55	572,23	522,91	626,36	659,42	1.035,77	2.385,27	924,87	162,55
15	MAP2K1: Exon 11/11	186,14	211,85	538,56	432,23	545,94	546,56	894,74	2.418,92	893,65	152,17
15	ACAN: Exon 12/18 A	152,52	211,76	435,21	404,11	464,92	420,94	747,59	2.021,43	791,81	134,52
15	ACAN: Exon 12/18 B	181,42	220,63	528,32	458,90	545,62	531,40	918,97	2.512,42	875,44	145,19
	IDH2: Exon 4/11,										
	Exon 5/11	217,22	340,22	566,64	531,30	580,02	650,96	993,46	2.095,89	918,64	191,44
16	CDH3: Exon 7/16	207,58	272,90	517,93	463,57	535,03	589,18	915,74	2.110,36	978,93	173,58
16	CDH3: Exon 15/16	194,23	342,56	472,60	485,16	611,27	727,73	883,88	2.510,23	919,11	150,35
16	CDH1: Exon 3/16	191,39	203,35	476,13	405,28	502,58	470,13	778,39	2.245,12	850,02	142,17
16	CDH1: Exon 8/16	173,34	254,10	533,93	457,82	599,17	557,98	1.008,95	2.445,14	948,01	156,09
16	CDH1: Exon 9/16	194,31	246,21	504,87	424,29	531,64	576,82	883,81	2.248,41	914,71	158,18
16	AARS: Exon 7/21	194,65	306,90	570,70	496,51	557,40	629,60	941,70	2.578,70	991,69	169,42
16	COG4: Exon 5/19	188,01	224,37	506,51	423,89	500,79	490,70	902,46	2.303,26	915,01	172,76
	YBX2: Exon 8/9, Exon										
	9/9	176,77	292,11	568,37	509,00	609,55	627,43	952,65	2.607,84	916,38	163,91
17	TP53: Exon 11/11	234,79	252,14	441,73	439,60	490,16	512,72	814,39	1.851,15	919,58	180,89
17	TP53: Exon 10/11	193,90	293,57	546,18	452,62	521,14	586,88	965,69	2.320,93	869,76	169,46
	TP53: Exon 8/11, Exon										
	9/11	225,12	277,29	580,27	504,96	526,38	505,55	910,30	1.837,93	960,50	170,95
17	TP53: Exon 7/11	230,46	290,10	571,97	523,37	560,85	589,84	923,84	2.046,99	982,83	166,59
	TP53: Exon 5/11, Exon										
	6/11	241,31	374,70	580,13	568,78	604,40	689,27	1.017,66	2.184,27	1.039,42	199,09
	TP53: Exon 2/11, Exon										
	3/11, Exon 4/11	209,21	342,45	458,32	435,59	477,89	536,09	851,63	1.504,37	861,12	176,68
17	MYH3: Exon 34/41	202,58	258,22	547,77	427,81	525,45	576,80	954,78	2.439,50	942,15	177,46
17	MYH3: Exon 25/41	186,32	187,73	539,79	416,99	522,73	527,97	942,86	2.449,64	998,75	160,18
17	ERBB2: Exon 8/27	202,54	328,37	554,87	517,91	644,81	699,36	976,39	3.402,35	952,79	179,38
17	ERBB2: Exon 19/27	170,74	258,30	462,49	404,62	425,56	509,34	781,62	1.928,22	774,70	136,90
17	ERBB2: Exon 20/27	198,33	337,88	573,09	501,38	637,83	732,61	1.028,09	2.442,10	899,88	164,00
17	ERBB2: Exon 21/27	196,17	321,01	483,88	480,07	557,00	639,54	903,88	2.189,54	860,11	151,25
17	ITGA2B: Exon 30/30	192,24	302,78	460,26	418,98	468,88	598,00	824,56	1.999,68	759,86	129,96
17	COG1: Exon 2/14	216,27	320,66	599,49	533,64	612,33	642,56	1.106,67	2.308,88	1.059,04	197,28
17	COG1: Exon 7/14	168,72	229,06	537,43	474,21	565,65	626,15	906,52	2.981,27	819,62	155,85
	AFG3L2: Exon 11/17,										
	Exon 12/17	140,92	232,00	350,62	318,24	367,36	429,07	599,25	1.612,16	711,82	109,47
18	MYO5B: Exon 17/40	234,74	358,57	566,53	531,93	640,64	605,24	1.034,61	2.210,30	1.072,03	183,80
18	SMAD4: Exon 3/12	152,71	142,11	410,99	338,85	408,80	414,95	653,92	2.073,35	654,81	110,76
18	SMAD4: Exon 4/12	135,08	109,02	317,70	304,22	280,02	292,32	602,07	1.315,98	622,32	99,40
18	SMAD4: Exon 5/12	173,70	190,67	455,63	406,78	473,98	469,27	859,30	2.128,81	875,43	152,58
18	SMAD4: Exon 6/12	185,40	174,45	495,27	398,02	470,78	422,83	804,95	2.172,76	812,92	148,02
18	SMAD4: Exon 8/12	159,41	134,82	442,76	356,89	352,67	388,04	737,64	1.930,18	834,43	120,61
18	SMAD4: Exon 9/12	156,50	201,86	457,97	412,44	450,84	460,68	850,66	2.119,87	858,65	154,89
18	SMAD4: Exon 10/12	124,66	140,27	397,12	366,21	443,12	388,01	694,14	1.948,68	727,67	126,80
18	SMAD4: Exon 11/12	144,19	221,51	437,91	410,20	472,39	479,74	750,66	1.827,45	824,69	138,56
18	SMAD4: Exon 12/12	182,01	250,67	551,28	547,77	551,44	606,69	984,57	2.528,93	1.034,15	179,31
19	STK11: Exon 1/10	134,77	222,64	459,10	370,43	450,53	458,01	634,27	2.210,39	545,39	76,59
	STK11: Exon 4/10,										
	Exon 5/10	265,87	419,82	620,19	561,54	645,78	658,17	968,23	2.629,42	816,70	155,99
19	STK11: Exon 6/10	218,49	308,11	442,61	450,23	505,02	521,63	760,52	2.086,01	626,07	111,84
19	STK11: Exon 8/10	224,30	377,40	581,70	513,14	620,64	688,10	904,78	3.050,11	807,48	136,71
19	GNA11: Exon 4/7	185,89	383,55	470,86	452,39	528,77	601,69	693,59	2.231,04	659,98	121,82

**Tablo 4.9 (devam):** Likit örneklerinin bütün bölgelerdeki okuma sayıları.

19	GNA11: Exon 5/7	160,35	291,43	407,32	385,80	429,28	546,76	669,87	2.011,49	655,61	122,90
19	MAP2K2: Exon 11/11	240,11	304,99	477,87	487,65	530,74	541,37	736,79	2.026,95	768,86	138,14
19	MAP2K2: Exon 10/11	213,73	339,07	412,06	426,35	521,00	632,61	726,78	2.220,29	636,65	114,30
19	MAP2K2: Exon 9/11	179,26	270,73	494,56	440,13	540,97	659,16	778,80	2.617,51	671,71	119,66
19	MAP2K2: Exon 8/11	184,91	255,37	412,31	396,83	410,14	442,88	686,27	1.974,19	650,59	131,91
19	MAP2K2: Exon 7/11	258,97	499,64	617,04	588,71	657,60	794,41	1.055,36	2.378,28	957,77	183,21
19	MAP2K2: Exon 5/11, Exon 6/11	142,37	240,24	277,53	280,08	329,99	400,64	558,37	1.099,81	522,26	108,00
19	MAP2K2: Exon 4/11	231,01	372,81	588,34	520,11	573,19	734,22	902,26	2.592,65	827,00	132,82
19	MAP2K2: Exon 3/11	234,18	394,31	589,48	541,20	635,95	759,73	995,58	2.446,79	897,47	180,09
19	MAP2K2: Exon 2/11	186,99	378,66	483,23	450,32	508,30	633,34	906,19	1.704,68	871,72	180,58
19	MAP2K2: Exon 1/11	131,58	181,36	309,32	288,08	299,16	297,58	349,35	1.094,66	428,62	52,74
19	DNASE2: Exon 4/6	199,17	265,85	548,46	440,03	505,89	607,20	887,59	2.771,96	747,27	150,05
19	CACNA1A: Exon 8/47	170,53	230,86	416,66	416,63	467,93	583,90	864,07	2.087,87	821,21	152,22
19	CALR3: Exon 8/9	145,33	186,85	441,16	369,55	361,57	402,32	693,54	1.877,19	708,94	110,14
19	JAK3: Exon 16/24	194,74	298,02	495,00	461,23	512,42	608,76	820,34	2.347,77	741,58	135,85
19	JAK3: Exon 13/24	135,26	182,91	363,80	345,73	405,29	457,45	663,83	1.845,46	614,77	114,92
19	JAK3: Exon 4/24	202,45	275,90	493,70	469,36	507,62	618,73	797,29	2.463,78	718,81	117,59
19	RYR1: Exon 50/106	210,60	287,68	499,68	450,19	540,26	649,33	860,57	2.179,88	877,53	176,70
20	TGM6: Exon 13/13	193,29	277,99	498,90	465,52	580,62	664,05	1.003,11	2.240,49	979,78	180,27
20	FERMT1: Exon 2/15	156,20	181,02	452,75	386,63	451,61	491,54	835,29	2.487,14	791,05	137,62
20	RIN2: Exon 8/11	155,90	233,07	492,41	476,07	525,62	455,64	881,95	2.604,82	847,88	144,58
20	RPN2: Exon 16/17	153,82	201,76	446,01	381,82	469,61	510,66	757,06	2.326,78	792,00	145,01
20	SRC: Exon 14/14	211,04	400,54	533,06	496,99	597,84	738,50	898,02	2.508,66	800,23	163,17
20	GNAS: Exon 8/13, Exon 9/13, Exon 10/13	206,67	217,88	522,14	455,96	513,73	510,31	835,59	1.951,21	896,43	142,19
21	NDUFV3: Exon 3/4	208,94	325,09	549,97	459,33	518,33	559,88	897,36	2.263,15	958,34	180,05
21	COL18A1: Exon 17/41	178,90	275,31	466,91	446,60	498,18	488,68	744,43	2.160,76	755,28	165,42
21	PCNT: Exon 10/47	166,76	208,62	426,37	402,06	463,48	457,63	839,46	1.729,55	827,08	155,86
22	SERPIND1: Exon 5/5	215,41	353,42	609,20	513,93	639,35	739,74	1.043,49	2.500,78	1.043,97	196,69
22	SMARCB1: Exon 2/9	205,15	215,12	498,38	465,83	505,17	519,46	873,33	2.518,81	837,53	145,12
22	SMARCB1: Exon 4/9	184,82	235,31	521,39	484,67	559,34	598,52	916,13	2.516,03	870,52	142,46
22	SMARCB1: Exon 5/9	213,13	264,48	458,94	457,14	539,10	581,14	838,37	2.433,41	781,12	154,80
22	SMARCB1: Exon 9/9	213,33	314,54	486,98	457,57	564,40	635,78	876,50	2.423,02	785,98	137,91
22	TMPRSS6: Exon 13/18	171,30	236,90	490,81	429,35	491,18	554,68	856,89	2.236,83	796,27	150,68

**Tablo 4.10:** Okuma sayısı kıyaslamasına göre öngörülen CNV analizi sonuçlarını ve mutasyon saptanan genleri gösteren özet tablo.

