

Sayı : 83501499-604.01.0333423

Konu : İzleme ve Raporlandırma

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİNE

Biriminiz **2022/3-27 M** koduyla desteklenen "KAHRAMANMARAŞ İLİ VE ÇEVRESİNDE GLİAL TÜMÖR TANISI ALMIŞ HASTALARDA KALITSAL BAP1 MUTASYONLARININ BİR RİSK FAKTÖRÜ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE TÜMÖR DOKULARINDAKİ SOMATİK BAP1 MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ (138 NOLU KONU BAŞLIĞI)" başlıklı **münferit projenin yürütücüsüyüm.**

Projemizin ikinci ara raporu BAP otomasyon sistemine yüklenmiştir. Otomasyon tarafından oluşturulan rapor dosyası ile raporun Word belgesi şeklindeki hali bu yazıda ek olarak sunulmaktadır.

İlgili raporun incelenmesi ve orada açıkça belirtilen 'Sorunlar' ve 'Öneriler' kapsamında, **projenin sonlandırılmasına ilişkin bir değerlendirme yapılması** hususunda;

Gereğinin yapılmasını saygılarımla arz ederim.

e-imzalıdır

Doç. Dr. Sabahattin CÖMERTPAY
Öğretim Üyesi

Ek:

- 1- SC_II.Ara Rapor_24.07.2023 (15 Sayfa)
- 2- 2022-3_27M_Gelisme raporu (1 Sayfa)



**KSÜ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
ARA GELİŞME RAPORU**

PROJE NO: 2022/3-27 M	GELİŞME RAPORU NO:2	BAŞLAMA TARİHİ
Raporun Kapsadığı Dönem		02.06.2022
Tarihinden 01.12.2022	Tarihine 24.07.2023	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş	Toplam Destekleme Miktarı (TL)	Şimdiye Kadar Harcanan (TL)
KSÜ	64.582,55	23.013,92
		Raporun Dönemi Sonuna Kalan (TL)
		41.568,63

Bu Rapor Dönemi İçinde Harcanan Miktar (TL)

Yolluklar	Hizmet Alımları	Tük. Mal Ve Malzeme	Makina Ve Techizat	Toplam (TL)
--	----	----	---	----

Projenin İsmi: KAHRAMANMARAŞ İLİ VE ÇEVRESİNDE GLİAL TÜMÖR TANISI ALMIŞ HASTALARDA KALITSAL BAP1 MUTASYONLARININ BİR RİSK FAKTÖRÜ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE TÜMÖR DOKULARINDAKİ SOMATİK BAP1 MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ (138 NOLU KONU BAŞLIĞI)

Proje Yöneticisinin Adı Ve Soyadı	İmza	Tarih
Sabahattin CÖMERTPAY		24.07.2023

Ara Gelişme Raporu: (Bu rapor dönemine ait materyal, metot, bulgular, sonuç ve önerileri yazınız)

İKİNCİ RAPOR DÖNEMİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN LABORATUVAR ÇALIŞMALARI (MATERYAL, METOT ve SONUÇLAR)

Tümör dokusundan DNA izolasyonu

DNA izolasyonu yapılacak olan tümör örneğinden 10 miligram kesilerek 2 mL'lik bir tüp içerisine konuldu. 1000µL 20mM Tris(pH:8.0) çözeltisi eklendikten sonra 4000 rpm'de 20 saniye santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı. 1000µL 20mM Tris(pH:8.0) çözeltisi eklendikten 12.000xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan doku üzerine 600µL liziz çözeltisi (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA ve %1 SDS) ve 10µL Proteinaz K eklendi. 56°C sıcaklıkla 90 dakika

inkübasyon yapıldıktan sonra 200µL 5M Potasyum çözeltisi eklendi ve 2 dakika nazikçe çalkalandı. 10.000xg'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmından 600µL alınarak başka bir 1.5 mL'lik tüp içerisine aktarıldı. Yeni tüpe aktarılan 600 µL süpernatant üzerine 660 µL izopropanol ve 60 µL distile su(dH₂O) eklendi. 13.000xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. 1000µL %75'lik soğuk Etanol çözeltisi eklendi ve 13.000xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant döküldü ve çökelti (DNA) 20 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan DNA otoklavlanmış 50µL distile su ile çözüldü ve -20°C'de saklanmak üzere dondurucuya konuldu.

Kandan DNA izolasyonu

DNA izolasyonu yapılacak olan kan örneğinden 400µL alınarak bir 1.5 mL'lik tüp içerisine konuldu. 1000µL 20mM Tris çözeltisi eklendi ve daha sonra 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıp süpernatant uzaklaştırıldı. Bu yapılan yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. 1000µL 20mM Tris çözeltisi eklenip 12.000xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellet üzerine 600µL liziz çözeltisi (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA ve %1 SDS) ve 10µL Proteinaz K eklendi. 56°C sıcaklıkta 90 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra 200µL 5M Potasyum çözeltisi eklendi ve 2 dakika nazikçe çalkalandı. 10.000xg'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmından 600µL alınarak başka bir 1.5 mL'lik tüp içerisine aktarıldı. Yeni tüpe aktarılan 600µL süpernatant üzerine 660µL izopropanol ve 60µL distile su(dH₂O) eklendi. 13.000xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. 1000µL %75'lik soğuk Etanol çözeltisi eklendi ve 13.000xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant döküldü ve çökelti (DNA) 20 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan DNA 50µL distile su ile çözüldü ve -20° saklanmak üzere dondurucuya konuldu.

