

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Over Kanserli Hastalarda ve Sağlıklı Bireylerde
PRDM6 Geninin Promotor Metilasyonlarının Karşılaştırılması

NUMAN CÖMERT

**DANIŞMAN
DR.ÖĞR. ÜYESİ ŞEREF BUĞRA TUNÇER**

**İKİNCİ DANIŞMAN
PROF.DR. HÜLYA YAZICI ÖZBEK**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2023

TEZ ONAYI

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



BEYAN

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

NUMAN CÖMERT

İTHAF

Değerli aileme ithaf ediyorum



TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Osman Bülent ZÜLFİKAR'a, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Zeynep KARAKAŞ'a, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Hatice Bilge BECERİR'e,

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım ve tez çalışmam boyunca her türlü olanağı sunan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Şeref Buğra TUNÇER ve Prof. Dr. Hülya YAZICI'ya,

Kanser Genetiği Bilim dalında görev alan Dr. Özge ŞÜKRÜOĞLU ERDOĞAN, Dr. Betül ÇELİK, Dr. Seda KILIÇ ERCİYAS, Dr. Zübeyde YALNIZ KAYIM ve Arzu BURNUVA'ya,

İstatistiksel analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Özge PASİN'e,

Tez çalışmam boyunca katkı ve destekleri için Kanser Genetiği Programında Doktora yapan Ahmet DİNÇ'e,

Son olarak yüksek lisans eğitimim boyunca beraber çalışmaktan keyif aldığım Ayşegül GÖNÇ ve Aydan ALİZADA'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38160

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	iii
BEYAN.....	iv
İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Geçmişten Günümüze Kanser.....	3
2.2. Over Biyolojisi.....	3
2.3. Over Kanseri	4
2.3.1. Over Kanseri ve Genetik.....	6
2.3.2. Over Kanserinin Alt Tipleri	8
2.4. Epigenetik Biyobelirteçler	8
2.4.1. Kanser ve Biyobelirteç İlişkisi.....	9
2.4.2. Over Kanseri Tanısında ve Tedavisinde Biyobelirteçler	10
2.5. Biyobelirteç Olarak DNA Metilasyonu	11
2.6. DNA Metilasyonu Analiz Yöntemleri	13
2.6.1. Enzim Kesme Yöntemi ile Metilasyon Analizi	14
2.6.2. Over Kanserinde Promotor Bölge DNA Metilasyonu	15
2.7. <i>PRDM6</i> Gen Ailesi ve Kanser İle İlişkisi	15
2.7.1. <i>PRDM6</i> Geni.....	17
2.7.2. <i>PRDM6</i> Geninin Biyolojik İşlevi.....	17
2.7.3. <i>PRDM6</i> Geninin Kanserdeki Rolü.....	18
2.7.4. Biyobelirteç Olarak <i>PRDM6</i> Geni	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Gereçler.....	20

3.1.1. Kitler	20
3.1.2. Cihazlar	21
3.2. Yöntemler	21
3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu	21
3.2.2. DNA İzolasyonu	22
3.2.3. Real-Time qPCR	22
3.2.4. İstatiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA	35
KAYNAKLAR	38
FORMLAR	44
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	48
ÖZGEÇMİŞ	49

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.Over kanserinin yaşa göre dağılımı	6
Tablo 2.2.Herediter over kanseri ve meme kanseri ile ilişkili genler	7
Tablo 2.3.DNA hipermetilasyonu görülen bazı genler ve hücrel fonksiyonları	12
Tablo 2.4.PRDM proteinlerinin çeşitli kanser yolakları ile ilişkisi	16
Tablo 3.1. <i>PRDM6</i> geni forward ve reverse primerin nükleotid dizilimi.....	20
Tablo 3.2.Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	21
Tablo 3.3.Real-time PCR test reaksiyonu.....	23
Tablo 3.4.Real-time PCR referans reaksiyonu	23
Tablo 3.5.Real-time PCR aşamaları	24
Tablo 4.1. Çalışma gruplarına ait nitel değişkenlerin sayı ve yüzdeleri.....	28
Tablo 4.2.Over kanserli hasta grubuna ait nicel değişkenlerin tanımlayıcı istatistik değerleri	29
Tablo 4.3.Çalışma gruplarında menopo ve yaş nitel değişkenlerinin metilasyon durumuna göre dağılımları.....	30
Tablo 4.5.Over kanserli hasta grubuna ait nicel değişkenlerin istatistiksel sonuçları	32
Tablo 4.6.Over kanserli hasta grubunda ilk CA125 ve son CA125 değişkenlerinin anlamlılık değerleri	32
Tablo 4.7.Sağlıklı kontroller ve benign kitlelere sahip kişilerin metilasyon durumuna göre istatistiksel analizi.....	33
Tablo 4.8.Over kanserli hastalar ve benign kitlelere sahip kişilerin metilasyon durumuna göre istatistiksel analizi.....	33
Tablo 4.9.Over kanserli hastalar ve sağlıklı kontrollerin metilasyon durumuna göre istatistiksel analizi.....	33
Tablo 4.10.Çalışma gruplarının metilasyon ortalamaları bakımından anlamlılık değerleri	34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.Kadın üreme sistemi	4
Şekil 2.2. Sağlıklı ve kanserli overin şematik hali.....	5
Şekil 2.3.Sitozin bazının metillenmesi	11
Şekil 2.4.DNA metilasyon analiz yöntemleri	14
Şekil 2.5.PRDM proteinleri	16
Şekil 2.6.İnsada <i>PRDM6</i> 'nın 3 farklı izoformlarının çizimi	17
Şekil 4.1. Over kanserli hastalara ait periferik kan örneklerinde <i>PRDM6</i> geninin metilasyon durumu	26
Şekil 4.2.Overlerinde benign kitlelere sahip kişilere ait periferik kan örneklerinde <i>PRDM6</i> geninin metilasyon durumu	27
Şekil 4.3.Sağlıklı kontrol grubunun periferik kan örneklerinde <i>PRDM6</i> geninin metilasyon durumu	27

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- BWS:** Beckwith-Wiedemann Sendromu
- C:** Sitozin
- CA-125:** Kanser Antijeni 125
- CpG:** Sitozin-fosfat-Guanin
- Ct:** Döngü Eşiği
- CYP:** Sitokrom P450 Protein
- DNA:** Deoksiribo Nükleik Asit
- DNMT:** DNA Metiltransferaz
- EDTA:** Etilendiamin Tetraasetik Asit
- EGFR:** Epidermal büyüme faktörü reseptörü
- G:** Guainidin
- HE4:** İnsan Epididim Proteini 4
- HMT:** Histon lizin metiltransferaz
- HNPCC:** Herediter nonpoliposis kolorektal kanser sendromu
- HP1:** Heterokromatin protein 1
- HIC1:** Hypermethylated in cancer 1 (Kanserde hipermetillenmiş protein 1)
- IGH:** Immunoglobulin Heavy Locus (İmmünoglobulin ağır lokusu)
- mRNA:** Mesajcı RNA
- NaHSO₃:** Sodyum Bisülfid
- NCI:** Ulusal Kanser Enstitüsü
- NGS:** Yeni Nesil Dizileme
- NNMT:** Nikotinamid-N-metiltransferaz
- MUC16:** Müsin 16
- MZ:** Monozigot
- PRISM:** Düz kasta PR alanı
- RMI:** Risk of Malignancy Index
- RNA:** Ribo Nükleik Asit
- %:** Yüzde
- µL:** Mikrolitre

ÖZET

CÖMERT, N. (2023). Over Kanserli Hastalarda ve Sağlıklı Bireylerde *PRDM6* Geninin Promotor Metilasyonlarının Karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2023.

Over kanseri, dünyada kadınlarda en sık görülen 8. kanserdir. 2020 yılında kanser ile ilişkili ölümlerin %4,7'sinin sebebidir. Over kanserinde erken teşhis, tedavinin seyrinde ve başarısındaki en önemli faktördür. Epigenetik gelişmeler kanser genetiği alanına büyük katkılar sağlamış olup, bu epigenetik mekanizmalardan biri de DNA metilasyonudur. DNA metilasyonunun, karsinogenezin erken evrelerinde meydana gelmesinden dolayı, erken tanı amacıyla kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır. Bu çalışmada *PRDM6* geninin over kanserli hastalar, benign kitlelere sahip kişiler ve sağlıklı kontrol grubunda metilasyon düzeyleri araştırılmıştır. Çalışma İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'ne başvuran 93 over kanserli hasta, overin benign kitlelerine sahip 48 kişi ve 54 sağlıklı kontrol grubundan oluşan 195 kişi ile yapılmıştır. Çalışmaya katılan kişilerin periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve Real-Time PCR yöntemiyle kantitatif olarak örnekler arasındaki metilasyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Metilasyon analizinde %6 metilasyon bulgusu eşik değeri olarak kabul edilmiş, %6 ve altında olan örneklerde gen unmetile, %6 üzerinde olan örneklerde ise metile olarak değerlendirilmiştir. Bu analiz verilerine göre over kanserli hasta grubunun %78,49'unda *PRDM6* geni metile, %21,51'inde ise unmetile bulunmuştur. Overinde benign kitleye sahip olan kişilerin %75'inde *PRDM6* geni metile, %25'inde unmetile iken sağlıklı kontrol grubunun %38,88'sinde *PRDM6* geni metile, %61,12'sinde unmetile bulunmuştur. Over kanserli hastaların metilasyon düzeyleri, sağlıklı kontrol örneklerinin metilasyon düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir. Overinde benign kitlelere sahip kişiler ile sağlıklı kontrol örneklerinin metilasyon düzeyleri arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır. *PRDM6* geninin over kanserinde biyobelirteç olarak kullanılabilme ihtimali, gelecekte *PRDM6* metilasyon düzeylerinin over kanseri ile ilişkili mekanizmalardaki rolünün aydınlatılması ile ortaya çıkacaktır.

Anahtar Kelimeler: Over Kanseri, DNA metilasyon, Promotor, *PRDM6* geni

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38160

ABSTRACT

CÖMERT, N. (2023). Comparison of Promotor Methylations of PRDM6 Gene in Ovarian Cancer Patients and Healthy Individuals. İstanbul University, Institute of Health Science, Basis Oncology D. Master Degree Thesis. İstanbul.2023.

Over cancer is the eighth most common cancer in women in the world. It is responsible for 4.7% of cancer-related deaths in 2020. In over cancer, early diagnosis is the most important factor in the course of treatment and its success. Epigenetic developments have made major contributions to the field of cancer genetics, and one of these epigenetic mechanisms is DNA methylation. Because DNA methylation occurs in the early stages of carcinogenesis, it has the potential to be used for early diagnosis. In this study, the methylation levels of the *PRDM6* gene were studied in over-cancer patients, individuals with benign masses, and healthy control groups. The study was conducted with 93 over-cancer patients, 48 people with over-benign masses, and 195 people from 54 healthy control groups, who applied to the Istanbul University Institute of Oncology. DNA isolation from peripheral blood samples of participants was performed and methylation levels between samples were compared quantitatively using Real-Time PCR. In methylation analysis, 6% of the methylation findings were considered to be marginal, in samples of 6% and below, the gene was unmethyl, and in those of more than 6%, it was methyl. According to this analysis, 78,49% of patients with over cancer had methylated the *PRDM6* gene and 21,51% had unmethylated it. 75 per cent of those with the overall benign mass had the *PRDM6* gene methyl, 25 per cent had the unmethyl and 38,88 per cent in the healthy control group had the methyl and 61,12 per cent. The methylation levels of over-cancer patients have been statistically significantly higher than those of healthy control samples. There was no statistically significant difference between the methylation levels of individuals with generally benign masses and those of healthy control samples. The possibility that the *PRDM6* gene can be used as a biobudget in over cancer will emerge in the future with the illumination of the role of methylation levels in the mechanisms associated with over cancer.

Key Words: Overian Cancer, DNA methylations, Promotor, *PRDM6* gene.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.

Project No: 38160

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hem dünyada hem de ülkemizde kanser önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu sebeple kanser hastalığında sağ kalım oranlarını arttırmak amacıyla erken teşhis ve tanı için farklı politikaların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [1]. Erken teşhis ve tanı açısından sürenin önemli olduğu kanserlerden biri de over kanseridir. Over kanseri, dünyada kadınlarda en sık görülen 8. kanserdir ve yılda 314.000 kadına over kanseri tanısı koyulmaktadır [2]. Ülkemizde ise kadınlarda en sık görülen 7. kanserdir ve yılda 4.059 kadın yeni tanı almaktadır. Overleri oluşturan hücrelerde meydana gelen kontrolsüz bölünme ve çoğalma sonucunda over kanseri gelişebilmektedir [3]. Over kanseri üzerine yapılan çalışmalarda, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler bulunmuştur. Ayrıca çeşitli kromozom lokuslarında heterozigotluk kaybı olduğu da gösterilmiştir [4]. Tüm kanserlerde olduğu gibi over kanserininin oluşumunda, hem hücresel DNA dizi değişikliği hem de epigenetik yani DNA dizisinde değişiklik olmaksızın gen ifade örüntüsündeki değişiklikler büyük rol oynamaktadır [5].

