BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RENAL HÜCRE KARSİNOMUNDA ADAY TÜMÖR BASKILAYICI BNC1, SCUBE3, SFRP1 ve PCDH8 GENLERİNİN EPİGENETİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve BALİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

OCAK 2020

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RENAL HÜCRE KARSİNOMUNDA ADAY TÜMÖR BASKILAYICI BNC1, SCUBE3, SFRP1 ve PCDH8 GENLERİNİN EPİGENETİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve BALİ

(160305012)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

OCAK 2020

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 160305012 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Merve BALİ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "Renal Hücre Karsinomunda Aday Tümör Baskılayıcı BNC1, SCUBE3, SFRP1 ve PCDH8 Genlerinin Epigenetik Analizi" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Fahri AKBAŞ** ……..
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Dr. Öğr. Üyesi Birsen ELİBOL** ……..
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ ……..
İstanbul Üniversitesi

Teslim Tarihi : 16.03.2020
Savunma Tarihi : 20.01.2020

Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmam sürecinde desteğini esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan, yeni şeyler öğrenmeme imkan sağlayan ve deneyimleriyle hep yanımda olan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fahri AKBAŞ'a, tez çalışmam için gerekli olan hasta grubunu temin edip, çalışmayı özveriyle takip eden Uzm. Dr. Ganime ÇOBAN'a, tez çalışmam süresince manevi desteği ile her an yanımda olan değerli arkadaşlarım Ayşe Şeyma BÜYÜK, Filiz GÜNEY, Nazlı ARLI ve Şeyma CEYLAN'a, tezimin ilerlemesi için her zaman moral veren, imkan ve desteklerini esirgemeyen, ne zaman yardıma ihtiyacım olsa yanımda olan sevgili Elif ÇAVUŞOĞLU ve Gizem DURUEL'e, hayatım boyunca varlıklarını her an yanımda hissettiğim çok sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ocak 2020 Merve BALİ

(Moleküler Biyolog)

BEYAN

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

Merve BALİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ…….....iv
BEYAN…….…..v
İÇİNDEKİLER…….....vi
KISALTMALAR…….....vii
TABLO LİSTESİ…….....x
ŞEKİL LİSTESİ…….....xi
ÖZET……..…..xiii
SUMMARY…….....xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ…….....1
2. GENEL BİLGİLER……...2
2.1 Kanser 2
2.2 Renal Hücreli Karsinom.....3
2.3 Renal Hücreli Karsinom Sınıflandırılması.....4
2.4 Renal Hücreli Karsinom Tipleri.....5
2.5 Renal Hücreli Karsinomda Prognostik Metilasyon Markerleri.....6
2.6 Epigenetik.....8
2.6.1 DNA Metilasyonu.....9
2.6.1.1.Metilasyonun araştırılmasında kullanılan metodlar.....10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....12
3.1 Malzemeler.....12
3.2 Cihazlar 12
3.3 Çalışma Materyali 12
3.4 Parafin Dokudan DNA İzolasyonu 13
3.4.1 İzole Edilen DNA'ların Kontrolü 14
3.5 Bisülfit Dönüşüm Aşaması 14
3.6 Primer Tasarımı.....15
3.6.1 Primer bilgileri 15

3.7 Real Time PCR 17
3.8 İstatistiksel Analizler.....18
4. BULGULAR VE TARTIŞMA…….....19
4.1 Hastalara Ait Bulgular..... 19
4.2 DNA Kantitasyon Sonuçları 19
4.3 BNC1 Genindeki Metilasyon Durumu 19
4.4 SCUBE3 Genindeki Metilasyon Durumu..... .22
4.5 SFRP1 Genindeki Metilasyon Durumu.....23
4.6 PCDH8 Genindeki Metilasyon Durumu.....25
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER……..…….30
KAYNAKLAR…….....31
ÖZGEÇMİŞ…….....36

KISALTMALAR

BNC1 : Basonuclin 1

CpG : Sitozin-Guanin Dizileri

dH_2O : Distile su

dk : Dakika

DNA : DeoksiribonükleikAsit

DNMT : DNA metiltransferaz

MSP : Metilasyon-Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ml : Mililitre

PCDH8 : Protocadherin 8

PCR :Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RHK : Renal Hücre Karsinomu

Rpm : Dakikada devir sayısı

RT PCR : Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SCUBE3 : Signal Peptide CUB Domain and EGF Like Domain Containing 3

SFRP1 : Secreted Frizzled Related Protein 1

Sn : Saniye

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Renal Hücreli Karsinom Sınıflandırılması.....5
Tablo 2.2: Renal Hücreli Karsinom Sınıflandırılması.....5
Tablo 3.1: BNC1 geni primer bilgileri.....15
Tablo 3.2: SCUBE3 geni primer bilgileri.....16
Tablo 3.3: SFRP1 geni primer bilgileri.....16
Tablo 3.4: PCDH8 geni primer bilgileri.....17
Tablo 3.5: Real Time PCR bileşenleri.....18
Tablo 3.6: Real Time PCR reaksiyon döngüsü.....18
Tablo 4.1: BNC1 geni için hasta ve kontrol dokularındaki metilasyonun yüzdelik dağılımları.....21
Tablo 4.2: SCUBE3 geni için hasta ve kontrol dokularındaki metilasyonun yüzdelik dağılımları.....23
Tablo 4.3: SFRP1 geni hasta ve kontrol dokularındaki metilasyonun yüzdelik dağılımları.....25
Tablo 4.4 : PCDH8 geni için hasta ve kontrol dokularındaki metilasyonun yüzdelik dağılımları.....27

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Normal böbrek ve Renal Hücre Karsinomlu böbrek……...4

Şekil 2.2: Renal Hücre Karsinomunun evreleri……...4

Şekil 2.3: BNC1 geninin 15. kromozomdaki lokalizasyonu……...6

Şekil 2.4: SCUBE3 geninin 6. kromozomdaki lokalizasyonu……7

Şekil 2.5: SFRP1 geninin 8. kromozomdaki lokalizasyonu……7

Şekil 2.6: Wnt-B katenin sinyal yolağı…….…8

Şekil 2.7: PCDH8 geninin 13. kromozomdaki lokalizasyonu……8

Şekil 2.8: Memeli genomundaki CpG adacıkları…….....9

Şekil 2.9: Sitozinin DNA Metiltransferaz ile metillenmesi……10

Şekil 4.1: BNC1 geni metile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi……...20

Şekil 4.2: BNC1 geni anmetile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi……...20

Şekil 4.3: BNC1 geni metile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi……20

Şekil 4.4: BNC1 geni anmetile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi……21

Şekil 4.5: Tümör ve sağlıklı dokuya göre BNC1 geni için metilasyon dağılımları...21

Şekil 4.6: SCUBE3 geni metile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi……..22

Şekil 4.7: SCUBE3 geni anmetile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi……..22

Şekil 4.8: SCUBE3 geni metile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi……...22

Şekil 4.9: SCUBE3 geni anmetile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi……...23

Şekil 4.10: Tümör ve sağlıklı dokuya göre SCUBE3 geni metilasyon dağılımları...23

Şekil 4.11: SFRP1 geni metile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi……...24

Şekil 4.12: SFRP1 geni anmetile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi……24

Şekil 4.13: SFRP1 geni metile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi…….24

Şekil 4.14: SFRP1 geni anmetile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi…….25

Şekil 4.15: Tümör ve sağlıklı dokuya göre SFRP1 geni metilasyon dağılımları…...25

Şekil 4.16: PCDH8 geni metile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi……..26

Şekil 4.17: PCDH8 geni anmetile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi……..26

Şekil 4.18: PCDH8 geni metile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi……...26

Şekil 4.19: PCDH8 geni anmetile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi……...26

Şekil 4.20: Tümör ve sağlıklı dokuya göre PCDH8 geni metilasyon dağılımları….27

RENAL HÜCRE KARSİNOMUNDA ADAY TÜMÖR BASKILAYICI BNC1, SCUBE3, SFRP1 ve PCDH8 GENLERİNİN EPİGENETİK ANALİZİ

ÖZET

Kanser; vücudun bir organ veya dokusunda beliren bazı anormal hücrelerin kontrolsüz ve düzensiz bir şekilde proliferasyonu sonucu oluşan bir hastalıktır. Bu hücreler bir araya gelir ve tümör olarak isimlendirilen bir kitle oluşturur. Kanser oluşumu; bir hücrenin, genetik yapısında ardı ardına oluşan kalıtılabilir değişikliklerin birikmesi sonucu, büyüme avantajı kazanması ile açıklanabilir. Çevresel faktörlerin de etki ettiği kanser, genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu oluşan bir süreçtir. Bu epigenetik değişikliklerin başında metilasyon gelmektedir. Yapılan çalışmalar, çok sayıda kanser türünün oluşumunda bazı genlerin hipermetilasyonlarının etkili olduğu vurgusunu yapmaktadır.

Böbreklerde değişik tiplerde kanser gelişebilir. Renal hücreli karsinom (RHK) böbrek tümörlerinin içinde en yaygın olanıdır. RHK tüm kanserlerin %2-3'lük kısmını oluşturmaktadır. En yüksek insidans, gelişmiş ülkelerde görülür.

Promotör metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerin tümör supresör genleri baskılayarak böbrek tümörogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında klinik gidişat için en anlamlı prognostik metilasyon markerlerinden bazıları BNC1, SCUBE3, SFRP1, ve PCDH8' dir.Bu çalışmada amaç, RHK hastalarında bu markerlerin promotör bölgelerindeki metilasyon durumunun tespit edilmesidir. Toplamda 22 hastanın parafine gömülü tümör dokusu ve komşu normal dokusundan izole edilen DNA örneklerinde bisülfit dönüşümü yapıldıktan sonra Metilasyon Spesifik PCR yöntemi uygulanmıştır. Sonuç olarak; BNC1, SCUBE3, SFRP1, ve PCDH8 aday tümör baskılayıcı genlerdeki promotör bölge metilasyonunun RHK patogenezinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Ancak bu sonuçların kesinleşmesi için farklı moleküler tekniklere ve daha fazla örnekle yapılan çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Renal Hücre Karsinomu (RHK), Epigenetik, Metilasyon

EPIGENETIC ANALYSIS OF BNC1, PCDH8, SCUBE3 and SFRP1 CANDIDATE TUMOR SUPPRESSOR GENES İN RENAL CELL CARCİNOMA

SUMMARY

Cancer is a disease arising from irregular and uncontrolled proliferation of abnormal cells found in a particular tissue and/or organ in the body. These cells form tumour when they come together. Cancer formation can be explained as accumulation of hereditary changes in the genetic structure of the cell. It is a process that results from environmental factors, genetics and epigenetics changes. Methylation is the foremost among the epigenetic changes. A great deal of studies emphasize that hypermethylation of some genes has influence on the formation of many cancer types. Different types of cancer can develop in kidneys. Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of kidney cancer. It comprises 2-3% of all cancer types. The highest incidence is seen in developed countries.It is observed that the incidence of this disease is increased 2% in Europe and across the world.

