

TEMMUZ 2015

Yüksek Lisans – Biyoloji Bölümü

ALPER DEMİRKÖK

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PAPİLLER TIP RENAL HÜCRE
KARSİNOMLARINDA ADAY TÜMÖR BASKILAYICI
GENLERİN EPİGENETİK ANALİZİ**

**BIYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ALPER DEMİRKÖK
TEMMUZ 2015**

**Papiller Tip Renal Hücre Karsinomlarında Aday Tümör
Baskılayıcı Genlerin Epigenetik Analizi**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Alper DEMİRKÖK

Temmuz 2015

© 2015 [Alper DEMİRKÖK]

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Papiller Tip Renal Hücre Karsinomlarında Aday Tümör Baskılayıcı Genlerin Epigenetik Analizi

Öğrencinin, Adı Soyadı: Alper DEMİRKÖK

Tez Savunma Tarihi: 07.07.2015

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Metin BEDİR
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.



Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Prof. Dr. Canan CAN

Yrd.Doç. Dr. Elif PALA

İmzası



.....
.....
.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Alper DEMİRKÖK

ABSTRACT

EPIGENETIC ANALYSIS OF CANDIDATE TUMOR SUPPRESSOR GENES IN PAPILLARY RENAL CELL CARCINOMA

DEMİRKÖK, Alper

M.Sc. İn Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

July, 2015

65 page

Papillary renal cell carcinoma (pRCC) accounts for 10-15% of renal cell carcinomas. pRCC is a type of renal cell cancer resistant to classical chemotherapy and immunotherapy. Although the role of DNA hypermethylation in pathogenesis of RCC was demonstrated previously, our knowledge in pRCC is limited. The aim of this study was to determine the methylation status of CST6, RPRM and GREM1 genes in pRCC patients. After bisulfite conversion of DNAs isolated from paraffine embedded tumor and adjacent normal tissues of 22 patients. Methylation Specific PCR was performed. Methylation frequencies for GREM1, CST6 and RPRM genes were found as % 41 (9/22), 14% (3/22) and 59% (13/22), respectively. No significant association was found between methylation status and sex, age and pathological grade ($p > 0.05$). As a result; it can be thought that promoter methylation in GREM1, CST6 and RPRM genes may have a role in the pathogenesis of pRCC. However, further studies by using different molecular techniques are needed to clarify these results.

Keywords: Papillary RCC (pRCC), Hypermethylation, CST6, GREM1, RPRM.

ÖZET

PAPİLLER TİP RENAL HÜCRE KARSİNOMLARINDA ADAY TÜMÖR BASKILAYICI GENLERİN EPİGENETİK ANALİZİ

DEMİRKÖK, Alper

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Temmuz, 2015

65 sayfa

Papiller Renal Hücreli Kanser (pRHK), böbrek hücreli kanserlerin %10-15'ini oluşturmaktadır. pRHK geleneksel kemoterapiye dirençli bir böbrek karsinom tipidir. RHK patogenezinde DNA hipermetilasyonun faktörü daha önce gösterilmiş olmasına rağmen, pRHK ile ilgili literatür bilgilerimiz sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada amaç, pRHK hastalarında CST6, RPRM ve GREM1 genlerinin promotör bölgelerindeki metilasyon durumunun tespit edilmesidir. Toplamda 22 hastanın parafine gömülü tümör dokusu ve komşu normal dokusundan izole edilen DNA örneklerinde bisülfid dönüşümü yapıldıktan sonra Metilasyon Spesifik PCR yöntemi uygulanmıştır. GREM1, CST6 ve RPRM genlerinin metilasyon sıklığı sırasıyla % 41 (9/22) , %14 (3/22) ve %59 (13/22) olarak belirlenmiştir. Metilasyon durumu ile hastalarının cinsiyet, yaş ve patolojik evreleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0.05$). Sonuç olarak; GREM1, CST6 ve RPRM aday tümör baskılayıcı genlerdeki promotör bölge metilasyonunun pRHK patogenezinde etkili olabileceği düşünülebilir. Ancak bu sonuçların kesinleşmesi için farklı moleküler tekniklerle yapılacak çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Papiller RHK (pRHK), hipermetilasyon, CST6, GREM1, RPRM.

Çok kıymetli aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini sınırsız sabrıyla benimle paylaşarak beni yönlendiren Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden tez danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER'e,

Tez çalışmam için gerekli olan hasta grubunu temin edip, çalışmayı özveriyle takip eden, her zaman desteğini hissettiğim Sayın Prof. Dr. Metin KARAKÖK ve Sayın Uzman. Dr. Sevgül KARA'ya,

Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında tezimin her aşamasında yardım eden patoloji teknik elemanlarına, rapor-bölüm sekreterlerine ve tüm bölüm çalışanlarına,

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte çalıştığım, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, sevgilerini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım; Sayın Ar. Gör. Sevgi GEZİCİ, Sayın Nazlı BOZMAN, Sayın İbrahim KARAKUŞ ve Sayın Özge ATAKER'e

Bu çalışmaya FEF.11.10 no'lu proje ile maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Yönetim Birimi'ne,

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Aileme ve tez çalışmamın yazılım aşamasında desteğini gördüğüm, moral kaynağım olan sevgili eşim ve aileme,

Anabilim dalımızın diğer tüm çalışanlarına;

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	v
ÖZET	vi
İTHAF	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
BÖLÜM 1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser ve Moleküler Biyolojisi	1
1.2. Renal Hücreli Karsinom (RHK)	3
1.3. İnsidans, Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	4
1.4. Renal hücreli Karsinom Sınıflandırılması	6
1.5. Renal hücreli Karsinom Tipleri	8
1.5.1. Benign Tümörler	8
1.5.1.1.Papiller Adenom	8
1.5.1.2.Onkositom	8
1.5.2. Malign Tümörler	8
1.5.2.1.Berrak Hücreli Renal Hücre Karsinomu (bRHK)	8
1.5.2.2.Multiloküler Kistik Renal Hücre Karsinomu (MkRHK)	9
1.5.2.3.Papiller Tip Renal Hücreli Karsinom (pRHK)	9
1.5.2.4.Kromofob Tip Renal Hücreli Karsinom (kRHK)	11
1.5.2.5.Bellini'nin Toplayıcı Kanal Karsinomu	13
1.5.2.6.Renal Medüller Karsinomu	13
1.5.2.7.Xp11 Translokasyon Karsinomu.....	13
1.5.2.8.Nöroblastom İle İlişkili Renal Karsinom	14
1.5.2.9.İğsi Hücreli ve Müsinöz Tübüler Renal Karsinom	15

1.5.2.10. Sınıflandırılmayan Renal Hücreli Karsinom	15
1.6. Böbrek Kanserlerinde Gözlenen Genetik Değişimler	16
1.7. Renal Hücreli Karsinomların Derecelendirilmesi	18
1.8. Renal Hücreli Karsinomların Evrenmesi	18
1.9. Epigenetik ve Epigenetik Değişiklikler	20
1.9.1. DNA metilasyonu	21
1.10. Metilasyon ve Kanser	22
1.10.1. Genom Genelindeki Hipometilasyon	23
1.10.2. CpG Dinükleotidlerindeki Mutasyonlar	24
1.10.3. Tümör Baskılayıcı Genlerin Hipermetilasyonu	24
1.11. Metilasyonun Araştırılmasında Kullanılan Metodlar	26
1.12. Amaç	28
BÖLÜM 2. KAYNAK ÖZETLERİ	29
BÖLÜM 3. MATERYAL VE METODLAR	36
3.1 MATERYAL	36
3.1.1. Örnekler	36
3.1.2. Gerekli Materyaller	36
3.1.2.1. Alet ve Gereçler	36
3.1.2.2. Sarf Malzemeler ve Kimyasallar	37
3.2. METOT	38
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	38
3.2.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi.....	40
3.2.3. Bisülfid Dönüşümü (DNA Modifikasyonu)	40
3.2.4. MS-PCR (Metilasyon Spesifik PCR)	42
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	43
3.2.6. İstatistiksel Analizler	44
BÖLÜM 4. BULGULAR	45
4.1. Hastalara Ait Bulgular.....	45
4.2. DNA Kantitasyon Sonuçları	46
4.3. RPRM Genindeki Metilasyon Durumu	46
4.4. CST6 Genindeki Metilasyon Durumu	47
4.5. GREM1 Genindeki Metilasyon Durumu	48
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR	53

TABLULAR LİSTESİ

sayfa

Tablo 1.1. Renal hücreli Karsinom Sınıflandırılması	7
Tablo 1.2. Böbrek Tümörlerinde Sık Görülen Genetik Bulgular.....	17
Tablo 1.3. Fuhrman Derecelendirme Sistemi.....	18
Tablo 1.4. Renal Epitelyal Tümörlerde Evreleme.....	19
Tablo 3.1. QIAamp® DNA FFPE Kit İçeriği.....	38
Tablo 3.2. QIAGEN® EpiTect® Bisulfite Kit İçeriği	40
Tablo 3.3. MS-PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri	42
Tablo 3.4. Genlerin amplifikasyonu için hazırlanan PCR karışımlarının içeriği.....	43
Tablo 3.5. MS-PCR işlemi için uygulanan program.....	43
Tablo 4.1. pRHK hastalarından elde edilen dokulara ait bilgiler	45
Tablo 4.2. pRHK olgularının cinsiyet, yaş ve patolojik evre dağılımı.....	46
Tablo 4.3. pRHK hastalarında RPRM geninin metilasyon analizi	48
Tablo 4.4. pRHK hastalarında CST6 geninin metilasyon analizi	49
Tablo 4.5. pRHK hastalarında GREM1 geninin metilasyon analizi	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

sayfa

Şekil 1.1. Tip 1 (A) ve Tip 2 (B) papiller RHK mikroskopik görüntüsü	11
Şekil 1.2. Memeli genomundaki CpG adacıkları	21
Şekil 1.3. Ökaryotlarda DNA Metilasyonu	22
Şekil 1.4. Kanserde metilasyon görünümü	23
Şekil 1.5. Bisülfid muamelesinin sitozin ve 5'-MeC üzerindeki etkisi.....	27
Şekil 4.1. RPRM geninin MS-PCR analizine sonucu örnek jel görüntüsü	47
Şekil 4.2. CST6 geninin MS-PCR analizine sonucu örnek jel görüntüsü.....	47
Şekil 4.3. GREM 1 geninin MS-PCR analizine sonucu örnek jel görüntüsü.....	48

SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ

ml	Mililitre
mg	Miligram
nm	Nanometre
μ l	Mikrolitre
sn	Saniye
g	Gram
dk	Dakika
rpm	Dakikada Devir Sayısı
UV	Morötesi Işık veya Ultraviyole Işık
V	Volt
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
∞	Sonsuz
Bç	Baz Çifti
A	Adenin
A.D	Anlamlı Değil
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
BRCA1	Meme Kanseri Geni
BMP	Kemik Morfojenik Protein
bRHK	Berrak Hücreli Renal Hücre Karsinomu
CpG	Sitozin-Guanin Dizileri
C	Sitozin

CK20	Sitokeratin 20
CST6	Sistatin 6
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EtOH	Etil Alkol
EtBr	Etidyum Bromür
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FISH	Fluorescence In Situ Hybridisation
FND	Fuhrman nükleer derecesi
GREM1	Gremlin 1
HAT	Histone Acetyltransferas
HDAC	Histone Deacetylas
H4	Histon Proteini 4
H2B	Histon Proteini 2B
H2A	Histon Proteini 2A
kRHK	Kromofob Tip Renal Hücreli Karsinom
LOH	Heterozigozite Kaybı
M	Metile Olmuş
MET	MET protoonkogen, tirozin kinaz reseptörü
MkRHK	Multiloküler Kistik Renal Hücre Karsinomu
MGMT	O6- Metilguanin- DNA Metiltransferaz
MS-PCR	Metilsyona Özgü
N	Normal
N	Örnek sayısı-adeti
pRHK	Papiller Renal Hücreli Karsinom
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PTEN	Fosfat ve Tensin
p53	Tümör Protein 53

RT-PCR	Ters transkriptaz PCR
RB	Retinoblastoma
RHK	Renal Hücreli Karsinom
RNase	Ribonükleaz
sRHK	Sınıflandırılmayan Renal Hücreli Karsinom
SAM	S-Adenozil Metiyonin
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
T	Timin
TRİS	Hidroksimetil
TE	TRİS-EDTA Çözeltisi
TBG	Tümör Baskılayıcı Gen
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü, Beta 1
TFE3	Transkripsiyon Faktörü E3
TNM	Tümör, Nod ve Metastaz
U	Urasil
vd	Ve Diğerleri
VHL	Von Hippel-Lindau

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Kanser ve Moleküler Biyolojisi

Kanser dünyada en önemli insan sağlığı problemlerinden birisidir. Kanseri hücrelerimizin çoğalmasını, farklılaşmasını ve ölümünü kontrol eden genlerin hastalığı olarak tanımlamak mümkündür.

Kompleks bir hastalık olan kanser hem çevresel hem de kalıtsal faktörlerden kaynaklanmaktadır (Lichtenstein vd., 2000). Diyet, çevresel faktörler, kalıtılan mutasyonlar ve somatik mutasyonlar gibi faktörler kanserin açığa çıkma nedenleri arasında yer almaktadır. Hanahan ve Weinberg kanser hücrelerini karakterize eden altı özelliği, büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilme, büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlık, programlanmış hücre ölümünden (apoptozis) kaçabilme, sınırsız bölünme, çoğalma potansiyeline sahip olma, anjiogenezi sürekli destekleyebilme, doku invazyonu ve metastaz yapabilme olarak tanımlamışlardır (Oláh, 2005).

Kanser hücrelerinin bu altı özelliğinin ortaya çıkmasında ön planda olan iki gen grubu; onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Proto-onkogenler, bir hücrenin doğal hayat sürecinde normal hücresel faaliyetlerini idare eden genlerdir. Bu genler herhangi bir etkenle mutasyona uğradıklarında “işlev kazanımı” geçirerek onkogene dönüşmekte ve hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve ilerleyen süreçte de hücrelerin kanserleşmesine neden olmaktadır.

Proto-onkogenler; nokta mutasyonları, kromozomal translokasyonlar, yeniden düzenlenmeler, gen amplifikasyonları, hipermetilasyonlar ve hipometilasyonlar gibi birçok farklı yolla onkogenlere dönüşüp kanser oluşturma özelliği kazanmaktadırlar (Oláh, 2005).

Karsinogenezde önemli diğer bir etken olan tümör baskılayıcı genler; hücre çoğalmasını baskılamakta ve apoptozisin (programlı hücre ölümünün) indüklenmesinde görev almaktadırlar. Bu genlerin kaybı veya inaktive olması sonucu hücre proliferasyonunda artma, hücre ölüm sürecinde aksamlar gözlenmektedir. Bu nedenle tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar genel olarak “işlev kaybı” sonucunu ortaya çıkarmaktadır (Kleinsmith 2006; Martinez vd., 2003).

İlk olarak karakterize edilen tümör baskılayıcı gen, kalıtsal retinoblastoma hastalığından sorumlu olan RB genidir. RB geni koruyucu (“gatekeeper”) bir gen olarak tanımlanmaktadır. Bu gen tarafından kodlanan Rb proteini, büyüme faktörlerinin yokluğunda hücre farklılaşmasını baskılayan bir proteindir. Bu gende meydana gelen bir mutasyon sonucu retinada tümör oluşmaktadır (Martinez vd., 2003; Ashktorab vd., 2010). RB geninin tanımlanmasından sonra p53, APC, PTEN, TGF- β gibi birçok tümör baskılayıcı gen belirlenmiştir. Pek çok kanser türünün oluşumunda rolü olduğu bilinen p53 bu tümör baskılayıcı genler içinde en fazla ön plana çıkan gen olmuştur (Kleinsmith, 2006).

Özetle, genetik bir hastalık olan kanser birçok faktörün etkisi altında birçok basamaktan geçerek ortaya çıkmaktadır. Bu basamakların gerçekleşmesinde etken olan moleküler değişiklikler binlerce araştırmanın konusu olmuştur (Takayama vd., 2006). Bu araştırmalarla kanserin ortaya çıkış ve gelişim mekanizmasına dair önemli bilgiler açığa çıkarılmış olmasına rağmen Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2030 yılında dünya çapında 14 milyon kişinin kanser nedeni ile hayatını kaybedeceğini bildirmektedir. Kanser nedenli ölümlerin başında akciğer, mide, kolorektal, karaciğer, böbrek ve meme kanseri gelmektedir ve bu ölümlerin %70’inden fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde gerçekleşmektedir. Kanser görülme sıklığı içerisinde 8. sırada yer alan böbrek kanseri ise dünya çapında yılda yaklaşık 270.000 vaka içerisinde 116.000 kişinin ölümüne neden olmaktadır (Eble vd., 2004).

1.2. Renal Hücreli Karsinom (RHK)

Böbrekler 12. sırt omuru ile 3. bel omuru arasında uzanan, karın zarı arka duvarında yerleşmiş sağlı sollu uzanan iç organımız olarak bilinmektedir. Her bir böbrek ortalama 12x6x2.5 cm. ölçülerindedir. Ağırlığı erkeklerde 125-170 g, kadınlarda 115-155 g arasındadır. İki böbrekte yaklaşık 2.400.000 adet nefron vardır ve her bir nefron kan plazmasını böbrekten geçerken istenmeyen maddeleri (özellikle üre, kreatinin, ürik asit, uratlar gibi metabolizma artıklar) temizlemektir (Bonsib, 2008). Normal böbrek parankimi kan damarları, glomerüller, tübüller ve interstisyum olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. Renal kan damarları yapısal olarak vücudun diğer bölgelerinde görülenlere benzer özelliktedir. Glomerüller kalın bir bazal membran etrafında dizilen özelleşmiş endotelial, epitelyal ve mezenşyal hücrelerin meydana getirdiği karmaşık yapılardır. Kompleks tübüler sistem üriner kutuptan başlar ve renal papillaya uzanır. Bu sistem proksimal tübül, Henle ansı, distal tübül ve toplayıcı tübüllerden oluşmaktadır. Proksimal tübül asidofilik sitoplazmalı uzun silindirik hücrelerle döşelidir. Sitoplazması, aktif sıvı geçişi için gerekli bazal kıvrımlanmalar, yoğun mikrovilluslar, endositik vakuoller ve mitokondrilerce zengindir. Henle ansı, ince inen ve kalın çıkan kısımlara sahiptir. Değişken miktarlarda mikrovillus ve sitoplazmik organel içeren kübik ve silindirik hücrelerle döşelidir. Distal tübül proksimal tübülden daha dar ve kısadır. Mikrovillus ve organel sayısı daha azdır. Toplayıcı tübüller, santral yerleşimli çekirdek ve soluk asidofilik sitoplazmaya sahip kübik hücrelerle döşelidir (Murphy vd., 1994).

Böbrekte benign ve malign tümörleri meydana gelebilmektedir. Vücutta gelişen katı tümörlerin %2-3'ünü böbrek tümörleri kapsamaktadır. Enfeksiyonlar ve böbrekteki iyi huylu tümörler dışında, erişkinlerdeki katı böbrek kitlelerinin birçoğunu renal hücreli kanser oluşturmaktadır. Bu kitlelerin önemli bir bölümü, yaklaşık %20'si, benigndir (Remzi, 2006). Özellikle başta meme, akciğer ve mide olmak üzere bütün malign tümörlerin yaklaşık %8'i böbreklere yayılmaktadır. Böbrek tümörlerinin yaklaşık %85'ini renal hücreli karsinomlar oluşturmaktadır. Mezenkimden kaynaklanan liposarkom, leiomyosarkom, rabdomiyosarkom, anjiyosarkom ve fibrosarkom çok daha az görülmektedir. Nefroblastom olarak da bilinen Wilms tümörü ise daha çok çocuklarda görülmektedir (Liang Cheng vd., 2008).

1.3. İnsidans, Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Tüm dünyada gelişen kanserlerin yaklaşık %2'si böbrek kaynaklıdır. Böbrek kanserlerinin yaklaşık %85' i renal hücre kaynaklı, %12' si böbrek toplayıcı sistemden kaynaklanan ürotelyal kanser ve geri kalanı nadir kanserlerdir (Liang Cheng vd., 2008).