Örnek	Saptanan CNV'ler	Mutasyon saptanan genler
GBM-DOKU-1	EGFR amplifikasyonu	TP53
GBM-LİKİT-1	-	-
GBM-DOKU-2	RPN2 amplifikasyonu	TP53, MET
GBM-LİKİT-2	-	-
	PDGFRA amplifikasyonu	TP53, PTEN
GBM-DOKU-3	KIT amplifikasyonu	
GBM-LİKİT-3	-	-
	EGFR amplifikasyonu	TP53, PTEN, EGFR
GBM-DOKU-4	MET amplifikasyonu	
GBM-LİKİT-4	-	-
GBM-DOKU-5	EGFR amplifikasyonu	-
GBM-LİKİT-5	-	-
	EGFR amplifikasyonu	TP53
GBM-DOKU-6	MET amplifikasyonu	
GBM-LİKİT-6	-	-
GBM-DOKU-7	EGFR amplifikasyonu	-
GBM-LİKİT-7	-	-
GBM-DOKU-8	-	PTEN, JAK2
GBM-LİKİT-8	-	JAK2
GBM-DOKU-9	-	-
GBM-LİKİT-9	-	-
GBM-DOKU-10	-	TP53, PTEN
GBM-LİKİT-10	-	-

## 5. TARTIŞMA

İnsan kanserlerinin başlamasından ve ilerlemesinden sorumlu olan genetik değişikliklerin keşfiyle yeni nesil biyobelirteçler kullanıma sunuldu. Son zamanlardaki kanser genom dizileme çalışmalarından elde edilen genomik bilgi akışıyla, hemen hemen her türden kanserin somatik genetik değişiklikler barındırdığı artık bilinmektedir. Bu değişiklikler, tek baz değişimlerini, insersiyonları, delesyonları ve translokasyonları içerir. Bu somatik mutasyonlar, normal hücre popülasyonlarında ihmal edilebilir sıklıkta meydana gelir ve bu nedenle biyolojik bir perspektiften son derece spesifik biyobelirteçler sağlar [118].

Spesifik mutasyonlar, primer tümörün değerlendirilmesi ile tanımlanır ve bu durum hasta yönetimine hem zaman hem de maliyet ekler. Daha fazla kanser hastası, terapötik kararlara rehberlik etmek için tümörlerini genetik olarak analiz ettirdikçe bu durum daha az engel oluşturacaktır. Görüntüleme çalışmaları genellikle bilgilendirici değildir veya ilerlemeyi yansıtmada yavaştır. Tekrarlanan görüntüleme çalışmaları ayrıca hastaları radyasyona maruz bırakır.

Tedavileri yönlendirmek için kullanılan genetik değişiklikler, ctDNA analizi için de kullanılabilir. İlerlemiş kanserli hastaları ctDNA veya diğer biyobelirteçlerle izlemenin, hastalığın ilerleyip ilerlemediğini en kısa sürede bilmek konusunda önemlidir. Öte yandan, ilerlemiş hastalığı olan hastaların herhangi bir biyobelirteçle izlenmesinin psikolojik yararların aksine klinik yararlar sağladığı henüz gösterilmemiştir. Klinik semptomlardaki değişikliklerden önce ilerlemenin (veya yanıtın) meydana geldiğini bilmek, sağkalımı uzatmayabilir veya yaşam kalitesini iyileştirmeyebilir.

CtDNA saptama tahlillerinin geliştirilmesinde ilerleme kaydedilmesine rağmen, bu aracın klinik değeri zaten gösterilmiştir. Eşleştirilmiş tümör ve ctDNA örneklerinin moleküler profili, metastatik meme, kolorektal ve küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde klinik olarak anlamlı mutasyonların tanımlanmasında yüksek uyum oranları olduğunu ortaya koymuştur ve bunun sıvı biyopsi için uygun bir araç olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, farklı tümör tiplerine sahip hastalarda plazma DNA'sının genom çapında dizilimi, ctDNA'nın tüm tümör genomunu temsil ettiğini ve tümör heterojenliğinin doğru bir yansıması olabileceğini düşündürmektedir. Meme,

kolon ve yumurtalık kanserlerinde ve melanomda, ctDNA düzeylerinin klinik olarak yararlı olduğu ve ctDNA düzeyleri ile sağkalım arasında ters bir ilişki ile klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir [22].

Mevcut ctDNA saptama stratejileri, esas olarak fragman konsantrasyonuna ve anormal mutasyonlar ve metilasyonlar gibi dizi özelliklerine dayalı olarak geliştirilir. ctDNA'nın dinamik konsantrasyonu, kanser hastalığının ilerlemesi ile önemli ölçüde ilişkilidir. 2 saatten kısa olan yarı ömrü ve düşük konsantrasyonu nedeniyle, ctDNA'nın, primer tümörlü hastalarda saptanması çok zordur. Hastalığın ilerlemesi ile birlikte, bağışıklık sistemi zayıflar ve belirli tespit limitleri altında cfDNA'dan ayırt edilebilen ctDNA yavaş yavaş birikir. Artan ctDNA konsantrasyonu, sağlıklı gruplardan kanserli hastaları tanımlayabilir ve hastaları erken ve ileri evrelerde sınıflandırabilir. Ayrıca ilaç tedavisinden önce ve sonra ctDNA seviyelerindeki değişiklikler, hastalar için terapötik etki ile ilgilidir ve tedaviden sonra tümörsüz hastalar için ctDNA'nın konsantrasyon seviyesi, kanserin tekrarlama riskini gösterir [119].

MSS'de glioblastomlar ortaya çıktığından erişilebilirlik bir sorundur ve KBB, tümörden türetilmiş materyalin kana salınmasını veya transferini engeller. Bu nedenle, serum veya plazmada, özellikle tümörden türetilen nükleik asitler genellikle düşük seviyelerde tespit edilmiştir ve bu, rutin klinik uygulamalarda uygulanmasını zorlaştırabilir. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, BOS umut verici bir örnek olarak ortaya çıkmaktadır ve artan analitik duyarlılık ve özgüllük ile gelişmiş sekanslama yaklaşımları ile birlikte, son zamanlarda ctDNA analizine yönelik umut verici sonuçlar göstermiştir [120].

Piccioni ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, ctDNA'nın dolaşıma ulaşmak için kan-beyin bariyerini geçemeyeceğini öne süren diğer cfDNA çalışmalarının aksine, primer beyin tümörlü hastaların yarısının saptanabilir cfDNA değişikliklerine sahip olduğunu ve bunların %48.9'unun potansiyel olarak genomik olarak hedeflenebilir bir değişikliğe sahip olduğunu bulmuşlardır. Çalışılan kohortta ortalama %0.33 VAF ve minimum %0.05 VAF ile, düşük seviyeli değişikliklerin tespiti için yüksek hassasiyete sahip bir cfDNA testinin kullanılmasının önemi vurgulanmıştır. Tümör DNA'sının kan dolaşımına salınmasını etkileyen mekanizmalar tam olarak

anlaşılmamıştır ve kan-beyin bariyerinin, birincil beyin tümöründen periferik dolaşıma girebilen ctDNA miktarını sınırlayabilmesi mümkündür. Bu çalışmada gözlemlenen düşük VAF'ler, bu hasta popülasyonunda klinik kullanım için ticari bir cfDNA platformu seçerken, bu düşük seviyeli değişiklikleri tanımlama olasılığını artırmak için teknik tahlil performansının özellikle önemli olduğunu göstermektedir [96].

cfDNA analizi için uygun örneklerin elde edilmesi için analitik adımların yanı sıra preanalitik adımların da doğru bir şekilde dikkate alınması gerekir. cfDNA'nın çoğunluğu normal hücrelerden kaynaklandığından ve küçük ctDNA fraksiyonu için bir seyreltici olarak hareket ettiğinden, tümürlü olmayan cfDNA'nın artmasına neden olan koşullardan kaçınılmalıdır. Bu çalışmada numunenin hassasiyetine uygun PAXgene Blood ccfDNA tüpü kullanılmıştır. Örnekler alındıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiş ve 7 gün içerisinde izole edilerek numunenin hızlı işlenmesi sağlanmıştır.

Damlacık dijital PCR (ddPCR), BEAMing veya Real-time PCR yöntemleri gibi aşırı duyarlı hedefli yaklaşımlar, önceden belirlenmiş kanserle ilişkili mutasyonların yüksek hassasiyette hızlı, ucuz ve hassas saptanmasına olanak tanır. YND tabanlı yöntemler ise, hedefli ve hedefsiz yaklaşımları içerir ve milyonlarca DNA dizisini büyük paralel dizileme yetenekleri nedeniyle öne çıkar. Hedefli yaklaşımlar yüksek analitik hassasiyet gösterse de, önceden tanımlanmış bir dizi gendeki mutasyonlarla sınırlıdır, oysa tüm genom dizilimi veya hedeflenmemiş yaklaşımlar gibi hedeflenmemiş yaklaşımlar tam ekzom dizileme, birincil tümör hakkında bilgi gerektirmeden yeni, klinik olarak alakalı genomik sapmaları tespit etme fırsatı sağlar. Bununla birlikte, hedeflenmemiş yaklaşımların klinik kullanımı, daha düşük duyarlılık, daha yüksek girdili numune hacmi gereksinimi ve daha yüksek maliyetler nedeniyle genellikle engel oluşturur [121]. Çalışmamızda yeni biyobelirteç keşfi hedeflenerek UMI tabanlı YND yöntemi tercih edilmiştir. YND teknolojisi ile yüksek miktarda verinin daha kısa sürede ve daha düşük maliyetle analizi sağlanmıştır.

İzolasyon daha fazla cfDNA elde edebilmek için 5 ml'ye kadar plazma gerektiğinden tüplere 10 ml'ye kadar kan alınmasına dikkat edilmiştir. İzolasyonda kullanılan DNA'sı izolasyonu için kullanılan QIAamp Circulating Nucleic Acid kitinde 20 µl ile 150 µl arasındaki esnek elüsyon hacimleri, numune materyalinde düşük miktarlarda

bulunan nükleik asit türlerinin konsantrasyonun ayarlanmasına izin verir. Bu nedenle konsantrasyonu yüksek cfDNA elde edebilmek için bütün hasta örneklerinde 40 µl elüsyon buffer kullanılmıştır. Hastaların kontrol olarak kullanılan taze doku örnekleri ise standart izolasyon protokolü ile izole edilmiştir. Elde edilen DNA'ların yüksek hassasiyetle ölçülmesi, YND çalışmasına uygun miktarda örnek girişi için önemlidir.

Çalışmamızda ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, DDR2, DNMT3A, EFGR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, FOXL2, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR, KRAS, MAP2K1, MET, MLH1, MPL, MSH6, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMO, SRC, STK11, TP53, TSC1 genlerinin hotspot bölgelerini, AR, BTK, ESR1, KIT, MAP2K2, MTOR, PTEN, RAF1, ROS1, VHL genlerinin tüm ekzon bölgelerini içeren 63 genden oluşan ve toplamda 3007 primer bölgesi dizaynından oluşan YND paneli kullanılmıştır. Hedef zenginleştirme ve kütüphane oluşturma aşamalarından önce her bir DNA molekülü -UMI olarak bilinen- kendine özgü bir sekans yada index ile işaretlenmiştir. Böylece YND sonrasında biyoinformatik iş akışında somatik mutasyonların doğru şekilde saptanması sağlanmıştır. Çalışmada her reaksiyondan sonra saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırma aşamasında amplikonlar manyetik boncuklarla iyice karıştırılır ve amplikonların boncuklara bağlanması sağlanır. Örnekler manyetik satnda konular ve boncuklara yapışık olan amplikonlar manyetik alanın etkisiyle tüpün çeperine yapışır. Çepere yapışamayan fragmanlar ise alkol ile yapılan yıkama sonucu tüpten uzaklaştırılır. Bu aşamada manyetik boncuklar ile amplikonlar yeterince karışmazsa amplikon kaybı yaşanabilir. Yıkama aşamasında tüpteki fazla sıvıyı alırken çeperde bulunan amplikon-manyetik boncuk kompleksine dokunulduğu zaman kompleks bozulur ve amplikonlar serbest hale geçerek yine yanlışlıkla tüpten uzaklaştırılma ihtimali ile karşı karşıya kalınır. Fragman boyutuna göre saflaştırma işleminde düzenlemeler yapılabilmektedir, çalışmamızda taze doku ve cfDNA örnekleri için farklı miktarlarda manyetik boncuk kullanılmıştır. Havuzların her biri farklı F ve R yönlü olarak ifade edebileceğimiz bir çift indeks ile işaretlenmiştir. Böylece her örneğin farklı bir kütüphaneyi temsil etmesi sağlanarak örneklerin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Kütüphaneler oluşturulduktan sonra Real-time PCR ile kantitasyon ölçümü yapılarak, normalizasyon için dilüsyon

miktarları belirlenmiştir. Her kütüphaneden 4 nM olacak şekilde megahavuz hazırlanmıştır.