Over kanseri vakalarının %70'inden fazlasına ileri evrede teşhis konulmaktadır. Over kanseri için prognoz değerlendirildiğinde hastaların %46'sında beş yıllık sağkalım oranı vardır. Prognoz tanı anındaki evre ile yakından ilişkilidir: Evre I veya II için beş yıl sonra sağkalım oranı > %70, evre III veya IV için sağkalım oranı %20-%40 arasındadır. Over kanseri tanısında belli başlı biyobelirteçler kullanılmaktadır. Yaygın olarak; HE4 ve CA125 biyobelirteçleri ön plana çıkmaktadır. Günümüze kadar over kanserini teşhis etmek için en etkili biyolojik teşhis aracı, CA125 ve HE4'ün kombinasyonudur [6]. Over kanseri vakalarında serum CA125 seviyesi yükselebilir ancak bu belirtecin over kanserinin erken evrelerinde duyarlılığı düşüktür. Menstrüasyon, gebelik, endometriozis ve peritonun enflamatuar hastalıkları gibi diğer fizyolojik veya patolojik durumlarda da CA125 seviyeleri artmaktadır [7].

Over kanserinin tanı ve teşhisinde DNA metilasyonu ile ilgili geçmiş yıllarda kısıtlı çalışmalar olsa da günümüzde yapılan pek çok güncel çalışma özellikle over kanserinde metilasyon konusuna odaklanmıştır. Son zamanlarda; *BRCA1*, *HOXA9*, *RASSF1A*, *SPARC* ve *HIC1* dahil olmak üzere bazı tümör baskılayıcı genlerdeki metilasyonunun over kanserinde önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir [8].

Over kanseri ile ilgili klinikteki en önemli zorluk erken dönemde spesifik ve güvenilir semptomların tespit edilememesinden dolayı tanının ancak geç evrelerde konulabilmesidir. İleri evrede tanı alan hastalarda tedaviye yanıt oranları azalmakta, nüks ve metastaz oranları ise artmaktadır. Bu sebeple hem tümör oluşumunun erken dönemlerinde hem de tedavi boyunca ortaya çıkan DNA metilasyon değişikliklerinin, over kanserinin erken teşhisi, hastalığın seyrinin tahmini ve tedavideki yanıt açısından biyobelirteç olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Over kanserinde hipometile veya hipermetile olarak belirlenen birçok gen tanımlanmıştır. Erdoğan ve arkadaşları tarafından biri sağlıklı diğeri over kanseri monozigotik ikizlerde (MZ) yapılan karşılaştırmalı çalışmada, *PRDM6* geninin promotor hipermetilasyonu, over kanseri ikizde belirlenmiştir. Aynı zamanda ilk defa *PRDM6* geni ile over kanseri arasında bir ilişkinin olduğu da yine bu çalışma sonucunda tespit edilmiştir [9]. *PRDM6* geninin kanserin hangi aşamalarında işlev gördüğü mekanizmaların aydınlatılmasıyla, *PRDM6* geninin çoklu tümör tiplerinde rol oynayan epigenetik düzenleyici olarak terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir [10].

Erdoğan ve ark. tarafından yapılan çalışmadan yola çıkılarak, çalışmamızda 93 over kanserli hasta, overin benign kitlelerine sahip 48 kişi ve 54 sağlıklı kontrolden alınan kan örneklerinde *PRDM6* geninin metilasyon profilleri değerlendirilmiş, *PRDM6* geninin over kanserinin tanısı açısından potansiyel bir biyobelirteç olma niteliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Geçmişten Günümüze Kanser

Kanser hastalığı, insanları etkileyen en önemli hastalıkların başında gelmektedir. Kanserin tarihçesine bakıldığında, kayıtlarda M.Ö. 3000 yılına dek uzanan bir tarihi olduğu bilinmektedir. Tarihin geçmiş birçok dönemlerinde kanser hastalığı ile ilgili çalışmalara odaklanılmıştır. Nitekim Galen ve Hipokrat gibi doktorlar tarafından kanser hastalığı ilk kez ‘cancer’, ‘carcinus’, ‘oncos’ gibi terimler ile isimlendirilmiş ve tanımlanmaya çalışılmıştır [11].

Dünyada kanser ile ilgili vakaları kayıt altına almak ve veri toplama işlemleri 1728 yılında Londra’da başlamış ve sonrasında gelişmiş pek çok ülkede veri toplama ve raporlama işlemlerine devam edilmiştir. Güncel olarak tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm sebebi olarak kanser hastalığı ikinci sırada yer almaktadır. 2013 yılında dünya genelinde 14,9 milyon kanser vakası içinde 8,2 milyon ölüm raporlanmıştır [12]. Bu sonuçlar sağ kalım oranının ne kadar düşük olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

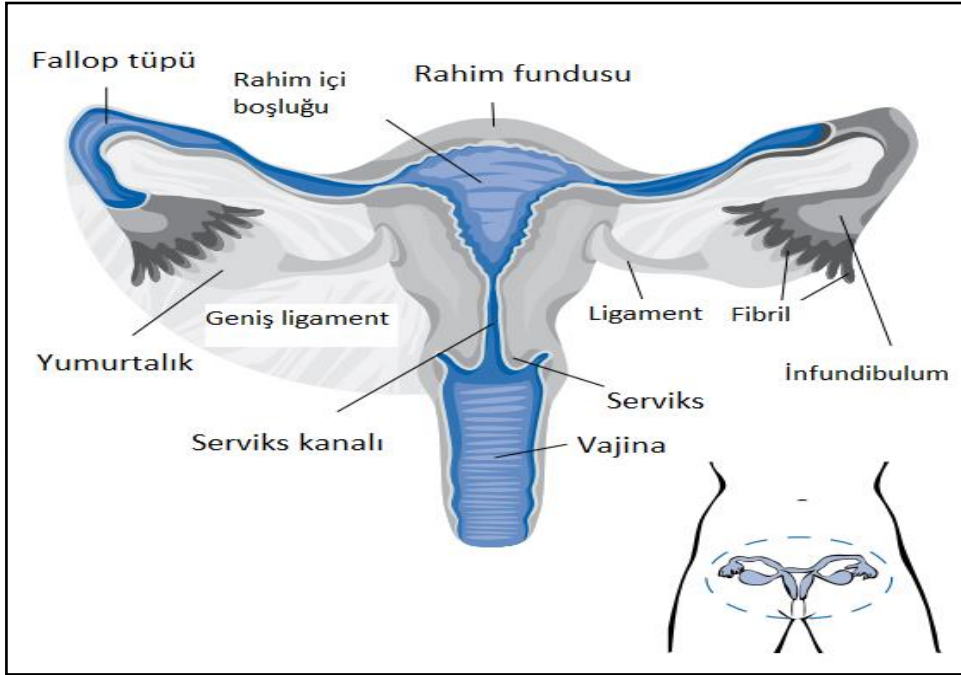
2020 yılında, kanser tanı ve tedavisi, koronavirüs hastalığı (COVID-19) pandemisinden olumsuz etkilenmiş, sağlık hizmeti sağlayan birimlerin kapanması ve COVID-19’a maruz kalma korkusu nedeniyle bakıma erişimin azalması, tanı ve tedavide gecikmelere neden olmuştur. Bu durum kısa vadede kanser insidansında düşüş olarak belirlense de ardından ileri evre kanser hastalığında bir artışa ve sonuç olarak mortalitede artışa neden olmuştur [13].

Dünya sağlık örgütünün yayınladığı en güncel raporlarda dünyada ve ülkemizde kanser önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu sebeple sağ kalım oranlarını arttırmak için halen erken teşhis ve tanı için farklı politikaların geliştirilmesi ihtiyaç duyulmaktadır [1].

2.2. Over Biyolojisi

Overler; bir çift üreme bezi olup, rahmin her iki yanında yer alırlar ve her biri yaklaşık olarak üzüm büyüklüğündedir. Overler rahme ligamentler ile bağlıdır. Overlerin her biri iç medula, folikül ve stroma içeren dış korteksten oluşur. Overlerin iki ana görevi vardır. Birincisi; döllenme için oosit (yumurta hücresi) üretimidir. İkincisi ise; kadınlar için önemli rollere sahip östrojen ve progesteron hormonlarının üretimidir. Overde üretilen yumurtalar, fallop tüplerinden geçerek rahme doğru hareket eder ve sperm ile

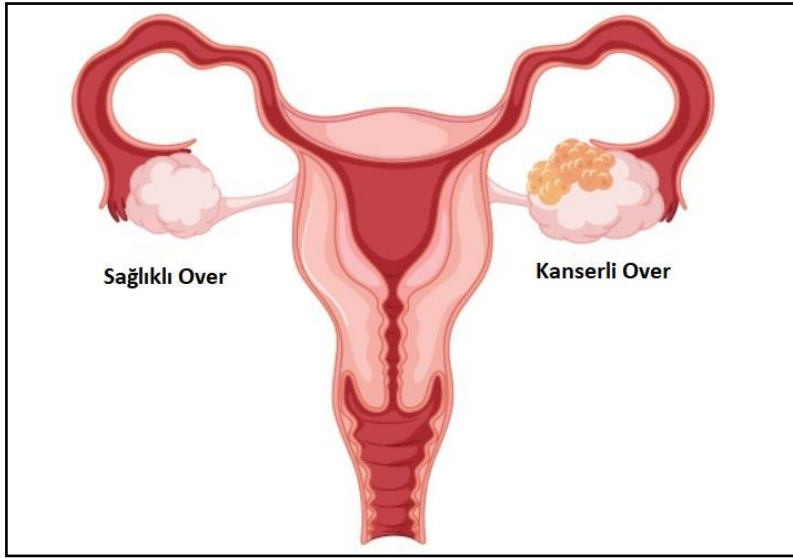
birleştğinde döllenme gerçekleşir. Rahim fundusundan itibaren fallop tüpleri ve overler karın boşluğu içerisinde yer alır (Şekil 2.1) [14].



Şekil 2.1.Kadın üreme sistemi

2.3. Over Kanseri

Over kanseri dünyada tüm kanserler arasında en sık görülen 18. kanser türü iken kadın kanserleri arasında 8. kanser türü olduğu literatürde bildirilmiştir. Overleri oluşturan hücrelerde meydana gelen kontrolsüz bölünme ve çoğalma sonucunda over kanseri gelişebilmektedir. Sağlıklı ve kanserli overin şematik hali Şekil 2.2’de gösterilmiştir [2,3].



Şekil 2.2. Sağlıklı ve kanserli overin şematik hali

Overler 3 farklı hücreden oluşur. Her hücre tipi çeşitli tümörlere farklılaşabilir:

- 1- Epitelyal tümörler, yumurtalığın dış yüzeyini çevreleyen hücrelerden köken alır. Over tümörlerinin büyük kısmı epitel hücre tümörleridir.
- 2- Germ hücreli tümörler, yumurtaların üretiminden sorumlu hücrelerinden gelişir.
- 3- Stromal tümörler, yumurtalığı bir arada tutan ve kadınlık hormonları olan östrojen ve progesteronu üreten yapısal doku hücrelerinden gelişir.

Over kanseri vakalarının yaklaşık %90'ı epitelyal hücre kaynaklı tümörlerdir [15].

GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 314.000 yeni over kanseri vakası bildirilmiş ve yaklaşık 207.000'i hastalık kaynaklı ölüm olarak kayıtlara geçmiştir. 2020 yılındaki tüm yeni kanser vakaları içerisinde over kanseri %3,4'lük paya sahiptir. 2020 yılındaki tüm kanser ile ilişkili ölümlerin %4,7'sinin sebebi over kanseridir. Aynı yıl ülkemizde ise 4.059 yeni over kanseri vakası bildirilmiş ve vakaların 2.730'u over kanserinden yaşamını yitirmiştir [2]. Türkiye Kanser İstatikleri verisine göre ise over kanseri kadınlarda en sık görülen kanserler arasında yedinci sıradadır. Over kanserinin yaşla birlikte insidansı artmaktadır ve en sık 50 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır [16].

Tablo 2.1.Over kanserinin yaşa göre dağılımı [16].

Yaş grupları	Yüzde %
0-9 yaş	0,4
10-19 yaş	2,7
20-29 yaş	3,6
30-39 yaş	7,9
40-49 yaş	21,4
50-59 yaş	30,1
60-69 yaş	20,3
70 yaş ve üstü	13,6
Toplam	100

% Dağılım

2.3.1. Over Kanseri ve Genetik

Over kanseri üzerine yapılan çalışmalarda, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler belirlenmiştir. Ayrıca over kanserinde çeşitli kromozom lokuslarında heterozigotluk kaybı olduğu da gösterilmiştir [4].