Tanısı ortalama 55-60 yaşları arasında konulan, genellikle yetişkinlerde görülen tümörlerdir. Yetişkin tümörlerin %2,3-4,3'ünü oluşturan RHK, ürolojik kanserlerin en ölümcül olanı olarak tanımlanmaktadır. RHK'a tüm etnik gruplarda ve coğrafik bölgelerde rastlanmakta ve ırklar arasında da fark bulunmamaktadır.

Dünyada ve Avrupa'da yıllık %2 oranında artış gözlenmektedir. Karsinom sıklığı açısından erkeklerde 12. sırada, kadınlarda 17. sırada yer almaktadır. Asya ve Afrikada düşük insidansda izlenirken, Latin Amerikada, birçok doğu ve batı avrupa ülkesinde, İskandinavya'da, Kuzey Amerika ve Avusturaya/Yeni Zelanda'da daha yüksek insidansda izlenmektedir (Ferlay vd., 2002). Danimarka ve İsveç'te ise son yirmi yıldır süren bir düşüş görülmektedir.

1998 yılında Avrupa'da yaklaşık 30.000 hastaya böbrek kanseri tanısı konulmuş ve yaklaşık 15.000 kadar hasta bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Lindblad, 2002). 2002 yılında, böbrek kanseri 210,000 vaka ile ilgili dünya çapında teşhis edilmiş ve 102.000 kişi böbrek kanserinden dolayı ölmüştür. 2008 yılında ise 46.000 yeni olgu bildirilmiştir. İnsidansı zencilerde %10-20 daha fazla olup bunun nedeni tam olarak bilinmemektedir (Lau vd., 2000).

Renal hücreli karsinom gelişimi birinci derecede akraba olan bireylerde iki üç kat daha fazla görülmektedir. Renal hücreli karsinomların yaklaşık %2-3'ü bazı herediter karsinom sendromlarıyla ilişkili olmakla birlikte, renal hücreli karsinomların büyük çoğunluğu genetik yatkınlık olmadan sporadik olarak görülmektedir (Noordzij vd., 2004). Ulusal Kanser Enstitüsü, %4 ailesel hastalık belirlemiştir. RHK çocuklukta ender görülmektedir. Çocukluk yaşındaki tüm böbrek tümörlerinin ancak %2,3-6,6'sını RHK oluşturmaktadır. Çocuklarda ortalama başlama yaşı 8-9 dur ve erkek/kız oranı eşittir (Ordenez vd., 2004).

Yüz yılı aşkın bir süredir RHK'lar üzerinde çalışılmaktadır, ancak etiyojisi ve histogenezi hala aydınlatılamamıştır. Etiyojisinde sigara en önemli faktördür ve erkeklerde %39 olguda etkin olmaktadır. Özellikle çok içilmesi ve uzun süreli alınan doz daha etkili olduğu görülmüştür. Tütün çiğneyenlerde bu riskin daha fazla olduğu belirtilmiştir (Kantor, 1977).

RHK'un metal işçilerinde, fırında çalışanlarda, asbestoza ve kadmium'a maruz kalanlarda biraz daha fazla olduğu gösterilmiştir. Radyasyon tedavisi ve antihipertansif olanlarda az oranda risk artışı belirtilmiştir. Yine hipertansiyonlu, diyabetik ve antihipertansif kullananlarda bu riskin yaklaşık 2 kat arttığı belirlenmiştir (Yuan vd., 1998). İçme suyunda yer alan arseniğin böbrek kanseri riskini artırdığı belirtilmektedir. Bunun dışında birçok çevresel kimyasal sorumlu tutulmuş ancak ispatlanmamıştır. Bunlar; ağır metaller, klorlu solventler, petrokimyasallar, boyalar, aromatik aminler, solventler, asbest, kadmiyum, organik çözücüler, pestisitler ve mantar toksinleridir.

Bazı östrojen muadillerinin hayvanlarda böbrek tümörlerine neden olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda aşırı şişmanlık ile ilişkisi de östrojen hormonları ile ilişkisini düşündürmektedir. Renal hücreli kanser riski BMI (vücut kitle indeksi) ile paralellik göstermektedir. Ayrıca renal hücreli kanser ile hipertansiyon arasında da bir ilişki saptanmıştır. Hastalığın nadir ailesel formu tanımlanmıştır (Bruder vd., 2004). Bir çalışmada ailesel RHK gelişiminin RHK riskini 2-3 kat artırdığı bulunmuştur (Argani vd., 2005).

RHK ile birlikte sıklıkla görülen hastalıklar arasında; Von Hippel-Lindau hastalığı (VHL), edinsel kistik hastalık, polikistik böbrek hastalığının erişkin formu ve multiloküler kist, tuberoskleroz, Birt-Hogg-Dube Sendromu, yapısal kromozom 3 translokasyonu, nöroblastom, ailesel kutanöz leiomyomatozis ve malign lenfoma yer almaktadır (Ordonez vd., 2004).

Renal hücreli kanserli hastalarda, hematüri, böğür ağrısı ve kitle hastalığın klasik şikayetlerdendir. Ancak hastaların %40'ında bu semptomların yerine kilo kaybı, karın ağrısı, anoreksia ve ateş gibi sistemik semptomlar görülebilmektedir. Olguların %50'sinde eritrosit sedimentasyon hızında artış görülmektedir. %33 oranında hematüri ile ilişkisiz normositik anemi mevcuttur (Eble vd., 2004).

1.4. Renal hücreli Karsinom Sınıflandırılması

1990'lardan önce RHK geleneksel olarak 4 gruba ayrılmıştır. Bunlar: Şeffaf hücreli, granüler hücreli, tübülopapiller ve sarkomatoid tipi renal hücreli karsinomlardır. Daha sonra yapılan değişikliklerle bu sınıflama yeniden belirlenmiştir. Özellikle kromofob hücreli karsinom adıyla yeni bir alt grub ortaya konmuştur. Ayrıca granüler hücreli tümörler yeniden sınıflandırılmış ve sarkomatoid lezyonların ayrı bir türden ziyade diğer alt gruplardan köken alan kötü huylu tümörler oldukları anlaşılmıştır (Oyasu 1998).

Sınıflama çalışmaları, 1981 yılında DSÖ böbreğin epitelyal neoplazilerini hücre tipi özellikleri, yapısal özellikler ve orjinlerine göre gruplandırmasıyla başlamıştır. Thoenes ve ark. 1985 yılında RHK'un kromofob tipini sunduktan sonra 1986 yılında yine Thoenes ve ark. tümör hücre sitoplazmasında izlenen morfolojik, histokimyasal ve elektron mikroskopik özelliklere göre Mainz sınıflamasını ortaya çıkarmışlardır. 1993 yılında sitogenetik temelli, 1997 yılında moleküler genetik temelli Heidelberg-Rochester sınıflaması kabul edilmiştir. Heidelberg-Rochester sınıflaması yeniden gözden geçirilerek DSÖ 1998 sınıflaması, Kovacs ile başlayan moleküler araştırmaların sonuçlarının yeniden incelenmesiyle de DSÖ 2004 sınıflaması ortaya çıkmıştır (Storkel vd., 1991; Lopez-Beltran vd., 2009)

Tablo1.1. Renal hücreli Karsinom Sınıflandırılması (Güçer H. (2006))

DSÖ 1981	MAINZ 1986	SİTOGENETİK 1993
1. Adenom 2. Renal hücreli karsinom a-Berrak hücreli tip b-Granüler hücreli tip c-İğsi hücreli tip 3. Diğer Bellini'nin duktal karsinomu	1. Adenom 2. Renal hücreli karsinom a-Berrak hücreli tip b-Kromofilik tip Bazofilik Eozinofilik Duofilik c-Kromofob hücreli tip Tipik Eozinofilik d-Toplayıcı kanal tipi 3. Onkositom	1. Papiller tümörler a-Adenom b-Karsinom 2. Berrak hücreli tümörler 3. Kromofob tümörler 4. Onkositom 5. Tanımlanmamış tümör grupları
HEİDELBERG-ROCHESTER 1997	DSÖ 1998	DSÖ 2004
1. Benign a-Papiller adenom b-Onkositom c-Metanefrik adenom 2. Malign a-Berrak hücreli karsinom b-Papiller karsinom c-Kromofob karsinom d-Toplayıcı kanal karsinomu e-Sınıflandırılmayan	1. Renal hücreli adenom a-Metanefrik tip b-Papiller tip c-Onkositik tip 2. Renal hücreli karsinom a-Berrak hücreli tip b-Papiller tip c-Kromofob tip d-Toplayıcı kanal tipi e-Nöroendokrin tip f-Sınıflandırılmayan	A-Benign 1-Papiller adenom 2-Onkositom B-Malign 1. Berrak hücreli tipte renal hücreli karsinom 2. Multiloküler berrak hücreli karsinom 3. Papiller tipte renal hücreli karsinom 4. Kromofob tipte renal hücreli karsinom 5. Bellini'nin toplayıcı kanal karsinomu 6. Renal medüller karsinom 7. Xp11 translokasyon karsinomu 8. Nöroblastom ile ilişkili karsinom 9. İğsi hücreli ve müsinöz tübüler karsinom 10. Sınıflandırılmayan renal hücreli karsinom

1.5. Renal hücreli Karsinom Tipleri

1.5.1. Benign Tümörler

1.5.1.1. Papiller Adenom

Papiller adenom (0,5 cm veya daha küçük boyutta) genellikle katı, hücresel tipleri böbrek korteksinde genellikle iyi sınırlı, tek, grimsi veya beyaz bir lezyon şeklinde olup pRHK 1 ve 2' ye benzer bir tubulopapiller yapı göstermektedir. Papiller adenom renal tübüllerin epitellerinden köken alan en yaygın tümörler olarak kabul edilmektedirler. pRHK örneklerinin yaklaşık %10 ile %40'ında benzer genetik değişiklikler gözlenmiştir (Eble vd., 2004).

1.5.1.2. Onkositom

Katı renal tümörlerin %3-7'sini oluşturan onkositomlar çok sayıdaki mitokondrinin varlığını gösteren, geniş granüler asidofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşan benign bir neoplazi olarak tanımlanmaktadır (Sorbellini vd., 2005). Yoğun granüler eozinofilik sitoplazmalı olup ve yuvarlak ve düzenli çekirdekleri vardır. Mitotik aktivite ve nekroz nadir olarak görülmektedir. En sık görülen anormallikler arasında kromozom 1 ve Y'nin kaybı, kromozom 14 delesyonu ile kromozom 11q13' ü içeren değişiklikler yer almaktadır. RHK'ların şeffaf hücreli alt türünün birçoğunda görülen kromozom 3'deki anormallik onkositomlarda bulunmamaktadır (Eble vd., 2004; Nagy, 2002). Erkekler bayanlara oranla iki kat daha sık etkilenmektedir. Tümör boyutu 4-6 cm arasında değişmektedir. Onkositomlar açık kahverenginde olup ve kapsüllüdür. Bu rengi veren mitokondrilerdeki sitokromlardır ve tümörde bulunan pigment miktarına göre değişmektedir. Kanama ve kistik dejenerasyon görülebilir ancak nekroz çoğunlukla izlenmemektedir (Tickoo vd., 1999).

1.5.2. Malign Tümörler

1.5.2.1. Berrak Hücreli Renal Hücre Karsinomu (bRHK)

2004 yılı DSÖ sınıflamasına göre tüm berrak hücreli böbrek tümörleri malign sınıfta kabul edilmiştir. Berrak hücreli RHK genellikle altın sarısı renkte görülmektedir. Nekroz, kistik dejenerasyon, kanama, kalsifikasyon, ossifikasyon, renal ven ve sarkomatoid değişimi (yaklaşık %5) gözlenebilmektedir (Grignon ve Che, 2005).

Berrak hücreli RHK tipik olarak alveoler kümeler halinde karsinom hücreleri ve bu kümeler arasında küçük kan damarlarının meydana getirdiği ağdan oluşan görünüme sahiptir (Eble, 2003). Tümörlerin büyük kısmında sitoplazma berrak ve granüler özellik göstermektedir. Tümör hücrelerinin berrak görünümünün temelinde PAS ve Oil Red ile boyandığında belli olan anormal glikojen ve yağ depolanması yatmaktadır.

Tüm tümörlerin %2'sini, renal hücreli karsinomların %70-80'ini oluşturmaktadır. Büyük çoğunluğu 40 yaş üstünde gelişmektedir ve 1,5:1 oranıyla erkeklerde daha sık görülmektedir. En sık 6-7 dekatta gözlenmektedir. Kromofob hücreli RHK ile karşılaştırıldığında şeffaf hücreli RHK kötü prognoza sahip olup, nadirde olsa papiller alt tipleride mevcuttur. Vakaların %90'ında 3. kromozom kısa kolunda genetik materyal kaybı ve VHL gen mutasyonu gözlenmiştir. Bu hasar hipermetilasyonla fonksiyon kaybı olabileceği gibi kromozomun tümünün kaybı şeklinde de olabilmektedir. Kötü prognoz ile ilişkili kromozom 14'te heterozigosite kaybı gibi diğer genetik anomalilerde görülmektedir (Eble, 2003).

1.5.2.2. Multiloküler Kistik Renal Hücre Karsinomu (MkRHK)

Tümör tamamıyla çok sayıda kistten ve bRHK'nın berrak hücrelerine benzeyen hücre gruplarının oluşturduğu bölmelerden meydana gelmektedir. Makroskopik olarak normal böbrekten ince bir fibröz kapsülle ayrılan küçük büyüklü çok sayıda kistten oluşan, seröz ya da kanamalı sıvı içeren iyi huylu kitlelerdir. Kitle boyutu 0,5 ile 13 cm arasında değişiklik göstermektedir. Ortalama 20-76 yaşlar arasında görülen MkRHK, nekroz içermemekte ve bölmeler arasında gözle görülebilir belirgin tümör nodülleri yoktur ki bu da kistik konvansiyonel berrak hücreli RHK'den ayrı bir özelliktir (MacLennan ve Cheng, 2008).

1.5.2.3. Papiller Tip Renal Hücreli Karsinom (pRHK)

Papiller renal hücreli karsinom, böbrek kanserlerinin yaklaşık %13-15'ini oluşturmaktadır. Bu özelliğinden dolayı böbrek tümörleri içerisinde ikinci en sık tipi olarak bilinmektedir (Reuter, 2006). Erkek-kadın oranı 2:1 ile 3,9:1 arasında değişmektedir. Vakaların büyük çoğunluğu kendiliğinden gelişmektedir. Kendiliğinden gelişen vakalarda trizomi veya tetrazomi 7, trizomi 17 ve Y kromozom kaybı yaygın olarak görülmektedir.

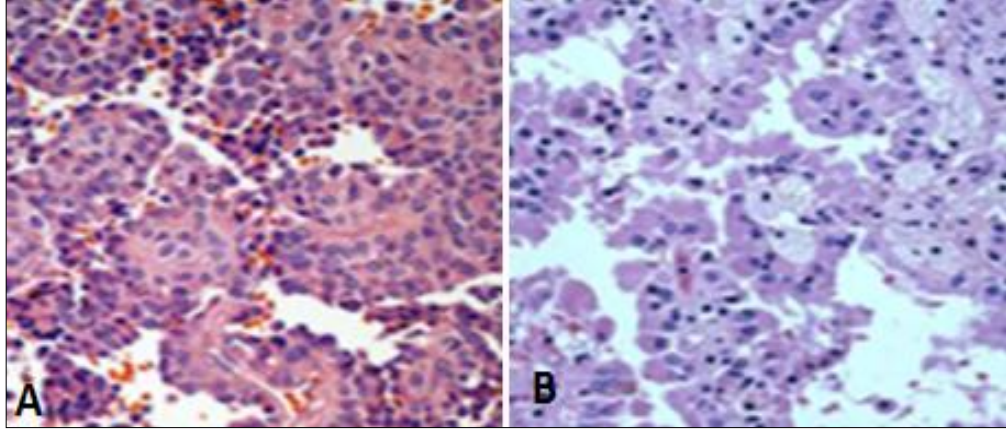
Yaklaşık %20'sinde 3p kromozom kaybı gözlenmektedir. Yine heterojenik olarak birçok kromozomda genetik kayıplar görülebilmektedir. Bu kanser tipi ailesel papiller karsinom şeklinde de görülebilir ve bu formunda MET onkogen mutasyonu ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal geçiş gösteren papiller RHK olgularında 7q31 bölgesinde yerleşmiş c-MET geni tiroid, over ve kolonun papiller karsinomlarında da görülmektedir. Bu genin özellikle hücre çoğalması (proliferasyon), yeni damar oluşumu (anjyogenez), hücre hareketliliği ve hücre farklılaşması üzerinde önemli etkisi olduğu bilinmektedir (MacLennan ve Cheng, 2008).

Makroskopik olarak genellikle böbrek dokusu içinde lokalize, iyi sınırlı, yalancı kapsül içeren, çapı 1-18 cm arasında değişebilen kitlelerdir. Papiller renal hücreli karsinom tipik olarak iyi sınırlı olup %90'dan fazla hastada böbrek parankiminden farklı bölgededir. Stromada makrofaj varlığı, eski kanama ve hemosiderin (Fe³) nedeniyle kesit yüzü kırmızı-kahverenkli, açık gri-kahverengi, altın sarısı gibi değişik renklerde gözlenmektedir (Burçin ve Kutsal, 2004).

Mikroskopik olarak pRHK'lar papiller, tübüler veya tübülopapiller büyüme paterni ile karakterizedir. Sitoplazma, bazofilik eozinofilik veya bazen kısmen açık olarak görülebilmektedir. Papiller yapılar tek sıralı tümör hücreleri şeklinde olup bazen yalancı tabakalaşmalar görülebilmektedir (Khan vd., 2007).

Delahunt ve ark., farklı klinik davranışa sahip iki morfolojik pRHK tipi tanımlanmıştır. Papiller RHK; tip1 ve tip2 olarak iki morfolojik alt tipe ayrılmaktadır. Her iki tip tümörde akut ve kronik inflamasyon, geniş nekroz, eski kanamalar, psammom cisimcikleri (kum cisimcikleri), kolesterol yarıkları, yabancı cisim tipi dev hücreler ve distrofik kalsifikasyon (kireç tuzlarının birikmesi) odakları görülebilir. **Tip 1 papiller RHK** da; papillalar tek veya iki sıralı düşük nükleer dereceli, küçük epitelyal hücre tabakası görülmektedir. Küçük yuvarlak veya oval çekirdek, belirsiz nükleol ve küçük soluk veya berrak sitoplazmaya sahiptirler. Tübüler yapılar benzer şekilde hücrelerle döşenmiş şekildedir. **Tip 2 papiller RHK** tip 1'e göre daha büyük olma eğilimindedir. Tip 1'de ortalama çap 6 cm iken, tip 2'de 9,5 cm olarak ölçülmekte ve nükleer derece de daha yüksek görülmektedir (Şekil 1.1.). Tip 2'de tümör hücreleri büyük küresel çekirdek, belirgin nükleol ve değişik derecelerde yalancı tabakalaşmalar içermektedir. Sitoplazma geniş ve tipik olarak eozinofiliktir. Makrofajlar nekroz alanları yakınlarında daha çok görülmektedir. Her iki tipte de %5 oranında sarkomatoid diferansiyasyon görülebilir.

Tip 1 papiller karsinomlarda sağkalım Tip 2'ye göre daha iyidir. Tip 2 tümörlerde AGNOR skoru (gümüş boyama) ve Ki-67 indeksi daha yüksektir. Vakaların büyük bir kısmı CD10, vimentin ve RCC-Ma eksprese ekmektedir. Tip 1 daha çok CK7 ve MUC-1 eksprese ederken, Tip 2 tümörler CK20 ve E-kadherini daha çok eksprese etmektedir. MUC-1(bir musin tipi) salınımı normal epitelyal hücreler ve diğer karsinoma göre daha azdır (Delahunt vd., 2001; Leroy vd., 2002).



