BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

BÖBREK VE ÜRİNER SİSTEM KONJENİTAL ANOMALİSİ (CAKUT) TANISI ALAN HASTALARDA *BCL-2* GENİ (rs2279115 ve rs4987856) ve *LIF* GENİ (rs929271) POLİMORFİZMLERİNİN SIKLIKLARININ BELİRLENMESİ

HAZIRLAYAN

TUĞÇE ÖZTEPE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA - 2021

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

BÖBREK VE ÜRİNER SİSTEM KONJENİTAL ANOMALİSİ (CAKUT) TANISI ALAN HASTALARDA *BCL-2* GENİ (rs2279115 ve rs4987856) ve *LIF* GENİ (rs929271) POLİMORFİZMLERİNİN SIKLIKLARININ BELİRLENMESİ

HAZIRLAYAN

TUĞÇE ÖZTEPE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. YUNUS KASIM TERZİ

ANKARA- 2021

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Tuğçe Öztepe tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/07/2021

Tez Adı: Böbrek ve Üriner Sistem Konjenital Anomalisi (CAKUT) Tanısı Alan Hastalarda *BCL-2* Geni (rs2279115 ve rs4987856) Ve *LIF* Geni (rs929271) Polimorfizmlerinin Sıklıklarının Belirlenmesi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu) **İmza**

ONAY

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORİJİNALLİK RAPORU

Tarih: 06 / 07 / 2021

Öğrencinin Adı, Soyadı: Tuğçe Öztepe

Öğrencinin Numarası: 21910236

Anabilim Dalı: Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Programı: Tıbbi Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. Yunus Kasım Terzi

Tez Başlığı: Böbrek ve Üriner Sistem Konjenital Anomalisi (CAKUT) Tanısı Alan Hastalarda *BCL-2* Geni (rs2279115 ve rs4987856) ve *LIF* Geni (rs929271) Polimorfizmlerinin Sıklıklarının Belirlenmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 78 sayfalık kısmına ilişkin, 06 / 07 / 2021 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3'dür. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç

2. Alıntılar hariç

3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

ONAY

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bana destek, yol gösterici olan, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve mesleki tecrübelerini sabırla aktaran, her zaman beni çalışmaya teşvik eden ve değerli zamanını bana ayıran tez danışmanım saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Yunus Kasım TERZİ'ye,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana vizyon katan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen iyi ki tanıştım dediğim değerli hocalarım Prof. Dr. Zerrin YILMAZ ÇELİK'e ve Prof. Dr. Feride İffet ŞAHİN'e,

Çalışmalarımın uygulama aşamasında danıştığım konularda sabırla ellerinden geleni yapan ve tez çalışmamın tamamlanabilmesi bana destek olup yol gösteren başta Mert POLAT ve Selin AKAD DİNÇER olmak üzere tüm Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına,

Eğitim sürecim boyunca tez çalışmamın tamamlanabilmesi için gerekli ortamı sağlayan, olumlu düşünceleri ve hayat enerjisiyle destek olan değerli ağabeyim Serkan BAKIR'a,

Tezimin istatistiksel analiz aşamasında bana yardımcı olan Öğretim Görevlisi Gözde KUBAT'a,

Maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman güvenen çok sevdiğim anneciğim Sibel ÖZTEPE'ye ve canım babacığım Erol ÖZTEPE'ye ve sevgili ağabeyim Baki Can ÖZTEPE'ye ve canım teyzem Derya DİLEK VAROL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Öztepe T. Böbrek ve Üriner Sistem Konjenital Anomalisi (CAKUT) Tanısı Alan Hastalarda *BCL-2* Geni (rs2279115 ve rs4987856) ve *LIF* Geni (rs929271) Polimorfizmlerinin Sıklıklarının Belirlenmesi. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021.

Böbrek ve idrar yolunun konjenital anomalileri (CAKUT), antenatal olarak teşhis edilen tüm fetal anomalilerin %20-50'sini temsil eden, en sık tanımlanan malformasyonlardır. CAKUT, böbrek, toplayıcı sistem, mesane ve üretranın yapısal ve fonksiyonel anormallikleriyle karakterizedir. CAKUT, böbrek agenezisi, böbrek displazisi, hidronefroz, hidroüreter ve vezikoüreteral reflü gibi idrar yolu morfogenezindeki bozukluklardan kaynaklanan malformasyonları kapsar. Son yıllarda, 50'den fazla gendeki değişikliklerin CAKUT'a neden olduğu gösterilmiştir. Ancak bu genlerdeki mutasyonlar, CAKUT vakalarının sadece %10-20'sini açıklamaktadır. Bu veriler CAKUT'ta genetik heterojenite görüldüğünü göstermektedir.

Bir düzenleyici protein olan *BCL-2* (B hücreli lenfoma 2), insanlarda *BCL-2* geni tarafından kodlanır. BCL-2 protein ailesi, apoptozun düzenlenmesinde etkin rol alır. *BCL-2*'nin kendisi, farklı tümör tiplerinde hem bir onkogen hem de bir tümör baskılayıcı gen olarak hareket eder. Bu nedenle bu gen kanser gelişimi, immün yanıt ve erken embriyonik gelişim gibi çok farklı mekanizmalarda görev alır. *BCL-2*'nin hücre ölümünü engellediğinden birçok çalışmada bahsedilmiştir. Bu çalışmalar, BCL-2 proteininin CAKUT ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Lösemi inhibitor faktörü (*LIF*), hücre büyümesi ve hücre farklılaşmasını inhibe ederek etkisini gösteren interlökin-6 sınıfı (IL-6) bir sitokindir. *LIF*, blastokist büyümesi ve gelişimi, implantasyon için uterus hazırlığı gibi süreçlere aracılık eder. *LIF*, endometriyumun epitel hücrelerinde ifadelenir ve döllenmeden sonraki ilk günlerdeki *LIF* ifadelenmesi, blastokist implantasyonu için uygun ortam oluşturulmasında rol oynar. *LIF* geni, MAPK, PI3K, JAK/STAT gibi çeşitli sinyal yolağında rol alan önemli bir gendir. Böbrek gelişiminde JAK/STAT sinyal yolağı önemli bir rol oynamaktadır. *LIF* geninin JAK/STAT, MAPK, PI3K gibi sinyal yolaklarında görev alması, bu genin CAKUT ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışma kapsamında, *BCL-2* geni 5' kodlanmayan bölgesinde (UTR) bulunan rs2279115, 3' UTR'de bulunan rs4987856 ve *LIF* geni 3' UTR'de bulunan rs929271 tek nükleotit polimorfizmlerinin (SNP) CAKUT tanısı alan hastalardaki görülme sıklıkları araştırıldı. rs2279115 ve rs929271 SNP'leri PZR-RFLP, rs4987856 ise PZR-SNaPshot yöntemi ile çalışıldı. Proje kapsamında 0-18 yaş arası 129 CAKUT tanılı hasta ve 105 kontrol örneği kullanıldı. İstatistiksel analizler, incelenen polimorfizmlerin sıklıklarının, CAKUT tanısı alan hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğunu gösterdi. Çalışma sonucunda *BCL2* geni rs2279115 ve rs4987867 SNP'leri ve *LIF* geni rs929271 SNP'i için hasta grubunda bulunan mutant allel frekansları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,000). Ayrıca, yapılan ikili analizlerde *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde atasal allel G'nin A alleline dönüşmesi ve *LIF* geni rs929271 SNP'inde atasal allel T'nin G'ye dönüşmesinin hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı anlamlı bulunmuştur (p=0.034).

ANAHTAR KELİMELER: Konjenital böbrek ve üriner kanal anomalisi, CAKUT, BCL-2, LIF, rs2279115, rs929271, rs4987856

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA21/77) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

Oztepe T. Determination of the Frequency of *BCL-2* Gene (rs2279115 and rs4987856) and *LIF* Gene (rs929271) Polymorphisms in Patients with Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract Anomaly (CAKUT). Baskent University Institute of Health Sciences, Medical Genetics Master's Thesis, Ankara, 2021.

Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) are the most frequently defined malformations representing 20-50% of all fetal anomalies diagnosed antenatally. CAKUT is characterized by structural and functional abnormalities of the kidney, collecting system, bladder, and urethra and includes structural malformations caused by disorders in urinary tract morphogenesis such as renal agenesis, renal dysplasia, hydronephrosis, hydroureter, and vesicoureteral reflux. Recently, more than 50 genes have been shown to cause CAKUT. However, mutations in these genes explain only 10-20% of CAKUT cases. These data show that there is genetic heterogeneity in CAKUT.

BCL-2 is encoded by the *BCL-2* gene. The BCL-2 family of proteins plays an active role in regulation of apoptosis. *BCL-2* itself acts as both an oncogene and a tumor suppressor gene in different tumor types. Therefore, this gene is involved in many different mechanisms such as cancer development, immune response, and early embryonic development. In addition, it has been shown that *BCL-2* prevents cell death.

Leukaemia inhibitory factor (*LIF*) is the interleukin-6 class (IL-6) cytokine that affects cell growth by inhibiting cell differentiation. *LIF* mediates processes such as blastocyst growth and development, and uterine preparation for implantation. Epithelial cells of the endometrium express *LIF* and this expression in the first days after fertilization creates a suitable environment for blastocyst implantation. Signaling via the JAK/STAT, MAPK pathways is important for the kidney's response to injury in disease. The fact that *LIF* gene plays a role in signaling pathways such as JAK / STAT, MAPK, PI3K suggests that this gene is related to CAKUT.

In this study, three different SNPs of *BCL-2* and the *LIF* genes were studied in patients with CAKUT. rs2279115 and rs4987856 SNPs in the *BCL-2* gene are located in the 5'UTR and 3'UTR, respectively. rs929271 is located in the 3'UTR of the *LIF* gene. rs2279115 and rs929271

were analyzed by PCR-RFLP, and rs4987856 was analyzed by PCR-SNaPshot method. A total of 129 CAKUT patients between 0-18 years old, and 105 control individuals were enrolled in the study. As a result of the study, the distribution of mutant allele frequencies in the patient group for the *BCL2* gene rs2279115 and rs4987867 and the *LIF* gene rs929271 were found to be statistically significant (p=0.000). In addition, cosegregation analysis showed A allele in the *BCL2* gene for rs4987856 and G allele in the *LIF* gene for rs929271 cosegregating together in the patient group significantly (p=0.034).

KEYWORDS: Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract, CAKUT, BCL-2, LIF, rs2279115, rs929271, rs 4987856

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project no:KA21/77) and supported by Baskent University Research Fund.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR……..……...…i

ÖZET…….ii

ABSTRACT…….....iv

İÇİNDEKİLER……....vi

TABLOLAR LİSTESİ……vii

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ……xi

1. GİRİŞ VE AMAÇ……...…1

2. GENEL BİLGİLER……...…4

2.1 Üriner Sistem Anatomisi……..…4

2.1.1. Böbrek……5

2.1.2. Üreter…….…..…5

2.1.3. Mesane……....…5

2.1.4. Üretra……..…5

2.2 Konjenital Böbrek ve Üriner Sistem Anomalisi……5

2.3. Nefrogenez ve CAKUT İlişkisi……...8

2.4. BCL2 Geninin Yapısı ve İşlevi……..…12

2.4.1. BCL2 Polimorfizmleri……...16

2.4.1.1. rs2279115 (c.-717C>A)……...……16

2.4.1.2. rs4987856 (c.*2364G>A) ……...…16

2.5. LIF Geninin Yapısı ve İşlevi……..…17

2.5.1. LIF geni polimorfizmleri……...…19

2.5.1.1. rs929271 (c.*1414T>G) ……..19

2.6. Polimorfizm……...19

2.6.1. SNP ve protein oluşumu üzerine etkileri……..……20

2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) …….……..…20

2.8. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ……22

2.9. Multiplex SNaPshot Yöntemi…….....…23

3. GEREÇ VE YÖNTEM……25

3.1. Etik Kurul Onayı……..25

3.2. Hasta Grubu……..25

3.3. Yöntem……...…...25

3.3.1. Kullanılan kimyasal malzemeler…….....…25

3.3.2. Kullanılan cihazlar……...……..…26

3.3.3. DNA örnekleri……27

3.3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ……..…..27

3.3.5. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) ……...…30

3.3.6. Jel elektroforez……...32

3.3.7. Multiplex SNaPshot yöntemi……34

3.3.8. İstatistiksel Analiz……..36

4. BULGULAR……37

5. TARTIŞMA…….…45

6. SONUÇ VE ÖNERİLER…….…51

KAYNAKLAR…….…....…52

EKLER

Ek-1: Hasta Bilgileri

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. CAKUT gelişimi ile ilişkili genler…….7

Tablo 2. İnsan böbreğinin gelişimde ve CAKUT oluşumunda rol oynayan genler……8

Tablo 3. *BCL2* ve *LIF* geninde bulan SNP'ler için kullanılan primer dizileri, amplikon uzunlukları ve Tm dereceleri…….27

Tablo 4. *BCL-2*'de bulunan rs2279115 ve rs4985856 ve *LIF* geninde bulunan rs929271 polimorfizmleri için uygulanan PZR reaksiyonlarının konsantrasyonları (içerikleri)……...28

Tablo 5. *BCL-2* geninde bulunan rs4987856 polimorfizmi için uygulanan program (c.*2364G>A) ……..28

Tablo 6. *BCL-2* geninde bulunan rs2279115 polimorfizmi için uygulanan program (-717C>A)…….……28

Tablo 7. *LIF* geninde bulunan rs929271 polimorfizmi için uygulanan program (c.*1414T>G)……....28

Tablo 8. RFLP yönteminde kullanılan enzimler, inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları…….….30

Tablo 9.*BCL2* geni rs2279115 ve *LIF* geni rs929271 polimorfizmlerinin RFLP reaksiyonu için kullanılan kimyasallar ve hacimleri……...31

Tablo 10. PZR ürünlerinin pürifikasyonları için kullanılan termal döngüleyici programı…….34

Tablo 11. Snapshot yöntemi için termal döngüleyici programı…….……34

Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımı (K: Kadın E: Erkek)…….36

Tablo 13. Genel hasta grubu ve kontrol grubu arasında hastalık görülme sıklığının yaşa ve tanı yaşına göre dağılımı……...36

Tablo 14. Hasta grubunun aldıkları tanılara göre gruplandırılması……37

Tablo 15. *BCL2* geni rs2279115 numaralı SNP'de saptanan genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı……..……38

Tablo 16. *BCL2* geni rs4987856 numaralı SNP'de saptanan genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı……..…38

Tablo 17. *LIF* geni rs929271 numaralı SNP'de saptanan genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı……..39

Tablo 18. *LIF* geni rs929271 SNP'i ve *BCL2* geni rs2279115 SNP'inde saptanan ikili genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı……..…40

Tablo 19. *LIF* geni rs929271 SNP'i ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde saptanan ikili genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı……..……40

Tablo 20. *BCL2* geni rs2279115 ve rs4987856 SNP'lerinde saptanan ikili genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı……..……41

Tablo 21. *BCL2* geni rs2279115 SNP'i, *BCL2* geni rs4987856 SNP'i ve *LIF* geni rs92927 SNP'inde saptanan üçlü genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı ……42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. Nefrogenezin 3 temel aşaması …..……..……..10

Şekil 2. *BCL2* geninin kromozomdaki yeri…….….13

Şekil 3. *BCL2* geninin yapısı…….13

Şekil 4. *BCL2* geninin homoloji (BH) alanlarının şematik gösterimi……14

Şekil 5. *BCL2* proteininin 3 boyutlu yapısı……14

Şekil 6. *BCL2* gen promotörünün şematik haritası……15

Şekil 7. Apoptoza yol açan intrinsik yol……16

Şekil 8. *LIF* geninin kromozomdaki yeri……..17

Şekil 9. *LIF* geninin yapısı……...…….17

Şekil 10. *LIF* proteininin yapısı, glikoprotein 130 ile kompleks oluşturmuş halde…….18

Şekil 11. JAK proteinlerinin aktivasyonunu içeren hücre içi sinyalleme kaskadları…….19

Şekil 12. Konum 8'deki tek nükleotit polimorfizmi (SNP)…….20

Şekil 13. PZR ilkesinin gösterimi……..22

Şekil 14. RFLP yönteminde jel elektroforezi görüntü örneği ve genotiplerin belirlenmesi..22

Şekil 15. Snapshot Yöntemi Prensibi…….……23

Şekil 16. *LIF* geni rs929271 (c.*1414T>G) polimorfizmi PZR ürünlerinin (433 bç) örnek jel elektroforezi görüntüleri.……28

Şekil 17. *BCL2* geni rs2279115 polimorfizmi (-717 C>A) PZR ürünlerinin (252 bç) örnek jel elektroforezi görüntüleri ……...…….…...29

Şekil 18. *BCL2* geni rs4987856 polimorfizmi (c.*2364G>A) PZR ürünlerinin (276 bç) örnek jel elektroforezi görüntüleri……29

Şekil 19. *LIF* geni rs929271 polimorfizmi RFLP analizi için kullanılan Hinf1 enziminin kesim paterni…….30

Şekil 20. *BCL2* geni rs2279115 polimorfizmi RFLP analizi için kullanılan Bcc1 enziminin kesim paterni…….30

Şekil 21. *Hinf1* restriksiyon endonükleaz enzimi ile fragmentlere ayrılan rs929271 polimorfizminin örnek görüntüsü…….32

Şekil 22. *Bcc1* restriksiyon endonükleaz enzimi ile fragmentlere ayrılan rs2279115 polimorfizminin örnek görüntüsü……...…...…33

Şekil 23. *BCL2* genindeki rs4987856 polimorfizmi için örnek SNaPshot yöntemi sonuçları……35

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

APAF-1	Apoptotik proteaz aktive eden faktör 1
BAD	BCL2 ile ilişkili hücre ölüm proteini
BAX	BCL bağlantılı protein
BCL2	B hücreli lenfoma 2
BÇ	Baz çifti
CAKUT	Böbrek ve Üriner Sistem Konjenital Anomalisi
CNV	Kopya sayısı varyasyonu
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ddNTP	dideoksinükleotit trifosfat
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr	Etidyum Bromür
ERK	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
Gp130	Glikoprotein 130
HCC	Hepatoselüler Karsinom
HCV	Hepatit Virüsü
IL	İnterlökin
JAK	Janus kinaz
LIF	Lösemi İnhibe Edici Faktör
MAPK	mitojenle etkileşen protein kinaz
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	Mikro RNA
OD	Otozomal Dominant
OR	Otozomal Resesif
PIK3/AKT	Fosfatidilinositol-3-kinaz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RET	rearranged during transfection
RFLP	Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit

RTK	Reseptör tirozin kinaz
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TBE	Tris, Borik asit, EDTA çözeltisi
TM	Erime Sıcaklığı
VUR	Veziko üreteral reflü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital böbrek ve üriner sistem anomalisi (CAKUT), böbrekleri ve idrar yollarını etkileyen malformasyonların tümünü kapsar ve böbrek, toplayıcı sistem, mesane ve üretranın yapısal ve fonksiyonel anormallikleriyle karakterizedir. CAKUT, bazı popülasyonlarda tüm fetal konjenital anomalilerin %20-50'sinde tanımlanmıştır, ancak nedenleri halen belirsizliğini korumaktadır (1). Her 1000 canlı doğumun 3-6'sını etkiler, çocukluktaki son evre böbrek hastalığının önde gelen nedenidir (yaklaşık %40) ve yetişkinlerde kronik böbrek hastalığının önemli bir sebebidir (2).

Son yıllarda, 50'den fazla gende meydana gelen değişikliklerin, otozomal dominant veya daha az sıklıkla resesif kalıtım modelinde izole veya sendromik CAKUT'a sebebiyet verdiği gösterilmiştir (2). Böbrek ve idrar yolunun konjenital anomalilerinin spektrumu son derece geniştir ve çift üreter veya minimal üreteral pelvik tıkanıklıklar gibi hafif, asemptomatik malformasyonlardan bilateral renal agenezi veya renal displazi gibi ciddi, yaşamı tehdit eden patolojilere kadar çeşitlilik gösterdiği için yüksek klinik heterojeniteye sahiptir (3). Yapısal böbrek anomalileri nefrogenezdeki kusurlardan kaynaklanabilir. İdrar yolu morfogenezinde gebelikten önce veya gebelik sırasında mevcut olan çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörlerin de yetersiz böbrek gelişiminde rol oynadığı varsayılmaktadır. Renal agenezinin çoğunun mezonefrik kanal indüksiyonunun olmamasından veya metanefrik mezenşim ile üreter tomurcuğu arasındaki etkileşim eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (4, 5).