Genellikle over kanseri sporadik olarak gelişse de, oluşum nedenlerinin %24'ü genetik ve aileseldir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar bu oranın %18'inden sorumludur. Over kanserli hastalarda yapılan *BRCA* gen mutasyon testleri sonucunda, patojenik *BRCA* gen mutasyon testlerinin %80-85'i somatik mutasyonlar tespit edilmekte iken, %15-20'sinde germline mutasyonlar tespit edilmektedir [17].

BRCA1 ve *BRCA2* genlerindeki kalıtsal mutasyonların yaşam boyu over kanseri riski oluşturduğu kanıtlanmıştır [18]. Ailesel over kanseri riski olan hastalarda *RAD51C*, *RAD51D* ve *PALB2* genlerinde de kalıtsal mutasyonların olduğu bilinmektedir [19,20]. Herediter nonpoliposis kolorektal kanser sendromu (HNPCC), Lynch sendromu ile ilişkili *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ve *PMS2* gibi DNA onarım genlerindeki mutasyonlar da over kanseri riskini arttırmaktadır [21].

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinin işlevinde ve DNA onarımında görev alan *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *BARD1* ve *PALB2* gibi genlerdeki germline mutasyonlar da over kanseri gelişme riskini arttırabilir. Aynı zamanda *CHEK2*, *MRE11A*, *RAD50*, *ATM* ve *TP53* gibi genlerdeki kalıtsal mutasyonların da over kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir [22].

Walsh ve ark. (2011) yaptığı bir çalışmada herediter over kanserine neden olabilecek genler incelendiğinde Tablo 2.2'deki sonuçlar ortaya çıkmıştır. Aynı çalışmada hem over hem de meme kanseri değerlendirilmiş ve birçok tümör baskılayıcı gendeki mutasyonların hem over hem de meme kanseri riskini arttırdığı ortaya çıkmıştır [23,24].

Şimdiye kadar over kanseri ile ilişkili olan pek çok gen ortaya koyulmuş olup, ayrıca meme kanseri ile olan ilişkisi de aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bazı genlerdeki mutasyonlar hem over hem de meme kanseri riskini arttırmaktadır. Bazı genlerdeki mutasyonlar ise her iki kanser tipinden sadece birine etki etmektedir ya da etkisi ortaya konulmamıştır. Bu genler ve etkileri Tablo 2.2'de gösterilmiştir [23].

Tablo 2.2.Herediter over kanseri ve meme kanseri ile ilişkili genler [23]

Gen	Over Kanseri Riski	Meme Kanseri Riski
<i>BRCA1</i>	Artar	Artar
<i>BRCA2</i>	Artar	Artar
<i>ATM</i>	Kanıt yetersiz	Artar
<i>BRIP1</i>	Artar	Kanıt yetersiz
<i>CDH1</i>	Kanıt yetersiz	Artar
<i>CHEK2</i>	Kanıt yetersiz	Artar
<i>RAD51C</i>	Artar	Kanıt yetersiz
<i>RAD51D</i>	Artar	Kanıt yetersiz
<i>MSH6</i>	Artar	Kanıt yetersiz
<i>TP53</i>	Kanıt yetersiz	Artar
<i>PTEN</i>	Kanıt yetersiz	Artar

2.3.2. Over Kanserinin Alt Tipleri

Over kanseri heterojen yapıya sahip bir hastalık olması sebebiyle farklı alt tiplerde ortaya çıkmaktadır. Genel olarak over kanseri yüksek dereceli seröz, düşük dereceli seröz, berrak hücreli, endometrioid ve müsinöz alt tipleri şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bu alt tiplerin her biri onkogenezi sırasında farklı genetik risk faktörleri ve moleküler olaylar ile ilişkilidir. Aynı zamanda her bir alt tip farklı mRNA ekspresyon profilleri ile ilişkilendirilmektedir [25].

Seröz olmayan over kanseri çoğunla erken evrede tanı alan kanserlerdir ve ileri evre yani seröz kanserler ile kıyaslandıklarında hem sıklık hem de belirti olarak önemli ölçüde farklılıklar gösterir. Nitekim over kanserinin her bir alt tipi tedaviye farklı yanıtlar vermektedir. Örneğin; berrak hücreli kanserlerin tedaviye yanıt oranı %15 iken, yüksek dereceli seröz kanserlerin yanıt oranı %80'dir. Bu nedenle Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) güncel raporunda berrak hücreli kanserlerin diğer alt tiplere göre tanı ve tedavideki farklılıkları ön plana çıkmaktadır [26].

Köbel ve ark. (2008) yaptığı çalışmada over kanseri alt tiplerine yönelik biyobelirteç ekspresyon profillerinin alt tiplere göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (International Federation of Gynecology and Obstetrics) (FIGO), 4 farklı evrede over, fallop tüpü ve periton kanserlerini sınıflandırmıştır [27].

2.4. Epigenetik Biyobelirteçler

Epigenetik değişiklikler; başta Beckwith-Wiedemann (BWS), Silver-Russell, Prader-Willi ve Angelman sendromları dahil olmak üzere birçok hastalıkta özellikle büyüme ve gelişme bozukluklarının altında yatan ana mekanizmalardır. Büyümeyle ilişkili yollardaki önemli rollerinden ötürü, epigenetik mutasyonlar (epimutasyonlar) neoplazinin erken evrelerinde yer almakta ve giderek kanserin ayırt edici özelliği olarak kabul edilmektedir [28].

Hem hücresel DNA dizi değişikliği hem de epigenetik yani DNA dizisinde değişiklik olmaksızın gen ifade düzeylerindeki değişiklikler kanser oluşumunda büyük rol oynamaktadır [5].

İlk olarak Waddington (1942) tarafından tanımlanan epigenetik çerçeve, bir hücrenin farklılaşmamış bir durumdan farklılaşmış bir duruma geçebileceği gelişimsel yolları ifade etmektedir. Epigenetik, bir organizmanın genetik yapısının çevreye uyumlu bir şekilde nasıl tepki verdiğini belirler. Epigenetik mekanizmalar, kromatin yapısını değiştirir ancak hücre büyümesi sırasında kararlı bir şekilde korunan DNA dizisini değiştirmeden farklı bir gen ekspresyon profili oluşturabilirler [29].

2.4.1. Kanser ve Biyobelirteç İlişkisi

Kanser; DNA onarımı, hücre sağkalımı, proliferasyonu ve ölümü ile ilişkili hücresel süreçleri kontrol eden önemli yolların düzensizliği ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Hücre transformasyonu, tümör ilerlemesi ve metastaz, özellikle onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki genomik mutasyonlar ve epigenetik değişiklikleri ile ilişkilidir. Tüm bu süreçler, çevresel faktörlerin malignite ve tümörogenezi indüklediği karmaşık ve ilgi çekici bir etkileşim ağı tarafından yönetilir [30, 31].

Kanser hücrelerindeki mutasyonlar, genomun yapısını ve stabilitesini değiştirir ve genetik lezyonlarla birlikte karsinogenezi ilerletir. Her hücre tipine göre yeni epigenetik programlar oluşturabilen epigenetik modifikasyonların ise dinamik ve geri dönüşümlü yapısı vardır. Epigenetik programlama, özellikle DNA metilasyonu olmak üzere epigenetik işaretlerin elde edilmesinde ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynayan çevresel faktörlerden güçlü bir şekilde etkilenir [32].

Çevresel kaynaklı epigenetik değişiklikler, çoğu kanserin sporadik kökenini açıklayabilir, çünkü kanıtlar bazı kanserlerin yaklaşık %10' unun genetik olarak kalıtsal olduğunu göstermektedir [33]. Bu nedenle, kanserdeki epigenetik değişiklikler sürekli gelişen bir alandır ve kanser epigenomunun yeniden programlanması olasılığı kanser tedavisi için umut verici bir tedavi olarak ortaya çıkmaktadır.

2.4.2. Over Kanseri Tanısında ve Tedavisinde Biyobelirteçler

Over kanseri vakalarının %70'inden fazlasına ileri evrede teşhis konur. Over kanseri prognoz açısından değerlendirildiğinde hastaların beş yıllık sağkalım oranı %46,2'dir. Prognoz tanı anındaki evre ile yakından ilişkilidir. Evre I veya II için beş yıllık sağkalım oranı > %70 iken, evre III veya IV için sağkalım oranları %20-%40 arasındadır. Over kanseri tanısında belli başlı biyobelirteçler kullanılmaktadır. Kullanılan bu biyobelirteçlerin en yaygın olanları HE4 (İnsan Epididim Proteini 4) ve CA 125 (kanseri antijeni 125) biyobelirteçleridir. Günümüze kadar over kanserini teşhis etmek amacıyla en etkili biyolojik teşhis aracı, CA125 ve HE4'ün kombinasyonudur [6].

Over kanseri açısından biyobelirteçler düşünüldüğünde, CA125 ilk olarak 1980'lerin başında tanımlanmıştır [34]. Over kanseri vakalarında serum CA125 seviyesi yükselbilmektedir, ancak CA125'in over kanserinin erken evrelerinde duyarlılığı düşüktür. Menstrüasyon, gebelik, endometriozis ve peritonun enflamatuar hastalıkları gibi diğer fizyolojik veya patolojik durumlarda da CA125 seviyeleri artmaktadır [7].

Over kanseri teşhisinde özgüllüğü arttırmak için HE4 gibi biyobelirteçler belirlenmiştir. Bu biyobelirteçin over kanserinde yüksek düzeyde eksprese olduğu bilinmektedir. Bu biyobelirteçlerin doğal özelliklerini iyileştirmek amacıyla RMI (Risk of Malignancy Index) ve ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) gibi index ve algoritmalar geliştirilmiştir [35].

CA 125, *MUC16* geni tarafından üretilen ve hücre zarla ilişkili müsin tip bir glikoproteindir. Menopoz öncesi ve sonrası hastalarda üst sınırı 35µ/mL'dir. Bununla birlikte, bu ölçüm over kanserinin erken evrelerinde çok hassas değildir (sadece evre I vakalarının %23 ila %50'sinde yükseldiği rapor edilmiştir). Ayrıca, diğer fizyolojik ve patolojik durumlarda (adet kanaması, gebelik, endometriozis, peritonun inflamatuvar hastalıkları) yüksek serum CA125 seviyeleri görülebilmektedir. Bu nedenle, over kanserinin erken teşhisini iyileştirmek amacıyla yeni biyobelirteçler değerlendirilmiştir [6].

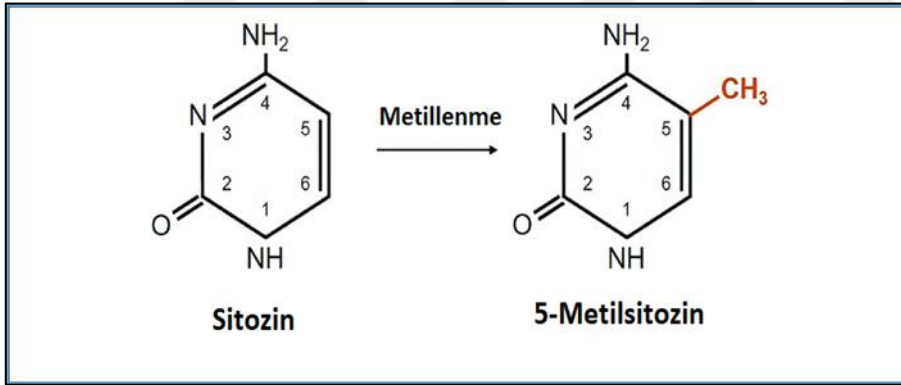
HE4, epitelyal dokuların doğal immün yanıtında yer alan bir peptid proteaz inhibitörüdür. HE4 overin yüzey epitelinde bulunmaz; bununla birlikte, hücre dışı ortama salgılandığı ve kan dolaşımında tespit edilebildiği için over kanseri dokusunda aşırı eksprese edilir. Bu nedenle, serum HE4'ün tespiti, over kanserinin teşhisi ve izlenmesi için başka bir potansiyel biyobelirteçtir [36]. Ülkemizde yapılan bir çalışmaya göre; CA

125 ile HE4 biyobelirteçleri özgüllük açısından kıyaslandığında, HE4'ün tek bir tümör belirteci olarak daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir [37].

2.5. Biyobelirteç Olarak DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, hücrelerin özelliklerini tanımlayan önemli bir epigenetik modifikasyondur. Tümör baskılayıcı genler ve gelişimsel düzenleyicilerle ilişkili CpG adalarının hipermetilasyonu kadar genom çapında hipometilasyon da kanser hücrelerinin özellikleridir.

