



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RENAL HÜCRELİ KARSİNOMDAKİ MUHTEMEL
CERNA'LARIN *İN SİLİKO* ANALİZİ VE İFADE
DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Sercan ERGÜN

**Samsun
Haziran-2018**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RENAL HÜCRELİ KARSİNOMDAKİ MUHTEMEL
CERNA'LARIN *İN SİLİKO* ANALİZİ VE İFADE
DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Sercan ERGÜN

**Danışman
Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ**

**Samsun
Haziran-2018**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sercan ERGÜN tarafından Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ danışmanlığında hazırlanan “Renal Hücreli Karsinomdaki Muhtemel ceRNA’ların İn Siliko Analizi ve İfade Düzeylerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından /..... /..... tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Recep BÜYÜKALPELLİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ertan ALTAYLI, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Alper ARSLAN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

..... / /.....

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktoraya başladığım günden bu yana karşılaştığım tüm zorluklarda elinden gelenin fazlası için çabalayan, tez konumun belirlenmesi ve çalışmamın bütün aşamalarında bilgi, tecrübe, destek ve yardımlarını esirgemeyen, yeni fikirlerime teşvik edici bir yaklaşımla destek veren, özgür çalışma ortamı sağlayan, her zaman fikir alışverişine açık olan ve desteğini hep hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e teşekkür ederim.

Tez danışmanım Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ ile tanışmama ve doktoramı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapmama vesile olan ve engin bilimsel tecrübesini bizden hiç esirgemeyen Prof. Dr. Hasan BAĞCI'ya çok teşekkür ederim.

Üroloji Ana Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Recep BÜYÜKALPELLİ'ye tez çalışmam boyunca özellikle klinik boyutta verdiği bilimsel destek için çok teşekkür ederim. Patoloji Ana Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Oğuz AYDIN'a hasta numuneleriyle ilgili verdiği bilgi ve önerileri için çok teşekkür ederim. Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Mehmet Alper ARSLAN'a tez konumun belirlenmesi ve tezimin diğer aşamalarındaki değerli yönlendirmeleri için çok teşekkür ederim.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız ve tez çalışmam boyunca desteklerini hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Aslı METİN ve Arş. Gör. Gülgeç Neslihan TAŞKURT HEKİM'e çok teşekkür ederim.

Tezimin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde yaptığı faydalı yönlendirmeler için Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Yeliz KAŞKO ARICI'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, büyük özveri gösteren ve en büyük destekçim olan EŞİM'e, oğlum Selim'e ve doktora sürecinde ailemize yeni katılan kızım Neva'ya sonsuz teşekkür ederim.

2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.18.002 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

RENAL HÜCRELİ KARSİNOMDAKİ MUHTEMEL CERNA'LARIN *İN SİLİKO* ANALİZİ VE İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Amaç: *In siliko* analiz kullanılarak Renal Hücreli Karsinom (RHK) patogenezinde rol alabileceği öngörülen potansiyel ceRNA aktivitesi gösterebilecek genlerin belirlenmesi amaçlandı. Daha sonra karşılaştırmalı olarak RHK'li hastalardan alınan tümör ve tümörün çevresindeki normal renal biyopsi örneklerinde bu genlerin ekspresyon düzeylerini incelemeyi ve klinik parametrelerle ilişkilendirmeyi hedefledik.

Materyal ve Metot: *In siliko* analiz sonucunda 3. kromozomda RHK'ye özgü delesyona uğrayan genlerden yola çıkarak dört muhtemel ceRNA (*ATXN3*, *ABI2*, *GOLGB1* ve *SMAD2*) belirlendi. Ondokuz RHK'li hastanın tümör dokusu ile aynı hastanın tümör çevresindeki sağlıklı böbrek dokusunda bu genlerin ifade düzeyleri eş zamanlı PCR ile ölçüldü. Dört genin ifade düzeyi tümör ve çevresindeki normal böbrek dokusu arasında kıyaslandı ve sonra hastaların klinik parametreleriyle ilişkilendirildi.

Bulgular: Çalışmamızın sonucunda, tümör dokularında normal böbrek dokularına göre *ATXN3* ve *GOLGB1* ifade düzeyleri yüksek, *ABI2* ifade düzeyi ise düşük bulunmuştur (sırasıyla $p=0,936$, $p=0,546$, $p=0,494$). *SMAD2* geninin tespit edilemeyecek kadar az ifade edildiği gözlemlendi. Hastaların *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeyi değişimleri yaş, cinsiyet, tümör nod metastaz (TNM) evreleri ve Fuhrman grade parametreleri ile ilişkilendirildiğinde anlamlı bir ilişki bulunamadı. *ATXN3* geninin direkt bilirubin, monosit eozinofil, bazofil, PCT ve LUC değerleri ile, *ABI2* geninin sodyum, klor, glukoz, direk bilirubin, MCV, PLT, eozinofil, bazofil, PCT, PDW, LUC, % PT ve PLT/lenfosit oranı ile ve *GOLGB1* geninin ise total bilirubin, direkt bilirubin, monosit eozinofil, bazofil, PCT ve LUC değerleri ile anlamlı derecede ilişkili olduğu belirlendi.

Sonuç: *In siliko* ceRNA analizi yaklaşımı ve gen ifadesi ölçümü, RHK ile ilişkisi daha önce kanıtlanmış genlerden yola çıkarak yeni hedef genlerin (*ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1*) belirlenmesinde akılcı ve ekonomik bir yaklaşım olabilir.

Anahtar Kelimeler: ceRNA; Epigenetik; miRNA; Onkogen; Renal hücreli karsinom

Sercan ERGÜN, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2018

ABSTRACT

***IN SILICO* ANALYSIS AND THE INVESTIGATION OF THE EXPRESSION LEVELS OF POTENTIAL CERNAS IN RENAL CELL CARCINOMA**

Aim: We aimed to determine the genes that could predict the potential ceRNA activity and could be involved in the pathogenesis of RCC *in silico* analysis. We then aimed to analyze the expression levels of these genes in tumor and their surrounding healthy kidney tissues of patients with RCC and correlate them with clinical parameters.

Material and Method: Via *in silico* analysis upon RCC-specific deleted genes in chromosome 3, four possible ceRNAs (*ATXN3*, *ABI2*, *GOLGB1* and *SMAD2*) were identified, expression levels of these genes in tumor tissues of 19 RCC patients and healthy kidney tissues surrounding tumors of the same patients were determined by Real Time PCR, the expression levels of these genes were firstly compared between tumor and healthy kidney tissues and eventually they were correlated with the clinical parameters of the patients.

Results: As a result of our study, the expression levels of *ATXN3* and *GOLGB1* were higher and the expression level of *ABI2* was lower in tumor tissues compared to healthy tissues ($p=0,936$, $p=0,546$, $p=0,494$). It has been observed that *SMAD2* gene was expressed too low to detect. No significant association was found when patients' *ATXN3*, *ABI2* and *GOLGB1* gene expression level changes were associated with TNM stages, Fuhrman grade, age and gender parameters. The *ATXN3* gene was significantly associated with direct bilirubin, monocyte eosinophil, basophil, PCT and LUC values, *ABI2* gene was significantly correlated with sodium, chlorine, glucose, direct bilirubin, MCV, PLT, eosinophil, basophil, PCT, PDW, LUC, % PT and PLT/lymphocyte ratio and *GOLGB1* gene was found to be significantly related to total bilirubin, direct bilirubin, monocyte eosinophil, basophil, PCT and LUC values.

Conclusion: *In silico* ceRNA analysis approach and measurement of gene expression has been a rational and economic approach to the identification of new target genes (*ATXN3*, *ABI2* and *GOLGB1*) from previously proven genes associated with RCC.

Keywords: ceRNA; Epigenetics; miRNA; Oncogene; Renal cell carcinoma

Sercan ERGÜN, PhD Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABHD5	: Abhidrolaz Domain 5
ABI2	: ABL Interactor 2
ALA	: α -Linolenik Asit
ALT	: Alanin Aminotransferaz
APTT	: Activated Partial Thromboplastin Time
Asetil KoA	: Asetil Koenzim A
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ATXN3	: Ataksin 3
BHD	: Birt-Hogg-Dubé
BUN	: Blood Urea Nitrogen
CD44	: Cytoplasmic Domain 44
CDC42	: Cell Division Cycle 42
cDNA	: Komplementer DNA
ceRNA	: Competing Endogenous RNA
CHDH	: Cholin Dehydrogenase
circRNA	: Circular RNA
COX-2	: Cyclooxygenase-2
CpG	: Sitozin-fosfat-guanin
DGCR8	: DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DRR1	: Down Regulated in Renal Cell Carcinoma 1
dsRNA	: Çift iplikli RNA
dsRNaz	: Çift iplikli RNA kesici
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Transmisyon
FFPE	: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FHIT	: Frajil Histidin Triad
FLT1	: FMS Like Tyrosine Kinase 1
FRA3B	: Fragile Site, Aphidicolin Type, Fra(3)
FXR1	: Fragile X Mental Retardation, Autosomal Homolog 1
GO	: Gene Ontology
GOLGB1	: Golgin B1

GPD1L	: Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 Like
HIF	: Hipoksiyle İndüklenen Faktörü
HK	: Heterozigotluk Kaybı
HOTAIR	: HOX Transkript Antisens RNA
IMPDH2	: İnozin 5'-Monofosfat Dehidrojenaz 2
INR	: International Normalization Ratio
IPS1	: Interferon β Promoter Stimulator 1
ITPR1	: İnositol 1,4,5-Trifosfat Reseptör, Tip 1
KLRHK	: Kalıtsal Leiomyomatozis ve Renal Hücreli Karsinom
KPRHK	: Kalıtsal Papiller Renal Hücreli Karsinom
lncRNA	: Long non-coding RNA
LUC	: Large Unstained Cell Concentration
MCH	: Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	: Mean Corpuscular Volume
miRNA	: MikroRNA
MPV	: Mean Platelet Volume
MRE	: miRNA response elements
mRNA	: Mesajcı RNA
NRP2	: Nöropilin 2
NSAİİ	: Non-Steroidale Anti-İnflamatuar İlaçlar
OMÜ	: Ondokuz Mayıs Üniversitesi
OMÜTF	: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
PAH	: Polikistik Aromatik Hidrokarbon
PCT	: Prokalsitonin
PDW	: Plaketalet Distribution Width
PDCD4	: Programmed Cell Death 4
PDHB	: Prüvat Dehidrojenaz Beta
PHO2	: Phosphate Overaccumulator 2
PLT	: Trombosit
POX	: Prolin Oksidaz
PPARG	: Peroksizom Proliferator-Aktiflenmiş Reseptör Gama

pre-miRNA:	Precursor miRNA
pri-miRNA :	Primer miRNA
PT	: Protombin
<i>PTEN</i>	: Phosphatase and Tensin Homolog
RAN-GTP	: RAS Associated Nuclear-Guanosine Triphosphate
Rb1	: Retinoblastoma 1
RBC	: Red Blood Cell
RDW	: Red Cell Distribution Width
RHK	: Renal Hücreli Karsinom
RISC	: RNA Induced Silencing Complex
RLC	: RISC Loading Complex
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
RT-PCR	: Real Time-Polimerase Chain Reaction
RXR	: Retinoik X Reseptörü
TCGA	: The Cancer Genome Atlas
TGF	: Transforming Growth Factor
TNFα	: Tümör Nekroz Faktörü- α
TİM	: Tümör ile İlişkili Makrofajlar
TNM	: Tümör Nod Metastaz
UBC24	: Ubiquitin Conjugating Enzyme 24
UTR	: Untranslated region
ISUP	: International Society of Urological Pathology
VAPA	: VAMP Associated Protein A
VCAN	: Versikan
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	: von Hippel-Lindau
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
WBC	: White Blood Cell
WHO	: World Health Organization
XRN1	: Ekzoribonükleaz 1
ZEB2	: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Renal Hücreli Karsinom.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etiyolojisi.....	4
2.1.3. Sınıflandırma.....	5
2.1.4. Genetiği.....	5
2.2. Epigenetik.....	11
2.2.1. miRNA'lar.....	12
2.2.2. ceRNA'lar.....	17
2.2.3. RHK'de miRNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalar.....	21
2.2.4. RHK'de ceRNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalar.....	25
3. MATERYAL VE METOT	28
3.1. Gönüllü Seçimi ve RHK Tanısının Konulması.....	28
3.2. <i>İn Siliko</i> ceRNA Analizi.....	29
3.3. FFPE Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu.....	31
3.4. cDNA Eldesi ve Kalite-Miktar Tayini.....	33
3.5. RT-PCR ile Gen İfade Analizi.....	34
3.6. İstatistiksel Analiz.....	35
4. BULGULAR	37
4.1. Hastaların Klinik Parametreleri.....	37
4.2. <i>İn Siliko</i> Veri Tabanı Analizi.....	40
4.3. cDNA Konsantrasyon ve Kontaminasyon Analizi.....	42
4.4. Gen İfadesi Analizleri.....	43

4.5. Gen İfade Düzeylerinin Klinik Parametrelerle İlişkisi.....	45
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR.....	58
EKLER.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	84



1.GİRİŞ

Renal hücreli karsinom (RHK), renal pelvis veya renal medullayı içeren böbrek kanserinden farklıdır ve sadece böbrek yatağına uzanan hücrelerde (renal tübüllerde) oluşan kanser türüdür. RHK, renal tübüler hücrelerden köken alan bir grup heterojen kanseri içermektedir. Ürolojik kanserler arasında prostat ve mesane kanserlerinden sonra üçüncü en sık ölüm nedeni olan RHK, tüm erişkin kanser olgularının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Ayrıca, ürolojik kanserler içerisinde klinik seyiri en mortal olanıdır. RHK diğer kanserler gibi birçok genetik ve epigenetik değişikliklerin birikiminden kaynaklanmaktadır (Shingarev ve Jaimes, 2017).

Son yirmi yılda yapılan, genetik ve klinik çalışmalar RHK'nin sadece histolojisinde ve klinik seyrinde heterojen olmadığını, aynı zamanda genetik değişimlerinde de heterojen olduğunu göstermiştir (Soultati ve ark., 2015). RHK'nin farklı histolojik alt tiplerinin tanımlanması, bu farklı alt tipler karsinogenezinin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır ve her bir alt tip için bir veya daha fazla önemli mutasyon belirlenmiştir. Kalıtsal RHK ile karşılaştırıldığında sporadik RHK için tanımlanmış daha fazla mutasyon bulunmaktadır (Muglia ve Prando, 2015). Ayrıca, sporadik kanserlerin çoklu (epi)genetik değişimlerden ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu nedenle, genlerin promoter hipermetilasyonunun RHK'nin sporadik ve/veya kalıtsal formlarına dahil olduğu düşünülmektedir. RHK'nin oluşumunu ve ilerlemesini düzenleyen epigenetik değişiklikler hala keşfin başlangıç aşamasındadır (Xing ve He,2016). RHK'de epigenetik olarak ifadesi değiştirilen genlerin ve yolakların daha ayrıntılı karakterizasyonu, RHK için yeni ve minimal invaziv diagnostik ve prognostik araçların geliştirilmesine yol açabilir. Uzun vadede, epigenetik tedaviler, standart tedaviye yanıt vermeyen, ileri RHK için ek bir tedavi seçeneği sunabilir (Xing ve He,2016). RHK patofizyolojisi ile ilgili olabilecek ve hastalığın progresyonunda biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeli olan parametrelerin keşfedilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışması da bu düşünceler bağlamında RHK'ye özgü yeni biyobelirteçler bulma hedefiyle yapılmıştır.

Üç numaralı kromozomun kısa kolunun (petit, p) bazı lokuslarında RHK'ye özgü belirli genlerin kaybına yol açan delesyonlar gözlenmektedir. RHK olgularında delesyona uğradığı tespit edilen ve 3 numaralı kromozomun kısa kolunda bulunan genler şunlardır: von Hippel-Lindau (*VHL*), Inositol 1,4,5-Trifosfat Reseptör Tip 1

(*ITPRI*), Peroksizom Proliferator-Aktiflenmiş Reseptör Gama (*PPARG*), Gliserol Fosfat Dehidrogenaz 1 Benzeri (Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 Like, *GPD1L*), Abhidrolaz Domain 5 (*ABHD5*), İnozin 5'-Monofosfat Dehidrogenaz 2 (Inosin 5'-Monophosphate Dehydrogenase 2, *IMPDH2*), kolin dehidrogenaz (Cholin Dehydrogenase *CHDH*), azalarak düzenlenen renal hücreli karsinom 1 (Down Regulated in Renal Cell Carcinoma 1, *DRRI*), Pirüvat Dehidrogenaz Beta (*PDHB*) ve Frajil Histidin Triad (*FHIT*). Bu bölgede, delesyona uğrayan bu genlerin transkriptlerine bağlanan mikroRNA'ların (miRNA), hedeflerinin kaybolması nedeniyle kendilerine başka hedef mesajcı RNA'lar (mRNA) arayacağı öngörülmektedir. İşte bu mRNA transkriptleri potansiyel ceRNA (competing endogenous RNA, ceRNA) özelliğine sahiptir (Singh ve Kadam, 2013; Shuib ve ark., 2011; Gatto ve Nookaew, 2014; Ergun ve Oztuzcu, 2015).

ceRNA'lar, ortak miRNA hedef bölgelerini taşıyan ve bu miRNA'ları kendi üzerine çekerek birbirleriyle iletişim kurabilen ribonükleik asit (RNA) transkriptleridir (Cesana ve ark., 2011). Ortak miRNA hedef bölgesi taşıyan genlerin, transkripsiyon düzeylerinin azalması veya delesyonları bu bölgeleri hedefleyen miRNA'ların serbest kalmasına ve yeni hedefler aramalarına sebep olacaktır. Bu miRNA'lar, aynı miRNA bağlanma bölgesi taşıyan ceRNA'ları kendilerine yeni hedef olarak seçerek transkripsiyonel olarak aktivitelerini baskılayacaktır. Tersine bir etki ile ceRNA aktivitesi gösteren bu mRNA'ların transkripsiyon seviyelerindeki artışı da ortak miRNA'ları kendi üzerine çekerek miRNA'ların önceki hedefleri üzerindeki etkisini azaltacaktır (Kumar ve ark., 2014). Bu bağlamda, ceRNA'ların pek çok kanser türünün patogenezinin aydınlatılmasında yeni aktörler olabileceği düşünülmektedir. Bu mekanizma göz önüne alınarak muhtemel ceRNA aktivitesi gösterebilecek genlerin tespiti için spesifik veri tabanlarının kullanılabilmesi gibi deneysel olarak aktiviteleri de test edilebilir (Ergun ve Oztuzcu, 2015).

Çalışmada, ilk olarak *in silico* analiz yardımıyla, RHK oluşum mekanizmasında rol alabileceği öngörülen ceRNA aktivitesi gösterebilecek genlerin bulunmasını hedefledik. Sonrasında bu genlerin ifade düzeylerini RHK'li hastalardan alınan tümör ve çevresindeki normal renal biyopsi örneklerinde karşılaştırmalı olarak analiz etmeyi ve hastaların klinik verileriyle ilişkilendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Renal Hücreli Karsinom

RHK, böbrekte atık molekülleri idrara taşıyan çok küçük kanalların bir parçası olan proksimal kıvrık tübülden kaynaklanan bir böbrek kanseridir. RHK, erişkinlerde böbrek kanserinin en sık görülen tipidir ve olguların yaklaşık % 90-95'inden sorumludur. İlk tedavi, en sık etkilenen böbreğin/bölgelerin kısmen ya da tamamen çıkarılmasıdır. Kanserın metastaz yapmadığı veya böbrek dokularına daha derine inen durumlarda, 5 yıllık sağkalım oranı % 65-90' olup kanserin yayılımı sırasında bu oran önemli ölçüde düşer. Vücut semptomları gizlemede son derece iyidir ve sonuç olarak hastalara RHK tanısı konduğunda hastalık oldukça gelişmiştir. RHK'nın başlangıç semptomları sıklıkla şunları içerir: idrarda kan (ilk kez tedavi arayışında bulunan hastaların % 40'ında görülür), yan ağrı (% 40), karında veya bacaklarda ağırlık (% 25), kilo kaybı (% 33), ateş (% 20), yüksek tansiyon (% 20), gece terlemesi ve genellikle kendini rahatsız hissetme. RHK metastazı en sık lenf nodları, akciğerler, karaciğer, adrenal bezler, beyin veya kemiklerde gözlenir. İmmünoterapi ve hedefli tedavi metastatik RHK'nın seyrini iyileştirmiştir (Jonasch ve Gao, 2014; Protzel ve Maruschke, 2012).

2.1.1. Epidemiyoloji

Hastalığın insidansı coğrafi, demografik ve daha az oranda kalıtsal faktörlere göre değişir. İyi bilinen bazı risk faktörleri olmakla birlikte, potansiyel risk faktörlerinin anlamı ve önemi hala tartışmalıdır (Escudier ve ark, 2016). Dünyada RHK insidansı, yeni olguların sayısının sabit kaldığı son yıllara kadar her on yılda yaklaşık % 2-3 oranında artmaktadır (Znaor ve ark., 2015). Ayrıca, RHK insidansı cinsiyet, yaş ve ırka göre de değişiklik göstermektedir. Erkeklerde kadınlardan daha sıktır (yaklaşık 1,6 : 1) ve büyük çoğunluğu 65 yaşından sonra teşhis edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde erkeklerde sıklığının neden daha yüksek olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte genetik faktörler, sigara kullanımı ve çalışma koşulları gibi çevresel etkenler ile ilişkilendirilebilir (Ciccarese ve ark., 2016). RHK'nın Asyalılarda beyazlara oranla belirgin olarak daha düşük oranlarda görüldüğü bildirilmiştir. Afrika ülkeleri en düşük RHK insidansına sahipken, Amerika'da Afrikalı Amerikalıların en yüksek RHK insidansına sahip olduğu görülmektedir (Ridge ve ark., 2014). Gelişmiş ülkelerde,

gelişmekte olan ülkelere oranla RHK insidansı daha yüksektir. En yüksek insidans Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya / Yeni Zelanda'da görülmektedir (Ljungberg ve ark., 2011).

Erişkin kanser olgularının yaklaşık %2'sini oluşturan RHK, ürolojik kanserler arasında prostat ve mesane kanserlerinden sonraki en sık ölüm nedenidir. Ayrıca, ürolojik kanserler içerisinde klinik seyiri en mortal olanıdır. RHK, dünya genelinde yapılan çalışmalara göre, kanser sıklığı sıralamasında dokuzuncu sırada yer almakta olup 2012 yılında 337,860 yeni olgu tanımlanmıştır (Capitani ve Montorsi, 2016). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO), Avrupa'da 2012 yılında yaklaşık 121,629 yeni olgunun teşhisinin konulduğunu ve bu olguların 75,676'sının erkek olduğunu bildirmiştir (Torre ve ark., 2015). Türkiye'de 2013 yapılan bir çalışmada ise böbrek kanserinin ülke genelindeki insidansının erkeklerde yaklaşık yüz binde 7, kadınlarda ise yüz binde 3,4 olduğu bildirilmiştir (Gültekin ve Boztaş, 2014).

2.1.2. Etiyolojisi

RHK için en büyük risk faktörü yaşam tarzıyla ilgilidir. Sigara, obezite ve hipertansiyonun olguların % 50'sinde rol oynadığı tahmin edilmektedir. Asbest, kadmiyum, kurşun, klorlu solventler, petrokimyasallar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi bazı kimyasallara maruz kalma ile RHK ilişkisi pek çok çalışma tarafından araştırılmış fakat net bir sonuç alınamamıştır (Shrestha ve ark., 2016). Tüm böbrek tümörlerinin neredeyse yarısı vücut kitle endeksi (VKİ) $> 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ olması ile ilişkilendirilmiştir. RHK riski de her $5 \text{ kg} / \text{m}^2$ VKİ artışla % 20-35 oranında artmaktadır (Wang ve Xu, 2014). Bu ilişki, obezitenin malignansilerden kardiyovasküler ve böbrek hastalıklarına kadar çeşitli ölümcül hastalıklarda başlıca risk faktör olduğunu önermektedir. Bir diğer potansiyel risk faktörü non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların (NSAİİ) uzun süreli kullanımıdır. Ayrıca çalışmalar, RHK gelişme riskinin histerektomi yapılan kadınlarda, yapılmayan kadınlara kıyasla iki kat daha fazla olduğunu göstermiştir (Altman ve ark., 2010). Diğer yandan, orta derecedeki alkol tüketiminin koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni belirsizliğini korumaktadır (Lew ve ark., 2011). Kalıtsal faktörlerin bireysel yatkınlık üzerinde küçük bir etkisinin olabileceği belirtilmektedir. Yapılan araştırmalar RHK hastalarının yakın akrabalarında da hastalığın görülme riskinin iki ila dört kat arası arttığını göstermektedir (Purdue ve ark., 2011). Kalıtsal papiller böbrek karsinoması, kalıtsal leiomyomatoz,

Birt-Hogg-Dube sendromu, hiperparatiroidizm-çene tümörü sendromu, ailesel papiller tiroit karsinoması, von Hippel-Lindau (VHL) hastalığı ve orak hücre anemisi gibi diğer genetik etiyojili hastalıklar da ayrıca RHK riskini artırabilir (Moch ve ark., 2013). Bununla birlikte, riski etkileyen en önemli hastalık genetik etiyojili değildir. Diyaliz gerektiren böbrek kistik hastalığı görülen hastalarda, RHK riski genel popülasyon ile karşılaştırıldığında 30 kat daha fazladır (Rini ve ark., 2009).

2.1.3. Sınıflandırma

WHO, 2004 yılında Mainz ve Hidelberg'in sınıflamasının özeti olarak nitelendirilebilecek bir RHK sınıflandırması yapmıştır (Tablo 1). Bu sınıflamada patolojik ve genetik analizlerin sonuçları da göz önünde bulundurularak çeşitli kategoriler oluşturulmuştur (Lopez-Beltran ve ark., 2006).

Tablo 1. WHO'nun RHK sınıflaması (Lopez-Beltran ve ark.'dan uyarlanarak, 2006)

Benign	Malign
Papiller Adenom	Şeffaf hücreli RHK
Onkositom	Multiloküler şeffaf hücreli RHK
	Papiller RHK
	Kromofob RHK
	Bellini toplayıcı kanal karsinomu
	Renal medüller karsinom
	Xp11 translokasyon karsinomu
	Nöroblastoma ile ilişkili karsinoma
	Müsinöz tubuler ve işsi hücreli karsinoma
	Sınıflandırılmayan RHK

2.1.4. RHK Genetiği

RHK, renal pelvis veya renal medullayı içeren böbrek kanserinden farklıdır ve sadece böbrek yatağına uzanan hücrelerde (yani renal tübüllerde) oluşan kanser türüdür. Bazı RHK'ye yatkın ailelerde kalıtsal kanser riskinin nedeni olarak genetik temelli varyantlar belirlenmiştir. Bu genetik altyapılı varyantların genel olarak RHK olgularının sadece % 5 ila % 8'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Diğer keşfedilmemiş genler ve

arka plandaki diğerk genetik faktörler, RHK'nin gelişmesine genetik olmayan risk faktörleri ile birlikte katkıda bulunabilir (Shuch ve ark., 2013).