Şekil 1.1. Tip 1 (A) ve Tip 2 (B) papiller RHK mikroskopik görüntüsü

Papiller RHK ile ayırıcı tanı gücü yaşıyan olgularda; papiller adenomda da benzer kromozom değişiklikleri görülebildiği için kromozom analizi her zaman net olarak ayırt edici olmamıştır. Müsinöz tübüler ve işsi hücreli karsinomun histopatolojik olarak tip I papiller RHK ile benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Ancak çok sayıda kromozomu ilgilendiren genetik bozukluklar taşıyan bu tümörlerde papiller RHK'daki 7,17 ve Y kromozomu değişiklikleri görülmemektedir. Berrak hücreli papiller karsinom da aynı nedenle moleküler düzeyde papiller RHK'dan ayrılabilir. bRHK ile karşılaştırıldığında, pRHK daha küçük bir ortalama çapa sahiptir.

1.5.2.4. Kromofob Tip Renal Hücreli Karsinom (kRHK)

Kromofob tip; RHK'lardan daha az agresif, ağısı sitoplazma ve belirgin hücre zarı ile çevrili, büyük ve soluk hücreler ile karakterize bir tiptir. Bannasch ve ark. sıçan böbrek kanseri indüksiyon deneylerini yaparken bu kanser tipini keşfetmişlerdir. Ardından Kromofob RHK, 1985'de Thoenes ve ark., tarafından insanlarda da tanımlanmıştır. Kromofob RHK'ler böbreğin tüm epitelyal tümörlerinin %5'ini oluşturmaktadır. Şeffaf hücreli ve kromofob RHK'larda daha sık kadınlara oranla

erkekler etkilenirken, aksine, kromofob RHK erkek ve kadınlarda aynı frekansta ortalama 23-86 yaşlar arasında görülmektedir. Mortalite oranı %10'dan azdır (Burçin ve Kutsal, 2004).

Tümörler iyi sınırlıdır ve makroskopik olarak tümör boyutu 2-22 cm arasında değişiklik göstermektedir. Kesit yüzeyi, tipik olarak soluk sarı, gri ya da kahverenkli ve onkositoma benzerlik gösterebilmektedir. Küçük kanama, nekroz ve skar (yara) alanları içerebilmektedir (Eble vd., 2004). Mikroskopik olarak genellikle katı, bazen glandüler, tubulokistik patern izlenebilmektedir. Fokal kalsifikasyon ve fibröz bölmeler görülebilmektedir. Berrak hücreli RHK'lerin aksine bu tümör grubunda kalın duvarlı, hyalinize orta boy damarlar tümöre eşlik etmektedir. Bundan farklı olarak berrak hücreli karsinomlarda daha küçük, ince duvarlı sinüzoidal nitelikte damarlar vardır (MacLennan ve Cheng, 2008).

İki tip kromofob tipte renal hücreli karsinom çeşiti bilinmektedir. Bunlar klasik tip ve eozinofilik tip olan kRHK'lerdir. Klasik tip eozinofilik tipten daha önce tanımlanmıştır. Klasik tipte hücreler bölmeler boyunca uzanım gösterme eğilimindedir. Hücreler sınırları belirgin, bol, ince ağsı bir yapılı ya da soluk asidofilik sitoplazmalıdır. Eozinofilik alanlardaki hücreler esas olarak onkosit özelliğinde olup onkositoma benzerlik göstermektedir. Klasik türünde mitokondriler periferde bulunmakta ve hücre membranına yakın yerde yoğunlaşmıştır. Eozinofilik türünde ise, mitokondriler daha yaygın olarak bulunmaktadır. Glikojen ve lipid içeriği azdır. Hücre yüzeyinde az miktarda kısa mikrovilluslar bulunmaktadır (Thoenes vd., 1998). Kromofob RHK'lar karakteristik sitogenetik anormallikler göstermektedir. Kromofob RHK'larda tipik genetik anomaliler saptanmıştır. Bunlar sıklıkla kromozom Y,1, 2, 3, 6, 10, 13, 17 ve 21'de tam veya çoklu kayıpların olduğu görülmektedir. Kromofob RHK larda p53 gen mutasyonu küçük oranda görülmektedir (Brunelli vd., 2008).

Önemli bir tanısal bulgu, bu tümörden HALE'in kolloidal demir boyası ile pozitif sitoplazmik boyanma izlenmesidir. İmmunohistokimyasal olarak Pankeratin, CK7, EMA, Lectin, Parvalbumin ile pozitif reaksiyon izlenirken, RHK-Ma ile pozitif/negatif reaksiyon gözlenmektedir. Vimentin, CD10, AMACR ve CK20 ile boyanma görülmemektedir (Hendrickson vd., 2004; MacLennan ve Cheng, 2008).

1.5.2.5. Bellini'nin Toplayıcı Kanal Karsinomu

Bu tümör Bellini toplayıcı kanal ana hücrelerinden kaynaklanır. Renal hücreli karsinomların %1'inden azını oluşturmaktadır. Tümör çapı 2,5-12cm arasında değişiklik göstermektedir. Ortalama görülme yaşı 55 olarak bilinmektedir. Erkek kadınlara oranla daha baskın gözlenmektedir (Kırkalı vd., 1996). RHK'lere göre daha farklı yerleşimli ve daha agresif tümörlerdir. Medulla yerleşimli olması nedeni ile yüksek dereceli ürotelyal kanserler ile karıştırılabilmektedir. Bildirilen az olgu olması nedeni ile sitogenetik özellikleri tam bilinmemektedir. Az sayıdaki olguda 1q (özellikle 1q32), 6p, 8p, 13q, 21q heterozigosite kaybı ve Y kromozomu kaybı gibi değişik derecelerde sitogenetik bulgular görülmektedir. Toplayıcı kanal karsinomlu %50 vakada cErbB2 gen amplifikasyonu belirgin olmuştur. Yaklaşık 2/3 hasta grubu 2 yıl içerisinde ölmekte olup ve ölüm oranları bazı araştırmacılara göre %83' ten daha fazla olarak belirlenmiştir (Tokuda vd., 2006).

1.5.2.6. Renal Medüller Karsinomu

Renal medüller karsinomu nadir görülen ve yüksek agresif seyirli böbrek tümörü olarak bilinmektedir. Terminal toplayıcı kanal ve komşu papiller epitelyumdan kaynaklandığına inanılmaktadır. Orak hücreli hemoglobinopatiler ile çok güçlü ilişkisi olduğu görülmüştür. Büyük çoğunlukla HbS taşıyıcıları olmak üzere HbSC hastalarında da görüldüğü bildirilmiştir. Erkek kadın oranı yaklaşık olarak; 1,9:1 olarak belirlenmiştir. Tanı anında erkeklerde ortalama yaş 19, kadınlarda ortalama yaş 22 dir. Makroskopik olarak bu tümörler tipik olarak medullada yerleşmektedir. Kötü sınırlı, lobüllü, elastik kıvamda, sarı-kahverenkli dirler ve değişik derecede kanama ve nekroz içermektedirler. Tümör boyutları 1,8 ile 13 cm arasında olup ortalama 7 cm dir (Yang vd., 2002). Tümör hücreleri tipik olarak büyük nükleus, belirgin nükleol ve değişik yoğunlukta eozinofilik sitoplazma içermektedir. Tanı anında veya kısa bir süre sonra böbrek medüller karsinomlu hastaların %95'inde metastaz gösterilmiştir. Dolayısıyla prognozu kötüdür (Eble vd., 2004).

1.5.2.7. Xp11 Translokasyon Karsinomu

Bu böbrek karsinomu ağırlıklı olarak çocuklar ve genç erişkinleri etkilemesi ile tanınmaktadır. Son yıllarda yapılan sitogenetik ve moleküler çalışmalar genç hastalardaki böbrek karsinomlarının yaklaşık 1/3'ünün Xp11 translokasyon karsinomu olduğunu göstermiştir. Bu kanser türü değişik kromozom

translokasyonları içermektedir. Tamamında Xp11.2 traslokasyonu görülmektedir (Altinok vd., 2005). Translokasyon karsinomlu hastaların hemen hemen hepsi 18 yaşından küçük olmasına rağmen bu yaş grubuyla sınırlı değildir. Erkek ve kadınlarda hemen hemen eşit oranda görülmektedir. En az %15'ini önceden kemoterapi alan hastalar oluşturmaktadır (Argani ve Ladanyi , 2005; Argani vd., 2006)

Tümör hücreleri papiller yapılar göstermekte olup tümör hücreleri genellikle katıdır. Alveolar yapı görülebilir ve bazı yuvalar merkezi lümen içerebilmektedir. Papiller yapılar değişik oranlarda olabilmektedir. Tümör hücreleri uniform yapıda, sınırları belirgin, granüler eozinofilik veya berrak arasında değişen geniş sitoplazmalıdır.

Diğer translokasyon karsinomları arasında; t(X;17) (p11.2;q25), t(6;11) (p21; q12) ile ilişkili karsinomlar gibi örnekler verilebilir. t(X;17) (p11.2;q25) karsinomlar kötü gidişlidir, t(6;11) ile ilişkili karsinomlar ise yavaş seyirli dirler (Argani ve Ladanyi, 2005).

1.5.2.8. Nöroblastom İle İlişkili Renal Karsinom

Böbrek üstü bezinde en sık görülen tümör nöroblastom olarak bilinmektedir. Nöroblastom, tüm çocukluk çağı tümörlerinin %8-10'unu oluşturmaktadır. Vakaların %36'sı bir yaş, %75'i iki yaş altında görülmektedir. Sempatik ganglionların ve adrenal medullanın öncül hücresi olan nöral krest hücrelerinden köken almaktadırlar. Dolayısıyla tümör sempatik sinir sistemi boyunca her yerde görülmektedir. Ancak vakaların %75'inde abdominal kitle saptanır. Bunların yarıya yakını adrenal medulladan, kalanı paravertebral ganglionlardan köken almaktadır. Karında kitlenin yanında karın ağrısı, iştahsızlık, kusma, kabızlık ve ateş gibi yakınmalar gözlenmektedir. Tümör hücrelerinden katekolamin salgılamasına bağlı olarak kanda adrenalin ve noradrenalin, idrarda homovalinik asit ve vanilmandelik asit düzeyi yüksektir. Hastaların %75'inde tanıda kemik iliği, kemik ve karaciğer gibi organlara metastaz ve bu organların tutulumuna bağlı bulgular saptanmıştır (Fleitz vd.,2003). Tümörlerin makroskopik boyutları 3,5 ile 8 cm arasındadır. Mikroskopik olarak; nöroblastom ile ilişkili renal hücreli karsinomda katı veya yuvalar içinde sıralanmış hücreler şeklindedir. Tümör hücre membranları keskin sınırlı ve geniş eozinofilik granüler sitoplazma içerir. 20q13 lokusunda allelik dengesizlik görülmektedir. Erkek ve kadınlarda görülme oranı hemen hemen eşit olup ortalama yaş 13,5 olarak görülmektedir (Koyle vd., 2001).

1.5.2.9. İğsi Hücreli ve Müsinöz Tübüler Renal Karsinom

İlk olarak 1997'de Maclennan ve öğrencileri tarafından, düşük dereceli toplayıcı tubül karsinomu adı altında 5 vaka rapor edilmiştir. Bu tümörler belirgin olarak kadınlarda görülmekte olup, erkek kadın oranı yaklaşık 1:4 oranındadır. Ortalama yaş 53 olarak görülmektedir. Ortalama çapları 6-7 cm dir. Tümörler keskin sınırlı, gri, beyaz, sarı veya açık kahverenkli. Bazen minimal kanama ve/veya nekroz da görülmektedir. Mikroskopik olarak; hücreler sıkıca paketlenmiş, küçük uzamış tübüllerde dağılmış geniş eozinofilik, ekstrasellüler müsin içeren, bazıları kabarcıklı miksoid görünüm içermektedir. Bu tümörlerde hücre kaynağı net olarak belirlenememekle birlikte, henle kulpu veya özellikle toplayıcı tübül epitelinden kaynaklandığını destekleyen çalışmalar vardır. Tümör ilişkili ölüm rapor edilmemiştir. Bu tümör kromozom 1, 4, 6, 8, 13 ve 14 için kayıplarla, kromozom 7, 11, 16 ve 17 için kazançlarla ilişkilidir (Eble vd., 2004).

1.5.2.10. Sınıflandırılmayan Renal Hücreli Karsinom

DSÖ'nün 2004 sınıflaması sınıflandırılmayan RHK (sRHK) tanısını diğer kategorilerden birine tam olarak uymayan olgularda konulacak bir tanı kategorisi olarak tanımlamıştır. Bu kategorideki tümörler değişik görünümle ve heterojen özellikler taşıdığından ve farklı genetik lezyonlar içerdiğinden sınırlı incelemeler ile tanı verilemeyeceği belirtilmektedir. sRHK kategorisinde yer alan tümörlere örnek olarak; müsin üreten, atipik ve tanımlanamayan hücresel özelliklere sahip olan, epitelyal komponenti olmayan sarkomatoid morfolojili ve epitelyal-stromal elementlerin karışımını içeren tümörler verilebilmektedir (Eble vd., 2004).

Sınıflandırılmayan RHK sıklığı %2-7 arasında verilmesine rağmen bu tümörlerin histopatolojik özellikleri ve sıklığı ile ilgili kesin veriler bulunmamaktadır. Bu konuda son en geniş çalışma Karakiewicz ve arkadaşlarına ait olup katılan 18 merkezin 6350 hastasına ait veriler değerlendirilmiştir. Bu çalışmada sRHK oranı %1,3 olarak belirlenmiştir (Karakiewicz vd.,2007).

1.6. Böbrek Kanserlerinde Gözlenen Genetik Değişimler

Son yıllarda RHK'un moleküler genetiği ile ilgili önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu konuda yeni ailesel sendromlar bulunduğu gibi; bu malignitenin kendiliğinden gelişen ve ailesel formları ile ilgili tümör baskılayıcı genler ve onkogenler tanımlanmıştır. Böbrek kanserlerinin büyük çoğunluğunda herhangi bir genetik anomali yada değişim söz konusu değildir. Ancak %5 kadar hastada kanserin genetik değişikliklerle ilişkili olduğu söylenmektedir. Böbrek karsinomlarının bü-yük çoğunluğu genetik yatkınlık olmadan sporadik olarak görülürler (Tokgün ve Akça 2013).

Ailesel böbrek kanserlerinin çoğunluğu (%75) berrak hücreli kanser tipindedir ve berrak hücreli RHK'lu olguların %50'ye yakın bölümünde VHL gen mutasyonu, %20'sinde DNA metilasyonu gözlenmektedir. Normalde VHL geni tümör baskılayıcı gen olup yeni damar gelişimini engellemek dahil, mikrotübül dinamiğinin kontrolünde, hücre dışı matris oluşumunda, apoptozun düzenlenmesinde ve p53 proteinlerinin kararlılığında rol oynamaktadır. Ancak, bu gen normal işlevlerini yapamaz hale gelince tümör büyümesinin önündeki önemli bir engel ortadan kalkmakta ve tümör büyümesi gerçekleşmektedir. VHL hastalığı olan bireyler bu mutasyona uğramış geni kendinden sonraki nesillere de aktarır. Ailesel olmayan kendiliğinden gelişen böbrek kanserlerinin yaklaşık %60 kadarında da bu gen mutasyonu saptanabilmektedir. Bunların dışında 9p ve 14q kromozom kaybı gözlenmektedir. Kromozom 9p kaybının kötü prognoz, 14q kaybının hem kötü prognoz, hem de ileri evre ve derece ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Xp11.2 translokasyon / TFE3 gen füzyonlu bRHK, daha çok çocuklarda, genç erişkinlerde görülmektedir (Kutsal, 2005; Eble vd., 2004).

Papiller RHK'da; kromozom 7 ve 17 trizomisi, kromozom 1, 16 ve Y'deki anormallikler saptanmıştır. pRHK alt tipi olan papiller tip 1 kanserlerde MET geni mutasyonlarına %5 oranında rastlandığı görülmüştür. Papillerde, Tip I tümörler cMET yolağı ile ilişkilendirilmiş olup Tip II kalıtsal tümörlerde fumarat hidrataz (FH) gen mutasyonları gösterilmiştir (Kovacs vd., 1991).

Kromofob RHK'lerde 1, 2, 6, 10, 13, 17 ve 21. kromozomlarda kayıp izlenirken, moleküler düzeyde p53 mutasyonları ve PTEN geni çevresinde heterozigozite kaybı (LOH) saptanmıştır (Sukosd vd., 2001).

Bellini'nin toplayıcı kanal karsinomu ile ilgili bildirilen az olgu olması nedeni ile sitogenetik özellikleri tam bilinmemektedir. Az sayıda olguda 18 ve 21. kromozom monozomisi ve Y kromozom kaybı bildirilmiştir. 1q, 6p, 13q, 21q kollarında heterozigozite kaybı, 3p kaybı saptanmıştır. 8p heterozigozite kaybının kötü prognostik gösterge olabileceği belirtilmiştir (Gregori-Romero vd., 1996).

Müsinöz tübüler ve iğsi hücreli kanser, düşük dereceli kabul edilen iyi prognozlu bir tümör olarak bilirse de genomik hibridizasyon ve FISH yöntemleri ile bu tümörde 1, 4, 6, 8, 13 ve 14. kromozomlarda kayıp, 7, 11, 16 ve 17. kromozomlarda artış saptanmıştır. Onkositomlarda Y ve 1. kromozom kaybı, 11q13 translokasyonu saptanmıştır (Eble vd., 2004).

Tablo 1.2. Böbrek Tümörlerinde Sık Görülen Genetik Bulgular (Kutsal, 2005).

Patolojik Tür	Sitogenetik Özellikler	Köken
Şeffaf Hücreli RHK	-3p VHL geni mutasyonu DNA metilasyonu -9p,-14q	Proksimal Nefron
Papiller RHK	+7, +17,-Y,+12, +16, +20	Proksimal Nefron
Kromofob RHK	-1, -2, -6, -10,-13, 3-17,- 21 -Y	Toplayıcı Duktusun Kortikal
Toplayıcı Duktus Kanseri	1q, 6p, 8p, 13q, 21q, -1, -6, -14, -15,-22, -8p, -13q	Medüller Toplayıcı Duktus
Böbrek medüller kanseri	-11	?
Müsinöz Tübüler İğsi Hücreli Karsinom	-1, -4, -6, -8, -13, -14,+7, +11, +16, +17	?
Papiller Adenom	Y, +7, +17, +12, +16,+20	Proksimal Nefron
Onkositom	-Y, -1, T(11q13)	Toplayıcı Duktusun Kortikal İnterkaler Hücreleri
Metanefrik Adenom	Normal -2p	?

1.7. Renal Hücreli Karsinomların Derecelendirilmesi

Renal hücreli karsinomların derecelendirilmesi için yıllar boyu pek çok sistem önerilmiştir. Bunlardan Fuhrman ve arkadaşlarının önerisi en çok kabul göreni olmuştur. Bu sistem nükleer boyut, nükleer membranın düzensizliği ve nükleolus belirginliği temeline dayanır. Klinik gidişle Fuhrman nükleer derecesi (FND) arasında berrak hücreli RHK'larda sıkı ilişki gözlenmektedir. Papiller ve kromofob RHK'de FND ve ya diğer derecelendirme sistemlerinin kullanımı ise tartışmalıdır. Farklı çalışmalarda papiller RHK'de nükleer derece ve sağkalım süreleri arasındaki ilişkiyle ilgili olarak çelişen sonuçlar yayınlanmaktadır (Fuhrman, 1982). Benzer olarak kromofob RHK'de sıklıkla nükleer düzensizlikler göstermesine karşın genel yaşam beklentisi çok iyidir (%90 oranında). Sistemin özellikleri Tablo 1,3'te özetlenmiştir.

Tablo 1.3. Fuhrman Derecelendirme Sistemi (Fuhrman, 1982).

