

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BERRAK HÜCRELİ RENAL HÜCRELİ KARSİNOMADA YAĞ ASİT
METABOLİZMASI İLİŞKİLİ AMPK ve miR-33a İFADELERİNİN
KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİNİN TCGA VERİ SETİNDE
ve HÜCRE HATLARINDA MOLEKÜLER DÜZEYDE ANALİZİ

DOKTORA TEZİ

Mustafa Zafer TEMİZ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI

OCAK 2024

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BERRAK HÜCRELİ RENAL HÜCRELİ KARSİNOMADA YAĞ ASİT
METABOLİZMASI İLİŞKİLİ AMPK ve miR-33a İFADELERİNİN
KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİNİN TCGA VERİ SETİNDE
ve HÜCRE HATLARINDA MOLEKÜLER DÜZEYDE ANALİZİ

DOKTORA TEZİ

Mustafa Zafer TEMİZ

1700005536

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI
Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Seyhan ALTUN
Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YILMAZER (İZÜ)
Dr. Öğr. Üyesi Öykü Gönül GEYİK (İSÜ)

OCAK 2024

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve doktora sürecimde bana her konuda destek ve yol gösterici olan sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI' na, Doktora ders dönemimde kıymetli bilgi birikimlerini benden esirgemeyen ve desteklerini yakinen hissettiğim hocalarım Prof. Dr. Zeynep Narçin ÜNSAL, Prof. Dr. Elif Damla ARISAN, Prof. Dr. Ajda Çoker GÜRKAN ve Prof. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA' ya,

Doktora sürecimde birlikte çalışma fırsatımız olmamasına rağmen kıymetli desteklerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Çimen ATAK ve Prof. Dr. Özge ÇELİK' e,

Doktoraya başladığım günden itibaren ders dönemimde ve laboratuvarıda benden desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ, Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN ve Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN' a

Tez projem sürecinde laboratuvarıda birlikte çalıştığım, her zaman desteklerini hissettiğim, Ayşe Simay METİN ve Ebrar KARAKAYA' ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecimi yürütebilmem ve tamamlamam için birlikte daha fazla vakit geçirebilmemiz hususunda fedakarlık gösteren ilk göz ağrım, kuzucuğum, Zeynep Öyküm TEMİZ ve aramıza yeni katılarak benim dünyama, kızımın dünyasına ve ailemize mutluluk ve neşe katan sevgili oğlum Mustafa Utkan TEMİZ ve annelerine sevgi dolu teşekkürler ediyorum.

Bu tez çalışması, BAP2215 numaralı İstanbul Kültür Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) desteği ile gerçekleşmiştir. Bu kapsamda desteğinden dolayı İstanbul Kültür Üniversitesi rektörlüğü' ne ve deneylerimi gerçekleştirdiğim İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü' ne teşekkür ederim.

OCAK 2024

Mustafa Zafer TEMİZ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
SİMGE LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
TÜRKÇE ÖZET	xv
YABANCI DİL ÖZET	xvii
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1 GİRİŞ	1
1.2 AMAÇ	2
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 BÖBREK KANSERİ	3
2.1.1 Böbrek Kanseri İnsidans ve Epidemiyolojisi	3
2.1.2 Böbrek Kanseri Etiyoloji ve Risk Faktörleri	6
2.1.3 Böbrek Kanseri Histopatolojik Sınıflandırılması	8
2.1.4 Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom (BHRHK)	11
2.1.5 Papiller Renal Hücreli Karsinom (Papiller RHK)	12
2.1.6 Kromofob Renal Hücreli Karsinom (Kromofob RHK)	12
2.1.7 Diğer Böbrek Tümörleri	13
2.1.8 Böbrek Kanseri Tümör Evrelemesi.....	15
2.1.9 Böbrek Kanseri Histolojik Tümör Derecelendirmesi	16
2.2 KANSERDE HÜCRESEL METABOLİK DEĞİŞİKLİKLER	18
2.2.1 Renal Hücreli Karsinomda Hücresel Metabolik Değişiklikler ...	20
2.3 LİPİD VE YAĞ ASİDİ METABOLİZMASI	28

2.3.1	Ana Hatları ile Yağ Asidi Metabolizmasına Genel Bakış.....	29
2.3.2	Yağ Asidi Metabolizmasının Düzenlenmesi	31
2.3.3	Yağ Asidi Metabolizması ve Kanseri.....	33
2.3.4	Lipid ve Yağ Asidi Metabolizması Renal Hücreli Karsinom İlişkisi	36
2.4	MikroRNA	40
2.4.1	İnsanlarda mikroRNA' ların Sentezi	40
2.4.2	İnsanlarda mikroRNA' ların Genel Etki Mekanizmaları ve Fonksiyonları	42
2.4.3	mikroRNA' ların Lipid Metabolizması ile İlişkisi	44
2.4.4	İnsanlarda mikroRNA' lar ve Kanseri ilişkisi	46
2.4.5	Renal Hücreli Karsinomda mikroRNA' lar.....	47
2.5	BİYOİNFORMATİK	48
2.5.1	Kanserle İlgili Omik Verileri için Halka Açık Çevrimiçi Kaynaklar	52
2.5.1.1	TCGA Veri Tabanı	53
3	MATERYAL VE METOT.....	61
3.1	KULLANILAN MATERYALLER.....	61
3.1.1	Kullanılan Cihazlar.....	61
3.1.2	Hücre Kültürü Donanımları	61
3.1.3	Kullanılan Kimyasallar.....	61
3.1.4	Kullanılan Tamponlar	61
3.2	YÖNTEMLER.....	61
3.2.1	TCGA Veri Tabanında Yer Alan BHRHK Hastalarında AMPK ve miR-33a İfadeleri ile Klinikopatolojik Özellikler Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi	61
3.2.1.1	cBioPortal Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri	62
3.2.1.2	UCSC Xena Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri	63
3.2.1.3	UALCAN Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri	64
3.2.1.4	LinkedOmics Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri.....	66
3.2.2	BHRHK Hücre Hatlarında AMPK ve miR-33a İfade Seviyelerinin Belirlenmesi için Hücre Kültürü Yöntemleri.....	67
3.2.3	BHRHK Hücre Hatlarında AMPK 1 Proteinini α Katalitik Alt Birim (AMPK 1 α) İfadelerinin Belirlenmesi için Protein İzolasyonu ..	68
3.2.3.1	BHRHK Hücrelerinden Protein İzolasyonu	68
3.2.3.2	İzole Edilen Proteinlerin Bradford Yöntemi ile Miktar Tayini ..	68
3.2.3.3	İmmunoblotlama	69
3.2.4	BHRHK Hücre Hatlarında miR-33a İfade Seviyelerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q PCR) ile Gösterilmesi.....	70

3.2.4.1	miRNA İzolasyonu	70
3.2.4.2	İzole Edilen miRNA' ların cDNA' lara Çevrimi.....	71
3.2.4.3	Kantatif Gerçek Zamanlı Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantative Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction, RT-qPCR).....	71
3.2.5	BHRHK Hücrelerine miR-33a-mimik ve anti-miR-33a Transfeksiyonu	72
3.2.5.1	miR-33a Mimik Transfeksiyonu	72
3.2.5.2	Anti-miR-33a Transfeksiyonu.....	73
3.2.6	AMPK ve miR-33a İfade Seviyesi ile İlişkili Olarak Düzenlenen Yağ Asidi Metabolizmasının Hücre içi Lipid Boyamayla İncelenmesi.....	73
3.2.6.1	BODIPY ile Floresan Boyama.....	74
3.2.7	İstatistiksel Analiz.....	74
4	SONUÇLAR	75
4.1	TCGA veri setinde BHRHK Hastalarında AMPK ve miR-33a İfadeleri ile Klinikopatolojik Özellikler Arasındaki İlişkiler	75
4.1.1	cBioPortal Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri	75
4.1.2	UCSC Xena Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri.....	78
4.1.3	UALCAN Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri	82
4.1.4	LinkedOmics Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri.....	88
4.2	BHRHK Hücre Hatlarında Moleküler Analizler	90
4.2.1	BHRHK Hücre Hatlarında AMPK 1 α Protein İfadeleri.....	90
4.2.2	BHRHK Hücre Hatlarında Bazal ve miR-33a-mimik ve anti-miR-33a Transfeksiyonları Sonrası miR-33a İfade Seviyeleri	91
4.2.3	BHRHK Hücre Hatlarında miR-33a İfade Seviyelerindeki Modülasyonlarla Hücre İçi Lipid Birikimi Değişiklikleri	92
5	TARTIŞMA	94
	KAYNAKÇA.....	102
	EKLER.....	119

KISALTMALAR

RHK	: Renal Hücreli Karsinom
BHRHK	: Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom
AMP	: 5'-Adenozin Monofosfat
AMPK	: AMP ile Aktive Edilmiş Protein Kinaz
RNA	: Ribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
miR-33a	: Mikro RNA33a
cDNA	: Komplementer DNA
SRE	: Sterol Düzenleyici Element
SREBP	: Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Proteinler
TCGA	: Kanser Genom Atlası
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
FH	: Fumarat Hidrataz
MET	: Metastaz proto-onkogen
FLCN	: Folikulin
VHL	: von Hippel Lindau
KLRHK	: Kalıtsal Leiomyomatozis ve RHK
BHD	: Birt-Hogg-Dubé
BAP 1	: BRCA1 ilişkili protein 1
SDHB	: Süksinat Dehidrojenaz Kompleks Demir Sülfür Alt Birim B
SDHC	: Süksinat Dehidrojenaz Kompleks Demir Sülfür Alt Birim C
SDHD	: Süksinat Dehidrojenaz Kompleks Demir Sülfür Alt Birim D
TSC 1	: Tüberoskleroz kompleks Alt Birim 1
TSC 2	: Tüberoskleroz kompleks Alt Birim 2
MITF	: Melanosit Uyarıcı Transkripsiyon Faktörü
PRBM 1	: Poliriboma 1

SETD 2	: SET domain 2, histone lizin metiltransferaz
KDM5C	: Lizine Demetilaz 5C
mTOR	: Mammalian Target of Rapamicin
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
WHO	: World Health Organisation
SMARCB1	: SWI/SNF ilişkili, Aktin bağımlı Kromatin Düzenleyici B, Üyesi 1
TFEB	: Transkripsiyon Faktörü EB
ALK	: ALK Reseptör Tirozin Kinaz
ELOC	: Elongin C
PKA	: Protein Kinaz A
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
TNM	: Tümör-Nod-Metastaz
ISUP	: Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği
LDH	: Laktat Dehidrojenaz
GLUT	: Glukoz Taşıyıcı
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
G6PD	: Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-Kinaz
K-Ras	: Kirsten Rat Sarcoma Virus Proto-onkogen
PTEN	: Fosfataz and Tensin Homolog
TCA	: Trisiklik asid
IDH	: İzositrat Dehidrojenaz
FH	: Fumarat Hidrataz
ATP	: Adenozin TriFosfat
SLC1A	: Solüt Taşıyıcı Protein Ailesi 1, Üyesi 2
TDO	: Triptofan-2, 3-Dioksijenaz
ASS	: Argininosüksinat Sentaz
ASL	: Argininosüksinat Liyaz
SGLT	: Sodyuma Bağımlı Glukoz Yardımcı Taşıyıcısı
FBP	: Fruktöz-1-Bisfosfataz
AKR1A	: Aldo-Keto Redüktaz Ailesi 1 Üyesi A
MCT	: Monokarboksilat Taşıyıcı

PDH	: Piruvat Dehidrojenaz
PDK	: Piruvat Dehidrojenaz Kinaz
PC	: Piruvat Karboksilaz
GABA	: Gama-Amino Bütirik Asit
PPARα	: Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptör- α
PGC	: Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptör- α Koaktivatör
TFAM	: Mitokondriyal Transkripsiyon Faktörü
MYBBP1A	: MYB-Bağlayıcı Protein 1A
IDO	: İndolamin2,3-Dioksijenaz
DDC	: DOPA Dekarboksilaz
MAO	: Monoamin Oksidaz
ALDH	: Aldehit Dehidrojenaz
ACC	: AsetilKoA Karboksilaz
FASN	: Yağ Asidi Sentaz
SAFA	: Doymuş Yağ Asitleri
MUFA	: Tekli Doymamış Yağ Asitleri
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
ACLY	: ATP Sitrat Liyaz
FA	: Yağ Asidi Translokaz
SLC27	: Solüt Taşıyıcı Protein Ailesi 27
FATBs	: Yağ Asidi Taşıma Protein Ailesi
FABPp	: Plazma Membranı Yağ Asidi Bağlayıcı Proteinler
SCD	: Stearoil-CoA Desatüraz
EVOL	: Yağ Asidi Elongazlar
FADs	: Yağ Asidi Desatürazlar
SCAP	: SREBP Bölünme Aktive Edici Protein
ACOX	: Açıl-CoA Oksidaz
CPT	: Karnitin Palmitoiltransferaz
LX	: Karaciğer X Reseptörleri
ACS	: Asetil-CoA Sentaz
ACAT	: Açıl-KoA Kolesterol Açıltransferaz

ABCA	: Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı A
DGAT	: Diaçilgliserol Açıltransferaz
Ran	: Ras İlişkili Nükleer Protein
GTP	: Guanozin Trifosfat
TRBP	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü Transaktif Edici Yanıt RNA-Bağlayıcı Protein
PACT	: Protein Kinaz r-Aktive Edici Protein
RISC	: RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
ChiP-se	: Kromatin İmmünopresipitasyon Dizileme
DNase1-seq	: DNase I Aşırı Duyarlı Bölgeler Dizileme
FAIRE-seq	: Düzenleyici Elementlerin Formaldehit Destekli İzolasyonlu Dizileme
RNA-seq	: RNA Dizileme
LC-MS	: Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometresi
RPPA	: Ters Faz Protein Dizisi
ICGC	: Uluslararası Kanseri Genom Konsorsiyumu
COSMIC	: Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu
GEO	: Gen İfadesi Omnibus
PRIDE	: Proteomik Tanımlamalar
SNV	: Tek Nükleotid Varyantları
CNV	: Kopya Sayısı Değişiklikleri
CPTAC	: Kanser Proteom Atlası
NCI	: Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü
TARGE	: Etkili Tedaviler Üretmek için Terapötik Olarak Uygulanabilir Araştırma Uygulamaları
GENIE	: Genomik Kanıt Neoplazi Bilgi Değişimi
MSKCC	: Memorial Sloan Kettering Kanser Merkezi
GTE	: Genotip-Doku İfadesi
CBTTC	: Çocuk Beyin Tümörü Doku Konsorsiyumu
KIRC	: Kidney Renal Clear Cell Carcinoma
OS	: Overall Survival
DSS	: Disease Specific Survival
PRKAA	: Protein Kinaz AMP ile Aktive Olan Katalitik Alt Birim alfa
RPM	: Milyon Başına Okuma
RKPM	: Milyon Eşlenen Okuma Başına Kilobaz Başına Okuma

FBS	: Fetal Bovin Serum
EMEM	: Eagle' s Temel Besiyeri
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
BSA	: Bovin Serum Albumin
SDS	: Sodyum Dodesil Sulfat
PVDF	: Poliviniliden Florür
RT-qPCR	: Kantatif Gerçek Zamanlı Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNU6B	: U6 Küçük Nükleer RNA
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FC	: Kat Değişimi



SİMGE LİSTESİ

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
L	: Litre
ml	: Mililitre
g	: Yerçekimsel kuvvet
mg	: Miligram
μ	: Mikro
μl	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
%	: Yüzde
mm	: Milimetre
V	: Volt
A	: Amper
nM	: Nanomolar
μM	: Mikromolar

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü böbrek tümörleri sınıflandırması-2022	9
Tablo 2.2. Diğer böbrek tümörleri	13
Tablo 2.3. Böbrek kanseri TNM sınıflandırma ve evreleme sistemi (Sekizinci versiyon-2017)	16
Tablo 2.4. Fuhrman ve WHO/ISUP nükleer derecelendirme sistemleri	17
Tablo 2.5. Genomik, epigenomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik farklı teknikler	49
Tablo 2.6. Sık kullanılan tek ve çoklu-omik veri tabanlar	52
Ek Tablo 1. Kullanılan cihazların listesi	119
Ek Tablo 2. Kullanılan hücre kültürü donanımları	120
Ek Tablo 3. Kullanılan kimyasalların listesi	121
Ek Tablo 4. Kullanılan tamponların içeriği	123
Ek Tablo 5. %4-12'lik SDS-Poliakrilamid Jel içeriği	127

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kıtalar arasında böbrek kanseri insidansı, toplamın yüzdesi olarak ve 2020 için bölge başına vaka sayısı olarak gösterilmiştir.....	4
Şekil 2.2. Böbrek kanseri insidansı için yaşa göre standardize edilmiş grafik.....	5
Şekil 2.3. Böbrek kanseri mortalitesi için yaşa göre standardize edilmiş grafik.....	6
Şekil 2.4. Böbrek kanseri gelişme riskine katkıda bulunan değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörlerinin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.5. Tümör Hücrelerinde Metabolik Yeniden Programlama: Warburg Etkisi.....	18
Şekil 2.6. Böbrek kanserinde glukoz taşınımı ve glukoz metabolizmasının yenidenprogramlanması.....	23
Şekil 2.7. Böbrek kanserinde TCA döngüsü, yağ asidi ve glutamin metabolizmasının yeniden programlanması.....	27
Şekil 2.8. Temsili molekül örnekleriyle sekiz lipid türü.....	28
Şekil 2.9. Lipid metabolizmasında SREBP' lerin rolü.....	33
Şekil 2.10. Kanser hücrelerinde yağ asitlerinin de novo lipogenez ve eksojen alım yoluyla elde edilmesi.....	35
Şekil 2.11. RHK' de lipid metabolizmasındaki değişikliklerin özeti ve bu süreçte farklı yollarda yer alan proteinler.....	39
Şekil 2.12. miRNA sentezi şematik gösterimi.....	42
Şekil 2.13. miRNA' ların gen düzenleme mekanizmaları.....	44
Şekil 2.14. miR-33 ile kolesterol taşınımı ve yağ asidi oksidasyonunda rol oynayan genlerin ifadesinin baskılanması.....	46
Şekil 2.15. Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi alanlarda biyoinformatik yöntemler.....	51