DNA metilasyonu, omurgalıların hücrelerinde guainidinden (G) önce gelen sitozinin (C)'nin metiltransferaz enziminin metil gruplarını eklemesi şeklinde gerçekleşir. Omurgalıların hücrelerinde sitozinin metillenmesi, etkin olan ve olmayan genleri ayırt etmek için önemli bir değişkendir. Metillenme işlemi Şekil 2.3'de gösterilmiştir. Sitozinin metillenmiş şekli olan 5-metilsitozin (5-metil C), çift sarmal DNA'nın sadece bir ipliğinde ortaya çıkar ve baz eşleşmesi üzerinde herhangi bir etkisi yoktur [5].



Şekil 2.3.Sitozin bazının metillenmesi

Genellikle 200 baz çifti ve üzeri uzunlukta ve CG dinükleotid oranı %50'den büyük olan bölgeler CpG adası (CGI) olarak tanımlanır [34]. CpG dinükleotitleri çoğunlukla genlerin promotor bölgesinde transkripsiyonun başlangıç bölgesini oluşturacak şekilde toplu halde bulunur ve CpG adalarını oluştururlar [39].

DNA metilasyonu kanser oluşumunun erken evrelerinde oluşur. Bu durum erken tanı amacıyla kullanılabilme potansiyelini arttırmaktadır. DNA metilasyonunun tespiti için farklı doku ve vücut sıvıları (kan, idrar, tükürük, gaita, bronşiyal sıvı, mide sıvısı vs.)

kullanılabilir. DNA metilasyonu, aynı zamanda kemoterapötik ajanlara cevabı değerlendirilmek için de kullanılabilen bir belirteçtir [40].

Metilasyon tümör baskılayıcı genleri inaktive eden esas mekanizmalardan birisidir. Tümör baskılayıcı genlerdeki promotor bölge hipermetilasyonu sporadik retinoblastomada *RB*, renal hücreli karsinomda *VHL*, hepatosellüler karsinomda *CDH1* geni dahil olmak üzere pek çok farklı tür kanserde tespit edilmiştir. DNA hipermetilasyonu görülen bazı genler ve hücresel fonksiyonları Tablo 2.3'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. DNA hipermetilasyonu görülen bazı genler ve hücresel fonksiyonları [40]

Kanserle İlişkili Mekanizmalar	Metile Olan Genler
DNA tamir	<i>MGMT, MLH1, BRCA1, FNACF</i>
Hücre siklusu	<i>Rb, p16, p15, p14, cyclin E, cyClin D2</i>
Sinyal iletimi	<i>RASSF1, LKB1/STK11, APC</i>
Detoksifikasyon	<i>GSTP1</i>
Hormonal cevap	<i>RARB2, ER, PR</i>
Apoptozis	<i>DAPK1, caspaz-8</i>
Metastaz	<i>CDH1, CDH13</i>
Transkripsiyon	<i>Runx3, Twist, ER, PR, RAR, vitamin D reseptör</i>

Metilasyonun, normal hücrelerde nadir olarak görülmesi ve somatik mutasyonlardan farklı olarak geri dönüşümlü olması nedeniyle kanser tedavisinde de öne çıkmaktadır. Demetile ajanlar olarak bilinen DNMT inhibitörleri, genomun demetilasyonuna neden olarak tümör oluşumunun azalmasına ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunun artışı sağlar. Bu ajanlar solid tümörleri ve hematolojik maligniteleri tedavi etmek için kullanılabilir [41].

2.6. DNA Metilasyonu Analiz Yöntemleri

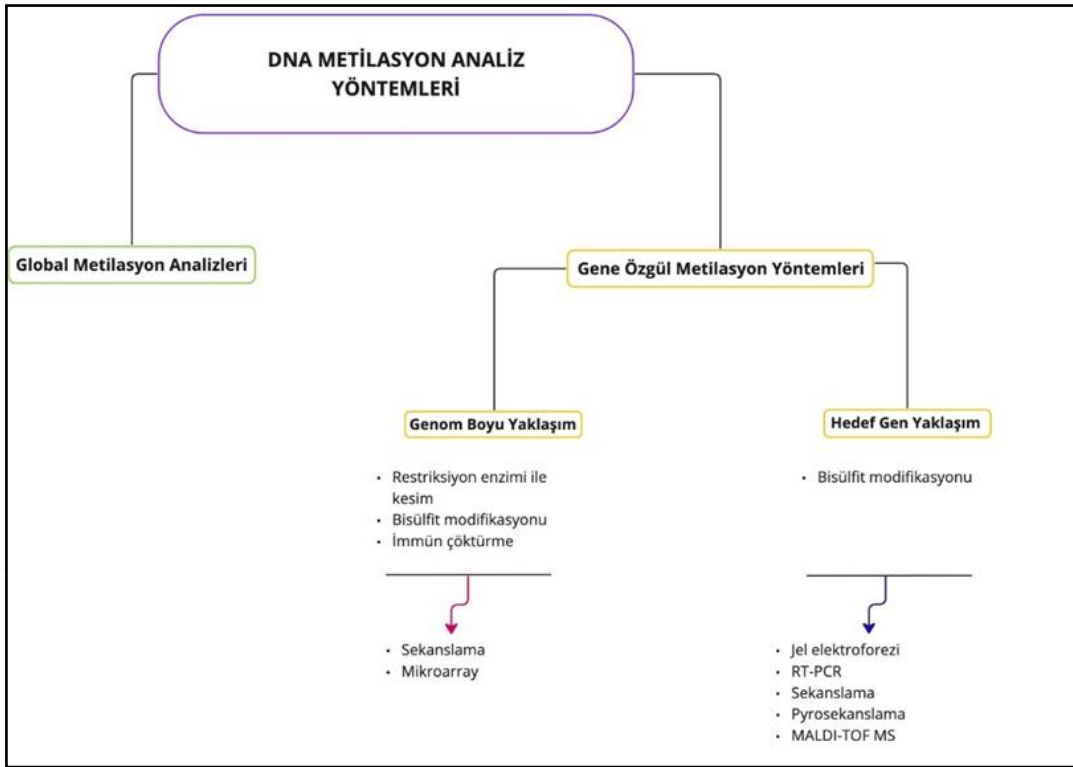
DNA metilasyon analizi için farklı yöntemler olup çalışmanın amacı analiz için gerekli yöntemin seçilmesinde en önemli unsurdur. Çalışmanın amacı dışında pek çok faktör kullanılacak yöntemin belirlenmesinde söz konusudur [42].

Bunlardan başlıcaları;

- Metilasyon analizi yapılacak DNA örneklerinin kalitesi ve miktarı,
- Çalışmanın duyarlılık ve özgüllük gereksinimleri,
- Analiz yönetiminin güvenilirliği,
- Verilerin analizi ve yorumlanması için biyoinformatik verilerinin varlığı,
- Özel ekipmanların ve reaktiflerin varlığı,
- Maliyet.

DNA metilasyon analizlerinin gelişmesine en büyük katkıyı sağlayan yöntem şüphesiz enzim kesme yöntemi ve bisülfid modifikasyonudur.

Sodyum bisülfid modifikasyonda, DNA'daki metillenmemiş sitozinler urasile dönüşür, metillenmiş sitozinler ise değişmeden kalır. Modifikasyon işleminden sonra DNA'daki metillenmiş ve metillenmemiş bölgeler PCR amplifikasyonu ve dizileme ile ayırt edilebilir. Bisülfid modifikasyonu, metilasyon analizi için altın standart haline gelmiş ve buna dayalı birçok yöntem geliştirilmiştir. Bisülfid bazlı yöntemlerin gelişmesiyle birlikte, gene özgü ve genom çapında çalışmalarda tek nükleotid rezolüsyon analizi de mümkün hale gelmiştir. Genom ve gen düzeyinde kullanılan DNA metilasyon yöntemleri Şekil 2.4'de gösterilmiştir [43].



Şekil 2.4.DNA metilasyon analiz yöntemleri [43].

2.6.1. Enzim Kesme Yöntemi ile Metilasyon Analizi

Enzim kesme yöntemi ile metilasyon analizi temel olarak duyarlı restriksiyon endonükleazlarının kullanımına ve ardından elde edilen fragmanların analizine dayanır. Genellikle genomik DNA, spesifik metillenmiş veya metillenmemiş DNA dizilerini tanıyan bir çift endonükleaz ile inkübe edilir. Endonükleaz muamelesinin ardından elde edilen fragmanların metilasyon durumları DNA dizi analizi, jel elektroforezi ve PCR gibi yöntemler ile belirlenebilir [44].

Endonükleaz kesimine dayalı yöntemler ile bisülfid muameleye dayalı yöntemler kıyaslandığında, enzim kesme yöntemi daha detaylı bir sonuç elde etmek ve metilasyon oranını belirleyebilmek açısından avantajlıdır. Metilasyona bağımlı endonükleazların, genomun yoğun şekilde metillenmiş bölgelerinde kısa fragmanları oluşturup, kalıp DNA olarak PCR'da kullanılması ile ön plana çıkmaktadır. Bu şekilde, ilgilenilen gen bölgesi metilasyona duyarlılık açısından değerlendirilmektedir [38].

2.6.2. Over Kanserinde Promotor Bölge DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu değişikliklerinin karsinogenez ile ilişkili olabileceğine dair en eski kanıtlardan biri, 1994 yılında Herman ve arkadaşlarının, tümör baskılayıcı gen *VHL*'nin, bazı renal karsinom vakalarında promotor hipermetilasyonu ile susturulabildiğini göstermesiyle ortaya çıkmıştır [45]. Over kanseri ile DNA metilasyonunu ilişkilendiren pek çok çalışma olup, bu çalışmalar sıklıkla tümör baskılayıcı genlerdeki promotor bölgelerin hipermetilasyonuna odaklanmıştır.

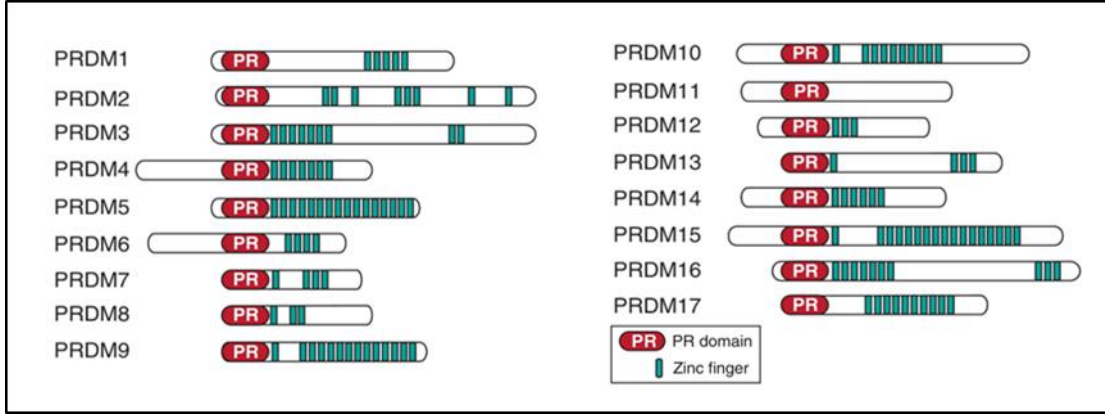
BRCA1 geni promotor hipermetilasyonu ile over kanseri de ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda *BRCA1* geninin promotor metilasyonunun over kanserlerinin %15-30'unda var olduğu tespit edilmiştir [46]. Bazı çalışmalarda over kanseri ve *BRCA1* metilasyonunun %68 civarında olduğu belirlenmiştir [47].

Over kanserinin tanı ve teşhisinde DNA metilasyonu ile ilgili geçmiş yıllarda kısıtlı çalışmalar olsa da günümüzde yapılan pek çok güncel çalışma özellikle over kanserine odaklanmıştır. Son zamanlarda; *BRCA1*, *HOXA9*, *RASSF1A*, *SPARC* ve *HIC1* dahil olmak üzere bazı tümör baskılayıcı genlerdeki metilasyonunun over kanserinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir [8].

2.7. *PRDM6* Gen Ailesi ve Kansere İlişkisi

PRDM gen ailesinde PR alanı ile karakterize edilen ve 19 farklı transkripsiyon faktörü kodlayan pek çok gen bulunmaktadır. PR alanı pek çok histon lizin metiltransferazda (HMT) bulunan bir SET alanının alt tipine karşılık gelmektedir. Bununla birlikte, sadece bazı *PRDM* proteinlerinin HMT aktivitesini sergilediği gösterilmiştir. Diğer *PRDM* proteinlerinin, HMT'ler, histon deasetilazlar ve histon asetiltransferazlar dahil olmak üzere histon değiştirici enzimlerin bağlanması yoluyla dolaylı epigenetik düzenlemelere aracılık ettiği bilinmektedir [48].

Memelilerde 17 farklı üyesi tanımlanmış olan bu protein ailesi, lizin metiltransferazlarda bulunan katalitik SET alanıyla yüksek sekans homolojisi paylaşan bir N-terminal PR alanının varlığı ile karakterize edilir [49]. Bu proteinler ve PR alanlarının şematik hali Şekil 2.5'de gösterilmiştir. *PRDM* proteini, hedef gen promotorlarında kromatin yapısını modüle ederek transkripsiyonel düzenleyiciler olarak işlev görmektedir [50].