Derece	Özellik
1	Nükleus yuvarlak (10 µm), nükleol belirsiz ya da yok
2	Nükleus hafif düzensiz (15 µm), nükleol kolayca görülebiliyor
3	Nükleus çok düzensiz (20 µm), nükleol büyük ve belirgin
4	Nükleus bizar ve multilobule (>20 µm), nükleol belirgin

1.8. Renal Hücreli Karsinomların Evrenmesi

En sık kullanılan sistem olan TNM (Tümör, Nod ve Metastaz) evrelendirmesi, hastalığın anatomik yaygınlığına dayanmaktadır. Böbreğe sınırlı tümörlerde prognoz daha iyidir. 5 yıllık yaşam oranları Evre I, II, III ve IV için sırasıyla %91, %74, %67 ve %32'dir (Sobin ve Wittekind, 2002). Robson ve ark. tarafından 1969 yılında oluşturulan evreleme sistemi pek çok klinisyen ve patolog tarafından kullanılmıştır. Geçen yıllarda Uluslararası Kanser Savaş Örgütü (UICC: Union Internationale Contrele Cancer) ve Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC: American Joint Committee on Cancer) işbirliği ile TNM evreleme sistemi oluşturulmuş ve bu sistemde böbrekte sınırlı tümörler evre 1 ve evre 2 olarak yer almışlardır. TNM

evreleme sistemi 1993 ve 2002 yıllarındaki düzenlemelerle bugünkü şeklini almıştır (Gren vd., 2002) (Tablo 1.4).

Bu evreleme sistemlerinin tümü ancak belirli tümör tiplerinde değerli prognostik bilgiler verir. Örneğin; tümör boyutu ve kapsül dışı yayılım kromofob hücreli RHK'de bRHK'da olduğu kadar fazla prognostik öneme sahip değildir. kRHK'lar ortalama 8-9 cm çaplarla renal kortikal neoplazilerin en büyükleri olmalarına karşın, hastaliksız yaşam oranları yaklaşık %90'dır. Toplayıcı duktus karsinomlarında ise prognoz kötüdür. Renal hücreli kanserde evreleme sistemi tümörün böbrekten öteye yayılım derecesine dayanır. Kan damarlarının tutulumu eğer tümör böbreğe sınırlı ise kötü bir prognostik faktör olmayabilir.

Tablo 1.4. Renal Epitelyal Tümörlerde Evreleme (TNM 2002) (Gren vd., 2002).

Primer tümör (T) Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor. T0: Primer tümöre ait delil yok. T1: Tümörün en büyük boyutu 7 cm ya da daha az, böbrekle sınırlı. T1a: Tümör 4 cm veya daha küçük T1b: Tümör 4 cm'den büyük, 7cm'den küçük T2: Tümörün en büyük boyutu 7cm ya da daha fazla, böbrekle sınırlı. T3: Tümör majör venlere yayımlı G ya da adrenal bez, perinefrik dokulara invaze olmuş, ancak Gerota fasyasını aşmamış T3a: Tümör adrenal beze ya da perinefrik dokuya invaze olmuş fakat Gerota fasyasını aşmamış. T3b: Tümör renal vene ya da diyafragma altındaki vena kavaya kadar ilerlemiş. T3c: Tümör diyafragma üstündeki vena kavaya yayılmış. T4: Tümör Gerota fasyasının ötesine yayılmış.	
Bölgesel lenf nodları (N) Nx: Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi. N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok. N1: Tek bir bölgesel lenf noduna metastaz. N2: Birden fazla bölgesel lenf noduna metastaz. Not: tek taraflı olması N sınıflamasını etkilemez.	
Uzak metastazlar (M) Mx: Uzak metastaz değerlendirilemedi. M0: Uzak metastaz yok. M1: Uzak metastaz.	
Evre I	T1, No, Mo
Evre II	T2, No, Mo
Evre III	T1, N1, Mo --- T2, N1, Mo --- T3a, No, Mo --- T3a, N1, Mo T3b, No, Mo --- T3b, N1, Mo --- T3c, No, Mo --- T3c, N1, Mo
Evre IV	T4, No, Mo --- T4, N1, Mo Herhangi T, N2,Mo, Herhangi T, Herhangi N, M1

1.9. Epigenetik ve Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik, genetik kodu yani DNA baz dizilimini değiştirmeksizin, gen ifadesinde uzun süreli değişikliklere yol açan farklı süreçleri ifade etmekte kullanılan bir terimdir. ‘Yanında, yanı sıra’ anlamlarına gelen “epi”, genetik kodu oluşturan Adenin, Guanin, Sitozin, Timin bazlarının dizilimlerini etkilemeden, bunların yanı sıra oluşan değişiklikleri ifade etmektedir.

Bu terim ilk kez Waddington tarafından 1942’de vücuttaki tüm hücrelerin aynı DNA dizilimine sahip olmasına rağmen, farklı genleri ifade etmelerini açıklamak amacıyla kullanılmıştır. Örneğin aynı genetik koda sahip olmalarına rağmen, karaciğer ve beyinde ifade edilen proteinler birbirlerinden oldukça farklılık göstermektedir. Waddington bunu açıklamak için, gelişim esnasında, DNA dizisinin ötesindeki düzeneklerin bu farklılığı kontrol ettiğini ileri sürmüştür. Yakın zamandaki çalışmalar, epigenetiğin yalnızca gelişim esnasında değil, erişkin yaşamda da gen ifadesinin sürekli olarak düzenlenmesinde rol oynadığını ortaya koymuştur (Kouzarides 2007).

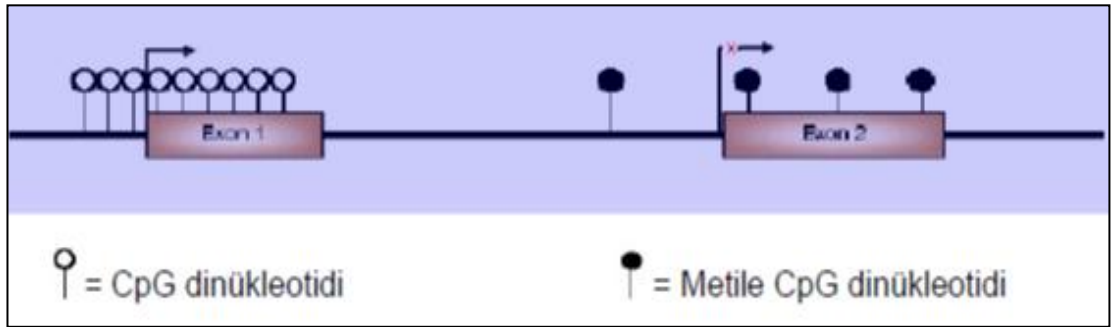
Epigenetik değişiklikler oldukça dengeli/kalıcıdır. Bu dengeli yapılarına rağmen, epigenetik değişiklikler aynı zamanda geri çevrilebilir niteliktedir. Bu dinamik özelliği epigenetik düzeneklerin gen ifadesini değişen koşullara göre düzenlemesini sağlamasında önemli kılmıştır. Bir başka deyişle çevresel koşulların değiştirilmesi, ilaç, terapi vb. dış müdahaleler ile gen ifadesinin kontrol edilmesi mümkündür. Bu özelliği epigenetik düzenekleri yeni tedavi stratejileri geliştirme çalışmalarının odaklarından biri haline getirmiştir. Bunun yanı sıra epigenetik değişiklikler kalıtlılabılır niteliktedir, yani çevresel koşulların gen ifadesi üzerinde yarattığı etki, bunun o bireye sağladığı avantaj veya dezavantaj sonraki nesillere aktarılabilmektedir (Delcuve vd., 2009; Kaminsky vd., 2009).

Epigenetik mekanizmalar, doğrudan ve dolaylı olarak gen ifadesini kontrol eden mekanizmalar olarak ikiye ayrılmaktadır. Dolaylı yoldan gen ifadesini kontrol eden mekanizmalar daha çok post-transkripsiyonel mekanizmaları özellikle de kodlamayan RNA’nın (siRNA, miRNA vb.) mRNA’yı etkileyerek protein sentezini engellemesini içermektedir. Doğrudan gen ifadesini etkileyen mekanizmalar ise kromatin modifikasyonları ve DNA modifikasyonları olarak iki grupta toplanmaktadır.

Kromatin modifikasyonu olan histon modifikasyonları; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, S-nitrasilasyon, ubikitinasyon, sumolasyon mekanizmalarını kapsamaktadır. DNA modifikasyonları içerisinde ise en iyi bilinen ve en işlevsel olanı DNA metilasyonudur (Kaminsky vd., 2009).

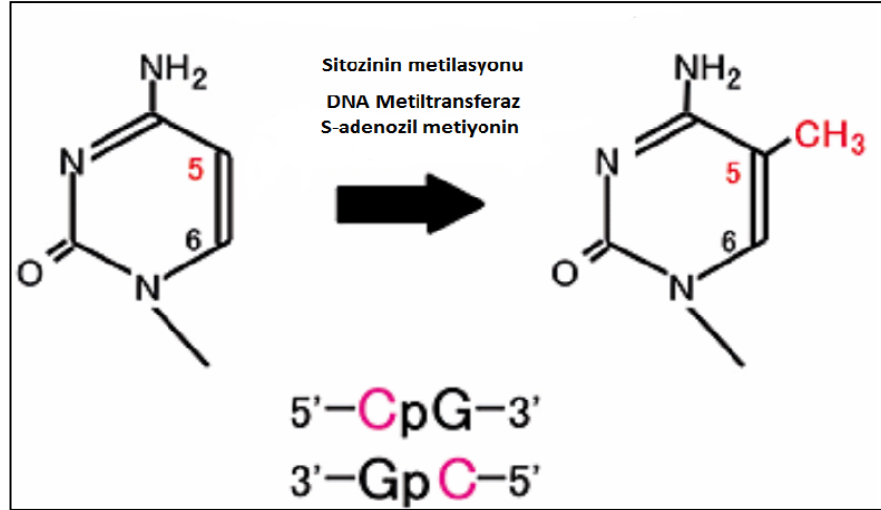
1.9.1. DNA metilasyonu

İnsanda başlıca epigenetik değişiklik, CpG dinükleotidleri içinde bulunan sitozinlerin metilasyonudur (Şekil 1.2). Bazı memeli genleri, DNA dizilerindeki metilasyonla sessizleştirilmektedir. Ayrıca, memeli genomunun büyük bölümü bu yolla işaretlenmekte (imprint) ve DNA metilasyonu sıklıkla heterokromatin bölgelerde görülmektedir. Epigenetik bir mekanizma olan genlerin CpG adacıklarının metilasyonu, kanserde gen susturulmalarında; gen delesyonu ve gen mutasyonları ile eşit öneme sahip olarak görülmektedir.



Şekil 1.2. Memeli genomundaki CpG adacıkları (Melki ve Clark, 2002).

Ökaryotlarda DNA metilasyonu; sitozin halkasının 5. pozisyonundaki karbonuna metil grubunun (-CH₃) eklenmesiyle meydana gelmektedir. Memeli hücrelerinin genomik DNA'larının yaklaşık olarak %3-5'inde sitozin bölgelerinde metilasyon görülmektedir (Şekil 1.3). Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon, DNA replikasyonundan sonra meydana gelir ve bu olay DNMT1 (DNA metiltransferaz) enzimi tarafından katalizlenmektedir. DNMT1 enzimi, genomik DNA'daki CpG dinükleotidlerini substrat olarak kullanmaktadır. Memeli DNMT1 metiltransferaz enzimi, DNA'daki hemimetile bölgelere karşı yüksek afiniteye sahip olmasına karşı ayrıca metile olmamış bölgelerde de *de novo* metilasyona neden olabilmektedir (Melki ve Clark, 2002).

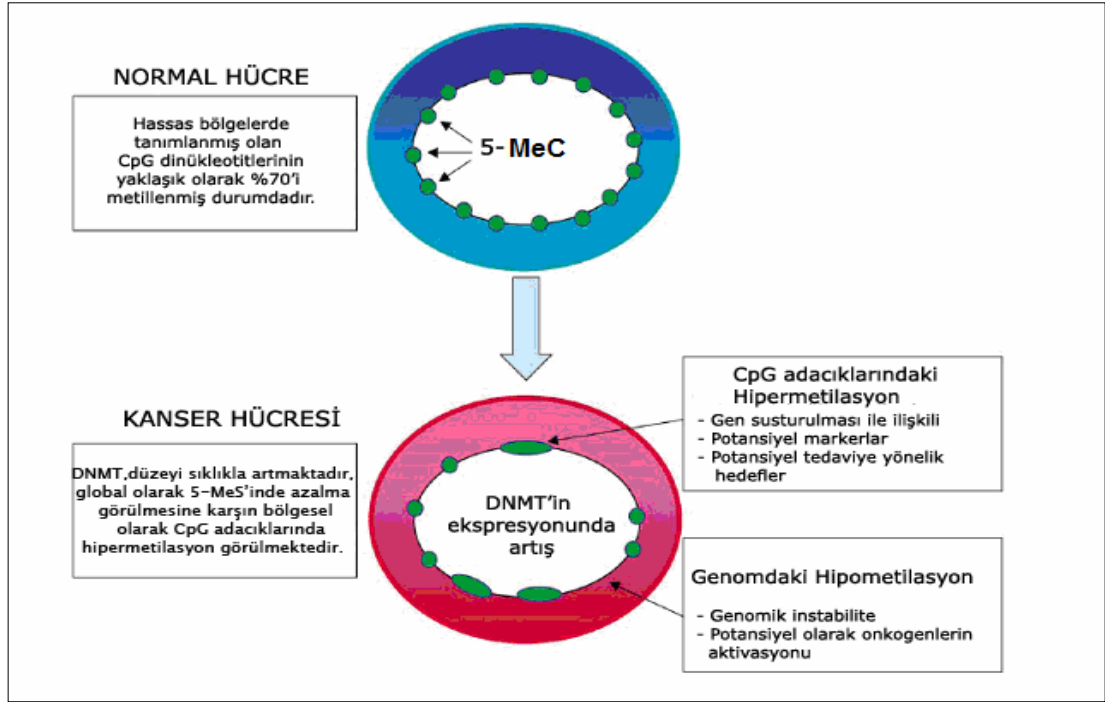


Şekil 1.3. Ökaryotlarda DNA Metilasyonu (Sulewska et al., 2007)

1.10. Metilasyon ve Kanser

Tümör hücreleri normal hücrelerle karşılaştırıldıklarında, DNA metilasyon desenlerinde büyük değişikliğe uğradıkları gözlenmektedir. Tümör hücrelerinde hipometilasyon çoğunlukla SINES (short interspersed nuclear elements) ve LINEs (long interspersed nuclear elements) gibi tekrarlayan DNA dizilerinde, hipermetilasyon ise CpG adalarında görülmektedir. Metilasyona bağlı tümör gelişimi genom genelindeki hipometilasyon, CpG adalarının hipermetilasyonu ile tümör süpresör genlerin inaktivasyonu, ve CpG dinükleotitlerindeki mutasyonlar olmak üzere üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (Novik vd., 2002).

Kanserde metilasyon değişiklikleri transkripsiyonel susturulma ve anahtar genlerin fonksiyonlarının kaybı ile ilişkilidir; ayrıca, mutasyon gelişimden de birebir sorumlu olmaktadır. DNA hipermetilasyonu, böbrek kanseri dahil birçok kanserde meydana gelen en yaygın ve en iyi karakterize edilen epigenetik değişikliktir (Novik vd., 2002).



Şekil 1.4. Kanserde metilasyon görünümü (Melki ve Clark 2002).

1.10.1. Genom Genelindeki Hipometilasyon

Tümörlerin geniş bir çeşitliliğinde gözlemlenen hipometilasyonun çoğunluğu satellit (uydu) dizilerde veya sentromerik bölgelerde lokalize olan tekrarlayan elemanlarda (SINEs ve LINEs) meydana gelmektedir. LINEs, genomda bulunan kararsız DNA'ların çoğu veya retrotranspozonlar şeklindedir. Kararsız DNA'ların hipometilasyonu transkripsiyonel aktivasyona neden olmakta ve pek çok kanser çeşidinde ortaya çıkmaktadır. Hipometile olma durumu kromozomal instabilite, hareketli elemanların reaktivasyonu ve baskılanma (imprinting) kaybı yolları ile kansere neden olmaktadır (Ehrlich, 2000).

Genom genelindeki hipometilasyon hemen her insan tümörünü açıklamaktadır. Örneğin; metastatik karaciğer kanseri, servikal kanser, prostat tümörleri gibi solid tümörlerde, B-hücreli kronik lenfositik lösemi gibi hematolojik tümörlerde bile hipometilasyon yaygındır. Kromozom 1 ve 16 üzerindeki perisentrik heterokromatin bölgeleri, bağışıklık sistemi eksikliği olan ve sentromerik instabiliteye sahip olan hastalarda ve pek çok kanserde hipometillenmiş durumdadırlar (Okano vd., 1999).

1.10.2. CpG Dinükleotidlerindeki Mutasyonlar

Bir genin kodlayan bölgesi içinde kalan sitozinin metillenmesi sonucunda da mutasyon oluşabilir; çünkü metile sitozinin kendisi de mutajeniktir ve kendiliğinden hidrolitik deaminasyonu ile C→T transisyonu ortaya çıkabilir ve mutasyon gelişebilmektedir. Somatik hücrelerdeki P53 tümör süpresör geninin kodlayan bölgesindeki nokta mutasyonlarının %50'si metillenmiş sitozinlerden kaynaklanmaktadır.

1.10.3. Tümör Baskılayıcı Genlerin Hipermetilasyonu

CpG adaları memeli genomunu oluşturan genlerin promotör bölgelerinde metillenmemiş halde bulunurlar; bununla birlikte, kanser hücrelerinde promotör bölgelerinin hipermetilasyonu tümörlerde en fazla gözlenen epigenetik değişikliklerdir. Metilasyona bağlı olarak promotör bölgenin transkripsiyonel susturulması kanser gelişimi ile ilişkilidir.

Knudson'ın iki alelik hedef (= double hit) hipotezine göre, bir tümör baskılayıcı geninin ekspresyon kaybına bağlı olarak ortaya çıkan tümör ancak o genin her iki alelinin de inaktive olması sonucu gözlenebilmektedir. Yapılan birçok çalışmada eşey hücrelerinde kalıtılan ilk mutasyondan sonra ikinci alelin susturulmasında en önemli mekanizmalardan birinin metilasyon olduğu gösterilmiştir. Mutasyonlu alelin promotör bölgesinde herhangi bir değişiklik olmazken, sağlam alelde metilasyon sonucu inaktivasyon meydana gelmektedir. Tümörlerde tümör baskılayıcı genin bir aleli hipermetillendiğinde, genin diğer alelinin mutasyonlu olduğu durumlar sıklıkla gözlenmektedir (Makki vd., 2013).

Promotör bölge hipermetilasyonuna bağlı olarak susturulan ve böylece kanserlere neden olan aday TBG büyüyen bir listesi bulunmaktadır. Bu genler, önemli bir DNA tamir geni kodlayan O6- metilguanin- DNA metiltransferaz (MGMT), bir hücre döngüsü düzenleyicisi siklin- bağımlı kinaz inhibitörü 2B (CDKN2B) olan p15 ve fonksiyonu bilinmeyen bir proteini kodlayan RAS onkogenine bağlanabilen RASSF1A'yı içermektedir. Tümör baskılayıcı grubunda önemli yerleri bulunan bu genlerin susturulmaları sonucunda, örneğin DNA hasarının tamiri uygun olarak yapılamayacağı için, mutasyonlar ortaya çıkmaktadır. Benzer şekilde MGMT genine ek olarak non-polipozis kolon kanserlerinin oluşumunda rol oynayan MLH1 geni de

örnek olarak verilebilir. MLH1, bir yanlış eşleşme (mismatch) tamir genidir ve mikrosatellit instabilitesi olan sporadik tümörlerde genellikle metillenmeye bağlı olarak susturulmuştur (Nakayama vd., 2003).

Ailesel tip kanser oluşturan genlerin sporadik formlarının %50' sinin hipermetilasyona bağlı olarak susturulmuş olmalarından dolayı geliştikleri gösterilmiştir. Von-Hippel Lindau sendromu (VHL), BRCA1 ve serin/treonin kinaz 11 (STK11) bu genlerden bazılarıdır (Esteller, 2000).