RHK, hem sporadik hem de kalıtsal olgularda ortaya çıkabilir. Otozomal dominant olarak kalıtıldığı tanımlanan dört ana RHK sendromu aşağıda listelenmiştir (Shuch ve ark., 2013):

- VHL sendromu
- Kalıtsal leiomyomatozis ve renal hücreli karsinom (KLRHK)
- Kalıtsal papiller renal hücreli karsinom (KPRHK).
- Birt-Hogg-Dubé (BHD) sendromu.

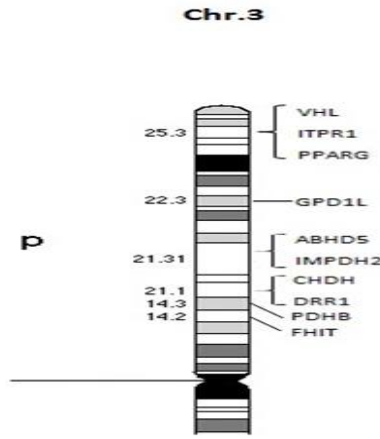
Kanser Genomu Atlas Konsorsiyumu 400'den fazla RHK hastası üzerinde, sağlıklı böbrek dokusu ile böbrek tümörünü kıyaslayan analiz yapmıştır. Ortalama olarak, RHK'de yirmiden daha az sayıda deoksiribonükleik asit (DNA) kopya sayısı değişikliğine rastlanmıştır. Kopya sayısı değişiklikleri, bir hücrenin DNA'sının bir veya daha fazla kısmının anormal sayıda kopyasına sahip olmasıdır. Bu değişiklikler genomda kantitatif bir dengesizliğe neden olmaktadır (Zarrei ve ark., 2015). Bu sayı kolon ve meme kanserlerindeki DNA kopya sayısı değişikliklerinden daha azdır. Bununla birlikte, orantısız olarak, tüm kromozom kollarını içeren kopya sayısı değişikliklerinin oranının kolon ve meme kanserinden daha fazla olduğu görülmüştür. RNA füzyonları (translokasyondan kaynaklanan), RHK olgularının % 10 ila % 20'sinde gözlenmiştir ve bunların büyük çoğunluğu ilk kez tanımlanmıştır (Network, 2013). Sato ve ark. (2013) yaptığı bir araştırmada, 100'den fazla RHK olgusunu tüm genom veya ekzom dizileme yöntemi kullanarak değerlendirmiştir. RHK'nin megabaz çifti başına bir ila iki somatik olarak edinilmiş tek nükleotid varyantı veya küçük insersiyon ve delesyonlar (tümör başına yaklaşık 3.000 ila 6.000 mutasyon) ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonların çoğu kodlama bölgelerinin dışında gerçekleşmiştir. Protein kodlayıcı bölgeler genomun yaklaşık % 1'ini oluşturur ve mutasyonların yaklaşık % 1'ine tabidir, bu da mutasyonların rasgele oluştuğunu düşündürmektedir (Brugarolas, 2014; Sato ve ark., 2013; Network, 2013).

RHK'ye neden olan kromozomal düzensizlikleri tanımlamaya çalışan araştırmalar, kritik öneme sahip birçok lokusu tanımlanmıştır. Heterozigotluk kaybı, birçok kalıtsal kanser sendromunda yabancıl tip allellerin somatik kaybına neden olur (Gatto ve ark., 2014). En yaygın heterozigotluk kayıpları şunlardır: 30 büyük parça

kaybı (3p21-36 boyunca uzanan), 1 interstisyel delesyon (3p12-14, 3p21-22, 3p24.1-24.2 ve 3p24.3 boyunca uzanan) ve çeşitli kromozom kayıpları (8p12-pter, 6q23.3-27, 14q24.1-qter, 9q32-qter, 10q22.3-qter, 9p13.3-pter, 4q28.3-qter ve 13q12.1-21.1) (Chen ve ark., 2009). RHK'de 3p kaybının saptanmasından sonra, sitogenetik değişiklikler ile RHK'nin histopatolojik alt türleri arasında anlamlı korelasyonlar olduğu belirlendi (Singh ve Kadam, 2013). RHK'de gözlemlenen kromozom 3p heterozigotluk kaybının genel sıklığı % 53'dür. RHK'nin histopatolojik fenotipleri ile 3p kaybı insidansı arasındaki ilişkinin incelenmesi, şeffaf hücre tipine sahip tümörlerde heterozigotluk kaybının % 75 (12/16) olduğunu ve bu hücre tipinde heterozigotluk kaybının granüler hücre tipi tümörlerden daha sık olduğunu göstermiştir (% 14, 1/7) ($p < 0,01$) (Favazza ve ark., 2017).

Üçüncü kromozomun kısa kolunda RHK ile ilişkili delesyonlar

RHK olgularında sıklıkla rastlanan 3 numaralı kromozomun kısa kolundaki heterozigotluk kaybı, bu bölgede tümör süpresör genlerin varlığına işaret etmektedir. Literatüre göre bu lokuslarda yerleşik olan genler *VHL*, *ITPR1*, *PPARG*, *GPD1L*, *ABHD5*, *IMPDH2*, *CHDH*, *DRR1*, *PDHB* ve *FHIT* olarak tanımlanmıştır (Singh ve Kadam, 2013; Shuib ve ark., 2011; Gatto ve Nookaew, 2014) (Şekil 1). Bu genlerin görevleri aşağıda özetlenmiştir.



Şekil 1. Üçüncü kromozomun kısa kolunda RHK'ye özgü delesyona uğrayan genler (Singh ve Kadam'dan uyarlanarak, 2013).

VHL geni

RHK olgularının çoğunluğu (% 90), *VHL* geninin iki allelik kaybıyla karakterizedir. von Hippel-Lindau sendromu, merkezi sinir sistemi hemanjioblastomaları, feokromasitomalar, pankreatik maligniteler ve RHK kalıtsal duyarlılığı olan otozomal dominant bir hastalıktır. RHK, bu mutasyon tipine sahip sporadik ve ailesel olmayan olgular arasında daha erken yaşta görülen, bilateral ve multifokal tümörler olarak ortaya çıkan ve bu hastalığın sık görülen ölüm nedenlerinden birisidir. *VHL* delesyonlu hastalar, etkilenmeyen bölgelerde *VHL* geninin yalnızca bir allelinde mutasyonu kalıtırlarken ve etkilenmiş hücrelerinde, dokularında ve organlarında diğer allelde de bir mutasyon taşırlar. Bu sendromdaki RHK'ler bu nedenle erken başlangıçlı ve multifokal olma eğilimindedir (Singh ve Kadam, 2013).

Fizyolojik olarak, bu gen tarafından kodlanan protein, elongin B, elongin C ve cullin-2 proteinlerinin de dahil olduğu bir kompleksin parçasıdır. Übikuitin ligaz E3 aktivitesine sahiptir ve hipoksiyle indüklenen faktörü (*HIF*) ubikuitinlenerek parçalanmasında görev alır (Wang ve ark., 2014).

ITPR1 geni

Bu gen inositol 1,4,5-trifosfat için intrasellüler bir reseptör proteinini kodlar ve aktive edilmesiyle endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını tetikler. *ITPR1*, *HIF2 α* 'nın yeni bir hedefidir ve ekspresyonu, hem mRNA hem de protein seviyelerinde *HIF2 α* tarafından düzenlenmektedir. *ITPR1*, *HIF2 α* 'nın RHK'de tümör büyümesini tetiklediği mekanizmalardan biri olabilir. RHK'de *VHL* mutasyonları tarafından tetiklenen *HIF2 α /ITPR1* eksenini, antitümör immünitesi, tümör hücresi sağkalımı ve hücre büyümesine geçişi kontrol etmede kritik rol oynayabilir (Messai ve ark., 2014).

PPARG geni

PPARG, lipid homeostazını düzenleyen, obezite ve diyabet de dahil olmak üzere sayısız hastalığın patolojisinde rol oynayan nükleer bir reseptördür (Barish ve ark., 2006). Ek olarak, çalışmalar *PPARG*'nin tümör büyümesi, progresyon ve metastaz inhibisyonunda önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Bu gen tarafından kodlanan protein, çekirdeğe girerek direkt olarak DNA'ya bağlanabilen bir transkripsiyon faktörü ailesinin üyesidir. Retinoik X reseptörü (RXR) proteini ile heterodimer oluşturarak pek çok genin ifadesinin düzenlenmesinde görev alır. ω -3 yağ asitlerinin anti kanser etkileri,

PPARG aktivasyonu da dahil olmak üzere pek çok yolakla sağlanabilir. *PPARG*, kolon, göğüs, akciğer ve prostat kanseri dahil bir dizi kanserde eksprese edilir. *PPARG* aktivasyonu, çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu *in vitro* olarak inhibe edebilir. Yağ asitlerinin *PPARG*'nin doğal ligandları olduğu gösterilmiştir. Yağ asitleri *PPARG*'yi önce aktive ederek, daha sonra kanser hücrelerinin büyümesini inhibe edebilir. *PPARG* aktivasyonu ve siklo oksijenaz-2'nin (cyclooxygenase-2, *COX-2*) inhibisyonu, α -linolenik asitin (ALA) RHK hücre proliferasyonunu önleyen iki sinyal yolağıdır ve bu iki yolak birbirine paralel olarak işlemektedir (Yang ve ark., 2013).

***GPD1L* geni**

Bu gen tarafından kodlanan protein sn-gliserol 3-fosfatın gliseron fosfata dönüşümünü sağlar. Sitoplazmada plazma membranına bağlı olarak bulunur ve sodyum kanallarına bağlanarak işlev gösterir (Valdivia ve ark., 2009). Üç numaralı kromozomun RHK ile ilişkili olarak delesyona uğrayan lokuslarından birinde olmasına rağmen patofizyolojik olarak RHK ile daha önce ilişkilendirilmemiştir. Bununla birlikte, hipoksi ile indüklenen pozitif geri besleme döngüsü, *GPD1L*'in miR-210 baskılanması yoluyla *HIF1 α* stabilitesini artırır (Kelly ve ark., 2011). Bu HIF aracılıklı *GPD1L* baskılanma, RHK ile olan muhtemel ilişkisine ışık tutabilir.

***ABHD5* geni**

Bu gen tarafından kodlanan protein fosfatidik asit biyosentezinde görev alır ve hücre içi triaçilgliserol depolanmasının aktivasyonunu sağlar (Lord ve ark., 2013). Üç numaralı kromozomun RHK ile ilişkili olarak delesyona uğrayan lokuslarından birinde olmasına rağmen *ABHD5* geni de patofizyolojik olarak RHK ile daha önce ilişkilendirilmemiştir.

***IMPDH2* geni**

Bu gen tarafından kodlanan protein *de novo* guanin nükleotid biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olarak görev yapar ve dolayısıyla DNA ve RNA sentezi için gereklidir. *De novo* guanin nükleotid biyosentezinde hız sınırlayıcı bir enzim olan *IMPDH2*'nin ekspresyonu, prostat kanseri de dahil olmak üzere çeşitli neoplazmalarda artarak düzenlenir. Aşırı ifade edilen *IMPDH2*, böbrek ve mesane kanseri teşhisinde bir biyobelirteç olarak kullanılabilir ve bu kanser tipleri için potansiyel bir terapötik

hedefdir. *IMPDH2* ekspresyonu, kanser hücreleri de dahil olmak üzere proliferasyona aktif olarak katılan hücrelerde aşırı artar (Zou ve ark., 2015).

***CHDH* geni**

Bu gen tarafından kodlanan protein mitokondride yerleşiktir ve kolin sentezinde rol alır. Bu genin diğer dokulara kıyasla hem mRNA hem de protein seviyesinde renal dokularda daha fazla ifade edilmesi RHK'ye ilişkin önemli bilgiler vermesi adına önemli bir bulgudur fakat henüz herhangi bir çalışmada bu ilişki tespit edilmemiştir (Johnson ve ark., 2012).

***DRRI* geni**

Bu gen tarafından kodlanan protein hücre büyümesinin baskılanmasında görev alır. İfade edilmediği hücre hatlarına transfekte edilirse, hücre büyümesi baskılanır. *DRRI* geninin ekspresyon kaybı, RHK ve muhtemelen diğer tümörlerin gelişiminde önemli bir rol oynayabilir (Wang ve ark., 2000).

***PDHB* geni**

Prüvat dehidrojenaz kompleksi, prüvatin asetil koenzim A'ya (asetil KoA) dönüşümünde rol alır ve bu sayede glikolitik yolağı trikaboksilik asit döngüsüne bağlar. Üç numaralı kromozomun RHK ile ilişkili olarak delesyona uğrayan lokuslarından birinde olmasına rağmen patofizyolojik olarak RHK ile daha önce ilişkilendirilmemiştir (Saunier ve ark., 2016).

***FHIT* geni**

Bu gen tarafından kodlanan diadenozin 5',5"-P1,P3-trifosfat hidrolaz pürin metabolizmasında rol alır ve kromozom 3 üzerine bulunan bu kırılğan gen bölgesi pek çok farklı translokasyonlara sebep olur. Fragile site, aphidicolin type, fra(3) (*FRA3B*), frajil bölgesinde bulunan *FHIT* geni, insan kanserlerinin çoğunda en erken ve en sık değişime uğrayan genlerden biridir. Son zamanlarda *FHIT* geninin, çoğu *FHIT*-negatif kanserlerin köken aldığı hücreler olan epitel hücrelerinde en frajil lokus olmadığı keşfedilmiştir (Hosseini ve ark., 2013). Bu keşif, bu lokusdaki delesyonların *FHIT* işlevinin kaybından ziyade DNA hasarına karşı oluşan aşırı hassasiyetten dolayı kanser hücre klonlarının geliştiğini desteklemiştir. Nitekim son araştırmalar, *FHIT* genini, apoptoz ve epitelyal mezenkimal geçişin (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)

önlenmesinde rolü olan bir tümör baskılayıcı gen olduğunu gösterdi. Diğer yeni çalışmalar, *FHIT* genin ürünü Fhit için "bekçi" olarak yeni bir rol tanımladı (Waters ve ark., 2014). Bu proteinin fonksiyonun kaybı, nükleotid dengesizliği, spontan replikasyon stresi ve DNA kopmalarına yol açabileceği belirtilmiştir. Fhit kaybına bağlı DNA hasarı "kontrol noktası körlüğü" oluşturduğu için, hücreler sonraki hücre döngüleri boyunca, onkogenik mutasyonları kolaylaştırabilir ve klonal ekspansiyonu hızlandıracak genomik kararsızlığa sebep olan DNA hasarı artar. Dolayısıyla, Fhit aktivitesinin kaybı mutator fenotipi uyarmaktadır. *FHIT* geninin bir mutator gen olduğuna dair kanıtı, Fhit kaybı ve hemen sonrasında gelen genomik kararsızlık üzerine yapılan son araştırmalar sunmaktadır. *FHIT*, sitozin-fosfat-guanin (CpG) adasının aşırı metilasyonu, RHK'de *FHIT* geninin inaktivasyonundan sorumlu olabilir (Waters ve ark., 2014; Kvasa ve ark., 2008).

2.2. Epigenetik

DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen anlatımında oluşan stabil ve kalıtsal değişimler epigenetik olarak tanımlanır (Holoch ve Moazed, 2015). Epigenetik değişim düzenli ve doğal bir olaydır, ancak yaş, çevre, yaşam biçimi ve hastalık gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir (Barua ve Junaid, 2015). Epigenetik değişiklikler, hücrelerin cilt, karaciğer, beyin hücreleri vb. olarak farklılaşmaları için de olanak sağlar. Ayrıca, epigenetik değişim kanser gibi hastalıklara neden olabilecek daha zararlı etkilere neden olur. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlamayan RNA (Non-coding RNA, ncRNA) ile ilişkili gen sessizleştirmeyi içeren en az üç sistem şu anda epigenetik değişikliği başlatmakta ve sürdürmektedir. Yeni ve devam eden araştırmalar, çeşitli insan hastalıklarında ve ölümcül hastalıklarda epigenetiğin rolünü sürekli olarak ortaya çıkarmaktadır (Walter ve Hümpel, 2017).

Yirminci yüzyılın ortalarında Conrad H. Waddington ve Ernst Hadorn gibi saygın bilim insanları tarafından genetiği ve gelişim biyolojisini birleştirmeye odaklanan kapsamlı araştırma, şu an epigenetik olarak adlandırdığımız alana dönüşmüştür (Szutorisz ve Hurd, 2017). 1942'de Waddington tarafından ortaya atılan epigenetik terimi, başlangıçta genetik süreçlerin gelişme üzerindeki etkisini anlatan Yunanca "epigenez" kelimesinden türetilmiştir. 1990'lı yıllarda genetik asimilasyona yenilenen bir ilgi oldu. Bu, çevresel stresin *Drosophila* meyve sineklerinde bazı fenotipik özelliklerin genetik asimilasyonuna neden olduğu, Conrad Waddington'un

gözlemlerinin moleküler temelini aydınlatmaya yol açmaktadır. O zamandan bu yana, araştırma çabaları bu değişikliklerle ilgili epigenetik mekanizmaları çözmeye odaklanmıştır (Felsenfeld, 2014).

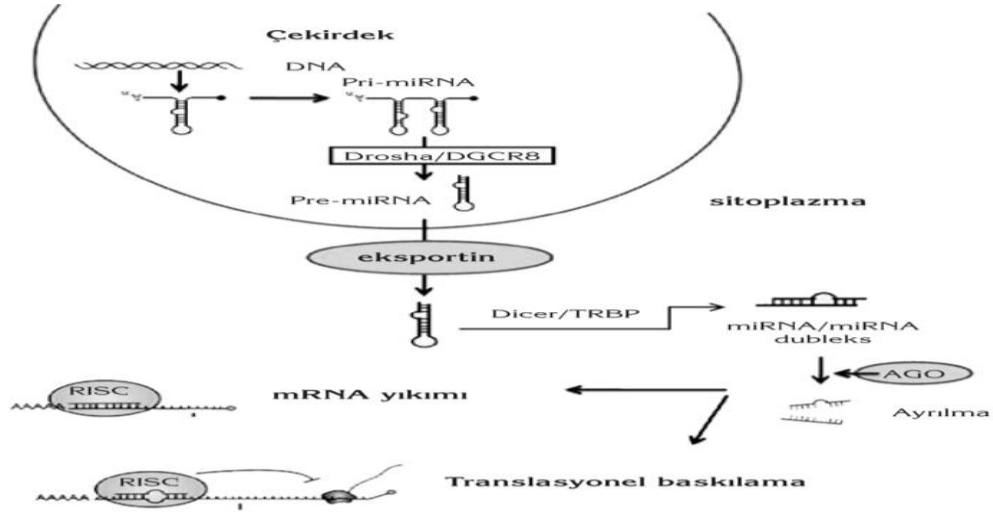
Günümüzde, DNA metilasyonu, 1969'da Griffith ve Mahler tarafından yapılan çalışmalara dayanan ve DNA metilasyonunun uzun süreli hafıza işlevinde önemli olabileceğini ileri süren, en geniş incelenmiş ve iyi tanımlanmış epigenetik modifikasyonlardan biridir. Diğer önemli değişiklikler arasında kromatin yeniden modellenmesi, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA mekanizmaları gelir (Venkatesh ve Workman, 2015). Epigenetikle ilişkili çalışmalar, çeşitli kanserler, mental retardasyonla ilişkili bozukluklar, bağışıklık sistemi bozukluklar, nöropsikiyatrik bozukluklar ve pediatrik bozukluklar dahil olmak üzere bir dizi hastalık ile epigenetik arasındaki ilişki hakkında yeni bulgulara ortaya koymuştur (Heard ve Martienssen, 2014).

Gen ifadesi ve DNA replikasyonu da dahil olmak üzere birçok hücresel işlem genellikle "klasik genetik" kategorisine giren mekanizmalarla düzenlenir (Macheret ve Halazonetis, 2015). Bu mekanizmalar, gen ifadesinin, DNA diziliminde mevcut olan veya olmayan, baskılayıcı proteinler için promoter, hızlandırıcı veya bağlama alanları gibi elementler tarafından kontrol edildiğini göstermektedir (Martyn ve ark., 2017). Bu tür düzenlemelere bir hücresel onkogenin ifadesinin kontrolü örnek olarak verilebilir. Sağlıklı hücrelerde bu gen eksprese edilmezken, bir kanser hücresinde kanserin ilerlemesine katkıda bulunabilecek bir mutasyona sahip olabilir (Johnson ve ark., 2015).

2.2.1. miRNA'lar

Çekirdekte, RNA polimeraz II, başlangıçta miRNA'ları primer miRNA'lar (pri-miRNA) olarak bilinen, uzun kodlanan veya kodlamayan RNA segmentleri olarak transkribe eder. Pri-miRNA'larda yaklaşık 70-100 nükleotid uzunluğunda ve bir stem-loop içeren kısımlar yakalanır. Bu pri-miRNA'lar ribonükleaz (RNaz) tip III, Drosha ve çift iplikli RNA (double stranded RNA, dsRNA) bağlayıcı protein içeren bir kompleks olan DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8, DGCR8) (Pasha olarak da bilinir) tarafından kesilir (Lin ve Gregory, 2015). Bu kısa stem-loop şeklindeki RNA'lar öncü miRNA'lar (precursor miRNA, pre-miRNA) olarak adlandırılır ve RNaz, Drosha ve DGCR8 protein mikroişlemci kompleksi olarak bilinir. Pre-miRNA'lar exportin-5 ve RAS ilişkili nükleer guanozin trifosfat (RAS Associated

Nuclear-Guanosine Triphosphate, RAN-GTP) ile kompleks oluşturur ve daha sonra çekirdekten sitoplazmaya aktarılır. Pre-miRNA'lar ayrıca bir çift iplikli RNA kesici (Double Stranded RNaz, dsRNaz) tip III, Dicer, tarafından bir çift sarmallı miRNA dubleksisi olarak işlenir (Svobodova ve ark., 2016). Bu çift iplikçikli miRNA dubleksisi, RNA ile indüklenmiş susturucu kompleks (RNA Induced Silencing Complex, RISC)-yükleme kompleksi (Loading Complex, RLC) ATP'ye bağımlı bir şekilde dahil edilir. Daha sonra, miRNA'nın bir dizisi (kılavuz dizi) RLC'den ayrılırken, diğer dizi (rehber dizi) olgun RISC yapısını oluşturmak için komplekste kalır ve hedef mRNA'ları yakalamak için kalıp görevi görür (Ha ve Kim, 2014). Genellikle, olgun RISC post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu baskılar. Olgun RISC kompleksi, kalıp dizisi ile oldukça yüksek düzeyde tamamlayıcılık gösteren mRNA'ları, RICS kompleksinin ana bileşeni olan Argonot proteinlerinin katalitik bölümü (RNaz III domaini) aracılığıyla keser ve degrades eder. Kısmen tamamlayıcılık gösteren hedefler için RISC kompleksi hedef mRNA'ların stabilitesini azaltmak için sırasıyla DCP1-DCP2 ve CNOT kompleksleri vasıtasıyla mRNA'ların 7-metilguanozin şapka ve çoklu adenilasyon bölgelerine zarar verir (Jonas ve Izaurralde, 2015). Ek olarak, RISC kompleksi, çoğunlukla hedef genlerin translasyonunu da engeller. Bununla birlikte, tüm miRNA'lar translasyonel baskılamada çalışmazlar. Örneğin, açlık koşulları altında, miR-369-3, fragil X mental retardasyon, otozomal homolog 1 (Fragile X Mental Retardation, Autosomal Homolog 1, FXR1) ile birlikte transkriptin 3' translasyona uğramayan bölge (3' Untranslated Region, 3' UTR) adenin ve urasil açısından zengin elementlere bağlanarak tümör nekroz faktörü- α 'nın (Tumor Necrosis Factor- α , TNF α) translasyonunu aktive eder (Riaza ve ark., 2015). Bu işlem, RISC kompleksinin translasyonun düzenlenmesindeki moleküler düzeydeki rolünü açıklamaktadır (Şekil 2) (Iorio ve Croce, 2012).