İzole edilen DNA'ların miktar ve saflık analizi

Tümör ve kan dokularından yapılan DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'ların miktarı ve protein kontaminasyonu spektrofotometrik olarak ölçülmesi için Nanodrop (ThermoFisher Scientific, 168 Third Avenue, Waltham, MA USA 02451) cihazı kullanıldı. DNA'ların ng/µL cinsinden derişimleri ve DNA saflığı (260nm/280nm) analizi yapıldı (Çizelge 1.).

Çizelge 1. DNA izolasyonu yapılan hastaların kodları, izolasyonun yapıldığı doku türü ve bu DNA'ların nanodrop'daki spektrofotometrik ölçümleri. Konsantrasyon ng/µL cinsinden belirtilirken, DNA saflığı 260 ve 280nm'deki absorpsanların oranları cinsinden ifade

edilmiştir. 6 adet tümör örneği, 6 adet hasta kanı ve 29 sağlıklı birey kanından izolasyon gerçekleşmiştir.

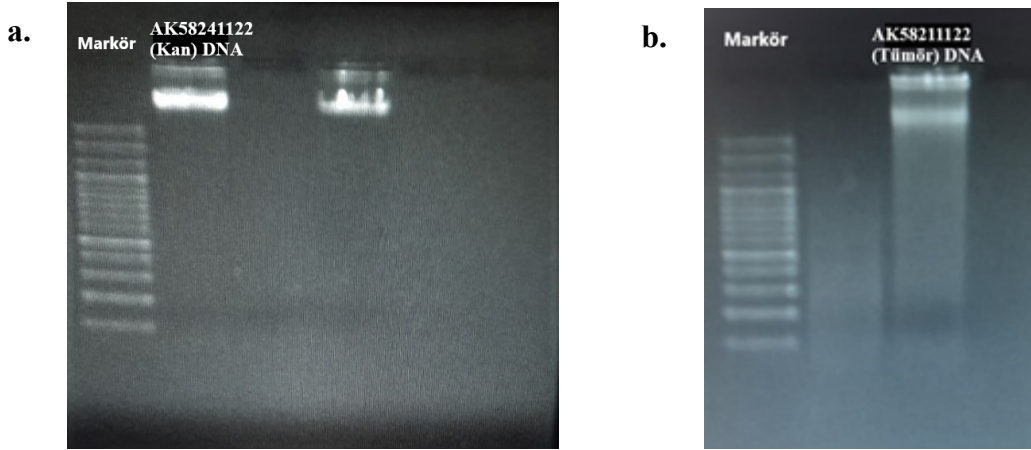
DNA İZOLE EDİLEN ÖRNEKLER	DERİŞİM (ng/μL)	260nm/280nm
İK57200722 (Tümör)	97,8	1,63
FN11141122 (Tümör)	14,5	2,13
AK58211122 (Tümör)	175,8	1,84
LÇ5871222 (Tümör)	11.1	2.37
TU794123 (Tümör)	72,2	1,37
AR5829149 (Tümör)	950	1.82
LÇ5871222 (Hasta Kanı)	29.5	1.81
İK57200722 (Hasta Kanı)	14,4	1,56
AK58241122 (Hasta Kanı)	140.1	1.86
TU794123 (Hasta Kanı)	20	1.50
AR5829149 (Hasta Kanı)	160	1.80
TR170822(Kan)	45	1,87
NN170822(Kan)	62,3	1,83
RR170822(Kan)	62,8	1,92
RU170822(Kan)	61,8	1,58
Hİ240822(Kan)	28,3	1,95
EN240822(Kan)	56,7	2,03

NN240822(Kan)	154,7	1,86
ÜÇ240822(Kan)	95,6	2,01
İİ170822 (Kan)	297,1	1,86
SR170822 (Kan)	81,9	1,87
TR170822 (Kan)	231.5	1.81
NN170822 (Kan)	104.9	1.81
SR170822 (Kan)	172.5	1.8
ERR170822 (Kan)	156.0	1.84
ARK170822 (Kan)	140.1	1.86
İİ170822 (Kan)	297.1	1.86
EN240822 (Kan)	21.4	1.81
NN240822 (Kan)	18.1	1.95
ÜÇ240822 (Kan)	42.3	2.02
RR240822 (Kan)	55.0	1.95
Lİ240822 (Kan)	29.7	1.95
Zİ240822 (Kan)	37.1	1.92
Aİ240822 (Kan)	54.1	1.65
EN240822 (Kan)	13.9	2.02