YND çalışması 260.000.000 paired-end okumayı mümkün kılan NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles) kartuşu ile gerçekleştirilmiştir. Böylece 23 numune ortalama 3000 coverage hedeflenerek dizilenebilmiştir. YND çalışmasının tamamlanmasının ardından verilerin analizine başlamadan önce elde edilen verilerin kalite değerlendirilmesi yapılması gerekmektedir. Çalışma sonucunda dizilemenin doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan en yaygın ölçüm platformu olan Q30 skorumuz %80,1 olarak tespit edilmiştir. Kalite skoru (Q-score), baz okumadaki hata olasılığının tahminidir. >Q30 bazların yüzdesinin, tüm çalışma boyunca ortalaması alınır. Q'nun değeri 30 olduğunda 1000 bazda 1 baz hatalı okuma olasılığını gösterir. Q30 skoru için Illumina firması NextSeq 500/550 Mid Output Kit için geçerli görülen değeri > %75 ve üzeri olarak belirtmiştir [122].

Cluster density olarak bilinen küme yoğunluğu, bir diğer analiz kalite değerlendirmesidir. Diziler akış hücresi (flow cell) üzerinde okuma plakaları üzerinde yer alan adaptörlere bağlanırlar. Akış hücresi üzerinde oluşan kütüphane kümelerinin yoğunluğu çalışmanın değerlendirmesinde önemlidir. Kullanmış olduğumuz kit için ideal küme yoğunluğu değeri 170-220 K/mm<sup>2</sup> 'dir [123]. Çalışma sonucu elde ettiğimiz değer ise 174 K/mm<sup>2</sup> 'dir.

Yürütmeye ait bütün parametreler değerlendirilip kalite değerlendirmesi olumlu sonuçlandıktan sonra her örneğin ikincil analizi FASTQ dosyaları kullanılarak QCI Analyze'da gerçekleştirilmiştir. Bütün örneklerin ortalama kalite okumaları önerildiği gibi %80'in üzerindeydi. UMI kapsamı  $\geq 400x$  ve  $\geq 200x$  kriterlerinde önerilen yüzdelerin altında kalan 3 örnek vardı; GBM-1-Likit, GBM-2-Likit ve GBM-10-Likit. Bu üç hasta çalışmadaki en düşük Qubit ölçümüne sahip likit biyopsi örnekleridir. Dolayısıyla reaksiyona diğer örneklerle göre reaksiyona daha az DNA girişleri olmuştur. Real time sonuçları incelendiğinde bu durumun kütüphane zenginleştirme açısından negatif bir etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Fakat düşük DNA girişi nedeniyle kütüphane zenginleştirme aşamasından sonra ortamda bulunan UMI işaretli DNA miktarının çok az olması nedeniyle biyoinformatik iş akışı için yeterli seviyeye gelemediği düşünülmüştür.

Doku ve likit biyopsi örneklerinin frekans dağılımlarına bakıldığında, doku örneklerinin tümör yüzdesi bilinmediği için frekans dağılımlarının değişken olduğu görülmüştür. Likit biyopsi örneklerinde ise homozigot ve heterozigot varyant frekanslarının daha net aralıklarda saptandığı gözlenmiştir. Aynı hastanın hem doku hemde likit biyopsi örneklerindeki allel frekans dağılımlarını kıyaslamanın, likit biyopsinin doku örneğini ne kadar temsil ettiği ile ilgili tam olarak bir ön bilgi sağlayamadığı görülmüştür. Bu durumun nedeninin taze dokulardaki tümör heterojenliğinin farklı olması ve likit biyopsi örneğinde düşük cfDNA nedeniyle çok fazla artefakt saptanması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Yapılan ön analizden sonra analiz kolaylığı sağlanması amacıyla QCI Interpret'e her hastanın doku ve likit biyopsi örneklerinin VCF dosyaları kullanılarak ve ilgili panel seçilerek somatik analiz edilmek üzere sisteme birlikte yüklenmiştir. Doku ve likit biyopsi örneklerinin her ikisi de hem germline hem somatik varyantları içerir. Somatik testler için, normal hücrelerden kontaminasyon ve tümör heterojenliği birleşerek öngörülemeyen VAF'lara neden olur. VAF beklenenden çok daha yüksekse, varyantın germ hattı veya heterozigotluk kaybı (LoH) bölgesinde olduğunu gösterebilir. Varyant, LoH'un beklenmediği bir gendeyse (örneğin, aktive edici mutasyonların mekanizma olduğu bir onkogende), germline daha olası bir açıklama olabilir. Beklenenden çok daha düşük bir VAF, yanlış pozitifliği veya düşük seviyeli tümör heterojenliğini gösterebilir. Beklenenden daha düşük bir VAF varyantının teknik geçerliliği çok güçlüyse, tümör heterojenitesi daha olasıdır [124]. Çalışmamızda kan örneği kullanılmamasına rağmen likit biyopsi örneğinde saptanabilen cfDNA kaynaklı germline varyantlar nedeniyle dokulardaki germline varyantların büyük oranda ayırt edilebildiği düşünülerek analizler gerçekleştirilmiştir.

6 doku örneğinde TP53 mutasyonu saptanmıştır. Tümör baskılayıcı ve transkripsiyon faktörü p53, hasarlı hücre apoptozu, genomik stabilitenin korunması, anjiyogenezin inhibisyonu ve hücre metabolizmasının ve tümör mikroçevresinin düzenlenmesi dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel tepkileri düzenleyerek tümörün önlenmesinde kritik roller oynar. TP53, kanserde en yaygın olarak deregüle edilmiş genlerden biridir. p53-ARF-MDM2 yolu, glioblastoma (GBM) hastalarının %84'ünde ve GBM hücre hatlarının %94'ünde düzensizdir. Düzensiz p53 yolu bileşenleri, GBM hücre istilası, göçü, çoğalması, apoptozdan kaçınma ve kanser hücresi sapması ile

ilişkilendirilmiştir. GBM'deki TP53 mutasyonları, çoğunlukla, p53 proteininin onkogenik varyantlarının bir fonksiyon kazancı (GOF) yüksek ifadesine yol açan nokta mutasyonlarıdır. Bu nispeten az çalışılmış GOF p53 mutantları, muhtemelen yabancı tip p53 tarafından düzenlenenlerden farklı bir dizi gen üzerinde transkripsiyon faktörleri olarak hareket ederek GBM malignitesini teşvik ederler. İfadeleri, GBM tedavisi için belirteç ve hedef olarak potansiyel önemlerini vurgulayarak daha kötü prognozla ilişkilidirler [125]. Chang ve arkadaşlarının (2016) tümör örneklerinde tekrarlayan mutasyona uğramış kalıntıları tanımlamak için geliştirdikleri istatistiksel bir algoritma yaptıkları çalışmada, glioblastoma dahil çalışmaya alınan 25 tümör tipinde gözlenen en yaygın hotspot bölgenin TP53 R248 varyantının olduğunu belirtmişlerdir [126]. GBM-DOKU-10 hastamızda saptanan R248C mutasyonu likit biyopsi örneğinde tespit edilememiştir. Aynı çalışmada geçen TP53 R249, R273 ve I195 mutasyonları ise sırasıyla çalışmamızdaki GBM-DOKU-3, GBM-DOKU-1 ve GBM-DOKU-2 örneklerimizde saptanmıştır. Bu üç varyantta hastaların likit biyopsi örneklerinde saptanamamıştır. Nguyen ve arkadaşlarının (2014) GBM'deki endojen MSH6 mutasyonlarını, anaplastik oligodendroglial tümör dokusunu ve karşılık gelen beyin tümörünü başlatan hücre dizilerini (BTIC) araştırdıkları çalışmalarında IDH1 negatif, radyoterapi ve temozolomide ön tedavisi uygulanmış nüks görülmüş bir GBM hastasında TP53 P151S mutasyonu raporlanmıştır [127]. Çalışmamızdaki GBM-DOKU-6 örneğinde P151S mutasyonu saptanmış olup, hastanın likit biyopsi örneğinde bu varyant saptanamamıştır. GBM-DOKU-4 örneğimizde saptanan L344P mutasyonu somatik olarak meme, pankreas, prostat, böbrek, üst solunum-sindirim sisteminde raporlanmıştır [128]. Dokuda saptanan varyant, hastanın likit biyopsi örneğinde saptanamamıştır.

4 doku örneğinde PTEN mutasyonu saptanmıştır. Parsons ve arkadaşlarının (2008) 22 insan GBM örneğinde 20.661 protein kodlayan geni analiz ettikleri çalışmalarında PTEN c.802-1G>A varyantı Br03X kodlu örnekte saptanmıştır ve PTEN geninin TP53 ve EGFR ile birlikte GBM'lerin %30 ila 40 arasında değiştiği belirtilmiştir [129]. Çalışmamızdaki GBM-DOKU-8 örneğinde bu mutasyon saptanmış olup, hastanın likit biyopsi örneğinde bu varyant saptanamamıştır. Kato ve arkadaşlarının (2000) 66 insan beyin tümöründe iki ana tümör baskılayıcı gen olan TP53 ve PTEN genlerindeki mutasyonlarını taradıkları çalışmalarında PTEN mutasyonunun, hem TP53 mutasyonu olan hem de olmayan 64 tümörün 8'inde (%12.5) ve başlıca GBM'lerde (26'nın 7'si,

%26.9) gözleendiği belirtilmiştir. Çalışmada S78348 kodlu örnekte PTEN c.212G>A mutasyonu saptanmıştır. PTEN geni mutasyonunun, glioma ilerlemesinde TP53 genininkinden daha sonraki bir olay olduğunu ve her iki genetik yolla ilişkili olduğu vurgulanmıştır [130]. Çalışmamızdaki GBM-DOKU-10 rneğinde bu mutasyon saptanmış olup, hastanın likit biyopsi örneğinde bu varyant saptanamamıştır. Çalışmamızdaki GBM-DOKU-3'te saptanan c.80-1G>C varyantı ve GBM-DOKU-4'te saptanan c.313T>A varyantı daha önce hiçbir yayında raporlanmamıştır, hastalarımızda saptanan bu varyantlar likit biyopsi örneklerinde saptanamamıştır.

1 doku rneğinde EGFR mutasyonu saptanmıştır. Lee ve arkadaşlarının (2006) 100'den fazla glioblastomda *EGFR* geninin bütün ekzonlarını dizilediler. Tümörlerin yaklaşık %15'i, EGFR'nin amino asit dizisini değiştiren değişiklikler olan missense mutasyonlar içeriyordu. Sadece bir tümör EGFR kinaz alanında mutasyona sahipti (L861Q); geri kalanların hücre dışı alanında mutasyonlar vardı. EGFR missense mutasyonlarının glioblastomdaki dağılımı, EGFR sinyallemedeki değişikliklerin kanser gelişiminde de rol oynadığı ancak tüm onkogenik mutasyonların kinaz alanında olduğu akciğer kanserindeki ile çelişki göstermesi özellikle yayında vurgulanmıştır. S003577 kodlu örnekte c.1787C>T mutasyonu saptanmıştır [131]. Çalışmamızdaki GBM-DOKU-4 rneğinde bu mutasyon saptanmış olup, hastanın likit biyopsi örneğinde bu varyant saptanamamıştır.

1 doku örneğinde de MET mutasyonu saptanmıştır. Saptanan c.1949G>A varyantı daha önce hiçbir yayında raporlanmamıştır. GBM-DOKU-2 rneğinde saptanan varyantın klinik önemi net olarak bilinmemekle birlikte hastanın likit biyopsi örneğinde bu varyant saptanamamıştır. Moon ve arkadaşlarının (2000) glioma tmrigenesinde MET mutasyonlarının ve delesyonlarının rolünün ilk araştırmasını temsil eden çalışmalarında, aktive edici mutasyonların yaygın olmamasına rağmen (11 tümörden 1'inde), MET geninin delesyonu, anöploidi ve amplifikasyonunun tümör hücrelerinde yaygın olduğunu (11 tümörün 7'sinde) ve glioma oluşumu veya ilerlemesinde katkıda bulunan bir faktör olabileceği sonucuna varıldığı vurgulanmıştır [132].