Proapoptotik ve antiapoptotik proteinler, programlanmış hücre ölümünün kritik düzenleyicileridir. Bu proteinlerden biri B hücreli lenfoma 2 (*BCL2*) gen ailesi tarafından kodlanır. Organogenez sürecinde organlar kontrollü şekilde gelişirler. Bu yapıların yeniden şekillendirilmesi ve gereksiz hücrelerin ortadan kaldırılması için apoptoza ihtiyaç vardır. Canlının hayatı boyunca, yaralanma gibi durumlar da dâhil olmak üzere dokuların yeniden şekillendirilmesi ve yenilenmesi gerekir. Bu nedenle apoptoz, yaşam süresince canlının hayatının bir parçası olarak kalır. Apoptoz ve apoptotik yolun bileşenlerinin kontrolünde genetik ve çevresel faktörler rol almaktadır. Böbrek morfogenezinde de apoptoz önemli bir rol oynamakta ve normal böbrek gelişimi için iyi bir şekilde denetlenmesi gerekmektedir (6,7).

BCL-2 proteini, *BCL2* geni tarafından kodlanır ve bu proteinin programlanmış hücre ölümünü düzenlediği birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu bilgiler sayesinde, tümör oluşumunun sadece kontrolsüz hücre çoğalmasına bağlı olmadığı, ayrıca doğru şekilde düzenlenemeyen programlanmış hücre ölümü ile ilişkili olduğu da kanıtlanmıştır. Hem foliküler Hodgkin dışı lenfomada hem de diğer hematopoietik malignitelerde ve solid tümörlerde *BCL2* onkoproteini aşırı şekilde ifadelenmektedir (7, 8). Anti-apoptotik protein olan *BCL2*'yi kodlayan gende meydana gelen polimorfizmler, birçok hastalıkla ilişkilidir. Bu veriler böbrek gelişimi sırasında *BCL2*'de var olan fonksiyonel polimorfizmlerin CAKUT ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Lösemi inhibitör faktörü (*LIF*), birçok biyolojik süreçte aktif olarak görev alır. Bu biyolojik süreçler lösemi hücre farklılaşmasının uyarılması, kök hücrelerin kendini yenilemesi, embriyonun uterusa tutunması, kanser progresyonu olarak örneklendirilebilir (9). *LIF*, endometriyumdaki epitel hücrelerinde de ifadelenir. *LIF*'in epitel hücrelerinde döllenmeden sonraki ilk günlerde ifadelenmesi, blastokist implantasyonu için uygun ortamı oluşturması için gereklidir. Bunun dışında, blastokist büyümesi ve gelişimi, implantasyon için uterus hazırlığı gibi süreçlerde de bu gen aracılık eder (10, 11).

Yapılan birçok farklı çalışma sonucunda *LIF* geninin farklı hücre tipleri üzerinde farklı etkilere yol açtığı bilgisi ortaya çıkmıştır. JAK/STAT, MAPK, PI3K ve diğer sinyal yolaklarında etkili olan bu glikoproteinin hücre büyümesinin inhibisyonu ile ilişkili görevleri vardır. Birçok hastalık, bu yolaklarda meydana gelen düzensizlikler ile bağlantılıdır. *LIF* geninin yukarıda bahsedilen yolaklarda görev yapması bu genin CAKUT ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (10, 12).

Bu tez çalışmasında *BCL2*'nin promotör bölgesinde konumlanmış ve *BCL2*'nin ifadelenmesini bozan fonksiyonel rs2279115 tek nükleotit polimorfizmi (SNP), miR-195'in miRNA bağlanma bölgesini etkileyen rs4987856 tek nükleotit polimorfizmi ve *LIF* geninde 3' kodlanmayan bölgede (UTR) yer alan polimorfizmlerden biri olan rs929271, CAKUT tanısı alan hastalarda incelendi. Çalışma sonucunda hasta gruplarında *BCL2* geni rs2279115 SNP'inde atasal allel C'nin A'ya dönüşmesi, *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde atasal allel G'nin A'ya dönüşmesi ve *LIF* geni rs929271 SNP'inde atasal allel T'nin G'ye dönüşme sıklıklarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak derecede farklı olduğu bulunmuştur ($p=0.000$). Ayrıca, yapılan ikili analizlerde *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde A alleli ve *LIF* geni rs929271 SNP'inde G allelinin birlikte bulunma sıklığının hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0.034$).

Literatür taraması sonucunda *BCL2* geninde bulunan rs2279115, rs4987856 SNP'leri ve *LIF* genindeki rs929271 SNP'i ile CAKUT arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma bulunamamıştır. Çalışma sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında allel frekansları açısından anlamlı farklar bulunmuş olması bu genlerin CAKUT patogenezi ile ilişkisinin anlaşılması için yeni çalışmaların planlanmasına imkân sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Konjenital böbrek ve üriner sistem anomalisi (CAKUT), böbrek, toplayıcı sistem, mesane ve üretranın yapısal ve fonksiyonel anormallikleriyle karakterizedir. Bu hastalık böbrekleri ve idrar yollarının diğer yapılarını etkileyen malformasyonların tümünü kapsayan bir anormalliktir ve bazı popülasyonlarda tüm fetal anomalilerin %20-50'sinde tanımlanmıştır (1,2).

2.1. Üriner Sistem Anatomisi

Üriner sistem, böbrek ve idrar yolu olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Bu sistemde böbreklerin görevi kanı filtreleyerek metabolik atıkları uzaklaştırmak, vücudun homeostasını, organların ve kanın asit baz ve elektrolit dengesini korumaktır. Yapılan bu filtreleme işleminden sonra metabolik atıklar, su ve elektrolitten oluşan bir sıvı olan idrar oluşur. İdrar, üreter vasıtasıyla vücuttan uzaklaştırılır (13).

2.1.1. Böbrek

Böbrekler şekil açısından barbunya fasulyesine benzerler, arka karın duvarına karşı yerleşiktir ve periton zarlarının arka tarafında bulunurlar. Omurganın her iki yanında T12 ve L3 vertebra seviyelerinde yerleşiktir. Böbrekler adrenal bezle örtülüdür ve son kaburga çiftleri tarafından kısmen korunurlar. Böbreğin fonksiyonları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- ✓ Kanı filtreleyerek kandan metabolik atıkların uzaklaştırılması
- ✓ Kanda çözünen su, potasyum, sodyum ve kalsiyum gibi elektrolitleri muhafaza ederek veya uzaklaştırarak kandaki konsantrasyonlarını dengeleyip kanın ozmolaritesinin ayarlanması
- ✓ Bikarbonat ve hidrojen iyonlarının kandaki konsantrasyonunu ayarlayarak kanın pH'sının stabil tutulması
- ✓ Kan hacminin ve sistemik kan basıncının kontrolü
- ✓ Eritropoetin hormonu salgılayarak kemik iliğinin eritrosit üretiminin kontrol edilmesi
- ✓ D vitamini aktivasyonu, glukoneogenez ile yeni glikoz yapımı ve kanın detoksifikasyonu (13, 14)

2.1.2. Üreter

Üreterler, yetişkin bir bireyde 25 ile 30 cm arasında değişen uzunlukta ve 3-4 mm çapındadır. Üreterin görevi, böbreklerde yapılan filtreleme işleminden sonra vücut tarafından üretilen ve metabolik atıkları taşıyan idrarı, böbreklerden mesaneye taşımaktır. Üreterde bulunan 3 adet kas tabakası peristaltik hareketlerle üreterin idrarı böbreklerden mesaneye taşınmasını sağlar (13, 15).

2.1.3. Mesane

Mesane (idrar kesesi), idrarın depolanmasını sağlayan içi boş, boşaldığında büzüşen, içi dolduğunda ise esneyen bir organdır. Mesane pelvik boşluğun tabanına oturur. Erkeklerde yaklaşık 700-800 ml idrar depolayabilirken, bu hacim kadınlarda uterus pozisyonundan dolayı daha düşüktür. Mesanede de üreterlerde olduğu gibi 3 tabaka vardır.

Mesanenin tabanında pürüzsüz görünümlü trigon adı verilen üçgen bir alan mevcuttur. Trigonun iki arka köşesi üreterin açıklıkları ile üst üste gelirken, trigonun diğer köşesi ise üretranın başlangıcındadır (13).

2.1.4. Üretra

Üretra, idrarın mesaneden boşalıp vücuttan atılması esnasında geçtiği yoldur. İdrar yolunun geri kalanı gibi üretra da 3 adet tabakadan oluşur. Üretra, internal üretral sfinkter ile çevrili olan mesanedeki internal üretral açıklık ile başlar. Bu sfinkter, idrarını eliminasyonu esnasında gevşeyip idrarın vücuttan atılmasını sağlar (13).

Üretra, kadınlarda ve erkeklerde farklı yapılarda bulunur. Bu yapısal farklılık beraberinde fonksiyonel farklılıkları da getirir. Kadın üretra yaklaşık 4 cm uzunluğunda ve yalnızca idrarın vücuttan atılmasını sağlarken, erkek üretra 20 cm uzunluğunda ve hem idrarı vücuttan uzaklaştırır hem de spermi vücuttan dışarı taşınmasını sağlar (13).

2.2. Konjenital Böbrek ve Üriner Sistem Anomalisi (CAKUT)

CAKUT, doğumsal olarak böbreğin yapısal ve fonksiyonel malformasyonlarını kapsar. Bu anomaliler;

Üreter Duplikasyonu: Komplet ya da inkomplet olabilir. İki ayrı pyelokalisiyal sistem var olması durumunda ve bu iki sistem üreteropelvik bileşkede (UPJ) birleşirse veya proksimal tarafta iki ayrı üreter varsa ve bu iki üreter UPJ'nin altında herhangi bir noktada birleşirse inkomplet duplikasyon olarak adlandırılır. Eğer iki ayrı üreter mesaneye birleşmeden girerse

bu duruma ise komplet duplikasyon adı verilir. Yetişkin bireylerde vakaların çoğu asemptomatik olmakla birlikte, çocuklarda böbrek inflamasyonu gelişme riski 20 kat fazladır (3).

Üreteropelvik Bileşke Obstrüksiyonu (UPJ Darlığı): UPJ darlığı, idrar akışı empedansını etkiler, bozuk drenaj neticesinde kalyektazi ve hidronefroz görülür. Bu sonuçlar böbrek fonksiyonlarının kaybedilmesine neden olur (3,16).

At Nalı Böbrek / Renal Füzyon: Bu malformasyon erkeklerde 2 kat daha fazla görülür ve normal böbreğe göre daha alçak pozisyonlarda konumlanır. Bazı durumlar, UPJ obstrüksiyonu ile bağlantılıdır (3).

Renal Agenezi: Bilateral renal agenezi yaşamla bağdaşmaz, nadir görülen bir anomalidir ve doğumdan itibaren birkaç saat içinde ölüm gerçekleşir. Unilateral renal agenezi ise başarısız embryonik böbrek oluşumundan dolayı gerçekleşir (17, 18).

Renal Displazi: Böbreğin ileri safhalardaki gelişimi esnasında böbreklerin parankiminde doğru şekilde farklılaşma gerçekleştirememesi ve bozuk dokuların oluşması sonucunda gelişir (19).

Renal Hipoplazi: Normal morfolojide, ancak anormal derece küçük ve normalden az nefrona sahip böbrekler olarak tanımlanır (20).

Hidronefroz: Böbreğin genişlemesi ve şişmesidir (21).

Vezikoüreteral Reflü (VUR): İdrarın mesaneden üst idrar yoluna geri akışıdır. Sebebi genellikle genetiktir, sonuçları asemptomatik ya da şiddetli nefropatiler olabilir. VUR neden olduğu idrar yolu enfeksiyonu ile tehlikeli hale gelir. Ayrıca, böbrek yetmezliği için de önemli bir nedendir (22).

Konjenital böbrek anomalisi (CAKUT), böbrek, üreter, mesane ve üretrada yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olan ve yaşamı tehdit eden doğumsal bir rahatsızlıktır. Her 1000 canlı doğumda 3 ile 6 arasında görülen bu hastalığın prevalansı göreceli olarak yüksektir (2).

Normal nefrogenezin bozulmasına, maternal diyabet, ACE reseptörlerine maruz kalmak gibi çevresel ve genetik faktörler CAKUT patogenezinin nedenleri arasındadır. Bu hastalığın genetik nedenlerinin aydınlatılmasında aynı ailenin farklı üyelerinde rastlanan mutasyonlar ile böbrek ve idrar yolları malformasyonlarının ilişkilendirilmesi etkili olmuştur.

Hastalığın birçok kuşakta gözlenmesi ve bireylerde azalmış penetrasyon görülmesi hastalığın multifaktöriyel veya dominant kalıtım ile aktarılan formları olduğu düşündürmektedir. Ancak, bunun dışında sporadik CAKUT hastalarının da görülmesi mutasyonların *de novo* olduğunu da akla getirmiştir. Bu sayede yüksek klinik heterojeniteye sahip olan bu hastalığın çoğu fenotipi *de novo* mutasyonlarla açıklanmıştır (5).

Günümüzde 50'den fazla gende meydana gelen mutasyonların otozomal dominant ya da resesif kalıtım ile izole veya sendromik CAKUT ile doğruda ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak bu genler, vakaların sadece %10-20'sini açıklayabilmektedir (2). Bu hastalığın patogenezinde rol alan genlerin listesi Tablo-1'de verilmiştir.

Tablo 1. CAKUT gelişimi ile ilişkili genler.

X'e Bağlı Kalıtım	
GEN	**HASTALIK**
KAL1	VUR
GPC-3	Medüller kistik displazi
Otozomal Resesif Kalıtım	
GEN	**HASTALIK**
RET	Bilateral böbrek hipodisplazisi, böbrek agenezisi, VUR, üreteral obstrüksiyon, megaureter, dubleks böbrek, böbrek anormallikleri ve Hirschsprung hastalığı
FGF20	Renal hipodisplazi
AGT	Renal tübüler disgenezi
REN	Renal tübüler disgenezi
ACE	Renal tübüler disgenezi
AGTR1	Renal tübüler disgenezi
PKHD1	Otozomal resesif polikistik böbrek hastalığı ve polikistik böbrek
FRAS1	Agenezi, kistik displazi, hipoplazi, hidronefroz
FREM1	Agenezi, kistik displazi, hipoplazi, hidronefroz
PEX	Kistik diplazi, hidronefroz
DHCR7	UP darlık, hidronefroz, VUR
HSPG2	Hidronefroz
ESCO2	Agenezi, hipodisplazi, hidronefroz
Otozomal Dominant Kalıtım	
GEN	**HASTALIK**
PAX2	Renal bozukluklar (oligomeganephrınia, hypodysplasia, VUR ve kistler)
EYA1	Brankio-Oto Sendromu
SALL1	Townes-Brocks Sendromu, Brakio-Oto Renal Sendromu
SIX1	Brankio- Oto Sendromu, Brakio-Oto Renal Sendromu
BMP4	Sendromik mikroftalmi, orofasiyal yarık
GATA3	Hipoparatiroidizm, böbrek displazisi.
WNT4	Müllerian aplazi, hiperrandrojenizm

HNF1B	Böbrek kistleri ve diyabet sendromu, böbrek hipodisplazisi, multikistik displastik böbrek, kistik böbrek hastalığı, tek böbrek, oligomeganetoni
HOXA13	VUR
NIPBL	VUR, Cornelia de Lange sendromu
PBX1	Böbrek ve idrar yollarının konjenital anomalileri birlikte veya harici işitme kaybı, anormal kulaklar veya gelişimsel gecikme
CHD7	CHARGE sendromu, agenezi, hipodisplazi, hidronefroz
DSTYK	Böbrek ve idrar yollarının konjenital anomalileri
JAG1	Agenezi, hipoplazi, kistikdisplazi, VUR
WT1	Tümör, nefromegali
Kalıtım Tipi Bilinmiyor	
GEN	**HASTALIK**
SIX2	Renal hidroplazi
ROBO2	VUR
SLIT2	Kistik displastik böbrekler, tek taraflı böbrek agenezisi.
SRGAP1	Kistik displastik böbrekler, tek taraflı böbrek agenezisi.
UMOD	Medüller kistik böbrek hastalığı tip 2, ailesel hiperüremik nefropati ve glomerülosistik böbrek hastalığı.
TRAP1	CAKUT

Tablo 2. İnsan böbreğinin gelişiminde ve CAKUT oluşumunda rol oynayan genler (23)

İnsanda Böbrek Gelişiminde ve CAKUT Oluşumunda Rol Oynayan Genler	**Böbrek Gelişim Aşamaları**
BMP4, EYA1, GATA3, PAX2, RET, ROBO2, SALL1, SIX1	Yerleşme ve Tomurcuk Oluşumu
FGF20, WNT4	Mezenkimalden Epitele Transisyon
AGT, AGTR	Dallanma
UMOD	Nefron Oluşumu ve Gelişimi

2.3. Nefrogenez ve CAKUT İlişkisi

CAKUT'un oluşumunda genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin tümü etkindir. Etkilenen aile bireylerinde farklı türde CAKUT hastalığının oluşması da mümkündür. Özellikle transgenik fare modellerinde yapılan çalışmalar, CAKUT patogenezinde genetik faktörlerinin rolünün anlaşılmasını sağlamıştır (24).

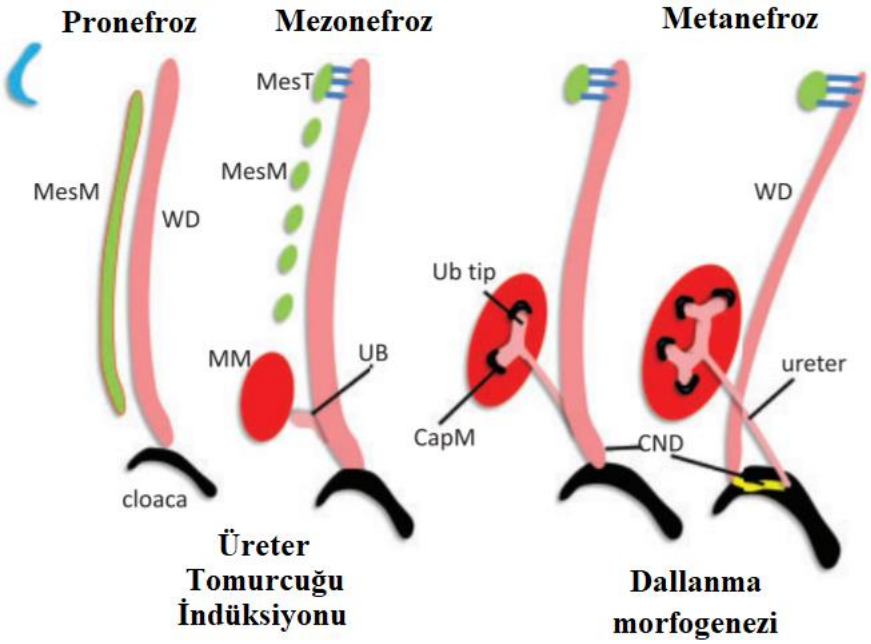
Üriner sistemin çoğu insanlarda gebeliğin 3. haftasında nefrojenik kordon, ara mezodermden oluşur. Nefrojenik kordon pronefroz, mezonefroz ve metanefroz olmak üzere 3 set nefrik yapının gelişimini sağlar. Pronefroz, gebeliğin 3. haftasında ortaya çıkan en kısa ömürlü yapıdır. Mezonefroz gelişimi ise mezonefrik mezenşim ile çevrili olan nefrojenik kordonun kuyruk şeklinde uzayıp Wolf kanalı'na başkalaşması ve pronefroz gerilemesidir.

Mezonefroz, memelilerde geçici ama oldukça fonksiyonel bir süreçtir. Mezonefrik tübüller insanlarda Wolf kanalı boyunca doğrusaldır ve doğrudan bu kanalla bağlıdır. Wolf kanalı alt ve üst idrar yolları arasındaki bağlantıyı birleştirir. İleride bu birleşme sonucunda mesane oluşacaktır. Mezonefroz gebeliğin 16. haftasına kadar geriler ve mezonefrik tübüllerin çoğu epididimis ve eferent arterlere dönüşür, Wolf Kanalı ise erkeklerde vas deferens olur. Mezonefrozun gerilemesi böbrek gelişiminde çok önemlidir ve bu süreç Wolf kanalındaki sinyaller ile kontrol altında tutulur.

Kalıcı böbrek gebeliğin 4 ile 5. haftalarının ortalarında oluşmaya başlar. Metanefrik gelişimin ilk aşaması, Wolf kanalından üreter tomurcuğu adı verilen epitel hücrelerin büyümesidir. Metanefrik mezenşimdeki indükleyici sinyallere cevaben gelişen üreter tomurcuğu invazyonu, metanefrik mezenşim hücrelerinin üreter tomurcuğu ucunun etrafında toplanmasını sağlar. Bu sayede uç, T şeklinde dallanmaya başlar. Üreter tomurcuğu hücreleri, toplama kanallarının kılavuzudur ve toplama kanalı sistemini oluşturmak için ardı ardına birçok dallanmaya maruz kalacaktır.