Şekil 2.16. GDC veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (https://portal.gdc.cancer.gov/).....	55
Şekil 2.17. cBioPortal veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (http://cbioportal.org).....	56
Şekil 2.18. TCPA veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (https://tcpaportal.org/tcpa/).....	57
Şekil 2.19. GEPIA veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (http://gepia.cancer-pku.cn/).....	58
Şekil 2.20. GEPIA veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (https://xena.ucsc.edu/).....	59
Şekil 2.21. UALCAN veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (http://ualcan.path.uab.edu/).....	60
Şekil 2.22. LinkedOmics veri portal web sitesi ana sayfasından kesit (http://www.linkedomics.org/).....	60
Şekil 3.1. cBioPortal veri portalı üzerinden AMPK 1 mRNA ifadesi analizi için veri giriş aşamasının ekran görüntüsü görseli.....	63
Şekil 3.2. UCSC Xena veri portalı üzerinden AMPK 1 mRNA ifadesi analizi için veri giriş aşamasının ekran görüntüsü görseli.....	64
Şekil 3.3. UALCAN veri portalı üzerinden AMPK 1 protein ifadesi analizi için veri giriş aşamasının ekran görüntüsü görseli.....	65
Şekil 3.4. UALCAN veri portalı üzerinden mir-33a ifadesi analizi için veri giriş aşamasının ekran görüntüsü görseli.....	66
Şekil 3.5. LinkedOmics veri portalı üzerinden miR-33a ve AMPK 1/2 korelasyon analizi için veri giriş aşamasının ekran görüntüsü görseli.....	67
Şekil 4.1. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokularında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinde etkilene oranları.....	76
Şekil 4.2. TCGA-KIRC olgularında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinde etkilenme olan grup ile olmayan grup arasındaki klinikopatolojik özelliklerin karşılaştırılma sonuçları.....	77
Şekil 4.3. TCGA-KIRC olgularında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinde etkilenme olan grup ile olmayan grup arasındaki sağ kalım parametreleri karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.4. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokusu ve normal dokudaki AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.....	79
Şekil 4.5. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokularında patolojik tümör derecesine göre AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.....	79
Şekil 4.6. TCGA-KIRC olgularında pT evresine göre AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.7. TCGA-KIRC olgularında pN evresine göre AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.8. TCGA-KIRC olgularında pM evresine göre AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.....	81
Şekil 4.9. TCGA-KIRC olgularında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerine göre OS ve DSS grafikleri.....	81
Şekil 4.10. TCGA-KIRC olgularında primer tümör ve normal doku örneklerinde AMPK 1 protein ifadeleri.....	82
Şekil 4.11. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokusu ve normal doku örneklerinde AMPK 2 protein ifadeleri.....	83

Şekil 4.12. TCGA-KIRC olgularında patolojik tümör derecesine göre primer tümör dokularında AMPK 1 protein ifadeleri.....	84
Şekil 4.13. TCGA-KIRC olgularında patolojik tümör derecesine göre primer tümör dokularında AMPK 2 protein ifadeleri.....	85
Şekil 4.14. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokusu ve normal doku örneklerinde miR-33a ifadeleri.....	86
Şekil 4.15. TCGA-KIRC olgularında farklı pT evrelerinde miR-33a ifadeleri.....	87
Şekil 4.16. TCGA-KIRC olgularında miR-33a ifadeleri ile sağ kalım (overall survival, OS) arasındaki ilişki.....	88
Şekil 4.17. TCGA-KIRC olgularında miR-33a ve AMPK 1/2 gen ifadeleri ilişkisi.....	89
Şekil 4.18. TCGA-KIRC olgularında miR-33a ve AMPK 1/2 gen ifadeleri ilişkilerine ait Spearman korelasyon grafikleri.....	89
Şekil 4.19. TCGA-KIRC olgularında pT evresine göre alt gruplardaki miR-33a ve AMPK 1/2 gen ifadeleri ilişkisi.....	90
Şekil 4.20. A-498 ve Caki-1 hücre hatlarında AMPK 1 α protein ifadeleri.....	91
Şekil 4.21. A-498 ve Caki-1 hücre hatlarında bazal ve mir-33a-mimik ve anti-mir-33a transfeksiyonları sonrası mir-33a ifade seviyeleri.....	92
Şekil 4.22. A-498 ve Caki-1 berrak hücreli renal hücreli karsinoma hücrelerinde mimik miR-33a veya anti-miR-33a uygulamalarına bağlı olarak hücre içi lipid değişiklikleri.....	93

TÜRKÇE ÖZET

Enstitüsü : Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI
Tez Türü ve Tarihi : Doktora – Ocak 2024

KISA ÖZET

BERRAK HÜCRELİ RENAL HÜCRELİ KARSİNOMADA YAĞ ASİT METABOLİZMASI İLİŞKİLİ AMPK ve miR-33a İFADELERİNİN KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİNİN TCGA VERİ SETİNDE ve HÜCRE HATLARINDA MOLEKÜLER DÜZEYDE ANALİZİ

Mustafa Zafer TEMİZ

Böbrek kaynaklı en sık izlenen kanser olan ve lipid metabolizması ile yakından ilişkili olduğu gösterilen berrak hücreli renal hücreli karsinom (BHRHK)' da yağ asidi metabolizmasının rolü, günümüzde prognozu tahmin etmek ve tedavi stratejilerini yönlendirebilmek amacıyla çok sayıda araştırmaya konu olmuş ve yeterli düzeyde kanıtlara ulaşmak için halen yeni çalışmalara konu olmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada, Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas, TCGA) veri bankası üzerinden, yağ asit metabolizması ile ilişkili olan 5'-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) ve yağ asidi metabolizması ile ilişkisi en net açıklanan mikro RNA olan miR-33a ifadelerinin BHRHK olgularında klinikopatolojik verilerle ilişkisini araştırdık. Ardından, hücre hattı analizleriyle, AMPK ve miR-33a ifadelerinin primer ve metastatik BHRHK hücre hatlarında hücresel düzeyde ifadelerini ve miR-33a modülasyonlarının hücre içi lipid birikimi üzerine etkilerini değerlendirdik. TCGA veri bankasında kayıtlı BHRHK olgularına ait biyoinformatik veriler açık erişimli cBioPortal, UCSC Xena, UALCAN ve Linkedomics veri portalları kullanılarak elde edildi. Bu portallardaki yerleşik istatistiksel metodlar ile AMPK 1 ve 2 genleri mRNA ifadeleri ile miR-33a ifade seviyelerinin BHRHK olgularında patolojik tümör derecesi, patolojik tümör T evresi, N evresi ve M evresi, ve sağkalım gibi klinikopatolojik parametrelerle olan ilişkileri

irdelendi. Ayrıca, miR-33a ve AMPK1 ve 2 ifadeleri arasındaki korelasyonlar da analiz edildi. Takiben, primer BHRHK kaynaklı A-498 ve metastatik BHRHK kaynaklı Caki-1 hücre hatları ve kontrol hücre hattı olarak kullanılan HEK-293 hücre hatlarında immunoblotlama ile AMPK 1 α alt ünitesi protein seviyeleri ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR, qRT-PCR) ile miR-33a ifadeleri belirlendi. Son aşamada ise, miR-33a mimik ve anti-miR-33a transfeksiyonları sonrası miR-33a modülasyonlarının bu hücre hatlarında hücre içi lipid birikimleri üzerine etkileri BODIPY ve eş zamanlı DAPI floresan boyama yöntemiyle değerlendirildi.

TCGA analiz sonuçlarına göre; BHRHK olgularında primer tümör dokularında AMPK 1 ve 2 mRNA ifadelerinin normal doku örneklerine kıyasla büyük oranda anlamlı azalma sergiledikleri izlendi. Tümör patolojik derecesi ve T evresi ilerledikçe bu azalmalar daha da belirginleşme eğilimindeydi. Benzer şekilde lenf nodu tutulumu ve metastazlı olgularda da anlamlı derecede daha az ifade edildikleri gözlemlendi. Ayrıca, azalmış AMPK 1 ve 2 mRNA ifadelerinin BHRHK olgularında daha kötü sağ kalım sonuçları ile ilişkili olduğu saptandı. Protein düzeyinde ise primer tümörlü dokularda AMPK 1 protein ifadesinin normal dokulara oranla anlamlı derecede yüksek, AMPK 2 protein ifadesinin ise anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi. Artmış AMPK 1 protein ifadesi artan tümör T evresi ile birlikte daha da artma eğilimindeydi. miR-33a ifadeleri irdelendiğinde primer tümör dokularında normal doku örneklerine kıyasla anlamlı derecede azalmış miR-33a ifadesi izlenirken, BHRHK' ya ait primer tümör doku örneklerinde T evresi ilerledikçe miR-33a ifadesinin artma eğiliminde olduğu belirlendi. Bu dokularda, ayrıca, miR-33a ile AMPK 1 ve 2 mRNA ifadeleri arasındaki negatif yönde zayıf korelasyonların olduğu saptandı. Ancak, alt grup analizlerinde bu korelasyonların yüksek T evreli olgularda olmadığı belirlendi. Hücre hatları analizlerimizde ise; AMPK 1 α protein ve miR-33a ifade düzeylerinin, daha agresif olan metastatik Caki-1 hücrelerinde A-498 primer tümör hücrelerine oranla anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlendi. miR-33a mimik transfeksiyonlarına bağlı olarak hücre içi lipid içeriğinde belirgin değişim olmadığı gözlemlenirken, anti-miR-33a transfeksiyonlarının A-498 ve Caki-1 hücrelerinde hücre içi doğal lipid oranında azalmaya sebep olduğu izlendi. Öte yandan, hücre içi lipid düzeyindeki azalma AMPK 1 α protein seviyesi daha yüksek olan metastatik Caki-1 hücrelerinde daha fazlaydı.

Bulgularımız, BHRHK patogenezinde yağ asit metabolizması ilişkili AMPK ve miR-33a' nın erken evre ve ileri evre hastalıkta farklı karmaşık rolleri olabileceğini düşündürecek kanıtlar olarak ele alınabilir. Hücre hatlarından elde ettiğimiz sonuçlara göre, AMPK 1 α protein seviyesi daha yüksek olan metastatik hücrelerde anti-miR-33a ile müdahalenin hücre içi lipid birikimini önemli ölçüde azalttığı saptandı. Sonuç olarak bulgularımız, miR-33a' nın ileri evre BHRHK tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini desteklemekle birlikte, bu konuda daha net sonuçlar için miR-33a' nın hücre sağkalımı üzerine etkilerinin de ayrıntı irdelenmesi gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Böbrek Kanseri, Yağ Asit Metabolizması, AMPK, miR-33a.

YABANCI DİL ÖZET

Institute : Institute of Graduate Studies
Department : Molecular Biology and Genetics
Programme : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist Prof. Dr. Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI
Degree Awarded and Dat : Doctorate – January 2024

ABSTRACT

MOLECULAR ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN FATTY ACID METABOLISM RELATED AMPK AND miR-33a EXPRESSIONS AND CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN CLEAR CELL RENAL CARCINOMA IN THE TCGA DATA SET AND CELL LINES

Mustafa Zafer TEMİZ

The role of fatty acid metabolism in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), which is the most common cancer of kidney origin and has been shown to be closely related to lipid metabolism, has been the subject of numerous studies to predict prognosis and guide treatment strategies and continues to be the subject of new studies to provide sufficient evidence.

In this study, we investigated the expression levels of 5'-adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK), which is associated with fatty acid metabolism, and miR-33a, the micro RNA most clearly associated with fatty acid metabolism, in patients with ccRCC. The associations between clinicopathological characteristics and these expression characteristics in ccRCC patients included in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database were also investigated. We then used cell line analyses to evaluate the expression of AMPK and miR-33a at the cellular level in primary and metastatic ccRCC cell lines and the effects of miR-33a modulations on intracellular lipid accumulation. Bioinformatic data of ccRCC cases from the TCGA database were obtained from the open access data portals cBioPortal, UCSC Xena, UALCAN, and Linkedomics. Using statistical methods built into these portals, the associations of AMPK 1 and 2 gene mRNA expression and miR-33a expression levels with clinicopathological parameters such as pathological tumor grade, pathological tumor T stage, N stage, and M stage, and

survival in ccRCC cases were evaluated. Correlations between miR-33a and AMPK 1 and 2 expression were also analyzed. Subsequently, AMPK 1 α subunit protein levels by immunoblotting and miR-33a expression by quantitative real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) were determined in primary ccRCC-derived A-498 and metastatic ccRCC-derived Caki-1 cell lines and HEK-293 cell lines used as control cell lines. Finally, the effects of miR-33a modulations on intracellular lipid accumulation in these cell lines after miR-33a mimic and anti-miR-33a transfections were evaluated by BODIPY and simultaneous DAPI fluorescent staining.

According to the results of the TCGA analysis, AMPK 1 and 2 mRNA expressions in primary tumor tissues of ccRCC cases showed a significant decrease compared to normal tissue samples. These decreases tended to be more pronounced with increasing tumor pathologic grade and T stage. Similarly, significantly lower expression was observed in patients with lymph node involvement and metastases. Furthermore, decreased AMPK 1 and 2 mRNA expression was associated with worse survival outcomes in patients with ccRCC. At the protein level, AMPK 1 protein expression was significantly higher and AMPK 2 protein expression was significantly lower in primary tumor tissues compared to normal tissues. Moreover, increased AMPK 1 protein expression tended to increase with tumor stage. When miR-33a expression was examined, it was found that miR-33a expression was significantly decreased in primary tumor tissues, while miR-33a expression tended to increase in tumor tissues as T stage progressed. In evaluating the relationship between miR-33a and AMPK 1 and 2 mRNA expressions, it was found that there were weak negative correlations in tumor tissues. However, subgroup analyses revealed that these correlations were not present in high T stage cases. In our cell line analyses, AMPK 1 α protein and miR-33a expression levels were significantly higher in the more aggressive metastatic Caki-1 cells compared to primary A-498 tumor cells. While no significant change in intracellular lipid content was observed by miR-33a mimic transfections, anti-miR-33a transfections caused a decrease in intracellular natural lipid content in A-498 and Caki-1 cells. On the other hand, the decrease in intracellular lipid levels was greater in metastatic Caki-1 cells with higher AMPK 1 α protein levels.

Our findings suggest that fatty acid metabolism-related AMPK and miR-33a may have different complex roles in the pathogenesis of ccRCC in early stage and advanced disease. According to our results from cell lines, intervention with anti-miR-33a significantly reduced intracellular lipid accumulation in metastatic cells with higher AMPK 1 α protein levels. In conclusion, our findings support that miR-33a may be a potential target in the treatment of advanced ccRCC, but the effects of miR-33a on cell survival should also be examined in detail for clearer results.

Key Words: Kidney Cancer, Fatty Acid Metabolism, AMPK, miR-33a.

1 GİRİŞ ve AMAÇ

1.1 GİRİŞ

Renal hücreli karsinom (RHK), böbrek epitelinden kaynaklanan ve böbrek kanserlerinin %90' ından fazlasını oluşturan bir kanserdir. Hastalık 10' dan fazla histolojik ve moleküler alt tipi kapsar, bunlardan berrak hücreli RHK (BHRHK) en yaygın olanıdır ve kansere bağlı ölümlerin çoğunu oluşturur (Hsieh JJ vd., 2017). BHRHK hücre içi lipid damlacık birikimi sergiler ve anormal yağ asidi metabolizması ile yakından ilişkilidir (Stepanovska Tanturovska B vd., 2023). BHRHK hücrelerinin histolojik görünümü, yani berrak sitoplazmaları, lipid birikimine bağlıdır ve hastalığın gelişimi sırasında metabolik yeniden programlanmanın meydana gelebileceğini düşündürmektedir (Rezende RB vd., 1999).

Kanser hücrelerinin anormal çoğalması genellikle sınırlı bir besin kaynağına yol açar. Bu zorlu koşullara uyum sağlamak için kanser hücreleri genellikle glukoz, proteinler, nükleik asitler ve lipidlerin metabolizmasını yeniden programlar (Zhu H vd., 2023). Metabolik yeniden programlama kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir (Heravi G vd., 2022). Steroller, açilgliseroller, fosfolipidler ve triaçilgliserol gibi lipidler karmaşık bir hidrofobik biyomolekül grubunu temsil eder. Bu biyomoleküller çok sayıda biyolojik fonksiyona hizmet eder. Sadece biyolojik membranların yapısal bütünlüğünden sorumlu olmakla kalmazlar, aynı zamanda enerji metabolizması ve depolanması için de önemlidirler ve sinyal iletiminde önemli roller üstlenirler (Zhu H vd., 2023). Literatürde, kanser patolojisinde artmış endojen lipid sentezi veya eksojen alımının neoplastik hücre

metabolizmasındaki bir dengesizliğin BHRHK agresifliği ile ilişkili olması muhtemeldir (Heravi G vd., 2022). Bu bağlamda, lipid yeniden programlamasının altında yatan ayrıntılı mekanizmaların tanımlanması, BHRHK patofizyolojisinin sağkalımı ve proliferasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Weiss RH, 2018). Bu nedenle, değişen lipid metabolizması, tümör hücrelerinin besinden yoksun ortamda hayatta kalmasını sağlar (Heravi G vd., 2022). Özellikle, lipid metabolizmasının düzensizliği BHRHK’ deki en belirgin değişikliklerden biridir. Ayrıca, lipiddaha iyi anlaşılmasına ve bu maligniteyi hedef alan yeni terapötik stratejilerin tasarlanmasına yardımcı olabilir.

Son çalışmalar, yağ asidi metabolizması ile en net ilişkiye sahip mikroRNA olan miR-33a’ nın BHRHK’ de antitümör aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir (Desgagné V vd., 2017; Jiang K vd., 2019; Gao C vd., 2020). Öte yandan, hücre sel sağkalım yollarının yağ asidi metabolizmasıyla ilişkili bir düzenleyicisi olan 5’-adenosin monofosfat (AMP) ile aktive olan protein kinaz (AMPK) ve miR-33a ile ilişkili başlıca yağ asidi metabolizması düzenleyicisi olan sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler (SREBP’ ler) BHRHK patogeneğinde rol oynayabilir (Desgagné V vd., 2017; Massari F vd., 2015). Dahası, BHRHK hastalarında klinikopatolojik özellikler ile hücre düzeyindeki miR-33a ve AMPK ifadeleri arasında ilişki olabilir. Bu da, bu moleküllerin hastalık seyrini öngörücü parametreler veya terapötik hedefler olarak düşünölebilmesine olanak sağlar.

1.2 AMAÇ

Bu tez çalışmamızda, lipid metabolizmasında önemli düzenleyici rol üstlendikleri daha önce gösterilen AMPK ve miR-33a ifadelerinin BHRHK’ da klinikopatolojik ve moleküler düzeyde öneminin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, öncelikle kanser genom atlası (The Cancer Genome Atlas, TCGA) veri tabanında yer alan BHRHK olgularında klinikopatolojik özellikler ile miR-33a ve AMPK ifadeleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi, daha sonra, bu moleküllerin primer ve metastatik BHRHK hücre hatlarında hücre sel düzeyde lipid birikimi üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

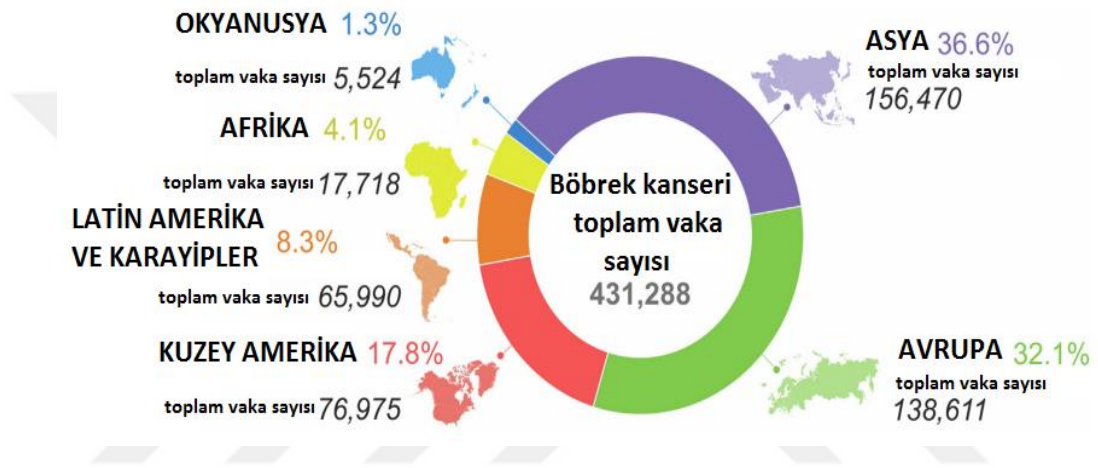
2.1 BÖBREK KANSERİ

Yetişkinlerde böbrek kanseri, tek bir hastalık değildir; her biri farklı bir histolojiye, farklı bir klinik seyre sahip ve farklı bir genin neden olduğu bir dizi farklı kanserden oluşur (Linehan WM ve Rathmell WK, 2011). Böbrek kanseri, böbrek parankimi veya pelvisinden kaynaklanan kötü huylu tümörleri kapsarken, neredeyse tüm böbrek pelvis kanserleri değişici epitel hücre tipindedir ve mikroskopik olarak doğrulanmış böbrek karsinomlarının %10' undan azını oluşturur. Adenokarsinomlar öncelikle böbrek parankiminde ortaya çıkar (bu nedenle renal hücreli kanser olarak adlandırılır, aynı zamanda hipernefroma veya Grawitz tümörü olarak da isimlendirilir) ve tüm primer böbrek neoplazmların %80-90' ını oluşturur. Renal sarkomlar gibi diğer parankimal epitelyal tümörler seyrek olarak görülür (Chow WH, Dong LM ve Devesa SS, 2010; Mohd AB, vd., 2022; Pandey J ve Syed W, 2023).