İzole edilen DNA'ların sağlamlıklarının kontrol edilmesi

Yapılan DNA izolasyonlarının başarılı olup olmadığını (izole edilen dNA'ların sağlam olup olmadığını) kontrol etmek için %2'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. 1 gram agaroz tartılıp 50mL 1X TAE(Tris-asetat-EDTA) içerisinde çözüldü. Mikrodalga fırın içerisinde homojen hale gelene kadar ısıtıldı ve çalkalandı. İçerisine 2µLEtidyum Bromür(EtBr)(Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr, Hercules, CA94547) eklendi ve jelin ılımı

beklendi. Hazırlanan jel kuyusu içerisine tarak yerleştirildi ve ılıyan jel solüsyonu dökülerek jel haline gelene kadar bekletildi. Tank 1X TAE solüsyonu ile dolduruldu. DNA markörü(HibriGen Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme San. ve Tic. A.Ş.,Barış, Gebze/Kocaeli) 3µL ; DNA örnekleri ise 10µL alındı ve 2µL yükleme tamponu (Loading Buffer)(TakaraBio 10X Loading Buffer, CA, ABD) ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi. Cihaz, 100 Volt, 240 mAmp'de 40 dakika olacak şekilde ayarlandı ve çalıştırıldı. Jel görüntüsü alındı ve izolasyonu yapılan DNA'ların varlığı ve sağlımlıklarının kontrolü yapıldı(Şekil 1a.ve b).



Şekil 1. a. AK58241122(Kan) örneğinden yapılan b. AK58211122(Tümör) örneğinden izolasyonu yapılan DNA'nın agaroz jeldeki görüntüsü.

Sağlımlığı kontrol edilmiş DNA'lar ile PCR işleminin yapılması

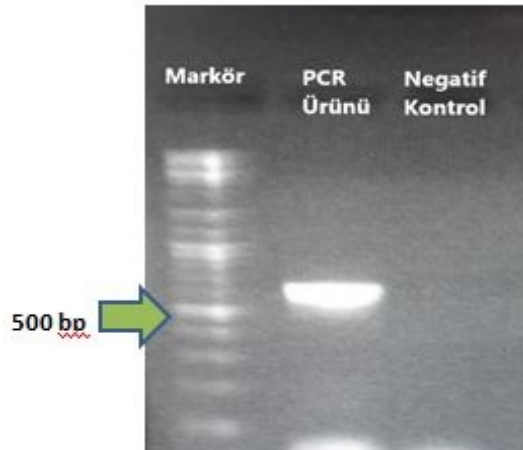
DNA izolasyonu yapıp agaroz jel elektroforezinde de sağlımlık kontrolleri yapılan DNA örnekleri ile PCR yapıldı. PCR tüpleri 25µL steril dH₂O, 3µL master mix(Solis Biodyne FIREPol Master Mix, Teaduspargi 9, 50411 Tartu, Estonya), 0.5µL Geri ve 0.5µL İleri olmak üzere Testa ve arkadaşları tarafından tasarlanmış BAP1 primerleri(Testa, Joseph R ve ark., 2011)(Çizelge 3) ve 1µL DNA eklenerek hazırlandı. PCR'da kullanılan malzemelerin kontrolü için negatif kontrol tüpü de hazırlandı (26µL steril dH₂O, 3µL master mix, 0.5µL Geri ve 0.5µL İleri olmak üzere BAP1 primerleri) ve PCR cihazına yerleştirildi. PCR cihazı 95°C 15 dakika, 35 döngü olacak şekilde 95°C 1 dakika, 68°C 1 dakika, 72°C 1 dakika; döngü sonunda 72°C 10 dakika ve 4°C de bekleme(hold) olarak ayarlandı ve bu şekilde PCR işlemi yapıldı.

Çizelge 3. PCR reaksiyonu için tasarlanmış BAP1 primerinin ismi, sekansı ve PCR reaksiyonu sonucu oluşacak olan ürünün boyutu.

Primer Adı	Primer sekansı	PCR Ürün Büyükluğu (baz çifti)
BAP1-20F	TCATCCTTGCCTCTAGCTGCCTATTGC	656
BAP1-20R	GCCTTGTAGGGGCGAGAGCGTTT	

PCR ürünlerinin boyutlarının kontrol edilmesi

Yapılan PCR metodunun başarılı olup olmadığını kontrol etmek için %2'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. 1 gram agaroz tartılıp 50mL 1X TAE(Tris-asetat-EDTA) içerisinde çözöldü. Mikrodalga fırın içerisinde homojen hale gelene kadar ısıtıldı ve çalkalandı. İçerisine 2µL Etidyum Bromür (EtBr) eklendi ve jelin ılması beklandı. Hazırlanan jel kuyusu içerisine tarak yerleştirildi ve ılıyan solüsyon dökölerek jel haline gelene kadar bekletildi. Tank 1X TAE solüsyonu ile dolduruldu. DNA markörö 3µL; PCR ürünleri ise 10 µL alındı ve 2 µL yükleme tamponu (Loading Buffer) ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi. Cihaz, 100 Volt, 240 mAmp'de 40 dakika olacak şekilde ayarlandı ve çalıştırıldı. Jel görüntüsü alındı. PCR ürününün jel üzerindeki konumu ve markör DNA bantlarına bakılarak üretilmesi hedeflenen DNA ürününün elde edilip edilmediği kontrol edildi (Şekil 3).



