

**TÜRK TOPLUMUNDA PAPİLLER TİROİD
KARSİNOMLARINDA BRAF V600E MUTASYON
SIKLIĞININ İNCELENMESİ**

Büşra AYDIN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Rifat BİRCAN
2. Danışman : Doç. Dr. Hülya İLİKSU GÖZÜ**

2017

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRK TOPLUMUNDA PAPİLLER TİROİD KARSİNOMLARINDA BRAF V600E
MUTASYON SIKLIĞININ İNCELENMESİ**

Büşra AYDIN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Rifat BİRCAN

2. DANIŞMAN: Doç.Dr. Hülya ILIKSU GÖZÜ

TEKİRDAĞ-2017

Her hakkı saklıdır

Bu tez NKÜBAP tarafından NKUBAP.01.YL.16.021 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Rıfat BİRCAN ve Doç. Dr. Hülya ILIKSU GÖZÜ danışmanlığında, Büşra AYDIN tarafından hazırlanan “Türk Toplumunda Papiller Tiroid Karsinomlarında BRAF V600E Mutasyon Sıklığının İncelenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Rıfat BİRCAN

İmza :

Üye: Doç. Dr. Fatih EREN

İmza :

Üye: Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRK TOPLUMUNDA PAPİLLER TİROİD KARSİNOMLARINDA BRAF V600E MUTASYON SIKLIĞININ İNCELENMESİ

Büşra AYDIN

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Rıfat BİRCAN

2. Danışman: Doç.Dr. Hülya ILIKSU GÖZÜ

Papiller tiroid karsinomu (PTK), tiroid kanserleri arasında en yaygın görülen (%75 - %83) malign tiroid neoplazmıdır. Bununla beraber, RAS-RAF-MEK-ERK sinyal ileti yolağında yer alan BRAF kinazında V600E amino grup asit yerdeğişimine neden olan gen mutasyonu, farklı toplumlarda PTK hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda en sık rastlanan mutasyonlardan biridir ve genellikle hastalığın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde, Türk toplumunda PTK olgularında BRAF V600E mutasyonu üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır ve ortaya konulan veriler birbirinden oldukça farklılık göstermektedir. Dolayısıyla, yapılan bu çalışma ile Türk toplumunda papiller tiroid kanserlerinde BRAF V600E mutasyon prevalansının saptanması ve mevcut literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır. Çalışmaya PTK tanısı almış 51 hasta dahil edilmiştir. Hastalara ait parafine gömülü tümör ve sağlıklı doku örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. BRAF geninin V600E mutasyonunu içeren 15. Ekzonu polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri saflaştırıldıktan sonra DNA dizi analizi, Beckman Coulter GenomeLab marka otomatik dizi analizi cihazı kullanılarak Sanger metoduyla gerçekleştirilmiştir. Toplam 51 hastadan alınan tümör dokularının 13'ünde (%25,4) BRAF gen mutasyonları tespit edilmiştir. Mutasyon dağılımı alt varyantlar açısından değerlendirildiğinde 18 klasik varyant PTK hastasının 11'inde (% 61,11) 15. ekzon üzerinde yer alan bir BRAF gen mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonların 8/11 (%44,4'ü) BRAF V600E mutasyonu, 3/11 (%16,7') si ise BRAF F583Y mutasyonudur. Bununla beraber, 33 foliküler varyant PTK olgusunda ise 1'i sessiz mutasyon olmak üzere iki mutasyon (BRAF

V600V, BRAF V600E) (% 6,10) tespit edilmiştir. Mutasyon pozitif tümör örnekleri ile mutasyon negatif tümör örnekleri karşılaştırıldığında; tümör çapından bağımsız olarak, tümör kapsül varlığı, tiroid kapsül invazyonu, tiroid dışı yumuşak doku invazyonu, tümör multisentiritesi, lenf nod metastazı ile mutasyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak, elde edilen veriler ışığında BRAF V600E mutasyonunun hastalığın kötü prognoz ile ilişkili olduğu göz önüne alırsa, hastalığın prognozunun takibi açısından Türk toplumunda daha büyük hasta popülasyonlarında yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, foliküler varyant PTK'ların agresifliğini belirlemek ve ayırıcı tanısında kullanılmak üzere bu hasta grubunda BRAF V600E mutasyonu haricinde RAS (KRAS, NRAS, HRAS) mutasyonlarının incelenmesine ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: BRAF V600E, Mutasyon, Papiller Tiroid Kanseri, Tiroid

2017, 61 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

SCREENING OF THE BRAF V600E PREVALANCE AT PAPİLLARY THYROID CARCİNOMAS İN TURKİSH POPULATION

Büşra AYDIN

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Rıfat BİRCAN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hülya İLİKSU GOZU

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common malign thyroid neoplasm (75%-83%) among the thyroid cancers. However, a mutation causing V600E amino acid substitution on BRAF kinase, which takes place in RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway, is the one of the most common mutation in PTC patients in different populations, and is associated with poor prognosis of the disease. There are few studies on BRAF V600E mutation prevalence in PTC cases in Turkish population in literature, and the data presented are quite inconsistent. For this reason, the purpose of this study is to determine the prevalence of BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancers in Turkish population with a contribution to current literature. Fifty-one patients, diagnosed PTC, were enrolled in this study. DNA was extracted from paraffin-embedded tumor and surrounding tissue samples. The 15th exon of the BRAF gene including V600E mutation was amplified by using polymerase chain reaction (PCR). Following purification of the obtained PCR products, DNA sequencing was performed with Sanger method, by employing a Beckman Coulter GenomeLab automated DNA sequencer. BRAF mutations were detected in 13 tumor tissues (25,4%) from a in total 51 patients. When mutation distribution was evaluated according to the sub variants of PTC, a mutation at 15th exon of the BRAF gene was detected 11 of 18 classical variant PTC patients (61,11%). 8/11 (44,4%) of these mutations were BRAF V600E, and 3/11 (16,7%) were BRAF F583Y. At the same time two mutations (6,10%) were detected in 33 follicular variant of PTC patients, One being silent mutation (BRAF V600V),

while the other BRAF V600E mutation. When mutation positive tumor samples compared with mutation negative ones, tumor encapsulation, thyroid capsule invasion, extrathyroidal tissue invasion, tumor multifocality, and lymph node metastasis were associated with BRAF mutations independent from tumor size ($p < 0,05$). As a result, considering that BRAF V600E mutation is correlated with poor prognosis of the disease according to the obtained data, larger population based studies are necessary in order to follow up to prognosis of the PTC patients in Turkish population. Besides, in order to evaluate aggressiveness of the follicular variant PTCs and to use in distinctive diagnosis, RAS (KRAS, NRAS and HRAS) mutation screening should be considered addition to BRAF V600E in follicular variant PTC patients.

Keywords: BRAF V600E, Mutation, Papillary Thyroid Cancer, Thyroid

2017, 61 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TEŞEKKÜR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	3
2.1.Tiroid.....	3
2.2.Tiroid Kanserleri.....	5
2.3. C hücre (Parafoliküler hücre) kaynaklı tiroid kanserleri	5
2.3.1. Medüller tiroid kanseri	5
2.3.2. Anaplastik (Kötü Diferansiye) tiroid kanseri	6
2.3.3. Foliküler tiroid kanseri	7
2.3.4. Papiller tiroid kanseri.....	7
2.4. Tiroid Kanserlerinin Moleküler Patogenezi	8
2.5. Braf	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	16
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
3.1.3. Kullanılan kitler.....	18
3.1.4. Kullanılan ticari çözelti ve tamponlar	18
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler	18
3.1.6. Primerler	19
3.1.7. Kullanılan bilgisayar programları.....	19
3.1.8. Hasta grubu.....	20
3.2. YÖNTEM.....	24
3.2.1. Parafine gömülü dokudan DNA izolasyonu	24
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu	25
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi	26
3.2.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	26
3.2.5. DNA dizileme reaksiyonu	27
3.2.6. DNA dizi analizi örneklerinin çöktürülmesi (etanol presipitasyonu).....	28
3.2.7. Kapiller elektroforez için örneklerin cihaza yüklenmesi.....	28
3.2.8. DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi	28
3.2.9. İstatistiksel analiz	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	29
4.1. Hasta Grubu.....	29
4.2. PZR Sonuçları	29
4.3. Saflaştırma Sonuçları.....	30
4.4. DNA Dizi Analizi Sonuçları	31
4.4.1. Epidemiyolojik Veriler	31
5. TARTIŞMA.....	36
6.KAYNAKLAR.....	40
ÖZGEÇMİŞ.....	46

ÇİZELGE DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Tiroid tümörlerinin sınıflandırılması	6
Çizelge 2.2. Papiller karsinoma varyantları	8
Çizelge 2.3. Tiroid tümöründe gen mutasyon	13
Çizelge 3.1. PZR ve DNA dizi analizi için kullanılan primerler.....	19
Çizelge 3.2. Hastaların demografik ve klinik bilgileri	21
Çizelge 4.1. Papiller tiroid karsinomu hastalarında demografik ve klinik verilerin karşılaştırılması.....	29
Çizelge 4.2. Papiller tiroid karsinom tanısı alan hastalarda BRAF V600E mutasyon dağılımına göre demografik ve klinik verilerin karşılaştırılması.....	33
Çizelge 4.3. Papiller tiroid karsinom klasik varyant tanısı alan hastalarda demografik ve klinik verilerin karşılaştırılması.....	33
Çizelge 4.4. Papiller tiroid karsinom foliküler varyant tanısı alan hastalarda demografik ve klinik verilerin karşılaştırılması.....	34
Çizelge 4.5. BRAF V600E mutasyonunun altvaryantlardaki dağılımı.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Tiroid bezi anatomisi.....	3
Şekil 2.2: Hipotalamus-hipofiz-tiroid eksenini ve tiroid foliküler hücrelerden temel sinyal ileti yolakları.....	4
Şekil 2.3: Tiroid kanserinde MAPK ve ilgili sinyal ileti yolakları.....	9
Şekil 4.1: PZR sonuçları.....	30
Şekil 4.2: PZR saflaştırma sonuçları.....	30
Şekil 4.3: PTK hastalarına ait tümör dokularından elde edilen DNA dizi analizi sonuçları...	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
AC	: Adenilat siklaz
ATK	: Anaplastik Tiroid Karsinomu
BRAF	: v-Raf mürin sarkoma viral onkogen homologu B1
Bç	: Baz çifti
β -HCG	: Koryonaganodotropik Hormon
C	: Sitozin
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CPTK	: Konvensiyonel Papiller Tiroid Kanseri
DAG	: Diasilgliserol
DAPK1	:Ölüm-ilişkili protein kinaz 1
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleik asit trifosfat
DTK	: Diferansiye Tiroid Kanseri
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
FOXO	: Forkhead box protein
FSH	: Foliküler stimule edici hormon
FTA	: Foliküller Tiroid Adenoma
FTK	: Foliküller Tiroid Karsinomu
FVPTK	: Foliküler Varyant Papiller Tiroid Karsinomu
G	: Guanin
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
HCl	: Hidrojen klorür
HIF1A	: Hipoksi indüklenebilir 1 α
IP ₃	: İnositol-3-fosfat
LH	: Luteotropik Hormon

MMP	: Matriks metaloproteinaz
MTK	: Medüller Tiroid Karsinomu
NFκB	: Nükleer faktör kappa hafif zincir güçlendirici aktive B hücreleri
NIS	: Sodyum iyot simporter
PK1	: Piruvat dehidrojenaz kinaz lipoamit izozim 1
PDTK	: Az Diferansiye Tiroid Kanseri
PEG	: Polietilenglikol
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog
PTK	: Papiller Tiroid Karsinomu
PEG	: Polietilenglikol
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAF	: Proto-onkogen serin/threonin –protein kinaz
RAS	: Rat sarkoma
RBD	: RAS bağlanma alanı
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SLS	: Örnek yükleme tamponu
T	: Timin
T3	: Triiyodotironin
T4	: Tiroksin
TBE	: Tris borik asit EDTA
TCPTC	: Tall-cell Papiller Tiroid Kanseri
Tg	: Tiroglobulin
TGFB1	: Transforming büyüme faktörü beta 1
TIMP3	: Metaloproteinaz 3'ündoku inhibitörü
TRH	: Tirotropin salgılayıcı hormon
TPO	: Tiroid peroksidaz
TSH	: Tiroid stimulan hormon
TSHR	: Tirotropin reseptörü
TSP1	: Trombospondin 1
UPA	: Ürokinaz plazminojen aktivatör

UPAR : Ürokinaz plazminojen aktivator reseptörü
UV : Ultraviyole
VEGFA : Vasküler endotelyal büyüme faktörü A
WHO : Dünya Sağlık Örgütü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimim boyunca tüm imkanları sağlayan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak ilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Rifat BİRCAN'a;

Tez çalışmamda kullandığım örneklerin sağlanmasında yardımcı olan desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Hülya ILIKSU GÖZÜ'ne;

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yardımlarını, bilgi ve görüşlerini eksik etmeyen, ilgi ve emeklelerini esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN'e ve Doç. Dr. Cenk ARAL'a;

Çalışma arkadaşlarım Fidan İSLAMOVA SOYDAN, Hande AKALAN, Esra ULU, Gürkan AKYILDIZ, Dilan Hevra KIZILOCAK, Bahar GÜRSU ve diğer tüm Biyoloji A.D. mensuplarına;

Her zaman yanımda olan değerli dostlarım Güzide AKYOL, Nurdan ERCAN ve Merve KOÇAK'a;

Hayatımın her anında yanımda olan desteklerini esirgemeyen annem Ergül AYDIN'a, babam Ayhan AYDIN'a ve kardeşim Ceren AYDIN'a çok teşekkür ederim.

Ocak, 2017

Büşra AYDIN

Biyolog

1. GİRİŞ

Günümüzde kanser tanımı 200'den fazla hastalığı kapsamaktadır ve gelişmiş ülkelerde ölümlerin 5'te birine kanser sebep olmaktadır (Schulz 2007). Bununla beraber tiroid kanserleri tüm malignitelerin %1'ini oluşturur. Buna karşın tiroid kanserleri en sık görülen endokrin malignantilerden biridir ve insidansı diğer tümörlere göre daha hızlı artmaktadır. Günümüzde tiroid kanseri insidansı artmasına rağmen tiroid kanserlerinden ölüm oranı azalmıştır. Bunun nedeni olarak hastalığın erken tanısı ve tedavisi olarak gösterilebilir (Arslan ve ark. 2011).

Tiroid kanserleri tiroid dokusunun epitelyal ve non-epitelyal kısımlarından gelişir. Tiroid foliküler epitelinden; papiller, foliküler ve anaplastik kanserler, parafoliküler hücrelerinden ise medüller kanser köken alır. Bunların içinde papiller tiroid kanseri, tiroid kanserleri içinde en sık görülen türdür ve vakaların %80'nini oluşturur (Boila ve ark. 2012).

Papiller tiroid karsinomlarının meydana gelmesinde proto-onogen serin/threonin-protein kinaz (RAF), Rat sarkoma (RAS) protoonkogen mutasyonları ve RET/Protein tirozin kinaz'ın (RET/PTK) yeniden düzenlenmesi rol oynamaktadır (Zimmermann ve ark. 2013, Schaaf ve ark. 2012). RAS mutasyonları, RAS/RAF/MEK/ERK yolu içinde anormal ERK sinyalizasyonuna neden olur.

RAF kinaz proteinleri ise serin/threonin kinazlar olup ARAF, BRAF ve CRAF olarak 3 alt 11 gruba ayrılmaktadır. RAF'lar RAS-RAF-MEK-ERK sinyal yolu üzerinde MEK kinazların önemli bir aktivatörüdür. RAS-RAF-MEK-ERK yolu; hormonlar, sitokinler ve çeşitli büyüme faktörleri gibi hücre dışı uyarılara yanıt olarak çalışan önemli bir sinyal ileti yoludur. Büyüme faktörleri gibi hücre dışı uyarılar hücre zarı üzerinde kendi reseptörleri sayesinde RAS kinazları aktive eder. Aktive RAS proteini adaptör proteinlerin yardımı ile BRAF kinaz bölgesinin aktivasyon segmentinde yerleşik bulunan, iki önemli rezidüyü fosforile eder. Fosforillenmiş BRAF; MEK1 ve MEK2'yi fosforile edilerek sinyal iletimi yönündeki ERK1 ve ERK2'nin aktive olmasını sağlar. Aktif ERK1/2 daha sonra hücre sel çoğalma, farklılaşma, büyüme ve hayatta kalma için iletim yönündeki efektörlerine (sitolitik ve nükleer efektörlerin her ikisine) sinyalleri iletir (Schulz 2007).