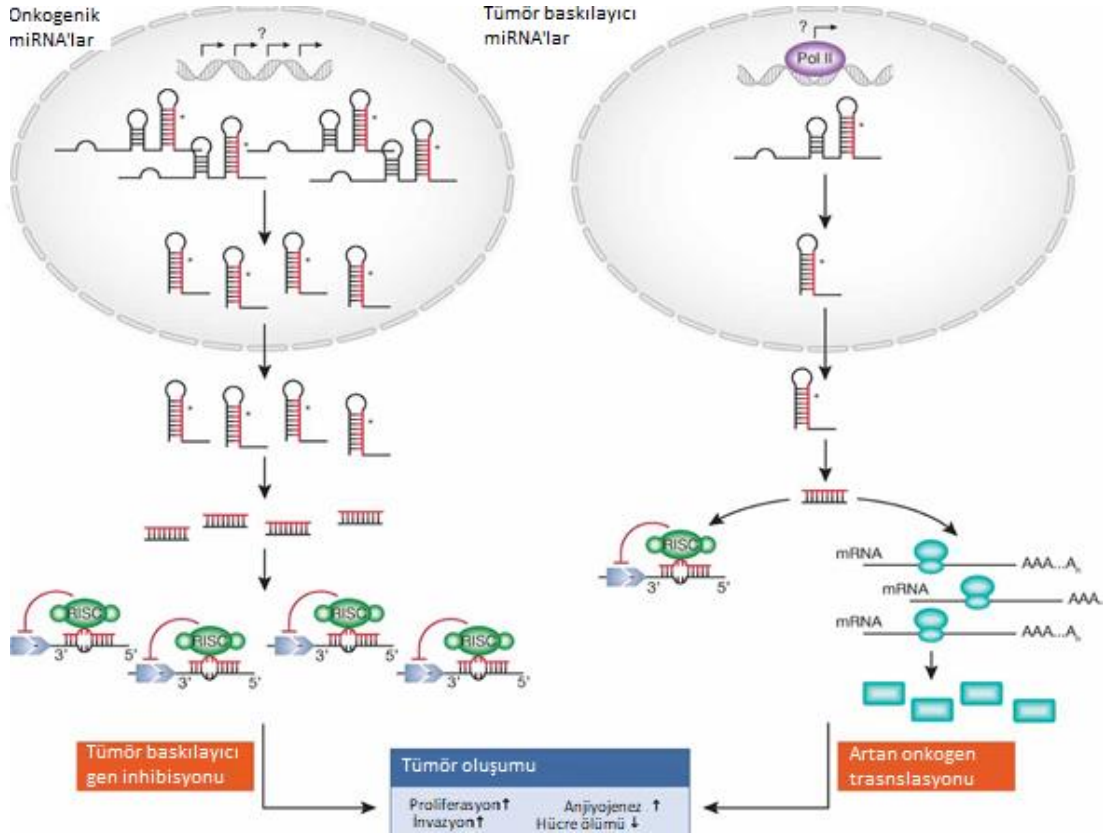


Şekil 2. miRNA biyogenez (Zamani ve Zamani'den uyarlanarak, 2013)

miRNA'lar transkripsiyon seviyesinde gen ifadesini düzenleyen kısa kodlamayan RNA türlerini içerir. Son yıllardaki araştırmalar, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik mekanizmaların sadece protein kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenlemekle kalmadığını, aynı zamanda let-7a, miR-9, miR-34a, miR-124, miR-137, miR-148 ve miR-203 gibi miRNA'larında ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (Ramassone ve ark., 2018). Tersine, miRNA'ların başka bir alt kümesi, DNA metil transferazları, histon deasetilazları ve polikom grubu genleri içeren önemli epigenetik düzenleyicilerin ifadesini kontrol etmektedir (Allis ve Jenuwein, 2016). MiRNA'lar ve epigenetik yollar arasındaki bu geribildirim ağının, bir epigenetik-miRNA düzenleyici döngüsü oluşturduğu ve bütün gen ekspresyon profilini organize ettiği görülmektedir. Bu düzenleyici döngü, normal fizyolojik fonksiyonlar engellenebilir ve çeşitli hastalık süreçleri ortaya çıkar (Sato ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalar, aşırı ifade edilen miRNA'ların, kanser gibi çeşitli hastalıkların işaretçisi olduğunu göstermiştir (Ouyang ve ark., 2014). miRNA ifade profillemesinin, tümörün gelişimi, progresyonu ve tedaviye yanıt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve bunların, tanı, prognostik ve prediktif biyolojik belirteç olarak olası kullanımlarını önerilmiştir (Schwarzenbach, 2015). Ayrıca, miRNA'ların potansiyel onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak işlev görebildiğini gösteren çalışmaların artmıştır. Buna dayanarak, hastalığa cevabı iyileştirmek ve tedavi oranlarını artırmak amacıyla gerçekleştirilen miRNA'ya dayalı anti kanser tedavileri, ya

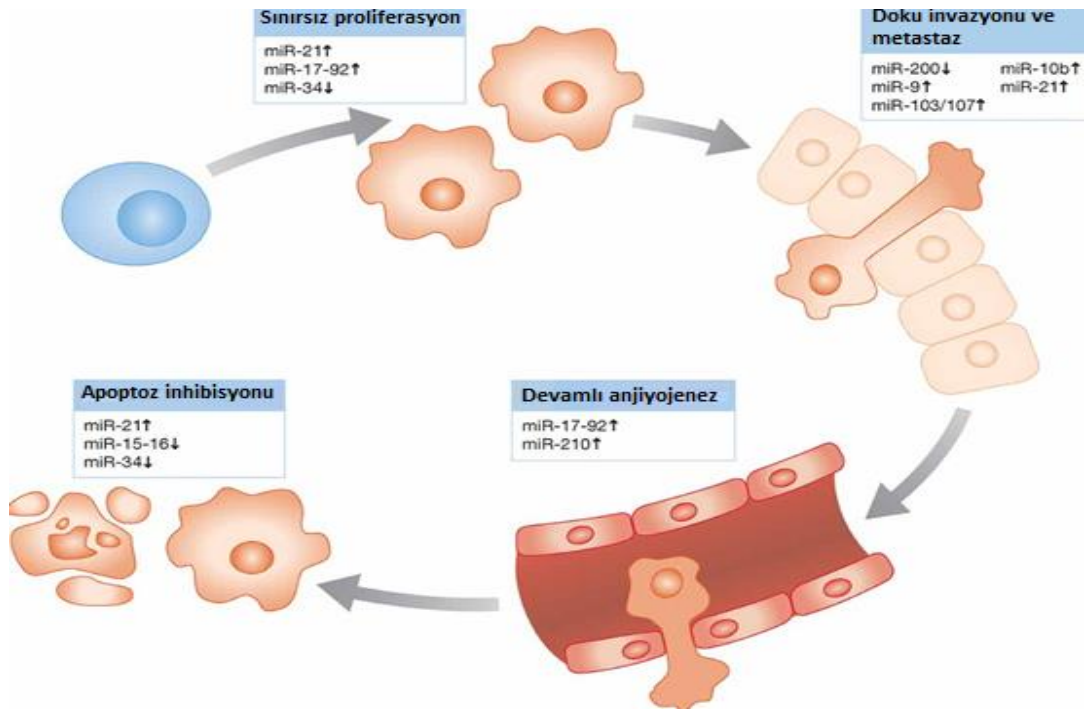
tek başına ya da mevcut hedefli terapilerle kombinasyon halinde son zamanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. miRNA odaklı yaklaşımları kullanmanın avantajı, hücre farklılaşması, çoğalması ve sağkalımı ile ilgili yolların birden fazla efektörünü aynı anda hedefleyebilme yeteneğine dayanmaktadır (Şekil 3) (Iorio ve Croce, 2012; Baer ve ark., 2013).



Şekil 3. miRNA'ların onkogenik ve tümör baskılayıcı olarak etki mekanizmaları (Baer ve ark.'dan uyarlanarak, 2013).

Zamanla çeşitli kanser tipleri kendilerini geliştirmelerine ve bazı durumlarda tedaviyi engelleyen gelişmiş biyolojik faaliyet ağları geliştirmişlerdir (Creixell ve ark., 2015). Bu karmaşık program, primer tümörün yanı sıra stromal hücreler de dahil olmak üzere çoklu hücre tipleri arasındaki iletişime dayanmaktadır (Seguin ve ark., 2015). Kanser progresyonunun altı temel özelliği tanımlanmıştır: büyüme sinyallerinde kendine yeterlilik, büyümeyi engelleyici sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçış ve sınırsız replikasyon potansiyeli, devamlı anjiyogenez ve doku istilası, ve metastaz

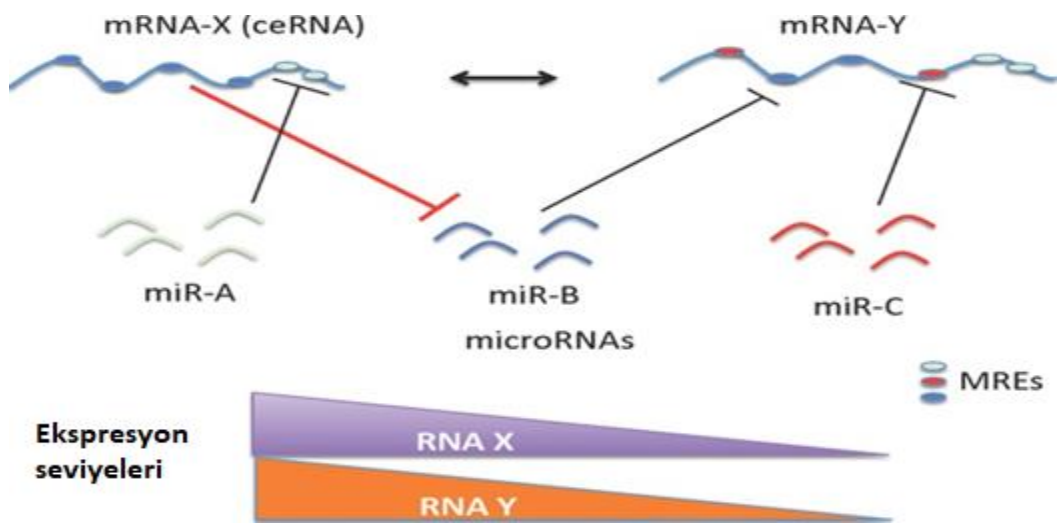
(Fouad ve Aanei, 2017). Düzeni bozulan miRNA'lar, bu özelliklerin her birini hedefleyerek kanserde tümör baskılayıcı veya onkogenik olarak işlev görebilir (Rupaimoole ve ark., 2016). Fonksiyon kazanımı yaklaşımları, tümör baskılayıcı olarak hareket eden miRNA'ların BCL2 (miR-15a ve miR-16-1 tarafından hedeflenmektedir), RAS ve MYC (let-7 tarafından hedeflenmektedir), ve MCL1 (miR-29 tarafından hedeflenmektedir) gibi çeşitli kanser yollarında önemli rolleri olan onkoproteinleri hedeflediğini göstermiştir (Peng ve Croce, 2016). Aksine, kanser hücrelerinde aşırı eksprese olan onkogenik miRNA'ların biyolojik etkilerini incelemek için antisens oligonükleotidler kullanılarak *in vitro* sessizleştirme yapılmaktadır (Cheng ve ark., 2015). Örneğin, miR-21 ekspresyonunun meme, glioblastoma, pankreas ve kolon kanserinde yüksek oranlarda olduğu bildirilmiştir (Pfeffer ve ark., 2015). Ayrıca, glioblastoma hücre hatlarında miR-21 ekspresyonunun bloke edilmesiyle, kaspaz aktivasyonlarında ve apoptozda artış olduğu bulunmuştur (Yeh ve ark., 2015). Ek çalışmalar, miR-21'in tümör baskılayıcı fosfotaz ve tensin homologu (Phosphatase and Tensin Homolog, PTEN) ve programlanmış hücre ölümü 4 (Programmed Cell Death 4, PDCD4) genlerini hedefleyerek anti-apoptotik etkilerin ortaya çıkardığı bulunmuştur (Şekil 4) (Iorio ve Croce, 2012; Manikandan ve ark., 2008).



Şekil 4. Tümör gelişiminde miRNA'ların rolü (Manikandan ve ark.'dan uyarlanarak, 2008).

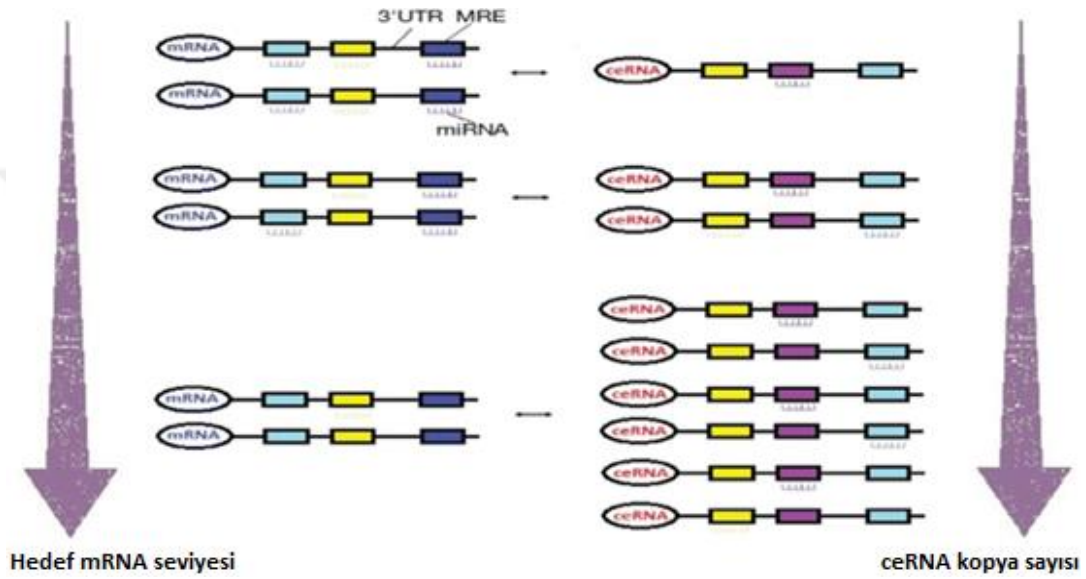
2.2.2. ceRNA'lar

ceRNA'lar, miRNA cevap elemanları (miRNA response elements, MRE's) adı verilen miRNA'lar tarafından tanınan dizileri paylaşan ve bu sayede birbirlerinin ifade düzeylerini düzenleyen RNA tipleri olarak tanımlanabilir (Denzler ve ark., 2016). Gen ekspresyonu, arttırıcı (enhancer) dizilerle “cis” şekilde veya transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler (aktivatör veya baskılayıcı olarak işlev görür) ya da RNA bağlayıcı proteinler tarafından “trans” şekilde düzenlenir (Tay ve ark., 2014). Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalar bazı kodlanan ve kodlamayan RNA moleküllerinin, miRNA süngerleri gibi davranarak trans gen ifadesini düzenleyebildiğini göstermiştir (Guil ve Esteller, 2015). Bu RNA moleküllerine, gen düzenleyicilerinin büyük bir bölümünü oluşturan ceRNA'lar denir (Thomson ve Dinger, 2016). Bu gen düzenleme seviyesi tanımı, genom boyutu ile tür karmaşıklıklarındaki artış arasındaki korelasyonu açıklayabilir (Boyle ve ark., 2014). Protein kodlayan genlerin sayısı alt organizmalar ve insanlar arasında kıyaslanabilir olmasına rağmen, kodlanmayan transkriptlerin sayısı ile türler arasındaki karmaşıklık arasında orantılı bir artış vardır (Hezroni ve ark., 2015). İnsanlarda kodlanmayan dizilerin kodlanan dizilere oranı 47:1'dir ve bu oran da insan genomunun % 97'sinin kodlanmayan dizilerden oluştuğunu gösterir (Almeida ve ark., 2012). Gen düzenleyici mekanizmalara bu yeni ilişkinin de katılması, hedefli tedaviler için yeni adayların bulunabilmesine olanak sağlamaktadır (Şekil 5) (Kartha ve Subramanian, 2014).



Şekil 5. ceRNA kavramı (Kartha ve Subramanian'dan uyarlanarak, 2014).

Son çalışmalarla, psödogenlerin, uzun kodlanmayan RNA'ların (long non-coding RNA, lncRNA) ve çembersel RNA'ların (circular RNA, circRNA), ortak MRE'leri paylaşarak ve normal miRNA aktivitesini inhibe ederek miRNA tutucular olarak işlev yapabileceği keşfedildi (Karreth ve ark., 2015). Bu sünger görevi gören ceRNA'lar, miRNA'ları tutarak, hedef mRNA için mevcut miRNA seviyelerini düşürür ve bu da translasyonun artmasına neden olur (Şekil 6) (Ergun ve Oztuzcu, 2015).



Şekil 6. ceRNA'ların çalışma prensibi (Ergun ve Oztuzcu'dan uyarlanarak, 2015).

İlk endojen miRNA tutucu, ceRNA, bitkilerde keşfedilmiş ve çevresel strese karşı gösterilen miRNA aracılıklı bir tepkiyi azalttığı bildirildi (Franco-Zorrilla ve ark., 2007). Tanımlanan miRNA tutucu Interferon β Promoter Stimulator 1 (*IPS1*) adında kodlamayan bir RNA idi. Bu RNA fosfat eksikliğiyle indüklenen bir miRNA olan miR-399 için bir bağlanma dizisi içermektedir. Bununla birlikte, miR-399 *IPS1*'e bağlanma bölgesinde tam komplementerlik göstermemektedir. Bu nedenle, miR-399 *IPS1* transkriptinin parçalanmasına neden olmuyor, aksine, diğer hedef transkriptler üzerinde bulunan miR-399'un tanı bölgeleri aracılığıyla yakalanıyor. Bu nedenle *IPS1*, aşırı aşırı fosfat biriktirici 2 (Phosphate Overaccumulator 2, *PHO2*) mRNA'sını hedefleyerek düzenleyen miR-399 moleküllerinin sayısını azaltan bir sünger gibi etkili bir şekilde işlev yapabilir (Broderick ve Zamore, 2014). Aksine, ters bir mekanizma olarak, *Arabidopsis thaliana* *pho2* mutanı fosfatın aşırı birikimine sebep olur. Bu mutant,

ubikuitin konjuge edici enzim 24 (Ubiquitin Conjugating Enzyme 24, UBC24) kodlayan *PHO2* geninde mutasyon geçirir ve bu da tam uzunluktaki transkriptlerde bir azalmaya yol açar. Bu mutasyon, fosfat alımı ve kökten uca fosfat taşınımı artışı ve yaşlı yapraklardan genç yapraklara fosfatın yeniden yönlendirilmesinin bir sonucu olarak inorganik fosfat toksisitesi ile ilgili semptomlara neden olur (Koroban ve ark., 2016). Başlangıçta fosfat açlığı sırasında *PHO2* ifadesi azalır. Fosfat açlığına tepki olarak, *IPS1* RNA'ları indüklenir. Artan *IPS1* miR-399'ları tutarak *PHO2* aktivasyonunun artmasına ve buna bağlı olarak fosfat içeriğinin azalmasına neden olur. miRNA aktivitesinin inhibisyonunun bu mekanizmasını tanımlamak için "hedef taklidi" terimi kullanılmaktadır (Karthi ve Subramanian, 2014; Franco-Zorrilla ve ark., 2007).

ceRNA'lar birçok biyolojik süreçle ilişkilendirilmektedir. ceRNA'ların ve miRNA'ların dengesinin bozulması, kanser gibi hastalıkların tetiklenmesi ve gelişmesi için kritik olabilir. ceRNA'ların birçok kanser türünde önemli düzenleyiciler olduğu bulunmuştur (Xu ve ark., 2015). ceRNA'ların gelişimsel süreçlerde (örn., Linc-MD1) yer aldığı bilinmektedir (Sen ve ark., 2014).

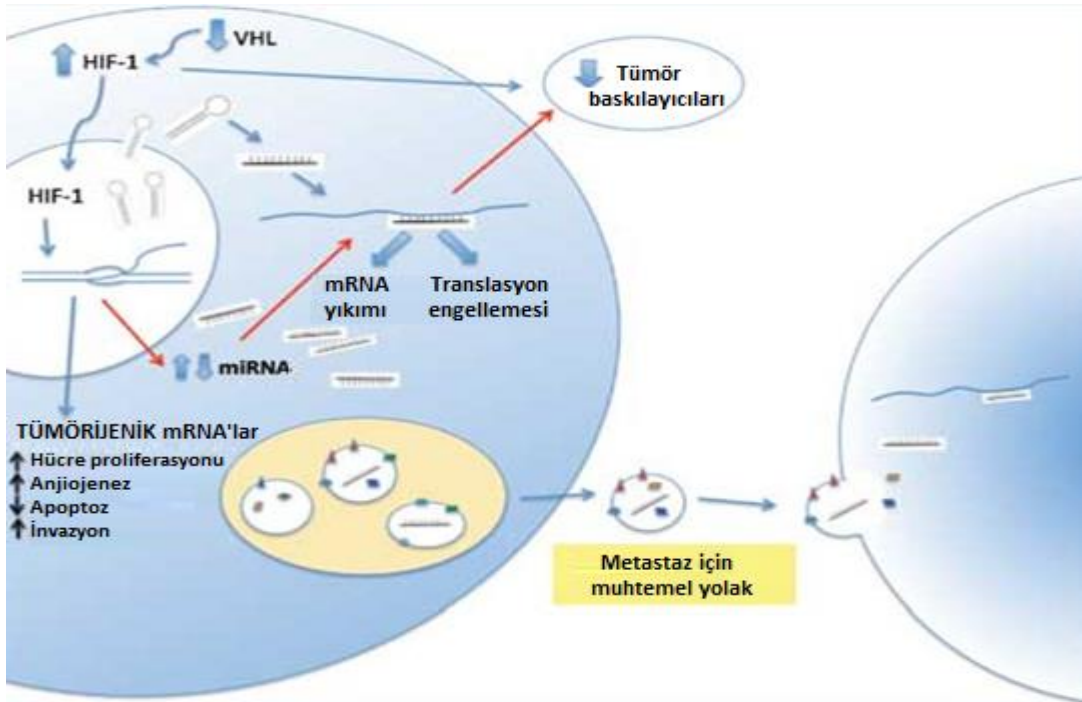
Gen fonksiyonu ve ifadesini değiştiren mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin birikimi kansere neden olur. Bununla birlikte, genom tabanlı somatik mutasyonlar, DNA kopya sayısı değişiklikleri, kromozomal translokasyonları, transkript füzyonları ve alternatif kesilim genellikle kanser oluşumunda görülür (Cheng ve ark., 2016). Sonuç olarak, transkriptlerin translasyona uğramayan bölgelerinin ifadesinin değişmesine neden olan durumlar, MRE düzeylerini etkiler veya hücrelere yeni MRE'ler sunar. ceRNA'ların MRE'lerindeki değişiklikler, belirli bir mRNA transkriptinin miRNA'ları yakalama veya ortamdan seyreltme yeteneğini etkiler (Denzler ve ark., 2014). Sonuç olarak, bozulan ceRNA etkileşimi hastalıklara ve kansere yol açabilir. Son zamanlarda, hedef gen üzerindeki miRNA aktivitesinin, paylaşılan MRE'leri içeren diğer ceRNA'nın varlığı veya yokluğu tarafından etkilenebileceği saptanmıştır (Li ve ark., 2014). RNA dünyasında ceRNA'lar için yeni bir terim olarak ortaya çıkan, "oncocer" (onkogenik ceRNA), birçok kanser tipinin oluşumuna sebep olan kanser yolaklarında önemli roller almaktadır ve bu yolaklardaki miRNA'ları düzenleyen etkileri göz önünde bulundurularak pek çok kanser tipinde çalışılmaya devam edilmektedir (Ergun ve Oztuzcu, 2015).

ceRNA ve miRNA'ların dengesinin bozulmasının, kanser gibi hastalıklarda ceRNA aktivitesi için kritik olabileceği iyi bilinmektedir (Qi ve ark., 2015). ceRNA'lar hastalıklara bağlı genlerin ifadelerini düzenleyerek hastalıklarda etkili rol oynamaktadır. Hastalığa bağlı ceRNA'ların en belirgin kanıtı, tümör baskılayıcı geni *PTEN*'dir. *PTEN* onkogenik fosfoinositid 3-kinaz / Akt sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir. Çalışmalar, *PTEN* ekspresyonunun prostat kanseri, glioblastom ve melanomda ceRNA mekanizması tarafından kontrol edildiğini ve bu mekanizmadaki bozulmanın birçok olguda tümörögeneze neden olduğunu ortaya koymaktadır (Poliseno ve Pandolfi, 2015). Karreth ve ark. (2011), melanomda *PTEN* ceRNA'sı olarak fonksiyon gösteren ve protein kodlayan bir çinko parmak E-kutusu bağlayıcı homeo kutusu 2 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2, *ZEB2*) kopyasının etkinliğini başarıyla doğruladı. Ekip *ZEB2*'nin, miRNA'ya bağlı bir şekilde *PTEN* ekspresyonunun düzenlenmesinde yer aldığını gösterdi. Başka bir çalışmada, protein kodlayan *CNOT* ve VAMP ilişkili protein A (VAMP Associated Protein A, *VAPA*) transkriptlerinin, prostat kanserinde ceRNA mekanizması ile *PTEN* ekspresyonunun düzenlenmesinde yer aldığı gösterilmiştir (Tay ve ark., 2011). İstatistiksel bir analizle, Sumazin ve ark. (2011), glioblastomda miRNA tutucusu gibi davranan yaklaşık 7000 geni tespit etti. Bu ceRNA ağının, *PTEN* de dahil olmak üzere tümör gelişiminde veya tümör baskılanmasında kilit bir rol oynadığı bulunmuştur. Hipotezlerinin doğrulanması için *PTEN* ceRNA'sı olabileceği öngörülen 13 transkriptin regülasyonu azaltıldı, bu da 3'UTR'ye bağlı bir şekilde *PTEN* ekspresyonunun azalmasıyla ve tümör hücresi büyümesinde artışla sonuçlandı. Jeyapalan ve ark. (2011), Sitoplazmik bölge 44 (Cytoplasmic Domain 44, *CD44*) transkriptinin 3'UTR'sinin insan meme kanseri hücre hattı MT-1'de miRNA aracılıklı ceRNA aktivitesi gösterdiği ortaya koulmuştur. *CD44* birçok kanser ile ilişkili bulunmuştur ve arttırılan aktivitesi tümörjenez baskılamada etkili sonuçlar vermiştir. Ekzojen olarak ekspresyon vektörleriyle aşırı ifade ettirilen *CD44* geni 3'-UTR'sinin, hücre migrasyonu ve hücre döngüsü progresyonunun kontrolünde rol oynayan bir gen olan cell division cycle 42'nin (*CDC42*) trasnlasyonun arttırdığı bulunmuştur. Bu çalışmada, miR-216a, miR-330 ve miR-608'in *CD44* ve *CDC42*'nin 3'UTR'sini bağlayabileceğini tespit edilmiştir. Lee ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada, hücre dışı matriks ilişkili gen versikanın (*VCAN*) 3'UTR'sinin aşırı ifadesinin, bu bölgeyi hedefleyen miR-199a-3p'nin hücresel seviyesinde azalmaya neden olduğu

gösterilmiştir. Versikan, hücre adezyonu, proliferasyon, migrasyon ve anjiyogenez ile ilişkilendirilmiştir. İstatistiksel analizlerle, versikan transkriptinin 3'UTR'nin hedefleri arasında olan miR-199a-3p ve miR-144'ün bir hücre döngüsü düzenleyicisi olan retinoblastoma 1'i (*Rb1*) hedeflediği, ve miR-144 ve miR-136'nın *PTEN*'i hedeflediği bulunmuştur. Dahası, meme kanseri hücre hattı 4T1'de versikan 3'UTR'nin aşırı ekspresyonunun *in vitro* ve *in vivo* *Rb1* ve *PTEN* ifadesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, versikan 3'UTR'nin, *Rb1* ve *PTEN*'i hedefleyen miRNA'ların aktivitelerini değiştirip düzenlediği ve bunları bağlayarak translasyon için *Rb1* ve *PTEN* mRNA'larının serbest bırakılmasına yol açtığını göstermiştir (Lee ve ark., 2010).

2.2.3. RHK'de miRNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalar

Çoğu RHK olgusunda ortak sinyal yollarının (VHL/HIF-1 gibi) hedeflenmesine yönelik yeni tedaviler, bu hastalığa yakalanmış olanların durumunu önemli ölçüde iyileştirmiştir. Hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı fonksiyona sahip birçok miRNA'nın artan popülaritesi göz önüne alındığında, RHK hastalarında bu küçük yapıların ölçülmesi ve manipülasyonu böbrek kanseri teşhis ve tedavisinde bir başka değerli ilerleme sağlayabilir (Şekil 7) (Sellitti ve Doi, 2015).



Şekil 7. Onkogenik ve tümör baskılayıcı fonksiyona sahip miRNA'lar (Sellitti ve Doi'den uyarlanarak, 2015).

Dörtüyz yetmiş miRNA içeren bir mikroarray platformu kullanılarak 16 RHK ve normal böbrek dokusunun karşılaştırıldığı çalışmada, 43 farklı şekilde ifade edilen miRNA tanımlanmıştır ve bunların çoğunun RHK tümör dokusunda ifadesi azalmıştır. Bunlardan ekspresyonunda en büyük azalma gözlenen miRNA'lar miR-200 ailesine ait olan miR-141 ve miR-200c idi (Jung ve ark., 2009).