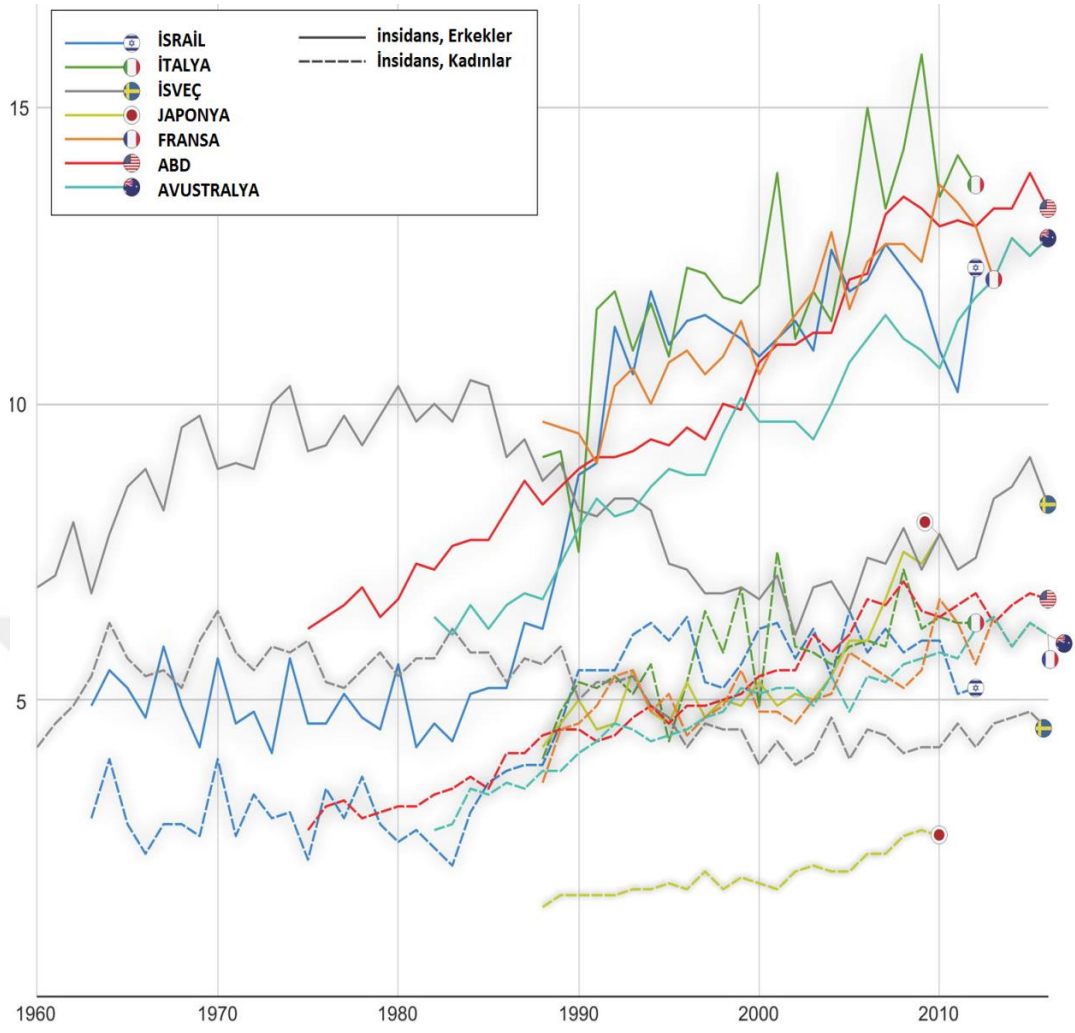
2.1.1 Böbrek Kanseri İnsidans ve Epidemiyolojisi

Renal hücreli karsinom (RHK), 2020 yılında tahmini 431 288 yeni vaka ile küresel olarak en yaygın 14. malignitedir. İnsidans açısından cinsiyet farklılıkları izlenmekte ve erkekler arasında en yaygın dokuzuncu, kadınlar arasında ise en yaygın 14. kanserdir (Bukavina L vd., 2022). RHK insidansı coğrafi olarak büyük farklılıklar göstermekte olup, Avrupa ve Kuzey Amerika' da genellikle daha yüksektir (Chow WH, Dong LM ve Devesa SS, 2010; Bukavina L vd., 2022; Znaor A vd., 2015) (Şekil 2.1). Amerika Birleşik Devletleri' nde her yıl yaklaşık 82.000 yeni RHK

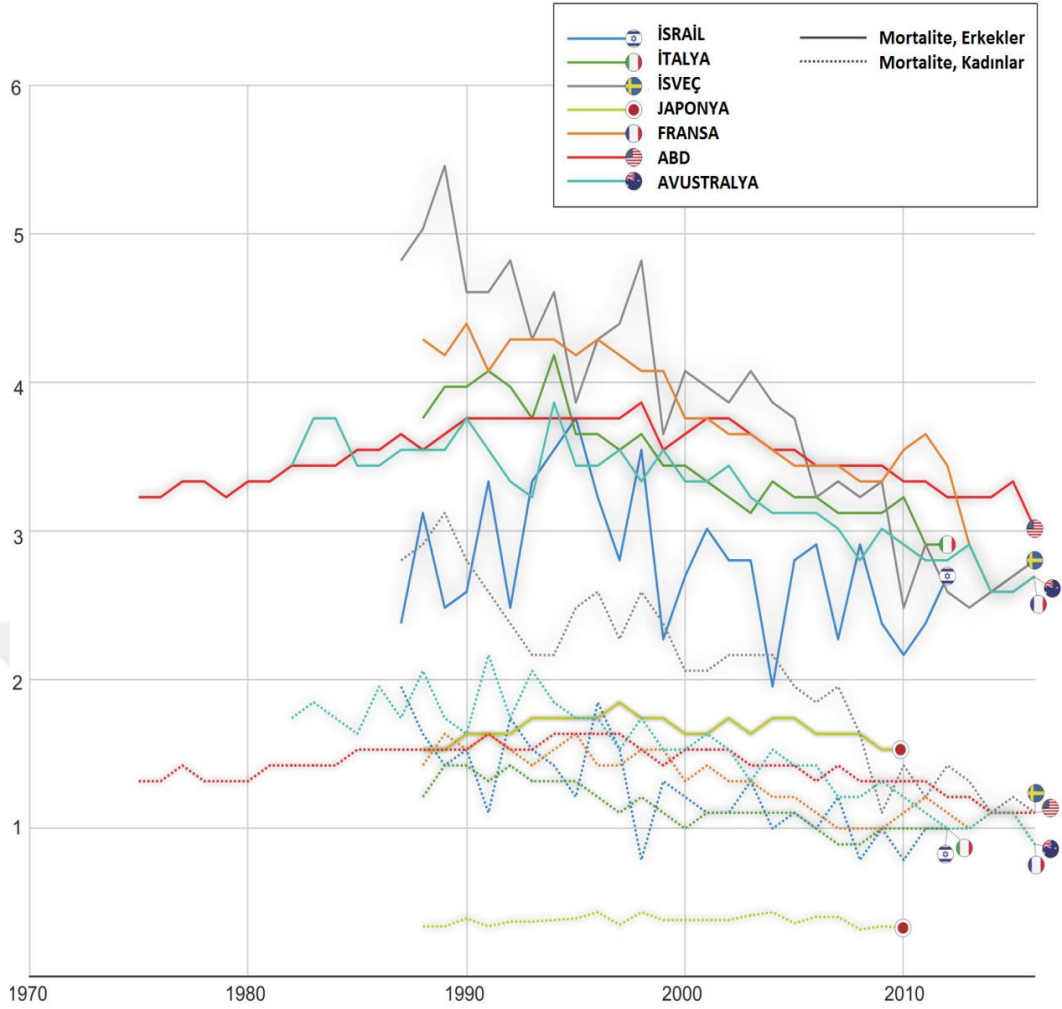
vakası görülmekte ve yaklaşık 15.000 RHK ölümü gerçekleşmektedir (Siegel RL vd., 2023). Dünya çapında, böbrek kanseri nedeniyle yılda 400.000' den fazla yeni RHK vakası ve 170.000' den fazla ölüm gerçekleşmektedir (Global Cancer Observatory, accessed on January 23, 2023). Son yirmi yılda RHK' nin tanı ve tedavisindeki gelişmelere rağmen, RHK hala en ölümcül ürolojik kanserdir ve ölüm oranı yaklaşık %40' ıdır. Metastatik tümör vakalarında ise mortalite oldukça artmaktadır ve yaklaşık %0 -13 gibi düşük bir sağkalım oranı vardır (Muglia VF vd., 2015; Ferlay J vd., 2018).



Şekil 2.1. Kıtalar arasında böbrek kanseri insidansı, toplamın yüzdesi olarak ve 2020 için bölge başına vaka sayısı olarak gösterilmiştir (Bukavina L vd., 2022).



Şekil 2.2. Böbrek kanseri insidansı için yaşa göre standardize edilmiş grafik
(Bukavina L vd., 2022)



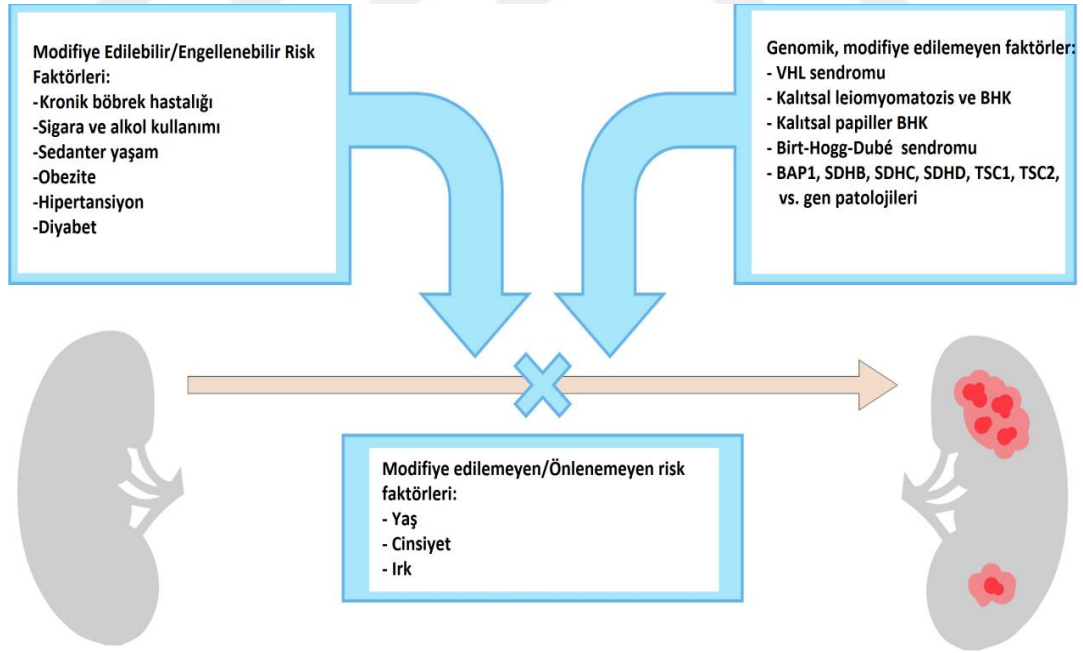
Şekil 2.3. Böbrek kanseri mortalitesi için yaşa göre standardize edilmiş grafik (Bukavina L vd., 2022).

2.1.2 Böbrek Kanseri Etiyoloji ve Risk faktörleri

Hastalık genetik veya edinsel nedenlere bağlı olarak gelişebilir. Yaygın edinsel nedenler arasında kronik böbrek hastalığı, uzun süreli diyaliz bağımlılığı, sigara içme öyküsü, uzun süreli analjezik kullanımı, alkol kullanımı, sedanter yaşam, obezite, hipertansiyon ve diyabet yer alır (Padala SA ve Kallam A, 2023; Nabi S vd., 2018). En yaygın izlenen genetik değişiklik, kromozom 3' ün kısa kolunun kaybıdır (3p kaybı). Bu değişiklik berrak hücreli renal hücreli karsinom (BHRHK) olgularının yaklaşık %95' inde görülür (Padala SA ve Kallam A, 2023). Sırasıyla VHL, FH, MET ve FLCN' deki germ hattı mutasyonlarının neden olduğu von Hippel Lindau (VHL) sendromu, kalıtsal leiomyomatozis ve RHK (KLRHK), kalıtsal papiller RHK ve Birt-Hogg-Dubé (BHD) sendromu dahil olmak üzere çeşitli otozomal dominant kalıtsal kanser sendromları hastaları böbrek kanseri gelişimine yatkın hale

getirmektedir (Huang KL vd., 2018). Ayrıca BAP 1, SDHB, SDHC, SDHD, TSC 1, TSC 2 ve MITF’ de germ hattı mutasyonları olan hastalar için de risk daha yüksektir (Bukavina L vd., 2022). Hastalık patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilen diğer genler arasında ise PBRM 1, SETD 2, KDM5C ve MTOR 1 ve 8 bulunmaktadır. Diğer genetik değişiklikler arasında 5q kazancı (% 69), 14q kısmi kaybı (% 42), 7q kazancı (% 20), 8p delesyonu (% 32) ve 9p kaybı (% 29) bulunmaktadır (Padala SA ve Kallam A, 2023).

Yaş, cinsiyet ve etnik köken de risk faktörleri arasında yer almaktadır. Böbrek kanseri insidansı yaşla birlikte istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Cinsiyete göre hastalık gelişme riskinin farklılığına ilişkin olarak, insidans erkeklerde kadınlara göre yaklaşık iki kat daha yüksektir ve bu durum zaman içinde, ülkeler ve yaş grupları arasında istikrarlı görünen bir gerçektir. ABD’ de böbrek kanseri insidansının etnik kökene göre karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada; siyah bireyler arasında hastalık insidansının 17.0/100 000’ e ulaştığını, beyaz bireyler için ise bu oranın 13.2/100 000 olduğu gösterilmiştir (Bukavina L vd., 2022).



Şekil 2.4. Böbrek kanseri gelişme riskine katkıda bulunan değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörlerinin şematik gösterimi (Bukavina L vd., 2022). VHL: Von Hippel-Lindau sendromu, RHK: Renal hücreli karsinom.

2.1.3 Böbrek Kanseri Histopatolojik Sınıflandırılması

Böbrek kanseri, histopatolojik olarak çeşitli farklılıklar sergileyen ve klinik özellikler ve genetik belirleyiciler açısından de değişiklikler gösteren alt tipler ile karakterize olup, bu alt tiplerden en yaygın izleneni renal korteksten kaynaklanan RHK' dur. RHK, bir ileri yaş grubu tümörü olup en sık 50 ila 70 yaşları arasında görülür ve yaklaşık 2:1 erkek/kadın oranına sahiptir (Pandey J ve Syed W, 2023). Ürolojik kanserler arasında prostat ve mesane kanserinden sonra üçüncü sıklıkta görülür ve tüm erişkin kanserlerinin ise yaklaşık %1 - %3' ünü oluşturur (Darré T vd., 2017; Athanazio DA vd., 2021). Son yıllarda tanısal radyolojideki teknolojik gelişmelerle birlikte birçok merkezde modern kesitsel görüntüleme yöntemlerinin yaygın olarak kullanımı sayesinde RHK izlenme ve saptanma oranında belirgin bir artış izlenmektedir (Krajewski KM ve Pedrosa I, 2018). Oldukça mortal seyir gösterebilen RHK, ürolojik kanserler arasında mortaliteye en sık neden olan kanser türü olup olguların 1/3' ü tanı anında metastatiktir. Öte yandan olguların 1/3' ünde ise tedaviye rağmen metastaz gelişebileceği öngörülmektedir (Padala SA ve Kallam A, 2023; Athanazio DA vd., 2021). RHK tüm primer renal neoplazmların %80 ila %85' inden sorumludur ve histopatolojik, klinik ve genetik özellikler açısından değişiklikler gösteren 10' dan fazla histolojik ve moleküler alt tipi vardır. RHK' un histolojik sınıflandırması, alt tiplerin bu tümörlerin prognozu ve tedavisi üzerindeki önemli etkileri göz önüne alındığında son derece önemlidir (Muglia VF vd., 2015). Geleneksel olarak, RHK alt tipleri histopatolojik incelemedeki baskın sitoplazmik özellikler (örn. berrak hücreli ve kromofob RHK) ve mimari özellikler (örn. papiller RHK) ile sınıflandırılmaktadır (Moch H vd., 2022). RHK patofizyolojisindeki moleküler değişimlerin keşfi ve moleküler biyoloji yöntemlerindeki ilerlemelerle birlikte olağandışı morfolojiye sahip böbrek tümörlerinde moleküler değişiklikleri tanımlamak için daha fazla olanak sağlamı olup morfolojiye dayalı sınıflamaya ek olarak moleküler odaklı bir böbrek tümörü sınıflandırması kavramı ortaya çıkmıştır (Moch H vd., 2022). Nitekim, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) [World Health Organisation, WHO] tarafından son baskısı 2022 yılında yayınlanan DSÖ Tümör Sınıflandırılması beşinci edisyonuna göre moleküler olarak tanımlanmış RHK' lar olarak da ayrı bir alt gruptan tanımlanmıştır (Tablo 2.1). Moleküler olarak tanımlanmış epitelyal böbrek tümörlerine örnek olarak SMARCB 1 eksikliği olan böbrek medüller karsinomu, TFEB-yeniden düzenlenmiş RHK, ALK-yeniden düzenlenmiş RHK ve elongin C (ELOC) mutasyonlu RHK verilebilir. DSÖ 2022 sınıflandırmasındaki en derin değişiklikler esas olarak nadir böbrek tümörleri ile

ilgilidir (Moch H vd., 2022). Morfoloji, immünohistokimya ve moleküler özelliklerin integrasyonu farklı tümör tiplerini rafine etmeye ve uzun süredir belirlenmiş böbrek kanseri kategorilerinden alt grupları ayırmaya devam etse de, bu ayrımların yalnızca belirli bir alt kümesi klinik yönetim için en yüksek öneme sahiptir (Williamson SR, 2022). Tümör alt tipinin prognozu etkileyip etkilemediği tartışmalıdır. Çok merkezli bir çalışmada, 4000’ den fazla hastada RHK alt tipinin prognostik bir farka neden olmadığı gösterilmiştir (Patard JJ vd., 2005). Buna karşılık, 3062 ve 1668 hastayı içeren tek kurumlu iki farklı çalışmada ise berrak hücreli histolojiye sahip hastaların kansere özgü sağkalımının önemli ölçüde daha kötü olduğunu gösterilmiştir (Leibovich BC vd., 2010; Teloken PE vd., 2009). Diğer yandan, RHK’ nin prognozunun tümör evresi, histopatolojik derece, sarkomatoid ve rabdoid özelliklerin varlığı, yağ ve vasküler invazyon ile ilişkili olduğu oldukça iyi bilinmektedir (Andreiana BC vd., 2018). Bu nedenle, histolojik tanı, RHK tipinin yanı sıra; histopatolojik derecesinin, sarkomatoid ve rabdoid özelliklerin, vasküler invazyonun, ve peri-renal yağ invazyonunun değerlendirilmesini de içermelidir (Ljungberg B vd., 2023). En sık görülen histolojik alt tipler berrak hücreli renal hücreli karsinom (BHRHK), papiller renal hücreli karsinomlar ve kromofob renal hücreli karsinomlardır. Bu üç alt tip birlikte tüm RHK’ lerin %90’ ından fazlasını temsil etmektedir (Muglia VF vd., 2015). Bunlardan en sık görüleni, aynı zamanda da böbrek kanserine bağlı ölümlerin çoğundan sorumlu olan, BHRHK’ dur (Chow WH, Dong LM ve Devesa SS, 2010; Mohd AB, vd., 2022; Pandey J ve Syed W, 2023). BHRHK böbreğin en yaygın malignitesini temsil eder ve böbrek karsinomların %80’ ini oluşturur, ayrıca oldukça agresif bir tümör olup kemik, akciğer ve karaciğere metastaz yapma eğilimi yüksektir (Gkolfinopoulos S, Psyrris A, ve Bamias A, 2021; Thaib PKP ve Rahaju AS, 2022).