BRAF proteinini kodlayan, 7. kromozom üzerinde yer alan BRAF geni 15. ekzon üzerinde meydana gelen V600E mutasyonu; kinaz aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir

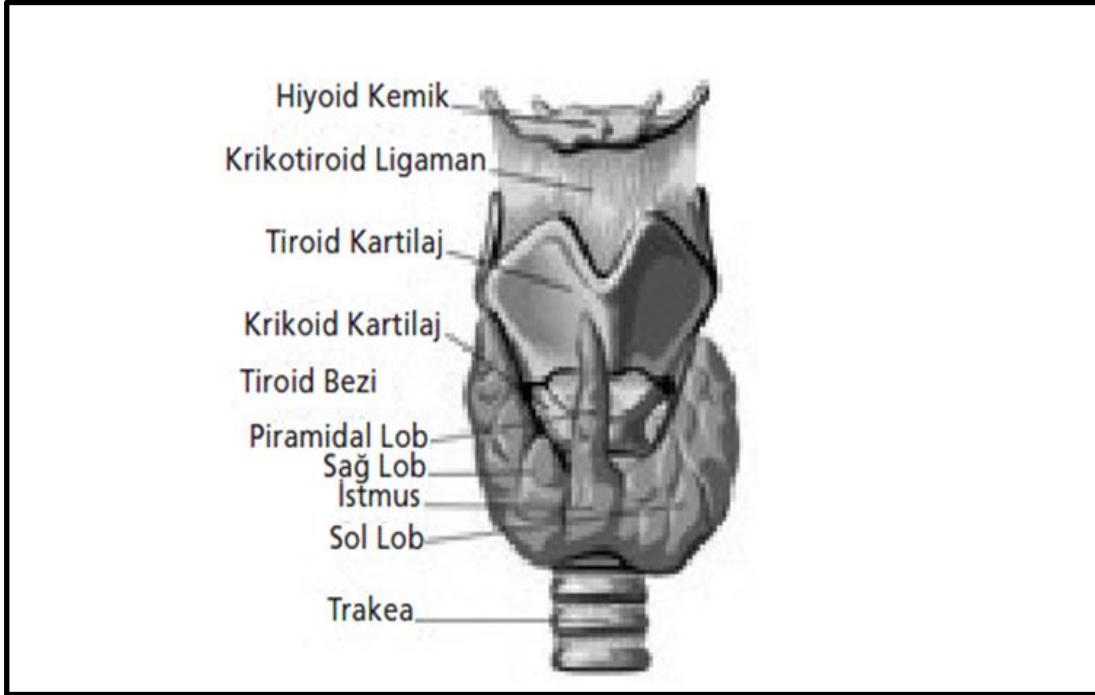
rol oynayan DFG motifine yakın bir bölgede valinle glutamik asitin yer değiştirmesi ile gerçekleşir (Rahman ve ark. 2013). V600E mutasyonuna sahip BRAF yapısal aktivasyon gosterir, herhangi bir sinyale ihtiyaç duymaksızın MAPK yolağını sürekli aktive eder ve tmorogenezi uyarır (Li ve ark. 2013). BRAF gen mutasyonu diğer tiroid kanserleri ile karşılaştırıldığında PTK'larındaki yaygınlığından dolayı PTK'unun genetik imzası olarak gosterilmektedir ve histopatolojik olarak PTK tanısında diagnostik önem taşır (Boila ve ark. 2012).

Literatürde, Türk toplumunda PTK vakalarında BRAF V600E mutasyonu üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır. Dolayısıyla, yapılacak bu çalışma ile Türk Toplumunda papiller tiroid kanserlerinde BRAF V600E mutasyon insidansının saptanması ve literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1.Tiroid

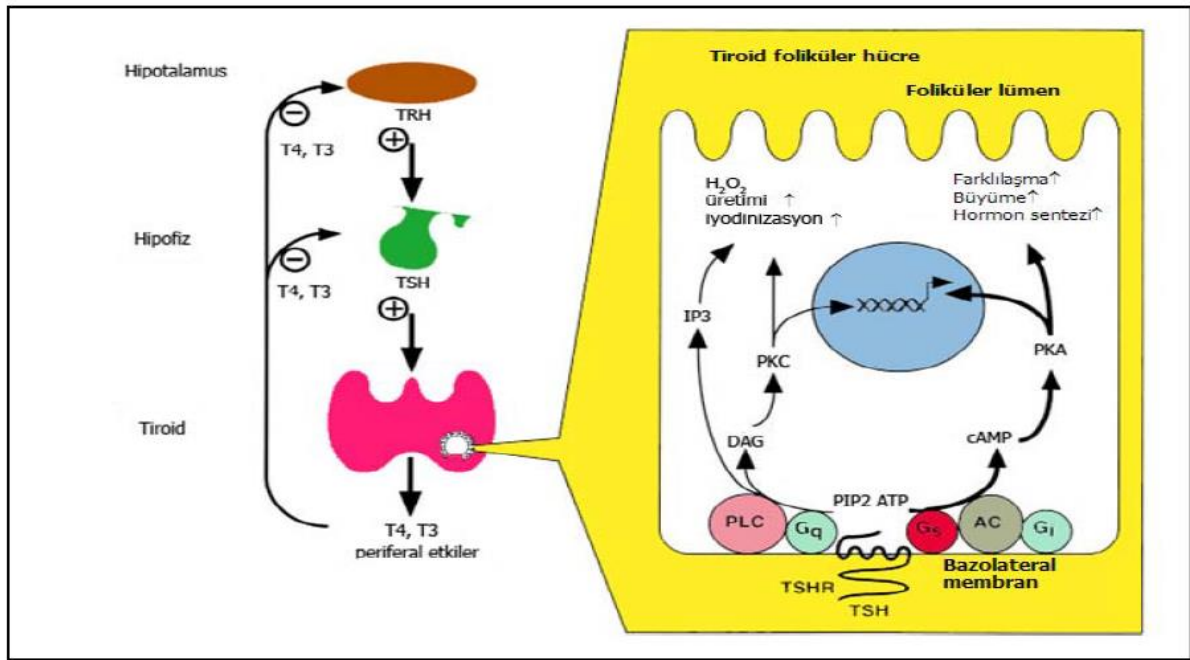
Tiroid bezi boynun alt kısmında, strep kaslarının önünde, larinks ve trakea'yı kelebek şeklinde saran, kahverengi-kırmızı renkte, sert kıvamlı insan vücudundaki en büyük endokrin bezdir (Akçakaya ve ark. 2012). Erişkinlerde ortalama ağırlığı 25 gr olan tiroid bezinin boyutları bireyin vücut ağırlığı ve iyot alımına göre değişmektedir (Toprak 2011). Tiroid bezi sağ ve sol olmak üzere iki loptan oluşur ve krikoid kıkırdağın altında isthmusla birbirine bağlanır (Akçakaya ve ark. 2012). Tiroid bezi histolojik olarak foliküler ve parafoliküler C hücrelerini içerir. Folikül epiteli genelde, tek tabakalı kübik epitelidir. Foliküler hücrelerde tiroid hormonlarının biyosentezi ve salınımı gerçekleştirilirken, tiroid bezinde, zemin bağ dokusuna gömülü olan, ya da folikül hücreleri arasına sıkışmış halde bulunan parafoliküler C hücrelerinde kalsitonin hormonunun biyosentezi ve salınımı gerçekleştirilir (Özata 2005).



Şekil 2.1. Tiroid bezi anatomisi (Akçakaya ve ark. 2012)

Tiroid bezinin kontrolü hipotalamus-hipofiz ekseninde sağlanır. Hipotalamus tarafından salgılanan TRH (tirotropin salgılayıcı hormon) hipofiz bezini uyarması sonucu tirotropin (TSH) hormonunun üretilmesini ve salgılanmasını sağlar (Bircan 2007). TSH reseptörü, foliküler stimule edici hormon (FSH), luteintropik hormon (LH), koryonaganodotropik hormon (β -HCG) reseptörü ile birlikte rodopsin/ β adrenerjik reseptör alt ailesinin bir üyesidir ve tiroid bezinin büyüme ve işlevlerinden sorumludur. TSH, TSH reseptörüne bağlanır, tiroid foliküler hücrelerinin büyüme ve işlevlerini uyarır, tirod bezi hormonlarının (tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3)) sentezini ve tiroid bezinden salgılanmalarını düzenler (Şekil 2.2) (Bircan 2007).

TSH normal tiroid dokusunda, iyot alımı ve metabolizmasından tiroid hormon sentezi ve salımına kadar tüm fizyolojik olayları uyarır. Tiroid hormonları sentezi ve salınımı da TSH tarafından kontrol edilir. Tiroid epitel hücrelerinde TSH sinyal iletisi, genel olarak cAMP'nin ikincil haberci molekül olarak yer aldığı sinyal ileti yolağı üzerinden ya da fosfolipaz C (PLC) yolağının aktivasyonu ile meydana gelir (Bircan 2007).



Şekil 2.2. Hipotalamus-hipofiz-tiroid eksenini ve tiroid foliküler hücrelerden temel sinyal iletme yollarını TRH, TSH salgılayıcı hormon; TSH, Tiroid stimule edici hormon; T4, tetraiyodotironin; T3, triiyodotironin; TSHR, TSH reseptörü; Gs/q/i, G proteinleri; AC, Adenilatsiklaz; PKA, Protein kinaz A; PLC, Fosfolipaz C; DAG, diasilgliserol; PKC, Protein kinaz C; IP3, İnositol-3-fosfat (Bircan 2007)

Tiroid hormonları üç aşamada üretilip hazırlanır. Her üç aşamada da tiroid stimulan hormon etkilidir. Birinci aşamada, tiroid bezi folikül hücreleri kandaki iyodu tutup

biriktirirler. İkinci aşamada, folikül hücrelerinde üretilen proteinlere iyot bağlanması gerçekleşir ve iyotlu tiroglobulin oluşur. Üçüncü aşamada tiroglobulin proteolitik enzimler aracılığıyla parçalanır. Böylece tiroid hormonları meydana gelir (Özata 2005).

2.2. Tiroid Kanseri

Tiroid bezi kanseri endokrin organlarda saptanan malign tümörler içerisinde en sık görülen kanserlerdir ve tüm kanserlerin %2,9'unu oluşturur (Barbaro ve ark. 2014, Fayaz ve ark. 2014). Tiroid kanseri genel popülasyonda kadınlarda en sık görülen 7. kanser türü, erkeklerde ise en sık görülen 14. kanser türüdür (Fayaz ve ark. 2014). Tiroid kanseri, tiroid dokusunun epitelial ve non-epitelial kısımlarından gelişir. Tiroid foliküler epitelinden; papiller, foliküler ve anaplastik kanserler köken alır. Parafoliküler epitelinden ise medüller kanser köken alır. Tiroid kanseri, iyi differansiye karsinomlar, medüller karsinom, anaplastik karsinom ve diğerleri olarak ayrılabilir (Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2). Papiller, papiller mikrokarsinom, foliküler ve Hürthle hücreli karsinomları foliküler epitel hücre kökenli iyi differansiye karsinom tipleridir. Buna karşın insülin karsinom, anaplastik tiroid karsinom, foliküler hücre kökenli az differansiye tiroid karsinom tiplerini oluştururlar (Özata 2005).

2.3. C hücre (Parafoliküler hücre) kaynaklı tiroid kanseri

2.3.1. Medüller tiroid kanseri

Medüller tiroid kanseri (MTK), tiroid bezinin C (parafoliküller) hücrelerinden köken almaktadır ve tiroid kanserlerinin %5-10'unu oluşturmaktadır (Marsh 1995). MTK olgularının % 25'ten fazlası kalıtsaldır (Ergüney 2015). Ailesel MTK olgularında germline RET mutasyonları otozomal dominant olarak kalıtılır ve multiple endokrin neoplazi 2A, multiple endokrin neoplazi 2B ve ailesel MTK olarak hastalık 3 kategoride sınıflandırılır. MTK tanısı konulan hastalarda 5 yıllık sağ kalım süresini doldurabilen hasta oranı %86 düzeyindedir. Kötü prognostik faktörler arasında tanı esnasındaki ilerlemiş yaş, ileri evre tümör, lenf nodu metastazının varlığı ve somatik RET mutasyonları sayılabilir. Sporadik MTK'ları soliter yapıya sahipken ailesel MTK'lar bilateral veya multisentrik odak yapıları gösterebilir (Kato ve ark. 2015).

Çizelge 2.1. Tiroid Tümörlerinin Sınıflandırılması (Özata2005)

I.PRİMER TÜMÖRLERİ
1.EPİTELYAL TÜMÖRLERİ
Folliküler Hücre Kaynaklı Tümörler
a) Bening Olanlar
Folliküler Adenomlar
1.Klasik
2.Varyantlar
b) Malign Olanlar
1.Diferansiye
Folliküler Karsinoma
Papiller Karsinoma
a.Klasik
b.Varyantlar
2.Az Diferansiye Karsinomlar
İnsüler Karsinoma
Diğerleri
3.Anaplastik Karsinoma
2.C HÜCRE KAYNAKLI TÜMÖRLER
Medüller Tiroid Karsinoma
3.MALİGN LENFOMA
4.ÇEŞİTLİ TÜMÖRLER
Sarkom, Fibrosarkom, Epidermoid, Mukoepidermoid karsinoma
II. SEKONDER TÜMÖRLER (METASTATİK)
III. TÜMÖR-BENZERİ LEZYONLAR

2.3.2. Anaplastik (Kötü Diferansiye) tiroid kanseri

Anaplastik (kötü diferansiye) tiroid kanserleri (ATK), tiroid kanserleri içinde en agresif seyirli olan kanser türüdür (Adaş ve ark. 2012). Tiroid kanserleri içinde %5'ten az bir oranda görülmektedir (Ergüney 2015). Yine de tiroid kanserine bağlı ölümlerin yarısından sorumludur. Medyan sağkalım süresi 6 aydır. Şikâyetler genellikle tiroid bezinde hızla büyüyen bir kitledir. ATK kitleleri genelde invazif solid, kanamalı ve nekrotik yapı

gösterirler. Prognozu oldukça kötüdür. Yakın çevre dokulardan invazyon ile başta akciğer olmak üzere kemik, beyin, karaciğer, cilt, kalp ve böbrekler gibi uzak dokulara metastaz temel karakteristiklerindedir. ATK hastalarının %70'i kadındır ve %50'sinde daha önce tanımlanmış olan diferansiye tiroid karsinomu (DTK) hikâyesi mevcuttur. ATK'ları DTK'lardan farklı olarak radyoaktif iyot tedavisine yanıt vermezler (Kato ve ark. 2015).

2.3.3. Foliküler tiroid kanseri

Foliküler tiroid karsinomu (FTK) genel popülasyonda papiller tiroid karsinomlarından (PTK) sonra en sık görülen ikinci iyi diferansiye tiroid kanser türüdür ve tiroid kanserlerinin %5-15'ini oluşturur (Delellis ve ark. 2004). FTK'ları kadınlarda daha sık görülür ve papiller tiroid kanserinin aksine çocuklarda nadiren görülür (Vayisoğlu ve Özcan 2011). Genel olarak iyot eksiliği olan bölgelerde görülmekle birlikte sıklığı %25-40'tır (Vayisoğlu ve Özcan 2011). FTK'ları foliküler diferansiyon gösteren fakat papiller nükleer karakteristik göstermeyen bir tiroid kanseridir. FTK'ları kirli gri ve pembe renkte genellikle fokal kanamalar gösteren soliter enkapsüle tümörlerdir. FTK tanısı genellikle tümör kapsülünün veya kan damarlarının foliküler hücre invazyonunun saptanması ile gerçekleştirilir. Vasküler invazyon kapsüler infiltrasyondan daha kötü prognoza neden olur (LiVolsi ve Asa, 1994). FTK'larında kötü prognostik faktörler; yaş, uzak metastaz, büyük tümör boyutu, yaygın vasküler invazyon, tiroid dışı uzantılar ve geniş invazif tümör karakteristiği olarak sıralanabilir (Lee ve ark. 2012, Adaş ve ark. 2012).