It is known that epigenetic changes, like promotor methylation, have an important role in kidney tumorigenesis by suppressing tumour suppressor genes. Some of the most significant prognostic methylation markers are BNC1, SCUBE3, SFRP1 and PCDH8. The purpose of this study is to determine the methylation situation in the promotor regions of these markers in RCC patients. In the study, the DNA in tumour tissues, which were embedded parafine, and adjacent normal tissues were isolated from 22 patients and bisulfide conversion was made in these samples, and then methylation-specific PCR method was applied. As a result, it is thought that the methylation of promotor region in candidate tumour suppressing genes BNC1, SCUBE3, SFRP1 and PCDH8 influences RCC pathogenesis. However, more studies that will be done with more samples and with different techniques are required to finalize these results.

Keywords: Renal cell carcinoma (RCC), Epigenetics, Methylation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser dünyadaki önemli insan sağlığı problemlerinden birisidir. Genlerdeki mutasyonlar sonucu farklı organlarda kontrolsüz çoğalan hücrelerin oluşmasıyla karakterize bir hastalıktır. Kanser, hem çevresel hem de kalıtsal faktörlerden kaynaklanmaktadır [1].

Böbrekler 12. sırt omuru ile 3. bel omuru arasında uzanan, karın zarı arka duvarında yerleşmiş iç organımız olarak bilinmektedir [2]. Böbrekte iyi huylu ve kötü huylu tümörler meydana gelebilmektedir. Vücutta gelişen katı tümörlerin %2-3'ünü böbrek tümörleri kapsamaktadır. Böbrek tümörlerinin yaklaşık %85'ini renal hücreli karsinomlar oluşturmaktadır. Renal Hücre Karsinomu tüm yetişkin kanser türleri arasında %3 ile üçüncü en sık görülen kanser türüdür. RHK, böbrek tubuluslerinin iç yüzeyini kaplayan hücrelerde oluşur ve büyüyerek tümör haline gelir. RHK görülme oranları dünyada sürekli olarak yükselmektedir [3].

Bu çalışmada amaç, RHK için anlamlı prognostik metilasyon markerlerinden olduğu düşünülen BNC1, SCUBE3, SFRP1 ve PCDH8'in promotör bölgelerindeki metilasyon durumunun tespit edilmesi ve RHK ile ilişkisinin belirlenmesidir. Bu amaçla toplam 22 hastanın parafine gömülü tümör dokusu ve komşu normal dokusunun DNA'ları izole edilmiştir. DNA örneklerinde bisülfit dönüşümü yapılmıştır. Daha sonra bu promotör bölgelere özgü metile ve anmetile primerler tasarlanmıştır ve Metilasyon Spesifik PCR yöntemi uygulanmıştır. Real Time PCR ile genlerin promotör bölgelerindeki metilasyon oranı kantitatif olarak belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesidir. Tek bir organı etkileyebileceği gibi uzaktaki organlara da yayılarak etkisini gösterebilir. Kanser; genlerdeki mutasyonlar ve patolojik hücre içi sinyal iletimi sonucu farklı organlarda kontrolsüz çoğalan hücrelerin oluşmasıyla karakterize bir hastalıktır. Kanser oluşumu; tek bir hücredeki mutasyon ya da mutasyon dışı kalıtımsal sebeplerle başlayarak, ilerledikçe yeni mutasyonlarla metastatik özellik kazanan klonal bir süreçtir [4].

Kompleks bir hastalık olan kanser çevresel ve kalıtsal faktörlerden kaynaklanmaktadır [5]. Beslenme, çevresel faktörler, kalıtılan mutasyonlar ve somatik mutasyonlar gibi faktörler kanserin açığa çıkma nedenlerindendir. Hanahan ve Weinberg kanser hücresini karakterize eden altı özelliği, büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilme, büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçabilme, sınırsız bölünme, çoğalma potansiyeline sahip olma, anjiogenezi destekleyebilme, doku invazyonu ve metastaz yapabilme olarak tanımlamışlardır.

Hücrelerin bölünmesi genlerin kontrolü altında olduğundan kanser temel olarak genlerle ilişkili bir hastalıktır. Kromozomlar üzerinde bulunan genler paketlenmiş durumdadır ve bu genlerin üzerindeki fiziksel veya kimyasal değişimler hücrenin işlevini etkileyebilir. Genlerde oluşan hasara bağlı olarak DNA tamir mekanizmaları genin işlevini tekrardan kazandırmaya çalışsa da her zaman başarı sağlanamaz. Bunun sonucu olarak genlerin ürünü olan proteinlerin eksik ya da hatalı üretilmesi hücresel işlevlerde bozulmaya yol açar.

Genin işlevini değiştiren bir diğer etmen ise genin yapısını değiştirmeden fonksiyonunu değişmesine neden olan metillenme, asetillenme, fosforillenme, ribozillenme gibi epigenetik modifikasyonlardır.

Bu modifikasyonlar yalnız özel bir lokasyon üzerinde etki gösterebileceği gibi kromozomların tamamını ya da büyük bir bölümünü etkileyen bölgesel delesyonlar, insersiyonlar veya inversiyonlar şeklinde de görülebilir [6].

Kanser oluşumunda büyük bir etkiye sahip olan üç gen grubu bulunmaktadır. Bu gen grupları onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir.

Hücre büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan normal genler olan proto-onkogenler, mutasyonlar, artmış gen ifadesi, gen duplikasyonları ve kromozal yeniden düzenlemeler nedeniyle etkin hale geçip onkogen haline dönüşebilirler.

Proto-onkogenler; nokta mutasyonları, kromozomal translokasyonlar, yeniden düzenlenmeler, gen amplifikasyonları, hipermetilasyonlar ve hipometilasyonlar gibi birçok farklı yolla onkogenlere dönüşüp kanser oluşturma özelliği kazanmaktadırlar [7].

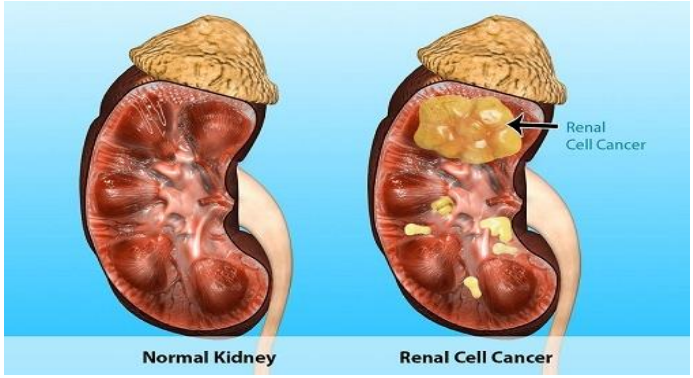
Kanser oluşumunda önemli diğer bir etken olan tümör baskılayıcı genler; hücre proliferasyonunu baskılamakta ve apoptozun indüklenmesinde görev alır. Bu genlerin kaybı veya aktif olmaması sonucunda hücre proliferasyonunda artma, apoptoz sürecinde aksamalar gözlenmektedir. Bu nedenle tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar sonucu “işlev kaybı” ortaya çıkmaktadır [8].

2.2 Renal Hücreli Karsinom

Böbreklerde iyi huylu (benign) veya kötü huylu (malign) tümörler meydana gelebilmektedir. Böbrek tümörlerinin yaklaşık %85’ini renal hücreli karsinomlar oluşturur. Renal hücreli karsinom (RHK), böbrek korteksinden kaynaklanır [5].

RHK kanserlerin %2-3'lük kısmını oluşturmaktadır. En yüksek insidans, gelişmiş ülkelerde görülür. hastalığın insidansında yıllık yaklaşık %2 artış gözlenmektedir [9].Yetişkinlerde görülen tüm malign tümörlerin %2’sini, tüm böbrek tümörlerinin ise %80’ini oluştururlar. Genellikle 55-60 yaşlar arasında ve kadınlarda erkeklerin iki katı sıklıkla görülür.

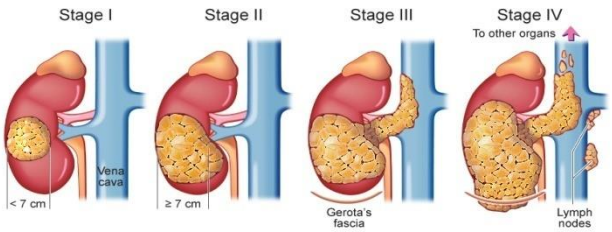
Renal hücreli karsinomu olan hastalar genellikle kötü prognoza sahiptir. 5 yıllık yaşam süresi %50, 10 yıllık yaşam süresi ise %33’dür. Hastaların %40’ında nüks görülmektedir [10].



Şekil 2.1 : Normal böbrek ve Renal Hücre Karsinomlu böbrek.

RHK, böbrek içinde en sık gelişen kitlesel lezyondur. Klinik olarak sessiz ilerler ve yüksek oranda metastaz tespit edilmiştir. İlk tanıda yaklaşık olarak hastaların %20-30'u metastatik iken, nefrektomi uygulanan hastaların %20-40'ında daha sonra metastaz gelişmektedir.

Renal hücreli kanserlerde tedavi seçeneklerinin sırası ve etkisi yapılan araştırmalarla önem kazanmaktadır. Bölgesel RHK için cerrahi genellikle tedavi edicidir. Cerrahi prosedür, hastanın yaşı ve hastalığın yayılımına bağlı olarak radikal veya parsiyel nefrektomiyi içerebilir. Cerrahi adayı olmayan göreceli küçük renal kitleli olan hastalarda diğer tedaviler seçenek olabilir [11].



Şekil 2.2 : Renal Hücreli Karsinomun evreleri.

2.3 Renal Hücreli Karsinom Sınıflandırılması

Önceki zamanlarda RHK geleneksel olarak 4 gruba ayrılmıştır. Bunlar: Şeffaf hücreli, granüler hücreli, tübülopapiller ve sarkomatoid tipi renal hücreli karsinomlardır.

Daha sonra yapılan çalışmalarla bu sınıflama yeniden oluşturulmuştur ve kromofob hücreli karsinom adlı bir alt grup ortaya konmuştur [12].

Sınıflama çalışmaları, 1981 yılında DSÖ böbreğin epitelyal neoplazilerini hücre tipi özellikleri, yapısal özellikler ve orjinlerine göre gruplandırmasıyla başlamıştır [13]. Thoenes ve ark. 1985 yılında RHK'un kromofob tipini sunmuşlar ve daha sonra Mainz sınıflamasını ortaya çıkarmışlardır. 1993 yılında sitogenetik temelli, 1997 yılında moleküler genetik temelli Heidelberg-Rochester sınıflaması kabul edilmiştir. Heidelberg-Rochester sınıflaması yeniden gözden geçirilerek DSÖ 1998 sınıflaması, Kovacs ile başlayan moleküler araştırmaların sonuçlarının yeniden incelenmesiyle de DSÖ 2004 sınıflaması ortaya çıkmıştır [14].

Tablo 2.1 : Renal hücreli Karsinom Sınıflandırılması [15].

DSÖ 1981	Mainz 1986	Sitogenetik 1993
Adenom	Adenom	Papiller Tümörler
Renal Hücreli Karsinom	Renal Hücreli Karsinom	Berrak Hücreli Tümörler
Diğer Bellini'nin Duktal karsinomu	Onkositom	Kromofob Tümörler
		Onkositom
		Tanımlanmamış Tümör Grupları

Tablo 2.2 : Renal hücreli Karsinom Sınıflandırılması [15].