Ayrıca, benzer boyutta miRNA mikroarray ve bunu takip eden eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time-Polimerase Chain Reaction, RT-PCR) konfirmasyonu kullanılarak yapılan çalışmada, RHK grubunda yine miR-141 ve miR-200c'nin anlamlı olarak ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, diğer 18 miRNA'nın ifadesinin %50 oranında azaldığı ve 13 miRNA'nın da iki kat ve daha fazlası oranda ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Aşırı ifade edilen miRNA'lardan miR-122a, miR-224, miR-210 ve miR-155'in daha önce meme, akciğer, kolon, tiroid ve B hücreli lenfoma tümörlerinde c-myc onkogeninin aşırı ekspresyonuyla bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Jung ve ark., 2009).

RHK'de en yüksek düzeyde regülasyonu bozulan miRNA'ların bir diğer örneği ise 13 numaralı kromozom üzerindeki miR-17-92 kümesinin üyeleridir. miR-17-92 onkogenik miRNA'sı altı miRNA'nın öncüllerini (miR-92a, miR-17, MiR-18a, miR-19a, miR-19b ve miR-20b) kodlamaktadır ve bu miRNA ailesi daha önce diğer kanser türleri ile ilişkilendirilmiştir (He ve ark., 2005). Diğer bir çalışmada, bu miRNA ailesinin RHK'de aşırı ekspresyonunu kantitatif RT-PCR ile kanıtlanmıştır. Ayrıca, bu miRNA ailesinin üyelerinden biri olan miR-17-5p'nin bir RHK hücre hattına transfeksiyonunun hücre proliferasyonunu önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Valera ve ark., 2011).

Onkogenik yolaklarla ilişkili genlerle etkileşimde olduğu tahmin edilen miRNA'ların birçoğunun daha önceki çalışmalarda diğer tümör tiplerinde önemli oranda arttığı veya azaldığı ve dolayısıyla RHK'de onkogen veya tümör baskılayıcı olarak düşünülebileceği gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2015). Örneğin, RHK'de miR-210'un aşırı ekspresyon göstermesi, miR-210'un VHL/HIF-1 yolağının bozulmasından dolayı düşük oksijen gerilimi altında meme kanserini indükleyerek gösterdiği onkogenik rolü ile uyumaktadır (Iwamoto ve ark., 2014). Bununla birlikte, regülasyonun bozulduğu tahmin edilen çoğu miRNA için *in silico* olarak gerçekleştirilen çekirdek dizi eşleminin tek başına yüksek oranda yanlış-pozitif miRNA hedef geni verebileceği

savunulmuştur (Schanen ve ark., 2011). Bu nedenle, daha sonraki çalışmalar, RHK hastalarının mRNA'larından elde edilmiş transkriptomları ya da proteom veri tabanlarındaki deregüle miRNA'ları, RHK'nin indüksiyonu ve progresyonunda spesifik rolleri olan miRNA ve mRNA düzenleyici ağlarla ilişkilendirildiğini göstermiştir. Bir çalışmada RHK'de regülasyonu bozulan miRNA hedeflerini tespit etmek için daha katı kriterler kullanılmıştır. Bu kriterler miRNA çekirdek dizisi ve hedef mRNA arasında tam eşleşme, memeli türlerine özgünlük, ve mRNA ve miRNA düzeyleri arasında negatif bir korelasyon gerekliliği olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak, vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, *VEGF*) seviyeleri ile miR-200 ailesinin (miR-200a, miR-200b, miR-200c ve miR-141) üyelerinin ekspresyonu arasında çok güçlü bir ters korelasyon tespit edilmiştir ve bu da miRNA-200 ailesi üyelerinin kaybının RHK anjiyogenezinde rol aldığını düşündürmektedir (Seliger ve ark., 2010).

Diğer çalışmalar, metastaz ile ilişkili bir süreç olan RHK'nin epitelyal-mezenkiyal geçişte miR-200 ailesinin kanonik rolünü doğrulamıştır (Lu ve ark., 2015; Mutlu ve ark., 2016). En düzensiz miRNA'ların mRNA hedefleri arasında, *c-MET*, *VEGF-A*, *VEGF-A* reseptörleri, nöropilin 2 (*NRP2*) ve FMS benzeri kinaz 1 (FMS-like tyrosine kinase 1, *FLT1*) de dahil olmak üzere RHK'nin anjiyogenez, motilite ve metastazında yer alan birkaç onkogen vardır (Sellitti ve Doi, 2015). Sonuçlar, analiz farklı ifade edilen, her biri RHK gelişiminde kritik öneme sahip tümör baskılayıcı veya onkogen olan teorik olarak belirlenmiştir. Daha sonra, hedef mRNA'lar ile etkileşen bir miRNA ağı (miR-206, miR-106-5p, miR135a-5p) oluşturmuştur. Yapılan bir çalışmada, RHK'de regülasyonu bozulan spesifik miRNA'ların *VHL* mRNA düzeyleri ile korelasyonları incelenmiştir. Bu incelemeler, birçok RHK alt tipinde miR-92 ve *VHL* ifadesi arasında kuvvetli bir ters korelasyonun varlığını göstermiştir (Valera ve ark., 2011). Sonuçlar, spesifik bir miRNA'nın aşırı ifadesi *VHL* mutasyonundan bağımsız HIF-1 transkripsiyonel aktivitesini arttırabileceğini ve dolayısıyla RHK indüksiyonunda ve progresyonunda önemli bir rol oynayabileceğini öngörmektedir (Mathew ve ark., 2013). Bunun bir örneği olarak başka bir çalışmada, onkogenik miRNA olan miR-23b'nin prolin oksidazı (*POX*) hedefleyerek RHK oluşumuna katkı sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, bunun da prolin hidrosilazın aktivitesinin

azalmasına ve dolayısıyla proteozomal yıkımdan kaçan daha yüksek HIF-1 seviyelerine neden olabileceği bulunmuştur (Yoshino ve ark., 2013).

Çok şaşırtıcı olmayan bir şekilde, RHK transkriptomunda transkripsiyonu aşırı artan veya azalan, miR-210 ve miR-221 dahil olmak üzere, birçok miRNA erken teşhis için serum biyolojik belirteçleri olarak geliştirilmiştir (Teixeria ve ark., 2014). Başka bir çalışmada, RHK'nin serumdan tanısı için birkaç aday miRNA değerlendirilmiştir ve miR-1233 seviyelerinin güçlü bir biyolojik belirteç olduğu bulunmuştur (Wulfken ve ark., 2011). Ayrıca, periferik kandaki miR-508-3p seviyelerinin aynı tanı amacı için hizmet edebileceğini savunulmuştur (Zhai ve ark., 2012). Wang ve ark. (2015), RHK'nin erken tanısında kullanmak üzere bireysel miRNA'ların kullanımındaki kısıtlamaları göz önüne alarak beş miRNA'lık (miR-193a-3p, miR-362, miR-572, miR-28-5p ve miR-378) bir panel geliştirmiştir. Sonuç olarak, tanımlanan beş miRNA'nın (miR-193a-3p, miR-572, miR-378 ve miR-28-5p dahil olmak üzere) dördünün odds oranları, RHK grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Odds oranları dört miRNA için sırasıyla 2,226, 2,012, 2,012 ve 0,076 idi ($p < 0.05$). Bu sonuçlar çalışmada tanımlanan dört miRNA'nın RHK için bağımsız güçlü birer tanı belirteci olabileceğini düşündürmektedir. Başka bir çalışmada, miR-26a-2, miR-191, miR-337-3p, miR-378'den oluşan bir panel önerilmiştir. RHK hastalarında, miR-378 seviyesi anlamlı olarak artmış ve bu nedenle validasyon için seçilmiştir. Bu çalışmaya, 117 RHK hastası ve 123 kişilik kontrol grubunun dahil edilmiştir. miR-378'in analizi miR-378 seviyesinin değişimini doğrulamamıştır. Ayrıca miR-378, evre, lenf düğümü/uzak metastaz, vasküler invazyon ve Fuhrman derecesi ile korelasyon göstermemiştir (Hauser ve ark., 2012). Diğer bir çalışmada, aynı amaç için miR-378 ve miR-451'in kullanılabilmesi tespit edilmiştir. RHK hastalarının serumlarında miR-378 düzeyleri artarken ($p = 0,0003$), miR-451 düzeyleri azalmıştır ($p < 0,0001$). miR-378 ve miR-451'in kombinasyonu % 81 duyarlılık ve % 83 özgüllük ile RHK hastalarının serumlarında biyobelirteç potansiyeli taşımaktadır (Redova ve ark., 2012). Kritik olarak, bu multi-miRNA panelleri RHK ile diğer organlardan kaynaklanan kanserler arasında ayırım yapma potansiyeline sahiptir (Juan ve ark., 2010).

RHK ile ilişkilendirilmiş miRNA'lar, muhtemel hedefleri, pozitif veya negatif etkileri ve işlevleri olan yolaklarla özet olarak Tablo 2'de sunulmuştur (Sellitti ve Doi, 2015).

Tablo 2. RHK ile ilişkilendirilmiş miRNA'lar, muhtemel hedefleri, pozitif veya negatif etki durumları ve etkili oldukları yollar (Sellitti ve Doi'den uyarlanarak, 2015)

miRNA	Etki durumu	Hedef gen	Etkilenen fonksiyon
miR-21	Pozitif	<i>TIMP3</i>	Apoptoz
		<i>PTEN</i>	Proliferasyon, invazyon/migrasyon
		<i>TCF21</i>	İnvazyon
		<i>PDCD4</i>	Proliferasyon, hücre transformasyonu
miR-224	Pozitif	<i>DIO1</i>	...
miR-122	Pozitif	...	Proliferasyon, colony formation, invazyon
miR-200c	Negatif	...	Proliferasyon, migrasyon
		<i>ZEB1</i>	İnvazyon/migrasyon
		<i>HO-1</i>	Apoptoz
		<i>CYP1B1</i>	Dosetaksel hassasiyeti
miR-30a	Negatif	<i>HIF2A</i>	Proliferasyon, anjiogenez, tümör büyümesi
miR-138	Negatif	<i>HIF1α</i>	Apoptoz, migrasyon
		<i>EZH2</i>	Hücre senesansın tetiklenmesi
miR-129-2	Negatif	<i>SOX4</i>	İnvazyon/migrasyon
miR-141	Negatif	<i>SEMA6A</i>	...
miR-335	Negatif	<i>BCL-W</i>	Proliferasyon, invazyon
miR-206	Negatif	...	Azalmış hücre viabilitesi
miR-155	Pozitif	<i>BACH1</i>	Proliferasyon, migrasyon, apoptoz
		<i>THRB</i>	...
miR-210	Pozitif	<i>E2F3</i>	Anploidy
		<i>HIF1α</i>	Viabilite, hücre döngüsü progresyonu, invazyon
miR-200b	Negatif	<i>ISCU</i>	Proliferasyon
		...	Proliferasyon, migrasyon

2.2.4. RHK'de ceRNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalar

Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas, TCGA) veri tabanından seçilen 59 RHK hastasının verileri, farklı klinik özelliklerde lncRNA'ların diferansiyel ekspresyon profillerini incelemek ve tümöre spesifik lncRNA'ların ceRNA potansiyelini saptamak için irdelenmiştir. Bu çalışmada, 150 lncRNA'nın tümör ve normal dokular arasında diferansiyel ekspresyon profili gösterdiği saptanmıştır (kat değişiklik $\geq 1,5$, $p < 0.001$). Bunların arasında, 12 lncRNA aynı zamanda klinik özelliklere göre farklı

olarak eksprese edilmiştir (kat değişim $\geq 1,5$, $p < 0,01$). Ayrıca, 7 lncRNA'nın (*COL18A1-AS*, *BRE-AS1*, *SNHG7*, *TMEM51-AS1*, *C21orf62-AS1*, *LINC00336* ve *LINC00882*) genel sağkalım ile anlamlı korelasyon (log-rank $p < 0,05$) gösterdiği bulunmuştur. RHK'de 16 lncRNA, 18 miRNA ve 168 protein kodlayan RNA içeren bir ceRNA ağı oluşturulmuştur. TCGA veri tabanından çıkarılan bağımsız RHK hasta kohortu analiz edilerek, farklı klinik özellikleri farklı olarak ifade edilen lncRNA'lar taranmış ve bir lncRNA ilişkili ceRNA ağı elde edilmiştir. Çalışma, bazı lncRNA'ların RHK progresyonu ve prognozu ile ilişkili olduğunu ve kompleks ceRNA ağı içerisinde ceRNA'lar olarak işlev görebileceğini öngörmüştür (He ve ark., 2016).

PTENP1, *PTEN* tümör baskılayıcı geninin bir psödogenidir. RHK'de *PTENP1*'in fonksiyonları henüz çalışılmamıştır. RHK'de, *PTENP1*'in promoter metilasyonu nedeniyle RHK tümör dokularında ve hücrelerinde ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. *PTENP1* ve *PTEN*, miR-21'in doğrudan hedefleridir ve bunların ekspresyonu, RHK hücre hatlarında miR-21 tarafından baskılanmaktadır. miR-21 ifadesi, *in vitro* olarak RHK hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu, ve *in vivo* olarak tümör büyümesini ve metastazı arttırmaktadır. *PTENP1*'in miR-21'i eksprese eden hücrelerde aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonunu, invazyonunu, tümör büyümesini ve metastazı azalmakta ve *PTEN* ekspresyonu ile indüklenen fenotipleri tekrar ortaya çıkarmaktadır. RHK hücrelerinde *PTENP1*'in aşırı ekspresyonu, bu hücreleri, *in vitro* ve *in vivo* olarak sisplatin ve gemsitabin tedavilerine duyarlı hale getirir. RHK hastalarının tümör dokularında, *PTENP1* ve *PTEN* ifadesiyle korelasyon göstermektedir ve her ikisinin ifadesi de miR-21 ifadesi ile ters korelasyon gösterir. *PTENP1* ekspresyonu olmayan RHK hastalarında daha düşük bir sağkalım oranı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, *PTENP1*'in kanser progresyonunu baskılamak için RHK'de bir ceRNA olarak işlev gördüğünü göstermektedir (Yu ve ark., 2014).

Bir lncRNA olan HOX transkripti antisens RNA (HOX Transkript Antisense RNA, *HOTAIR*), pek çok kanser türünde onkogen olarak değerlendirilmektedir (Hajjari ve Salavaty, 2015). Daha önceki çalışmalar *HOTAIR*'in RHK tümör hücrelerinin çoğalması ve tümörögenezinde rol oynamasına karşın, miR-217'nin RHK'de tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü göstermiştir (Li ve ark., 2013). Çalışmada, önce miR-217'nin *HOTAIR* ifadesini artırdığı, bunun tümör progresyonuyla korelasyon gösterdiği ve RHK tümör dokularında ve hücrelerinde miR-217'nin ekspresyonunun

azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, *HOTAIR* ekspresyonunun RHK tümör dokularında miR-217 ekspresyonu ile negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. *HOTAIR*'in fonksiyon kazanımı ve kaybının, *HOTAIR*'in HIF1 α ekspresyonunu kolaylaştırmak amacıyla miR-217 için bir ceRNA olarak işlev gördüğü bulunmuştur. Ayrıca *HOTAIR*'in ifadesindeki azalmanın RHK proliferasyonunu, hücre migrasyonunu ve EMT sürecini destekleyen ve apoptozu inhibe eden *AXL* seviyesini artırdığı ortaya konmuştur. Dahası, *HOTAIR* ifade kaybı, tümör büyümesini bastırması ve proliferasyon antijeni *ki-67*, *HIF-1 α* ve *AXL*'nin ekspresyonunu azaltırken *in vivo* olarak miR-217 ekspresyonunu arttırmıştır. Ayrıca, *AXL* inhibitörü olarak kullanılan BGB324 ile *HOTAIR*'in hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak *AXL* sinyali aracılığı ile RHK aktivitesini desteklediği teyit edilmiştir. Sonuç olarak, *HOTAIR*'in RHK tümöröenezini, miR-217/HIF-1 α /*AXL* yolu aracılığıyla teşvik ettiği gösterilmiştir (Hong ve ark., 2017).

Bu çalışmanın ilk aşaması olarak RHK patogenezinde aktif bir fonksiyona sahip olabileceği öngörülen muhtemel ceRNA etkinliği gösterebilecek genleri *in silico* analiz sonucunda belirlemeyi amaçladık. Belirlenen genlerin karşılaştırmalı olarak RHK'li hastalardan alınan tümör ve çevresindeki normal renal biyopsi örneklerinde ifade seviyelerini belirlemeyi ve hasta parametreleriyle olan potansiyel ilişkisini araştırmayı hedefledik.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Gönüllü Seçimi ve RHK Tanısının Konulması

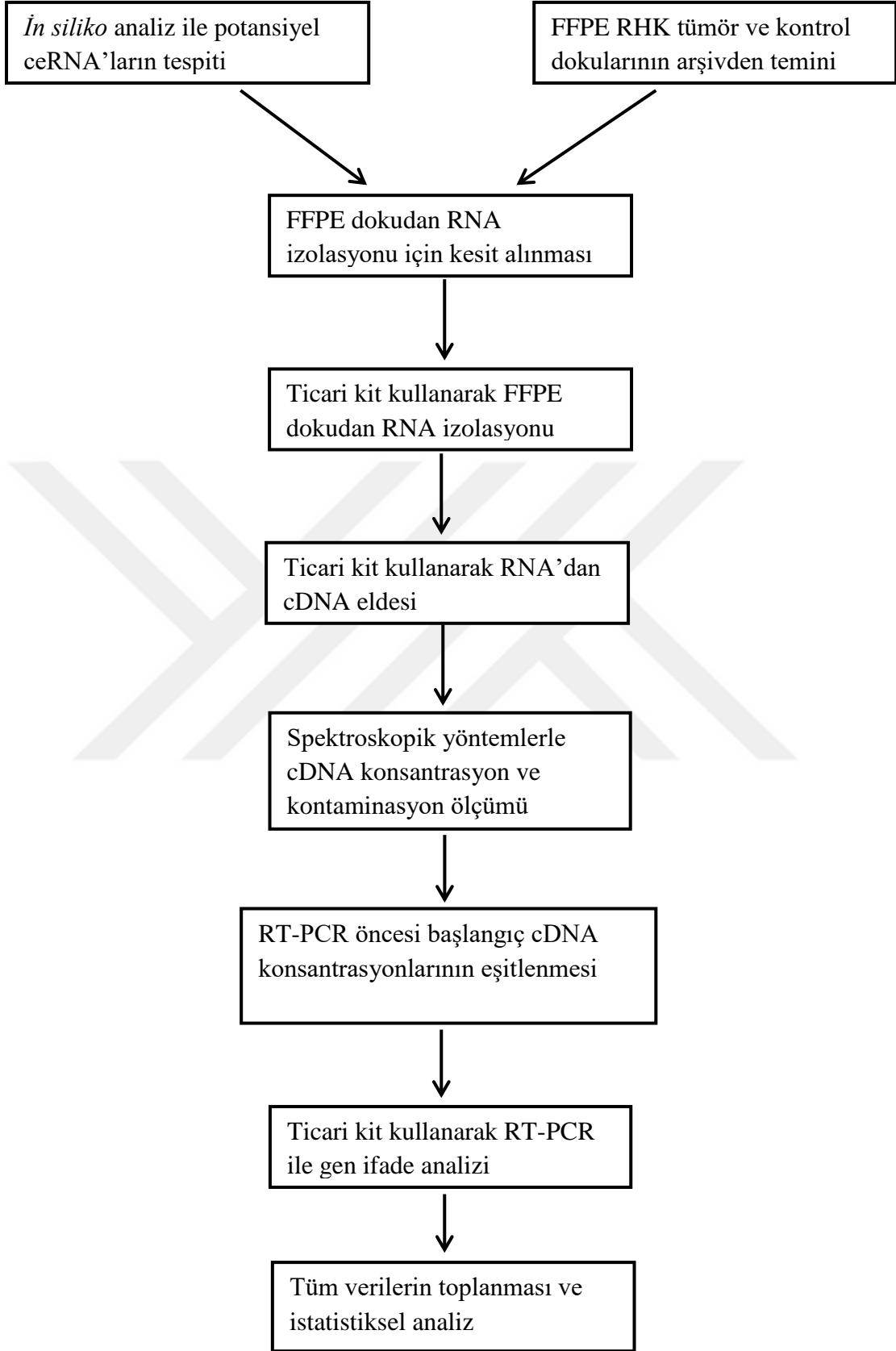
Çalışmaya Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Tıp Fakültesi Üroloji Kliniği'ne Haziran 2016 ile Haziran 2017 tarihleri arasında başvuran ve ilk kez şeffaf hücreli RHK tanısı alan 19 hasta dahil edildi. Bu hastalardan radikal nefrektomi ile çıkarılmış tümörlü dokunun ve bu dokunun çevresindeki sağlıklı böbrek dokusunun bir kısmı histopatolojik inceleme amacıyla alındı. Alınan dokular %10 formalinde fikse edildikten sonra parafine gömülü olarak arşiv dokusu olarak Patoloji Anabilim Dalı'nda oda sıcaklığında saklandı. RHK tanısı radyolojik ve histopatolojik incelemeler sonucunda konuldu. Böbrek tümörlerinin histolojik sınıflamasında International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Renal Neoplazi Sınıflandırması (2012) kullanıldı (Hes, 2014).

Gönüllülerin araştırmaya dahil olma kriteri olarak ilk kez RHK tanısı almış olması arandı. Daha önce kanser tedavisi alan, ailesinde RHK tanısı alan başka bireyler bulunan, erken yaşta (<35) RHK tanısı alan, metastaz olan ve örnek alınmadan önce kemoterapi veya radyoterapi alan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmaya dahil edilecek hasta ve kontrol grubu birey sayısı %95 güven aralığında ve %80 test gücüyle belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı hasta sayısı en az 19 olarak hesaplandı.

Hastane veri otomasyon sistemi olan Nucleus sisteminden, çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri, histopatoloji sonuçları, kan biyokimya, hemogram sonuçlarına tek tek ulaşıldı. Daha sonra tüm veriler istatistiksel analize uygun bir biçimde tek bir liste haline dönüştürüldü. Ek olarak literatürde RHK ile ilişkili olduğu bilinen nötrofil/lenfosit ve trombosit/lenfosit oranları hesaplanarak liste halinde kaydedildi.

OMÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 14.04.2016 tarihli toplantısında, tez çalışmasının amaç, gereç, yaklaşım ve yöntemi incelenmiş ve gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir (Karar no: 2016/139) (Bkz: Ek A).

Çalışmada izlenilecek metodoloji aşağıda şematize edildi (Şekil 8).

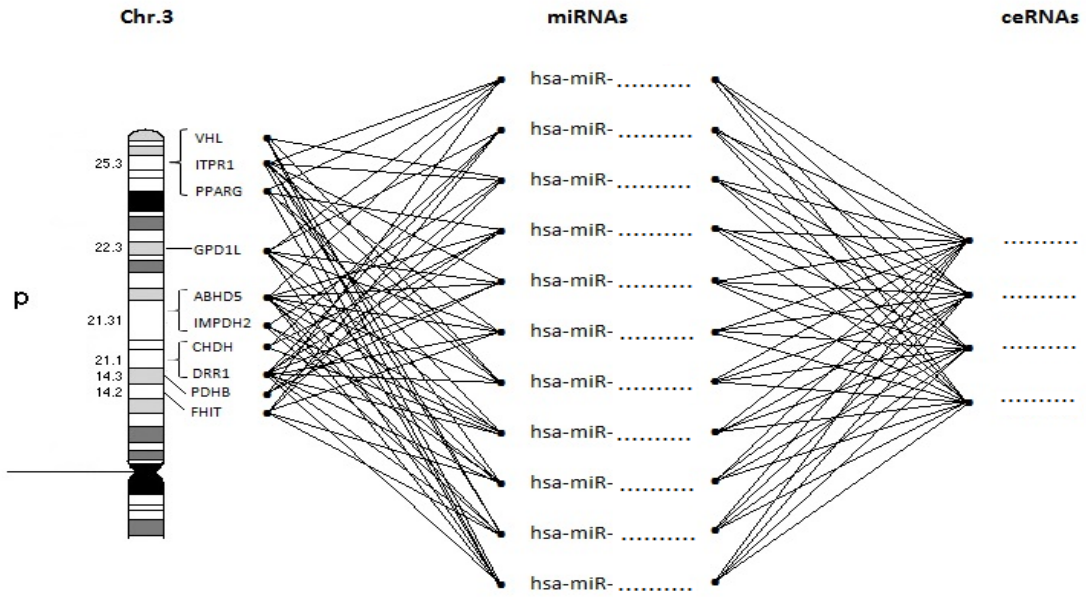


Şekil 8. Çalışmanın akış şeması

(Kısaltmalar. cDNA: complementary DNA, komplementer DNA; ceRNA: Competing endogenous RNA; FFPE: Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; RHK: Renal Hücreli Karsinom;; RT-PCR: Eş Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Real Time-Polymerase Chain Reaction)

3.2. *İn Siliko* ceRNA Analizi

Daha önce yapılmış çalışmalar, RHK olgularında 3 numaralı kromozomun 3p12-p26 lokusunda bulunan *VHL* (%96), *ITPR1* (%1), *PPARG* (%1), *GPD1L* (%80), *ABHD* (%85), *IMPDH2* (%81), *CHDH* (%78), *DRR1* (%68), *PDHB* (%74) ve *FHIT* (%96) genlerinin parantez içinde belirtilen sıklıkla delesyona uğradığını göstermiştir (Singh ve Kadam, 2013; Shuib ve ark., 2011; Gatto ve ark., 2014; Moch, 2013; Wang ve ark., 2000; Wang ve ark., 2014). Delesyona uğrayan bu genlerden en az beş tanesini hedefleyen 11 miRNA, miRWalk veri tabanı kullanılarak tespit edildi. Bunu yaparken tek tek delesyona uğrayan genleri hedefleyen miRNA'lar veri tabanından çekildi. Daha gerçekçi sonuçlar elde edilmesi amacıyla miRWalk veri tabanını kullanırken tahmine dayalı modül yerine valide edilmiş modül kullanıldı. Valide edilmiş modülde, elde edilen miRNA hedef listesi en az bir deneysel aşamayla kanıtlanmış verilere dayanmaktaydı. Sonraki aşamada, bu miRNA'ların tamamı tarafından hedeflenen, potansiyel olarak en muhtemel ceRNA aktivitesi gösterebilecek dört gen ComiR veri tabanı kullanılarak tespit edildi. Bunu yaparken ComiR veri tabanına daha önce tespit edilen miRNA listesi yüklendi ve çalıştırıldı. Analiz sonucu olarak ComiR veri tabanı 11 tane miRNA'nın da eş potansiyelle hedeflediği genlerin listesini verdi. Bu liste hedeflenme potansiyeli en yüksek olan genden en düşük olanına doğru sıralanmaktaydı. Bu listenin en tepesinde, yani en yüksek hedeflenme katsayısına sahip, dört gen çalışma için seçildi (Dweep ve Gretz, 2015; Coronello ve Benos, 2013; Ergun ve Oztuzcu, 2015) (Şekil 9).