Dallanmada üreter tomurcuğu, metanefrik mezenşim, stromal ve endotelyal hücrelerin etkileşimiyle gerçekleşir. Üreter tomurcuğunun uçları, yeni üreter tomurcuklarını oluşturmak için dallanır ve ilk birkaç dal, majör ve minör kaliksleri oluşturur. Tüm majör kaliksler pelvise boşalır ve oradan üretere taşınır.

Nefrogenez, mezenşim hücreleri üreter tomurcuğu sapı ve uçlarının birleşme yeri yakınında kümelendiğinde başlar. Hücreler distal tübüller, bağlantı tübülleri, inen ve çıkan Henle halkaları ve glomerulusu oluşturmak için bir dizi morfogenetik aşamalardan geçer. Endotelyal progenitörler stromal hücreler ile S şekilli gövdenin yarığını kaplayarak glomerüler kapillerler ve mezanjiyum haline gelir. Nefrogenez, doğumdan önce tamamlanan bir süreçtir (Şekil 1) (31).



Şekil 1. Nefrogenezin 3 temel aşaması. MesM: Mezonefrik mezenşim, WD: Wolf kanalı. MM: Metanefrik mezenşim, MesT: Mezonefrik tübüller UB: Üreter tomurcuğu, UB tip: Üreter tomurcuk ucu, CapM: Kep Mezenşim hücreleri, CND: Ortak nefrik kanal (31)

Nefrogenez sırasında meydana gelen bozukluklar CAKUT başta olmak üzere birçok hastalık ile ilişkilidir. Örneğin agenezis, sıklıkla kusurlu Wolf kanalı büyümesinden ya da üreter tomurcuğu indüksiyonundan kaynaklanır. Hipoplazi ise morfogenez sırasında azalan dallanma sonrasında az sayıda nefrona sahip küçük böbrekler nedeni ile oluşur. Displastik böbrekler farklılaşmamış stromaya ve az dallanmaya sahiptir. Yani dallanma esnasında meydana gelen sorunlar hipoplazi ve displaziye neden olabilir (24). Nefrogenezin ve yukarıda bahsi geçen hastalıkların ve daha birçoğunun oluşumunda rol oynayan farklı sinyal yolakları ve genler mevcuttur.

Üreter tomurcuğu büyümesini ve dallanmasını kontrol eden sistemler birçok farklı uyarıcı ve engelleyici sinyal yolaklarıyla düzenlenir (örneğin, GDNF, FGF'ler, BMP'ler) (25). *PAX2, EYA1, SIX1, SIX2, SALL1, FOXC1, WT1* ve *HOX11* genleri gibi erken böbrek gelişiminde çok önemli rol oynayan genlerin çoğu mezenkimde ifade edilir ve çoğu *GDNF* geninin düzenlenmesinde görev alan transkripsiyon faktörlerini kodlar. Bu nedenle insanlarda gelişen böbrek hastalıkları, bu sinyal yolaklarında görev alan genlerin bir kısmındaki mutasyonlarla ilişkilidir (26). GDNF/RET sinyalizasyonu birincil tomurcuk oluşmasında ve üreter

tomurcuğunun dallanmasında etkilidir. ERK, MAP kinaz, PI3K ve PLCγ yolları gibi birçok yolla etkinleştirilen Ret sinyallerinin ifadelenmesini kontrol eden genlerin, üreter tomurcuğun uçlarında da görev aldığı çalışmalarda gösterilmiştir. GDNF / RET sinyal yolağının en önemli işlevlerinden biri *ERTV4, ETV5, MET, MMP1, SPRY* ve *WNT11* dahil olmak üzere farklı üreter tomurcuğu ucu hedef genlerinin ifadelenmesindeki artışdır (25). Fibroblast büyüme faktörleri (FGF), erken metanefrik dönemde FGF reseptörleri aracılığı ile etkisini gösterir. Metanefrik mezenşim ve üreter tomurcuğunda ifade edilen FGFR1 ve *FGFR2* genlerinin önemi büyüktür. Wolf kanalının tüm bölümlerinde ifade edilen *FGFR2* geninin wolf kanalının gelişiminde önemli rolü vardır. Reseptörlerden yalnızca birinin olmaması durumu malformasyona neden olmazken, ikisinin olmaması durumu böbrek agenezisine yol açar. Ayrıca bir çift reseptör delesyonu sonucunda *PAX2, SIX2* ve *SALL1*'in yokluğu ve *GDNF* seviyelerinde kayıplara neden olur (25, 27). Six1, uyarılmamış metanefrik mezenşimde eksprese edilir. Bu nedenle erken böbrek gelişimi için gerekli bir homeobox proteinidir. Sall1, metanefrozun gerçekleştirilmesinde görev alır. Six1'in varlığı ile Sall1 ifade edilir. Eğer Six1 yoksa Sall1 de olmayacaktır. Bu nedenle Sall1 ve Six1'in eksikliği wolf kanalında üreter tomurcuklanması büyümesinde başarısızlıkla sonuçlanır ve böbrek agenezisi olur (25, 28). Lipit modifikasyonu yapılmış Wnt-glikoproteinlerinin organogenez sırasında ve gelişmekte olan böbrekte önemli rolleri vardır. Wnt5a, -5b, -6, -9b ve -11 üreter tomurcuğunda, Wnt2b, -4 ve -5a ise metanefrik mezenşimde ifade edilir. Bu hücre tipleri arasındaki iletişimin organ büyümesi, nefrogenez indüklemesi ve düzenlemesi yaptığı çalışmalarca ispatlanmıştır. Wnt4 ise yoğun mezenşimin epitelizasyonunda görevlidir. Nefron prekürsör hücrelerinde Wnt4'ün ifadelenmesi, bu hücrelerin nefrona gelişmelerinde gereklidir (25, 29,30).

Organogenezde, sinyal yolaklarının yanı sıra apoptozun da önemi büyüktür. Apoptoz, diğer adıyla tip I hücre ölümü, bir hücrenin komşu hücrelerden ve hücre dışı matriksten bağını koparması ile karakterizedir (31). Apoptoz, organogenezde ve yaralanma durumlarında organları kontrollü şekilde şekillendirmek, gereksiz hücreleri yok etmek ve doku yenilenmesi için gereklidir. Apoptozun aktivasyonu, B hücreli lenfoma 2 (BCL2) protein ailesinin pro- ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki karmaşık etkileşimlerle düzenlenir. Bir hücrenin apoptoz geçirip geçirmeyeceğine dair karar apoptozu düzenleyen sistemde görevli faktörler tarafından verilir. Proapoptotik BCL2 ailesi proteinleri, mitokondri dış zarının geçirgenliğini sağlayan efektör proteinleri (Bax, Bak) ve anti-apoptotik BCL2 üyeleriyle veya efektör proteinlerle etkileşen BH2 proteinleri olmak üzere ikiye ayrılır. Anti-apoptotik BCL2 ailesi üyeleri, proapoptotik BCL2 aile üyelerine ve Bax veya Bak'a bağlanarak apoptozu durdurur. Anti-

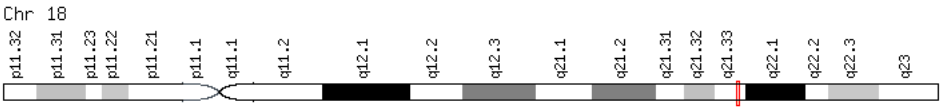
apoptotik BCL2 ailesi üyeleri, proapoptotik BCL2 aile üyelerini ve aktive Bax veya Bak'ı bağlayarak apoptozu inhibe eder. Mitokondrinin dış zarının geçirgenliği artar ve proapoptotik proteinler zardan salınmaya başlar. Böylece bir protein kompleksi olan apoptozom vasıtasıyla kaspazların aktivasyonu sağlanmış olur. Sonuç olarak Kaspaz 3 ve 7'nin aktivasyonu ile apoptoz başlatılmış olur. Omurgalılarda apoptotik uyaranların, kaspazların aktive edilmesine ve mitokondri dış zarının geçirgenliğine ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. BCL2 proteini olmayan farelerin metanefrik mezenşimde apoptozun arttığı bunun da az sayıda nefron, renal hipoplazi ve sistogenez ile sonuçlandığı görülmüştür (7).

Lösemi inhibe edici faktör (*LIF*), hücre dışı matriks onarımı ve nefrogenezde görevli bir sitokindir. Böbrek epitel hücreleri de dâhil birçok hücre *LIF*'in üretiminden sorumludur. Lösemi inhibe edici faktörü (*LIF*), nefrogenez sırasında mezenkimin epitele dönüşmesini sağlar. *LIF*'in iltihaplı böbrek hastalıklarında rol aldığı düşünülmektedir (32, 33). Barasch ve arkadaşlarının sıçanlar üzerine yaptığı standart indüksiyon modelli bir araştırmada üreter tomurcuk hücrelerinde, mezenkimi epitele çeviren ve nefronları oluşturan faktörün *LIF* olduğu bulunmuştur. *LIF*'in Pax2, Wnt4 ifade eden epitel öncül hücreleri üzerinde etkisini incelemek için metanefrik mezenşim hücrelerinde *LIF* ile kültür çalışması yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, sitokinin epitel öncüllerinde ikinci haberci sinyalini doğrudan aktif hale getirebileceği ve IL-6 sitokinlerinin böbrek gelişimi sırasında mezenkimalden epitelyal dönüşüme aday düzenleyiciler olduğu ortaya çıkmıştır (34).

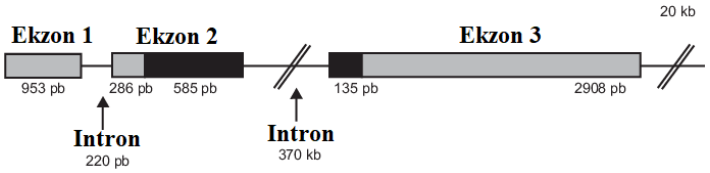
2.4. *BCL2* Geninin Yapısı ve İşlevi

2008 yılına kadar BCL2 ailesinde 25 gen tanımlanmıştır (35). Bcl2, BCL-xL, BAX, BAK, BAD proteinleri, *BCL2* gen ailesine üyedir ve bütün bu proteinler apoptozun düzenlenmesinde rol alır (36). *BCL2* geni 18. kromozomun q kolunun 21. lokusunda yer alır (19q21.33) (Şekil 2) (37).

BCL2 geni 3 ekzondan oluşur. İlk iki ekzon dört BH alanını (homoloji bölgelerini) kodlar. Üçüncü ekzon ise proteinin hücre içi zarlara tutunmasını sağlayan transmembran alanı kodlar (Şekil 3). *BCL2* geninin BCL2α ve BCL2β olmak üzere 2 izoformu vardır. BCL2α'nın antiapoptotik olduğu bilinirken BCL2β izoformu hakkında henüz net bir bilgi edinilememiştir (38).



Şekil 2. *BCL2* geninin kromozomdaki yeri (39).

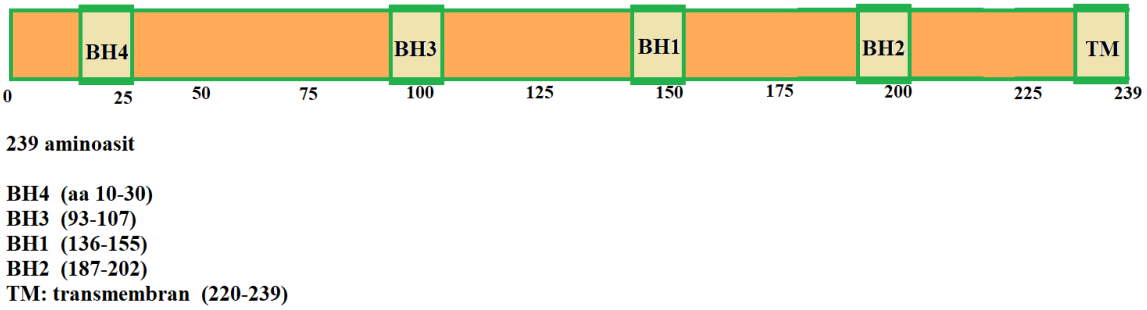


Şekil 3. *BCL2* geninin yapısı. Gri alanlar translasyon geçirmeyen bölgeleri temsil ederken, siyah bölgeler translasyon geçiren bölgeleri temsil etmektedir (40).

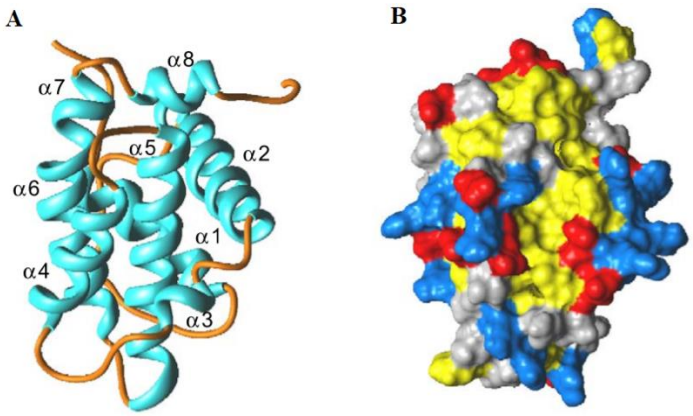
BCL2 geni, 239 aminoasitten oluşan 26 kDa'luk BCL2 proteinini kodlar. BCL2 proteininin C terminalinde tek bir hidrofobisitesi yüksek alan vardır. Bu alan sayesinde çekirdek ve endoplazmik retikulum zarına ve mitokondrinin dış zarına yerleşir. Mitokondri zarına yerleşen BCL2 proteini, mitokondri zar bütünlüğünü korur, sitokrom C salınımını engeller. Bu protein 4 homoloji alanına sahiptir (BH1, BH2, BH3, BH4) (Şekil 4). BH1, BH2 ve BH3 alanları hidrofobik yarık oluşturarak BCL2 proteininin, BCL2 protein ailesinin proapoptotik (Bax, Bak, Bad) ve antiapoptotik (BCL2, BCL-XL) üyeleri ile etkileşime girip homodimer ve heterodimerler oluşturmasını sağlar (37). BH3 oligopeptidinin çeşitli hücrelerde apoptoza neden olduğu bilinmektedir. BH3 proteinleri pro-apoptotik aktivitelerini gerçekleştirirken, diğer proteinlerle BH3 alanları ile etkileşirler. Bu nedenle BH3 proteinleri ölüm ligandları ve hedefleri ise ölüm reseptörleri olarak adlandırılır (41).

BCL2 proteininin 3 boyutlu yapısı Şekil 5A ve B'de görülmektedir. BCL2'nin yapısında sekiz adet α heliks ve hidrofobik yarık bulunmaktadır. BCL2 ailesi proteinleri arasındaki en büyük fark, hidrofobik yarığın bir kısmını oluşturmakta görev alan α3 bölgesindedir. Proteinlerin birincil yapılarında bağlanma yarığının fonksiyonunu etkileyen farklılıklar da vardır (42).

BCL2'nin P1 ve P2 olmak üzere iki promotörü vardır. Majör transkripsiyonel promotör olan Pl, translasyon başlangıç bölgesinin 1386 ile 1423 bp yukarı akışında bulunur. P2 ise P1'den 1.3 kb aşağı akışta bulunur (Şekil 6). P1 bölgesi transkripsiyon başlangıç bölgelerine (−1,394, −1,399, −1,406, −1,410 ve −1,432) ve nükleaz hiperduyarlı bölgeye yakındır (Young ve Korsmeyer, 1993). P1 promotörü *BCL2* gen ifadelenmesinde temel yapıdır (Catz ve Johnson, 2001), (Onel ve arkadaşları, 2016). P1 promotörünü direk veya indirek olarak düzenleyen tümör baskılayıcı gen ürünü p53 gibi, birkaç gen tanımlanmıştır (Miyashita ve Reed, 1995). Nükleer faktör kB (Catz ve Johnson, 2001) ve POU ailesi üyesi Brn-3a'nın (Smith ve diğerleri, 1998) P2 promotör transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, *BCL2* gen ifadelenmesinin düzenlenmesi tam olarak anlaşılmış değildir. (43, 44).

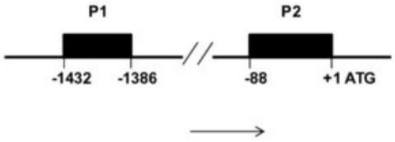


Şekil 4. *BCL2* geninin homoloji (BH) alanlarının şematik gösterimi (37).

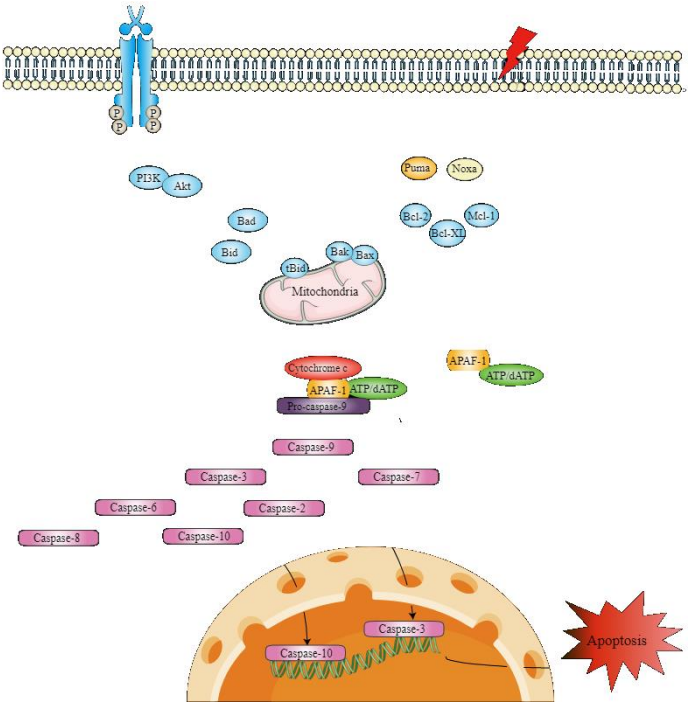


Şekil 5. *BCL2* proteininin 3 boyutlu yapısı. **(A)** *BCL2* proteininin yapısında sekiz adet α heliks bulunur. **(B)** Sarı: Lösin, valin, izolösin, fenilalanin, tirozin, triptofan, metiyonin ve alanin; Mavi: arginin, lizin ve histidin; Kırmızı: aspartik asit ve glutamik asit Gri: diğerleri. Hidrofobik yarık sarı renkli alandır (42).

Evrimsel olarak korunan apoptoz, kaspaz protein ailesi ile kontrol edilir. Kaspazlar sistein proteazlarıdır ve inaktif enzimler olarak sentezlenip proteolitik bölünme ile aktif hale gelirler. Aktif hale gelmesinde izlenen yolların kontrolü BCL2 proteini ile gerçekleşir. Apoptoz, dış kaynaklı ve iç kaynaklı olabilir (Şekil 7). İç kaynaklı apoptoz, radyasyon, sitokin yoksunluğu, sitotoksik ilaçlar, büyüme faktörü yoksunluğu gibi hücre içi streslerle harekete geçer. BCL2 ailesi proteinleri intrinsik apoptozun düzenlenmesinde görev alır. Eğer hücre içi stres seviyesi artarsa, zarar görmüş mitokondriden sitokrom c salınır. Salınan sitokrom c, bir multiprotein kompleksi olan apoptozomdaki adaptör molekül APAF-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör 1) ve inaktif haldeki başlatıcı kaspaz (prokaspaz 9)'a bağlanır. Sitokrom c'nin inaktive haldeki başlatıcı kaspaz'a bağlanması ile kaspaz 9 aktif hale gelir ve apoptozla ilişkili morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açacak olan kaspaz 3 ve 7 'nin aktivasyonu gerçekleşir (8).



Şekil 6 insan *BCL2* gen promotörünün şematik haritası, 5 (P1) promotörü ve 3 (P2) promotör bölgesini içerir (43)



Şekil 7. Apoptoza yol açan intrinsik yol (45).

BCL2 geninde meydana gelen anomaliler başta böbrek ve üriner sistem anomalileri olmak üzere B hücreli lenfoma, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer gibi hastalıklara yol açtığı bilinmektedir (39, 46). *BCL2* geninde meydana gelen polimorfizmler, *BCL2* geni ifadelenmesini etkilediği bilinmektedir. İfadelenmede meydana gelen bu değişiklik sonucunda *BCL2* geninin diğer genlerle etkileşimi de değişir ve bu da *BCL2* geninin görev aldığı mekanizmaların etkilenmesine yol açar. Bu çalışmada *BCL2* geninde yer alan 2 adet polimorfizm incelenmiştir. Bu polimorfizmler rs2279115 (c.-717C>A) (NM_000633.2) ve rs4987856'dır (c.*2364G>A) (NM_000633.2).