Şekil 3. İzolasyonu yapılan DNA'lar ile yapılan PCR ürünü ve negatif kontrolün agaroz jel üzerindeki görüntüsü. Yeşil ok, 500 baz çifti büyüklüğünde deoksiniükelotit zincirinin jelde bulunacağı yeri temsil etmektedir.

Reference 1 -----tggtgctggccgcgcgatcagaggtgcaatgctgggttttggcaggagctgctgcaactgctgaagtgtgtgaggtgagattgcaaatatgagcgtgcctcaaggaggagtagagaagagaaggaagtcaaggtgggtgatttctccagttgctgatct
AK58211122(Tümör) 1 nnnnnnnngctnnntgctggcgcgcgcgatcagaggtgcaatgctgggttttggcaggagctgctgcaactgctgaagtgtgtgaggtgagattgcaaatatgagcgtgcctcaaggaggagtagagaagagaaggaagtcaaggtgggtgatttctccagttgctgatct

Reference 169 ggctctctccgaggtccactgggtgctgctgcaagattggctccagtcagtcctctctctctctacagattgatgaccagagaaggaccacaactacgatgattcatctgcacctttatctccatgctggctcaggaggtgagggatgctgctgcttcttaactgaa
AK58211122(Tümör) 179 ggctctctccgaggtccactgggtgctgctgcaagattggctccagtcagtcctctctctctctacagattgatgaccagagaaggaccacaactacgatgattcatctgcacctttatctccatgctggctcaggaggtgagggatgctgctgcttcttaactgaa

Reference 349 tgccctgctgagggcgtgtctctcagtcctccctccctggcctctctgagccttgagcagaccttggggcacaggaggccatgagagctcagctctgctgagcagcagacctgctcaagggtctctacctcttgcaggcatgctggccaactagtgagcagaacat
AK58211122(Tümör) 359 tgccctgctgagggcgtgtctctcagtcctccctccctggcctctctgagccttgagcagaccttggggcacaggaggccatgagagctcagctctgctgagcagcagacctgctcaagggtctctacctcttgcaggcatgctggccaactagtgagcagaacat

Reference 529 ctccgtgctggcggcgcccaagggtcagcatcgccggctccacaagcagcggagcctgaccggcggaagcctctgccccctacaaggc---
AK58211122(Tümör) 539 ctccgtgctggcggcgcccaagggtcagcatcgccggctccacaagcagcggagcctgaccggcggaagcctctgccccctacaaggc

l.

Reference 1 -----tggtgctggccgcgcgatcagaggtgcaatgctgggttttggcaggagctgctgcaactgctgaagtgtgtgaggtgagattgcaaatatgagcgtgcctcaaggaggagtagagaagagaaggaagtcaaggtgggtgatttctccagttgctgatct
AK58211122(Kan)- 1 nnnnnnnngctnnntgctggcgcgcgcgatcagaggtgcaatgctgggttttggcaggagctgctgcaactgctgaagtgtgtgaggtgagattgcaaatatgagcgtgcctcaaggaggagtagagaagagaaggaagtcaaggtgggtgatttctccagttgctgatct

Reference 169 ggctctctccgaggtccactgggtgctgctgcaagattggctccagtcagtcctctctctctctacagattgatgaccagagaaggaccacaactacgatgattcatctgcacctttatctccatgctggctcaggaggtgagggatgctgctgcttcttaactgaa
AK58211122(Kan)- 179 ggctctctccgaggtccactgggtgctgctgcaagattggctccagtcagtcctctctctctctacagattgatgaccagagaaggaccacaactacgatgattcatctgcacctttatctccctgctggctcaggaggtgagggatgctgctgcttcttaactgaa

Reference 349 tgccctgctgagggcgtgtctctcagtcctccctccctggcctctctgagccttgagcagaccttggggcacaggaggccatgagagctcagctctgctgagcagcagacctgctcaagggtctctacctcttgcaggcatgctggccaactagtgagcagaacat
AK58211122(Kan)- 357 tgccctgctgagggcgtgtctctcagtcctccctccctggcctctctgagccttgagcagaccttggggcacaggaggccatgagagctcagctctgctgagcagcagacctgctcaagggtctctacctcttgcaggcatgctggccaactagtgagcagaacat

Reference 529 ctccgtgctggcggcgcccaagggtcagcatcgccggctccacaagcagcggagcctgaccggcggaagcctctgccccctacaaggc---
AK58211122(Kan)- 537 ctccgtgctggcggcgcccaagggtcagcatcgccggctccacaagcagcggagcctgaccggcggaagcctctgccccctacaaggc

m.