Şekil 2.5.PRDM proteinleri

Protein-protein ve protein-DNA etkileşimlerine aracılık etme işlevi gören bir dizi çinko parmak motifinin ardından gelen bir N-terminal PR alanının varlığı ile karakterize edilir [49]

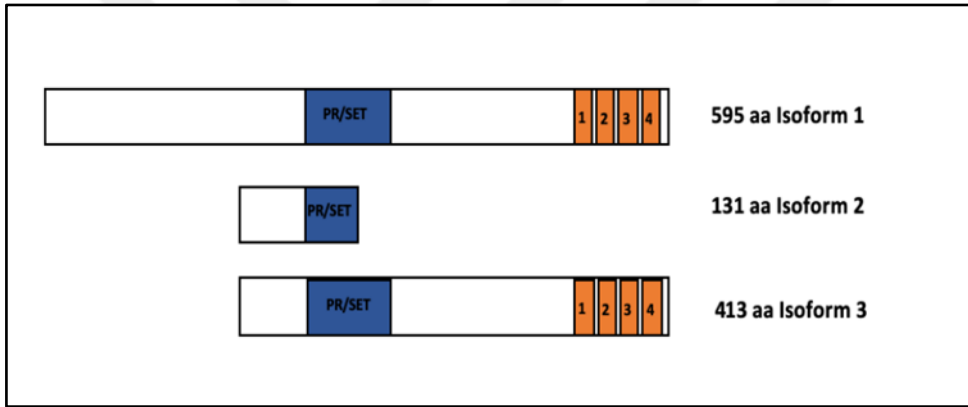
PRDM proteinleri, gelişimdeki rolleri açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve farklı hücre türlerinde hücre farklılaşmasını ve olgunlaşması olaylarını yönlendirdiği gösterilmiştir. PRDM proteinleri, hücre farklılaşmasında çok önemli roller oynamakta ve çok sayıda gelişim sürecini düzenleyebilmektedir. Bu nedenle işlevlerindeki sapmalar neoplazi ile sonuçlanır. PRDM proteinlerinin tümör baskılayıcılar olarak hareket ettiği düşünülmektedir ve bir dizi farklı kanserde susturulduğu bulunmuştur. *PRDM* genlerinin çeşitli kanserlerle ilişkisi Tablo 2.4’de gösterilmiştir [10].

Tablo 2.4.PRDM proteinlerinin çeşitli kanser yolakları ile ilişkisi [10]

<i>PRDM</i> Gen Ailesi	Kanser ile İlişkisi/Rolü
<i>PRDM1</i>	Tümör baskılayıcı - insan DLBCL'sinde ve diğer hematolojik malignitelerde susturulur.
<i>PRDM2</i>	Tümör baskılayıcı - farklı kanser türlerinde, promotörünün DNA metilasyonunu ve mutasyon mekanizmalar yoluyla susturulur. p53 bağımlı hücre döngüsü durmasına yol açar. Meme kanserinde ER sinyalini modüle eder.
<i>PRDM3</i>	Tümör baskılayıcı- kısa PR'siz izoformu, Lösemi ve Lenfomalarda aşırı eksprese edilir.
<i>PRDM5</i>	Tümör baskılayıcı - İnsan kanserinde susturuldu. Meme kanseri, over kanseri ve hepatom hücre hatlarında apoptozu indükler
<i>PRDM6</i>	Beyin tümörünü inceleyen büyük kapsamlı bir genomik çalışmada genin bir alt tipinin aşırı mutasyona uğradığı belirlenmiştir.
<i>PRDM11</i>	Tümör baskılayıcı: Aşırı ekspresyonu apoptozu indükler.
<i>PRDM12</i>	Tümör baskılayıcı - KML'de aşırı ekspresyon, çoğalmayı önleyici özelliklere sahiptir.
<i>PRDM14</i>	İnsan lenfoid neoplazmalarının yaklaşık %25'inde aşırı eksprese edilir. Meme kanserinde artan kopya sayısı vardır.
<i>PRDM16</i>	Tümör baskılayıcı: kısa PR'siz izoform (sPRDM16) onkojenik bir varyanttır ve p53 KO farelerinde miyeloid lösemiye indükler.

2.7.1. *PRDM6* Geni

PRISM (düz kasta PR alanı) olarak da bilinen *PRDM6* geni ilk olarak farede PR alanı olarak tanımlanan bir N-terminal bölgesinden ve ayrıca dört C-terminal çinko parmak tekrarından oluşan 395 amino asitli (aa) bir protein olarak belirlenmiştir. İnsanlarda *PRDM6*'nın üç izoformu tanımlanmış ve Uniprot protein veritabanında açıklanmıştır. Tam uzunluktaki insan izoformu 595 aa'dan oluşur ve murin *PRDM6*'ya benzer alan yapısı gösterir. ISO2, *PRDM6*'nın kısa bir şeklidir ve 1-182 ve 314-595 amino asitlerini içerirken ISO3, 1-182 amino asitlerini içermez [51]. *PRDM6* geninin izoformları Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6.İnsanda *PRDM6*'nın 3 farklı izoformlarının çizimi [46].

İzoform 1 olarak adlandırılan tam uzunluktaki proteine kıyasla İzoform 2'de 1-182 ve 314-595 amino asitleri eksiktir ve İzoform 3'te 1-182 amino asitleri eksiktir.

2.7.2. *PRDM6* Geninin Biyolojik İşlevi

PRDM6 geni ile ilgili yapılan ilk çalışmada, *PRDM6*'nın vasküler düz kas hücrelerinin (SMC'ler) fenotip farklılaşması ve vasküler SMC'lerin proliferasyonu teşvik edici özelliği olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada, primer SMC kültüründe *PRDM6*'nın aşırı ekspresyonu, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) bir üyesi olan Amphiregulin gibi hücre proliferasyonunda yer alan genlerin yukarı regülasyonu ile sonuçlanmıştır. Bu sonuç, *PRDM6*'nın *MAPK* yoluyla hücre proliferasyonunu indüklediğini göstermektedir.

PRDM6'nın yıkılması, düz kas farklılaşmasının ana düzenleyicileri olan Miyokardın ve GATA-6'nın ifadesiyle sonuçlanmıştır [51].

Wu ve arkadaşları multipotent kök hücrelerde farklılaşmayı düzenleyen genleri araştırmışlar ve *PRDM6*'nın vasküler endotel hücrelerini oluşturan flk1(+) hematovasküler prekürsör hücrelerde oldukça zengin olduğunu bulmuşlardır [52].

PRDM6'nın erken farklılaşan vasküler öncü hücrelerde yüksek oranda eksprese olduğu bilinmektedir. Endotel hücrelerinde *PRDM6*'nın aşırı ekspresyonu, *PRDM6*'nın endotel hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu inhibe ettiği, hücre döngüsünün durmasını ve apoptoz ile sonuçlandığı da kanıtlanmıştır [53].

PRDM6'nın, histon modifiye edici proteinleri toplayarak bir transkripsiyon baskılayıcı olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. *PRDM6* için içsel metiltransferaz aktivitesi bildirilmemiştir, ancak transkripsiyonel baskılayıcılar EMT2/G9a, HDACs 1-3 ve heterokromatin protein 1 (HP1) ile etkileşime girdiği belirlenmiştir. Ayrıca, *PRDM6*'nın transkripsiyon aktivasyonunu destekleyen histon asetil transferaz (HAT) p300 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir [51, 53].

2.7.3. *PRDM6* Geninin Kanserdeki Rolü

Bcl-6 ve *Myc* gibi onkogenlerle IGH lokusunu içeren kromozomal translokasyon, sıklıkla lenfoid malignitelerde tespit edilmektedir. Buna ek olarak, bu translokasyona sahip hastalarda, *PRDM6*'nın mRNA seviyesi aşırı ekspresyon artışı göstererek *PRDM6*'nın onkogenik potansiyele sahip olduğuna dair güçlü bir kanıt oluşturmaktadır [10].

Çocukluk çağı beyin tümörü olan medulloblastomayı (MB) inceleyen büyük ölçekli bir genomik çalışmada, *PRDM6*'nın MB alt tipinde en sık mutasyona uğrayan gen olduğunu belirlenmiştir [54].

Elde edilen sonuçlar *PRDM6* geninin epigenetik düzenleyici olarak işlev görme yeteneği olabileceği yönündedir. Primer hücrelerde *PRDM6*'nın aşırı ifade düzeyinin, *PRDM6*'nın hücrenin morfolojik değişikliklerini sağlaması ve hücre çoğalması ile ilişkili olduğunu açıkça göstermektedir [10].

2.7.4. Biyobelirteç Olarak *PRDM6* Geni

PRDM6 geninin dahil olduğu *PRDM* gen ailesinin pek çok kanser türü ile ilişkili olabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir. *PRDM6* geninde tespit edilen değişikliklerin farklı kanser türlerinde biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeli olduğunu düşündürmektedir.

PRDM6'nın, *MAPK* ve *WNT* sinyal yolaklarının çoklu bileşenlerini düzenlediği de bilinmektedir. Bu veriler; *PRDM6*'nın bir epigenetik düzenleyici olarak işlev görme yeteneğini gösterebilir. *PRDM6*'nın kanserde işlev gördüğü mekanizmalar aydınlatıldıkça, *PRDM6*'nın çoklu tümör tiplerinde rol oynayan epigenetik düzenleyici olarak çekici bir terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir [10].

2020 yılında Erdoğan ve arkadaşları tarafından over kanseri açısından diskordant olan monozigot ikizlerde (MZ) yapılan çalışmada, over kanserinde *PRDM6* geninin promotor hipermetilasyonu belirlenmiştir. Aynı zamanda ilk defa *PRDM6* geni ile over kanseri arasında bir ilişki bu çalışma sayesinde ortaya çıkmıştır [9].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma gruplarındaki kişi sayıları power and sample size programı kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan power analizi sonucunda over kanseri hastaları, benign kitlelere sahip kişiler ve sağlıklı kontroller arasındaki metilasyon analizi için Tip I Hata = 0,05, Testin Gücü %80 olarak ele alınmıştır. İki grup ortalaması arasında 15,00 birimlik farkın anlamlı bulunabilmesi için her grupta olması gereken minimum kişi sayısı 40 olarak belirlenmiştir. İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü'ne başvuran, araştırmaya katılmayı kabul eden ve gönüllü onamı alınan 93 over kanseri hastası ile yaş, cinsiyet ve etnik açıdan eşleştirilmiş overin benign kitlelere sahip 48 kişi ve 54 sağlıklı kontrole ait periferik kan örnekleri çalışmada kullanılmıştır. Tez çalışması için İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Etik Kurul Onayı: 13 sayılı, 25/06/2021 tarihli toplantı, Dosya No: 2021/1122).

3.1. Gereçler

3.1.1. Kitler

Çalışmada DNA izolasyonu, PCR reaksiyonu ve metilasyon analizi için kullanılan kitler aşağıda belirtilmiştir.

- ❖ Zymo Research Quick-DNA Miniprep Kit [USA]
- ❖ Zymo Research OneStepqMethyl [USA]
- ❖ Zymo Research *PRDM6* Geni Primeri [USA]

PRDM6 genindeki metilasyon farklılıklarını belirlemek için PCR reaksiyonunda kullanılan forward ve reverse primerin nükleotid dizilimi 5' ucundan 3' ucuna doğru Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. *PRDM6* geni forward ve reverse primerin nükleotid dizilimi

<i>PRDM6</i> geni forward primer	PRDM6METF1	5'- GGA GTT GGT GCC TTC TCT AAC -3'
<i>PRDM6</i> geni reverse primer	PRDM6METR1	5'- CTC GAC TGC CTC CCA AAC -3'

3.1.2. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Spektrofotometre Nano Drop 2000 (Thermo Scientific)
Mikropipetler (Gilson)
Soğutmasız Santrifüjler (Hettich, Jouan)
-80 Derin Dondurucu (Sanyo)
-30 Derin Dondurucu (Sanyo)
+4 Buzdolabı (Vestel)
Vorteks (Finepaz)
Applied Biosystems Real-Time PCR (Thermo Fisher) (ABI QS5)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

Periferik kan örneğinden lenfositlerin izolasyonu için kullanılan yöntem sırasıyla aşağıdaki gibidir.