2.4.1. *BCL2* Polimorfizmleri

2.4.1.1 rs2279115 (c.-717C>A)

BCL2 geninin P2 5'-promotör bölgesinde bulunan ve *BCL2* geninin ifadelenmesini düzensizleştiren fonksiyonel bir polimorfizmdir. A alelinin C aleline dönüşmesi, *BCL2* promoter aktivitesi ve nükleer proteinlerin bağlanmasını büyük miktarda inhibe etmektedir (Nuckel ve arkadaşları, 2007) (6). Bu polimorfizmin birçok farklı malignitede farklı sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (45, 47). Irak popülasyonunda yapılan bir çalışmada rs2279115 polimorfizminin lösemi oluşumu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. *BCL2*'nin (rs2279115) (AA) homozigot genotipinin varlığında riskin 3 kat arttığı bildirilmektedir (49). Bir başka çalışmada ise rs2279115 polimorfizminin erkeklerde glioma yatkınlığını arttırdığı, kadınlarda bu risk üzerine etkide bulunmadığı gösterilmiştir (47).

2.4.1.2 rs4987856 (c.*2364G>A)

miRNA'lar gen ifadelenmesinin posttranskripsiyonel seviyede kontrol edilmesinde görev alırlar (42). Hedeflenen mRNA'ların 3'UTR'sine bağlanarak protein üretiminin mRNA seviyesinde kontrol edilmesine neden olur (45). rs4987856, miRNA-195 bağlanma bölgesindeki G>A varyantıdır ve meydana gelen bu değişiklik sonucunda gen ifadelenmesi seviyesinde değişiklikler meydana gelir (48, 49). İkincil yapı tahmini ve bağlanma enerjileri üzerine yapılan bir çalışmada rs4987856 polimorfizminin *BCL2* ve miR-195 etkileşimini değiştirdiği gösterilmiştir. Deregüle miRNA'lar, multipl kanser türlerinde onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak işlev görür. Bunlar arasında miR-195'in, kritik genlere ve sinyal

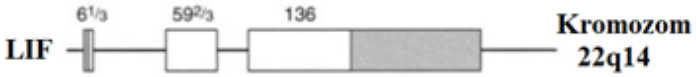
yollarına bağlanarak, kanserlerin ilerlemesini artırarak veya inhibe ederek çeşitli neoplazmalarda onkojenisiteyi önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca, miR-195'in yukarı regülasyonunun antiapoptotik protein BCL-2'nin ekspresyonunu baskılayarak hücre canlılığını azalttığına dair kanıtlar vardır (Yu ve arkadaşları, 2018) (45).

2.5. *LIF* Geninin Yapısı ve İşlevi

İnterlokin-6 (IL-6) sınıfı sitokinlerin bir üyesi olan Lösemi İnhibitör Faktörü (*LIF*) geni, multifonksiyonel bir sitokindir. IL-6 ailesine mensup diğer üyeler onkostatin M (OSM), IL-6, IL-11, siliyer nörotrofik faktör (CNTF) ve kardiyotrofin-1 (CT-1)'dir. *LIF* geni evrimsel süreçte iyi bir şekilde korunmuştur. *LIF* geni, 22. kromozomun q kolunun 12. lokusunda bulunur (22q12.1-q12.2) (Şekil 8) (9, 10, 37).

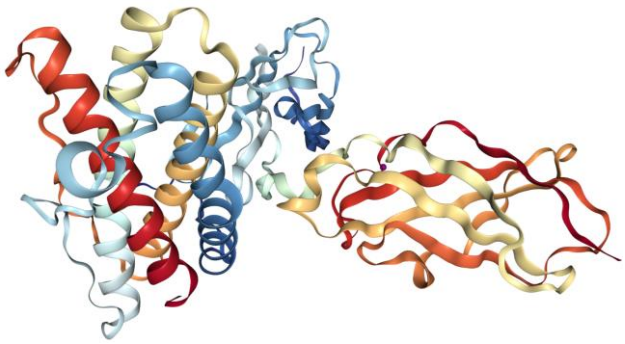
Şekil 8. *LIF* geninin kromozomdaki yeri (37).

LIF geni sırasıyla $6^{1/3}$, $59^{2/3}$ ve 136 amino asitlik üç ekzon içerir (Şekil 9) (51).



Şekil 9. *LIF* geninin yapısı (51).

Monomerik glikoprotein olan LIF proteini, genellikle glikozilasyon yoluyla modifiye edilir. Glikozilasyona uğramamış LIF proteininin moleküler ağırlığı 20–25 kDa arasında değişirken, modifikasyona uğrayan LIF proteininin moleküler ağırlığı 37–63 kDa arasında değişir (Şekil 10) (9).

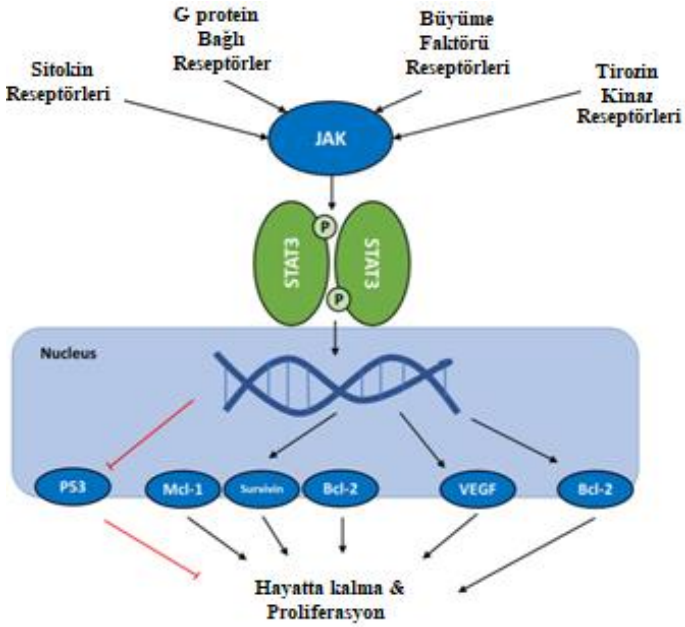


Şekil 10. LIF proteininin yapısı, glikoprotein 130 ile kompleks oluşturmuş halde (52).

LIF işlevlerini JAK/STAT2, AKT ERK1/2 ve mTOR gibi sinyal yolakları ile yapar ve *LIF* ifadelenmesi farklı doku ve hücre tiplerinde bu yolaklar ile kontrol edilir. *LIF* otokrin ve parakrin yollarla çalışır. *LIF*'in spesifik reseptörü Lösemi İnhibitör Faktörü Reseptörü (LIFR)'dür. *LIF*, spesifik reseptörünün alt birimi olan LIF-Rβ ile glikoprotein 130 (gp 130)'un heterodimerizasyonunu indükler. Bu bağlanma ile janus kinaz 1 ve 2 (JAK1/JAK2) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1 ve 3 (STAT1/STAT3) fosforilasyona uğrayarak aktif hale gelir. *LIF*'in JAK / STAT sinyal yolunu, öncelikli olarak STAT3'ün fosforilasyonuyla aktif hale getirdiği bildirilmiştir (Şekil 11). *LIF*, hücreyi hücre bölünmesine teşvik eden küçük bir protein olan mitojenle faaliyete geçen mitojenle etkileşen protein kinaz (MAPK)'ları ve fosfatidilinositol-3-kinaz (PIK3/AKT)'ın görev aldığı diğer sinyal yolaklarını da aktif hale getirir. Bu aktivasyon süreci hücrenin tipi ile ilişkilidir (9, 53).

LIF geni biyolojik işlevlerini JAK/STAT sinyal yolu vasıtaysıyla yapar. Bu sinyal yolağının proliferasyona, hücre büyümesi, anjiyogenez ve immün yanıtlar gibi birçok hücresel süreçleri düzenlediği bilinmektedir. STAT3 aktivasyonunun düzenli şekilde yapılamaması sonucunda kanser ve otoimmün hastalıklar gibi birçok önemli kabul edilen hastalık görüldüğü bilinmektedir. STAT3 asetilasyonunun ve aktivitesinin böbrek hasarının derecesi ile ilişkili olduğu da yakın zamanda yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (54).

LIF geninde meydana gelen polimorfizmlerin çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. *LIF* geninde meydana gelen değişiklikler, *LIF* geninin ifadelenmesinde değişikliklere yol açar. Bu çalışmada *LIF* geninde yer alan 1 polimorfizm incelenmiştir. Bu polimorfizm rs929271'dir (c.*1414T>G) (NM_002309.4).



Şekil 11. JAK proteinlerinin aktivasyonunu içeren hücre içi sinyalleme kaskadları (55).

2.5.1. *LIF* Geni Polimorfizmi

2.5.1.1. rs 929271 (c.*1414T>G)

Bu polimorfizm *LIF* geninin 3'UTR bölgesinde bulunur (11). 3' UTR'ler mRNA'ların kodlanmayan kısımlarıdır. mRNA'ların 3' UTR bölgeleri mRNA lokalizasyonu, stabilitesi ve translasyon gibi süreçleri düzenler (56, 57, 58). 2020 yılında İran popülasyonu üzerine yapılan bir çalışmada rs 929271 polimorfizminin *LIF* geninden kodlanan mRNA katlanma yapısını değiştirerek şizofreni gelişiminde ve miRNA'lar tarafından hedeflenen *LIF* geninin düzenlenmesinde etkili olduğu bulunmuştur (59). Yapılan başka bir çalışmada ise rs929271 polimorfizminin in vitro fertilizasyon ve mikroenjeksiyon sonrası implantasyon verimi ve gebelik sonuçları için biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (60).

2.6. Polimorfizm

Genomik DNA varyasyonları, bireyleri tanımlayabilmek için parmak izi gibi kullanılabilir. Bunun yanı sıra bu varyasyonlar insanların fenotipik ve genotipik varyasyonunda rol alabileceği gibi, birçok hastalığın da nedeni olabilir. Polimorfizmler popülasyonun en az %1'inde mevcut olan ve insan genetik varyasyonunun büyük bölümünü açıklayan değişikliklerdir (61).

2.6.1. Tek Nükleotit Değişimi (SNP) ve Protein Oluşumu Üzerine Etkileri

Tüm polimorfizmler arasında en basit ve en yaygın olanıdır. Bir SNP ile karakterize edilen bir lokus, genellikle genomda o belirli lokasyonu işgal eden en az iki farklı baza karşılık gelen iki allele sahiptir (Şekil 12) (62).

Şekil 12. Konum 8'deki tek nükleotit polimorfizmi (SNP), biri T (referans dizisine karşılık gelir) ve diğeri C ile olmak üzere iki alleli vardır (62).

SNP'ler oldukça sık görülür ve genomda ortalama her 1000 baz çifti başına bir SNP görülür. Ancak SNP'ler genomda eşit şekilde dağılmamıştır. Gen içinde ekzonlarda, intronlarda ve bilinen genlerden uzak dizilerde çok daha fazla SNP'ler bulunur. Bunun yanı sıra genlerin regülatör dizilerinde de önemli sayıda SNP bulunur. Ekzonlarda bugüne kadar 100.000'den fazla SNP tespit edilmiştir. Görülen bu SNP'lerin yaklaşık yarısı kodlanan aminoasit dizisini değiştirmemektedir. Bulunduğu bölge ile ilişkili olarak SNP'lerin önemli fonksiyonel sonuçlara yol açtığı görülmektedir. SNP'ler ifadelenen mRNA seviyesi ve stabilitesini bozabileceği için gen ifadelenme üzerinde etkili olabilmektedir.

SNP'lerin sıklıkla görülmesi, sağlığı etkilemedikleri anlamına gelmez. SNP'ler ciddi bir hastalığın doğrudan nedeni olmaktan ziyade, hastalığa yatkınlığı veya hastalığın seyrini belirleyen bir faktör de olabilir (62).

2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu 1986 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir ve bu buluşu kendisine 1993 yılında Kimya dalında Nobel Ödülü kazandırmıştır (63). Polimeraz Zincir Reaksiyonu Biyoloji ve Genetik dallarında oldukça sık kullanılan bir yöntemdir.

PZR çeşitli organizmaların kan, deri, saç, tükürük gibi çeşitli dokularından alınan örneklerin DNA'sı kullanılarak yapılır. Eser miktarda DNA, PZR ile *in vivo* ortamda çoğaltılır.

Az miktarda DNA kullanılması PZR yönteminin oldukça hassas bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Bir PZR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için ortamda uygun moleküllerin bulunması gerekir:

DNA: Genetik yapısı incelenmek istenen canlıdan izole edilir. Her bir PZR testi ortalama 50-100 ng kalıp DNA gerektirir.

DNA Polimeraz Enzimi: PZR ürünü oluşması için nükleotitleri birbirine bağlayan enzimdir.

dNTP: DNA'da bulunan dört bazı bulundurur: adenin, timin, sitozin ve guanin (sırasıyla A, T, C, G). Sentezlenecek PZR ürünü için DNA polimeraz enziminin substratı olarak görev alır.

***Forward* (İleri) ve *Reverse* (Geri) Primerler:** Tanımlayıcı şekilde tasarlanır. Çoğaltılacak edilecek DNA zincirine tutunur. DNA'nın özgül bölgelerine bağlanır. DNA polimeraz aracılığı ile dNTP'ler primeri tamamlayarak hedef bölgenin çoğaltılmasını sağlar (64). Primerler yaklaşık 10-30 baz uzunluğunda tek bir iplikten oluşan dizilerdir. Primerlerin her biri, birbirlerinin eşleniği olan DNA dizilerine tutunur ve her primer zıt yönlerde uzar.

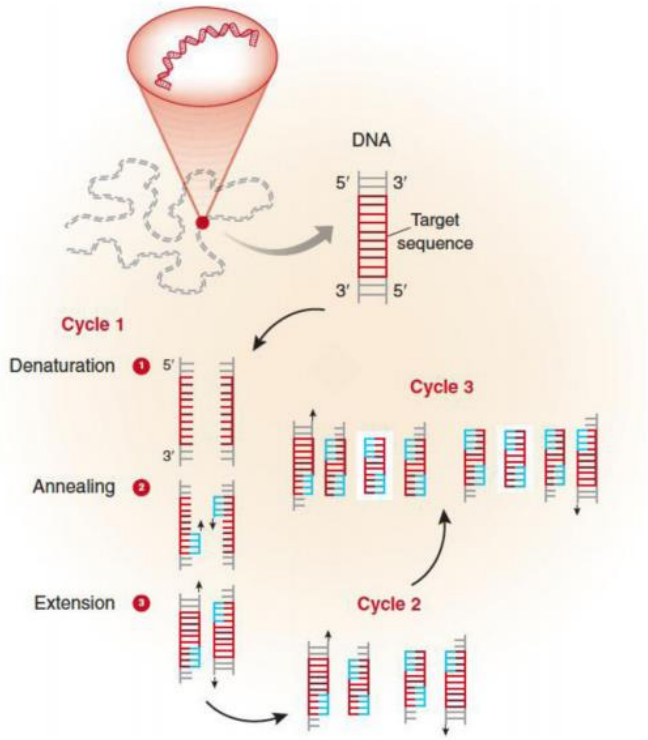
Yukarıda bahsedilen bileşenler test tüpünde karıştırılır ve DNA amplifikasyonunu gerçekleştirecek olan PZR cihazına yerleştirilir. PZR 3 aşamadan oluşur:

Denatürasyon: Çift sarmal kalıp DNA'yı iki ayrı tek sarmal olarak ayırma işlemidir. Tüm bileşenler 94-95°C'ye ısıtılır, böylelikle DNA sarmalının bazları arasındaki hidrojen bağları kırılır. Böylece yeni DNA ipliklerinin üretimi için yeni 2 kalıp DNA dizisi oluşmuş olur (65, 66, 67).

Annealing: Primerlerin tek sarmal olan kalıp DNA'lara hidrojen bağları ile bağlanması için sıcaklığın 50-65°C'ye düşürülmesidir. Kesin sıcaklığa, primerlerin erime sıcaklığına göre karar verilir (65, 66, 67).

Amplifikasyon: Bu aşamada sıcaklık yaklaşık 68-72°C'ye yükselir ve DNA polimeraz enzimi aktif hale gelir. Aktif hale gelen enzim, primerlere eklenerek yeni DNA çift sarmallarını oluşturur. Bu adımın süresi amplifiye edilen DNA'nın uzunluğuna bağlıdır ve genelde yaklaşık 60 saniye sürer (65, 66, 67).

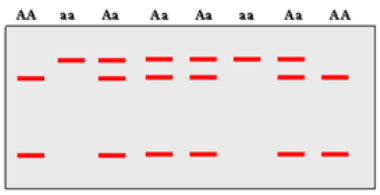
PZR adımları döngü olarak gerçekleştirilir ve 20-30 döngü sonunda milyarlarca DNA kopyası elde edilmiş olur (Şekil 13) (65, 66, 67).



Şekil 13. PZR ilkesinin gösterimi (64)

2.8.Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

1974 yılında oluşturulan bu yöntem, farklı bireylerde DNA polimorfizmlerini belirlemek amacıyla halen kullanılmaktadır. Farklı bireylerden alınan DNA örnekleri, bölgeye özgü restriksiyon enzimleri ile farklı boyutlarda DNA fragmanlarına parçalanır, fragmanlara ayrılan DNA'lar jel elektroforezinde yürütülür ve birbirinden ayrılır (68).

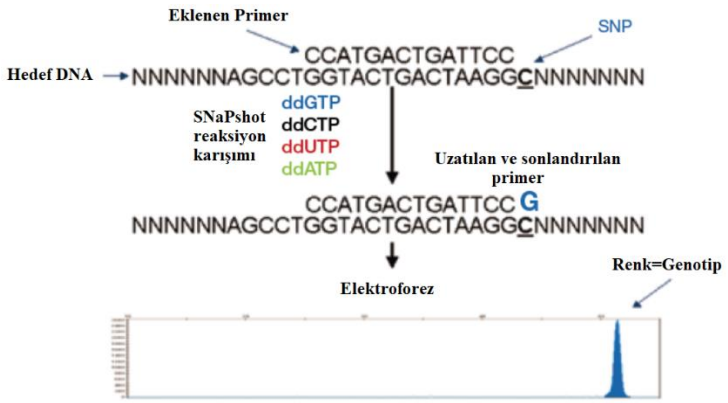


Şekil 14. RFLP yönteminde jel elektroforezi görüntü örneği ve genotiplerin belirlenmesi (69)

Bu yöntemin temeli nükleotit tabanlı delesyonlar, duplikasyonlar, inversiyonlar ve insersiyonların yeni restriksiyon bölgeleri oluşturmalarıdır. Bu varyasyonlar sonucunda DNA'nın parçalandığı fragmentlerin miktarı ve uzunluğu değişir. Bu sayede jel elektroforezinde farklı boyutlarda fragmentler görülür (Şekil 14) (68, 69).

2.9. SnaPshot Yöntemi

Bu yöntem, bir nükleotit ile primer uzatılması ve terminal ucun sonlandırılması temeline dayanan SNP analizi yapmak için geliştirilmiş bir metoddur (70,71).



Şekil 15. Snapshot Yöntemi Prensibi (72)

Şekil 15'te SNaPshot yönteminin çalışma prensibi resmedilmiştir. Eklenen primer, hedef DNA'daki tek nükleotit polimorfizminin bir baz öncesine bağlanır. Polimorfizm görülen baz, snapshot reaksiyon karışımı içinde bulunan uygun nükleozit trifosfat ile tamamlanır. Eklenen nükleozit trifosfat, analiz programında sinyal çıktısı olarak alınır.

Bu çalışmanın amacı *BCL2* geninde yer alan rs2279115 ve rs4987856 polimorfizmlerinin ve *LIF* geninde yer alan rs929271 polimorfizminin CAKUT hastalığı ile ilişkisini araştırmaktır. Ayrıca bu çalışmada bireylerde iki ya da daha fazla polimorfizmin aynı anda bulunması durumlarının hastalığa katkısını araştırmak hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma (Proje No: KA 21/77) Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Bilimsel Araştırma fonunca desteklenmiştir.

3.2. Hasta Grubu

Çalışmada KA18/189 numaralı projede kullanılan ve Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi Pediatrik Nefroloji Anabilim Dalı'nda takip edilen 0-18 yaş arası hasta ve kontrol grupları kullanılmıştır. Hasta grubuna 129 CAKUT tanılı hasta dahil edilmişken, kontrol grubuna herhangi bir üriner sistem anomalisi bulunmayan ve genel pediatri kliniğine başvuran benzer yaş ve cinsiyette 105 hasta dahil edildi. Hasta grubuna dahil edilen bireylerde hidronefroz, vazikoüretel reflü, idrar yolu enfeksiyonu, kronik böbrek yetmezliği, renal hipoplazi ve agenezi bulunmaktadır. Hasta bilgileri Ek A'da verilmiştir.