2.3.4. Papiller tiroid kanseri

Papiller tiroid karsinomu (PTK), tiroid kanserleri arasında toplumda ensık rastlanan tiroid kanseridir ve tiroid kanseri vakalarının %80'ini kapsar (Boila ve ark. 2012). PTK, tiroid kanserleri içerisinde prognozu en iyi olan tiroid kanseridir. Ancak PTK hastalarının yaklaşık %10'nunda lenf nod nüksleri ve akciğer metastazları gibi yeniden nüks görülebilir. Bilinen kötü prognostik faktörler arasında yaş >45, büyük tümör boyutu, tiroid dışı invazyon, uzak metastaz ve vasküler invazyon sayılabilir (Kato ve ark.2015). Bununla beraber, çocukluk çağında aşırı radyasyon almış olma papiller tiroid kanserine yatkınlıkta en önemli risk faktörüdür (Adaş ve ark. 2012). Papiller tiroid kanseri lenfatik yayılıma eğilimlidir ve metastazın sağ kalım üzerine olumsuz etkisi azdır (Erhan ve ark. 1999).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflandırılmasına göre; PTK'nun foliküler, makrofoliküler, onkositik hücre, yüksek hücre, silindirik hücre, sklerozan ve solid varyantları gibi alt tipleri bulunmaktadır (Çizelge 2.2) (Erşen ve ark. 2013). Bu alt tiplerden solid varyant ve (tall) hücre varyantları daha kötü prognoz gösterirken diğerleri daha iyi prognostik özelliklere sahiptir.

Çizelge 2.2. Papiller Karsinoma Varyantları (Özata 2005)

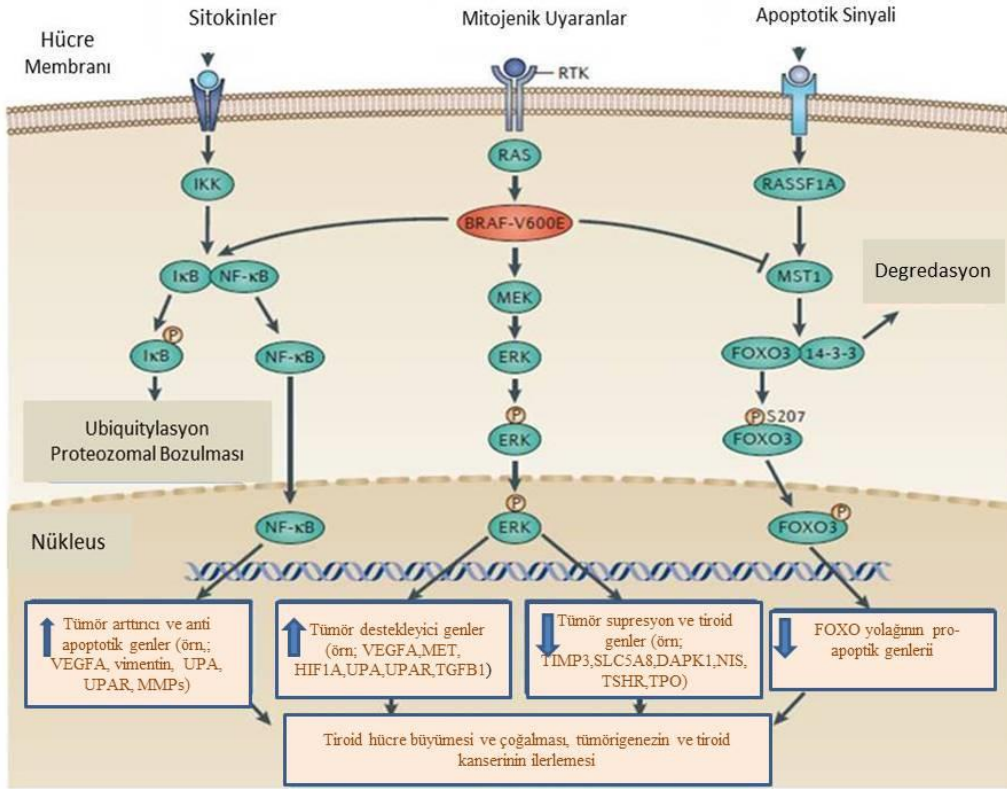
A-İyi Prognozlu Papiller Kanser Varyantları
1-Mikrokarsinoma (okült(gizli))
2-Enkapsüle Varyant
3-Solid Varyant
4-Foliküler Varyant
B-Kötü Prognozlu Papiller Kanser Varyantları
1-Uzun Hücreli (Tall hücreli) Varyant
2-Onkositik (oksifil) Varyant
3-Kolumnar Hücreleri Varyant
4-Diffüz Sklerozan

2.4. Tiroid Kanserlerinin Moleküler Patogenezi

Sağlıklı normal hücrelerde, hücrelerin proliferasyonu, diferansiyasyonu ve hücre sağkalımı çok sayıdaki moleküler yolak tarafından kontrol edilmektedir. Üstelik bu yolaklar birbiriyle iletişim halindedir. Bu yolaklar, büyüme faktörleri, hormonlar, hücre-hücre etkileşimleri, hücre-matriks etkileşimleri ile oluşan sinyalleri iletmekte ve sinyallerin entegrasyonunu sağlamaktadırlar. Genellikle, bu sinyal ileti yolaklarının deregülasyon sonucunda kanser ortaya çıkmaktadır. Kanserlerin gelişim ve ilerleyişine bazen belirli sinyal ileti yolaklarının yersiz aktivasyonu neden olurken, bazen de diğer sinyal ileti yolaklarının yersiz inaktivasyonu neden olmaktadır. Özellikle, sinyal ileti yolağı içerisinde ya da bu yolağın düzenlenmesinde işlev gören protoonkogenlerin aktivasyonu veya tümör supressörlerin inaktivasyonu gözlenmektedir (Schulz 2007).

Tiroid kanserlerinde deregülasyona uğrayan sinyal ileti yolaklarının başında Mitogen Activated Protein (MAPK) sinyal ileti yolağı gelmektedir. Bu sinyal ileti yolağını takiben Fosfoinositid 3-kinaz-Protein kinaz B (PI3K-AKT), Nükleer Faktör kappa B (NF-KB), Ras

association domain-containing protein 1, Macrophage-stimulating protein1, forkhead box O3 (RASSF1-MST1-FOXO3) ve WNT- β -Katenin sinyal ileti yolaklarında meydana gelen bozukluklar tiroid kanserlerinin gelişim ve progresyonunda önemli rol oynamaktadır (Xing 2013) (Şekil 2.3).



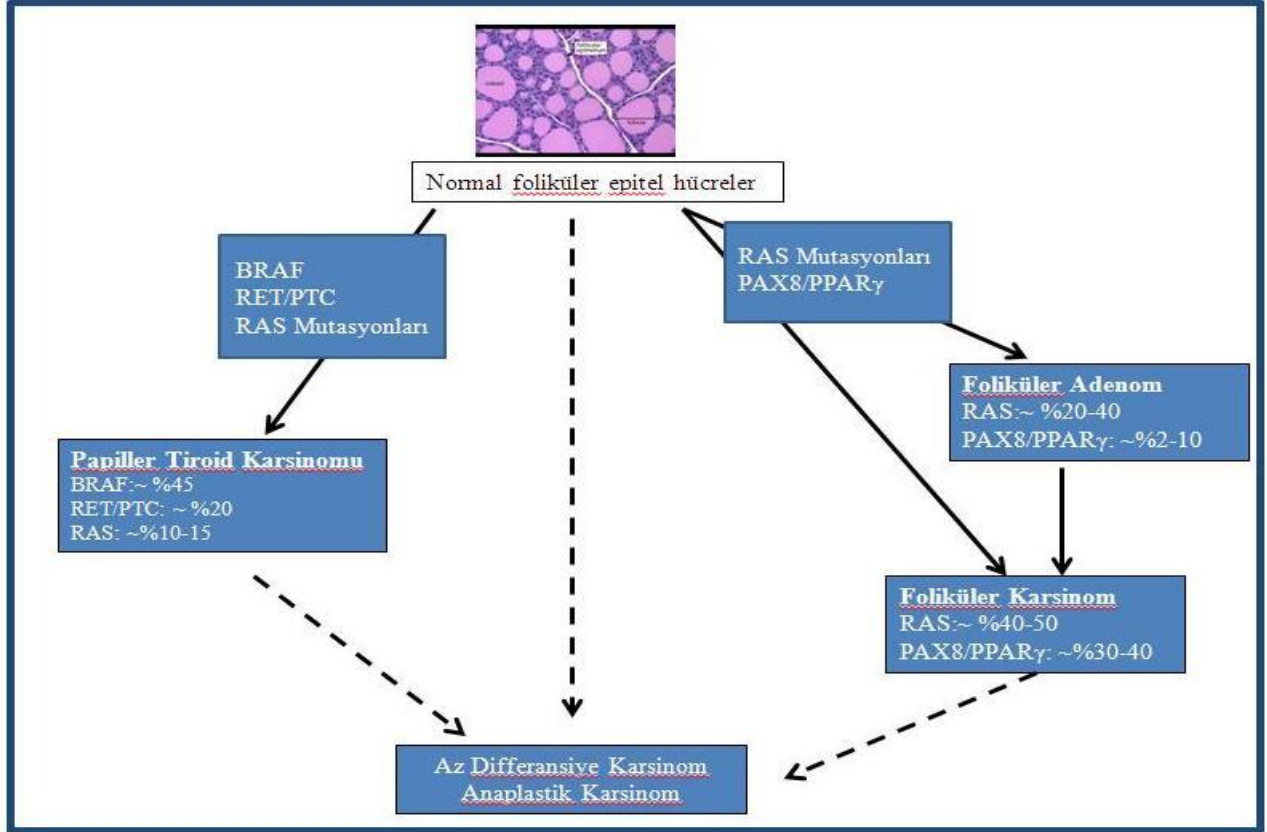
Şekil 2.3. Tiroid kanserinde MAPK ve ilgili sinyal ileti yolları. Şeklin ortasında yer alan sinyal ileti yolağı klasik MAP kinaz sinyal ileti yolağıdır. Hücre dışı mitojenik bir uyarı, hücre membranında yer alan bir reseptör tirozin kinazı (RTK) aktive eder ve sinyal RAS, RAF (BRAF V600E olarak gösterilen), MEK ve ERK'e iletilir. ERK'in aktivasyonu bu molekülün fosforilasyonu ile gerçekleşir ve ERK nükleusa girer. ERK nükleusta tümör teşvik edici genlerin ifadesinde artışa neden olurken tümör baskılayıcı genlerin ve tiroid dokusunda iyodun alınımından ve organifikasyonundan sorumlu genlerin ifadesinde azalmaya neden olur. Şeklin sol tarafında yer alan sinyal ileti yolağı nükleer faktör κ B (NF κ B) sinyal ileti yolağıdır. Bu sinyal ileti yolağında hücre dışı uyarılar (örn. Sitokinler) hücre yüzeyinde yer alan reseptörler vasıtasıyla sinyal ileti yolağını aktive ederler. Bunun sonucunda inhibitör κ B(I κ B)'nin fosforilasyonu ile sonuçlanan I κ B kinazının (IKK) aktivasyonuna neden olur. Fosforile olan I κ B, sitoplazmada tek başına duran ve I κ B ile kompleks yapan NF- κ B'den ayrılır ve ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyona uğrar. Serbest NF- κ B daha sonra tümör teşvik edici genlerin ekspresyonunu arttırmak için nükleusa girer. MEK sinyal iletiminden bağımsız ve henüz tanımlanmamış bir mekanizma ile BRAF-V600E I κ B'nin fosforilasyonunu ve NF- κ B'nin serbest bırakılmasını teşvik eder ve böylece NF- κ B yolu aktivasyonunu sağlar. Şeklin sağ tarafında gösterilen sinyal ileti yolağı RASSF1-memeli STE20-protein kinaz 1 benzeri (MST1)-çatal bağlantı kutusu O3 (FOXO3) yoludur. Membran reseptörleri vasıtasıyla hücre dışı pro-apoptik uyarıcılar tarafından aktive edilen RASSF1A, MST1'i aktive eder. Aktif MST1 daha sonra FOXO3'ü Ser207 pozisyonundan fosforile eder. Fosforile FOXO3, sitoplazmada 14-3-3 proteinlerinden disasosiyat olur. 14-3-3 proteinleri proteozomal

degradasyona uğrar ve fosforile FOXO3, FOXO yolağında yeralan pro-apoptik genlerin ifadesini arttırmak için nukleusa girer. BRAFV600E, MST1 ile doğrudan etkileşim halindedir ve MST1'i inhibe ederek RASSF1A aktivasyonunu engeller, dolayısıyla FOXO3 yolunun pro-apoptik sinyal iletisi bastırılmış olur. Nukleusta gösterilen FOXO faaliyetleri için kullanılan aşağı yönlü ok BRAFV600E'nin, pro-apoptik genler üzerinde negatif etkisini göstermektedir. Normalde bu genler RASSF1A-MST1-FOXO3 sinyal yolağı üzerinden upregüle edilmektedirler. Burada gösterilen BRAFV600E'nin sinyal ileti yolaklarına üçlü bağımsız eşleşmesi BRAFV600E tarafından yönlendirilen benzersiz, kendine özgü ve güçlü bir tiroid tümörüne mekanizmasını tanımlamaktadır (Xing 2013)

Çeşitli tiroid tümörlerinin tümörögeninde, bu yolaklar üzerinde yer alan çok sayıda genetik değişim önemli role sahiptir (Şekil 2.4). Bu genetik değişimlerin başında MAP-kinaz yolağı üzerinde yer alan BRAF proteinini kodlayan gen üzerinde 1799. nükleotit de meydana gelen T/A yer değişimi (BRAF V600E mutasyonu) gelmektedir. Bu mutasyon BRAF V600E mutant proteinin ifadesiyle sonuçlanır ve BRAF serin/treonin kinazının yapısal aktivasyonuna (otonomisine) neden olur. PTK vakalarının yaklaşık %45'inde BRAF V600E mutasyonu görülmektedir. BRAF mutasyonlarının PTK'larında tespit edilen birkaç nadir varyantı daha vardır, bunlar genellikle kodon 600 civarındaki nükleotidleri etkiler ve BRAF kinazı yapısal olarak aktif hale getirirler (Hou ve ark. 2007, Trovisco ve ark. 2005).

Tümör gelişiminin otonom olarak sürdürebilmesi için BRAF V600E mutasyonunun gereksinimi ilk olarak ksenograft tümör modelinde gösterilmiştir (Liu ve ark. 2007). Literatürde yer alan kapsamlı çok merkezli bir çalışmada, BRAF V600E ile PTK'nun kötü prognozu arasında kuvvetli ilişki olduğu tespit edilmiştir (Xing ve ark. 2005). Bu çalışmada, BRAFV600E mutasyonuna sahip bireylerde tümör dokusunun daha agresif özelliklere sahip olduğu, kanser nüks oranının daha yüksek olduğu, mutasyonun radyoaktif iyot ablasyon tedavisinde radyoaktif iyot bağlanma kapasitesinde düşüşe neden olarak tedavi başarı şansını azalttığı tespit edilmiştir (Xing ve ark. 2005). Bu çalışmayı takiben yapılan birçok çalışmada BRAF V600E mutasyonu ve PTK'unun kötü prognozu arasındaki ilişki teyit edilmiştir. Bununla beraber, BRAF V600E mutasyonu taşıyan transgenik farelerde yapılan deneylerde, bu farelerde agresif PTK'unun geliştiği tespit edilmiştir (Knauf ve ark. 2005). Buna karşın, yapılan bazı çalışmalarda ilgi çekici olarak PTK'larında BRAF genotipinin tümör içi heterojenite gösterdiği saptanmıştır. Kantitatif yöntemler (pyrosequencing) kullanılarak yapılan bir çalışmada, taranan olguların bir kısmında BRAF V600E mutasyon yüzdesinin %25 ile %5.1 arasında değiştiği tespit edilmiş ve bireylerde tümör hücrelerinin çoğunluğunun yabanıl tip BRAF genotipine sahip olduğunu belirlemişlerdir (Guerra ve ark. 2012). BRAF

V600E mutasyonu mu PTK'larında tümörögenezini tetiklemektedir yoksa BRAF V600E mutasyonu süre gelen PTK tümörögenezinde ikincil bir onkogenik varyasyon olarak mı ortaya çıkmaktadır ? Bu ikilem halen literatürde tartışılmaktadır.



