



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AFLATOKSİN B1 KAYNAKLI
HEPATOSELLÜLER
KARSİNOMALARDA ADAY MOLEKÜLER
HEDEFLERİN ANALİZİ**

ŞİRİN YÜKSEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Cemaliye Akyerli Boylu

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

Kurum : Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ

Tez Sahibi : ŞİRİN YÜKSEL

Tez Başlığı : AFLATOKSİN B1 KAYNAKLI HEPATOSELLÜLER

KARSİNOMALARDA ADAY MOLEKÜLER HEDEFLERİN ANALİZİ

Sınav Yeri : Acıbadem Üniversitesi 7. Kat Toplantı Salonu

Sınav Tarihi : 22 MART 2013

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Yrd.Doç.Dr. Cemaliye Akyerli
Boylu

Kurumu

Acıbadem Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. Cengiz Yakıcıer

Prof. Dr. Tanıl Kocagöz

Acıbadem Üniversitesi

Acıbadem Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 10.11.2013. tarih ve 06. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Enis ÖZYAR

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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.

01. 03. 2013

Şirin Yüksel

TEŞEKKÜR

Bugüne kadar Acıbadem Genetik Tanı Merkezi'nde edindiğim laboratuvar tecrübemi akademik olarak da desteklememe olanak sağlayan, tecrübe ve bilgisiyle karşılaştığım tüm zorlukları aşmamda desteğini esirgemeyen danışman hocam ve müdürüm Prof.Dr. Mustafa Cengiz Yakıcıer'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans ders dönemi ve tez yazım sürecinde bana güvenerek motive eden, anlayış ve sabrını esirgemeyen, eğitimimin yanı sıra her konuda sonsuz desteğini gördüğüm değerli danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Cemaliye Akyerli Boylu'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübe ve bilgilerini karşılık beklemeden aktaran, başta program koordinatörü Prof.Dr. Aysel Özpınar olmak üzere Sağlık Bilimleri Enstitüsü "Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı"nda görev alan tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalara katkılarından dolayı Dr. Tolga Acun'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 112T661 nolu proje ile TÜBİTAK tarafından maddi olarak desteklenmiştir. Acıbadem Üniversitesi ve Acıbadem Genetik Tanı Merkezi olanakları kullanılmıştır.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de bana olan güvenleri, karşılıksız destekleri, tükenmeyen sevgi ve anlayışları ile daima yanımda olan biricik aileme de sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Hepatosellüler Karsinoma.....	6
2.1.1. Epidemiyoloji.....	6
2.1.2. Patogenez.....	7
2.1.3. Risk faktörleri.....	9
2.1.3.1. Kronik viral enfeksiyonlar.....	9
2.1.3.2. Kronik alkol kullanımı.....	11
2.1.3.3. Aflatoksin B1 maruziyeti.....	12
2.1.3.4. Metabolik hastalıklar.....	13
2.1.3.5. Diğer risk faktörleri.....	15
2.1.4. Moleküler biyolojisi.....	15
2.1.4.1. Kromozomal aberasyonlar.....	17
2.1.4.2. P53/ARF yolağı.....	18
2.1.4.3. RB/INK4A yolağı.....	21
2.1.4.4. WNT/β-KATENİN yolağı.....	21
2.1.4.5. TGF-β yolağı.....	23
2.1.4.6. Diğer yollar.....	24
2.1.4.7. Epigenetik değişiklikler.....	26

2.1.5. Tanı.....	28
2.1.5.1. Evreleme.....	29
2.1.6. Tedavi.....	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	31
3.1. Gereçler.....	31
3.1.1. Hücre hatları.....	31
3.1.2. Cihazlar.....	31
3.1.3. Kimyasallar ve kitler.....	32
3.1.4. Plastik malzemeler.....	33
3.1.5. Oligonükleotitler.....	33
3.1.6. Standart solüsyonlar ve tampon çözeltiler.....	38
3.1.6.1. PZR grade H ₂ O.....	38
3.1.6.2. dNTP.....	38
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu.....	39
3.2.2. Yeni nesil DNA analizi.....	39
3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	43
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi.....	45
3.2.5. PZR ürün saflaştırma.....	45
3.2.6. Dizi analizi reaksiyonu.....	45
3.2.7. Bağlanmamış floresan işaretli ddNTPler'in uzaklaştırılması.....	46
3.2.8. Otomatik DNA dizi analizi ve verilerin incelenmesi.....	47
3.2.9. Yeni nesil DNA analizinden elde edilen sonuçların Sanger yöntemi ile doğrulanması.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. Yeni Nesil DNA Dizi Analizi.....	48
4.2. PZR ve Sanger Dizi Analizi.....	50
4.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonları.....	50
4.2.2. Yeni nesil DNA analizi sonuçlarının Sanger yöntemi ile doğrulanması... 51	
4.2.3. <i>BCORL1</i> ve <i>ARID2</i> genlerinin Sanger dizi analizi.....	52
4.2.3.1. <i>BCORL1</i> geninin Sanger dizi analizi.....	53
4.2.3.2. <i>ARID2</i> geninin Sanger dizi analizi.....	54

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
5.1. Çalışmanın Gelecek Planları.....	58
6. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	70

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

3' UTR	3' translasyona uğramayan bölge
AASLD	Amerikan Karaciğer Hastalıkları Derneği (American Association for the Study of Liver Diseases)
AFB1	Aflatoksin B1
AFP	Alfa-1 fetoprotein
AFP-L3	Lens culinaris agglutinin-reaktif alfa-1 fetoprotein
AKT	v-akt murine thymoma viral onkogen homolog
AP-1	Aktivatör protein-1
APC	Adenomatöz poliposis koli
ARHGAP26	Rho GTPaz aktive edici protein 26
ARID2	AT-rich interactive domain-containing protein 2
AXIN1	Aksis inhibisyon proteini 1
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BCLC	Barselona Kliniği Karaciğer Kanseri (Barcelona Clinic Liver Cancer)
BCORL1	BCL6 co-repressor-like 1
bç	Baz çifti
BMPRI1A	Kemik morfogenetik protein reseptörü tip IA
CDK	Siklin-bağımlı kinaz
CDKN2A	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CGH	Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (comparative genomic hybridization)
CK1	Kazein kinaz 1
co-SMAD	Common mediator SMAD
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
DCP	Des gamma karboksi protrombin
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
ddNTP	Dideoksinükleotit trifosfat
dGTP	Deoksiganin trifosfat

DNMT	DNA metiltransferaz
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dTTP	Deoksitimin trifosfat
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
Egr-1	Early growth response-1
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1
EtBr	Etidyum bromür
FANCD2	Fankoni komplementasyon grubu D2
FDA-EMEA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi – Avrupa İlaç Ajansı (US Food and Drug Administration - European Medicines Agency)
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
GP73	Golgi proteini 73
GPC3	Glipikan-3
GSK3	Glikojen sintaz kinaz 3
HCC	Hepatocellular carcinoma
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
H.K.	Hepatosellüler karsinoma
hTERT	İnsan telomeraz revers transkriptaz
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer)
IGFR	İnsülin-benzeri büyüme faktörü reseptörü
IGF	İnsülin-benzeri büyüme faktörü
IRF2	İnterferon regülatör faktörü 2
I-SMAD	İnhibitör SMAD
JAK	Janus kinaz
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Heterozigote kaybı (loss of heterozygosity)
MAP2K4	Mitojen aktive protein kinaz kinaz 4
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
MBP	Metil-CpG bağlayıcı protein

MDM2	Mouse double minute 2 homolog
miRNA	mikroRNA
mTOR	Rapamisinin memelilerdeki hedefi
MYCL1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)
NF1	Nörofibromin 1
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NF-kB	Nükleer faktör kappaB
p14 ^{ARF}	p14 alternative reading frame
PBS	Fosfat tamponlu salin (phosphate buffered saline)
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PDGFR	Platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)
PRKAR1A	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I-alpha
PTEN	Fosfataz ve tensin homolog
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR)
RB1	Retinoblastoma 1
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPS6KA3	Ribozomal protein S6 kinaz
R-SMAD	Reseptör ile regüle edilen SMAD
SAM	s-adenozilmetiyonin
SCCA	Skvamöz hücreli karsinom antijeni
SDHC	Suksinat dehidrogenaz kompleks, alt ünite C
SDHD	Suksinat dehidrogenaz kompleks, alt ünite D
SELDI-TOF	Yüzey ile geliştirilmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi
SOCS	Sitokin sinyal baskılayıcı (suppressor of cytokine signaling)
STAT	Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatör
TACE	Transarteriyel kemoembolizasyon
TBE	Tris-borik asit-EDTA

T β RI	TGF- β tip I reseptör
T β RII	TGF- β tip II reseptör
T β RIII	TGF- β tip III reseptör
TE	Tris-EDTA
TGF- β	Transforming büyüme faktörü- β
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TLR-4	Toll-benzeri reseptör-4
T _m	Erime sıcaklığı (melting temperature)
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
Wnt	Wingless
XPC	Xeroderma pigmentosum, komplementasyon grubu C

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Dünyadaki hepatosellüler karsinoma kaynaklı ölüm oranları.....	6
Şekil 2: Hepatosellüler karsinoma gelişiminde meydana gelen hücresel lezyonların kronolojik sıralaması.....	8
Şekil 3: AFB1'in 8,9-ekso-epoksite dönüşümü ve sonrasında DNA katımı oluşumu.....	13
Şekil 4: Hepatosellüler karsinoma ile ilişkilendirilmiş sinyal ileti yolları.....	16
Şekil 5: Hepatosellüler karsinomada görülen p53 mutasyonlarının spektrumu.....	19
Şekil 6: CDKN2A lokusu.....	20
Şekil 7: Karaciğerde Wnt/ β -katenin sinyal iletimi.....	22
Şekil 8: TGF- β sinyal iletim yolağı.....	24
Şekil 9: Ras/Raf/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolları.....	25
Şekil 10: Hepatosellüler karsinomadaki moleküler hedefli terapiler.....	30
Şekil 11: PZR sonucu elde edilen ürünlerin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	50
Şekil 12: Yeni nesil DNA analizinden elde edilen <i>NF1</i> geni mutasyonlarının doğrulanması için kullanılan Sanger dizileme sonuçları.....	51
Şekil 13: Sanger yöntemi ile analiz edilen <i>BCORL1</i> geni varyasyonları.....	53
Şekil 14: Sanger yöntemi ile analiz edilen <i>ARID2</i> geni varyasyonları.....	54

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: <i>BCORL1</i> geninin çoğaltılması için kullanılan primerler.....	33
Tablo 2: <i>ARID2</i> geninin çoğaltılması için kullanılan primerler.....	35
Tablo 3: Yeni nesil DNA analizi sonuçlarının Sanger yöntemi ile doğrulanması amacıyla <i>FANCD2</i> , <i>NF1</i> ve <i>SDHC</i> genleri için kullanılan primerler.....	37
Tablo 4: Yeni nesil DNA analizinden elde edilen sonuçların Sanger yöntemi ile doğrulanması amacıyla <i>NF1</i> ve <i>p53</i> genleri için kullanılan primerler.....	37
Tablo 5: HybSelect protokolü ile analiz edilen 115 gen paneli.....	40
Tablo 6: Sanger yöntemi ile analiz edilen genler.....	44
Tablo 7: PZR koşulları.....	44
Tablo 8: Dizi analizi reaksiyonu koşulları.....	46
Tablo 9: Yeni nesil DNA analizinden elde edilen ve her iki hücre hattında da ortak olan G>T ve C>A varyasyonları.....	48
Tablo 10: MAHLAVU hücre hattında <i>BCORL1</i> ve <i>ARID2</i> genlerinde saptanan varyasyonlar.....	52
Tablo 11: PLC/PRF hücre hattında <i>BCORL1</i> ve <i>ARID2</i> genlerinde saptanan varyasyonlar.....	52

ÖZET

Hepatosellüler karsinoma (H.K.) dünyada en sık görülen kanserler arasında 6. sırada, kanserden ölüm nedenleri arasında da 3. sırada yer almaktadır. Hastalığın tanı ve tedavisinde yeni gelişmeler olsa da, sıklığı ve kötü prognozu nedeniyle H.K. hala önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, moleküler patogenezinin bilinmesi, tanı ve tedavide kullanılabilecek yöntemlerin geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Temel etiyolojik ajanlar olan hepatit B, hepatit C, aflatoksin B1 (AFB1) ve siroz tüm H.K. vakalarının yaklaşık %80'inden sorumludur. Aflatoksinler insan gıdalarında, tahıllarda, yemlerde ve her türlü kuru yiyeceklerde saklama koşullarında rutubetin artmasına ve sıcaklığa bağlı olarak, mantar türleri tarafından üretilen mikotoksinlerdir. Aflatoksinler arasında en bilinen ve genotoksik özelliği nedeniyle mutasyonlara yol açarak kanser gelişimine neden olan AFB1'dir. AFB1'e maruz kalmış H.K. vakalarında p53 R249S (G>T) mutasyonu olduğu bilinmektedir. Ancak AFB1 kaynaklı H.K. gelişiminde, bu mutasyondan başka p53 yolağına eşlik eden diğer yolaklar ya da genlerin mekanizmaları henüz açığa çıkarılamamıştır. Çalışmamızda, p53 R249S (G>T) mutasyonundan önce ya da sonra oluşmuş olası genetik değişikliklerin tanımlanabilmesi amacıyla R249S mutasyonu taşıdığı bilinen MAHLAVU ve PLC/PRF hücre hatları kullanılmıştır. Karsinogenezde rol oynadığı ve diğer kanser türlerinde mutasyonu bildirilen 115 kanser geni yeni nesil dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca, son zamanlarda yüksek çıktılı genom araştırmalarında, AFB1 dışı faktörlerle oluşan H.K.'larda mutasyonu gösterilen *BCORL1* ve *ARID2* genleri de Sanger dizi analizi ile taranmıştır. İki hücre hattından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, toplam 117 gende AFB1 ile ilişkilendirilebilecek bir genetik değişiklik saptanmamıştır.

Anahtar sözcükler: Aflatoksin B1, *ARID2*, *BCORL1*, hepatosellüler karsinoma, p53 R249S mutasyonu

SUMMARY

Analysis of Candidate Molecular Targets in Aflatoxin B1-Induced Hepatocellular Carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth most common cancer and the third leading cause of cancer deaths worldwide. Despite the recent advances in the diagnosis and treatment, HCC still appears to be an important health problem due to the frequency and poor prognosis of the disease. Therefore, understanding its molecular pathogenesis is very important for the development of new diagnostic and therapeutic modalities. Common etiological agents hepatitis B, hepatitis C, aflatoxin B1 (AFB1) and cirrhosis are responsible for about 80% of all HCC cases. Aflatoxins are mycotoxins produced by fungal species in human foods, cereals, feeds and any dried foods at increased humidity and temperature of storage conditions. AFB1 is the best known aflatoxin, which leads to mutations that cause cancer development due to its genotoxic characteristic. The presence of p53 R249S (G>T) mutation is known in AFB1 exposed HCC cases. However, involvement of other pathways or genes accompanying the p53 pathway in the development of AFB1-induced HCC other than this mutation has not been identified yet. In order to define the possible genetic changes taking place before or after the p53 R249S (G>T) mutation, we used two cell lines, MAHLAVU and PLC/PRF both known to carry the R249S mutation. 115 cancer genes previously reported to be involved in carcinogenesis with mutations in different cancer types were analyzed by next generation sequencing technologies. Moreover, *BCORL1* and *ARID2* genes shown to have mutations in HCC cases resulting from other factors than AFB1 were sequenced by Sanger method. When the results of the two cell lines were compared, no genetic variation possibly associated with AFB1 was detected in the 117 genes.

Keywords: Aflatoxin B1, *ARID2*, *BCORL1*, hepatocellular carcinoma, p53 R249S mutation

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatosellüler karsinoma (H.K.), primer karaciğer kanseri türüdür ve prognozu oldukça kötü bir hastalıktır. Gelişimi genellikle 30 yıldan uzun sürmektedir ve çok basamaklı bir süreç olan hepatokarsinogenezin moleküler mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. H.K. sürecinde en sık rastlanan genetik değişikliklerin; *TP53*, *beta-katenin* ve *aksin* genlerinde yoğunlaştığı gösterilmiş, ancak bu yollara eşlik eden diğer yollar ya da genlerdeki ardışık genetik değişiklikler henüz açığa çıkarılamamıştır (1).

Hepatosellüler karsinomaya yol açan etiyolojik faktörlerden biri özellikle bazı coğrafik bölgelerde çok önemli bir çevresel faktör olan aflatoksin B1 (AFB1)'dir. AFB1; insan gıdalarında, tahıllarda, yemlerde ve her türlü kuru yiyeceklerde rutubetin artmasına ve sıcaklığa bağlı olarak, mantar türleri tarafından üretilen zararlı toksinlerin en önemlilerinden biridir ve genotoksik özelliği nedeniyle mutasyonlara yol açarak kanser gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (2, 3, 4).

TP53 genindeki özgün R249S (G>T) somatik mutasyonu, AFB1 toksini ile ilişkilendirilmiştir (5, 6). Bu mutasyonunun varlığı, o hücre DNA'sında hasar meydana geldiğinin ve bu hasarın aflatoksin kaynaklı olduğunun bir işaretidir. Ancak, çok basamaklı hepatokarsinogenezde, AFB1'e maruz kalmış vakalarda, p53 R249S mutasyonuna eşlik eden diğer genetik değişiklikler (diğer basamaklar) henüz bilinmemektedir. AFB1'in yol açtığı genetik değişikliklerin araştırılması bu yüzden çok önemlidir.

Bu projenin amacı, öncelikle aflatoksinin sebep olduğu, p53 R249S (G>T) mutasyonundan önce ya da sonra oluşmuş diğer genetik değişiklikleri tanımlayarak, bunların hepatokarsinogenez ile ilişkisini göstermeye çalışmaktır. p53 mutasyonları farklı etiyolojik faktörler varlığında gelişmiş H.K.'larda da bildirilmiş olmasına rağmen, bu mutasyonlar genin belirli bir bölgesinde ya da nükleotidinde yoğunlaşmamaktadır. Bu yoğunlaşma sadece aflatoksin maruziyeti (ve genellikle buna eşlik eden HBV enfeksiyonu varlığında) olan vakalarda karşımıza çıkmaktadır.

Projenin diğerk amacı ise, herhangi bir genetik değışiklik saptanması durumunda, bunun aflatoksin dışı faktörlerle oluşan H.K.'larda da etkili olup olmadığının araştırılmasıdır. Böylece, çalışmamız yeni onkogen ya da tümör baskılayıcı genlerin tanımlanmasına da yardımcı olabilecektir.

Çalışmamızda, AFB1 maruziyeti sebebiyle p53 R249S (G>T) mutasyonuna sahip olduğu bilinen MAHLAVU ve PLC/PRF hücre hatlarında, daha önce farklı kanserlerle ilişkisi gösterilmiş 115 gen için yeni nesil dizi analizi yöntemleri ile mutasyon taraması yapılması hedeflenmiştir.

Ayrıca, literatürde HCV kaynaklı bir H.K. vakasında bildirilmiş kromozomal yeniden düzenlenme saptanmış *BCORL1* (BCL6 co-repressor-like 1) (7) ve AFB1 dışı faktörlerle oluşan H.K.'larda yeni mutasyonlar saptanması nedeniyle tümör baskılayıcı bir gen olduğu önerilmiş *ARID2* (AT-rich interactive domain-containing protein 2) (8, 9) genlerinde Sanger dizi analizi yöntemi ile kodlayan bölgeler için mutasyon analizi yapılması planlanmıştır. Bu analizler sonucunda referans dizilerden farklılık gösteren değışiklikler tespit edilebilecektir. Bu değışikliklerin biyolojik önemi, literatür bilgileri ve mutasyonların proteinlerde oluşturduğu değışiklikler göz önüne alınarak belirlenmeye çalışılacaktır. Bu değerlendirme sonucunda her iki hücre hattında da saptanan ve biyolojik önemi olduğu öngörülen mutasyonlar, genomunda aynı parmak izini taşıyan klinik örneklerde doğrulanacaktır.

Projemizin sonucunda, çok basamaklı hepatokarsinogenez sürecinde rol oynayarak AFB1'e maruz kalan hastalarda p53 R249S mutasyonundan önce ya da sonra ortaya çıkmış yeni genetik değışikliklerin saptanması hedeflenmektedir. Böylelikle, p53 yolağı mutasyona uğramak suretiyle inaktive olmuş H.K.'larda, yeni gen veya yolakların tanımlanması ile H.K. gelişim süreci daha iyi anlaşılabilir. Tanımlanacak yeni değışiklikler diğerk çevresel faktörlerin yol açtığı kanserlerde de araştırılmaya başlanabileceğinden, bu proje yeni moleküler epidemiyolojik çalışmalara da öncülük edebilecektir.

Hepatosellüler karsinomanın moleküler patogenezinin bilinmesi, tanı ve tedavide kullanılabilecek yöntemlerin geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Öte yandan saptanacak genetik değışiklikler kronik karaciğerk hastalığı olan bireylerde

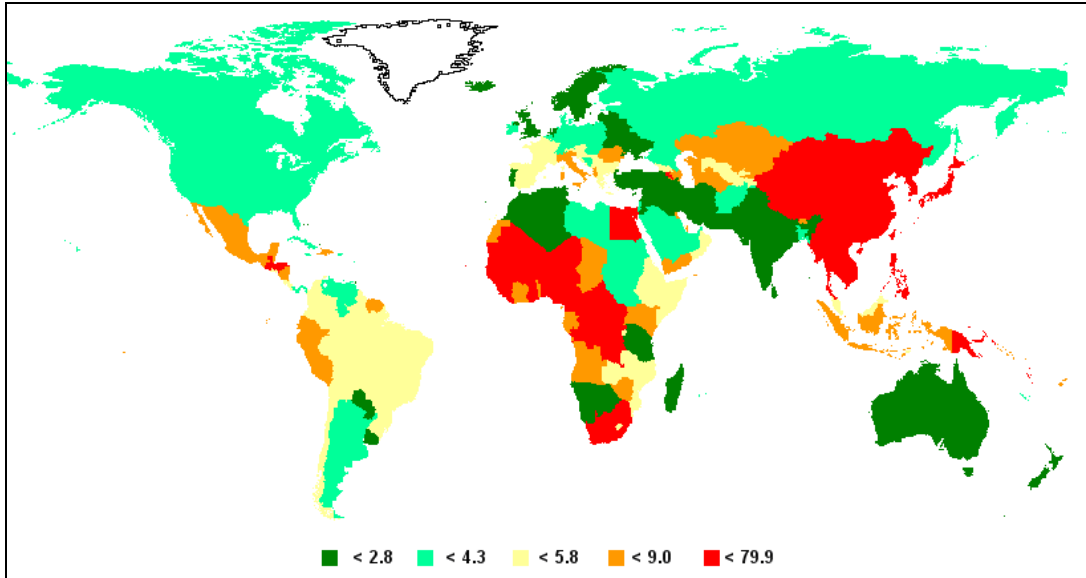
H.K.'nın başladığının belirtci olabileceği gibi, yeni ilaçların geliştirilmesi için de bir hedef olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatosellüler Karsinoma

2.1.1. Epidemiyoloji

Karaciğer kanseri dünyada en yaygın 6. kanser türü olup, kanser nedenli ölümler arasında akciğer ve mide kanserlerinden sonra gelerek 3. sırada yer almaktadır (Globocan2008, <http://globocan.iarc.fr>, Erişim tarihi: 1 Ocak 2013). En çok vaka Mongolya'da görülmekle birlikte, gittikçe artan hastalık insidansı coğrafik bölgeler arasında 20 – 40 kat farklılık göstermektedir. Vakaların % 80'den fazlası Afrika ve doğu Asya gibi gelişmekte olan ülkelerde, daha az oranda ise kuzey Avrupa ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerde görülmektedir (Şekil 1). Dağılımdaki farklılıkların nedeni risk faktörlerine maruziyetteki farklılıklarla açıklanmaktadır (10, 11).