Çalışma ve kontrol grubundaki hastalardan ve resmi vasilerinden çalışmaya dahil olmaya gönüllü olduklarını gösteren imzalı bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

3.3. Yöntem

Bu çalışmada, *LIF* geninde bulunan rs929271 ve *BCL2* geninde bulunan rs2279115 ve rs4987856 varyantlarının belirlenmesi ve bu varyantların hasta ve kontrol grubuna alınan bireylerindeki allel sıklıklarının belirlenmesi için aşağıdaki yöntem ve gereçler kullanılmıştır. Çalışmada rs929271 ve rs2279115 varyantları PZR-RFLP, rs4987856 varyantı ise PZR-SNaPshot yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.3.1. Kullanılan kimyasal malzemeler

• Bölgeye özgü primerler (4 çift)

• BccI Restriksiyon endonükleaz enzimi, New England Biolabs Inc. Katalog No: R0704L

• Hinf Restriksiyon endonükleaz enzimi, Thermo Scientific™ Katalog No: ER0012

• Agaroz Serva Katalog No: :11404

• 0,5X Tris-Cl borik asit EDTA (TBE) 40 mM Tris-Cl, pH 8.3. 45 mM borik asit. 1 mM EDTA

• Orange G

• EtBr (Etidyum Bromur)

• dNTP Thermo Fisher Scientific™ Katalog No: 10297018

• Hotstart Taq DNA Polimeraz qiagen Katalog No: 203203

• DNA molekül ağırlık belirteci 50bç Thermo Scientific™ Katalog No: SM0373

• DNA molekül ağırlık belirteci 100bç Thermo Scientific™ Katalog No: SM0242

• Hi-Di™ Formamid- Thermo Fisher Scientific, Katalog No: 4401457

• SNaPshot™ Multiplex Kit – Thermo Fisher Scientific, Katalog No: 4323159

• ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent, – Thermo Fisher Scientific, Katalog No: 78205.10.ML

3.3.2 Kullanılan cihazlar

• Yatay elektroforez tankı (Cleaver Scientific)

• PZR Cihazı (Bio-Rad S1000™ Thermal Cycler)

• Elektroforez güç kaynağı (Consort)

• Jel görüntüleme sistemi (Syngene InGenius LHR)

• Mikro Pipet takımı (Eppendorf)

• Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA)

• Buz makinesi (Elektrolux)

• Mini santrifüj (Biosan combispin FVL-2400N)

• Derin dondurucu (Arçelik)

• Ependorf Tüpü (1,5 ml ve 2,0 ml)

• PZR tüpleri (0,2 ml ve 0,5 ml)

• Etüv

• 3130xl Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific

3.3.3 DNA örnekleri

Bu çalışmada kullanılan DNA örnekleri ve hasta grubunun seçimi Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı ile ortak olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kapsamında KA18/189 numaralı proje kapsamında periferik kandan izole edilmiş ve arşivlenmiş DNA örnekleri kullanılmıştır.

-20°C'de muhafaza edilen DNA örneklerinin miktar ve kalitesi Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA) marka spektrofotometre kullanılarak ölçüldü.

3.3.4 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Ekstrakte edilen DNA örneklerine Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) uygulandı. Kullanılan primerler, bu primerlerin uzunlukları ve TM dereceleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. *BCL2* ve *LIF* geninde bulan SNP'ler için kullanılan primer dizileri, amplikon uzunlukları ve Tm dereceleri. FWD: Forward, RV: Reverse, TM: Erime Sıcaklığı, BÇ: Baz Çifti

SNP	***Forward*/*Reverse* Primer Dizileri**	**PZR Amplikon Uzunluğu (bç)**	**TM (°C)**
rs2279115	Forward : 5'-TTATCCAGCAGCTTTTCGG-3' Reverse :5'-GGCGGCAGATGAATTACAA-3'	252	58
rs4987856	Forward 5'-GTTTCAACACAGACCCACCC-3' Reverse 5'-AGGATAGCAGCACAGGATTGG-3'	279	59
rs929271	Forward : 5'-TGATGGCTCCCGACACAAG-3' Reverse : 5'-GGTTGTTCCAGGGCGCTATTTC-3'	433	58

Tablo 4. *BCL2*'de bulunan rs2279115 ve rs4985856 ve *LIF* geninde bulunan rs929271 polimorfizmleri için uygulanan PZR reaksiyonlarının içerikleri.

	Stok Konsantrasyon	**Son Konsantrasyon**
10X Standart Taq Reaksiyon Tamponu	10x	1x
10mM dNTPs	10 mM	0.1 mM
Forward Primer	10 µM	0.4 µM
Reverse Primer	10 µM	0.4 µM
Taq DNA Polymerase	10 µM	0.03 U/ µl
DNA		50 ng

PZR reaksiyonu için uygulanan termal döngüler aşağıdaki gibidir;

Tablo 5. *BCL2* geninde bulunan rs4987856 polimorfizmi için uygulanan program (c.*2364G>A) (NM_000633.2).

94°C	5 dk	
94°C	30 sn	30 döngü
59°C	30 sn	
68°C	30 sn	
68°C	30 sn	
+4°C	∞	

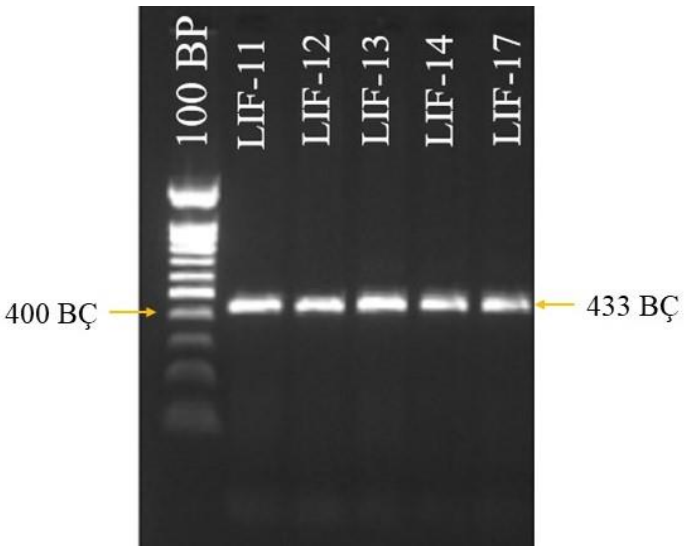
Tablo 6. *BCL2* geninde bulunan rs2279115 polimorfizmi için uygulanan program (c.-717C>A) (NM_000633.2)

94°C	5 dk	
94°C	30 sn	35 döngü
58°C	30 sn	
68°C	30 sn	
68°C	30 sn	
+4°C	∞	

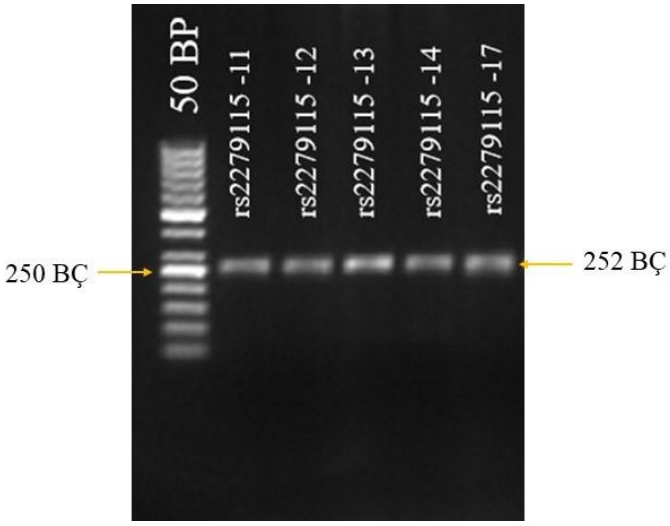
Tablo 7. *LIF* geninde bulunan rs929271 polimorfizmi için uygulanan program (c.*1414T>G) (NM_002309.4).

94°C	5 dk	
94°C	30 sn	30 döngü
58°C	30 sn	
68°C	30 sn	
68°C	30 sn	
+4°C	∞	

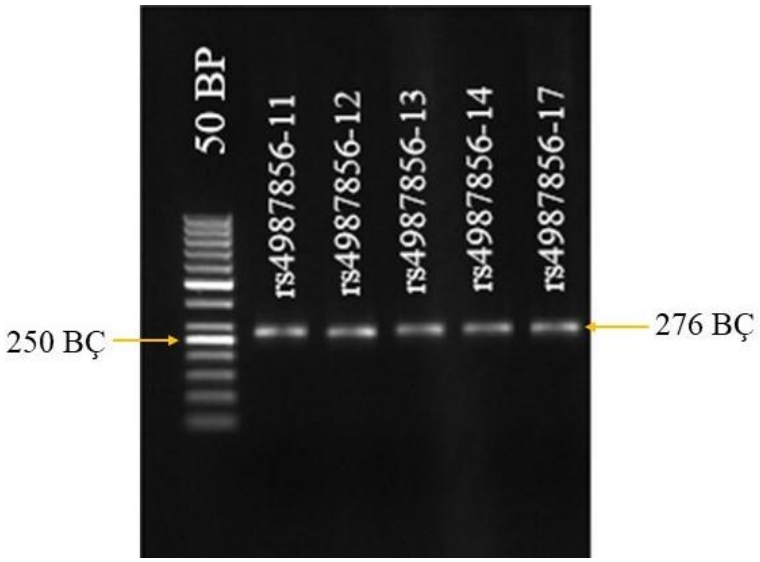
Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler jel elektroforezi sistemine yüklenerek PZR başarısı incelendi ve uygun amplikon boyuna sahip PZR ürünleri ile bir sonraki basamağa geçildi.



Şekil 16. *LIF* geni rs929271 (c.*1414T>G) polimorfizmi PZR ürünlerinin (433 bç) örnek jel elektroforezi görüntüleri. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Moleküler ağırlık belirleyicisi olarak 100 bç ladder kullanılmıştır. BÇ: Baz Çifti



Şekil 17. *BCL2* geni rs2279115 polimorfizmi (-717C>A) PZR ürünlerinin (252 bç) örnek jel elektroforezi görüntüleri. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Moleküler ağırlık belirleyicisi olarak 50 bç ladder kullanılmıştır. BÇ: Baz Çifti

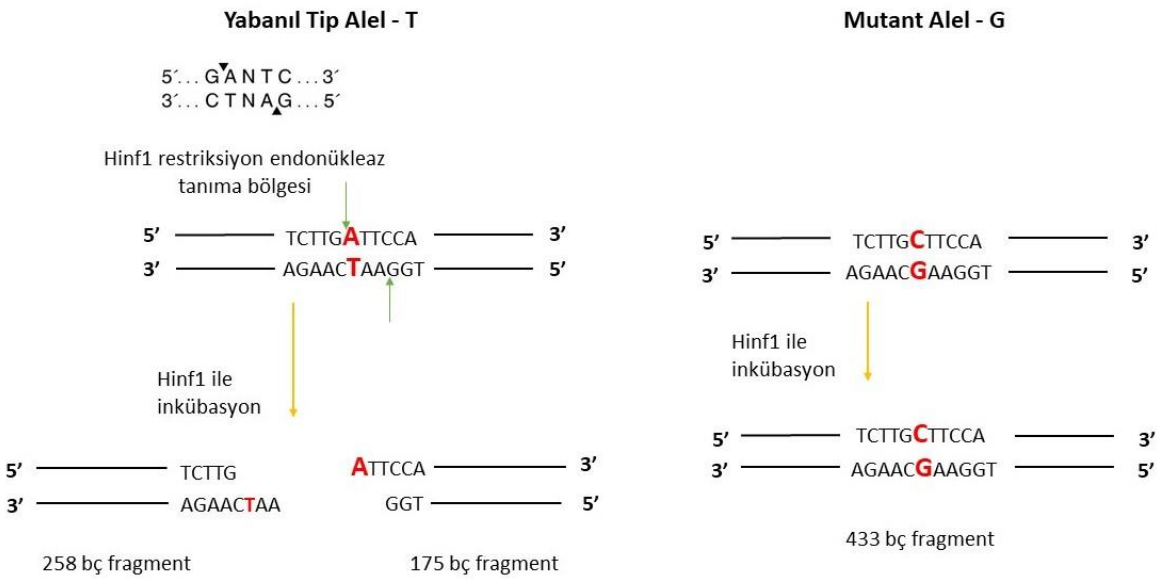


Şekil 18. *BCL2* geni rs4987856 polimorfizmi (c.*2364G>A) PZR ürünlerinin (276 bç) örnek jel elektroforezi görüntüleri. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Moleküler ağırlık belirleyicisi olarak 50 bç ladder kullanılmıştır. BÇ: Baz Çifti

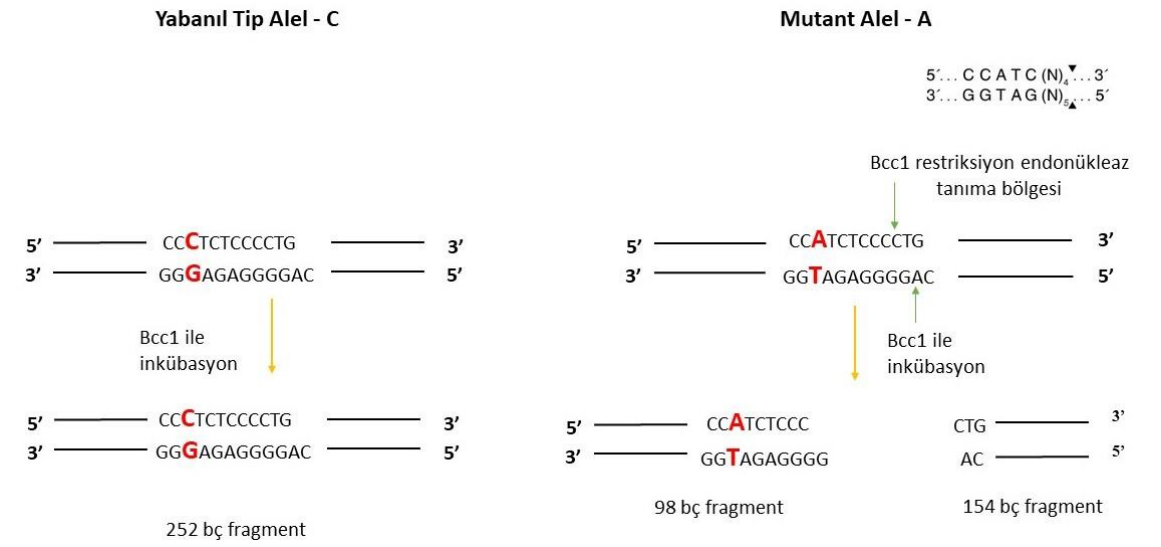
3.3.5. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Tablo 8. RFLP yönteminde kullanılan enzimler, inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları.

SNP	Restriksiyon Endonükleaz	İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi
***LIF*- rs929271**	*Hinf1*	37°C	1 saat
***BCL2*- rs2279115**	*Bcc1*	37°C	1 saat



Şekil 19. *LIF* geni rs929271 polimorfizmi RFLP analizi için kullanılan *Hinf1* enziminin kesim paterni. *Hinf1* enzimi, yabanıl tip alelin nükleotit dizisini tanır ve 433 bç PZR ürününü 258 bç ve 175 bç olmak üzere iki fragmente ayırır. Hinf1 enzimi mutant alelin nükleotit dizisini tanıyamaz ve PZR ürünü kesilmeden 433 bç olarak kalır. BÇ: Baz Çifti



Şekil 20. *BCL2* geni rs2279115 polimorfizmi RFLP analizi için kullanılan Bcc1 enziminin kesim paterni. *Bcc1* enzimi, mutant tip alelin nükleotit dizisini tanır ve 252 bç PZR ürününü 98 bç ve 154 bç olmak üzere iki fragmente ayırır. Bcc1 enzimi yabanıl alelin nükleotit dizisini tanıyamaz ve PZR ürünü kesilmeden 252 bç olarak kalır. BÇ: Baz Çifti

Tablo 9. *BCL2* geni rs2279115 ve *LIF* geni rs929271 polimorfizmlerinin RFLP reaksiyonu için kullanılan kimyasallar ve hacimleri.

Kullanılan Kimyasal	**Hacim**
PZR ürünü	10 µl
Nükleaz içermeyen su	0.5 µl
10X Tampon	1.2 µl
Enzim	0.3 µl

rs2277115 ve rs929271 polimorfizmleri için elde edilen PZR ürünleri, belirtilen hacimlerde reaksiyon kuruldu ve 37°C'de 1 saat inkübe edilerek uygun enzimlerle kesildi (Tablo 9).

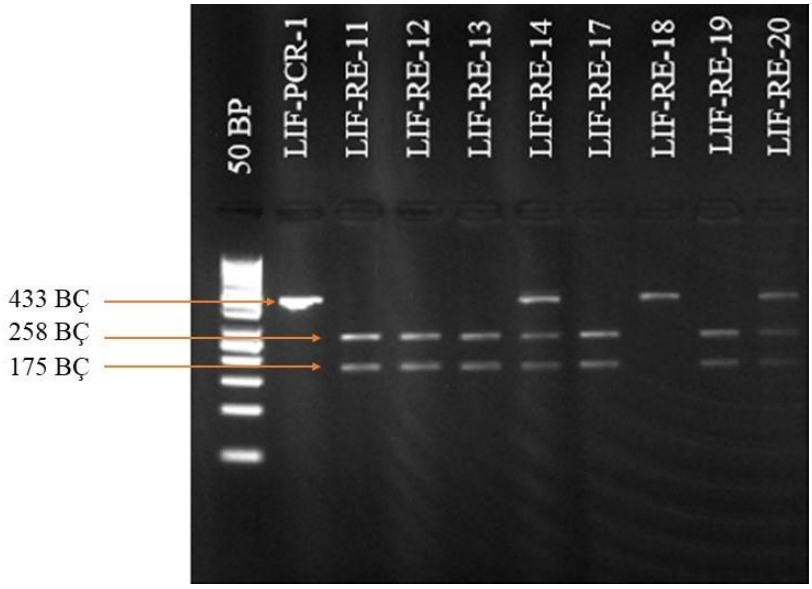
3.3.6. Jel elektroforezi

BCL2 geni rs2279115, rs4987856 ve *LIF* geni rs929271 polimorfizmleri için yapılan PZR sonrası ve RFLP yapılan rs929271 ve rs2279915 polimorfizmleri kesim sonrasında jele yüklenmiştir. PZR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenirken, kesim ürünleri %3'lük agaroz jele yüklenmiştir.

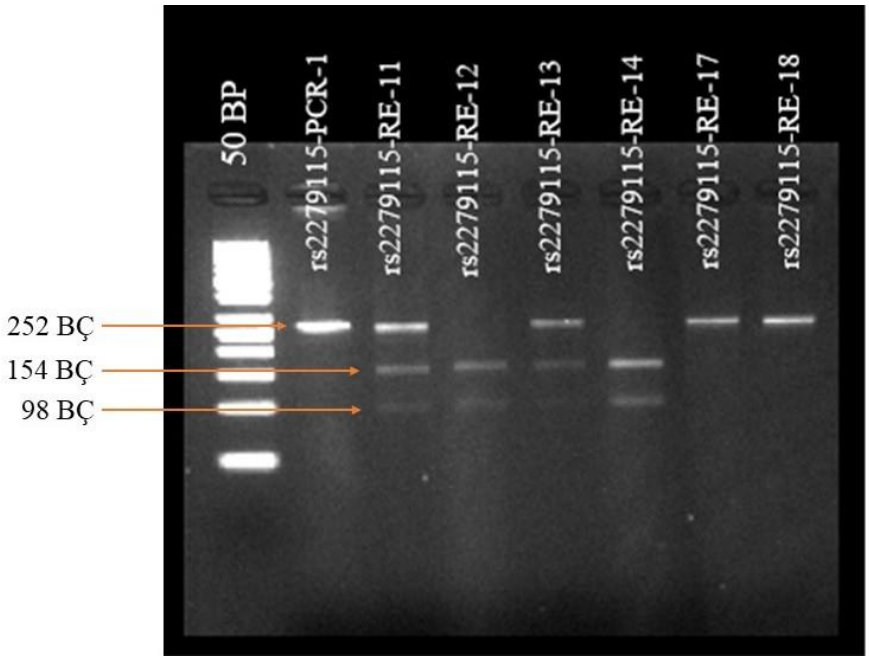
Uygulanan yöntemde;

1. PZR ürünleri için 140 ml 0.5X TBE tampon çözeltisine 1.4 gram agaroz eklenmiştir.
2. RFLP ürünleri için 140 ml 0.5X TBE tampon çözeltisine 4.2 gram agaroz eklenmiştir.
3. Çözelti mikrodalga fırında yaklaşık iki dakika ısıtılarak homojenize edilmiştir. Isınma esnasında mikrodalga fırın 30 saniye aralıklarla taşma ihtimaline karşı kontrol edilmiştir.
4. Çözelti tamamen homojen hale geldikten sonra soğumaya bırakılmış ve soğuma sonrasında etidyum bromür eklenip karıştırılmıştır.
5. Karıştırılan çözelti, önceden hazır edilip tarağı yerleştirilen tabağa beklemeden dökülmüştür.
6. Jelin polimerize olması için yaklaşık 15-20 dk boyunca beklenmiştir.
7. Kullanılacak olan tanka 0.5X TBE tampon çözeltisi doldurulmuştur.
8. Jel polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılmıştır. PZR ürünleri için hazırlanan jelin 1 kuyucuğuna 3.5 µl moleküler ağırlık belirleyicisi, geri kalanına ise 5 µl orange G ve 5 µl PZR ürünleri yüklenmiştir. RFLP için hazırlanan jelin bir kuyucuğuna 3.5 µl moleküler ağırlık belirleyicisi, 1 kuyucuğuna 5 µl orange G ve örnek PCR ürünü yüklenmiş ve geriye kalan kuyucuklara 5 µl RFLP ürünü ve 5 ul orange G yüklenmiştir.