Reference 1 -----tggtgctggccgcgcgatcagaggtgcaatgctgggttttggcaggagctgctgcaactgctgaagtgtgtgaggtgagattgcaaatatgagcgtgcctcaaggaggagtagagaagagaaggaagtcaaggtgggtgatttctccagttgctgatct
FN11141122(Tümör) 1 nnnnnnnngctnnntgctggcgcgcgcgatcagaggtgcaatgctgggttttggcaggagctgctgcaactgctgaagtgtgtgaggtgagattgcaaatatgagcgtgcctcaaggaggagtagagaagagaaggaagtcaaggtgggtgatttctccagttgctgatct

Reference 168 tgccctctccgaggtccactgggtgctgctgcaagattggctccagtcagtcctctctctctctacagattgatgaccagagaaggaccacaactacgatgattcatctgcacctttatctccatgctggctcaggaggtgagggatgctgctgcttcttaactgaa
FN11141122(Tümör) 178 tgccctctccgaggtccactgggtgctgctgcaagattggctccagtcagtcctctctctctctacagattgatgaccagagaaggaccacaactacgatgattcatctgcacctttatctccatgctggctcaggaggtgagggatgctgctgcttcttaactgaa

Reference 348 atgcccctgctgagggcgtgtctctcagtcctccctccctggcctctctgagccttgagcagaccttggggcacaggaggccatgagagctcagctctgctgagcagcagacctgctcaagggtctctacctcttgcaggcatgctggccaactagtgagcagaacat
FN11141122(Tümör) 358 atgcccctgctgagggcgtgtctctcagtcctccctccctggcctctctgagccttgagcagaccttggggcacaggaggccatgagagctcagctctgctgagcagcagacctgctcaagggtctctacctcttgcaggcatgctggccaactagtgagcagaacat

Reference 528 tctccgtgctggcggcgcccaagggtcagcatcgccggctccacaagcagcggagcctgaccggcggaagcctctgccccctacaaggc---
FN11141122(Tümör) 538 tctccgtgctggcggcgcccaagggtcagcatcgccggctccacaagcagcggagcctgaccggcggaagcctctgccccctacaaggc

Şekil 4. PCR ürünleri ile referans sekansın (NG_031859.1) karşılaştırılması. **a.** i-İ170822(Kan)-R. **b.** İK57200722(Tümör)-F. **c.** i-İK57200722(Tümör)-R. **d.** İK57200722(Kan)-F. **e.** i-İK57200722(Kan-2)-R. **f.** SR170822(Kan)-F. **g.** LÇ5871222(Tümör)-F **h.** LÇ5871222(Kan)-F **i.** TU794123(Tümör)-F **j.** TU794123(Kan)-F **k.** AK58211122(Tümör)-F **l.** AK58211122(Kan)-F **m.** FN11141122(Tümör)-F

Elde edilen sekans sonuçlarının okunmayan kısımları belirlendi (Çizelge 4). Toplam okunmayan baz sayılarına göre analiz yapıldığında toplam 656 baz çiftinden oluşan her örnek için ortalama hatalı okunan baz sayısı 45,15; yüzdelik hata payı ise %6,88 olarak hesaplandı. Sekans sonucunda okunmayan bölgeler incelendiğinde, ileri (forward) primer ürünlerinde ortalama ilk 25; geri (reverse) primer ürünlerinde ise ortalama 21 baz uzunluğundaki kısımlarda hiç eşleşme saptanmadı. Yapılan analizler sonucunda, okunmayan bu bölgelerin baz uzunluğunun yaklaşık olarak kullanılan primerlerin baz uzunluğu ile aynı olduğu görülmektedir.

Çizelge 4. DNA izolasyonu yapılan örneklerin isimleri, sekans sonuçlarının baştan(5')ve sondan(3') okunmayan bazların sayısı ve toplam okunmayan baz sayısını gösteren tablo.i: ters çevrilip tekrardan düzenlenen geri primer ürünü; R: Geri (reverse) primer; F: İleri (forward) primer ürünü.

ÖRNEK İSMİ	BAŞTAN	SONDAN	TOPLAM
i-İİ170822(Kan)-R	11	44	55
İK57200722(Tümör)-F	48	17	65
i-İK57200722(Tümör)-R	10	31	41
İK57200722(Kan)-F	55	33	88
i-İK57200722(Kan-2)-R	24	39	63
SR170822(Kan)-F	52	7	59
LÇ5871222(Tümör)-F	20	11	31
LÇ5871222(Kan)- F	26	8	34
TU794123(Tümör)-F	23	12	35
TU794123(Kan)-F	24	2	26
AK58211122(Tümör)-F	27	3	30
AK58211122(Kan)-F	23	10	33
FN11141122(Tümör)-F	24	3	27

Yapılan analizler değerlendirildiğinde, forward primerle yapılan dizileme ürünlerinde hem NLS-1 hem de NLS-2 bölgeleri okunurken; reverse ürünlerinde ise sadece NLS-1 bölgelerinin okunduğu saptandı.