Çalışmamızda GBM-8 numaralı örneğimizin hem doku hem de likit biyopsi örneklerinde JAK2 V617F (dokuda saptanan VAF: %2.72, likit biyopside saptanan

VAF: %8.77) mutasyonu saptanmıştır. Diğer hiçbir örneğimizin dokusunda saptanan mutasyon daha önce belirtildiği gibi likit biyopsi örneğinde saptanamıştır. GBM-DOKU-8 örneğinde %33 VAF ile saptanan PTEN mutasyonunun ise likit biyopsi örneğinde saptanamaması dikkat çekici bir unsurdur. JAK2 V617F, miyeloproliferatif hastalıklarda oldukça tekrarlayan bir mutasyondur. Polisitemi veralı hastaların yaklaşık %98'inde ve esansiyel trombositemi ve primer miyelofibrozu hastaların yarısından biraz fazlasında bulunur. Kansere daha az ilişkili olmakla birlikte görüldüğünde miyeloid lösemilerde lenfoid lösemilere göre daha olasıdır. V617F mutasyonu, artan kinaz aktivitesi ile sonuçlanan aktive edici bir mutasyondur. Mutasyon hematolojik malignitelerle sınırlı gibi görünmektedir [133]. Piccioni ve arkadaşlarının (2019) 222 GBM hastası dahil olmak üzere primer beyin tümörü olan 419 hastayı analiz ettikleri çalışmalarında kullandıkları cfDNA tahlilinin, yalnızca somatik değişiklikleri bildirdiğini, bununla birlikte yüksek tümör yükü ve/veya kromozomal instabilitesi olan vakalarda germline değişiklikler ile somatik değişikliklerin arasındaki ayrımın zorlaştığını belirtmişlerdir. Tek başına cfDNA'nın dizilenmesi yoluyla değişikliklerin hematopoietik kökenini dışlamanın mümkün olmadığını ve JAK2 V617F gibi bazı değişikliklerin katı tümörlerden ziyade miyeloproliferatif neoplazmalarda daha sık meydana geldiğini vurgulamışlardır. Bu nedenle, yalnızca doku testine benzer şekilde, cfDNA'nın YND'si tarafından tanımlanan değişikliklerin tümör kaynaklı kökeninin kesin olarak doğrulanamadığının altını çizmişlerdir [96]. Ptashkin ve arkadaşları (2018) eşleştirilmiş tümör-kan sekansını kullanarak solid tümörlü hastalarda klonal hematopoez (KH) ile ilgili mutasyonları belirlemeyi hedefledikleri çalışmalarında, her hastanın kan lökositlerinde KH ile ilgili mutasyonların varlığını ve karşılık gelen eşleşen tümör örneğinde mutasyonu barındıran DNA moleküllerinin fraksiyonunu belirlediler. KH, hematopoietik kök ve/veya progenitör hücrelerde klonal genişlemeye yol açan genomik değişikliklerin somatik edinimidir. Kanserli hastalarda, yaşlanma, sigara içme ve radyasyon tedavisi ile ilişkili olarak KH sık görülen bir durumdur. Klonal hematopoez, tedaviyle ilişkili hematolojik malign neoplazma riskinin artmasıyla ilişkilidir ve sıklıkla KH'de mutasyona uğrayan genler, hematolojik malign neoplazmalarda da yaygın olarak değişmiştir. Ptashkin ve arkadaşları, solid tümörlerde yaygın bir lösemi mutasyonu olan JAK2 V617F'in yakın tarihli raporlarının, kanserli hastalarda yüksek KH prevalansının, infiltrat lökositlerin varlığı nedeniyle yalnızca tümöre yönelik genomik profillemenin sonuçlarını ne derece karıştırabileceğini

incelemelerine neden olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında, eşleşen normal bir numunenin sekanslanmadığı hastalarda KH mutasyonlarının somatik tümör varyantları olarak yanlış atfedilip atfedilmeyeceğini ve bazılarının hatalı tedavi önerileriyle sonuçlanabilecek eyleme geçirilebilir değişiklikler olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, ilerlemiş kanserli bir hasta popülasyonuna dayanan en büyük solid tümörde klonal hematopoez raporunu sunduklarını belirtmişlerdir. Genel olarak hastaların küçük bir kısmı etkilenirken, yaşlı hastalarda solid tümörde klonal hematopoez prevalansının daha yüksek olduğunu ve özellikle tedavi kararları değişken sonuçlara dayalıysa, yalnızca tümör dizileme sonuçlarının dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermişlerdir. JAK2 mutasyonları diğer büyük ölçekli dizileme çalışmaları tarafından tanımlanmadığından, bu çalışmada JAK2 V617F mutasyonlarının bulunması, muhtemelen lökosit infiltrasyonu nedeniyle solid tümörde klonal hematopoez mutasyonlarının saptanmasından kaynaklanan bir artefaktı temsil ettiği düşünülmüştür [134].

Li ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada Küçük hücreli dışı akciğer kanserli (KHDAK) hastaların %1'inde JAK2 V617F mutasyonunu saptadıklarını bildirmişlerdir. JAK2 p.V617F mutasyonu, JAK2 kinazın yapısal aktivasyonuna ve dolayısıyla JAK-STAT sinyal yolağına neden olur. JAK-STAT yolu proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz dahil hücresel süreçleri düzenler ve tümörjenez ve kanser gelişimindeki rolü hem hematolojik maligniteler hem de katı tümörler için iyi belgelenmiştir. JAK kinaz inhibitörleri, anormal JAK-STAT yolağı aktivitesinin hastalık patogenezinin ana mekanizması olduğu kanserleri tedavi etmek için geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada dokuz tümör örneğinde %2-13 aralığındaki düşük mutasyon alel fraksiyonu, mutasyonun somatik olduğunu kuvvetle düşündürmüştür. Daha sonra JAK2 p.V617F için gerçek zamanlı allel spesifik PCR gerçekleştirilmiş ve bu mutasyon dokuz tümör örneğinin tümünde doğrulanmıştır. JAK2 p.V617F mutasyonlu dokuz vakadan üçü KRAS mutasyonu, biri EGFR mutasyonu ve ikisi BRAF p.V600E mutasyonu ile birlikte ortaya çıktığı saptanmıştır. Mutasyon alel fraksiyonlarının daha fazla incelenmesi, JAK2 p.V617F mutasyonunun, birlikte meydana gelen onkojenik mutasyonlardan çok farklı alel fraksiyonlarına sahip olduğunu göstermiştir ve bunların aynı tümör numunesindeki farklı alt klonal hücre popülasyonlarından türetildiğini düşündürmüştür. Gen ekspresyonu analizi, JAK2 kazancının önemli ölçüde yüksek PD-L1 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu, JAK2

kaybının ise önemli ölçüde azaltılmış PD-L1 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koydu. Anlamsız mutasyon veya delesyondan kaynaklanan JAK2 kaybı, PD-L1 ekspresyonu üzerinde benzer etkiye sahipti. p.V617F gibi JAK2 aktive edici mutasyonların, artan PD-L1 ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini ve bu nedenle tümörü anti-PD1 immünoterapisine duyarlı hale getirebileceği varsayılmıştır. PD-L1 ekspresyon verilerinin olmaması nedeniyle bu fikir doğrudan test edilememiş olsa da, hipotezin önemli potansiyel klinik etkisinin olduğu ve gelecekte araştırmaya açık olduğu belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca düşük allel fraksiyonlarının, JAK2 p.V617F mutasyonunun test edilen numunelerdeki subklonal tümör hücrelerinden geldiğini öne sürse de, belirsiz potansiye sahip klonal hematopoezi olarak adlandırılan yaşlanmayla ilgili bir fenomene ilişkin alternatif bir yorumunda bulunduğu belirtilmiştir. Tespit edilen JAK2 p.V617F mutasyonunun belirsiz potansiye sahip klonal hematopoezi olan kişilerde infiltre hematolojik hücrelerden kaynaklandığı düşünülebilir. Bununla birlikte, belirsiz potansiye sahip klonal hematopoezi olan bireylerin kan örneklerinde tespit edilen lösemideki somatik mutasyonların ve lenfoma ile ilgili genlerin genel olarak düşük allel fraksiyonlarına sahip olduğu yayınlanmış sonuçlara ek olarak, sekanslanmış numunelerindeki hematolojik hücrelerin yüzdesi neredeyse sıfır olduğu için bu senaryoyu olası görmediklerini de eklemişlerdir. Belirsiz potansiye sahip klonal hematopoezi nedeniyle kandaki klonal popülasyon %100'e yaklaşabilir ve sıralı tümör örneklerindeki hematolojik hücrelerin yüzdesi tipik vakalardan daha yüksektir, bu nedenle infiltre hematolojik hücreler nedeniyle JAK2 p.V617F mutasyonunun saptanmasına yol açar. Çalışmadaki JAK2 p.V617F mutasyonuna sahip dokuz hastadan bazıları için en azından bir olasılık olduğu kabul edilmiş fakat bu olasılığı dışlamak için dokuz hastanın kan örneklerinin sekanslanmadığı belirtilmiştir [135].

Hu ve arkadaşları (2018) tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışma, cfDNA'da bulunan ancak KHDAK hastalarının tümör dokusunda bulunmayan KRAS ve JAK2 mutasyonlarının çoğunun belirsiz potansiye sahip klonal hematopoeziden kaynaklanma olasılığının yüksek olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada, aslında tümörden ziyade beyaz kan hücrelerinden (yani klonal hematopoez) türetilen doğrulanmış plazma genotipleme deneylerinde cfDNA'da tespit edilen JAK2, TP53 ve KRAS'ta tekrarlayan mutasyonlar rapor edilmiştir. Yaklaşım, klinisyenlerin cfDNA'da, özellikle KH ile ilişkili genlerde tespit edilen mutasyonların her zaman

tümör genotipini yansıtmayabileceğinin farkında olması gerektiğini vurgulamaktadır. Çalışmada, klonal hematopoez olarak bilinen malign olmayan hematopoietik hücrelerdeki somatik mutasyonların, tümör genotipleme ile plazma cfDNA genotipleme arasında tekrar eden bir uyumsuzluk kaynağı olabileceği varsayılmıştır. Spesifik amaç, KH'ye bağlı yanlış pozitifleri, yani KHDAK genotipini belirlemek amacıyla kullanılan plazma genotiplemesinin, bunun yerine tümörden değil KH'den türetilen mutasyonları tanımladığı durumları belirlemektir. Hastaların hem doku, hem plazma hem de periferik kan hücrelerinden yapılan testler sonucunda; plazma ve periferik kan hücrelerinde saptanıp tümör dokusunda saptanmayan mutasyonun kökeninin KH olduğu, plazma ve tümörlü dokuda saptanıp periferik kan hücrelerinde saptanmayan mutasyonun kökeninin tümör olduğu, sadece plazmada saptanıp periferik kan hücrelerinde ve tümörlü dokuda saptanmayan mutasyonun kökeninin ise belirsiz olduğu belirtilmiştir [136].