Şekil 9. RHK olgularında 3 numaralı kromozomun kısa kolunda delesyona uğrayan genler değerlendirmeye alınarak, analiz edilen muhtemel ceRNA aktivitesi gösteren genlerin *in silico* analiz yöntemi şeması

3.3. FFPE Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu

Arşivdeki her olguya ait FFPE tümör ve çevresindeki sağlıklı böbrek dokusu örneklerinin üzerindeki fazla parafin uzaklaştırıldı. Sonrasında, Microtome (Leica Microsystems, Nussloch, Almanya) cihazı kullanılarak 5 µm kalınlığında 3-4 adet kesit alındı ve steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Kesit alınırken kontaminasyon riskini en aza indirmek için her örnek için bıçağın değiştirilmesine dikkat edildi. Bu aktarım yapıldıktan sonra RNA izolasyonu aşamalarına başlayana kadar kesit içeren tüpler -20°C'de bekletildi. FFPE dokudan total RNA izolasyonu için miRNeasy FFPE Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı (Hirata ve ark., 2015). Kit protokolünde bulunan aşağıdaki çalışma prosedürü uygulandı:

1. Tüp içerisindeki kesitlerin üzerine 1 ml ksilen eklendi ve 10 saniye vorteks uygulandı.
2. 2 dakika süre ile 10000 rpm'de santrifuj uygulandı ve süpernatant atıldı.
3. 1 ml absöü etanol eklendi ve 7 dakika vorteks uygulandı.
4. 2 dakika süre ile 10000 rpm'de santrifuj uygulandı, süpernatant atıldı ve kalan pelletin iyice kuruması sağlandı.
5. 150 µl PKD tampon eklendi ve vorteks uygulandı.

6. 1 dakika süre ile 10000 rpm'de santrifuj uygulandı.
7. 10 µl proteinaz K dipteki renksiz kısma eklenip, hafifçe pipetaj yapıldı.
8. 56°C'de 15 dakika ve hemen ardından 80°C'de 15 dakika çalkalamalı su banyosunda (Nüve, Ankara, Türkiye) inkübe edildi. Bu aşamada iki bekleme süresi arasında sıcaklığın 56°C'den 80°C'ye daha hızlı çıkartmak ve sıcaklık değişimi için geçen süreyi kısaltmak için cihazın su haznesine kaynamış su ilavesi yapıldı.
9. İnkübasyon sonrası dipteki renksiz kısım yeni bir 1,5 ml'lik Eppendorf tüpüne alındı.
10. 3 dakika boyunca buzda inkübe edildi.
11. 15 dakika 13500 rpm'de santrifuj yapıldı.
12. Pellet sarsılmadan süpernatant ayrı bir tüpe alındı.
13. 16 µl DNA Booster Tamponu ve 10 µl DNaz I Stock solüsyonu eklendi. (DNaz I Stock solüsyonu liyofilize halde kitin içerisinde bulunmaktadır. Bu yüzden kitin önerdiği şekilde çalışma öncesinde 550 µl RNaz içermeyen su ilave edildi, çok hafifçe tüp ters düz edildi ve kullanıma hazır hale getirildi.)
14. Tüp ters-düz edilerek karıştırıldı, kısa bir santrifuj yapıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
15. 320 µl RBC tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı.
16. 1120 µl absölu etanol eklendi ve pipetajla iyice karıştırıldı.
17. Bu karışımın 700 µl'si 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş kolonlara eklendi, kapak hafifçe kapatıldı, 15 dakika 10000 rpm'de santrifuj edildi ve süzülen sıvı atıldı.
18. Kalan tüm örnek bitene kadar bu aşama tekrar edildi.
19. Kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu eklendi ve 10000 rpm'de 15 saniye santrifuj edildi ve süzüntü atıldı. (Kitin içerisinde bulunan RPE tamponu kullanıma hazır değildir. Raf ömrünü uzatmak için etanol eklenmeden gönderilmektedir. Kullanıma hazır hale getirmek için tüp içerisinde bulunan 11 ml'lik solüsyona 44 ml %100'lük etanol eklenerek RPE tamponu çalışma öncesi hazır hale getirildi.)
20. Kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu eklendi ve 10000 rpm'de 2 dakika santrifuj edildi ve süzüntü toplama tüpü ile beraber atıldı.

21. Kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi, kapak açık bir şekilde 5 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı.

22. Kolon temiz bir 1,5 ml'lik ependorfa yerleştirildi, 20 µl RNaz içermeyen su eklendi ve kapak kapalı bir biçimde 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi.

23. Elde edilen süzüntü yaklaşık 18 µl RNA içermekteydi. RNA örnekleri elde edilir edilmez bir sonraki aşama olan komplementer DNA (cDNA) eldesine kadar -20°C'de tutuldu. Çalışmamız boyunca RNA izolasyonu ve cDNA eldesi hiç vakit kaybetmeden birbiri ardına gerçekleştirildi.

3.4. cDNA Eldesi ve Kalite-Miktar Tayini

Elde edilen RNA örnekleri Ipsogen RT Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak ters transkripsiyon yöntemiyle cDNA'ya çevirildi. Her bir RNA örneğinin 10 µl'si cDNA çevirim reaksiyonu öncesi 5 dakika 65°C'de inkübe edildi. Bu inkübasyon sonrası 5 dakika buzda bekletildi. Ters transkripsiyon reaksiyonu için ön karışım kitin belirttiği şekilde hazırlandı (Tablo 3).

Tablo 3. Revers transkripsiyon reaksiyonu ön karışım bileşenleri

Bileşenler	Örnek başına hacim (µl)
5x Ters Transkriptaz tamponu	5
dNTP	2
Random primer (100 µM)	5,25
RNaz İnhibitörü (40 U/µl)	0,5
Ters transkriptaz (200 U/µl)	1
DTT	1,25
RNaz içermeyen su	0,5
Örnek başına ön karışım hacmi	15,5

(dNTP: Deoksinükleosid trifosfat; DTT: Ditiyotretol)

Ön karışım dikkatlice karıştırıldı, kısa süreli santrifüj edildi ve her bir RNA örneğinin 10 µl'si için ön karışımdan 15 µl eklendi. Oluşturulan karışımlar GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazında revers transkripsiyon programında 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 60 dakika, 85°C'de 5 dakika ve 4°C'de 5 dakika bırakıldı (Ghallab ve ark., 2015). cDNA'lar eş zamanlı PCR (RT-PCR) gerçekleştirilinceye kadar -20°C'de saklandı.

RT-PCR deneyleri öncesi elde edilen cDNA örneklerinin miktarlarını ve kalitesini belirlenmek amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Kalite ve miktar tayini Microplate Spektrofotometre (Multiscan GO, Thermo Scientific, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA kalitesinin bir göstergesi olarak A260/A280 oranının 1,8'e yakın olması beklendi. İfade analizi deneyleri öncesi örneklerden elde edilen cDNA miktarları 100 ng/μl'ye seyreltildi.

3.5. RT-PCR ile Gen İfade Analizi

Gen ifade analizleri için RT-PCR yöntemi uygulandı ve bu amaç için Rotor Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazı kullanıldı.

İfade analizini çalıştığımız dört gene [Ataksin 3 (*ATXN3*), ABL Interactor 2 (*ABI2*), Golgin B1 (*GOLGB1*) ve (*SMAD2*)] özgü primerler kullanıldı: sırasıyla Hs_ATXN3_1_SG QuantiTect Primer Assay, Hs_ABI2_1_SG QuantiTect Primer Assay, Hs_GOLGB1_1_SG QuantiTect Primer Assay ve Hs_SMAD2_1_SG QuantiTect Primer Assay (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya). Tüm bu primer çiftleri, bu genlerin ifade düzeyi hakkında bilgi verdiği deneysel olarak ispatlanmış fakat genin hangi bölgesini hedeflediği firma tarafından açıklanmamış ürünlerdir. İnternal kontrol olarak, zorunlu yaşam geni (housekeeping) *GAPDH* geni ve bu gene özgü primer olarak Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı (Pichler ve ark., 2014). Kullanılan tüm primerler ticari olarak kullanıma hazır bir şekilde satılan ve önerilen qPCR master mix ile etkili bir şekilde çalıştığı ispatlanmış primer çiftleridir. Firma bu primer çiftlerinin nükleotid dizisini paylaşmamaktadır. Gen ifade analizi için hazırlanan ön karışımda RT² SYBR[®] Green qPCR Mastermix (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı.

RT-PCR reaksiyonu, DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibine olanak sağlar. Bu amaç için en sık kullanılan boyalardan biridir SYBR Green. Çift iplikli DNA molekülüne bağlanması sonucu floresan ışımaya oluşur. Primerin bağlanması sonrasında gerçekleşen uzama evresinde, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı artar ve bununla beraber saçılan floresans miktarında artış gözlemlenir. SYBR Green boyasından elde edilen ışımının sınır değeri aştığı seviyeye Ct değeri denilmektedir. Bu seviyede DNA amplifiye olmuş ve DNA'ya bağlanan boyanın yaydığı ışımaya sınır değerine erişmiştir. Işımanın sınır değerini aştığı anda amplifikasyondan emin olunur fakat doğru

amplikonun varlığından emin olmak için erime eğrisinin incelenmesi gerekmektedir. Çünkü SYBR Green hedef DNA molekülünün haricinde ortamdaki tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlanma eğilimine sahiptir.

Kit protokolüne göre Tablo 4'deki RT-PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. 25 µl'lik cihaza özgü tüplere karışımlar aktarıldı ve cihaza yerleştirilen tüpler Tablo 5'teki koşullarda reaksiyona tabi tutuldu.

Tablo 4. İfade düzeyinin ölçüldüğü RT-PCR reaksiyon karışım bileşenleri

Bileşenler	Hacim (µl)
RT ² SYBR [®] Green qPCR Mastermix	12,5
İlgili gene özgü primer (10 µM)	1
RNaz/DNaz içermeyen su	10,5
cDNA (100 ng)	1
Toplam	25

Tablo 5. İfade düzeyinin ölçüldüğü RT-PCR koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre	
Enzim aktivasyonu	95	10 dak	
Denaturasyon	95	15 saniye	40 döngü
Primer bağlanması/uzama	60	60 saniye	
Erime eğrisi	65-95	Her derecede 25 ölçüm alınmaktadır	

3.6. İstatistiksel Analiz

RHK'li hastaların tümör örnekleri, aynı hastanın tümör dokusunun periferindeki sağlıklı dokularla kıyaslandı. Bu dokulardan elde edilen Ct değerleri kullanılarak ilgili genlerin ifade düzeyleri istatistiksel olarak kıyaslandı. Kısmi miktarlara dayalı yöntemde ifade ölçümü yapılan genlerin ölçüm değerleri *GAPDH* geni transkripsiyonu ile normalize edildi. Referans olarak kullanılan *GAPDH* geni belirli şartlar altında ifade düzeyi değişmeyen, her doku ya da hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden ifade edilen zorunlu yaşam genlerinden biridir. Kıyaslama yapılırken elde edilen Ct değerleri ile $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanıldı (Formül 1).

Formül 1. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{Örnek } \Delta Ct (\text{Gen-Referans}) - \text{Kontrol } \Delta Ct (\text{Gen-Referans})]}$$

Bu formül sonucu elde edilen değer ilgilendiğiniz gen ürününün tümör örneğindeki ifade düzeyinin periferindeki böbrek dokusuna kıyasla kaç kat değişim gösterdiğini ifade etmektedir. Elde edilen bu değer istatistiksel olarak tümör ve normal renal dokuları arasındaki gen ekspresyon farklılığının anlamlılık analizi yapıldı ve istatistiksel olarak hastaların klinik parametreleriyle ilişkilendirildi.

Tümör ve çevresindeki sağlıklı böbrek dokusu için gen ifade düzeylerini ayrı ayrı hesaplamak için ise $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanıldı (Formül 2). Bu formül kullanılarak tümör dokusunda ve çevresindeki sağlıklı böbrek dokusunda ilgili genin referans gene göre kaç kat değişim gösterdiği ayrı ayrı hesaplandı. Daha sonra bu formül sonucu elde edilen gen ifade düzeylerindeki değişimin istatitiki olarak anlamlılık analizi yapıldı.

Formül 2. $2^{-\Delta Ct}$ formülü

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-[\text{Örnek } \Delta Ct (\text{Gen-Referans})]} \quad 2^{-\Delta Ct} = 2^{-[\text{Kontrol } \Delta Ct (\text{Gen-Referans})]}$$

Tüm istatistiki analizler için SPSS 21 programı (IBM software, Pointe Claire, Quebec, Kanada) kullanıldı. İstatistiksel olarak verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Simirnov testi ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygun olmaması ($p < 0,05$) ve örnek sayısının 30'un altında olması sebebiyle non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verildi. İstatistiki analizler olarak, ikili karşılaştırmalarda Wilcoxon Signed Rank Testi, ikiden fazla karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis Testi uygulandı. $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilerek, 0,95 güven aralığında değerlendirme yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, 3. kromozomun p kolunda RHK'de delesyona uğrayan genlerden yola çıkarak potansiyel ceRNA aktivitesine sahip 4 gen (*ATXN3*, *ABI2*, *GOLGB1* ve *SMAD2*) kompütasyonel bir yaklaşımla tespit edildi, bu genlerin ifade düzeyleri 19 RHK hastasının tümör ve tümörün çevresindeki sağlıklı böbrek dokusunda analiz edildi, ve gen ifade düzeyleri önce tümör ve tümörün çevresindeki sağlıklı böbrek dokuları arasında kıyaslandı sonrasında hastaların klinik parametreleriyle muhtemel ilişkisi araştırıldı.

4.1. Hastaların Klinik Parametreleri

Çalışmamıza dahil edilen 19 şeffaf hücreli RHK hastasının demografik bilgilerine Tablo 6'da ve klinik parametrelerine Tablo 7'de yer verildi.

Tablo 6. Hastaların demografik bilgileri

		Hasta (n=19)
Cinsiyet	Erkek	9 (%47,4)
	Kadın	10 (%52,6)
Yaş ortalaması	Erkek	55,3 ± 10,4
	Kadın	58,9 ± 13,2
Tümör yönü	Sağ böbrek	9 (%47,4)
	Sol böbrek	10 (%52,6)
TNM evre	Evre I	13 (%68,4)
	Evre II	3 (%15,8)
	Evre III	1 (%5,3)
	Evre IV	2 (%10,5)
Fuhrman nükleer derece	Derece 2	13 (%68,4)
	Derece 3	2 (%10,5)
	Derece 4	4 (%21,1)

(Kısaltmalar.TNM: Tümör Nod Metastaz)

Tablo 7. Hastaların klinik parametreleri

Hasta no Parametre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
BUN (mg/dL)	40,6	12,6	19,2	9,6	15,9	30	11,4	17,1	12,7	12,1	14,8	11,9	8,9	17,6	20,7	12,4	16,6	7,7	16,1
Kreatinin (mg/dL)	9,4	0,83	0,8	0,49	0,67	1,53	0,7	1,15	0,88	0,65	0,48	0,8	1,29	1,07	1,22	0,79	0,78	0,56	0,73
Kalsiyum (mg/dL)	25,4	9	9,8	9,6	9,7	9,5	10	10,7	9,3	10,1	9,4	9,6	10	9,2	8,8	9,6	9,8	10	10,1
Total Bilirubin (mg/dL)	0,43	0,23	0,27	0,29	0,13	0,68	0,61	0,44	0,22	0,76	0,3	0,56	0,57	0,79	0,19	0,38	0,23	0,55	0,54
Direkt Bilirubin (mg/dL)	0,18	0,17	0,15	0,09	0,08	0,29	0,21	0,18	0,14	0,27	0,17	0,22	0,19	0,32	0,11	0,16	0,12	0,21	0,19
AST (U/L)	25,4	12,1	15,5	38	17,2	9	16,2	14,7	39,9	15,7	15,7	13,1	17	25,6	10,1	36,5	21,8	23,6	21
ALT (U/L)	37	8,9	17,7	10	18	6	15,4	13,5	49,9	7,9	19,1	9,5	12,7	18	8	46,6	26,2	30,4	24
WBC (bin/μL)	6,08	4,33	7,59	5,03	3,79	4,04	6,15	10,7	9,05	6,66	9,69	8,23	8,69	10,0	8,13	7,35	7	4,39	8,01
RBC (milyon/μL)	3,24	3,65	4,61	5,06	4,41	3,74	4,7	5,55	4,25	4,39	4,38	5,6	4,8	4,98	4,37	5,22	4,99	4,65	5,31
Hemoglobin (g/dL)	8,2	11,8	12,9	14,3	12,8	8,5	13,2	17,1	11,5	13,7	13,1	14,3	13,9	14,7	9,4	15,5	14,5	13,8	15
Hemotokrit (%)	29,7	36	40,4	44	40	28,1	39,7	49,8	35,4	42	38,5	46,4	44,3	45,8	31,1	46,3	43,3	41,5	44,9
MCV (fL)	91,8	98,7	87,6	86,9	90,8	75,1	84,6	89,6	83,2	95,7	87,9	82,8	92,4	92,1	71,3	88,8	86,7	89,3	84,5
MCH (pg)	25,2	32,4	28,1	28,2	29,1	22,6	28,1	30,8	27,1	31,3	29,8	25,6	28,9	29,6	21,6	29,7	29	29,7	28,2
MCHC (g/dL)	27,5	32,8	32,1	32,5	32	30,1	33,2	34,4	32,6	32,7	33,9	30,9	31,3	32,1	30,3	33,5	33,5	33,2	33,4
RDW (%)	14,7	13,1	13,5	13,9	12,7	16,4	14,8	13,1	12,8	12,4	13,5	13,8	13,6	13,7	13,9	13,2	12,8	12,7	13,1
PLT (bin/μL)	219	219	507	196	200	186	249	211	272	266	426	263	181	220	352	215	309	312	393
MPV (fL)	8,7	8,2	7,4	8,7	8,3	8,7	7,5	7,7	8,5	7,3	7,5	6,7	6,1	7,4	7,1	7	7,3	12,7	6,5
Lenfosit (bin/uL)	0,75	1,13	2,16	1,66	1,31	1,31	2,17	1,96	2,18	2,27	2,31	1,9	1,65	2,79	1,63	2,46	1,93	1,67	2,92
Monosit (bin/uL)	0,52	0,28	0,49	0,42	0,24	0,34	0,23	0,59	0,39	0,36	0,61	0,38	0,6	0,46	0,46	0,64	0,34	0,21	0,49
Nötrofil (bin/μL)	4,39	2,55	4,53	2,56	2,01	2,21	3,58	7,94	6,31	3,71	6,49	5,69	6,16	6,53	5,7	3,99	4,48	2,29	4,32

Tablo 7. Hastaların klinik parametreleri (devam)

Hasta no Parametre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Eozinofil (bin/uL)	0,3	0,23	0,19	0,24	0,12	0,14	0,05	0,09	0	0,14	0,08	0,08	0,11	0,04	0,26	0,08	0,07	0,1	0,07
Bazofil (bin/μL)	0,03	0,02	0,06	0,03	0,03	0,01	0,02	0,04	0,02	0,02	0,05	0,02	0,03	0,04	0,01	0,03	0,04	0,01	0,04
PCT (%)	0,19	0,18	0,38	0,17	0,17	0,16	0,19	0,16	0,23	0,19	0,32	0,18	0,11	0,16	0,25	0,15	0,23	0,24	0,26
PDW (%)	44	64,8	49,5	51,3	53	42,3	47,4	58,1	55,2	42,8	49,6	57	45,6	56,2	39,8	55,4	57,9	46,3	50,3
LUC (bin/μL)	0,1	0,11	0,16	0,12	0,08	0,03	0,1	0,11	0,15	0,15	0,15	0,17	0,13	0,17	0,06	0,15	0,14	0,11	0,16
APTT (saniye)	26,7	27,9	27,5	19,9	27,5	24,1	23,7	24,7	25,1	24	27,7	26,9	24,9	34,5	31	24,4	24,8	23,8	20
PT Zamani (saniye)	12,7	10,7	11,4	11,1	10,7	13,1	11,1	10,8	11,9	10,5	10,8	12,1	10,4	23	12,5	11,4	11,7	11,4	11,4
PT INR (INR)	0,91	0,87	0,9	0,96	0,83	1,16	0,94	0,84	1,07	0,93	0,85	1,06	0,91	2	1,05	1,11	1,03	1,02	0,97
PT % (%)	105	123	96,1	110	106	79,7	105	103	107	130	132	90,4	110	36,9	94,7	89,6	94,2	115	92,6
Nötrofil/lenfosit	5,85	2,26	2,10	1,54	1,53	1,69	1,65	4,05	2,89	1,63	2,81	2,99	3,73	2,34	3,50	1,62	2,32	1,37	1,48
PLT/lenfosit	292	193	234	118	152	141	114	107	124	117	184	138	109	78	215	87	160	186	134

(Kısaltmalar. **BUN**: Kan Üre Nitrojeni, Blood Urea Nitrogen; **AST**: Aspartat Aminotransferaz; **ALT**: Alanin Aminotransferaz; **WBC**: Beyaz Kan Hücresi, White Blood Cell; **RBC**: Kırmızı Kan Hücresi, Red Blood Cell; **MCV**: Ortalama Alyuvar Hacmi, Mean Corpuscular Volume; **MCH**: Ortalama Alyuvar Hemoglobini, Mean Corpuscular Hemoglobin; **MCHC**: Ortalama Alyuvar Hemoglobin Konsantrasyonu, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; **RDW**: Kırmızı Kan Hücresi Dağılım Genişliği, Red Cell Distribution Width; **PLT**: Trombosit; **MPV**: Ortalama Trombosit Hacmi, Mean Platelet Volume; **PCT**: Prokalsitonin; **PDW**: Trombosit Dağılım Genişliği, Platelet Distribution Width; **LUC**: Büyük Boyanmamış Hücre Konsantrasyonu, Large Unstained Cell Concentration; **APTT**: Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamani, Activated Partial Thromboplastin Time; **PT**: Protrombin; **INR**: İnternasyonel Normalizasyon Oranı, International Normalization Ratio)

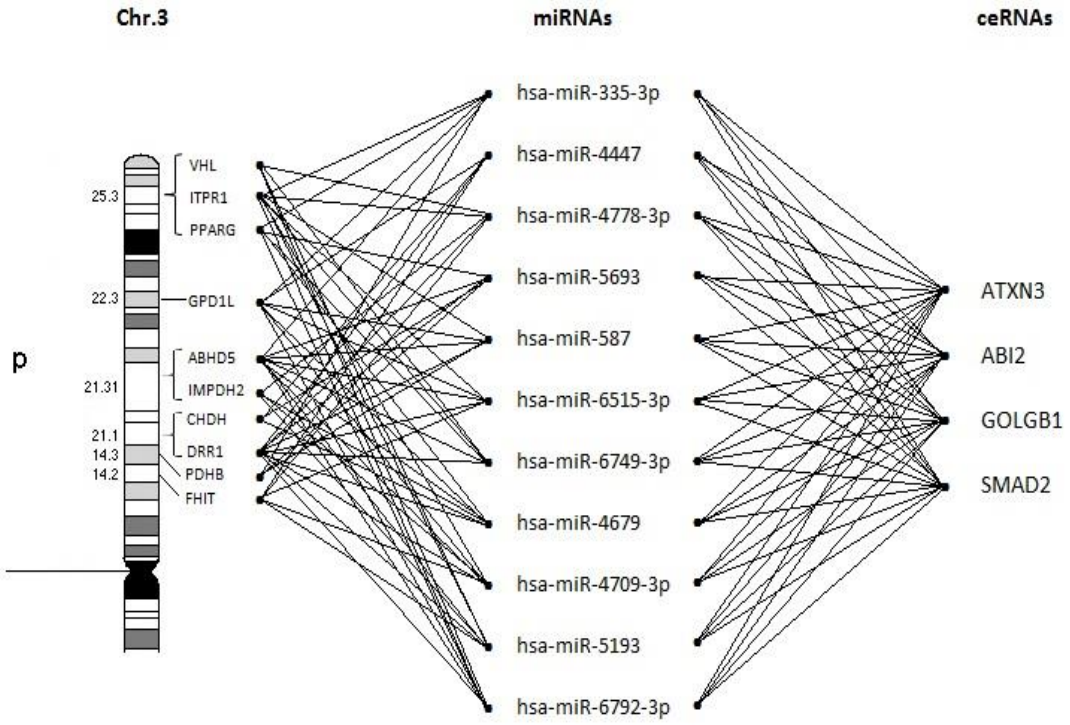
4.2. İn Siliko Veri tabanı Analizi

Üç numaralı kromozomun kısa kolunda RHK ile ilişkil olarak delesyona uğradığı bilinen *VHL*, *ITPR1*, *PPARG*, *GPD1L*, *ABHD5*, *IMPDH2*, *CHDH*, *DRR1*, *PDHB* ve *FHIT* genlerin en az beş tanesini hedefleyen 11 miRNA (hsa-miR-335-3p, hsa-miR-4447, hsa-miR-4778-3p, hsa-miR-5693, hsa-miR-587, hsa-miR-6515-3p, hsa-miR-6749-3p, hsa-miR-4679, hsa-miR-4709-3p, hsa-miR-5193, hsa-miR-6792-3p) miRWalk veri tabanı kullanılarak tespit edildi. Bu miRNA'ların tamamı tarafından ortak olarak hedeflenen, potansiyel olarak en yüksek ceRNA aktivitesi gösterebilecek dört gen (*ATXN3*, *ABI2*, *GOLGB1* ve *SMAD2*) ComiR veri tabanı kullanılarak tespit edildi (Şekil 10-11).