Çizelge 5. DNA izolasyonu yapılan örneklerin isimleri, sekanslama sonuçları ile referans BAP1 geni DNA sekansı (NG_031859.1) NLS-1 ve NLS-2 (Nükleer lokalizasyon sinyali) bölgeleriyle yapılan karşılaştırma sonucundaki eşleşme durumları gösterilmiştir.i: ters çevrilip tekrardan düzenlenen geri primer ürünü; R: Geri(reverse) primer; F: İleri(forward) primer ürünü.

İSİM	NLS1	NLS2
i-İİ170822(Kan)-R	Tam eşleşme var	-

İK57200722(Tümör)- F	Tam eşleşme var	Tam eşleşme var
i -İK57200722(Tümör)- R	Tam eşleşme var	-
İK57200722(Kan)- F	Tam eşleşme var	2., 4. Ve 5.nükleotitlerde farklılık var
i -İK57200722(Kan-2)- R	Tam eşleşme var	-
SR170822(Kan)- F	Tam eşleşme var	Tam eşleşme var
LÇ5871222(Tümör)- F	Tam eşleşme var	Tam eşleşme var
LÇ5871222(Kan)- F	Tam eşleşme var	Tam eşleşme var
TU794123(Tümör)- F	Tam eşleşme var	3. ve 7. nükleotitlerde eşleşme bulunmamakta
TU794123(Kan)- F	Tam eşleşme var	Tam eşleşme var
AK58211122(Tümör)- F	Tam eşleşme var	Tam eşleşme var
AK58211122(Kan)- F	Tam eşleşme var	Tam eşleşme var
FN11141122(Tümör)- F	Tam eşleşme var	Tam eşleşme var

SONUÇ ve TARTIŞMA

Hasta ve sağlıklı kişilerden izole edilen DNA örnekleri ve BAP1 primerleri (20-F, 20-R) kullanılarak sekanslama ve analiz yapıldı. BAP1 genindeki NLS bölgeleri (NLS-1 ve NLS-2) incelendiğinde NLS-1 bölgesinin hiç değişikliğe uğramadığı tespit edildi. Ancak, her ne kadar reverse (geri) primer kaynaklı bazı okuma hataları olsa da yine de iki farklı hastadan alınan örneklerde NLS-2 bölgesinde değişimler(mutasyonlar) gözlenmiştir.

İK57200722 kodlu hastanın kanından izole edilen DNA sekansında genetik mutasyonlar (2. 4. ve 5. nükleotit) görülürken tümör DNA sekansında herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Bu gözlem ilk anda şaşırtıcı gelse de, aslında sağlıklı dokularla yaşlanmaya bağlı olarak genotip farklılaşması olduğu bilinmektedir (Kenndey ve ark., 2019). İlginç olan sağlıklı dokularda farklılaşmış bu dizilimin tümörde “normal”e dönmesidir. Tümör hücrelerinde mutasyon olması beklenebilir, ama bu mutasyonun tam da farklılaşsan bazların eski hallerine dönüşü şeklinde olması beklenmez. Bu nedenle burada teknik bir sorun yaşanmış olabileceği gerçeği akılda tutulmalıdır.

Diğer bir taraftan, TU794123 kodlu hastanın ise kandan izole edilen DNA sekansında bir mutasyon gözlemlenmezken tümör DNA sekansında somatik mutasyonlar (3.-7. nükleotit) tespit edilmiştir. Her ne kadar kişi sayısı az bile olsa bu sonuçlar bize NLS-1 bölgesinin aksine, NLS-2 bölgesinin glial tümör tanısı almış kişilerde somatik veya genetik olarak mutasyona uğramış olabileceğini göstermektedir ancak daha kesin sonuçlar için bu çalışmanın çok daha fazla sayıda hastanın katılımıyla teyit edilmesi gerekmektedir.