- ❖ EDTA’lı tüpe alınmış 6 mL kan 1700 rpm’ de 30 dakika santrifüj edildi.
- ❖ Kan tüpündeki plazmalar mikropipet yardımıyla çekilerek atıldı, 6 ml kanların üzerine 4 ml izotonik koyularak Pasteur pipeti ile pipetaj yapılır.
- ❖ Çözülen kan 2 mL Ficoll üzerine yavaş yavaş pipet yardımıyla eklendi, 1900 rpm’de 30 dk. süreyle santrifüj edildi.
- ❖ Üst fazında serum, alt fazında eritrosit ve diğer beyaz kan hücreleri bulunan tüpten lenfositler pastör pipet yardımıyla temiz bir tüpte toplandı.
- ❖ 1900 rpm’de tekrar 20 dk. santrifüj edildi.
- ❖ Süpernatant dökülerek pellet üzerine 4 mL PBS eklendi ve pipetlenerek pellet çözüldü. Çözülmüş pellet 4 cryo tüpe 1’er mL olacak şekilde dağıtıldı.
- ❖ Cryo tüpler 1900 rpm’de 10 dk. santrifüj edildi.
- ❖ Süpernatant dökülür. Elde edilen hücreler -80°’e kaldırıldı.

3.2.2. DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol örneklerinden elde edilen lenfositlerden DNA izolasyonu için Quick-DNA MiniPrep İzolasyon Kiti (ZYMO RESEARCH) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre yapılan işlemin aşamaları aşağıdaki gibidir.

- ❖ -80°C’ de saklanan hücreler bir süre oda ısısında bekletildikten sonra üzerine 400 µL DNA Lysis Buffer eklendi ve pipetaj yapılarak hücreler çözdürüldü.
- ❖ Karışım Zymo-Spin IIC DNA kolonuna aktarıldı ve 1200g’de 1 dakika santrifüj edildi.
- ❖ DNA kolonlarına 400 µl Prep Buffer eklendi, 12000g’de 1 dakika santrifüj edildi ve altta kalan sıvı döküldü.
- ❖ DNA kolonlarına 700 µl Wash Buffer eklendi, 12000g’de 1 dakika santrifüj edildi ve altta kalan sıvı döküldü.
- ❖ Kolonlara 400 µl Wash Buffer eklendi 12000g’de 2 dakika santrifüj edilerek alttaki sıvı atıldı.
- ❖ DNA kolonuna 100 µl DNA free buffer eklendikten sonra 5 dakika beklendi ve 10000g’de 1 dakika santrifüj edildi.
- ❖ Kolonlar atıldı ve altta kalan DNA’ların Nanodrop ile saflık ve konsantrasyon ölçümü yapıldıktan sonra -80 °C’de saklandı.

3.2.3. Real-Time qPCR

Real-Time qPCR işlemi, Applied Biosystems Real-Time PCR cihazı kullanılarak yapıldı. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı bireylerden elde edilen DNA örnekleri 80°C’den çıkarılarak çözdürüldü. Distile su ile sulandırıldıktan sonra qPCR tüplerinde test ve referans reaksiyonları Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’de verilen miktarlarda hazırlandı. Reaksiyonlarda son hacim 20 µL olacak şekilde tüpler, PCR cihazına yerleştirilerek Tablo 3.5’de belirtilen döngüye göre reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. Real-time PCR test reaksiyonu

Test Reaksiyonu	20 µl Total hacim
2X Test Reaksiyon PreMix (MSREs içerir)	10 µl
10 µM MGMT Primer I & II	2 µl
DNase/RNase-free Su	3 µl
DNA örneği	5 µl

Tablo 3.4. Real-time PCR referans reaksiyonu

Referans Reaksiyonu	20 µl Total hacim
2X Referans Reaksiyon PreMix	10 µl
10 µM MGMT Primer I & II	2 µl
DNase/RNase-free Su	3 µl
DNA örneği	5 µl

Tablo 3.5.Real-time PCR aşamaları

Aşamalar	Sıcaklık	Süre
MSR enzimleri ile kesim	37°C	2 saat
Başlangıç denatürasyonu	95°C	10 dakika
Denatürasyon	95°C	30 saniye
Bağlanma	54°C	60 saniye
Uzama	72°C	60 saniye
Son uzama	72°C	7 dakika
Bekleme	4°C	5 dakika

Çalışmada DNA metilasyon analizi için enzim kesme yöntemine dayanan, hızlı ve kolay uygulanabilir bir prosedür olan Zymo Research OneStep qMethylTM (USA) PCR kiti kullanılmıştır. Kitin bileşenleri ile her bir örnek için test ve referans olmak üzere iki reaksiyon hazırlanmıştır.

Test reaksiyonunda metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri (MSRE'ler) bulunurken referans reaksiyonunda bulunmamaktadır. Her iki reaksiyonda da DNA, SYTO ® 9 floresan boya ve *PRDM6* genine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PCR ile DNA fragmanları amplifiye edilmiştir. DNA'nın metillenme durumuna göre test ve referans reaksiyonlarının döngü eşiği değerinin (Ct) farklılık göstermesi beklenmektedir. İlgili gen metillenmiş ise test reaksiyonunda kesim yapılamayacak ve enzim içermeyen referans reaksiyonu ile yakın Ct değeri verecektir. Metillenmemiş ise enzim kesimi gerçekleşecek ve test reaksiyonu daha geç bir döngüde Ct değeri verecektir. Test ve referans Ct değerlerinin farkı ΔCt olarak ifade edilir. Yüzde metilasyon formülü (Yüzde Metilasyon = $100 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}$) ile genin görece metilasyon oranı hesaplanmıştır.

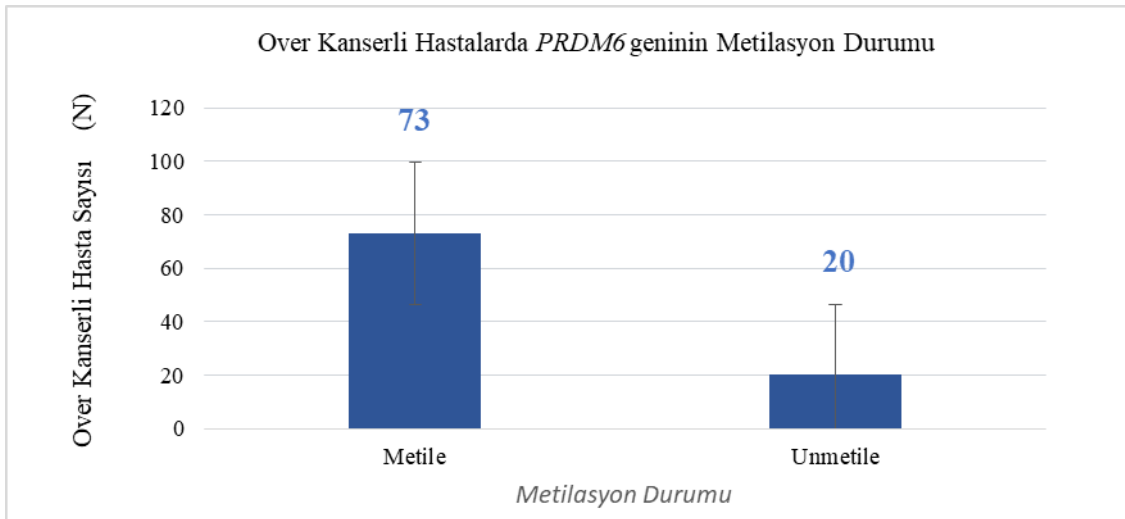
3.2.4. İstatiksel Analiz

Çalışmada nitel değişkenler için tanımlayıcı istatistik olarak sayı ve yüzde, nicel değişkenler için ise ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri verilmiştir. Nitel değişkenler arasındaki ilişkiler Pearson Ki kare ve Fisher Exact testleri ile incelenmiştir. İki den fazla grubun görülme oranlarının karşılaştırılmasında post hoc testler için Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Varyans homojenliği Levene testi ile araştırılmıştır. İki bağımsız grubun ortalama karşılaştırmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İki den fazla bağımsız grubun ortalama karşılaştırmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda ise post hoc test olarak Dunn testinden yararlanılmıştır. Nicel değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon katsayısı ile incelenmiştir. İstatiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak alınmış olup, hesaplamalarda SPSS (versiyon 26, IBM Corp. in Armonk, NY) programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

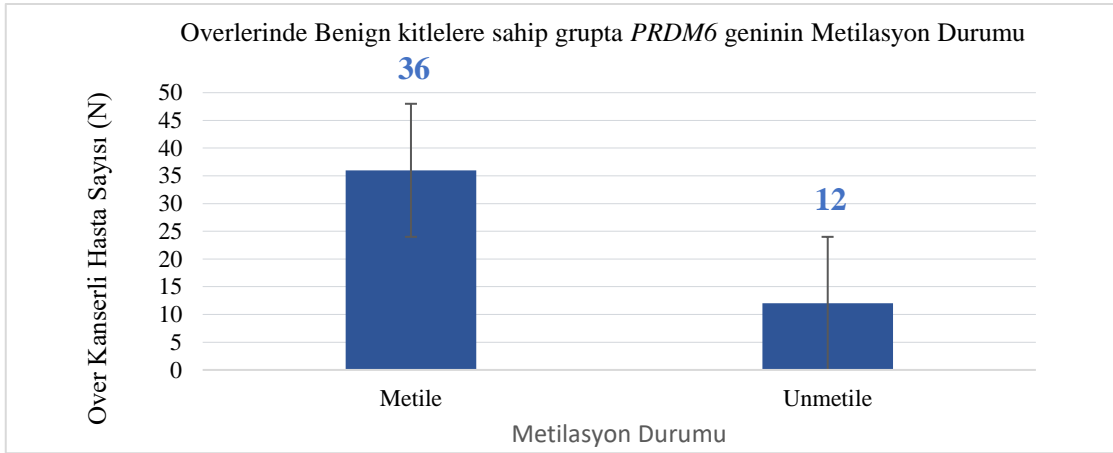
Bu tez çalışmasında İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'ne başvuran 93 over kanseri hastası, overin benign kitlelere sahip 48 kişi ve kontrol grubu olarak aile öyküsünde kanser tanısı bulunmayan 54 kişinin periferik kan örneklerinden *PRDM6* geni metilasyon durumu incelenmiştir.

İstatiksel analizde; *BRCA* mutasyonu, klinik evre, histolojik grade, histolojik alt tip, etnik köken, menopoz gibi nitel değişkenlerin istatistiksel analizleri de yapılmıştır. Aynı zamanda sayı ve yüzde olarak, yaş, tedavi öncesi ve sonrası CA125 durumu gibi nicel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ise ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum olarak verilmiştir. İlgili değişkenler için SPSS (version 26, IBM Corp. in Armonk, NY) hesaplamaları yapılmıştır. İstatiksel anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$ olarak alınmıştır. Bulgular nitel ve nicel değişkenler ile metilasyon için eşik değeri olarak belirlenen %6 metilasyon oranlarına göre analiz edilerek karşılaştırılmıştır. Metilasyon bulgusu %6 ve altında olan örnekler unmetile, %6 üstünde olan örnekler ise metile olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada over kanserli hasta grubunda 93 kişi olup, bunların 73'ünde *PRDM6* geninin metile (%78,49) olduğu 20'sinde ise unmetile (%21,51) olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).

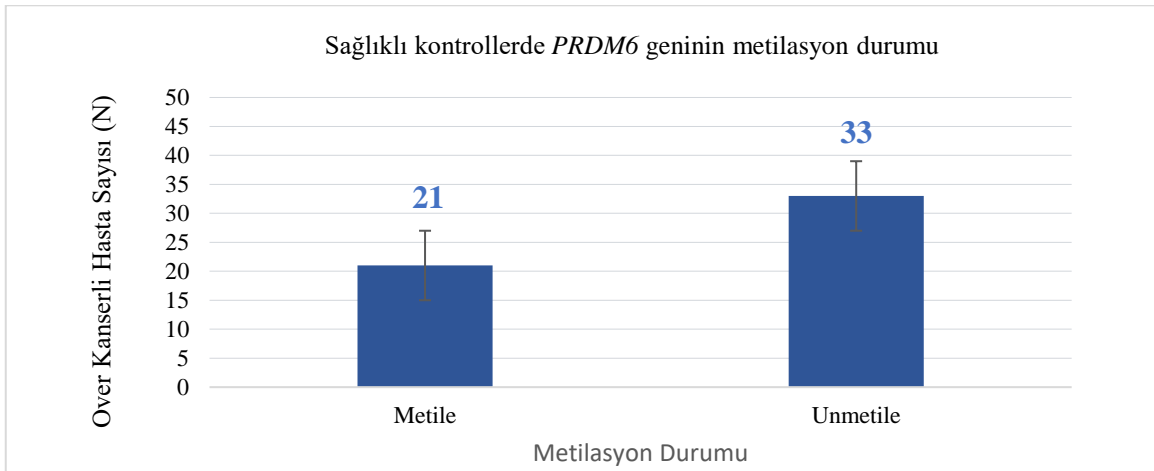


Şekil 4.1. Over kanserli hastalara ait periferik kan örneklerinde *PRDM6* geninin metilasyon durumu

