

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

(DOKTORA TEZİ)

**ANJİYOGENEZ İLE İLGİLİ TROMBOSPONDİN-1, HIF-1 VE
CA9 MOLEKÜLLERİNİN BÖBREK KANSERLİ HASTALARDA
ARAŞTIRILMASI**

HÜLYA TIĞLI

**DANIŞMAN
PROF.DR. NUR BUYRU**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
ONKOLOJİK BİYOLOJİ VE İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

05 / 05 / 2009

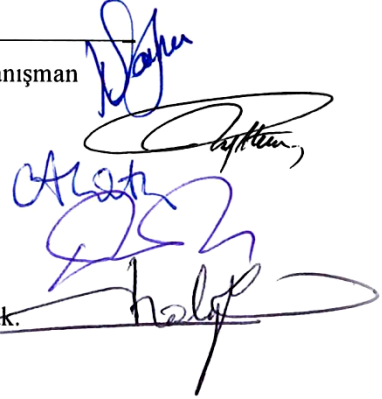
Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Onkolojik Biyoloji ve İmmünoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Temel Onkoloji
Tez Sahibi : Hülya TİĞLİ
Tez Başlığı : "'Anjiyogenez İle İlgili Trombospondin-1, HIF-1α ve CA9 Moleküllerinin Böbrek Kanseri Hastalarda Araştırılması"
Sınav Yeri : İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Sınav Tarihi : 19 / 01 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof.Dr.Nur BUYRU/İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak./Tıbbi Biyoloji /Danışman
- 2.Prof.Dr.Nejat DALAY/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü/Temel Onkoloji
- 3.Prof.Dr.Canan ALATLI/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü/Klinik Onkoloji
- 4.Prof.Dr.Tarık ESEN/İ.Ü.İstanbul Tıp Fak./Üroloji
- 5.Prof.Dr.Beyazıt ÇIRAKOĞLU/Acıbadem Üniv./Fen Edebiyat Fak.



BEYAN

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

Hülya Tıǧlı



İTHAF

Sevgili Aileme ve desteklerini her daim hissettiğim sevgili dostlarıma,

TEŞEKKÜR

Enstitü Müdürümüz Sayın Prof. Dr. Erkan Topuz'a ,

Tezimin hazırlanmasında gösterdiği içten ilgi, hoşgörü ve sabır için , bilgi ve deneyimlerini uzun yıllardır bizlerle paylaşan Sayın Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Nejat Dalay'a

Sunduğu değişik bakış açıları ve katkıları için, Sevgili Danışman hocam Prof. Dr. Nur Buyru'ya,

Özveriyle ve içtenlikle bilgi ve birikimlerini bizlere aktaran Sevgili Doç. Dr. Hülya Yazıcı'ya,

Sorularıma, sorularıma içtenlikle cevaplar arayan ve sabırla yardımını esirgemeyen Sevgili Doç. Dr. Uğur Deligezer'e

Kanser Biyokimyası Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Vildan Yasasever'e,

Her daim içten gülüş ve tavırlarıyla bizlere destek olan Sevgili Prof. Dr. Canan Alatlı'ya,

Sayın Doç.Dr.Ahmet Özaydın'a isteğimizi geri çevirmeyip verdiği destek için,

Her yardım isteğime elinden geldiğince ilgili davranan ve çözüm bulan sevgili Prof. Dr. Pınar Saip'e ve Doç. Dr. Esra Kaytan Sağlam'a da ayrıca çok teşekkür ederim.

Uzun yıllardır tüm deneyimlerini ve en önemlisi arkadaşlıklarını içtenlikle benimle paylaşan artık ailemden saydığım, sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Elif Akışık'a, MSc. Ebru Akışık'a, Dr. Mustafa Işın'a, Dr. Özlem Özgüven'e ve Türkan Şen Feradoğlu'na tüm kalbimle ayrı ayrı çok teşekkür ederim. Tüm katkıları için MSc. Zübeyde Yalnız'a, MSc. Hilal Oğuz'a, MSc. Onur Baykara ve ayrıca MSc. adaylarımız Orkun Gürbüz, Seda Kılıç, Özge Şükrüoğlu, Nazlı Uçunoğlu ve Müge Kovancılar 'a da bize getirdikleri enerji ve neşe için teşekkür ederim.

Üniversitemizin Üroloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Tarık Esen'e ve Sayın Prof. Dr. Faruk Özcan'a ve diğer sayın üroloji hocalarımıza değerli destekleri için,

Sayın Üroloji Anabilim Dalı Başasistanı Dr. M. Öner Şanlı'ya tüm azmi ve yardımları için, Sevgili Üroloji uzman ve aday arkadaşlarımdan Dr. Tzevat Tefik'e, Dr. Murat Tezer'e, Dr. Ömer Acar'a , Dr. M.Fatih Akbulut'a, Dr. Akın Soner Amasyalı'ya, Dr. Ömer Aytaç'e ve adını saymadığım tüm asistan arkadaşlarıma tezimin yapılmasındaki en önemli kısımlardan biri olan doku toplama ve dosya inceleme aşamalarında içten ve özveriyle yaptıkları tüm yardım ve katkılar için çok teşekkür ederim.

Sevgili ablam, meslektaşım, arkadaşım MSc. Hatice Tıgılı'ya hem mesleğime hem hayatıma yaptığı tüm katkılar için, tatlı kardeşim Filiz Tıgılı'ya bana öğrettiği yenilikler ve arkadaşlığı için , sevgili ablam Havva İrigül'e, hayatımın neşesi tatlı yeğenlerim Rana ve Sena İrigül ile Mustafa Onur Tıgılı'ya ve özellikle sevgili babam Mustafa Tıgılı ve sevgili annem Fatma Tıgılı'ya gösterdikleri anlayış, sabır ve içten destekleri için en büyük teşekkürü hak eden aileme sevgilerimle çokook teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:T-845/02062006

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.1. Böbrek Hücreli Karsinom (BHK).....	3
2.1.1.1. BHK'un Etiyolojisi	4
2.1.1.2. BHK'un Evrelemesi	7
2.1.1.3. BHK'un Sınıflandırması	7
2.2. Tümör Anjiyogenezi	8
2.2.1. Bazı Anjiyogenik Etmenlerin Özellikleri	11
2.2.1.1. Vasküler Endotel Büyüme Etmeni (VEGF).....	11
2.2.1.2. Epidermal Büyüme Etmeni (EGF).....	12
2.2.1.3. Fibroblast Büyüme Etmeni (FGF)	12
2.2.1.4. Trombosit Kökenli Büyüme Etmeni (PDGF)	13
2.2.1.5. Transforme Edici Büyüme Etmeni- β (TGF- β).....	13
2.2.1.6. Tümör Nekroz Etmeni-Alfa (TNF).....	13
2.2.2. BHK' da Anjiyogenezi.....	13
2.2.2.1. Anjiyogenezi Engelleyicileri İle Tedavi	14
2.3. Hipoksi İle İndüklenen Etmen-1 (HIF-1)	15
2.4. Karbonik Anhidraz 9 (CA9)	19
2.5. Trombospondin-1 (TSP-1).....	22
2.6. Epigenetik Mekanizmalar	24

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. GEREÇ	26
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	26
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	28
3.1.3. Tampon ve Çözeltiler.....	29
3.1.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi Tamponları.....	29
3.1.3.2. Jel Yükleme Tamponları	29
3.1.3.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	29
3.1.3.4. RNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	30
3.1.3.5. cDNA Sentezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	30
3.1.3.6. DNA Uzunluk Belirtecinin Parça Boyutu.....	31
3.1.3.7. Polimeraz Zincir Tepkimesinde Kullanılan Tampon	31
3.1.3.8. Gerçek Zamanlı PCR da Kullanılan Tampon	31
3.1.3.9. ELISA Öncesi Doku Parçalama Tamponu (HEPES Tamponu)	32
3.2. YÖNTEM	32
3.2.1. Dokudan RNA İzolasyonu	32
3.2.2. Dokudan DNA İzolasyonu.....	34
3.2.3. Spektrofotometrik Analiz.....	35
3.2.4. Agaroz Jellerin Hazırlanması.....	35
3.2.5. Gen İfade Analizleri.....	36
3.2.6. Metillenme Analizi :	38
3.2.7. ELISA (Enzim Linked İmmuno Sorbent Assay)	41
3.2.8. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Gen İfade Analizleri.....	44
4.1.1. HIF 1 Gen İfade Analizi İle İlişkili Bulgular	45
4.1.2. CA9 Gen İfade Analizi İle İlişkili Bulgular.....	47
4.1.3. TSP-1 Gen İfade Analizi İle İlişkili Bulgular	49
4.2. TSP-1 Metillenme Bulguları.....	53
4.3. ELISA Sonuçları.....	55
4.3.1. Dokuda HIF-1 Protein Düzeyleri	57
4.3.2. Dokuda CA9 Protein Düzeyleri	58

4.3.3. Dokuda TSP-1 Protein Düzeyleri	58
5. TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR	65
FORMLAR	76
ETİK KURUL KARARI	77
ÖZGEÇMİŞ	78

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Sporadik Böbrek Hücreli Karsinom İçin Risk Etmenleri	5
Tablo 2-2: Anjiyogenezi Uyarıcı ve Engelleyen Etmenler	9
Tablo 3-1: Dokudan RNA İzolasyonu	33
Tablo 3-2: DNA İzolasyonu	34
Tablo 3-3: cDNA Sentez Koşulları	35
Tablo 3-4: G6PDH, TSP-1, HIF-1 ve CA9 Primer ve Prob Çiftleri	37
Tablo 3-5: Gen İfade Analizleri İçin Gerçek Zamanlı PCR Koşulları	37
Tablo 3-6: Bisülfid Modifikasyon İşlemi	38
Tablo 3-7: Primer Dizileri ve Tepkime Koşulları	40
Tablo 3-8: ELISA' nın Uygulanışı	42
Tablo 4-1: Hastalara ait Klinik Parametreler	43
Tablo 4-2: Hastaların Tümör ve Normal Dokularına Ait Gen İfade Analiz Sonuçları ..	51
Tablo 4-3: Hastaların Tümör ve Normal Dokularına Ait Protein Düzeyleri	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Böbrek Hücreli Karsinomun Evreleri	7
Şekil 2-2: Yeni Damar Oluşumu	8
Şekil 2-3: Normal ve Patolojik Anjiyogenez.....	9
Şekil 2-4: Normal Doku Onarımı ve Tümörde Anjiyogenezin Ortak Yolları.....	10
Şekil 2-5: Anjiyogenezin Etkinleşme ve Engellenmesi.....	11
Şekil 2-6: Tümör Dokusunda ve Normal Dokuda Hipoksi	15
Şekil 2-7: HIF' in Düzenlenmesi ve Etkinliğinin Şematik Gösterimi.....	16
Şekil 2-8: VHL ve HIF-1 İlişkisi.....	17
Şekil 2-9: Dokuda O ₂ , HIF-1 ve Anjiyogenez	18
Şekil 2-10: HIF-1 α 'ın VEGF Üzerine Etkisi	19
Şekil 2-11: Karbonik Anhidraz Aracıyla HCO ₃ ⁻ ün CO ₂ 'e Dönüşümü.....	20
Şekil 2-12: CA9'un BHK daki Olası Etki Mekanizması	21
Şekil 2-13: TSP-1 İle Anjiyogenezin Baskılanması	23
Şekil 2-14: TSP-1'nin Baskılanması ile Yeni Damar Oluşumu	23
Şekil 2-15: DNA Metillenmesi	24
Şekil 2-16: Normal ve Kanser Hücresinde Metillenme Durumu	25
Şekil 3-1: Lightcycler Cihazında Kullanılan HybProb Sistemi.....	36
Şekil 3-2: Sitozinin Bisülfid Modifikasyonu İle Urasile Dönüşümü.....	39
Şekil 3-3: SYBR Green Çalışma Prensipleri (95).....	40
Şekil 4-1: G6PDH Standartlarına Ait Floresan Eğriler	44
Şekil 4-2: Gerçek Zamanlı PCR Sonrası Örneklerin Jelde Görünümü	45
Şekil 4-3: HIF-1 Floresan Diyagramı.....	46
Şekil 4-4: Tümör ve Normalde HIF-1 Gen İfadesi	46
Şekil 4-5: CA9 Floresan Diyagramı	47
Şekil 4-6: Tümör Dokusunda ve Normal Dokularda CA9 Gen İfade Düzeyleri.....	48
Şekil 4-7: CA9 Gen İfadesi ve Grad İlişkisi	48
Şekil 4-8: TSP-1 Floresan Diyagramı.....	49
Şekil 4-9: Tümör ve Normalde TSP-1 Gen İfadesi	50
Şekil 4-10: TSP-1 Metilasyon Syber Green Floresan Diyagramı.....	53
Şekil 4-11: Metillenmiş Örneklerin Jel Görüntüsü.....	54

Şekil 4-12: Tümör ve Normaldeki TSP-1 Gen Metilasyonu	54
Şekil 4-13: TSP-1 Gen İfadesi İle Metilasyonu Arasındaki Zıt İlişki	55
Şekil 4-14: Tümör ve Normal Doku Örneklerinde HIF-1 Protein Düzeyleri	57
Şekil 4-15: Hastaların Tümörlerinin Gradlarına Göre HIF-1 Protein Düzeyleri	57
Şekil 4-16: Tümör ve Normal Doku Örneklerinde CA9 Protein Düzeyleri	58
Şekil 4-17: Tümör ve Normaldeki TSP-1 Protein Düzeyleri	59
Şekil 4-188: TSP-1 Protein Düzeyleri ve Tümör Çapı Arasındaki İlişki	59

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BHK-	Böbrek Hücreli Karsinom
BMI -	Vücut Kitle İndeksi
bFGF-	Temel Fibroblast Büyüme Etmeni
CA9-	Karbonik Anhidraz9
EAU-	Avrupa Üroloji Birliği
EGF-	Epidermal Büyüme Etmeni
EGFR-	Epidermal Büyüme Etmeni Almacı
FGF-	Fibroblast Büyüme Etmeni
G6PDH-	Glukoz6 Fosfat Dehidrogenaz
HIF-1	- Hipoksiyle İndüklenen Etmen-1
IGF-	İnsüline Benzer Büyüme Etmeni
KT-	Kemoterapi
LC-	Light Cycler
MMP-	MatrisMetalloProteinaz
m-TOR-	memeli Rafamisin Hedefi
PCR-	Polimeraz Zincir Tepkimesi
PDGF-	Trombosit Kaynaklı Büyüme Etmeni
RT-	Radyoterapi
SDS-	Sodyum Dodesil Sülfat
TGF- α ,	- Transforme Edici Büyüme Etmeni- α ,
TK-	Tirozin Kinaz
TNF-	Tümör Nekroz Etmeni
TSP1-	Trombospondin1
VEGF-	Vasküler Endotelyal Büyüme Etmeni
VEGFR-	Vasküler Endotelyal Büyüme Etmeni Almacı
VHL-	Von Hippel Lindau

ÖZET

Tıgılı H. Anjiyogenez ile İlgili Trombospondin-1, HIF-1 α ve CA9 Moleküllerinin Böbrek Kanseri Hastalarda Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2008.

Tümörlerin büyümesinde ve metastazında önemli role sahip olan tümör anjiyogenezi, pro ve antianjiyogenik etmenler tarafından kontrol edilmektedir. Bu etmenler doğrudan ya da dolaylı olarak HIF-1 α (Hipoksi ile indüklenen etmen) tarafından düzenlenir. CA9 (Karbonik Anhidraz9), düşük oksijen varlığında HIF-1 α aracılığıyla düzenlenen bir zargeçen hücre yüzey proteini, TSP (Trombospondin)-1 ise potansiyel anjiyogenez baskılayıcısıdır. TSP-1 geninin promotör bölgesinde meydana gelen metillenmenin genin anlatımını engellediği gözlenmiştir. Bu nedenle bizim çalışmamızda anjiyogenez ile ilgili olan TSP-1, HIF-1 α ve CA9' un nicel gen ifade düzeyleri ve TSP-1 geninin promotör metilasyon durumu incelenmiştir. Aynı zamanda TSP-1, HIF-1 α ve CA9 genlerinin ürünleri olan proteinlerin miktarları tayin edilmiştir. HIF-1 α ve CA9 gen ifade düzeyleri arasında beklendiği gibi anlamlı korelasyon gözlenmektedir ($p=0,029$). Tümör doku örneklerinde HIF-1 α gen ifadesinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,017$). HIF-1 α protein düzeyleri tümörde normal dokuya göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,035$). Çalışmamızda tümör örneklerinde, hem CA9 gen ifadesi hem de protein düzeyi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). CA9 gen ifadesi ve grad arasında zıt yönde bir ilişki vardır($p=0,010$). Normal dokudaki TSP-1 gen ifadesi ($p=0,026$) ve protein düzeyi ($p=0,001$) tümör dokusuna oranla anlamlı derecede yüksektir. TSP-1 gen ifadesinin ve protein düzeyinin metilasyona bağlı olarak azaldığı görülmektedir ($p=0,052$ ve $p=0,011$). Sonuçlarımız çalıştığımız üç parametrenin (CA9, HIF-1 α ve TSP-1) böbrek kanserinin oluşum ve seyri ile yakından ilgili olabileceğini göstermekte olup hastalığın takibi açısından da uygun belirleyiciler olabileceklerini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler : Böbrek kanseri, Anjiyogenez, TSP-1, HIF-1 α , CA9

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-845/02062006

ABSTRACT

Tigli H. Investigation of Angiogenesis Related Genes TSP-1, HIF-1 α and CA9 in Patients with Renal Cancer. Istanbul University, Institute of Oncology, Basic Oncology Department. Doctorate Thesis. Istanbul. 2008.

Tumor angiogenesis, a major requirement for tumor outgrowth and metastasis, is regulated by pro- and antiangiogenic factors. These factors are regulated directly or indirectly by HIF (Hypoxia Inducible Factor)-1 α . The transmembrane CA (Carbonic anhydrase) 9 cell surface protein, is mediated by HIF-1 α under hypoxic conditions. TSP (Thrombospondin)-1 is a potent inhibitor of angiogenesis. Alterations in DNA methylation also appear to play a role in TSP-1 regulation, and promoter- associated CpG island methylation has been implicated recently in transcriptional inactivation of TSP-1. In our study quantitative expression levels of angiogenesis related genes HIF-1 α , TSP-1, CA9 and methylation of the TSP-1 promoter region were investigated. Protein levels of CA9, HIF-1 α and TSP-1 were also determined. HIF-1 α gene expression level was significantly higher in tumor tissues ($p=0.017$). A positive correlation was detected between HIF-1 α and CA9 gene expression in neoplastic tissue samples ($p=0.029$). HIF-1 protein levels were significantly higher in tumor tissue compared to normal kidney tissue ($p=0.03$). In our study both expression and proteins level of CA9 were significantly higher in tumor tissues ($p<0.001$). There was a negative correlation between CA9 gene expression and grade ($p=0.010$). TSP-1 gene expression and protein levels were significantly higher in normal tissue compared to tumor tissue ($p=0.026$, $p=0.001$, respectively). There was a negative correlation between TSP-1 gene methylation and TSP-1 gene expression and protein levels ($p=0.052$, $p=0.011$, respectively). Our findings are consistent with the fact that HIF-1 α , CA9 and TSP-1 gene products are involved in the tumorigenesis and pathogenesis of renal cell cancer.

Key Words: Kidney cancer, angiogenesis, HIF-1 α , TSP-1, CA9.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-845/02062006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Böbrek kanseri, damarlanması yoğun olan tümörlerden olduğundan anjiyogenezin etkinleşmesi ve baskılanmasından sorumlu moleküller bu kanserin prognozunda önemli yer tutmaktadır. Çalışmamızda HIF-1 α , CA9 ve TSP-1 genlerinin böbrek kanseri ile ilişkisi araştırılmıştır.

Tümörün baskılanması ile ilgili genlerin promotör bölgesinde yer alan CpG adalarının aşırı metillenmesi ile yazılımsal olarak sessizleşmesi bu genlerin etkisizleşmesinde yaygın bir mekanizmadır. TSP-1 geninin baskılanması üzerinde metillenmenin etkisini değerlendirmek amacıyla TSP-1 geninde promotör bölge metillenmesi araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarımız, bu molekülleri hedef alarak yapılan tedavi çalışmaları açısından da yol gösterici olabilecektir.

Tümörlerin büyümesinde ve metastazında önemli role sahip olan anjiyogenez, pro ve antianjiyogenik etmenler tarafından kontrol edilmektedir. Bu etmenler doğrudan ya da dolaylı olarak doku oksijen dengesinin düzenleyicisi olan HIF-1 α tarafından düzenlenir.

HIF-1 α , doku O₂ seviyesi azaldığında (hipoksi) anjiyogenez, glukoz taşınması ve anaerobik metabolizma ile ilgili genlerin anlatımını etkinleştirir. Bir çok anjiyogenik etmeni etkinleştirerek damar oluşumuna yol açar ve oksijen seviyesini yükseltir. HIF-1 α etkinliği nedeniyle CA9 gibi pro-anjiyogenik etmenlerin hedef genlerinin yazılımı etkinleşir. CA9, hipoksik koşullar altında hızla ve aşırı derecede ifade edilen, tümör hücre hipoksisi ile ilgili olduğu en iyi bilinen genlerden biridir. CA9, tümör büyümesi ve hastalığın ilerlemesindeki rolünü hipoksiye cevap olarak pH'yı azaltarak sağlar. Bu da CA9'un gen ifade düzeylerinin klinik seyri tahmin etmek için uygun bir belirteç olabileceğini göstermektedir.

TSP-1, potansiyel bir anjiyogenez baskılayıcısıdır. Birçok anjiyogenik uyarıya karşın endotel hücre göçünü baskılayabilir, yeni damar oluşumunu önleyebilir ve endotel hücre apoptozunu etkinleştirebilir.

Çalışmamızda böbrek kanserli hastalardan alınan normal ve tümör dokularında anjiyogenezin etkinleşmesinde önemli role sahip olan HIF-1 α 'nın ve onun etkinleşmesi ile uyarılan CA9'un gen ifade düzeylerine Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR ile bakılmıştır. Aynı zamanda böbrek kanserinde damarlanmanın yoğun olması nedeniyle anjiyogenezi baskılayan etmenlerin etkisini kaybetmesi de beklendiğinden anjiyogenezin baskılanmasında görevli olan TSP-1'in gen ifade düzeyine de bakılarak bu varsayımın geçerliliği araştırılmıştır. TSP-1 geninin baskılanmasından sorumlu olarak promotör metillenmesi incelenmiştir. Ayrıca uygulanan bu yöntemlere ek olarak ilgili moleküllerin protein seviyeleri ölçülerek gen ifadeleri ile aralarındaki ilişki araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Tümörleri

Üriner sistemde çok çeşitli selim ve habis tümörler görülür. Böbrekte en sık görülen habis tümörlerden biri böbrek hücreli karsinomlar (BHK)'dır (1). Bunu Wilms tümörleri ile kaliks ve pelvislerin birincil tümörleri izlemektedir. Üriner yollarda tümör görülme sıklığı böbrek hücreli karsinomdan iki kat daha fazladır.

2.1.1. Böbrek Hücreli Karsinom (BHK)

BHK, genellikle böbrek kanseri terimi ile tanımlanan neoplazmdır. BHK, tübüler epitelden köken alan bir adenokarsinom olup böbrekte görülen tüm habis tümörlerin % 80-90'ını ve tüm solid tümörlerin yaklaşık %3'ünü oluşturur (1-4). BHK'lar prostat ve mesane kanserinden sonra üçüncü en sık gözlenen genitoüriner kanser olup ürolojik kanserler içerisinde en öldürücü olanıdır. Prostat ve mesane kanserli hastaların %20'si hastalıkları nedeniyle ölürken, BHK'li hastaların yaklaşık %40'ı bu hastalıktan ölür (5). Hastalığın görülme sıklığı 100.000 de 7,5' tur (1,2,6) . Tüm dünyada ve Avrupa'da BHK'da yıllık yaklaşık %2 oranında artış gözlenmektedir (7). Avrupada ve Amerikada her yıl yaklaşık 30.000 yeni hastaya böbrek kanseri tanısı konulmakta ve bunların yaklaşık 12.000 kadarı bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Görülme sıklığı Kuzey ülkelerinde daha fazla, Asya ülkelerinde ise daha azdır (7-11). Ayrıca böbrek kanserinin zencilerde görülme oranı daha yüksektir (1,2).