KARŞILAŞILAN SORUNLAR

- i) Bu projemizde bütün BAP1 genini çoğaltmak için tasarlanmış olan bütün (24 çift) primerler ile PCR yapıp, bu PCR ürünleri ile sekanslama yapılması planlanıyordu ancak sekanslama ücretlerinin yüksekliği ve bütçenin kısıtlamasından dolayı bu sekanslamaların yapılamayacağı anlaşıldı. Bu durumdan dolayı, bütün primerleri kullanmak yerine BAP1 proteinin tümör baskılayıcı işlevi için önemli olduğu yapılan çalışmalar (Ventii ve ark.,2008; Murali ve ark., 2013) tarafından ortaya konulan NLS bölgelerini(NLS-1 ve NLS-2) hedef alan BAP1-20 primer çifti kullanılarak(Çizelge 3) sekanslama yapılmasına karar verilmiştir.
- ii) Ancak ilk üç tümörde yapılan (Çizelge 5'te NLS-2 için değer verilmemiş örnekler) denemelerde, geri primerle yapılan okumalarda NLS-2 bölgesinin çoğaltılmasının mümkün olmadığı fark edilmiştir. Bu nedenle bu rapor döneminde yapılan okumalar sadece ileri (forward) primer ile gerçekleştirilmiştir.
- iii) Çalışmamızın karşılaştığı belki de en önemli problem, tümör örnekleri sayısının beklenin altında kalması olmuştur. Projenin önerisi sunulurken toplam 143 örnek düşünülmüş; bunların 100 tanesinin hasta, 43 tanesinin sağlıklı kontrol olacağı öngörülmüştür. Proje önerisinin yazımı sırasında, proje araştırmacılarından (beyin cerrahı) Doç. Dr. Kutsal Devrim SEÇİNTİ tarafından ilk 12 ayda 100'e yakın tümörün kolaylıkla toplanabileceğine dair teminat verilmiş olduğundan, proje zamanı 18 ay olarak sınırlandırılmıştır. Ancak, maalesef, tümörlerin toplanacağı klinik beklenin çok altında ameliyatlı hasta ile karşılaşmış, projenin ilk 12 aylık süresinde tamamlanması beklenen tümör toplama işlemi, beklenenin çok çok altında kalarak 100 yerine ancak 8 örneğe ulaşılmıştır. Bu durum projenin uzatma verilse dahi tamamlanabileceğine dair büyük kuşklar oluşturmaktadır. Projenin beklenenden çok daha yavaş bir şekilde ilerlemiş olduğu ortadadır.
- iv) Proje sürecinin yaşadığı bir diğer aksama, 06.02.2023 tarihinde Kahramanmaraş Pazarcık ve Elbistan merkezli olarak meydana gelen depremler nedeni ile olmuştur. Bu doğal afetin hem şehir hayatında hem hastanede hem de akademide oluşturduğu belirsizlik ve duraklamalar projenin devam ettirilmesini imkansızlaştırmıştır. Bütün bu sürecin atlatılması sırasında, laboratuvarımıza ulaşımın zorlaşması, öğrencilerin konaklamasının imkansızlaşması ve acil olmayan hastalara ayrılan zamanın belirgin bir şekilde düşmesi, şubat ayından itibaren hiç örnek alınmamasına neden olmuştur.

- v) Örnek toplama işlemine ilişkin bir diğer zorluk, proje araştırmacılarından, tümör örneklerinin toplanmasında oldukça önemli rol oynayan, Doç. Dr. Kutsal Devrim Seçinti'nin Haziran ayı içerisinde görevden ayrılması olmuştur. Hocamızın şehir değiştirerek özel bir hastanede çalışmaya başlaması, zaten zor ilerleyen projeyi durma noktasına getirmiştir.
- vi) Tüm bunlara ek olarak projemizin mali sürecini de değerlendirmek gerekirse; alınması gereken malzemelerin fiyatı sürekli olarak yükseltmekte ve bu da projenin başlangıçtaki alım gücünü büyük oranda azaltmaktadır. Kullanılacak malzemelerin dolar bazlı olması, fiyatlarının yükselmesinin en önemli nedenidir. Birinci rapor döneminden itibaren projenin yürüyüşüne ilişkin kaygılarımızdan ötürü alımı durdurmuş olmamız, bu açıdan doğru bir karar verdiğimizizi ortaya koymuş; projenin tamamlanması durumunda ortaya çıkacak maddi kaybın proje toplam bütçesinin üçte biri seviyesinde kalmasını sağlamıştır. Şu anda, projenin ihtiyacı olacak malzemeler alınmaya kalksa elde kalan bütçe bu alımlar için yeterli olmayacaktır.

ÖNERİLER

Örnek sayısının beklenenin çok altında kalması, çalışma ekibinin uğradığı kayıplar ve artan maliyetler bir arada düşünüldüğünde projemizin bu şekilde devam etmesi mümkün görünmemektedir. **Projenin mevcut halinin, son hal olarak kabul edilmesi ve sonlandırılması talep edilmektedir.** Projede, yukarıda karşılaşılan sorunlar erken fark edildiği için birinci rapor (01.06.2022) döneminden itibaren herhangi bir harcama yapılmamış ve proje bütçesinin 41.568,63 TL'lik bir kısmı korunabilmiştir. Bu da en azından projenin kurumumuzda oluşturduğu mali yükün azalmasına yardımcı olacaktır.