Şekil 1: Dünyadaki hepatosellüler karsinoma kaynaklı ölüm oranları. Oranlar tüm yaşlar ve her iki cinsiyet için yaşa göre standardize edilmiş ve her 100,000 vakaya göre hesaplanmıştır. Görülme sıklığı, bölgesel farklılık göstererek doğu Asya ve Afrika'da yüksek, Avrupa ve kuzey Amerika'da düşük oranlardadır. (Globocan 2008, <http://globocan.iarc.fr>, Erişim tarihi: 1 Ocak 2013).

Karaciğer kanserleri erkeklerde kadınlardan 2-7 kat fazla görülmektedir ve yaşla birlikte insidansı artmaktadır (9). Kanser görülme yaşı, HBV-HCV enfeksiyon yaşı ve aktif viral yük oranına bağlıdır. Erkeklerde Asya ve Afrika başta olmak üzere sık görülen 5. kanser türüdür ve kanser nedenli ölümlerde 2. sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise Asya, Afrika ve Orta Amerika başta olmak üzere en sık görülen 7. kanser türü olmakla birlikte, kanser nedenli ölümlerde 6. sıradadır (Globocan2008, <http://globocan.iarc.fr>, Erişim tarihi: 1 Ocak 2013). Erkeklerdeki yüksek oranın sebebi, sigara ile alkol gibi siroza neden olan karaciğer kanserojenleri, hepatit virüs enfeksiyonlarına maruz kalma oranlarının daha yüksek olması ve androjen etkisidir (10, 11).

2.1.2. Patogenezi

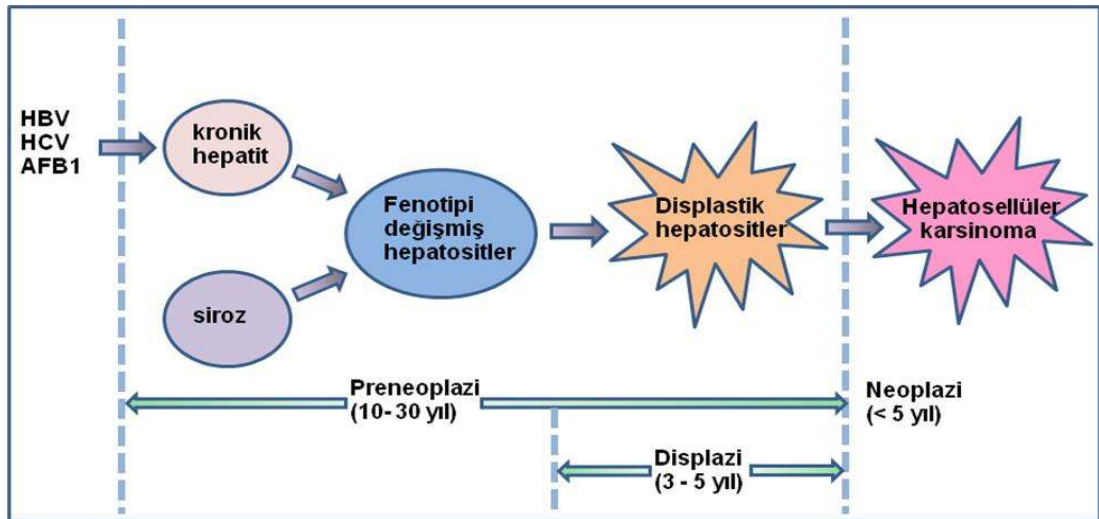
Karaciğer kanserleri, karaciğerin kendine özgü malign (kötü huylu) neoplazmlarını kapsamaktadır ve karaciğerde geliştiği hücrelere göre isimlendirilmektedir. Hepatositlerde (fonksiyonel karaciğer hücreleri) gelişen hepatosellüler karsinom, karaciğer içi safra kanallarındaki intrahepatik kolanjiyosellüler karsinom, karaciğer damarlarında başlayan anjiyosarkom ve çocuklarda görülen hepatoblastom, karaciğer kanseri türlerinden bazılarıdır (Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/type/liver-cancer/about/types-of-primary-liver-cancer>, Erişim tarihi: 1 Ocak 2013). Hepatosellüler karsinoma (H.K.), karaciğer kanserlerinin %70-85'ini oluşturan primer karaciğer kanseri türüdür (12).

Karaciğer fibrozisi, karaciğerde fibröz skar dokunun oluşumu anlamına gelmektedir. Skar doku oluşumu yaralanmaya karşı normal bir vücut yanıtıdır ancak fibroziste iyileşme süreci bozulmaktadır (13). Hepatositlerde (fonksiyonel karaciğer hücreleri) viral enfeksiyonlar, alkol, toksinler gibi çeşitli risk faktörleri nedeniyle hasar meydana geldiğinde, bağışıklık sistemi aktifleşerek hızla onarım sürecini başlatmaktadır. Hepatositlerin yaralanması veya ölümü (nekroz), enflamatuvar immün hücrelerin sitokinler, büyüme faktörleri ve diğer kimyasalların salınımı için uyarılmasını sağlamaktadır. Onarım sürecinde sentezlenen bu maddeler, karaciğerde birikerek ekstrasellüler matriks oluşumuna neden olmaktadır. Bu devamlı yıkıcı-

yenileyici sürecin uzun süreli döngüsü, siroz ile sonuçlanan kronik karaciğer hastalığına yol açmaktadır (HCV Advocate, <http://www.hcvadvocate.org/news/newsLetter/2004/advocate1004.html>, Erişim tarihi: 13 Ocak 2013).

Siroz, kolajen birikimi (fibrozis) ile çevrelenmiş anormal karaciğer nodülleri ve karaciğer hücrelerinin yerini alan skar doku ile karakterizedir (1). Karaciğer fonksiyonlarında azalmaya neden olan sirozun ilerleyen aşamalarında hiperplastik nodüller görülmektedir. Daha sonra gelişen displastik nodüller sonuç olarak H.K.'ya neden olmaktadır (Şekil 2) (14). Tüm H.K.'ların %80 - 90'ı sirotik karaciğerde gelişmektedir (15).

Hepatosellüler karsinoma ileri evrelere kadar herhangi bir belirti göstermemektedir. Yapılan farklı çalışmalarda, tanı alan hastaların bildirilen ortalama sağkalım süreleri, cerrahi müdahalede bulunulmamış hastalarda 8 ay (16) ile rezeksiyon uygulanmış hastalarda 64 ay arasında (17) değişiklik göstermektedir. Bu farklılıklar, hastalığın tanı anındaki evresinden ve hastanın klinik tablosuna göre değişiklik gösteren tedavi yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Düşük sağkalım oranlarının nedenleri, erken tanı için güvenilir biyolojik belirteçlerin yokluğu, tümörlerin kemoterapiye direnci ve altta yatan yaygın karaciğer hastalığının kemoterapik tedavi uygulamalarına engel teşkil etmesidir (18).



Şekil 2: Hepatosellüler karsinoma gelişiminde meydana gelen hücresel lezyonların kronolojik sıralaması. (Thorgeirsson ve Grisham (14)'dan uyarlanmıştır).

2.1.3. Risk faktörleri

Hepatosellüler karsinomaya neden olduğu bilinen majör risk faktörleri, kronik hepatit B ve hepatit C viral enfeksiyonlarını, kronik alkol kullanımını, aflatoksin B1 (AFB1) ile kontamine olmuş yiyecek tüketimini ve aslında tüm siroz indükleyici durumları kapsamaktadır (11). Majör risk faktörlerinin dışında obezite, diyabet, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, kalıtsal hemakromatozis, α 1-antitripsin eksikliği, herediter tirozinemi gibi metabolik hastalıklar, oral kontraseptif kullanımı, vinil klorür gibi çevresel toksinler ve sigara kullanımının da düşük frekanslarda H.K. ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (1). Risk faktörlerinin prevalansı coğrafik bölgelere ve etnik kökene göre farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, Afrika ve Asya’da daha çok HBV enfeksiyonu görülürken, Japonya ve Amerika’da HCV daha sıktır (10).

2.1.3.1. Kronik viral enfeksiyonlar

Viral enfeksiyonlar HCV ile enfekte hastaların %60-80’inde, HBV ile enfekte hastaların ise %10’unda kronik hepatite dönüşmektedir (19). HCV’nin siroz gelişimine katkısı HBV’den yaklaşık 10-20 kat daha fazladır.

Dünyadaki H.K. vakalarının yaklaşık %80’i kronik viral enfeksiyon kaynaklıdır (20). Hepatosellüler karsinoma riskinin kronik HBV taşıyıcılarında 5-15 kat (11), HCV-enfekte hastalarda ise 11.5-17 kat (21, 22) arttığı bildirilmiştir. Hepatosellüler karsinoma gelişiminde HBV ve HCV’nin etkisi, kronik enflamasyona neden olması ile dolaylı veya viral proteinler aracılığıyla direkt veya HBV durumunda olduğu gibi, hepatosit genomuna entegrasyon yoluyla mutasyonlar oluşturmak şeklinde olabilmektedir (23).

Hepatit B virüsü

İlk enfeksiyonu takiben HBV S antijeninin sürekli ekspresyonunun en az 6 ay devam etmesi olarak tanımlanan kronik HBV enfeksiyonu, karaciğer patolojileri ile ilişkilidir (24). Bu patolojiler sonuç olarak H.K. gelişimine etki eden fibrozis ve

sirozu kapsayabilmektedir. HBV-enfekte hastalarda H.K., siroz ve fibrozis yokluğunda da gelişebilmektedir (15).

HBV, kısmi çift sarmal sirküler DNAlı, hepatit B yüzey antijeni tarafından oluşturulan zarfa sahip, *Hepadnaviridae* ailesine mensup bir para-retrovirüstür (25). HBV genomu, revers transkriptaz / DNA polimeraz, kapsid proteini, zarf proteinleri (L, M ve S) ile HBx ve HbeAg gibi fonksiyonu henüz bilinmeyen az sayıda proteini kodlamaktadır (23). Hepatosite girdikten sonra, HBV genomu nükleusa giderek kovalent kapalı sirküler DNA halinde oldukça stabil bir konfirmasyon almaktadır. Bu DNA, viral proteinlerin translasyonunda gerekli viral RNA transkripsiyonu için kalıp (template) oluşturmaktadır (15).

HBV transgenik fare modellerinde yapılan çalışmalarda, sadece büyük zarfın ve HBx proteininin H.K. gelişimi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (26). HBV entegrasyonunun konak genomda kromozomal delesyonlar, translokasyonlar, füzyon transkriptlerinin üretimi, hücresel DNA amplifikasyonu ve genomik instabilite gibi çok çeşitli genetik alterasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (27, 28). Bu alterasyonlar insan telomeraz revers transkriptaz (*hTERT*) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (*PDGF*) genleri, kalsiyum sinyal iletimiyle ilişkili genler ve mitojen aktive protein kinaz 1 (*MAPK1*) gibi tümör oluşumu ve gelişimi ile ilişkili genleri hedef alabilmektedir (29). HBx proteini *TP53* geninin represyonunu sağlayarak apoptoz, hücre döngüsü regülasyonu, DNA tamiri ve tümör baskılama gibi p53 ilişkili aktiviteleri inaktive etmek üzere de etkisini gösterebilmektedir (28).

Hepatit C virüsü

HCV, pozitif zincirli, zarflı, *Flaviviridae* ailesine mensup bir RNA virüsüdür (30). HCV genomu, posttranslasyonel olarak viral ve hücresel proteazlar ile işlenerek meydana getirilen dört yapısal (kor, E1, E3 ve E7) ve altı yapısal olmayan (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) viral proteini kodlamaktadır. Revers transkriptaza sahip olmadığından, bu virüs kendini konak genoma entegre edememektedir. Bunun yerine viral proteinler ve onların yol açtığı konak yanıtları viral onkogenik süreçte katkı sağlamaktadır (15). Zarflanmış virüs partiküllerinin konaktaki spesifik yüzey

reseptörleriyle etkileşmesi ile meydana gelen füzyon sonucu tek zincirli RNA genomu sitoplazmaya salınır. Bu genom, virüs yaşam döngüsünde: 1) viral proteinlerin translasyonu için messenger RNA, 2) RNA replikasyonu için kalıp ve 3) yeni virüs partiküllerine paketlenmek üzere başlangıç genomu görevlerini üstlenmektedir (30).

HCV transgenik fare modellerinde , sadece kor proteine sahip farelerde H.K. gelişimi olduğu gösterilmiştir (31). Tam mekanizması bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalarda HCV kor proteinin hücresel gen ürünlerini ve hücre regülatör yollarını (hücresel transformasyon, transkripsiyon kontrolü, apoptoz, lipid metabolizması, immün modülasyon ve oksidatif stres gibi) değiştirmek üzere HCV-hücre etkileşimlerinde önemli role sahip olduğu ileri sürülmektedir (32).

2.1.3.2. Kronik alkol kullanımı

Günlük 50-70g'dan fazla alkolün en az 5 senelik dönemde kullanımı, aşırı alkol tüketimi olarak tanımlanmaktadır ve H.K. riskini yaklaşık beş kat arttırdığı gösterilmiş önemli bir risk faktörüdür (22). Ancak, az ve orta düzey kullanımın H.K. riskinde anlamlı bir etkisi olup olmadığı bilinmemektedir (11). Alkolün hücre transformasyonundaki ve H.K. gelişimindeki etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir, ancak araştırmacılar etkinin doğrudan alkol ile değil hepatik alkol metabolizması ile ilişkili olduğu konusunda fikir birliğine varmışlardır (33).

Alkol kullanımı birkaç mekanizma ile H.K. gelişimini başlatmakta ve/veya neden olmaktadır (34, 35, 36): 1) asetaldehit-DNA katımı (adduct) oluşumu; 2) sitokrom P450E1-ilişkili reaktif oksijen türlerinin (ROS) jenerasyonu, lipid peroksidasyonu, p53 mutasyonu ve prokarsinojenlerin karsinojenlere dönüşümü; 3) ROS jenerasyonu, lipid peroksidasyonu, p53 mutasyonu ve nükleer faktör kappaB (NF-kB) aktivasyonu aracılığıyla enflamatuar kaskadının başlangıcına neden olan demir birikimi; 4) oksidatif strese neden olan glutatyon depleasyonu; 5) s-adenozilmetiyonin (SAM) depleasyonu ve bununla ilişkili olarak onkogenlerde DNA hipometilasyonu; 6) retionik asit depleasyonu ve sonucunda aktivatör protein-1 (AP-1) up-regülasyonu aracılığıyla hepatosit proliferasyonu; 7) bağırsaklardan

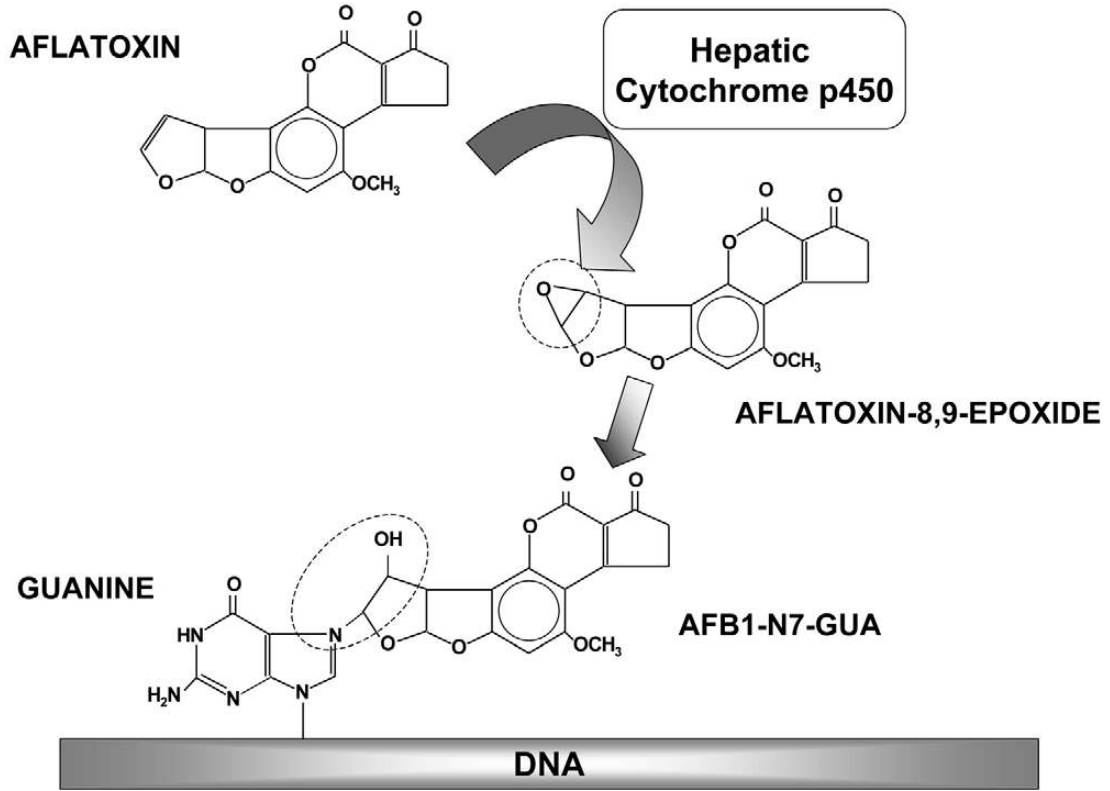
karaciğere endotoksin transferinin artması, CD14/toll-benzeri reseptör-4 (TLR-4) aracılığıyla Küppfer hücrelerinin aktivasyonu, oksidatif stres, NF-kB veya Egr-1 (early growth response-1) aktivasyonu ve enflamatuvar sitokin ve kemokinlerin jenerasyonu ile enflamatuvar kaskadın başlatılması; 8) karaciğerde fibrozis başlangıcı; ve 9) doğal öldürücü hücrelerin sayı ve/veya fonksiyonlarının azaltılmasıdır (34, 35, 36).

2.1.3.3. Aflatoksin B1 maruziyeti

İnsan gıdalarında, tahıllarda, yemlerde ve her türlü kuru yiyeceklerde saklama koşullarında rutubetin artmasına ve sıcaklığa bağlı olarak, mantar türleri (*Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*) hızla üreyerek mikotoksin (küf zehiri) denilen zararlı bir toksin (zehir) üretirler (3). Bunların en önemlilerinden biri de “Aflatoksin” grubu toksinlerdir. Yapılan hayvan deneyleri aflatoksinlerin doğal olarak bulunan kuvvetli zehir ve hepatokanserojen maddeler olduğunu göstermiştir. Bu nedenle aflatoksinler Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer, IARC) tarafından kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. Bunların arasında en bilinen ve genotoksik özelliği nedeniyle mutasyonlara yol açarak kanser gelişimine neden olan aflatoksin B1 (AFB1)’dir (2, 3, 4).

Aflatoksin B1’in doza bağlı olarak hepatokarsinogenezde önemli rolü vardır. AFB1, büyük oranda karaciğerde sitokrom p450 tarafından AFB1-8,9-ekso-epoksit’e metabolize edilir (Şekil 3). AFB1-8,9-ekso-epoksit DNA’ya bağlanarak guaninden (G) timine (T) transversiyon mutasyonlarına neden olan, promutajenik AFB1-N7-guanin DNA katımı (adduct) oluşturan bir kanserojendir (37, 38). Yüksek aflatoksin maruziyeti olan bölgelerde insan H.K. tümörlerinin yaklaşık %50’sinde *TP53* tümör baskılayıcı gende 249. kodonda AGG’den AGT’ye dönüşen (Arg249Ser) nokta mutasyonu gösterilmiştir (5, 6, 39, 40). Bu mutasyonun klonal olarak seçilmesi, söz konusu mutasyona sahip olan karaciğer hücrelerinin büyüme ve/veya sağ kalım avantajları ile açıklanmıştır (41, 42, 43).

AFB1 maruziyeti H.K. riskini tek başına yaklaşık 4 kat arttıran bir risk faktörü olmasının yanı sıra, HBV enfeksiyonu ile birlikte sinerjik etki yaratarak riski 60 kata kadar arttırabilmektedir (44, 45).



Şekil 3: AFB1'in 8,9-ekso-epoksite dönüşümü ve sonrasında DNA katımı oluşumu. Burada aflatoksin maruziyeti sonucu AFB1-8,9-ekso-epoksitin en sık görülen guanin ile reaksiyonu gösterilmiştir. (McKillop ve Schrum (36)' dan alınmıştır).

2.1.3.4. Metabolik hastalıklar

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, aşırı alkol tüketimine bağlı olmayan nedenlerle karaciğerde yağ birikmesinden (steatoz) kaynaklanmaktadır (46). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının H.K. ile ilişkisi, bu hastalığın en önemli iki nedeni olan obezite ve diyabet çalışmaları ile dolaylı olarak gösterilmiştir (47, 48).

Calle ve arkadaşları (49) tarafından Amerika’da yapılan ve 900,000’den fazla kişinin 16 yıl süren takibini kapsayan çalışmada, büyük vücut kitle indeksine sahip erkeklerin karaciğer kanseri nedeniyle ölüm oranlarının, normal indekse sahip erkeklerden 5 kat fazla olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada kadınlarda anlamlı bir risk artışının olmadığı saptanırken, Wolk ve ark. (50) ve Moller ve ark. (51)’in sırasıyla İsveç ve Danimarka’daki çalışmalarında obezitenin kadın ve erkeklerde H.K. riskini 2-4 kat arttırdığı gösterilmiştir.