9. Tüm kuyucuklara yükleme işlemi yapıldıktan sonra tank güç kaynağına bağlanıp sabit 120 V'da yürütülmüştür.
10. %1'lik ve %3'lük hazırlanan jeller, yürütme işlemi tamamlanana kadar 15 dakika aralıklarla durdurulmuş ve jel görüntüleme sistemi ile görüntüleri kaydedilmiştir.



Şekil 21. *Hinf1* restriksiyon endonükleaz enzimi ile fragmentlere ayrılan rs929271 polimorfizminin örnek görüntüsü. Kesilmemiş PZR ürünü 433 bç, TG genotipi (433, 258, 175 bç), TT genotipi (258, 175 bç), GG genotipi (433 bç). BÇ: Baz Çifti



Şekil 22. *Bcc1* restriksiyon endonükleaz enzimi ile fragmentlere ayrılan rs2279115 polimorfizminin örnek görüntüsü. Kesilmemiş PZR ürünü 252 bç, AC genotipi (252, 154, 98 bç), AA genotipi (154, 98 bç), GG genotipi (252 bç). BÇ: baz çifti

3.3.7. SNaPshot yöntemi

Bu yöntem, *BCL2* genindeki rs4987856 polimorfizminin genotiplemesi için kullanılmıştır. SNaPshot yönteminde uygulanan işlemler aşağıdaki gibidir:

1. PZR ürünleri 1:10 oranında dilüe edilmiştir. Her bir PZR ürününden 2 µl, 18µl nükleaz içermeyen suya eklenmiş, ardından spin işlemi yapılmıştır.
2. Dilüe edilen PZR ürünleri (5 µl), Thermofisher Scientific marka ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (2 µl) ile karıştırılmış, santifüj yapılmış, ardından termal döngüleyici cihazına yerleştirilerek pürifiye edilmiştir (Tablo 10).
3. Her bir reaksiyon için SNaPshot® Multiplex Kit içeriğindeki Snapshot multiplex mix'ten 2.5 µl, nükleaz içermeyen sudan 5 µl ve snapshot reaksiyonu için tasarlanan 2 pmol/µl forward primerden (5'-TGAAATGCAGTGGTGCTTAC-3') 1µl ve pürifiye edilen PZR ürününden 1.5 µl kullanılmıştır.
4. Hazırlanan tüpler karıştırılıp santifüj edilmiştir ve termal döngüleyicide bekletilmiştir (Tablo 11).

5. Termal döngüleyici programı tamamlandıktan sonra her birinde 96 kuyucuk bulunan plate'lerin her bir kuyucuğuna 10µl Hi-Di formamid, 0.3 µl GeneScan™-120 LIZ™ Size Standard ve 1 µl PZR ürünü eklenmiştir.
6. Plate santrifüj edildikten sonra 3130xl Genetic Analyzer sekans cihazına yüklenmiştir.

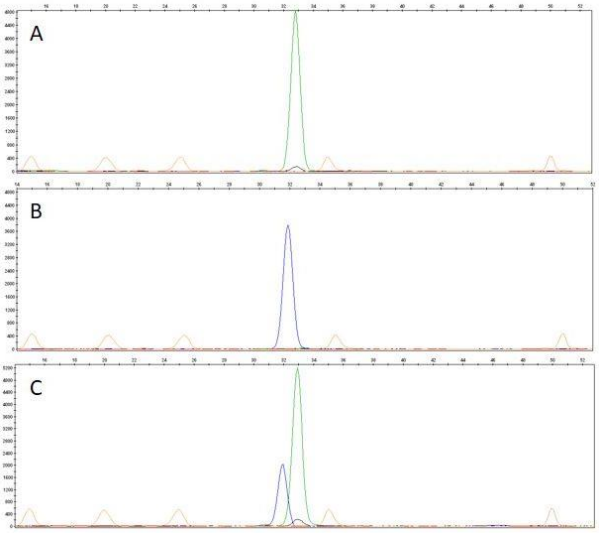
Tablo 10. PZR ürünlerinin pürifikasyonları için kullanılan termal döngüleyici programı.

37°C	30 dk
80°C	15 dk
4°C	∞

Tablo 11. Snapshot yöntemi için termal döngüleyici programı.

96°C	1 dk	
96°C	10 sn	25 döngü
50°C	5 sn	
60°C	30 sn	
4°C	∞	

Elde edilen sonuçlar Genemapper Software v4.0 ile analiz edilmiştir.



Şekil 23. *BCL2* genindeki rs4987856 polimorfizmi için örnek SNaPshot yöntemi sonuçları. SNaPshot Reaction Ready Mix içinde bulunan ddNTP'lerden (ddATP, ddUTP, ddCTP ve ddGTP) uygun olan nükleotit, polimorfizmden hemen önce bağlanmış olan *forward* primerin bir sonraki dizisine (polimorfik nükleotit) eklenir (adenin (yeşil), sitozin (siyah), guanin (mavi), timin (kırmızı)). **(A)** Grafikte sadece yeşil pik görülmektedir (AA genotipi) **(B)** Grafikte sadece mavi pik görülmektedir (GG genotipi). **(C)** Grafikte hem mavi hem de yeşil pik görülmektedir (AG)**.**

3.3.8. İstatistiksel analiz

Çalışmada istatistiksel analiz IBM SPSS Statistics 25 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değişkenlerin demografik özelliklerine ilişkin bilgiler kesikli değişkenler için frekans ve yüzde olarak verilirken, sürekli veriler için bilgiler ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. Kesikli değişkenlere ilişkin karşılaştırmalarda Ki-kare test istatistiği kullanılarak, sürekli değişkenlere ilişkin karşılaştırmalarda ise Kolmogorov Smirnov testi ile normallik sınaması yapıldıktan sonra Independent Sample t Test kullanılmıştır. Çalışma kapsamında tüm istatistiksel analizler $p<0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Hasta ve kontrol grubu *dâhil*, çalışmaya toplam 234 kişi katılmıştır. Çalışmaya katılan bu kişilerin yaşları 0-18 arasında değişmektedir. Tablo 12'de hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımına dair bilgiler bulunmaktadır.

Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımı (K: Kadın E: Erkek)

		Hasta n (%)	**Kontrol n (%)**	**Toplam n**
Cinsiyet	**K**	61 (%47.3)	47 (%44.8)	108
	E	68 (%52.7)	58 (%55.2)	126
Toplam		129	105	234

Hasta grubunda 68 erkek, 61 kadın, kontrol grubunda ise 58 erkek, 47 kadın bulunmaktadır. Genel hasta grubu ve kontrol grubu asasında hastalık görülme sıklığının yaşa ve tanı yaşına göre dağılımı Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. Genel hasta grubu ve kontrol grubu arasında hastalık görülme sıklığının yaşa ve tanı yaşına göre dağılımı

	Kontrol n /(%)		**Hasta n /(%)**		**p değeri**
	Ort.	**SS.**	**Ort.**	**SS.**	
Yaş	10.61	5.32	10.46	5.67	0.837
Tanı yaşı			4.47	4.99	

Yaşa göre hastalık görülme sıklıklarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur (p=0.837).

Hasta grubunun aldıkları tanılara göre gruplandırılması Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 14. Hasta grubunun aldıkları tanılara göre gruplandırılması

Klinik Bulgu	**Sayı n (%)**	**Cinsiyet (E/K) n**	**Tanı Yaşı (Ay) – (Ort.)**
Anormal Böbrek Fonksiyonları	1 (%0.8)	1/0	192
Böbrek Taşı	5 (%3.9)	3/2	84.00
Hidronefroz	31 (%24)	25/6	21.01
Tekrarlayan İdrar Yolu Enfeksiyonu	6 (%4.7)	2/4	64.13
Kronik Böbrek Yetmezliği	16 (%12.4)	10/6	107.44
Kontrakte Böbrek	1 (%0.8)	0/1	120.00
Renal Agenezi	3 (%2.3)	1/2	48.00
Renal Displazi	2 (%1.6)	0/2	24.00
Tek Taraflı Küçük böbrek	1 (%0.8)	1/0	132.00
Son Dönem Böbrek Hastalığı	3 (%2.3)	3/0	72.67
Üriner Sistem Enfeksiyonu	26 (%20.1)	9/17	53.38
Vezikoüreteral Reflü	31 (%24.0)	10/21	53.02
Kistik Böbrek	3 (%2.3)	3/0	2.00
Toplam	129 (%100)	68/61	54.58

Konjenital böbrek anomalisi (CAKUT) başlığında toplanan hasta grubunda vezikoüreteral reflü tanısı alan 31, üriner sistem enfeksiyonu olan 26, hidronefroz tanısı alan 31 ve kronik böbrek yetmezliği olan 16 hasta vardır.

CAKUT tanılı hastaların ve kontrollerin *BCL2* geni rs2279115 numaralı SNP'te saptanan genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. *BCL2* geni rs2279115 numaralı SNP'de saptanan genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı

	Genotip(Allel)	Hasta N (%)	Kontrol N (%)	p değeri	Göreceli Olasılıklar Oranı (%95 Güven Aralığı)
***BCL2* rs2279115**	**AA**	26 (%20.2)	26 (%24.8)	0.229	
	AC	75 (%58.1)	65 (%61.9)		
	CC	28 (%21.7)	14 (%13.3)		
	A	101(%78.3)	91 (%86.7)	**0.000**	16,000 (10,158 - 25,203)
	C	28 (%21.7)	14 (%13.3)		

BCL2 geni rs2279115 SNP'i için genotip frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p=0,229). *BCL2* geni rs2279115 SNP'i için allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı, istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,000). Anlamlı fark içeren bu grubun yapılan istatistiki analizinde göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 16,000 (10.158 – 25.203) bulunmuştur.

CAKUT tanılı hastaların ve kontrollerin *BCL2* geni rs4987856 numaralı SNP'te saptanan genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. *BCL2* geni rs4987856 numaralı SNP'de saptanan genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı

	Genotip(Allel)	Hasta N (%)	Kontrol N (%)	p değeri	Göreceli Olasılıklar Oranı (%95 Güven Aralığı)
***BCL2* rs4987856**	**AA**	3 (%2.3)	0 (%.0)	0.117	
	GA	28 (%21.7)	16 (%15.2)		
	GG	98 (%76.0)	89 (%84.8)		
	A	31 (%24.0)	16 (%15.2)	**0.000**	19,353 (5,929 - 63,168)
	G	98 (%76.0)	89 (%84.8)		

BCL2 geni rs4987856 SNP'i için genotip frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p=0,117). *BCL2* geni rs4987856 SNP'i için allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı, istatistiksel olarak anlamlıdır

(p=0,000). Anlamlı fark içeren bu grubun yapılan istatistiki analizinde göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 19.353 (5.929 – 63.168) bulunmuştur.

CAKUT tanılı hastaların ve kontrollerin *LIF* geni rs929271 numaralı SNP'te saptanan genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17. *LIF* geni rs929271 numaralı SNP'de saptanan genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı

	Genotip(Allel)	**Hasta N (%)**	**Kontrol N (%)**	**p değeri**	**Göreceli Olasılıklar Oranı (%95 Güven Aralığı)**
***LIF* rs927271**	**GG**	13 (%10.1)	11 (%10.5)	0.826	
	TG	68 (%52.7)	59 (%56.2)		
	TT	48 (%37.2)	35 (%33.3)		
	G	81(%62.8)	70 (%66.7)	0.000	15,919 (9,654 - 26,247)
	T	48 (%37.2)	35 (%33.3)		

LIF geni rs929271 SNP'i için genotip frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p=0,826). *LIF* geni rs929271 SNP'i için allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı, istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,000). Anlamlı fark içeren bu grubun yapılan istatistiki analizinde göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 15.919 (9.654 – 26.247) bulunmuştur.

LIF geni rs929271 SNP'i ve *BCL2* geni rs2279115 SNP'inde saptanan ikili genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18. *LIF* geni rs929271 SNP'i ve *BCL2* geni rs2279115 SNP'inde saptanan ikili genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı

	rs929271	rs2279115	Hasta n/(%)	Kontrol n/(%)	p	Göreceli Olasılıklar Oranı (%95 Güven Aralığı)
***LIF* rs929271 *BCL-2* rs2279115**	**GG**	**AA**	2 (%15.4)	2 (%18.2)	0.397	
		AC	9 (%69.2)	9 (%81.8)		
		CC	2 (%15.4)	0 (%0.0)		
	TG	**AA**	16 (%23.5)	18 (%30.5)	0.360	
		AC	38 (%55.9)	34 (%57.6)		
		CC	14 (%20.6)	7 (%11.9)		
	TT	**AA**	8 (%16.7)	6 (%17.1)	0.864	
		AC	28 (%58.3)	22 (%62.9)		
		CC	12 (%25.0)	7 (%20.0)		
	G	**A**	67 (%71.3)	65 (%80.2)	0.169	0,611 (0,301 - 1,238)
		C	27 (%28.7)	16 (%19.8)		
	T	**A**	60 (%36.6)	52 (%40.3)	0.515	0,854 (0,532 - 1,372)
		C	104 (%63.4)	77 (%59.7)		

LIF geni rs929271 SNP'i ve *BCL2* geni rs2279115 SNP'i için genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

LIF geni rs929271 SNP'i ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde saptanan ikili genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. *LIF* geni rs929271 SNP'i ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde saptanan ikili genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı

	rs929271	rs4987856	Hasta n/(%)	Kontrol n/(%)	p	Göreceli Olasılıklar Oranı (%95 Güven Aralığı)
***LIF* rs929271 *BCL-2* rs4987856**	**GG**	**AA**	1 (%7.7)	0 (%0.0)	0.594	
		GA	3 (%23.1)	2 (%18.2)		
		GG	9 (%69.2)	9 (%81.8)		
	TG	**AA**	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0.059	
		GA	17 (%25.0)	7 (%11.9)		
		GG	51 (%75.0)	52 (%88.1)		
	TT	**AA**	2 (%4.2)	0 (%0.0)	0.453	
		GA	8 (%16.7)	7 (%20.0)		
		GG	38 (%79.2)	28 (%80.0)		
	G	**A**	22 (%23.4)	9 (%11.1)	**0,034**	2,444 (1,054 - 5,671)
		G	72 (%76.6)	72 (%88.9)		
	T	**A**	12 (%7.3)	7 (%5.4)	0.514	1,376 (0,526 - 3,601)
		G	152(%92.7)	122 (%94.6)		

LIF geni rs929271 SNP'i ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'i için allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımında anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0.034). Anlamlı fark içeren bu grubun yapılan istatistiki analizinde göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 2.444 (1.054 – 5.671) bulunmuştur.

BCL2 geni rs2279115 SNP'i ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde saptanan ikili genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. *BCL2* geni rs2279115 ve rs4987856 SNP'lerinde saptanan ikili genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı

	rs2279115	**rs4987856**	**Hasta n/(%)**	**Kontrol n/(%)**	**p**	**Göreceli Olasılıklar Oranı (%95 Güven Aralığı)**
***BCL-2* rs2279115** ***BCL-2* rs4987856**	**AA**	**AA**	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0.090	
		GA	8 (%30.8)	3 (%11.5)		
		GG	18 (%69.2)	23 (%88.5)		
	AC	**AA**	3 (%4.0)	0 (%0.0)	0.228	
		GA	16 (%21.3)	12 (%18.5)		
		GG	56 (%74.7)	53 (%81.5)		
	CC	**AA**	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0.500	
		GA	4 (%14.3)	1 (%7.1)		
		GG	24 (%85.7)	13 (%92.9)		
	A	**A**	27 (%21.3)	15 (%12.8)	0.081	1,836 (0,922 - 3,656)
		G	100 (%78.7)	102 (%87.2)		
	C	**A**	7 (%5.3)	1 (%1.1)	0.090	5,194 (0,628 - 42,948)
		G	124 (%94.7)	92 (%98.9)		

BCL2 geni rs2279115 SNP'i ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'i için genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

BCL2 geni rs2279115 SNP'i, *BCL2* geni rs4987856 SNP'i ve *LIF* geni rs92927 SNP'inde saptanan üçlü genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. *BCL2* geni rs2279115 SNP'i, *BCL2* geni rs4987856 SNP'i ve *LIF* geni rs92927 SNP'inde saptanan üçlü genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı

	rs2279115	**rs4987856**	**rs929271**	**Hasta**	**Kontrol**	**p**	**Göreceli Olasılıklar Oranı (%95 Güven Aralığı)**
***BCL-2* rs2279115** ***BCL-2* rs498 7856** ***LIF* rs929271**	**AA**	**AA**	**GG**	0 (%0.0)	0 (%0.0)	P değeri hesaplanmadı	
			TG	0 (%0.0)	0 (%0.0)		
			TT	0 (%0.0)	0 (%0.0)		
		GA	**GG**	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0.201	
			TG	6 (%75.0)	1 (%33.3)		
			TT	2 (%25.0)	2 (%66.7)		
		GG	**GG**	2 (%11.1)	2 (%8.7)	0.443	
			TG	10 (%55.6)	17 (%73.9)		
			TT	6 (%33.3)	4 (%17.4)		
	AC	**AA**	**GG**	1 (%33.3)	0 (%0.0)	P değeri hesaplanmadı	
			TG	0 (%0.0)	0 (%0.0)		
			TT	2 (%66.7)	0 (%0.0)		
		GA	**GG**	2 (%12.5)	2 (%16.7)	0.931	
			TG	9 (%56.3)	6 (%50.0)		
			TT	5 (%31.3)	4 (%33.3)		
		GG	**GG**	6 (%10.7)	7 (%13.2)	0.886	
			TG	29 (%51.8)	28 (%52.8)		
			TT	21 (%37.5)	18 (%34.0)		
	CC	**AA**	**GG**	0 (%0.0)	0 (%0.0)	P değeri hesaplanmadı	
			TG	0 (%0.0)	0 (%0.0)		
			TT	0 (%0.0)	0 (%0.0)		
		GA	**GG**	1 (%25.0)	0 (%0.0)	0.392	
			TG	2 (%50.0)	0 (%0.0)		
			TT	1 (%25.0)	1 (%100.0)		
		GG	**GG**	1 (%4.2)	0 (%0.0)	0.753	
			TG	12 (%50.0)	7 (%53.8)		
			TT	11 (%45.8)	6 (%46.2)		
	A	**A**	**T**	18 (%66.7)	9 (%60.0)	0.666	1,333 (0,361 - 4,925)
			G	9 (%33.3)	6 (%40.0)		
		G	**T**	49 (%49.0)	56 (%54.9)	0.401	0,789 (0,454 - 1,372)
			G	51 (%51.0)	46 (%45.1)		
	C	**A**	**T**	4 (%57.1)	0 (%0.0)	0.285	1,333 (0,757 - 2,348)
			G	3 (%42.9)	1 (%100.0)		
		G	**T**	23 (%18.5)	16 (%17.4)	0.827	1,082 (0,535 - 2,187)
			G	101 (%81.5)	76 (%82.6)		

BCL2 geni rs2279115 SNP'i, *BCL2* rs4987856 SNP'i ve *LIF* geni rs929271 SNP'i için genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Konjenital böbrek ve üriner sistem anomalisi (CAKUT), böbrekleri ve idrar yolları malformasyonlarının tümünü kapsar ve böbrek, toplayıcı sistem, mesane ve üretranın yapısal ve fonksiyonel anormalliklerine neden olur. CAKUT, bazı popülasyonlarda tüm fetal konjenital anomalilerin %20-50'sinde tanımlanmış olsa da nedenleri halen belirsizliğini korumaktadır (1). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda minimum 50 gende meydana gelen değişikliklerin, otozomal dominant veya resesif kalıtım modelinde CAKUT'a neden olduğu gösterilmiştir. Ancak bu genler, vakaların sadece %10-20'sini açıklayabilmektedir (2). CAKUT'un spektrumu oldukça geniştir ve çift üreter veya minimal üreteral pelvik tıkanıklıklar gibi hafif, asemptomatik malformasyonlardan bilateral renal agenezi veya renal displazi gibi ciddi patolojilere kadar çeşitlilik gösterdiği için yüksek heterojenitesi vardır (3). Yapısal böbrek anomalileri nefrogenezdeki kusurlardan kaynaklanabilir. İdrar yolu morfogenezinde gebelikten önce veya gebelik sırasında mevcut olan çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörlerin de yetersiz böbrek gelişiminde rol oynadığı varsayılmaktadır (4, 5). Bu çalışmanın amacı apoptozu inhibe ederek nefrogenezde etkin rol alan *BCL2* genindeki rs2279115 ve rs4987856 polimorfizmlerinin ve JAK/STAT, MAPK, PI3K gibi yolaklarda ve nefrogenezde görev yapan *LIF* genindeki rs929271 polimorfizminin CAKUT hastalığı ile ilişkisini araştırmaktır.