CNV'ler, bir kilobazdan (Kb) birkaç megabaza (Mb) kadar değişen genomik bölgeleri etkileyen bir tür yapısal değişikliktir. Bu büyük ölçekli genetik varyantlar, genom boyunca ortaya çıkabilir ve yapıyı değiştirebilir. CNV'ler, belirli bir bölgenin kopya sayısını, bu bölgeleri delesyona (kayıp) veya duplikasyona (kazanım) uğratarak değiştirebilirler. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH), genom çapında CNV'leri (genom boyunca yayılmış CNV'ler) tespit etmek için kullanılan en eski tekniklerden biridir. Test-referans numuneleri arasındaki floresan yoğunluk oranlarındaki değişiklikler kromozomal kayıp ve kazanç bölgelerini belirlemek için kullanılır. Çözünürlüğü > 5Mb ile sınırlı olduğu için CGH yöntemi, genom çapında CNV'leri yüksek çözünürlükte tespit etmek için mikroarrayler kullanılarak daha da geliştirildi. Mikroarray tabanlı yöntemler, CGH tekniklerinde kullanılan aynı prensibi uygular. Bununla birlikte, CGH'de kullanılan normal metafaz kromozomlarının aksine, mikroarray cam slaytlar üzerine basılmış problemler içerir. Bu problemler genom boyunca yayılır ve spesifik DNA segmentlerine hibridize olabilir. Mikroarrayler, hem klinik hem de araştırma ortamında CNV'leri tespit etmek için güvenilir, verimli ve ölçeklenebilir bir yöntem sunar. Farklı platformlardaki CNV algılama hassasiyetlerindeki farklılıklar, bu arraylerin ana dezavantajı olarak kabul edilir [137]. Yapılan bir çalışmada büyük CNV'lerin (>1Mb) farklı prob dağılımlarına sahip arraylerde bile yüksek doğrulukla tespit edildiği, ancak kısa CNV'leri tespit etmede değişken verimlilikler gösterdiği saptanmıştır [138]. Bilim adamları, bu sorunu

çözmek için CNV'leri tahmin etmek için yeni nesil dizileme tabanlı yöntemler geliştirdiler. Yakın tarihli bir çalışmada, kopya sayısının tahmini olarak, ampikon ve/veya gen başına normalize edilmiş okuma sayılarının normal örneklerdekilere oranı kullanılmıştır. Gen başına sınırlı sayıda ampikon içeren hedeflenen YND verileri için, önceki çalışmalarda önerildiği gibi medyan oran değerleri ve 3.5'lik bir değiştirilmiş z-skoru cut-off değeri kullanılarak değiştirilmiş bir yaklaşım önerilmiştir [139]. Kanserde klinik olarak ilgili dizi varyantlarını (küçük indeller ve tek nükleotid varyantları) raporlamaya yönelik kılavuzlar kapsamlıdır, ancak somatik kopya sayısı kazanımları açısından kısıtlıdır. Sınırlı boyutta gen (hot spot) panelleri uygulanırken, yüksek düzeyli kopya sayısı kazanımları, kopya sayısı kayıplarından veya düşük düzeyli kopya sayısı kazanımlarından daha güvenilir bir şekilde saptanabilir [140].

Kapsama derinliğine (depth of coverage) dayalı CNV tahmininde, önce bir dizi hedef ekzomdan bir kontrol veri seti oluşturulur. Bu kontrol veri seti, kopya sayısı nötr bir örnekte kapsama derinliği dağılımını temsil eder. Ardından tahmin programı, her bir ekzomu kontrol ile karşılaştırır ve kapsamı artmış veya azalmış bölgeleri arar. Duplikasyonlar (amplifikasyon) kapsamı artmış bölgelerdir, delesyonlar ise kapsamı azalmış bölgelerdir. Çalışmamızda medyan coverage değerlerini kullanarak doku örneklerini kendi içinde, likit biyopsi örneklerini de kendi içinde kıyaslayarak CNV analizini gerçekleştirilmiştir. YND panellerinde amplifiye edilen bütün bölgelerin birbirine oranları sabittir. Kullanılan başlangıç DNA miktarının farklı olması veya oluşturulan megahavuzda farklı nM'da eklenmesi gibi faktörlerin örneklerin okuma sayılarının daha yüksek veya daha düşük olması ile sonuçlanırken, panelde bulunan bölgelerin okuma sayılarının birbirine oranı değişmez. Bu durum göz önünde bulundurularak excell'de koşullu biçimlendirme özelliğini kullanarak renklendirilen değerler amplifikasyon ve delesyon açısından değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz verileri ek bir yöntemle (FISH, MLPA vb.) doğrulama imkanımız olmamıştır.

Doğrulama imkanımız olmamasına rağmen bazı hastalardaki sonuçlar tek başına YND yöntemi ile kesin bulgular elde etmemizi sağlamıştır. GBM-DOKU-1, GBM-DOKU-5 ve GBM-DOKU-7 örneklerinde EGFR geninde bariz bir amplifikasyon göze çarpmaktadır. 28 ekzonlu olan EGFR genindeki hot spot mutasyonların yoğun olduğu 7 ekzon panelimizin kapsamındadır, bu nedenle yapılan analizler de bu bölgelerin medyan coverage değerlerine göre yapılmıştır. Yaptığımız analizler EGFR

amplifikasyonu ile ilgili yorum yapabilmemizi mümkün kılarken, EGFRvI (N-terminali delesyonu), vII (ekzon 14-15 delesyonu), vIII (ekzon 2-7 delesyonu), vIV (25-27 ekzonlarının delesyonu), vV (ekzon 25-28 delesyonu) açısından değerlendirme yapılamamıştır. Bunların arasında vII ve vIII onkogeniktir. GBM'de bulunan EGFR mutantları arasında en yaygın olarak EGFRvIII görülür. Dolayısıyla özellikle EGFR geninde CNV analizi için bütün ekzonların panelde bulunması gerektiği anlaşılmaktadır ve CNV analizi hedefleyen YND panellerinde buna dikkat edilmesi gerekmektedir. EGFR geninin amplifikasyonu, ikincil GBM hastalarının %8'ine kıyasla birincil GBM hastalarının %57.4'ünde meydana gelir ve yüksek EGFR protein seviyeleri ile ilişkilidir [141].

GBM-DOKU-4 ve GBM-DOKU-6 örneklerinde hem EGFR geninde hem de MET geninde amplifikasyondan şüphelenilmiştir. Bu iki genin medyan coverage değerleri kıyaslandığında normalin biraz üzerinde bir okuma oranına sahip oldukları farkedilmiştir. Reseptör tirozin kinaz (RTK) genlerinin amplifikasyonu, GBM'nin tümörigenezinde çok önemli bir rol oynar ve mitojenle aktive olan protein kinaz yolunun aktivasyonu yoluyla tümör büyümesinin ana itici gücüdür. GBM'lerin %50'ye kadarı, EGFR , KIT , VEGFR2 , PDGFRA ve MET dahil olmak üzere RTK amplifikasyonuna sahiptir. RTK genlerinin yüksek düzeyde amplifikasyonu, GBM'nin tümörigenezinde nispeten geç bir olay gibi görünmektedir ve genellikle yalnızca bir RTK yüksek seviyeli amplifikasyon gösterir. GBM'de olası yeni terapötik hedefler olarak RTK'leri belirlemek amacıyla, belirli RTK'lerin amplifikasyonları için Cancer Genome Atlas projesi kopya numarası verilerini analiz eden bir çalışmada en yaygın amplifiye edilmiş RTK geni EGFR (vakaların %41'i) idi ve bunu tek bir 4q12 amplikonunun bir parçası olarak KIT (vakaların %7'si) ve KDR (vakaların %4'ü) ile yaygın olarak koamplifiye edilen PDGFRA (10%) izledi. MET, en sık amplifiye edilen üçüncü RTK idi (vakaların %2'si). Beklenmeyen bir gözlem, 13 vakada (%6.3) çoklu RTK'ların birlikte amplifikasyon göstermesiydi. En yaygın olanı EGFR ve PDGFRA'nın birlikte amplifikasyonuydu (5 vaka). EGFR, her biri tek bir vakada EPHB3, ERBB3, INSR, MET ve NTRK1 ile eş zamanlı olarak birlikte amplifiye edilmiştir. Bir vaka, EPHA8, EPHB2, FGFR2 ve PDGFRA dahil olmak üzere çok sayıda RTK'nın birlikte amplifikasyonunu gösterdi. Bir vaka, MET ve PDGFRA'nın birlikte amplifikasyonunu gösterdi. Genel olarak, EGFR, PDGFRA ve MET, en yaygın olarak birleştirilmiş RTK'lar olmuştur. Koamplifikasyonun varlığını

doğrulamak için yapılan FISH çalışmasında aynı tümör hücrelerinde amplifikasyonlar gözlemlendikten sonra, tek tümörlerde çoklu RTK'lerin birlikte amplifikasyonunun olası önemli klinik etkileri nedeniyle, 350 GBM'lik kohortta EGFR , MET ve PDGFRA için eşzamanlı FISH çalışması gerçekleştirilmiştir. Toplamda, birden fazla RTK'nın amplifiye olduğu 16 GBM (%4,5) gözlemlenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde çoklu RTK amplifikasyonlarının aynı tümör hücresinde mevcut olmadığını, ancak tümör hücrelerinin farklı iç içe geçmiş alt popülasyonlarında mevcut olduğu belirtilmiştir. Böyle bir durumda, çoklu amplifikasyonların "yolcu" olaylarını temsil edebileceğine dikkat çekilmiştir (yani, tümörün büyümesi üzerinde çok az etki ile genomik kararsızlığı yansıtır) [142].

GBM-DOKU-3 örneğinde hem PDGFRA geninde hem de KIT geninde amplifikasyondan şüphelenilmiştir. Özellikle PDGFRA genindeki amplifikasyon net bir şekilde dikkat çekmektedir. Puputti ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir çalışmada KIT amplifikasyonlarının, hem glioma teşhisi sırasında hem de tümör nüksü sırasında PDGFRA ve EGFR amplifikasyonlarının varlığı ile önemli ölçüde ilişkili olduğu belirtilmiştir [143].

GBM-DOKU-2 örneğinde RPN2 genindeki amplifikasyon dikkat çekmektedir. Normalde 17 ekzondan oluşan genin sadece 16. ekzonunu içeren panelimizde genin tamamı hakkında yorum yapamamakla birlikte 16. ekzondaki net bir şekilde artmış olan medyan coverage'ı tek başına bile oldukça dikkat çekmektedir. Ribophorin II (RPN2), aşağı regülasyonu, docetaxele dirençli insan meme kanseri hücrelerinde apoptozu tetikleyebilen bir N-oligosakkaril transferaz kompleksinin bir protein bileşenidir ve susturulması, tümörün sisplatin tedavisine duyarlılığını verir. Ek olarak, yüksek RPN2 ekspresyonuna sahip mide kanserleri, düşük ekspresyonu olanlara kıyasla çarpıcı biçimde daha yüksek nüks oranları ve daha düşük 5 yıllık sağkalım oranları sergilemiştir. Bu gözlemler, RPN2 ekspresyonunun kemoterapi direnci için öngörücü bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. Yakın tarihli bir çalışmada, RPN2'nin circNFIX (Dairesel RNA nükleer faktör I X) tarafından modüle edildiği ve in vivo ve in vitro GBM tümör büyümesini desteklediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, GBM'de RPN2 ekspresyonu ve radyoterapi direncinin korelasyonu bilinmemektedir [144].

Doku örneklerinin aksine likit biyopsi örneklerinde medyan coverage oranlarının genelde birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bu durumda amplifikasyon olduğu düşünülen örneklerin hiçbiri likit biyopsi örneklerinde saptanamamıştır. Çalışmamızda ana hedefimiz yeni biyobelirteç keşfi ve likit biyopside glioblastoma biyobelirteçlerini saptamaktır. Bu nedenle CNV analizini excel üzerinden yapmayı yeterli bulunmuştur ve doğrulama için ek bir programa ihtiyaç duyulmamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre glioblastomada likit biyopsi biyobelirteçleri saptanamamıştır.



## **6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Glioblastoma, zayıf sağkalıma sahip birincil MSS malignitesidir. Tedavi seçenekleri azdır ve hastalığın son derece heterojen doğasına rağmen, klinisyenler farklı sonuçları olan hastaları karakterize etmek için prognostik ve prediktif belirteçlerden yoksundur. IDH1/2 mutasyonları, EGFRvIII mutasyonu, VEGF aşırı ekspresyonu veya MGMT promotör metilasyon durumu dahil olmak üzere belirli immünohistokimya, FISH veya PCR bazlı moleküler belirteçler iyi tanımlanmıştır; bununla birlikte, klinik yararları ve doğrulukları sınırlıdır ve tümör dokusu örnekleri her zaman gereklidir.

Serum, idrar, BOS ve diğer vücut sıvıları, prognoz veya tedavi yanıtı ile bağlantılı küçük nükleik asit partikülleri içerir. Bunlardan bazıları tanıda faydalı olabilir, diğerleri cerrahi veya radyo-kemoterapi sonrası erken takipte kullanılabilir ve bazıları da tümör nüksü veya terapötik direnç gelişimini belirlemek için kullanılabilir. Beyin tümörlerinde BOS, primer tümöre anatomik yakınlığı nedeniyle sıvı biyopsi tabanlı tanı ve izleme için ideal likit biyopsi örneği olarak kabul edilse de, plazma ve serum kolayca erişilebilir ve minimal invazivdir. Plazma cfDNA'sında tümör tarafından saçılan genomik değişiklikleri belirleme olasılığı, hastaların klinik olarak stabil olduğu veya kana ctDNA salınımının baskılandığı aktif tedavide olduğu zamandan ziyade, tedaviden önce ve ilerleyici hastalık zamanlarında en yüksektir.