Yapılan farklı çalışmalarda, diyabet hastalarında H.K. insidansının 2-3 kat arttığı gösterilmiştir (52, 53). Bu yatkınlığın, insülin direnci ve bununla ilişkili olarak karaciğerde serbest yağ asidi artışı ve hepatik trigliserid birikiminden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (54, 55).

Aşırı demir depolanmasından kaynaklanan ve *HFE* genindeki H63D ile C282Y mutasyonları ile ilişkisi gösterilmiş kalıtsal hemakromatozisin, H.K. üzerindeki etkisi hakkında çok fazla çalışma bulunmamaktadır (56). Seçilen hastalarda siroz gibi farklı etiyolojik faktörlerin de mevcut olması, çelişkili sonuçlara neden olan çalışmalarda, homozigot C282Y mutasyonuna sahip erkek hastalarda H.K. riskinin düşük oranda arttığı gösterilmiştir (57).

α 1-antitripsin eksikliği, karaciğerde üretilen α 1-antitripsin proteinin burada tutulumu ve bu nedenle kanda düşük miktarda bulunması ile ilişkili bir kalıtsal metabolik hastalıktır (58). Yaklaşık 100 alelik varyantı bulunan proteinin en ağır fenotipik etkilere neden olanı Z varyantıdır. Karaciğerde α 1-antitripsin birikimi sonucu kronik enflamasyon ve siroza sebep olması nedeniyle, α 1-antitripsin eksikliği H.K. ile ilişkilendirilmiştir (58).

Kalıtsal tirozinemi tip 1, tirozin katabolizmasında son enzim olan fumarilasetoasetat hidrolazın eksikliği nedeniyle tirozinin yıkılamaması sonucunda, bu aminoasit ile metabolitlerinin özellikle karaciğerde meydana gelen toksik birikiminden kaynaklanan bir hastalıktır (59). Yeni doğanlarda etkisini göstermeye başlayan hastalık, tedavi edilmemesi durumunda karaciğere yoğun hasar vermekte ve erken yaşta gelişen siroz nedeniyle H.K. riskini oldukça arttırmaktadır (60).

2.1.3.5. Diğer risk faktörleri

Hepatositlerde nükleer östrojen reseptörleri bulunmaktadır ve bunların H.K.'da artış göstermeleri hepatik neoplastik dokunun hormonal yanıtı sahip olabileceğine işaret etmektedir. Hayvanlarda yapılan deneylerde, oral kontraseptiflerin östrojen ve progesteron bileşenlerinin karaciğer tümörlerini indüklediği gösterilmiş olmasına rağmen, insan deneylerinde tutarlı sonuçlar elde edilememiştir (11). Bu nedenle, oral kontraseptif kullanımı ile H.K. ilişkisinin belirlenmesi, kullanım süresinin bu ilişkiyi nasıl etkilediğinin değerlendirilmesi ve daha düşük hormon düzeyli yeni nesil ilaçların etkisinin anlaşılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalar gereklidir (61).

Fabrika çalışanları üzerinde yapılan çalışmalarda, vinil klorür maruziyeti ile karaciğer anjiyosarkomu (damar dokusundan gelişen kötü huylu tümör) arasında bir ilişki gösterilmiş, ancak bu ilişki diğer histolojik karaciğer tümörlerinde gösterilememiştir (11).

Sigara kullanan kişilerde H.K. riskinin ve H.K.'dan ölüm oranlarının arttığı gösterilmiştir (61). Ancak bu kişilerde alkol kullanımı gibi diğer etiyolojik faktörler de mevcut olduğundan, yapılan çalışmalarda H.K. riskinin sigara kullanımından kaynaklandığı sonucuna varılması oldukça zordur (11).

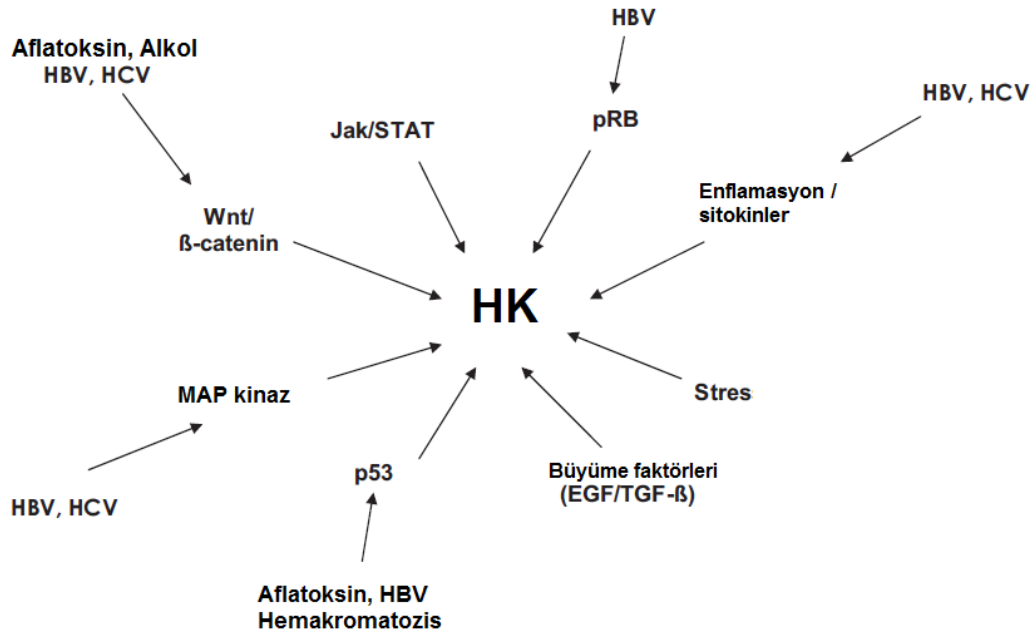
2.1.4. Moleküler biyolojisi

Hepatokarsinogenez, hepatositlerde etiyolojik faktörler nedeniyle meydana gelen kronik hepatitin ilk aşamaları ile başlayan ve sonrasında karaciğer sirozu ile devam eden sürekli enflamasyon ve rejeneratif uyaranlar sonucunda, hücre proliferasyonu ve/veya apoptozu kontrol eden genlerde meydana gelen genetik ve epigenetik alterasyonlar ile çoklu sinyal ileti yollarındaki disregülasyonları kapsayan çok basamaklı bir süreç olarak kabul edilmektedir (15, 23).

Karaciğerin normal yaşlanma sürecinde nadiren karşılaşılan kronik karaciğer hasarı, hepatokarsinogenez ile oldukça ilişkilidir (62). Bu ilişki, hücresel transformasyon gelişimine neden olan hücre bölünmesi kaynaklı olarak açıklanabilir. Ancak, insan H.K. vakalarında replikasyon hatası frekansının oldukça az olması,

bunun temel mekanizma olmadığına işaret etmektedir (62). Bunun yerine, kromozom kopya sayısı alterasyonları ve translokasyonların prevalansı oldukça yüksektir (63).

Hepatokarsinogenez ile en ilişkili durum, uzun süreli (20-40 yıl) kronik karaciğer hastalığı sonucunda meydana gelen sirozdur (11). Kronik karaciğer hastalığı döneminde H.K. riski düşük seyrederken, siroz evresinde eksponansiyal olarak artış göstermektedir. Bu evrede karaciğerde tümör oluşumu üç temel mekanizma ile gerçekleşmektedir: kromozomal instabiliteye neden olan telomer disfonksiyonu; hücre döngüsü kontrol noktalarının (checkpoints) aktifleşmesi nedeniyle hepatosit proliferasyonunda azalma; karaciğer mikro ve makro çevre koşullarında tümör gelişimine neden olacak değişikliklerdir (11).



Şekil 4: Hepatosellüler karsinoma ile ilişkilendirilmiş sinyal ileti yolları. Yolların H.K.'daki etkisi, farklı etiyolojik faktörlere göre değişiklik göstermektedir. (Aravalli ve ark. (64)'dan alınmıştır).

Yapılan çalışmalarda hepatokarsinogenezde meydana gelen çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin hücre proliferasyonu, hücresel sağkalım, farklılaşma ve anjiyogenez gibi hücresel sinyal ileti yolları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (65).

Bu yollar p53, retinoblastoma (Rb), Wingless/ β -katenin (Wnt/ β -katenin), transforming büyüme faktörü- β (TGF- β), MAPK, fosfatidilinositol 3-kinaz/v-akt murine thymoma viral onkogen homolog (PI3K/Akt) ve Janus kinaz/sinyal iletilici ve transkripsiyon aktivator (JAK/STAT) yollarını kapsamaktadır (66). Farklı etiyolojik faktörlerin farklı yollardaki genetik değişiklikler ile ilişkisi gösterilmiştir (Şekil 4).

2.1.4.1. Kromozomal aberasyonlar

Hepatosellüler karsinoma tümörleri ile normal dokular kullanılarak yapılan geniş ölçekli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (comparative genomic hybridization, CGH) mikrodizini ve heterozigozite kaybı (loss of heterozygosity, LOH) çalışmaları, insan H.K.'larındaki kromozomal aberasyonların incelenmesine olanak sağlamıştır. Bu çalışmaların sonucunda, 1p, 4q, 6q, 8p, 9p, 13q, 16p, 16q ile 17p kromozom kollarında sıklıkla delesyon ve 1q, 6p, 8q ile 17q kromozom kollarında ise bölgesel kazanım saptanmıştır (14). Saptanan kromozom kayıpları, bu lokuslarda bulunan tümör baskılayıcı genlerin bir alelinin inaktivasyonundan sorumlu olması açısından oldukça önemlidir. LOH çalışmalarında H.K.'da saptanan 17p, 13q, 16p, 9p ve 6q kromozom kollarındaki kayıplar sırasıyla *TP53*, *RBI*, aksis inhibisyon proteini 1 (*AXIN1*), siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A (*CDKN2A*) ve insülin-benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü (*IGF2R*) tümör baskılayıcı genlerinin inaktivasyonuna işaret etmektedir. Ancak 1p, 4q, 8p ve 16q kollarında henüz tümör baskılayıcı gen saptanmamıştır (67).

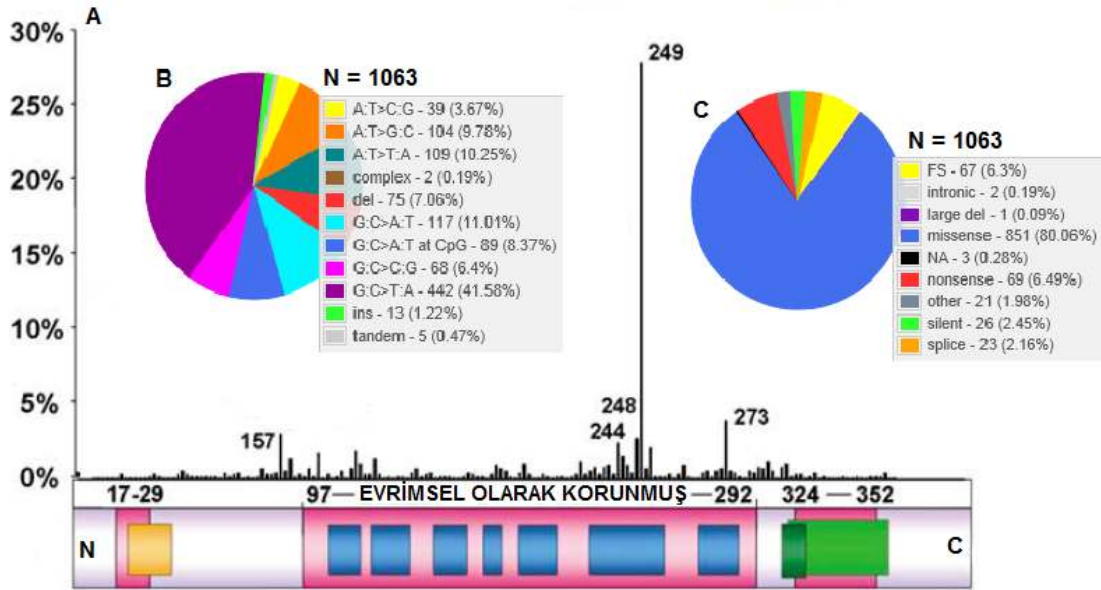
Tümör büyüklüğünden bağımsız olarak, H.K.'larda çoklu alelik delesyonlar, kromozomal kazanımlar ve kayıplar görülebilmektedir. Bunlar, ardışık hücre proliferasyonları sonucunda birikerek heterojen genomik aberasyonlara neden olabilmektedir. Tümörlerin heterojenliği, tümörün orijininin belirlenmesine ve tümörün tekrarlayan veya ikinci bir primer tümör olduğunun anlaşılmasına olanak sağlayabilmesi açısından önem taşımaktadır (66).

2.1.4.2. p53/ p14^{ARF} yolağı

p53/p14^{ARF} (p53/p14 alternative reading frame) yolağı; hücre döngüsü kontrolü, programlı hücre ölümü, senesens, farklılaşma ve gelişim, transkripsiyon, DNA replikasyonu, DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması gibi çeşitli hücresel fonksiyonlarından sorumludur (67). p53 birçok önemli görevde yer aldığından bu yolaktaki bozukluklar H.K. da dahil olmak üzere neredeyse tüm kanser çeşitlerinde gösterilmiştir (68).

p53 mutasyonları, AFB1 kaynaklı H.K.'larda yüksek (>%50), AFB1 kaynaklı olmayan H.K.'larda daha düşük (%20-%40) frekanslarda saptanmaktadır (11). 200 kodondan fazla bölgeyi etkileyen ve %75 oranda yanlış anlamlı (missense) mutasyon ve bunlara eşlik eden kromozom 17'nin kısa kolunun kaybının da dahil olduğu p53 mutasyon spektrumu, pozisyonları ve doğaları itibarı ile farklılık göstermektedir (69, 70). Afrika ve Çin gibi AFB1 ve kronik viral hepatit insidansı yüksek coğrafik bölgelerde *TP53* geninde 249. kodonda G>T transversiyonu sonucunda meydana gelen R249S (Arg249Ser) mutasyonu oldukça sıktır (4, 5, 71). AFB1 seviyesi düşük bölgelerde saptanan p53 mutasyonlarının ise belirli bir kodonda yoğunlaşmadan, gen üzerinde rastlantısal olarak yayılmış şekilde farklı bir spektruma sahip olduğu bildirilmiştir (Şekil 5) (6, 69, 72).

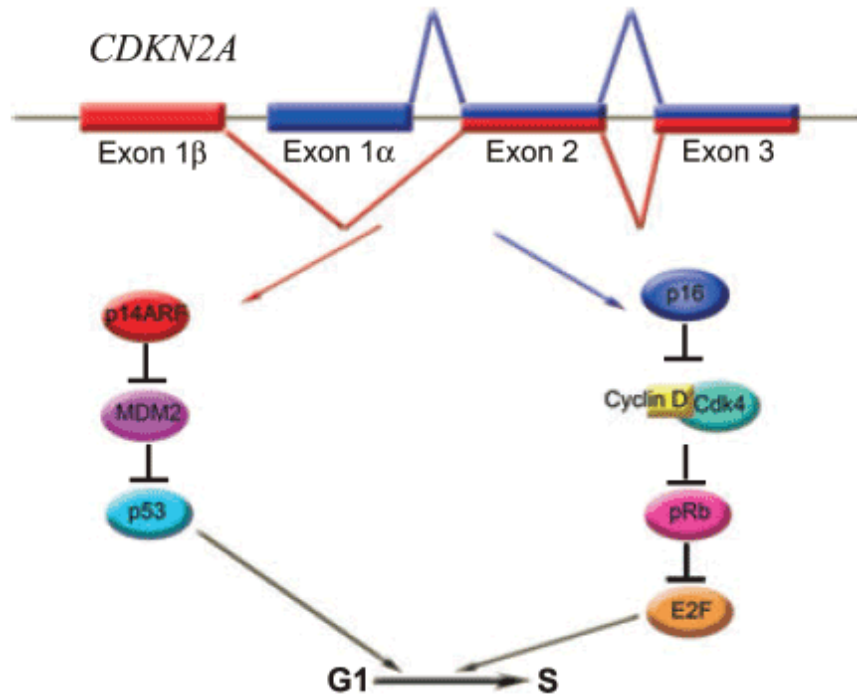
Birçok çalışmada, özellikle hemakromatozis ve Wilson hastalığındaki oksidatif stresin de p53 mutasyonlarına bağlı olarak karaciğer karsinogenezindeki etkisi gösterilmiştir (73). Bu durumlarda, enflamasyon kaynaklı oksidatif stres nedeniyle oluşan reaktif oksijen ve nitrojen, siroz ve karaciğer yetmezliğinin yanısıra, H.K. gelişim riskini de 200 kata kadar arttırmaktadır. Oksidatif stres sonucunda p53 fonksiyonunu etkileyen mutasyonlar kodon 249'daki G>T ve kodon 250'deki C>A mutasyonlarıdır (74).



Şekil 5: Hepatosellüler karsinomada görülen p53 mutasyonlarının spektrumu. (A) p53 molekülünün şematik görüntüsü. İnsan p53 proteini 393 aminoasitten oluşmaktadır. Transaktivasyon bölgesi (turuncu), DNA bağlanma bölgesi (100-293 arası aminoasitler), nükleer lokalizasyon dizisi (316-325. aminoasitler, koyu yeşil) ve oligomerizasyon bölgeleri (319-360. aminoasitler, açık yeşil) fonksiyonel domainleri oluşturmaktadır. Pembe alanlar evrimsel olarak korunmuş domainleri ve mavi alanlar sık mutasyon görülen bölgeleri temsil etmektedir. Şematik proteinin üzerindeki dikey çizgiler yanlış anlamalı mutasyonları temsil etmektedir. Bu mutasyonların çoğu, proteinin korunmuş hidrofobik orta kısmında bulunan DNA'ya bağlanma bölgesinde bulunmaktadır. (Hussain ve ark. (74)'dan uyarlanmıştır). (B) p53 mutasyonlarının nükleotit değişikliklerine göre dağılımı. (IARC TP53 databazından [<http://p53.iarc.fr/TP53SomaticMutations.aspx>, Erişim tarihi: 25 Ocak 2013] alınmıştır). (C) p53 mutasyonlarının mutasyon etkilerine göre dağılımı. Large del: büyük delesyon; missense: yanlış anlamalı; nonsense: anlamsız; other: diğer; silent: sessiz. (IARC TP53 databazından [<http://p53.iarc.fr/TP53SomaticMutations.aspx>, Erişim tarihi: 25 Ocak 2013] alınmıştır).

p53-ilişkili aktiviteleri etkileyen mutasyonlar sadece bu gende değil, bu yolak ile ilişkili diğer genlerde de olabilmektedir (65). Normal hücre koşullarında, p53 proteininin negatif regülasyonunu ubiquitin ligaz aktivitesi ile mouse double homolog 2 (Mdm2) sağlamaktadır. *CDKN2A* geni tarafından kodlanan p14^{ARF} ise Mdm2 fonksiyonlarını tersine çevirmek üzere p53 aktifleştirilmesinden sorumludur (Şekil 6). Bu genlerle ilişkili olarak, insan H.K.'larında Mdm2 ekspresyonunda artış (75) ve p14^{ARF}'de mikrodelsyonlar (76) gösterilmiştir. Ayrıca, p53'ü inhibe eden gankyrin ekspresyonunda da artış gösterilmiştir (77).

Yapılan çalışmalarda, fare karaciğer hücrelerinde telomer disfonksiyonuna yanıt olarak p53'ün hücreyi senesense götürdüğü gösterilmiştir (78). Bu nedenle, siroz evresinde p53 kontrol noktası fonksiyonunun bozulması kısa telomere sahip hepatositler için seçici avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, p53 delesyonunun telomer disfonksiyonu olan farelerde kromozomal instabiliteyi ve epitel kanser oluşumunu da arttırdığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, siroz evresinde p53 kontrol noktasındaki fonksiyon kaybı, disfonksiyonel telomerlere ve kromozomal instabiliteye sahip hepatositlerin çoğalmasına ve H.K. başlangıcına neden olmaktadır (11, 78).



Şekil 6: CDKN2A lokusu. CDKN2A lokusu dört eksondan oluşmaktadır: ekson 1α ve ekson 1β sırasıyla p16^{INK4A} ve p14^{ARF} için spesifik olurken, ekson 2 ve ekson 3 iki protein tarafından kodlanmaktadır. p16^{INK4A} Rb yolu, p14^{ARF} ise p53 yolu ile ilişkilidir ve bu lokus önemli kanser yollarında oldukça etkilidir. (Lin ve ark. (79)'dan alınmıştır).

2.1.4.3. RB/INK4A yolağı

RB/INK4A yolağı, hücre döngüsünde G1/S fazı geçişi regülasyonunda önemli bir role sahiptir (80). Rb'nin aktivitesi, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ile fosforile olma durumuna bağlıdır. Fosforile olmayan Rb, E2F-1 transkripsiyon faktörüne bağlanmak suretiyle hücrenin transkripsiyonel aktivitesine engel olarak hücre döngüsünü kontrol etmektedir. p14^{ARF} gibi *CDKN2A* geni tarafından kodlanan p16^{INK4A}, bu yolda CDK inhibitörüdür (Şekil 6).

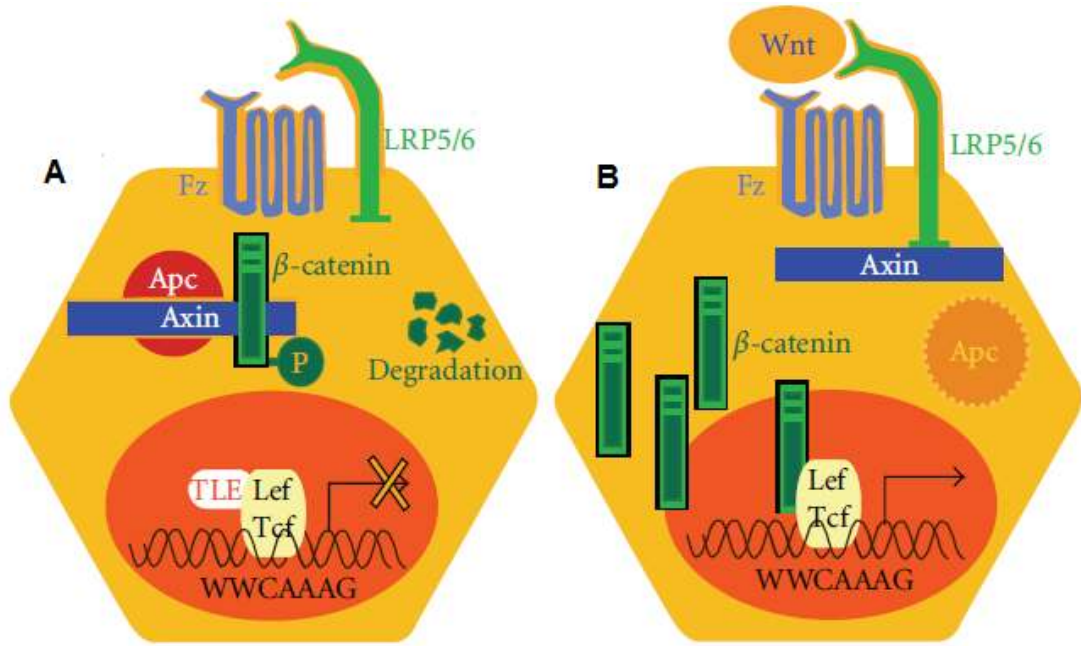
Yapılan çalışmalarda, insan H.K. vakalarının %80'inden fazlasında Rb yolağı aberasyonları saptanmıştır (81). *RB* geninin bulunduğu 13q14 bölgesindeki kromozomal kayıp, tümörlerin %18-48'inde gösterilmiştir (65). Kromozom kaybının yanı sıra, bu yoldaki diğer alterasyonlar p16^{INK4A} mutasyonları ve sıklıkla promotör metilasyonu sonucu p16^{INK4A} represyonudur (82). Ayrıca, p53'te olduğu gibi Rb inhibitörü olan gankyrin ekspresyonundaki artış da Rb yolağının fonksiyonunun engellendiğinin göstergesidir (77).