Böbrek kanseri genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkar ve 60-70'li yaşlarda en yüksek seviyelere ulaşır (5). Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre 1,5 kat fazladır. BHK çocuklukta ender görülür. Çocukluk yaşındaki tüm böbrek tümörlerinin ancak %2-6'sı BHK' dır. Küçük çocuklarda Wilms tümörü çok daha sık görülür. Çocuklarda ortalama görülme yaşı 8-9 olup, cinsiyet dağılımı erişkinlerden farklı olarak kız ve erkek çocuklarında aynıdır.

Ulusal Kanser Enstitüsü BHK olgularının çoğunun sporadik, % 4'ünün ise ailesel olduğunu belirlemiştir (5,12,13).

VHL (Von Hippel-Lindau) sendromlu hastaların %40'ında bilateral ve çoğunlukla da multiple BHK'lar gelişir ve 60 yaşlarında sıklığı %75'in üzerindedir. (14,15). VHL sendromuyla birlikte görülen tümörler primer olarak berrak hücreli tiptedir ve kromozom 3p'de lokalize VHL tümör baskılayıcı geninin mutasyonu ile ilişkilidir (16). VHL, otozomal dominant geçiş gösteren, tümör baskılayıcı gen kusurlarından kaynaklanan bir hastalıktır. VHL geni yazılımının düzenlenmesinden ve büyüme etmenlerinin sentezinden sorumlu pVHL proteinini kodlar (17).

Birt-Hogg-Dube ve Kalıtsal Leiomyomatöz genetik sendromları da BHK ile ilişkilendirilmişlerdir. Bu sendromlar hem böbrek kanserine, hem de deri hastalıklarına neden olur. Ayrıca tüberöz sklerozlu hastalar da yüksek kanser riskine sahiptir (1,2).

2.1.1.1. BHK'un Etiyolojisi

Günümüzde bilimsel olarak en çok kabul gören ve kısmen de kanıtlanan risk etmenleri, obezite, sigara kullanımı, son dönem böbrek yetmezliği ve diyaliz ile böbreğin edinsel kistik hastalıklarıdır. Ancak genel olarak risk etmenleri 3 grupta ele alınmaktadır (Tablo1). Sporadik formlarda etiyoloji kesin olarak bilinmemekle birlikte, en önemli risk etmenleri son dönem böbrek yetmezliğine eşlik eden diyaliz veya edinsel böbrek kisti, obezite ve sigara kullanımı olarak gösterilmektedir (5,18,19).

Tablo 2-1: Sporadik Böbrek Hücreli Karsinom İçin Risk Etmenleri

Yaşam Tarzı / Diyet	Çevresel Etmenler	Diğer Etmenler
Sigara ve Tütün	Kadmiyum	Uzun Dönem Diyaliz
Obezite	Klorlu Çözücüler	Hipertansiyon
Yağdan zengin gıda	Petrol-kimya ürünleri	Uzun dönem analjezik kullanımı
	Asbest	

Tablo 2-2: Sporadik Böbrek Hücreli Karsinomda Risk Etmenlerinin Genel Topluma Göre Risk Oranları

Risk Etmeni	Kanser Riskinde Artış
Son dönem böbrek yetmezliği ve diyaliz	32 kat
Son dönem böbrek yetmezliği ile birlikte edinsel kistik hastalık	> 100 kat
Obezite	3,6 kat
Sigara ve tütün kullanımı	2,3 kat
Hipertansiyon	1,4 kat
Kuru temizlemede çalışan işçiler	1,4 kat
Hipertansiyon olmaksızın diüretik kullananlar	1,3 kat
Trikloretilene maruz kalma	1 kat
Uzun dönem fenasetin kullanımı	1,1-6 kat
Polikistik böbrek hastalığı	0,8-2 kat
Kadmiyuma maruz kalma	1-3,9 kat
Arsenik maruziyeti	1,6 kat
Asbestozis	1,1-1,8 kat

Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda başta böbrek hücreli karsinom olmak üzere, birçok organda kanser görülme sıklığının arttığı artık bilinen bir gerçektir. Ayrıca son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda (özellikle diyaliz tedavisi görenlerde) edinsel böbrek kistik hastalığı görülme sıklığı da artmaktadır (5,19,20).

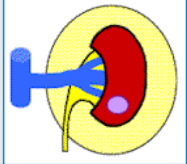
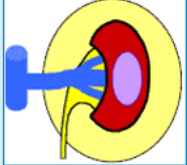
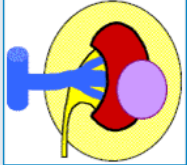
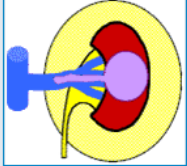
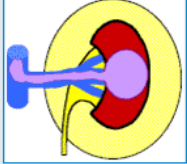
Uzun süre diyalize giren hastalarda kanseröz kistler oluşabilir. Ancak bunlar genellikle erken fark edilirler.

Sporadik BHK'ların önemli ikinci risk etmeni obezite olarak kabul edilmektedir. EAU (Avrupa Üroloji Birliği) 2006 kılavuzunda sporadik böbrek hücreli karsinom için en önemli risk etmeninin obezite olduğu bildirilmiş ve genel topluma göre bu tümörü arttırma riskinin 3,6 kat olduğu belirtilmiştir (21). Riski arttıran bir diğer etmen yüksek yağlı diyet (1,2). Böbrek hücreli karsinom riski BMI (vücut kitle indeksi) ile paralellik göstermektedir (9,22,10). Son yıllarda aşırı şişmanlık ile ilişkisi östrojen hormonları ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bazı östrojen muadillerinin hayvanlarda böbrek tümörlerine neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca böbrek hücreli karsinom ile hipertansiyon arasında da bir ilişki saptanmıştır (1,2,9). Obezitenin böbrek kanserine yol açma mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte, birkaç mekanizmanın böbrek kanserine neden olabileceği belirtilmektedir. Obezlerde insulin ve insulin benzeri büyüme etmeni-1 (IGF-1)'in artması ve bunların kanser uyarıcı moleküller olması, obezitenin hipertansiyon ve diyabete yol açması ve bu her iki hastalıkta da böbrek kanseri riskinin artması, ayrıca obezitenin östrojen düzeyini, glomerüler filtrasyon hızını ve renal plazma akımını artırması da olası mekanizmalar olarak düşünülmektedir (10,15,22).

Sigara kullanımı ve tütün çiğneme obeziteden sonra önemli ikinci risk etmeni olarak kabul edilmektedir. Sigarada bulunan yüzlerce karsinojen madde, diğer birçok organda değişik rölatif risk oranları ile kansere yol açtığı gibi, böbrek hücreli karsinomun gelişme riskini de 1,4-2,3 kat arttırmaktadır. BHK'lerin erkeklerde %30'una, kadınlarda ise %25'ine sigara sebep olmaktadır (23,24).

İçme suyunda yer alan arseniğin riski arttırdığı belirtilmektedir. Bunun dışında organik çözücüler, pestisidler ve mantar toksinleri gibi birçok çevresel kimyasal da BHK'dan sorumlu tutulmuş ancak ispatlanamamıştır (9).

2.1.1.2. BHK'un Evrelemesi

Primer Tümörün Evresi	ŞEMA	
T1		Böbreğe sınırlı, <2,5cm
T2		Böbreğe sınırlı, >2,5cm
T3a		Sürrenal veya periferik doku tutulumu
T3b veya T3c		Tümör böbrek venine ulaşmış
T4		Tümör gerota fasyası dışına çıkmış

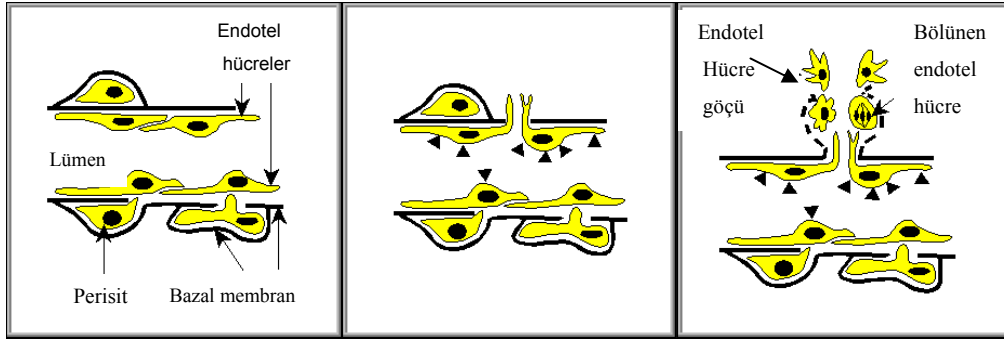
Şekil 2-1: Böbrek Hücreli Karsinomun Evreleri

2.1.1.3. BHK'un Sınıflandırması

Böbrek hücreli karsinomların %70-80 kadarı berrak hücreli, %10-15 kadarı papiller, %4-5 'i kromofobik, %3-7' si de onkositom tip olarak sınıflandırılmaktadır.

2.2. Tümör Anjiyogenezi

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, proanjiyogenik ve anti anjiyogenik etmenler tarafından kontrol edilir (25).



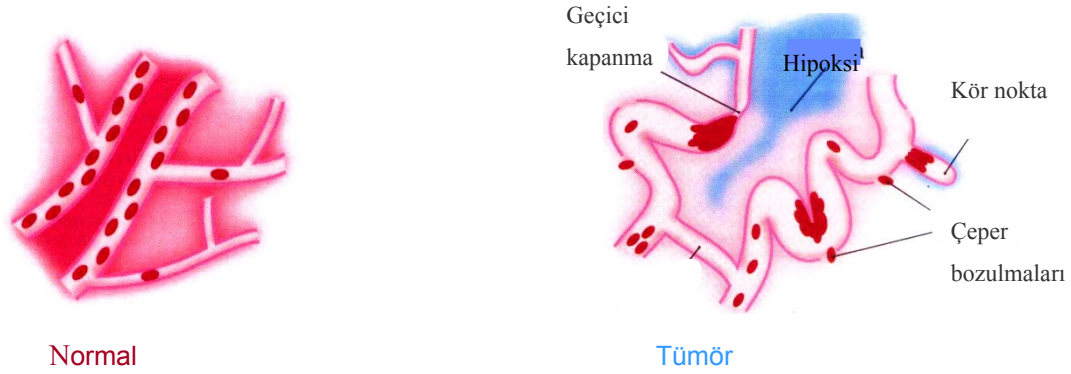
Şekil 2-2: Yeni Damar Oluşumu

Anjiyogenezin fizyolojik ve patolojik olmak üzere 2 çeşidi vardır. Fizyolojik anjiyogenez gelişmekte olan fetüste başlar ve doğum sonrasında, erişkin dokulardaki normal kan damarlarını oluşturacak biçimde devam eder. Fizyolojik anjiyogenez kendi kendini sınırlayan bir olay olmasına rağmen patolojik anjiyogenez uzun süre devam eder (26).

Fizyolojik anjiyogenezde kan damarları, düzenli, birbirinden yakın boşluklarla ayrılmış ve iyi düzenlenmiş bir dağılım gösterirler. Patolojik anjiyogenezde ise uyarılan yeni kan damarları (örneğin tümörler tarafından) son derece anormaldir, düzensiz dallanırlar ve belirli bir düzene uymazlar. Ayrıca yapısal ve işlevsel açıdan heterojen ve plazma proteinlerine ve plazmaya karşı genellikle yüksek derecede geçirgendirler. Yüzeylerinde pek çok büyüme etmen almaçları taşırlar (27,28) (Şekil 2-3).

Anjiyogenezin sıkı biçimde denetlendiği döllenmeden sonra plasentanın gelişmesi, yara iyileşmesi, menstruasyondan sonra uterus iç tabakasının yenilenmesi gibi fizyolojik durumlar dışında anjiyogenez organizmada oldukça sınırlıdır (29). Normal koşullarda anjiyogenez, endotel hücrelerinin çoğalmasını ve etkinleşmesini sağlayan pek çok büyüme etmeni ile, buna karşı gelen anti-anjiyogenik etmenler arasında oluşan bir denge ile düzenlenir (30). Bu etmenler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilemez. Bu olay özellikle tümörlerin yayılmasında önemlidir. Anjiyogenez ayrıca iskemik kardiyovasküler hastalıklar, retinopatiler, yara

iyileşmesi ve enflamasyon gibi pek çok önemli hastalık durumunu da önemli ölçüde etkiler (27,31).



Şekil 2-3: Normal ve Patolojik Anjiyogenez

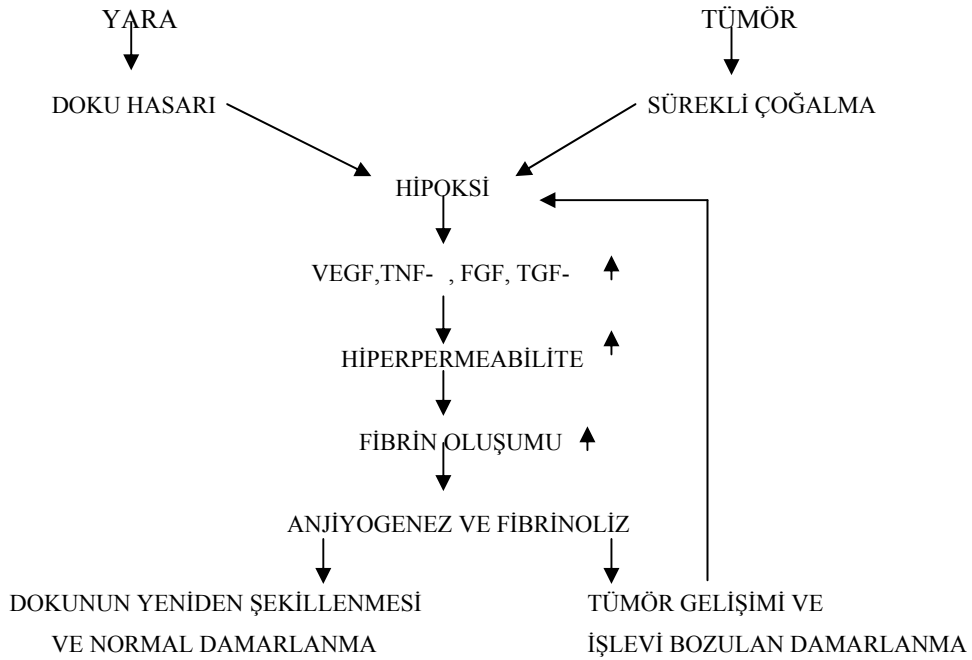
Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Hücre dışı matris ve matrisi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme etmeni, sitokinler ve bunların almaçları anjiyogenezde temel rol oynar (28,32-34).

Tablo 2-2: Anjiyogenezi Uyaran ve Engelleyen Etmenler

Anjiyogenezi Uyaran Etmenler	Anjiyogenezi Engelleyen Etmenler
VEGF (Vasküler endotelial büyüme etmeni)	Trombospondin- 1
PGF (Plasental büyüme etmeni)	Anjiostatin
FGF (Asidik, bazik fibroblast büyüme etmeni)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme etmeni-3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme etmeni-4)	Vasküler eldotelyal büyüme faktörü inhibitörü
TGF- α (Transforme edici büyüme etmeni- α)	Trombosit factor-4 parçacığı
TGF- β (Transforme edici büyüme etmeni- β)	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme etmeni)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme etmeni)	Proliferinle ilgili protein
TNF- α (Tümör nekroz etmeni- α)	İnterferon- α - β
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme etmeni)	Anjiopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran etmen)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (İnterlökin-8)	İnterferon ile indüklenebilen protein- 10
Anjiogenin	
Proliferin	

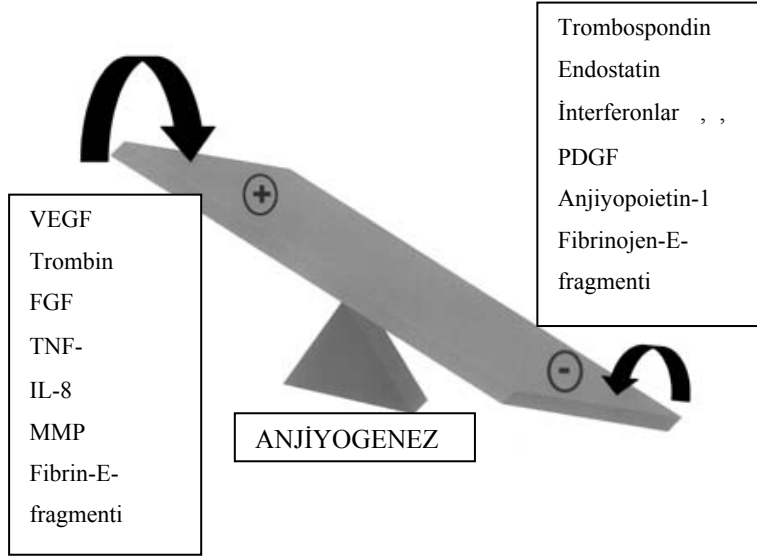
Tümörün büyüklüğü $0,5 \text{ mm}^3$ 'ün üstüne çıkınca tümörün beslenmesi yeni damarların oluşumuna bağlıdır. $0,5 \text{ mm}^3$ 'den daha küçük bir tümör, oksijen ve gıdayı difüzyon ile alabilir (32-34). Tümörün büyümesi sırasında ortamdaki oksijen miktarının azalması ve tümör hücrelerinin yeterli oksijen alamaması durumunda mikrodamarlar, tümöre besin, oksijen ve büyüme etmenleri sağlayabilmek için sayıca büyük oranda artış gösterirler. Henüz tam olarak belirlenememiş bazı uyaranlar, tümör hücrelerini, enflamasyonda rol alan hücreleri ve bağ dokusu hücrelerini uyarak anjiyogenezi başlatan moleküllerin (VEGF, FGF, TGF-beta, PDGF gibi) oluşumuna yol açar (35,36).

Şekil 2-4: Normal Doku Onarımı ve Tümörde Anjiyogenezin Ortak Yolları



Tümörlerde anjiyogenezin düzenlenmesi, fizyolojik anjiyogeneze göre farklılıklar göstermektedir. Uyaranlar ve engelleyiciler arasındaki dinamik denge bozulurken, bu dengenin bozulmasında tümör ve endotel hücreleri temel rol oynar. Anjiyogenik büyüme etmeni belirgin olarak aşırı ifade edilmedikçe, tümörün büyüemeyeceği gösterilmiştir. Anjiyogenezi uyarmak için yalnızca anjiyogenik etmenlerin artması yeterli olmayıp, tümörün anjiyogenik özellik kazanması için anjiyogeneze engelleyicilerinin de azalması gerekmektedir (35,36).

Tümör dokusunda yeni damar oluşumu, anjiyogenezi uyaran ve engelleyen etmenler arasındaki ince bir denge ile düzenlenir.



Şekil 2-5: Anjiyogenezin Etkinleşme ve Engellenmesi

2.2.1. Bazı Anjiyogenik Etmenlerin Özellikleri

2.2.1.1. Vasküler Endotel Büyüme Etmeni (VEGF)

Başlangıçta damar geçirgenliğini arttıran bir etmen olarak tanımlanan VEGF, endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik işlevini, sitokin sentezi ve salınımını, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ifade edilmesini ve düz kas hücre hiperplazisini düzenler. VEGF postnatal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retinada yeni damarlanma ve kalp-damar hastalıkları dahil olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumda önemlidir (37-42).

VEGF üretimi, tümörler tarafından yaygın şekilde ifade edilen EGF, TGF- ve , fibroblast büyüme etmeni (FGF) ve trombosit türevi büyüme etmeni (PDGF) gibi çeşitli önemli büyüme etmenleri tarafından düzenlenmektedir.

VEGF, birçok kanser türünde, anjiyogenezde rol oynayan en önemli etmenlerden biridir. VEGF mikrovasküler geçirgenliği artırır, endotel hücrelerin göçünü, bölünmesini ve anjiyogenezi uyarır. Gen ifadesini tekrar programlar ve endotel hücrelerinde apoptozu önler. Kanser tedavisinde önemli bir hedeftir. VEGF gen ifadesinin BHK damarlanması ile uyum gösterdiği bulunmuştur. VEGF geninin ifadesi BHK'lerin %70'inde artmaktadır. Ayrıca VEGF gen ifadesi ile tümör evresi arasında ilişki olduğu da belirlenmiştir (43).

Hipoksi, VEGF mRNA düzeylerinde hızlı ve güçlü bir artışı tetikler. Bu durum özellikle, tümörlerin nekrotik alanları etrafında daha belirgin bir şekilde görülür. Hipoksik hücrelerden salgılanan adenosin, adenosin A2 almaçlarına bağlanır ve c-AMP bağımlı protein kinaz (PKA) yolağı üzerinde VEGF'nin ifadesini artırır (44).

VHL geninin etkisizleştirilmesi, p53 mutasyonları ve ras'ın onkojenik mutasyonu ya da amplifikasyonu gibi çeşitli olaylar da VEGF'nin ifade edilmesini uyaramaktadır (45).

2.2.1.2. Epidermal Büyüme Etmeni (EGF)

EGF, polipeptid yapısında olup birçok dokuda bulunur ve trombosit degranülasyonu sırasında salınır. Epitel hücreler, endotel ve fibroblastlar için kemotaktiktir. Anjiyogenezi ve kollagenaz etkinliğini uyarır (46).

2.2.1.3. Fibroblast Büyüme Etmeni (FGF)

FGF, mezenkimal hücreler için bir mitojendir. Endotel hücre çoğalma ve hareketliliğini artırıp yeniden damarlanmayı hızlandırarak anjiyogenezde etkili olur. Ayrıca heparinin etkilerini güçlendirmek, kollajen sentezini uyararak, yaranın kontraksiyonunu ve epitellenmesini sağlamak ve fibronektin ve proteoglikan sentezini uyararak yapışmayı kolaylaştırmak gibi etkileri vardır (47).

2.2.1.4. Trombosit Kökenli Büyüme Etmeni (PDGF)

PDGF, trombositlerin alfa granülleri içinde bulunur. Tümörler, endotel hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF benzeri büyüme etmenleri salgılar. PDGF, makrofajların ve polimorf nüveli lökositlerin kemotaksisini uyarır. Fibroblastlarda ve düz kas hücrelerinde hem kemotaksisi, hem mitogenezi etkinleştirir. PDGF, kollajen ve fibronektin sentezini de uyarır; ayrıca kollajenaz etkinliğini de artırır (48).

2.2.1.5. Transforme Edici Büyüme Etmeni- β (TGF- β)

Trombositler, makrofajlar, lenfositler, kemik, böbrek gibi farklı dokulardan izole edilmiş olan TGF- β trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur, hasarlanan bölgeye degranülasyonla salınır. TGF- β düşük dozda anjiyogenik, yüksek dozda antianjiyogenik özellikler gösterir ve monositleri uyararak FGF, PDGF, TNF- α , IL-1 gibi büyüme etmenlerinin salgılanmasını sağlar. TGF- β makrofajlar için kemotaktik olup fibroblast kemotaksisi ve çoğalmasını uyarır, fibroblastlarda fibronektin ve proteoglikan sentezini uyararak yara kontraksiyonunda rol oynar. Ayrıca epitel hücrelerin çoğalmasını uyarır (49).

2.2.1.6. Tümör Nekroz Etmeni-Alfa (TNF)

TNF, kanser kaşeksisi ve endotoksik şokta yer alır. Ateş yükseltici özelliği vardır. TNF düşük dozda endotel hücre çoğalmasını ve tübül oluşumunu sağlarken, yüksek dozda zıt etki gösterir. Proenflamatuar özellikleri ile in vivo olarak yeni damarların oluşumuna yol açar (44).

2.2.2. BHK' da Anjiyogenez

BHK uzun yıllardan beri en çok damarlanma görülen kanserlerden birisi olarak bilinmektedir. BHK'da anjiyogenezi başlatan VEGF olduğu düşünülmektedir (50). BHK olgularının çoğunda tümör baskılayıcı VHL geninin etkinsizleşmesinden dolayı VEGF geninin ifadesi artmaktadır (5,51). VHL geninin etkinsizleşmesi ya da mutasyona uğraması, hipoksi, açlık ve diğer streslere karşı oluşan hücresel cevabın düzenlenmesinde rol oynayan HIF-1 α 'ın düzensiz ifade edilmesine yol açmaktadır. Bu

etmen hücre çoğalması, yeniden damarlanma ve hücre dışı matris oluşumunda görevlidir. HIF-1 α 'in etkinleşmesi sonucunda VEGF, BHK'a özgü tümöre bağlı antijen olan tümör büyüme etmeni (TGP), karbonik anhidraz-9 gibi hipoksi ile uyarılan genler etkinleşir (5,14,50,52).