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü böbrek tümörleri sınıflandırması-2022

Böbrek tümörleri
1- Renal hücreli tümörler - Berrak hücreli böbrek tümörleri • Berrak hücreli renal hücreli karsinom • Düşük malignite potansiyelli multiloküler kistik böbrek tümörü - Papiller böbrek tümörleri • Papiller adenom • Papiller renal hücreli karsinom - Onkositik ve kromofob böbrek tümörleri

• Onkositoma • Kromofob renal hücreli tümörler • Böbreğin diğer onkositik tümörleri - Toplayıcı kanal tümörleri • Toplayıcı kanal karsinomu - Diğer böbrek tümörleri • Berrak hücreli papiller renal hücreli tümör • Müsinöz tubüler ve içsi hücreli karsinom • Tubülökistik renal hücreli karsinom • Eozinofilik solid ve kistik renal hücreli karsinom • Non spesifik renal hücreli karsinom - Moleküler olarak tanımlanmış böbrek tümörleri • TFE3-yeniden düzenlenmiş renal hücreli karsinom • TFEB-değişiklikli renal hücreli karsinom • ELOC (eski adıyla TCEB1) mutasyonlu renal hücreli karsinom • Fumarat hidrataz eksiklikli renal hücreli karsinom • Süksinat dehidrojenaz eksiklikli renal hücreli karsinom • ALK-yeniden düzenlenmiş renal hücreli karsinom • SMARCB1 eksiklikli böbrek medüller karsinomu
2- Metanefrik tümörler - Metanefrik adenom - Metanefrik adenofibrom - Metanefrik stromal tümör
3- Mikst epidermal ve stromal tümör ailesi - Mikst epidermal ve stromal tümör - Erişkin kistik nefroma
4- Böbrek mezenkimal tümörleri - Erişkin böbrek mezenkimal tümörleri • Anjiyomiyolipom • Onkositik anjiyomiyolipom • Epitel kistleri ile birlikte anjiyomiyolipom • Anjiyomiyolipom, epiteloid • Hemanjioblastom • Jukstaglomerüler tümör • Fonksiyonel jukstaglomerüler hücre tümörü • Fonksiyonel olmayan jukstaglomerüler hücre tümörü • Renomedüller interstisyel hücre tümörü - Çocukluk çağı böbrek mezenkimal tümörleri • Bebeklik döneminde kemikleşen böbrek tümörü • Konjenital mezoblastik nefroma

• Böbreğin rabdoid tümörü • Böbreğin berrak hücreli sarkomu
5- Böbreğin embriyonal tümörleri - Nefroblastik tümörler • Nefrojenik kalıntılar • Çocukluk çağı kistik nefroması • Kistik kısmi diferansiye nefroblastom • Nefroblastom
6- Muhtelif tümörler - Böbreğin germ hücreli tümörleri • Prepubertal tip teratom • Karsinoidli teratom (nöroendokrin tümör) • Non spesifik yolk kesesi tümörü • Karışık teratom-yolk kesesi tümörü

2.1.4 Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom (BHRHK)

RHK' nin en sık izlenen alt tipi olan ve böbrek kanserine bağlı ölümlerin çoğundan sorumlu olan BHRHK tüm böbrek karsinomların %80' ini oluşturur, ayrıca oldukça agresif bir tümör olup kemik, akciğer ve karaciğere metastaz yapma eğilimi yüksektir (Chow WH, Dong LM ve Devesa SS, 2010; Mohd AB, vd., 2022; Pandey J ve Syed W, 2023; Gkolfinopoulos S, Psyrris A, ve Bamias A, 2021; Thaib PKP ve Rahaju AS, 2022). Tipik olarak kromozom 3p delesyonuna sahip olan berrak hücreli karsinomlar proksimal tübülden kaynaklanır (Young MD vd., 2018; Zhang Y vd., 2021). Sporadik tümörler, birden fazla ve iki taraflı olabilen ailesel lezyonların aksine genellikle tek ve tek taraflıdır. Makroskopik olarak solid veya daha az yaygın olarak kistik olabilirler, iyi sınırlıdır ve kapsül genellikle yoktur. Kesit yüzeyi, hücrelerdeki büyük miktarda lipid nedeniyle sarıdır ve geniş nekroz ve hemoraji alanları vardır (Pandey J ve Syed W, 2023; WHO Classification of Tumours-5th Edition, 2022). Mikroskopik olarak tümör hücreleri yuvarlak veya poligonaldır ve glikojen ve lipid bakımından zengin berrak veya pembe bir sitoplazma içerir (Pandey J ve Syed W, 2023). BHRHK sporadik hastalıkta görülmelerinin yanı sıra özellikle VHL hastalığı ile ilişkilidir ve kromozom 3p25' teki VHL geninin mutasyonu sıklıkla bulunur. Von Hippel-Lindau protein fonksiyonunun kaybı tümörün başlamasına, ilerlemesine ve metastazlarına katkıda bulunur (WHO Classification of Tumours-5th Edition, 2022).

2.1.5 Papiller Renal Hücreli Karsinom (Papiller RHK)

Papiller RHK, renal epitelyal tümörlerin %13-20' sini oluşturan ve en sık rastlanan ikinci RHK morfortipidir. Genellikle sınırlıdır ve papiller veya tübülopapiller mimari ile karakterizedir (Moch H vd., 2022; WHO Classification of Tumours-5th Edition, 2022). BHRHK' den farklı olarak, sporadik tümörler bile multifokal ve bilateral olabilir. Gross olarak tümör iyi sınırlı ve grimsi-beyazdır ve tipik olarak santral nekroz ve sık kanamalar sergiler (Pandey J ve Syed W, 2023). Papiller RHK geleneksel olarak iki tipe ayrılmıştır; Tip I ve II papiller RHK (Moch H vd., 2022). Bununla birlikte, yeni 2022 WHO sınıflandırmasında, eski pRCC tip I artık "klasik patern papiller RHK" olarak adlandırılmaktadır. Üç ek morfolojik papiller RHK paterni tanımlanmıştır: a) çoğunlukla solid büyüme gösteren bifazik (alveolo-skuamoid) patern; b) daha önce "onkositik düşük dereceli papiller RHK" olarak tanımlanan ters nükleer polariteye sahip papiller tümör; ve c) tükürük bezinin Warthin tümörünü taklit eden hızlı inflamasyon sergileyen Warthin benzeri papiller RHK (Ljungberg B vd., 2023; WHO Classification of Tumours-5th Edition, 2022). Papiller RHK' nin genetik değişiklikleri arasında kromozom 7 ve 17' nin trizomileri ve tetrasomileri ve Y kromozomunun kaybı yer alır. MET gen mutasyonları düşük dereceli papiller RHK' de daha sıktır (Ljungberg B vd., 2023). Sert bir yalancı kapsül yapısına sahiptir ve oldukça kırılğan yapıda bir histolojisi vardır. Tümör papillalarının kırılğanlığına bağlı olarak böbrek tümör biyopsisi gerçekleştirilen olgularda biyopsi yapılan hatta tümör yayılım riski mevcuttur (Ljungberg B vd., 2023).

2.1.6 Kromofob Renal Hücreli Karsinom (Kromofob RHK)

Kromofob RHK artık "onkositik ve kromofob tümörler" olarak gruplandırılmaktadır. KRHK' lerin çoğu asemptomatik hastalarda tesadüfen keşfedilir (Moch H vd., 2022; WHO Classification of Tumours-5th Edition, 2022). Toplayıcı kanalların interkale hücrelerinden kaynaklandıkları düşünülmektedir (Pandey J ve Syed W, 2023). Kesit yüzeyi soluk ten renginde, nispeten homojen ve sert, kapsülü olmayan iyi sınırlı bir kitle olarak ortaya çıkar. Histolojik olarak, şeffaf hafif retiküle sitoplazmaya ve kalın duvarlı vaskülatürlü perinükleer halelere sahip bazik kromofob büyük poligonal hücrelerden oluşurlar. Onkositomdan ayırt edilmeleri zordur (Pandey J ve Syed W, 2023). Kromofob RHK, nükleer atipisi nedeniyle histopatolojik derecelendirme sistemi ile derecelendirilemez (Moch H vd., 2022). Prognozu diğer alt tiplere nazaran daha iyidir (Volpe A vd., 2012).

2.1.7 Diğer Böbrek Tümörleri

Diğer böbrek tümörleri en sık görülen histolojik alt tipler olan BHRHK, papiller RHK ve kromofob RHK haricinde geri kalan renal kortikal tümörleri oluşturur. Bunlar, bazıları yakın zamanda tanımlanmış çeşitli nadir, sporadik ve ailesel karsinom/tümörlerin yanı sıra bir grup sınıflandırılmamış karsinomu da içerir. Bu tümörlerin bir özeti Tablo 2.2’ de verilmiştir (Moch H vd., 2022; Ljungberg B vd., 2023; Abern MR vd., 2012).

Tablo 2.2. Diğer böbrek tümörleri

Böbrek tümörü alt tipi	Klinik özellikler	Kötü huylu potansiyel
Toplayıcı kanal karsinomu	Önceden bellini kanalı karsinomu olarak adlandırılmaktaydı. Nadirdir, sıklıkla ileri evrede ortaya çıkar (tanı sırasında N+ %44 ve M1, %33).	Yüksek, çok agresif. Medyan sağkalım 30 ay.
Berrak hücreli papiller renal hücreli tümör	Edinilmiş kistik böbrek hastalığı olanlarda genel popülasyona kıyasla 100 kat daha fazla risk.	Düşük, yavaş seyirli.
Müsinöz tübüler ve iğsi hücreli karsinom	Tümör Henle halkası ile ilişkilidir. Böbrek tümörlerinin <%1’ i. Kadınlarda görülme oranı daha yüksek (3-4:1).	Orta derecede.
Tübülökistik RHK	Nadir (<%1). Çoğunlukla erkeklerde izlenir, görüntülemeye Boşniak tip III veya IV kistik yapı şeklinde olabilir.	Düşük, yavaş seyirli.
Eozinofilik solid ve kistik RHK	Genellikle tuberoskleroz kompleks (TCS) genlerinde değişiklik mevcuttur. Ağırlıklı olarak yetişkin kadınlarda görülür. Bazılarında TSC sendromu bulunabilir.	Nadiren metastatik.
TFE3-yeniden düzenlenmiş renal hücreli karsinom	Birçok farklı ortak genden biriyle TFE3’ ü içeren gen füzyonları. Eski adıyla translokasyon RHK (TRHK) Xp11.2. Çocukluk çağı RHK’ sinin yaklaşık %40’ ı ve yetişkin RHK’ nin %1,6-4’ ü.	BHRHK’a benzer sağkalım.
TFEB-yeniden düzenlenmiş renal hücreli karsinom	TFEB transkripsiyon faktörünü içeren gen füzyonları, tipik olarak bir MALAT1-TFEB gen füzyonu ile sonuçlanan bir t(6;11)(p21;q12) translokasyonu yoluyla.	TFE3-yeniden düzenlenmiş RHK’ den daha selimdir

	Eskiden translokasyon RHK t(6;11) olarak isimlendirilmekteydi. TFE3 ile yeniden düzenlenmiş RHK' den daha az yaygındır.	ve vakaların %10' undan azı hasta ölümüyle sonuçlanır.
ELOC (eski adıyla TCEB1) mutasyonlu renal hücreli karsinom	Literatürde yirmi vaka tanımlanmıştır. Tipik olarak T1 tümörler.	Düşük, yavaş seyirli. Sadece 2 metastatik vaka bildirilmiştir.
Fumarat hidrataz eksiklikli renal hücreli karsinom	Daha önce hereditör leiomyomatozis ve RHK ile ilişkili RHK olarak isimlendirilmekteydi. FH geninde değişiklikler. Otozomal dominant. Yaşam boyu %21-30 RHK risk. Kutanöz leiomyomlar, kadın uterin leiomyomu veya leiomyosarkom. Erkeklerde daha sık görülür.	Genellikle agresif.
Süksinat dehidrojenaz eksiklikli renal hücreli karsinom	Nadir görülür. Tüm RHK' lerin %0,05-0,2'si.	Metastatik hastalık sergileme oranı %11.
ALK-yeniden düzenlenmiş renal hücreli karsinom	Kromozom 2p23' te anaplastik lenfoma kinaz genini (ALK) içeren gen füzyonlar ile karakterizedir. Yaklaşık 40 vaka tanımlanmıştır.	Düşük, yavaş seyirli.
Metanefrik tümörler	Metanefrik adenom, adenofibrom ve metanefrik stromal tümörler olarak ayrılır.	Selim.
Mikst epidermal ve stromal tümörler	Böbreğin mikst epitelyal ve stromal tümörü (MEST) ve erişkin kistik nefromu olmak üzere 2 benign lezyonu kapsar. Görüntülemeye sıklıkla Bosniak tip III veya IIF/IV kistik lezyon olarak izlenir. Çoğunlukla kadınlarda görülür (7:1).	Selim.
Böbrek kistleri/kistik lezyonlar	Sık izlenirler, ortaya çıkan septa, kalsifikasyonlar ve solid komponentler takip ve/veya tedavi gerektirebilirler.	Sıklıkla selim.

2.1.8 Böbrek Kanseri Tümör Evrelemesi

Kanser evrelemesi, primer tümörün büyüklüğünü ve yayılma derecesini belirleme sürecidir. Prognozu tahmin eder, klinik pratikte hastalık yönetimi ve tedavi kararlarına rehberlik eder ve takip ve gözetim planlarının formüle edilmesine yardımcı olur (Swami U vd., 2019). Amerikan Kanser Ortak Komitesi (American Joint Committee on Cancer, AJCC) tümör-nod-metastaz (TNM) evrelemesi, kanser için en yaygın kullanılan ve evrensel olarak kabul edilen evreleme sistemidir. Diğer çoğu kanser tipinde olduğu gibi, böbrek kanserinde de TNM sınıflandırma ve evreleme sistemi klinik ve bilimsel kullanım için önerilmektedir (Ljungberg B vd., 2023). TNM sınıflandırmasının böbrek kanserli olgularda prognostik değeri olduğu tek ve çok merkezli birçok çalışma tarafından doğrulanmıştır (Ljungberg B vd., 2023). Örneğin, Tsui ve ark. (Tsui KH vd., 1997) tarafından 2000 yılında yayınlanan 643 olguluk seride TNM evre I, II, III ve IV RHK' lar için 5 yıllık kansere özgü sağkalım oranları sırasıyla %91, %74, %67 ve %32, primer tümör yaygınlığı T1 hastalık için %83, T2 hastalık için %57, T3 hastalık için %42 ve T4 hastalık için %28 sağkalım oranı gösterilmiştir. TNM sınıflandırma ve evreleme sistemi, 1977' deki ilk yayınından bu yana çeşitli değişikliklere uğramıştır ve 2017 yılı itibariyle sekizinci versiyonu ilan edilmiştir (Swami U vd., 2019). Böbrek kanserinde TNM evrelemesi (Tablo 2.3), tümör boyutu, damarlara veya perinefrik dokulara uzanım, ipsilateral adrenal bez veya Gerota fasyasına invazyon (T), bölgesel lenf nodlarına (N) veya uzak bölgelere metastaz (M) gibi birçok önemli anatomik parametreye dayanılarak gerçekleştirilir (Swami U vd., 2019; Ljungberg B vd., 2023).

**Tablo 2.3. Böbrek kanseri TNM sınıflandırma ve evreleme sistemi
(Sekizinci versiyon-2017).**

T-Primer Tümör

- TX Primer tümör değerlendirilemiyor.
- T0 Primer tümör kanıtı yok.
- T1 Tümör en büyük çapı ≤ 7 cm, böbreğe sınırlı.
- T1a Tümör en büyük çapı ≤ 4 cm, böbreğe sınırlı
- T1b $4 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 7 \text{ cm}$, böbreğe sınırlı.
- T2 Tümör en büyük çapı > 7 cm, böbreğe sınırlı.
- T2a $7 \text{ cm} < \text{tümör en büyük çapı} \leq 10 \text{ cm}$, böbreğe sınırlı.
- T2b Tümör $> 10 \text{ cm}$, böbreğe sınırlı.
- T3 Tümör ana venlere veya perirenal dokulara yayılmış fakat aynı taraf adrenal beze veya Gerota fasyasının dışına yayılım göstermiyor.
- T3a Tümör renal ven veya segmental dallarına yayılmış, veya pelvikalisijel sistemi invaze etmiş, veya perirenal ve/veya renal sinüs yağ dokusunu invaze etmiş fakat Gerota fasyasının dışına yayılım göstermiyor.
- T3b Tümör diyaframın altında vena kavaya yayılmış.
- T3c Tümör diyaframın üzerinde vena kavaya yayılmış, veya vena kava duvarını invaze etmiş
- T4 Tümör Gerota fasyasının dışına yayılmış (aynı taraf adrenal beze direkt invazyon dahil).