2.1.4.4. WNT/β-KATENİN yolağı

Wnt/β-katenin yolağının aktivasyonu, β-kateninin çekirdeğe translokasyonu ve buradaki çeşitli transkripsiyon faktörleriyle etkileşimine olanak sağlamak üzere doku homeostazisi ve embriyonik gelişimde etkilidir (83). Wnt ligandına bağlanmayan hücrelerde sitozolik β-katenin, kazein kinaz 1 (CK1) ve glikojen sintaz kinaz 3 (GSK3) fosforilasyonu ile degradasyon için sürekli ubiquitinlenmektedir. Bu “yıkıcı kompleks” içinde AXIN ve adenomatöz poliposis koli (APC) tümör baskılayıcı proteinleri de bulunmaktadır. Wnt ligandının Frizzled reseptör ve membranda bulunan LRP5/6 koreseptöre bağlanması ile kinaz aktivitesi engellenerek hücrede β-katenin birikmekte ve çekirdeğe translokasyonu ile TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) DNA transkripsiyon faktörlerine bağlanmak üzere etkisini göstererek hedef genleri aktifleştirmektedir (Şekil 7) (84).

Fare ve insan H.K.'larında yapılan çalışmalarda, Wnt/β-katenin yolağının somatik mutasyonlar nedeniyle aktivasyonu (85) veya negatif regülatörlerinin

transkripsiyonel represyonu (86) gösterilmiştir. β -katenini kodlayan *CTNNB1* geninde, özellikle fosforilasyon bölgesindeki ekson 3 mutasyonları çekirdekte β -katenin birikimini sağlamaktadır. Ayrıca, *AXIN* geni mutasyonları ve *APC* genindeki promotör metilasyonu veya kromozomal kayıp nedeniyle genin bialelik inaktivasyonu da bu yolaktaki etkileri nedeniyle H.K. ile ilişkilendirilmiştir (65, 84).

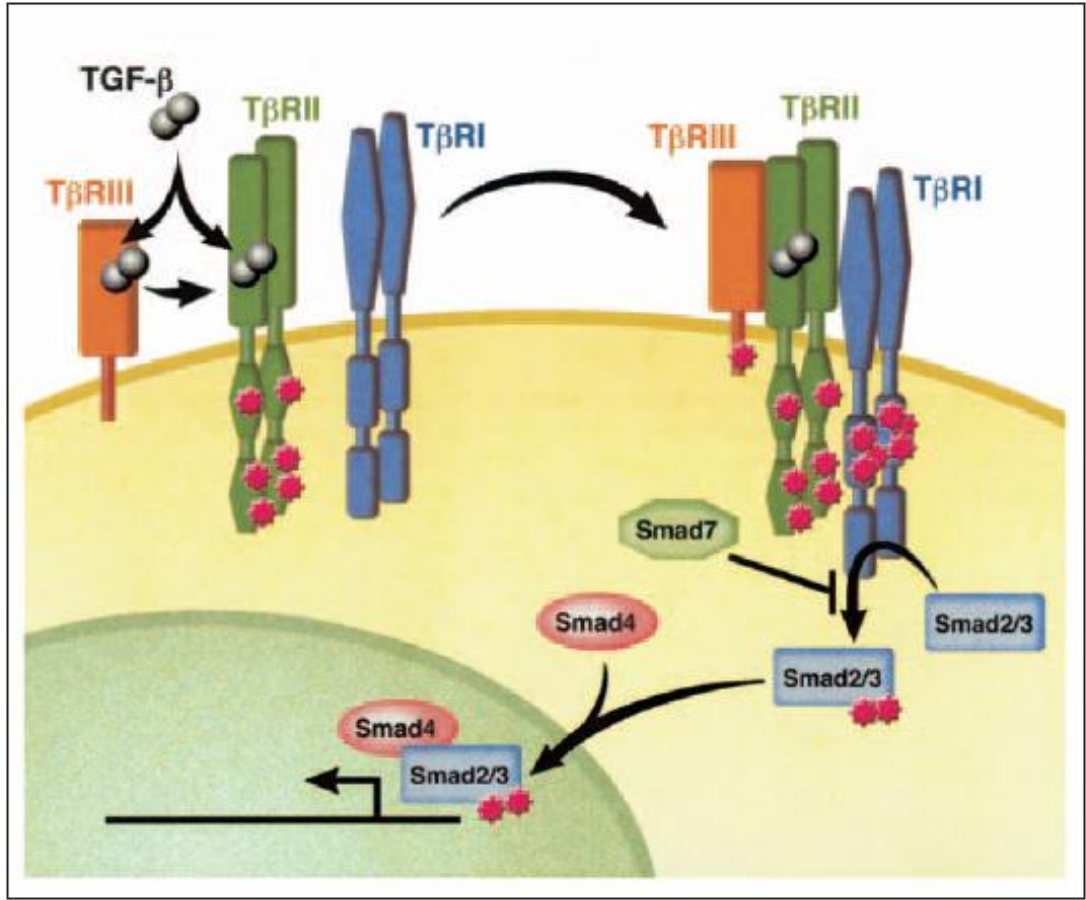


Şekil 7: Karaciğerde Wnt/ β -katenin sinyal iletimi. (A) Wnt ligandı bağlanmadığında, β -katenin “yıkıcı kompleks” tarafından degrade edilmektedir. (B) Wnt ligandının bağlanması durumunda, β -kateninin çekirdeğe translokasyonu ile hedef genlerde transkripsiyon gerçekleşmektedir. (Gougelet ve Colnot (84)’dan uyarlanmıştır).

2.1.4.5. TGF- β yolağı

TGF- β hücre gelişimi, farklılaşma, migrasyon, apoptoz, adhezyon, sağkalım ve bağışıklık gibi değişik fonksiyonlarda görev alan bir enflamatuvar sitokindir (87). TGF- β süper ailesi ligandları kendilerini TGF- β tip II reseptöre (T β RII) sunan TGF- β tip III reseptöre (T β RIII) veya doğrudan T β RII'ye bağlanırlar. T β RII, TGF- β 'ya bağlandıktan sonra TGF- β tip I reseptörü (T β RI) transfosforile ederek protein kinaz aktivitesini uyarır. Aktifleşen T β RI, reseptör ile regüle edilen Smad'ları (R-Smad; Smad2 ve Smad3) fosforile ederek common mediator Smad'a (co-Smad; Smad4) bağlanmalarına olanak sağlamaktadır. R-Smad/co-Smad kompleksleri çekirdekte birikerek transkripsiyon faktörleri olarak hareket eder ve hedef genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar. Smad6 ve Smad7 (inhibitör Smadlar; I-Smad) ise Smad2 ve Smad3'ün fosforilasyonunu bloke etmek üzere TGF- β yolağının negatif regülasyonunda görev alırlar (Şekil 8). T β RI, T β RII, Smad2, Smad3 ve Smad4 temel Smad-bağımlı TGF β sinyal ileti yolağını oluştursa da, mekanizmaları henüz tam olarak bilinmeyen Smad-bağımsız MAPK, PI3K/Akt, Rho ailesi proteinleri ve protein fosfataz 2A yolakları da bulunmaktadır (87, 88, 89, 90).

TGF- β , H.K.'da hücre proliferasyonunu düzenleyen tümör baskılayıcı ve aynı zamanda tümör kanser motilitesi ve invazyonunu sağlamak üzere tümör destekleyici olarak ikili role sahiptir (88). Normal dokular ve erken evre tümörlerde TGF- β tümör baskılayıcı olarak hareket etmektedir. Bu yolağın TGF- β reseptörlerinin ve Smad'ların mutasyonu (91) veya TGF- β ligandlarının over-ekspresyonu (92) ile bozulması, tümör hücrelerinin TGF- β tarafından yönetilen bu düzenlemeden kaçmalarına olanak sağlamaktadır. Böylece, TGF- β tümör destekleyici şekilde hareket ederek, hücrelerin epitelyal-mezenkimal dönüşümüne ve bu şekilde invazif olmalarına neden olmaktadır. TGF- β ayrıca tümörleri immünosüpresif düzenlemeden uzaklaştırmak üzere anjiyogenezi desteklemek yoluyla ikincil tümör bölgelerine metastazına da destek olmaktadır (89, 90).



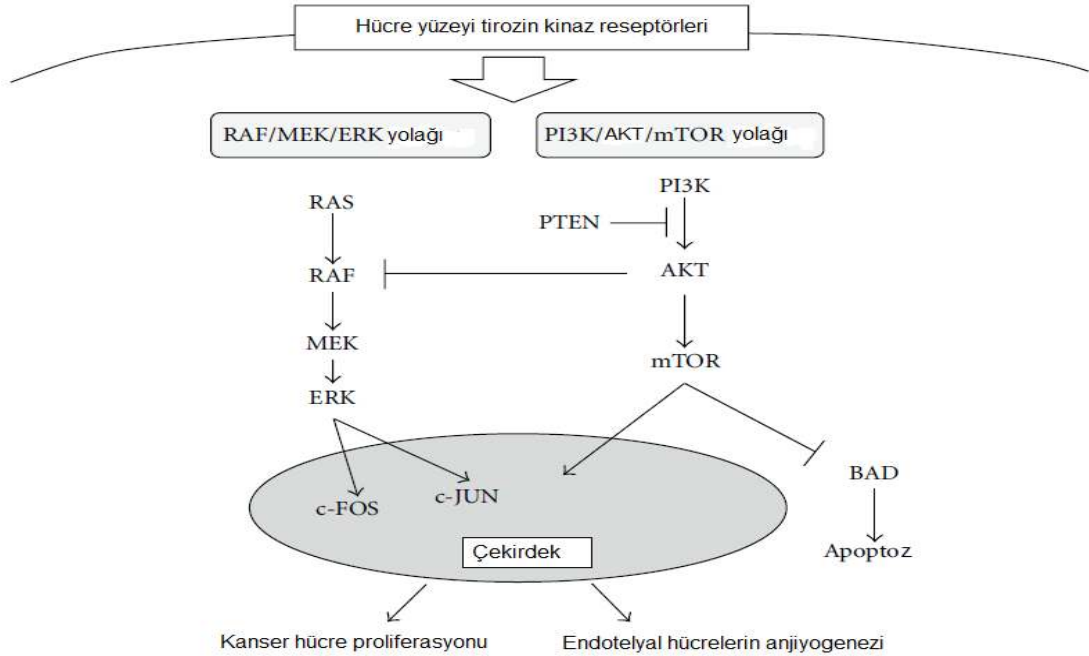
Şekil 8: TGF- β sinyal iletim yolağı. TGF- β bağlanması ile aktifleşen T β RII, T β RI'e bağlanmaktadır. Aktif T β RI Smad2 ve Smad3'ün fosforillenmesini ve Smad4 ile etkileşmesini sağlamaktadır. Bu kompleks, çekirdeğe transloke olarak hedef genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır. Smad7, Smad2 veya Smad3'ün T β RI tarafından aktivasyonunu engellemektedir. (Elliott ve Blobel (88)'dan alınmıştır).

2.1.4.6. Diğer yollar

H.K.'ya özgü patolojik özelliklerden biri kanser hücresi proliferasyonu ve metastaz için gerekli olan tümör damarlanmasıdır. Bu nedenle, kanser gelişiminin ilk aşamalarından itibaren vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), PDGF, epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunun artması gerekmektedir (93). Bu büyüme faktörlerinin VEGFR (vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü), PDGFR (platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü), EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü), FGFR (fibroblast büyüme faktörü reseptörü)

ve IGFR tirozin kinaz reseptörlerine bağlanmasıyla Ras/Raf/MEK/ERK yolağındaki intrasellüler Ras aktive olmaktadır. Sonrasında bu yolaktaki moleküller sırasıyla aktifleşerek hücre farklılaşması için gerekli *c-jun* ve *c-fos* genlerinin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Şekil 9) (94, 95). Bu yolağın H.K. gelişimi ile ilişkisi doğrudan yolaktaki genlerin mutasyonlarından değil, çeşitli faktörler nedeniyle bu yolağın aşırı aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (96).

Büyüme faktörlerinin tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile PI3K/Akt/mTOR yolağı da aktive olmaktadır (Şekil 9). PI3K aktivasyonunun ardından, bu yolaktaki moleküller AKT ve rapamisininin memelilerdeki hedefi (mTOR) sırasıyla aktifleşerek, hücre proliferasyonunu sağlamakta ve apoptoz regülasyonunda rol alan Bcl-2-associated death promoter (BAD) inaktive etmektedir. PI3K yolağının negatif regülasyonu, fosfataz ve tensin homolog (PTEN) tarafından sağlanmaktadır (94, 95). Bu yolağın aşırı aktivasyonuna veya PTEN ifadesinin baskılanmasına neden olan alterasyonların H.K.'larda tümör gelişimi, evresi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (97).



Şekil 9: Ras/Raf/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolakları. Proanjiyogenik ve proliferatif büyüme faktörleri bu yolakları aktive etmektedir. (Meguro ve ark. (93)'dan alınmıştır).

Büyüme faktörleri ve sitokinler, ilgili reseptörlerine bağlandıklarında reseptörlerde meydana gelen dimerizasyon sonucunda otofosforilasyon ile JAK'lar aktive olmaktadır (98). Aktif JAK'lar, nükleusta hedef genler için transkripsiyon faktörü olarak hareket eden STAT'ları fosforile ederek aktifleştirmekte ve dimerler oluşturarak nükleusa translokasyonlarına olanak sağlamaktadır. Böylece, JAK/STAT yolağı ekstrasellüler sinyalin transkripsiyonel yanıtı çevrilmesi için doğrudan bir mekanizma oluşturmaktadır. H.K.'larda, JAK/STAT yolağının aktivasyonu ve STAT inhibitörü olan sitokin sinyal baskılayıcılarının (suppressor of cytokine signaling, SOCS) inaktivasyonu bildirilmiştir (64).

Son yıllarda gelişen genom dizileme teknolojisi ile çok sayıdaki H.K. tümöründe yapılan çalışmalarda, yeni genler ve mekanizmaların H.K. ile ilişkisi gösterilmiştir. *ARID1A*, *ARID1B* ve *ARID2* genlerinde tekrarlayan mutasyonlar farklı çalışmalarda (8, 99, 100) gösterilmiştir ve hepatokarsinogenezde kromatinin yeniden şekillenme mekanizmasının önemine işaret etmektedir. Totoki ve arkadaşları (7) tarafından yapılan çalışmada ise, *BCORL1* geninin transkripsiyonel aktivitesini etkilediği gösterilmiş *BCORL1* – ELF4 füzyon transkripti tanımlanmıştır.

Yapılan karşılaştırmalı genom dizilemelerinde, H.K. tümörlerinde p53 yolağındaki interferon regülatör faktörü 2 (*IRF2*) geninde, oksidatif stres ile ilişkili olarak nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (*NFE2L2*) geninde, büyüme faktörü sinyal ağındaki ERBB receptor feedback inhibitor 1 (*ERF1*) geninde ve Ras/MAPK iletim yolağındaki ribozomal protein S6 kinaz (*RPS6KA3*) genlerinde de tekrarlayan mutasyonlar saptanmıştır (99, 101). Ancak, bu mutasyonların ve genlerin hepatokarsinogenez ile ilişkisinin belirlenebilmesi için çalışmalar devam etmektedir.

2.1.4.7. Epigenetik değişiklikler

Epigenetik değişikliklerin, H.K. gelişimi ve ilerlemesindeki önemi yapılan çalışmalarda gösterilmeye çalışılmaktadır (102). DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'ları kapsayan bu epigenetik değişiklikler, risk faktörlerine göre farklılık göstermektedir.

Genellikle genlerin promotörlerinde bulunan CpG bölgelerinde meydana gelen DNA metilasyonu, ökaryotlarda gen regülasyonunu sağlayan majör epigenetik mekanizmadır (103). Memelilerdeki DNA metilasyon mekanizması, metil grubunun enzimatik olarak eklenmesini sağlayan DNA metiltransferazlar (DNMT) ve metilasyon paterninin belirlenmesinde etkili metil-CpG bağlayıcı proteinleri (MBP) kapsamaktadır. H.K. da dahil olmak üzere, bu mekanizma ile ilişkili olarak tümörlerde saptanan ve onkogenler ile transpozonların ekspresyonuna neden olan global hipometilasyon, genomik instabiliteye neden olmaktadır. Spesifik promotör hipermetilasyonları ise hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz, DNA tamiri, hücre homeostazisi, hücre adhezyonu ve invazyon ile ilişkili tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile bağlantılıdır. Yapılan çalışmalarda, özellikle HBV proteini HBx'in, DNMT ekspresyonunu arttırarak tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (104, 105).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, transkripsiyon faktörlerinin ve DNA tamir proteinlerinin transkripsiyon, replikasyon veya DNA tamiri gibi kritik kromatin aktivitelerini katalize edebilmesi için gerekli DNA erişiminin düzenlenmesinde kromatin histon modifikasyonu enzimlerinin ve ATP-bağımlı kromatinin yeniden şekillenme komplekslerinin H.K. gelişimindeki etkisine işaret etmektedir (102).

mikroRNAlar (miRNA), transkripsiyonu RNA polimeraz II tarafından gerçekleşen miRNA prekürsöründen kesilerek meydana gelen 19-25 nükleotit uzunluğunda, kodlamayan tek zincirli RNA molekülleridir (106). miRNA, hedef mRNA'nın 3' translasyona uğramayan bölgesindeki (3' UTR) komplementer diziye bağlanarak, translasyonel inhibisyon veya mRNA degradasyonunu sağlamak üzere etkisini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, H.K. sürecinde regülasyonu bozularak tümör oluşumuna ve metastatik gelişime katkısı bulunan birçok miRNA tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları onkogen gibi hareket etmek üzere apoptozu inhibe ederek (miR-221), hücre invazyonunu teşvik ederek (miR-9) veya migrasyon ve proliferasyonu engelleyerek (miR-23b) etkili olmaktadır. miR-101, miR-195, miR-122 ve miR-338 ise tümör baskılayıcı gen benzeri özelliklere sahiptir ve H.K.'da susturulmaktadır (106, 107).

2.1.5. Tanı

Hepatosellüler karsinoma tanısında kullanılan başlıca diagnostik teknikler serum belirteçlerini, karaciğer fonksiyon testlerini, çeşitli görüntüleme yöntemlerini ve histolojik incelemeyi kapsamaktadır (Amerikan Karaciğer Hastalıkları Derneği - American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD, <http://www.aasld.org/practiceguidelines/Documents/Bookmarked&percent;20Practice%20Guidelines/HCCUpdate2010.pdf>, Erişim tarihi: 8 Şubat 2013).

Serum belirteçleri arasında sıklıkla kullanılan alfa-1 fetoproteindir (AFP). AFP gebelikte fetal karaciğer hücreleri tarafından üretilen ve normal şartlarda erişkinlerde baskılanan bir glikoproteindir. Patolojik olarak, kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda yüksek hepatosit rejenerasyonuna bağlı AFP miktarında artış olabilmekte ve bu nedenle kansere özgü ayırıcı tanıda kullanılamamaktadır. AFP yerine son yıllarda, AFP'nin temel glikoformu olan ve malign hücreler tarafından üretilen lens culinaris agglutinin-reaktif alfa-1 fetoprotein (AFP-L3) miktarı dikkate alınarak, total AFP miktarının %10'undan fazla ise pozitif kabul edilmektedir. Ayrıca, H.K. hücrelerinde kazanılmış posttranslasyonel defekt sonucu oluşan anormal protrombin prekürsörü, des gamma karboksi protrombin (DCP) değerleri de AFP ve AFP-L3 sonuçları ile birlikte değerlendirilmektedir. Normal olarak sadece plasenta ve fetal karaciğerde bulunan glipikan-3 (GPC3) ekspresyonu da H.K. belirteci olarak kullanılabilmektedir. Bu belirteçler dışında α -L-Fukosidaz, skuamöz hücreli karsinom antijeni (SCCA), Golgi proteini 73 (GP73), hepatosit büyüme faktörü (HGF), TGF- β 1, VEGF de diagnostik amaçlı kullanılmaktadır. Ancak bu belirteçler, diğer kanser türlerinde de saptandığından H.K.'ya özgü değildir. Son zamanlarda yüzey ile geliştirilmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi (SELDI-TOF) ile yapılan serum proteomiks çalışmalarında, küçük tümörlerin saptanabilmesi amacıyla, tanıda kullanılmak üzere daha yüksek ayırt edici özellikteki hassas proteinlerin belirlenmesi için araştırmalar devam etmektedir (108, AASLD, <http://www.aasld.org/practiceguidelines/Documents/Bookmarked&percent;20Practice%20Guidelines/HCCUpdate2010.pdf>, Erişim tarihi: 8 Şubat 2013).

Rutinde kullanılan görüntüleme yöntemi ultrasonografi ile rejenere karaciğer nodülünün erken H.K.'dan ayrılması zordur. Bu nedenle üç fazlı spiral bilgisayar tomografisi veya üç fazlı dinamik kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (109).

Görüntüleme yöntemleri ile tanı konamıyorsa, histopatolojik inceleme için radyolojik destek altında iğne biyopsisi uygulanabilmektedir. Ancak, tümörün kanaması ve implantasyon yoluyla yayılması riski söz konusudur (108).