B hücreli lenfoma 2 *(BCL2)* programlanmış hücre ölümünün önemli düzenleyicilerinden biridir (6,7). *BCL2* geni 18. kromozomun q kolunun 21. lokusunda yer alır (19q21.33). Bcl2, BCL-xL, BAX, BAK, BAD proteinleri, *BCL2* gen ailesine üyedir ve bütün bu proteinler apoptozun düzenlenmesinde rol alır (36,37). *BCL2* geninde meydana gelen polimorfizmlerin böbrek ve üriner sistem anomalileri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (39, 46). Bu çalışmada *BCL2* geninde yer alan 2 polimorfizmin CAKUT hasta grubundaki sıklıkları incelenmiştir. Bu polimorfizmler rs2279115 (c.-717C>A) (NM_000633.2) ve rs4987856'dır ((c.*2364G>A) (NM_000633.2)).

BCL2'nin P1 ve P2 olmak üzere iki promotörü vardır. Majör transkripsiyonel promotör olan Pl, translasyon başlangıç bölgesinin 1386 ile 1423 bp yukarı akışında bulunur. P2 ise P1'den 1.3 kb aşağı akışta bulunur (43,44). rs2279115 *BCL2* geninin P2 5'promotör bölgesinde bulunan ve *BCL2* geninin ifadelenmesini düzensizleştiren fonksiyonel bir polimorfizmdir. C atasal alelinin mutant A aleline dönüşmesi rs2279115 polimorfizmi olarak tanımlanır.

miRNA'lar gen ifadelenmesinin posttranskripsiyonel seviyede kontrol edilmesinde görev alırlar ve hedeflenen mRNA'ların 3'UTR'sine bağlanarak protein üretiminin mRNA seviyesinde kontrol edilmesini sağlarlar (42, 45). rs4987856, *BCL-2* geninin 3'UTR bölgesinde miRNA-195 bağlanma bölgesinde yer alır. Bu pozisyonda G nükleotidinin A'ya dönüşmesi sonucunda gen ifadelenmesinin etkilendiği gösterilmiştir (48, 49).

Nefrogenezde apoptozun yanı sıra diğer biyolojik süreçlerin de önemi büyüktür. Lösemi inhibitör faktörü (*LIF*), birçok biyolojik süreçte aktif olarak görev alan önemli bir sitokindir. Lösemi İnhibitör Faktörü (*LIF*) geni, 22. kromozomun q kolunun 12. lokusunda bulunur (22q12.1-q12.2) ve interlokin-6 (IL-6) sınıfı sitokinlerin multifonksiyonel bir üyesidir. (9, 10, 37). *LIF* geninin JAK/STAT, MAPK, PI3K ve diğer sinyal yolaklarında, bu glikoproteinin hücre büyümesi inhibisyonu ile ilişkili görevleri vardır. Birçok hastalık, bu yolaklarda meydana gelen düzensizlikler ile bağlantılıdır (10, 12). Bu çalışmada *LIF* geninde yer alan rs929271 polimorfizmi incelenmiştir ((c.*1414A>C) (NM_002309.4)).

3' UTR'ler mRNA'ların kodlanmayan kısımlarıdır. rs929271 polimorfizmi *LIF* geninin 3'UTR bölgesinde bulunur (11). mRNA'ların 3' UTR bölgeleri mRNA lokalizasyonu, stabilitesi ve translasyon gibi süreçleri düzenler (56, 57, 58). Yapılan çalışmalarda bu polimorfizmde görülen T allelinin G alleline dönüşmesi sonucunda *LIF* mRNA'sının katlanma yapısını değiştirdiği ve miRNA'lar tarafından hedeflenen *LIF* geninin düzenlenmesinde etkili olduğu bulunmuştur (59). Bütün bu veriler *LIF* geninde meydana gelen rs929271 polimorfizminin bahsi geçen yolaklarda ve nefrogenezde önemli görevlerinin olması nedeniyle bu genin CAKUT ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda KA18/189 numaralı projede kullanılan ve Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi Pediatrik Nefroloji Anabilim Dalı'nda takip edilen 0-18 yaş arası hasta ve kontrol grupları kullanılmıştır. Hasta grubuna 129 CAKUT tanılı hasta, kontrol grubuna herhangi bir üriner sistem anomalisi bulunmayan ve genel pediatri kliniğine başvuran benzer yaş ve cinsiyette 105 hasta dahil edilmiştir. Hasta alt grupları hidronefroz, vezikoüretel reflü, idrar yolu enfeksiyonu, kronik böbrek yetmezliği, renal hipoplazi ve agenezi olarak belirlenmiştir. CAKUT, yüksek klinik heterojeniteye sahip olmasına rağmen, bu çalışmada toplamda 129 kişiden oluşan hasta grubunda vezikoüreteral reflü tanısı alan 31, üriner sistem enfeksiyonu olan 26, hidronefroz tanısı alan 31 ve kronik böbrek yetmezliği olan 16 hasta vardır. Hasta grubundaki bu tanıları alan kişiler, tüm hasta grubunun %80.62'sini oluşturmaktadır. Bu nedenle yapılan istatistiksel analizler daha çok sayıca ağırlığı daha çok olan bu hastalıkları yansıtmaktadır.

Hasta ve kontrol grubu dahil, çalışmaya toplam 234 kişi katılmıştır. Hasta grubunda 68 erkek, 61 kadın, kontrol grubunda ise 58 erkek, 47 kadın bulunmaktadır. Yapılan istatistiksel analizler neticesinde yaşa ve tanı yaşına göre hastalık görülme sıklıklarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı bulunmuştur (p=0.837).

Çalışmada 3 farklı başlıkta analizler yapılmıştır. Tekli analizlerde sadece tek bir gen için genotip ve allel frekansları hasta ve kontrol grupları arasında değerlendirilmiştir. İkili analizlerde ise, çalışmada incelenen 3 genin ikili kombinasyonları olarak gruplandırılmış ve bu gruplar içinde her iki gende yer alan atasal homozigot, heterozigot ve homozigot mutant genotiplerinin ve atasal ve mutant allellerinin ikili kombinasyonlarının hasta ve kontrol gruplarındaki görülme sıklıkları değerlendirilmiştir. Üçlü analizde ise tüm genler birlikte değerlendirilmiş olup her üç genin atasal homozigot, heterozigot ve homozigot mutant genotiplerinin ve atasal ve mutant allellerinin üçlü kombinasyonlarının hasta ve kontrol gruplarındaki görülme sıklıkları değerlendirilmiştir.

Yapılan tekli analizlerde *BCL2* geni rs2279115, rs4987856 ve *LIF* geni rs4987856 için genotip frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (sırasıyla p=0,229, p=0.117, p=0.826). Bununla birlikte *BCL2* geni rs2279115, rs4987856 ve *LIF* geni rs929271 için allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımlarının farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (sırasıyla p=0.000, p=0.000, p=0.000).

Tekli analizde *BCL2* geni rs2279115 SNP'inde atasal allel C'nin mutant A alleline dönüşmesi sonucu göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 16,000 (10.158 – 25.203) bulunmuştur. Bu durumda, atasal C allelinin mutant A alleline dönüşmesi, CAKUT hastalığının görülme riskini 16 kat arttırmaktadır. *BCL2* geni rs2279115 SNP'inin *BCL2* promotör aktivitesini inhibe etmesi ve bu genin nefrogenezdeki etkin rolünden dolayı elde edilen sonuçlar çalışmanın hipotezini desteklemektedir.

BCL2 geninin diğer bir polimorfizmi olan rs4987856'nın tekli analizinde ise atasal allel G'nin mutant A alleline dönüşmesi sonucu göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 19,353 (5,929 - 63,168) olarak bulunmuştur. Başka bir ifade ile atasal G allelinin mutant A alleline dönüşmesi, CAKUT hastalığının görülme riskini yaklaşık 19 kat arttırmaktadır. rs4987856 SNP'i miRNA-195 bağlanma bölgesindeki varyantı olduğu için ve bu değişimin genin ifadelenmesini değiştireceği için elde edilen sonuçlar ile çalışmanın hipotezi uyumludur.

Tekli analizde *LIF* geni rs929271 SNP'inde atasal allel C'nin mutant A alleline dönüşmesi sonucu göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 15,919 (9,654 - 26,247) bulunmuştur. Başka bir deyişle, atasal T allelinin mutant G alleline dönüşmesi, CAKUT hastalığının görülme riskini yaklaşık 16 kat arttırmaktadır. *LIF* geni rs929271 SNP'inin nefrogenezin yanı sıra diğer biyolojik süreçlerde büyük rol üstlendiği için elde edilen sonuçlar ile çalışmanın hipotezi ile aynı yöndedir.

LIF geni rs929271 SNP'i ve *BCL2* geni rs2279115 SNP'inin ikili analizinde genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamış olup, *LIF* geni rs929271 SNP'inde mutant G alleli ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde mutant A allelinin birlikte görülme sıklığının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımının istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur ($p=0.034$). Anlamlı fark içeren bu grubun yapılan istatistiki analizinde göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 2.444 (1.054 – 5.671) bulunmuştur. Başka bir deyişle, bahsedilen bu iki değişimin aynı anda görülmesi CAKUT hastalığının görülme riskini yaklaşık 2.5 kat arttırmaktadır. *BCL2* geni rs4987856 SNP'inin miRNA-195 bağlanma bölgesindeki G>A varyantı olduğunu ve protein üretimini mRNA seviyesinde etkilediği, *LIF* geni rs929271 polimorfizminin *LIF* geninin 3'UTR bölgesinde bulunduğu ve mRNA'ların 3'UTR bölgelerinin mRNA lokalizasyonu, stabilitesi ve translasyon gibi süreçleri düzenlenlediği düşünülecek olursa bu iki polimorfizmin genlerin ifadelenmesini mRNA seviyesinde etkilediği görülmektedir. CAKUT kliniği ile ilişkileri göz önüne alındığında bu iki polimorfizmin tek tek analizine göre ikili analizlerinde daha düşük bir göreceli olasılık oranı olduğu saptanmıştır.

Tekli analizde *BCL2* geni rs2279115 SNP'inde atasal allel C'nin mutant A alleline dönüşmesi, rs4987856 SNP'inde atasal allel G'nin mutant A alleline dönüşmesi ve *LIF* geni rs929271 SNP'inde atasal allel C'nin mutant A alleline dönüşmesi durumlarının göreceli olasılıklar oranları, *LIF* geni rs929271 SNP'inde mutant G alleli ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde mutant A allelinin birlikte görülme sıklığının göreceli olasılıklar oranına göre çok daha yüksektir.

Ayrıca yapılan bu ikili analizde *LIF* geni rs929271 SNP'inde heterozigot olan TG genotipinin ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde atasal heterozigot GA genotipinin birlikte görülmesinin hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımında anlamlı bir farklılığa yol açmadığı bulunmuştur ($p=0.059$). Ancak istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilen $p<0.05$ değerine oldukça yakın olan bu değer hasta ve kontrol grubundaki kişi sayıları arttırılarak veya

sadece vezikoüreteral reflü, üriner sistem enfeksiyonu, hidronefroz ve kronik böbrek yetmezliği tanısı alan hastalarla çalışma yapılarak aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

BCL2 geni rs2279115 SNP'i ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'i için yapılan ikili analizlerde genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadığı gibi, *BCL2* geni rs2279115 SNP'i, *BCL2* rs4987856 SNP'i ve *LIF* geni rs929271 SNP'lerinin bir arada analiz edilmesi sonucu genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Yüksek heterojeniteye sahip CAKUT hastalığının patogenezinin aydınlatılması için uzun yıllardır araştırmalar sürmektedir. Bu çalışmadan elde edilen anlamlı istatistiksel veriler sayesinde CAKUT patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunulmuştur. Elde eldilen verilerle *BCL2* ve *LIF* geninde görülen polimorfizmlerin tek başına/birlikte CAKUT hastalığına yatkınlık oluşturduğu bu çalışma sonucunda anlaşılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla şimdiye kadar *BCL2* geni rs2279115, rs 4987856 polimorfizmleri ve *LIF* geni rs929271 polimorfizmlerinin CAKUT hastalığı ile ilişkisi araştırılmamıştır. Bu araştırma sayesinde literatürdeki eksik bilgiler doldurulmuştur.

Literatürde 50'den fazla gendeki değişikliklerin CAKUT'a neden olduğu gösterilmiştir; yapılan bu çalışmalarda *BCL2* ve *LIF* genlerinin de CAKUT patogenezinde rol oynayabileceği belirtilmektedir. 2018 yılında Al-Koofe ve arkadaşlarının yaptığı 120 lösemi hastası ve 110 kontrol grubundan oluşan çalışmada *BCL-2* gen promotöründe yer alan rs2279115 SNP'inde C atasal allelinin mutant A alelinin dönüşmesinin Irak popülasyonunda lösemi gelişme riskinin artmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, *BCL-2* gen polimorfizminin promotörleri ile lösemi gelişimi arasındaki ilişkiyi anlamak esastır (73). 2020 yılında Zhu ve arkadaşlarının 482 hasta ve 482 kontrol grubunda yaptığı çalışmada ise *BCL2* genindeki rs2279115 polimorfizminin gürültü kaynaklı işitme kaybına etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda *BCL2* rs2279115'in genotip frekansının kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (74). Ahmed ve arkadaşları, 270 kişide *BCL-2* rs2279115 SNP'i ve hepatit C virüsü (HCV) ile ilişkili hepatoselüler karsinom (HCC) duyarlılığı arasındaki ilişkiyi değerlenmiştir ve *BCL2*'deki bu polimorfizm ile hepatit virüsü ile ilişkili hepatoselüler karsinoma duyarlılık arasındaki ilişkiyi kanıtlamıştır (75). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *BCL2* geninde yer alan rs2279115 polimorfizminin CAKUT ile ilişkisi araştırılmamıştır. Çalışmamızda *BCL2* genindeki rs2279115 polimorfizmi CAKUT hastalığının görülme riskini

yaklaşık 19 kat arttırmaktadır. Bunun nedeni, rs2279115'in P2 promotörünü inhibe etmesi ve Bcl2 proteini ifadelenme seviyelerini değiştirmesi olduğu düşünülmektedir.

Literatürde *BCL2* geninde yer alan rs4987856 polimorfizminin miR-195 etkileşimini değiştirdiğine dair çalışmalar yapılmıştır. Reshmi ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada rs4987856 polimorfizminin miR-195 bağlanmasını zayıflattığı ve sonuç olarak BCL2 protein seviyelerinin artmasına ve daha yüksek rahim ağzı kanseri riskine yol açabileceği gösterilmiştir. Proteinlerin ikincil yapı tahmini ve bağlanma enerjileri üzerine yapılan diğer bir çalışmada da rs4987856 polimorfizminin *BCL2* ve miR-195 etkileşimini değiştirdiği ve myastenia gravis hastalığına yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir (48). Çalışmamızda *BCL2* genindeki rs4987856 polimorfizminde atasal G allelinin mutant A alleline dönüşmesi, CAKUT hastalığının görülme riskini yaklaşık 19 kat arttırmaktadır. Bunun nedeni literatürün de desteklediği gibi, gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenleyicileri olan miRNA'ların aynı anda çok sayıda geni hedefleyebilmesi ve çeşitli biyolojik yolları aynı anda düzenleyebilmeleri olabilir.

Literatürde *LIF* geni rs929271 polimorfizmine dair çok fazla çalışma olmamakla birlikte, Gulkovskyi ve arkadaşlarının 2015 yılında 64 hasta ve 238 kontrol grubunda yapılan bir çalışmada *LIF* geni rs929271 polimorfizmi ile idiyopatik zekâ geriliği arasında ilişki olduğu saptanmıştır (76). 2010 yılında 390 hasta ve 410 kontrol grubunda yapılan bir çalışmada rs929271 polimofizmi ile hebefrenik şizofreni hastalığıyla bağlantı olduğu bulunmuştur (59). 2019 yılında Heydarzadeh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kontrol grubu olarak en az iki tekrarlayan düşük yapmış 150 kadın hasta grubu ve en az iki sağlıklı doğum yapmış 150 kadın kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiş ve rs929271 polimorfizminin tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak plasenta lokalizasyonunu ve tekrarlayan gebelik kaybını öngörmek için rs929271 polimorfizminin potansiyel biyobelirteç olduğu ortaya konulmuştur (11). Çalışmamızda *LIF* geni rs929271 polimorfizminde atasal T allelinin mutant G alleline dönüşmesi, CAKUT hastalığının görülme riskini yaklaşık 16 kat arttırmaktadır. Bunun nedeni literatürde bahsi geçen çalışmaların da desteklediği gibi *LIF* geni rs929271 polimorfizmleri *LIF* seviyelerinde azalmalara sebep olması ve LIF/ERK/MAPK sinyal yoluyla sinir gelişimi, sinir korunması, gebelik kaybı gibi birçok biyolojik süreci etkilemesi olabilir.

Sonuç olarak, klinik olarak yüksek heterojeniteye sahip olan CAKUT hastalığında *BCL2* geni için rs2279115 ve rs4987856 ve *LIF* geni rs929271 SNP'lerinin genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımı istatistiksel olarak 3 farklı analiz ile

değerlendirilmiştir ve bu analizlerden 4 adet anlamlı p değeri elde edilmiştir. Literatürde ilk defa yapılan bu çalışma ile *BCL2* ve *LIF* genlerinde meydana gelen değişikliklerin CAKUT hastalığı ile ilişkisi olduğu bu çalışma ile gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Tekli analizde *BCL2* geni rs2279115 SNP'inde atasal allel C'nin mutant A alleline dönüşmesi sonucu göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 16,000 (10.158 – 25.203) bulunmuştur.
- *BCL2* geninin diğer bir polimorfizmi olan rs4987856'nın tekli analizinde ise atasal allel G'nin mutant A alleline dönüşmesi sonucu göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 19,353 (5,929 - 63,168) olarak bulunmuştur.
- Tekli analizde *LIF* geni rs929271 SNP'inde atasal allel C'nin mutant A alleline dönüşmesi sonucu göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 15,919 (9,654 - 26,247) bulunmuştur.
- *LIF* geni rs929271 SNP'inde mutant G alleli ve *BCL2* geni rs4987856 SNP'inde mutant A allelinin birlikte görülme sıklığının hasta ve kontrol grupları arasındaki dağılımının istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur (p=0.034). Anlamlı fark içeren bu grubun yapılan istatistiki analizinde göreceli olasılıklar oranı %95 güven aralığında 2.444 (1.054 – 5.671) bulunmuştur.

Öneriler:

- *BCL2* geni rs2279115, rs4987856 ve *LIF* geni rs929271 polimorfizlerinin CAKUT hastalığına etkisini daha detaylı incelemek için daha fazla sayıda hasta ve kontrol grubu ile çalışılması,
- CAKUT hastalığına sahip bireylerin çalışmaya dahil edilirken daha homojen bir grup oluşturulması,
- Çalışmada incelenen rs2279115, rs4987856 ve rs929271 polimorfizmlerinin CAKUT fenotipiyle ilişkilendirilebilmesi için bunların fonksiyonel etkilerinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

(1) Tain Y-L, Luh H, Lin C-Y, Hsu C-N. Incidence and Risks of Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract in Newborns: A Population-Based Case-Control Study in Taiwan. Medicine (Baltimore). 2016;95(5):e2659.

(2) Knoers NVAM, Renkema KY. The genomic landscape of CAKUT; you gain some, you lose some. Kidney Int. 2019;96(2):267–9.

(3) Rodriguez MM. Congenital Anomalies of the Kidney and the Urinary Tract (CAKUT). Fetal Pediatr Pathol. 2014;33(5–6):293–320.

(4) Renkema KY, Winyard PJ, Skovorodkin IN, Levtchenko E, Hindryckx A, Jeanpierre C, et al. Novel perspectives for investigating congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). Nephrol Dial Transplant. 2011;26(12):3843–51.

(5) Capone VP, Morello W, Taroni F, Montini G. Genetics of Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract: The Current State of Play. Int J Mol Sci. 2017;18(4).