GBM'nin, KBB'nin bozulmasıyla birlikte oldukça agresif ve invaziv bir beyin tümörü olmasına rağmen, KBB'nin büyük bölümleri bozulmadan kalır. KBB'nin geniş çaplı bozulmaları genellikle hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkar. CtDNA, KBB bozulma bölgeleri aracılığıyla kan dolaşımına girebilir.

Bu veriler doğrultusunda çalışmamızdaki hasta grubunu Glioblastoma evre 4 tanılı hastalar oluşturmaktadır. Hastaların doku örnekleri ile eş zamanlı olarak likit biyopsi örnekleri de alınmıştır. Glioblastomda, plazmadaki kanser hücresi kaynaklı ctDNA'nın konsantrasyonu, diğer kanser türlerine kıyasla düşüktür ve bu, esas olarak kan-beyin bariyerinin varlığının bir sonucu olarak düşünülmektedir. Hastalarımızın cfDNA konsantrasyonları beklendiği gibi 0,5-2,12 ng aralığında saptanmıştır. Çalışmamızı benzersiz moleküler tanımlayıcı (UMI) tabanlı hedef dizileme yöntemi ile yaptık. UMI'ler, amplifiye edilen orijinal DNA'yı, amplifikasyon sonucu oluşan PCR kopyalarından ayırt edebilmesini sağlamaktadır. Böylece gerçek somatik mutasyonlar saptanabilmektedir. Çalışılan doku ve plazma örneklerini kıyasladığımızda, dokuda saptanan varyantların hiçbirini plazma örneklerinde saptayamadık. Doku örneklerinde glioblastomada en çok rastlanan TP53, PTEN, EGFR genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. 1 hastada MET geninde klinik önemi bilinmeyen varyant saptanmıştır. Doku örneklerinde saptanan TP53 c.1031T>C, PTEN c.80-1G>C ve c.313T>A, MET c.1949G>A varyantları literatürde daha önce glioblastoma örneklerinde saptanmamıştır. Ayrıca yapılan CNV analizlerinde EGFR, PDGFRA, KIT, MET genlerinde normalin üzerinde okuma sayısı alınmıştır, ek bir yöntemle doğrulanamamakla birlikte bölgelerdeki ciddi okuma sayısı artışı ve bu genlerin amplifikasyonlarının GBM'de sık gözlenmesi sonuçları destekler niteliktedir. 1

hastada RPN2 geninde, panelde genin sadece 16. ekzonu bulunmasına rağmen literatürde RPN2 geninin genin tamamının aşırı ifade edilmesi ile ilgili yayınlar bulunması nedeniyle aslında hastada RPN2 geninin genel olarak aşırı ifadesinin olabileceği düşünülmüştür.

Dolaşımdaki hücre dışı DNA'da tanımlanan tüm somatik varyantlar kanserden kaynaklanmaz. Somatik varyantlar, kısmen klonal hematopoezden kaynaklanan , görünüşte sağlıklı insanlarda bulunabilir. Belirsiz potansiyele sahip klonal hematopoez olarak da adlandırılan yaşa bağlı klonal hematopoez, periferik kanda en yaygın olarak hematolojik kanserlerle ilişkili tekrarlayan somatik varyantların saptanması ile karakterize edilir. Bu varyantlar, yaklaşık olarak yaşamın beşinci on yılından itibaren artan sıklıkta gözlenir ve 60 ila 69 yaş arasındaki kişilerin yaklaşık %5'inde ve  $\geq 70$  yaşındaki kişilerin %10'unda saptanır. Klonal hematopoezli bireylerin büyük çoğunluğunda hematolojik kanser yoktur, ancak artmış bir risk oluşturur. Belirsiz potansiyele sahip klonal hematopoezi inceleyen çalışmaların çoğu periferik kan ile yapılmış olsa da, bu mutasyonlar plazmada da görülmektedir. Çünkü sağlıklı bireylerde hücre içermeyen DNA'nın çoğunluğunun kaynağı hematopoietik hücrelerdir. Sınırlı kanıt göz önüne alındığında, bu genlerdeki ctDNA varyantlarını yorumlarken dikkatli olunması gerekir ve bu genlerdeki ctDNA varyantlarının nasıl yorumlanıp rapor edileceğini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızda 1 hastamızın hem doku hem de likit biyopsi örneklerinde JAK2 V617F mutasyonu saptanmıştır. Bu varyantın KH kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

ctDNA'daki mutasyon tespiti, erken kanser tespitinde, menşeye dokuyu, prognozu belirlemek, yanıtı izlemek ve tedaviye potansiyel direnci değerlendirmek veya minimal rezidüel hastalığı tespit etmek için kullanılma potansiyeline sahiptir. Nokta mutasyonlarının saptanmasının ötesinde cfDNA'nın değerlendirilmesi, kromozomal yeniden düzenlemeler, kopya sayısı değişiklikleri, metilasyon, fragmentasyon ve gen ekspresyonu çalışmalarını da kapsadığı için artan bir ilgi görmektedir.

Çalışmamızda YND yöntemi ile nokta mutasyonu ve kopya sayısı değişikliklerinin birlikte saptanabileceği gördük. Daha geniş hasta popülasyonunda, farklı yöntem ve farklı kitlerle glioblastomada likit biyopsi çalışmalarına ihtiyaç vardır.



## **KAYNAKLAR**

- [1] **Huang, R. Y., Neagu, M. R., Reardon, D. A. & Wen, P. Y.** Pitfalls in the neuroimaging of glioblastoma in the era of antiangiogenic and immuno/targeted

- therapy - detecting illusive disease, defining response. *Front. Neurol.* **6**, 33 (2015).
- [2] **Müller Bark, J., Kulasinghe, A., Chua, B. et al.** Circulating biomarkers in patients with glioblastoma. *Br J Cancer* **122**, 295–305 (2020).
  - [3] **Zhang, L., Riethdorf, S., Wu, G., Wang, T., Yang, K., Peng, G. et al.** Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 5701–5710 (2012).
  - [4] **Kulasinghe, A., Schmidt, H., Perry, C., Whitfield, B., Kenny, L., Nelson, C. et al.** A collective route to head and neck cancer metastasis. *Sci. Rep.* **8**, 746 (2018).
  - [5] **Kulasinghe, A., Kapeleris, J., Cooper, C., Warkiani, M. E., O’Byrne, K. & Punyadeera, C.** Phenotypic characterization of circulating lung cancer cells for clinically actionable targets. *Cancers (Basel)*; **11**; <https://doi.org/10.3390/cancers11030380> (2019).
  - [6] **Bardelli, A. & Pantel, K.** Liquid biopsies, what we do not know (yet). *Cancer Cell* **31**, 172–179 (2017).
  - [7] **Almutairi, M. M., Gong, C., Xu, Y. G., Chang, Y. & Shi, H.** Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cell Mol. Life Sci.* **73**, 57–77 (2016).
  - [8] **Wolburg, H., Noell, S., Fallier-Becker, P., Mack, A. F. & Wolburg-Buchholz, K.** The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. *Mol. Aspects Med.* **33**, 579–589 (2012).
  - [9] **Chen, Z. & Hambardzumyan, D.** Immune microenvironment in glioblastoma subtypes. *Front. Immunol.* **9**, 1004 (2018).
  - [10] **Zhao, C., Wang, H., Xiong, C. & Liu, Y.** Hypoxic glioblastoma release exosomal VEGF-A induce the permeability of blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **502**, 324–331 (2018).
  - [11] **Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K. et al.** The 2016 World Health Organization Classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
  - [12] **Iacob G, Dinca EB.** Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life.* 2009;2:386.
  - [13] **Rock K, McArdle O, Forde P, et al.** A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial:has a more radical approach improved survival? *Br J Radiol.* 2014;85:729–729.
  - [14] **Ohgaki H, Kleihues P.** Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005;109:93–93.
  - [15] **Salcman M.** Epidemiology and factors affecting survival. In: In malignant cerebral Glioma. Neurosurgical topic series. Apuzzo MLJ, editor. Ill. Park Ridge: American Association of Neurological Surgeons; 1990. pp. 95–110.
  - [16] **Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al.** Epidemiologic and molecular prognostic review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23:1985–1985.
  - [17] **Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee ShU.** Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Jan 1;18(1):3-9.
  - [18] **Salvati M, Frati A, Russo N, et al.** Radiation-induced gliomas:Report of 10 cases and review of the literature. *Surg Neurol.* 2003;60:60–60.

- [19] **Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL.** Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* 2007;25:867–867.
- [20] **Stupp, R., Brada, M., van den Bent, M. J., Tonn, J. C., Pentheroudakis, G. & Group, E. G. W.** High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **25**(Suppl 3), iii93–iii101 (2014).
- [21] **Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B. et al.** Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
- [22] **Wang, J. & Bettegowda, C.** Applications of DNA-based liquid biopsy for central nervous system neoplasms. *J. Mol. Diagn.* **19**, 24–34 (2017).
- [23] **Best, M. G., Sol, N., Zijl, S., Reijneveld, J. C., Wesseling, P. & Wurdinger, T.** Liquid biopsies in patients with diffuse glioma. *Acta Neuropathol.* **129**, 849–865 (2015).
- [24] **Westphal, M. & Lamszus, K.** Circulating biomarkers for gliomas. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 556–566 (2015).
- [25] **Furnari FB, et al.** Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21:2683–710.
- [26] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1061-8. doi: 10.1038/nature07385. Epub 2008 Sep 4. Erratum in: *Nature.* 2013 Feb 28;494(7438):506.
- [27] **McLendon R, Friedman A, Bigner D, et al.** Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455:1061–1061.
- [28] **Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al.** Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17:98–98.
- [29] **Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS.** Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol.* 2014;1(9):1–25.
- [30] **Nakada M, Kita D, Watanabe T, et al.** Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers.* 2011;3:3242–3242.
- [31] **Shankar, G. M., Balaj, L., Stott, S. L., Nahed, B. & Carter, B. S.** Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **17**, 943–947 (2017).
- [32] **Yoshimoto, K., Mizoguchi, M., Hata, N., Amano, T., Nakamizo, A. & Sasaki, T.** Molecular biomarkers of glioblastoma: current targets and clinical implications. *Curr. Biomark. Find.* **2**, 63–76; <https://doi.org/10.2147/cbf.s25590> (2012).
- [33] **Newton HB, Ray Chaudhury Malkin MG.** In: Overview of pathology and treatment of primary brain tumor, In *Textbook of Neuro-Oncology Neuroimaging.* 2nd ed. Newton HB, Jolesz FA, Malkin MG, Bourekas EC, Christoforidis GA, editors. London: Elsevier Medical Publishers/Academic Press; 2007. pp. 9–19.
- [34] **Scott J, Tsai Y-Y, Chinnaiyan P, Yu H-HM.** Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;81:206–206.
- [35] **Shergalis, A., Bankhead, A. 3rd, Luesakul, U., Muangsin, N. & Neamati, N.** Current challenges and opportunities in treating glioblastoma. *Pharmacol. Rev.* **70**, 412–445 (2018).