Heidelberg-Rochester1997	DSO 1998	DSO 2004
Benign	Renal Hücreli Adenom	Benign
Malign	Renal Hücreli Karsinom	Malign

2.4 Renal Hücreli Karsinom Tipleri

Berrak hücreli RHK'lerde neoplastik hücreler berrak veya eozinofilik sitoplazmalıdır. Daha çok akciğerlere yayılım gösterir. Bunun dışında lenfatik yayılım veya retrograd emboli şeklinde omurgalara yayılım gösterebilir. Berrak hücreli RHK'de alışılmadık yerlere ve geç metastazlar sıktır [16].

Papiller Böbrek Hücreli Kanser papiller veya tubulopapiller yapı gösteren RHK'lerdir. Tüm RHK'lerin %10'unu oluştururlar. nekroza uğrayıp, canlı tümör hücresi saptamak çok güç olabilir.

Papiller RHK'lerde en sık 7 ve 17. Kromozom trizomisi ile Y kromozomu kaybı görülür [17].

Kromofob Böbrek Hücreli Kanser belirgin hücre zarları olan, berrak ama transparan olmayan sitoplazmaya sahip hücrelerden oluşan BHK alt türüdür. Yapılan çalışmalarda diğer türlere göre hastalığın seyrinin iyi olduğu belirtilmiştir [18].

Toplayıcı Duktus Kanseri (Bellini Duktus Kanseri) böbreğin malign tümörlerinin %1'inden az bir bölümünü oluşturan nadir bir türdür. Tanısı zordur ve diğer tümörlerin ekarte edilmesi ile konabilir. RHK'lere göre daha farklı yerleşimli ve daha agresif tümörlerdir [19].

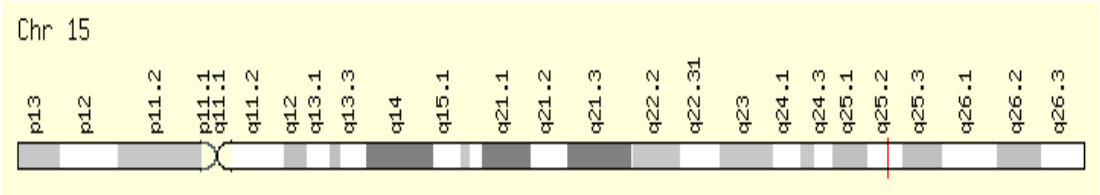
Böbrek medüller kanseri, toplayıcı duktus kanseri gibi medulla yerleşimlidir. 20-40 yaş civarında ve orak hücre anemili olgularda izlenir. Bu olgularda hemoglobin geninin yer aldığı kromozom 11 monozomisi gösterilmiştir. Genellikle tanı esnasında böbrek dışına yayılmıştır ve metastazlar vardır [17].

2.5 Renal Hücreli Karsinomda Prognostik Metilasyon Markerleri

Promotör metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerin tümör supresör genleri baskılayarak böbrek tümörogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda RHK'daki DNA metilasyon değişikliklerinin sıklıkla klinikopatolojik özellikler ve hastanın sağkalımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında klinik gidişat için en anlamlı prognostik metilasyon markerlerinden bazıları BNC1, SCUBE3, SFRP1, ve PCDH8' dir [20].

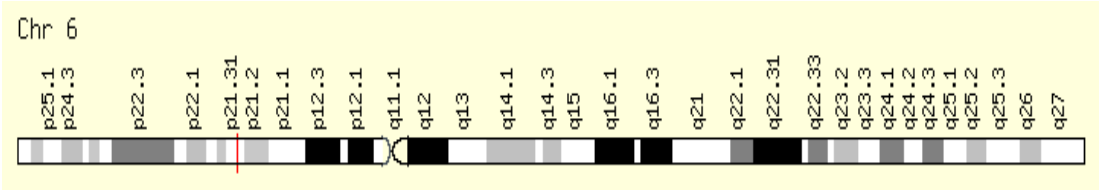


Şekil 2.3 : BNC1(basonuclin) geninin 15. kromozomdaki lokalizasyonu.

BNC1 geni 15. Kromozomda lokalize bir gendir. Bu gen insanlarda zinc finger protein basonuclini kodlar. Basonuclin 1 proteini epidermisin bazal hücre tabakasında ve kıl foliküllerinde bulunur. Oositlerin farklılaşması ve embriyoların erken gelişiminde rol oynayabilir.

Farklı tümör tiplerinde, transkripsiyon faktörü olan basonuclin'in anormal ekspresyonu bildirilmiştir.

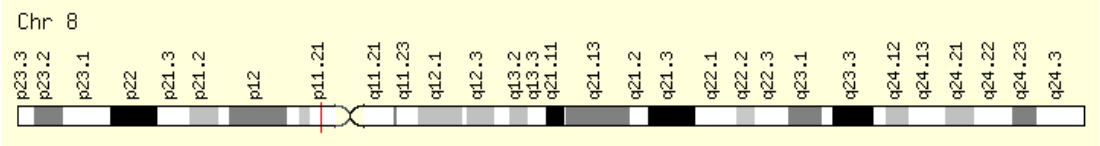
BNC1 promotör metilasyonu ve bununla ilişkili olarak genin susturulması meme tümörlerinin beyne metastazında sık görülmüştür. Birincil meme tümörlerinin beyin metastazlarına ilerlemesinde, BNC1'in geniş bir hedef aralığına sahip bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynayabileceğini gösterilmiştir [21].



Şekil 2.4 : SCUBE3 (Signal Peptide CUB Domain and EGF Like Domain Containing 3) geninin 6. kromozomdaki lokalizasyonu.

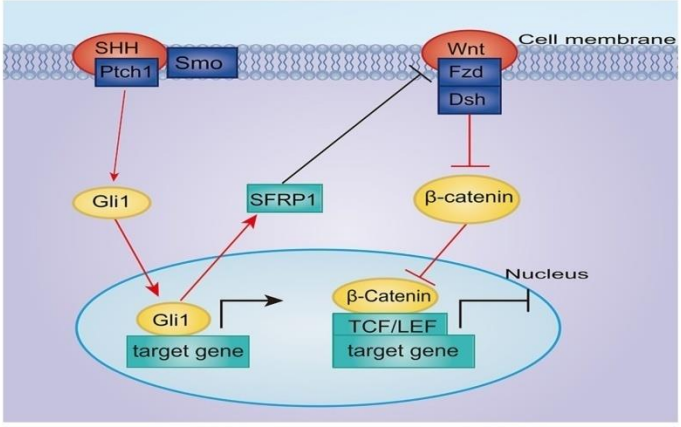
SCUBE 3 geni 6. Kromozomda lokalizedir. Bu genin insan embriyonik böbrek hücrelerinde aşırı ekspresyonu hücre yüzeyinde oligomerleri ve bağları oluşturan bir proteinin glikozile edilmiş bir formunun salgılanmasına neden olur. Bu gen sağlıklı dokuya kıyasla akciğer kanseri tümör dokusunda upregüle haldedir. SCUBE3'ün akciğer karsinomasında güçlü şekilde eksprese edildiği bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda bu genin, TGF-β (transforme edici büyüme faktörü-β) yolağını tetiklediğini ve daha sonra tümör anjiyogenezini teşvik ettiği gösterilmiştir [21].



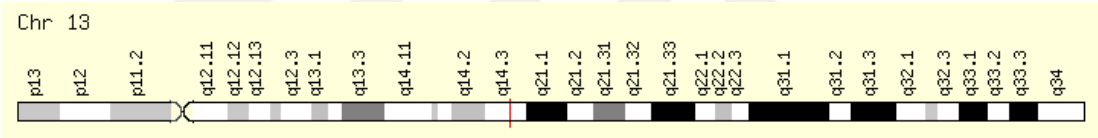
Şekil 2.5 : SFRP1 (Secreted Frizzled Related Protein 1) geninin 8. Kromozomdaki lokalizasyonu.

SFRP1 geni 8. Kromozomda lokalizedir. Bu gen Frizzled proteinlerinin Wnt bağlanma alanına homolog bir sistein açısından zengin alan içeren SFRP ailesinin bir üyesini kodlar. SFRP ailesinin üyeleri Wnt sinyalizasyonunun modülatörleri olarak hareket eder. SFRP genlerinin epigenetik olarak susturulması kanserle ilişkili olan Wnt yolağının düzensiz aktivasyonuna yol açar.



Şekil 2.6 : Wnt-B katenin sinyal yolağı.

SFRP1, RHK'da de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerle ilişkili bir Wingless-type (Wnt) antagonistidir. Böbrekte SFRP1 yüksek oranda eksprese edilir ve böbrek metanefrik gelişiminde gereklidir. Yapılan çalışmalarda SFRP1'in metastatik RHK'da up-regüle edildiği tespit edilmiştir [22].



Şekil 2.7 : PCDH8 (Protocadherin 8) geninin 13. kromozomdaki lokalizasyonu. 13. kromozomda lokalizedir.PCDH8 geni kadherin süperailesinin bir alt ailesi olan protokadherin gen ailesine aittir. Bu gen, hücre adhezyonunda görevli olduğu düşünülen bir proteini kodlar. Genellikle 15-17 ekzon tarafından kodlanan kadherinlerin aksine PCDH8 geni sadece 3 ekzon içerir.

PCDH8 kadherin ailesinin bir üyesidir. Kadherinler, tümörogenez sırasında hücre morfolojisi, temas inhibisyonu ve sinyal iletiminde önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda metillenmiş PCDH8'in , lenf nodu metastazı ile anlamlı derecede ilişkisi bulunmuştur. PCDH8'in metilasyonunun meme kanseri olan hastalarda yüksek olduğu gözlenmiştir [23].

2.6 Epigenetik

Epigenetik en sade tanımıyla çevre ve genetik arasındaki etkileşimdir. DNA baz dizilimini değiştirmeden, gen ifadesinde değişikliklere yol açan farklı süreçleri ifade etmekte kullanılır.

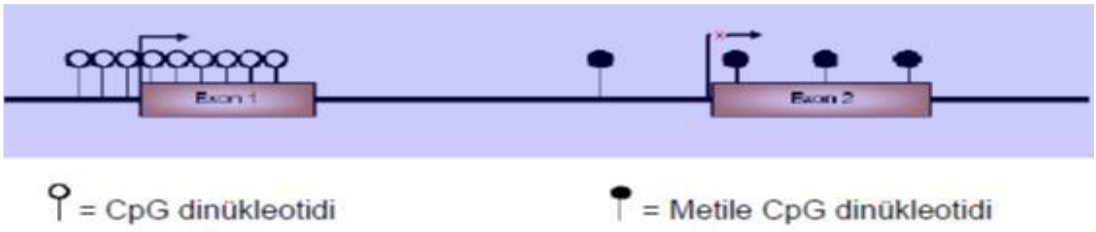
Epigenetik terimi ilk kez Waddington tarafından 1942'de vücuttaki tüm hücrelerin aynı DNA dizilimine sahip olmasına rağmen, farklı genleri ifade etmelerini açıklamak amacıyla kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar, epigenetiğin yalnızca gelişim sırasında değil, erişkin yaşamda da gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadığını ortaya koymuştur [24].