N-Bölgesel Lenf Nodülleri

- N0 Bölgesel lenf nodülü tutulumu yok.
- NX Bölgesel lenf nodülleri değerlendirilemiyor.
- N1 Bölgesel lenf nodülü tutulumu var.

M-Uzak Metastaz

- Uzak metastaz değerlendirilemiyor.
- M0 Uzak metastaz yok.
- M1 Uzak metastaz var.

TNM Evre Gruplaması

Evre I= T1 N0 M0.

Evre II= T2 N0 M0.

Evre III= T1 N1 M0, T2 N1 M0, T3 N0 M0, T3 N1 M0.

Evre IV= T4 Herhangi N M0, Herhangi T Herhangi N M1.

2.1.9 Böbrek Kanseri Histolojik Tümör Derecelendirmesi

Böbrek kanseri metastaz yapma kapasitesine göre farklı biyolojik davranış sergileme eğilimindedir. Bu nedenle, yüksek riskli hastaları tanıyacak ek prognostik faktörlere ihtiyaç vardır. Literatürde, TNM evreleme ve sınıflamasına ek olarak, böbrek kanserinde hastalığın seyrini ve prognozu etkileyen tümör derecesi, tümör alt tipi, lenfovasküler invazyon, tümör nekrozu ve toplayıcı sistem invazyonu gibi çeşitli histolojik parametrelerin de olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, tümör derecesi en önemli histolojik prognostik faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Ljungberg B vd., 2023).

RHK için morfolojik özelliklere dayalı çeşitli derecelendirme sınıflandırmaları önerilmiş olup tümör nükleer derecelendirme sistemleri en yaygın kullanılan derecelendirme sistemlerdir ve literatürdeki mevcut kanıtlar nükleer derecelendirmenin nükleer kriterleri kullanmayan diğer derecelendirme türlerine göre daha iyi bir prognostik gösterge olduğunu göstermektedir (Medeiros LJ vd., 1997).

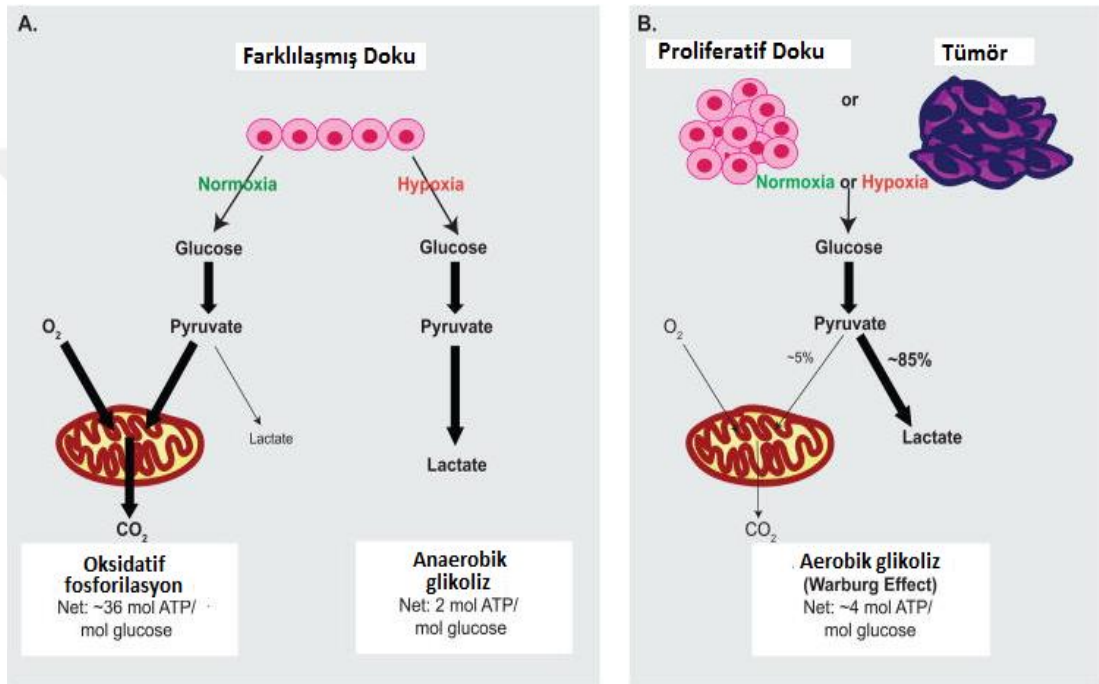
Bunlardan Fuhrman derecelendirme sistemi (Fuhrman SA, Lasky LC ve Limas C, 1982) patoloji pratiğinde yaygın bir kullanıma ulaşmış ve Fuhrman derecelendirme sisteminin hastalık seyrinin, sağkalımın ve prognozun önemli bir belirleyicisi olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından kanıtlanmıştır (Qayyum T, vd., 2013). Günümüzde, Fuhrman derecelendirme sisteminin yerini artık Dünya Sağlık Örgütü/Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (WHO/ISUP) derecelendirme sınıflandırması almıştır. Bu derecelendirme sisteminin histopatolojik tanı esnasında patologlar arası varyasyonun daha az olmasına olanak sağladığı kabul edilmektedir. Ayrıca, WHO/ISUP derecelendirmesinin, özellikle derece 2 ve derece 3 tümörler için Fuhrman derecelendirmesine kıyasla daha üstün prognostik bilgi sağladığı gösterilmiştir (Ljungberg B vd., 2023). Sonuç olarak, RHK için WHO/ISUP derecelendirme sistemi, BHRHK ve papiller RHK’ de prognostik olarak önemlidir ve BHRHK için risk stratifikasyon skorlarına dahil edilir, böylece hasta yönetimini etkiler (Browning L vd., 2021; Rabjerg M vd., 2021).

Tablo 2.4. Fuhrman ve WHO/ISUP nükleer derecelendirme sistemleri.

Nükleer derece sistemi	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Fuhrman	Küçük ($\approx 10\mu\text{m}$), yuvarlak tek tip çekirdek, nükleol yok veya göze çarpmaz.	Daha büyük ($\approx 15\mu\text{m}$), dış hatlarında düzensizlik olan ve $\times 400$ büyütmede nükleolleri görülebilen çekirdekler.	Daha da büyük çekirdekler ($\approx 20\mu\text{m}$), belirgin bir düzensiz dış hat ve $\times 100$ büyütmede görülebilen nükleoller.	Hücreler büyük, pleomorfik, tuhaf çok loblu dev hücreler ve ağır kromatin kümeleri, aşırı düzensiz dış hatlar.
WHO/ISUP	Nükleol yok veya $\times 400$ büyütmede göze çarpmayan bazofilik nükleol.	$\times 400$ büyütmede belirgin ve eozinofilik nükleoller ($\times 100$ büyütmede görülebilir, ancak belirgin değildir.	Nükleoller $\times 100$ büyütmede belirgin ve eozinofiliktir.	Rabdoid veya sarkomatöz farklılaşma, tümör dev hücreleri ve kromatin kümelenmesi ile aşırı nükleer pleomorfizm.

2.2 KANSERDE HÜCRESEL METABOLİK DEĞİŞİKLİKLER

HücreSEL enerji metabolizmasının yeniden programlanması kanserin ortaya çıkan bir özelliğini oluşturmaktadır ve son yıllarda kanserdeki metabolik değişikliklerin altında yatan mekanizmaları ortaya çıkarmak için normal hücreler ve kanserli hücrelerde çok sayıda çalışmalar yürütülmektedir (Weyandt JD vd., 2017). Kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlamanın ilk gözlemi 1927 yılında Otto Warburg tarafından yapılmıştır (Warburg OP ve Negelein E, 1927).



Şekil 2.5. Tümör Hücrelerinde Metabolik Yeniden Programlama: Warburg Etkisi (Weyandt JD vd., 2017). A. Normoksik koşullar altında, normal dokular piruvatın glikolitik ürünü Asetil-CoA'ya dönüştürür, bu da mitokondride trisiklik asid döngüsünde oksidatif fosforilasyon sürecini başlatmak için kullanılır. Oksijen yokluğunda piruvat laktata dönüştürülür ve enerji ve besin gereksinimlerini karşılamak için sürekli anaerobik glikoliz kullanılır. B. Tümör hücreleri glikolitik ürün piruvatın büyük kısmını laktata dönüştürür ve besin ve enerjilerini sürekli aerobik glikoliz yoluyla yeniler, ancak mitokondriyal işlevi ve bir miktar oksidatif solunumu sürdürür.

Kanser hücrelerinde, bir veya daha fazla klasik metabolik yol hücreSEL gereksinime göre yeniden programlanır. Örneğin, hızla büyüyen kanser hücrelerinde Warburg etkisi, tümörlerin besin eksikliği koşullarında gelişmesini sağlar. Buna karşılık, aynı hücrelerde pentoz fosfat yolu, nükleotidlere yönelik artan talebi beslemek için yukarı doğru düzenlenir. Benzer şekilde hücreleri oksidatif strese karşı korumak ve

lipidlerin biyosentezi için glutamin metabolizmasının yukarı regülasyonu da söz konusu olabilir (Pavlova NN ve Thompson CB, 2016). Normal hücrelerin aksine kanser hücreleri pirüvatı laktata dönüştürmek için laktat dehidrojenaz (LDH) ile laktik asit fermentasyonunu kullanır. Glukozun laktata katabolizması, oksidatif fosforilasyona kıyasla daha düşük miktarda enerji verir. Bu nedenle, kanser hücrelerinin enerji ihtiyacını telafi etmek için yüksek bir glukoz tüketim oranı gereklidir (Chakraborty S vd., 2021). Kanser hücrelerinin membranı boyunca glukoz taşıyıcılarının artan ifadesi yüksek glukoz tüketimine katkıda bulunur. GLUT (glukoz transporter, glukoz taşıyıcı) ailesinin pasif glukoz taşıyıcılarının ifadesi farklı kanserlerde sıklıkla yukarı regüle edilir (Chakraborty S vd., 2021). Normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri uzun süreli metabolik ve oksidatif strese maruz kalır (Nogueira V ve Hay N, 2013). Kanser hücreleri bu kronik oksidatif strese karşı savunmak için daha fazla NADPH üretmek üzere glukoz metabolizmasını yeniden programlar. Pentoz fosfat yolunun hız sınırlayıcı enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD), kanser hücrelerinde sıklıkla yukarı regüle edilir (Chakraborty S vd., 2021). Birçok çalışma, kanser hücrelerinde pentoz fosfat yolunun PI3K, mTORC 1 ve K-Ras gibi onkogenler tarafından yukarı regüle edildiğini ve p53 ve PTEN gibi tümör baskılayıcı genler tarafından inhibe edildiğini göstermiştir (Chakraborty S vd., 2021).

Trisiklik asid (TCA) döngüsü kanser hücrelerinde genellikle enzim mutasyonları nedeniyle bozulur. Örneğin, izositrat dehidrojenaz (IDH), süksinat dehidrojenaz (SDH) ve fumarat hidratazı (FH) kodlayan genlerdeki mutasyonlar normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine yol açabilir (Chakraborty S vd., 2021). Kanser hücrelerinde, sitoplazmik glikoliz yoluyla daha hızlı ATP üretimi mitokondriyal oksidatif fosforilasyona tercih edilir. Glikoliz, oksidatif fosforilasyondan 100 kata kadar daha hızlı ATP sentezleyebilir, ancak glikolizin toplam enerji verimi çok düşüktür; oksidatif fosforilasyondan 18 kat daha düşüktür. Bununla birlikte, tümör tiplerine ve besin maddelerinin mevcudiyetine bağlı olarak glikoliz veya oksidatif fosforilasyon yoluyla glukoz tüketiminde heterojenlik vardır (Chakraborty S vd., 2021).

Kanser hücresinde glutamin, triptofan ve arginin metabolizmalarında da değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Örneğin, β -katenin' deki aktive edici mutasyonların hepatoselüler karsinomda glutamin taşıyıcılarının (SLC1A 2) ve glutamin sentetazın

ifadesini arttırdığı bildirilmiştir (Dal Bello B vd., 2010). Triptofan metabolizmasının önemli yolağı olan kinürenin yolunun enzimi olan triptofan-2, 3-dioksijenaz (TDO 2) solid tümörlerde sıklıkla aşırı eksprese edildiğı gösterilmiştir (Wettersten HI, 2020). Biriken kinünerinin efektör T hücrelerinin apoptozunu teşvik ettiğı ve antitümör immün yanıtları baskıladığı bilinmektedir. Ayrıca kinünerin, kanser hücreleri üzerindeki aril hidrokarbon reseptörü (AhR) aracılığıyla otokrin sinyale aracılık ederek hücre dışı matrisin bozulmasını ve kanser hücrelerinin istilasını tetikler. Ayrıca, kinünerin kanserle ilişkili immünosupresyonla bağlantılı hem doğal hem de adaptif immün yanıtı modüle edebilir (Chakraborty S vd., 2021). Argininosüksinat sentaz-1 (ASS 1) ve arginin metabolizması yolunun kritik bir enzimi olan argininosüksinat liyaz (ASL), hepatosellüler karsinom, renal hücreli karsinom ve melanom gibi kanserlerde genellikle epigenetik olarak bozulur. Bununla birlikte, ASL ve ASS 1' in aşağı regülasyonu genellikle kemoterapötik ilaç direnci ve kanserin kötü prognozu ile ilişkilidir (Chakraborty S vd., 2021).

Kanser hücrelerinde izlenen metabolik değişikliklerin belki de en iyi bilineni lipid metabolizmasını kapsamaktadır. Tümörlerin de novo lipid sentezleme yeteneğı 1950' lerde keşfedilmiş ve o zamandan beri bazı kanserler için önemli bir metabolik durum olarak tanımlanmıştır (Kuhajda FP vd., 1994; Menendez JA ve Lupu R, 2006; Rohrig F ve Schulze A, 2016). Lipid metabolizmasındaki kansere özgü izlenen değişiklikler sonraki bölümlerde ayrı alt başlık olarak daha detaylı irdelenecektir.

2.2.1 Renal Hücreli Karsinomda Hücresel Metabolik Değişiklikler

Böbrek kanseri metabolik yollardaki değişikliklerle yüksek oranda bağlantılı tümör tiplerinin başlıca örneğidir. Çoklu metabolik yollardaki değişiklikler ve pertürbasyonlar nedeniyle, RHK bazen bir "metabolik hastalık" olarak adlandırılır. İlginç bir şekilde, genel mutasyon yükü diğer birçok tümör tipine kıyasla RHK' de nispeten düşük olsa da, bu tümörlerde tanımlanan mutasyonların büyük çoğunluğu bir şekilde hücrenin besinleri, oksijeni, demiri veya enerjiyi algılama veya bunlara yanıt verme becerisiyle ilgilidir; bu da metabolik yolak değişikliklerinin RHK' nin tüm alt gruplarında proliferasyonun temel itici güçleri olduğunu düşündürmektedir. Glikoliz, TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyon yollarının spesifik adımlarının düzensizliği ile sonuçlanan mutasyonların tümü RHK alt tiplerinde bulunmuştur ve tümörigeneze katkıda bulunabilecek metabolik değişikliklerin çeşitliliğini

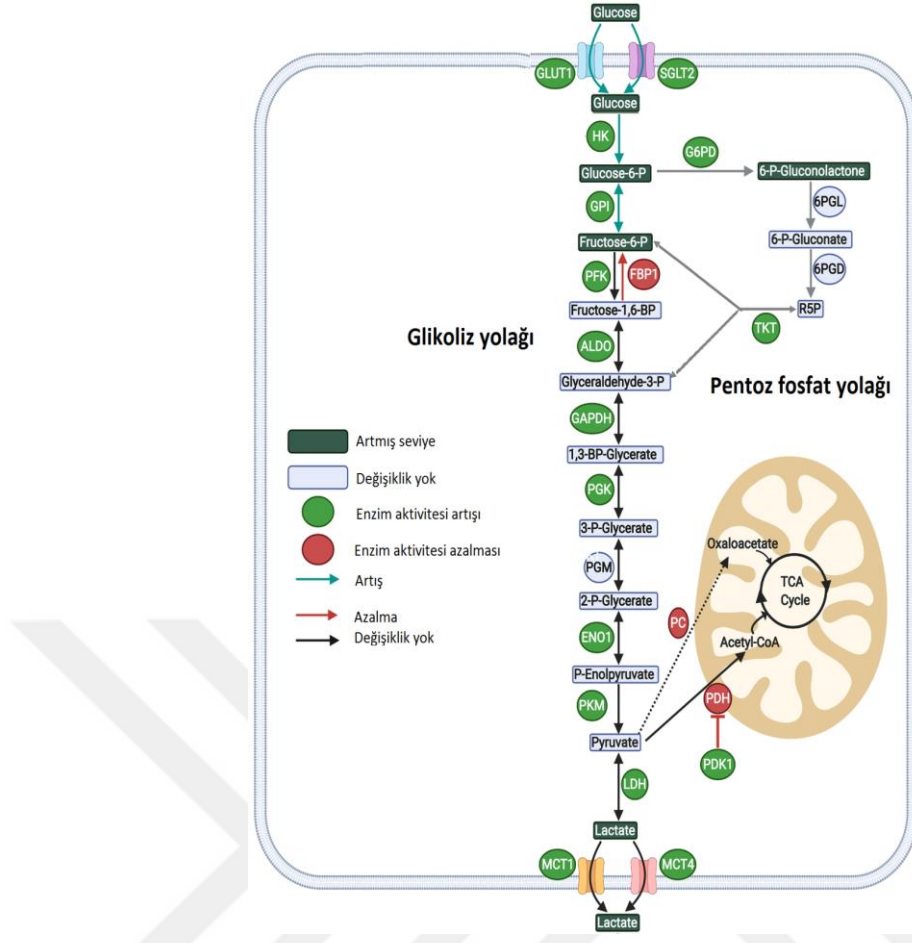
göstermektedir (Weyandt JD vd., 2017; Chakraborty S vd., 2021). RHK hücrelerinin değişen biyosentetik, biyoenerjetik ve redoks gereksinimlerine dayanmak için besin alımı ve metabolizmasında yer alan yolları yeniden programlayabilme özelliği tümör baskılayıcı genlerin kaybı ve onkogenlerin aktivasyonu ile desteklenen metabolik yeniden programlama olarak adlandırılır (Chakraborty S vd., 2021). Böbrek kanserindeki metabolik yeniden programlamanın büyük bir kısmı VHL geninin inaktivasyonu ve Ras-PI3K-AKT-mTOR yolağının aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) ve Myc, RHK' nin metabolik yeniden programlanmasındaki diğer önemli oyunculardır. Tüm RHK türleri glukoz ve yağ asidi metabolizmasının ve TCA döngüsünün yeniden programlanması ile ilişkilidir (Chakraborty S vd., 2021). Bu yeniden programlanmalar; glukoz taşınımı ve glikolizde yeniden düzenlenme, pentoz fosfat yolağında değişiklikler, TCA siklüs değişiklikleri, oksidatif fosforilasyonda değişiklikler, glutamin, triptofan ve arjinin metabolizması değişiklikleri ve yağ asit metabolizması değişiklikleri kapsar (Chakraborty S vd., 2021).