- [36] **Delgado-Lopez, P. D., Rinones-Mena, E. & Corrales-Garcia, E. M.** Treatment-related changes in glioblastoma: a review on the controversies in response assessment criteria and the concepts of true progression, pseudoprogression, pseudoresponse and radionecrosis. *Clin. Transl. Oncol.* **20**, 939–953 (2018).
- [37] **Kros, J. M., Mustafa, D. M., Dekker, L. J., Sillevs Smitt, P. A., Luiders, T. M. & Zheng, P. P.** Circulating glioma biomarkers. *Neuro Oncol.* **17**, 343–360 (2015).
- [38] **Brandes, A. A., Franceschi, E., Tosoni, A., Blatt, V., Pession, A., Tallini, G. et al.** MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2192–2197 (2008).
- [39] **Kang, H. C., Kim, C. Y., Han, J. H., Choe, G. Y., Kim, J. H., Kim, J. H. et al.** Pseudoprogression in patients with malignant gliomas treated with concurrent temozolomide and radiotherapy: potential role of p53. *J. Neurooncol.* **102**, 157–162 (2011).
- [40] **Parrish K.E., Sarkaria J.N., Elmquist W.F.** Improving drug delivery to primary and metastatic brain tumors: Strategies to overcome the blood-brain barrier. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2015;97:336–346. doi: 10.1002/cpt.71.
- [41] **Cardoso F.L., Brites D., Brito M.A.** Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res. Rev.* 2010;64:328–363. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.003.
- [42] **Hirano A., Matsui T.** (1975). Vascular structures in brain tumors. *Hum. Pathol.* **6**, 611–621. 10.1016/s0046-8177(75)80045-1.
- [43] **Bertossi M., Virgintino D., Maiorano E., Occhiogrosso M., Roncali L.** (1997). Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues. *Ultrastruct. Pathol.* **21**, 41–49. 10.3109/01913129709023246.
- [44] **Agarwal S., Sane R., Oberoi R., Ohlfest J.R., Elmquist W.F.** Delivery of molecularly targeted therapy to malignant glioma, a disease of the whole brain. *Expert Rev. Mol. Med.* 2011;13:e17. doi: 10.1017/S1462399411001888.
- [45] **Cohen A.L., Holmen S.L., Colman H.** IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2013;13:345. doi: 10.1007/s11910-013-0345-4.
- [46] **Amelot A., De Cremoux P., Quillien V., Polivka M., Adle-Biassette H., Lehmann-Che J., Françoise L., Carpentier A.F., George B., Mandonnet E., et al.** IDH-Mutation Is a Weak Predictor of Long-Term Survival in Glioblastoma Patients. *PLoS ONE.* 2015;10:e0130596. doi: 10.1371/journal.pone.0130596.
- [47] **Hegi M.E., Diserens A.-C., Gorlia T., Hamou M.-F., De Tribolet N., Weller M., Kros J.M., Hainfellner J.A., Mason W., Mariani L., et al.** MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005;352:997–1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331.
- [48] **Wick W., Meisner C., Hentschel B., Platten M., Schilling A., Wiestler B., Sabel M., Koeppen S., Ketter R., Weiler M., et al.** Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology.* 2013;81:1515–1522. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a95680.
- [49] **Aldape K.D., Ballman K., Furth A., Buckner J.C., Giannini C., Burger P.C., Scheithauer B.W., Jenkins R.B., James C.D.** Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of

- prognostic significance. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004;63:700–707. doi: 10.1093/jnen/63.7.700.
- [50] **Mellinghoff I.K., Wang M.Y., Vivanco I., Haas-Kogan D.A., Zhu S., Dia E.Q., Lu K.V., Yoshimoto K., Huang J.H., Chute D.J., et al.** Molecular Determinants of the Response of Glioblastomas to EGFR Kinase Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2005;353:2012–2024. doi: 10.1056/NEJMoa051918.
- [51] **Krex D., Klink B., Hartmann C., Von Deimling A., Pietsch T., Simon M., Sabel M., Steinbach J.P., Heese O., Reifenberger G., et al.** Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007;130:2596–2606. doi: 10.1093/brain/awm204.
- [52] **Chamberlain M.C.** Bevacizumab for the Treatment of Recurrent Glioblastoma. *Clin. Med. Insights Oncol.* 2011;5:117–129. doi: 10.4137/CMO.S7232.
- [53] **Verduin M., Compter I., Steijvers D., Postma A.A., Eekers D.B.P., Anten M.M., Ackermans L., Ter Laan M., Leijenaar R.T.H., Van De Weijer T., et al.** Noninvasive Glioblastoma Testing: Multimodal Approach to Monitoring and Predicting Treatment Response. *Dis. Markers.* 2018;2018:2908609. doi: 10.1155/2018/2908609.
- [54] **Siravegna G., Marsoni S., Siena S., Bardelli A.** Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017;14:531–548. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.14.
- [55] **Zsuzsanna Birkó, Bálint Nagy, Álmos Klekner, József Virga** *Int J Mol Sci.* 2020 Oct; 21(20): 7522. Published online 2020 Oct 12. doi: 10.3390/ijms21207522.
- [56] **Poulet G, Massias J, Taly V.** Liquid biopsy: general concepts. *Acta Cytol.* 2019;63(6):449–55.
- [57] **Rodríguez, J., Avila, J., Rolfo, C. et al.** When Tissue is an Issue the Liquid Biopsy is Nonissue: A Review. *Oncol Ther* **9**, 89–110 (2021). <https://doi.org/10.1007/s40487-021-00144-6>.
- [58] **Jia S, Zhang R, Li Z, Li J.** Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(33):55632–45.
- [59] **Guibert N, Delaunay M, Lusque A, et al.** PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer.* 2018;120:108–12.
- [60] **Zhao, C., Wang, H., Xiong, C. & Liu, Y.** Hypoxic glioblastoma release exosomal VEGF-A induce the permeability of blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **502**, 324–331 (2018).
- [61] **Dubois, L. G., Campanati, L., Righy, C., D’Andrea-Meira, I., Spohr, T. C., Porto-Carreiro, I. et al.** Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Front. Cell Neurosci.* **8**, 418 (2014).
- [62] **Kalpathy-Cramer, J., Gerstner, E. R., Emblem, K. E., Andronesi, O. C. & Rosen, B.** Advanced magnetic resonance imaging of the physical processes in human glioblastoma. *Cancer Res.* **74**, 4622–4637 (2014).
- [63] **Sarkaria, J. N., Hu, L. S., Parney, I. F., Pafundi, D. H., Brinkmann, D. H., Laack, N. N. et al.** Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro Oncol.* **20**, 184–191 (2018).
- [64] **García-Romero, N., Carrión-Navarro, J., Esteban-Rubio, S., Lázaro-Ibáñez, E., Peris-Celda, M., Alonso, M. M. et al.** DNA sequences within

- glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients. *Oncotarget* **8**, 1416–1428 (2017).
- [65] **Montani F., Bianchi F.** Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA. *EBioMedicine*. 2016;5:4–6. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.02.038.
- [66] **Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K.** The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* 2010;56:1733–1741. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.
- [67] **Calin G.A., Croce C.M.** MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*. 2006;6:857–866. doi: 10.1038/nrc1997.
- [68] **Yang C., Wang C., Chen X., Chen S., Zhang Y., Zhi F., Wang J., Li L., Zhou X., Li N., et al.** Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas. *Int. J. Cancer*. 2013;132:116–127. doi: 10.1002/ijc.27657.
- [69] **Wang Q., Li P., Li A., Jiang W., Wang H., Wang J., Xie K.** Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2012;31:97. doi: 10.1186/1756-9966-31-97.
- [70] **Sol N, Wurdinger T.** Platelet RNA signatures for the detection of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2017;36:263–72.
- [71] **Sol N, Wurdinger T.** Platelet RNA signatures for the detection of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017 Jun;36(2):263-272. doi: 10.1007/s10555-017-9674-0. PMID: 28681241; PMCID: PMC5557864.
- [72] **Dasgupta A, Lim AR & Ghajar CM** Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Mol. Oncol* 11, 40–61 (2017).
- [73] **Joose SA, Gorges TM & Pantel K.** Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Molecular Medicine* vol. 7 1–11 (2015).
- [74] **Aceto N. et al.** Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158, 1110–1122 (2014).
- [75] **Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B. & Carter BS** Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Review of Molecular Diagnostics* vol. 17 943–947 (2017).
- [76] **Sullivan JP et al.** Brain Tumor Cells in Circulation Are Enriched for Mesenchymal Gene Expression. *Cancer Discovery* vol. 4 1299–1309 (2014).
- [77] **Cristofanilli M. et al.** Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med* 351, 781–791 (2004).
- [78] **Yan W-T et al.** Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. *Sci. Rep* 7, 43464 (2017).
- [79] **Bono J. S. de et al.** Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* vol. 14 6302–6309 (2008).
- [80] **Krol, I., Castro-Giner, F., Maurer, M., Gkountela, S., Szczerba, B. M., Scherrer, R. et al.** Detection of circulating tumour cell clusters in human glioblastoma. *Br. J. Cancer* **119**, 487–491 (2018).
- [81] **Chudziak, J., Burt, D. J., Mohan, S., Rothwell, D. G., Mesquita, B., Antonello, J. et al.** Clinical evaluation of a novel microfluidic device for epitope-independent enrichment of circulating tumour cells in patients with small cell lung cancer. *Analyst* **141**, 669–678 (2016).

- [82] **Silvestris N, Ciliberto G, De Paoli P, et al.** Liquid dynamic medicine and N-of-1 clinical trials: a change of perspective in oncology research. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):128.
- [83] **Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N. et al.** Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 6, 224ra224–224ra224 (2014).
- [84] **Ignatiadis, M., Lee, M. & Jeffrey, S. S.** Circulating tumor cells and circulating tumor DNA: challenges and opportunities on the path to clinical utility. *Clin. Cancer Res.* 21, 4786–4800 (2015).
- [85] **Qiu J, Xu J, Zhang K, Gu W, Nie L, Wang G, Luo Y.** Refining Cancer Management Using Integrated Liquid Biopsy. *Theranostics.* 2020; 10(5): 2374–2384. Published online 2020 Jan 16. doi: 10.7150/thno.40677
- [86] **Arnedos M, Vicier C, Loi S, et al.** Precision medicine for metastatic breast cancer—limitations and solutions. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(12):693–704.
- [87] **Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T.** Role of circulating cell-free DNA in cancers. *Mol Diagn Ther.* 2015;19(6):339–50.
- [88] **Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S.** The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019;17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425120/>. Accessed 30 Sep 2020.
- [89] **Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, Higashiyama M, Kodama K, Imamura F, Kato K.** Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec 15;17(24):7808-15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1712. Epub 2011 Oct 5. PMID: 21976538.
- [90] **Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B.** The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature.* 2012 Jun 28;486(7404):537-40. doi: 10.1038/nature11219. PMID: 22722843; PMCID: PMC3436069.
- [91] **Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A.** Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature.* 2012 Jun 28;486(7404):532-6. doi: 10.1038/nature11156. PMID: 22722830; PMCID: PMC3927413.
- [92] **Otandault A, Anker P, Al Amir Dache Z, et al.** Recent advances in circulating nucleic acids in oncology. *Ann Oncol.* 2019;30(3):374–84.
- [93] **Birkó Z, Nagy B, Klekner Á, Virga J.** Novel Molecular Markers in Glioblastoma-Benefits of Liquid Biopsy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7522. Published 2020 Oct 12. doi:10.3390/ijms21207522
- [94] **Schwaederle M, Husain H, Fanta PT, Piccioni DE, Kesari S, Schwab RB, et al.** Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay. *Oncotarget.* 2016;7:9707–9717. doi: 10.18632/oncotarget.7110.
- [95] **Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al.** Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 2014;6:224ra224–224ra224. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.