Epigenetik mutasyon olarak adlandırılan CpG adacıklarındaki metilasyon değişikliği canlının gen ifadesini değiştirebilir. Epigenetiğin gen ifadesi kontrolündeki önemli etkisi transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını engelleyecek değişiklikler yaratmasıdır. Epigenetik değişiklikler kalıcılardır. Bu kalıcı yapılarına rağmen, epigenetik değişiklikler aynı zamanda geri çevrilebilir niteliktedir.

Çevresel koşulların değiştirilmesi, ilaç, terapi gibi dış müdahaleler ile gen ifadesinin kontrol edilmesi mümkündür. Epigenetik mekanizmalar doğrudan ve dolaylı olarak gen ifadesini kontrol eden mekanizmalar olarak ikiye ayrılmaktadır. Gen ifadesini dolaylı yoldan kontrol eden mekanizmalar daha çok transkripsiyon sonrası mekanizmaları etkileyerek protein sentezini engellemesini içermektedir. Gen ifadesini doğrudan etkileyen mekanizmalar ise kromotin modifikasyonları ve DNA modifikasyonları olarak iki grupta incelenmektedir. DNA modifikasyonları içerisinde en iyi bilinen ve en işlevsel olanı DNA metilasyonudur [25].

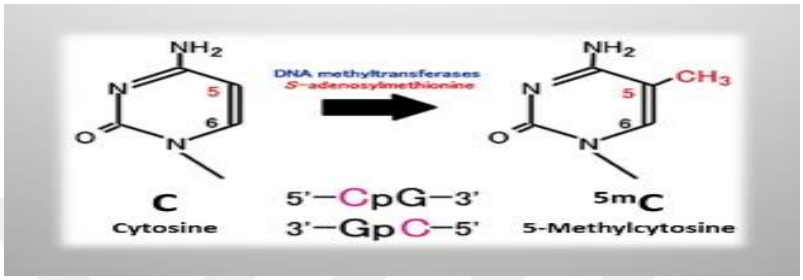
2.6.1 DNA Metilasyonu

İnsanda gözlenen epigenetik değişikliklerin başında CpG dinükleotidleri içerisinde bulunan sitozinlerin metilasyonu gelmektedir. Bazı genler , DNA dizilerindeki metilasyonla susturulmaktadır. Genlerin CpG adacıklarının metilasyonu, kanserde gen susturulmalarında; gen delesyonu ve gen mutasyonları ile eşit öneme sahip olarak görülmektedir.



Şekil 2.8 : Memeli genomundaki CpG adacıkları [26].

Ökaryotlarda DNA metilasyonu; sitozin halkasının 5. posizyonundaki karbonuna metil grubunun(CH3) eklenmesiyle meydana gelmektedir. Memeli hücrelerinin genomik DNA'larının yaklaşık olarak %3-5'inde sitozin bölgelerinde metilasyon görülmektedir. Bu modifikasyon, DNA eşlenmesinden sonra meydana gelir ve bu olay DNMT1 (DNA metiltransferaz) enzimi tarafından katalizlenmektedir. Bu enzim, metile olmamış bölgelerde de de novo metilasyona neden olabilmektedir [26].



Şekil 2.9 : Sitozinin DNA metiltransferaz ile metillenmesi (metilasyon).

2.6.1.1.Metilasyonun Araştırılmasında Kullanılan Metodlar

Sitozin metilasyonunun analizi için bisülfit reaksiyonuna bağlı metotlar geliştirilmiştir. Bisülfit metodunda, ilk olarak DNA sodyum bisülfit ile muamele edilir ve DNA' da sitozinler urasile dönüştürülür; ancak, 5-MeC' ler aynı, yani sitozin şeklinde kalırlar. DNA dizisi, daha sonra bisülfit ile muamele edilmiş DNA için özgül primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. 5-MeC' nin araştırılmasında kullanılan bisülfit reaksiyonu dışında Southern Blot, Restriksiyon enzimi-PCR, bisülfit DNA dizi analizi, metilasyona hassas tek nükleotid primer uzaması (Ms-SNuPE), Restriksiyon belirteç genomik taraması (RLGS), Diferansiyel metilasyon hibridizasyonu (DMH), DNA mikroarray ve metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) gibi birçok metot geliştirilmiştir [27].

Southern blot yöntemi , metilasyon analizinde en sık kullanılan metoddur. Bu metodda; genomik DNA, aynı dizilim için spesifik olan methylation-sensitive ve insensitive endonükleazlarla kesilir.

Daha sonra restriksiyon fragmentleri agaroz jelde ayrılır, bir membrana trasfer edilir ve hedef DNA dizisi için spesifik olan bir probla hibridize edilir. Otoradyografi tahmin edilen büyüklükteki bantların varlığını ortaya çıkaracaktır.

Restriksiyon Enzim PCR'ı Genomik DNA metilasyon-sensitive ve metilasyon insensitive restriksiyon enzimleri ile kesilir ve daha sonra parçalanmış DNA hedef dizinin kanatları olan primerlerle amplifiye edilir. Metilasyon-sensitive endonükleazların kullanımı, eğer hedef dizi metilenmiş CpG alanları içeriyorsa tahmin edilen bir büyüklükte DNA amplifikasyonunu olası hale getirir. Metilasyon-insensitive bir endonükleazın kullanımı ile, hedef DNA dizisinin metilasyon durumu ne olursa olsun amplifikasyon olası olmayacaktır. Bu teknik yine de hedef bir dizideki DNA metilasyonunun birincil seçicisi olarak oldukça faydalıdır [27].

Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MS-PCR), yönteminde bisülfit muamelesinden sonra metillenmiş ve metillenmemiş DNA arasında var olan dizi farklılığından faydalanılır. MS PCR'da bilsülfit muamelesinden sonra değişikliğe uğramış promotör bölgesinin amplifikasyonu için metilasyona özgü olan ve olmayan farklı primer çiftleri kullanılır [28].

MS-PCR; DNA' nın bir bölgesindeki metilasyonun varlığının analizi için oldukça hızlı bir yöntemdir [29].

DNA metilasyon analizlerinin gelişmesinde kullanılan yöntemlerden biri bisülfit modifikasyonudur. Sodyum bisülfit modifikasyonu, DNA'daki metillenmemiş sitozinlerin urasile dönüşmesi ve metillenmiş sitozinlerin değişmeden kalması temeline dayanmaktadır [30]. Modifikasyondan sonra PCR yöntemi ile amplifikasyon ve ardından sekanslama ile DNA'daki metillenmiş ve metillenmemiş bölgeler ayırt edilebilir [31].

DNA'nın bisülfit modifikasyonundan sonra, metillenmiş CpG dizilerine özgü olarak tasarlanan metil-spesifik primerler kullanılarak DNA amplifiye edilir ve oluşan fragmentler jel elektroforezinde yürütülür. Bu yönteme Metilasyon-Spesifik PCR (MSP) denir [32]. MSP, hızlı ve yüksek hassasiyete sahiptir ancak kantitatif değildir.

Bu yöntemin kantitatif sonuçlar veren alternatifi MethylLight yöntemidir. MethylLight yönteminde metil-spesifik primerlere ek olarak metil-spesifik floresan işaretler kullanılır ve amplifikasyon RT-PCR cihazı ile gerçekleştirilir [33].

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

Ksilen, Etil alkol, dH_2O,DNA izolasyon kiti(Zymo Quick DNA Miniprep Plus Kit), Bisülfite EZ DNA Methlation Gold Kit(Zymo), Eurogreen 2X qPCR master mix

3.2 Cihazlar

Buz Makinesi (Scotsman) DNA' lar için gerekli ısı değişimlerini sağlamak amacı ile kullanıldı.

Isı Bloğu Örneklerin inkübasyonu için kullanıldı.

Real Time PCR Cihazı (BioRad) Amplifikasyona bağlı DNA artışının ölçümünü belirlemek için kullanıldı.

Santrifüj Parafinden DNA izolasyonu ve bisülfit muamelesi aşamalarında kullanıldı.

Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Scientific) İzole edilen DNA'ların konsantrasyonunu tayin etmek için kullanıldı.

Shaker Parafin dokudan DNA izolasyonunun ön aşamalarında örneklerin inkübasyonu için kulllanıldı.

Vorteks Parafin dokudan DNA izolasyonunun ön aşamalarında ksilenin parafini çözmesine yardımcı olmak amacıyla kullanıldı.

3.3 Çalışma Materyali

RHK tanısı kesinleşmiş, hem tümör hem de normal dokusu mevcut bulunan 22 RHK hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından patolojik değerlendirme ve teşhis koyma amacıyla hastalardan temin edilmiş ve arşivlenmiş parafine gömülü doku blokları çalışmada kullanılmıştır. Tümör ve normal dokulardan oluşan toplam 22 parafine gömülü dokudan 8µ kalınlığında 3'er kesit alınmış ve 1.5 ml tüpler içerisine yerleştirilmiştir.

3.4 Parafin Dokudan DNA İzolasyonu

- Parafin dokudan DNA izolasyonu için Zymo Quick DNA Miniprep Plus Kit kullanılmıştır.
- Parafin bloğa gömülü kesitten 10 µm 3 kesit alınarak DNase RNase free 1.5'lik eppendorflara alınmıştır.
- Üzerine 800 µL Xylene eklenmiştir ve vorteks yapılmıştır.
- Oda ısısında 10 dakika shaker'da inkübasyona bırakılmıştır.
- 16000 rpm' de 20 °C'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılmıştır ve bu adımlar 3 defa tekrarlanmıştır.
- 800 µL %100 etanol eklenip vorteks yapılmıştır.
- 16000 rpm'de 3 dk santrifüj yapılmıştır ve süpernatant atılmıştır.
- 800 µL %75 etanol eklenmiştir ve vorteks yapılmıştır.
- 16000 rpm'de 3 dk santrifüj yapılmıştır ve süpernatant atılmıştır.
- 800 µL dH_2O eklenmiştir, vorteks yapılmıştır ve 5 dk santrijüj edilip süpernatant atılmıştır.
- 95 µL DNase RNase free su, 95 µL solid tissue buffer ve 20 µL proteinaz K eklenip vorteks yapılmıştır.
- Örnekler ısı bloğunda 55 °C'de 1 saat, 94 °C'de 1 saat bekletilmiştir.
- 16000 rpm'de 2 dk 20 °C de santrifüj yapılmış süpernatant yeni tüpe alınmış ve pelet atılmıştır.
- Üzerine 950 µL Genomic Binding Buffer eklenmiştir ve tüp birkaç kez alt üst edilmiştir.
- Karışım yeni toplama tüpüne alınmıştır ve 12000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Tüpün altındaki sıvı dökülmüştür, 400 µL DNA pre wash buffer eklenmiştir ve 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- 700 µL gDNA wash buffer eklenmiştir ve 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- 200 µL gDNA wash buffer eklenmiştir ve 16000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.

- Filtre 1.5 mL'lik eppenddorflara alınmıştır, üzerine 50 µL DNA elution buffer eklenmiştir ve 16000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Blank olarak elution buffer kullanılarak spektrofotometrede okutulmuştur.
- Bu işlemden sonra DNA'lar +4 °C'de saklanmıştır.