BHK'da fibroblast büyüme etmeni (bFGF) düzeylerinde artış bildirilmiştir. Artış gösteren diğer etmenler, TGF- 1, anjiogenin, IL-8 ve hepatosit büyüme etmenidir (51).

2.2.2.1. Anjiyogenez Engelleyicileri İle Tedavi

Anjiyogenez bağımlılığı ve etkin sistemik tedavilerin yokluğu BHK için bazı antianjiyogenik yaklaşımları gündeme getirmiştir (53-55).

Antianjiyogenik ilaçların kimyasal tedavi ve ışın tedavisi ile biraraya getirilerek yapıldığı tedavi çalışmalarında ilerlemeler sağlanmıştır. Anjiyogenez engelleyicileri, farklı mekanizmalar ile etki göstermektedir (56). Matris yıkılımının engellenmesi, anjiyogenez etkinleştiricilerinin engellenmesi veya endotel hücrelerinin doğrudan engellenmesi gibi etkiler gözlenebilir. Tek bir anjiyogenez baskılayıcısı ile yapılan tedavilerin kanser hücreleri tarafından oluşturulan çok sayıdaki anjiyogenik etmen ile mücadelede yetersiz kalabileceği düşünülmektedir. Tümör tedavisinde anjiyogenez baskılayıcılarının ve diğer klasik ajanların birlikte kullanılması daha da etkili olabilir. Anjiyogenez engelleyicilerinin, kemoterapi ile birleştirilmesi daha etkili sonuçlar vermiştir. Kemoterapi ile tümör kitlesi küçültülüp antianjiyogenik ajanlarla tümörün durağan kalması sağlanabilir. Bu nedenle gelecek yıllarda anjiyogenezin moleküler temellerinin daha iyi belirlenmesi yeni tedavi modellerinin geliştirilmesi açısından önemli olabilecektir. Çok daha önemli bir konu anjiyogenik yanıtın bireyler arasında farklı olabileceğinin de düşünülmesidir (42).

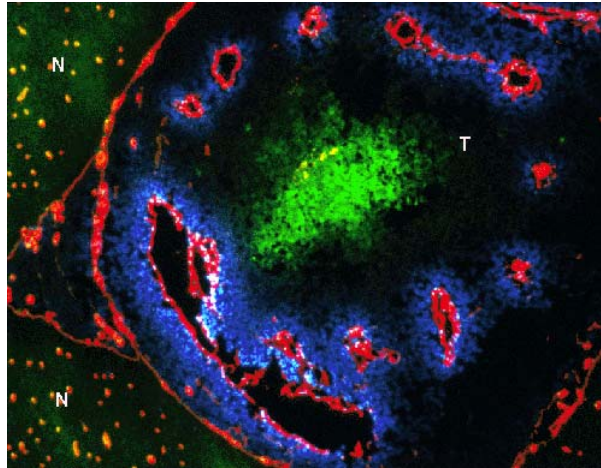
Tümörlerin içindeki damarlanma, endotel büyüme etmeni almaçlarının sahte ligandlar, protein kinaz engelleyicileri veya monoklonal antikorlar ile durdurulmasıyla engellenebilmektedir. Bundan dolayı özellikle berrak hücreli BHK'de VEGF ve VEGF almacı (VEGFR) gibi etkenler ilaç tedavisi için ilginç hedeflerdir. İleri evre BHK'li hastalarda VEGF, VEGFR, CA9, EGFR, PDGFR, bFGF, TSP-1, Endotelin-1 almacı ve m-TOR'u hedef alarak hazırlanan ilaçlar güncel tedavi stratejilerinde kullanılmaktadır (57).

2.3. Hipoksi İle İndüklenen Etmen-1 (HIF-1)

Ortamda yeterli oksijen bulunamadığı durum olarak tanımlanan hipoksi, aralarında kanserin de bulunduğu pek çok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar (58). Bir tümörün oksijen alımının, tümörün agresifliği veya metastaz yeteneği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Oksijenin eksik olması durumunda, kanser hücrelerinin anjiyogenik proteinler salarak hipoksiye uyum sağladığı ve yayılmasının kolaylaştığı gözlenmiştir.

Hipoksik tümörler daha agresif ve tedaviye dirençlidir. Hipoksinin kötü prognoz ile ilgili olduğu ve hipoksi ile etkinleşen moleküler yolların (anjiyogenez, anaerobik metabolizma veya apoptozun inhibisyonu) Radyoterapi (RT) ve Kemoterapi (KT)'ye direnç oluşturduğu, aynı zamanda kanser hücrelerinin göç etme ve metastazla sonuçlanan farklı organlarda yaşama yeteneklerini de arttırdığı belirlenmiştir (59).

Radyoterapi sırasında serbest radikallerin sabitlenmesi ve maksimum hücre ölümü için ortamda moleküler oksijen bulunmalıdır. Tümörde kan damarlarından uzakta kalan bölgeler aşırı derecede hipoksik olduğundan ışınlama bu bölgeler için küçük bir etkiye sahiptir.

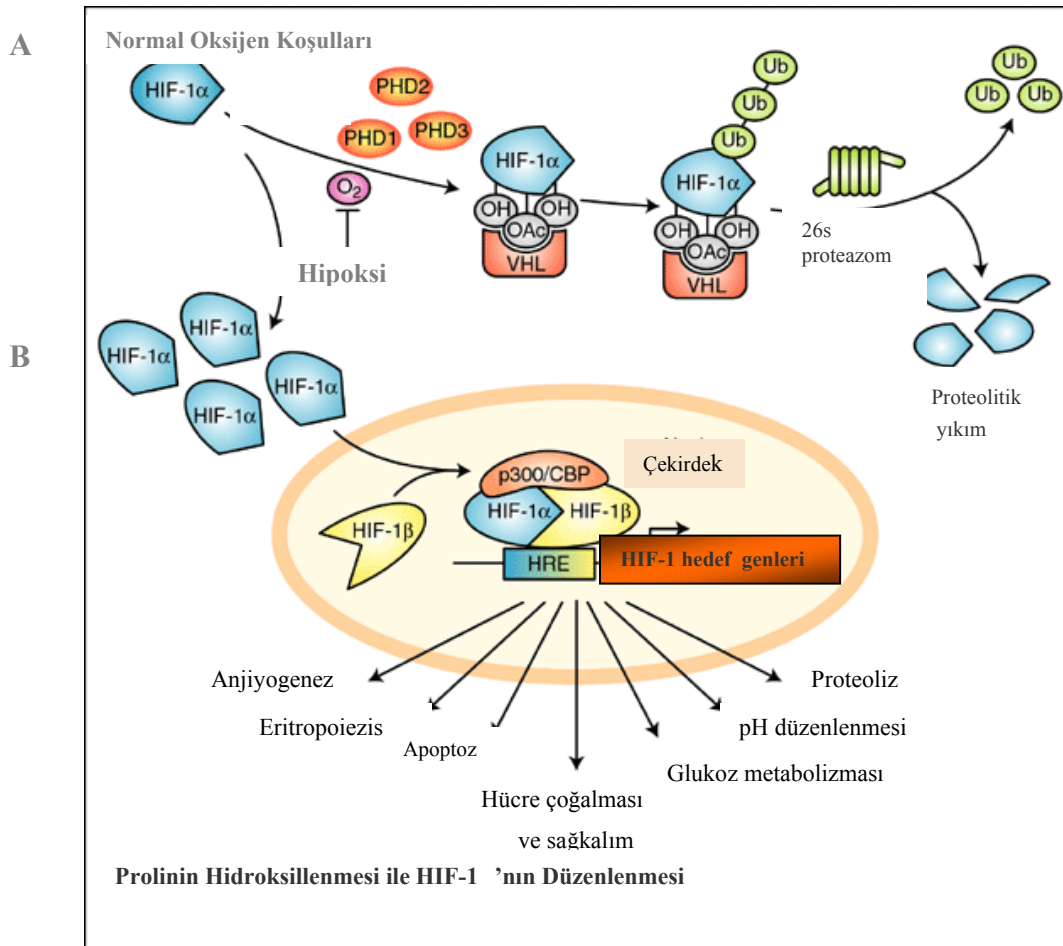


Şekil 2-6: Tümör Dokusunda ve Normal Dokuda Hipoksi

T: Tümör dokusu, **N:** Normal doku. Yeşil renkli alan hipoksik kısmı belirlemektedir.

Hipoksi, HIF-1 α yazılım etmeni tarafından denetlenir (55). Düşük oksijen basıncı (hipoksi), HIF-1 α düzeylerini ve ayrıca HIF-1 α 'nın DNA'ya bağlanma kapasitesini de arttırır. Hipoksik koşullarda HIF-1 α , hipoksiye hücrel cevap için gerekli olan hedef genlerin yazılımını etkinleştirir (60).

Normal koşullarda tümör baskılayıcı VHL geni, HIF-1 α ve -2 α etmenlerinin ubikütün aracılı yıkımını düzenler. Oksijen miktarı normal olduğunda HIF-1 α 'nın prolin kalıntısı oksijen bağımlı prolin 4-hidroksilazlar (PHD) tarafından hidroksillenir. Bu olay pVHL'ye bağımlı ubikütinleşmeye yol açar ve HIF-1 α 'nın hızlı proteazomal yıkımı gerçekleşir (61). Hidroksillenmemiş HIF-1 α 'lar ise VHL'ye bağlanamaz ve hücrede birikir (53,61-68) (Şekil 2-7).

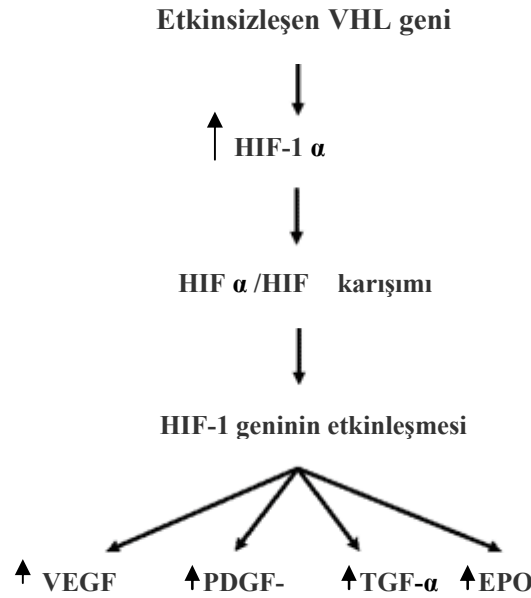


Şekil 2-7: HIF' in Düzenlenmesi ve Etkinliğinin Şematik Gösterimi

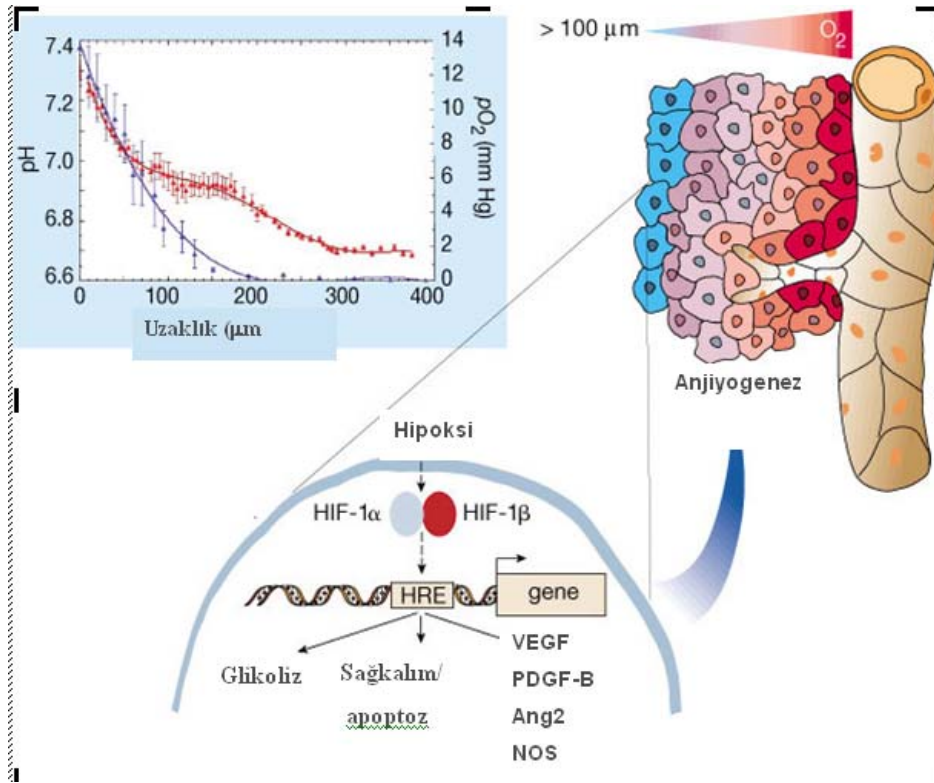
A: HIF'in normal oksijen içeren ortamda VHL aracılı yıkımı. **B:** Hipoksik ortamda HIF-1 ve HIF-1 (ARNT) altbirimlerinin birleşerek kalımlılık kazanması ve hücrede etkiledikleri mekanizmalar.

HIF-1 α altbirimleri oksijen düzeyi normal olan hücrelerde bulunmaz, ancak, hipoksik koşullarda HIF'nın α ve β altbirimleri birleşerek hipoksiye karşı hücresel cevap için gerekli olan hedef genlerin yazılımını uyarır. HIF-1 α birçok anjiyogenik etmeni etkinleştirerek damar oluşumuna yol açar ve oksijen düzeyini yükseltir (69). Bir yazılım etmeni olan HIF-1 α hipoksik koşullarda anjiyogenez, glukoz taşınması ve anaerobik metabolizma ile ilgili genlerin ifade edilmesini uyarak damarlanmanın yoğun olduğu doku hücrelerinde hayati bir rol oynar (70). HIF1 α 'nın engellenmesi yalnız tümör anjiyogenezine değil, aynı zamanda glikolitik metabolizmaya ve tümör hücre büyümesine de müdahale anlamına gelir (64).

VHL mutasyonu taşıyan tüm böbrek tümörlerinde HIF-1 α 'nın ubiquitinlenmesi kusurludur. VHL etkisizleştiğinden dolayı HIF-1 α 'nın yıkımı durur. Bunun sonucunda hücrede HIF birikimi olur (61-68).

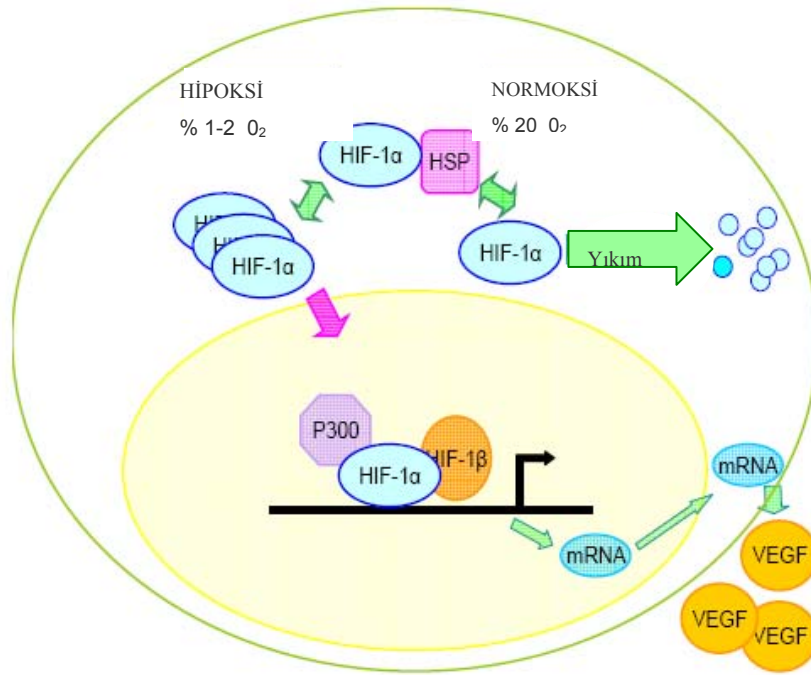


Şekil 2-8: VHL ve HIF-1 İlişkisi



Şekil 2-9: Dokuda O₂ , HIF-1 ve Anjiyogenez

Hipoksik koşullarda artan HIF-1 α etkinliği nedeniyle VEGF, PDGF, bFGF, eritropoetin ve TGF- α gibi büyüme etmenleri salgılanır (71). Salgılanan VEGF ve PDGF kendilerine ait özel almaçlara bağlanır ve bu da hücre içinde tirozin kinaz (TK) almaçlarının uyarılması ile sonuçlanır. TK almaçlarının uyarılması endotel hücre çoğalması, hücre sağ kalımının artması, anjiyogenezde artış ve tipik yoğun damarlı BHK histolojisi ile sonuçlanır (57).



Şekil 2-10: HIF-1α'nın VEGF Üzerine Etkisi

HIF-1α aracılı gen ifadesi doğrudan veya dolaylı olarak PTEN, p53, p16, p14 ve EGFR' nin de dahil olduğu onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki değişimleri de düzenler. Genetik değişimlerin aynı zamanda HIF-1α dan bağımsız trombospodin-1 (TSP-1) gibi anti-anjiyogenik etmenlerin ifadesini de etkilediği düşünülmektedir (60).

HIF-1α birikimi ayrıca birçok zar proteininin de etkinleşmesine yol açar. Bunlardan bir tanesi G250 zar proteini olarak da adlandırılan bir karbonik anhidraz (CA9) izoenzimidir (72).

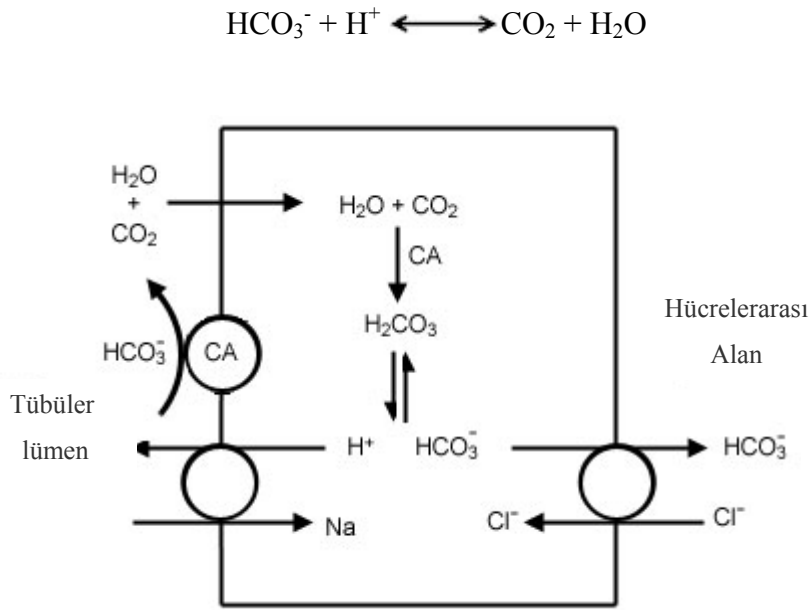
2.4. Karbonik Anhidraz 9 (CA9)

Böbrek Hücreli Karsinomda tümörün immun özellikleri PRAME, RAGE-1, gp75 ve CA9 gibi birçok tümörle ilişkili antijen (TAA) tarafından belirlenir.

CA9, şimdiye kadar böbrek kanserleri için tanımlanmış en önemli tümör ilişkili antijendir. G250 veya MN olarak da adlandırılan CA9, berrak hücreli böbrek kanseri olgularında potansiyel bir belirteç gibi görülmektedir (73).

CA9 düşük oksijen varlığında HIF-1α aracılığıyla hızla ve aşırı derecede ifade edilen, tümör hücre hipoksisi ile ilgili en iyi bilinen genlerden biridir. CA9 proteini,

zargeçen bir hücre yüzey glikoproteinidir. Bu protein tümör büyümesi ve hastalığın ilerlemesi sırasında etkisini hipoksiye cevap olarak pH'yı azaltarak gösterir (74). CA9'un enzimatik etkinliği karbondioksidin karbonik aside dönüşmesini sağlayarak, tümörün çevresinde asidik ortamı artırır (58,59).

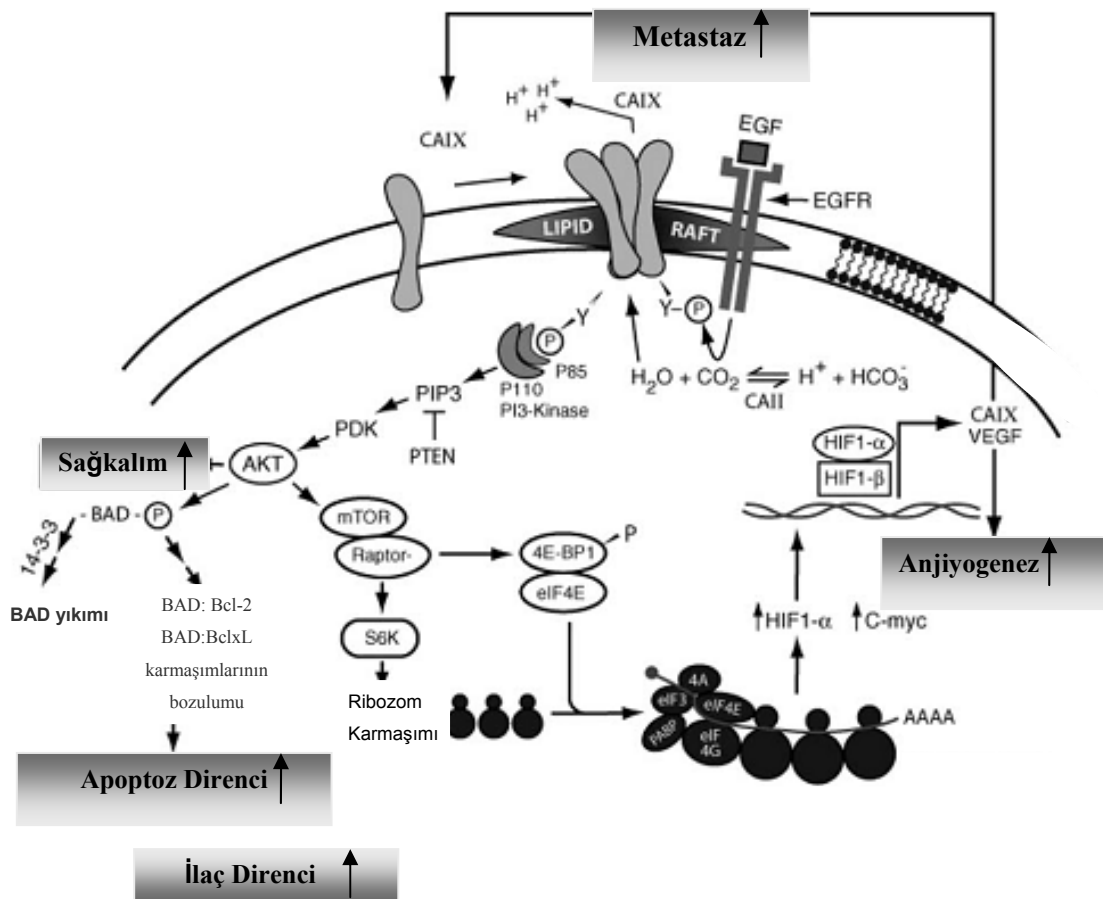


Şekil 2-11: Karbonik Anhidraz Aracıyla HCO_3^- ün CO_2 'e Dönüşümü

Böbrek hücreli karsinomların çoğunda tümör baskılayıcı VHL geninde işlev kaybı görülür. VHL'nin etkinsizleşmesinden dolayı HIF-1 α yıkımı engelleneceğinden HIF-1 α 'nın ifadesi artar (61). Bu da HIF-1 α ile düzenlenen CA9 gibi pro-anjiyogenik hedef genlerin yazılımının artmasına neden olur (75). Hipoksi aracılı bu yolda VEGF, PTEN gibi moleküler proteinler de görev alır. CA9, CA12 ve PTEN, hipoksi yolunun kritik elemanlarıdır ve tümörlerin oksijenden yoksun ortama uyumunu sağlarlar. CA9 geninin aşırı ifadesi, VHL mutasyonlarının doğrudan bir sonucudur (76,77). BHK'lı olgularda normal VHL geninin ürünü olan proteinin verilmesinin CA9 gen ifadesini baskıladığı gözlenmiştir (59).

CA9 geni insan tümörlerinin birçoğunda ifade edilirken, normal dokularda genellikle ifade edilmez (78). Solid tümörlerde özellikle berrak hücreli böbrek karsinomu, serviks, over, kolon, baş-boyun, mesane ve küçük hücre dışı akciğer karsinomlarında CA9'un aşırı ifade edildiği görülmüştür (78,79).