Böbrek hücreleri, GLUT 1 ve GLUT 2 gibi pasif glukoz taşıyıcıları olan GLUT ailesinden çok sayıda molekülün ifadesini gerçekleştirir. Ayrıca böbrekler, sodyuma bağımlı glukoz yardımcı taşıyıcısı (SGLT) ailesinden çok sayıda ATP' ye bağımlı aktif glukoz taşıyıcıya da sahiptir (Kuang H vd., 2017; Chowdhury B vd., 2016). RHK' de bu glukoz taşıyıcılarının ifadelerinde çeşitli değişiklikler ortaya çıkmakta ve bu moleküllerin değişmiş ifadesi muhtemelen bu kanserin başlıca fenotipik özelliklerinden biridir. Bir tümör baskılayıcı olan PBRM 1, BHRHK' de en sık mutasyona uğrayan ikinci gendir ve Chowdhury ve ark. (Chowdhury B vd., 2016). RHK hücrelerinde PBRM 1' in yeniden ifadesinin glukoz alımında azalmaya yol açtığını göstermişlerdir. Böbrek kanseri hücrelerinde glikoliz ile ilgili tüm enzimlerin hücresel ifadesinde artış olduğu kanıtlanmıştır (Hakimi AA vd., 2016; Wettersten HI vd., 2015). Alternatif olarak, tümör baskılayıcı olduğu bilinen hız sınırlayıcı glukoneojenetik enzim fruktoz-1-bisfosfatazin (FBP 1) ifadesi RHK' de yok denecek kadar az olduğu da bildirilmiştir (Moore LE vd., 2012). Benzer şekilde, RHK hücrelerinde laktat oluşumu ve laktat dehidrojenaz A (LDHA) ifadesi artarken, pirüvatı etanole dönüştüren aldo-keto redüktaz ailesi 1 üyesi A1 (AKR1A 1) enzimi azalır (Liang K ve Dai JY, 2022). Monocarboxylate transporter 1 ve 4 (MCT 1 ve MCT 4) gibi laktat taşıyıcılarını kodlayan genlerin ifadelerinde agresif böbrek

tümörlerinde sıklıkla artış olduğu da gösterilmiştir (Kim Y vd., 2015; Fisel P vd., 2013).

Pentoz fosfat yolunun hem oksidatif hem de oksidatif olmayan fazları böbrek kanserinde artmaktadır. İlginç bir şekilde, pentoz fosfat yolunun yukarı yönlü regülasyonu agresif BHRHK ve kötü hasta prognozu ile ilişkilendirmiştir. Bu yolakda hız sınırlayıcı enzimi olan G6PD ifadesi, redoks durumundan bağımsız olarak normal böbrek hücrelerine kıyasla RHK hücrelerinde önemli ölçüde yükselir ve kötü prognoz ile korelasyon gösterir (Langbein S vd., 2008; Zhang Q vd., 2017). Bunlara ek olarak, RHK hücrelerinde diğer birçok enzim aktivitesinde değişiklikleri olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.6) (Chakraborty S vd., 2021).





Şekil 2.6. Böbrek kanserinde glukoz taşıyımı ve glukoz metabolizmasının yeniden programlanması (Chakraborty S vd., 2021). ALDO, aldolaz; ENO, enolaz; FBP 1, fruktoz-1-bisofataz; Fruktoz-1,6-BP, fruktoz 1,6-bisfosfat; Fruktoz-6-P, fruktoz 6-fosfat; Gliseralehit-3-P, gliseralehit-3-fosfat; GAPDH, gliseralehit-3-fosfat dehidrojenaz; GPI, glukoz-6-fosfat izomeraz; Gliseralehit-3-P, gliseralehit 3-fosfat; HK, heksokinaz; LDH, laktat dehidrojenaz; PC, piruvat karboksilaz; PDH, piruvat dehidrojenaz; PDK 1, piruvat dehidrojenaz kinaz; P-Enolpiruvat, fosfoenolpiruvat; PFK, fosfofruktokinaz; PGK, fosfogliserat kinaz; PGM, fosfogliserat mutaz; R5P, riboz-5-fosfat; TKT, transketolaz; TPI, triozefosfat izomeraz; 1,3-BP-Gliserat, 1,3-bisfosfo-D-gliserat; GLUT 1, glukoz taşıyıcı-1; 2-P-Gliserat, 2-fosfogliserat; 3-P-Gliserat, 3-fosfogliserat; 6-P-Glukonolakton, 6-fosfoglukono-d-lakton; 6-P-Glukonat, 6-fosfoglukonat; 6PGD, 6-fosfoglukonat dehidrojenaz; G6PD; glukoz- 6-fosfat dehidrojenaz; MCT 1, Monokarboksilat taşıyıcı 1; MCT 4, Monokarboksilat taşıyıcı 4; SGLT 2, sodyum-glukoz kotransporter 2.

RHK' de, diğer metabolik yolların TCA döngüsü ile birleşen kısmında görev alan enzimler genellikle aşağı yönde regüle edilir (Şekil 2.7). Bu yollar glikoliz, lipid metabolizması ve glutamin metabolizmasını içerir. Bu enzimler, TCA döngüsüne ya doğrudan ya da biyokimyasal dönüşüm yoluyla girebilen bir son ürüne yönelik bir reaksiyonu katalize eder. Piruvat dehidrojenaz (PDH) piruvatın asetil-CoA' ya

dönüşümünü katalize eder ve bu da anti-TCA döngüsü enzimi piruvat dehidrojenaz kinaz (PDK 1) tarafından inhibe edilir. Piruvat karboksilaz (PC), asetil-CoA' yı TCA döngüsünün ilk stabil ara ürünü olan oksaloasetata dönüştürür. g-aminobütirik asit transaminaz, glutamin metabolizmasının bir yan ürünü olan nörotransmitter GABA' nın başka bir TCA döngüsü ara ürünü olan süksinata dönüşümünü katalize eder. Dihidrolipoamid asetiltransferaz, α -ketoglutaratın geri dönüşümünü düzenleyen α -ketoglutarat dehidrojenaz kompleksinin bir bileşenidir. Deneyisel çalışmalar, proteomik, metabolomik ve transkriptomik bulgularla desteklendiği üzere, bu enzimlerin ve şekil 2.7' de gösterilen diğer bazı ilişkili enzimlerin normal böbrek hücrelerine kıyasla RHK hücrelerinde aşağı regüle edildiğini ortaya koymuştur (Chakraborty S vd., 2021).

RHK' de yeniden düzenlenmiş bir TCA döngüsünün yanı sıra, kanser hücreleri azalmış oksidatif fosforilasyon aktivitesi de gösterir (Simonnet H vd., 2022). Simonnet ve ark. (Simonnet H vd., 2022) RHK' li doku örneklerinde oksidatif fosforilasyon aktivitesini değerlendirdikleri çalışmalarında mitokondriyal metabolizma ve oksidatif fosforilasyondaki bozulmanın agresif seyreden RHK doku örneklerinde oldukça arttığını göstermişlerdir. Bu durum, yazarlar tarafından, oksidatif fosforilasyon komplekslerinin önemli ölçüde azalmış ifadesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, söz konusu çalışmalarında tüm RHK örneklerinde oksidatif fosforilasyon komplekslerinden kompleks-V' in aşağı yönde regüle olduğunu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada ise, peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör- α (PPAR α), koaktivatörleri (PGC) transkripsiyonel koaktivatör ailesinin en önemli üyesi olan PGC-1 α ' nın, BHRHK hücrelerinde baskılandığı gösterilmiştir (LaGory EL vd., 2015). PGC-1 α ' nın baskılanması mitokondriyal transkripsiyon faktörü (TFAM) ifadesinin azalmasına ve mitokondriyal solunumun gecikmesine yol açtığı ve BHRHK hücrelerindeki düşük PGC-1 α ifadesini kötü hasta sonucu, hastalık ilerlemesi ve metastaz ile ilişkili olduğu da rapor edilmiştir (LaGory EL vd., 2015). PGC-1 α ' nın baskılanmasının böbrek kanserinin büyümesi için önemi Felipe-Abrio ve ark. (Felipe-Abrio B, Verdugo-Sivianes EM ve Carnero A, 2019) tarafından da gösterilmiştir. Yazarlar, böbrek kanseri hücrelerinde MYB-bağlayıcı protein 1A (MYBBP1A) aşağı regülasyonunun PGC-1 α ' yı aktive ederek glikolitik metabolizmayı oksidatif fosforilasyona çevirdiğini göstermişlerdir.

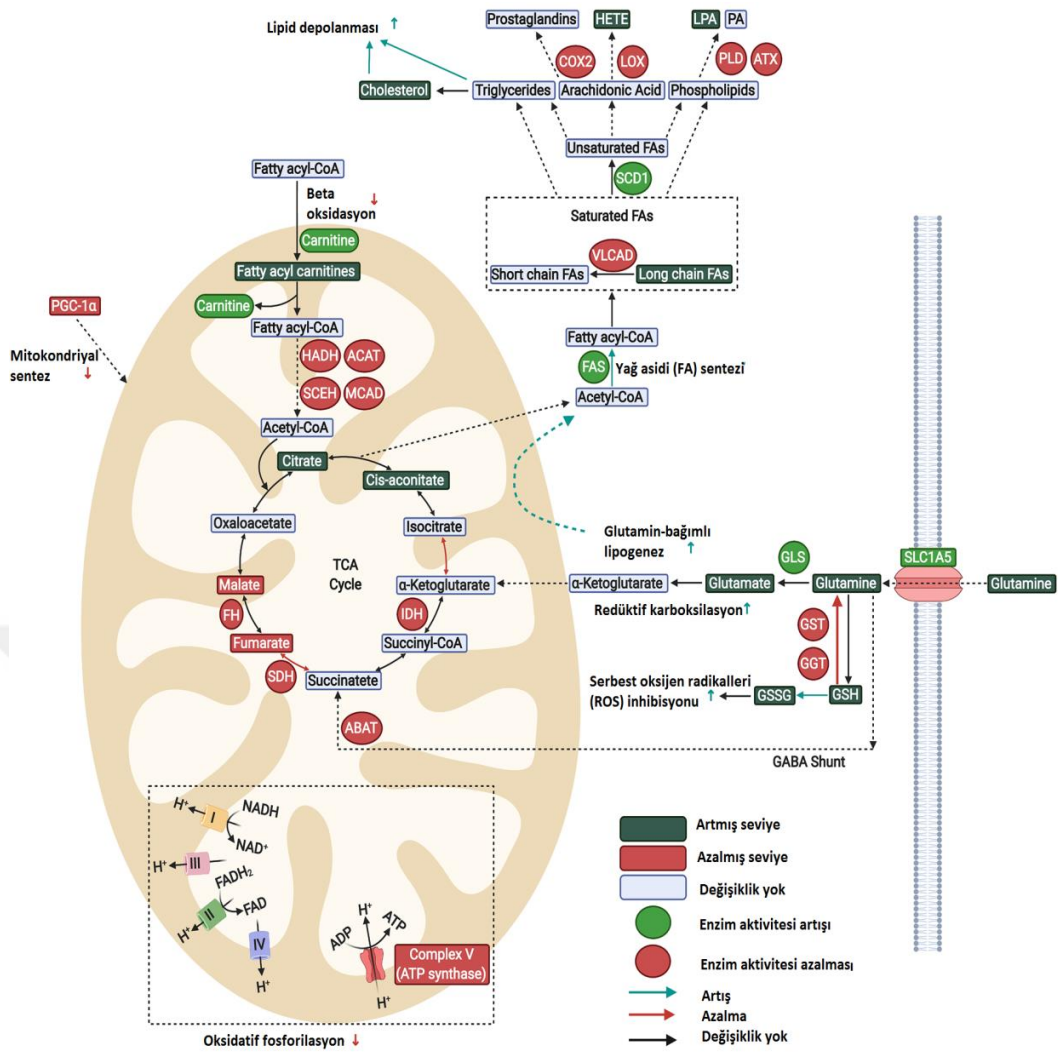
Böbrek korteksinde idrar oluşumu sırasında idrar pH dengesinin korunmasında rol alan glutamin' in de RHK' de metabolizmasında değişiklikler izlenir (Chakraborty S vd., 2021). BHRHK' de normal böbrek dokularına kıyasla glutamin kullanımı önemli ölçüde artar, ve artmış glutamin seviyesinin RHK' de serbest yağ asitleri metabolizması ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Mullen AR vd., 2011). Ayrıca, glutaminin redüktif karboksilasyonunun hızla büyüyen böbrek karsinom hücrelerinde baskın metabolizma modlarından biri olduğu da gösterilmiştir (Mullen AR vd., 2011). Yine literatürde, yüksek dereceli, yüksek evreli ve metastatik BHRHK' nin artmış glutamin seviyesi ve glutatyon/oksitlenmiş glutatyon yolları ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Chakraborty S vd., 2021).

RHK' de, triptofan aminoasidinin önemli bir metabolik yolağı olan kinürenin yolağı metabolitlerinde artış ve triptofan seviyesinde ise azalma olduğu gösterilmiştir. birlikte artar (Wettersten HI vd., 2015). Kinürenin yolağı, diyetle alınan triptofanın büyük bir kısmının metabolizmasında sorumludur ve indolamin2,3-dioksijenaz (IDO) bu yolağın hız sınırlayıcı enzimidir (Chakraborty S vd., 2021). IDO ifadesi, normal dokulara kıyasla renal tümör endotel hücrelerinde artmıştır. Buna karşılık, serotonin ve indoleasetat yolları gibi diğer triptofan katabolizma yollarıyla ilişkili enzimler aşağı regüle edilir. Örneğin, DOPA dekarboksilaz (DDC), monoamin oksidaz (MAO) ve aldehit dehidrojenaz 2 (ALDH 2), RHK hücrelerinde Kinürenin yolağı aktivasyonunu gösterecek şekilde azalmıştır (Riesenberg R vd., 2007; Trott JF vd., 2006). Bu bulgular RHK' de triptofan tüketiminin arttığını ve bunun da RHK hücrelerinde triptofan metabolizmasının değişiklik gösterdiğini göstermektedir. Kinürenin ve kinolinatin kanser hücrelerinde immünosupresif etkiler gösterdiği daha önceden bilindiğinden, triptofan metabolizmasındaki bu değişikliklerin RHK hücrelerinde immünosupresyona katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Chakraborty S vd., 2021).

Benzer şekilde, RHK' de arginin metabolizması da etkilenmiştir. Arginin sentezi için hız sınırlayıcı enzim olan ASS 1, BHRHK hastalarının biyopsi örneklerinde önemli ölçüde düşük seviyelerde gösterilmiştir ve dolayısıyla bu kanser hücreleri büyüme için dış arginin kaynağına bağımlılık gösterir (Yoon CY vd., 2007). Bu durum, yapılan bir proteomik çalışmayla doğrulanmış, BHRHK' de farklı tümör derecelerinde benzer şekilde ASS 1 enziminde baskılanma gösterilmiştir (Perroud B vd., 2009).

RHK' de en önemli metabolik değişiklikler esasen lipid metabolizmasında izlenmektedir. Nitekim RHK sıklıkla obezite ile ilişkili olduğu günümüzde oldukça iyi bilinmektedir. BHRHK hastalarının böbreklerinde daha yüksek düzeyde kolesterol ester birikimi bildirilmiştir. Metabolomik çalışmalarla kontrol hücrelerine kıyasla BHRHK dokularında yağ açilkarnitinleri ve karnitin seviyelerinde artış gözlenmiştir (Chakraborty S vd., 2021). Tüm bu bulgular, RHK' de yağ asit metabolizması değişikliklerinin olduğuna delalet eder (Chakraborty S vd., 2021). RHK' de lipid metabolizması ve yağ asit metabolizmasındaki değişiklikler, lipid ve yağ asit metabolizması hakkında genel bilgiler verildikten sonra ayrı bir başlık altında aşağıdaki bölümde irdelenmiştir.

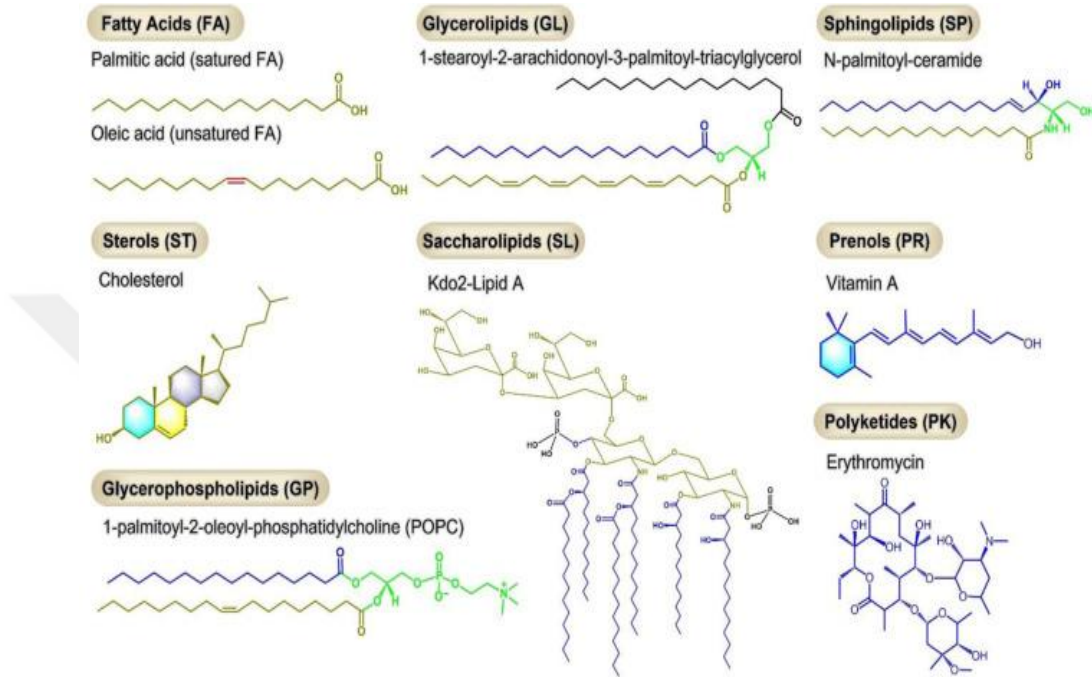




Şekil 2.7. Böbrek kanserinde TCA döngüsü, yağ asidi ve glutamin metabolizmasının yeniden programlanması (Chakraborty S vd., 2021). ABAT, 4-aminobütirat aminotransferaz; ACAT, asetil-CoA asetiltransferaz; COX-2, siklooksijenaz-2; CPT 1, karnitin palmitoiltransferaz 1; FASN, yağ asidi sentaz; FH, fumaraz; GABA, g-aminobütirik asit; GLS, glutaminaz; GGT, γ-glutamil transpeptidaz; GST, glutatyon-S-transferaz; HADH, hidroksiasil-CoA dehidrojenaz; HETE, hidroksiyeikosatetraenoik asit; IDH, izositrat dehidrojenaz; LOX-2, lipoksijenaz-2; LPA, lizofosfatidik asit; MCAD, orta zincire özgü açıl-CoA dehidrojenaz; PA, fosfatidik asit; ROS, reaktif oksijen türleri; SCD 1, stearoil-CoA desatüraz-1; SCEH, kısa zincirli enoil-CoA hidrataz; SDH, süksinat dehidrojenaz. VLCAD, çok uzun zincirli spesifik asil-CoA dehidrojenaz.