3.4.1 İzole Edilen DNA' ların Kontrolü

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile ölçümler yapılarak belirlenmiştir. Ölçümleri gerçekleştirilen DNA'larla ilgili hesaplamalar yapılmıştır.

3.5 Bisülfit Dönüşümü Aşaması

- Bisülfit dönüşümü aşamasında Zymo Bisülfite EZ DNA Methlation Gold Kit ile izole edilen DNA lara muamele edilmiştir.
- 900 µL dH_2O 300 µL M dilution buffer ve 50 µL dissolving buffer karıştırılarak CT conversion reagent elde edilmiştir.
- 20 µL DNA örneği üzerine 130 µL CT conversion reagent konulmuştur.
- Örnekler 98 °C'de 10 dk, 64 C'de 150 dk bekletilmiştir.
- Kolona 600 µL M binding buffer eklenmiştir ve toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Üzerine örnekler konulmuştur, kapaklar kapatılıp tüpler çalkalanmıştır.
- 30 sn 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır ve süpernatant atılmıştır.
- 100 µL M Wash Buffer eklenmiştir ve 30 sn santrifüj edilip süpernatant atılmıştır.
- 200 µL M Desulphonation Buffer eklenmiştir ve örnekler oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra 30 sn santrifüj yapılıp süpernatant atılmıştır.
- 200 µL M Wash Buffer eklenip 30 sn santrifüj yapılmıştır, süpernatant atılmıştır ve bu işlem 2 defa tekrar edilmiştir.
- Kolon ependorflara alınmıştır ve üzerine 30 µL Elution Buffer eklenmiştir.
- 30 sn santrifüj edilip örnekler spektrofotometrede ölçülmüştür.
- Bu işlemlerden sonra DNA -20 °C'de saklanılmıştır.

3.6 Primer Tasarımı

- BNC1, SCUBE3, SFRP1, ve PCDH8 genlerinin promotor bölgelerine özgü primerler tasarlanmıştır.
- Methprimer primer dizayn programı adlı programdan reverse ve forward primerler tasarlanmıştır.
- Her bir primer çifti için hem metile hem anmetile primerler tasarlanmıştır.

3.6.1 Primer Bilgileri

Tablo 3.1 : BNC1 Metile(M) ve Anmetile(U) Forward(F) Reverse(R) Primer Bilgileri.

Primer	Dizi Bilgisi	Sıcaklık	%GC
BNC1 MF	GGTTGGAAGTCGGGTCGAGT	57°C	%60
BNC1 MR	ACACGAAACCGACGAAACGC	58°C	%55
BNC1 UF	TTGGGTTGGAAGTTGGGTTGAG	56°C	%50
BNC1 UR	AACACAAAACCAACAAAACACTCCC	56°C	%40

Tablo3.2 : SCUBE3 Geni Primer Bilgileri.

Primer	Dizi Bilgisi	Sıcaklık	%GC
SCUBE3 MF	GTTTCGAGCGAAAAGTCGGAT	57°C	%48
SCUBE3 MR	TCGAACGAAATTCTAAAACGCGTAA	58°C	%36
SCUBE3 UF	GTTTTGAGTGAAAAGTTGGAT	49°C	%33
SCUBE3 UR	TCAAACAAAATTCTAAAACACATAA	50°C	%20

Tablo 3.3 : SFRP1 Geni Primer Bilgileri.

Primer	Dizi Bilgisi	Sıcaklık	%GC
SFRP1 MF	GTTGGAGTACGAGATTATGGCGG	58°C	%52
SFRP1 MR	AAAACCAACGACACGAATAAATAAACC	56°C	%33
SFRP1 UF	GTTGGAGTATGAGATTATGGTGG	54°C	%44
SFRP1 UR	AAACCAACAACACAAATAAATAAACC	52°C	%27

Tablo 3.4 : PCDH8 Primer Bilgileri.

Primer	Dizi Bilgisi	Sıcaklık	%GC
PCDH8 MF	TAGAGTTCGTTGGAGGTTCG	55°C	%50
PCDH8 MR	AATCTCAAACTCTCGAAATCACG	56°C	%39
PCDH8 UF	GAGTTTGTTGGAGGTTTGGAG	53°C	%48
PCDH8 UR	CAAACTCTCAAAATCACACTCTTTAC	55°C	%35

- Primerler metile ve anmetile olarak methprimerdan tasarlandıktan sonra Sentegen firmasına sipariş verilmiştir.
- Kurutulmuş (liyofilize) halde gelen primerler stok haline gelmeleri için 100 µL stok µL TE başlıklı kolonda belirtilen miktar kadar nuclease free su ile çözülmüştür.
- 20 µL forward primer 20 µL reverse primerden alınarak üzerine 200 µL dH_2O eklenip çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.7 Real Time PCR

DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemi olan Real Time PCR ‘da çift iplikli DNA ya bağlandığında floresan sinyal veren Syber Green kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı ölçülmüştür.

Gerekli tüm materyaller aşağıda belirtilen miktarlarda bir araya getirilerek reaksiyon başlatılmıştır.

Tablo 3.5 : Real Time PCR bileşenleri.

Bileşen	Miktar (µL)
Eurogreen 2X qPCR master mix	7.5 µL
Forward Primer	0.45 µL
Reverse Primer	0.45 Ml
H_2O	6.05 µL
DNA	1 mL

PCR reaksiyon döngüleri Tablo 3.6 da gösterilmiştir.

Tablo 3.6 : Real Time PCR reaksiyon döngüsü.

Sıcaklık (°C)	Süre	
95°C	10 dk	
95°C	10 sn	39 Tekrar
59°C	20 sn	
60°C	20 sn	
4°C	∞	

3.8 İstatistiksel Analizler

Real Time PCR sonucu dikkate alınarak metilasyon durumu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler "SPSS 13,0 for Windows" programı ile analiz edilerek incelenmiş olup $p>0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamsız, $p<0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Hastalara Ait Bulgular

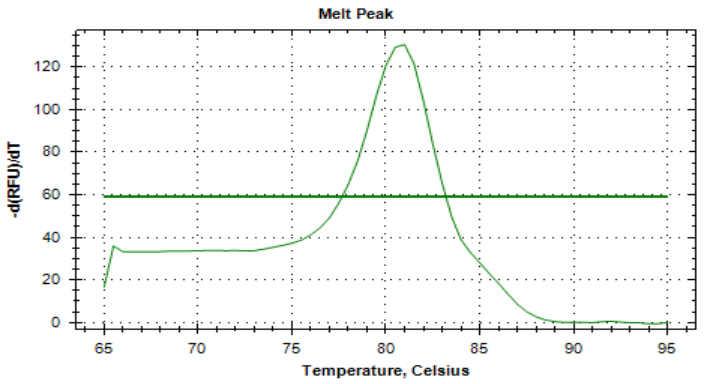
Bu çalışmada; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan hastalar arasından tarama yapılarak çalışma grubumuza uygun 11 RHK'li hastanın normal ve tümörlü dokularından toplam 22 doku bloğu seçilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen RHK tanısı konmuş 11 hastanın 9'u (%81,8) erkek, geri kalan 2'si (%18,2) ise kadındır.

4.2 DNA Kantitasyon Sonuçları

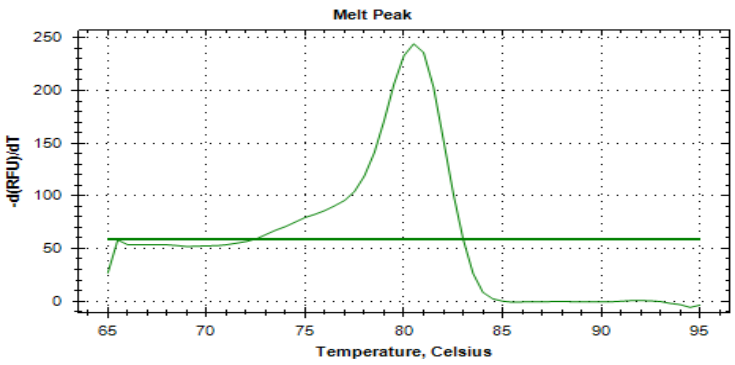
RHK hastalarına ait parafine gömülü tümörlü doku ve normal doku örneklerinden toplam 22 genomik DNA izolasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. DNA örneklerinin konsantrasyonları ölçüldüğünde normal DNA konsantrasyonu ortalaması 70,83 µg/ml ve tümörlü DNA konsantrasyonu ortalaması 60,21 µg/ml olarak tespit edilmiştir. İzolasyon aşaması sonrası bisülfit modifikasyonuna hazırlık aşamasında elde edilen genomik DNA distile su ile seyreltilerek konsantrasyonları eşitlenmiştir.

4.3 BNC1 Genindeki Metilasyon Durumu

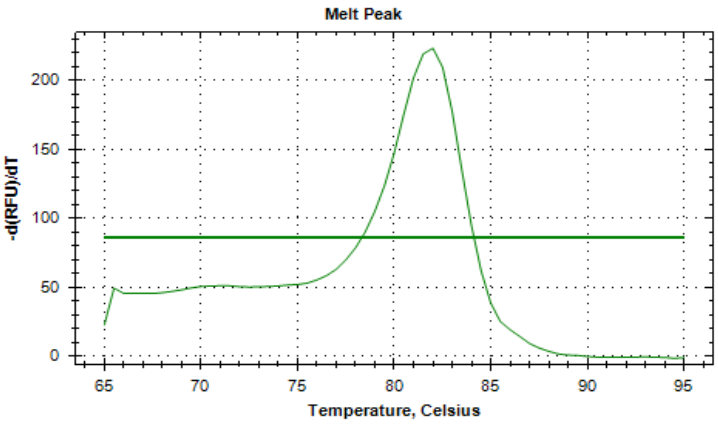
Referans gen BNC1 kullanılarak yapılan real-time PCR analizi sonucu p değeri 0,009 olarak belirlenerek istatiksel olarak anlamlı bir değer bulunmuştur.



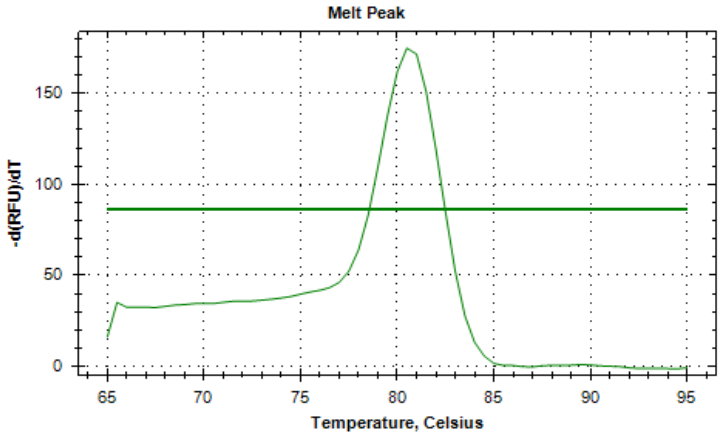
Şekil 4.1 : BNC1 geni metile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi.



Şekil 4.2 : BNC1 geni anmetile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi.