Şekil 2.4. Papiller ve foliküler tiroid karsinomlarının patogeneğinde mutasyonlar ve translokasyonlar (Anonim 2011)

PTK'larında BRAF mutasyonlarından sonra en sık rastlanan mutasyonlar Ras mutasyonlarıdır. Ras mutasyonları PTK'larının % 10-20'sinde, FTK'larının %40-50'sinde ve ATK'larının %50'den fazlasında görülmektedir (Chien ve Koeffler 2012). RAS proteinini GTP'ye bağlandığında aktif durumdadır. RAS'da bulunan intrinsik GTPaz GTP'yi hidroliz ederek RAS'ın GDP'ye bağlı inaktif duruma geçmesini sağlar ve RAS sinyal iletilsinin sonlanmasına neden olur. RAS proteinini üzerinde meydana gelen mutasyonlar RAS'ın GTPaz aktivitesinin kaybına yol açar ve RAS proteininin aktif durumda kalmasına, RAS sinyal iletilsinin devamına neden olur. RAS proteininin 3 izoformu vardır: HRAS, KRAS ve NRAS (Chien ve Koeffler 2012, Xing 2013). Tiroid kanserlerinde genellikle NRAS mutasyona uğramaktadır. Mutasyonlar çoğunlukla 12. ve 61. kodonda meydana gelmektedir (Xing 2013).

Tiroid kanserlerinde BRAF ve RAS mutasyonlarından sonra en sık görülen mutasyonlar gen yeniden düzenlenmeleridir. Kromozomlarda meydana gelen translokasyonlar iki genin farklı parçalarının birleşmesine ve onkogenik özellik gösteren yeni bir proteinin oluşmasına neden olabilir. FTK'larının %36'sında, foliküler adenomların (FA) %11'inde ve foliküler varyant papiller tiroid karsinomlarının (FVPTK) 13'de t(2;3) (q13; p25) translokasyonu görülmektedir. Bu translokasyon bir nükleer hormon reseptörü olan PPAR γ 'ya PAX8 gen parçasının kaynaşmasına neden olur (Kroll ve ark. 2000, Castro ve ark. 2006). Literatürde yer alan çalışmaların bir kısmı oluşan füzyon proteininin anti-apoptotik özellik gösteren PPAR γ ile indüklenmiş gen ekspresyonuna dominant negatif süpresyon gösterdiğini belirtirken, diğer çalışmalar oluşan füzyon proteininin PAX8 transkripsiyon aktivitesini bozduğunu, bununda tiroglobulin (Tg) tiroid peroksidaz (TPO) ve sodyum iyot simporter (NIS) gibi tiroid spesifik genlerin ekspresyonunda deregülasyona neden olduğunu ortaya koymuşlardır (Au AYM ve ark. 2006, Martelli ve ark. 2002).

Tiroid kanserlerinde görülen bir diğer gen yeniden düzenlenmesi RET geni yeniden düzenlenmeleridir. PTK'larının %40-70'inde, normalde sessiz olan tirozin kinaz RET domeninin çeşitli yapısal aktivasyon gösteren genlerle füzyonu ile sonuçlanan RET gen yeniden düzenlenmelerinin görüldüğü saptanmıştır (Zitzelsberger ve ark. 2010). PTK'larında en sık görülen RET/PTC gen ürünleri RET/PTC1 (inv(10)(q11.2;q21)) ve RET/PTC3 (inv(10)(q11.2;q10)) dur (Chien ve Koeffler 2012). PTK'larında yapısal olarak aktif tirozin kinaz protein oluşumu ile sonuçlanan füzyon proteinleri MAP kinaz yolağının stimüle edilmesine neden olmakta ve sonuç olarak tiroid karsinogenezini başlatmaktadır.

Bugüne kadar çeşitli tiroid tümörlerinin tümörögenezinde önemli rol oynayan ve sinyal ileti yolları üzerinde yer alan mutasyonlar çizelge 2.3'te sunulmuştur.

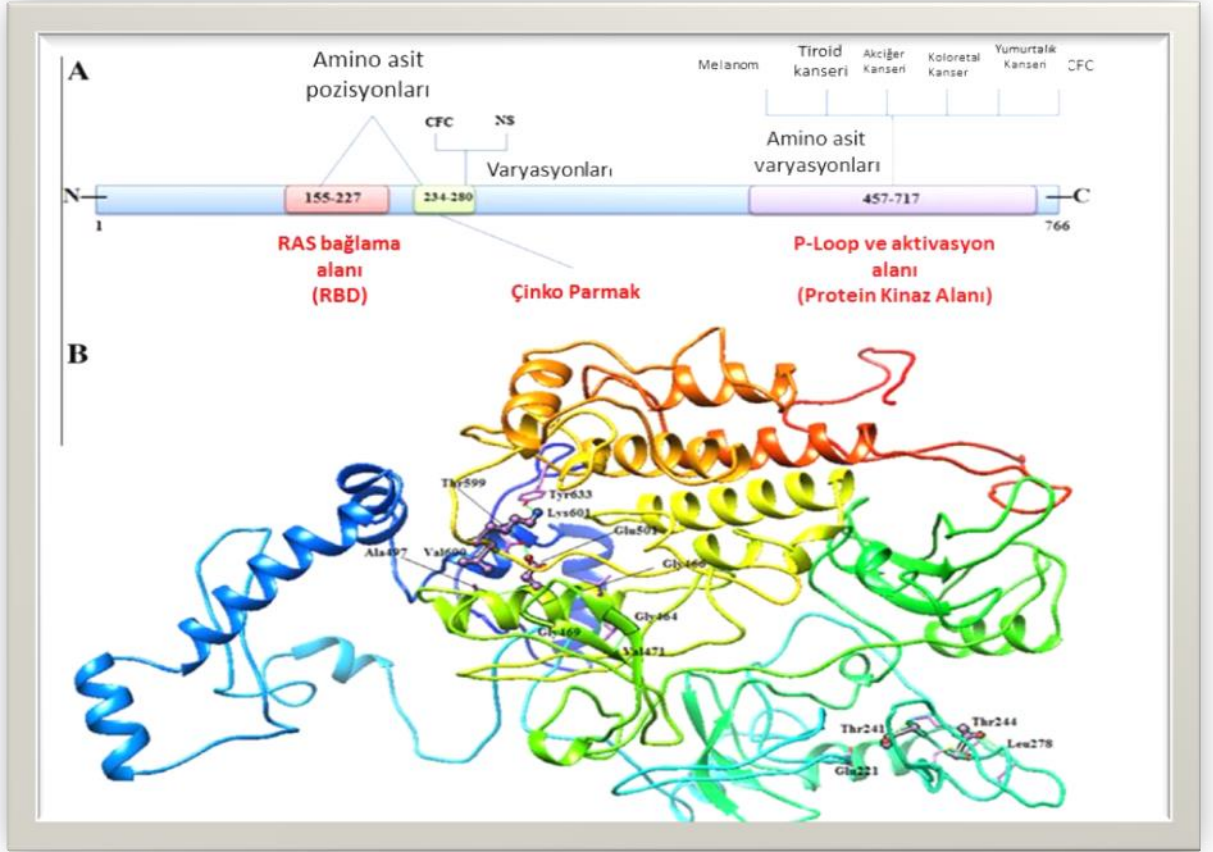
Çizelge 2.3. Tiroid tümörögenesinde rol oynayan önemli sinyal ileti yolları ve gözlenen mutasyonlar (Xing 2013)

Mutasyon	Tiroid Tümörlerinin Çeşitleri	Yaklaşık Yaygınlığı (%)	Etkilenmiş Birincil Sinyal Yolları	Protein ve Tümör Üzerindeki Fonksiyonel Etkisi
BRAFV600E	CPTK FVPTK TCPTK ATK	45 15 80-100 25	MAPK	Aktive edici, tümörögenез invazyon, metastaz, nüks ve mortaliteyi teşvik edici
BRAFK601E	FVPTK	5	MAPK	Aktive edici; muhtemelen BRAF V600E'ye benzer etki
HRAS, KRAS, NRAS	FTA FTK FVPTK PDTK ATK	20-25 30-45 30-45 20-40 20-30	MAPK ve PI3K-AKT	Aktive edici; PDK ve FTK tümörögenезini, invazyon ve metastazi teşvik edici.
PTEN (Mutasyon)	FTA FTK ATK PTK	0 10-15 10-20 1-2	PI3K-AKT	Geni inaktive edici ancak PI3K yolunun aktivasyonu ile tümörögenез ve invazif yayılımı teşvik edici.
PTEN(Delesyon)	FTK	30	PI3K-AKT	Geni inaktive edici ancak PI3K yolunun aktivasyonu ile tümörögenез ve invazif yayılımı teşvik edici.
PIK3CA	FTA FTK ATK PTK	0-5 5-15 15-25 1-2	PI3K-AKT	Aktive edici; tümörögenез ve invazyon teşvik edici
AKT1	Metastatik Kanser	15	PI3K-AKT	Belirsiz; metastaz lehine gibi görünüyor.
CTNNB1	PDK ATK	25 60-65	WNT-β-katenin	Aktive edici; tümör progresyonunu teşvik edici.
TP53	PDK ATK	25 70-80	P53-	İnaktive edici; tümör progresyonunu teşvik edici.
IDH1	FTK FVPTK CPTK ATK	5-25 20 10 10-30	IDH1	İnaktive edici; tümörler üzerindeki etkisi belirsiz.
ALK	ATK	10	MAPK ve PI3K-AKT	Aktive edici; tümör progresyonunu teşvik edici.
EGFR	CPTK	5	MAPK ve PI3K-AKT	Aktive edici; tümörler üzerindeki etkisi belirsiz.
NDUFA13	HCTK	15		Muhtemelen inaktive edici; mitokondriyal metabolizmayı ve hücre ölümünü etkileyecek.

2.5. Braf

BRAF; diğerk adıyla v-Raf mürin sarkoma viral onkogen homologu B1 insanlarda BRAF geni tarafından kodlanan bir proteindir. BRAF; hücre'nin farklılaşma ve apoptozisini düzenleyen MAPK yolaklarında sinyal düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 2.5) (Tural ve ark. 2012). İnsanlarda şimdiye kadar A-Raf, B-Raf, C-Raf olmak üzere üç tane RAF kinaz proteinleri tanımlanmıştır. Bunların içinde BRAF, MAPK yolağının en güçlü aktivatörüdür (Tural ve ark. 2012).

Tiroid kanseri'nde, BRAF V600E mutasyonu ilk olarak 2003'te keşfedilmiştir ve Günümüze kadar BRAF geni üzerinde 65'ten fazla mutasyon tanımlanmıştır (Rahman ve ark. 2013). BRAF mutasyonları 7. kromozomun "q" kolunda yer alan BRAF geni üzerinde proteinin katalitik kinaz bölgesini kodlayan 11.ve 15. Ekzon arasında meydana gelmektedir Tiroid kanserlerinde tespit edilen mutasyonların büyük çoğunluğu (%95'ten fazlası) 1799. nükleotidte meydana gelen timinin adenine tranversiyonudur. (Boila ve ark. 2012). Bu mutasyon BRAF geninin 15. ekzonundaki yanlış anlamlı bir mutasyondur ve BRAF proteinin 600. pozisyonunda yer alan valin amino asitinin glutamik asitle yer değiştirmesiyle sonuçlanır. (Henke ve ark. 2014). Valin; hidrofobik bir yan zincire ve glutamik asit negatif yüklü bir yan zincire sahiptir. BRAF V600E mutasyonu glisin bakımından zengin ilmek ile aktivasyon segmenti arasındaki hidrofobik etkileşimi istikrarsız hale getirir bunun sonucu olarak DFG motifinin karakteristiğinde değişikliğe yol açar ve yabancı tip BRAF ile karşılaştırıldığında mutasyona uğramış BRAF kinaz faaliyetinde yaklaşık 500 kat bir artış görülür. Diğerk bir deyişle, molekül otonom olarak sinyal amplifikasyonuna neden olur ve herhangi bir RAS sinyal iletisi gelmeksizin sinyal iletiyi aşağı yönlü iletir. Dolayısıyla, bu olay hücrenin hayatta kalması ve hücresel çoğalmayı sağlamada sinyal göndermek için BRAF'ı tek başına yeterli hale getirir. Bu nedenle BRAF'ın kendisi sinyal iletimine karşı efektörlerden veya dış uyaranlardan herhangi bir giriş yapmadan MEK-ERK sinyal yolunu uyarabilir. MEK-ERK sinyal yolunun mutasyonla aktivasyonu kontrolsüz hücre çoğalması ve hayatta kalma faaliyetleri ile sonuçlanır (Schulz 2007). Yapılan analizlerde, erişkin papiller tiroid karsinom hastalarında BRAF V600E mutasyonunun sıklığının yaklaşık %45 civarında olduğu saptanmıştır (Arslan ve ark. 2011).



Şekil 2.5. Kanser ve RASopatiler, BRAF proteinin 3D bağlantı yapısı ve protein alanları (A). Kinaz alanı (415-717 amino asit) için BRAF mutasyonları çoğunlukla melanoma, kolorektal kanser, akciğer kanseri, tiroid kanseri, yumurtalık kanseri ve CFC ile karakterize edilir (B). NS, CFC ve kanserde BRAF proteininde en sık olarak 241, 257, 469, 499 ve 600. pozisyonda bulunan aminoasit rezidularında değişim görülmektedir şekilde BRAF proteininin 3 boyutlu yapısı ve sıklıkla değişime uğrayan aminoasitler gösterilmiştir (Hussain ve ark. 2014)

Literatürde yer alan araştırmalar ve meta analizler BRAF V600E mutasyonunun; tekrarlayan papiller tiroid karsinomları, lenf düğümü metastazları ve ekstratiroidal uzantılar ile ilişkisi olduğunu da göstermiştir (Arslan ve ark. 2011). Dolayısıyla, günümüzde PTK vakalarında BRAFV600E mutasyonunun taranması hastalığın tekrarının önlenmesinde ve olası tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bununla beraber, literatürde, Türk toplumunda PTK hastalarında BRAF V600E mutasyon insidansının tespitine ilişkin üç çalışma yer almaktadır ve bu çalışmalara göre BRAF mutasyon insidansı %39-89 arasında değişmektedir (Dağlar-Aday ve ark. 2013, Kurt ve ark. 2012, Kurtulmuş ve ark. 2012). Bu nedenle, yapılacak bu çalışma ile Türk Toplumunda papiller tiroid kanserlerinde BRAF V600E mutasyon insidansının saptanması ve literatüre katkı sağlaması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı +4 °C, Beko, Türkiye kontrol

Derin dondurucu -20°C, Uğur, Türkiye kontrol

Elektroforez güç kaynağı, Cleaver, İngiltere

Elektroforez güç kaynağı, Thermo, İngiltere

Yatay elektroforez tankı, Thermo, ABD

Yatay elektroforez tankı, Cleaver, İngiltere

Hassas terazi, Ohaus, ABD

Buz makinası, Bluewave BW, Çin

Mikrosantrifüj, Cleaver, İngiltere

Mikrosantrifüj, Sigma, Almanya

Otoklav, Tek Bal, Türkiye

Otomatik pipet seti, Axygen, ABD

Soğutmalı santrifüj, Nüve, Türkiye

Vorteks, WiseMix, Kore

Genome lab GeXP genetic analysis system Beckman Coulter, ABD

Isı-Döngü Cihazı Proflex Applied Biosystems, Singapur

Transillüminatör, Vilber Lourmat, Fransa

Distile su cihazı, GFL, Almanya

Ultrasaf su cihazı, Millipore, ABD

Mikrodalga Fırını, Bosch, Almanya

Thermo-Shaker, Biosan, Letonya

pH metre, Hanna HI221, Romanya

Isıtıcı manyetik karıştırıcı, WiseStir, Kore

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

33 cm x 75 µm Kapiler dizi, Beckman Coulter, ABD

Dizi analizi seperasyon jeli, Beckman Coulter, ABD

Dizi analizi kapiller elektroforez tamponu, Beckman Coulter, ABD

Deoksiribonükleik asit trifosfat (dNTP) set, MBI Fermentas, Litvanya

DNA belirteç (100 bç'lik), Thermo, Almanya

Agaroz, Sigma, ABD

Borik asit, Sigma, ABD

EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit), Sigma, ABD

Etidyum bromür, Sigma, ABD

Etil alkol, Sigma, ABD

Magnezyum klorür, Sigma, ABD

SLS (örnek yükleme tamponu), Beckman Coulter, ABD

Tris, Sigma, ABD

PEG (polietilenglikol) 4000, Merck, Almanya

Glikojen, Roche, Almanya

Mineral yağ, Sigma, ABD

Sodyum asetat, Merck, Almanya

Hotstart Mix, Qiagen, USA

3.1.3. Kullanılan kitler

3.1.3.1. DNA Ekstraksiyon Kiti (QIAGEN)

DNA ekstraksiyon için Qiagen kiti kullanılmıştır. Kit içeriği, ATL buffer, ATE buffer, AW1 buffer, AW2 buffer, AL buffer ve proteinaz K'dan oluşmaktadır.