The screenshot displays the ComiR web interface. The top section is the 'miRNA Input' area, where a list of miRNAs is entered into a text box. Below this, there are options to load miRNAs from a file and a checkbox for 'Data is in log-scale'. The bottom section is the 'mRNA custom sequences Input (optional)' area, which is currently empty. The right side of the interface shows the 'Modify Results Table' section, which includes a table of results. The table has columns for Entrez ID, Gene name, and equal abundance. The results table is as follows:

Entrez ID	Gene name	equal abundance
10152	ABI2	0.9241
4087	SMAD2	0.9241
4287	ATXN3	0.9241
2804	GOLGB1	0.9241
23768	FLRT2	0.924

Şekil 10. ComiR sonuçlarının veritabanı arayüz üzerindeki görünümü



Şekil 11. RHK olgularında 3 numaralı kromozomun kısa kolunda delesyona uğrayan genler değerlendirmeye alınarak, analiz edilen muhtemel ceRNA aktivitesi gösteren genlerin *in siliko* tespiti

Çalışmamızda *in siliko* analiz sonucunda RHK ile ilişkisi olabileceğini öngördüğümüz genlerin hücredeki fizyolojik rolleri aşağıda özetlenmiştir;

Ataksin 3 (Ataxin 3, ATXN3): Protein homeostazı, transkripsiyon, hücre iskeleti regülasyonu, miyogenez ve yanlış katlanmış şaperon substratların yıkımında görev alan deubikitinleyici enzimdir. Uzun poliubikuitin zincirlerini bağlar ve onları keser, buna karşın 4 veya daha az ubikuitin zincirine karşı zayıf veya hiçbir aktivitesi yoktur. Yanlış katlanmış şaperon substratlarının STUB1/CHIP kompleksi ile etkileşimi sonrasında parçalanmasıyla ilgilidir: monoubiquitine STUB1/CHIP kompleksine yaklaşır ve STUB1/CHIP substratlarına eklenen ubikitin zincirinin uzunluğunu sınırlar ve daha fazla zincir uzamasını önler. Yanlış katlanmış substrat ubikitasyona yanıt olarak, monoubiquitine STUB1/CHIP kompleksinin deubikuinasyonuna aracılık eder. Transkripsiyonun ana regülatörleri ile etkileşime girer ve transkripsiyonu baskılayarak transkripsiyonu düzenleyen bir histon bağlayıcı protein görevi görür. ATXN3 ile ilişkili bir hastalık olan spinoserebellar ataksi klinik ve genetik olarak heterojen bir serebellar

bozukluk grubudur. Hastalar, beyin sapı ve omuriliğin değişken tutulumu ile serebellum dejenerasyonuna bağlı olarak yürüyüşün aşamalı olarak uyumsuzlaşmasını ve sıklıkla ellerin, konuşmanın ve göz hareketlerinin kötü koordinasyonunu gösterir (Mao ve ark., 2005).

Abl interaktör 2 (Abl Interactor 2, ABI2): Reseptör olmayan tirozin kinazlar ABL1 ve/veya ABL2 ile etkileşerek hücre büyümesi ve transformasyonunun düzenlenmesinde rol oynayabilir. Lamellipodia (hücrenin hareketi sağlayan yüzeylerindeki aktin proteini içerikli hücre iskeleti uzantısı) oluşumunu düzenleyen WAVE kompleksinin bir parçasıdır. WAVE kompleksi, Arp2/3 kompleksiyle etkileşimi yoluyla aktin filament yeniden düzenlenmesini organize eder. WAVE kompleksinin bileşeni olarak, BDNF-NTRK2 endositik trafiği ve erken endozomlardan sinyalizasyon için gereklidir. İlişkili olduğu yolaklar arasında aktin hücre iskeleti elemanının düzenlenmesi ve RET sinyalizasyonu bulunur (Courtney ve ark., 2000).

Golgin B1 (GOLGB1): İlişkili olduğu yolaklar arasında golgi kompleksine taşınım ve sonrasında modifikasyon, ve klatrinden türetilen vezikül çıkışı bulunur. Bu genle ilgili Gene Ontology (GO) açıklamaları, poli(A) RNA'ya bağlanma ve diziye özgü DNA bağlanma işlevlerini içermektedir. Golgi kompleksinin inter-sisternal çapraz köprüler kurma sürecine katılır. GOLGB1 ile ilişkili en bilinen hastalıklar pedofili (cinsel eğiliminin çocuklara yönelik olmasına neden olan psikoseksüel rahatsızlık) ve mavi kone monokromasisidir (Lan ve ark., 2016).

SMAD Family Member 2 (SMAD2): Trasnforme edici büyüme faktörü beta (TGF-beta) ve aktivin tip 1 reseptör kinazlar tarafından aktive edilen bir hücre içi sinyal transdüseri ve transkripsiyonel modülatör olan reseptör tarafından düzenlenen bir protein ailesinin üyesidir. TGF-beta ile regüle edilen birçok genin promotör bölgesindeki TRE elementini bağlar ve SMAD2/SMAD4 kompleksinin oluşması üzerine transkripsiyonu aktive eder. Kolorektal karsinomada tümör baskılayıcı olarak görev yapar. Negatif bir regülatör görevi gören 14-3-3 proteininin YWHAQ amino asit dizisinden ayrışmasını uyararak PDPK1 kinaz aktivitesini pozitif olarak düzenler (Wu ve ark., 2001).

4.3. cDNA Konsantrasyon ve Kontaminasyon Analizi

cDNA eldesi gerçekleştirilen 19 tümör ve tümör çevresinde yer alan 19 sağlıklı böbrek dokusunun cDNA konsantrasyonu ölçümleri ve kontaminasyon bilgisi veren A260/A280 oranları Tablo 8’de verilmektedir.

Tablo 8. cDNA’ların konsantrasyon ve kontaminasyon (A260/A280) ölçümleri

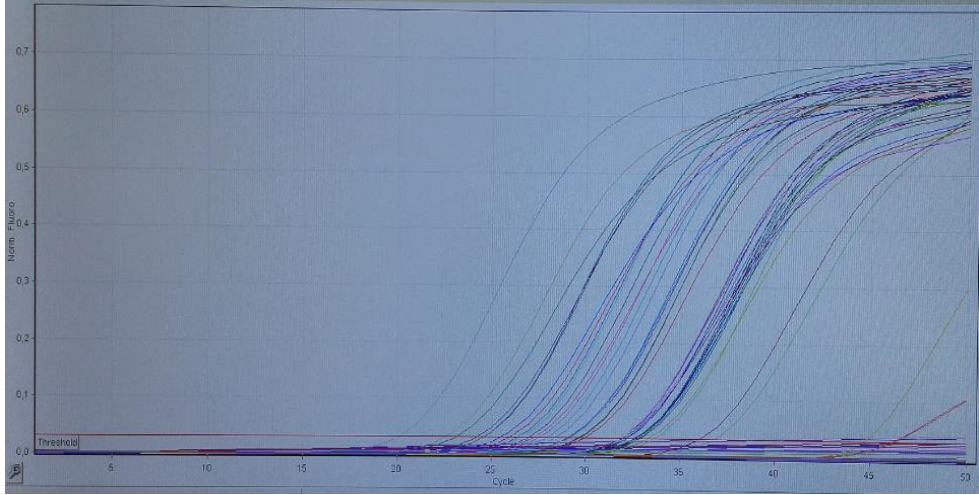
Hasta no	cDNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)		A260/A280 oranları	
	Tümör	Normal	Tümör	Normal
1	1391	1703	1,78	1,77
2	1458	1470	1,78	1,79
3	1185	1276	1,81	1,81
4	1276	1214	1,79	1,81
5	2067	2556	1,81	1,75
6	2212	1977	1,8	1,81
7	2817	1488	1,8	1,8
8	2826	2821	1,63	1,59
9	2594	2803	1,73	1,58
10	2299	2592	1,8	1,62
11	2316	2954	1,79	1,8
12	2888	2316	1,64	1,81
13	2263	2700	1,81	1,71
14	2439	2592	1,77	1,75
15	2391	2313	1,8	1,8
16	2252	2199	1,81	1,8
17	2107	2048	1,81	1,81
18	1719	1780	1,81	1,81
19	1711	1768	1,82	1,82

4.4. Gen İfadesi Analizleri

qRT-PCR analiz sonucu olarak Ct değerleri elde edildi. *SMAD2* geninin ifade analizi sonucu Ct değerleri elde edilemedi. Diğer *ATXN3*, *ABI2*, *GOLGB1* ve *GAPDH* genlerinin ifade analizi sonucu elde edilen Ct değerleri Tablo 9'da ve gen amplifikasyon eğrilerinin yazılım görüntüsü de Şekil 12'de verildi.

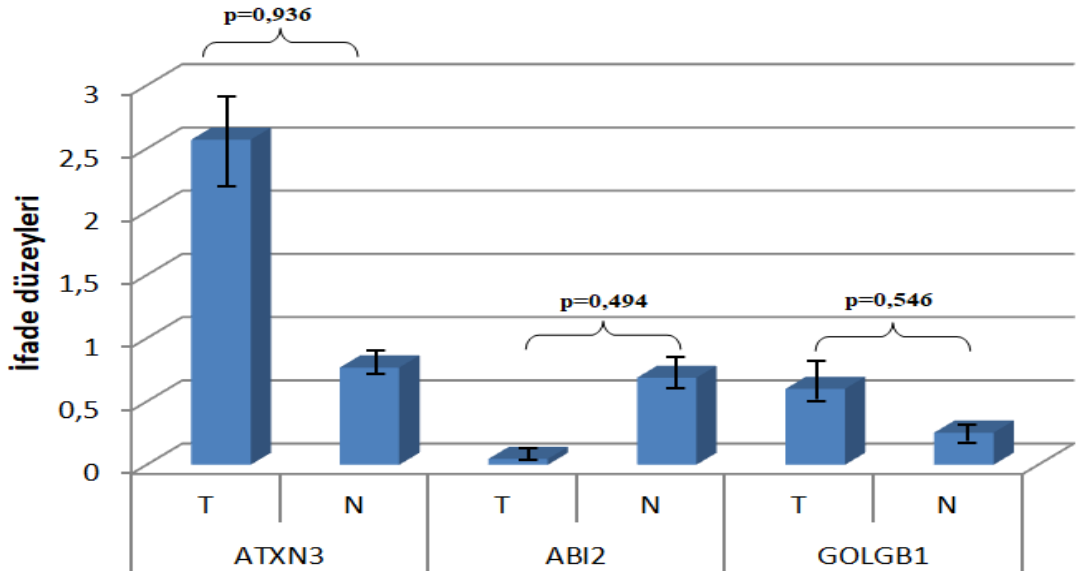
Tablo 9. *ATXN3*, *ABI2*, *GOLGB1* ve *GAPDH* genlerinin ifade düzeyleri (Ct değerleri)

Hasta no	<i>ATXN3</i>		<i>ABI2</i>		<i>GOLGB1</i>		<i>GAPDH</i>	
	Tümör	Normal	Tümör	Normal	Tümör	Normal	Tümör	Normal
1	31,43	29,96	32,11	31,83	54,05	53,99	29,84	23,02
2	32,49	32,82	35,55	32,66	40,09	37,5	27,76	26,45
3	31,83	32,92	32,19	48,23	30,47	49,83	26,2	33,71
4	29,72	29,25	49,15	46,04	32,58	30,57	32,59	31,02
5	32,57	27,54	31,94	32,9	28,5	53,8	26,14	35,92
6	26,41	29,08	36,79	31,82	48,02	38,88	31,5	27,06
7	32,65	32,81	31,77	32,67	30,89	30,13	27,41	28,01
8	39,01	27,22	33,95	27,94	28,84	25,52	32,02	23,41
9	24,23	23,12	24,61	22,61	23,26	21,16	18,84	17,19
10	29,22	47,92	29,67	33,64	29,03	36,82	26,6	32,44
11	20,09	32,62	48,4	46,7	32,06	33,06	29,74	31,35
12	29,15	31,3	33,32	32,71	32,01	33,12	26,27	29,57
13	24,51	31,29	35,55	27,09	30,42	37,5	25,02	29,16
14	26,99	36,79	37,13	52,01	48,04	33,42	28,11	28,96
15	25,98	26,62	35,55	43,83	45,83	37,5	23,67	32,95
16	44,65	28,38	45,29	36,04	30,92	40,28	25,4	28,42
17	25,51	29,61	24,58	36,87	22,92	44,53	18,78	30,38
18	52,17	54,4	46,12	46	34,53	37,5	33,24	38,7
19	30,46	32,31	31,91	39,08	33,71	37,5	28,98	34,26



Şekil 12. RT-PCR’da yapılan gen amplifikasyon yazılım görüntüsü (X eksenini floresan miktarını Y eksenini döngü sayısını göstermektedir.)

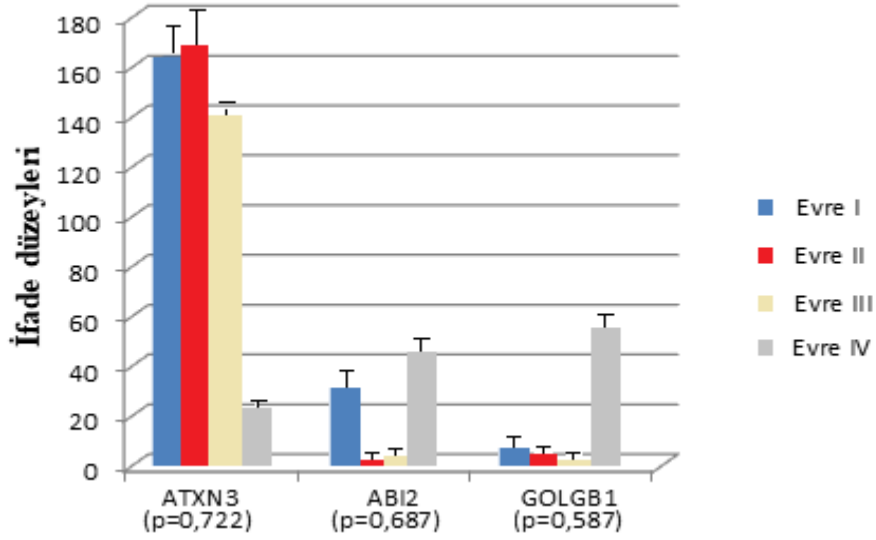
RHK’li hastaların tümör örnekleri yine aynı hastanın tümörün periferindeki sağlıklı dokulardaki *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade düzeyleri kıyaslandı. Şekil 13’de genlerin tümör ve periferlerindeki sağlıklı dokular arasındaki ifade düzeyi farklılıkları gösterildi. Böbrek tümörü dokularında *ATXN3* ve *GOLGB1* gen ifadelerinin normal böbrek dokusuna göre arttığı fakat *ABI2* geninin ifade düzeyinin azaldığı görülmektedir. Şekil 13’de görüldüğü gibi tümör ve normal böbrek dokusu arasında *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).



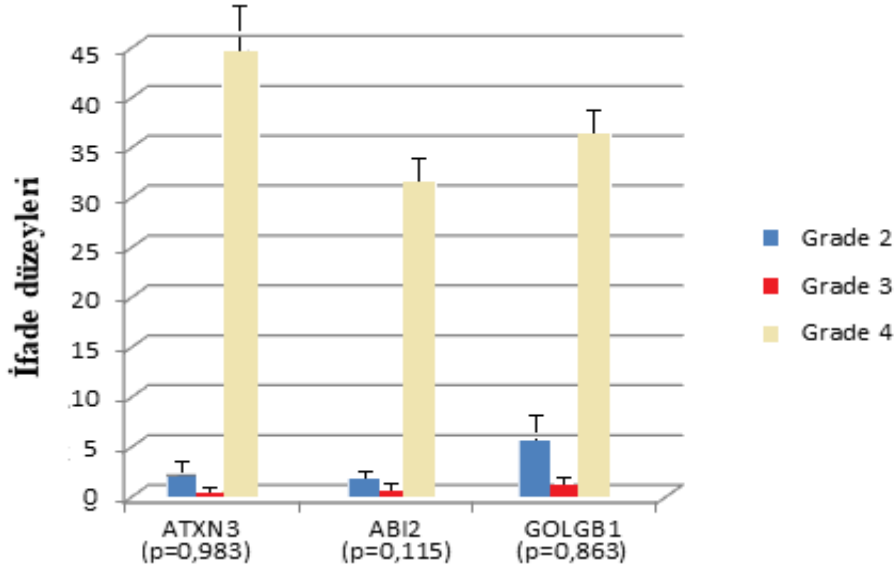
Şekil 13. Tümör (T) ve normal (N) böbrek dokularında *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması (GAPDH’e göre kat değişim ifade edilmektedir.)

4.5. Gen İfade Düzeylerinin Klinik Parametrelerle İlişkisi

Hastaların *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeyi değişimleri klinik özellikleriyle ilişkilendirilmiş ve anlamlılık düzeyleri test edildi. Bunun sonucu olarak, *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeyi değişimleri TNM evreleri ve Fuhrman grade ile ilişkilendirildi ve istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$) (Şekil 14-15).



Şekil 14. *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeylerinin TNM evrelemesine göre karşılaştırılması



Şekil 15. *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeylerinin Fuhrman grade göre karşılaştırılması

ATXN3, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeyi değişimleri yaşı ve cinsiyet parametreleri ile ilişkilendirildiğinde istatistiksel bir anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$). Hastaların tümör ve periferindeki normal böbrek dokuları arasındaki *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade düzeyi değişimleri diğer klinik parametreleri ile ilişkilendirildiğinde *ATXN3* geninin direk bilirubin, monosit eozinofil, bazofil, PCT ve LUC değerleri ile, *ABI2* geninin sodyum, klor, glukoz, direk bilirubin, MCV, PLT, eozinofil, bazofil, PCT, PDW, LUC ve % PT ile ve *GOLGB1* geninin total bilirubin, direk bilirubin, monosit eozinofil, bazofil, PCT ve LUC değerleri ile anlamlı derecede ilişkili olduğu görüldü ($p<0,05$).

Rutin hemogram ve biyokimya parametrelerinin haricinde literatürde RHK ile ilişkilendirilmiş bazı klinik parametrelerin (Nötrofil/lenfosit oranı, PLT/lenfosit oranı, RBC düşüklüğü, kalsiyum yüksekliği) de tümör ve normal böbrek dokuları arasındaki *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeyi değişimleri ile ilişkisi incelendi. Yalnızca *ABI2* geni ifade düzeyi değişimleri PLT/lenfosit oranı ile anlamlı derecede ilişkilendirildi ($p<0,05$).

5. TARTIŞMA

RHK, renal pelvis veya renal medullayı içeren böbrek kanserinden farklı olarak sadece böbrek yatağına uzanan hücrelerde oluşan kanser türüdür. RHK, renal tübüler hücrelerden köken alan bir grup heterojen kanseri içermektedir. RHK, sinsi gelişen ve genellikle teşhis edildiğinde metastaz yapmış olan bir kanser türüdür. RHK alttipleri farklı prognoz göstermekte ve tedaviye de farklı yanıtlar verebilmektedir. Prognozunun sadece histopatolojik inceleme ile belirlenmesi mümkün değildir. Son yıllarda, çok sayıda renal hücre biyobelirtecinin çalışılmasına ve çok sayıda veri elde edilmesine rağmen, hastalığın patofizyolojisi hala çok iyi bilinmemektedir (Moch, 2013; Ngo ve ark., 2014; Pastore ve ark., 2015).

Bu çalışmada yapılan *in siliko* analizi ile önce RHK patogenezinde rol alabilecek genlerin belirlenmesi hedeflendi. Daha sonra karşılaştırmalı olarak RHK hastalarından alınan tümör ve periferindeki normal böbrek dokusunun ekspresyon düzeylerinin incelenmesi ve hastalıkla olan ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Yapılan *in siliko* analiz ile önce RHK'de spesifik olarak delesyona uğrayan lokuslar değerlendirmeye alınarak ceRNA olma potansiyeli en yüksek olan 4 gen (*ATXN3*, *ABI2*, *GOLGB1* ve *SMAD2*) belirlendi. Daha sonra bu genlerin ekspresyon seviyeleri RHK hastalarının klinik bulgularıyla ilişkilendirildi. Bu sayede hastalığın patolojisinde rol oynayabilecek olası yeni aday genler analiz edildi. Bu *in siliko* analiz yaklaşımı için Arancio ve arkadaşlarının miyelodisplastik sendrom hastalarında 5. kromozomun q kolunda delesyona uğrayan lokuslardan yola çıkarak potansiyel ceRNA aktivitesine ve biyobelirteç olma özelliğine sahip genlerin bulunma yöntemi model alındı. Arancio ve arkadaşları, çalışmalarında öngördükleri yöntemin, genomik delesyon fenotiplerine beklenmedik katkıda bulunan etkenlerin belirlenmesi amacıyla genetik delesyonların etkilerini incelemek için yeni bir yaklaşımı temsil ettiğini ve deneysel geçerliliği hakettiğini öngörmektedir. Aynı yaklaşımın, bizim çalışmamızda olduğu gibi, karmaşık sendromları ve şu an tam olarak anlaşılammış olan fenotipleri sorgulamak için kullanılabileceği öne sürülmektedir (Arancio ve ark., 2015).

Çalışmamızda, RHK'li hastaların tümörlü örnekleri yine aynı hastaların tümörlü dokularının çevresindeki sağlıklı dokularla *ATXN3*, *ABI2*, *GOLGB1* ve *SMAD2* genlerinin ifade düzeyleri açısından kıyaslandı. Böbrek tümörü dokularında *ATXN3* ve *GOLGB1* genlerinin ifadelerinin normal böbrek dokusuna göre artarken, *ABI2* geninin

ifade düzeyinin azaldığı görüldü. Tüm bunlara ek olarak, ceRNA hipotezinde olduğu gibi delesyona uğrayan genleri hedefleyen miRNA'ların etkinliğinin artmasıyla potansiyel ceRNA olarak belirlediğimiz genlerin ifade düzeylerinin azalması beklenmektedir. Bizim sonuçlarımıza göre yalnızca *ABI2* geninin azalan ifade düzeyi bu duruma uyumludur. *ATXN3* ve *GOLGB1* genlerinin artan ifade düzeyi ceRNA hipotezi ile uyumsuzdur. Bu da bu genlerin ceRNA fonksiyonlarından bağımsız bir şekilde kendi endojen fonksiyonları ile ilişkili olabilir. *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade düzeyleri arasındaki farkın ise tümör ve normal böbrek dokusu istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p>0,05$).

Çalışmamızda, tümör örneklerindeki *ATXN3*'ün ifade düzeyi artışı literatürü destekler niteliktedir (Pfoh ve ark., 2015). Shin ve arkadaşlarının (2003) çalışması, RHK gibi endokrin sistemle ilişkili olan tümör baskılayıcı *PTEN* ekspresyonunun sıklıkla azaldığını ve *PTEN* gen ürününün hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Bu inhibisyonun RHK'nin gelişiminin bastırılması için önemli olabileceğini göstermektedir. Yakın tarihli bir çalışmada ise *PTEN*'in transkripsiyonunun, *ATXN3*'ün artan aktivitesi ile baskılandığı bildirilmiştir (Sacco ve ark., 2014; Fu ve ark., 2014). Bir diğer yaklaşımda ise Stratton ve arkadaşlarının (2014) ekzom dizilime yöntemi ile RHK'de en yüksek potansiyelle onkogenik role sahip olabilecek genleri taramış ve *ATXN3*'ü bu genlerin arasında göstermiştir. Ayrıca, *ATXN3* bir deubikuitinaz enzimdir. *USP9x*, *CYLD*, *AMSH2* gibi RHK'de aşırı ekspresyonu artan deubikuitinaz enzimlere benzer şekilde eğilim göstererek, RHK'de ekspresyonun artması muhtemeldir (Liu ve ark., 2016).

Çalışmamızda RHK tümör örneklerinde tespit ettiğimiz *ABI2* geninin azalan ifadesi de literatür tarafından desteklenmektedir. *ABI2* önemli bir c-Abl regülatörü ve kromozom 10p11.2 üzerinde bulunan nükseden bir MLL-translokasyon ortağı olan *ABII*'in fonksiyonel bir homologudur. Coenen ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışma, *ABI2*'nin c-Abl sinyalizasyonunu inhibe edici fonksiyonu ile kronik myeloid lösemide bir tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını göstermiştir. Bir diğer çalışmada, Abi-2 proteininin özellikleri c-Abl proteinin düzenleyici ve potansiyel efektör olarak ikili bir rolü ile tutarlıdır. Bu da Abi-2'nin memeli hücrelerinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini önermektedir (Dai ve Pendergast, 1995). Literatürdeki bu çalışmalar, her ne kadar doğrudan RHK üzerine yapılmış olmasa da, diğer kanser

türlerinde *ABI2* için öngörülen tümör baskılayıcı rol, çalışmamızdaki RHK tümör örneklerindeki azalan *ABI2* ekspresyonu ile tutarlıdır (Coenen ve ark., 2012; Dai ve Pendergast, 1995).

RHK tümör örneklerinde, sağlıklı böbrek dokusuna göre yüksek ifade düzeyine sahip olduğunu bulduğumuz *GOLGB1*'in potansiyel onkogen aktivitesine sahip olabileceğini öngörmekteyiz. Çalışmamız her ne kadar *GOLGB1* ile ilgili RHK üzerine yapılan ilk çalışma olsa da, diğer kanser türlerinde *GOLGB1*'in onkogenik rolü literatür tarafından da desteklenmektedir. Eozinofili ile ilişkili miyeloproliferatif neoplazilerde, translokasyon, inversiyon/insersiyon ve füzyon gibi yapısal kromozom anomalileri sonucu protein tirozin kinazların yapısal aktivasyonu sıklıkla gözlemlenir. Eozinofili ile ilişkili miyeloproliferatif neoplazileri olan bazı hastalarda da *GOLGB1*'in onkogenik özelliğini destekler nitelikte olan *PDGFRB*'nin *MPRIP*, *CPSF6* ve *GOLGB1*'e füzyonu görülmektedir (Naumann ve ark., 2015). Ayrıca, Choi ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmaya göre, *GOLGB1*'in artan ekspresyon düzeyinin ve bu gendeki E2721V mutasyonunun karaciğer kanserinin nüks etmesiyle doğrudan ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, *GOLGB1* inhibitörlerinin teröpatik olarak karaciğer kanseri endikasyonda kullanılabileceğine dair patent alınmıştır. Bu da *GOLGB1*'in ne denli ciddi bir onkogenik aday olduğunu göstermektedir.

SMAD2 geninin ifade analizi sonucu Ct değerleri elde edilmedi. Tümör ve çevresindeki sağlıklı dokuda tespit edilemeyecek kadar az ifade edilebileceği şeklinde değerlendirildi. Cardillo ve arkadaşlarının (2001) yapmış olduğu çalışma *SMAD2* ifade düzeyinin RHK hastalarında çok düşük olduğunu ve Park ve arkadaşlarının (2013) yapmış olduğu çalışmalar da *SMAD2* ifade düzeyinin RHK hasta parametreleriyle ilişkilendirilemediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, *SMAD2* bir transkripsiyon faktörü olması nedeniyle ifadesi düzenli olarak kontrol edilmektedir (Akhurst ve Derynck, 2001). Bu nedenle *SMAD2* geninin ifade düzeyinin düşük olması normal olarak kabul edilebilir. Bu da bizim çalışmamızda *SMAD2* ifade düzeyi ile ilgili neden bilgi elde edemediğimizi açıklamaktadır.

Hastaların tümör ve normal böbrek dokuları arasındaki *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeyi değişimleri klinik parametreleri ile ilişkilendirildiğinde, *ATXN3* geninin direk bilirubin, monosit eozinofil, bazofil, prokalsitonin ve büyük boyanmamış hücre konsantrasyonu değerleri ile, *ABI2* geninin sodyum, klor, glukoz,

direk bilirubin, ortalama korpusküler hacim, platalet, eozinofil, bazofil, prokalsitonin, platalet dağılım genişliği, büyük boyanmamış hücre konsantrasyonu ve protrombin yüzdesi ile ve *GOLGB1* geninin total bilirubin, direk bilirubin, monosit eozinofil, bazofil, prokalsitonin ve büyük boyanmamış hücre konsantrasyonu değerleri ile anlamlı derecede ilişkili olduğu görüldü.