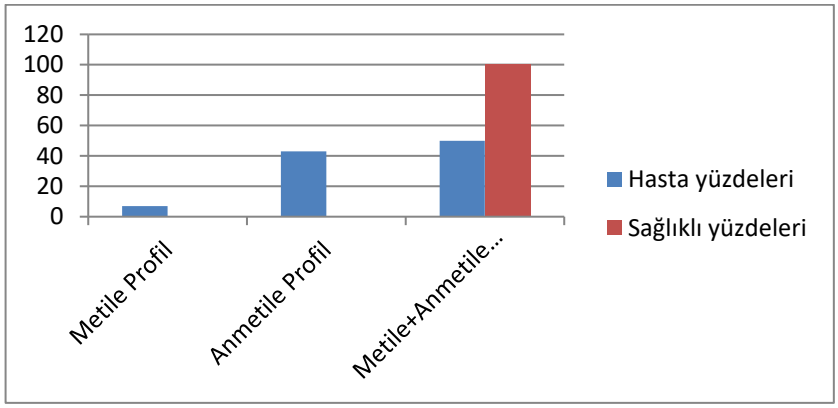
Şekil 4.3 : BNC1 geni metile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi.



Şekil 4.4 : BNC1 geni anmetile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi.

Tablo 4.1 : BNC1 geni için hasta ve kontrol dokularındaki metilasyonun yüzdelik dağılımları.

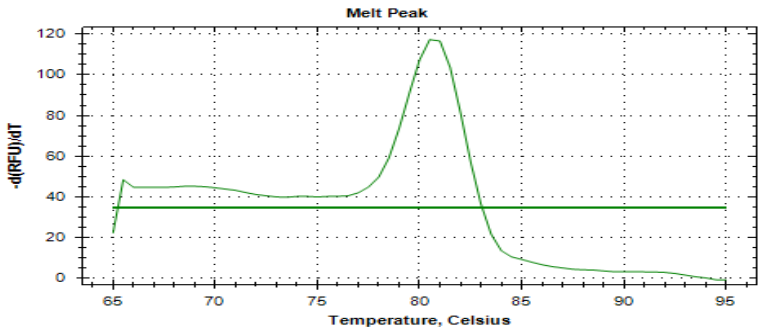
BNC1	Hasta	Kontrol
Metile	%0	% 7,1
Anmetile	%0	%42,9
Metile+Anmetile	%100	%50
Toplam	%100	%100



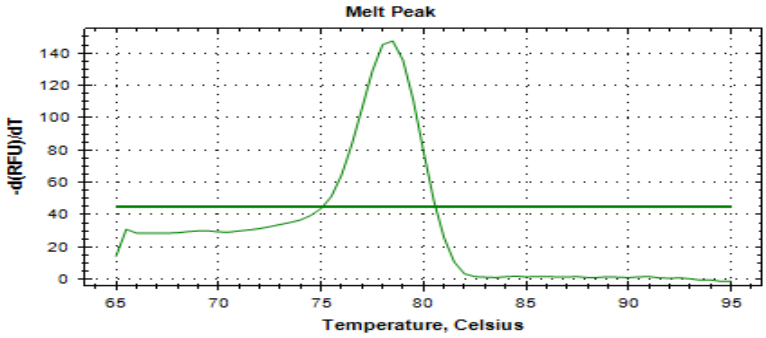
Şekil 4.5 : Tümör ve sağlıklı dokuya göre BNC1 geni için metilasyon dağılımları.

4.4 SCUBE3 Genindeki Metilasyon Durumu

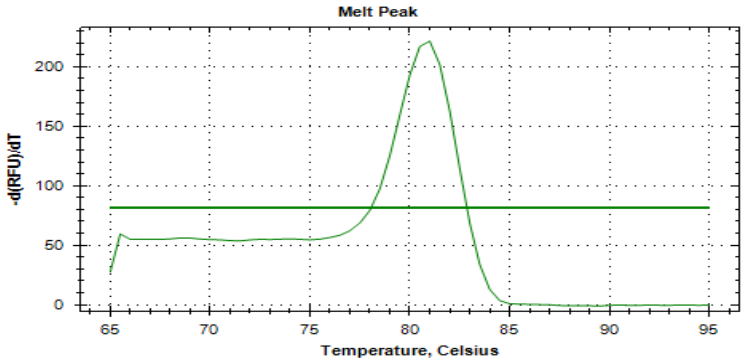
Referans gen SCUBE3 kullanılarak real-time PCR analizi sonucu için p değeri 0,671 olarak belirlenerek istatiksel olarak anlamlı bir değer bulunamamıştır.



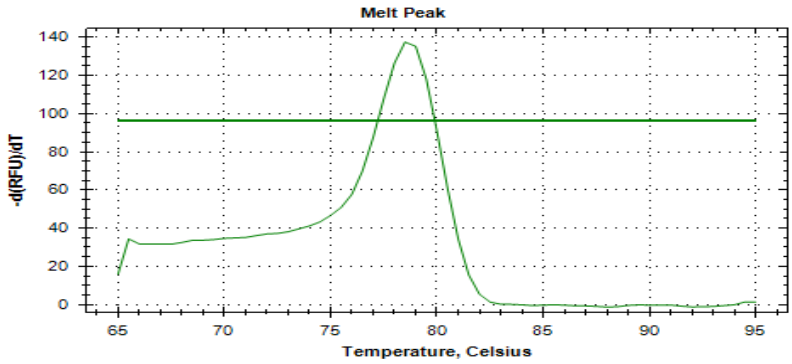
Şekil 4.6 : SCUBE 3 geni metile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi.



Şekil 4.7 : SCUBE 3 geni anmetile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi.



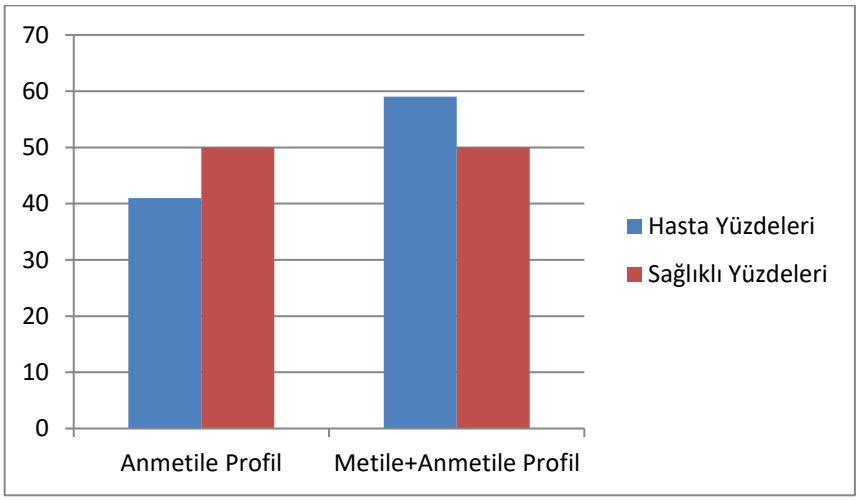
Şekil 4.8 : SCUBE3 geni metile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi.



Şekil 4.9 : SCUBE3 geni anmetile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi.

Tablo 4.2 : SCUBE3 geni için hasta ve kontrol dokularındaki metilasyonun yüzdelik dağılımları.

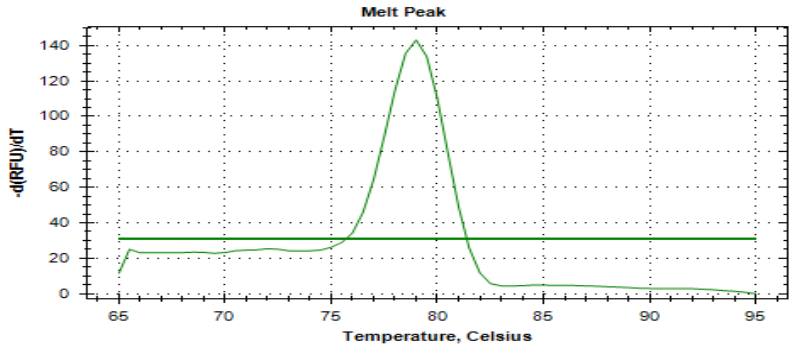
SCUBE3	Hasta	Kontrol
Anmetile	%41,7	%50
Metile+Anmetile	%58,3	%50
Toplam	%100	%100



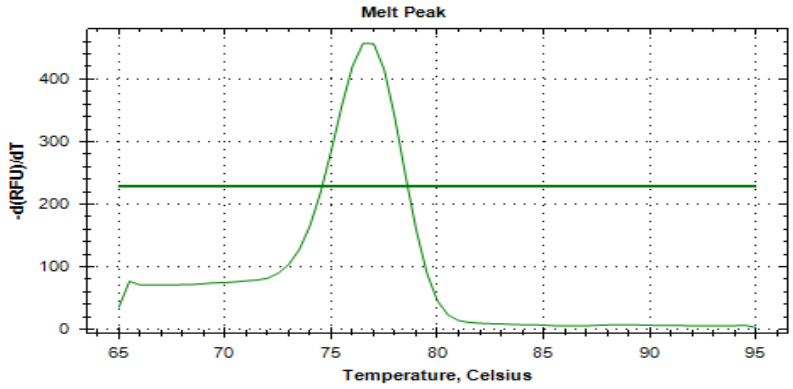
Şekil 4.10 Tümör ve sağlıklı dokuya göre SCUBE3 geni için metilasyon dağılımları.

4.5 SFRP1 Genindeki Metilasyon Durumu

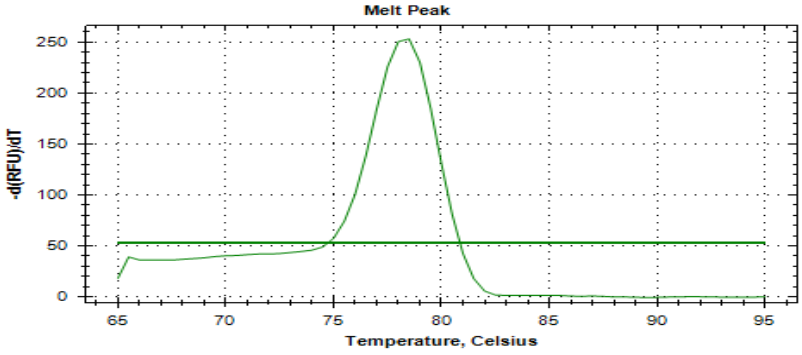
Referans gen SFRP1 kullanılarak real-time PCR analizi sonucu p değeri 0,135 olarak belirlenerek istatiksel olarak anlamlı bir değer bulunamamıştır.



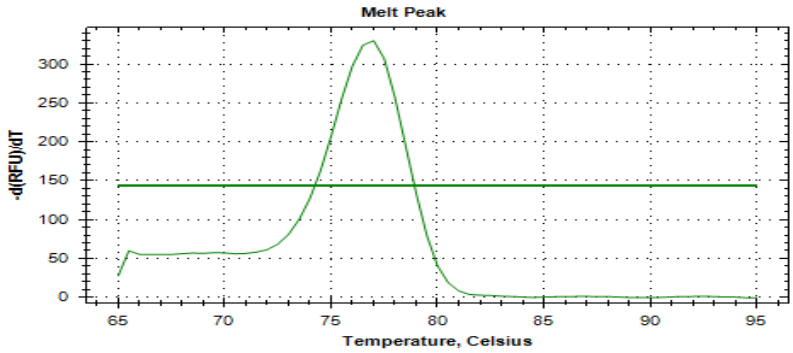
Şekil 4.11 : SFRP1 geni metile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi.