3.1.3.2. DNA Sekanslama Kiti: DNA dizi analizinde kullanılan GenomeLab DTCS – Quick Start DNA Sequencing Kit, Beckman Coulter, (ABD) firmasından elde edilmiştir. Kit dizileme için gerekli olan glikojen, quick start mix, mineral yağ ve SLS içermektedir

3.1.4. Kullanılan ticari çözelti ve tamponlar

Yükleme tamponu (Fermantas, Litvanya)

Tris-HCl pH 7,6

% 0,03 bromfenol mavisi

% 0,03 ksilen siyanol FF

% 60 gliserol

60 mM EDTA

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

Etidyum bromür çözeltisi

10 mg/ml etidyum bromür distile su kullanılarak hazırlandı.

5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu

54 g Tris baz

27,5 g Borik asit

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Çözelti 1 litre'ye dH₂O ile tamamlandı. 1X TBE hazırlamak için 5X TBE stoğundan 200 ml alındı ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

%26 PEG solüsyonu

13 gr. PEG 4000

67 mg. Magnezyum klorür (MgCl₂)

25 ml 1.2 M Sodyum asetat (NaAc) (pH 5.2)

Çözelti 50 ml'ye dH₂O ile tamamlandı.

DNA dizileme reaksiyonu durdurma solüsyonu

Her bir örnek için 5 µl olacak şekilde 0.1 M EDTA (pH 8)'dan 2 µl, 3 M NaAc'tan 2 µl ve 20mg/ml Glikojenden 1 µl alınarak 0.2 ml'lik eppendorf tüpte kullanım öncesi hazırlandı.

3.1.6. Primerler

Çalışmada PZR ve DNA dizi analizi esnasında kullanılan primerler Iontek Ltd şti. Türkiye'den temin edilmiştir. Primerlerin dizileri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR ve DNA dizi analizi için kullanılan primerler

Primer	T _m (°C)	Primer Dizileri (5'→3')
BRAFF	53	5' CTCTTCATAATGCTTGCTC-3'
BRAFR	55	5'-ACCTTCAATGACTTTCTAGTAA-3'

3.1.7. Kullanılan bilgisayar programları

GenomeLab GeXP Genetic Analysis System, DNA sekanslama analiz programı version 10.2, Beckman Coulter, ABD

Microsoft word, ABD

Microsoft excel, ABD

Infinity jel görüntüleme sistemi, Vilber Lourmat, Fransa

SPSS 16.0, ABD

3.1.8. Hasta grubu

1995-2011 tarihleri arasında Kartal Dr. Lutfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tedavi olan ve papiller tiroid karsinomu (PTK) tanısı konulan 51 hasta bu çalışmaya katıldı. Çalışma retrospektif olarak gerçekleştirildi ve gerekli olan etik kurul izni Kartal Dr. Lutfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik kurulundan alındı.

Hastalara ait PTK konulan formalin fikse parafine gömülü tiroid tümör ve çevre dokularından 8-10 mm'lik kesitler alındı ve DNA izolasyonu bu örneklerden gerçekleştirildi. Hastalığın klinik karakteriyle BRAFV600E mutasyonunun korelasyonunun ilişkilendirilmesi amacıyla hastaların cinsiyeti, tanı yaşı, tümör büyüklüğü, tümörün histolojik tipi, tümör kapsül varlığı, tümör kapsül invazyonu, multifokalite, lenf nod metastazı, tiroid dışı invazyon ve tümör dokusu dışı patoloji kayıt altına alındı. Hastalara ait demografik ve klinik bilgiler Çizelge 3.2.'de sunuldu.

Çizelge 3.2. Hastaların demografik ve patolojik tanı verileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	PTK Varyant	Tümör Çapı (cm)	Tümör Nekrozu	Kalsifikasyon	Vasküler İnvazyon	Tümörde Kapsül Varlığı	Tümör Kapsül İnvazyonu	Tiroid Kapsül İnvazyonu	Yumuşak Doku İnvazyonu	Tümör Multi-sentiritesi	Lenf Nod Metastazı	BRAF Mutasyon durumu
1	55	K	Klasik	1.5	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yabanıl
2	33	K	Klasik	1.5	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
3	17	E	Klasik	5	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Var	Var	V600E
4	46	K	Klasik	1.4	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yabanıl
5	44	E	Klasik ve Folküler	1.9	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	V600E
6	53	K	Klasik	1.2	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
7	52	E	Klasik	1.5	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Var	F583Y
8	84	K	Klasik	6	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Var	V600E
9	50	K	Klasik	2	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
10	83	K	Klasik	6	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Var	V600E
11	40	K	Klasik	1.5	Yok	Var	Yok	Var	Var	Var	Var	Var	Var	F583Y

12	18	K	Klasik	3	Yok	Var	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Var	V600E
13	31	K	Klasik	1.1	Yok	Var	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	F583Y
14	57	E	Klasik	2.1	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	V600E
15	34	K	Klasik	1.2	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yabanıl
16	62	E	Klasik	4.2	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
17	63	E	Klasik	2.5	Yok	Var	Var	Var	Bilinmiyor	Var	Var	Yok	Yok	V600E
18	29	K	Klasik	1.3	Yok	Bilinmiyor	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Var	V600E
19	48	K	Foliküler Varyat	2.8	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yabanıl
20	54	K	Foliküler Varyant	4	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yabanıl
21	25	K	Foliküler Varyant	3	Yok	Var	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
22	26	K	Foliküler Varyant	3	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
23	55	K	Foliküler Varyant	7	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
24	59	K	Foliküler Varyant	1.5	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
25	86	K	Foliküler Varyant	5	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
26	45	K	Foliküler Varyant	2.2	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
27	62	K	Foliküler Varyant	3	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
28	34	K	Foliküler Varyant	3	Yok	Var	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Var	Yok	Yabanıl
29	45	K	Foliküler Varyant	2	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
30	47	K	Foliküler Varyant	1.2	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
31	31	K	Foliküler Varyant	2.4	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
32	41	K	Foliküler Varyant	5	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
33	72	E	Foliküler Varyant	4.5	Yok	Var	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl

34	50	K	Foliküler Varyant	2.2	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
35	34	E	Foliküler Varyant	3	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
36	43	K	Foliküler Varyant	2	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
37	34	E	Foliküler Varyant	3.5	Yok	Var	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
38	32	K	Foliküler Varyant	1.2	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
39	35	K	Foliküler Varyant	1.5	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
40	61	K	Foliküler Varyant	6	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Doğrulan amadı
41	40	E	Foliküler Varyant	1.3	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
42	59	K	Foliküler Varyant	4	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
43	41	E	Foliküler Varyant	6.5	Yok	Var	Yok	Var	Değerlendi rilemedi	Değerlendi rilemedi	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
44	55	K	Foliküler Varyant	3.5	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
45	42	E	Foliküler Varyant	3.7	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
46	38	K	Foliküler Varyant	2.7	Yok	Var	Var	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
47	29	K	Foliküler Varyant	3.2	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl
48	48	K	Foliküler Varyant	3	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	V600V
49	61	E	Foliküler Varyant	5.5	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	V600E
50	47	K	Foliküler Varyant	2.5	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yabanıl
51	41	K	Foliküler Varyant	8	Var	Var	Var	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yabanıl

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Parafine gömülü dokudan DNA izolasyonu

Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde papiller tiroid kanser tanısı almış hastalara ait formalin fiske parafine gömülü dokulardan mikrotom ile 10 µm kalınlığında kesitler alınarak steril eppendorf tüplere konuldu. Çalışmaya dahil edilen dokulardan DNA izolasyonu QIAGEN marka DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak üretici firmanın kullanım kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi. QIAGEN marka kit ile yapılan DNA ekstraksiyonu aşağıda belirtilen protokole uygun olarak yapıldı.

1. Öncelikle kesitlerin bulunduğu eppendorf tüpün içine parafini çözmek ve uzaklaştırmak amacıyla 1000 µl ksilen ilave edildi. Örnekler, 10 saniye boyunca kuvvetli bir şekilde vortekslendi ve oda ısısında 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Sıvı üst faz otomatik pipet kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldı.
2. Dokulardaki ksileni ve suyu uzaklaştırmak amacıyla pellet üzerine 1000 µl Absolu etanol eklenip vortekslendi ve 2 dakika oda ısısında 14000 devir/dakikada santrifüj yapıldı. Otomatik pipetle sıvı üst faz ortamdan uzaklaştırıldı.
3. Pelleti kurutmak amacıyla tüp kapakları açık olacak şekilde 10 dakika boyunca bırakıldı.
4. Daha sonra pellet üzerine 180µl buffer ATL ilave edilerek pellet çözüldü. Hücresel proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla üzerine 20µl Proteinaz K eklenerek vortekslendi.
5. Örnekler, parafinin tam erimesi için 56 °C'de Thermo-Shaker 'da 1200 rpm'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra örnekler 90 °C'de 1200 rpm'de tekrar 1 saat inkübe edildi. Vortekslendi.
6. Örneklerin üzerine 200 µl AL buffer eklenip vortekslendi. Sonra üzerine 200 µl etanol ilave edilip vortekslendi.
7. Örnekler filtreli tüplere aktarıldı ve üzerine 500µl AW1 solüsyonundan eklenip 6000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
8. Filtreli tüpün üzerine 500µl AW2 solüsyonundan eklenip 6000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreli tüpler yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.

Membranı tamamen kurutmak için örnekler 1400rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Sonra filtreli tüpler temiz eppendorf tüplerin içerisine yerleştirilip 50µl ATE buffer membranın tam ortasına gelecek şekilde eklendi. Böylelikle DNA'nın yeniden

çözünmesi sağlamandı. Daha sonra 1400g'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen DNA'lar temiz eppendorf tüplerin içerisine aktarıldı.

İzolasyon sonrası örnekler %1'lik agaroz jelde görüntülenerek kontrol edildi.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu çift sarmallı DNA'nın hedef dizilerine oligonükleotid primerler kullanarak bağlanması ve uzaması esasına dayanan *in vitro* DNA klonlanma yöntemidir (Temizkan ve Arda 2008). Bir PCR döngüsü denatürasyon, bağlanma, uzama olmak üzere üç aşamadan oluşur. Tekrarlanan denatürasyonun ardından primerler kalıp DNA'ya bağlanır ve polimerizasyon başlar. Bu da DNA parçalarının üssel artışını sağlar.

Denatürasyon aşamasında çift iplikli DNA açılır. Daha sonra ortamın ısısı, primerlerin tek iplikli DNA'ya bağlanabileceği özgül sıcaklık değerine düşürülerek primerlerin ilgili DNA dizilerine bağlanması sağlanır. Son aşama olan uzamada da ilgili primerler kullanılarak çoğaltılması istenilen DNA dizilerinin 5' →3' yönünde sentezi gerçekleştirilir (Schochetman ve ark. 1988).

BRAF V600E mutasyonunun saptanması amacıyla BRAF geninin 15. ekzonunu içeren gen bölgesinin amplifikasyonu hotstart PZR yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu amaçla toplam 25 µl hacimlik reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı

20 pmol ileri ve geri primer,

0,1-1 µg kalıp DNA,

12,5 µl hotstart mix

ve H₂O içermektedir.

Bu işlem 0,2 ml'lik eppendorf tüpünde ve buz içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler ısı-döngü cihazına yerleştirilerek, aşağıda belirtilen program uygulandı.

95°C'de 15 dk öndenatürasyon	} 40 döngü
94°C'de 30 saniye denatürasyon	
56 °C'de 30 saniye bağlanma	
72°C'de 30 saniye uzama	

72°C’de 7 dakika son uzama olarak gerçekleştirildi.

PZR reaksiyonu sonrasında örnekler %2’lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz, kırmızı alg türü olan *Agar agar*’dan izole edilmiş bir polisakkarittir (Temizkan ve Arda 2008). Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin tanımı, ayrımı, saflaştırılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Somma ve Querci, 2016). Agaroz jele DNA parçacıkları yükleri, büyüklükleri ve biçimlerine göre hareket ederler. Küçük DNA fragmanları için yüksek agaroz jel konsantrasyonu, büyük DNA fragmanları için düşük agaroz jel konsantrasyonu ile DNA parçalarının ayrılması sağlanmaktadır. DNA’nın jelde görünür hale gelebilmesi için EtBr kullanılmaktadır (Temizkan ve Arda 2008).

Yapılan bu çalışmada PZR ile çoğaltılan ürünlerin doğruluğunun kontrolü için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Bu amaçla 50 ml 1 X TBE içerisinde 1 gr agaroz ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. 10mg/ml konsantrasyonu olan EtBr’den 2,5 µl ilave edilerek jel düzeneğine uygun taraklar takılarak döküldü. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılarak içerisinde 1 X TBE olan tanka yerleştirildi. Kuyucuklara belirteç DNA ve örnekler yükleme boyasıyla karıştırılarak yüklendi. Yüklenen DNA örnekleri 30 dakika 120 volt sabit voltajda koşuruldu ve oluşan DNA bantları UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekildi. 267 bç’lik amplifikasyon ürünlerinin varlığı DNA belirteç ile kıyaslanarak kontrol edildi.

3.2.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması

Dizi analizi reaksiyonu öncesi PZR karışımındaki dNTP, primer gibi kimyasalların ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla PEG ile çöktürme yöntemi kullanılarak saflaştırıldı (Rosenthal ve ark. 1993).

PZR ürünlerinin üzerine 1:1 oranında %26’lık PEG çözeltisi ilave edildikten sonra kuvvetlice vortekslenip oda ısısında 20 dakika bekletildi. Ardından oda ısısında 20 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 90 µl %70’lik soğuk etil alkol ilave edildi ve 10 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi. Pellet 20 µl dH₂O ile çözdürüldü. 4 µl alınarak %2’ik agaroz jelde görüntülendi.

3.2.5. DNA dizileme reaksiyonu

DNA dizilemesi, bir DNA molekülünün baz dizisinin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir yöntemdir. DNA dizileme; adli tıp tanımlamaları, mikrobiyal hastalıklara neden olan mikroorganizmaların saptanması, genetik bozukluklara yol açan DNA baz değişimlerinin belirlenmesi gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. DNA dizi analizi için geliştirilen klasik iki yöntem vardır: Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi ile Fred Sanger ve Coulson'un zincir sonlama yöntemi. DNA dizi analizinde en sık kullanılan klasik yöntem; Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği zincir sonlama yöntemidir. Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır. Her iki yöntemde de dizi analizi yapılacak olan DNA'ya dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Reaksiyonların her birinde az miktarda modifiye nükleotid kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir. Reaksiyon sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde görüntülenir.

Kimyasal ve enzimatik yöntemler dışında otomatik dizi analizi sistemleri de kullanılmaktadır. Otomatik dizi analizinde fotokrom işaretli nükleotidler kullanılır. Tüm dideoksi işaretli ddNTP'ler tek bir reaksiyon tüpü içerisine konulur. Reaksiyon karışımı kapiller jele yüklenir, iki farklı floresans detektörle bazlar tanımlanır.

Yapılan bu çalışmada, BRAF V600E mutasyonun saptanması amacıyla, ilgili mutasyonu içeren BRAF geni 15. ekzonuna ait DNA dizilerinin tespiti için Sanger metoduna dayanan otomatik dizi analiz yöntemi kullanıldı. Bu amaçla dizileme reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği üzere hazırlandı.

10 µl'lik reaksiyon karışımı:

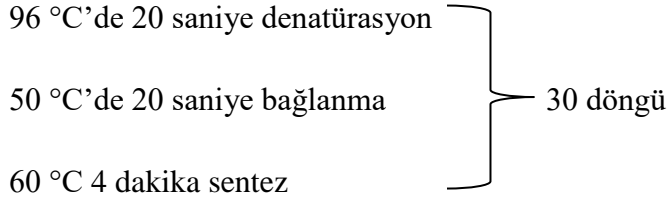
35-50 ng Saflaştırılmış PZR ürünü

1.5 µl dizileme reaksiyon karışımı (Sequencing Mix)

5 pmol primer (ileri veya geri)

dH₂O içermektedir.