CA9'un hücrenin iç bölgesinde bulunan tirozin birimi EGF bağımlı yolda fosforillenir (59). Fosforillenmiş CA9'un, PI-3-kinazın düzenleyici altbirimi ile ilişki kurarak Akt etkinleşmesine katkı sağladığı düşünülmektedir. Bu da BHK'un ilerlemesine ve kötü prognoza katkıda bulunabilir.



Şekil 2-12: CA9'un BHK daki Olası Etki Mekanizması

CA9 hücre dışı ortamın asitleşmesine katkı sağlaması nedeniyle katepsin B ve matris metalloproteinaz 9 gibi hücre yüzey proteazlarının etkinleşmesine destek olur ve büyüme etmenleri serbest kalır.

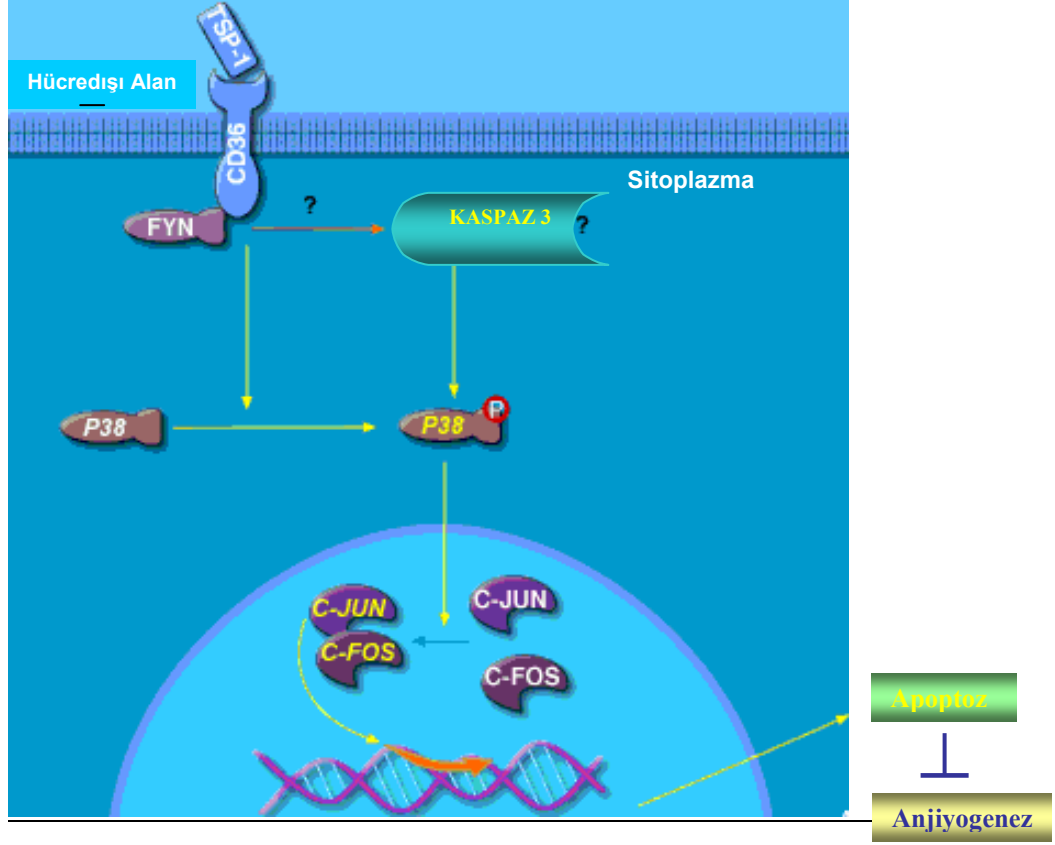
Hipoksi ile düzenlenen genlerin ifadesinin tümörün agresifliğini etkilediğine dair artan kanıtlar mevcuttur (58,78). Çalışmalar CA9 ifadesinin kötü prognozla ilişkili ve anjiyogenezden bağımsız olarak anlamlı bir prognostik etmen olduğunu göstermektedir (59,80).

Hem hipoksi, hem de asidik pH agresif tümör davranışı ve kanserin RT ve KT'ye direnci ile ilgilidir. Bu nedenle CA9 hipoksi belirteci olmasının yanında tedavi için de çarpıcı bir hedeftir. CA9'un ifade düzeyi, hipoksiye yönelik tedavilerden ya da indirgeyici ilaçlardan fayda görecektir hastaları belirlemek amacıyla kullanılabilmektedir (78).

2.5. Trombospondin-1 (TSP-1)

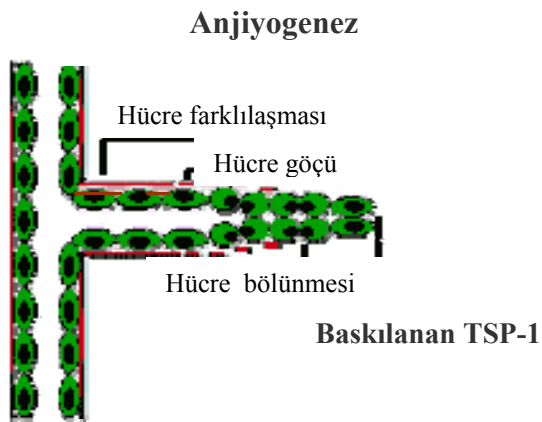
Pro ve antianjiyogenik etmenler tarafından düzenlenen tümör anjiyogenezi tümörün büyümesi ve metastaz için önemli bir gereksinimdir. 450 kDa ağırlığında matris bağımlı bir glikoprotein olan TSP-1, yapısal özellikleri aynı olan, çok işlevli, 5 üyeden oluşan bir ailenin üyesidir (81,82). Trombospondinler kalsiyum bağlayan hücre dışı glikoproteinlerdir. TSP-1, anjiyogenik uyarıların değişik türlerine cevap olarak endotel hücrelerde hücre göçünü durdurma, apoptozu uyarma ve yeni damar oluşumunu önleme yeteneğine sahip potansiyel bir anjiyogenez baskılayıcısıdır. TSP-1 kanser hücrelerinde, endotel hücre çoğalmasında, hücre hareketini ve metastazı baskılayıcı role sahiptir (83-84).

Transforme hücreler ve tümör hücre soylarında TSP-1 geni genellikle çok düşük düzeyde ifade edilir. Bu hücre soylarında TSP-1'in ifadesi arttığında tümörögenезin baskılandığı gözlenmiştir. Artan TSP-1 gen ifadesi damarlanmanın da azalmasına neden olur. TSP-1 ayrıca endotel hücrelerinde bulunan CD36 almaçlarına bağlanabilir ve apoptotik yolları da etkinleştirebilir (45) (Şekil 2-15). p53, anjiyogenezin temel engelleyicisi olan ve hücre dışı matrisin normal bileşiminde yer alan TSP-1'i uyarır. Buna karşılık mutant p53 bunu yapamaz (85).



Şekil 2-13: TSP-1 İle Anjiyogenezin Baskılanması (86)

Doku oksijen seviyesindeki azalma sonucunda CA9 gibi hücrenin hipoksiye uyumunda gerekli genlerin uyarıldığı TSP-1'in ise engellendiği görülmüştür. Bunun sonucunda da yeni damar oluşumları gözlenmiştir (87) (Şekil 2-16).



Şekil 2-14: TSP-1'nin Baskılanması ile Yeni Damar Oluşumu

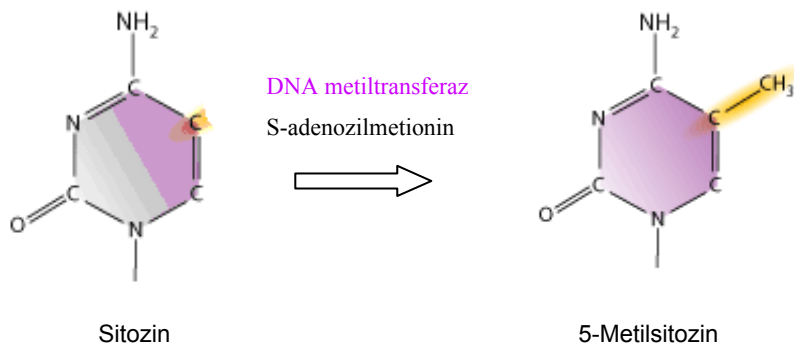
TSP-1'in bir çok çalışmada tümör baskılayıcı özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Farklılaşmamış ileri evre tümörlerde TSP-1 sessiz iken, lokalize tümörlerde bu genin ifade edildiği görülmüştür (82).

TSP-1'in düzenlenmesinde DNA metillenmesindeki değişimlerin rol oynadığı, genin ifadesinin promotör bölgesinde meydana gelen metillenmeyle engellendiği bildirilmiştir (83,84). Metillenme ortadan kaldırıldığında genin yeniden ifade edilerek tümörün baskılanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (83,84,88).

2.6. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar, DNA dizisinde bir değişme olmaksızın, genlerin işlevini düzenleyen kalıtsal değişimlerdir. Epigenetik değişimler genlerin sessizleşmesine neden olur. Bu olay geni sessizleştiren mutasyon veya delesyon gibi genetik mekanizmalara eşdeğerdir ve kanser oluşumunda bunlar kadar etkilidir. Ancak epigenetik değişimler geri dönüşümlü oluşları ve DNA'nın baz dizisinde bir değişime neden olmamaları gibi özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılırlar (89).

Metillenme, en önemli epigenetik değişikliklerden biridir. DNA metillenmesi, insanlarda ve pek çok memelide bilinen tek doğal DNA modifikasyonudur ve yalnızca Guanozin (G)'den önce yer alan Sitozin (C) bazlarını etkiler. Böylelikle, DNA metillenmesi yalnızca CpG alanlarında gözlenir (Şekil 2-17).

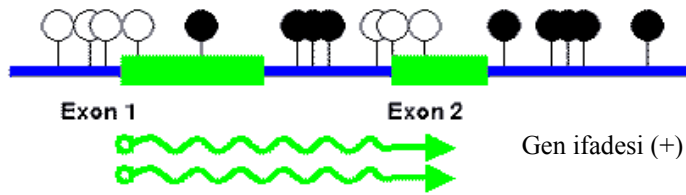


Şekil 2-15: DNA Metillenmesi (90)

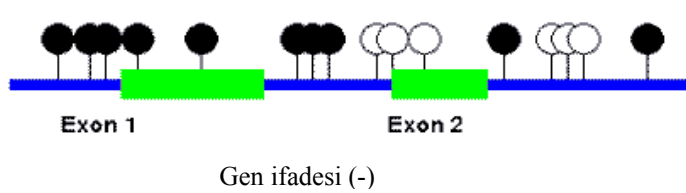
Sitozin bazına (C) DNA Metil transferaz aracılığıyla metil (M) grubunun eklenmesi

Bir DNA dizisinde herhangi bir ikili nükleotidin bulunma olasılığı 1/16 ya da ~ %6 iken insanlarda CpG ikili nükleotidi tüm genomun % 1'lik kısmını oluşturur. Bu alanlara CpG adacıkları denilmektedir (CpG yoğunluğunun fazla olduğu yerler). CpG adacıklarının öncelikli olarak, ifade edilen genlerin 5' bölgesinde bulundukları gözlenmiştir. İnsanda promotörlerin % 60'ından fazlası CpG adacıkları içerir. CpG alanlarının %70-80'i metillenmiştir. Bu düzenleyici bölgelerdeki CpG ikili nükleotidlerdeki somatik metillenme yazılım etkinliğini düzenler. Diğer bir deyişle, DNA'nın metillenmesi genlerin etkin olup olmamasını düzenleyebilir. Promotörle ilişkili CpG adacıklarında ilgili genin yazılabilmesi için metillenme olmaması gerekmektedir (91-93).

A. Normal hücre



B. Kanserli hücre



○ Metillenmemiş CpG adası
● Metillenmiş CpG adası

Şekil 2-16: Normal ve Kanser Hücresinde Metillenme Durumu (94)

A ve B'de promotör bölgedeki metillenmenin gen ifadesi üzerine etkisi görülmektedir. A'da gen ifadesi olurken B'de ise metillenmiş promotör bölge nedeniyle gen ifade edilemez.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Çalışmamızda Şubat 2006 ve Mart 2008 tarihleri arasında İ.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na böbrek kanseri tanısı ile başvuran, ameliyatına karar verilmiş hastalardan elde edilen tümör ve normal dokular kullanılmıştır. Dokuların saklanması ve deney aşamaları İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Hastalardan ameliyat sırasında alınan tümör ve normal doku örnekleri buz içinde bölümümüze nakledilerek -80⁰C de saklanmıştır. Ortalama yaşları 61,6 (11,5) olan böbrek kanserli 60 hastanın tümör ve normal dokularında HIF-1 α , CA9 ve TSP-1 genlerinin gen ifade düzeyleri ve protein miktarı nicel olarak tayin edilmiştir. Ayrıca TSP-1 geninin promotör metillenme durumu da incelenmiştir. Çalışma İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul'unun 07.03.2006 tarih ve T-845/02062006 sayılı kararı ile uygun görülmüştür.

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Agaroz (Sigma, Almanya), Benzamidine(Sigma, Almanya), Bromfenol Mavisı (BFB) (Ambresco, ABD), Borik Asit (Applichem, Almanya) , Deoksiribonükleotitfosfatlar dNTP'ler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas, Litvanya), DTT (Dithiothreitol)(Sigma, Almanya), Etilen-diamin-tetraasetikasit (EDTA) (Sigma, Almanya), Etidyum Bromür (EtBr) (Merck, Almanya), Etanol (Riedel De Haen, Almanya), HEPES (2-Hidroksietilpiperazine 2-etansulfonikasit) (Sigma, Almanya), İzopropanol (Merck, Almanya), Magnezyum klorür (MgCl₂) (25mM) (Fermentas, Litvanya), PMSF (Fenilmetilsülfonilflorid) (Sigma, Almanya), Primerler (IDT, ABD), Problar (TIB MOLBIOL, ABD), Taq Polimeraz (Fermentas, Litvanya) , 10XPCR Tamponu [100mM Tris-HCl (pH:8,8, 25 C), 500mM KCl, %0,8 Nonidet P40], Tris (Applichem, Almanya), Tripsin inhibitörü (Sigma, Almanya) .

- MagNA Lyser Green Beads (Roche, Almanya).

- Lightcycler Kapillerleri (Roche, Almanya).

- **cDNA Sentez Kiti** - Ters Transkriptaz Tepkime Tamponu 5X, RNaz inhibitör 40U/ L, Deoksinükleotid karışımı-herbiri 10mM, Ters Transkriptaz enzimi 20U/ L, Random hexamer primerler 600pmol/ L (Fermentas, Litvanya).

- **SV Total RNA İzolasyon Sistemi** - Nükleazsız su, RNA Parçalama Tamponu, RNA Sulandırma Tamponu, MnCl₂, 0,9M, Yellow Core Tamponu, DNaz I, RNA Yıkama Tamponu , Spin Kolon , Elüsyon tüpleri, DNase Durdurma Tamponu, -merkapto etanol (Promega, ABD).

- **Human-G6PDH Housekeeping Gen Set** - h-G6PDH Tespit Karışımı-10X, MgCl₂-25mM, h-G6PDH Standart1,2,3,4,5 (Roche, Almanya).

- **Fast Start DNA Master Hibridizasyon Prob Kiti** - Light Cycler Fast Start Enzim, Light Cycler Fast Start Reaksiyon Karışımı HybProb, MgCl₂-25mM (Roche, Almanya).

- **Light Cycler Fast Start DNA Master Syber Green I Kit** - LC Fast Start Enzim, LC Fast Start Reaksiyon Karışımı, SYBR Green I-10X, MgCl₂-25mM (Roche, Almanya).

- **Wizard Genomik DNA Saflaştırma Kiti** - Parçalama Tamponu, RNaz Tamponu, Protein Çöktürme Tamponu, DNA Sulandırma Tamponu (Promega, ABD).

- **EZ DNA Metilasyon-Gold TM Kit** - CT Dönüşüm Solüsyonu, M-Sulandırma Tamponu, M-Çözücü Tamponu, M-Bağlanma Tamponu, M-Yıkama Tamponu, M-Kükürtsüzleştirme Tamponu, M- Elüsyon Tamponu, Zymo-Spin IC kolonları, Toplama Tüpleri (Zymo Research, ABD).

- **İnsan Karbonik Anhidraz IX İmmunoassay** - Karbonik Anhidraz IX Mikroplate, Karbonik Anhidraz IX Konjugat , Karbonik Anhidraz IX Standart, Örnek Çözücü RD1-21, Kalibratör Çözücü RD6-12, Yıkama Tamponu, Renk Tamponu A, Renk Tamponu B, Durdurma Tamponu (Quantikine -R&D Systems, ABD).

-İnsan Trombospondin-1 Immunoassay - Trombospondin-1 Mikroplate, Trombospondin-1 Konjugat , Trombospondin-1 Standart, Örnek Çözücü RD1-56, Kalibratör Çözücü RD5-33, Yıkama Tamponu, Renk Tamponu A, Renk Tamponu B, Durdurma Tamponu (Quantikine- R&D Systems, ABD).

- SurveyorTM IC (Intracellular) İnsan/ Fare Total HIF-1 α - Total HIF-1 α Mikroplate, Total HIF-1 α Standart, Total HIF-1 α Tespit Antikoru, Parçalama Tamponu, Çözücü Tampon 2(10x), Yıkama Tamponu (25X), Renk Tamponu A, Renk Tamponu B, Streptavidin-HRP, Durdurma Tamponu (R&D Systems, ABD).

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Bidistile Su Cihazı (Labconco, ABD)
- Çalkalayıcı (Edmund Bühler, Almanya)
- Derin Dondurucu (-20⁰C) (Ariston)
- Derin Dondurucu (-80⁰C) (Nuaire, ABD)
- Etüv 56⁰C (Elektromag, Türkiye)
- Etüv 37⁰C (Heraeus, Almanya)
- Güç Kaynağı - Power Pack P25 (Biometra, Almanya)
- Homojenizatör-MagNA Lyser (Roche, Almanya)
- Jel Dökümentasyon Sistemi (Vilber Lourmat, Fransa)(Bio-Profil 1D Software)
- Lightcycler Real Time PCR cihazı 1.2 (Roche, Almanya)
- Manyetik Karıştırıcı (Snijders, Hollanda)
- Mikropipetler (Gilson, ABD)
- Soğutmalı Santrifüj- Mikro 200R (Hettich , Almanya)
- Spektrofotometre (ND-1000 , ABD)
- Spektrofotometre (Rayto, Çin)
- Su Banyosu (Köttermann, Almanya)
- TermalCycler - Progene (Techne, İngiltere)
- TermalCycler - Touchgene (Techne, İngiltere)
- Vortex (Snijders, Hollanda)
- Yatay Elektroforez Tankı - HORIZON11.14 (BRL, ABD)

3.1.3. Tampon ve Çözeltiler

3.1.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi Tamponları

10X TEB (Tris-Borat Tamponu) :	: 0,88 M Borik Asit
	5 M Tris bazı
	0,02M EDTA (pH:8,0)
Etidyum Bromür :	: 10 mg / ml

3.1.3.2. Jel Yükleme Tamponları

10X Yükleme Tamponu (2ml)	: % 1 SDS
	5mg BFB
	2ml Gliserol

3.1.3.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

DNA Sulandırma Tamponu	: 10mM Tris-HCl (pH: 7,4)
	1mM EDTA (pH: 8,0)
RNaz A	: 4mg/ml

3.1.3.4. RNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

SV Parçalama Tamponu	: 4M Guanidinyumizotiyosiyanat
	0,01M Tris (pH: 7,5)
	%0,97 Merkaptoetanol
SV Yıkama Tamponu	: 162,8 mM Potasyumasetat
	27,1 mM Tris-HCl (pH: 7,5)
SV DNaz Durdurucu Tamponu	: 5M Guanidiniumizotiosiyanat
	10mM Tris-HCl (pH: 7,5)
DNaz I Karışımı	: 0,0225 Tris
	0,0025 % sarı renkli boya
	0,09M MnCl ₂
	5 L DNaz I

3.1.3.5. cDNA Sentezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Ters Transkriptaz Tepkime Tamponu-5X	: 250mM Tris-HCl
	150mM KCl
	40mM MgCl ₂
RNaz inhibitör	40U/ L
Deoksinükleotid karışımı-herbiri	10mM
Ters Transkriptaz enzimi	20U/ L
Random hexamer primerler	600pmol/ L

3.1.3.6. DNA Uzunluk Belirtecinin Parça Boyutu

100bp DNA Uzunluk Belirteci : 1.200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500,
400, 300, 200, 100 bç

3.1.3.7. Polimeraz Zincir Tepkimesinde Kullanılan Tampon

10X PCR Tamponu : 20mM Tris-HCl (pH: 8,0)
100mM KCl
0,1mM EDTA
1mM DTT
%0,5 Tween20
%0,5 Nonidet P-40
%50 Gliserol

3.1.3.8. Gerçek Zamanlı PCR da Kullanılan Tampon

Light Cycler FastStart Tepkime Karışımı : DNA Master HybProb 10X
FastStart Taq DNA Polimeraz
Reaksiyon tampon dNTP karışımı
MgCl₂ 10mM

3.1.3.9. ELISA Öncesi Doku Parçalama Tamponu (HEPES Tamponu)

20mM HEPES, PH 7,4

1,5 mM EDTA

0,5 mM PMSF

0,5 mM Benzamidine

10 g/ml Tripsin inhibitörü

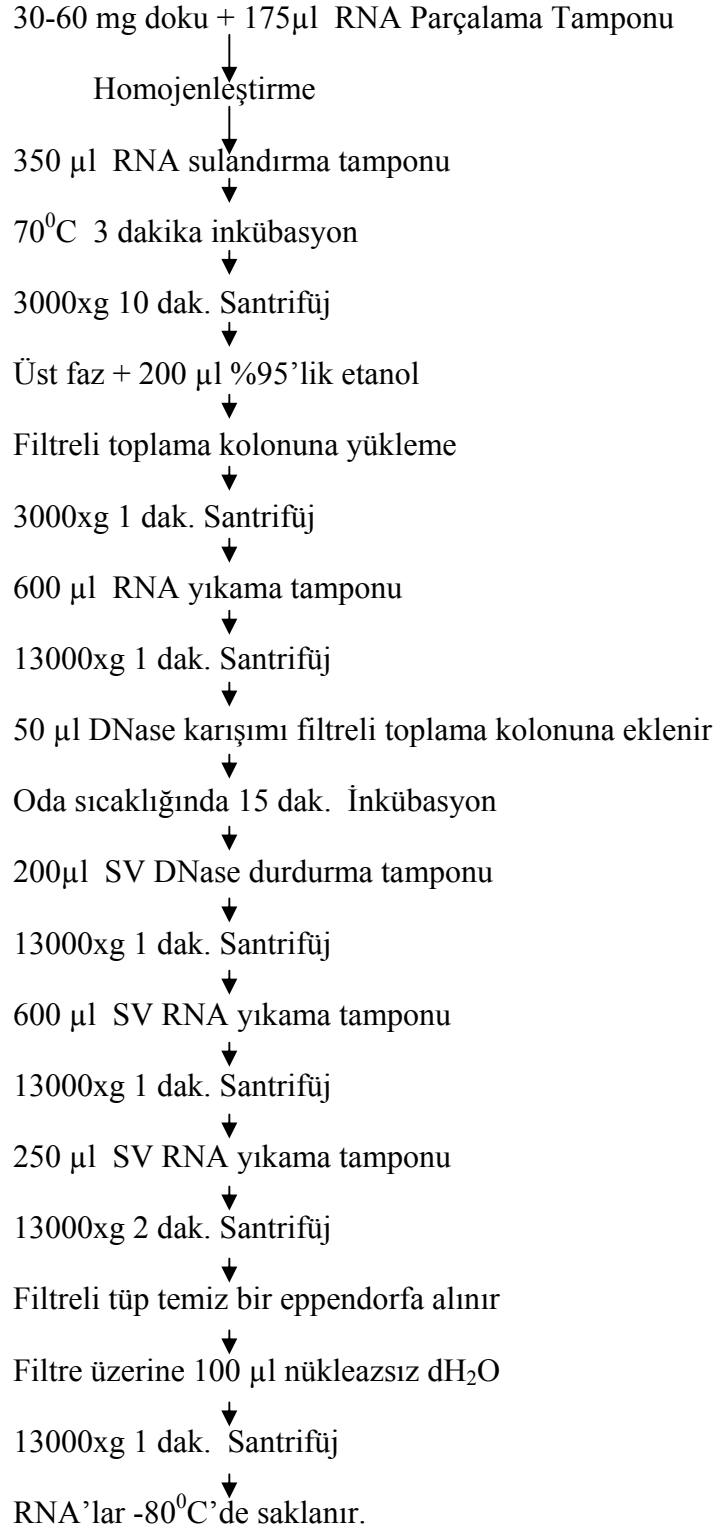
1mM DTT

3.2. YÖNTEM

Ameliyat esnasında böbrek kanserli hastalardan alınan normal ve tümörlü dokular üç parçaya ayrılarak -80°C de muhafaza edildi. Birinci grup doku parçaları RNA ve gen ifade analiz işlemleri için, ikinci grup DNA izolasyonu ve metillenme analizleri için, üçüncü grup ise ELISA işlemi için kullanıldı. Hastalara ait tümörlü ve normal dokular ayrı ayrı DNA, RNA ve ELISA parçalama tamponları ile -80°C de soğutulmuş havan içinde veya MagNA Lyser Green bead tüplerine alınarak MagNA Lyser (Roche, Almanya) cihazında homojenleştirildi.