Şekil 4.12 : SFRP1 geni anmetile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi.



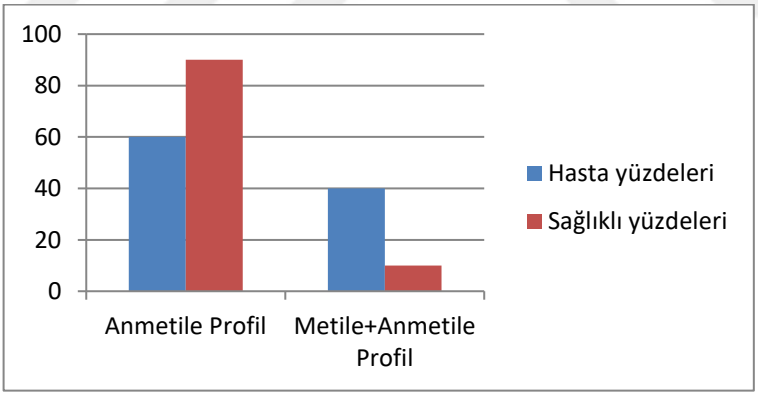
Şekil 4.13 : SFRP1 geni metile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi.



Şekil 4.14 : SFRP1 geni anmetile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi.

Tablo 4.3 : SFRP1 geni için hasta ve kontrol dokularındaki metilasyonun yüzdelik dağılımları.

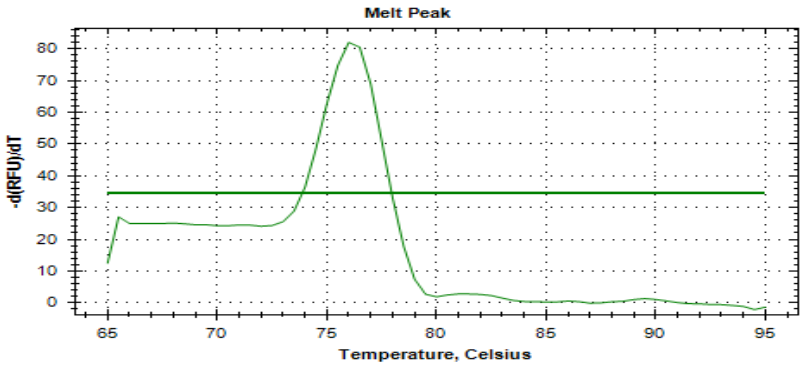
SFRP1	Hasta	Kontrol
Anmetile	%60	%91,7
Metile+Anmetile	%40	%8,3
Toplam	%100	%100



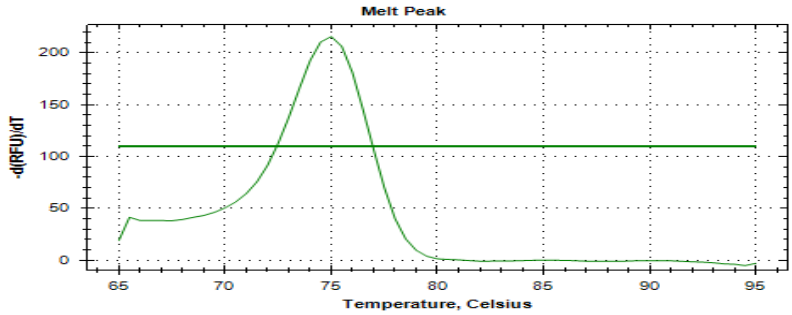
Şekil 4.15 : Tümör ve sağlıklı dokuya göre SFRP1 geni için metilasyon dağılımları.

4.6 PCDH8 Genindeki Metilasyon Durumu

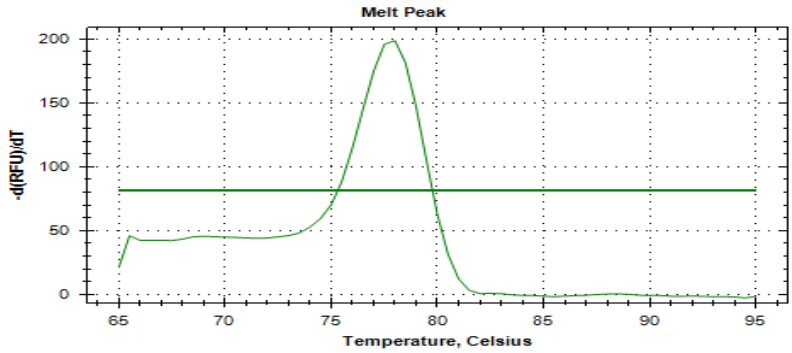
Referans gen PCDH8 kullanılarak real-time PCR analizi sonucu p değeri 0,680 olarak belirlenerek istatiksel olarak anlamlı bir değer bulunamamıştır.



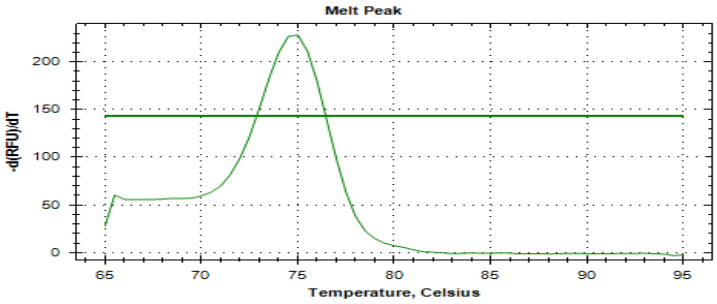
Şekil 4.16 : PCDH8 geni metile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi.



Şekil 4.17 : PCDH8 geni anmetile sağlıklı doku Real Time PCR erime eğrisi.



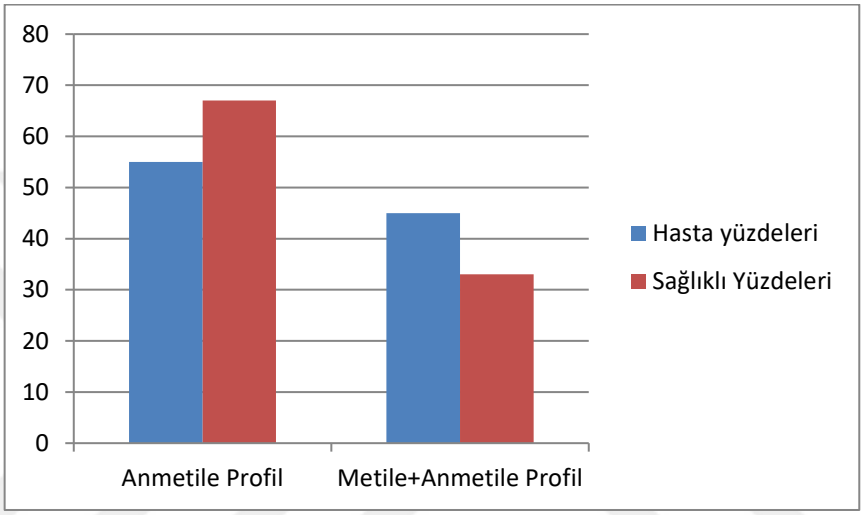
Şekil 4.18 : PCDH8 geni metile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi.



Şekil 4.19 : PCDH8 geni anmetile hasta örneği Real Time PCR erime eğrisi.

Tablo 4.4 : PCDH8 geni için hasta ve kontrol dokularındaki metilasyonun yüzdelik dağılımları.

PCDH8	Hasta	Kontrol
Anmetile	%54,5	%66,7
Metile+Anmetile	%45,5	%33,3
Toplam	%100	%100



Şekil 4.20 : Tümör ve sağlıklı dokuya göre PCDH8 geni için metilasyon dağılımları.

Bu çalışmada RHK hastalarına ait doku örneklerini sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda referans genler PCDH8, SCUBE3 ve SFRP1 için yapılan real-time PCR analizi sonucu p değeri 0,05'ten büyük olarak belirlenerek istatiksel olarak anlamlı bir değer bulunamamıştır. Diğer referans gen BNC1 için ise p değeri 0,05'ten küçük olarak belirlenmiştir ve bulunan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu çalışmamıza benzer olarak yapılan çalışmalardan bir tanesi Peters I. ve arkadaşlarının 18 Renal Hücreli Karsinoma hastasında aday tümör baskılayıcı genlerinin metilasyon seviyelerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmadır. Yaptıkları çalışma sonucunda CST6 ve LAD1 genlerindeki hipermetilasyonun antianjiyojenik tedavi alan mRHK hastalarında sağ kalım ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir [34].

Peters ve Dubrowinskaja (2014), 18 Renal Hücreli Karsinoma hastasında bazı tümör baskılayıcı genlerinin metilasyon seviyelerini belirlemeye yönelik yaptıkları

çalışmalarda CST6 ve LAD1 genlerindeki hipermetilasyonun antianjiyojenik tedavi alan mRHK hastalarında sağ kalım ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir [34].

Sharanjot ve ark. SFRP1‘ in RHK dahil çeşitli malignitelerle ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir [35].

Morris vd. (2011), Renal Hücreli Karsinomda metillenmiş ve susturulmuş genleri tanımlamak için bir genom stratejisi kullanmışlardır.

9 RHK tümörü ve 3 normal böbrek dokusu örnekleri üzerinde metillenmiş 56 aday tümör baskılayıcı genden 9 geni teyit etmişlerdir; SCUBE3 metilasyonunun kanser ölüm veya tekrar riski ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [36].

Morris vd. yaptıkları çalışmalar sonucunda WNT yolağı inhibitörlerinin, RHK vakalarında epigenetik olarak inaktive edildiğini bildirilmişlerdir. SFRP1, SFRP2, SFRP4, SFRP5 ve Dickkopf (DKK1, DKK2 ve DKK3) genlerinin de renal hücreli kanserlerde sıklıkla metillendiği belirtilmiştir [36].

Koen Dreijerink vd. (2001), aday tümör baskılayıcı bir gen olan RASSF1A’nın hipermetilasyon düzeyini RHK hastalarında incelemişler ve 43 primer tümörün 39’unda RASSF1A promotör bölgede hipermetilasyon tespit etmişlerdir. RASSF1A promotör bölgesindeki metilasyonu sonucuna bağlı olarak mRNA transkripsiyonunun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir [37].

Makoto Suzuki vd. (2004), Metilasyon spesifik PCR yöntemi ile 35 akciğer kanseri hücre hattı ve toplam 167 primer tümörlü bireyde RPRM aday tümör baskılayıcı gen ifadesini incelemişlerdir. Bu genin metilasyon analizi sonucunda, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) hücre hatlarında %32, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hücre hatlarında %6 ve primer tümörlerde %31 oranında metilasyon tespit etmişlerdir. Akciğer kanserlerinde RPRM genindeki hipermetilasyonun sıklığının yüksek olduğu ve bunun p53 bağımsız bir şekilde gerçekleştiği sonucuna varmışlardır [38].