Bu işlem 0.2 ml'lik eppendorf tüplerinde ve buz içerisinde gerçekleştirildi. Tüpler ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen ısı-döngü programı uygulandı.



3.2.6. DNA dizi analizi örneklerinin çöktürülmesi (etanol presipitasyonu)

Dizileme reaksiyonu sonrası presipitasyon üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu tüpleri içerisinde bulunan reaksiyon ürünleri 0.5 ml'lik steril eppendorf tüplerine aktarıldı. Her bir örneğin üzerine hazırlanan durdurma solüsyonundan 5µl. ve soğuk absolü etanoldan 60 µl ilave edilip vortekslendi. +4 °C'de 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırıldı. Pellet üzerine %70'lik soğuk etanoldan 90 µl ilave edildi ve +4°C'de 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra örnekler 10 dakika kurumaya bırakıldı. Örnekler, otomatik dizi analizi cihazına yüklenene kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.7. Kapiller elektroforez için örneklerin cihaza yüklenmesi

Presipite dizi analizi ürünleri formamid ve üre içeren 30 µl SLS tamponu içerisinde çözüldürülerek üzerine buharlaşmayı önlemek amacıyla bir damla mineral yağ eklendi ve cihaza yüklendi. Kapiller elektroforez üretici firma tarafından belirtilen koşullara doğrultusunda Backman Coulter GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (ABD) marka otomatik dizi analizi cihazında gerçekleştirildi.

3.2.8. DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

Elde edilen dizi analizi sonuçları GenomeLab GeXP Genetic Analysis System Version 10.2 DNA dizi analizi programı kullanılarak değerlendirildi. Hastalara ait sağlıklı ve tümör dokularından elde edilen DNA dizileri değerlendirilip, GENE BANK'ta bulunan HM459603.1 nolu gen dizisi ile karşılaştırılarak ilgili gen bölgesinde bulunan BRAF F583Y, V600E, ve BRAF V600V mutasyonları tespit edildi.

3.2.9. İstatistiksel analiz

Yapılan çalışma kapsamında, hastalara ait demografik ve klinik bilgiler BRAF mutasyon durumlarına göre SPSS 15.0 bilgisayar programı kullanılarak karşılaştırıldı. Yaş, tümör çapı gibi niteliksel veriler student t-testi kullanılarak karşılaştırılırken, tümör kapsül varlığı vasküler invazyon gibi niceliksel veriler Pearson ki-kare testi kullanılarak

karşılaştırıldı. “p” değerinin 0,05’den küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hasta Grubu

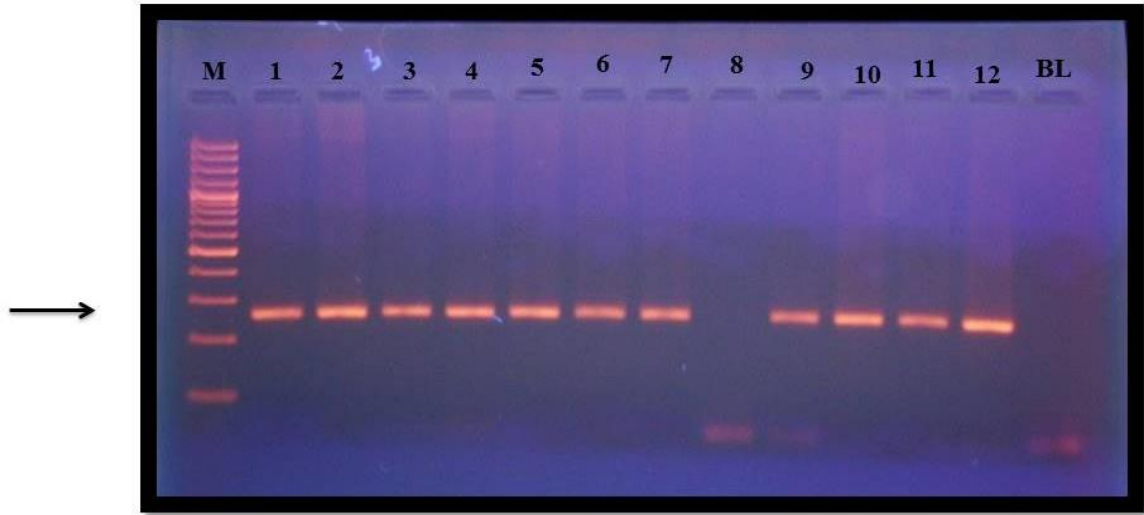
Çalışmaya, klinik ve patolojik tanısı konulmuş 51 hasta dahil edilmiş olup bu hastaların 18’i klasik varyant, 33’ü foliküler varyanttır. Hastaların 38’i kadın ve 13’ü erkektir. Çalışmaya alınan hastalara ait demografik ve patolojik tanı kriterlerine ilişkin veriler detaylı olarak daha önce tablo 3.2’de sunulmuştur. Bununla beraber, demografik ve patolojik tanı verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

4.2. PZR Sonuçları

Sağlıklı doku ve hasta dokulardan elde edilen DNA örnekleri yöntem 3.2.2’de belirtildiği gibi amplifiye edilmiştir. Tüm örneklerde 266 bç olan amplifikasyon örnekleri agaroz jel elektroforezinde marker DNA ile kontrol edilmiştir. Negatif kontrol örneğinde amplifikasyon görülmemiştir (Şekil 4.1.).

Çizelge 4.1. Papiller tiroid karsinomu hastalarında demografik ve patolojik tanı verilerin karşılaştırılması

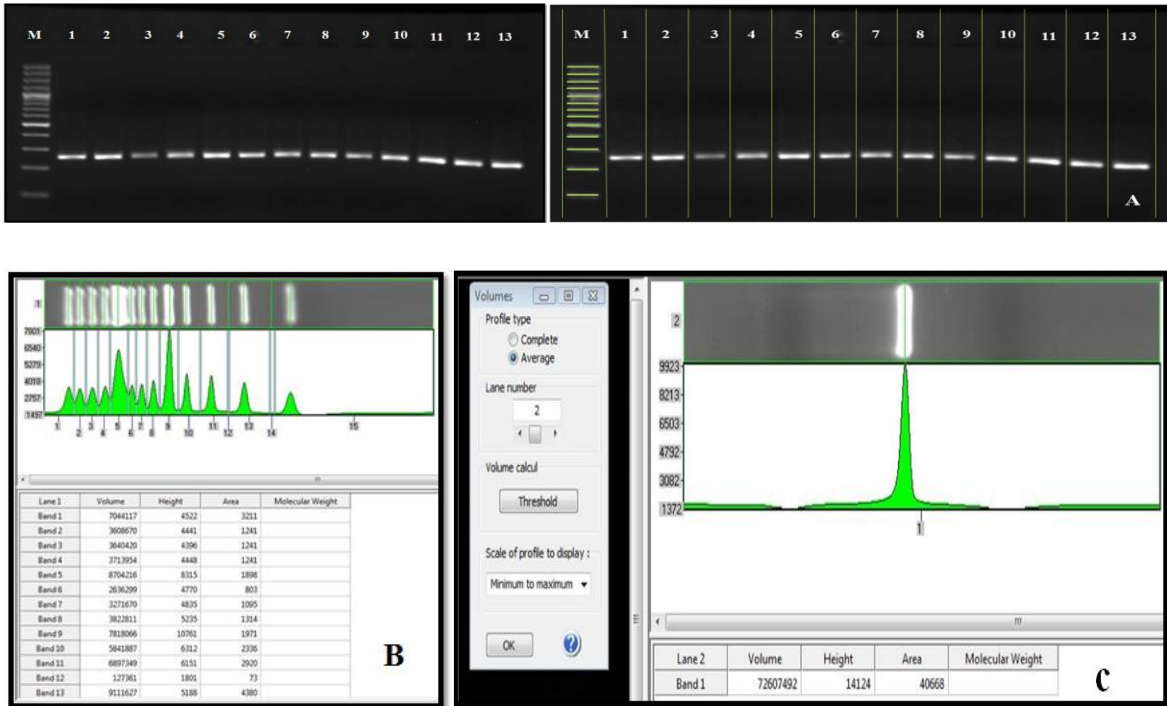
Tümör Tipi	Klasik Varyant n=18	Foliküler Varyant n=33	P değeri
Yaş	47,65±17,54	47,85±14,21	0,483
Cinsiyet n(%)	6 erkek(33,53) 12kadın(66,47)	6 erkek(18,18) 27 kadın(81,82)	0,223
Tümör Çapı (cm)	2,40±1,52	3,41±1,64	0,010
Vasküler invazyon n(%)	yok:14(77,78) var:4(22,22)	yok:31(93,94) var:2(6,06)	0,087
Tümörde kapsül varlığı n(%)	yok:11(61,11) var:7(38,89)	yok:4(12,12) var:29(87,88)	0,002
Tümörde kapsül invazyonu n(%)	yok:15(83,33) var:3(16,67)	yok:22(66,67) var:11(33,33)	0,202
Tiroid kapsül invazyonu n(%)	yok:9(50,00) var:9(50,00)	yok:32(96,97) var:1(3,03)	0,00005
Yumuşak doku invazyonu n(%)	yok:8(44,44) var:10(55,56)	yok:32(96,97) var:1(3,03)	0,00001
Tümör Multisentiritesi n(%)	yok:14(77,78) var:4(22,22)	yok:30(90,91) var:3(9,09)	0,193
Tümörde lenf nod metastazi n(%)	yok:10(55,56) var:8(44,44)	yok:33(100,00) var:0(0)	0,000003



Şekil 4.1. PZR sonuçları M: Marker (100 bç), BL: Negatif kontrol, 1.2.3.4.5.6.7.9.10.11.12 nolu hasta örneklerine ait 266 bç'lik PZR ürünleri

4.3. Saflaştırma Sonuçları

Yöntem 3.2.4.'te belirtildiği şekilde saflaştırılan PZR örnekleri %2'lik jel elektroforezinin ardından fotodansimetrik olarak değerlendirildi. Örnek konsantrasyonu 25 ng/µl-65 ng/µl arasında olacak şekilde hesaplandı (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. PZR saflaştırma sonuçları A; %2'lik agaroz jelin fotodansimetrik olarak görüntülenmesi, B; marker bantlarının değerlendirilmesi, C; 1. kuyudaki örneğin değerlendirilmesi

4.4.DNA Dizi Analizi Sonuçları

Saflaştırılan sağlıklı ve hasta doku örnekleri yöntem 3.2.7.'deki belirtildiği gibi kapiller elektroforez için cihaza yüklendi. Cihazdan elde edilen dizi analizi sonuçları GenomeLab GeXP Genetic Analysis System Version 10.2 DNA dizi analizi programı kullanılarak değerlendirildi. PTK hastalarına ait tümör dokularından elde edilen DNA dizi analizi sonuçları şekil 4.3'te gösterilmiştir.

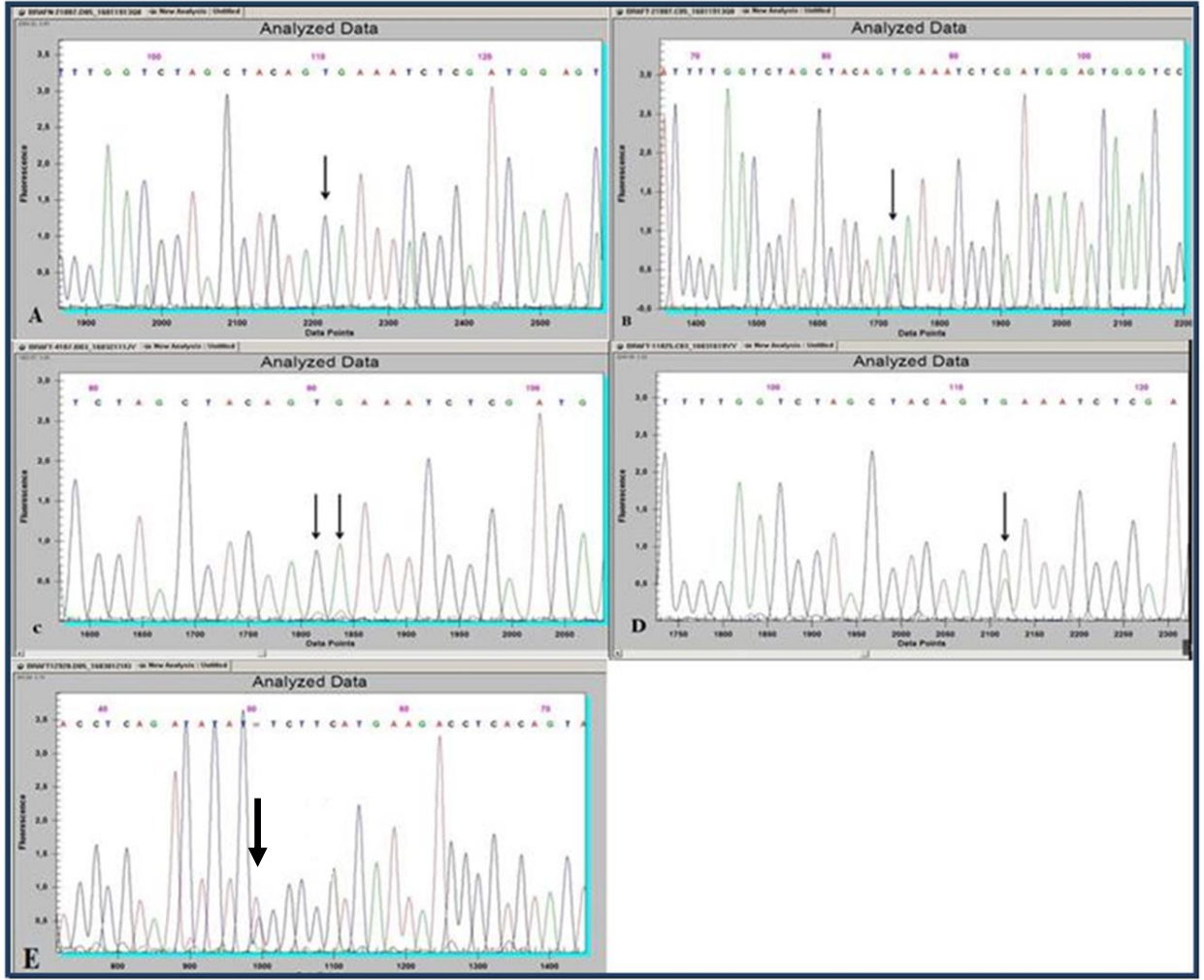
Yapılan bu çalışmada, 7 Klasik varyant PTK ve 1 foliküler varyant PTK hastasına ait tümör dokusunda BRAF proteini üzerinde 600. pozisyondaki valin aminoasitini kodlayan kodon üzerinde valin glutamat dönüşümüne neden olan timin adenin (gtg→gag; BRAFV600E) baz yerdeğişimi saptandı. Yine bir klasik varyant PTK hastasına ait tümör dokusunda BRAF V600E mutasyonuna neden olan gtg→gaa baz değişimi belirlendi. Ayrıca bir foliküler varyant PTK hastasında BRAF proteininde 600. pozisyonda yer alan valin aminoasitini kodlayan kodanda herhangi bir aminoasit yerdeğişimine neden olmayan guaninden adenine (gtg→gta) baz değişimi saptandı. Bununla beraber 3 klasik varyant PTK olgusuna ait tümör dokularında BRAF proteininde 583. pozisyonda fenilalanin kodlayan kodonda fenilalanin tirozin yerdeğişimine (ttt→tat; F583Y) neden olan timin-adenin baz değişimi tespit edildi.

4.4.1. Epidemiyolojik Veriler

Çalışmaya alınan 51 PTK hastasına ait tümör ve çevre dokularında BRAF geni 15. ekzon mutasyonları DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Toplam 51 tümör dokusunun 13'ünde (%25,4) BRAF gen mutasyonları tespit edildi. Mutasyon dağılımı alt varyantlar açısından değerlendirildiğinde 18 klasik varyant PTK hastasının 11'inde (% 61,11) BRAF gen mutasyonu bulundu. Bu mutasyonların %44,4'ü BRAF V600E mutasyonu, %16,7' si ise BRAF F583Y mutasyonudur. Bununla beraber, 33 foliküler varyant PTK olgusunda ise 1'i sessiz mutasyon olmak üzere 2 mutasyon (%6,10) tespit edilmiştir. Bulunan mutasyonlara göre hastalara ait demografik bilgilerin ve patolojik bulguların karşılaştırılması çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'te özetlenmiştir.