2.1.5.1. Evreleme

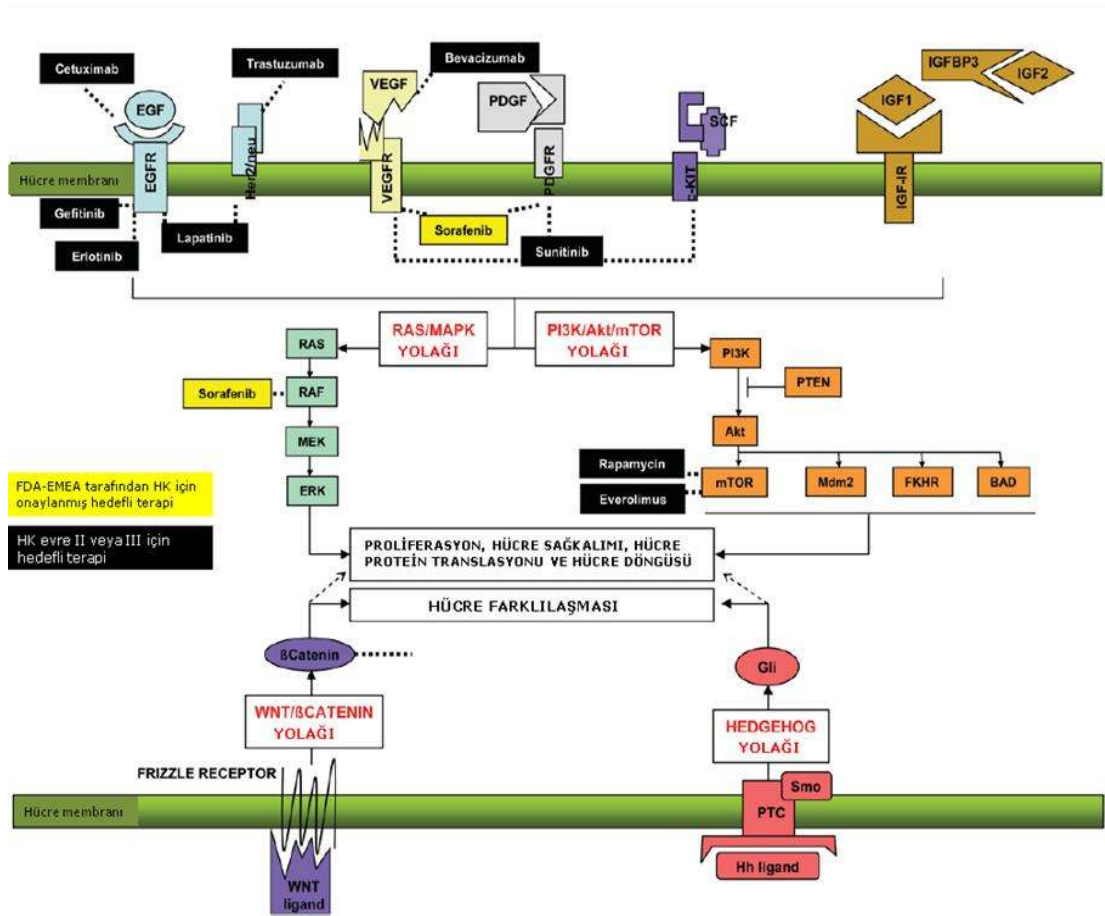
Hepatosellüler karsinoma tanısı alan hastalarda, uygun tedavi yönteminin belirlenmesi için evreleme gereklidir. Birçok evreleme sistemi olmasına rağmen Barselona Kliniği Karaciğer Kanseri (Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC) evreleme sistemi tedavi ile ilişkilendirilebilmesi açısından standart yöntem olarak kullanılmaktadır (110). Bu sisteme göre evreleme ve prognozda önemli kriterler, hepatik fonksiyonu, bilirubin değerleri, tümör büyüklüğü ve sayısı, tümör yayılma hızı, tümör kapsülünün varlığı, karaciğer damarlarının tutulumu, yavru nodüllerin varlığı, tümör damarlanması ve karaciğer dışı metastaz olarak sıralanabilir (111).

2.1.6. Tedavi

Günümüzde H.K. tedavisinde, küratif tedavi olarak karaciğer rezeksiyonu, karaciğer nakli ve ablasyon (perkütan etanol enjeksiyonu veya radyofrekans ile), bölgesel tedavi olarak transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), transarteriyel radyoembolizasyon kullanılmaktadır (109).

Son zamanlarda, hepatokarsinogenezde etkili olduğu gösterilmiş önemli yolakları hedefleyen moleküler ajanların geliştirilebilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (112). Bu terapiler sinyal iletimi, anjiyogenez, apoptoz, metastaz, hücre döngüsü, proliferasyon ve farklılaşma ile ilişkili olmak üzere sıklıkla büyüme faktörleri ve reseptörleri ile intrasellüler sinyal ileti proteinlerini hedef alarak tasarlanmaktadır. Bu ilaçlar arasında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi – Avrupa İlaç

Ajansı (US Food and Drug Administration - European Medicines Agency, FDA-EMEA) tarafından ileri evre H.K. hastalarının tedavisinde kullanılması onaylanmış tek ilaç Sorafenib'tir. Diğer ilaçlar için klinik denemeler devam etmektedir. Hastalığın etkin tedavisinde kullanılabilecek ajanların geliştirilebilmesi için hepatokarsinogenezde etkili mekanizmaların detaylarının anlaşılması oldukça önemlidir (94).



Şekil 10: Hepatosellüler karsinomadaki moleküler hedefli terapiler. Büyüme faktörlerini (VEGFR: bevacizumab; EGFR: cetuximab), tirozin kinaz inhibitörlerini (VEGFR: sorafenib, sunitinib; PDGFR: sorafenib, sunitinib; EGFR: erlotinib, lapatinib; AEE788, Her2/nu: lapatinib, AEE788) ve Serin/Treonin kinaz inhibitörlerini (Raf: sorafenib; mTOR: rapamycin, everolimus; PI3K: XL-765) hedefleyen ilaçlar geliştirilmiştir. (Llovet ve Bruix (94)'dan alınmıştır).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Hücre hatları

Bu çalışmada, laboratuvarımızda -80°C’de saklanan ve daha önceden p53 R249S mutasyonu taşıdığı bilinen, insan hepatomalarından elde edilmiş MAHLAVU (Güney Afrika, kadın) ve PLC/PRF (Mozambik, erkek) hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatları 1994 yılında Ünsal ve ark. (70), 1999 yılında TÜBİTAK desteğiyle Yakıcıer ve ark. (91) ve 2010 yılında Acun ve ark. (113) tarafından yapılan çalışmalarda da kullanılmıştır. Retrospektif çalışmamızda yeni klinik örnek elde edilmemiştir.

3.1.2. Cihazlar

Çalkalayıcı: Maxi-Mix III, type 65800 – Barnstead / Thermolyne, ABD

Çekerocak: Tezsan, Türkiye

Dizi analiz cihazı: Megabace 750 – GE Healthcare Life Sciences, ABD

Elektroforez güç kaynağı: 250 EX electrophoresis power supply – Gibco, ABD

Elektroforez tankı: Horizon 11.14 – Whatman-Biometra, Almanya

Hassas terazi: Adventurer Pro – Ohaus, ABD

Isıtıcı blok: Thermo Block TDB-120 – Biosan, Letonya

Jel görüntüleme sistemi: Molview (GELDOC) – Molargen, Türkiye

Mikropipet seti: Pipetman (P10, P20, P200, P1000) – Gilson, ABD

pHmetre: Inolab – WTW, Almanya

Santrifüj: Biofuge pico – Heraeus, Almanya

Spektrofotometre: NanoPhotometer Pearl – Implen, Almanya

Termal döngü cihazı: DNA Engine, PTC-200 – Biorad MJ Research, ABD

Vakum sistemi: Axygen, ABD

Vorteks: Velp Scientifica, İtalya

3.1.3. Kimyasallar ve kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler aşağıda belirtilen üretici firmalardan temin edilmiştir:

Reaktif	Üretici firma
Agaroz	Applichem, Almanya
Borik asit	Sigma-Aldrich, ABD
Deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP)	Promega, ABD
DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit (MegaBACE)	GE Healthcare Life Sciences, İngiltere
EDTA	Applichem, Almanya
Etanol	Merck, Almanya
Etidyum bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich, ABD
ExoSAP-IT	Affymetrix, ABD
Generuler 100 bp DNA ladder	Thermo Scientific, ABD
GoTaq Flexi DNA polimeraz	Promega, ABD
Halfseq dilution reagent	Genetix, İngiltere
Megabace long read matrix	GE Healthcare Life Sciences, İngiltere
Montage SEQ ₉₆ sequencing reaction cleanup kit	Merck Millipore, ABD
Potasyum dihidrojen fosfat anhidrus	Sigma-Aldrich, ABD
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich, ABD
QIAamp DNA mini kit	Qiagen, ABD
Sequencing Wash Solution	Merck Millipore, ABD
Sodyum fosfat anhidrus	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich, ABD
Steril distile su	Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye
Tris-Base	Sigma-Aldrich, ABD

3.1.4. Plastik malzemeler

Bu çalışmada kullanılan eppendorf tüpleri (0.2, 0.6 ve 1.5 mL için), pipet uçları (10, 20, 200 ve 1000 mikrolitre için) ve plastik plaklar (PCR ve Megabace için), Axygen (ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.1.5. Oligonükleotitler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR – polymerase chain reaction, PCR) ve dizi analizi reaksiyonlarında kullanılacak primerler İONTEK (İstanbul, Türkiye) tarafından sentezlenmiştir. Bu primerlerin nükleotit dizileri Tablo 1, Tablo 2, Tablo 3 ve Tablo 4’de verilmiştir.

Liyofilize (dondurarak kurutulmuş) halde bulunan primer tüpleri 13,000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra içlerine üretici firma tarafından 100 pmol’lük konsantrasyon elde etmek için belirtilen miktarda Tris-EDTA (TE) eklenerek çözülmüştür. Primerler, 10 µl hacimlerde porsiyonlanarak -20°C’de saklanmıştır. Dizi analizi reaksiyonunda kullanılmak üzere PZR grade H₂O ile dilüsyon yapılarak 10 pmol primerler elde edilmiştir.

Tablo 1: *BCORL1* geninin çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer	Ekson	Primer dizisi	Tm (°C)	Ürün boyu (bp)
BCORL1-1F*	1	GGCTGGCTGCTTTAACATTC	59.85	341
BCORL1-1R*		CTCCCCAGGCCCTATTGTAT	60.17	
BCORL1-2F*	2	AGGTGGTGTGGCTCAAATC	59.97	341
BCORL1-2R*		CAACTCGACCAACCAGGTCT	60.15	
BCORL1-3aF	3 (a)	AAGACCAGCAGTTGCCTCTC	59.60	577
BCORL1-3aR		CTGGAATGCATCTGGAACAG	59.24	
BCORL1-3bF*	3 (b)	GAAGTGGAGTCCCTGTGGAG	59.68	578
BCORL1-3bR*		GAGGGTGGGGGTAGAAGGT	60.18	

(*) Lase ve ark. (114)’dan alınmıştır. Tm: Erime sıcaklığı (melting temperature), bp: baz çifti

Tablo 1 (devam): *BCORL1* geninin çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer	Ekson	Primer dizisi	Tm (°C)	Ürün boyu (bp)
BCORL1-3cF* BCORL1-3cR*	3 (c)	GTCCCCACTCCGGTTCTG CAGGGAGCGTAAGAGTGGAG	61.52 60.01	442
BCORL1-3dF* BCORL1-3dR*	3 (d)	TGGTATATATCCCGCCTCCA GTCCCTTCTGTTTGCTGCTC	60.13 60.00	436
BCORL1-3eF* BCORL1-3eR*	3 (e)	CTTCCAACCTCCACAGCCTCT AATGGTGCTGATCAGTGCAG	59.45 59.86	459
BCORL1-3fF* BCORL1-3fR*	3 (f)	CTCGCCCTTTGTCATCTTTC GCTGGTAGGTTTCCCATTTGA	59.81 59.93	424
BCORL1-3gF* BCORL1-3gR*	3 (g)	GACAGCCAAGCACAGTGAAA GCTGAGGGTCAAGAGGACAG	60.03 59.99	452
BCORL1-3hF BCORL1-3hR	3 (h)	GCTTTCCATTGGCATTTC GCATCTTAGGCAGGTTCTGG	60.41 59.84	497
BCORL1-3iF* BCORL1-3iR*	3 (i)	AGAGAGCCACCTCTGCTCTG ACCCCTACGCTTTCCTGTTT	59.88 60.00	435
BCORL1-3jF* BCORL1-3jR*	3 (j)	AAGGTGGATGGTGATGTGGT GAGGGGACAGCAGGTCATTA	60.10 60.07	457
BCORL1-4F* BCORL1-4R*	4	GCAGCTCATGCCTCTAGGTC ATCCTTGCTCGCTCACCTTA	60.13 59.98	446
BCORL1-5F* BCORL1-5R*	5	GCAAAAGCGACCAAACCTCTC AATTCCCAACTCGACACCTG	60.00 59.97	423
BCORL1-6F BCORL1-6R*	6	CTCCTAGTCCAGGGCATTCA GTAGAGATGCCCCGAGGGTTC	60.21 60.99	544
BCORL1-7F* BCORL1-7R	7	AGGCGTTGCTTTTCTGTGTT CTTCAAATCCACCCCAAC	59.92 60.16	442
BCORL1-8F* BCORL1-8R*	8	TGGGCAACAGAGTGAGACTG GCAGGCAAGGTCTTTTGAGT	60.02 59.48	488
BCORL1-9F* BCORL1-9R*	9	CAGGTGGTTCCTTGTCCTA GAGCTGTTCAAGGTGGAAGG	59.96 59.84	399

(*) Lose ve ark. (114)'dan alınmıştır.

Tablo 1 (devam): *BCORL1* geninin çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer	Ekson	Primer dizisi	Tm (°C)	Ürün boyu (bp)
BCORL1-10F*	10	CTTCTCCCATTCCTTAGCC	60.03	454
BCORL1-10R*		AAAGCCAGGGAGAAGAAAGG	59.82	
BCORL1-11F	11	CCATGCCCCCTTTATCTGCT	60.04	339
BCORL1-11R*		TTGCCAGGTCTTCACTTCCT	59.84	
BCORL1-12F	12	AGACATTGATGGTCGTGCAG	59.71	521
BCORL1-12R		GATAAGGCGGCTTCTTGTTG	59.85	

(*)Lose ve ark. (114)'dan alınmıştır.

Tablo 2: *ARID2* geninin çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer	Ekson	Primer dizisi	Tm (°C)	Ürün boyu (bp)
ARID2-1F	1 & 2	GCTCCGGGCTCTGGTAG	59.46	462
ARID2-2R ^m		CCACTCCGGGGTCAAAG	60.02	
ARID2-3F*	3	TACCGATCGATCCGAAACAC	60.86	330
ARID2-3R*		CTGTTTGGTGTGCAAGGTTTG	61.53	
ARID2-4F	4	AGGAAAACAAATATGTGGTGAGAG	58.63	302
ARID2-4R		AGGAAGGGACTAACTCATTGG	57.27	
ARID2-5F*	5	GCTGTGTTCTGTATTCAAGGGA	59.24	565
ARID2-5R*		AGCAATCGTCTCAACTCAGGA	60.00	
ARID2-6F ^m	6	AATGAAAGCCAGTGTGGAGTA	57.34	638
ARID2-6R		AGAATCCCAGTTGAGAAGAGG	57.45	
ARID2-7F ^m	7 & 8	AGCCACCATACCTAGCCTGT	58.70	567
ARID2-8R		ATGCCACATCCTAAAATTGTAAC	57.18	
ARID2-9F ^m	9 & 10	AACGTTATGCAACATTGTCC	56.00	622
ARID2-10R		TATGCCTGAGGAGGTAATGA	55.77	
ARID2-11F	11	CTGATGTACTGTGATTCATGGAC	57.06	425
ARID2-11R		CAAATTCCACTTTGGCCTAC	57.22	

(*) Li ve ark. (8)'dan alınmıştır. (^m) Li ve ark. (8)'dan uyarlanmıştır.

Tablo 2 (devam): *ARID2* geninin çoğaltılması için kullanılan primerler

Primer	Ekson	Primer dizisi	Tm (°C)	Ürün boyu (bp)
ARID2-12F ^m ARID2-12R	12	TGCCTGGTATGATATGTGCTC GAATACAGAACAAAACATTCTGGA	58.61 57.38	370
ARID2-13F ^m ARID2-13R*	13	TGCCTCCACATGGCTTTAG CCTCCACCACACTATAACCTATCC	59.81 60.02	363
ARID2-14F ARID2-14R	14	AACTGTGAGTCATACTGGTTCATAC CCAAGTAAGAAAATGCTACTGGAG	56.46 58.59	445
ARID2-15aF ARID2-15aR	15 (a)	GTGGCACAACACTGTTTCAAG TCTGTACTGAAGTTGCTGAGAC	56.79 54.83	577
ARID2-15bF ARID2-15bF	15 (b)	ACCTGTGCAAACTTCATCTC GTGAATGTTGCTGCTGTTG	55.26 56.22	575
ARID2-15cF ARID2-15cF	15 (c)	AATTGAAGTCATGGAGAACC TGTGGTTCCATTGGAGATA	54.04 54.64	402
ARID2-15dF ARID2-15dF	15 (d)	GCAGTATACAGGAGGCTTCA CAGGTTGGATACAAGTGAGC	55.57 55.75	618
ARID2-15eF ARID2-15eF	15 (e)	ATCTCCTGCTCCTTCACCTG ACTCCTGTCTGGGGTATGGA	59.40 59.38	553
ARID2-15fF ARID2-15fF	15 (f)	CCATCACCTGTCCCAGCTA AGATCAGTGGACCTGGCAAT	59.64 59.54	550
ARID2-15gF ARID2-15gF	15 (g)	CCAGCTCAGCAGCTATTGGT TCCCTGAGTTTGAAGGAGGT	60.56 58.72	586
ARID2-15hF ARID2-15hR	15 (h)	AGCCACAAACACCAGCAAT AACTACACTTGGGCGTTGC	59.15 58.79	583
ARID2-16F ^m ARID2-16R ^m	16	CAATGTGGTATTACCTTCGTG TCGCTAAAGTTAGTGGTTCTAAAG	55.64 56.42	497
ARID2-17F ^m ARID2-18R	17 & 18	GATTCCACTTGGAATATAAGCAG CCTAATATGCTAAGTTGCGTTTC	58.30 57.32	499
ARID2-19F ARID2-20R	19 & 20	GACCATTGGACCTTTAGTCA CCTAGGCATAAACTTTTGA	55.03 54.69	581
ARID2-21F ARID2-21R ^m	21	GTTGTTTCCCAGATGCTTCC ACGAAGCTTCTCTCAGCAT	59.53 59.19	456

(*) Li ve ark. (8)'dan alınmıştır. (^m) Li ve ark. (8)'dan uyarlanmıştır.

Tablo 3: Yeni nesil DNA analizi sonuçlarının Sanger yöntemi ile doğrulanması amacıyla Fankoni komplementasyon grubu D2 (*FANCD2*), nörofibromin 1 (*NF1*) ve suksinat dehidrogenaz kompleks, alt ünite C (*SDHC*) genleri için kullanılan primerler (Dr. Tolga Acun tarafından kullanılmıştır)

Primer	Mutasyon	Primer dizisi	T _m (°C)	Ürün boyu (bp)
FANCD2-F1 FANCD2-R1	Gln802His	GTATACCACGTTGTTGAGGACAG CAGTATAGGACACTTCTTACCTGC	58.57 59.02	279
FANCD2-F2 FANCD2-R2	Asp400Glu	TTTCTGTTGTTGCATATTTATTGAC TGGGTTTGAACAATGGACTG	57.45 59.39	270
FANCD2-F3 FANCD2-R3	Leu436Met	AAGATTTCTTAAGTTAAAATGAGAGC CAACATACCTGCTGGCAGTAC	57.17 58.32	272
NF1-F11 NF1-R11	Met1041Ile Leu1064Ile	CGTCATGTCACTTAGGTTATCTGG CAAACACAAAAGTTTGACATCTC	59.95 56.51	331
NF1-F12 NF1-R12	Ala1417Asp	TCAAACCTTATACTCAATTCTCAACTC TGACATTAACTTCAAGCCCCTTT	58.47 61.17	194
SDHC-F SDHC-R	Leu124Ile	GGTTCTTACTGTGTTGTCCTCTATG GAAAACTAGACCCTTTTCCACTATTAT	58.34 57.98	228

Tablo 4: Yeni nesil DNA analizinden elde edilen sonuçların Sanger yöntemi ile doğrulanması amacıyla *NF1* ve *p53* genleri için kullanılan primerler

Primer	Mutasyon	Primer dizisi	T _m (°C)	Ürün boyu (bp)
NF1-F1 NF1-R1	Met1041Ile Leu1064Ile	AAATCTTACGTGACTAAAGGTGTG TTCAAACACAAAAGTTTGACATC	56.7 56.9	289
NF1-F2 NF1-R2	Ala1417Asp	TTGAACTCTTTTGTTCATGTCTT GGAATTTAAGATAGCTAGATTATC	58.5 50.2	267
p53-7F p53-7R	Arg249Ser	CCTCATCTTGGGCCTGTGTT TGGAAGAAATCGGTAAGAGGTG	62.4 60.4	234

3.1.6. Standart solüsyonlar ve tampon çözeltiler

0.5X TBE (Tris-borik asit-EDTA)	44.5 mM Tris-base, 44.5 mM borik asit, 1 mM EDTA, pH 8.3
TE	10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
10X PBS Fosfat tamponlu salin (Phosphate buffered saline)	1 litre için: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na ₂ HPO ₄ , 2.4 g KH ₂ PO ₄ , pH 7.4

3.1.6.1. PZR grade H₂O

Steril distile su 1000 µl olarak 1.5 mL eppendorf tüplere porsiyonlanmıştır. 85°C’de 15 dakika inkübe edildikten sonra soğumaya bırakılmış ve kullanıma hazır olarak +4°C’de saklanmıştır.

3.1.6.2. dNTP

100 mM deoksiadenozin trifosfat (dATP), deoksisitozin trifosfat (dCTP), deoksiguanin trifosfat (dGTP), deoksitimin trifosfat (dTTP) stok solüsyonları kullanılarak, içinde her birinden 10mM olmak üzere dNTP kokteyli hazırlanmıştır. Bunun için dATP, dCTP, dGTP, dTTP’nin her birinden 100 µl alınarak, üzerine 600 µl PZR grade H₂O eklenerek toplam 1000 µl hacimde karıştırılmış ve 50-100 µl hacimlerde porsiyonlanarak -20°C’de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

-80°C’de saklanan hücre hatlarından “QIAamp DNA Mini Kit” kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde genomik DNA elde edilmiştir.