2.3 LİPİD VE YAĞ ASİT METABOLİZMASI

Lipidler, sekiz türe ayrılabilen hidrofobik veya amfifilik küçük moleküller sınıfıdır: 1) yağ asitleri, 2) gliserolipidler, 3) sfingolipidler, 4) steroller, 5) sakkarolipidler, 6) prenoller, 7) gliserofosfolipidler, 8) poliketidler (Liang K ve Dai JY, 2022).



Şekil 2.8. Temsili molekül örnekleriyle sekiz lipid türü (Liang K ve Dai JY, 2022).

Farklı lipidler, vücutta yapısal bileşenler, enerji depolanması, hücreler arası iletişim ve sinyalizasyon, enerji metabolizması ve hormonal aktivite gibi vücutta çeşitli hayati roller oynayan metabolik işlevlerde rol üstlenirler. Lipidler suda çözünmeyen ve organik çözücülerde çözünebilen organik bileşiklerdir. Yağ asitlerinin esterleridir, nadiren alkol veya fosfat fonksiyonel grup molekülleri içerirler ve trigliseritler, fosfolipitler ve steroidlerden oluşurlar (Liang K ve Dai JY, 2022). Farklı enzimlerin ve biyolojik maddelerin katılımı ile çeşitli biyokimyasal dönüşümler sonucunda karmaşık yapılara sahip olabilen lipidler organik çözücülerde polar olmayan çözünürlüğe sahip hidrokarbon grupları içerir. Değişken zincir uzunluklarına bağlı olarak önemli yapısal çeşitliliğe sahiptirler ve şeker kalıntıları ve diğer fonksiyonel gruplarla birlikte bir dizi oksidatif ve indirgeyici reaksiyonlara, yapısal görevlere ve diğer bileşiklerle kimyasal bağlar oluşturma kabiliyetine sahiptirler. Bazı lipid moleküllerindeki yapı bileşenlerinin asetil, propenil ve izopren fonksiyonel grupları

aynı zamanda hormon görevi de görür. Çoklu doymamış yağ asitleri hücreler arası sinyal iletişimi işlevi görür ve membran yapısından sorumludur (Natesan V ve Kim SJ, 2021; Fahy E, vd., 2011; Bazinet RP ve Layé S, 2019).

2.3.1 Ana Hatları ile Yağ Asidi Metabolizmasına Genel Bakış

Lipidlerin temel yapı taşı olan yağ asitlerinin metabolizması, yağ asitlerinin hem katabolizmasını hem de anabolizmasını içerir. Yağ asitlerinin katabolizması, yağ asidi oksidasyonunu (β -oksidasyon) ve ardından üretilen asetil-CoA' nın TCA döngüsüne geçişini içerir. Anabolizma veya yağ asidi sentezi, en basit tanım ile iki enzim sisteminin aktivitesi ile asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve yağ asidi sentaz (FASN) asetil-CoA ve NADPH' den yağ asitlerinin üretilmesinden oluşur (Chakraborty S vd., 2021; Tracey TJ vd., 2018; Ohlrogge JB ve Jaworski JG, 1997). İnsan vücudunda, yağ asitleri, karbon zincirinde bulunan çift bağ miktarına göre üç ana gruba ayrılır: doymuş yağ asitleri (SAFA), tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA). SAFA tamamen hidrojenlenmiş olup sıfır çift bağ içerir. Hücrel membran yapılarında bulunan fosfolipidler ve sfingolipidlerin yanı sıra gliserolipidlerin birincil bileşenidirler. SAFA aynı zamanda post-translasyonel modifiye ediciler olarak hareket edebilir, böylece hücrel sinyal proteinlerinin aktivitesini ve yerini belirleyebilir. MUFA, en yaygın olarak alfa karbonundan itibaren 9. ve 10. karbonlar arasında ve bazen de 7. ve 8. karbonlar arasında bulunan tek bir çift bağ içerir. MUFA ayrıca hücrel membran yapılarının ve gliserolipidlerin birincil bileşenleridir. PUFA' nın karbon zincirinde birden fazla ve altıya kadar çift bağ bulunur. PUFA, membran yapılarının fosfolipidlerinde bulunur ve ayrıca çeşitli lipid sinyal moleküllerinin öncüleri olarak da işlev görebilir. PUFA insan vücudunda de novo olarak sentezlenemediğinden diyetle alınması gereken esansiyel yağ asitleri olarak kabul edilir (Suburu J vd., 2013). Esasen vücutta yağ asidi sentezinin başlıca biyolojik işlevi, karbondhidrat türevi karbon öncüllerinden elde edilen enerjiyi kompakt yağ asitleri olarak depolamaktır. Bu süreç hücrelerin sitozolünde gerçekleşir ve ATP sitrat liyaz (ACLY) tarafından asetil-CoA üretimiyle başlayan bir dizi enzim tarafından gerçekleştirilir. Asetil-CoA daha sonra yağ asidi sentez yolunun hız sınırlayıcı enzimi olan ACC 1 tarafından metabolize edilerek sınırlayıcı reaktif olan malonil-CoA üretilir. Çok işlevli enzim olan FASN daha sonra bir dizi biyokimyasal reaksiyon yoluyla büyüyen açıl zincirine sırayla malonil-CoA ekleyerek doymuş yağ asitleri üretir (Kuhajda FP vd., 1994; Jayakumar A vd., 1995).

Yağ asidi sentezinin hızla çoğalan dokuların gelişimi ve hayatta kalması için kritik olduğu düşünülmektedir. Gerçekten de FASN, membran biyogenezini kolaylaştırmak ve lipid peroksidasyonu ile reaktif oksijen türlerinin neden olduğu apoptotik hücre ölümünü önlemek için de novo yağ asitlerini kullanan çoğu kanserin çoğalması ve hayatta kalması için de kritik öneme sahiptir (Chirala SS vd., 2003; Menendez JA ve Lupu R, 2007; Rysman E vd., 2010).

Lipid metabolizmasındaki en önemli iki basamak yağ asitlerinin eksojen temini ve de novo sentezidir. Eksojen yağ asit alımı açısından, plazma membranı boyunca etkin hareketi kolaylaştırmak için özelleşmiş taşıyıcılar gereklidir. Bunların en iyi karakterize edilenleri arasında yağ asidi translokaz (FAT) olarak da bilinen CD36, solüt taşıyıcı protein ailesi 27 (SLC27) olarak da bilinen yağ asidi taşıma protein ailesi (FATPs) ve plazma membranı yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABPpm) yer almaktadır (Koundouros N ve Poulogiannis G, 2020).

De novo lipogenez, glukoz gibi karbonhidratlardan ve glutamin dahil amino asitlerden türetilen karbon atomlarının yağ asitlerine dönüştürüldüğü süreçtir. Yağ asidi sentezi için ana substrat sitoplazmik asetil-CoA' dır ve sitrat ya da asetattan elde edilebilir (Koundouros N ve Poulogiannis G, 2020). Glukoz ya da glutaminden elde edilen karbonlar, sırasıyla TCA döngüsünde piruvatın oksidasyonu ya da indirgeyici karboksilasyon yoluyla sitrat üretimine katkıda bulunur. Sitrat, karboksilasyon enzimleri ACC' ler için substrat olan ACLY tarafından asetil-CoA' ya dönüştürülür. Asetil-CoA karboksilaz tarafından katalizlenen asetil-CoA' nın malonil-CoA' ya geri dönüşümsüz karboksilasyonu de novo lipogenezin hız sınırlayıcı adımıdır. Bunun akabinde yedi malonil-CoA molekülü ile bir asetil-CoA molekülünün FASN tarafından katalize edilen birleşimiyle doymuş 16 karbonlu palmitat üretimi sağlanır. Palmitat de novo lipogenezin ana ürünüdür. Daha kompleks yağ asitleri ve dolayısıyla yapısal ve fonksiyonel bileşenler için gereken kompleks lipid moleküllerinin sentezlenmesi ise palmitat' ın çeşitli metabolik reaksiyonlarıyla gerçekleştirilir. Stearat ve oleat dahil olmak üzere diğer yağ asidi türevlerini üretmek için stearoil-CoA desatüراز (SCD), yağ asidi elongazlar (ELOVL' ler) ve yağ asidi desatüرازlar (FADs)' ın aktivitesi ile palmitat zinciri uzatılabilir veya desatüre edilebilir (Collins JM vd., 2010). Örneğin, palmitatın SCD tarafından daha sonra desatürasyonu ile tekli doymamış yağ asitleri üretirken, ELOVL 6 gibi yağ asidi elongazlar tarafından ek reaksiyonlarla palmitata iki karbon

grubu eklenmesiyle doymuş yağ asidi olan stearik asit sentezlenir (Koundouros N ve Poulogiannis G, 2020). Bu yağ asitleri de daha sonra daha karmaşık lipidlerin üretimi için kullanılabilir. De novo lipogenezin düzenlenmesi üç ana transkripsiyon faktörü bulunan sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinlerin (SREBP' ler) aktivasyonu yoluyla büyük ölçüde transkripsiyonel düzeyde gerçekleşir. Bu üç faktör SREBP 1a ve SREBP 1c (SREBP 1' in alternatif splicing' inden kaynaklanırlar) ve SREBP 2 geni tarafından kodlanan SREBP 2' dir (Eberle D vd., 2004). SREBP' ler, kolesterol ve yağ asidi biyosentezinde yer alan enzimleri düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Yeterli hücre içi lipid seviyeleri olduğunda, bu proteinler inaktiftir ve SREBP bölünme aktive edici proteine (SCAP) bağlı olarak endoplazmik retikulumda tutulurlar. Endoplazmik retikulumdaki yetersiz lipid seviyeleri SREBP' leri aktive eder. Aktivasyon sonrası SREBP hedef genlerinin promotör bölgelerine bağlanır ve gen ifadesini başlatırlar. SREBP 1 esas olarak FASN, ACLY ve ACC gibi sterol düzenleyici elementler (SRE' ler) içeren genlerin transkripsiyonlarını kontrol ederek yağ asidi ve trigliserid sentezini düzenlerken, SREBP 2 seçici olarak HMG-CoA redüktaz dahil olmak üzere kolesterol biyosentezinde yer alan enzimlerin ifadesini indükler (Heravi G vd., 2022; Koundouros N ve Poulogiannis G, 2020).

2.3.2 Yağ Asidi Metabolizmasının Düzenlenmesi

Transkripsiyon faktörleri ailesi olan SREBP' ler lipid metabolizmasındaki endojen kolesterol, yağ asidi, triasilgliserol ve fosfolipid sentezi gibi kritik süreçleri yöneten ana moleküllerdir. Üç SREBP izoformu, SREBP 1a, SREBP 1c ve SREBP 2, lipid metabolizmasında farklı rollere sahiptir. SREBP' ler kolesterol, yağ asitleri, trigliseritler ve fosfolipitlerin sentezi ve alımında rol oynayan FASN, ACLY, ACC ve HMG-CoA redüktaz gibi 30' dan fazla genin yanı sıra bu molekülleri sentezlemek için gereken NADPH kofaktörünün ifadesini doğrudan aktive eder. Bu nedenle, SREBP' ler kolesterogenez ve lipogenezin en temel ana düzenleyicileri olarak kabul edilir (Eberle D vd., 2004; Fernández-Hernando C vd., 2011).

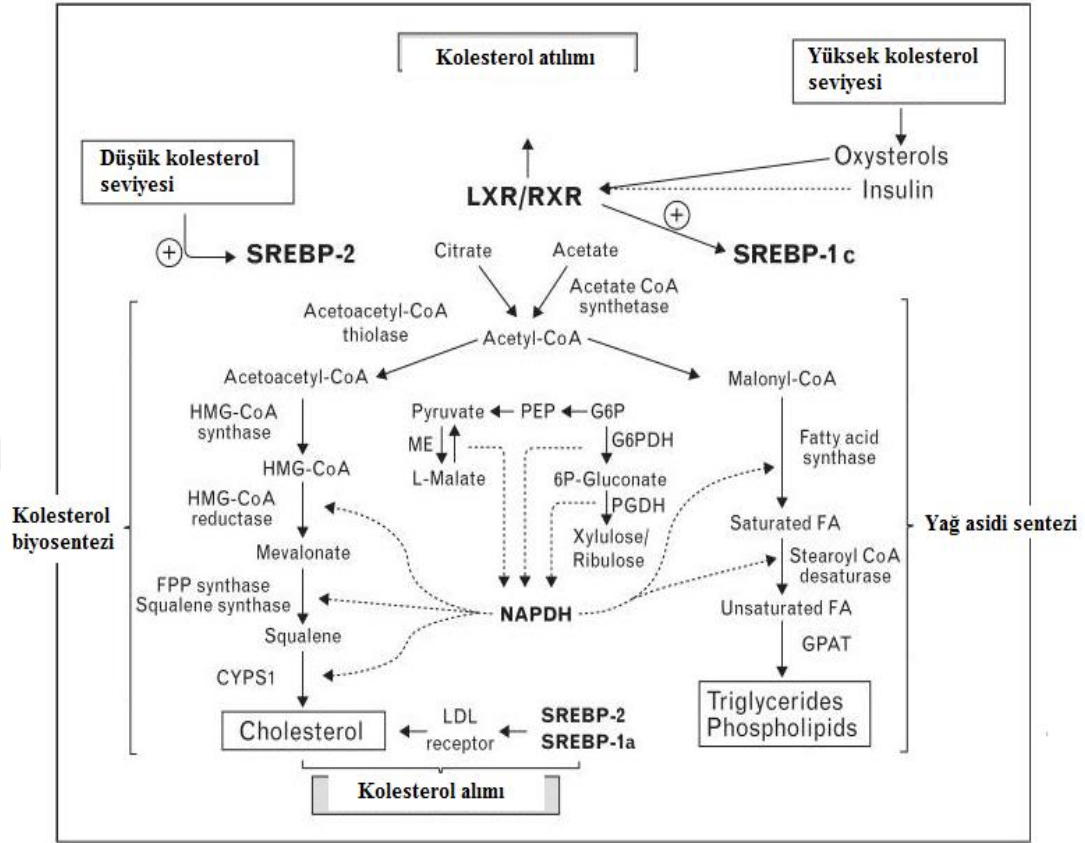
PPAR α , yağ asitlerinin oksidasyonunu ve taşınmasını düzenleyen nükleer hormon reseptörlerinin süper ailesine ait ligandla aktive olan transkripsiyon faktörleridir (Rakhshandehroo M vd., 2010). Yağ asitlerinin taşınmasında görev alan SLC27A1, SLC27A2 ve SLC27A4 proteinlerinin karaciğerde PPAR α tarafından yukarı yönde regüle edilmektedir. PPAR α ' nın doğal ligandları arasında çeşitli yağ asitlerinin yanı

sıra açıl-CoA ve çok sayıda yağ asidi türev de bulunur. PPAR α ve yağ asidi katabolizması arasındaki ilk bağlantı, peroksizomal uzun zincirli yağ asidi oksidasyonunda hız sınırlayıcı enzimi kodlayan Açıl-CoA oksidaz (ACOX) geninin doğrudan PPAR α hedef geni olarak tanımlanmasıyla kurulmuştur. Ayrıca, peroksizomal yağ asidi taşınımında yağ asidinin açıl-CoA' ya dönüşümünde ve açıl-CoA' ların tekrar yağ asidlerine dönüşümünde yer alan birçok enzimin gen ifadeleri de PPAR α tarafından düzenlenebilmektedir (Rakhshandehroo M vd., 2010).

ACC' ler, malonil-CoA üretmek için asetil-CoA' nın karboksilasyonunu katalize eden enzimlerdir. Memelilerde ACC 1 ve ACC 2, olarak isimlendirilen iki üyesi bulunmaktadır. Sitozolde lokalize olan ACC 1 de novo yağ asidi sentezi yolunda ilk ve hız sınırlayıcı enzim olarak görev yapar. ACC 2 mitokondrinin dış membranında lokalize olur ve yağ asidinin β -oksidasyonunda yer alan karnitin palmitoiltransferaz 1' in (CPT 1) aktivitesini düzenlemek için malonil-CoA üretir. ACC' lerin hücrelerdeki faaliyetleri, hücrelerin metabolik durumuyla sıkı bir şekilde ilişkili olan transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel olarak düzenlenebilir. Genel olarak, ACC' lerin protein seviyesi ve enzimatik aktiviteleri, besin ve enerjinin bol olduğu koşullarda yağ asidleri şeklinde enerji kaynakları depolanması amaçlanarak artarken besin ve enerji eksikliği koşullarında baskılanır (Wang Y vd., 2022). AMPK, hücrelerin besin ve enerji durumunu algılayan ve ACC 1' in önemli bir düzenleyicisi olan en çok çalışılmış enerji sensörüdür. Hücreler glukoz yoksunluğu veya hipoksi gibi metabolik streslere maruz kaldığında, ACC 1 enzimatik aktivitesini bloke eden AMPK aktive olur (Wang Y vd., 2022; Steinberg GR ve Kemp BE, 2009). Böylece hücre içi yağ asidi sentezinde azalma ortaya çıkar, bu yağ asidi sentezindeki azalmaya AMPK aracılı SREBP 1 inhibisyonu da katkı sağlayabilir (Steinberg GR ve Kemp BE, 2009). AMPK aktivasyonu aynı zamanda kolesterolün de novo sentezi için hız sınırlayıcı enzim olan HMG-CoA redüktaz inhibisyonu ile kolesterol sentezini baskılayabilir (Steinberg GR ve Kemp BE, 2009).

SREBP' ye ek olarak, nükleer reseptörler olan karaciğer X reseptörleri (LXR) de lipid metabolizmasının önemli transkripsiyonel düzenleyicileridir. LXR' ler hücreler kolesterol akışında rol oynayan genlerin transkripsiyonunu aktive etmesinin yanı sıra ayrıca SREBP 1 transkripsiyonunu da etkileyerek yağ asidi sentezini artırmak için bu yollar arasında çapraz iletişime aracılık eder. ELOVL 5, FADS 2, SCD 1 VE SCD 2

gibi yağ asidi sentezinde rol oynayan enzimlerin aktivasyonları da doğrudan LXR' ler tarafından düzenlenebilir (Fernández-Hernando C vd., 2011; Qian X vd., 2018).



Şekil 2.9. Lipid metabolizmasında SREBP' lerin rolü (Fernández-Hernando C vd., 2011).

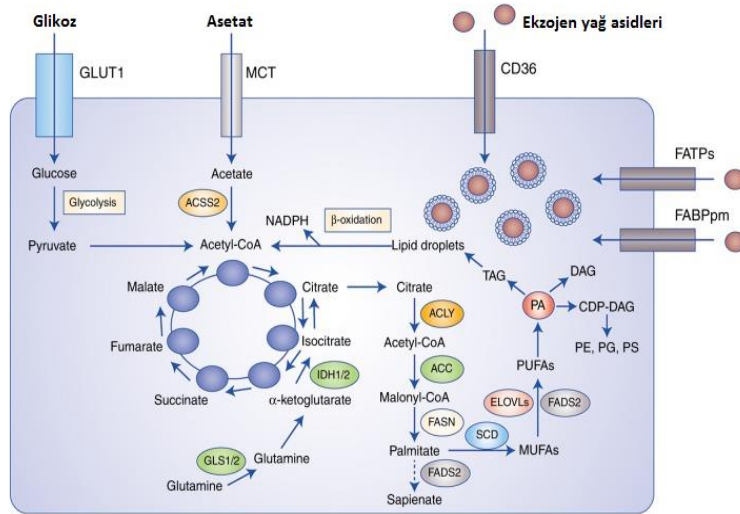
Kolesterolün azaldığı koşullarda SREBP 2 aktive olur ve kolesterol sentezi ve alımına adanmış genlerin yanı sıra bu molekülleri sentezlemek için gereken NADPH kofaktörünün ifadesini artırır. Benzer şekilde, SREBP 1a kolesterol metabolizmasını düzenler ancak ifadesi in vivo olarak nispeten düşüktür. SREBP 1c, karaciğer X reseptörü (LXR) agonistleri (oksisteroller) ve insülin tarafından aktive edilir ve yağ asidi sentezi için gerekli genlerin ifadesini düzenler.