Overlerinde benign kitlesi olan grupta 48 kişiden 36'sında *PRDM6* geninin metile (%75), 12'sinin ise unmetile (%25) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Sağlıklı kontrol grubunda ise 54 kişiden 21'inde *PRDM6* geninin metile (%38,88), 33'ünde unmetile (%61,12) olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.2.Overlerinde benign kitlelere sahip kişilere ait periferik kan örneklerinde *PRDM6* geninin metilasyon durumu



Şekil 4.3.Sağlıklı kontrol grubunun periferik kan örneklerinde *PRDM6* geninin metilasyon durumu

Araştırılan nitel (Tablo 4.1) ve nicel (Tablo 4.2) değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Çalışma gruplarına ait nitel değişkenlerin sayısı ve yüzdeleri

		Over Kanserli hastalar		Benign kitlelere sahip kişiler		Sağlıklı kontroller	
		N	%	N	%	N	%
Metilasyon	Unmetile	20	21,5	12	25,0	33	61,1
	Metile	73	78,5	36	75,0	21	38,9
BRCA1	BRCA1 Negatif	82	88,2	48	100	54	100
	BRCA1 Pozitif	11	11,8	0	0	0	0
BRCA2	BRCA2 Negatif	88	94,6	48	100,0	54	100,0
	BRCA2 Pozitif	5	5,4	0	0	0	0
BRCA	BRCA Negatif	77	82,8	48	100,0	54	100,0
	BRCA Pozitif	16	17,2	0	0	0	0
45 yaş	45 yaş altı	36	38,7	40	83,3	33	61,1
	45 yaş üstü	57	61,3	8	16,7	21	38,9
Klinik evre	Evre 1	11	11,8	0	0	0	0
	Evre 2	19	20,4	0	0	0	0
	Evre 3	50	53,8	0	0	0	0
	Evre 4	13	14,0	0	0	0	0
Histolojik Grade	Evre 1	13	14,0	0	0	0	0
	Evre 2	48	51,6	0	0	0	0
	Evre 3	32	34,4	0	0	0	0

Histolojik alt tip	Seröz epitelyal	54	58,1	0	0	0	0
	Müsinöz	2	2,2	0	0	0	0
	Endometrioid	7	7,5	0	0	0	0
	Berrak hücreli	30	32,3	0	0	0	0
Etnik köken	Türk	81	87,1	48	100,0	54	100,0
	Balkan	12	12,9	0	0	0	0
Menopoz durumu	Premenopoz	29	31,2	45	93,8	51	94,4
	Postmenopoz	64	68,8	3	6,3	3	5,6

Tablo 4.2.Over kanserli hasta grubuna ait nicel değişkenlerin tanımlayıcı istatistik değerleri

	Yaş	İlk CA125	Son CA125	Metilasyon Durumu
Ortalama	48,95	110,34	170,42	29,61
Medyan	49,00	93,0	68,47	10,20
Standart Sapma	11,00	420,01	681,03	88,27
Minimum	17	16,8	2,2	0,26
Maksimum	79	3007,00	4284,5	649,80

Tüm gruplara ait yaş ve menopoz nitel değişkenlerinin metilasyon durumuna göre dağılımları Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Over kanserli hastalarda, overlerinde benign kitlelere sahip kişilerde ve sağlıklı kontrollerde 45 yaş altı ve 45 yaş üstü olma ve menopoz durumu ile metilasyon değerleri kıyaslandığında belirgin bir farklılık görülmemiştir.

Tablo 4.3.Çalışma gruplarında menopoz ve yaş nitel değişkenlerinin metilasyon durumuna göre dağılımları

		Over kanserli hastalar				Overlerinde Benign kitlere sahip kişiler				Sağlıklı kontroller			
		Metile		Unmetile		Metile		Unmetile		Metile		Unmetile	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Menopoz durumu	Pre-menopoz	23	31,5	6	30	34	94,4	11	91,7	21	100	30	90,9
	Post-menopoz	50	68,5	14	70	2	5,6	1	8,3	0	0	3	9,1%
Yaş	45 yaş altı	26	35,6	10	50	9	75,0	31	86,1	15	71,4	18	54,5
	45 yaş üstü	47	64,4	10	50	3	25,0	5	13,9	6	28,6	15	45,5

Over kanserli hastalarda nitel değişkenlerin dağılımlarının karşılaştırılması sonucunda elde edilen p değerleri ve tanımlayıcı istatistikler Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Over kanserli hastalarda *PRDM6* geni unmetile olan 20 hasta olup, bunların 2'sinde *BRCA1* geninde mutasyon söz konusudur. Aynı gruptaki 18 hastada *BRCA1* geninin mutasyon durumu negatiftir. Over kanserli hastalarda *PRDM6* geni metile olan 73 hastanın 64'ünde ise *BRCA1* geninin mutasyon durumu negatiftir. Geriye kalan 9 hastada *BRCA1* geninde mutasyon söz konusudur. Metilasyon değerleri açısından *BRCA1* geninde mutasyon görülme oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0,775$).

Benzer olarak *PRDM6* genindeki metilasyon durumu ile *BRCA2* genindeki mutasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0,292$). Klinik evre ve histolojik grade değişkeninde metilasyon durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Değişkenlere ait p değerleri sırasıyla 0,342 ve 0,792'dir. Etnik köken ile metilasyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,052$) ancak elde edilen sonuçlar istatistiksel anlamlılığa oldukça yakındır.

Tablo 4.4. Over kanserli hastalara ait nitel değişkenlerin metilasyon durumuna göre istatistiksel sonuçları

		Metile		Unmetile		p
		N	%	N	%	
BRCA1	Negatif	64	87,7%	18	90%	0,775
	Pozitif	9	12,3%	2	10%	
BRCA2	Negatif	70	95,9%	18	90%	0,292
	Pozitif	3	4,1%	2	10%	
Etnik köken	Türk	61	83,6%	20	%100	0,052
	Balkan	12	16,4%	0	%0	
Histolojik alt tip	Seröz epitelyal	42	57,5%	12	60%	1,000
	Müsinöz	2	2,7%	0	0%	
	Endometrioid	6	8,2%	1	5%	
	Berrak hücreli	23	31,5%	7	35%	
Klinik evre	Evre 1	10	13,7%	1	5%	0,342
	Evre 2	17	23,3%	2	10%	
	Evre 3	36	49,3%	14	70%	
	Evre 4	10	10%	3	15%	
Histolojik alt tip	Evre 1	10	13,7%	3	15%	0,792
	Evre 2	39	53,4%	9	45%	
	Evre 3	24	32,9%	8	40%	

Over kanserli hastalarda *PRDM6* geninin metilasyon durumu yaş, ilk ve son CA125 ortalamaları bakımından istatistiksel sonuçlar Tablo 4.5'te belirtilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla p=0,903; p=0,349; p=0,121).

Tablo 4.5.Over kanserli hasta grubuna ait nicel değişkenlerin istatistiksel sonuçları

	Metilasyon Durumu	Ortalama	Medyan	Standart sapma	Minimum	Maksimum	P
Yaş	Unmetile	48,55	47,50	11,071	23	68	0,903
	Metile	49,05	49,00	11,057	17	79	
İlk CA125	Unmetile	73,60	68,47	1951,38	7,97	628,00	0,349
	Metile	120,40	110,34	531,91	5,00	3007,00	
Son CA125	Unmetile	547,56	198,95	1337,39	4,35	4284,50	0,121
	Metile	67,09	24,00	265,179	2,20	1913,00	

Hastalarda ilk CA125 ve son CA125 arasında metilasyon değeri açığından istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmemiştir ($p=0,333$; $p=0,309$).

Tablo 4.6.Over kanserli hasta grubunda ilk CA125 ve son CA125 değişkenlerinin anlamlılık değerleri

		İlk CA125	Son CA125
% metilasyon	r	0,005	0,101
	p	0,333	0,309
	N	93	93

Over kanserli hastalar, benign kitlelere sahip kişiler ve sağlıklı kontrol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında over kanserli 93 hastanın 73'ünde (%78,49) *PRDM6* geninin metile olduğu tespit edilmiştir.

Sağlıklı kontroller ve benign kitlelere sahip kişilerin metilasyon durumu kıyaslandığında iki grup arasında metilasyon oranlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$) (Tablo 4.7). Aynı kıyaslama over kanserli hastalar ve benign kitlelere sahip kişilerin arasında yapıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p=0,639$) (Tablo 4.8). Over kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda genin metile olma oranları kıyaslandığında farkın istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.7. Sağlıklı kontroller ve benign kitlelere sahip kişilerin metilasyon durumuna göre istatistiksel analizi

			Unmetile	Metile	Toplam	p
Tanı	Sağlıklı	N	33	21	54	<0,001
	Kontroller	%	61,12	38,88	100	
	Benign kitlelere	N	12	36	48	
	sahip kişiler	%	25	75	100	

Tablo 4.8. Over kanserli hastalar ve benign kitlelere sahip kişilerin metilasyon durumuna göre istatistiksel analizi

			Unmetile	Metile	Toplam	p
Tanı	Benign kitlelere	N	12	36	48	0,639
	sahip kişiler	%	25	75	100	
	Over kanserli	N	20	73	93	
	hastalar	%	21,51	78,49	100	

Tablo 4.9. Over kanserli hastalar ve sağlıklı kontrollerin metilasyon durumuna göre istatistiksel analizi

			Unmetile	Metile	Toplam	p
Tanı	Sağlıklı	N	33	21	54	<0,001
	Kontroller	%	61,12	38,88	100	
	Over kanserli	N	20	73	93	
	hastalar	%	21,51	78,49	100	

Çalışma grupları arasındaki metilasyon ortalaması, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değer Tablo 4.10'da gösterilmiştir. Metilasyon ortalaması over kanserli hastalarda 29,61 olarak belirlenmiştir. Over kanserli hastaların metilasyon ortalaması ayrı ayrı kontrol ve benign kitlelere sahip kişilerin olduğu gruplarla kıyaslandığında metilasyon ortalamasının over kanseri olan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$).

Tablo 4.10.Çalışma gruplarının metilasyon ortalamaları bakımından anlamlılık değerleri

Tanı	Ortalama	Medyan	Standart sapma	Minimum	Maksimum	p
Sağlıklı Kontroller	8,08	5,42	13,29	0,15	94,61	
Benign kitlelere sahip kişiler	11,95	8,54	9,23	2,42	50,00	<0,001
Over kanserli hastalar	29,61	10,20	88,27	0,01	649,80	

5. TARTIŞMA

Over kanseri, dünyada kadınlarda en sık görülen 8. kanser türüdür. 2020 yılındaki tüm kanser ile ilişkili ölümlerin %4,7'sinin sebebi over kanseridir [1][2]. Over kanserinde tanı ve teşhisin konulduğu evre ile sağkalım oranı doğrudan ilişkili olup, tanı ne kadar erken konulursa sağkalım oranı o kadar artmaktadır [6]. Over kanserinin teşhisi için kullanılan en etkili biyolojik araçlar, CA125 ve HE4'ün kombinasyonudur [6]. Ancak bu yöntemlerin belli başlı kısıtlılıkları söz konusudur [7]. Over kanseri ile ilgili klinikteki en önemli zorluk erken dönemde özgül ve güvenilir biyobelirteçleri yetersiz olması ve semptomların geç fark edilmesinden dolayı tanının gecikmesidir. Bu çalışmada over kanserinin tanısında kullanılabileceğini ve diğer tanı yöntemlerine katkı sağlayabileceğini düşündüğümüz *PRDM6* geninin metilasyon durumu değerlendirmiştir. Son yıllarda DNA hipermetilasyonu karsinogenezin erken evrelerinde meydana gelmesinden dolayı erken tanı amacıyla kullanılabilme potansiyeli ile çoğunlukla gündemdedir [36].

PRDM6 geniyle yapılan çalışmalarda sonuçlar, epigenetik düzenleyici olarak işlev görme yeteneği olabileceği şeklindedir. Primer hücrelerde *PRDM6*'nın aşırı ifade edilmesiyle, *PRDM6*'nın hücrenin morfolojik değişiklikleri ve hücre çoğalması ile ilişkili olduğu açıkça gösterilmiştir [10]. *PRDM6* geni ve over kanseri ilişkisi araştırıldığında, *PRDM6* geni ile over kanseri arasında ilişkilendirme ilk kez Erdoğan ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılmıştır. Over kanseri olan ve olmayan monozigotik ikizlerde yapılan bu çalışmada over kanseri olan kardeşte *PRDM6* geninin hipermetile olduğu gösterilmiştir [9].

Bu verilerden yola çıkarak yapılan bu tez çalışması ile *PRDM6* geninin over kanseri tanısında kullanılabilecek aday bir biyobelirteç olma niteliği daha fazla sayıda over kanserli hasta grubu üzerinde araştırılmış ve değerlendirilmiştir. 93 over kanserli hasta, overin benign kitlelerine sahip 48 kişi ile aile öyküsünde kanser tanısı bulunmayan kontrol grubu olarak 54 sağlıklı kişiden alınan kan örneklerinde *PRDM6* geninin metilasyon analizi yapılmıştır.