-80°C’den çıkartılan hücre hatları oda sıcaklığında bekletilerek çözüldükten sonra üzerlerine 500 µl 1X PBS eklenmiş ve vorteks ile karıştırıldıktan sonra 5000rpm’ de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Dibe çöken hücre peletleri üzerindeki PBS uzaklaştırılmış ve üzerine 200 µl Tissue Lysis Buffer (ATL) ve 20 µl Proteinase K eklenip iyice vortekslendikten sonra bir saat 55°C’ye ayarlanmış ısıtıcı blokta inkübe edilmiştir. Bir saat sonra, örnekler üzerine 200 µl Lysis Buffer (AL) eklenmiş ve 10 dakika 70°C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerine 200 µl etanol eklenmiş ve vortekslenen örnekler filtreli tüplere aktarılmıştır. 10,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, altlarındaki tüpler atılarak filtreler temiz tüplere aktarılmış ve üzerlerine 500 µl Washing Solution I (AW1) eklenerek 10,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası aynı işlem 500 µl Washing Solution 2 (AW2) ile tekrar edilmiştir. Filtreler temiz tüpe aktarılmış ve kurutulmak üzere 13,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra temiz tüplere aktarılmış ve üzerlerine 200 µl Elution Buffer (AE) eklendikten sonra 10,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen DNAlar temiz eppendorf tüplere aktarılmış ve +2°C / +8°C’de saklanmıştır. Uzun süreli saklamalar için -20°C kullanılmıştır.

Elde edilen DNA’ların konsantrasyonları ve saflığı saptanmak üzere 260 nm ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Saf DNA örneklerinin A_{260}/A_{280} oranı 1.8 - 2.0 olmalıdır.

3.2.2. Yeni nesil DNA analizi

Tablo 5’de listelenen 115 genin analizi hedeflendirilmiş DNA hibridizasyon capture (hibridizasyon yakalama) yöntemi olan HybSelect protokolü uygulanmak üzere Dr. Özgür Şahin (DKFZ, Heidelberg, Almanya) kolabrasyonu ile FEBIT (Heidelberg, Almanya) laboratuvarında yapılmıştır.

Tablo 5: HybSelect protokolü ile analiz edilen 115 gen paneli

Gen adı	Ensembl gen no	Kromozom bölgesi
ABL1	ENSG00000097007	9q34.12
AKT1	ENSG00000142208	14q32.33
AKT2	ENSG00000105221	19q13.2
ALK	ENSG00000171094	2p23.2-p23.1
APC	ENSG00000134982	5q22.2
ARHGAP26	ENSG00000145819	5q31.3
ATM	ENSG00000149311	11q22.3
BCL6	ENSG00000113916	3q27.3
BLM	ENSG00000197299	15q26.1
BMPR1A	ENSG00000107779	10q23.2
BRAF	ENSG00000157764	7q34
BRCA1	ENSG00000012048	17q21.31
BRCA2	ENSG00000139618	13q13.1
BRIP1	ENSG00000136492	17q23.2
BUB1B	ENSG00000156970	15q15.1
CARD11	ENSG00000198286	7p22.2
CDC73	ENSG00000134371	1q31.2
CDH1	ENSG00000039068	16q22.1
CDK4	ENSG00000135446	12q14.1
CDKN2A	ENSG00000147889	9p21.3
CEBPA	ENSG00000245848	19q13.11
CHEK2	ENSG00000183765	22q12.1
CTNNB1	ENSG00000168036	3p22.1
CYLD	ENSG00000083799	16q12.1
DDB2	ENSG00000134574	11p11.2
EGFR	ENSG00000146648	7p11.2
ERBB2	ENSG00000141736	17q12
ERCC2	ENSG00000104884	19q13.32
ERCC3	ENSG00000163161	2q14.3
ERCC4	ENSG00000175595	16p13.12
ERCC5	ENSG00000134899	13q33.1
EXT1	ENSG00000182197	8q24.11
EXT2	ENSG00000151348	11p11.2
FAM123B	ENSG00000184675	Xq11.2
FANCA	ENSG00000187741	16q24.3
FANCC	ENSG00000158169	9q22.32

Tablo 5 (devam): HybSelect protokolü ile analiz edilen 115 gen paneli

Gen adı	Ensembl gen no	Kromozom bölgesi
FANCD2	ENSG00000144554	3p25.3
FANCE	ENSG00000112039	6p21.31
FANCF	ENSG00000183161	11p14.3
FANCG	ENSG00000221829	9p13.3
FAS	ENSG00000026103	10q23.31
FBXW7	ENSG00000109670	4q31.3
FGFR2	ENSG00000066468	10q26.13
FGFR3	ENSG00000068078	4p16.3
FH	ENSG00000091483	1q43
FLCN	ENSG00000154803	17p11.2
FLT3	ENSG00000122025	13q12.2
GATA1	ENSG00000102145	Xp11.23
GATA2	ENSG00000179348	3q21.3
GNAS	ENSG00000087460	20q13.32
GOPC	ENSG00000047932	6q22.1
GPC3	ENSG00000147257	Xq26.2
HNF1A	ENSG00000135100	12q24.31
HRAS	ENSG00000174775	11p15.5
IKZF1	ENSG00000185811	7p12.2
JAK2	ENSG00000096968	9p24.1
JAK3	ENSG00000105639	19p13.11
KIT	ENSG00000157404	4q12
KLF6	ENSG00000067082	10p15.1
KRAS	ENSG00000133703	12p12.1
MAP2K4	ENSG00000065559	17p12
MEN1	ENSG00000133895	11q13.1
MET	ENSG00000105976	7q31.2
MITF	ENSG00000187098	3p14-p13
MLH1	ENSG00000076242	3p22.2
MLL	ENSG00000118058	11q23.3
MPL	ENSG00000117400	1p34.2
MSH2	ENSG00000095002	2p21
MSH6	ENSG00000116062	2p16.3
MUTYH	ENSG00000132781	1p34.1
MYC	ENSG00000136997	8q24.21
MYCL1	ENSG00000116990	1p34.2

Tablo 5 (devam): HybSelect protokolü ile analiz edilen 115 gen paneli

Gen adı	Ensembl gen no	Kromozom bölgesi
MYCN	ENSG00000134323	2p24.3
NBN	ENSG00000104320	8q21.3
NF1	ENSG00000196712	17q11.2
NF2	ENSG00000186575	22q12.2
NOTCH1	ENSG00000148400	9q34.3
NPM1	ENSG00000181163	5q35.1
NRAS	ENSG00000213281	1p13.2
PALB2	ENSG00000083093	16p12.2
PAX5	ENSG00000196092	9p13.2
PDGFRA	ENSG00000134853	4q12
PHOX2B	ENSG00000109132	4p13
PIK3CA	ENSG00000121879	3q26.32
PIK3R1	ENSG00000145675	5q13.1
PMS1	ENSG00000064933	2q32.2
PMS2	ENSG00000122512	7p22.1
PRKAR1A	ENSG00000108946	17q24.2
PTCH1	ENSG00000185920	9q22.32
PTEN	ENSG00000171862	10q23.31
PTPN11	ENSG00000179295	12q24.13
RB1	ENSG00000139687	13q14.2
RECQL4	ENSG00000160957	8q24.3
REL	ENSG00000162924	2p16.1
RET	ENSG00000165731	10q11.21
SBDS	ENSG00000126524	7q11.21
SDHB	ENSG00000117118	1p36.13
SDHC	ENSG00000143252	1q23.3
SDHD	ENSG00000204370	11q23.1
SMAD4	ENSG00000141646	18q21.2
SMARCB1	ENSG00000099956	22q11.23
SMO	ENSG00000128602	7q32.1
SOCS1	ENSG00000185338	16p13.13
STK11	ENSG00000118046	19p13.3
SUFU	ENSG00000107882	10q24.32
TP53	ENSG00000141510	17p13.1
TSC1	ENSG00000165699	9q34.13
TSC2	ENSG00000103197	16p13.3

Tablo 5 (devam): HybSelect protokolü ile analiz edilen 115 gen paneli

Gen adı	Ensembl gen no	Kromozom bölgesi
TSHR	ENSG00000165409	14q31.1
VHL	ENSG00000134086	3p25.3
WAS	ENSG00000015285	Xp11.23
WRN	ENSG00000165392	8p12
WT1	ENSG00000184937	11p13
XPA	ENSG00000136936	9q22.33
XPC	ENSG00000154767	3p25.1

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

PZR, DNA'nın belirli bir bölgesinin laboratuvar koşullarında enzimatik olarak çoğaltılması işlemidir. Genellikle üç temel aşamadan oluşmaktadır: Denatürasyon, primer bağlanması ve DNA sentezi. İlk aşamada, DNA molekülünün çift zincirli yapısının yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılması sağlanır ve 94 - 96°C'de gerçekleştirilir. Denatürasyondan sonra primerlerin daha düşük ısılarda, kendilerine komplementer tek zincirli DNA ile hibridize olmasına olanak sağlanır. Bu aşamanın sıcaklığı, kullanılan primerlerin G/C oranına göre farklılık gösteren erime sıcaklıklarına uygun şekilde ayarlanmaktadır. Son aşamada, genellikle 72°C'de Taq polimeraz ile DNA zincirinde uzatma sağlanır. Uzatma aşamasının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve çoğaltılacak DNA bölgesinin uzunluğuna göre değişiklik göstermektedir. Bu üç aşamanın her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkmaktadır. Oluşan ürün miktarı, başlangıçtaki DNA konsantrasyonu ve döngü sayısına bağlıdır (115).

Çalışmamızda, *BCORL1* ve *ARID2* genlerinin (Tablo 6) splice bölgeleri de dahil olmak üzere kodlayan bölgeleri, toplam 50 µl hacimde 100 ng genomik DNA kullanılarak son konsantrasyonlar 1X Colorless GoTaq Flexi Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 20 pmol ileri ve geri primerler (Tablo 1 ve Tablo 2) ve 1.25 U GoTaq Flexi DNA polimeraz olacak şekilde PZR yapılarak çoğaltılmıştır. Yayınlardan alınmayan primerler, Primer3 (v.0.4.0) programı (<http://frodo.wi.mit.edu/>, Erişim tarihi: 06 Ağustos 2012) kullanılarak tasarlanmıştır. PZR koşulları Tablo 7'deki

gibidir ve bağlanma (annealing) sıcaklıkları Tablo 1 ve 2’deki primerlerin Tm değerlerine göre ayarlanmıştır. Her primer çifti için en uygun PZR koşulu, farklı bağlanma sıcaklıklarında PZR yapılarak optimize edilmiştir. Bütün PZR ürünleri %2’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

Tablo 6: Sanger yöntemi ile analiz edilen genler

Gen adı	Ensembl gen no	Kromozom bölgesi	Ekson sayısı
ARID2	ENSG00000189079	12q12	13
BCORL1	ENSG00000085185	Xq26.1	21

Tablo 7: PZR koşulları

Derece / basamak	Süre	Döngü
96°C ilk denatürasyon	2 dakika	1
94°C denatürasyon	30 saniye	
54 – 61°C bağlanma*	35 saniye	35
72°C uzatma	45 saniye	
72°C son uzatma	3 dakika	1
4°C	sonsuz	1

(*) Bağlanma sıcaklıkları, Tablo 1 ve Tablo 2’deki primer Tm’lerine göre değişiklik göstermektedir.

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünleri, standart tampon çözeltiler kullanılarak yatay elektroforez ile görüntülenmiştir.

Agaroz, 0.5X TBE içinde tamamen çözülüp homojen bir görüntü elde edilinceye kadar mikrodalga fırında kaynatılmış ve çeker ocak altında biraz soğuması beklendikten sonra içine EtBr (son konsantrasyon 30-50 ng/ml olacak şekilde) eklenmiştir.

Örnekler agaroz jele, ticari olarak temin edilen bromfenol mavi yükleme boyası (örneklerin 1/5 hacminde) kullanılarak yüklenmiş ve 120V'da 30 dakika yürütülmüştür. Ürün boylarının belirlenebilmesi için örneklerle birlikte 100 bp DNA ladder da yürütülmüştür.

3.2.5. PZR ürün saflaştırma

Elde edilen PZR ürünleri ticari "ExoSAP-IT" kiti kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde 5 µl PZR ürünü içine 2 µl enzim eklenerek 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında 85°C'de 15 dakika bekletilerek saflaştırılmıştır.

3.2.6. Dizi analizi reaksiyonu

DNA dizi analizi, belirli bir DNA fragmanının nükleotit sıralamasının saptanması işlemidir. Günümüzde, Frederick Sanger tarafından geliştirilmiş olan zincir sonlandırma (chain termination) yöntemi, ilk dizi analizi yöntemi olan Maxam-Gilbert kimyasal kırılma (chain breakage) tekniğine göre daha verimli olması ve daha az toksik kimyasal ile düşük miktarda radyoaktivite kullanılması nedeniyle tercih edilmektedir. Sanger yönteminin temel ilkesi DNA zincir uzamasının sonlandırıcısı olarak dideoksinükleotit trifosfatların (ddNTP) kullanılmasıdır. 2',3'-dideoksinükleotit trifosfat molekülleri, dNTP'lerden 3' karbonunda OH grubu yerine bir H atomu bulunması nedeniyle farklıdır. Bu moleküller bir sonraki deoksinükleotit ile fosfodiester bağı oluşturmamışlarından

DNA zincir uzamasını sonlandırırlar. Sanger yönteminde işaretleme radyoaktif / floresan işaretli primerler ile *dye-primer* veya işaretli ddNTP'ler ile *dye-terminator* dizileme yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (116).

Otomatize dizi analizi ile daha fazla DNA'nın daha kısa sürede analiz edilebilmesi mümkün olmaktadır. Otomatik yöntemlerde reaksiyonlar herbiri farklı dalgaboylarında ışıma yapan boyalar ile işaretlenmiş dört ddNTP'yi de içeren tek bir tüp içerisinde gerçekleştirilir (*dye-terminator* dizileme) ve lazer ile okuma sağlanır.

Çalışmamızda, saflaştırılmış PZR ürünleri, ticari “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” kit kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde 2 µl saflaştırılmış örnek içine 20 pmol ileri veya geri primer, 2 µl Halfseq dilüsyon solüsyonu ve 4 µl Sequencing Premix eklenerek Tablo 8'deki programda dizi analizi reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 8: Dizi analizi reaksiyonu koşulları

Derece / basamak	Süre	Döngü
95°C denatürasyon	20 saniye	25
50°C bağlanma	15 saniye	
60°C uzatma	1 dakika	

3.2.7. Bağlanmamış floresan işaretli ddNTP'lerin uzaklaştırılması

Dizi analizi reaksiyonundan elde edilen ürünlerden bağlanmamış floresan işaretli ddNTPler'in uzaklaştırılması (*dye-removal*), dizideki gürültünün önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızda, dizi analizi reaksiyonundan elde edilen ürünler “Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit” ile üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde muamele edilerek, bağlanmamış floresan işaretli ddNTP'lerin uzaklaştırılması (*dye-removal*) sağlanmıştır.

Toplam 10 µl olan dizi analizi reaksiyonu ürünlerinin üzerine 40 µl Sequencing Wash Solution eklenmiştir. 3-5 kez pipetaj yapıldıktan sonra SEQ₉₆ plağa aktarılmış ve plak 600 - 800 mbar'a ayarlanmış vakum sistemine yerleştirilmiştir. 7 dakika vakum uygulandıktan sonra plak vakum sisteminden çıkartılmıştır. SEQ₉₆ plağının altında kalan sıvı, kağıt havlu ile çektilirilmiş ve plak yeniden vakum sistemine yerleştirilmiştir. SEQ₉₆ plak kuyularına 30 µl Sequencing Wash Solution eklenmiş ve tekrar 600 - 800 mbar vakum 6 dakika uygulandıktan sonra plak vakum sisteminden çıkartılmış ve havlu kağıt ile plağın altında kalan sıvı çektilirilmişdir. Kuyular üzerine 20 µl Injection Solution eklenmiş ve 8 – 10 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra pipet ile SEQ₉₆ plak kuyularından alınan örnekler otomatik DNA dizi analizi cihazına yüklenmek üzere Megabace plağına aktarılmıştır.

3.2.8. Otomatik DNA dizi analizi ve verilerin incelenmesi

Bağlanmamış floresan işaretli ddNTP'leri uzaklaştırılmış dizi analizi reaksiyonu örnekleri, otomatik dizi analizi cihazı Megabace 750'de Long Read Matrix kullanılarak yürütülmüştür. Elde edilen diziler Lasergene Seqman II, versiyon 5.08 (Dnastar Inc., Madison, ABD, 2005) (117) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.9. Yeni nesil DNA analizinden elde edilen sonuçların Sanger yöntemi ile doğrulanması

Yeni nesil DNA analizi sonucunda G>T ve C>A transversiyonları saptanan *FANCD2*, *NF1* ve *SDHC* genlerindeki mutasyonların doğrulanması için Dr. Tolga Acun tarafından Sanger yöntemi ile dizileme yapılmıştır. Burada kullanılan PZR ve dizileme koşulları *BCORL1* ve *ARID2* genleri için belirtilen koşullar ile aynıdır. Kullanılan primerler ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 3'de gösterilmiştir.

NF1 genindeki G>T ve C>A transversiyonlarının doğrulanması için Tablo 4'deki primerler kullanılarak da Sanger yöntemi ile dizileme yapılmıştır. Ayrıca, p53 R249S mutasyonunun doğrulanması için de Sanger dizileme yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Yeni Nesil DNA Dizi Analizi

TP53 genindeki özgün R249S (G>T) somatik mutasyonu, AFB1 toksini ile ilişkilendirilmiştir (5, 6). Ancak, çok basamaklı hepatokarsinogenezde, AFB1'e maruz kalmış vakalarda, p53 R249S mutasyonuna eşlik eden diğer genetik değişiklikler (diğer basamaklar) henüz bilinmemektedir.

Çalışmamızda, öncelikle AFB1'in sebep olduğu p53 R249S (G>T) mutasyonundan önce ya da sonra oluşmuş diğer genetik değişiklikleri tanımlayabilmek amacıyla, MAHLAVU ve PLC/PRF hücre hatlarında 115 gen için yeni nesil DNA analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve her iki hücre hattında da ortak olan 485 adet varyasyon bulunmuştur. AFB1, DNA'ya bağlanarak guaninden timine transversiyon mutasyonlarına neden olan bir kanserojendir (37, 38). Bu nedenle, saptanan varyasyonlardan sadece G>T ve C>A transversiyonları üzerinde çalışılmıştır. Saptanan 16 tane G>T ve 18 tane C>A varyasyonu Tablo 9'da özetlenmiştir.

Tablo 9: Yeni nesil DNA analizinden elde edilen ve her iki hücre hattında da ortak olan G>T ve C>A varyasyonları

Gen	Pozisyon (genomik)	NCBI referans (hg 19)	Dizileme sonucu	Varyasyonun etkisi / türü
ARHGAP26	142606301	C	AA	intronik
BMPR1A	88635779	C	AA	CCT>ACT (Pro2Thr) yanlış anlamlı
BMPR1A	88681340	C	AC	CCC>CCA (Pro410Pro) sessiz
BMPR1A	88684282	G	GT	intronik
FANCD2	10088329	C	AC	GAC>GAA (Asp400Glu) yanlış anlamlı
FANCD2	10089628	C	AC	CTG>ATG (Leu436Met) yanlış anlamlı

Tablo 9 (devam): Yeni nesil DNA analizinden elde edilen ve her iki hücre hattında da ortak olan G>T ve C>A varyasyonları

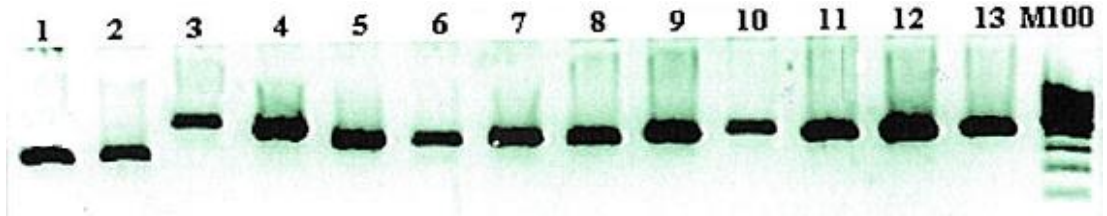
Gen	Pozisyon (genomik)	NCBI referans (hg 19)	Dizileme sonucu	Varyasyonun etkisi / türü
FANCD2	10108913	G	GT	CAG>CAT (Gln802His) yanlış anlamlı
KRAS	25358317	C	AC	intronik
KRAS	25361739	C	AC	intronik
MAP2K4	12045351	G	GT	3'UTR
MAP2K4	12045721	G	GT	3'UTR
MAP2K4	12046844	C	AC	intronik
MYCL1	40361667	C	AC	intronik
MYCL1	40361828	G	GT	intronik
NF1	29557936	G	GT	ATG>ATT (Met1041Ile) yanlış anlamlı
NF1	29557869	C	AC	CTT>ATT (Leu1064Ile) yanlış anlamlı
NF1	29585438	C	AC	GCC>GAC (Ala1417Asp) yanlış anlamlı
PDGFRA	55162950	C	AA	intronik
PMS2	6042143	G	GT	CAG>AAG (Gln160Lys) yanlış anlamlı
PRKAR1A	66508243	C	AA	intronik
PTEN	89725633	C	AC	intronik
PTPN11	112919961	G	GT	intronik
PTPN11	112944095	C	AC	GCC>GCA (Ala392Ala) sessiz
PTPN11	112944557	G	GT	intronik
PTPN11	112945056	G	GT	intronik
PTPN11	112945237	G	GT	intronik
PTPN11	112947498	G	GT	intronik
RET	43613843	G	TT	CTG>CTT (Leu769Leu) sessiz
SDHC	161332247	C	AC	CTT>ATT (Leu124Ile) yanlış anlamlı
SDHC	161332470	C	AA	intronik
SDHD	111965702	G	GT	intronik
SDHD	111966220	G	GT	intronik
TP53	7577534	C	AA	AGG>AGT (Arg249Ser) yanlış anlamlı
XPC	14187449	G	TT	CAG>AAG (Gln939Lys) yanlış anlamlı

4.2. PZR ve Sanger Dizi Analizi

4.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonları

Sanger dizi analizi yapılacak bölgeler için uygun primerler (*BCORL1*: Tablo 1, *ARID2*: Tablo 2, Tolga Acun tarafından yapılan PZR'ler: Tablo 3, *NF1* ve *p53*: Tablo 4) kullanılarak PZR yapılmıştır. Her primer çifti için en uygun PZR koşulunun saptanması için farklı bağlanma sıcaklıklarında PZR yapılmıştır. Optimizasyon sonucunda en uygun PZR koşulları, *BCORL1* primerleri için 61°C, *ARID2* primerleri için 56°C (Tm değeri 54-56°C olan primerler için) ve 59°C (Tm değeri 56.5-61.5°C olan primerler için), Tablo 3'deki primerler için 59°C ve Tablo 4'deki NF1-F1 & NF1-R1 primer çifti için 58°C, NF1-F2 & NF1-R2 için 52°C ve p53-7F & p53-7R için 61°C olarak belirlenmiştir.