BRAF mutasyon dağılımı açısından çizelge 4.2'deki veriler incelendiğinde; BRAF mutasyonu taşıyan erkek bireylerin sayısının (%50) yabancı tip bireylere göre daha yüksek

olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, mutasyon tespit edilen nodüler dokular, yabancı tip



Şekil 4.3. PTK hastalarına ait tümör dokularından elde edilen DNA dizi analizi sonuçları A; BRAF V600E yabancı tip dokuya ait dizi ana, B; BRAF V600E mutasyonu (gtg→gag) içeren dokuya ait DNA dizi analizi sonucu C; BRAF V600E mutasyonu, (gtg→gaa) içeren dokuya ait DNA dizi analizi sonucu, D; BRAF V600V mutasyonu, (gtg→gta) içeren dokuya ait DNA dizi analizi sonucu, E; BRAF F583Y mutasyonu (ttt→tat) içeren dokuya ait DNA dizi analizi sonucu

nodüler dokularla karşılaştırıldıklarında çoğunda (%53,60) tümörde kapsül oluşumu gözlenmediği tespit edilmiştir (p=0,022). Ayrıca mutasyon taşıyan tümör dokularında tiroid dışı doku invazyonunun (%58,3; p=0,00039), tümör multisentiritesinin (%53,30; p=0,024) ve lenf nod metastazının (%66,70; p<0,0001) daha sık olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.2. Papiller tiroid karsinom tanısı alan hastalarda BRAF V600E mutasyon dağılımına göre demografik ve klinik verilerin karşılaştırılması

	Braf mtasyon negatif n=39	Braf mutasyon pozitif n=12	P değeri
Yaş	48,18±14,58	43,12±17,16	0,138
Cinsiyet n(%)	7 erkek (17,9) 32 kadın (82,1)	6 erkek (50,00) 6 kadın (50,00)	<u>0,026</u>
Tümör Çapı (cm)	3,1±1,97	3,09±1,66	0,49
Vasküler invazyon n(%)	yok: 36 (92,30) var: 3 (7,70)	yok: 9 (75) var: 3 (25)	0,104
Tümörde kapsül varlığı n(%)	yok: 8 (20,50) var: 31 (79,50)	yok: 7 (53,80) var: 6 (46,20)	<u>0,022</u>
Tümörde kapsül invazyonu n(%)	yok: 28 (71,8) var: 11(28,2)	yok: 9 (75,0) var: 3 (25,0)	0,828
Tiroid kapsül invazyonu n(%)	yok: 36 (88,24) var: 3 (11,76)	yok: 5 (64,71) var: 7 (35,29)	<u>0,00011</u>
Yumuşak doku invazyonu n(%)	yok: 35 (89,70) var: 4 (10,30)	yok: 5 (41,70) var: 7 (58,30)	<u>0,00039</u>
Tümör Multisentiritesi n(%)	yok: 36 (92,30) var: 3 (7,70)	yok: 8 (66,70) var: 4 (33,30)	<u>0,024</u>
Tümörde lenf nod metastazı n(%)	yok: 39 (100,00) var: 0 (0,00)	yok: 4 (33,30) var: 8 (66,70)	<u><0,0001</u>

Çizelge 4.3. Papiller tiroid karsinom klasik varyant tanısı alan hastalarda demografik ve klinik verilerin karşılaştırılması

	Braf mutasyon negatif n=7	Braf mutasyon pozitif n=11	P değeri
Yaş	51,75±21,67	42,22±14,99	0,138
Cinsiyet n (%)	1 erkek (14,30) 6 kadın (85,70)	5 erkek (45,50) 6 kadın (55,50)	0,171
Tümör Çapı (cm)	2,24±1,60	2,81±1,78	0,241
Vasküler invazyon (%)	yok: 6 (85,70) var: 1 (14,30)	yok: 8 (72,70) var: 3 (27,30)	0,518
Tümörde kapsül varlığı (%)	yok: 4 (57,10) var: 3 (42,90)	yok: 7 (63,60) var: 4 (36,40)	0,783
Tümörde kapsül invazyonu (%)	yok: 7 (100,00) var: 0 (0,00)	yok: 8 (72,70) var: 3 (27,30)	0,130
Tiroid kapsül invazyonu (%)	yok: 5 (71,40) var: 2 (28,60)	yok: 4 (36,40) var: 7 (63,6)	0,147
Yumuşak doku invazyonu (%)	yok: 4 (57,10) var: 3 (42,90)	yok: 4 (36,40) var: 7 (63,6)	0,138
Tümör Multisentiritesi (%)	yok: 7 (100,00) var: 0 (0,00)	yok: 7 (63,60) var: 4 (36,40)	<u>0,070</u>
Tümörde lenf nod metastazı (%)	yok: 7 (100,00) var: 0 (0,00)	yok: 3 (27,30) var: 8 (72,70)	<u>0,002</u>

BRAF mutasyon dağılımı PTK'larının alt varyantları açısından değerlendirildiğinde, klasik varyant PTK tanısı konulan olgulara ait BRAF mutasyonu pozitif tümör dokularında tiroid kapsül invazyonu, yabancı tip bireylere ait tümör dokularlarından 2 kat daha fazla görülmesine karşın istatistiksel olarak bir farklılık tespit edilememiştir ($p=0,138$). Yine, mutasyon pozitif bireylerde yumuşak tiroid dışı yumuşak doku invazyonu daha sık olduğunun gözlemlenmesine karşın istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,138$). Bunun nedeni büyük bir olasılıkla örnek sayısının yetersiz olmasıdır. Diğer taraftan tümör örnekleri tümör multisentiritesi açısından değerlendirildiğinde, mutasyon pozitif bireylerin %36,4'ünde birden fazla tümör odağı tespit edilirken, mutasyon negatif bireylerin hepsinde tümör tek odaklıdır ($p=0,070$). Yine BRAF mutasyonlarından birini taşıyan bireylerin %72,7'sinde lenf nod metatazı gözlemlenirken, mutasyon negatif bireylerin hiçbirinde lenf nod metatazı gözlemlenmemiştir ($p=0,002$) (Çizelge 4.3).

Foliküler varyant PTK olgularının sadece 2'sinde BRAF mutasyonları tespit edilmiştir. Bunlardan biri BRAF V600E mutasyonu ve diğeri ise sessiz V600V mutasyonudur. Dolayısıyla, bu olgularda tespit edilen mutasyon sayısının yetersiz olması nedeniyle, demografik ve patolojik tanı bulguları ile mutasyonlar arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır (Çizelge 4.4). Bununla beraber, PTK alt varyantlarında mutasyon dağılımı karşılaştırıldığında klasik tip varyantlarda gözlemlenen mutasyon oranınının (%61,1) foliküler varyantlarda gözlemlenen mutasyon oranından (%6,1) on kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0,00001$)(Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4. Papiller tiroid karsinom foliküler varyant tanısı alan hastalarda demografik ve klinik verilerin karşılaştırılması

	Braf mutasyon negatif n=31	Braf mutasyon pozitif n=2	P değeri
Yaş	47,35±14,51	43,00±12,53	0,166
Cinsiyet n (%)	6 erkek (25,00) 25 kadın (75,00)	1 erkek (50,00) 1 kadın (50,00)	0,385
Tümör Çapı (cm)	3,49±1,61	3,74±2,36	0,373
Vasküler invazyon (%)	yok: 29 (93,54) var: 2 (6,46)	yok: 2 (100,00) var: 0 (0,00)	0,701
Tümörde kapsül varlığı (%)	yok: 4(13,90) var: 27(87,10)	yok: 0 (0,00) var: 2(100,00)	0,191
Tümörde kapsül invazyonu (%)	yok: 20 (64,50) var: 11 (35,50)	yok: 2 (100,00) var: 0 (0,00)	0,278
Tiroid kapsül invazyonu (%)	yok: 30 (96,80) var: 1 (3,20)	yok: 2 (100,00) var: 0 (0,00)	0,790
Yumuşak doku invazyonu (%)	yok: 30 (96,80) var: 1(3,20)	yok: 2 (100,00) var: 0 (0,00)	0,790
Tümör Multisentiritesi (%)	yok: 28 (90,30) var: 3 (9,70)	yok: 2 (100,00) var: 0 (0,00)	0,632
Tümörde lenf nod metatazı (%)	yok: 31 (100,00) var: 0 (0,00)	yok: 2 (100,00) var: 0 (0,00)	1,00

Çizelge 4.5. BRAF V600E mutasyonunun altvaryantlardaki dağılımı.

BRAFV600E Mutasyon	Klasik Varyant n(%)	Foliküler Varyant n(%)	P değeri
negatif	7(38,9)	31(93,90)	<u>≤0,0001</u>
pozitif	11(61,1)	2(6,10)	

5. TARTIŞMA

Bu çalışma türk toplumunda PTK olgularında BRAF V600E mutasyon sıklığının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Günümüzde, literatürde BRAF V600E mutasyonunun; tekrarlayan papiller tiroid karsinomları, lenf düğümü metastazları ve ekstratiroidal invazyon ile ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Liu D ve ark. 2012). Ancak, ülkemiz iyot eksik, endemik guatr bölgesi olmasına rağmen (Erdoğan G ve ark. 2002) ve buna bağlı olarak ülkemizde nodüler guatr olgularına sık rastlanılmasına karşın papiller tiroid karsinomlarının moleküler patogenizine ilişkin çalışma sayısı oldukça azdır. Tezin genel bilgiler kısmında da belirtildiği üzere, literatürde Türk toplumunda PTK hastalarında BRAF V600E mutasyon insidansının tespitine ilişkin üç çalışma yer almaktadır ve BRAF mutasyon insidansı %39-89 arasında değişmektedir (Dağlar-Aday ve ark. 2013, Kurt ve ark. 2012, Kurtulmuş ve ark. 2012).

Yapılan bu tez çalışmasında, 51 PTK olgusuna ait nodüler ve çevre dokularda BRAF geni 15. ekzonu üzerinde yeralan mutasyonlar DNA dizi analizi (sanger metodu) ile taranmıştır. Tespit edilen mutasyonlar ile yaş cinsiyet gibi demografik veriler karşılaştırılmıştır. Literatürle uyumlu olarak braf mutasyon pozitif bireyler ile mutasyon negatif bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (p 0,138) (Kurtulmuş ve ark. 2012). Mutasyon dağılımı cinsiyet açısından incelendiğinde, BRAF mutasyonu taşıyan bireylerin yarısının (6/12; %50) erkek olduğu saptanmıştır. Bu oran Kurtulmuş ve ark.'larınca (2012) 109 PTK olgusu üzerinde yapılan çalışmayla uyumlu olmakta beraber (13/21; % 61,90), Dağlar- Aday ve ark. (2013) tarafından Türk toplumunda 108 vaka üzerinde yapılan çalışmayla örtüşmemektedir. Bunun iki nedeni olabilir. Birincisi, hasta grubundaki mutasyonu taşıyan örnek sayısının az olması nedeniyle, mutasyonun görülme sıklığı tam olarak saptanamamış olabilir. İkinci neden ise mutasyon oranının artışı üzerine coğrafi etki sözkonusu olabilir. Buna örnek olarak Frasca ve ark.'larının (2008) Scilyada 393 tiroid kanser hastasında yaptıkları çalışmada yaş, cinsiyet ve iyot alımı ile BRAF V600E mutasyon varlığı arasında ilişki saptayamazken, hastaların yaşadıkları bölge ile mutasyon varlığı arasında pozitif bir korelasyon saptamışlardır. Bu hastalar arasında yaş, cinsiyet ve iyot alımı açısından farklılık bulunmaması nedeniyle, çevresel karsinojenlerin etkili olabileceği öne sürülmüştür. Dolayısıyla, Türk popülasyonunda daha büyük bir hasta popülasyonunda yapılacak bir çalışmayla bu verilerin doğrulanması gerektiği öngörülmektedir.

PTK'larında tümör agresivitesinin en belirgin karakteristikleri lenf nod metazltazları ve tiroid dışı yumuşak doku invazyonlarıdır (Xing M 2005). Yapılan bu çalışmada yine literatürle uyumlu olarak mutasyon pozitif bireylerde lenf nod metaztazı (12/8; % 66,7) ve yumuşak doku invazyonu (7/12, %58,70) daha yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$; $p=0,00039$). Yine, Kurtulmuş ve ark.'larınca (2012) yapılan çalışmaya uyumlu bir şekilde tümör çapından bağımsız olarak tiroid kapsül invazyon ve tümör multisentiritesi BRAF mutasyonları ile ilişkili bulunmuştur ($p=0,024$; $p= 0,00011$). Ancak, yapılan bu çalışmada BRAF V600E mutasyonlarının en sık görüldüğü klasik varyant PTK olgularında (yaklaşık %45; (Xing M. 2013)), lenf nod metaztazı ile BRAF mutasyonları arasındaki korelasyon teyit edilirken ($p=0,002$); mutasyon pozitif tümör örneklerinde yumuşak doku invazyon görülme sıklığı daha yüksek olmasına rağmen (Braf (+):%63,6; Braf(-): %42,90) istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilememiştir ($p=0,138$). Bunun nedeni çalışma örnek sayısının az olmasıdır.

Literatürde yer alan makalelere bakıldığında; klasik varyat mikro papiller tiroid karsinomlarında (KVMPTK) lenf nod metaztazının BRAF V600E mutasyonu ile birlikte tümörün daha agresif olduğu önesürülmektedir (Kurtulmuş ve ark. 2012). Son yıllarda Kim ve ark. (2012) tarafından BRAF V600E mutasyonlarının prognostik faktörler ve kötü klinik prognoz ile ilişkisi üzerine yapılan bir meta analiz çalışmasında, BRAF V600E mutasyonunun papiller tiroid kanserlerinde kötü klinik prognoz ve yüksek riskli klinik-patolojik faktörlerle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada elde edilen bulgular literatürdeki mevcut çalışmaları desteklemektedir.

Papiller tiroid kanserlerinin altvaryantları arasında BRAF mutasyonlarının dağılımına bakıldığında, yapılan bu çalışmada klasik varyant PTK olgularında 11/17 (% 61,1) iken foliküler varyant PTK olgularında 2/33 (% 6,1) olarak tespit edilmiştir. Türk toplumunda PTK olgularında alt varyantlara göre BRAF V600E mutasyon dağılımı sadece Dağlar- Aday ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir. Söz konusu bu çalışmada, klasik varyant PTK olgularının % 63,9'unda BRAF V600E mutasyon varlığı bildirirken; foliküler varyant PTK olgularının %30,6'sında BRAF V600E mutasyon varlığı saptanmıştır. Literatürde yer alan derlemelerde klasik varyant olguların yaklaşık %45'inde BRAF mutasyonu saptadığı belirtilirken bu oranın foliküler varyant PTK olgularındayaklaşık %15 olduğu belirtilmiştir (Xing M, 2013). Dolayısıyla, yapılan bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular bir kısım literatürle uyumlu iken, Dağlar- Aday ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmayla örtüşmemektedir.