3.2.1. Dokudan RNA İzolasyonu

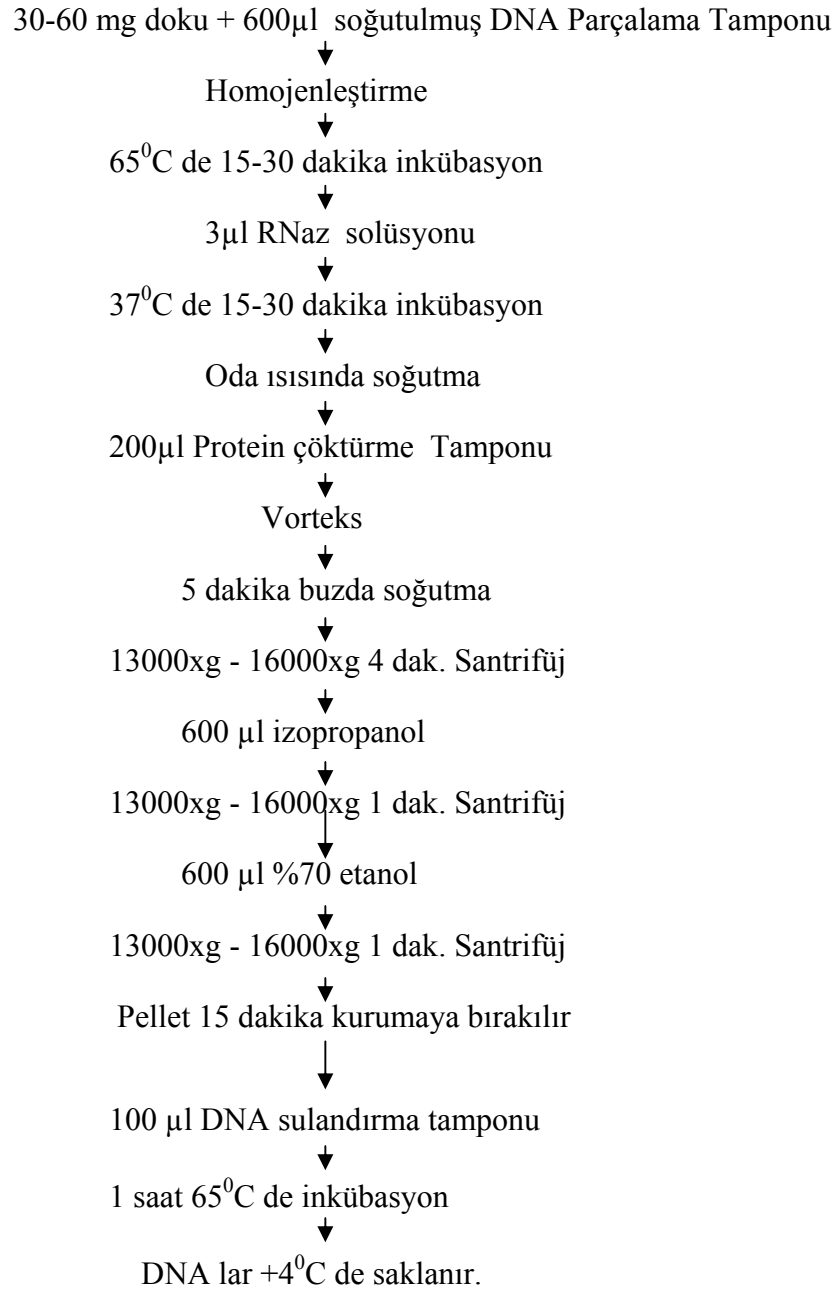
Dokudan RNA eldesi için SV Total RNA İzolasyon kiti (Promega, ABD) kullanıldı. Yöntemin akış şeması Tablo 3-1’de verilmektedir.

Tablo 3-1: Dokudan RNA İzolasyonu

3.2.2. Dokudan DNA İzolasyonu

Dokudan DNA İzolasyonu için Wizard Genomik DNA Saflaştırma Kiti (Promega, ABD) kullanıldı. Yöntemin akış şeması Tablo 3-2’de verilmektedir.

Tablo 3-2: DNA İzolasyonu



3.2.3. Spektrofotometrik Analiz

DNA örneklerinin derişimi spektrofotometrede (Nanodrop, ABD) 260nm dalga boyunda, RNA örneklerinin ise 280 nm dalga boyunda optik yoğunlukları okunarak belirlendi.

3.2.4. Agaroz Jellerin Hazırlanması

RNA ve PCR ürünlerinin izlenmesi için %1,5'lik, DNA örneklerinin izlenmesi için ise %0,8'lik agaroz jel 0,5XTBE tamponu ile hazırlandı. Bantların jelde izlenebilmesi için 0,5mg/ml olacak şekilde etidyumbromür eklendi. Jel, polimerleştikten sonra 0,5X TBE tamponu içeren jel tankına alındı. Örnekler, son derişimi 1X olacak şekilde yükleme tamponu ile jele yüklendi ve 100-160 V'ta yürütülerek UV ışık altında incelendi.

RNA izolasyon kiti aracılığıyla elde edilen RNA'lar, spektrofotometrede ölçümleri yapılarak miktarlarının eşit olarak uygulanması amacı ile 250 ng/μl olacak şekilde sulandırılarak cDNA sentez kiti (Fermentas, Litvanya) aracılığıyla cDNA'ya dönüştürüldü. Tepkime koşulları Tablo 3-3 'de gösterilmiştir.

Tablo 3-3: cDNA Sentez Koşulları

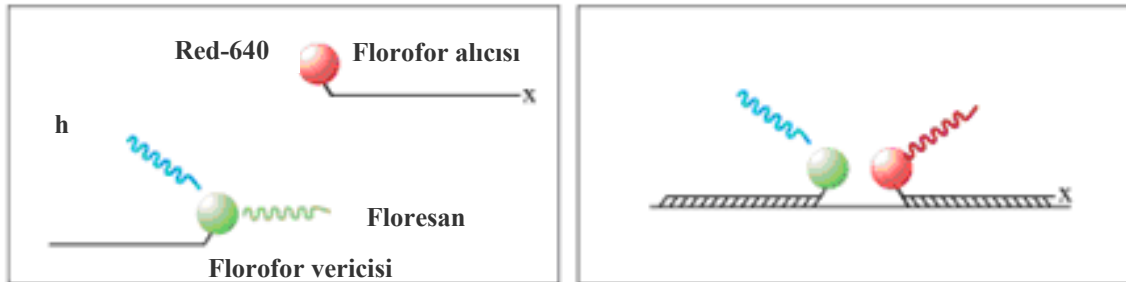
Kimyasallar	Derişim
Toplam RNA	100ng
Random hexamer primer	2,5 μM
Toplam hacim 12 μl'ye tamamlanır Karışım 70°C'de 5 dakika inkübe edilir	
Tepkime tamponu (5 x)	1 X
RNA engelleyici	20 U
dNTP karışımı	1mM her biri
25°C'de 5 dakika inkübe edilir	
Ters transkriptaz	10U
25°C'de 10 dakika inkübe edilir	
42°C'de 60 dakika inkübe edilir	
70°C'de 10 dakika inkübe edilir	

3.2.5. Gen İfade Analizleri

TSP-1, HIF-1 α ve CA9 genlerinin nicel anlatım analizleri Lightcycler Fast Start DNA Master Hibridizasyon Prob kiti (Roche, Almanya) ve hG6PDH House Keeper Gene Set (Roche, Almanya) kullanılarak Light Cycler cihazında (Roche, Almanya) yapıldı.

LightCycler cihazı kullanılarak ilgili genlerin hedef bölgelerine özgü primerler ve hedef bölge ile melez oluşturacak şekilde melezleme prob çiftleri dizayn edildi. (LightCycler Software-Roche-Almanya). Melezleme prob çiftinin biri 5'ucundan Red 640 ile (alıcı boya) diğeri ise 3'ucundan "florescein" adlı floresan boya ile işaretli olarak sentezletildi.

Floresanla işaretli olan prob, floresan rezonans enerji transfer (FRET) vericisi olarak, 5'ucundan Red 640 ile işaretli prob ise alıcı olarak görev yapar. Enerji transferi ancak iki prob melezlendiği zaman floroforların yaklaşması ile gerçekleşir (Şekil 3-1). Birkaç nukleotid uzaklıktaki iki florofor arasında gerçekleşen enerji transferi sırasında açığa çıkan floresan emisyonu PCR döngüleri esnasında eşzamanlı olarak görüntülenir.



Şekil 3-1: Lightcycler Cihazında Kullanılan HybProb Sistemi

TSP-1, HIF-1 α ve CA9 genlerinin ifade analizi için 4mM MgCl₂, 0,5 μ M primer karışımı, 0,2 μ M prob karışımı, 1X Hybprobe tampon karışımı ve 12,5 μ l'ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklenerek hazırlanan karışım kapillerlere koyuldu ve her bir kapillere 2,5 μ l cDNA eklendi.

Aynı cDNA'lar referans gen G6PDH'ın ifadesi için de kullanıldı. Kapillerler 700g'de 10 saniye santrifüjlenerek LightCycler (Roche, Almanya) rotoru içine yerleştirildi.

Normal ve tümör dokularında gen ifade düzeyleri G6PDH gen kopya sayıları ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Kullanılan primer ve prob dizileri Tablo 3-4'de, tepkime için uygulanan protokol ise Tablo 3-5'de verilmiştir.

Tablo 3-4: TSP-1, HIF-1 ve CA9 Primer ve Prob Çiftleri

HIF-1 Primer Çiftleri:	CA9 Primer Çiftleri:	TSP-1 Primer Çifti:
İleri-5'-GAC ACC TAG TCC TTC CG-3'	İleri-5'- CGT GGT TCA CCT CAG C-3'	İleri-5'- CTG CGA TAG CCT CAA CA-3'
Geri-5'-TTG GGA TAT AGG GAG CTA AC-3'	Geri-5'- CAT ATT GGA AGT AGC GGC-3'	Geri-5'- AGG GTT TCC CGT TCA T-3'
HIF-1 Prob1	CA9 Prob 1	TSP-1 Prob 1
5'- CTG AAG ACA CAG AAG CAA AGA ACCC-FL	5'- GAA GGC TCA GAG ACT CAG GTC C--FL	5'-TCC TCG GTC CAG ACA CGG—FL
HIF-1 Prob2	CA9 Prob 2	TSP-1 Prob 2
5'-LC640-TTT CTA CTC AGG ACA CAG ATT TAG ACT TGG-PH	5'-LC640- GGACTGGACATATCTGCACTCC-PH	5'- LC640- CTG CCA CAT TCA GGA GTG TGAC-PH

Tablo 3-5: Gen İfade Analizleri İçin Gerçek Zamanlı PCR Koşulları

G6PDH, TSP-1, HIF-1α ve CA9			
İşlem	Sıcaklık	Süre	
İnkübasyon	95 C	10dk	
Denatürasyon	95 C	10sn	45 Döngü
Primer bağlanması	58 C	10sn	
Uzama	72 C	10sn	
Soğuma	40 C		

3.2.6. Metillenme Analizi :

Tümör ve normal doku DNA örnekleri 200-500 ng olacak şekilde sulandırıldı. TSP-1 geninin promotör bölgesindeki metillenmeyi tespit etmek için EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, ABD) kullanılarak modifikasyon gerçekleştirildi (Tablo3-6).

Tablo 3-6: Bisülfid Modifikasyon İşlemi

130 μ l CT Değişim Solüsyonu +20 μ l DNA



98⁰C 10 dakika inkübasyon

64⁰C 2,5 saat inkübasyon

4⁰C



600 μ l M- Bağlama Tamponu Zymo Spin kolona eklenir.



DNA örneğini ekleyerek karıştırılır.



Maksimum hızda 30 saniye santrifüjlenir



100 μ l M-Yıkama Tamponu kolona eklenir



Maksimum hızda 30 saniye santrifüjlenir



Kolona 200 μ l M-Desülfonasyon Tamponu eklenir



15-20 dakika inkübasyona bırakılır



Maksimum hızda 30 saniye santrifüjlenir



200 μ l M-Yıkama Tamponu kolona eklenir



Maksimum hızda 30 saniye santrifüjlenir



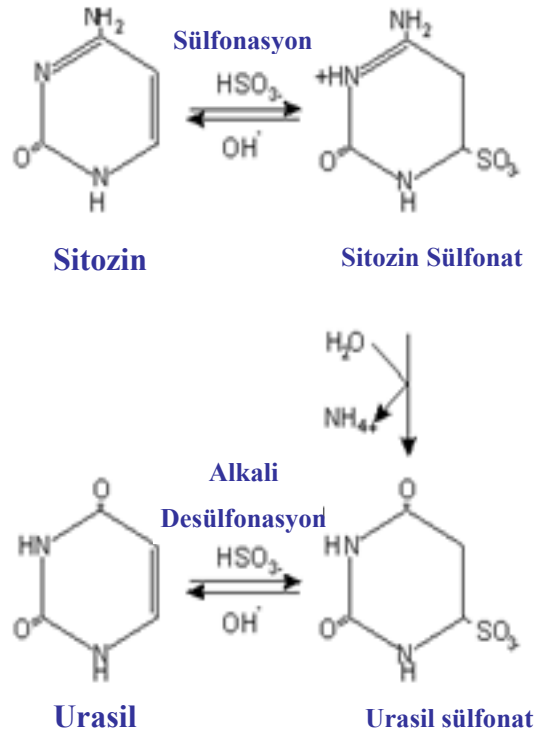
Tekrar 200 μ l yıkama tamponu eklenerek santrifüjlenir



10 μ l M-Elüsyon Tamponu 1.5 ml'lik yeni tüpe yerleştirilmiş kolon matriksine uygulanır



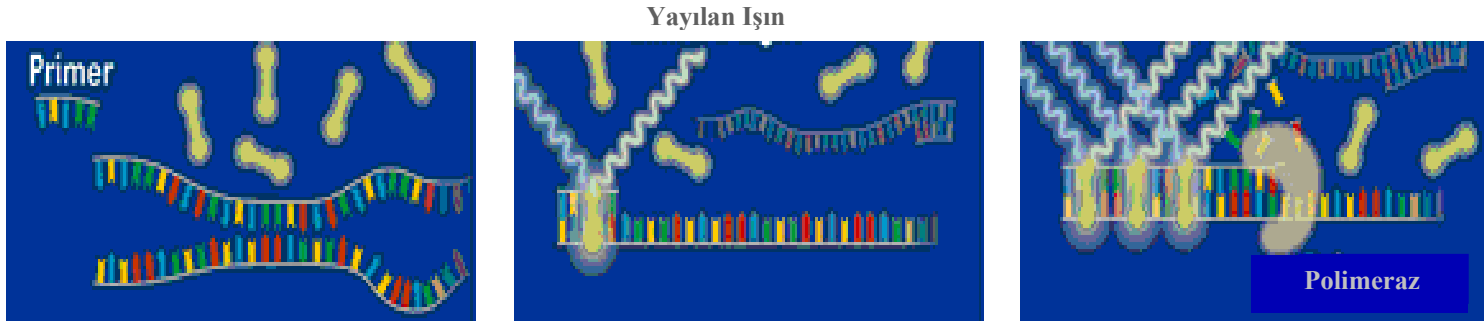
Elde edilen ürünler -20°C de ya da -80°C de saklanır. Modifikasyon aracılığıyla DNA örneklerindeki metillenmemiş sitozinler urasile dönüştürülür (Şekil 3-2). Metillenmiş sitozinler ise değişmeden kalır.



Şekil 3-2: Sitozinin Bisülfid Modifikasyonu İle Urasile Dönüşümü

Modifiye edilen örnekler Lightcycler Syber Green kit (Roche, Almanya) kullanılarak, ilgili gene ait metillenmiş diziye uygun primer çifti ile uygun koşullarda çoğaltıldı. Primer dizisi ve uygun PCR koşulları Tablo 3.8. de verilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan Gerçek Zamanlı PCR yönteminde yalnızca çift sarmallı DNA'ya bağlandıklarında floresan veren bir boya olan Syber Green kullanılmıştır. Şekil 3-2'de Syber Green'in çalışma prensibi gözlenmektedir.



Şekil 3-3: SYBR Green Çalışma Prensibi (95)

Primer DNA iplikçisine bağlandığında az miktarda boya molekülü de bağlanır ve ışın yaymaya başlar. Uzama aşamasında ise yeni sentezlenmekte olan DNA ya daha fazla boya molekülü bağlanır ve yayılan floresan artar.

Tablo 3-7: Primer Dizileri ve Tepkime Koşulları

Metillenmiş Ürünleri Tespit Etmek İçin Kullanılan Primer Çifti:

İleri -5'- TGC GAG CGT TTT TTT AAA TGC-3'
Geri- 5'- TAA ACT CGC AAA CCA ACT CG-3'

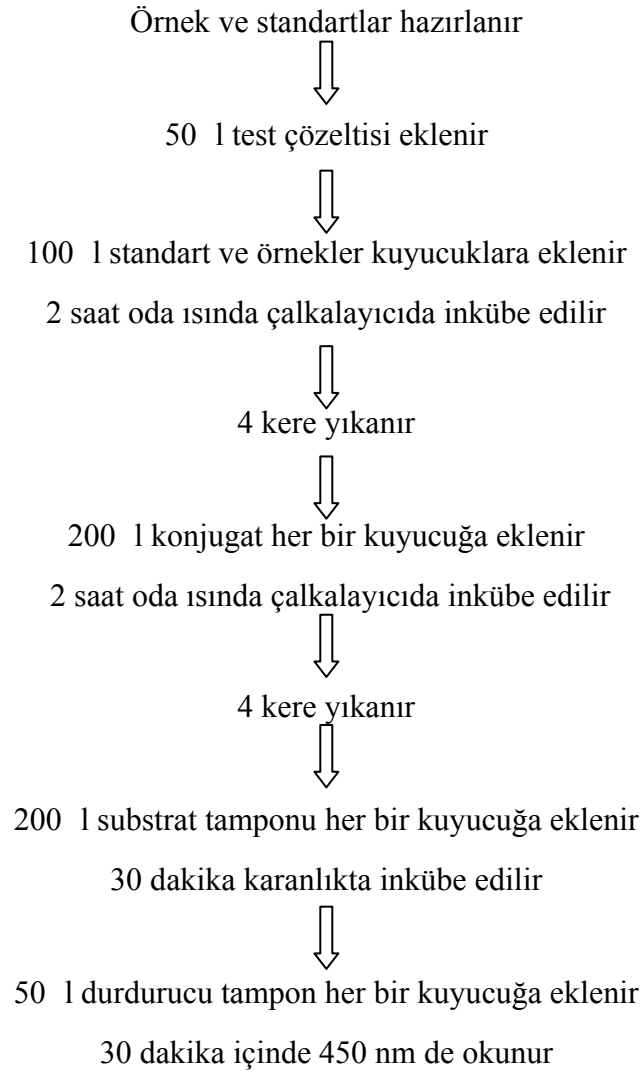
İşlem	Sıcaklık	Süre	
İnkübasyon	95 C	10dk	
Denatürasyon	95 C	10sn	45 Döngü
Primer bağlanması	58 C	10sn	
Uzama	72 C	10sn	
Soğuma	40 C		

Oluşan PCR ürünleri etidyum bromid içeren agaroz jelde yürütüldü. Metillenme düzeyleri jel dökümantasyon sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) BIO-1D programı kullanılarak jel görüntüsü üzerinde hacim oranları yardımıyla belirlendi.

3.2.7. ELISA (Enzim Linked İmmuno Sorbent Assay)

Hastaların tümör ve normal dokuları HEPES tamponu kullanılarak MagNA Lyser Green bead tüplerine alınarak MagNA Lyser cihazında (Roche, Almanya) homojenize edildi. Elde edilen homojenatların toplam protein miktarları 1mg/ l olacak şekilde ayarlandı. Homojenatların CA9, TSP-1 ve HIF-1 α protein miktarları İnsan Karbonik Anhidraz IX, İnsan Trombospondin-1 Immunoassay ve HIF-1 α kitleri (R&D Systems, ABD) kullanılarak ELISA yöntemi ile belirlendi.

Homojenattaki ilgili proteinin miktarını saptamak için standartlar ve örnekler özgül monoklonal antikor ile önceden kaplanmış bir plağın kuyucuklarına pipetlendi. Ortamdaki ilgili protein kendine özgü antikora bağlandıktan sonra bağlanmayan moleküller yıkama ile uzaklaştırıldı ve kuyucuklara ilgili proteine karşı biotin işaretli ikincil antikor eklendi. Bağlanmayan antikorları ayırmak için yapılan yıkamadan sonra, ilgili proteini saptamak için kuyucuklara streptavidin – HRP substrat çözeltisi eklendi. Bağlanan protein miktarına bağlı olarak gelişen renk yoğunluğu 450nm’de ölçüldü. Tablo 3-8’de ELISA yönteminin uygulanaşı görölmektedir.

Tablo 3-8: ELISA' nın Uygulanışı

3.2.8. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Hastalara ait tümör dokusu ile normal dokulardaki CA9, TSP-1 ve HIF-1 α genlerine ait mRNA ifade farklılıkları, ELISA yöntemi ile saptanan protein miktarları ve metillenme sonuçlarının istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek için SPSS 12 programı kullanıldı. Mann-Whitney U testi, Kruskal Wallis ve Spearman's rho testleri kullanılarak elde edilen p değerlerine göre anlamlılıklar değerlendirildi.

4. BULGULAR

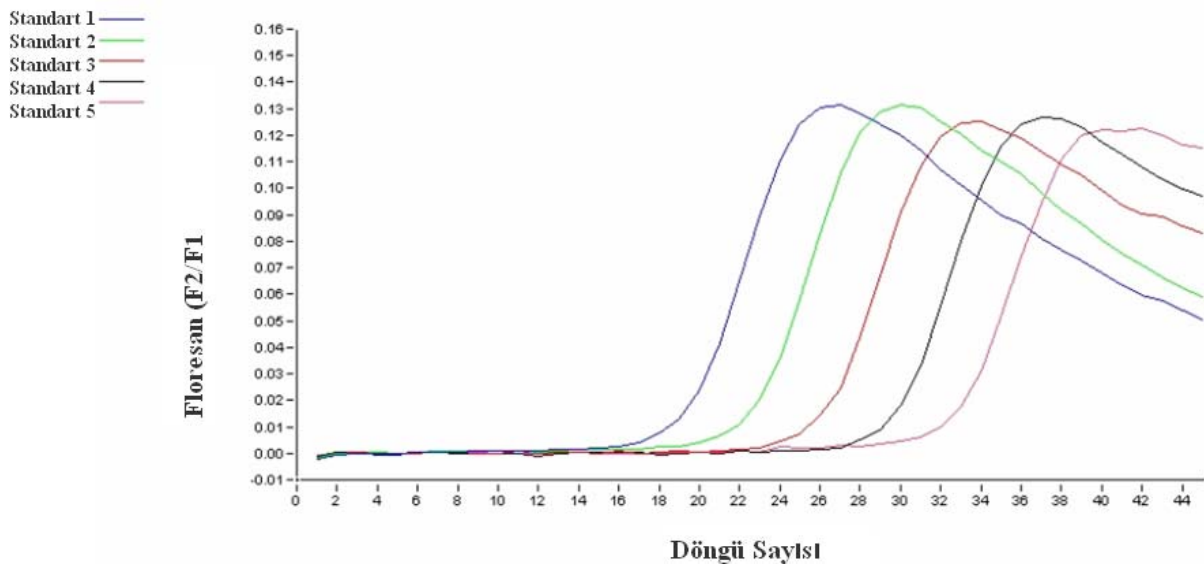
Çalışmamızda 60 böbrek kanserli hastanın hem tümör, hem de normal dokuları incelendi. Aynı hastaların tümörlü dokularından elde edilen sonuçlar, normal dokularından elde edilen sonuçlar ile kıyaslanarak değerlendirildi. Çalışılan hastalara ait deneysel sonuçlar patoloji evreleri, **patoloji gradları**, tümör büyüklükleri, invazyon ve metastaz durumları ile birlikte değerlendirildi. Hastalara ait klinik parametreler Tablo 4-1’de görülmektedir.