Bazı kanserlerde MASI, retinoblastoma 1 (RB1), E-catherin, Wilms tümörü 1 (WT1) gibi genlerin promotör bölgelerinde veya yakınlarında, normalde metillenmemiş olan sitozinlerin metile hale geldikleri gözlenmiştir. Değişen metilasyon durumu kalıcı olarak yavru hücrelere de kalıtılmaktadır (Kulis ve Esteller,2010). Bir TBG inaktivasyonunda epigenetik inaktivasyonun fonksiyonel etkisi bir inaktive mutasyona benzer olsa da, mutasyondan farklı olarak DNA metilasyonu ve diğer epigenetik değişiklikler farklı potansiyellerde geri dönüşebilme özelliği gösterebilmektedir (Issa ve Kantarjian, 2009).

Yakın geçmişte yapılan büyük ölçekli çalışmalarla, PBRM1, UTX, SETD2 ve JARID1C genlerindeki epigenetik değişikliklerin RHK patogenezinde etkili olduğu bildirilmiştir (Ibragimova vd., 2013). İlk insan TBG birisi olarak tespit edilmiş olan *VHL* geninin metilasyon ile inaktive olduğu anlaşılmıştır.

İntragenik somatik mutasyonlar sporadik berrak hücreli RCC içinde *VHL* inaktivasyonunun oluşmasında en önemli neden olmasına rağmen, epigenetik susturma önemli bir etkidir (olguların %20'si). Benzer şekilde 3p21 bölgesindeki *RASSF1A* geninin sporadik berrak hücreli ve papiller hücreli böbrek kanserlerinde %30-50 oranında metillendiği görülmüştür. RHK'de *RASSF1A* inaktivasyonu tipik alel kaybı ve metilasyon bileşiminden kaynaklanırken, *VHL* aksine *RASSF1* somatik intragenik mutasyon nadir görülmektedir (Morrissey vd., 2001).

RASSF1A, *VHL* ve *PBRM1*, *TU3A*, *DLEC1* aday TBG şeffaf hücreli RHK ve pRHK olgularında metillenmiş olduğu bildirilmiştir. Başka bir aday TBG olan *FHIT* geninin promotör bölgesinin %50 oranında metilasyona uğradığı belirtilmiştir (Zhang vd., 2010). *WNT/Katenin* yolağı düzensizliği çeşitli kanserlerde yaygındır, onkogenik aktivasyon sonucunda hücre çoğalması, hayatta kalma ve invazyona

katkıda bulunan genlerin ekspresyonu tetiklenmektedir. WNT yolağı inhibitörlerinin, RHK olgularında epigenetik olarak inaktive edildiği bildirilmiştir. SFRP1, SFRP2, SFRP4, SFRP5 ve Dickkopf (DKK1, DKK2 ve DKK3) genlerinin de renal hücreli kanserlerde sıklıkla metillendiği belirtilmiştir (Morris vd., 2010). Bunlara ek olarak bRHK'de aday TBG metilasyon analizleri yapılmış ve GREM1, RASSF1A, TIMP3 genlerinde promotör bölge hipermetilasyonu tespit edilmiştir (Van Vlodrop vd., 2010; Ellinger vd., 2010)

RPRM (Reprimo) geni 2q23.3 bölgesinde lokalize olan ve p53 yolu ile hücre döngüsünün G2' de durdurulmasından sorumlu bir tümör baskılayıcı gendir ve çeşitli kanserlerde anormal metilasyona uğradığı saptanmıştır (Takao Takahashi vd., 2005).

CST6 (Sistatin 6) aday TBG 11q13.1'de lokalize olup, lizozomal sistein proteazların fizyolojik inhibitörü olarak fonksiyon gösteren bulunan Sistatin M i kodlamaktadır. Berrak hücreli renal kanserlerde ve farklı tip kanserlerde CST6 geninde hipermetilasyon tespit edilmiştir (Morris vd.,2010). Ancak papiller hücreli renal kanserlerde bu genin metilasyon analizi daha önce hiç incelenmemiştir.

GREM1 (Gremlin1) geni 15q13.3 bölgesinde yerleşik olan ve Kemik Morfojenik Proteinler (BMP) 2.4 ve 7' ye bağlanıp bu ligandların reseptörleri ile etkileşmesini engelleyerek sinyal iletimini baskılayan bir glikoprotein olarak bilinmektedir. BMP' ler anjiyogenez, proliferasyon, apoptoz, farklılaşma ve gelişim sırasında hücre dışı matriks üretimi gibi çok sayıda hücreli olayda görev almaktadırlar (Van Vlodrop vd., 2010).

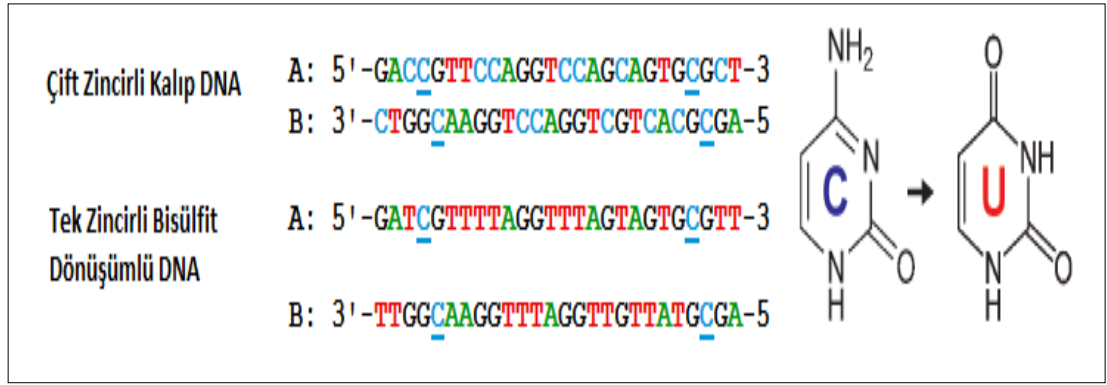
GREM1 geninin bRHK hastalarında promotör bölgesinde hipermetilasyon ile birlikte GREM1 mRNA' sının yokluğu bildirilmiştir. Ancak bu genin metilasyon durumu papiller tip RHK hastalarında daha önce hiç araştırılmamıştır (Michos vd., 2007).

1.11. Metilasyonun Araştırılmasında Kullanılan Metodlar

Sitozin metilasyonunun analizi için özellikle DNA dizisindeki metile sitozinin (5-MeC) hızlı tanısına izin veren bisülfid reaksiyonuna bağlı metotlar geliştirilmiştir. Bisülfid reaksiyonu, ilk kez 1970' li yılların başında tanımlanmış ve Frommer ve ark. tarafından DNA' daki Sitozin ve 5- MeC arasındaki farkın ayırt edilmesi için kullanılmıştır. Bu metotta, ilk olarak DNA sodyum bisülfid ile muamele edilir ve DNA' da sitozinler urasile dönüştürülür; ancak, 5-MeC' ler aynı, yani sitozin

şeklinde kalırlar (Şekil 1.5). İncelenecek olan DNA dizisi, daha sonra bisülfıt ile muamele edilmiş DNA için özgül primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilir.

5-MeC' nin araştırılmasında ilk bisülfıt reaksiyonunun uygulanmasından bu yana aynı prensibe dayanan Southern Blot, Restriksiyon enzimi-PCR, bisülfıt DNA dizi analizi, metilasyona hassas tek nükleotid primer uzaması (Ms-SNuPE), Restriksiyon belirteç genomik taraması (RLGS), Diferansiyel metilasyon hibridizasyonu (DMH), DNA mikroarray ve metilasyon spesifik PCR (MS-PCR) gibi birçok metot geliştirilmiştir (Clark vd., 1994).



Şekil 1.5. Bisülfıt muamelesinin sitozin ve 5'-MeC üzerindeki etkisi.

Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MS-PCR) ilk kez J.G. Herman tarafından tanımlanan yüksek duyarlılığa sahip bir metottur. Bu metotta, bisülfıt muamelesinden sonra metillenmiş ve metillenmemiş DNA arasında var olan dizi farklılığından faydalanılır; bisülfıt aşamasından sonra değişikliğe uğramış promotör bölgesinin amplifikasyonu için metilasyona özgül olan ve olmayan farklı primer çiftleri kullanılır (Peter ve Daiya, 2001). Sitozinler Urasile deamine olur, bu Urasiller PCR sırasında Timine replike olur, PCR'dan sonra çoğalmış olan DNA; metillenmemiş veya metilenmiş sekanslar için spesifik olan primer çifti ile elde edilir (Herman et al., 1996).

MS-PCR; DNA' nın verilmiş bir bölgedeki metilasyonun varlığının analizi için oldukça hızlı ve nitel bir yöntemdir. Primerlerin dikkatli seçilmesi çok önemlidir çünkü hem metilenmiş hem de metillenmemiş primer çiftleri ile yanlış pozitif sonuç elde etmek olasıdır ve bu da sonuçları değerlendirmeyi oldukça zorlaştırır. Genomik DNA' nın tamamlanmamış bisülfıt modifikasyonu da metilenmiş C' ler için yanlış pozitif sonuç verebilir.

1.12. Amaç

Son yıllarda RHK'un moleküler genetiği ile ilgili önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerindeki hipermetilasyonun kanser gelişiminde rolü olduğunu bildiren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Böbrek kanserlerinde çalışmalar daha çok berrak hücreli renal karsinomlara odaklanmıştır. Ancak papiller tipi renal karsinomlarda etkili aday genlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar nadirdir.

Bu tez çalışmasında amaç; daha önce papiller renal hücreli karsinom hasta dokularında çalışılmamış olan RPRM, CST6 ve GREM1 tümör baskılayıcı genlerinin metilasyon durumunun MS-PCR yöntemi ile belirlenmesi ve hipermetilasyon ile papiller renal hücreli karsinom gelişimi arasındaki ilişkisinin araştırılmasıdır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Koen Dreijerink vd. (2001), RASSF1A aday tümör baskılayıcı genin hipermetilasyon düzeyini bRHK hastalarında incelemişler ve 43 primer tümörün 39'unda (%91) RASSF1A promotör bölgede hipermetilasyon tespit etmişlerdir. Ayrıca, 18 RHK hücre hattında yaptıkları analizlerde kısmen veya tamamen metillenmiş olduklarını bulmuşlardır. RASSF1A promotör bölgesindeki metilasyonu sonucuna bağlı olarak mRNA transkripsiyonunun gerçekleşmediğini belirtmişlerdir.

Battagli vd. (2003) tarafından yapılan çalışmada, renal hücreli karsinom teşhisi konmuş 50 hasta örneğinde (35 şeffaf, 6 papiller, 3 onkositom, 2 kromofob, 2 transisyonel, 1 kanal toplama, 1 sınıflandırılmamış) bazı aday tümör baskılayıcı genlerin metilasyon durumları incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, VHL'de %12, p16'da %10, p14'de %18, APC'de %18, RASSF1A'de %52 ve TIMP3'de %60 oranında promotör hipermetilasyonu olduğu saptanmıştır.

Makoto Suzuki vd. (2004), ters transkriptaz PCR (RT-PCR) ve metilasyon spesifik PCR yöntemi ile 35 akciğer kanseri hücre hattı ve toplam 167 primer tümörlü bireyde RPRM aday tümör baskılayıcı gen ifadesini incelemişlerdir. Reprimo geninin metilasyon analizi sonucunda, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) hücre hatlarında %32, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hücre hatlarında %6 ve primer tümörlerde %31 oranında metilasyon tespit etmişlerdir. Akciğer kanserlerinde RPRM genindeki hipermetilasyonun sıklığının oldukça yüksek olduğu ve bunun p53 bağımsız bir şekilde gerçekleştiği sonucuna varmışlardır.

Dulaimi vd. (2004), böbrek kanserlerinde VHL, p16, p14, APC, MGMT, GSTP1, RARbeta2, RASSF1 A, E-catherin ve Timp-3 genlerinin promotör bölgelerindeki hipermetilasyon durumlarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, VHL genindeki

hipermetilasyonun şeffaf hücreli kansere özgül olduğu, RASSF1A' daki metilasyon sıklığının papiller hücre kanserlerinde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Takao Takahashi vd. (2005), Reprimo geninin p53-aracılı hücre döngüsünde rol oynaması ve daha önce Reprimo gen ekspresyon kaybının pankreas ve akciğer kanserlerinde tespit edilmiş olmasından yola çıkarak, diğer kanser türlerinde geniş bir yelpazede bu genin metilasyon durumunu incelemişlerdir. Bu amaçla 39 tümör hücre hattında, RT-PCR ve MS-PCR yöntemleri yardımıyla gen ifadesi ve promotör metilasyon durumunu araştırmışlardır. Reprimo metilasyonu mide kanserlerinin %79'unda, safra kesesi kanserlerinin %62'sinde, lenfomaların %57'sinde, kolorektal kanserlerin %56'sında, özefagus adenokarsinomlarının %40'ında, meme kanserlerinin %37'sinde ve lösemilerin %31'inde gözlenmiştir. Yumurtalık kanserleri, mesane kanserleri, serviks kanserleri, beyin tümörleri, malign mezotelyoma ve pediatrik tümörlerde metilasyon frekansları daha düşük seviyelerde gözlenmiştir (%0-20).

Suzuki vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada, farklı kanser örneklerinde DRM/Gremlin, RUNX3, ve HPP1 genleri incelenmiştir. 5-Aza-CdR dönüşümü ve MS-PCR yöntemlerini de içeren çalışmada 123 akciğer kanseri hastasının %70'inde, 37 meme kanseri hastanın %54'ünde, 57 lösemi hastanın %50'sinde GREM1 geninin promotör bölgesinin hipermetilasyonu saptanmıştır. Ayrıca 51 skuamöz hücreli karsinom hastasının %78'inde, malign mezotelyoma'lı 63 hastanın %60'ında, 57 mesane kanseri hastasının %51'inde, 20 lenfoma kanseri hastasının %50'sinde ve son olarak 50 prostat kanseri hastasının %20'sinde GREM1 geninin promotör bölgesinde hipermetilasyon saptanmıştır. Ayrıca, GREM1 geninin sigara içen akciğer kanseri hastalarında sıklıkla metile olduğu bildirmiştir.

Costa vd. (2007) tarafından yapılan çalışma, 147 RHK doku ve 18 gen üzerinde gerçekleştirilmiş olup bisülfid dönüşüm ve MS-PCR yöntemlerini içermektedir. Çalışma sonucunda; ARH1, SFN, MTHFR genlerinin tüm örneklerde %100 oranında metile olduğu saptanmıştır. Bu sonuçların yanı sıra, kRHK örneklerinde PTSG2 (%90), MDR1 (%80), ESR1 (%60), ESR2 (%50), FHIT (%50) ve RASSF1A (%40) genlerinde yüksek oranda metilasyon görülmüştür. CDH1, PTGS2 ve RASSF1A genlerinin promotör bölgelerindeki metilasyon seviyelerinin RHK'nın alt gruplarında önemli oranda farklılık gösterdiği bildirmiştir.

Carolina Bernal vd. (2008), 32 mide kanserli hastanın primer dokularında ve 43 kontrol grubu doku örneğinde MS-PCR ile 24 genin DNA metilasyon analizini yapmışlardır. Metilasyon ve gen ekspresyonu arasındaki ilişki 5-aza-2-deoksisitidin tedavisinden sonra MKN-45 hücre hattında değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda Test grubunda, 11 genin (APC, SHP1, E-cadherin, ER, Reprimo, SEMA3B, 3OST2, p14, p15, DAPK ve p16) en az %50 hipermetile olduğu bulunmuştur. 8 genin (BRCA1, p73, RARb, hMLH1, RIZ1, RUNX3, MGMT ve TIMP3) metilasyonu istatistiksel olarak SRCC tip mide kanseri ile ilişkili bulunmuştur (p = 0.03). APC, SHP1, E-cadherin, ER, Reprimo, SEMA3B ve 3OST2 genlerinin kontrol gruplarında yüksek frekansta metillediği görülmüştür. Reprimo aday tümör baskılayıcı geninde tümörlü dokuda %97,7 (43/42) ve kontrol grubunda %95,3 (43/41) oranında metilasyon tespit edilmiştir.

Baldewijns vd. (2008) yaptıkları çalışmada, kromofob tip renal hücreli karsinomlarda CDH1 de %13, RARB'da %6, CDKN2 (p14 ve p16) genlerinde %9-27, RASSF1'de %27, CoL1A1'de %50, TIMP3'de %44, ABCB1' de %80, ESR1'de %60, ESR2'de %50, FHIT'de %50, MTHFR'de %100 ve PTGS2'de %90, IGFBP3 ve IGFBP1 genlerinde %50 oranında metilasyon olduğunu tespit etmişlerdir.

Thomas Dunwell vd. (2009), çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemide epigenetik olarak inaktif genlerin belirlenmesi için bir çalışma yapmışlar ve üç yeni genin ALL çocukluk çağında sıklıkla metilasyona uğradığını göstermişlerdir. PPP2R3A' nın T hücrelerinde (%69) ve B hücrelerinde (%82) sıklıkla metillenmiş olduğu, öte yandan FBLN2 ve THRB' nin B hücrelerinde (sırasıyla %58 ve %56) sıklıkla metilasyona uğrarken T hücrelerinde daha az sıklıkla (her iki gen için %17) metillendiği bildirilmiştir. Çocukluk çağı ALL'de BNC1 geninin T hücrelerinde %77 ve B hücrelerinde %79 oranında metillenmiş olduğu, ayrıca MSX1 geninin de T hücrelerinde %25 oranında metilasyona uğradığı tespit edilmiştir. Bu çalışma PPP2R3A, FBLN2, THRB, BNC1 ve MSX1'in lösemide epigenetik inaktivasyonu gösteren ilk rapor olarak kayda geçmiştir.

H. Onay ve vd. (2009) yaptıkları çalışmada, renal hücreli kanser RHK hastalarında 3 farklı doku örneğinde (normal, premalign, malign) 7 TBG'in (RASSF1A, ECAD, TIMP3, APC, MGMT, p16 ve RARβ2) metilasyon kalıplarının araştırılmasını amaçlamışlardır. RHK tanısı konmuş 21 hastada yapılan çalışma sonucunda,

RASSF1A geninde %76, p16'da %80, ECAD'da %42, TIMP3'de %33 ve MGMT'de %33 oranında metilasyon gözlenmiştir. Öte yandan, APC geninde %14 ve RARβ2' de %19 olmak üzere düşük seviyede metilasyon olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, 5 TBG olan RASSF1A, ECAD, TIMP3, MGMT ve p16 genlerini içeren metilasyon temelli gen testi RHK erken tanısında yararlı olabileceği önerilmiştir.

MR Morris vd. (2010), 11 renal hücreli karsinom (RHK) hücre hattı üzerinde yüksek yoğunluklu gen ekspresyonu düzeylerini epigenetik olarak incelemişlerdir. Çalışmada ayrıca yaş aralığı 23-79 arasında olan 61 primer RHK (%80 berrak hücreli ve %20 berrak hücreli olmayan) hasta dokusunda ve makroskopik olarak normal olan komşu böbrek dokusu analiz edilmiştir. Seçilen 24 genin promotör metilasyon durumu incelenmiş ve DMRTB1, SCYA20, CLDN6, TPM2L1, LOXL ve ZFP42 genlerinin RHK hücre hatlarında metillendiği belirtilmiştir. Ayrıca, BNC1 geninde %46, PDLIM4'de %43, RPRM'de %44, CST6'da %46, SFRP1'de %34, GREM1'de %41, COL14A1'de %44 ve COL15A1'de %53 oranında promotör bölge metilasyonu gözlenmiştir. Bu genlerin hipermetilasyon ile transkripsiyonel olarak susturulduğu düşünülmüştür. BNC1 veya COL14A1 metilasyonu tümör boyutu, aşaması ve derecesi açısından kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur.

Van Vlodrop vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, 185 berrak RHK doku örneği kullanılmış ve GREM1 geninin promotör bölgesinin yüksek seviyede metillenmiş olduğu bildirilmiştir. Ayrıca promotör bölge hipermetilasyonun tümörün çapı, derecesi, safhası ve prognozuyla ilişkili olduğu da tespit edilmiştir.