(6) Searle CJ, Brock IW, Cross SS, Balasubramanian SP, Reed MW, Cox A. A *BCL2* promoter polymorphism rs2279115 is not associated with *BCL2* protein expression or patient survival in breast cancer patients. Springerplus. 2012;1:38.

(7) Ho J. The regulation of apoptosis in kidney development: implications for nephron number and pattern? Front Pediatr. 2014;2:128.

(8) Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The Role of *BCL2* Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. Adv Hematol. 2012;2012:524308.

(9) Yue X, Wu L, Hu W. The regulation of leukemia inhibitory factor. Cancer Cell Microenviron. 2015;2(3).

(10) Moudi M, Sargazi S, Heidari Nia M, Saravani R, Shirvaliloo M, Shakiba M. Polymorphism in the 3′-UTR of *LIF* but Not in the ATF6B Gene Associates with Schizophrenia Susceptibility: a Case-Control Study and In Silico Analyses. Journal of Molecular Neuroscience. 2020;70(12):2093–101.

(11) Heydarzadeh MJ, Mehmannavaz Y. Effects of rs929271 SNP in Leukemia Inhibitory Factor Gene on Recurrent Pregnancy Loss, Placental Location and Fetal Gender. 2019th-04–01 ed. Vol. 6, Gene Cell Tissue. Kowsar; 2019. p. e86579.

(12) Chuang PY, He JC. JAK/STAT signaling in renal diseases. Kidney Int. 2010;78(3):231–4.

(13) Amerman EC. Human anatomy & physiology. 2016.

(14) Assefa N, Tsige Y. Human Anatomy and Physiology For Nursing Students [Internet]. Availablefrom: https://www.cartercenter.org/resources/pdfs/health/ephti/library/lecture_notes/nursing_students/ln_human_anat_final.pdf

(15) Lescay HA, Jiang J, Tuma F. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ureter. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

(16) Grasso M, Caruso RP, Phillips CK. UPJ Obstruction in the Adult Population: Are Crossing Vessels Significant? Rev Urol. 2001;3(1):42–51.

(17) Westland R, Schreuder MF, Ket JCF, van Wijk JAE. Unilateral renal agenesis: a systematic review on associated anomalies and renal injury. Nephrol Dial Transplant. 2013;28(7):1844–55.

(18) Soloway HM. Bilateral and Unilateral Renal Agenesis. Ann Surg. 1939;109(2):267–73.

(19) Phua YL, Ho J. Renal dysplasia in the neonate. Curr Opin Pediatr. 2016;28(2):209–15.

(20) Cain JE, Di Giovanni V, Smeeton J, Rosenblum ND. Genetics of Renal Hypoplasia: Insights Into the Mechanisms Controlling Nephron Endowment. Pediatric Research. 2010;68(2):91–8.

(21) Nuraj P, Hyseni N. The Diagnosis of Obstructive Hydronephrosis with Color Doppler Ultrasound. Acta Inform Med. 2017;25(3):178–81.

(22) Johnston DL, Qureshi AH, Irvine RW, Giel DW, Hains DS. Contemporary Management of Vesicoureteral Reflux. Curr Treat Options Pediatr. 2016;2(2):82–93.

(23) Vivante A, Kohl S, Hwang D-Y, Dworschak GC, Hildebrandt F. Single-gene causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans. Pediatr Nephrol. 2014;29(4):695–704.

(24) Jain S, Chen F. Developmental pathology of congenital kidney and urinary tract anomalies. Clin Kidney J. 2019;12(3):382–99.

(25) Krause M, Rak-Raszewska A, Pietilä I, Quaggin SE, Vainio S. Signaling during Kidney Development. Cells. 2015;4(2):112–32.

(26) Brodbeck S, Englert C. Genetic determination of nephrogenesis: the Pax/Eya/Six gene network. Pediatr Nephrol. 2004;19(3):249–55.

(27) Hains D, Sims-Lucas S, Kish K, Saha M, McHugh K, Bates CM. Role of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Kidney Mesenchyme. Pediatric Research. 2008;64(6):592–8.

(28) Nishinakamura R, Takasato M. Essential roles of Sall1 in kidney development. Kidney International. 2005;68(5):1948–50.

(29) Carroll TJ, Park J-S, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. Dev Cell. 2005;9(2):283–92.

(30) Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. Development. 1998;125(21):4225–34.

(31) Penaloza C, Lin L, Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in development: shaping the embryo. Histochem Cell Biol. 2006;126(2):149–58.

(32) Morel DS, Taupin JL, Potier M, Deminière C, Potaux L, Gualde N, et al. Renal synthesis of leukaemia inhibitory factor (*LIF*), under normal and inflammatory conditions. Cytokine. 2000;12(3):265–71.

(33) Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M, Hayashi M, Saruta T. Leukemia inhibitory factor is involved in tubular regeneration after experimental acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 2003;14(12):3090–101.

(34) Barasch J, Yang J, Ware CB, Taga T, Yoshida K, Erdjument-Bromage H, et al. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by *LIF*. Cell. 1999;99(4):377–86.

(35) Youle RJ, Strasser A. The *BCL-2* protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(1):47–59.

(36) Bircan S, Çandır Ö, Kapucuoğlu N, Başpınar Ş. Bazal Hücreli Karsinom ve Çevre Nontümöral Epidermiste p53, *bcl-2* ve bax Ekspresyonu. Turkish Pathology. 2005;21(3–4):44–8.

(37) *BCL2* (B-Cell Leukemia/Lymphoma 2) [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_BCL2.html

(38) Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. *BCL-2* family isoforms in apoptosis and cancer. Cell Death Dis. 2019;10(3):177.

(39) GeneCards The Human Gene Database - *BCL2* Gene [Internet]. Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2

(40) Montovani J, Sales M, Pardini M. Detection of Protein BCL2/JH Rearrangement in Epidermoid Carcinomas of Mouth and Pharynx. Int Arch Otorhinolaryngol. 2010;14(3):288–93.

(41) Tsujimoto Y. Role of *Bcl-2* family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? Genes Cells. 1998;3(11):697–707.

(42) Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the *Bcl-2* family of proteins. Biochim Biophys Acta. 2004;1644(2–3):83–94.

(43) Chen N, Hu T, Gui Y, Gao J, Li Z, Huang S. Transcriptional regulation of *Bcl-2* gene by the PR/SET domain family member PRDM10. PeerJ. 2019;7:e6941.

(44) Javid J, Mir R, Mirza M, Imtiyaz A, Prasant Y, Mariyam Z, et al. CC genotype of anti-apoptotic gene *BCL-2* (-938 C/A) is an independent prognostic marker of unfavorable clinical outcome in patients with non-small-cell lung cancer. Clin Transl Oncol. 2015;17(4):289–95.

(45) Intrinsic Apoptosis Pathway - Creative Diagnostics [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: https://www.creative-diagnostics.com/intrinsic-apoptosis-pathway.htm

(46) Sorenson CM. *Bcl-2* family members and disease. Biochim Biophys Acta. 2004;1644(2–3):169–77.

(47) Qiu X-G, Chen Y-D, Yuan J, Zhang N, Lei T, Liu J, et al. Functional *BCL-2* rs2279115 Promoter Noncoding Variant Contributes to Glioma Predisposition, Especially in Males. DNA Cell Biol. 2019;38(1):85–90.

(48) Yang L, Wang J, Sun X, Cao Y, Ning S, Zhang H, et al. Identifying a polymorphic 'switch' that influences miRNAs' regulation of a myasthenia gravis risk pathway. PLoS One. 2014;9(8):e104827.

(49) Zhang N, Li X, Tao K, Jiang L, Ma T, Yan S, et al. *BCL-2* (-938C > A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. BMC Med Genet. 2011;12:48.

(50) Moudi M, Sargazi S, Heidari Nia M, Saravani R, Shirvaliloo M, Shakiba M. Polymorphism in the 3′-UTR of *LIF* but Not in the ATF6B Gene Associates with Schizophrenia Susceptibility: a Case-Control Study and In Silico Analyses. Journal of Molecular Neuroscience. 2020;70(12):2093–101.

(51) Fitzgerald KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE. *LIF*. In: Fitzgerald KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE, editors. The Cytokine FactsBook and Webfacts (Second Edition) [Internet]. London: Academic Press; 2001. p. 346–50. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780121551421500749

(52) *LIF* Protein Overview: Sequence, Structure, Function and Protein Interaction | Sino Biological [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: https://www.sinobiological.com/resource/lif/proteins

(53) Leduc K, Bourassa V, Asselin E, Leclerc P, Lafond J, Reyes-Moreno C. Leukemia inhibitory factor regulates differentiation of trophoblastlike BeWo cells through the activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP kinase-signaling pathways. Biol Reprod. 2012;86(2):54.

(54) Pace J, Paladugu P, Das B, He JC, Mallipattu SK. Targeting STAT3 signaling in kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol. 2019;316(6):F1151–61.

(55) Bousoik E, Montazeri Aliabadi H. 'Do We Know Jack' About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. Front Oncol. 2018;8:287.

(56) Mayr C. Regulation by 3'-Untranslated Regions. Annu Rev Genet. 2017 Nov 27;51:171–94.

(57) Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. Cell Mol Life Sci. 2012;69(21):3613–34.

(58) Mayr C. What Are 3' UTRs Doing? Cold Spring Harb Perspect Biol. 2019 Oct 1;11(10).

(59) Okahisa Y, Ujike H, Kunugi H, Ishihara T, Kodama M, Takaki M, et al. Leukemia inhibitory factor gene is associated with schizophrenia and working memory function. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2010;34(1):172–6.

(60) Oliveira JBA, Vagnini LD, Petersen CG, Renzi A, Oliveira-Pelegrin GR, Mauri AL, et al. Association between leukaemia inhibitory factor gene polymorphism and pregnancy outcomes after assisted reproduction techniques. Reprod Biomed Online. 2016;32(1):66–78.

(61) Arsham M, Barch M, Lawce H. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. 4th ed. Wiley; 2017. 21–22 p.

(62) Nussbaum R, McInnes R, Willard H. Genetics in Medicine. 8th ed. Thompson&Thompson; 2016. 45–46 p.

(63) Watson J, Gann A, Baker T. The Molecular Biology of the Gene. 7th ed. Pearson; 2014. 48 p.

(64) Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. J Invest Dermatol. 2013;133(3):1–4.

(65) What is PCR (polymerase chain reaction)? [Internet]. yourgenome. [cited 2021 Jun 27]. Available from: https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction

(66) Polymerase Chain Reaction [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/polymerase-chain-reaction

(67) Polymerase chain reaction (PCR) (article) | Khan Academy [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr

(68) Yang W, Kang X, Yang Q, Lin Y, Fang M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. J Anim Sci Biotechnol. 2013;4(1):2.

(69) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/

(70) Magnin S, Viel E, Baraquin A, Valmary-Degano S, Kantelip B, Pretet J-L, et al. A multiplex SNaPshot assay as a rapid method for detecting KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancers. J Mol Diagn. 2011;13(5):485–92.

(71) SNaPshot™ Multiplex Kit [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4323163#/4323163

(72) SNP Genotyping by Fragment Analysis - TR [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/sequencing/dna-sequencing/snp-genotyping-variant-detection-sequencing/snp-genotyping-fragment-analysis.html

(73) Al-Koofee DAF, Ismael JM. Genotyping of the *BCL2* Gene Polymorphism rs2279115 Shows Associations with Eukemia Tendencies in the Iraqi Population. Journal of Pure and Applied Microbiology. 2018;12:1899–904.

(74) Zhu H, Chen H, Ying H, Zhu B. Functional *BCL-2* rs2279115 Noncoding variant associated with noise-induced hearing loss in Chinese workers: a case-control study. J Public Health Emerg. 2020;4:32.

(75) Ahmed HS, Wahab EA, Elhady HA, et al. Association of genetic polymorphism of *BCL-2* (rs2279115) with susceptibility to HCV-related hepatocellular carcinoma. Immunol Res 2020;68:189-97.

(76) Gulkovskyi R, Volkova LS, Livshits L. Association of the leukemia inhibitory factor gene polymorphism rs929271 with idiopathic mild intellectual disability. Biopolymers & Cell. 2015;31:34–7.

Ek 1: Hasta Bilgileri

Hasta No	Tanı Yaşı (ay)	Cinsiyet	Endikasyon Bilgileri
1	24	Kadın	Kronik Böbrek Yetmezliği
2	1	Erkek	Kistik Böbrek Hastalığı
3	24	Kadın	Vezikoüretral Reflü
4	3	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
5	60	Erkek	Hidronefroz
6	2	Erkek	Hidronefroz
7	168	Erkek	Bardet-Biedl Sendromu-Kronik Böbrek Yetmezliği
8	12	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
9	12	Erkek	Hidronefroz
10	24	Kadın	Renal Displazi
11	48	Erkek	Kronik Böbrek Yetmezliği tanısı yazmıyor, esansiyel hipertansiyon tanısı var
12	4	Erkek	Polikistik Böbrek
13	132	Erkek	Küçük Böbrek Tek Taraflı
14	24	Kadın	Vezikoüretral Reflü
15	192	Erkek	Kronik Böbrek Yetmezliği
16	60	Erkek	Bileteral UV darlık,Hidronefroz, Kronik Böbrek Yetmezliği
17	132	Erkek	Son Dönem Böbrek Hastalığı
18	1	Erkek	Hidronefroz
19	12	Erkek	Hidronefroz
20	48	Kadın	Vezikoüretral Reflü, Üriner Sistem Enfeksiyonu
21	120	Kadın	Kontrakte Böbrek
22	1	Erkek	Hidronefroz
23	96	Kadın	Vezikoüretral Reflü
24	3	Kadın	Vezikoüretral Reflü
25	108	Kadın	Kronik Böbrek Yetmezliği
26	60	Kadın	Vezikoüretral Reflü
27	1	Erkek	Hidronefroz
28	9	Kadın	Vezikoüretral Reflü
29	4	Erkek	Hidronefroz
30	5	Erkek	Hidronefroz
31	96	Kadın	Vezikoüretral Reflü
32	36	Erkek	Soliter böbrek, Üriner Sistem Enfeksiyonu
33	1	Erkek	Üriner Sistem Enfeksiyonu
34	2	Erkek	Hidronefroz
35	108	Kadın	Düzelmiş VUR, Üriner Sistem Enfeksiyonu
36	204	Kadın	Kronik Böbrek Yetmezliği
37	24	Kadın	Vezikoüretral Reflü
38	3	Kadın	Hidronefroz
39	12	Erkek	Hidronefroz, PUV
40	2	Erkek	Üriner Sistem Enfeksiyonu
41	96	Kadın	Tekrarlayan İdrar Yolu Enfeksiyonu
42	2	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu, Hidronefroz

43	36	Kadın	Tekrarlayan İdrar Yolu Enfeksiyonu, Bilateral Vezikoüretral Reflü
44	2	Erkek	Son Dönem Böbrek Hastalığı
45	180	Erkek	Vezikoüretral Reflü, Kronik Böbrek Yetmezliği
46	72	Kadın	Vezikoüretral Reflü, Kronik Böbrek Yetmezliği, Böbrek Nakli
47	108	Kadın	Vezikoüretral Reflü, Böbrek Nakli
48	2	Erkek	Vezikoüretral Reflü
49	3	Erkek	Kronik Böbrek Yetmezliği, Böbrek Nakli
50	48	Erkek	Renal Agenezi, unilateral
51	48	Erkek	Kronik Böbrek Yetmezliği
52	216	Erkek	Tekrarlayan İdrar Yolu Enfeksiyonu
53	24	Erkek	Tekrarlayan İdrar Yolu Enfeksiyonu
54	0.66	Erkek	Vezikoüretral Reflü
55	216	Erkek	Vezikoüretral Reflü,Kronik Böbrek Yetmezliği, Böbrek Nakli
56	36	Erkek	Hidronefroz
57	168	Kadın	Kronik Böbrek Yetmezliği, Vezikoüretral Reflü
58	108	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu, Hidronefroz
59	36	Erkek	Vezikoüretral Reflü,Kronik Böbrek Yetmezliği, Böbrek Nakli
60	12	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
61	108	Erkek	Kronik Böbrek Yetmezliği, İdrar Yolu Enfeksiyonu
62	5	Erkek	Hidronefroz
63	0.5	Erkek	Konjenital Hidronefroz, Üriner Sistem Enfeksiyonu
64	12	Erkek	Vezikoüretral Reflü, Üriner Sistem Enfeksiyonu
65	108	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
66	96	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
67	12	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
68	48	Kadın	Hidronefroz
69	8	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
70	96	Erkek	Üriner Sistem Enfeksiyonu
71	192	Erkek	Kronik Böbrek Yetmezliği
72	24	Erkek	Böbrek Taşı
73	96	Erkek	Böbrek Taşı, Tekrarlayan Hemotüri, Flask Nöropatik Mesane
74	5	Erkek	Hidronefroz
75	0.36	Erkek	Hidronefroz, Vezikoüretral Reflü
76	2	Kadın	Hidronefroz, Vezikoüretral Reflü
77	5	Kadın	Hidronefroz, Vezikoüretral Reflü
78	84	Kadın	Hematüri, Üriner Sistem Enfeksiyonu
79	12	Erkek	Vezikoüretral Reflü
80	4	Kadın	Vezikoüretral Reflü
81	0.33	Erkek	Hidronefroz, Vezikoüretral Reflü
82	156	Erkek	Hidronefroz
83	84	Erkek	Son Dönem Böbrek Hastalığı
84	1	Erkek	Vezikoüretral Reflü
85	1	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
86	84	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu, İzole Proteinüri

87	192	Erkek	Böbrek Fonksiyonlarının Anormal Çalışmaları
88	48	Erkek	Konjenital Hidronefroz, Vezikoüretral Reflü
89	11	Erkek	Hidronefroz, Üriner Sistem Enfeksiyonu, Böbrek Taşı
90	120	Erkek	Kronik Böbrek Yetmezliği, Hidronefroz, Renal Agenezi
91	1	Kadın	Hidronefroz, Kronik Böbrek Yetmezliği, İdrar Yolu Enfeksiyonu
92	0.8	Kadın	İdrar Yolu Enfeksiyonu, Hidronefroz, Hipotiroidizm
93	2	Erkek	Vezikoüretral Reflü, İdrar Yolu Enfeksiyonu
94	7	Kadın	Hidronefroz
95	12	Erkek	Hidronefroz
96	24	Kadın	Vezikoüretral Reflü, Üropati ile
97	24	Erkek	Üriner Sistem Enfeksiyonu
98	60	Kadın	Kronik Böbrek Yetmezliği, Vezikoüretral Reflü
99	1	Erkek	Hematüri, Üriner Sistem Enfeksiyonu
100	12	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
101	12	Kadın	İdrar Yolu Enfeksiyonu, Dermatit
102	36	Erkek	Kronik Böbrek Yetmezliği, Hipotiroidizm, TOF
103	132	Erkek	Üriner Sistem Enfeksiyonu, Alerjik Ürtiker
104	168	Kadın	Akne Vukgaris, Böbrek Taşı
105	72	Erkek	Üriner Sistem Enfeksiyonu, Böbrek Taşı
106	1	Erkek	Polikistik Böbrek
107	12	Kadın	Vezikoüretral Reflü, Üropati ile
108	84	Kadın	Renal Agenezi
109	48	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu, Aort Koarktasyonu
110	72	Erkek	Akut Nefritik Sendromu, Böbrek Taşı
111	60	Kadın	İdrar Yolu Enfeksiyonu, Böbrek Taşı
112	7	Erkek	Hidronefroz, İdrar Yolu Enfeksiyonu, Konjenital Hidrosel
113	120	Erkek	Sol UP darlık,Hidronefroz
114	12	Kadın	Renal Agenezi
115	24	Kadın	Renal Displazi, İdrar Yolu Enfeksiyonu
116	156	Erkek	Üriner Sistem Enfeksiyonu, Flask Nöropatik Mesane
117	2	Kadın	Vezikoüretral Reflü, Üriner Sistem Enfeksiyonu
118	108	Erkek	Vezikoüretral Reflü
119	60	Erkek	Kronik Böbrek Yetmezliği, Böbrek Nakli
120	12	Erkek	Hidronefroz, Kistik Böbrek Hastalığı, Medular Kistik Böbrek
121	96	Kadın	Vezikoüretral Reflü
122	96	Kadın	Vezikoüretral Reflü, Üriner Sistem Enfeksiyonu
123	36	Kadın	Vezikoüretral Reflü, Üriner Sistem Enfeksiyonu
124	24	Kadın	Vezikoüretral Reflü
125	108	Kadın	Vezikoüretral Reflü, İzole proteinüri, Puberte Prokoks
126	180	Kadın	Kronik Böbrek Yetmezliği, Böbrek Nakli, İdrar Yolu Enfeksiyonu
127	72	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
128	144	Kadın	Üriner Sistem Enfeksiyonu
129	36	Kadın	Üriner İnkontinans, Üriner Sistem Enfeksiyonu