Tablo 4-1: Hastalara ait Klinik Parametreler

KLİNİK PARAMETRELER	Hasta sayısı (n=60)	(%)
Evre		
I	16	%27,6
II	14	%24,1
III	20	%34,5
IV	8	%13,8
Grad		
1	2	%3,6
2	14	%25
3	26	%46,4
4	14	%25
Tümör çapı		
3-6 cm arası	28	%46,7
7-10cm arası	21	%35
10cm den büyük	11	%18,3

4.1. Gen İfade Analizleri

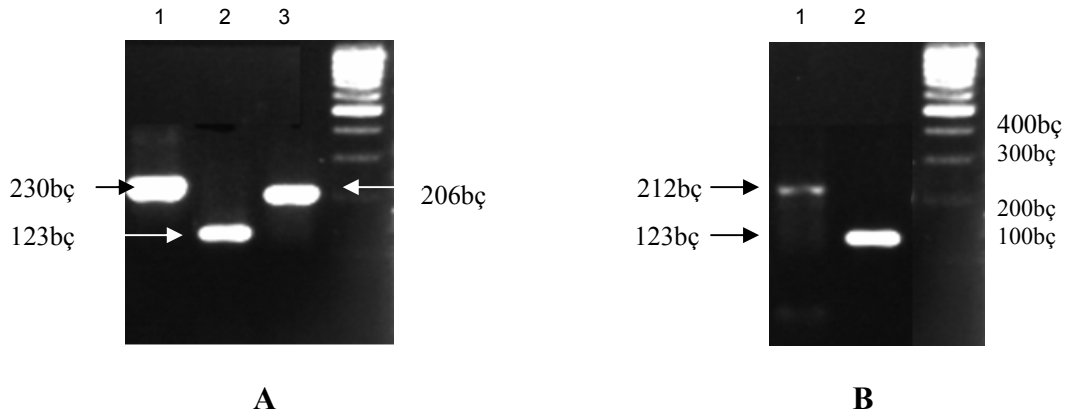
TSP-1, HIF-1 α ve CA9 genlerinin nicel ifade analizleri için Lightcycler cihazı ile Lightcycler Fast Start DNA Master Hibridizasyon Prob kiti ve referans gen olarak da G6PDH geni kullanıldı. G6PDH'nin 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 ve 5×10^2 sayıda mRNA kopyası içeren standartları kullanılarak standart eğri oluşturuldu. Şekil 4-1'de G6PDH standartlarının Gerçek Zamanlı PCR eğrileri görülmektedir.



Şekil 4-1: G6PDH Standartlarına Ait Floresan Eğriler

Standart 1: 5×10^6 , Standart 2: 5×10^5 , Standart 3: 5×10^4 , Standart 4: 5×10^3 , Standart 5: 5×10^2 kopya.

Gerçek Zamanlı PCR ile nicel miktarları belirlenen örnekler aynı zamanda PCR sonrası %1,5 agaroz jelde de yürütülerek elde edilen bantların doğruluğu belirlendi. PCR sonucunda HIF-1 α için 212, TSP-1 için 206 ve CA9 için ise 230 baz çiftlik PCR ürünleri oluşmaktadır.



Şekil 4-2: Gerçek Zamanlı PCR Sonrası Örneklerin Jelde Görünümü

A- 1. CA9 (230bç), 2. G6PDH (123bç), 3. kuyucuk TSP-1(206bç),

B- 1. HIF-1α (212bç), 2. G6PDH. Her iki jelin son kuyucukları 100 bç lik DNA belirtecini göstermektedir.

Örneklerde HIF-1α, CA9 ve TSP-1 genlerinin ifade düzeylerini hesaplamak için aşağıdaki bağıntı kullanıldı.

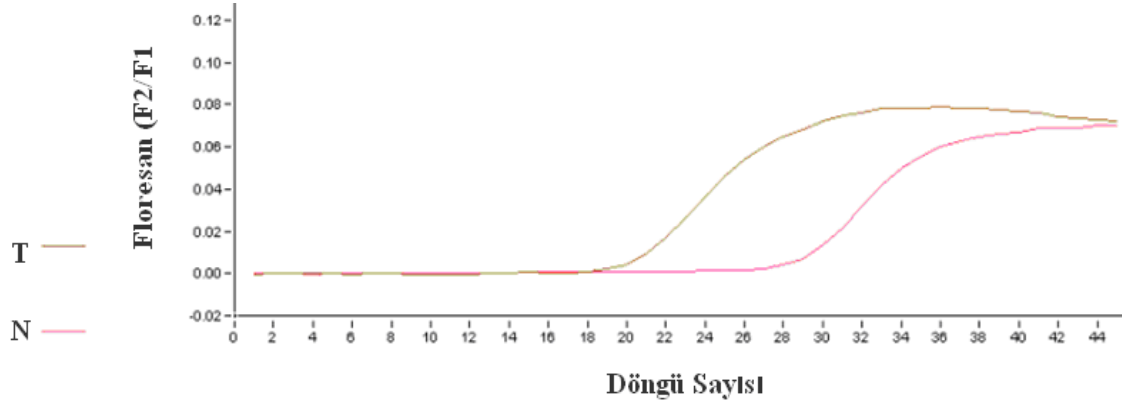
İfade Düzeyi= Örnekte ilgili gen kopya sayısı/ Örnekte G6PDH kopya sayısı

Hastaların tümör ve normal dokularına ait HIF-1α, CA9 ve TSP-1 gen ifade analizlerinin sonuçları toplu olarak Tablo 4.1 de görülmektedir.

4.1.1. HIF 1 Gen İfade Analizi İle İlişkili Bulgular

HIF-1α gen ifade analizleri aynı hastaların tümör ve normal dokusuna ait cDNA'lar ile HIF-1α genine özgü kullanılan prob ve primerlerle yapılan Gerçek Zamanlı PCR ile elde edilen nicel değerler, aynı örneklerin referans gen değerleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

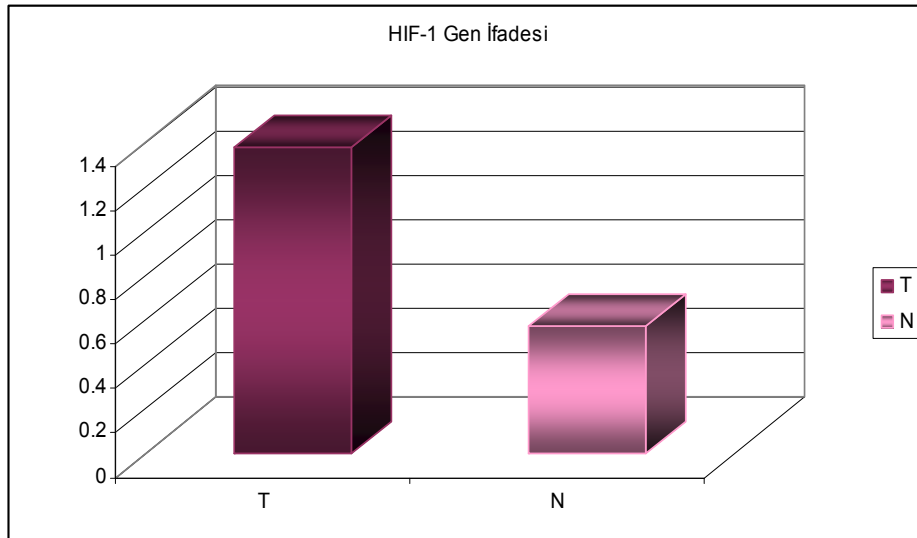
Örneklere ait HIF-1α floresan diyagramı Şekil 4-3'de görülmektedir. Şekilde izlendiği gibi ilgili genin ifade düzeyleri ne kadar fazla ise gözlenen floresan değerlerinde yükselme o kadar erken döngü sayısında başlamaktadır.



Şekil 4-3: HIF-1 Floresan Diyagramı

T: tümör, N:normal

Hastaların tümör ve normal dokularının HIF-1 α gen ifadesi kıyaslandığında tümör doku örneklerinde ifadenin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,017$). HIF-1 α gen ifadesinin tümördeki ortalama değeri 1,38, normaldeki ortalama değeri ise 0,57'dir (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Tümör ve Normalde HIF-1 Gen İfadesi

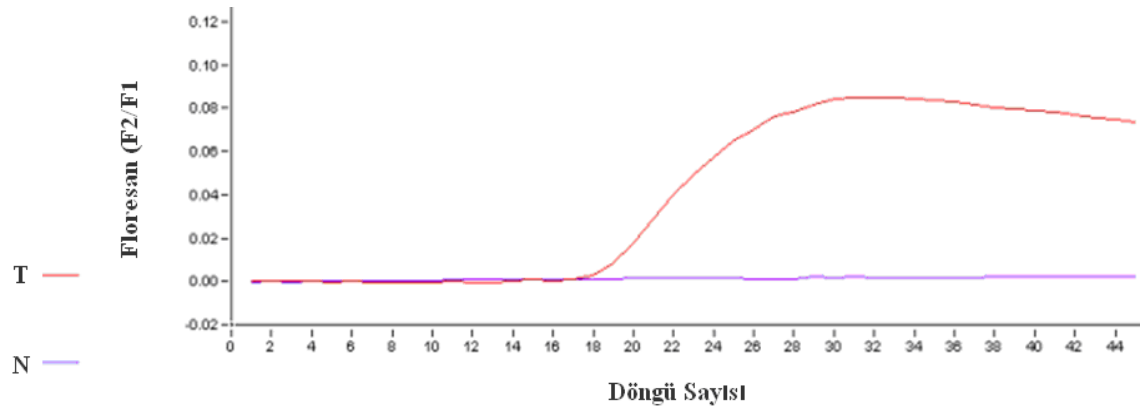
Hastaların HIF-1 α gen ifade düzeyleri klinik parametreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık görülmemiştir.

4.1.2. CA9 Gen İfade Analizi İle İlişkili Bulgular

Hastaların tümör ve normal dokusuna ait cDNA'lar ile CA9 genine özgü kullanılan prob ve primerlerle yapılan Gerçek Zamanlı PCR ile okunan nicel değerler, aynı örneklerin referans gen değerleri ile karşılaştırılarak örneklerin CA9 gen ifade analizleri yapıldı.

CA9 geninin ifade düzeyleri bölüm 4.2.de belirtilen bağıntı yardımıyla saptandı.

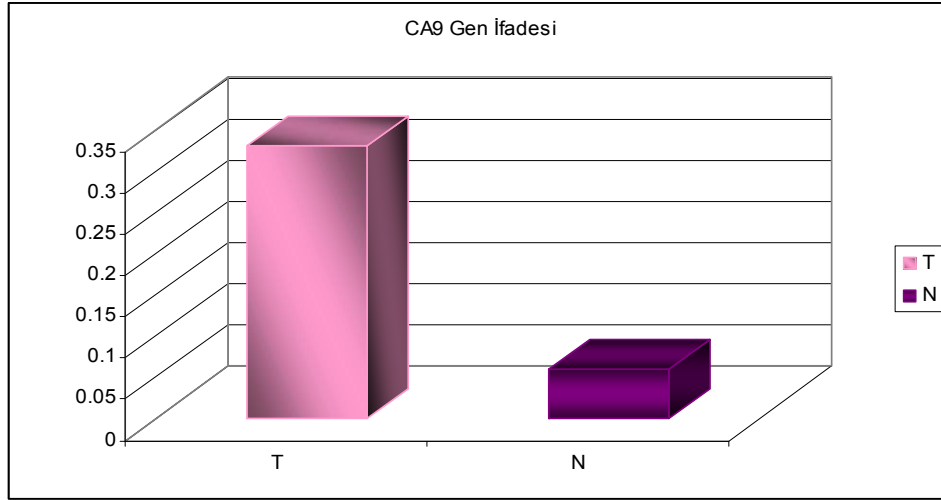
Örneklere ait grafik şekil 4-5'de görülmektedir.



Şekil 4-5: CA9 Floresan Diyagramı

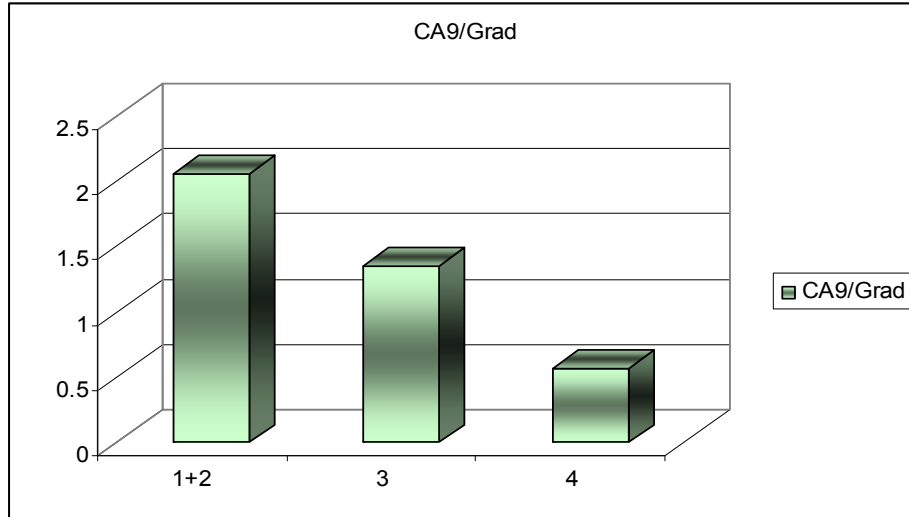
T: Tümör, N: Normal

Tümörler ile normal dokular kıyaslandığında CA9 gen ifadesinin tümör doku örneklerinde anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). Tümörde CA9 gen ifadesinin ortalama değeri 0,33, normalde ise CA9 ortalama değeri 0,06'dır (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Tümör Dokusunda ve Normal Dokularda CA9 Gen İfade Düzeyleri

CA9 gen ifadesi açısından karşılaştırılan tümörler gradlarına göre kıyaslandığında yüksek gradlı tümörlerde gen ifadesinin düşük gradlı tümörlere oranla azaldığı gözlenmiştir ($p=0,010$). Grad 1+2 'de CA9 gen ifadesinin ortanca değeri 2,05, Grad 3'de 1,35, Grad 4'de ise 0,57'dir (Şekil4-7). CA9 gen ifadesi diğer klinik parametreler ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4-7: CA9 Gen İfadesi ve Grad İlişkisi

HIF-1 α ve CA9 gen ifade düzeyleri arasında beklendiği gibi anlamlı bir ilişki gözlenmektedir ($p=0,029$).

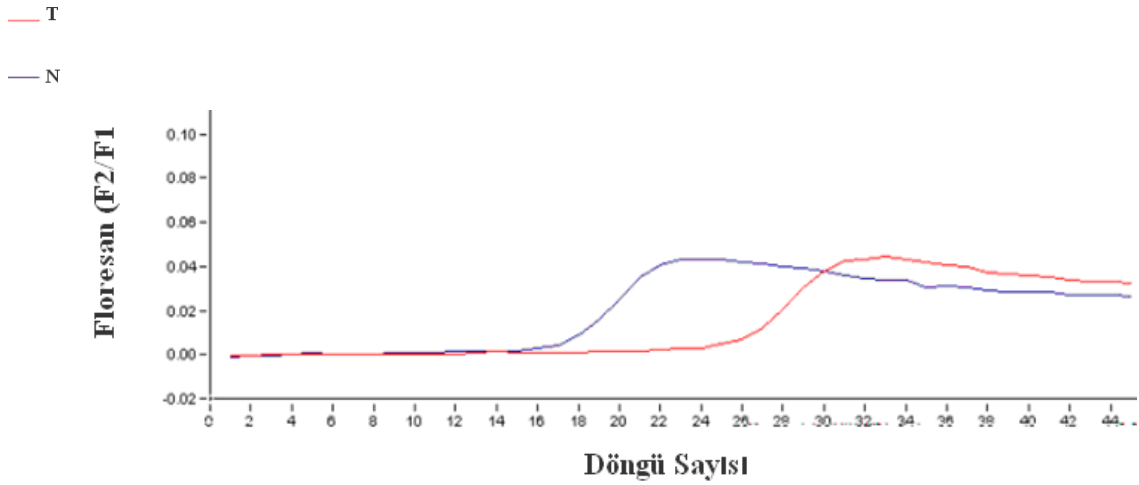
4.1.3. TSP-1 Gen İfade Analizi İle İlişkili Bulgular

Çalışmamızın bu bölümünde tümör ve normal dokularında, TSP geni mRNA düzeylerinin nicel analizi Light Cycler cihazı ile FastStart HybProbe kiti ve referans gen olarak G6PDH kullanılarak yapıldı.

Aynı hastaların tümör ve normal dokusuna ait elde ettiğimiz cDNA'lar ile TSP-1 genine özgü kullanılan prob ve primerlerle yaptığımız Gerçek Zamanlı PCR ile okunan nicel değerler, aynı örneklerin referans gen değerleri ile karşılaştırılarak örneklerin TSP-1 gen ifade analizleri yapılmıştır.

TSP-1 geninin ifade düzeylerini hesaplamak için de bölüm 4.2.de belirtilen bağıntı kullanılmıştır.

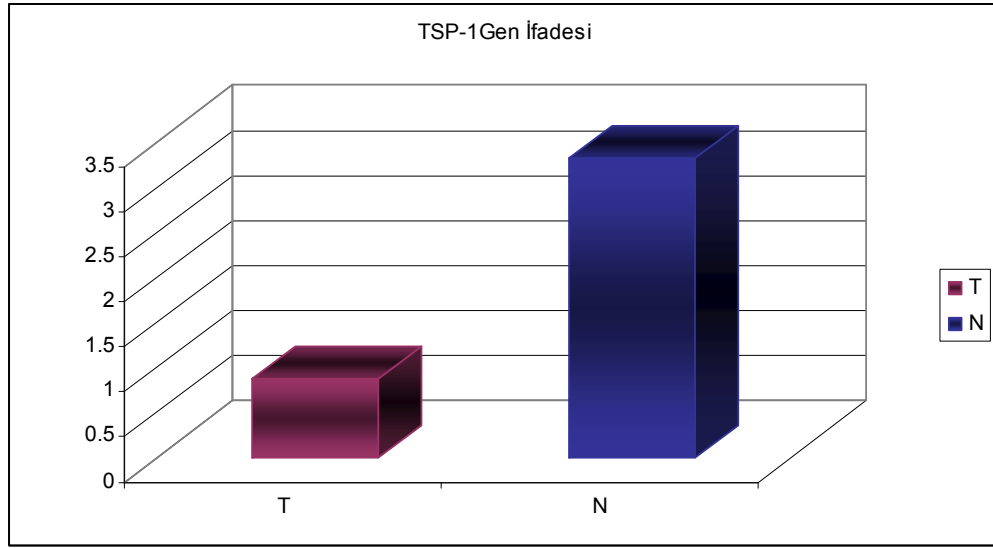
Örneklere ait grafik Şekil 4-8'de görülmektedir.



Şekil 4-8: TSP-1 Floresan Diyagramı

T: Tümör, N: Normal

Hastaların tümör ve normal dokuları arasında TSP-1 gen ifadesi açısından anlamlı farklılık vardır. Normal dokuda gen ifadesi tümöre göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,026$). Tümörde TSP-1 gen ifadesinin ortanca değeri 0,87, normalde ise 3,32'dir (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: Tümör ve Normalde TSP-1 Gen İfadesi

TSP-1 gen ifadesinin HIF-1 α ve CA9 ile beklendiği gibi zıt yönde bir ilişkiye sahip olduğu görülmekle birlikte aradaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,49$).

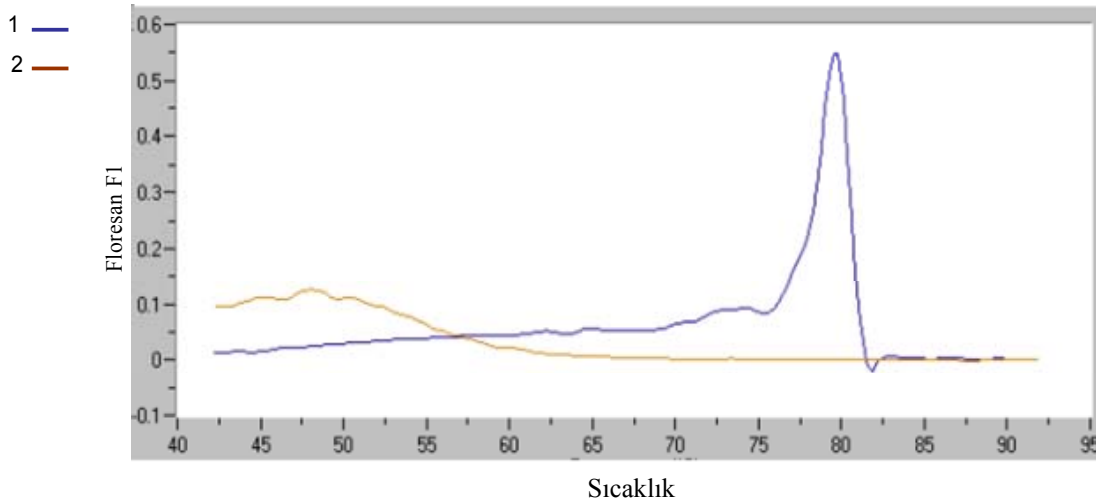
TSP-1 gen ifadesi, ileri evre ve yüksek grad ile ters orantılı olup, fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 4-2: Hastaların Tümör ve Normal Dokularına Ait Gen İfade Analiz Sonuçları

4.2. TSP-1 Metillenme Bulguları

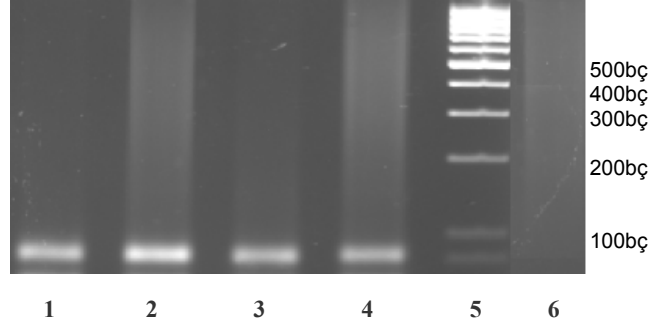
Böbrek kanserli hastaların tümör ve normal dokularından elde edilen DNA örnekleri 200-500 ng olacak şekilde sulandırılarak TSP-1 geninin promoter bölgesindeki metillenmeyi tespit etmek amacıyla bisülfıt modifikasyonu yapıldı. Modifiye edilen örnekler Gerçek Zamanlı PCR yöntemiyle ilgili gene ait metillenmiş diziye uygun primerleri içeren uygun koşullarda çoğaltıldı. Oluşan PCR ürünleri etidyum bromid içeren agaroz jelde yürütüldü. Jel dökümentasyon sisteminde örneklerin jel görüntüsü üzerinden hacim hesaplaması yapılarak metillenme oranları tespit edildi.

TSP-1 metillenmesinin Syber Green kullanılarak belirlendiği bir floresan diyagramı Şekil 4-12’de ve metillenmiş örneklere ait agaroz jel fotoğrafı da Şekil 4-13’de görülmektedir.