Ellinger vd. (2010) yaptıkları çalışmada, papiller tip renal hücreli karsinomda (pRHK) APC, CDH1, GSTP1, RASSF1A ve TIMP3 genlerinin CpG adacıklarındaki hipermetilasyon durumunu araştırmışlardır. Sonuç olarak, RASSF1A geninde metilasyon pRRHK ve normal örneklerde sırasıyla %100 ve %94,4 oranında gözlenmiştir. RASSF1A hipermetilasyonu pRHK ve normal doku arasındaki ayrımında %87,5 oranında bir duyarlılık %73,3 oranında bir özgüllük göstermiştir. Diğer genlerin metilasyon yüzdeleri tümör ve normal örneklerde sırasıyla APC'de %3,0-%6,7, CDH1'de %15,6-%0, GSTP1'de %21,9-%6,7 veTIMP3'de % 6,3-%0 olarak belirlenmiştir. Metillenmiş gen bölgeleri patolojik evre ile (p=0.007) ve lenf nodu metastazı (p=0.008) ile ilişkilendirilmiştir. RASSF1A genindeki anormal

hipermetilasyonun pRHK için bir biyolojik biyomarker olabileceği belirtilmiştir. RASSF1A genindeki DNA hipermetilasyonu, histolojik alt tip ne olursa olsun pRHK dokularında yaygın gözlenmiş olup aynı zamanda normal komşu dokularda da düşük seviyelerde görülmüştür.

Luo J. vd. (2010), 100 gastrik adenokarsinom hasta örneğinde Reprimo ve S100A2 aday tümör baskılayıcı genlerin ifadelerini incelemişler ve patolojik ve klinik parametreler ile ilişkilendirmişlerdir. Reprimo ve S100A2 gen ifadeleri immünohistokimyasal analizler ile değerlendirilmiştir. Hastaların %52'sinde Reprimo ve S100A2 gen ifade kaybı gözlenmiştir. Reprimo ifade kaybı önemli ölçüde tümör invazyonu ($p = 0.000$), lenf damarı invazyonu ($p = 0.006$) ve lenf nodu metastazı ($p = 0.000$) derinliği ile ilişkilendirilmiştir. S100A2 ifade kaybı belirgin histolojik tipi ($p = 0.009$), invazyon derinliği ($p = 0.033$), lenf damarı invazyonu ($p = 0.01$) ve lenf nodu metastazı ($p=0.001$) ile ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak mide adenokarsinomlarında Reprimo ve S100A2 gen ifadelerinin kaybının sık görüldüğü ve Reprimo ve S100A2 ifadelerinin mide adenokarsinomu tespiti için potansiyel biyolojik biyomarker olabileceği bildirilmiştir.

Lv vd. (2011), insan renal hücreli karsinomunda UNC5C gen ifadesi ve epigenetik kontrolü üzerine yaptıkları çalışmada 44 normal ve tümörlü doku örneği kullanılmıştır. Bisülfid dönüşüm ve MS-PCR yöntemlerinin kullanıldığı çalışmada, UNC5C geninin promotör bölgesinde %27,3 oranında metilasyon saptanmış ve heterozigosite kaybının (LOH) %61,4 olduğu tespit edilmiştir. UNC5C geninin tümör oluşumunu, metastazı, sitotoksik ajanların kimyasal etkilerini baskıladığı bildirmiştir.

Morris vd. (2011), RHK'da sık metillenmiş ve susturulmuş genleri tanımlamak için bir genom stratejisi kullanmışlardır. 9 RHK tümörü ve 3 malign olmayan normal böbrek doku örnekleri üzerinde MeDIP analizi yapılmış ve dizi analizi ile metillenmiş 56 aday tümör baskılayıcı genden 9 geni teyit etmişlerdir; KLHL35 (%39), QPCT (%19), SCUBE3 (%19), ZSCAN18 (%32), CCDC8 (%35), FBN2 (%34), ATP5G2 (%36), PCDH8 (%58) ve CORO6 (%22). SCUBE3 metilasyonunun kanser ölüm veya nüks riski ile önemli ölçüde ilişkili olduğu belirtilmiştir ($p = 0,0046$).

Chimonidou vd. (2011), çalışmalarında 23 sağlıklı, 56 meme kanseri ve 27 metastazı doğrulanmış hasta doku örneklerini kullanmışlar ve tümör baskılayıcı ve metastaz baskılayıcı genlerin DNA metilasyon durumlarını incelemişlerdir. Sonuç olarak; CST6 geninde meme kanseri örneklerinin %17,9'unda, metastazda ise %37 oranında promotör bölge metilasyonu saptanmıştır. Ayrıca, meme kanserinde ve metastazda sırasıyla BRMS1 geninde %32,1-%44,4 oranında, SOX17 geninde ise %53,6-%74,1 oranında promotör bölge metilasyonu tespit etmişlerdir.

Radpour vd. (2011), 126 meme kanseri hastasının plazma ve serum örneklerinde metilasyon analizi yaparak aday tümör baskılayıcı genlerin metilasyon durumunu incelemişlerdir. Genlerin plazma ve serum örneklerindeki metilasyon düzeyleri sırasıyla CST6 geninde %52,8-%30, APC' de %47,2-%25, BIN1'de %52,8-%30, BRCA1'de %50-%40, GSTP1'de %27,8-%35, P16'da %50-%40, P21'de %38,9-%25, TIMP3'te ise %30,6-%40 olarak belirlenmiştir.

Yi J.M vd. (2013), kanser ölümlerinde dördüncü sırada yer alan pankreas kanserinde bazı tümör baskılayıcı genlerin metilasyon analizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 173 hasta serumunda DNA metilasyonu analizi yaparak erken evre pankreas kanserlerini tespit etmek için bir nanoparçacık özellikli MOB (Methylation On Beads) teknoloji kullanılmıştır. Sonuç olarak, pankreas kanserleri hastada BNC1 geninde %92 ve ADAMTS1 geninde %68 oranında metilasyon görülmüş ve hipermetilasyonun erken evre pankreas kanserlerini tespit etmek için potansiyel biyolojik marker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Akira Ooki vd. (2013), 7 hücre hattı (GCIY, AZ521, KatoIII, SH10, H111, MKN74, NUGC4) ve 83 primer insan gastrik kanser dokusundaki metilasyon durumu ile klinik tablo arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Primer gastrik kanser dokularının %80'inde (8/10), kontrol grubu normal dokularının %10'unda (1/10), hücre hatlarının %75'inde (6/8) RPRM promotör bölge metilasyonu görülmüştür. Reprimo metilasyonu kemoterapi ile tedavi edilen gastrik kanserli hastalarda kötü yanıtla ($p = 0.028$) ve gelişmiş gastrik kanserli hastalarda kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur ($p=0.03$). Sonuç olarak, Reprimo metilasyonunun hem tümör saldırganlığı hem de kemoterapi yanıtı için belirteç olarak kullanılabileceği önerilmiştir.

Ibragimova vd. (2013), 25 berrak, 15 papiller, 10 kromofob ve 25 renal onkositom tipi RHK hastasında yaptıkları çalışmada, ZNF177'de %41, GRIK1'de %56 ve

CHODL'de %56 oranında hipermetilasyon saptamışlardır. Papiller RHK'da BCAN geninde (%93), kRHK'da SCGN geninde (%30) ve onkositom'da NAGS geninde (%36) hipermetilasyon tespit edilmiştir. Öte yandan, OXR1 geninde bRHK ve pRHK hastalarında %62 oranında hipermetilasyon saptanırken kRHK ve onkositom hastalarında metilasyon saptanmamıştır.

Wang vd. (2013) yaptıkları çalışmada, RHK hastalarının %90,5'inde hMOF gen ekspresyon düzeylerinin baskılandığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra hMOF protein ifade eksikliği H4K16 histon asetilasyonu ile ilişkili bulunmuş olup CA9 aşırı ifadesi hastaların %100'ünde gözlenmiştir.

Peters ve Dubrowinskaja (2014), 48-80 yaş aralığında olan 18 RHK hastasında aday tümör baskılayıcı genlerinin metilasyon seviyelerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, CST6 ve LAD1 genlerindeki hipermetilasyonun antianjiyojenik tedavi alan mRHK hastalarında sağ kalım ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METODLAR

3.1. MATERYAL

3.1.1. Örnekler

pRHK tanısı kesinleşmiş, hem tümör hem de normal dokusu mevcut bulunan 22 pRHK hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından patolojik değerlendirme ve teşhis koyma amacıyla hastalardan temin edilmiş ve arşivlenmiş parafine gömülü doku blokları çalışmada kullanılmıştır. Tümör ve normal dokulardan oluşan toplam 44 parafine gömülü dokudan 8µ kalınlığında 5'er kesit alınmış ve 2 ml tüpler içerisine yerleştirilmiştir. Üzerlerine 1'er ml ksilen eklenerek ve tüplerin kapakları parafilm ile kapatılarak muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Gerekli Materyaller

3.1.2.1. Alet ve Gereçler

- ◆ Mikropipetler (0.1-10µl, 20-200µl, 100-1000µl (Gilson-Pipetman® Neo, Fransa)
- ◆ Elektroforez Tankı, Güç Kaynağı (BIO-RAD, PowerPac® Basic, Fransa)
- ◆ UV Jel Görüntüleme Cihazı (Vilber Lourmat, Almanya)
- ◆ Santrifüj (Hettich Zentrifugen-Mikro 200, Almanya)
- ◆ Santrifüj (P Selecta Centronic- BL II, İspanya)
- ◆ Isı Bloğu (Wealtec-Wealtec Corp.-Hb-1, USA)
- ◆ Gradient PCR Cihazı (Takara, Japonya)
- ◆ Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)
- ◆ Derin Dondurucu (Uğur, Türkiye)

- ◆ Otoklav (Nüve, Türkiye)
- ◆ Hassas Terazi (Precisa, İsviçre)
- ◆ Etüv (Mettler, Almanya)
- ◆ Vorteks (Bio Metra, Almanya)
- ◆ Buzdolabı (Vestel, Türkiye)

3.1.2.2. Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

- ◆ QIAGEN® QIAamp® DNA FFPE Tissue kiti (Qiagen, Almanya)
- ◆ QIAGEN® EpiTect® Bisulfite kiti (Qiagen, Almanya)
- ◆ QIAGEN® EpiTect® MSP (Qiagen, Almanya)
- ◆ DNA Ladder (50bç-100bç) (Fermentas, USA)
- ◆ Steril filtreli mikropipet uçları (10 µl, 100 µl, 1000 µl'lik) (Gilson, USA)
- ◆ Eppendorf tüpler (0,2 ml, 0,5 ml ve 1,5 ml'lik) (Axygen, Kanada)
- ◆ Eppendorf tüp destekleyicileri (Isolab, Almanya)
- ◆ Disodyum EDTA (Na₂EDTA) (Amresco, Kanada)
- ◆ Parafilm (Parafilm® M, USA)
- ◆ Etanol (%96) (Merk, Kanada)
- ◆ Etidyum Bromür (Applichem, USA)
- ◆ Borik Asit (Merck, Kanada)
- ◆ Tris-HCl (Sigma, USA)
- ◆ Tris Baz (Sigma, USA)
- ◆ Agaroz (Sigma, USA)
- ◆ Orange G (Sigma, USA)
- ◆ Ksilen (Merck, Almanya)
- ◆ Gliserin (Merck, Almanya)
- ◆ Primer Setleri (Qiagen, Almanya)

3. 2. METOT

3. 2. 1. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada Papiller Tip Renal hücreli Karsinom tanısı konmuş hasta bireylere ait, parafine gömülü tümörlü doku ve aynı hasta bireylerin normal doku örneklerinden QIAGEN® QIAamp® DNA FFPE Tissue kiti kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 22 pRHK hastasının normal ve tümörlü dokularından toplam 44 genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. QIAamp@ DNA FFPE Kit İçeriği

Reaktifler	Hacim	İçeriği
Tampon ATL	10 ml	Doku lizis tamponu
Tampon AL	12 ml	Guanidin hidroklorür içerir, lizis tamponu
Tampon AW1 (konsantre)	19 ml	Yıkama tampon1, Guanidin hidroklorür içerir. 25 ml EtOH eklenir.
Tampon AW2 (konsantre)	13 ml	Yıkama tampon2 30 ml EtOH eklenir.
Tampon ATE	12 ml	
Proteinaz K	1.25 ml	DNA'ya bağlı olan proteinleri parçalayarak DNA'nın serbest kalmasını sağlar.

Protokol:

- Oda sıcaklığında tampon AW1 (19ml) üzerine 25 ml EtOH ve tampon AW2 (13ml) üzerine 30 ml EtOH eklenerek konsantre hale getirilmiştir.
- Formalinle fiske edilmiş parafine gömülü dokulardan 8µ kalınlığında 5 kesit alınarak 2ml ependorf tüp içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 1ml ksilen eklenerek kısa bir süre vorteksle karıştırılmıştır.
- Ksilenle muamele edilen dokular ependorf tüp içerisinde bir gece oda sıcaklığında inkübe edilerek parafilminden uzaklaştırılmıştır.
- Örnekleri içeren ependorf tüpler 2 dakika, 15000 rpm. de santrifüj edilmiştir.
- Pipet yardımıyla süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 1ml %96-100 EtOH eklenmiş ve kısa bir süre vorteksle karıştırılmıştır.

- 2 dakika 15000 rpm. de tekrar santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dk kapakları açılarak pellet'deki tüm EtOH'un uzaklaşması sağlanmıştır.
- Pelletin üzerine 180 µl ATL tamponu ve 20 µl proteinaz K eklenerek kısa bir süre vorteksle karıştırılmış ve örnekler ısı bloğunda 56°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 1 saatin ardından ısı derecesi 90°C'ye çıkartılarak örnekler 1 saat daha inkübe edilmiştir.
- Kapakta sıvı kalmaması için tüpler çok kısa santrifüj edilmiş ve sonra 2 µl RNase (100mg/ml) eklenmiştir. 2 dk. oda sıcaklığında bekletilerek RNA içermeyen DNA elde edilmesi sağlanmıştır.
- Örneklere, 200 µl AL tamponu eklenerek kısa bir süre vorteksle karıştırılmıştır.
- 200 µl EtOH eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır. Kapakta sıvı kalmaması için tüpler çok kısa santrifüj edilmiştir.
- OIAamp MinElute® Kolonları 2 ml toplama tüplerine yerleştirilerek, kenarları ıslatılmadan bütün lizat kolonun tam ortasına gelecek şekilde aktarılmış ve 2 dk 11000 rpm. de santrifüj edilmiştir. Ardından, kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
- Kolonların kapakları dikkatlice açılarak kolonun tam ortasına 500µl AW1 tamponu eklenmiş, kapakları kapatılarak 2 dk 11000 rpm. de santrifüj edilmiştir.
- Kolonlar yeni toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 500µl AW2 tamponu eklenerek 2 dk. 11000 rpm. de santrifüj edilmiştir.
- Kolonlar yeni toplama tüpüne yerleştirilerek 3 dk. 14.000 rpm. de santrifüj edilmiştir.
- Kolon yeni toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 55µl ATE tamponu eklenmiştir. Kapakları kapatılarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
- Tüpler, 1 dk 14.000 rpm. de. santrifüj edilmiştir.
- DNA örnekleri 24 saat içerisinde kullanılacaksa 2-8°C de, eğer daha uzun süre bekleyecekse -80°C'de saklanmıştır.

3.2.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi

DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (NanoDrop ND) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. 260 nm DNA'nın, 280 proteinin ve 230 ise fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyudur. DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakılmaktadır. 260/280 oranının ~1,8 ve A260/ A230 oranının ise 1,8-2,2 olması DNA'nın saf olduğunu göstermektedir.

3.2.3. Bisülfite Dönüşümü (DNA Modifikasyonu)

MS-PCR' ın başlangıç basamağı, DNA örneğinin bisülfite modifiye edilmesidir. DNA'nın bisülfite ile modifikasyonu sonucunda metillenmemiş olan bütün sitozinler urasile dönüşürken, 5-metilsitozinler hiçbir değişikliğe uğramadan aynen kalır. Bisülfite reaksiyonda, metillenmemiş tüm sitozinlerin deamine edilmesi ve sülfat bağlanması ile bu sitozinler, urasile çevrilir. DNA zincirlerinin bisülfite muamelesinde, metile olmayan DNA dizisi bisülfite hassas, metile olan DNA dizisi bisülfite dirençli olacaktır. DNA'daki kırılma ve kayıpların en aza indirgenmesi, DNA'nın yeterli miktarda ve saf elde edilebilmesi ve böylece PCR verimliliğinin artırılması için bisülfite dönüştürme ve pürifikasyon işlemleri için QIAGEN® EpiTect® Bisulfite kiti kullanılmıştır. Bisülfite ile muamele edildikten sonra pürifikasyon yapılarak bisülfite tuzlarının ve diğer kimyasallar uzaklaştırılmıştır.

Tablo 3.2. QIAGEN® EpiTect® Bisulfite Kit İçeriği

Reaktifler	Hacim
Bisülfite Karışımı	6 ml
DNA koruyucu Tampon	1.9 ml
RNA içermeyen su	3X 1,9 ml
Tampon BL	31 ml
Tampon BW (konsantre)	2x13 ml
Tampon BD (konsantre)	3 ml
Tampon EB	15 ml
Taşıyıcı RNA	310 µl

Protokol:

- Her bisülfıt karışım üzerine 800µl RNaz içermeyen su eklenerek çözülmesi sağlanmıştır. Bisülfıt karışım tamamen çözülene kadar vorteks ile karıştırılmıştır (Gerektiğinde çok kısa süre 60°C’de inkübe edilerek).
- 35µl DNA koruyucu tampon çözelti, 85 µl Bisülfıt karışım ve 20 µl DNA örneği eklenerek karışım hazırlanmış ve DNA bisülfıt dönüşüm reaksiyonu PCR cihazında Tablo 3.2.’de belirtilen programa uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.
- İnkübasyon sonunda her örneğin üzerine taşıyıcı RNA (10 mg/ml/örnek) içeren Tampon BL çözeltisi eklenmiş ve vorteks ile karıştırıldıktan sonra kısa santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Her örneğe 250 µl Etanol (%96-100) eklenmiş, 15 sn vorteksle karıştırılarak kısa süreli santrifüj yapılmıştır.
- Örnekler EpiTect Spin kolonlar içerisine transfer edilerek 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpleri atılmış ve kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
- Her kolona 500 µl yıkama tamponu eklenmiş ve 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpleri atılarak kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
- Kolonlara 500 µl desülfonasyon tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında (15-25°C) 15 dakika inkübe edilmiştir.
- 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılmış, toplama tüpleri atılarak kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir. Bir önceki basamak yeniden tekrarlanmıştır.
- Yeni 2 ml toplama tüpleri içine kolonlar yerleştirilmiş ve uzaklaştırmak için 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
- Kolonlar temiz tüplere aktararak sıvının tamamen buharlaşması için ısı bloğunda kapakları açık halde 56°C’de 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
- Kolonlar temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüpler içine yerleştirilmiş ve üzerine 20 µl elüsyon tamponu eklenmiştir.
- Tüpler 12.000 rpm’de 1 dk. santrifüj edilerek DNA örnekleri toplanmış ve elde edilen DNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.2.4. MS-PCR (Metilasyon Spesifik PCR)

RPRM, CST6 ve GREM1 genlerinin promotör bölgesinin metilasyon durumu MS-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. MS-PCR; Sitozinlerdeki metilasyon durumunun tespiti için geliştirilen etkili yöntemlerden birisidir.

MS-PCR tekniği, RPRM, CST6 ve GREM1 genlerinin promotör bölgelerini tanıyan metillenmiş ve metillenmemiş DNA'ya özgül primer dizileri kullanılarak QIAGEN® EpiTect® MPS Kit protokolüne göre uygulanmıştır.