Bütün PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jel görüntülerinden bir örnek Şekil 11'de verilmiştir.



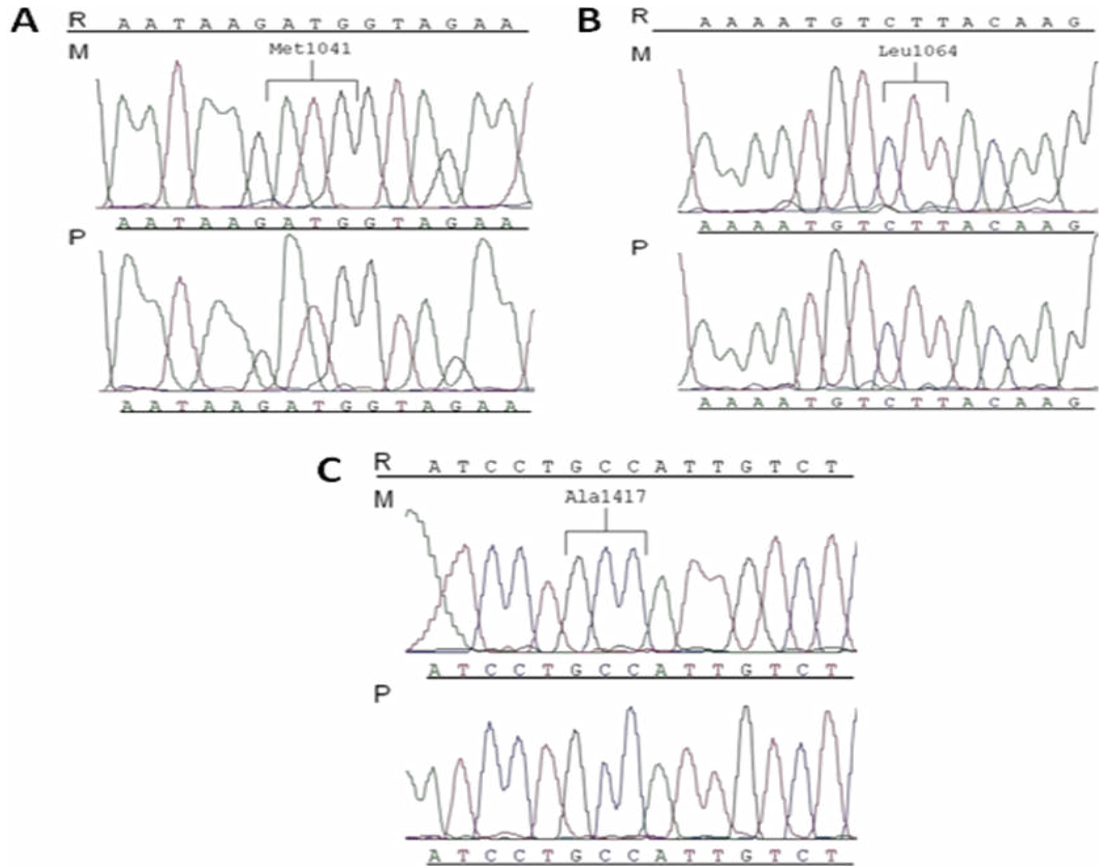
Şekil 11: PZR sonucu elde edilen ürünlerin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1-13: *BCORL1* geninin 1-4. eksonları için elde edilen PZR ürünleri, M100: 100 bç DNA ladder. Ürün boyları 1-13. kuyular için sırasıyla: 341 bç, 341 bç, 577 bç, 578 bç, 442 bç, 436 bç, 459 bç, 424 bç, 452 bç, 497 bç, 435 bç, 457 bç, 446 bç.

İlk çalışmada ürün elde edilememesi durumunda, reaksiyonlar aynı PZR koşullarında doğrudan DNA ile veya bağlanma sıcaklığı 2°C arttırılarak ilk tur PZR ürününden 2 µl kullanılarak tekrar edilmiştir.

4.2.2. Yeni nesil DNA analizi sonuçlarının Sanger yöntemi ile doğrulanması

Yeni nesil DNA analizinde saptanan transversiyonlardan *FANCD2*, *NF1*, *SDHC* genlerinde bulunan ve yanlış anlamalı mutasyona neden olanlar doğrulanmak üzere Dr. Tolga Acun tarafından Sanger yöntemi ile Tablo 3'deki primerler ile dizilenmiş ancak referans diziden farklılık saptanmamış ve konfirme edilememiştir.

NF1 genindeki transversiyonlar alternatif primer çiftleriyle (Tablo 4) de dizilenmiş ancak mutasyonlar bu analizde de doğrulanamamıştır (Şekil 12). Ancak, her iki hücre hattında da p53 R249S mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır.



Şekil 12: Yeni nesil DNA analizinden elde edilen *NF1* geni mutasyonlarının doğrulanması için kullanılan Sanger dizileme sonuçları. R: referans dizi (hg19, GRCh37, <http://genome.ucsc.edu/>, Erişim tarihi: 3 Aralık 2012), M: MAHLAVU hücre hattı, P: PLC / PRF hücre hattı. (A) *NF1* geni kodon 1041. MAHLAVU ve PLC referans dizi ile aynı, ATG=Met1041. (B) *NF1* geni kodon 1064. MAHLAVU ve PLC referans dizi ile aynı, CTT=Leu1064. (C) *NF1* geni 1417. MAHLAVU ve PLC referans dizi ile aynı, GCC=Ala1417.

4.2.3. *BCORL1* ve *ARID2* genlerinin Sanger dizi analizi

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, bir HCV kaynaklı H.K vakasında saptanan *BCORL1*-*ELF4* translokasyonunun transkripsiyon regülasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (7). Ayrıca, AFB1 dışı faktörlerle oluşan H.K.'larda, *ARID2* geninde yeni mutasyonlar bulunarak tümör baskılayıcı bir gen olduğu önerilmiştir (8, 9). Bu genlerin Sanger analizinde saptanan varyasyonları, MAHLAVU ve PLC/PRF hücre hatları için sırasıyla Tablo 10 ve Tablo 11'de özetlenmiştir.

İlk çalışmada kaliteli dizi elde edilememesi durumunda, reaksiyonlar saflaştırma aşamasından itibaren tekrar edilmiştir.

Tablo 10: MAHLAVU hücre hattında *BCORL1* ve *ARID2* genlerinde saptanan varyasyonlar

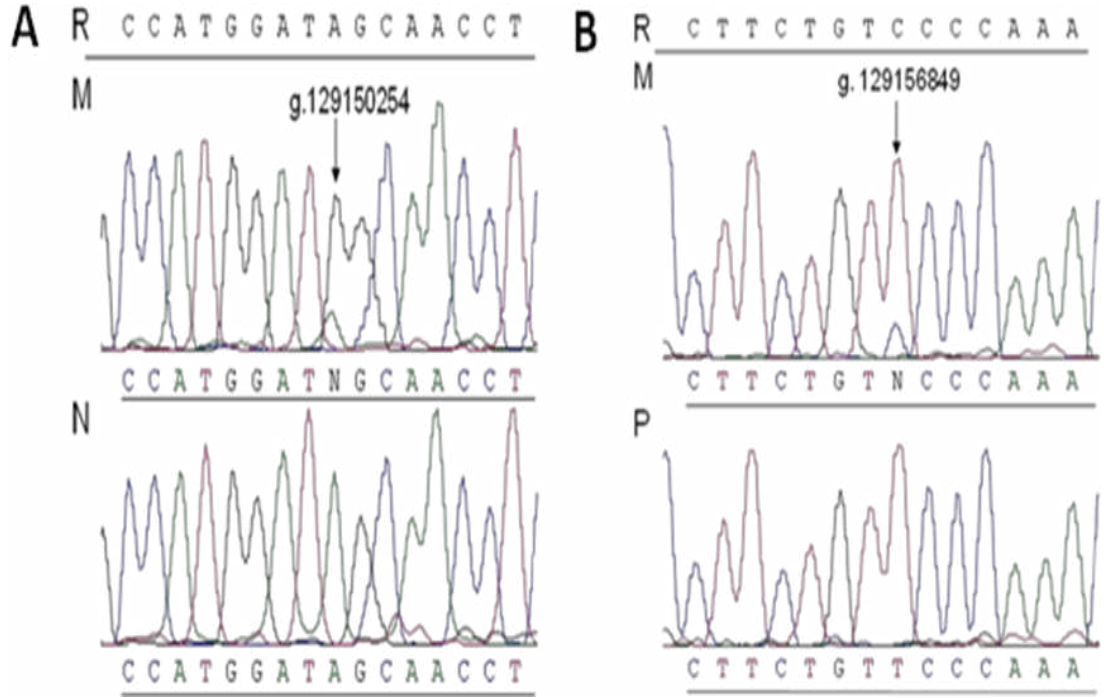
Gen	Pozisyon (genomik)	NCBI referans (hg 19)	Dizileme sonucu	Varyasyonun etkisi / türü
BCORL1	129150144	C	CG	CTC>CTG (Leu1132Leu) sessiz
BCORL1	129150254	A	AG	intronik
BCORL1	129156849	C	CT	intronik
BCORL1	129184876	A	GG	intronik
ARID2	46211724	T	-T	intronik
ARID2	46233042	T	CC	intronik

Tablo 11: PLC/PRF hücre hattında *BCORL1* ve *ARID2* genlerinde saptanan varyasyonlar

Gen	Pozisyon (genomik)	NCBI referans (hg 19)	Dizileme sonucu	Varyasyonun etkisi / türü
BCORL1	129156849	C	T	intronik
BCORL1	129184876	A	G	intronik
ARID2	46205255	A	AC	GTA>GTC (Val113Val) sessiz
ARID2	46211724	T	-T	intronik
ARID2	46215163	G	AG	intronik
ARID2	46233042	T	CT	intronik

4.2.3.1. *BCORL1* geninin Sanger dizi analizi

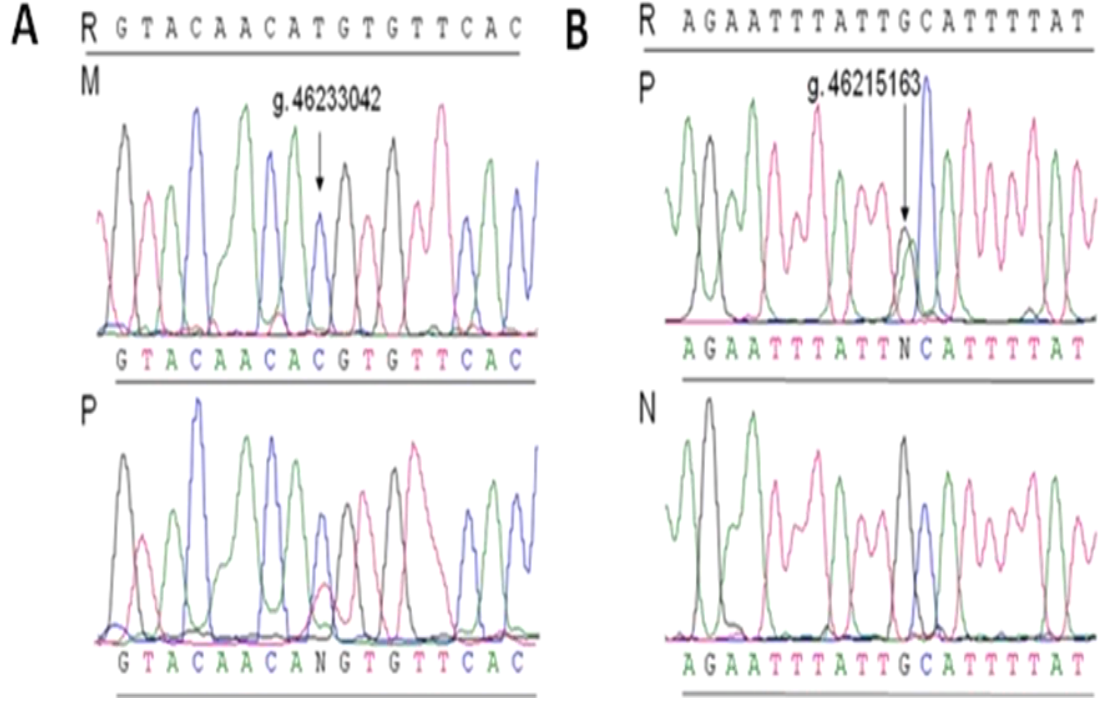
13 eksonu bulunan *BCORL1* geninin kodlayan 12 eksonu için toplam 21 adet PZR ve aynı primerler (Tablo 1) kullanılarak bunların çift yönlü (toplam 42 adet) dizi analizi reaksiyonu yapılmıştır. Bazı Sanger dizi analizi sonuçları Şekil 13’de gösterilmiştir.



Şekil 13: Sanger yöntemi ile analiz edilen *BCORL1* geni varyasyonları. R: referans dizi (hg19, GRCh37, <http://genome.ucsc.edu/>, Erişim tarihi: 22 Aralık 2012), M: MAHLAVU hücre hattı, P: PLC / PRF hücre hattı, N: Normal kontrol. (A) *BCORL1* geni g.129150254 A>G varyasyonu. MAHLAVU bu varyasyon için heterozigot. (B) *BCORL1* geni g.129156849 C>T varyasyonu. MAHLAVU bu varyasyon için heterozigot, PLC hemizigot mutant.

4.2.3.2. *ARID2* geninin Sanger dizi analizi

ARID2 geninin kodlayan 21 eksonu için toplam 23 adet PZR ve aynı primerler (Tablo 2) kullanılarak bunların çift yönlü (toplam 46 adet) dizi analizi reaksiyonu yapılmıştır. Bazı Sanger dizi analizi sonuçları Şekil 14’de gösterilmiştir.



Şekil 14: Sanger yöntemi ile analiz edilen *ARID2* geni varyasyonları. R: referans dizi (hg19, GRCh37, <http://genome.ucsc.edu/>, Erişim tarihi: 16 Ocak 2013), M: MAHLAVU hücre hattı, P: PLC / PRF hücre hattı, N: Normal kontrol. (A) *ARID2* geni g.46233042 T>C varyasyonu. MAHLAVU bu varyasyon için homozigot, PLC heterozigot. (B) *ARID2* geni g.46215163 G>A varyasyonu. PLC bu varyasyon için heterozigot.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi, değişmiş hücrelere avantaj sağlayan çoklu genetik ve epigenetik değişikliklerin eşlik ettiği kompleks bir süreçtir (118). Tümörögeneze neden olan alterasyonların, gelişen tümörde büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilme, tümör baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçış, sınırsız bölünme potansiyeli, sürekli anjiyogenez ve sonuç olarak doku invazyonu ile metastaz gibi olanaklar sağladığı gösterilmiştir

Tümörögenizde rol alan genlerin çeşitliliğine rağmen, p53 transkripsiyon faktörü temel tümör baskılayıcı ve bu sürece dahil olan çeşitli sinyal yollarının yöneticisi olarak görev almaktadır. Bu görevlerle uyumlu olarak, p53 mutasyonları H.K. da dahil olmak üzere neredeyse tüm kanser çeşitlerinde gösterilmiştir (68). p53 mutasyonlarının malignant transformasyonun başlangıcında rol aldığı ya da sadece kanserin ileri evrelerinde ortaya çıkarak büyüme ve sağkalım avantajı sağladığı sorusu hala cevaplanamamıştır. Ancak, tümörögenizde p53 mutasyonu oluşma zamanı, kanser türlerine göre farklılık göstermektedir (119).

Çevresel karsinojenlerden kaynaklanan kanserlerde, erken evrede p53 mutasyonları meydana gelebilmektedir (120). Yapılan birçok çalışmada, AFB1 kaynaklı H.K.'larda p53 R249S mutasyonunun (5, 6), tütün dumanındaki benzo(a)pirenin neden olduğu akciğer kanserlerinde özellikle kodon 157'de meydana gelen G>T transversiyonunun (121) ve güneş ışığı ile UV radyasyonundan kaynaklanan cilt kanserlerinde pirimidin dimerlerinin (122) karsinogenez ile ilişkileri gösterilmiştir.

Özellikle bazı coğrafik bölgelerde çok önemli bir çevresel faktör olan AFB1; insan gıdalarında, tahıllarda, yemlerde ve her türlü kuru yiyeceklerde rutubetin artmasına ve sıcaklığa bağlı olarak, mantar türleri tarafından üretilen zararlı toksinlerin en önemlilerinden biridir ve genotoksik özelliği nedeniyle mutasyonlara yol açarak kanser gelişiminde etkilidir (2, 3, 4).

Çalışmamızda, AFB1 kaynaklı H.K.'larda p53 R249S mutasyonundan önce ya da sonra ortaya çıkmış yeni genetik değişikliklerin tanımlanması ve hepatokarsinogenez ile ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Hepatosellüler karsinoma, oldukça uzun bir süreçte, enflamasyon ve organ hasarı koşullarında gelişmektedir (112). Bu uzun sürecin her evresinde, farklı genetik ve genomik alterasyonlar meydana gelmektedir. Farklı etiyolojik faktörlerin de katkısıyla hepatokarsinogenez süreci moleküler açıdan oldukça karmaşık ve heterojen bir durum almaktadır. Bu süreçte en sık rastlanan genetik değişikliklerin *TP53*, *beta-katenin* ve *aksin* genlerinde yoğunlaştığı gösterilmiştir. Ancak, bu yollara eşlik eden diğer yollar ya da genlerdeki ardışık genetik değişiklikler henüz açıklanamamıştır. H.K.'nın moleküler patogenezi anlamak yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için vazgeçilmez bir basamaktır (123).

Amacımız doğrultusunda, MAHLAVU ve PLC/PRF hücre hatlarında daha önce farklı kanserler ile ilişkisi gösterilmiş 115 gen (Tablo 5) ve AFB1 dışı faktörlerle oluşan H.K.'larda mutasyonu bildirilmiş *BCORL1* ve *ARID2* genleri analiz edilmiştir. Hepatokarsinogenezde AFB1 etkisinin anlaşılabilmesi için genomunda AFB1 maruziyetinin parmak izi olan p53 R249S mutasyonunu taşıdığı bilinen bu iki hücre hattı kullanılmıştır.

115 genin yeni nesil DNA analizi sonucunda iki hücre hattında ortak olarak saptanan varyasyonlardan, AFB1 kaynaklı p53 R249S G>T mutasyonu ile benzerlik göstermesi açısından, sadece G>T ve C>A transversiyonları üzerinde çalışılmıştır.

ARHGAP26 (Rho GTPaz aktive edici protein 26), *BMPRIA* (kemik morfogenetik protein reseptörü tip IA), *KRAS* (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), *MAP2K4* (mitojen aktive protein kinaz kinaz 4), *MYCL1* (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)), *PDGFRA*, *PRKARIA* (protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I-alpha), *PTEN*, *PTPN11* (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11), *SDHC* ve *SDHD* (suksinat dehidrogenaz kompleks, alt ünite D) genlerinde intronik ve/veya 3' translasyona uğramayan bölgede (3' UTR) varyasyonlar saptanmıştır. Ayrıca, *BMPRIA*, *PTPN11*, *RET* genlerinde sırasıyla Pro410Pro, Ala392Ala, Leu769Leu

(rs1800861) sessiz mutasyonları saptanmıştır (Tablo 9). Bu varyasyonlar kodlamayan bölgelerde bulunduğundan veya aminoasit değişikliğine neden olmadığından polimorfizm olarak değerlendirilerek hepatokarsinogenez ile ilişkili olmadıkları düşünülmektedir.

BMPRIA, *FANCD2*, *NF1*, *PMS2* (postmeiotic segregation increased 2 (*S. cerevisiae*)), *SDHC*, *TP53* ve *XPC* (Xeroderma pigmentosum, komplementasyon grubu C) genlerinde yanlış anlamlı mutasyonlar saptanmıştır (Tablo 9). *TP53* geninde saptanan Arg249Ser mutasyonu bu hücre hatlarının AFB1 maruziyetini doğrulamaktadır. *XPC* geninde saptanan C>A transversiyonu ise, Gln939Lys varyasyonuna neden olmaktadır. Bu varyasyona sahip hastalarda, AFB1 maruziyeti durumunda H.K. gelişme riskinin arttığı daha önce bildirilmiştir (124).

Saptanan transversiyonlardan öncelikle *FANCD2* Asp400Glu, Leu436Met, Gln802His; *NF1* Met1041Ile, Leu1064Ile, Ala1417Asp ve *SDHC* Leu124Ile mutasyonları doğrulanmak üzere Sanger yöntemi ile analiz edilmiş ancak konfirme edilememiştir. Bu mutasyonlar doğrulanamadığından, *BMPRIA*, *PMS2* ve *XPC* genlerindeki C>A transversiyonlarının incelenmesine devam edilmemiştir.

Hücre hatlarında, AFB1 ile ilişkilendirilebilecek bir genetik değişiklik saptanması durumunda, daha önce aynı mutasyonu taşıdığı bildirilmiş DNA örnekleri ile p53 R249S mutasyonu bulunmayan ancak yüksek aflatoksin maruziyeti olduğu bilinen bölgelerden elde edilmiş klinik H.K. DNA örneklerinin de çalışmaya dahil edilerek bu varyasyonlar için analiz edilmesi planlanmıştır. Ancak, yeni nesil DNA analizinde saptanan varyasyonlar Sanger yöntemi ile doğrulanamadığından, bunlar klinik örneklerde çalışılmamıştır.

Sanger yöntemi ile analiz edilen *BCORL1* ve *ARID2* genlerinde MAHLAVU ve PLC/PRF hücre hatlarında saptanan varyasyonlar sırasıyla Tablo 10 ve Tablo 11’de gösterilmiştir. MAHLAVU’da *BCORL1* geninde saptanan Leu1132Leu (rs7062200) ve PLC/PRF’de *ARID2* genindeki Val113Val (rs73292513) varyasyonları eksonlarda bulunmakta ancak aminoasit değişikliğine neden olmamaktadır. Diğer varyasyonlar intronik olmakla birlikte splice bölgelerinde bulunmamaktadır. Bu nedenlerle, bu

varyasyonların AFB1 kaynaklı H.K.'larda hepatokarsinogeneze katkısı olmadığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, iki hücre hattından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, toplam 117 gende AFB1 ile ilişkilendirilebilecek bir genetik değişiklik saptanmamıştır.