Ayrıca proje kapsamında yapılan çalışmalar büyük oranda yüksek lisans öğrencisi Ali Serçe tarafından gerçekleştirildiğinden ve bir eğitimci gözüyle, proje boyunca yapılan bu çalışmaların bir yüksek lisans öğrencisinin yetiştirilmesi bakımından yeterince kapsayıcı olduğuna inanıldığından, *projenin gerçekleşen kısmının yüksek lisans tezi olarak sunulması düşünülmektedir.* Nitekim Ali Serçe, projenin faaliyette olduğu bir yıla yakın zamanda hem laboratuvar hem de hastane kısmında emek vererek teknik ve teorik bakımından birçok bilgi edinmiştir. Her ne kadar yapılan çalışmalar, projenin çıkış noktası olan hipotezi tam olarak sınayamıyorsa da veriler bir yüksek lisans tezi oluşturacak düzeydedir. Bu nedenle, proje sürecinin ve sonuçlarının bir yüksek lisans tezi şeklinde düzenlenmesi ve öğrenci Ali Serçe'nin bu konuda jüri üyelerince değerlendirilmesi sağlanabilir. Bu da daha fazla deneysel

harcama yapmadan BAP destekli bir yüksek lisans tezinin tamamlanması şeklinde görülebilir. Böyle bir talepte, proje çalışmasının büyük kısmı tamamlanmış olduğu için, projeden, eğer BAP kurulu uygun görürse, sadece öğrencinin bir kongreye katılımını mümkün kılacak kadar ücret talep edilecektir. Öte yandan, elde edilen sonuçların düzenlenmesi, sunulması ve tez savunulmasının yapılması için yaklaşık 6 ay yeterli olacağından; böylesi bir tez önerisinin kabulü ve sonlandırılması arasında çok büyük bir zaman geçmemesi de beklenmektedir.

KAYNAKÇA

- 1) Ventii, Karen H et al. “BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization.” Cancer research vol. 68,17 (2008): 6953-62. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0365
- 2) Murali, R., Wiesner, T., & Scolyer, R. A. (2013). Tumours associated with BAP1 mutations. Pathology, 45(2), 116–126. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e32835d0efb>
- 3) Crossley, Beate M et al. “Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring.” Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc vol. 32,6 (2020): 767-775. doi:10.1177/1040638720905833
- 4) Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, Cox NJ, Dogan AU, Pass HI, Trusa S, Hesdorffer M, Nasu M, Powers A, Rivera Z, Comertpay S, Tanji M, Gaudino G, Yang H, Carbone M. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. Nat Genet. 2011 Aug 28;43(10):1022-5. doi: 10.1038/ng.912.
- 5) Kennedy SR, Zhang Y, Risques RA. Cancer-Associated Mutations but No Cancer: Insights into the Early Steps of Carcinogenesis and Implications for Early Cancer Detection. Trends Cancer. 2019 Sep;5(9):531-540. doi: 10.1016/j.trecan.2019.07.007.



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
PROJE GELİŞME RAPORU

F-6

Proje Adı

KAHRAMANMARAŞ İLİ VE ÇEVRESİNDE GLİAL TÜMÖR TANISI ALMIŞ HASTALARDA KALITSAL BAP1 MUTASYONLARININ BİR RİSK FAKTÖRÜ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE TÜMÖR DOKULARINDAKİ SOMATİK BAP1 MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ (138 NOLU KONU BAŞLIĞI)

Proje No	Başlama Tarihi	Bitiş Tarihi	
2022/3-27 M	02-06-2022	01-02-2024	
Rapor Türü	Raporun Kapsadığı Dönemin Tarihleri		
2. Ara Rapor	02-12-2022	01-08-2023	
Bilimsel Araştırmalar Birimi Tarafından Sağlanan Destek Miktarı	Gelişme Raporu Döneminde Harcanan	Şimdiye Kadar Harcanan	Kalan
64.582,55 TL		23.013,92 TL	41.568,63 TL
Destek Sağlayan Diğer Kuruluşların Katkısı	Gelişme Raporu Döneminde Harcanan	Şimdiye Kadar Harcanan	Kalan

SAĞLANAN DESTEKTEN ŞİMDİYE KADAR YAPILAN HARCAMALARIN FASILLARA GÖRE DAĞILIMI

Fasıl	Harcanan	Kalan
TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	21.319,06 TL	41.263,48 TL
HİZMET ALIMLARI	1.694,86 TL	305,15 TL

RAPOR DÖNEMİNE AİT İLGİLİ YAYINLAR

No	Yayın
	Bulunmamaktadır

RAPOR DÖNEMİNE AİT İLGİLİ FİKRİ MÜLKİYETLER

No	Fikri Mülkiyet Adı	Fikri Mülkiyet No	Alındığı Ülke	Tescil Tarihi
				Bulunmamaktadır

RAPOR DÖNEMİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR VE ELDE EDİLEN SONUÇLAR

Rapor içeriği için lütfen eke bakınız.

EK:

[SC_II.Ara Rapor_24.07.2023.doc](#)

Proje Yürütücü Unvanı, Adı SOYADI	İmzası	Tarih
Doç.Dr. Sabahattin CÖMERTPAY		24-07-2023

Bu belge, güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

Eyrak sorgulaması <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5637&eD=BSMNKHTA6F&eS=33423> adresinden yapılabilir.

<https://baprotomasyon.ksu.edu.tr/?act=yazdir&mode=clear&ftype=f6&prid=3407&r=2&uyari=1>