Tablo 3.3. MS-PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

RPRM promotör primer dizisi (86 bç.)		
Metile Olmayan	İleri primer	5'- TTG TGA GTG AGT GTT TAG TTT G -3'
	Geri primer	5'- TAA TTA CCT AAA ACC AAA TTC ATC -3'
Metile Olan	İleri primer	5'- GCG AGT GAG CGT TTA GTT C -3'
	Geri primer	5'- TAC CTA AAA CCG AAT TCA TCG -3'
GREM1 promotör primer dizisi (155 bç.)		
Metile Olmayan	İleri primer	5'- ATT TAA ATG GGA GAT GGT GTG -3'
	Geri primer	5'- AAC CAA AAC CAC CAA AAC TCA -3'
Metile Olan	İleri primer	5'- ATT TAA ACG GGA GAC GGC GCG -3'
	Geri primer	5'- GAC CAA AAC CGC CGA AAC TCG -3'
CST6 promotör primer dizisi (106 bç.)		
Metile Olmayan	İleri primer	5'- GGT TTT TTG AAT TTT GTA GGA TTT T-3'
	Geri primer	5'- CAA CTT TTA CCC ACT AAA CCA GC -3'
Metile Olan	İleri primer	5'-GTT TTT TGA ATT TCG TAG GAT TTC -3'
	Geri primer	5'- AAC TTT TAC CCG CTA AAC CG -3'

Tablo 3.4. Genlerin amplifikasyonu için hazırlanan PCR karışımlarının içeriği

	U	M	U Kontrol DNA	M Kontrol DNA
MS-PCR karışımı	6,2	6,2	6,2	6,2
İleri primer	0,3	0,3	0,3	0,3
Geri primer	0,3	0,3	0,3	0,3
DNA	1	1	1	1
H₂O	2,2	2,2	2,2	2,2
Toplam	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tablo 3.5. MS-PCR işlemi için uygulanan program

	İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Basamak 1	Ön denatürasyon	95 °C	10 dk.	1
	Denatürasyon	95 °C	20 sn.	
Basamak 2	Primer Bağlanma	Primere Özgü	30 sn.	40
	Zincir Uzama (Sentez)	72 °C	30 sn.	
Basamak 3	Final Sentez	72 °C	10 dk.	1
Basamak 4	Sonlandırma	+4 °C	∞	1

3.2.5. Agaroz Jel Elektrofrez

Birçok önemli biyolojik makromolekül (örn. amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler) iyonlaşabilen gruplara sahiptir ve pH'ya bağlı olarak çözeltide katyon (+) ya da anyon (-) biçiminde, elektrik yükü taşıyan türler olarak bulunurlar. Agaroz jel elektrofrez DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntemdir. DNA'nın jeldeki konumunu, düşük konsantrasyonlarda floresan veren etidyum bromid ile boyayarak belirlemek mümkündür (Westermeier, 1997).

Yapılan bu çalışmada MS-PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünleri %2' lik agaroz jelde elektrofrez işlemi ile ayrıştırılarak ve etidyum bromür kullanılarak DNA bantlarının görüntülenmesi sağlanmıştır.

%2'lik Agaroz Jelin Hazırlanma Protokolü;

- 2 gr agaroz hassas terazide tartılıp bir erlene konulmuştur.
- Üzerine 100 ml 1xTBE (10 mL.1xTBE ve 90 mL. dH₂O) tamponu ilave edilmiş ve mikrodalga fırın kullanılarak kaynatılmıştır.
- Erlen yaklaşık 50-55°C'ye soğutulduktan sonra, içerisine 20mg/ml etidyum bromür eklenmiştir.
- Karışım hava kabarcığı olmayacak şekilde jel tabağına dökülmüş ve oda sıcaklığında yaklaşık 40 dk. polimerize olması için bekletilmiştir.
- Jel tabağı, jel tamamen tamponun içerisinde olacak şekilde tankın içerisine yerleştirilmiştir.
- En az bir kuyucuğa DNA belirleyici (50 bç) olmak üzere, çalışılan bireylere ait PCR ürünleri yükleme tamponu (Orange G) ile karıştırılarak yüklenmiştir.
- Örnekler 120 V'da yaklaşık 15-20 dakika yürütülmüş, ardından jel görüntüleme sistemi kullanılarak UV ışığında bantların görüntülenmesi sağlanmıştır.

3.2.6. İstatistiksel Analizler

Görüntülenen jel üzerindeki bantların varlığı/yokluğu dikkate alınarak metilasyon durumu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler "SPSS 13,0 for Windows" programı ile analiz edilerek incelenmiş olup $p>0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamsız, $p<0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. Hastalara Ait Bulgular

Bu çalışmada; Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan hastalar arasından tarama yapılarak çalışma grubumuza uygun 22 papiller tip hastalarının normal ve tümörlü dokularından toplam 44 doku bloğu seçilmiştir. Patolojik değerlendirmeler için hastaların %77,2'sinde nefrektomi uygulanmış, geri kalan %22,8'inde eksizyon, rezeksiyon ve yayma yöntemi ile doku eldesi sağlanmıştır.

Tablo 4.1. pRHK hastalarından elde edilen dokulara ait bilgiler

pRHK	(n=22)
Ameliyat	
Sağ böbrek	11
Sol böbrek	9
Kist aspirasyon sıvısı	1
Böbrek	1
Alınma şekli	
Nefrektomi	17
Eksizyon	3
Yayma	1
Rezeksiyon	1

Çalışmamıza dahil edilen pRHK tanısı konmuş 22 hastanın 17'si (%77,2) erkek, geri kalan 5'i (%22,8) ise kadın olup erkek/kadın oranı 3.4:1' dir. pRHK tanısı konmuş olgularının yaş ortalaması kadınlarda 46,6 (15-71), erkeklerde ise 59,58 (41-71) iken cinsiyet ayırımı yapmaksızın yaş ortalaması ise 56,6 (15-71) olarak hesaplanmıştır. 50 yaş ve üzerinde olan hastalar çalışmaya dahil edilen olguların 18'ini (%81,81) oluşturmaktadır.

Tablo 4.2. pRHK olgularının cinsiyet, yaş ve patolojik evre dağılımı

	pRHK	Olgu sayısı (%)
Cinsiyet	Erkek	17 (%77,2)
	Kadın	5 (%28,2)
	E:K	3,4:1
Yaş	< 60	11(%50)
	≥ 60	11 (%50)
Patolojik Evre	T1	6 (%27,2)
	Diğerleri (T2, T3, T4)	16 (%72,8)

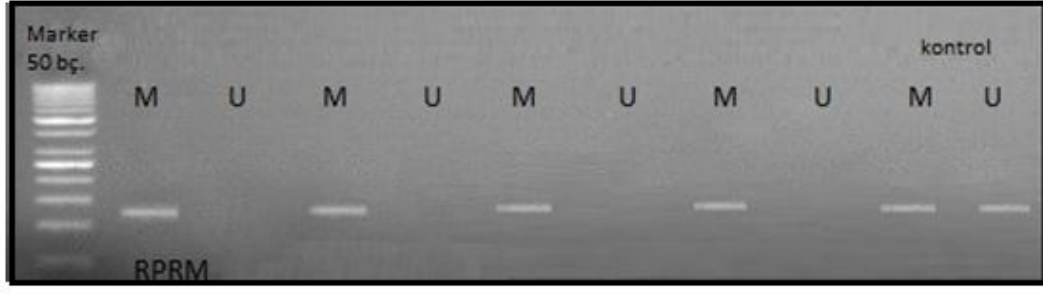
4.2. DNA Kantitasyon Sonuçları

pRHK hastalarına ait parafine gömülü tümörlü doku ve normal doku örneklerinden toplam 44 genomik DNA izolasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. DNA örneklerinin konsantrasyonları ölçüldüğünde normal DNA konsantrasyonu ortalaması 93,118 µg/ml ve tümörlü DNA konsantrasyonu ortalaması 152,109 µg/ml olarak tespit edilmiştir. İzolasyon aşaması sonrası bisülfid modifikasyonuna hazırlık aşamasında elde edilen genomik DNA distile su ile seyreltilerek konsantrasyonları eşitlenmiştir.

4.3. RPRM Genindeki Metilasyon Durumu

RPRM genindeki metilasyon yüzdesi pRHK hastalarının tümör dokularında yaklaşık %59 (13/22) oranında bulunmuş olup normal dokularda metilasyon sıklığı yaklaşık %5 (1/22) olarak belirlenmiştir. Bu durumda tümör dokularındaki metilasyon normal dokulara göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. [p=0.017, OR (%95CI)=4.91 (1.33-18,2)].

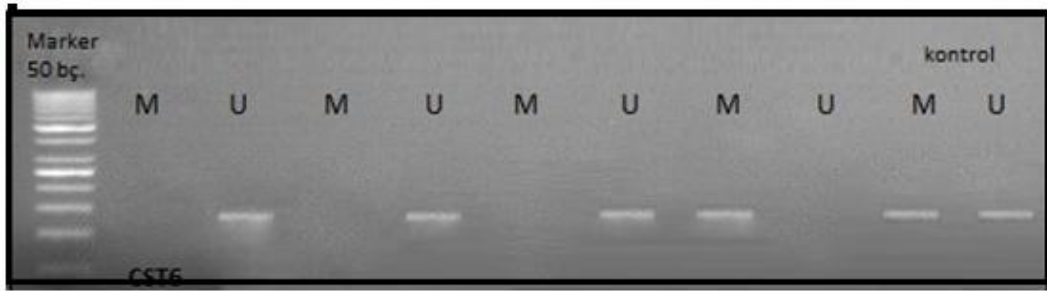
Metilasyon durumu ile hastaların cinsiyet, yaş ve patolojik evreleri ile hipermetilasyon arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.1. RPRM geninin MS-PCR analizine sonucu örnek jel görüntüsü (M: metillenmiş, U: metillenmemiş, Kontrol M-U: QIAGEN® EpiTect® PCR Control set)

4.4. CST6 Genindeki Metilasyon Durumu

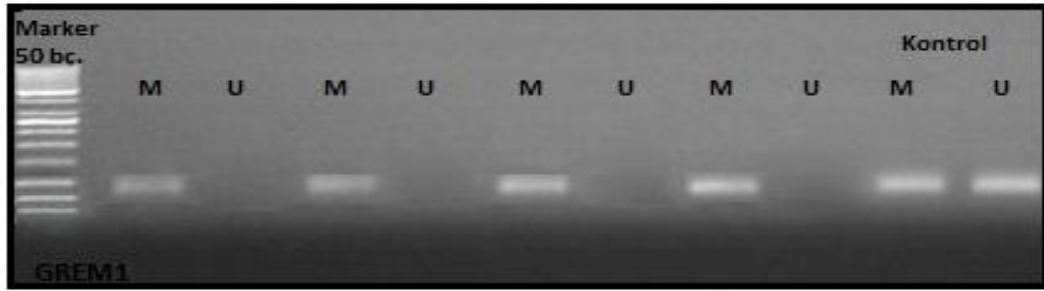
CST6 genindeki metilasyona uğradığı tespit edilen hasta yüzdesi pRHK hastalarının tümör dokularında yaklaşık %14 (3/22) oranında bulunmuşken, normal dokularda metilasyon sıklığı yaklaşık %9 (2/22) olarak belirlenmiştir. Bu durumda tümör dokularındaki metilasyon istatistiksel olarak anlamlı ölçüde normal dokulara göre yüksek bulunmuştur. CST6 geninde gözlenen metilasyon ile pRHK hastalarının cinsiyet, yaş ve patolojik evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.2. CST6 geninin MS-PCR analizine sonucu örnek jel görüntüsü (M: metillenmiş, U: metillenmemiş, Kontrol M-U: QIAGEN® EpiTect® PCR Control set)

4.5. GREM1 Genindeki Metilasyon Durumu

pRHK hastalarında tümör dokularındaki GREM1 gen metilasyonu oranı %41 (9/22) iken normal dokularda %5 (1/22) bulunmuştur. Tümör ve normal dokulardaki metilasyon oranları karşılaştırıldığında metilasyon oranı tümör dokularında normal dokulara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [$p=0.016$, OR (%95CI)=14.5 (1.64-128.5)]. GREM1 metilasyonu ile pRHK hastalarının cinsiyet, yaş ve patolojik evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.3. GREM 1 geninin MS-PCR analizine sonucu örnek jel görüntüsü (M: metillenmiş, U: metillenmemiş, Kontrol M-U: QIAGEN® EpiTect® PCR Control set)

Tablo 4.3. pRHK hastalarında RPRM geninin metilasyon analizi

RPRM	Örnek sayısı (%)	Metile olan (%)	Metile olmayan (%)	OR (%95CI)	p	
Cinsiyet	E	17 (77,2)	12 (70,5)	5 (29,5)	4.91 (1.33-18,2)	0.017
	K	5 (22,8)	1 (20)	4 (80)		
Yaş (15-71)	<60	11 (50)	8 (72,7)	3 (27,3)	A.D	A.D
	≥60	11 (50)	5 (45,4)	6 (54,6)		
Ort: 56,6						
Patolojik evre	T1	6 (27,2)	3 (50)	3 (50)	A.D	A.D
	Diğerleri (T2,T3,T4)	16 (72,8)	10 (62,5)	6 (37,5)		

$p>0.05$ istatistiksel olarak anlamsız kabul edilmiştir.

Tablo 4.4. pRHK hastalarında CST6 geninin metilasyon analizi

CST6		Örnek sayısı (%)	Metile olan (%)	Metile olmayan (%)	OR (%95 CI)	p
Cinsiyet	E	17(77,2)	3 (17,6)	14 (82,6)		A.D
	K	5 (22,8)	0 (0)	5 (100)		
Yaş (15-71)	<60	11 (50)	1 (9)	10 (91)		A.D
	≥60	11 (50)	2 (18)	9 (82)		
Ort: 56,6						
Patolojik evre	T1	6 (27,2)	3 (50)	3 (50)		A.D
	Diğerleri (T2,T3,T4)	16(72,8)	0 (0)	16 (100)		

p>0.05 istatistiksel olarak anlamsız kabul edilmiştir.

Tablo 4.5. pRHK hastalarında GREM1 geninin metilasyon analizi

GREM1		Örnek sayısı (%)	Metile olan (%)	Metile olmayan (%)	OR (%95 CI)	p
Cinsiyet	E	17(77,2)	6 (35,3)	11 (64,7)	14.5 (1.64-128,5)	0.016
	K	5 (22,8)	3 (60)	2 (40)		
Yaş (15-71)	<60	11 (50)	4 (36,4)	7 (63,6)		A.D
	≥60	11 (50)	5 (45,5)	6 (54,5)		
Ort: 56,6						
Patolojik evre	T1	6 (27,2)	4 (66,7)	2 (33,3)		A.D
	Diğerleri (T2, T3, T4)	16(72,8)	5 (31,2)	11 (68,8)		

p>0.05 istatistiksel olarak anlamsız kabul edilmiştir

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüze kadar olan zaman dilimindeki literatür bilgilerinde, renal hücreli karsinomlar üzerinde aday tümör baskılayıcı genlerin metilasyon analizine yönelik yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup net tanısal özellik gösterilememiştir. Yapılan çalışmalar daha çok bRHK üzerinde yoğunlaşmış olup, papiller renal hücreli kanserlerin moleküler temelleri henüz net olarak aydınlatılamamıştır.

Papiller RHK, renal hücreli karsinomların %10-15'ini oluşturarak 2. sıklıkta izlenmektedir. Erkeklerde daha sık görülmekte olup; bizim çalışmamızda da E/K oranı 3.4.1 olarak belirlenmiştir, vakaların %50'si 60 yaşın üstünde olup, 50 yaşın altında sadece 3 olgu görülmüştür.

Bu çalışmada, pRHK hastalarının normal ve tümör dokularında RPRM, GREM1 ve CST6 genlerinin metilasyon analizleri yapılmış ve bu genlerin papiller renal hücreli karsinom gelişimi üzerindeki etkisi ortaya konmaya çalışılmıştır.

CST6 (Sistatin E/M) geni 11q13.1 bölgesinde yerleşik olup lizozomal sistein proteazların fizyolojik inhibitörü olarak fonksiyon gören Sistatin M'i kodlamaktadır. Sistatin M ekspresyon kaybının primer tümörlerin metastazıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Morris vd., 2010). Kioulafa vd., (2009), toplam 134 formalinle fikse edilmiş meme kanseri dokusunda yaptıkları metilasyon çalışmasında CST6 geninde yüksek oranda metilasyon (%55,9) tespit etmişler ve bu genin meme kanseri gelişimde önemli bir biyomarker olabileceğini belirtmişlerdir. Radpour vd., (2011) yılında çalışmaları sonucunda CST6 geninin meme kanserinde biyomarker olabileceği düşüncesini desteklemişlerdir. Chimonidou vd., (2011), 27'si meme kanserli 56 örnek üzerinde yaptıkları promotör bölge metilasyon analizi çalışmasında hasta bireylerde %37 ve sağlıklı bireylerde %4,3 oranında metilasyon olduğunu bulmuşlardır. Chimonidou vd., (2013), meme kanser örneklerinin plazmasında serbest DNA üzerinde CST6 geninin promotör bölge hipermetilasyon durumu

üzerindeki yaptıkları çalışma sonucunda CST6 geninin meme kanserinde biyomarker olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

CST6 geninin ayrıca; erişkin ve pediatrik beyin tümörleri (Qiu vd., 2008), servikal kanserler (Veena vd., 2008) ve gliomalar (Kim ve Kim, 2002) ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir.

CST6 geninin renal hücre kanserleriyle olan ilişkisi de bazı çalışmalarda ele alınmıştır, ancak pRHK' da daha önce hiç incelenmemiştir. Morris vd., (2010), renal hücre karsinomlu hücre hatlarında 28 gen üzerinde yaptığı metilasyon analizi çalışmasında içlerinde CST6 geninde olduğu 8 genin hastalığın tedavisinde ve gelişiminde biyomarker olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, CST6 geni metastatik renal hücreli karsinomla da ilişkili bulunmuştur (Dubrowinskaja ve Peters, 2014). Bizim çalışmamızda, pRHK hastalarının tümör dokularında CST6 geninin metilasyon sıklığı %14 (3/22) olarak belirlenmiştir, bu oran daha önceki çalışmalarda bRHK için belirlenen oranlara göre daha düşüktür. pRHK hastalarında tümör ve normal dokulardaki metilasyon oranları karşılaştırıldığında CST6 genindeki metilasyon oranı istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Bu nedenle, CST6 geninin pRHK gelişiminde önemli etkiye sahip olduğu fikrini desteklememektedir.

GREM1 (Gremlin1) geninin anjiyogenez, hücre çoğalması, kontrollü hücre ölümü, hücre farklılaşması ve kemotaksi olaylarında rolü olduğu bilinmektedir (Michos vd., 2007). Bu nedenle farklı türde kanserlerin gelişmesinde direk etkili olabilecek bir gen olarak öne çıkmaktadır. Van Vlodrop vd., (2010), berrak hücreli RHK hastalarında GREM1 hipermetilasyonun varlığıyla birlikte mRNA düzeyinde bir azalma olduğunu tespit etmişler ve sonuç olarak da GREM1 geninin aday tümör baskılayıcı gen olabileceğini ve bRHK anjiyogenezinde rolü olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, pRHK hastalarının tümör dokularında GREM1 geninin metilasyon sıklığı yüksek bulunmuştur; %41 (9/22). pRHK hastalarında tümör ve normal dokulardaki metilasyon oranları karşılaştırıldığında GREM1 genindeki metilasyon oranı tümör dokularında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Metilasyon durumu ile cinsiyet, yaş ve patolojik evre arasındaki ilişki incelendiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p > 0.05$).

p53 yolu ile hücre döngüsünün G2/M' de durdurulmasından sorumlu bir TBG olarak bilinen RPRM geni hipermetilasyonunun 600'den fazla tümörde, (mide kanserlerinin %79'u, lenfomaların %57'si ve meme kanserlerinin %37'sinde, daha düşük oranlarda ise beyin, yumurtalık, rahim ağzı ve mesane kanserlerinde) gözleendiği bildirilmiştir (Takahashi vd., 2005). Daha yakın zamanlarda, araştırmacılar prostat kanseri örneklerinde %54 oranında RPRM hipermetilasyon olduğunu belirtmişlerdir (Suzuki vd., 2006). Morris vd., (2010) 61 primer RHK hasta grubunun olduğu 11 renal hücre karsinomlu hücre hattında (%80'i bRHK) 28 gen üzerinde yaptıkları metilasyon analizi çalışması sonucunda; GREM1 geninin %41 oranında, CST6 geninin %46 oranında ve RPRM geninin de %44 oranında promotör bölge metilasyonuna maruz kaldığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre ise; RPRM geninde gözlenen metilasyon sıklığı %59 (13/22) olarak belirlenmiş olup bu oran oldukça yüksek bulunmuştur. pRHK hastalarında tümör ve normal dokulardaki metilasyon oranları karşılaştırıldığında ise, RPRM genindeki metilasyon oranı tümör dokularında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Öte yandan, RPRM genindeki metilasyon durumunun cinsiyet, yaş ve patolojik evre ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

Çalışmamızda RPRM ve GREM1 genlerinde gözlenen hipermetilasyon, bu genlerin pRHK gelişiminde etkili tümör baskılayıcı genler olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir. Ancak, çalışmadaki örnek sayısının arttırılarak daha geniş hasta serisinde yeni çalışmaların yapılması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

Akira Ooki, Keishi Yamashita, Kensei Yamaguchi, Anupom Mondal, Hiroshi Nishimiya, Masahiko Watanabe. (2013). DNA damage-inducible gene, Reprimo functions as a tumor-suppressor and is suppressed by promoter methylation in gastric cancer. *Mol Cancer Res.* **11**,1362-1374.