- [96] **Piccioni, D. E., Achrol, A. S., Kiedrowski, L. A., Banks, K. C., Boucher, N., Barkhoudarian, G. et al.** Analysis of cell-free circulating tumor DNA in 419 patients with glioblastoma and other primary brain tumors. *CNS Oncol.* 10.2217/cns-2018-0015 (2019).
- [97] **Wang Z, Jiang W, Wang Y, Guo Y, Cong Z, Du F, et al.** MGMT promoter methylation in serum and cerebrospinal fluid as a tumor-specific biomarker of glioma. *Biomed Rep.* 2015;3:543–548. doi: 10.3892/br.2015.462.
- [98] **Brennan C.W., Verhaak R.G., McKenna A., Campos B., Nounshmehr H., Salama S.R., Zheng S., Chakravarty D., Sanborn J.Z., Berman S.H., et al.** The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 2013;155:462–477. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034.
- [99] The Cancer Genome Atlas Program-National Cancer Institute Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455:1061–1068. doi: 10.1038/nature07385.
- [100] **Markus H, Contente-Cuomo T, Farooq M, Liang WS, Borad MJ, Sivakumar S, et al.** Evaluation of Pre-Analytical Factors Affecting Plasma DNA Analysis. *Sci Rep* (2018) 8(1):7375. doi: 10.1038/s41598-018-25810-0.
- [101] **Rikkert LG, van der Pol E, van Leeuwen TG, Nieuwland R, Coumans FAW.** Centrifugation Affects the Purity of Liquid Biopsy-Based Tumor Biomarkers. *Cytomet A* (2018) 93(12):1207–12. doi: 10.1002/cyto.a.23641.
- [102] **van der Pol Y, Mouliere F.** Toward the Early Detection of Cancer by Decoding the Epigenetic and Environmental Fingerprints of Cell-Free DNA. *Cancer Cell* (2019) 36(4):350–68. doi: 10.1016/j.ccell.2019.09.003.
- [103] **Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, et al.** A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *J Mol Diagn* (2017) 19(1):162–8. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.09.009.
- [104] **Kuderer NM, Burton KA, Blau S, Rose AL, Parker S, Lyman GH, et al.** Comparison of 2 Commercially Available Next-Generation Sequencing Platforms in Oncology. *JAMA Oncol* (2017) 3(7):996–8. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.4983.
- [105] **Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J., Kinde I., Wang Y., Agrawal N., Bartlett B.R., Wang H., Luber B., Alani R.M., et al.** Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 2014;6:224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
- [106] **Perkins G., Lu H., Garlan F., Taly V.** Droplet-Based Digital PCR: Application in Cancer Research. *Adv. Clin. Chem.* 2017;79:43–91.
- [107] **Newman A.M., Bratman S.V., To J., Wynne J.F., Eclov N.C., Modlin L.A., Liu C.L., Neal J.W., Wakelee H.A., Merritt R.E., et al.** An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat. Med.* 2014;20:548–554. doi: 10.1038/nm.3519.
- [108] **Zhong Q., Bhattacharya S., Kotsopoulos S., Olson J., Taly V., Griffiths A.D., Link D.R., Larson J.W.** Multiplex digital PCR: Breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab. A Chip.* 2011;11:2167–2174. doi: 10.1039/c1lc20126c.
- [109] **Zill O.A., Banks K.C., Fairclough S.R., Mortimer S.A., Vowles J.V., Mokhtari R., Gandara D.R., Mack P.C., Odegaard J.I., Nagy R.J., et al.** The Landscape of Actionable Genomic Alterations in Cell-Free Circulating Tumor DNA from 21,807 Advanced Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 2018;24:3528–3538. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3837.

- [110] **Kennedy S.R., Schmitt M.W., Fox E.J., Kohn B.F., Salk J.J., Ahn E.H., Prindle M.J., Kuong K.J., Shen J.C., Risques R.A., et al.** Detecting ultralow-frequency mutations by Duplex Sequencing. *Nat. Protoc.* 2014;9:2586–2606. doi: 10.1038/nprot.2014.170.
- [111] **Schmitt M.W., Fox E.J., Prindle M.J., Reid-Bayliss K.S., True L.D., Radich J.P., Loeb L.A.** Sequencing small genomic targets with high efficiency and extreme accuracy. *Nat. Methods.* 2015;12:423–425. doi: 10.1038/nmeth.3351.
- [112] **Chung J., Lee K.W., Lee C., Shin S.H., Kyung S., Jeon H.J., Kim S.Y., Cho E., Yoo C.E., Son D.S., et al.** Performance evaluation of commercial library construction kits for PCR-based targeted sequencing using a unique molecular identifier. *BMC Genom.* 2019;20:216. doi: 10.1186/s12864-019-5583-7.
- [113] **Board RE, Wardley AM, Dixon JM, et al:** Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 120:461-467, 2010.
- [114] **Page K, Powles T, Slade MJ, et al:** The importance of careful blood processing in isolation of cell-free DNA. *Ann N Y Acad Sci* 1075:313-317, 2006.
- [115] **Url-1**<<https://www.qiagen.com/de-us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/cell-free-dna/qiaamp-circulating-nucleic-acid-kit/>> date retrieved 2021.
- [116] **Url-2**<<https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html>> date retrieved 2021.
- [117] **Url-3**<<https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology/2-channel-sbs.html>> date retrieved 2021.
- [118] **Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al.** Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra24.
- [119] **Li M, Xie S, Lu C, Zhu L, Zhu L.** Application of Data Science in Circulating Tumor DNA Detection: A Promising Avenue Towards Liquid Biopsy. *Front Oncol.* 2021 Jul 21;11:692322. doi: 10.3389/fonc.2021.692322. PMID: 34367974; PMCID: PMC8337081.
- [120] **Saenz-Antoñanzas A, Auzmendi-Iriarte J, Carrasco-Garcia E, et al.** Liquid Biopsy in Glioblastoma: Opportunities, Applications and Challenges. *Cancers (Basel).* 2019;11(7):950. Published 2019 Jul 5. doi:10.3390/cancers11070950.
- [121] **Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K.** Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int J Cancer.* 2021 Feb 1;148(3):528-545. doi: 10.1002/ijc.33217. Epub 2020 Aug 10. PMID: 32683679.
- [122] **Url-4**<<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq/specifications.html>> date retrieved 2022.
- [123] **Url-5**<<https://support.illumina.com/bulletins/2016/10/cluster-density-guidelines-for-illumina-sequencing-platforms-.html>> date retrieved 2022.
- [124] **Strom SP.** Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med.* 2016;13(1):3-11. doi:10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0004
- [125] **Zhang Y, Dube C, Gibert M Jr, et al.** The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers (Basel).* 2018;10(9):297. Published 2018 Sep 1. doi:10.3390/cancers10090297.
- [126] **Chang MT, Asthana S, Gao SP, Lee BH, Chapman JS, Kandath C, Gao J, Succi ND, Solit DB, Olshen AB, Schultz N, Taylor BS.** Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol.* 2016 Feb;34(2):155-63. doi: 10.1038/nbt.3391.

- [127] **Nguyen SA, Stechishin OD, Luchman HA, Lun XQ, Senger DL, Robbins SM, Cairncross JG, Weiss S.** Novel MSH6 mutations in treatment-naïve glioblastoma and anaplastic oligodendroglioma contribute to temozolomide resistance independently of MGMT promoter methylation. *Clin Cancer Res.* 2014 Sep 15;20(18):4894-903. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1856. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25078279.
- [128] **Url-6**<<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=24624812>> date retrieved 2022.
- [129] **Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW.** An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1807-12. doi: 10.1126/science.1164382. Epub 2008 Sep 4. PMID: 18772396; PMCID: PMC2820389.
- [130] **Kato H, Kato S, Kumabe T, Sonoda Y, Yoshimoto T, Kato S, Han SY, Suzuki T, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C.** Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):3937-43. PMID: 11051241.
- [131] **Lee JC, Vivanco I, Beroukhir R, Huang JH, Feng WL, DeBiasi RM, Yoshimoto K, King JC, Nghiemphu P, Yuza Y, Xu Q, Greulich H, Thomas RK, Paez JG, Peck TC, Linhart DJ, Glatt KA, Getz G, Onofrio R, Ziaugra L, Levine RL, Gabriel S, Kawaguchi T, O'Neill K, Khan H, Liau LM, Nelson SF, Rao PN, Mischel P, Pieper RO, Cloughesy T, Leahy DJ, Sellers WR, Sawyers CL, Meyerson M, Mellinghoff IK.** Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med.* 2006 Dec;3(12):e485. doi: 10.1371/journal.pmed.0030485.
- [132] **Moon YW, Weil RJ, Pack SD, Park WS, Pak E, Pham T, Karkera JD, Kim HK, Vortmeyer AO, Fuller BG, Zhuang Z.** Missense mutation of the MET gene detected in human glioma. *Mod Pathol.* 2000 Sep;13(9):973-7. doi: 10.1038/modpathol.3880177. PMID: 11007037.
- [133] **Url-7**<<https://civicdb.org/variants/64/summary>>date retrieved 2022.
- [134] **Ptashkin RN, Mandelker DL, Coombs CC, Bolton K, Yelskaya Z, Hyman DM, Solit DB, Baselga J, Arcila ME, Ladanyi M, Zhang L, Levine RL, Berger MF, Zehir A.** Prevalence of Clonal Hematopoiesis Mutations in Tumor-Only Clinical Genomic Profiling of Solid Tumors. *JAMA Oncol.* 2018 Nov 1;4(11):1589-1593. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2297.
- [135] **Li SD, Ma M, Li H, Waluszko A, Sidorenko T, Schadt EE, Zhang DY, Chen R, Ye F.** Cancer gene profiling in non-small cell lung cancers reveals activating mutations in JAK2 and JAK3 with therapeutic implications. *Genome Med.* 2017 Oct 30;9(1):89. doi: 10.1186/s13073-017-0478-1.
- [136] **Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, Kuang Y, Lizotte PH, Feeney NB, Guibert NM, Awad MM, Wong KK, Jänne PA, Paweletz CP, Oxnard GR.** False-Positive Plasma Genotyping Due to Clonal Hematopoiesis. *Clin Cancer Res.* 2018 Sep 15;24(18):4437-4443. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0143.

- [137] **Url-8**<<https://medium.com/intothegenomics/cnvs-copy-number-variants-context-detection-methods-and-exploratory-data-analysis-with-python-986de6a58072>> date retrieved 2022.
- [138] **Curtis C, Lynch AG, Dunning MJ, Spiteri I, Marioni JC, Hadfield J, Chin SF, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C.** The pitfalls of platform comparison: DNA copy number array technologies assessed. *BMC Genomics*. 2009 Dec 8;10:588. doi: 10.1186/1471-2164-10-588.
- [139] **Alshabi AM, Vastrad B, Shaikh IA, Vastrad C.** Identification of Crucial Candidate Genes and Pathways in Glioblastoma Multiform by Bioinformatics Analysis. *Biomolecules*. 2019 May 24;9(5):201. doi: 10.3390/biom9050201.
- [140] **Eijkelenboom A, Tops BBJ, van den Berg A, van den Brule AJC, Dinjens WNM, Dubbink HJ, Ter Elst A, Geurts-Giele WRR, Groenen PJTA, Groenendijk FH, Heideman DAM, Huibers MMH, Huijismans CJJ, Jeuken JWM, van Kempen LC, Korpershoek E, Kroeze LI, de Leng WWJ, van Noesel CJM, Speel EM, Vogel MJ, van Wezel T, Nederlof PM, Schuurung E, Ligtenberg MJL.** Recommendations for the clinical interpretation and reporting of copy number gains using gene panel NGS analysis in routine diagnostics. *Virchows Arch*. 2019 Jun;474(6):673-680. doi: 10.1007/s00428-019-02555-3.
- [141] **An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan QW, Weiss WA.** Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*. 2018 Mar;37(12):1561-1575. doi: 10.1038/s41388-017-0045-7.
- [142] **Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, Akhavanfard S, Cahill DP, Aldape KD, Betensky RA, Louis DN, Iafrate AJ.** Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2011 Dec 13;20(6):810-7. doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.005.
- [143] **Puputti M, Tynninen O, Sihto H, Blom T, Mäenpää H, Isola J, Paetau A, Joensuu H, Nupponen NN.** Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. *Mol Cancer Res*. 2006 Dec;4(12):927-34. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0085.
- [144] **Li, C., Ran, H., Song, S. et al.** Overexpression of RPN2 suppresses radiosensitivity of glioma cells by activating STAT3 signal transduction. *Mol Med* 26, 43 (2020). <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00171-5>.

## **EKLER**

**EK A:** Etik kurul onayı



**EK A**



T.C.  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 71306642-050.05.04-  
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Doç.Dr. Fahri AKBAŞ  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

08.07.2020 tarihinde yapılan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında "Likit Biyopside Glioblastoma Genetik Biyobelirteçlerinin Araştırılması" başlıklı başvurunuz değerlendirilmiş olup karar yazısı ektedir.  
Bilgilerinize.

**e-İmzalıdır**

Doç.Dr. Selahattin TUĞRUL  
Başkan V.

Ek: -Karar yazısı (3 sayfa)

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** :Büşra Kaya

**Doğum Tarihi ve Yeri** :

**E-posta** :

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2018-Halen Moleküler Biyolog, Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi
- 2016-2018 Moleküler Biyolog, DNA Laboratuvarları Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi
- 2013-2016 Moleküler Biyolog, Burç Genetik Tanı Merkezi