Van Vlodrop vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, 185 berrak Renal Hücreli Karsinom doku örneği kullanılmıştır. Bu çalışmada GREM1 geninin promotör bölgesinin yüksek seviyede metillenmiş olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu promotör bölge hipermetilasyonun tümörün çapı, derecesi, evresi ve prognozuyla ilişkili olduğu da tespit edilmiştir [39].

Yi J.M vd. (2013), pankreas kanserinde ADAMTS1 ve BNC1 tümör baskılayıcı genlerinin metilasyon analizini gerçekleştirmişlerdir.

Çalışmada 173 hastadan metilasyon analizi yapılmıştır ve pankreas kanserlerini tespit etmek için bir nanoparçacık özellikli MOB (Methylation On Beads) teknolojisi kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda, pankreas kanserli hastalarda BNC1 geninde %92 ve ADAMTS1 geninde %68 oranında metilasyon görülmüştür. Hipermetilasyonun erken evre pankreas kanserlerini tespit etmek için biyolojik marker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [40].

Bu tez çalışmasında BNC1, PCDH8, SCUBE3 ve SFRP1 genlerinin metilasyon durumları Real Time PCR yapılarak incelenmiştir. Daha sonra SPSS yardımıyla hasta ve kontrol dokuları arasındaki metilasyon dağılımlarına bakılmış ve p değerleri hesaplanmıştır. BNC1 geni için yapılan hesaplamada p değeri 0,009 olarak bulunmuştur ve bu sonuç BNC1 geninin metilasyon durumunda hasta ve kontrol dokuları arasında anlamlı bir fark olduğunu belirtmektedir. PCDH8, SCUBE3 ve SFRP1 genlerinde ise hesaplanan p değerleri 0,05'den büyük bulunmuştur ve bu sonuç bu genler için hasta ve kontrol dokuları arasında anlamlı bir fark olmadığını belirtmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından patolojik değerlendirme ve teşhis koyma amacıyla hastalardan temin edilmiş ve arşivlenmiş parafine gömülü doku blokları çalışmada kullanılmıştır. Çalışmamıza dahil edilen RHK tanısı konmuş 11 hastanın 9'u erkek, geri kalan 2'si ise kadındır. Seçilen örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır ve izole edilen DNA'lara bisülfit dönüşümü yöntemi uygulanmıştır. BNC1, PCDH8, SCUBE3 ve SFRP1 genleri için promotör bölgelere özel metilasyon spesifik primerler tasarlanmıştır ve Real Time PCR yöntemiyle kantitatif olarak analiz yapılmıştır. BNC1, PCDH8, SCUBE3 ve SFRP1 genlerinde hasta ve kontrol dokuları arasındaki metilasyon dağılımları hesaplanmıştır.

Sonuç olarak PCDH8, SCUBE3 ve SFRP1 genlerinde anlamlı bir değer bulunamamıştır. Ancak BNC1 geninde hasta ve kontrol dokuları arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Bu sonuç literatürdeki benzer çalışmalar ile de uyumluluk göstermektedir. BNC1 geni insanlarda zinc finger protein basonuclini kodlar. Oositlerin farklılaşması ve embriyoların erken gelişiminde rol oynayabilir.Farklı tümör tiplerinde, transkripsiyon faktörü olan basonuclinin anormal ekspresyonu bildirilmiştir. BNC1 promotör metilasyonu ve bununla ilişkili olarak genin susturulması meme tümörlerinin beyne metastazında sık görülmüştür.Birincil meme tümörlerinin beyin metastazlarına ilerlemesinde, BNC1'in geniş bir hedef aralığına sahip bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynayabileceğini gösterilmiştir. BNC1 geninin bu özellikleri de çalışmamızı doğrular niteliktedir. Yaptığımız çalışmada kullanılan vaka sayısı sınırlı olması sonuçların kesinliğini etkileyebilir. Daha fazla örnekle ve parafin dokuya gömülü olmayan taze dokular ile çalışmak daha kesin sonuçlar alınmasını mümkün kılacaktır. Ayrıca renal karsinoma alt tiplerinin sadece bir tanesinin spesifik olarak seçilip bu şekilde çalışmalar yapılması da homojen bir dağılım sağlayacağı için daha doğru sonuçlar elde edilmesine imkan tanıyacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, RL., Torre LA. ve Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 68(6): p. 394-424.

[2] Bonsib SM. (2008). Embryologic development and normal structure. 2nd edition. Mosby Elsevier Indianapolis. Chapter 1: 2-12.

[3] Remzi M, Özsoy M, Klingler HC. (2006). Aresmall renal tumors harmless? stopathologic features according to tumors 4 cm. or less in diameter. *J Urol*. 176, 896-899.

[4] Sverre, H. ve Mitelman, F. (2015). Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells. Wiley-Blackwell.

[**5] Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M,, Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki, K.** (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 343(2), 78-85.

[6] Oláh, E. (2005). Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination." The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 16(2).

[7] Kleinsmith, L.J. (2006). Principles of Cancer Biology. Benjamin Cummings, 352, Michigan

[8] Martinez et al., J. D., Parker, M.D., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A., Gerner, E.W. (2003). Molecular Biology of Cancer. John Wiley&Sons, Inc. Chapter 1, 1-50.

[9] Papadopoulos I, Weichert-Jacobsen K, Sprenger E, Wacker H.H. DNA Content and the Proliferation Marker Ki-67 as Prognostic İndicators in Renal Cell Carcinoma.Urol Int 1994; 53:181-185.

[10] Liang Cheng, Gregory T. MacLennan. (2008). Neoplasms of the kidney. 2nd edition. Mosby Elsevier Indianapolis. Chapter 2: 82-112.

[11] Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Eskelinen M, Syrjänen K. Prognostic Value of Ki-67 Expression in Renal Cell Carcinoma. Eur Urol 1997;31:350-355.

[12] Oyasu RM (1998). Renal cancer: Histologic classification update. *Int J Clin Oncol*. 3, 125-133.

[13] Storkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K. (1997). Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*. 80, 987-989.

[14] Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. (2009). Update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol*. **16(5)**, 432-43.

[15] Güçer H. (2009). Renal Hücreli (Berrak Hücreli Tip) karsinomlarda COX-2 Ekspresyonu ve mikrodamar yoğunluğunun klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırılması. *Turkish Journal of Pathology*. **25(2)**, 13-19.

[16] Grignon DJ, Che M. (2005). Clear cell renal cell carcinoma. *Clin Lab Med*. **25**, 305–16.

[17] Eble JN. (2003). Renal neoplasia. Modern Surgical Pathology. pp. 1065-1101.

Kleinsmith, L.J. (2006). Principles of Cancer Biology. Benjamin Cummings, 352, Michigan.

[18] Yörükoğlu H, Köseoğlu H, Tuna B, Mungan M, Kistik Nefroma Olgu Sunumu Kocatepe Tıp Dergisi 9 (2008): 15-17

[19] Tokuda N, Naito S, Matsuzaki O, Nagashima Y, Ozono S, Igarashi T. (2006). Japanese Society of Renal Cancer. Collecting duct (Bellini duct) renal cell carcinoma: a nationwide survey in Japan. *J Urol*. **176**, 40-43.

[20] Sophie C Joosten, Ivette AG Deckers, Maureen J Aarts, Ann Hoeben, JoepGvan Roermund, KimMSmits,Veerle Melotte, Manon van Engeland & Vivianne C Tjan-Heijnen, (2017) Prognostic DNA methylation markers for renal cell carcinoma: a systematic review *Epigenomics* (2017) 9(9), 1243–1257

[21] Morris MR, Ricketts C, Gentle D *et al.* Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. *Oncogene* 29(14), 2104–2117 (2010).

[22] Ricketts CJ, Hill VK, Linehan WM. Tumor-specific hypermethylation of epigenetic biomarkers, including SFRP1, predicts for poorer survival in patients from the TCGA kidney renal clear cell carcinoma (KIRC) project. *PLoS ONE*, 9(1), e85621 (2014).

[23] Lin YL, Wang YL, Fu XL, Ma JG. Aberrant methylation of PCDH8 is a potential prognostic biomarker for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Med. Sci. Monit.* 20, 2380–2385 (2014).

[24] Kouzarides T. (2007).Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128,693-705.

[25] Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC ve ark. (2009) DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet*. 41, 240-5.

[26] Melki, J. and Clark, S. (2002). DNA methylation changes in leukaemia. *Seminars in Cancer Biology*. 12, 347 357.

[27] Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 22(15), 2990-7.

[28] Peter A. Jones and Daiya Takai. (2001). The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Scince*. 293,1068-1070.

[29] Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2007; 10: 576-81.

[30] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K. MethyLight: a highthroughput assay to measure DNA methylation. Nucl Acids Res 2000; 28: E32.

[31] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNAstrands. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 1827-31.

[32] Gupta R, Nagarajan A, Wajapeyee N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. BioTechniques 2010; 49: 3-13.

[33] Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2007; 10: 576-81.

[34] Peters I, Dubrowinskaja N, Abbas M, Seidel C, Kogosov M, Scherer R, Gebauer K, Merseburger AS, Kuczyk MA, Grünwald V, Serth J. (2014). DNA methylation biomarkers predict progression-free and overall survival of metastatic renal cell cancer (mRCC) treated with antiangiogenic therapies. *Plos One.* 9(3), e91440.

[35] Sharanjot Saini, Jan Liu, Soichiro Yamamura, Shahana Majid, Kazumori Kawakami, Hiroshi Hirata, and Rajvir Dahiya. Functional Significance of Secreted Frizzled-Related Protein 1 in Metastatic Renal Cell Carcinomas. Department of Urology

[36] Morris MR, Ricketts CJ, Gentle D, McRonald F, Carli N, Khalili H, Brown M,Kishida T, Yao M, Banks RE, Clarke N, Latif F, Maher ER. (2011). Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 30, 1390-401.

[37] Koen Dreijerink, Eleonora Braga, Igor Kuzmin, Laura Geil, Fuh-Mei Duh, Debora Angeloni, Berton Zbar, Michael I. Lerman, Eric J. Stanbridge, John D. Minna, Alexei Protopopov, Jingfeng Li, Vladimir Kashuba, George Klein, and Eugene R. Zabarovsky (2001). The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *PNAS*. 98,13

[38] Makoto Suzuki,Hisayuki Shigematsu,Takao Takahashi,Narayan Shivapurkar,UbaradkaG. Sathyanarayana,Toshihiko Iizasa,Takehiko Fujisawa,Adi F. Gazdar. Aberrant methylation of Reprimo in lung cancer. *Elsevier*. **47**, 309-314.

[39] Van Vlodrop IJ, Schouten LJ, Soetekouw PM, de Bruine AP and van Engeland M. (2008). Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochim Biophys Acta*. **85**, 133-155.

[40] Yi JM, Guzzetta AA, Bailey VJ, Downing SR, Van Neste L, Chiappinelli KB, Keeley BP, Stark A, Herrera A, Wolfgang C, Pappou EP, Iacobuzio-Donahue CA, Goggins MG, Herman JG, Wang TH, Baylin SB, Ahuja N. (2013). Novel methylation biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 19(23), 6544-55.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Merve BALİ
Doğum Tarihi ve Yeri : 20.01.1995 / İstanbul
E-posta : balimerve95@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **İnternational 13th Balkan Congress of Human Genetics 2018** (Poster sunumu)