5.1. Çalışmanın Gelecek Planları

Bu proje sonucunda elde edilen veriler, yeni nesil teknolojilerin oldukça heterojen bir yapıya sahip olan karaciğer kanser genomunun doğasının belirlenmesinde yardımcı olabileceğine işaret etmektedir. Yeni nesil DNA analizinde saptanan varyasyonların ikinci bir yöntem ile doğrulanamamış olması, HybSelect protokolü uygulanan çalışmanın güvenilirliğinin sorgulanmasına neden olmaktadır. Bu çalışma ile hedeflenen sonuç, teknik nedenlerle elde edilemediğinden, bu çalışmanın incelenen gen paneli genişletilerek 500 kanser geni için farklı bir laboratuarda analiz edilmesi planlanmaktadır.

Hepatosellüler karsinomalarda özellikle CGH mikrodizini ve LOH çalışmaları ile kromozomal aberasyonlar incelenmiştir (14). Aflatoksin B1 kaynaklı H.K.'lardaki yeni genetik değişikliklerin tanımlanabilmesi için, öncelikle karşılaştırmalı genom dizilemelerinde H.K. tümörlerinde tekrarlayan mutasyonlar bildirilmiş yeni genlerin (99, 101) çalışılması uygun olacaktır. Bu genler arasında, *ERRF1* ve *IRF2* genleri sırasıyla 1p ve 4q kromozom kollarında bulunmaları açısından oldukça önemlidir, çünkü LOH çalışmalarında kayıplar saptanan 1p, 4q, 8p ve 16q kollarında henüz tümör baskılayıcı gen saptanmamıştır (67).

Ayrıca, her iki hücre hattında da saptanan *XPC* genindeki Gln939Lys varyasyonu (Tablo 5) için Türk populasyonunda tarama yapılarak AFB1 maruziyeti durumunda, H.K. gelişme riski belirlenebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: From genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(9):674-687.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). Aflatoxins. In: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 56; 1992 June 9-16; Lyon, France. IARC Press: UK; 1993. p.245-395.
3. International Agency for Research on Cancer (IARC). Aflatoxins. In: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 82; 2002 Feb 12-19; Lyon, France. IARC Press: Lyon, France; 2002. p.171-300.
4. Wild CP, Montesano R. A model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Lett* 2009; 286(1):22-28.
5. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; 350:429-431.
6. Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991; 338(8779):1356-1359.
7. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, Tsutsumi S, Sonoda K, Totsuka H, Shirakihara T, Sakamoto H, Wang L, Ojima H, Shimada K, Kosuge T, Okusaka T, Kato K, Kusuda J, Yoshida T, Aburatani H, Shibata T. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* 2011; 43(5):464-469.
8. Li M, Zhao H, Zhang X, Wood LD, Anders RA, Choti MA, Pawlik TM, Daniel HD, Kannangai R, Offerhaus GJ, Velculescu VE, Wang L, Zhou S, Vogelstein B, Hruban RH, Papadopoulos N, Cai J, Torbenson MS, Kinzler KW. Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2011; 43(9):828-829.
9. Zhao H, Wang J, Han Y, Huang Z, Ying J, Bi X, Zhao J, Fang Y, Zhou H, Zhou J, Li Z, Zhang Y, Yang X, Yan T, Wang L, Torbenson MS, Cai J. ARID2: A new tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2011; 2(11):886-891.

10. Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:448-458.
11. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132(7):2557-2576.
12. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(8):1893-1907.
13. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275(4):2247-2250.
14. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31(4):339-346.
15. Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010; 29(16):2309-2324.
16. Schöniger-Hekele M, Müller C, Kutilek M, Oesterreicher C, Ferenci P, Gangl A. Hepatocellular carcinoma in Central Europe: Prognostic features and survival. *Gut* 2001; 48(1):103-109.
17. Yang T, Zhang J, Lu JH, Yang LQ, Yang GS, Wu MC, Yu WF. A new staging system for resectable hepatocellular carcinoma: Comparison with six existing staging systems in a large Chinese cohort. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(5):739-750.
18. op den Winkel M, Nagel D, Sappl J, op den Winkel P, Lamerz R, Zech CJ, Straub G, Nickel T, Rentsch M, Stieber P, Göke B, Kolligs FT. Prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. Validation and ranking of established staging-systems in a large western HCC-cohort. *PLoS One* 2012; 7(10):e45066.
19. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(3):2159-229.
20. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45(4):529-538.
21. Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 75(3):347-354.
22. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002; 155(4):323-331.

23. Marra M, Sordelli IM, Lombardi A, Lamberti M, Tarantino L, Giudice A, Stiuso P, Abbruzzese A, Sperlongano R, Accardo M, Agresti M, Caraglia M, Sperlongano P. Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: An overview. *J Transl Med* 2011; 9:171.
24. Bouchard MJ, Navas-Martin S. Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: Lessons learned and future challenges. *Cancer Lett* 2011; 305(2):123-143.
25. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(1):51-68.
26. Leenders MW, Nijkamp MW, Borel Rinkes IH. Mouse models in liver cancer research: A review of current literature. *World J Gastroenterol* 2008; 14(45):6915-6923.
27. Guerrero RB, Roberts LR. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42(5):760-777.
28. Feitelson MA, Reis HM, Tufan NL, Sun B, Pan J, Lian Z. Putative roles of hepatitis B x antigen in the pathogenesis of chronic liver disease. *Cancer Lett* 2009; 286(1):69-79.
29. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Br  chot C, Paterlini Br  chot P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* 2005; 54(8):1162-1168.
30. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005; 436(7053):933-938.
31. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997; 78:1527-1531.
32. Irshad M, Dhar I. Hepatitis C virus core protein: An update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract* 2006; 15(6):405-416.
33. McKillop IH, Moran DM, Jin X, Koniaris LG. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res* 2006; 136(1):125-135.
34. Purohit V, Rapaka R, Kwon OS, Song BJ. Roles of alcohol and tobacco exposure in the development of hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 2013; 92(1):3-9.
35. McKillop IH, Schrum LW. Role of alcohol in liver carcinogenesis. *Semin Liver Dis* 2009; 29(2):222-232 [Electronic Journal]
<http://www.medscape.com/viewarticle/705411>.
36. McKillop IH, Schrum LW. Alcohol and liver cancer. *Alcohol* 2005; 35(3):195-203.
37. Wild CP, Turner PC. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 2002; 17(6):471-481.

38. Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): From mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2001; 22(4):535-545.
39. Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(18): 8586–8590.
40. Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res* 1991; 51(22):6185-6189.
41. Gouas D, Shi H, Hainaut P. The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): Biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Lett* 2009; 286(1):29-37.
42. Reed CA, Mayhew CN, McClendon AK, Yang X, Witkiewicz A, Knudsen ES. RB has a critical role in mediating the in vivo checkpoint response, mitigating secondary DNA damage and suppressing liver tumorigenesis initiated by aflatoxin B1. *Oncogene* 2009; 28(50):4434-4443.
43. Gouas DA, Shi H, Hautefeuille AH, Ortiz-Cuaran SL, Legros PC, Szymanska KJ, Galy O, Egevad LA, Abedi-Ardekani B, Wiman KG, Hantz O, Caron de Fromentel C, Chemin IA, Hainaut PL. Effects of the TP53 p.R249S mutant on proliferation and clonogenic properties in human hepatocellular carcinoma cell lines: Interaction with hepatitis B virus X protein. *Carcinogenesis* 2010; 31(8):1475-1482.
44. Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE, Wogan GN, Groopman JD. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(1):3-10.
45. Kew MC. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int* 2003; 23(6):405-409.
46. Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 2007; 128(5):837-847.
47. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection. *Hepatology* 2010; 51(5):1820-1832.
48. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *J Hepatol* 2012; 56(6):1384-1391.

49. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348(17):1625-1638.
50. Wolk A, Gridley G, Svensson M, Nyrén O, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Adam HO. A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control* 2001;12(1):13-21.
51. Moller H, Mellempgaard A, Lindvig K, Olsen JH. Obesity and cancer risk: A Danish record-linkage study. *Eur J Cancer* 1994; 30A(3):344-350. In: El-Serag HB, Rudolph KL. *Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis*. *Gastroenterology* 2007; 132(7):2557-2576.
52. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126(2):460-468.
53. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: A systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(3):369-380.
54. Gao J, Xie L, Yang WS, Zhang W, Gao S, Wang J, Xiang YB. Risk factors of hepatocellular carcinoma - Current status and perspectives. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(3):743-752.
55. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(4):1103-1123.
56. Willis G, Bardsley V, Fellows IW, Lonsdale R, Wimperis JZ, Jennings BA. Hepatocellular carcinoma and the penetrance of HFE C282Y mutations: A cross sectional study. *BMC Gastroenterol* 2005; 5:17.
57. Cauza E, Peck-Radosavljevic M, Ulrich-Pur H, Datz C, Gschwantler M, Schöniger Hekele M, Hackl F, Polli C, Rasoul-Rockenschaub S, Müller C, Wrba F, Gangl A, Ferenci P. Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(2):442-447.
58. Fairbanks KD, Tavill AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: A review. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(8):2136-2141.
59. Tanguay RM, Jorquera R, Poudrier J, St-Louis M. Tyrosine and its catabolites: From disease to cancer. *Acta Biochim Pol* 1996; 43(1):209-216.
60. Sniderman King L, Trahms C, Scott CR. Tyrosinemia Type 1. 2006 Jul 24 [Updated 2011 Aug 25]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1515/>

61. Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16(29):3603-3615.
62. Kawai H, Suda T, Aoyagi Y, Isokawa O, Mita Y, Waguri N, Kuroiwa T, Igarashi M, Tsukada K, Mori S, Shimizu T, Suzuki Y, Abe Y, Takahashi T, Nomoto M, Asakura H. Quantitative evaluation of genomic instability as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma: Comparison of loss of heterozygosity and replication error. *Hepatology* 2000; 31(6):1246-1250.
63. Chang J, Kim NG, Piao Z, Park C, Park KS, Paik YK, Lee WJ, Kim BR, Kim H. Assessment of chromosomal losses and gains in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2002; 182(2):193-202.
64. Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48(6):2047-2063.
65. Nishida N, Goel A. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Curr Genomics* 2011; 12(2):130-137.
66. Kumar M, Zhao X, Wang XW. Molecular carcinogenesis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: One step closer to personalized medicine? *Cell Biosci* 2011; 1(1):5.
67. Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* 2006; 25(27):3778-3786.
68. Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(3):233-240.
69. Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S. p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52:6358-6364.
70. Ünsal H, Yakıcıer Mc, Marcais C, Kew M, Volkmann M, Zentgraf H, Isselbacher KJ, Ozturk M. Genetic Heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1994; 91:822-826.
71. Scorsone KA, Zhou YZ, Butel JS, Slagle BL. p53 mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. *Cancer Res* 1992; 52:1635-1638.
72. Kress S, Jahn UR, Buchmann A, Bannasch P, Schwarz M. p53 Mutations in human hepatocellular carcinomas from Germany. *Cancer Res* 1992; 52:3220-3223.
73. Hussain SP, Raja K, Amstad PA, Sawyer M, Trudel LJ, Wogan GN, Hofseth LJ, Shields PG, Billiar TR, Trautwein C, Hohler T, Galle PR, Phillips DH, Markin R, Marrogi AJ, Harris CC. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of

- wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(23):12770-12775.
74. Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: Insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 2007; 26(15):2166-2176.
 75. Jablkowski M, Bocian A, Bialkowska J, Bartkowiak J. A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24(1):117-125.
 76. Tannapfel A, Busse C, Weinans L, Benicke M, Katalinic A, Geissler F, Hauss J, Wittekind C. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2001; 20(48):7104-7109.
 77. Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T, Mayer RJ, Arai S, Fujita J. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med* 2000; 6(1):96-99.
 78. Farazi PA, Glickman J, Jiang S, Yu A, Rudolph KL, DePinho RA. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(16):5021-5027.
 79. Lin J, Hocker TL, Singh M, Tsao H. Genetics of melanoma predisposition. *The British Journal of Dermatology* 2008; 159(2):286-291 [Electronic Journal] <http://www.medscape.com/viewarticle/578548>.
 80. Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7):699-703.
 81. Azechi H, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Minata M, Katsuma H, Kuno M, Ito T, Komeda T, Kita R, Takahashi R, Nakao K. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology* 2001; 60(4):346-354.
 82. Matsuda Y, Ichida T. p16 and p27 are functionally correlated during the progress of hepatocarcinogenesis. *Med Mol Morphol* 2006; 39(4):169-175.
 83. Monga SP. Role of Wnt/ β -catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43(7):1021-1029.
 84. Gougelet A, Colnot S. A Complex Interplay between Wnt/ β -Catenin Signalling and the Cell Cycle in the Adult Liver. *Int J Hepatol* 2012; 2012:816125.
 85. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(15):8847-8851.

86. Chan DW, Chan CY, Yam JW, Ching YP, Ng IO. Prickle-1 negatively regulates Wnt/beta-catenin pathway by promoting Dishevelled ubiquitination/degradation in liver cancer. *Gastroenterology* 2006; 131(4):1218-1227.
87. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41(4):263-272.
88. Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(9):2078-2093.
89. Giannelli G, Mazzocca A, Fransvea E, Lahn M, Antonaci S. Inhibiting TGF- β signaling in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1815(2):214-223.
90. Perrot CY, Javelaud D, Mauviel A. Overlapping activities of TGF- β and Hedgehog signaling in cancer: Therapeutic targets for cancer treatment. *Pharmacol Ther* 2013; 137(2):183-199.
91. Yalciner MC, Irmak MB, Romano A, Kew M, Ozturk M. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999; 18(34):4879-4883.
92. Shirai Y, Kawata S, Tamura S, Ito N, Tsushima H, Takaishi K, Kiso S, Matsuzawa Y. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. *Cancer* 1994; 73(9):2275-2279.
93. Meguro M, Mizuguchi T, Kawamoto M, Hirata K. The molecular pathogenesis and clinical implications of hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol* 2011; 2011:818672.
94. Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48(4):1312-1327.
95. Kudo M. Signaling pathway/molecular targets and new targeted agents under development in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2012; 18(42):6005-6017.
96. Guégan JP, Frémin C, Baffet G. The MAPK MEK1/2-ERK1/2 pathway and its implication in hepatocyte cell cycle control. *Int J Hepatol* 2012; 2012:328372.
97. Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L, Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)* 2011; 3(3):192-222.
98. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 8):1281-1283.

99. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Letexier M, Degos F, Clément B, Balabaud C, Chevet E, Laurent A, Couchy G, Letouzé E, Calvo F, Zucman-Rossi J. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012; 44(6):694-698.
100. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono N, Kubo M, Miya F, Arai Y, Takahashi H, Shirakihara T, Nagasaki M, Shibuya T, Nakano K, Watanabe-Makino K, Tanaka H, Nakamura H, Kusuda J, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Ueno M, Shigekawa Y, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Gotoh K, Ishikawa O, Ariizumi S, Yamamoto M, Yamada T, Chayama K, Kosuge T, Yamaue H, Kamatani N, Miyano S, Nakagama H, Nakamura Y, Tsunoda T, Shibata T, Nakagawa H. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet* 2012; 44(7):760-764.
101. Nakagawa H, Shibata T. Comprehensive genome sequencing of the liver cancer genome. *Cancer Lett* 2012 Nov 8. pii: S0304-3835(12)00640-4.
102. Herceg Z, Vaissière T. Epigenetic mechanisms and cancer: An interface between the environment and the genome. *Epigenetics* 2011; 6(7):804-819.
103. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18(5):869-882.
104. Wei-ren L, Ying-hong S, Yuan-fei P, Jia F. Epigenetics of hepatocellular carcinoma: A new horizon. *Chin Med J* 2012; 125(13):2349-2360.
105. Sceusi EL, Loose DS, Wray CJ. Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 2011; 13(6):369-376.
106. Katayama Y, Maeda M, Miyaguchi K, Nemoto S, Yasen M, Tanaka S, Mizushima H, Fukuoka Y, Arai S, Tanaka H. Identification of pathogenesis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma by expression profiling. *Oncol Lett* 2012; 4(4):817-823.
107. Gramantieri L, Fornari F, Callegari E, Sabbioni S, Lanza G, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* 2008; 12(6A):2189-2204.
108. Gomaa AI, Khan SA, Leen EL, Waked I, Taylor-Robinson SD. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15(11):1301-1314.
109. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008; 134(6):1752-1763.

110. Marrero JA, Kudo M, Bronowicki JP. The challenge of prognosis and staging for hepatocellular carcinoma. *Oncologist* 2010; 15 Suppl 4:23-33.
111. França AV, Elias Junior J, Lima BL, Martinelli AL, Carrilho FJ. Diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(11):1689-1705.
112. Villanueva A, Toffanin S, Llovet JM. Linking molecular classification of hepatocellular carcinoma and personalized medicine: preliminary steps. *Curr Opin Oncol* 2008; 20(4):444-453.
113. Acun T, Terzioğlu-Kara E, Konu O, Ozturk M, Yakicier MC. Mdm2 Snp309 G allele displays high frequency and inverse correlation with somatic p53 mutations in hepatocellular carcinoma. *Mutat Res* 2010; 684(1-2):106-108.
114. Lose F, Arnold J, Young DB, Brown CJ, Mann GJ, Pupo GM, The Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer, Khanna KK, Chenevix-Trench G, Spurdle AB. BcoR-L1 variation and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007; 9:R54.
115. Buckingham L, Flaws ML. Nucleic Acid Amplification. In: *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*. Buckingham L, Flaws ML, eds. Philadelphia, F. A. Davis Company: 2007, pp.121-154.
116. Buckingham L. DNA Sequencing. In: *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*. Buckingham L, Flaws ML, eds. Philadelphia, F. A. Davis Company: 2007, pp.203-224.
117. Dnastar Inc., Lasergene Seqman II, versiyon 5.08, Madison, ABD. 2005.
118. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
119. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes Cancer* 2011; 2(4):466-474.
120. Pfeifer GP, Besaratinia A. Mutational spectra of human cancer. *Hum Genet* 2009; 125(5-6):493-506.
121. Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G-->T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 2001; 22(3):367-374.
122. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(22):10124-10128.

123. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27(1):55-76.
124. Long XD, Ma Y, Zhou YF, Ma AM, Fu GH. Polymorphism in xeroderma pigmentosum complementation group C codon 939 and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma in the Guangxi population. *Hepatology* 2010; 52(4):1301-1309.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şirin	Soyadı	Yüksel
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	13. 03. 1980
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	52468128208
E-mail	sirinyuksel@gmail.com	Tel	05324433564

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Boğaziçi Üniversitesi	2003
Lise	Özel Üsküdar Amerikan Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Moleküler Biyolog	Acıbadem Sağlık Grubu	2003 -
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı (Mayıs 2010)	72.274	68.347	62.724
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
DNASTAR	Çok iyi
İnternet uygulamaları	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

ULUSLARARASI ve ULUSAL YAYINLAR / BİLDİRİLER

Yüksel Ş, Taylan F, Yenmiş G, Özciğer D, Çınar D, Altıok E (2009) *Sözlü sunum* - Osteogenezis İmpfekta hastalığından sorumlu yeni mutasyonların tanımlanması ve koruyucu genetik tanıları. 5. *Ulusal Tıbbi Genetik Sempozyumu (Endokrin Hastalıklar ve Genetik)*.

Yüksel Ş, Taylan F, Yenmiş G, Özciğer D, Çınar D, Altıok E (2009) *Poster sunumu* - Importance of External Quality Control Management in Molecular Hematology. 35. *Ulusal Hematoloji Kongresi*.

Yenmiş G, Yüksel Ş, Taylan F, Özciğer D, Çınar D, Altıok E (2009) *Poster sunumu* - Differences in prevalence of JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. 35. *Ulusal Hematoloji Kongresi*.

Unalp A, Altıok E, Uran N, Oztürk A, Yüksel Ş. Novel mutation of aspartoacylase gene in a Turkish patient with Canavan disease. *J Trop Pediatr* 2008; 54(3):208-210.

Yüksel Ş, Taylan F, Ünsal İ, Altıok E (2006) *Poster sunumu* - Rapid testing of embryo, CVS and amniotic fluid samples for beta thalassemia mutations by real time PCR and melting curve analysis. *European Human Genetics Conference*.

Taylan F, Yüksel Ş, Altıok E (2005) *Poster sunumu* - HLA match test by real time PCR in buccal cheek swabs increase the feasibility for reaching higher number of donors. *European Human Genetics Conference*.

Yüksel Ş, Taylan F, Ünsal İ, Altıok E (2005) *Poster sunumu* - Rapid prenatal testing of beta thalassemia mutations by real time fluorescent PCR and melting curve analysis. 30. *Ulusal Hematoloji Kongresi*.

Taylan F, Yüksel Ş, Ünsal İ, Altıok E (2005) *Poster sunumu* - Rapid HLA match testing by real time fluorescent PCR and melting curve analysis from buccal cheek swabs may increase the number of available donors. 30. *Ulusal Hematoloji Kongresi*.

Altıok E, Taylan F, Yüksel Ş, Demirel C, Dönmez E, Bahçeci M, Tuncer M, Okur H, Ünsal İ, Demirköser G (2005) *Poster sunumu* - Genetic selection of HLA compatible and disease free embryos for hematopoietic stem cell transplantations. 30. *Ulusal Hematoloji Kongresi*.

KATILDIĞI EĞİTİMLER / SERTİFİKALAR

- Special Lectures on Proteomics, Erasmus Workshop for Graduate Students, İstanbul (2012)
- New Technologies in Clinical Proteomics, Basic Course for Graduate Students, Andrea Henze – Potsdam University (2012)
- 5. Ulusal Tıbbi Genetik Sempozyumu (Endokrin Hastalıklar ve Genetik), Abant (2009)
- XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Bodrum (2009)
- Lightcycler 480 kullanıcı eğitimi, Mehmet Demirci – Roche Diyagnostik (2007)
- Magna Pure LC kullanıcı eğitimi, Mehmet Demirci – Roche Diyagnostik (2007)
- “cGMP” de steril uygulamalar” eğitimi, Dilek Sunar – Academia Life Sciences Center (2007)
- “cGMP” eğitimi, Dilek Sunar - Academia Life Sciences Center (2006)
- European Human Genetics Conference, Amsterdam (2006)
- “ISO 9001:2000 İç Tetkikçi” sertifikası, Nihan Karaçam – Acıbadem İnsan Kaynakları Departmanı (2006)
- 30. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul (2005)
- IV. HLA Sistemi ve Transplantasyon İmmünoloji Sempozyumu, Ankara (2004)

BİLİMSEL KURULUŞ ve DERNEKLERE ÜYELİKLER

Proteomik Derneği (Türkiye)