Çalışmamızda analiz ettiğimiz üç gen de RHK tümör ve sağlıklı örneklerinin kıyaslanmasında direk bilirubin seviyesiyle ilişkili bulunurken yalnızca *GOLGB1* total bilirubin ile anlamlı derecede ilişkili bulundu. Pick ve Nystrom'un yaptığı çalışmada da pazopanibin RHK tedavisi sürecince oluşturduğu en ciddi yan etkilerden birinin bilirubin seviyesinin artışı olduğunu göstermiştir (Pick ve Nystrom, 2012). Ayrıca, paraneoplastik sendromlar, tümörle birlikte ortaya çıkan, tümör ve metastaz yerlerinden uzakta görülen değişik belirtilerle tanımlanan bozukluklardır. Paraneoplastik kolestaz, lenfoma ve RHK ile tanımlanır. Yeh ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan çalışmada da paraneoplastik kolestaz gözlenen bir hasta yüksek bilirubin seviyesi ile karakterize edilmiştir. Bu iki çalışma, *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade düzeylerindeki değişimlerinin, RHK hastalarındaki yüksek bilirubin seviyesi hakkında bilgi verebileceğini göstermektedir.

Yine analiz ettiğimiz *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade düzeylerindeki değişimlerin hastaların eozinofil seviyesi ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur. Naumann ve arkadaşları (2015), eozinofili ile ilişkili miyeloproliferatif neoplazili hastalarda *GOLGB1*'in onkogenik özellik gösterecek bir füzyon protein kompleksine dahil olduğunu bulmuşlardır. Eozinofili ile *GOLGB1* seviyesinin onkogenezdeki ilişkisini göstermekte ve benzer bir ilişkinin bizim çalışmamızın sonucunu destekler nitelikte olabileceğini göstermektedir. RHK ile eozinofil arasındaki ilişkiyi irdeleyecek olursak, yüksek dereceli RHK lezyonlarında eozinofilik hücrelerin miktarı artmış ve klinik sonuç ile anlamlı korelasyon göstermiştir (Zimmermann ve ark., 2004; 2007). Ayrıca, eozinofilik hücrelerin miktarı, RHK'nin kötü prognozuyla olduğu kadar hücre farklılaşma derecesiyle de ilişkilendirilmiştir (Thoenes ve Rumpelt 1986). Moroni ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmaya göre, kan dolaşımında eozinofillerin sayısının artması RHK'nin neoplastik özelliklerinin ilerlemesiyle karakterizedir. Bu bulgular da, çalışmamızın RHK ile ilişkilendirilmiş eozinofillerin *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* ile olan ilişkisini tutarlı hale getirmektedir.

Çalışmamızda analiz ettiğimiz üç gen ile de anlamlı ilişkilendirilen bazofili ve RHK'nin ilişkilendirildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bazofilin, diğer kanser türleri ile olan ilişkisini incelediğimizde, yumurtalık kanserinde yüksek bazofil sayısının mortalite ile ilişkili olduğu görülmektedir (Bishara ve ark., 2008).

ATXN3, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade düzeyleri ile prokalsitonin yüzdesi ile anlamlı derecede korelasyon göstermiş ve bu üç genin prokalsitonin üzerinden RHK ile ilişkilendirilebileceğine işaret etmiştir. Hamidi ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışma, yüksek preoperatif serum prokalsitonin değerlerinin, RHK'li hastaların prognostik sınıflandırılmasında rol oynayabileceğini göstermiştir. Farklı kanser türlerinde prokalsitoninin fonksiyonu incelendiğinde, prokalsitoninin medüller tiroid karsinoması için umut verici bir tümör biyobelirteci olabileceği öngörülmektedir. (Algeciras-Schimmich ve ark., 2009). Ayrıca, prokalsitoninin hematolojik maligniteleri olan nötropenik hastalarda bakteriyemi için zemin hazırladığı gösterilmiştir (Bernard ve ark., 1998). Akciğer kanserli 120 hasta üzerine yapılan bir diğer çalışmada, antibiyotik kullanımı için bir gösterge olarak da kullanılan prokalsitonin yüksekliğinin, metastaz varlığında yanlış pozitifliğe neden olabileceği bulunmuştur (Avrillon ve ark., 2015).

Çalışmamızda, *ABI2* ifade düzeyi ile sodyum seviyesi arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. Kawashima ve arkadaşlarının (2012), 87 metastatik RHK'li hasta üzerine yaptığı çalışma, hiponatreminin ilk basamak tedavisi olarak moleküler hedefli tedavi uygulanan bu hastalarda, sodyum seviyesinin 138 mEq/L altına düşmesinin kanser spesifik sağkalım için belirgin bir prediktif faktör olarak gösterilmiştir. Ayrıca, hiponatremi, RHK'de kronik inflamasyon ve tümör agresivitesi ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur (Jeppesen ve ark., 2010).

Kan glukoz seviyesinin *ABI2* gen ifade düzeyiyle anlamlı bir şekilde korelasyon gösterdiği çalışmamızdan yola çıkarak, kandaki glukoz seviyesinin RHK ile olan ilişkisinde *ABI2*'nin rol oynayabileceğini öngörmekteyiz. Haggström ve arkadaşlarının (2013) Norveç, Avusturya ve İsveç'teki 560,388 kişi üzerinde gerçekleştirmiş olduğu çalışmada, yüksek glukoz seviyesinin RHK riski ile doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, 310 RHK hastasının dahil edildiği bir çalışmada, açlık kan şekeri bozukluğu ile karakterize edilen diyabetli hastalarda RHK'nin daha agresif seyrettiği tespit edilmiştir (Otunctemur ve ark., 2014).

Çalışmamızda analiz ettiğimiz genlerden *ABI2* ile anlamlı bir şekilde korelasyon göstermeyen MCV parametresinin RHK ile ilişkilendirildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Diğer kanser türleri ile olan ilişkisini incelediğimizde, Zheng ve arkadaşları (2013), 298 özofagus kanseri hasta üzerine yaptıkları çalışmada, prognozu öngörmek için MCV'nin kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu hastalarda, ameliyattan kısa süre önce rutin kan testlerinin yapılmasının ve MCV'nin özellikle 95,6 fl.'den yüksek olan hastaların ameliyat riskleri ve fizibilitesinin iyi değerlendirilmesi gerektiği öngörülmüştür. Bir diğer çalışmada, 1174 kolorektal kanser hastası MCV bakımından değerlendirilmiş ve hastaliksız sağkalım için bu hastalarda prognostik faktör olarak kullanılabileceği bulunmuştur (Nagai ve ark., 2017).

ABI2 ile anlamlı olarak ilişkilendirilen bir diğer parametreyle ilgili olarak 25 merkezde 11458 RHK hastası üzerine yapılan bir meta-analiz çalışmasında, platalet artışının RHK'li hastalarda kötü prognozu işaret ettiği ve bu hastalık için halihazırda mevcut bir biyobelirteç görevi görebileceği tespit edilmiştir (Gu ve ark., 2015).

Periferik kan monositlerinden türetilen tümör ile ilişkili makrofajlar (TİM) RHK mikro ortamına dahil olur. RHK anjiyogenezi, invazyonu, anti-tümör immün yanıtının bozulması ve ilaç direncinin gelişmesinde TİM'lar kritik rollere sahiptir ve bu özellikleri sayesinde RHK hastaları için ortaya çıkan TİM merkezli terapiler öngörülmektedir (Santoni ve ark., 2013). Bu bilgidan yola çıkarak çalışmamızda monosit sayısı ile ilişkilendirdiğimiz *ATXN3* ve *GOLGB1*'in de RHK için önemli fonksiyonlara sahip olabileceği sonucunu çıkarabiliriz.

Trombosit dağılım genişliği değeri, kandaki trombosit büyüklüklerinin dağılımı hakkında bilgi verir. Trombosit dağılım genişliği testi sayesinde kemik iliğinin çalışması konusunda fikir edinilir. Direkt olarak RHK ile ilgili literatürde çalışma olmayan trombosit dağılım genişliği yüzdesi bizim çalışmamızda *ABI2* ifade düzeyi ile anlamlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Kandaki trombosit dağılım genişliği yüzdesi ile ilgili RHK dışındaki diğer kanser tipleriyle yapılan çalışmalara bakıldığında, anlamlı sonuçlar bildirilmiştir. Akciğer kanseri teşhis edilen 44 hasta ve 47 sağlıklı kontrolün dahil edildiği bir çalışmada trombosit dağılım genişliği yüzdesi hasta grubunda anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (Oncel ve ark., 2015). Yüksek trombosit dağılım genişliği yüzdesi eğilimi bir diğer çalışmada endometriyel kanserli hasta grubunda teyit edilmiştir (Karateke ve ark., 2015).

İfade düzeylerini çalıştığımız üç genin hepsiyle anlamlı ilişkili bulduğumuz bir diğer parametre olan büyük boyanmamış hücre konsantrasyonu değeri ve *ABI2* ifade düzeyi ile anlamlı ilişkilendirdiğimiz klor seviyesi ve PT % ile ilgili literatürde RHK veya diğer kanser türleriyle ilgili bir çalışma bulunamamıştır. İleride bu parametrelerin özellikle RHK'deki fonksiyon analizi yapılırken *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* genleri ile olan ilişkinin yol gösterici olabileceğini öngörmekteyiz.

ATXN3, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade düzeylerindeki bu değişimlerin dışında diğer klinik parametrelerle anlamlı ilişki bulunamadı. Bu parametreler dışında literatürde RHK ile ilişkilendirilmiş bazı klinik parametrelerin (Nötrofil/lenfosit oranı, PLT/lenfosit oranı, RBC düşüklüğü, kalsiyum yüksekliği) de tümör ve normal böbrek dokuları arasındaki *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* gen ifade düzeyi değişimleri ile ilişkisi incelendi. Yalnızca *ABI2* geni ifade düzeyi değişimleri PLT/lenfosit oranı ile anlamlı derecede ilişkilendi. Gunduz ve arkadaşları (2015), 100 RHK hastasını dahil ettiği çalışmada tirozin kinaz tedavisi öncesinde PLT/lenfosit oranının bu hastalar için prognostik bir öneme sahip olduğunu bulmuştur. Bu oranın çalışmamızda *ABI2* ile olan korelasyonu bu değerli prognostik parametre gibi *ABI2*'nin de yapılacak olan daha kapsamlı çalışmalarla RHK için önemli bir belirteç haline gelebileceğini göstermiştir.

Tartışmada gen ifade analizleriyle ilişkili bulunan kan parametrelerinin RHK ile ilişkisi ortaya konulmuştur. Bu kan parametrelerinin RHK ile ilişkisini ve kontrolünü açıklayan mekanizma/mekanizmalarla ilgili literatürde veri bulunamamıştır.

Çalışmamızın kısıtlı yanlarını irdelendiğinde, *in siliko* analiz yaklaşımıyla RHK ile ilişkili olarak delesyona uğrayan genleri hedefleyen miRNA'ları belirleyip bu miRNA'ların ortak hedefleri olan olası ceRNA'ların ifade analizlerini gerçekleştirdik. Ancak, bütçemizin kısıtlı olması nedeniyle bu genlerin ifadelerinin yanısıra bulduğumuz miRNA'ların ifade analizlerini yapamadık. miRNA'ların ifade analizleri yapılabilmiş olsaydı bu miRNA'ların ifade değişimlerine potansiyel ceRNA genlerinin ifadeleri ne şekilde karşılık görebilecekti, bir diğer deyişle RHK'de bu genlerin değişen ifade düzeylerini onları hedefleyen miRNA'ların değişen ifadeleriyle açıklama şansımız olacaktı. Çalışmamızın bir diğer kısıtlı yanı ise hasta profilimizin seçimindeki sınırlılıktır. Birincisi çalışmamız sadece RHK hasta grubu bireylerinden oluştuğu için sağlıklı kontrol grubunda çalıştığımız genlerin ifade düzeylerinin nasıl değiştiğini bilemiyoruz. İkincisi çalışma dizaynımızın çıkış noktası RHK spesifik delesyona

uğrayan genlerdir ancak çalışmaya dahil ettiğimiz RHK hastalarının bu gen delesyonlarına sahip olup olmadığını Florosan İn Situ Hibridizasyon (FISH) testi ile tespit etme imkanımız mümkün olmadı. Çalışmaya dahil edilen hastaların 3 numaralı kromozomun kısa kolunda delesyon bulunanlar arasından seçilmesi daha rasyonel bir yaklaşım olabilirdi. Böylece, doğrudan bu delesyonların miRNA aracılı olarak başka genleri nasıl etkilediğini görülebilirdi. Fakat yine de daha önce yapılmış çalışmalardan bildiğimiz üzere, RHK olgularında bu delesyonlar yüksek oranlarda [*VHL* (%96), *ITPRI* (%1), *PPARG* (%1), *GPDIL* (%80), *ABHD* (%85), *IMPDH2* (%81), *CHDH* (%78), *DRR1* (%68), *PDHB* (%74) ve *FHIT* (%96)] tespit edilmektedir (Singh ve Kadam, 2013; Shuib ve ark., 2011; Gatto ve ark., 2014; Moch, 2013; Wang ve ark., 2000; Wang ve ark., 2014). Yani hastalarımızın bu delesyonları taşıma ihtimali oldukça yüksektir. Bu da yine çalışma dizaynımızı destekleyen bir bulgudur. Çalışmamız *in siliko* yaklaşımla RHK’de rol oynayabilecek yeni hedef genlerin bulunması anlamında daha önce uygulanmamış bir yöntemi kapsamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, öncelikle *in siliko* analizle RHK'nin oluşum mekanizmasında rol alabileceğini öngördüğümüz dört gen tespit ettik. RHK hastalarının tümör ve tümörün çevresindeki sağlıklı dokularında bu genlerin ifade düzeylerini analiz etmeyi amaçladık. Çalışmamızın sonucunda tümör ve normal böbrek dokusu arasında *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Ayrıca, *SMAD2* genin hem tümör dokusunda hem de çevresindeki normal dokuda tespit edilemeyecek kadar az ifade edildiği gözlemlendi. Hastaların *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade düzeyi değişimleri ile TNM evreleri, Fuhrman grade, yaş ve cinsiyet parametreleri ile ilişkilendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunamadı. *ATXN3* geninin direk bilirubin, monosit eozinofil, bazofil, prokalsitonin ve büyük boyanmamış hücre konsantrasyonu değerleri ile, *ABI2* geninin ise sodyum, klor, glukoz, direk bilirubin, ortalama korpusküler hacim, platelet, eozinofil, bazofil, prokalsitonin, platelet dağılım genişliği, büyük boyanmamış hücre konsantrasyonu, protrombin yüzdesi ve platelet/lenfosit oranı ile ve *GOLGB1* geninin total bilirubin, direk bilirubin, monosit eozinofil, bazofil, prokalsitonin ve büyük boyanmamış hücre konsantrasyonu değerleri ile anlamlı derecede ilişkili olduğu görüldü.

In siliko analiz sonucunda ifade düzeylerini analiz ettiğimiz genler ve RHK ile arasındaki ilişkinin belirlenmesinde daha önce kombine olarak kullanılmamış ve hastalığın moleküler mekanizmasında yer verilmeye çalışılmamıştır. Ayrıca, gerçekleştirilen çalışmanın ilk aşaması olan *in siliko* veri tabanı analizi yaklaşımı ve RHK ilişkisi daha önce rol oynadığı kanıtlanan genlerden yola çıkarak yeni aday genlerin belirlenmesinde akılcı ve ekonomik bir yaklaşım olabilir. RHK gelişiminde potansiyel belirteç olabilecek pek çok geni ayrı ayrı deneysel olarak incelemek yerine, belirteç olma ihtimali en yüksek olan genlerin belirlenmesindeki *in siliko* yaklaşımın kullanımı daha ekonomik ve hızlı sonuçlar sağlayabilir.

Çalışmamızın daha gerçekçi sonuçlara ulaşması için *in vitro* hücre deneyleri ile miRNA-ceRNA ilişkilerini ispat edecek ileri analizler gerekmektedir. Bu kapsamda RHK hücre hatlarında ilgili miRNA'ların aşırı ifadesi ya da ifadesinin baskılanması sonrasında Western blot deneyleri ile ceRNA'ların protein seviyelerinin ölçümü yapılarak miRNA-ceRNA ilişkisi net olarak ortaya konulmalıdır. Ayrıca, analiz edilen genlerin ifade düzeylerindeki değişimler ile RHK ve ilişkili parametrelerin daha büyük

Çalışma grubunda doğrulanması gerekmektedir. Doğrulanması durumunda *ATXN3*, *ABI2* ve *GOLGB1* genlerinin ifade değişimlerinin RHK prognozu için biyobelirteç olarak kullanılabilmesi mümkün olabilecektir. Bu çalışmanın sonuçları, ileride yapılacak projelerde ceRNA'ların ifade edilme seviyesini veya kalitesini değiştirmeye yönelik hücresel tedavilerin ve moleküler uygulamalarının tasarlanabilmesinin nn açabilecektir.



KAYNAKLAR

- Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β signaling in cancer—a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001;11(11), S44-S51.
- Algeciras-Schimmich A, Carol MP, Paul T, Mary SF, Stefan G. Procalcitonin: a marker for the diagnosis and follow-up of patients with medullary thyroid carcinoma. *Int J Clin Endocrinol Metab* 2009;94: 861-68.
- Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* 2016;17(8), 487.
- Almeida MI, Reis RM, Calin GA. Decoy activity through microRNAs: the therapeutic implications. *Expert Opin Biol Th* 2012;12(9): 1153-1159.
- Altman D, Yin L, Johansson A, Lundholm C, Grönberg H. Risk of renal cell carcinoma after hysterectomy. *Arch Intern Med* 2010; 170(22), 2011-2016.
- Arancio W, Swonild IG, Lucia B, Claudio T. A ceRNA approach may unveil unexpected contributors to deletion syndromes, the model of 5q-syndrome. *Oncoscience* 2015;2: 872.
- Avrillon V, Myriam LS, Laure F, Mélodie C, Emilie P, Gaëlle F, Marine D, Nathalie F, Laurence G, Emilie P. Lung cancer may increase serum procalcitonin level. *Infect Disord Drug Targets* 2015;15: 57-63.
- Baer C, Rainer C, Christoph P. Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer. *Cancer Res* 2013;73: 473-77.
- Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116(3): 590-597.

- Barua S, Junaid MA. Lifestyle, pregnancy and epigenetic effects. *Epigenomics* 2015;7(1): 85-102.
- Bernard L, Françoise F, Philippe C, Fabrice M, Sophie L, Loïc G, Olivier L. Procalcitonin as an early marker of bacterial infection in severely neutropenic febrile adults. *Clin Infect Dis* 1998;27: 914-15.
- Bishara S, Griffin M, Cargill A, Bali A, Gore M, Kaye SB, Shepherd JH, Van Trappen PO. Pre-treatment white blood cell subtypes as prognostic indicators in ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;138: 71-75.
- Boyle AP, Araya CL, Brdlik C, Cayting P, Cheng C, Cheng Y, Kasper D. Comparative analysis of regulatory information and circuits across distant species. *Nature* 2014;512(7515): 453.
- Broderick JA, Zamore PD. Competitive endogenous RNAs cannot alter microRNA function in vivo. *Mol Cell* 2014;54(5): 711-713.
- Brugarolas J. Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2014;32: 1968-76.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*, 2013;499: 43-49.
- Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *Lancet* 2016;387(10021): 894-906.
- Cardillo MR, Davide L, Orietta G, Di Silverio F, Giulia C. Transforming growth factor-beta pathway in human renal cell carcinoma and surrounding normal-appearing renal parenchyma. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23: 109-17.

- Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M, Bozzoni I. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* 2011;147(2): 358-369.
- Chen M, Yuanqing Y, Hushan Y, Pheroze T, Surena M, Nizar MT, Christopher GW, Jian G, Xifeng W. Genome-wide profiling of chromosomal alterations in renal cell carcinoma using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Int J Cancer* 2009;125: 2342-48.
- Cheng C, Zhou Y, Li H, Xiong T, Li S, Bi Y, Fang X. Whole-genome sequencing reveals diverse models of structural variations in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Hum Genet* 2016;98(2): 256-274.
- Cheng CJ, Bahal R, Babar IA, Pincus Z, Barrera F, Liu C, Saltzman WM. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment. *Nature* 2015; 518(7537): 107.
- Choi JH, Min JK, Yong KP, Jong-Yeop I, So MK, Hyung CK, Hyun GW, Hee-Jung W. Mutations acquired by hepatocellular carcinoma recurrence give rise to an aggressive phenotype. *Oncotarget* 2017;8: 22903.
- Ciccarese C, Matteo B, Rodolfo M, Michelangelo F, Roberto I, Daniel H, Giampaolo T, Francesco M. The prospect of precision therapy for renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2016;49: 37-44.
- Coenen, EA, Michel Z, Claus M, Rolf M, Ursula C, Rob P, Jutta B, Marry HE. Abl-interactor 2 (ABI2): a novel MLL translocation partner in acute myeloid leukemia. *Leukemia Res* 2012;36: e113-e15.
- Coronnello C, Panayiotis VB. ComiR: combinatorial microRNA target prediction tool. *Nucleic Acids Res* 2013;41: W159-W64.

- Courtney KD, Matthew G, Hendrika V, Antonius V, Anthony-Samuel L, Ann MP. Localization and phosphorylation of Abl-interactor proteins, Abi-1 and Abi-2, in the developing nervous system. *Mol Cell Neurosci* 2000;16: 244-57.
- Creixell P, Reimand J, Haider S, Wu G, Shibata T, Vazquez M, Raphael BJ. Pathway and network analysis of cancer genomes. *Nat Met* 2015;12(7): 615.
- Dai Z, Ann MP. Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Gene Dev* 1995;9: 2569-82.
- Denzler R, Agarwal V, Stefano J, Bartel DP, Stoffel M. Assessing the ceRNA hypothesis with quantitative measurements of miRNA and target abundance. *Mol Cell* 2014;54(5): 766-776.
- Denzler R, McGearry SE, Agarwal V, Bartel DP, Stoffel M. Impact of microRNA levels, target-site complementarity, and cooperativity on competing endogenous RNA-regulated gene expression. *Mol Cell* 2016;64(3): 565-579.
- Dweep H, Norbert G. miRWalk2. 0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods*, 2015;12: 697-97.
- Ergun S, Serdar O. Oncocers: ceRNA-mediated cross-talk by sponging miRNAs in oncogenic pathways. *Tumor Biol* 2015;36: 3129-36.
- Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, Horwich A. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27(suppl_5): 58-68.
- Favazza L, Chitale DA, Barod R, Rogers CG, Kalyana-Sundaram S, Palanisamy N, Williamson SR Renal cell tumors with clear cell histology and intact VHL and chromosome 3p: a histological review of tumors from the Cancer Genome Atlas database. *Modern Pathol* 2017; 30(11), 1603.

- Felsenfeld G. A brief history of epigenetics. *CSH Perspect Biol* 2014;6: a018200.
- Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* 2017; 7(5), 1016.
- Franco-Zorrilla JM, Adrián V, Marco T, Isabel M, María IP, Ignacio RS, Antonio L, Detlef W, Juan AG, Javier PA. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* 2007;39: 1033-37.
- Fu X, Chad JC, Nrusingh CB, Vijetha K, Martin S, Sabrina H, Alejandro C, Carolina G, Tao W, Sarmistha N. Overcoming endocrine resistance due to reduced PTEN levels in estrogen receptor-positive breast cancer by co-targeting mammalian target of rapamycin, protein kinase B, or mitogen-activated protein kinase kinase. *Breast Cancer Res* 2014;16: 430.
- Gatto F, Intawat N, Jens N. Chromosome 3p loss of heterozygosity is associated with a unique metabolic network in clear cell renal carcinoma. *P Natl Acad Sci* 2014;111: E866-E75.
- Ghallab O, Hamed NA, El Shafei S, Abo R, Sherif S. MDR1 Gene Polymorphism and Outcome in Egyptian Chronic Myeloid Leukaemia Patients. *J Cancer Biol Res* 2015;8: 9.
- Griffith JS, Mahler HR. DNA ticketing theory of memory. *Nature* 1969;223(5206): 580-582
- Gu L, Hongzhao L, Yu G, Xin M, Luyao C, Xintao L, Yu Z, Yang F, Xu Z. The association of platelet count with clinicopathological significance and prognosis in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Plos One* 2015;10: e0125538.

- Guil S, Esteller M. RNA–RNA interactions in gene regulation: the coding and noncoding players. *Trends Biochem Sci* 2015;40(5): 248-256.
- Gunduz S, Hasan M, Deniz T, Özcan Y, Mukremin U, Hasan SC, Hakan B. Platelet to lymphocyte ratio as a new prognostic for patients with metastatic renal cell cancer. *Asia-Pac J Clin Onco* 2015;11: 288-92.
- Gültekin M, Güledal B. Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014;43.
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(8): 509.
- Häggström C, Kilian R, Tanja S, Jonas M, Tone B, Hanno U, Anders E, Martin A, Hans C, Randi S. Metabolic factors associated with risk of renal cell carcinoma. *Plos One*, 2013;8: e57475.
- Hajjari M, Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer Biol Med* 2015;12(1): 1.
- Hamidi N, Gökçe M, Evren S, Sumer B. Evaluation of increased preoperative serum high sensitive C-reactive protein and procalcitonin levels on grade and stage of clear cell renal cell carcinoma. *Clin Nephrol* 2015;83: 225-30.
- Hauser S, Wulfken LM, Holdenrieder S, Moritz R, Ohlmann CH, Jung V, Müller SC. Analysis of serum microRNAs (miR-26a-2*, miR-191, miR-337-3p and miR-378) as potential biomarkers in renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol* 2012; 36(4), 391-394.
- He HT, Mu X, Ye K, Xiao-Yun H, Ming-Qi W, Qing Y. Biomarker and competing endogenous rna potential of tumor-specific long noncoding RNA in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncotargets Ther* 2016;9: 6399.

- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435(7043), 828.
- Heard E, Robert M. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 2014;157: 95-109.
- Hes Ondşej. International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia 2012. *Cesk Patol* 2014;50: 137-41.
- Hezroni H, Koppstein D, Schwartz MG, Avrutin A, Bartel DP, Ulitsky I. Principles of long noncoding RNA evolution derived from direct comparison of transcriptomes in 17 species. *Cell Rep* 2015;11(7): 1110-1122.
- Hirata H, Hinoda Y, Shahryari V, Deng G, Nakajima K, Tabatabai ZL, Ishii N, Dahiya R. Long noncoding RNA MALAT1 promotes aggressive renal cell carcinoma through Ezh2 and interacts with miR-205. *Cancer Res* 2015;75(7), 1322-1331.
- Holoch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet* 2015;16(2): 71.
- Hong Q, Ou L, Wei Z, Wen-zhen X, Lu Z, Di W, Guang-yan C, John CH, Xiang-mei C. LncRNA HOTAIR regulates HIF-1 α /AXL signaling through inhibition of miR-217 in renal cell carcinoma. *Cell Death Dis* 2017;8: e2772.
- Hosseini SA, Horton S, Saldivar JC, Miuma S, Stampfer MR, Heerema NA, Huebner K. Common chromosome fragile sites in human and murine epithelial cells and FHIT/FRA3B loss-induced global genome instability. *Gene Chromosome Canc* 2013; 52(11):1017–1029

- Iorio MV, Carlo MC. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012;4: 143-59.
- Iorio MV, Carlo MC. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 2012;33(6):1126-1133.
- Iwamoto H, Kanda Y, Sejima T, Osaki M, Okada F, Takenaka A. Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2014;44(1): 53-58.
- Jeppesen AN, Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Von Der Maase H. Hyponatremia as a prognostic and predictive factor in metastatic renal cell carcinoma. *Brit J Cancer* 2010;102(5): 867.
- Jeyapalan Z, Zhaoqun D, Tatiana S, Ling F, Chengyan H, Burton BY. Expression of CD44 3'-untranslated region regulates endogenous microRNA functions in tumorigenesis and angiogenesis. *Nucleic Acids Res* 2011;39: 3026-41.
- Johnson AR, Sai L, Tongwen W, Joseph AG, Steven HZ. Choline dehydrogenase polymorphism rs12676 is a functional variation and is associated with changes in human sperm cell function. *Plos One*. 2012;7: e36047.
- Johnson C, Marc OW, Xiling S, Jason WL. Epigenetics and cancer metabolism. *Cancer Lett* 2015;356: 309-14.
- Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 2015;16(7): 421.
- Jonasch E, Jianjun G, W Kimryn R. Renal cell carcinoma. *Brit Med J* 2014;349: g4797.
- Jung M, Hans-Joachim M, Christina G, Ina W, Marco A, Tobias W, Christian P, Manfred J, Carsten S, Hans L. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer

- identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med* 2009;13: 3918-28.
- Karateke A, Mustafa K, Ali B. Relations of Platelet Indices with Endometrial Hyperplasia and Endometrial Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16: 4905-8.
- Karreth FA, Reschke M, Ruocco A, Ng C, Chapuy B, Léopold V, Tay Y. The BRAF pseudogene functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma in vivo. *Cell* 2015;161(2): 319-332.
- Karreth FA, Yvonne T, Daniele P, Ugo A, Shen MT, Alistair GR, Gina D, Kaitlyn AW, Dror W, Pedro AP. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*, 2011;147: 382-95.
- Kartha RV, Subbaya S. Competing endogenous RNAs (ceRNAs): new entrants to the intricacies of gene regulation. *Front Genet* 2014;5:8.
- Kawashima A, Akira T, Hitoshi T, Yasuyuki A, Mikio N, Go T, Motohide U, Yasutomo N, Kazuo N, Norio N. Impact of hyponatremia on survival of patients with metastatic renal cell carcinoma treated with molecular targeted therapy. *Int J Urol* 2012;19: 1050-57.
- Kelly TJ, Amanda LS, Clary BC, Pere P. A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1 α stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Mol Cell Biol* 2011;31: 2696-706.
- Koroban NV, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Snezhkina AV, Melnikova NV. The role of microRNA in abiotic stress response in plants. *Mol Biol* 2016;50(3): 337-343.

- Kumar MS, Armenteros-Monterroso E, East P, Chakravorty P, Matthews N, Winslow MM, Downward J. HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature* 2014;505(7482): 212.
- Kvasha S, Vasily G, Alexandr K, Dmytro U, Yury MZ, Alla VR, Alexandr F V. Hypermethylation of the 5' CpG island of the FHIT gene in clear cell renal carcinomas. *Cancer Lett* 2008;265: 250-57.
- Lan Y, Nian Z, Han , Jingyue X, Rulang J. Golgb1 regulates protein glycosylation and is crucial for mammalian palate development. *Development* 2016;143: 2344-55.
- Lee DY, Zina J, Ling F, Jennifer Y, Yaou Z, Albert YY, Minhui L, William WD, Tatiana S, and Burton BY. Expression of versican 3'-untranslated region modulates endogenous microRNA functions. *PLoS One* 2010;5: e13599.
- Lew JQ, Chow WH, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Park Y. Alcohol consumption and risk of renal cell cancer: the NIH-AARP diet and health study. *Brit J Cancer* 2011; 104(3), 537.
- Li H, Zhao J, Zhang JW, Huang QY, Huang JZ, Chi LS, Ma WM. MicroRNA-217, down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and associated with lower survival, suppresses cell proliferation and migration. *Neoplasma* 2013;60(5): 511-515.
- Li L, Wang D, Xue M, Mi X, Liang Y, Wang P. 3' UTR shortening identifies high-risk cancers with targeted dysregulation of the ceRNA network. *Sci Rep* 2014;4: 5406.
- Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15(6): 321.
- Liu S, Miriam B, Hans van D, Peter D. Regulation of the TGF- β pathway by deubiquitinases in cancer. *Int J Biochem C B* 2016;76: 135-45.

- Lopez-Beltran A, Marina S, Rodolfo M, Ziya K. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol* 2006;49: 798-805.
- Lord CC, Gwynneth T, Mark B. Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *BBA-Mol Cell Biol L* 2013;1831: 792-802.
- Lu R, Ji Z, Li X, Qin J, Cui G, Chen J, Yu Z. Tumor suppressive microRNA-200a inhibits renal cell carcinoma development by directly targeting TGFB2. *Tumor Biol* 2015;36(9): 6691-6700.
- Macheret M, Halazonetis TD. DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol Mech* 2015;10: 425-448.
- Manikandan J, Joseph JA, Srinivasan DK, Peter NP. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformatics* 2008;2: 330-34.
- Mao Y, Francesca SM, Pier PDF, Simona P, Michael EH, Pietro DC. Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *P Natl Acad Sci USA* 2005;102: 12700-05.
- Martyn GE, Quinlan KG, Crossley M. The regulation of human globin promoters by CCAAT box elements and the recruitment of NF-Y. *BBA Gene Regul Mech* 2017;1860(5): 525-536.
- Mathew LK, Lee SS, Skuli N, Rao S, Keith B, Nathanson KL, Simon MC. Restricted expression of miR-30c-2-3p and miR-30a-3p in Clear Cell Renal Carcinomas enhances HIF2 α activity. *Cancer Discov* 2013;CD-13.

- Messai Y, Muhammad ZN, Meriem H, Bassam J, Andrés T, Marie B, Véronique B, Elodie V, Katy B, Arash N. ITPR1 protects renal cancer cells against natural killer cells by inducing autophagy. *Cancer Res* 2014;74: 6820-32.
- Moch H. An overview of renal cell cancer: pathology and genetics. *Semin Cancer Biol* 2013;23(1):3-9.
- Moroni M, Camillo P, Mara DA, Silvana Q, Maria AC, Carlo B. Eosinophils and C4 predict clinical failure of combination immunotherapy with very low dose subcutaneous interleukin-2 and interferon in renal cell carcinoma patients. *Haematologica* 2000;85: 298-303.
- Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras* 2015;48(3): 166-174.
- Mutlu M, Raza U, Saatci Ö, Eyüpoğlu E, Yurdusev E, Şahin Ö. miR-200c: a versatile watchdog in cancer progression, EMT, and drug resistance. *J Mol Med* 2016;94(6): 629-644.
- Nagai H, Norihiro Y, Eiji T, Hideo M, Yuichiro Y, Kanji M. The mean corpuscular volume as a prognostic factor for colorectal cancer. *Surg Today* 2017;1-9.
- Naumann N, Juliana S, Georgia M, Mohamad J, Claudia H, Gudrun G, Brigitte S, Christian TD, Susanne S, Sina L. Fusion of PDGFRB to MPRIP, CPSF6, and GOLGB1 in three patients with eosinophilia-associated myeloproliferative neoplasms. *Gene Chromosome Canc* 2015;54:762-70.
- Ngo TC, Wood CG, Karam JA. Biomarkers of renal cell carcinoma. *Urol Oncol-Semin Ori* 2014;32(3):243-251.
- Oncel M, Aysel K, Murat O, Guven SS, Emel S, Bahattin A. Evaluation of platelet indices in lung cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16: 7599-602.

- Otunctemur A, Emin O, Suleyman S, Murat D, Huseyin B, Ismail K, Mustafa E, Eyyup D, Muammer B, Ahmet G. Diabetes mellitus as a risk factor for high grade renal cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15: 3993-6.
- Ouyang M, Li Y, Ye S, Ma J, Lu L, Lv W, Wang W. MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PloS One*, 2014;9(5): e96228.
- Park JH, Cheol L, Ja HS, Ji YC, Kyung CM. Nuclear expression of Smad proteins and its prognostic significance in clear cell renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2013;44: 2047-54.
- Pastore AL, Palleschi G, Silvestri L, Moschese D, Ricci S, Petrozza V, Carbone A, Di Carlo A. Serum and urine biomarkers for human renal cell carcinoma. *Dis Markers* 2015;2015, 251403.
- Pfeffer SR, Yang CH, Pfeffer LM. The Role of miR-21 in Cancer. *Drug Develop Res* 2015;76(6): 270-277.
- Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transd Tar Ther* 2016;1: 15004.
- Pfoh R, Ira KL, Vivian S. Deubiquitinases and the new therapeutic opportunities offered to cancer. *Endocr Relat Cancer* 2015;22: T35-T54.
- Poliseno L, Pandolfi PP. PTEN ceRNA networks in human cancer. *Methods* 2015;77: 41-50.
- Pichler M, Ress AL, Winter E, Stiegelbauer V, Karbiener M, Schwarzenbacher D, Scheideler M, Ivan C, Jahn SW, Kiesslich T, Gerger A, Bauernhofer T, Calin GA, Hoefler G. MiR-200a regulates epithelial to mesenchymal transition-related

- gene expression and determines prognosis in colorectal cancer patients. *Brit J Cancer* 2014;110(6): 1614.
- Pick AM, Kelly KN. Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Clin Ther* 2012;34: 511-20.
- Protzel C, Matthias M, Oliver WH. Epidemiology, aetiology, and pathogenesis of renal cell carcinoma. *Eur Urol Suppl* 2012;11: 52-59.
- Purdue MP, Johansson M, Zelenika D, Toro JR, Scelo G, Moore LE, Jacobs KB. Genome-wide association study of renal cell carcinoma identifies two susceptibility loci on 2p21 and 11q13. *Nat Genet* 2011; 43(1), 60.
- Qi X, Zhang D H, Wu N, Xiao JH, Wang X, Ma W. ceRNA in cancer: possible functions and clinical implications. *J Med Genet* 2015;52(10): 710-718.
- Ramassone A, Pagotto S, Veronese A, Visone, R. Epigenetics and MicroRNAs in Cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19(2): 459.
- Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Slaby O. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med* 2012; 10(1), 55.
- Riaza A, Dalzielb RG, Venturinac VM, Shaha MA. MicroRNAs: History, biogenesis and modes of action to regulate gene expression. *Veterinaria* 2015;2: 14-20.
- Ridge CA, Pua BB, Madoff DC. Epidemiology and staging of renal cell carcinoma. *Semin Interv Radiol* 2014; 31(1):3.
- Rini BI, Steven CC, Bernard E. Renal cell carcinoma. *Lancet* 2009;373: 1119-32.

- Rogers TE, Rakheja D, Zhou XJ, Laszik Z, Nadasdy T, D'Agati V. *Silva's Diagnostic Renal Pathology*, 2nd Edt., Cambridge, Cambridge University Press. 2009; 10-25.
- Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, Sood AK. miRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment. *Cancer Discov* 2016;6(3): 235-246.
- Sacco JJ, Yau TY, Darling S, Patel V, Liu H, Urbe S, Clague MJ, Coulson M. The deubiquitylase Ataxin-3 restricts PTEN transcription in lung cancer cells. *Oncogene* 2014;33: 4265-72.
- Santoni M, Francesco M, Consuelo A, Massimo N, Francesca M, Luciano B, Rossana B, Giorgio S, Rodolfo M, Giampaolo T. Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immun* 2013;62: 1757-68.
- Sato F, Soken T, Stephen JM, Kazuharu S. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 2011;278: 1598-609.
- Sato Y, Tetsuichi Y, Yuichi S, Shigekatsu M, Yusuke O, Takumi K, Teppei S, Aiko SO, Genta N, Hiromichi S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2013;45: 860-67.
- Saunier E, Benelli C, Bortoli S. The pyruvate dehydrogenase complex in cancer: An old metabolic gatekeeper regulated by new pathways and pharmacological agents. *Int J Cancer* 2016;138(4), 809-817.
- Schanen BC, Li X. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics* 2011;97(1): 1-6.
- Schwarzenbach H. The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15(9),1159-1169.

- Svobodova E, Kubikova J, Svoboda P. Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Pflug Arch Eur J Phy* 2016;468(6): 1089-1102.
- Seguin L, Desgrosellier JS, Weis S M, Cheresh DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol* 2015;25(4): 234-240.
- Seliger B, Simon J, Sven PD, Francesco MM, Christian VR, Ena W, Rudolf L. Linkage of microRNA and proteome-based profiling data sets: a perspective for the prioritization of candidate biomarkers in renal cell carcinoma? *J Proteome Res* 2010;10: 191-99.
- Sellitti D, Sonia QD. MicroRNAs in renal cell carcinoma. *MicroRNA* 2015;4: 26-35.
- Sen R, Suman G, Shaoli D, Subrata B, Jayprokas C. Competing endogenous RNA: the key to posttranscriptional regulation. *Sci World J* 2014; 896206.
- Shin LJ, Hyung SK, Young BK, Min CL, Chang SP. Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *J Surg Oncol* 2003;84: 166-72.
- Shingarev R, Jaimes EA. Renal cell carcinoma: new insights and challenges for a clinician scientist. *Am J Physiol-Renal* 2017;313(2), F145-F154.
- Shrestha D, Liu S, Hammond SK, LaValley MP, Weiner DE, Eisen EA, Applebaum KM. Risk of renal cell carcinoma following exposure to metalworking fluids among autoworkers. *Occup Environ Med* 2016; oemed-2016.
- Shuch B, Srinivas V, Christopher JR, Lindsay M, James P, Maria JM, Adam RM, Ramaprasad S, Marston L. Defining early-onset kidney cancer: implications for germline and somatic mutation testing and clinical management. *J Clin Oncol* 2013;32: 431-37.

- Shuib S, Wenbin W, Hariom S, Mark RM, Dominic M, Eleanor R, Esther M, Patrick HM, Takeshi K, Masahiro Y. Copy number profiling in von hippel-lindau disease renal cell carcinoma. *Gene Chromosome Canc* 2011;50: 479-88.
- Singh RB, Kadam PSA. Investigation of tumor suppressor genes apart from VHL on 3p by deletion mapping in sporadic clear cell renal cell carcinoma (cRCC). *Urol Oncol-Semin Ori* 2013;1333-42.
- Soultati A, Stares M, Swanton C, Larkin J, Turajlic S. How should clinicians address intratumour heterogeneity in clear cell renal cell carcinoma? *Curr Opin Urol* 2015;25(5): 358-366.
- Stratton K, Kasmintan S, Christopher M, Rohini RM, Marina C, Lauren J, Janice D, Peter W, Lia P, Carol P. Renal cell carcinoma and non-hodgkin's lymphoma: genomic approaches to identification of shared susceptibility. *J Urol* 2014;191: e318.
- Sumazin P, Xuerui Y, Hua-Sheng C, Wei-Jen C, Archana I, David LN, Presha R, Mukesh B, Paolo G, Jose S. An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma. *Cell* 2011;147: 370-81.
- Szutorisz H, Hurd YL. High times for cannabis: Epigenetic imprint and its legacy on brain and behavior. *Neurosci Biobehav R* 2017; 85: 93-101.
- Tay Y, Lev K, Leonardo S, Dror W, Shen MT, Ugo A, Florian K, Laura P, Paolo P, Ferdinando DC. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell* 2011;147: 344-57.
- Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature* 2014;505(7483): 344.

- Teixeira AL, Ferreira M, Silva J, Gomes M, Dias F, Santos JI, Medeiros R. Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients. *Tumor Biol* 2014;35(5): 4057-4066.
- Thoenes W, Rumpelt HJ. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas): the basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract* 1986;181: 125-43.
- Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nat Rev Genet* 2016;17(5): 272.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *Cancer J Clin* 2015;65(2): 87-108.
- Valdivia CR, Kazuo U, Michael JA, Jonathan CM. GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am J Physiol Heart C* 2009;297: H1446-H52.
- Valera VA, Beatriz AW, Marston L, Maria JM. Regulatory effects of microRNA-92 (miR-92) on VHL gene expression and the hypoxic activation of miR-210 in clear cell renal cell carcinoma *J Cancer* 2011;2: 515-26.
- Valera VA, Walter BA, Linehan WM, Merino MJ. Regulatory effects of microRNA-92 (miR-92) on VHL gene expression and the hypoxic activation of miR-210 in clear cell renal cell carcinoma. *J Cancer* 2011;2: 515.
- Venkatesh S, Workman JL. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2015;16(3): 178.

- Walter J, Anja H. Epigenetics, Introduction to Epigenetics, 1st Edt., Springer, Germany. 2017;11-29.
- Wang C, Jicheng H, Meiling L, Hongwei G, Xiaojun Z, Xi C, Ke Z, Chen-Yu Z, Tiehui Z, Jingping G. A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma. *Sci Rep* 2015;5: 7610.
- Wang F, Xu Y. Body mass index and risk of renal cell cancer: A dose-response meta-analysis of published cohort studies. *Int J Cancer* 2014; 135(7):1673-1686.
- Wang L, John D, Jin-San Z, Wanguo L, Junqi Q, David B, Lynn H, Robert J, Walter B, Jochen S. Loss of expression of the DRR 1 gene at chromosomal segment 3p21. 1 in renal cell carcinoma. *Gene Chromosome Canc* 2000;27: 1-10.
- Wan L, Sean RW, Mingsheng W, Darrell DD, Shaobo Z, Lee AB, Xiang D, Liang C. Molecular subtyping of metastatic renal cell carcinoma: implications for targeted therapy. *Mol Canc* 2014;13: 39.
- Wang SS, Yi-Feng G, Nicholas W, Karoliina S, Alana C, Anwasha D, Robert EH, Xian-Jin X, Dinesh R, Ivan P. Bap1 is essential for kidney function and cooperates with Vhl in renal tumorigenesis. *P Natl Acad Sci* 2014;111: 16538-43.
- Waters CE, Joshua CS, Seyed AH, Kay H. The FHIT gene product: tumor suppressor and genome “caretaker”. *Cell Mol Life Sci* 2014;71: 4577-87.
- Wu JW, Min H, Jijie C, Joan S, Morgan H, Carey L, Daniel JR, Saw K, Tom WM, Robert F. Crystal structure of a phosphorylated Smad2: Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF- β signaling. *Mol Cell* 2001;8: 1277-89.

- Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, Ellinger J. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PloS One* 2011;6(9): e25787.
- Xing T, He H. Epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: mechanisms and potential use in molecular pathology. *Chinese J Cancer Res* 2016; 28(1), 80.
- Xu J, Li Y, Lu J, Pan T, Ding N, Wang Z, Li X. The mRNA related ceRNA–ceRNA landscape and significance across 20 major cancer types. *Nucleic Acids Res* 2015;43(17): 8169-8182.
- Yang L, Jianlin Y, Liwen L, Changhong S, Longxin W, Feng T, Fei L, He W, Chen S, Qiang Z. α -linolenic acid inhibits human renal cell carcinoma cell proliferation through PPAR- γ activation and COX-2 inhibition. *Oncol Lett* 2013;6: 197-202.
- Yeh KE, Peter SM, Tse-Ling F. Paraneoplastic cholestasis associated with ovarian dysgerminoma. *Obstet Gynecol* 2015;126: 431-34.
- Yeh WL, Lin HY, Huang, CY, Huang BR, Lin C, Lu DY, Wei KC. Migration-prone glioma cells show curcumin resistance associated with enhanced expression of miR-21 and invasion/anti-apoptosis-related proteins. *Oncotarget* 2015;6(35): 37770.
- Yoshino H, Hideki E, Toshihiko I, Shuichi T, Takashi K, Miki F, Satoko K, Masayuki N, Naohiko S. 2013. Epithelial–mesenchymal transition-related microRNA-200s regulate molecular targets and pathways in renal cell carcinoma. *J Hum Genet* 2013;58: 508-16.
- Yu G, Weimin Y, Kiranmai G, Anping L, Ji W, Wei X, Ke C, Haibing X, Heng L, Kun T. Pseudogene PTENP1 functions as a competing endogenous RNA to suppress clear-cell renal cell carcinoma progression. *Mol Cancer Ther* 2014;13: 3086-97.

- Zamani AG, Zamani A. MikroRNA'lar ve akciğer kanseri. *Tuberk Toraks* 2013; 61(1), 57-62.
- Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet* 2015;16(3): 172.
- Zhai Q, Zhou L, Zhao C, Wan J, Yu Z, Guo X, Lu R. Identification of miR-508-3p and miR-509-3p that are associated with cell invasion and migration and involved in the apoptosis of renal cell carcinoma. *Biochem Bioph Res Co* 2012;419(4): 621-626.
- Zheng B, Zhu H, Gu D, Pan X, Qian L, Xue B, Shan Y. MiRNA-30a-mediated autophagy inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to sorafenib. *Biochem Bioph Res Co* 2015;459(2): 234-239.
- Zheng YZ, Shu-Qin D, Wei L, Xun C, Yong L, Lan-Jun Z, Jian-Hua F, Jun-Ye W. Prognostic value of preoperative mean corpuscular volume in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroentero* 2013;19: 2811.
- Zimmermann U, Woenckhaus C, Pietschmann S, Junker H, Maile S, Schultz K, Protzel C, Giebel J. Expression of annexin II in conventional renal cell carcinoma is correlated with Fuhrman grade and clinical outcome. *Virchows Arch* 2004;445: 368-74.
- Zimmermann U, Woenckhaus C, Teller S, Venz S, Langheinrich M, Protzel C, Maile S, Junker H, Giebel J. Expression of annexin AI in conventional renal cell carcinoma (CRCC) correlates with tumour stage, Fuhrman grade, amount of eosinophilic cells and clinical outcome. *Histol Histopathol* 2007;22: 527-34.
- Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol* 2015;67(3): 519-530.

EKLER

A. Etik Kurul Raporu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/239

25.04.2016

Sayın Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Renal Hücreli Karsinomdaki Muhtemel ceRNA'ların İn Siliko Analizi ve İfade Düzeylerinin İncelenmesi** başlıklı OMÜ KAEK 2016/139 Karar nolu **Patoloji çalışması+ Genetik çalışma** nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 14.04.2016 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanmadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr.Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

B. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

ARASTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

“RENAL HÜCRELİ KARSİNOMDAKİ MUHTEMEL ceRNA’LARIN İN SİLİKO ANALİZİ VE İFADE DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ”

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz bilgilendirilecektir.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

Çalışma, renal hücreli kanser tanısı almış hastalardan tedavi amaçlı ameliyatla hali hazırda çıkarılmış olan tümör ve yakınındaki normal böbrek dokusunda ve renal hücreli karsinom dışındaki sebeplerle ameliyat olmuş kişilerin sağlıklı dokularında hastalığa sebep olabileceği düşünülen bazı genlerin miktarında değişikliklerin (muhtemel yeni onkogenlerin gen ekspresyon değişiklikleri) olup olmadığı araştırılacaktır. Bu çalışma sonucunda tespit edilebilecek bu genetik değişikliklerin bu hastalığın nasıl oluştuğuna dair bizlere ipuçları verebileceğini umut ediyoruz.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Araştırma sırasında size tedavi için uygulanacak işlemler haricinde ek bir ilaç uygulaması veya canınızı acıtacak girişimsel herhangi bir uygulama yapılmayacak olup tedavi ve teşhis amacıyla ameliyat sırasında hali hazırda böbreğinizden çıkarılan tümör

ve yakınındaki normal böbrek dokusundan ve renal hücreli karsinom dışındaki sebeplerle ameliyat olmuş kişilerin sağlıklı dokularından bir miktar alınarak bütün inceleme ve araştırma bu doku parçası üzerinde yapılacaktır. Bu doku parçasından RNA (kalıtsal materyal) izole edilerek hastalığa sebep olabileceği düşünülen bazı genlerin miktarındaki değişimler araştırılacak ve bu dokular daha sonra kullanılmayacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Çalışma doktorunuzu ziyarete belirlenen günlerde gelmelisiniz ve bir sonraki ziyaretiniz de, ziyaretten ayrılmadan önce planlanmalıdır. Yine çalışmadan önce veya çalışma sırasında aldığımız başka herhangi bir tıbbi tedaviyi de çalışma doktoruna söylemeniz önemlidir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Çalışmaya katılarak başvurmuş olduğunuz merkezde size uygulanacak olan ve sizin teşhis ve tedavi sürecinde uygulanacak işlemler haricinde herhangi bir uygulama yapılmayacağı için bu çalışmanın size bir yan etkisi söz konusu değildir.

GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ

Eğer denek / hasta doğurganlık döneminde / emziren bir kadın ise çalışmaya dahil edilmeyecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR? (Varsa açıklayınız)

Bu çalışma ile renal hücreli karsinom ile ilgili olarak böbrek dokunuzdan çıkarılma tümör dokusunda daha önceden uygulanmamış ve henüz rutin testler dahilinde olmayan bir test uygulanacaktır. Testin sonuçları kansere sebep olabileceği düşünülen bazı genlerin miktarında değişikliklerin (muhtemel yeni onkogenlerin gen ekspresyon değişiklikleri) olup olmadığını gösterir. Bu sayede tespit edilebilecek bu genetik değişiklikler bu hastalığın nasıl oluştuğuna dair bizlere ipuçları verebilecek ve hastalığın tedavisi için yeni hedefler bulunmasına yardımcı olacaktır.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabileceğim bilincindeyim. Çalışmadan her hangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma kapsamında katılımcılardan herhangi (yol dahil) bir ücret talep edilmeyecek ve hastaya da herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi (“Çalışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca Çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Doktorunuzdan toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahibsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahibsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Recep BÜYÜKALPELLİ’yi 0 (362) 3121919 / 2508 telefon numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji ABD’den arayabileceğimi biliyorum.

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:

Yoktur.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sercan Ergün

Doğum Yeri: Ayancık

Doğum Tarihi: 07.12.1987

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü-2010

Yüksek Lisans: Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi
Biyoloji Ana Bilim Dalı-2014

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2012-2015
(Araştırma Görevlisi)

Ordu Üniversitesi, Ulubey Meslek Yüksekokulu, 2015-..... (Öğretim
Görevlisi)

E-posta: sercanergun@msn.com, sercanergun@odu.edu.tr