Şekil 4-10: TSP-1 Metilasyon Syber Green Floresan Diyagramı

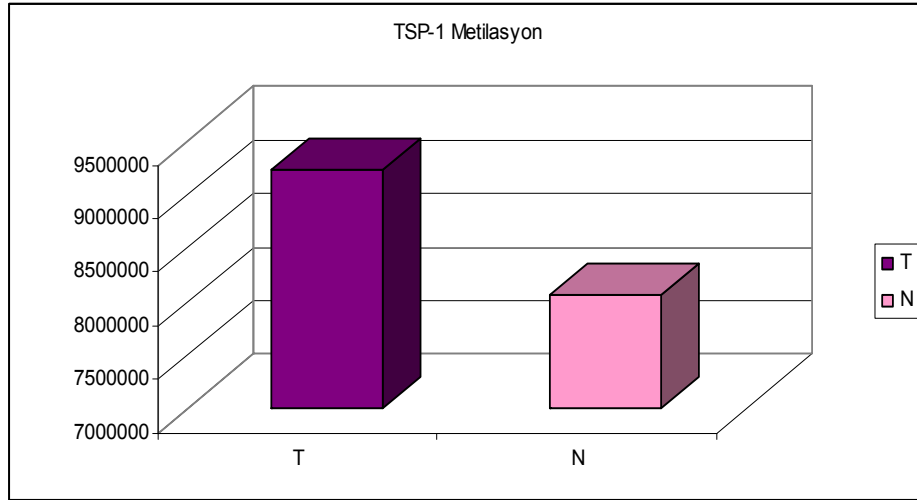
1-Metillenmiş örnek, 2- Metillenmemiş örnek



Şekil 4-11: Metillenmiş Örneklerin Jel Görüntüsü

1-4. kuyucuklarda 74 bp'lik metillenmiş örnekler, 5. kuyucukta 100 bç.lik DNA belirteci ve 6. kuyucukta ise metillenmemiş bir örnek bulunmaktadır.

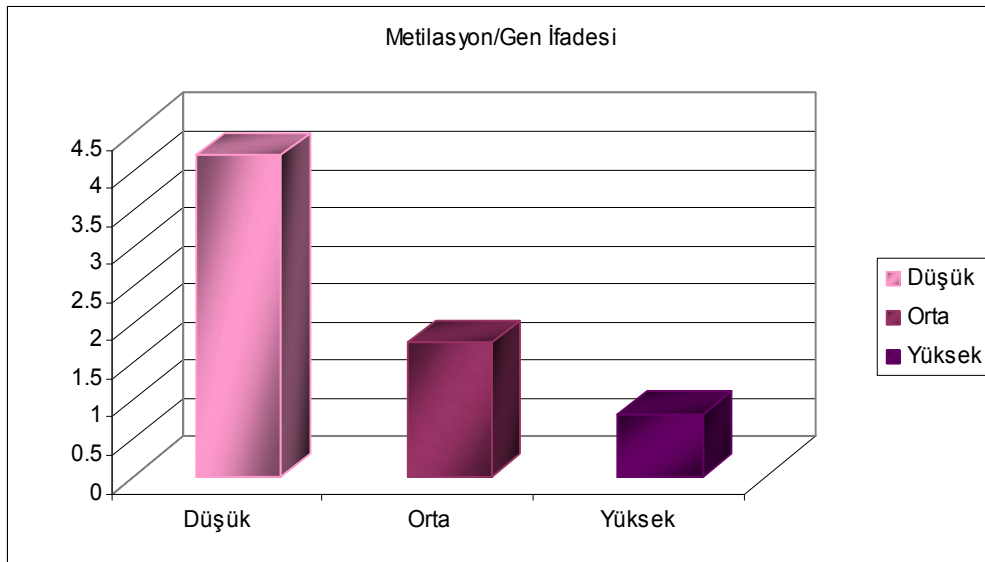
Hastaların tümör örneklerinde normallerine göre daha yüksek TSP-1 promotör metillenmesi görülse de, fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,4$)(Şekil 4-14).



Şekil 4-12: Tümör ve Normaldeki TSP-1 Gen Metilasyonu

TSP-1 gen metillenmesi düşük(% 0-25), orta (%26-55) ve yüksek (%56-100) olmak üzere gruplandırılarak metillenme TSP-1'in gen ifade ve protein düzeyleriyle kıyaslanarak aralarındaki ilişki değerlendirildi.

Düşük, orta ve yüksek düzey TSP-1 gen metillenmesi ile genin ifade düzeyinin beklendiği şekilde ters orantılı olduğu gözlemlendi ($p=0,05$). Düşük düzeyde metillenme görülen örneklerdeki TSP-1 gen ifadesi ortalama değeri 4,21, orta düzey metillenenlerde TSP-1 ortalama değeri 1,29, yüksek düzey metillenenlerde ise 0,82'dir (Şekil 4-15).



Şekil 4-13: TSP-1 Gen İfadesi İle Metilasyonu Arasındaki Zıt İlişki

TSP-1 metillenmesi ile protein düzeyi arasında da ters orantılı bir ilişki görüldü ($p=0,011$) (Şekil 4-22).

4.3. ELISA Sonuçları

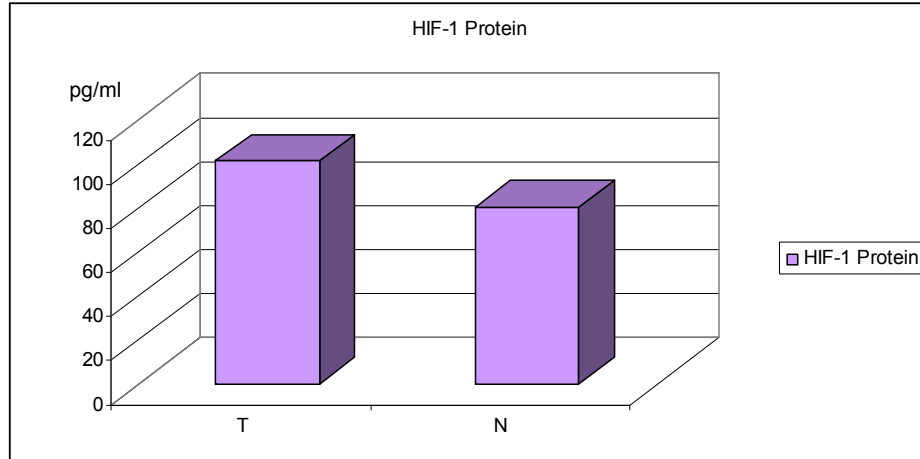
Hastaların tümör ve normal dokuları homojenize edildikten sonra CA9, TSP-1 ve HIF-1 proteinlerinin miktar tayini için ELISA yöntemi uygulandı. İşlem sonrası plaklar ELISA okuyucu cihazında (Rayto, Çin) değerlendirildi.

Tablo 4-3'de hastaların tümör ve normal dokularına ait HIF-1 α , CA9 ve TSP-1 protein ölçüm sonuçları görülmektedir.

Tablo 4-3: Hastaların Tümör ve Normal Dokularına Ait Protein Düzeyleri

4.3.1. Dokuda HIF-1 Protein Düzeyleri

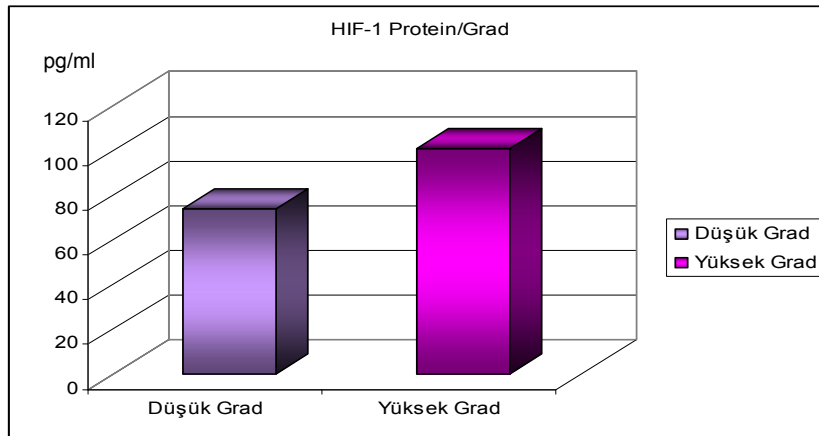
HIF-1 protein düzeyleri tümör örneklerinde normal doku örneklerine göre anlamlı derecede daha yüksektir ($p=0,035$). Tümör örneklerinde HIF-1 proteinin ortalama değeri 101,6 pg/ml, normalde ise 80,5 pg/ml dir.



Şekil 4-14: Tümör ve Normal Doku Örneklerinde HIF-1 Protein Düzeyleri

HIF-1 protein düzeyleri hastaların tümörlerinin gradlarına göre kıyaslandığında anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($p=0,001$). Ancak diğer parametrelerle anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

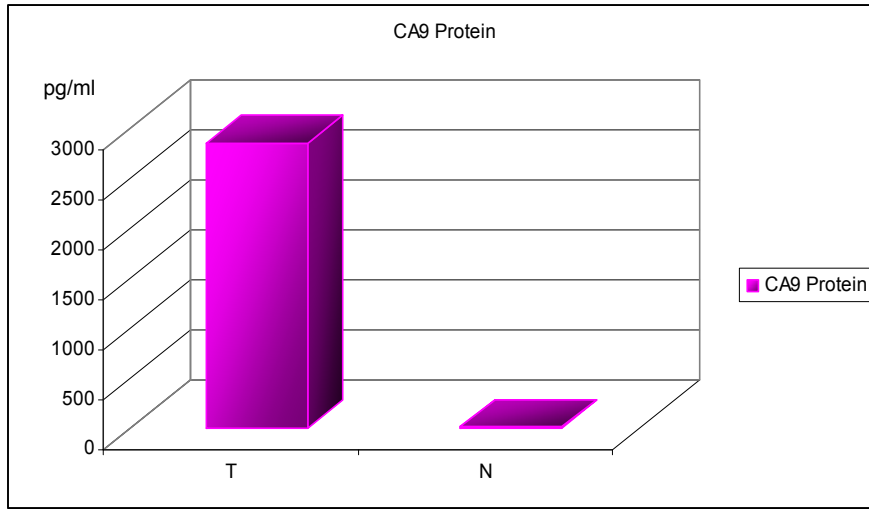
Düşük gradlı hastalarda HIF-1 proteinin ortalama değeri 74 pg/ml, yüksek gradlı hastalarda ise 101 pg/ml dir.



Şekil 4-15: Hastaların Tümörlerinin Gradlarına Göre HIF-1 Protein Düzeyleri

4.3.2. Dokuda CA9 Protein Düzeyleri

Hastaların tümör ve normal dokuları CA9 protein düzeyleri açısından kıyaslandığında tümörde CA9 protein düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Tümör doku örneklerinde CA9 proteinin ortalanca değeri 2865 pg/ml iken normal doku örneklerindeki ortalanca değeri 14 pg/ml'dir.

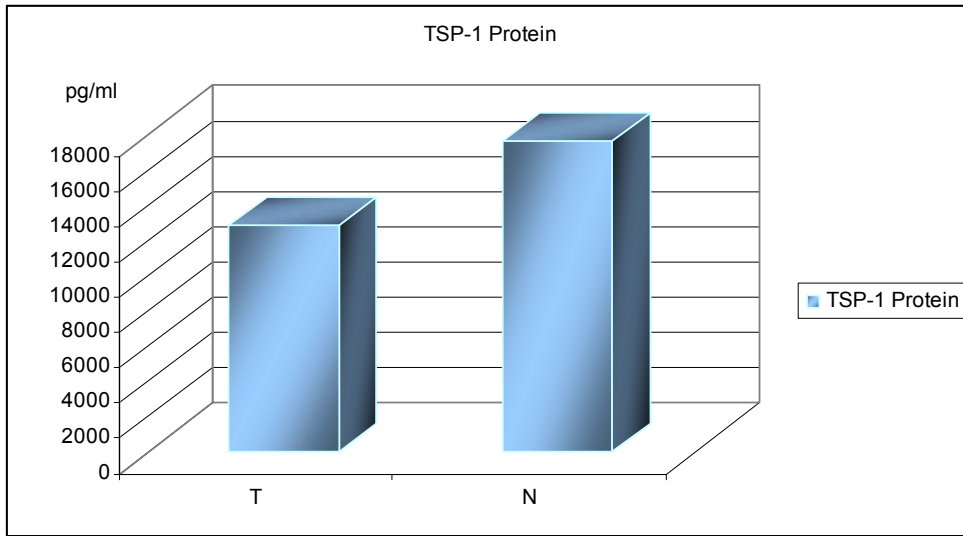


Şekil 4-16: Tümör ve Normal Doku Örneklerinde CA9 Protein Düzeyleri

Hastaların CA9 protein düzeyleri ile gen ifadesi düzeyleri arasında uyumlu bir ilişki vardır ($p=0,003$).

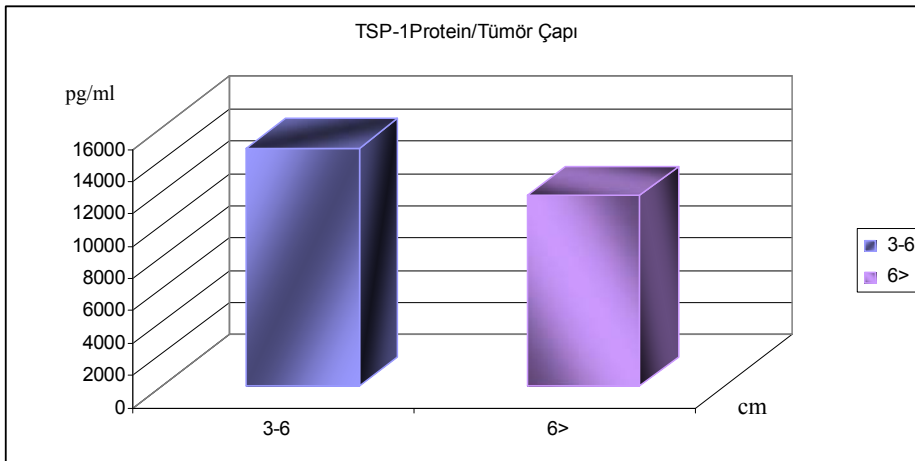
4.3.3. Dokuda TSP-1 Protein Düzeyleri

TSP-1 protein düzeyleri, hastaların normal doku örneklerinde tümör doku örneklerine oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,001$). Tümör örneklerinde TSP-1 proteinin ortalanca değeri 12,911 ng/ml, normalde ise 17,634 ng/ml'dir (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: Tümör ve Normaldeki TSP-1 Protein Düzeyleri

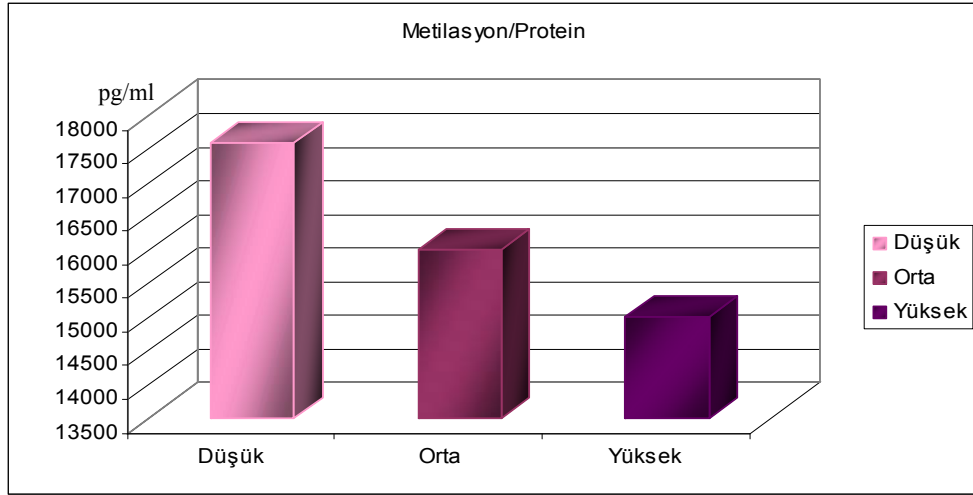
TSP-1 protein düzeyi ile hastaların tümör çapı arasında ters orantılı bir ilişki olduğu görülmektedir ($p=0,048$). Tümör çapı 3-6cm arası olanlarda ortalama TSP-1 protein düzeyi 14,748 ng/ml, çapı 6> cm olanlarda ise 11,798 ng/ml dir (Şekil 4-18).



Şekil 4-18: TSP-1 Protein Düzeyleri ve Tümör Çapı Arasındaki İlişki

TSP-1 protein düzeyi, hastaların diğer klinik parametreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

TSP-1 geninde metillenme oranı ile genin protein düzeyinin ters orantılı oldukları görülmektedir ($p=0,011$). Düşük derece metillenme (%0-25) görülenlerde ortalama TSP-1 protein değeri 17,6ng/ml, orta derece metillenme (%26-55) görülenlerde 16 ng/ml, yüksek metillenme (%56-100) görülenlerde ise 15 ng/ml'dir (Şekil 4-19).



Şekil 4-19: TSP-1 Protein Düzeyleri İle Metillenmenin Karşılaştırılması

TSP-1 protein düzeyleri CA9 ve HIF-1 protein düzeyleri ile kıyaslandığında aralarında ters orantılı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,012$, $p=0,011$).

5. TARTIŞMA

Damarlanması yoğun bir kanser olan böbrek kanserinde anjiyogenez önemli bir yer tutmaktadır. Anjiyogenezin etkinleşmesi ve baskılanmasından sorumlu moleküller bu kanserin prognozu açısından da önem taşır.

Bu nedenle çalışma kapsamında anjiyogenezin etkinleşmesinde önemli role sahip olan HIF-1 , onun etkinleşmesiyle ifade düzeyi artan CA9 ve anjiyogenezin baskılanmasında görev alan TSP-1 molekülleri incelenmiştir. Bu üç molekülün BHK da dahil, pek çok karsinomda tanı, takip ve tedavi açısından ayrı ayrı araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Ancak literatürde üç parametrenin birlikte değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu moleküller ile yapılan çalışmaların çoğunluğunda immünohistokimya, bir kısmında Western Blot, küçük bir kısmında da RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda mRNA ifade analizi için nicel sonuç veren Gerçek Zamanlı-PCR ve protein ölçüm metodlarından da gene nicel sonuç veren ELISA yöntemleri seçilmiştir.

Anjiyogenezi denetleyen etmenlerin bir çoğu doğrudan ya da dolaylı olarak doku oksijen dengesinin düzenleyicisi olan HIF-1 α tarafından kontrol edilir. HIF-1 α damarlanmanın yoğun olduğu doku hücrelerinde hayati bir rol oynar. HIF-1 α , hem glukoz/enerji metabolizmasında gerekli olup hem de anjiyogenez ve tümör progresyonu ile ilgilidir. Dokuda O₂ seviyesi azaldığında bir çok anjiyogenik etmeni etkinleştirerek damar oluşumuna yol açar ve oksijen seviyesini yükseltir (69). HIF-1 α 'nın etkinleşmesi sonucunda VEGF ve CA9 gibi hipoksi ile uyarılan genler etkinleşir (5,14,50,52). Prostat, meme gibi yaygın görülen çoğu kanserde artmış damarlanma ve tümör progresyonu ile ilgili HIF-1 α geninin aşırı ifade edildiği gözlenir (64).

Prostat kanserli hastalar ile yapılan bir çalışmada kanda RT-PCR ile HIF-1 α gen ifade düzeyi incelenmiş, HIF-1 α gen ifade düzeyi erken evre prostat kanserlerinde, kanser olmayanlara ve nodüler hiperplazilere oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (96). Çalışmamızda da hastalarımızın tümör ve normal doku örnekleri nicel Gerçek Zamanlı PCR yöntemi ile HIF-1 α gen ifadesi açısından kıyaslandığında tümör doku örneklerinde ifadenin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür.

Çalışma grubumuzdaki hastaların tümör örneklerinde de HIF-1 α protein düzeyleri normallere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgu HIF-1 α protein düzeyinin Western Blot ve immünohistokimya ile incelendiği çalışmalarla aynı doğrultudadır (97,100) ve tümörlerde HIF-1 α protein düzeyinin yüksek ve mikrodamar yoğunluğu ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalarla da uyumludur (63,59).

Ancak hastaların HIF-1 gen ifade düzeyi ile protein miktarları karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

HIF-1 proteininin yarılanma ömrü 5 dakikadan azdır ve oda ısısında birkaç dakika içinde bozulabilmektedir (100,101). HIF-1'in bu özelliği dikkate alınarak gen ifade düzeyi ile protein düzeyi arasındaki uyumsuzluğun doku örneklerinin ameliyathaneden optimal saklama koşullarına ulaştırılmasına kadar geçen sürede yıkıma uğramasından kaynaklandığı düşünülebilir. Literatürde benzer şekilde, HIF-1 α geninin ifadesi ile ve protein düzeyi arasında uyum gözlenmeyen başka çalışmalar mevcuttur (100,101).

HIF-1 α protein düzeyleri hastaların tümör gradlarına göre anlamlı farklılık göstermektedir. Bu sonuç belirtilen çalışmalarla uyumlu olup HIF-1 α 'nın prognoz açısından önemine işaret etmektedir (102,103). Diğer yandan HIF-1 α 'nın agresif tümörlerde lokal tümörlere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (97).

CA9, hipoksik koşullar altında hızla ve aşırı derecede ifade edilen, tümör hücre hipoksisi ile ilgili olduğu en iyi bilinen genlerden biridir (74). CA9 geninin solid tümörlerde, özellikle berrak hücreli böbrek kansinomu, serviks, over, kolon, baş-boyun, mesane ve küçük hücreli dışı akciğer kansinomlarında aşırı ifade edildiği bildirilmiştir (59,73,78-80,99).

Çalışmamızda tümör örneklerinde CA9 gen ifadesinin normal dokuya kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. CA9 gen ifadesi düşük gradlı olgularda da yüksek gradlılara göre anlamlı derecede yüksektir. Bu sonuç düşük evreli, düşük gradlı ve metastaz varlığı görülmeyen hastalarda CA9 seviyelerinin daha yüksek olduğunu bildiren çalışmalarla uyumludur (73,80,99,104). Buna karşılık BHK dışındaki kanserlerde yüksek CA9 gen ifadesinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (59,79).

CA9 gen ifadesinin erken evrelerde hipoksiye uyum nedeniyle arttığı ve bunun tümöre büyüme ve yayılma avantajı sağladığı buna karşılık habis tümör büyüdükçe

CA9'a gerekliliğin azalması nedeniyle gen ifadesinin de azaldığı ileri sürülmüştür (73,80). Çalışmamızda CA9 protein düzeylerinin tümör doku örneklerinde normal doku örneklerine kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüş CA9 protein miktarları ile gen ifade düzeyleri arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu parametrenin klinik gidişi ve tümör davranışını tahmin etmek için kullanılabileceği gibi adjuvan immünoterapiden ve CA9'a yönelik tedavilerden yararlanabilecek yüksek riskli hastaları belirlemek açısından da yararlı olacağını düşündürmektedir (73,80,104).

HIF-1 α ve CA9 gen ifade düzeyleri arasında beklendiği gibi anlamlı bir ilişki görülmektedir. Bu ilişki gerek BHK gerekse akciğer kanserinde yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (59,105,106).

Doku oksijen seviyesindeki azalma ile CA9'un etkinleştiği ve TSP-1'in de engellendiği bilinmektedir. Potansiyel bir anjiyogenez baskılayıcısı olan TSP-1'in bir çok çalışmada tümör baskılayıcı özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir (98). Bu molekül anjiyogenik uyarıların geniş bir çeşidine cevap olarak endotel hücre göçünü baskılama, endotel hücresinde apoptozu etkinleştirme ve yeni damar oluşumunu önleme yeteneğine sahiptir (83,84). Çalışmamızda hastaların tümör ve normal dokularında TSP-1 gen ifadesinin belirgin fark gösterdiği bulunmuştur. Normal dokuda gen ifadesi ve protein düzeyleri tümöre göre anlamlı ölçüde yüksektir. Bu bulgu BHK olgularında daha önce immünohistokimya, Western blot ve Gerçek Zamanlı-PCR kullanılarak bildirilmiş olan sonuçlarla uyumludur (45,94,82). TSP-1 protein düzeyi ile hastaların tümör çapı arasında ters orantılı bir ilişki olduğu görülmektedir. BHK da yapılan çalışmalarda da benzer olarak TSP-1'in tümör büyüklüğü ve anjiyogenez ile ters orantılı olduğu gözlenmiştir (81,107).

TSP-1 geninin yazılımının baskılanmasının gende metillenmeye bağlı olarak gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Bazı çalışmalarda BHK ve diğer kanserlerde TSP-1 geninin promotör bölgesinde yüksek oranda metillenme bildirilmiştir (45,82). Çalışmamızda beklentiler doğrultusunda tümör örneklerinde TSP-1 geninde daha yüksek düzeyde metillenme gözlenmiş ve TSP-1 geninin metillenmesi ile genin ifade düzeyi ve protein düzeyi arasında ters orantılı bir ilişki bulunduğu görülmüştür. Benzer bir ilişki TSP-1 geni için beyin epitel hücrelerinde bildirilmiştir (84).