Literatürde, foliküler varyant PTK'larında BRAF V600E mutasyon oranları arasındaki farklılıkların nedeni bu varyantın klinik-patolojik karakterlerinden kaynaklanabilir. Bu hastalığın hibrid bir hastalık mı yoksa iki kanser türünün karışımı mı olduğu günümüzde halen tartışma konusudur. Bunun nedeni, foliküler varyant PTK, folikül tiroid karsinomlarından (FTK) daha düşük oranda mortaliteye ve uzak metastazlara sahip olma özelliği gösterirken, klasik varyant PTK'larından daha yüksek oranda mortalite ve uzak metastazlara sahiptir. Klasik varyant PTKlarla karşılaştırıldığında, foliküler varyant PTK'larda lenf nod metastazı görülme ve tiroid dışı yumuşak doku invazyon görülme oranı düşüktür ancak FTK'lardan yüksektir (Yu XM ve ark. 2006). Hastalığın klasik varyant nükleer karakteristiğiyle beraber foliküler paterne sahip olması patolojik açıdan hastalığın hibrid olabileceğine işaret ederken; hastalığın heterojen karakteristiği ve mutasyon profili hastalığın bir karışım olabileceğine işaret etmektedir (Daniels GH, 2016). Lui J ve ark. 2007'de yaptıkları bir çalışmada foliküler varyant PTK olgularını infiltratif ve kapsüllü olmak üzere iki temel sınıfa ayırmıştır. İnfiltratif foliküler varyant genel olarak klasik varyant gibi daha çok lenf nod metastazı ve tiroid dışı invazyon karakteristiklerine sahipken; kapsüle sahip foliküler varyant kanser hücreleri daha çok FTK karsinomları gibi davranmaktadır. İnfiltratif foliküler varyant PTK'lar daha çok BRAF V600E mutasyonu taşıırken; Enkapsüle olanlar daha çok RAS mutasyonları taşımaktadır. Aslında klasik varyant PTK'larda RAS mutasyonları görülmez ve RAS mutasyonları FTK'ların tipik karakteristik bir özelliğidir (Xing M, 2013). Yaptığımız bu çalışmada foliküler varyant PTK örneklerinin hiçbiri lenf nod metastazına sahip değildi ve sadece bir olguda tiroid dışı yumuşak doku invazyonu mevcuttu. Dolayısıyla, yukarıdaki bilgiler ışığında foliküler varyant PTK örneklerimizde BRAF V600E mutasyon sıklığının uyumlu olduğunu düşünmekteyiz. Bununla beraber, Dağlar- Aday ve ark. (2013) yayınladıkları makalede papiller tiroid karsinomların altvaryantlar ile BRAFV600E mutasyonunun ilişkisini gösteren bir çizelge veya bilgi paylaşmadıkları için, bu yayımla verilerimizi kıyaslamamızın bir imkanı yoktur.

Bununla beraber yapılan bu çalışmada BRAF V600E mutasyonu haricinde iki farklı mutasyon daha tespit edilmiştir. Bunlardan birisi F583Y, diğeri ise V600V mutasyonudur. Literatürde F583Y mutasyonuna ait bir veri yer almamaktadır. Yalnız, Amerikan Sağlık Enstitüsünün veritabanının klinik varyasyonlar bölümünde (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/40385) F583L mutasyonunun RASopatilerde tespit edildiği ancak klinik önemine dair bir veri bulunmadığı belirtilmektedir. Bununla beraber Hussain MR ve ark. (2014) tarafından sunulan bir derlemede, melanoma örneklerinde F583F mutasyonu

bulunduğu belirtilmektedir. BRAF proteininin aktivasyon loop'u 596-600. aminoasitler arasında yer almaktadır (Wan PTC ve ark, 2004) . Dolayısıyla mutasyonun BRAF yapısal aktivasyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını söylemek oldukça zordur. Dolayısıyla, mutasyonun yapısal aktiviteye neden olup olmadığına dair fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada saptanan diğer mutasyon BRAF V600V, anaplastik tiroid kanserlerinde ilk olarak Güney Kore popülasyonunda yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (Park JH ve ark 2014). Yine aynı çalışmada, ilgili mutasyonun biri malign melanoma diğer de kolorektal karsinoma örnekleri üzerine yapılan iki çalışmada tespit edildiği belirtilmektedir. Ancak mutasyonun klinik önemine ilişkin bir veri bulunmamaktadır (Park JH ve ark 2014).

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada, 51 tümör dokusunun 13'ünde (%25,4) BRAF gen mutasyonları tespit edilmiştir. Klasik varyan PTK olgularının ise %44,4'ünde BRAF V600E mutasyonu, %16,6'sında ise F583Y mutasyonu tespit edilmiştir. Literatürde mevcut veriler ışığında BRAF V600E mutasyonunun hastalığın kötü prognoz ile ilişkili olduğu göz önüne alırsa, hastalığın prognozunun takibi açısından Türk toplumunda daha büyük hasta popülasyonlarında yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, foliküler varyant PTK'ların agresifliğini belirlemek ve ayırıcı tanısında kullanılmak üzere bu hasta grubunda BRAF V600E mutasyonu haricinde RAS mutasyonlarının incelenmesine ihtiyaç vardır.

6.KAYNAKLAR

- Adaş G, Adaş M, Özülker F, Akçakaya A (2012). Tiroid Kanserleri. Okmeydanı Tıp Dergisi, 28:26-34.
- Akçakaya A, Koç B, Ferhatoğlu F (2012). Tiroid Anatomisi ve Cerrahi Yaklaşım. Ok Meydanı Tıp Dergisi, 28:1-9.
- Anonim (2011). Molecular Pathogenesis of Thyroid Cancer. http://asuragen.com/ClinicalLab/images/PDF/Molecular_pathogenesis_of_Thyroid_Cancer_White_Paper_Asuragen.pdf (erişim tarihi, 14.06.2016).
- Arslan M, Delibaşı T, Şahin M (2011). Thyroid Cancer. İÇ HASTALIKLARI Dergisi, 18: 41-48.
- Au AYM, McBride C, Wilhelm Jr KG, Koenig RJ, Speller B, Cheung L, Messina M, Wentworth J, Tasevski V, Learoyd D, Robinson BG, Clifton-Bligh RJ (2006). PAX8-Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR Gamma) Disrupts Normal PAX8 or PPAR Gamma Transcriptional Function and Stimulates Follicular Thyroid Cell Growth. Endocrinology, 147:367-76.
- Barbaro D, Incensati RB, Materazzi G, Boni G, Grosso M, Panicucci E, Lapi P, Pasquini C, Miccoli P(2014). The BRAF V600E Mutation in Papillary Thyroid Cancer with Positive or Suspected pre-surgical Cytological Finding is not Associated with Advanced Stages or Worse Prognosis. Endocrine, 45:462-468.
- Boila AD, Petrucci MD, Gazzo S, Paşcanu I, Borda (2012).Detection of BRAF V600E Mutation in Thyroid Fine-needle Aspiration Specimes by High Resolution Melting (HRM) Analysis.Rom J Morphol Embryol, 53(2):263–267.
- Bircan R (2007). İyot Düzeyinin Farklı Olduğu Bölgelerde Hiperfonksiyone Tiroid Nodüllerinde Tirotropin Reseptör (TSHR) Mustasyon İnsidansının Saptanması. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveria M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simoes M (2006). PAX8-PPAR Gamma Rearrangement is Frequently Detected in the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. J Clin Endocrinol Metab, 91:213-20.
- Chien W ve Koeffler HP (2012). Molecular Biology of Thyroid Cancer. Springer, 35-43.

- Dağlar-Aday A, Toptaş B, Oztürk T, Seyhan F, Saygili N, Eronat AP, Akadam-Teker B, Yılmaz-Aydoğan H, Aksoy F, Oztürk O (2013). Investigation of BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma and tumor-surrounding nontumoral tissues. *DNA Cell Biol*, 32(1):13-8.
- Daniels GH (2016). Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma:Hybrid or Mixture?. *Thyroid*, 26(7): 1-3.
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU (2004). *Tumors of Endocrine Hormones. WHO Classification of Tumors. IARC Pres, Lyon.*
- Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Renzini G, Molinaro E, Agate L, Vivaldi A, Faviana P, Basolo F, Miccoli P, Berti P, Pacini F, Pinchera A (2008). Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab.*,93: 682-687.
- Ergüney S (2015). *Kanser Gündemi. Türkiye Kanserle Savaş Vakfı, 96s, İstanbul.*
- Erdoğan G., Erdoğan M.F., Emral R., Bastemir M., Sav H., Haznedaroglu D., Ustundag M., Kose R., Kamel N., Genc Y2002. Iodine status and goiter prevalence in Turkey before mandatory iodization. *J. Endocrinol. Invest.*, 25: 224-228.
- Erhan Y, Aydede H, Sakarya A (1999). Tiroid Kanserinde Prognostik Faktörler. *Türkiye Etopatoloji Dergisi*, 5(1-2):69-77.
- Erşen A, Durak MG, Canda T, Sevinç Aİ, Saydam S, Koçdor MA (2013). Warthin-like Papillary Carcinoma of the Thyroid: A Case Series and Review of the Literature. *Türk Patoloji Dergisi*, 29:150-155.
- Fayaz S, Esfahani PF, Torbati PY (2014). Lack of CHECK2 Gene Mutations in Differentiated Thyroid Carcinoma Patients Using High Resolution Melting Analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(12):5019-5022.
- Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, Loda M, Vella V, Giordano C, Trimarchi F, Mazzone E, Belfiore A and Vigneri R (2008) BRAF(V600E) Mutation and the Biology of Papillary Thyroid Cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 15: 191–205.

- Guerra A, Rosaria M, Marotta V, Campanile E, Rossi S, Forno I, Fugazzola L, Budillon A, Moccia T, Fenzi G, Vitale M (2012). The Primary Occurrence of BRAF(V600E) is a Rare Clonal Event in Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Metab*, 97(2):517-24.
- Hassell LA, Gillies EM, Dunn ST (2012). Cytologic and Molecular Diagnosis of Thyroid Cancers. *Cancer Cytopathology*, 120:(1)7-17.
- Henke LE, Pfeifer JD, Ma C, Stephanie M, Perkins S, DeWees T, vEl-Mofty S, Moley JF, Nussenbaum B, Haughey BH, Baranski TJ, Schwarz JK, Grigsby PW (2014). BRAF Mutation is not Predictive of Long-Term Outcome in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer Medicine*, 4(6)791-9.
- Hou P, Liu D, Xing M (2007). Functional Characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF Mutations in Papillary Thyroid Cancer. *Cell Cycle*, 6:377-379.
- Hussain MR, Baig M, Mohamoud HS, Ulhaq Z, Hoessli DC, Khoogeer GS, Al-Sayed RR, Al-Aama JY (2014). BRAF gene: From human Cancers to Developmental Syndromes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22:359-373.
- Katoh H, Yamashita K, Enomoto T, Watanabe M (2015). Classification and General Considerations of Thyroid Cancer. *Annals of Clinical Pathology*, 3(1):10451-9.
- Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, Kim KW, Hahn SK, Youn YK, Kim KH, Cho BY, Park do J (2012). The Association of the BRAF (V600E) Mutation with Prognostic Factors and Poor Clinical Outcome in Papillary Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *Cancer*, 118:1764-1773.
- Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA (2005). Targeted Expression of BRAF V600E in Thyroid Cells of Transgenic Mice Results in Papillary Thyroid Cancers that Undergo Dedifferentiation. *Cancer Res*, 65:4238-4245.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA (2000). PAX8-PPAR Gamma 1 Fusion in Oncogene Human Thyroid Carcinoma. *Science*, 289:1357-60.

- Kurt B, Yalçın S, Alagöz E, Karşlıoğlu Y, Yigit N, Günal A, Deveci MS (2012). The relationship of the BRAF(V600E) mutation and the established prognostic factors in papillary thyroid carcinomas. *Endocr Pathol*, 23(3):135-140.
- Kurtulmus N, Duren M, Ince U, Cengiz Yakicier M, Peker O, Aydın O, Altıok E, Giray S, Azizlerli H (2012). BRAF(V600E) mutation in Turkish patients with papillary thyroid cancer: strong correlation with indicators of tumor aggressiveness. *Endocrine*, 42(2):404-10.
- Lee SS, Ross SD, Mulder EJ (2012). Overview of follicular thyroid cancer. Li C., Lee K.C., Schneider E.B., Zeiger M.A. (2012). BRAF V600E Mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Papillary Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: 4559–4570.
- Li X, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Kandil E (2013). The nuclear factor κ -B signaling pathway as atherapeutic target against thyroid cancers. *Thyroid*, 23(2): 209-218.
- Liu D, Liu Z, Condouris S, Xing M (2007). BRAF V600E Maintains Proliferation, Transformation, and Tumorigenicity of BRAF-Mutant Papillary Thyroid Cancer Cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 92:2264-2271.
- Liu D, Liu X, Xing M (2012). Epigenetic Genes Regulated by the BRAFV600E Signaling are Associated with Alterations in the Methylation and Expression of Tumor Suppressor Genes and Patient Survival in Melanoma. *Elsevier*, 45-50.
- Liu J, Singh B, Tallini G, Carlson DL, Katabi N, Shaha A, Tuttle RM, Ghossein RA (2006) Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity. *Cancer*, 107:1255–1644.
- LiVolsi VA, Asa SL (1994). The Demise of Follicular Carcinoma of the Thyroid Gland. *Thyroid*, 4:223-236.
- Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG (1995). Medullary Thyroid Carcinoma: Recent advances and management update. *Thyroid*, 5(5): 407-24.
- Martelli ML, Iuliano R, Le Pera I, Sama I, Monaco C, Cammarota S, Kroll T, Chiariotti L, Santoro M, Fusco A (2002). Inhibitory Effects of Peroxisome Proliferator-

Activated Receptor Gamma on Thyroid Carcinoma Cell Growth. J Clin Endocrinol Metab, 87:4728-35.

NM_004333.4(BRAF):c.1749T>G (p.Phe583Leu),
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/40385>.

Özata M (2005). Tiroid Hastalıklarına Güncel Yaklaşım. Epsilon Yayınları, 407s, İstanbul.

Park JH, Kwon HJ, Park CS, Hong SW (2014). Anaplastic Transformation of Papillary Thyroid Carcinoma in a Young Man: A Case Study with Immunohistochemical and BRAF Analysis. The Korean Journal of Pathology, 48:234-240.

Rahman M.A, Salajegheh A, Smith R.A, Lam A.K-Y (2013). B-Raf Mutation: A Key Player in Molecular Biology of Cancer. Experimental and Molecular Pathology, 95:336-342.

Rosenthal A, Coutelle O ve Craxton M (1993). Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. Nucleic Acids Res, 21: 173-174.

Schaaf CP, Zschocke J, Potocki L (2012). Human Genetics: From Molecules to Medicine. Wolters Kluwer, 90s, Philadelphia.

Schochetman G, Ou CY ve Jones WK (1988). Polymerase chain reaction. J Infect Dis, 158: 1154-1157.

Schulz WA (2007). Molecular Biology of Human Cancers. Springer Netherlands, 508s, Dordrecht, Almanya.

Somma M, Querci M. Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri. Joint Research Centre European Commission,
<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20TR/bolum5.pdf> (erişim tarihi, 01.06.2016).

Temizkan G, Arda N (2008). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri, 345 s, İstanbul.

Toprak M (2011). Tiroid ve Paratiroid Cerrahisi. Deomed Yayıncılık, 235s, İstanbul.

Turovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, Maximo V, Botelho T, Moreira S, Meireles AM, Magalhaes J, Abrosimov A, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M (2005). Type and Prevalence of BRAF Mutations are

Closely Associated with Papillary Thyroid Carcinoma Histotype and Patients Age but not with Tumour Aggressiveness. *Virchows Arch*, 446:589-595.

Tural Ş, Tekcan A, Elbistan M, Kara N. (2012). Tiroid Kanseri Genetiği. *Journal of Experimental Clinical Medicine Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi*, 55-62.

Vayısoğlu Y, Özcan C (2011). Tiroid Folliküler Kanseri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 1-3.

Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good V M., Cancer Genome Project, Jones CM, Marshall CM, Springer C J, Barford D and Marais R (2004). Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell*, 116: 855–867.

Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufaro AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW (2005). BRAF Mutation Predicts a Poorer Clinical Prognosis for Papillary Thyroid Cancer. *L Clin Endocrinol Metab*, 90:6373-6379.

Xing M (2005). BRAF Mutation in Thyroid Cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 12:245-262.

Xing M (2007). BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer: Pathogenic Role, Molecular Bases, and Clinical Implications. *Endocr Rev*, 28:742-762.

Xing M (2013). Molecular Pathogenesis and Mechanism of Thyroid Cancer. *Nature Review Cancer*, 13:184-199.

Yu X-M, Schneider DF, Levenson G, Chen H, Sippel RS (2013) Follicular variant of papillary thyroid carcinoma is a unique clinical entity: a population-based study of 10,740 cases. *Thyroid* 23:1263-1268.

Zimmermann AK, Camenisch U, Rechsteiner MP, Bode-Lesniewska B, Rössle M (2013). Value of immunohistochemistry in the detection of BRAF(V600E) mutations in fine-needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathology*, 122:48-58.

Zitzelsberger H, Bauer V, Thomas G, Umger K (2010). Molecular Rearrangements in Papillary Thyroid Carcinomas. *Clin Chim Acta*, 411:301-8.

ÖZGEÇMİŞ

Büşra AYDIN; 26.01.1991 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlköğrenimini Halil Vedat Fıratlı Etüt ve Beslenme İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini Bakırköy Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Bakırköy Lisesi'nde tamamladı. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2013 yılında Biyolog unvanıyla mezun oldu. 2014-2015 Eğitim Öğretim yılının güz yarıyıl döneminde Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2014 yılından itibaren yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.