Altinok G, Kattar MM, Mohamed A, Poulik J, Grignon D, Rabah R. (2005). Pediatric renal carcinoma associated with Xp11.2 translocations/TFE3 gene fusions and clinicopathologic associations. *Pediatr Dev. Pathol.* **8**,168-180.

Argani P, Ladanyi M. (2005). Translocation Carcinomas of Kidney. *Clin. Lab. Med.* **25**, 363-378.

Argani P, Laè M, Ballard ET, Amin M, Manivel C, Hutchinson B, Reuter VE, Ladanyi M. (2006). Translocation carcinomas of the kidney after chemotherapy in childhood. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1529-1534.

Ashktorab H , Schaffer A.A , Daremipouran M, Smoot D.T , Lee E, Brim H. (2010). Distinct genetic alterations in colorectal cancer. *Plos One.* **5(1)**, e8879.

Baldewijns MM, Van Vlodrop IJ, Schouten LJ, Soetekouw PM, de Bruine AP and van Engeland M. (2008). Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochim Biophys Acta.* **85**, 133-155.

Battagli C, Uzzo RG, Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Krassenstein R, Al-Saleem T, Greenberg RE, Cairns P. (2003). Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Urine from Kidney Cancer Patients. *Cancer Res.* **63**, 8695-8699.

Bonsib SM. (2008). Embryologic development and normal structure. 2nd edition. Mosby Elsevier Indianapolis. Chapter 1: 2-12.

Bruder E, Passera O, Harms D, Leushner I, Ladanyi M, Argani P, Eble JN, Struckmann K, Schram P, Moch H. (2004). Morphologic and molecular characterization of renal cell carcinoma in children and young adults. *Am J Surg Pathol.* **28**, 1117-1132.

Brunelli M, Eble JN, Zhang S, Martignoni G, Delahunt B, Cheng L. (2005). Eosinophilic and classic chromophobe renal cell carcinomas have similar frequent losses of multiple chromosomes from among chromosomes 1, 2, 6, 10 and 17, and this pattern of genetic abnormality is not present in renal oncocytoma. *Mod Pathol.* **18**, 161-169.

Cairns P, Esteller M, Herman JG, et al. (2001). Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res.* **7**, 2727-30.

Carolina Bernal, Francisco Aguayo, Cynthia Villarroel, et al.(2008). *Reprimo* as a Potential Biomarker for Early Detection in Gastric Cancer. *Clin Cancer Res.* **14**, 6264-6269.

Chimonidou M, Strati A, Tzitzira A, Sotiropoulou G, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES. (2011). DNA methylation of tumor suppressor and metastasis suppressor genes in circulating tumor cells. *Clin Chem.* **57**, 1169-77.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* **22(15)**, 2990-7.

Costa VL, Henrique R, Ribeiro FR, Pinto M, Oliveira J, Lobo F, Teixeira MR and Jerónimo C. (2007). Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors. *BMC Cancer.* **7**, 133.

Delahunt B, Eble JN, McCredie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. (2001). Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Human Pathol.* **32**, 590-595.

Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. (2009). Epigenetic control. *J Cell Physiol.* **219**, 243-50.

Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo RG, Al-Saleem T, Greenberg RE, Polascik TJ, Babb JS, Grizzle WE, Cairns P. (2004). Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* **10**, 6189-93.

Eble JN. (2003). Renal neoplasia. *Modern Surgical Pathology*. pp. 1065-1101.

Ehrlich M.(2000). DNA methylation: normal development, inherited diseases and cancer. *J Clin Ligand Assay.* **23**, 144-146.

Ellinger J, Holl D, Nuhn P, Kahl P, Haseke N, Staehler M, Siegert S, Hauser S, Stief CG, Müller S and Bastian PJ. (2010).DNA hypermethylation in papillary renal cell carcinoma. *Journal Compilation[©] Bju International.* **107**, 664–669.

Esteller, M. et al. (2000). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* **60**, 2368–2371.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *Int J Cancer.* **127(12)**, 2893-917.

Fleitz JM, Wootton-Gorges SI, Wyatt-Ashmead J, McGavran L, Koyle M, West DC, Kurzrock EA, Martin KW, Odom LF. (2003). Renal cell carcinoma in long-term survivors of advanced stage neuroblastoma in early childhood. *Pediatr Radiol.* **33**,540-545.

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* **6**, 655-63.

Gonzalzo ML, Jones PA.(2002). Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) methods. *Elsevier.* **27(2)**, 128-33.

Gregori-Romero MA, Morell-Quadreny L, Llombart-Bosch A: (1996). Cytogenetic analysis of three primary Bellini duct carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* **15**, 170- 172.

Gren F, Page D, Fleming L. (2002). AJCC cancer staging manual. 6th ed. Springer.

Grignon DJ, Che M. (2005). Clear cell renal cell carcinoma. *Clin Lab Med.* **25**, 305–16.

Güçer H. (2009). Renal Hücreli (Berrak Hücreli Tip) karsinomlarda COX-2 Ekspresyonu ve mikrodamar yoğunluğunun klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırılması. *Turkish Journal of Pathology.* **25(2)**, 13-19.

Harrison J, Stirzaker C, Clark S. (1998). Cytosines adjacent to methylated CpG sites can be partially resistant to conversion in genomic bisulfite sequencing leading to methylation artifacts. *Anal Biochem.* **264**, 129–132.

Hendrickson MR, Longacre TA, Kempso RL. Theuterin corpus. In: Mills SE, Carter D, Reuter VE, Greenson JK, Stoler Mh, Oberman HA (Eds.). (2004). 4th ed. Steinberg's diagnostic surgical Pathology. **2**, 1955-71.

Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 9700-4.

Ibragimova I, Slifker MJ, Maradeo ME, Banumathy G, Dulaimi E, Uzzo RG, Cairns P. (2013). Genome-Wide Promoter Methylation Of Small Renal Masses. *Plos One*. **8(10)**, 77309.

Issa J-PJ, Kantarjian HM. (2009). Targeting DNA methylation. *Clinical Cancer Research*. **15**, 3938-46.

J. N. Eble, G Sauter, J I Epstein, I A Sesterhenn. (2004). World Health Organization Classification of Tumours, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. pp, 10-4

J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani, D. Parkin, GLOBOCAN. (2002). Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Press, Lyon.

Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC ve ark. (2009) DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet*. **41**, 240-5.

Kantor AF. (1977). Current concepts in the epidemiology and etiology of primary renal cell carcinoma. *J Urol*. **117**, 415-417.

Karakiewicz PI, Hutterer GC, Trinh QD, Pantuck AJ, Klatter T, Lam JS, Guille F, de La Taille A, Novara G, Tostain J, Cindolo L, Ficarra V, Schips L, Zigeuner R, Mulders PF, Chautard D, Lechevallier E, Valeri A, Descotes JL, Lang H, Soulie M, Ferriere JM, Pfister C, Mejean A, Belldegrun AS, Patard JJ. (2007). Unclassified renal cell carcinoma: an analysis of 85 cases. *BJU Int*. **100(4)**, 802-8.

Khan A, Thomas N, Costello B, Jobling L, de Kretser D, Broadfield E et al. (2007). Renal medullary carcinoma: sonographic, computed tomography, magnetic resonance and angiographic findings. *Eur J Radiol*. **35**, 1-7.

Kırkalı Z, Çelebi İ, Akan G, Yörükoğlu K (1996). Bellini duct (collecting duct) carcinoma of the kidney. *Urology*. **47**, 921-923.

Kleinsmith, L.J. (2006). Principles of Cancer Biology. Benjamin Cummings, 352, Michigan.

Koen Dreijerink, Eleonora Braga, Igor Kuzmin, Laura Geil, Fuh-Mei Duh, Debora Angeloni, Berton Zbar, Michael I. Lerman, Eric J. Stanbridge, John D. Minna, Alexei Protopopov, Jingfeng Li, Vladimir Kashuba, George Klein, and Eugene R. Zabarovsky (2001). The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *PNAS*. **98**,13

Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF (1991). Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. **3**, 249-255.

Koyle MA, Hatch DA, Furness III PD, Lovell MA, OdomLF, Kurzrock EA. (2001). Long-term urological complications in survivors younger than 15 months of advanced stage abdominal neuroblastoma. *J Urol*. **166**, 1455–8.

Kouzarides T. (2007).Chromatin modifications and their function. *Cell*. **128**,693-705.

Kulis M, Esteller M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in Genetics*. **70**, 27–56.

Kutsal Yörükoğlu. (2005). Böbrek hücreli kanserlerde sınıflama sitogenetik ve patolojik prognostik faktörler. *Dokuz Eylül Üniversitesi Türk Üroloji dergisi*. **31(3)**, 305-317.

Lau WK, Blute ML, Weaver AL, Torres VE and Zincke H.(2000). Matched comparison of radical nephrectomy vs nephron-sparing surgery in patients with unilateral renal cell carcinoma and a normal contralateral kidney. *Mayo Clin Proc*. **75**, 1236.

Leroy X, Zini L, Leteure E, Zerimech F, Porchet N, Aubert JP, Gosselin B, Copin MC. (2002). Morphologic subtyping of papillary renal cell carcinoma: correlation with prognosis and differential expression of MUC1 between the two subtypes. *Mod Pathol.* **15**, 1126-1130.

Liang Cheng, Gregory T. MacLennan. (2008). Neoplasms of the kidney. 2nd edition. Mosby Elsevier Indianapolis. Chapter 2: 82-112.

Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* **343(2)**, 78-85.

Lindblad P. (2004). Epidemiology of renal cell carcinoma. *J Surg.* **93**, 88-96.

Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. (2009). Update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol.* **16(5)**, 432-43.

Luo J, Zhu Y, Yang G, Gong L, Wang B, Liu H. (2011). Loss of Reprimo and S100A2 expression in human gastric adenocarcinoma. *Diagn Cytopathol.* **39(10)**, 752-7.

Lv D, Zhao W, Dong D, Qian XP, Zhang Y, Tian XJ, Zhang J. (2011). Genetic and epigenetic control of UNC5C expression in human renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* **47**, 2068-76.

MacLennan GT, Cheng L. Neoplasm of the Kidney. In: Bostwick DG, Cheng L (Eds.). (2008). Urologic Surgical Pathology. 2nd ed. Philadelphia: Mosby Elsevier. pp:77-172.

Makki FM, Taylor SM, Shahnava A, Leslie A, Gallant J, Douglas S, Teh E, Trites J, Bullock M, Inglis K, Pinto DM, Hart RD. (2013). Serum biomarkers of papillary thyroid cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* **42**, 16.

Makoto Suzuki, Hisayuki Shigematsu, Takao Takahashi, Narayan Shivapurkar, Ubarad kaG. Sathyanarayana, Toshihiko Iizasa, Takehiko Fujisawa, Adi F. Gazdar. Aberrant methylation of Reprimo in lung cancer. *Elsevier*. **47**, 309-314.

Martinez et al., J. D., Parker, M.D., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A., Gerner, E.W. (2003). *Molecular Biology of Cancer*. John Wiley & Sons, Inc. Chapter 1, 1-50.

Melki, J. and Clark, S. (2002). DNA methylation changes in leukaemia. *Seminars in Cancer Biology*. **12**, 347-357.

Michos O, Goncalves A, Lopez-Rios J, Tiecke E, Naillat F, Beier K, Galli A, Vainio S, Zeller R (2007). Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development*. **134**, 2397-2405.

Morris MR, Ricketts C, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, et al. (2010). Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. *Oncogene*. **29**, 2104-17.

Morris MR, Ricketts CJ, Gentle D, McDonald F, Carli N, Khalili H, Brown M, Kishida T, Yao M, Banks RE, Clarke N, Latif F, Maher ER. (2011). Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Oncogene*. **30**, 1390-401.

Morrissey C, Martinez A, Zatyka M, Agathangelou A, Honorio S, Astuti D, et al. (2001). Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Research*. **61**, 7277-81.

Murphy WM, Beckwith JC, Farrow GM. Normal Anatomy. (1994). Tumors of the kidney, bladder and related urinary structures. *AFIP*. 1-11.

Nagy A, Wilhelm M, Sukosd F, Ljungberg B, Kovacs G. (2002). Somatic mitochondrial DNA mutations in human chromophobe renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. **35**, 256-60.

Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG & De Marzo AM.(2003). Hypermethylation of the human glutathione Stransferase- pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol.* **163**, 923-933.

Noordzij MA, Mickisch GH. (2004). The genetic make-up of renal cell tumors. *Urol Res.* **32**, 251-254.

Novik KL, Nimmrich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S. (2002). Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues Mol Biol.* **4(4)**, 111-28.

Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, Taniguchi T. (2000). Reprimo, a new candidate mediator of the p53- mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem.* **275**, 22627–22630.

Okano M., Bell D.W., Haber D.A., and Li E.(1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* **99**, 247-257.

Oláh, E. (2005). Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination." *The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* **16(2)**.

Onay H., Pehlivan S., Koyuncuoglu M., Kirkali Z., Ozkinay F. (2009). Multigene Methylation Analysis of Conventional Renal Cell Carcinoma. *Urol Int.* **83**,107–112.

Ordenez NG, Rosai J. (2004). Renal Cell Carcinoma. *Surgical Pathology 9th ed.* Mosby. 1251-1263.

Oyasu RM (1998). Renal cancer: Histologic classification update. *Int J Clin Oncol.* **3**, 125-133.

Peter A. Jones and Daiya Takai. (2001). The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*. **293**,1068-1070.

Peters I, Dubrowinskaja N, Abbas M, Seidel C, Kogosov M, Scherer R, Gebauer K, Merseburger AS, Kuczyk MA, Grünwald V, Serth J. (2014). DNA methylation biomarkers predict progression-free and overall survival of metastatic renal cell cancer (mRCC) treated with antiangiogenic therapies. *Plos One*. **9(3)**, e91440.

Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, Bürki N, Diesch C, Bitzer J, Zheng H, Schmid S, Zhong XY. (2011). Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes Involved in Critical Regulatory Pathways for Developing a Blood-Based Test in Breast Cancer. *Plos One*. **6**, e16080.

Remzi M, Özsoy M, Klingler HC. (2006). Aresmall renal tumors harmless? Analysis of histopathologic features according to tumors 4 cm. or less in diameter. *J Urol*. **176**, 896-899.

Reuter VE. (2006). The pathology of renal epithelial neoplasms. *Semin Oncol*. **33**, 534–543.

Sobin LH, Wittekind CH. (2002). TNM classification of malignant tumors. 6th Ed. UICC International Union Against Cancer.

Sorbellini M, Kattan MW, Snyder ME, Reuter V, Motzer R, Goetzl M, Mc Kiernan J, Russo P. (2005). A postoperative nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*. **173(1)**, 48-51.

Storkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K. (1997). Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*. **80**, 987-989.

Sukosd F, Digon B, Fischer J, Pietsch T, Kovacs G. (2001). Allelic loss at 10q23.3 but lack of mutation of PTEN/MMAC1 in chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* **128**, 161-163.

Suzuki M, Shigematsu H, Shames DS, Sunaga N, Takahashi T, Shivapurkar N, Iizasa T, Frenkel EP, Minna JD, Fujisawa T and Gazdar AF. (2005). DNA methylation-associated inactivation of TGF β -related genes DRM/Gremlin, RUNX3, and HPP1 in human cancers. *British Journal of Cancer.* **93**, 1029–1037.

Suzuki M, Shigematsu H, Shivapurkar N, Reddy J, Miyajima K, Takahashi T, Gazdar AF, Frenkel EP. (2006). Methylation of apoptosis related genes in the pathogenesis and prognosis of prostate cancer. *Cancer Lett.* **242**, 222–230.

Takahashi T, Suzuki M, Shigematsu H, Shivapurkar N, Echebiri C, Nomura M, Stastny V, Augustus M, Wu CW, Wistuba, II, Meltzer SJ, Gazdar AF. (2005). Aberrant methylation of Reprimo in human malignancies. *Int J Cancer.* **115**, 503–510.

Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, et al. Chromophobe cell renal carcinoma and its variants: a report on 32 cases. *J Pathol.* **155**, 277-287

Tickoo SK, dePeralta-Venturina MN, Harik LR, Worcester HD, Salama ME, Young AN, Moch H, Amin MB. (2006). 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.* **30**, 141-153.

Tickoo SK, Reuter VE, Amin MB, Srigley JR, Epstein JI, Min KW, et al. (1999). Renal oncocytosis: a morphologic study of fourteen cases. *Am J Surg Pathol.* **23**, 1094–101.

Thomas L. Dunwell, Luke B. Hesson, Tatiana Pavlova, Veronika Zabarovska, Vladimir Kashuba, Daniel Catchpoole, Raffaella Chiaramonte, Anna T. Brini, Mike Griffiths, Eamonn R. Maher, Eugene Zabarovsky and Farida Latif. (2009).

Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics*. **4(3)**, 185-193.

Tokgün O, Akça H. (2013). Genetic alterations in kidney cancer. *Üroonkoloji Bülteni*. **12(3)**.

Tokuda N, Naito S, Matsuzaki O, Nagashima Y, Ozono S, Igarashi T. (2006). Japanese Society of Renal Cancer. Collecting duct (Bellini duct) renal cell carcinoma: a nationwide survey in Japan. *J Urol*. **176**, 40-43.

Tuna B, Yorukoglu K, Gurel D, Mungan U, Kirkali Z. (2004). Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma. *Urology*. **64(6)**, 1116-20.

Wang Y, Zhang R, Wu D, Lu Z, Sun W, Cai Y, Wang C, Jin J. (2013). Epigenetic Change In Kidney Tumor: Downregulation Of Histone Acetyltransferase MYST1 In Human Renal Cell Carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. **9**, 32-8.

Westermeier R. (1997). *Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*, VCH, Weinheim.

Yang XJ, Sugimura J, Tretiakova MS, Furge K, Zagaja G, Sokoloff M, Pins M, Bergan R, Grignon DJ, Stadler WM, Vogelzang NJ, Teh BT. (2004). Gene expression profiling of renal medullary carcinoma: potential clinical relevance. *Cancer*. **100**, 976-985.

Yi JM, Guzzetta AA, Bailey VJ, Downing SR, Van Neste L, Chiappinelli KB, Keeley BP, Stark A, Herrera A, Wolfgang C, Pappou EP, Iacobuzio-Donahue CA, Goggins MG, Herman JG, Wang TH, Baylin SB, Ahuja N. (2013). Novel methylation biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. **19(23)**, 6544-55.

Yuan JM, Gago-Dominguez M, Ross RK, Yu MC. (1998). Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *J Cancer*. **77**, 1508-1511.

Zhang Q, Ying J, Li J, Fan Y, Poon FF, Ng KM, et al. (2010). Aberrant promoter methylation of DLEC1, a critical 3p22 tumor suppressor for renal cell carcinoma, is associated with more advanced tumor stage. *Journal of Urology*. **184**, 731–7.