TSP-1 gen ifade düzeyi ile protein miktarları karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Protein düzeyi ile gen ifade düzeyi arasında anlamlı

bir uyum bulunmamasının, genin yazılımı sonrasındaki düzenlenme veya proteine çevirim aşamalarında, ya da çevirim sonrası gerçekleşen aşamalardaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Hastaların TSP-1 protein düzeyleri CA9 ve HIF-1 α protein düzeyleri ile ters orantılı olup aralarındaki ilişki anlamlıdır. İlgili moleküllerin anjiyogenez üzerindeki zıt etkileri düşünüldüğünde bu beklenen bir sonuçtur.

Bulgularımız HIF-1 α , CA9 ve TSP-1 ifadeleri ile protein düzeylerindeki buna bağlı değişikliklerin böbrek tümörünün patogenezindeki olası rolünü desteklemekte ve bu moleküllerin kanser oluşumu ve hastalık takibi açısından böbrek kanseri için uygun belirleyiciler olabileceklerine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Tuncer İ, Gönlüşen G. İçinde Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editörler. Çevikbaş U, çeviri editörü. Böbrek ve Toplayıcı Sistemi. *Temel Patoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2000. 439-469.
- 2- Özcan F. İçinde Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN, editörler. Ürolojik ve Erkek Genital Kanseri. *Klinik Onkoloji*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 2000. 140-56.
- 3- Furge KA, Lucas KA, Takahashi M ve ark. Robust classification of renal cell carcinoma based on gene expression data and predicted cytogenetic profiles. *Cancer Research* 2004; **64**:4117-21.
- 4- Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA ve ark. *Böbrek Hücreli Karsinom Kılavuzu*. Avrupa Üroloji Derneği. 2006.
- 5- Novick AC, Campbell SC. İçinde Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editörler. Renal Tumors. *Campbell's Urology*. 8th edition. New York: WB Saunders Co Ltd; 2002. 2672-2731.
- 6- Tüzel E, Kırkal Z. İleri evre böbrek hücreli kanser tedavisinde yeni gelişmeler. *Türk Üroloji Dergisi* 2007; **33**: 385-391.
- 7- Lindblad P. Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scan J Sur* 2004; **93**: 88-96.
- 8- Landis SH, Murray T, Bolden S ve ark. Cancer statistics,1999. *CA Cancer J Clin* 1999; **49**:8-31.
- 9- Yörükoğlu K. Böbrek hücreli kanserlerde sınıflama, Sitogenetik ve patolojik prognostik faktörler. *Türk Üroloji Dergisi* 2005; **31**: 305-317.
- 10- Pischon T, Lahmann PH, Boeing H ve ark. Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2006; **118**: 728-738.

- 11- Weikert S, Boeing H, Pischon T ve ark. Fruits and vegetables and renal cell carcinoma: findings from the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2006; **118**: 3133-3139.
- 12- Indolfi P, Trenziani M, Casale F ve ark. Renal cell carcinoma in children: a clinicopathologic study. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 530-535.
- 13- Chow WH, Devesa SS, Warren JL ve ark. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999; **281**: 1628-1631.
- 14- Richard S. Von hippel-lindau disease: recent advances and therapeutic perspectives. *Expert Rev Anticancer Ther* 2003; **3**:215-233.
- 15- Mc Laughlin JK, Lipworth L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin Oncol* 2000; **27**:115-123.
- 16- Latif F, Tory K, Gnarr J ve ark. Identification of the von hippel-lindau disease tumor supressor gene. *Science* 1993; **260**: 1317-1320.
- 17- Kaelin WG, Iliopoulos O, Lonergan KM ve ark. Functions of the von hippel-lindau tumor supressor protein. *J Intern Med* 1998; **243**: 535-539.
- 18- Rathmell WK, Godley PA. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2004; **16**:247-252.
- 19- Tickoo SK, Venturina MN, Harik LR ve ark. Spectrum of epithelial neoplasms in end-stage renal disease: an experience from 66 tumor-bearing kidneys with emphasis on histologic patterns distinct from those in sporadic adult renal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2006; **30**:141-153.
- 20- Petrolla AA, MacLennan GT. Renal cell carcinoma associated with end stage renal disease. *J Urol* 2006; **176**:345.
- 21- Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA ve ark. Renal cell carcinoma guideline. *European Urology* 2007; **51**: 1502-1510.

- 22- Bergstrom A, Hsieh CC, Lindblad P ve ark. Obesity and renal cell cancer-a quantitative review. *Br J Cancer* 2001; **85**: 984-990.
- 23- Yuan JM, Castelao JE, Dominguez MG ve ark. Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; **7**:429-433.
- 24- Shapiro JA, Williams MA, Weiss NS ve ark. Hypertension, antihypertensive medication use, and risk of renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol* 1999; **149**: 521-30.
- 25- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; **9**: 653- 660.
- 26- Dvorak HF. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003; **162**: 1747–57.
- 27- Dibbens JA, Miller DL, Damert A ve ark. Hypoxic regulations of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation multiple RNA elements. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 907-19.
- 28- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ ve ark. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; **246**:1306-309.
- 29- Allure R. Basement membranes: Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 422- 433.
- 30- Haroon ZA, Peters KG, Greenberg CS ve ark. İçinde Teicher BA, editör. Angiogenesis and Oxygen Transport in Solid Tumors. *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy*. Totowa, Humana Press; 1999. 3- 21.
- 31- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**: 669–76.
- 32- Lawrence WT, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol* 1994; **12**: 157- 169.
- 33- Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells* 2003; **21**: 118–119.

- 34- Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996; **32**: 2423–2429.
- 35- Hu DE, Hori Y, Fan TP. Interleukin 8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation* 1993; **17**: 135- 143.
- 36- Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 505- 515.
- 37- Fernandez PM, Rickles FR. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol* 2000; **9**: 401-406.
- 38- Stone J, Itin A, Alon T ve ark. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 1995;**15**: 4738- 4747.
- 39- Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S ve ark. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 1512- 1520.
- 40- Servos S, Zachary I, Martin JF. VEGF modulates NO production: The basis of a cytoprotective effect? *Cardiovasc Res* 1999; **41**: 509-510.
- 41- Pepper MS, Ferrara N, Orci L ve ark. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**: 902- 906.
- 42- Turhan MS. Meme tümörlü hastalarda vasküler endotelial büyüme faktörü, nitrik oksit ve ürokinaz plazminojen aktivator. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıpta Uzmanlık tezi, 2004.
- 43- Ali İhsan Taşçı, Çetin Dinçel. İçinde Haluk Özen, Levent Türkeri, editörler. Böbrek Tümörleri. *Üroonkoloji*. İzmir: Üroonkoloji Derneği; 2007. 558-705.
- 44- Distler JH, Hirth A, Kurowska SM ve ark. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *J Nucl Med* 2003; **47**: 149- 161.

- 45- Arai E, Kanai Y, Fujimoto H ve ark. Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int J Cancer* 2006; **119**: 288-96.
- 46- Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **59**: 21- 6.
- 47- Steiling H, Werner S. Fibroblast growth factors: Key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Curr Opin Biotechnol* 2003; **14**: 533- 537.
- 48- Betsholtz C. Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Res Part C Embryo Today* 2003; **69**: 272- 285.
- 49- Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 2003; **98**: 257- 265.
- 50- Gnarra JR, Zhou S, Merrill MJ ve ark. Post- transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor supressor gene. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 10589-10594.
- 51- Campbell SC. Advaces in angiogenesis research: Relevance to urological oncology *J Urol* 1997; **158**:1663-1667.
- 52- Illiopoulos O, Levy AP, Jiang C ve ark. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von hippel lindau protein. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1996; **93**:10595-10599.
- 53- Stadler WM, Shapiro CL, Sosman J ve ark. A multi-institutional study of the angiogenesis inhibitor TNP-470 in metastatic renal cell carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; **17**:310.
- 54- Barrett JS, Szego P, Rohatagi S ve ark. Absorption and presystemic metabolism of selegiline hydrochloride at different regions in the gastrointestinal tract in healthy males. *Pharm Res* 1996; **13**:1535-40.

- 55- de Wit R, Pawinsky A, Stoter G ve ark. EORTC phase II study of daily oral linomide in metastatic renal cell carcinoma patients with good prognostic factors. *Eur J Cancer* 1997; **33**:493-5.
- 56-Carter SK. Clinical strategy for the development of angiogenesis inhibitors. *Oncologist* 2000; **5**:51–54.
- 57- Canda AE, Kırkalı Z. Current management of renal cell carcinoma targeted therapy. *J Urology* 2006; **3**: 1-14.
- 58- Koukourakis MI, Giatromalonaki A, Sivridis E, ve ark. Hypoxia-activated tumor pathways of angiogenesis and pH regulation independent of anemia in head-and-neck cancer. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2004; **59**: 67-71.
- 59- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E ve ark. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 7992-7998.
- 60- Diaz-Gonzalez JA, Russell J, Rouzaut A ve ark. Targeting hypoxia and angiogenesis through HIF-1alpha Inhibition. *Cancer Biol Ther* 2005; **4**:1055-62.
- 61- Hughson MD, He Z, Liu S ve ark. Expression of HIF-1 and ubiquitin in conventional renal cell carcinoma: relationship to mutations of the von hippel-lindau tumor suppressor gene. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; **143**:145-53.
- 62- Kashyap MK, Kumar A, Emelianenko N ve ark: Biochemical and molecular markers in renal cell carcinoma: an update and future prospects. *Biomarkers* 2005; **10**:258-94.
- 63– Turner KJ, Moore JW, Jones A. Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: relationship to angiogenesis and to the von hippel-lindau gene mutation. *Cancer Res* 2002; **62**: 2957–2961.

- 64- Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA ve ark. Identification of small molecule inhibitors of Hypoxia Inducible Factor-1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res* 2002; **62**: 4316-4324.
- 65- Chun YS, Choi E, Kim TY ve ark. A dominant-negative isoforms lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia inducible factor-1 α gene. *Biochem J* 2002; **362**:71-79.
- 66- Chun YS, Choi E, Kim GT ve ark. Cadmium blocks hypoxia-inducible factor (HIF)-1 mediated response to hypoxia by stimulating the proteasome-dependent degradation of HIF-1 α . *Eur J Biochem* 2000; **267**:4198-4204.
- 67- Chan DA, Sutphin PD, Denko NC ve ark. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized Hypoxia-inducible Factor- 1 α . *J Biol Chem* 2002; **277**: 40112-40117.
- 68- Sanchez T, Hernandez TE, Paik JH ve ark. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem* 2003; **278**: 47281-47290.
- 69- Ho T, Rajkumar V, Ponticos M ve ark. Increased endogenous angiogenic response and hypoxia- inducible factor-1alfa in human cricital limb ischemia. *J Vasc Surg* 2006; **43**: 125-33..
- 70- Peter U, Uzzo NJ, Chu CR ve ark. Tonic activation of hypoxia inducible factor 1 alpha in avaskular articular cartilage and implications for metabolic homeostasis. *Arthritis&Rheumatism* 2005; **52**:3181-3191.
- 71- Turner KJ, Moore JW, Jones A ve ark. Expression of hypoxia inducible factors in human renal cell cancer: relationship to angiogenesis and to the von hippel lindau gene mutation. *Cancer Res* 2002; **62**: 2957-61.
- 72- Grabmaier KA, de Weijert MC, Verhaegh GW ve ark. Strict regulation of CAIX (G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 2004; **23**: 5624-5631.

- 73- Murakami Y, Kanda K, Tsuji M ve ark. MN/CA9 gene expression as a potential biomarker in renal cell carcinoma. *BJU Int* 1999; **83**: 743-747.
- 74- Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH ve ark. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild- type von hippel-lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**:12596-601.
- 75- Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH. Hypoxia- inducible expression of tumor associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; **60**:7075-83.
- 76- Zagzag D, Krishnamachary B, Yee H ve ark. Stromal cell-derived factor-1 alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von hippel- lindau loss of function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer Res* 2005; **65**: 6178-6188.
- 77- Leppert JT, Lam JS, Pantuck AJ ve ark. Carbonic anhydrase IX and the future of molecular markers in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2005; **96**: 281- 285.
- 78- Dorai T, Sawczuk IS, Pastorek J ve ark. The role of carbonic anhydrase IX over expression in kidney cancer. *Eur J Cancer* 2005; **41**: 2935-2947.
- 79- Loncaster JA, Haris AL, Davidson SE ve ark. Carbonic Anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 2001; **61**: 6394-6399.
- 80- Soyupak B, Erdogan S, Ergin M ve ark. CA9 expression as a prognostic factor in renal clear cell carcinoma. *Urol Int* 2005; **74**: 68-73 ;2005.
- 81- Baltacı S, Orhan D, Göğüş Ç ve ark. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in renal cell carcinoma and their relationship with multifocality. *Eur Urol* 2003; **44** : 760-81.
- 82- Yang QW, Liu S, Tian Y ve ark. Methylation-associated silencing of the Thrombospondin-1 gene in human neuroblastoma. *Cancer Res* 2003; **63**: 6299-6310.

83- Ohta Y, Shridhar V, GP Kalemkerian ve ark. Thrombospondin-1 expression and clinical implications in malignant pleural mesothelioma. *Cancer* 1999; **85** :2570-2576.

84- Hu CJ, Chen SD, Yang D Y ve ark. Promoter region methylation and reduced expression of thrombospondin-1 after oxygen–glucose deprivation in murine cerebral endothelial cells. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2006; **26**: 1519–1526.

85- Grossfeld GD, Carroll PR, Lindeman N ve ark. Thrombospondin-1 expression in patients with pathologic stage T3 prostate cancer undergoing radical prostatectomy: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *Urology* 2002; **59**:97-102 .

86- TSP-1 Induced Apoptosis in Microvascular Endothelial Cell (internette-erişim 03.02.2008)

[http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_tsp1 Pathway](http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_tsp1_Pathway)

87- Yasuyoshi M, Shigehiko K, Kousuke T ve ark. Expression of thrombospondin-derived 4N1K peptide-containing proteins in renal cell carcinoma tissues is associated with a decrease in tumor growth and angiogenesis . *Clin Cancer Res* 2003; **9** :1734-1740.

88- Ushijima T, Morimura K, Hosoya Y. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1997; **94**: 2284.

89- Razin SV. Spatial organization of the eukaryotic genome and the action of epigenetic mechanisms. *Genetika* 2006; **42**:1605-14.

90- Costa VL, Henrique R, Ribeiro FR ve ark. Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors. *BMC Cancer* 2007; **7**:133.

- 91- Baylin SB, Makos M, Wu JJ ve ark. Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer Cells* 1991; **3**: 383-90.
- 92- Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 1996; **56**: 2463-7.
- 93- Adam S Kibel, Joel B Nelson. İçinde Walsh Retik, Vaughan Wein, editörler. Moleküler Genetik ve Kanser Biyolojisi. Sekizinci baskı, *Campbell Üroloji*. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2005. Cilt 4, S.2653.
- 94- Damber JE, Vallbo C, Albertsson P ve ark. The anti-tumour effect of low-dose continuous chemotherapy may partly be mediated by thrombospondin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; **58**:354-60.
- 95- Mapping Protein/DNA Interactions by Cross-Linking Examining the Distribution of Telomeric and DNA Repair Proteins by ChrIP and Real-Time PCR. (İnternette-Erişim 13.10.2008)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=inserm.figgrp.336>
- 96- Pipinikas CP, Carter ND, Corbishley CM ve ark. HIF-1alpha mRNA gene expression levels in improved diagnosis of early stages of prostate cancer. *Biomarkers* 2008; **13**: 680-91.
- 97- Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K ve ark. The expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:1129-35.
- 98- Li Q, Ahja N, Burger PC. Methylation and silencing of the thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 1999; **18**: 3284-3289.
- 99- Li G, Feng G, Perret AG ve ark. CA9 gene expression in conventional renal cell carcinoma: a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *Clin Exp Metastasis* 2007; **24**: 149–155.

- 100-Wiesener MS, M nchenhagen PM, Bergerve I ve ark. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res* 2001; **61**: 5215–5222.
- 101- Chien CY, Tai CF, Ho KY ve ark. Expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in the nasal polyps by real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;**139**: 206-10.
- 102- Formento JL, Berra E, Ferrua B ve ark. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for pharmacological studies targeting hypoxia-inducible factor 1 . *Clin Diag Lab Immunol* 2005;**12**:660-664.
- 103- SemenzaGL. Transcription factors as targets for chemoprevention. Involvement of hypoxia-inductible factor 1 in preinvasive and early-stage cancer. Symposium 6. Proc Amer Assoc Cancer Res 2005; **46**.
- 104- Bui MHT, Seligson D, Han K ve ark. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clinical Cancer Research* 2003; **9**: 802–811.
- 105- Grabmaier K, Weijert MC, Verhaegh GW ve ark. Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2004; **23**: 5624-31.
- 106- Hui EP, Chan AT, Pezzella F, Turley H ve ark. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res* 2000; **8**: 2595-604.
- 107- Miyata Y, Koga S. Expression of thrombospondin-derived 4N1K peptide-containing proteins in renal cell carcinoma tissues is associated with a disease in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 1734-1740.

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hülya	Soyadı	Tıǧlı
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	25.12.1978
Uyruđu	T.C.	TC Kim No	20978277204
Email	hulyatigli@yahoo.com	Tel	0 532 714 16 77

Eđitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü	2002
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	1999
Lise	Vefa Lisesi	1995

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü	2000
2.			-

Yabancı Dilleri	Okuduđunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	63.750	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word, Excel, Powerpoint	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası Yayınlar

- Hulya Tigli, Hulya Yazici, Nejat Dalay – CYP17 Genetic polymorphism in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology. 2003;113-114:307-14.

- Hulya Yazici,¹ Hulya Tigli,¹ Zuleyha Kadehçi,² Seden Kucucuk,² Pinar Saip,³ Halim Issever,⁴ Hilmi Ozcelik,⁵ and Nejat Dalay¹ -Are CYP17 Genotypes a Biomarker for Ovarian Cancer in Patients With Cancer History in Their Family? Oncology Research, 2006;16(1),43-47.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Posterler

- Tigli H.¹, Sanli O.², Tezer M.², Tefik T.², Ozcan F.², Dalay N.¹. Single Nucleotide Polymorphism In The Estrogen Receptor (ER) Gene Constitutes A Risk Factor For Prostate Cancer But Not For RCC. European Association of Urology 1st Eastern Mediterranean Meeting 19-20 October 2007 Glorai Convention Centre, Antalya,Turkey.

- 23rd Annual EAU Congress – Winner Poster Presentation, 26-29 March 2008, Milan, Italy.

- Tigli H.¹, Yazici H.¹ Sanli O.², Acar O.², Ates O.², Esen T.², Dalay N.¹.The Role Of Expression Of The PSA Gene And CYP17, ER , Insulin Polymorphisms In Prostate Cancer. EAU 4th South Eastern European Meeting, Tiran ,17-18 Ekim,2008.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

- Yazici H, Zipprich J, Peng T, Akisik EZ, Tigli H,Isin M, Akisik EE, Terry MB, Senie RT, Li L, Peng M, Liu Z, Dalay N, Santella RM. “ Lack of the miR16-1 (C>T)+7 substitution in six different types of cancer from three ethnic groups’ 7th AACR / JCA Joint Conference, In the Forefront of Basic and Translational Cancer research, January 21-26th, 2007, Kona, Big Island, HI, USA (Abstract No: C28).

- Hulya Yazıcı, Hui-Chen Wu, Hulya Tıgılı, Elif. Z. Akisik, Rejin Kebudi, İnci Ayan, Gonul Peksayar, Nejat Dalay, Regina M. Santella. Genome-wide methylation levels in peripheral blood and tumor tissue of retinoblastoma patients and their healthy sibling. April 13-18, 2007, AACR-Annual Meeting 2007, Los Angeles Convention Center, Los Angeles, CA, USA.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Posterler

- Hülya Tıgılı, Hülya Yazıcı, Nejat Dalay – Prostat Kanseri Hastalarında CYP17 Gen Polimorfizminin Araştırılması- XV. Ulusal Kanser Kongresi, 23-27 Nisan 2003, Antalya – Kemer .

- Yazıcı H, Tıgılı H, Saip P, Buyru F, Issever H, Dalay N – BRCA1/2 Gen Mutasyonu Taşımayan Sporadik Over Kanseri Hastalarında CYP17 ve WAF1 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması- XV. Ulusal Kanser Kongresi, 23-27 Nisan 2003, Antalya- Kemer .

- Hülya Tıgılı, Hülya Yazıcı, Nejat Dalay - PSA ARE1 Gen Polimorfizminin Prostat Kanseri Riski İle İlişkisi – 1. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi 16-19 Nisan 2005.

- Hülya Tıgılı, Hülya Yazıcı, Nejat Dalay- Prostat Kanseri Hastalarında PSA ve PSM Genlerinin RT-PCR Yöntemi ile İncelenerek Mikrometastaz Varlığının Araştırılması - XVI Ulusal Kanser Kongresi 20-24 Nisan 2005.

- Hülya Tıgılı, Nejat Dalay . Prostat kanserinde PSA ve PSM Gen Ekspresyonu ve Promotör Bölge Değişikliklerinin İncelenmesi - XVII Ulusal Kanser Kongresi 19-23 Nisan 2007.

- Hülya Yazıcı, Hülya Tıgılı, Elif Z. Akışık, Rejin Kebudi, İnci Ayan, Gönül Peksayar, Regina M. Santella. Retinoblastoma Onkogenezinde Genom Düzeyindeki Global Metilasyonun Etkisinin Araştırılması. VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 06-09 Mayıs 2008, Çanakkale.

- Hülya Tıgılı, Öner Şanlı, Tzevat Tefik, Murat Tezer, Ömer Acar, Nur Buyru, Nejat Dalay, Tarık Esen, Faruk Özcan. Anjiyogenez İle İlişkili TSP-1, HIF-1 α Ve CA9 Genlerinin Böbrek Kanseri Hastalardaki Rolü. 20. Ulusal Üroloji Kongresi-1-6 Kasım 2008, Antalya.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

- Hülya Tıǒlı, Nejat Dalay. Prostat Kanserinde PSA Gen Ekspresyonu İle CYP17, ER alfa Polimorfizmlerinin Rolü-X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 6-9 Eylül 2007,Antalya.
- Hülya Yazıcı, Hülya Tıǒlı, Elif Zeynep Akışık, Zübeyde Yalnız, Rejin Kebudi, İnci Ayan, Gönül Peksayar. Retinoblastoma Etiyolojisine Farklı Bir Bakış Açısı: 2. Hit'in Oluşmasında Genom Düzeyindeki Global Metilasyonun Etkisi Olabilir mi? XV. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi 21-25 Mayıs 2008,Çeşme-İzmir.
- Hülya Tıǒlı, Hülya Yazıcı , Öner Şanlı , Ömer Acar, Ömer Ateş, Tarık Esen, Nejat Dalay. Prostat Kanserinde PSA, PSM Gen Ekspresyonları İle CYP17 , ER , INS Polimorfizmlerinin Rolü. 20. Ulusal Üroloji Kongresi-1-6 Kasım 2008, Antalya.
- Hatice Tıǒlı, Hülya Tıǒlı, Öner Şanlı, Fatih Akbulut, Murat Tunç, Nur Buyru. Mesane Kanseri Hastalarda mTOR Sinyal Yolağında Yer Alan Rheb Proteininin Araştırılması. 20. Ulusal Üroloji Kongresi-1-6 Kasım 2008, Antalya.

Kazandığı Ödüller

- Prizma Moleküler Biyoloji Proje Yarışması 2006 Elips ve Akademi Teşvik Ödülü
- İ.Ü.Bilim Günleri-II , İ.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi , 2006 Başarılı Araştırmacı Belgesi
- R. Wolf Award, Third Prize at the European Association of Urology 1st Eastern Mediterranean Meeting in Antalya,Turkey ,2007.
- Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Pediatrik Onkoloji Araştırma Sözel Bildiri Ödülü. XV. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi 21-25 Mayıs 2008, Çeşme-İzmir.
- Second Karl Storz Award for Best Poster Presentation at the European Association of Urology 4th South Eastern European Meeting, Tirana,Albania,17-18 October 2008.

Katılım Belgeleri ve Sertifikalar:

- Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu - Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 9Nisan 2008.

-3.Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi Katılım Belgesi -29Mayıs-1Haziran2008 Harbiye, İstanbul

-3.Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi - Moleküler Biyoloji ve Genetik Metodlara Giriş Uygulamalı kursuna katılım belgesi.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Seyahat, yüzme, kitap okuma, resim.