Çalışmada *PRDM6* geni metile olan over kanserli hastalarda *BRCA1* ve *BRCA2* gen mutasyon dağılımı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Tüm çalışma grubu değerlendirildiğinde, etnik köken ile metilasyon durumu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Hastalarda *PRDM6* geninin metile ve unmetile olma durumu arasında yaş, ilk CA125 ve son CA125 ortalamaları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Over kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda genin metile olma oranları kıyaslandığında farkın istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). Çalışmada metilasyon ortalaması over kanserli hastalarda 29,61 olarak belirlenmiştir. Diğer gruplarla ayrı ayrı kıyaslandığında metilasyon ortalamasının anlamlı olarak hasta grubunda yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Çalışmaya katılan tüm katılımcılar analiz edildiğinde *PRDM6* geninde metilasyon tespit edilen 130 kişinin büyük çoğunluğunu (%56,2) over kanseri tanısı almış hastalar olduğu görülmektedir. *PRDM6* geni unmetile olan kişilerin çoğunluğun ise sağlıklı kontrol grubunda yer alan kişiler oluşturmaktadır. Overinde benign kitlelere sahip 48 kişinin 36'sında *PRDM6* geni metile olmuştur. İstatiki sonuçlar değerlendirildiğinde bu kişilerinde gelecekte over kanseri açısından takiplerinin yapılması gerekliliği anlaşılmaktadır. Biyobelirteç olabilecek moleküllerin özellikleri göz önünde bulundurulduğunda *PRDM6* gen metilasyon durumu, benign kitlelere sahip kişilerinde gelecekte takiplerinin ve hastalık açısından risklerinin belirlenmesi sonrası over kanseri tanı ve teşhisinde epigenetik bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Ancak biyobelirteç niteliğinin kesin olarak ölçülmesi için daha büyük hasta ve kontrol gruplarıyla genin ekspresyonel farklılıklarının da ortaya konularak değerlendirileceği çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Özetle, over kanserinde hipometile veya hipermetile olduğu belirlenen birçok gen tanımlanmıştır. *PRDM* gen ailesi içerisinde yer alan genlerin metilasyon durumları bazı çalışmalarda analiz edilmiş ve farklı kanser türlerinde bu genlerin metile olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda genin metilasyon durumunun yanı sıra ilgili kanser dokusunda mRNA ekspresyon seviyeleri de araştırılmıştır. İlgili dokularda gen ekspresyonun düşük olması ile genin promotor metilasyonunun yüksek oluşu arasında bağlantılar belirlenmeye çalışılmıştır [53].

Bu çalışmada sadece *PRDM6* geninin periferik kan örneklerinde metilasyon durumu değerlendirilmiştir. İlgili genin over kanserinde biyobelirteç niteliğinin tam olarak değerlendirilmesi için diğer çalışmalarda olduğu gibi doku düzeyinde ekspresyon seviyelerinin de araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gruplarındaki kişi sayıları artırılarak daha kapsamlı bir çalışma

dizaynı ile sonuçların güvenilirliğinin arttırılması hedeflenmektedir. Çalışmada elde edilen bulgular daha önce monozigotik ikizlerde yapılmış öncü çalışmayı desteklemekte ve *PRDM6* geni ile over kanseri arasındaki ilişkinin aydınlatılması adına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. ve Jemal, A. (2014). Cancer statistics, *CA Cancer J Clin.*, Jan-Feb;64(1):9-29.
2. Sung, H., Ferlay, J., Siegel R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ve ark. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.*, May;71(3):209-249.
3. Redondo, A., Guerra, E., Manso, L., Martin-Lorente, C., Martinez-Garcia, J., Perez-Fidalgo, J. A., ve ark. (2021). SEOM clinical guideline in ovarian cancer (2020). *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 23(5), 961–968.
4. Horiuchi, A., Itoh, K., Shimizu, M., Nakai, I., Yamazaki, T., Kimura, K. ve ark. (2003). Toward understanding the natural history of ovarian carcinoma development: A clinicopathological approach. *Gynecologic Oncology*, 88(3), 309–317.
5. Alberts, B. (2015) *Molecular Biology of the Cell*. 6th Edition, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York.
6. Dochez, V., Caillon, H., Vaucel, E., Dimet, J., Winer, N. ve Ducarme, G., Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res.*, 27;12(1):28.
7. Buamah, P. (2000). Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration. *J Surg Oncol.*, 75:264–5.
8. Guo, J., Sun, L. ve Qingqing L. (2022). The association between HIC1 methylation and ovarian cancer: a meta-analysis. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, 43(2), 315–320.
9. Erdogan, O. S., Tuncer, S. B., Kilic, S., Odemis, D. A., Turkcan, G. K., Celik, B. ve ark. (2020). Genome-wide methylation profiles in monozygotic twins with discordance for ovarian carcinoma. *Oncology letters*, 20(6), 357.
10. Hassan, M. (2021). Investigating the role of the epigenetic regulator *PRDM6* in cancer (Doctoral dissertation, University of Leicester).

11. Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (3), 154-165.
12. Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre M.F. ve ark. (2015) The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.*,1(4):505-27.
13. Siegel, R., Miller, K. D., Fuchs, H. E. ve Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians*, 72(1), 7–33.
14. Graziottin, A., ve Gambini, D. (2015). Anatomy and physiology of genital organs - women. *Clin Neurol.*,130:39-60.,130 (1). Elsevier B.V.
15. Dubeau, L. (2008). The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol.*,9(12):1191-7.
16. Güzel, D., Yıldırım, N., Besler A., Akman L., Özdemir N., Zekioğlu O. ve ark. (2019). Over kanserinin epidemiyolojisi ve genel sağ kalım özellikleri. *Ege Tıp Dergisi*; 44-49
17. Ledermann, J., Harter. P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G. ve ark. (2014). Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by *BRCA* status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.*,15(8):852-61.
18. King, M.C., Marks, J.H. ve Mandell, J.B. (2003). New York Breast Cancer Study Group Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Science* 302: 643–646.
19. Loveday, C., Turnbull, C., Ramsay, E., Hughes, D., Ruark, E., Frankum, J. R. Ve ark. (2011). Germline mutations in *RAD51D* confer susceptibility to ovarian cancer. *Nature genetics*, 43(9), 879–882.
20. Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D. Ve ark. (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish *RAD51C* as a human cancer susceptibility gene. *Nature genetics*, 42(5), 410–414.
21. Lancaster, J. M., Powell, C. B., Chen, L. M., Richardson, D. L., & SGO Clinical Practice Committee (2015). Society of Gynecologic Oncology statement on risk

- assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. *Gynecologic oncology*, 136(1), 3–7.
22. Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J., ve Karlan, B. Y. (2016). Ovarian cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–22.
 23. Walsh, T., Casadei, S., Lee, M. K., Pennil, C. C., Nord, A. S., Thornton, A. M. Ve ark. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), 18032–18037.
 24. Selçuk, İ., Özel, Ş., Güngör, T. Ve Engin, Y. (2018). Over Kanseri Perspektifinde BRCA Gen Mutasyonları ve Herediter Meme ve Over Kanser Sendromu. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, 15(3): 135-144.
 25. Narod, S.A. ve Boyd, J. (2002). Current understanding of the epidemiology and clinical implications of *BRCA1* and *BRCA2* mutations for ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.*, 14:19–26.
 26. Gilks, C. B., Ionescu, D. N., Kalloger, S. E., Köbel, M., Irving, J., Clarke, B. ve ark. (2008) Tumor cell type can be reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. *Human pathology*, 39(8), 1239–1251.
 27. Berek, J. S., Kehoe, S. T., Kumar, L., ve Friedlander, M. (2018). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 143, 59–78.
 28. Furtado, C. L., Dos Santos Luciano, M. C., Silva Santos, R. D., Furtado, G. P., Moraes, M. O., ve Pessoa, C. (2019). Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*, 14(12), 1164–1176.
 29. Bennett, R.L. ve Licht, J.D. (2018). Targeting epigenetics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 58:187–207.
 30. Werner, H.M.J., Mills, G.B. ve Ram, P.T. (2014), Cancer systems biology: A peek into the future of patient care? *Nat Rev Clin Oncol.*, 11:1–22.
 31. Park, J.W. ve Han P.J. (2019). Targeting epigenetics for cancer therapy. *Arch Pharm Res.*, 42:159–170.

32. Yamada, Y. (2018). The causal relationship between epigenetic abnormality and cancer development: in vivo reprogramming and its future application. *Proc Jpn Acad Ser B.*, 94:235–247.
33. Zervos, E. E., Tanner, S. M., Osborne, D. A., Bloomston, M. ve ark. (2006). Differential gene expression in patients genetically predisposed to pancreatic cancer. *The Journal of surgical research*, 135(2), 317–322.
34. Bast, R. C., Jr, Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L. M., Colvin, R. B., ve Knapp, R. C. (1981). Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *The Journal of clinical investigation*, 68(5), 1331–1337.
35. Drapkin, R., von Horsten, H. H., Lin, Y., Mok, S. C., Crum, C. P., Welch, W. R., ve Hecht, J. L. (2005). Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer research*, 65(6), 2162–2169.
36. Ferraro, S., ve Panteghini, M. (2014). Is serum human epididymis protein 4 ready for prime time?. *Annals of clinical biochemistry*, 51(Pt 2), 128–136.
37. Dikmen, Z. G., Colak, A., Dogan, P., Tuncer, S., ve Akbıyık, F. (2015). Diagnostic performances of CA125, HE4, and ROMA index in ovarian cancer. *European journal of gynaecological oncology*, 36(4), 457–462.
38. Li, S., ve Tollefsbol, T. O. (2021). DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. *Methods*, 187, 28-43.
39. Khodadadi, E., Fahmideh, L., Khodadadi, E., Dao, S., Yousefi, M., Taghizadeh, S. ve ark. (2021). Current Advances in DNA Methylation Analysis Methods. *BioMed research international*, 2021, 8827516.
40. Gürel, Ç., Nursal, F.A. ve Yiğit, S. (2016). Epigenetik ve Kanser, *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics*. 2(1):45-51.
41. Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A. ve Anant, S. (2014) DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol*, 4:80.
42. Kurdyukov, S. ve Bullock, M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel)*, 6;5(1):3.
43. Güler, C. ve Peynircioğlu, B. B. (2016). DNA Metilasyonu ve Hastalıklarla İlişkisi, *ACU Sağlık Bil Dergisi*, 2:61-68.

44. Rocha, M. S., Castro, R., Rivera, I., Kok, R. M., Smulders, Y. M., Jakobs, C. ve ark. (2010). Global DNA methylation: comparison of enzymatic- and non-enzymatic-based methods. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 48(12), 1793–1798.
45. Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., ve ark. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9700–9704.
46. Hentze, J.L., Høgdall, C.K. ve Høgdall, E.V. (2019). Methylation and ovarian cancer: Can DNA methylation be of diagnostic use? *Mol Clin Oncol.*, 10(3):323-330.
47. Ibanez de Caceres, I., Battagli, C., Esteller, M., Herman, J. G., Dulaimi, E., Edelson, M. I. ve ark. (2004). Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer research*, 64(18), 6476–6481.
48. Rienzo, M., Sorrentino, A., Di Zazzo, E., Di Donato, M., Carafa, V., Marino, M. M. ve ark. (2021). Searching for a Putative Mechanism of RIZ2 Tumor-Promoting Function in Cancer Models. *Frontiers in oncology*, 10, 583533.
49. Fog, C. K., Galli, G. G., ve Lund, A. H. (2012). PRDM proteins: important players in differentiation and disease. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 34(1), 50–60.
50. Hohenauer, T. Ve Moore, A. W. (2012). The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. *Development (Cambridge, England)*, 139(13), 2267–2282.
51. Davis, C. A., Haberland, M., Arnold, M. A., Sutherland, L. B., McDonald, O. G., Richardson, J. A. ve ark. (2006). PRISM/PRDM6, a transcriptional repressor that promotes the proliferative gene program in smooth muscle cells. *Molecular and cellular biology*, 26(7), 2626–2636.
52. Yamashita, J., H. Itoh, M. Hirashima, M. Ogawa, S. Nishikawa, T. Yurugi, M. Naito, K. Nakao, ve S. Nishikawa. (2000). 'Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors', *Nature*, 408: 92-6.

53. Wu, Y., Ferguson, J. E., 3rd, Wang, H., Kelley, R., Ren, R., McDonough, H., Meeker, J. ve ark. (2008). PRDM6 is enriched in vascular precursors during development and inhibits endothelial cell proliferation, survival, and differentiation. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 44(1), 47–58.
54. Northcott, P. A., Buchhalter, I., Morrissy, A. S., Hovestadt, V., Weischenfeldt, J., Ehrenberger, T. ve ark. (2017). The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature*, 547(7663), 311–317.