2.3.3 Yağ Asidi Metabolizması ve Kanser

Memeli hücrelerinde, yağ asitleri ya hücre dışından doğrudan eksojen alım yoluyla elde edilebilir ya da glukoz veya glutamin gibi besinler kullanılarak de novo olarak sentezlenebilir. Kanser hücrelerindeki karmaşık metabolik değişikliklerden birinin lipidomik yeniden şekillenme olduğu günümüzde oldukça iyi bilinmektedir ve bu da genel olarak yağ asidi taşınması, de novo lipogenez, hücre içi lipid damlacıkları olarak lipid depolanması ve ATP üretmek için β -oksidasyondaki değişiklikleri kapsamaktadır (Monaco ME, 2017). Kanser hücrelerinde yağ asitlerinin eksojen

alımı kolaylıkla sağlanır. Şüphesiz buna neden olarak, plazma membranında yerleşim göstererek hücre dışı yağ asitlerinin hücre içine taşınımından sorumlu temel taşıyıcılar olan CD 36, SLC 27 olarak da bilinen FATPs ve FABPpm moleküllerinin tümörlerde artmış gen ve protein ifadesi gösterilebilir (Su X ve Abumrad NA, 2009). Yüksek seviyede CD 36 ifadesi beyin, meme, kolon, mide, over, pankreas ve birçok farklı kanser türünde izlenmektedir ve sıklıkla bu tümörlerdeki yüksek CD 36 seviyeleri, hastalarda daha kötü klinik sonuçla önemli ölçüde ilişkilendirilmektedir. Örneğin artmış CD 36 ifade seviyesinin beyin, serviks, kolorektal, mide, pankreas ve prostat kanserlerinde de daha kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Calvo D vd., 1998; Feng WW, Zuppe HT ve Kurokawa M, 2023). Kanser hücrelerinde ekzojen yağ asitlerinin yüksek oranda hücre içine alınımı ile bunlar daha sonra triaçilgliserol ve sterol esterleri olarak lipid damlacıkları şeklinde sitoplazmik olarak depolanır (Petan T, Jarc E ve Jusovic M, 2018). Bu artmış yağ asitleri birikimi yalnızca lipid homeostazını korumak ve lipotoksisiteyi önlemek için değil, aynı zamanda metabolik stres koşulları sırasında kanser hücreleri tarafından değerli bir ATP ve NADPH kaynağı sağlamak için de kullanılır (Olzmann JA ve Carvalho P, 2019). Normal dokuda, de novo lipogenez hepatositler ve adipositlerle sınırlıdır; ancak kanser hücreleri, ekzojen lipid kaynaklarının varlığında bile bu anabolik yolu yeniden etkinleştirebilir (Rohrig F ve Schulze A, 2016; Medes G, Thomas A ve Weinhouse S, 1953). Hipoksi veya lipid tükenmesi gibi metabolik stres koşulları altında, kanser hücreleri asetattan asetil-CoA üretmek için asetil-CoA sentaz 2 (ACS 2) enziminde ifade artışına yönelirler. Buna ilave olarak kanser hücrelerinin çoğunluğu FASN' ı aşırı eksprese eder (Menendez JA ve Lupu R, 2007; Koundouros N ve Poulogiannis G, 2020). Kanser hücrelerinin işlevsel olarak faydalı lipid türleri üretmek için alternatif desatürasyon yolları da kullanabildiği gösterilmiştir. Bu durumda sadece SCD aracılı desatürasyona bağımlı kalmayıp daha kompleks lipidleri farklı yollarla üretebilmektedirler. Gerçekten de, yağ asidi desatüraz 2 (FADS 2)' nin kanser hücre hatlarında ve SCD inhibitörlerine dirençli primer tümörlerde yağ asidi desatürasyonunda baskın bir rol oynadığı gösterilmiştir (Vriens K vd., 2019). SREBP' lerin de kanserde hayatta kalma ve ilerleme için önemli olduğu gösterilmiştir. Li ve ark. (Li N vd., 2017) SREBP' nin bloke edilmesiyle IL-6, TNF α ve IL-1 β gibi tümörü teşvik eden enflamatuvar sitokinlerin aşağı regülasyonu vasıtasıyla hepatosellüler kanser hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde engellediğini göstermişlerdir.

Kanser hücrelerinde yeniden düzenlenen veya yeni ortaya çıkan çeşitli sinyal yolları da kanserli hücrenin yağ asit metabolizmasındaki değişikliklerde rol alabilirler. Örneğin, HER2 amplifiye meme kanserinde PI3K sinyalinin hiperaktivasyonu ve AKT sinyal yolağında artmış fosforilasyon söz konusudur. Bu hiperaktivasyonun HER2-pozitif tümörlerin agresifliklerine katkıda bulunan artmış de novo lipogenezden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Menendez JA, 2015). HER2' nin aşırı ifadesi, kanser hücrelerinde FASN aktivasyonuna bağlı lipojenik bir etki göstererek de novo lipogenezi artırabilir (Koundouros N ve Poulogiannis G, 2020). Son yıllarda birçok çalışma, genel olarak, hiperaktif onkojenik sinyalizasyonun FASN, ACLY ve ACS 2 gibi lipojenik enzimlerin aktivasyonuna neden olabileceğini göstermiştir (Koundouros N ve Poulogiannis G, 2020).



Şekil 2.10. Kanser hücrelerinde yağ asitlerinin de novo lipogenez ve eksojen alım yoluyla elde edilmesi (Koundouros N ve Poulogiannis G, 2020). Kanser hücreleri yağ asitlerini de novo lipogenez ve eksojen alım yoluyla elde eder. Yağ asitlerinin eksojen alımı CD 36, FATPs ve FABPpm gibi özelleşmiş taşıyıcılar tarafından kolaylaştırılır. Yağ asitleri ve ürünleri daha sonra lipid damlacıkları olarak depolanabilir ve β -oksidasyon yoluyla NADPH ve asetil-CoA üretimi için kullanılabilir. De novo lipogenez için kanser hücreleri karbon kaynakları olarak sitrat sentezlemek için glukoz, glutamin ve asetat kullanabilir. GLUT 1, glukoz taşıyıcı 1; MCT, monokarboksilat taşıyıcı; FATP' ler, yağ asidi taşıma proteinleri; FABPpm, yağ asidi bağlayıcı protein; GLS, glutaminaz; IDH 1/2, izositrat dehidrojenaz; ACLY, ATP-sitrat liyaz; ACS 2, asil-CoA sentaz kısa zincirli aile üyesi 2; ACC, asetil-CoA karboksilaz; FASN, yağ asidi sentaz; MUFA' lar, tekli doymamış yağ asitleri; PUFA' lar, çoklu doymamış yağ asitleri; SCD, stearoil-CoA desatüraz-1; FADS 2, yağ asidi desatüraz 2; ELOVL' ler, çok uzun zincirli yağ asidi proteininin uzaması; PA, fosfatidik asit; TAG, triaçilgliserol; DAG, diaçilgliserol; PE, fosfatidiletanolamin; PG, fosfatidilgliserol; PS; fosfatidilserin.

2.3.4 Lipid ve Yağ Asidi Metabolizması Renal Hücreli Karsinom İlişkisi

Renal hücreli karsinom (RHK)' u diğer kanserlerden ayıran en önemli özelliklerden biri metabolik yönünün oldukça belirgin olmasıdır. Günümüzde, RHK genellikle metabolik bir hastalık olarak kabul edilir ve çeşitli metabolik yollarda rol oynayan hedef gen mutasyonları hastalıkta oldukça sık görülür. Kanserlerin tümünde metabolik değişiklikler mevcut olmasa da, hipoksi yolağındaki VHL ve mTOR, PI3K ve AKT yolaklarında yer alan ve metabolizmayı kontrol eden genlerdeki yüksek mutasyon oranı nedeniyle RHK' nın metabolik değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, böbrek kanseri hücrelerinde anormal lipid metabolizmasının meydana geldiği de iyi bilinmektedir (Linehan WM, Srinivasan R ve Schmidt LS, 2010). Bu hücrelerde büyük miktarda lipid birikimi, böbrek kanseri hücrelerinin anormal lipid metabolizması ile ilişkili olduğunun göstergesidir. Literatürde birçok çalışmada RHK hücrelerinde hücre içi kolesterol, kolesterol esterleri ve nötral lipidlerin diğer doku hücrelerine oranla daha yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir (Saito K vd., 2016). Warburg etkisiyle kanser hücrelerinde aerobik glikoliz yoluyla artan miktarda asetil-CoA üretildiği ve kolesterol ve lipid sentezi için bir bileşik olan asetil-CoA' nın nasıl yağ asitlerine ve kolesterole dönüştüğü günümüzde oldukça iyi bilinmektedir. RHK hücresinin metabolik anormallikleri asetil-CoA' dan anormal lipid metabolizmasına kadar gider. Yağ asidi sentezi asetil-CoA' ya bağlıdır ve bu asetil-CoA normal hücrelerde Krebs döngüsünden sağlanır. Ancak BHRHK' deki SCD 1, FASN ve ACC mutasyonları ile (asetil-CoA üretiminde artış ve sitoplazmada lipid damlacıkları şeklinde depolanan yağ asidi sentezi için) çok sayıda anormal yolun ortaya çıkması sağlanmış olur (Qi X vd., 2021).

Yağ asidleri membran sürdürülebilirliğini korumak ve hızlı proliferasyon sırasında enerji kaynakları sağlamak için tümör hücresi büyümesi için gereklidir. Bu nedenle, dolaşımdaki lipid seviyelerinden bağımsız olarak tümör hücrelerinde yağ asidi biyosentezi yukarı doğru düzenlenir. Lipidomik çalışmalar RHK' de yağ asidi kullanımında bir artış olduğunu göstermiştir (Ganti S, 2012; McCauley C vd., 2020). BHRHK' deki anormal lipid metabolizması anormal yağ asidi sentezini kontrol eden genler ve bu gen ürünleri enzimlerin ifadeleri ile ilişkilidir. Bu genlerin en önemlilerinden biri olan SCD 1, lipid sentezinin önemli bir düzenleyicisidir. SCD 1 esas olarak sterol SERBP 1 tarafından düzenlendiği göz önüne alınırsa, SREBP 1' in

de BHRHK ve anormal lipid metabolizması ilişkisinde önemli rol oynadığı kolaylıkla çıkarılabilir (Su X ve Abumrad NA, 2009). SCD 1, hücrelerde doymuş yağ asitlerinin tekli doymamış yağ asitlerine dönüşümünü düzenler ve kanserde lipid metabolizması ile yakından ilişkili olduğuna inanılmaktadır (McCauley C vd., 2020; Igal RA, 2010). SCD 1' in rolüne benzer şekilde, FASN ve ACC' de BHRHK hücrelerinde lipid sentezinde önemli düzenleyici roller oynamaktadır. Bu üç gen BHRHK hücrelerinde normal hücrelere göre daha yüksek mRNA ifadesi sergiler ve hücrelerde lipid sentezini domine eden FASN hastalarda kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Takahashi M vd., 2001; Zhao Z vd., 2019; Guo D vd., 2011). FASN' nin BHRHK' de yukarı yönde regüle olduğu ve bunun RHK hücrelerindeki lipid damlacıklarının varlığı ile önemli ölçüde korele olduğu gösterilmiş olup, ayrıca FASN' nin BHRHK hastalarında kötü sağkalımın bağımsız bir belirleyicisi olduğu da ortaya konmuştur (Yuan Y vd., 2020). Yağ asidi sentezinin ikinci basamağında asetil coA' malonil coA sentezini katalizleyen ACC upregülasyonunun RHK hastalarında kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir ve bir ACC inhibitörü olan TOFA' nın PI3K/Akt/mTOR yolağı inhibisyonuyla in vitro olarak RHK hücrelerinin inhibe gösterilmiştir (Wu X vd., 2014). Yağ asidi biyosentezinin başlangıç molekülü olan asetil-CoA' yı sitrik asitin enzimatik yıkımı ile sağlayan ACLY ve asetik asitten asetil-CoA oluşumunu indükleyen ACS 2 enzimleri de RHK hücrelerinde artmış ifade seviyeleri sergiler (Qi X vd., 2021). Aynı zamanda, ACS 2 böbrek kanserinde metastaz ve kötü prognoz ile de ilişkili bulunmuştur (Qi X vd., 2021). Hücrelerde depolanan kolesterole açıl grupları transferini sağlayarak kolesterol esterlerinin oluşumunu sağlayan Açıl-KoA kolesterol açıltransferaz 1 (ACAT 1) mRNA ve protein ifadelerinin de BHRHK' de azaldığı ve bunun ileri patolojik evre ve kısa sağkalım süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Cui W vd., 2019). Uzun zincirli serbest yağ asitlerinin CoA esterlerine aktivasyonunu katalize ederek aktive edilmiş bu uzun zincirli yağ asitlerinin de novo kompleks lipid biyosentezi de dahil olmak üzere çeşitli anabolik ve katabolik lipid metabolik yollarına katılımına aracılık eden uzun zincirli açıl-CoA sentazlar (ACSL) enzimlerinin de RHK hücrelerindeki lipid metabolizmasında rol oynayabileceği ve hastalığın klinik sonuçlarıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Temiz ve ark. (Temiz MZ vd., 2023), harici doğrulama kohortlarıyla destekledikleri biyoinformatik analiz çalışmalarında, ileri patolojik evreli ve metastatik BHRHK' lerde ACSL 1 mRNA ifadesinin anlamlı derecede

düşük ifade sergilediğini bildirerek, düşük ACSL 1 mRNA ifade düzeylerinin BHRHK olgularında mortalite ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

RHK' de hücre içi yağ asidi sentez yollarındaki değişikliklerin yanı sıra, ekzojen yağ asidi alımını ilgilendiren süreçlerde de çeşitli farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Örneğin, kolesterol taşınmasında ve yağ asidi sentezinde rol oynayan bir dizi anahtar molekülü düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörü olan LXR' nün kanser hücrelerinde proliferasyonu, invazyon, apoptoz ve metastaz üzerine etkisinin olabileceği ve RHK hücrelerinde metastatik özellikleri tetikleyebileceği gösterilmiştir (Han N vd., 2023). Benzer şekilde, Wang ve ark. (Wang Q vd., 2023) LXR ekspresyonunun RHK hücrelerinde yağ asidi ve kolesterol sentezi ile korele olduğunu göstererek, LXR' ın RHK' ye özgü lipid metabolizması değişikliklerindeki rolünü göstermişlerdir. Aynı zamanda, LXR, SCD-1, FASN, SREBP, LDLR ve adenozin trifosfat bağlayıcı kaset taşıyıcı A 1 (ABCA 1) ve benzeri dahil olmak üzere kolesterol ve lipid metabolizmasıyla ilgili birçok geni düzenler (Qi X vd., 2021). Yağ asitlerinin hücre içine taşınmasında rol alan FABP' lerin de RHK hücrelerinde izlenen lipid metabolizması değişikliklerinde rol oynadığı, FABP 5, 6 ve 7 ifadelerinin BHRHK' de artmış ifadesi ve bunun hastalarda kötü genel sağkalım ile ilişkili olduğunun gösterilmesiyle ortaya konmuştur (Heravi G vd., 2022; Qi X vd., 2021). Yağ asitlerinden triaçilgliserol sentezlemek için diaçilgliserolü katalize eden ve lipid sentezinde önemli bir rol oynayan diaçilgliserol asiltransferaz (DGAT)' ı kodlayan iki gen olan DGAT 1 ve DGAT 2' nin lipid birikimiyle ilişkili olduğu ve birçok kanserde pozitif düzenleyici rol oynadığı gösterilmiş olup (Petan T, Jarc E ve Jusovic M, 2018; Qi X vd., 2021; Zhou J vd., 2018). Quan ve ark. (Quan Y vd., 2023), trigliserit sentezinde önemli rol oynayan DGAT 1 ve DGAT 2 ifadelerinin BHRHK dokularında artmış olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, bu çalışmada, ayrıca, sitoplazmik protein olan RNase T2 (RNASET 2)' nin DGAT 1 ve DGAT 2 ifadesini düzenleyebildiğini ve BHRHK hücrelerinde RNASET 2 inhibisyonu ile DGAT 1 ve DGAT 2 sentezinin baskılanarak lipid damlacık oluşumunda azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Zhou ve ark. (Zhou J vd., 2018), güncel bir çalışmada, DGAT 1' in baskılanmasıyla RHK hücrelerinde lipid damlacık oluşumunun ve tümöral hücre proliferasyonunun azaldığını rapor etmişlerdir. Bu bulgular RHK hücrelerinde ifadeleri artan DGAT' ler aracılı lipid damlacıkları birikiminin böbrek kanserinde izlenen özgün değişikliklerden biri

olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. RHK’ de hücre çoğalması glukozun tam olarak kullanılmadığı aerobik glikolizin yanı sıra büyük miktarlarda laktik asit, kolesterol ve yağ asitlerinin oluşumunu gerektirir. Diğer kanserlerle karşılaştırıldığında, lipid metabolizması süreci, esas olarak RHK hücrelerindeki lipid sentezi, alımı ve dönüşümünün çeşitliliği nedeniyle spesifik kalmaktadır. RHK’ de lipid metabolizmasına ilişkin araştırmalar gün geçtikçe artış göstermekte ve yukarıda bahsedilen genlerin yanı sıra, yağ asit metabolizmasında görev alan daha birçok farklı gen ve gen ürünlerinin de RHK’ deki lipid metabolizmasının şekillenmesinde rol oynadığı düşünülmekte ve yeni çalışmalarla bu hipotezler her geçen gün doğrulanmaktadır (Heravi G vd., 2022; Qi X vd., 2021).

Lipid metabolizması basamakları	Mekanizma
Azalmış kolesterol biyosentezi	↓ HMG-CoA Reductase
Artmış kolesterol alımı	↑ VLDL-R ↑ SR-B1
Artmış yağ asidi biyosentezi	↑ ACC ↑ ACLY ↑ FASN ↑ SCD ↑ FADS1
Artmış yağ asidi alımı	↑ FABP-5
Azalmış yağ asidi katabolizması	↓ CPT1A
Azalmış lipoliz	↓ ATGL
Lipid damlacıkları birikimi	HIF-α stabilization ↑ DGAT 1 ↑ DGAT 2

Şekil 2.11. RHK’ de lipid metabolizmasındaki değişikliklerin özeti ve bu süreçte farklı yollarda yer alan proteinler (Weiss RH, 2018; Quan Y vd., 2023).

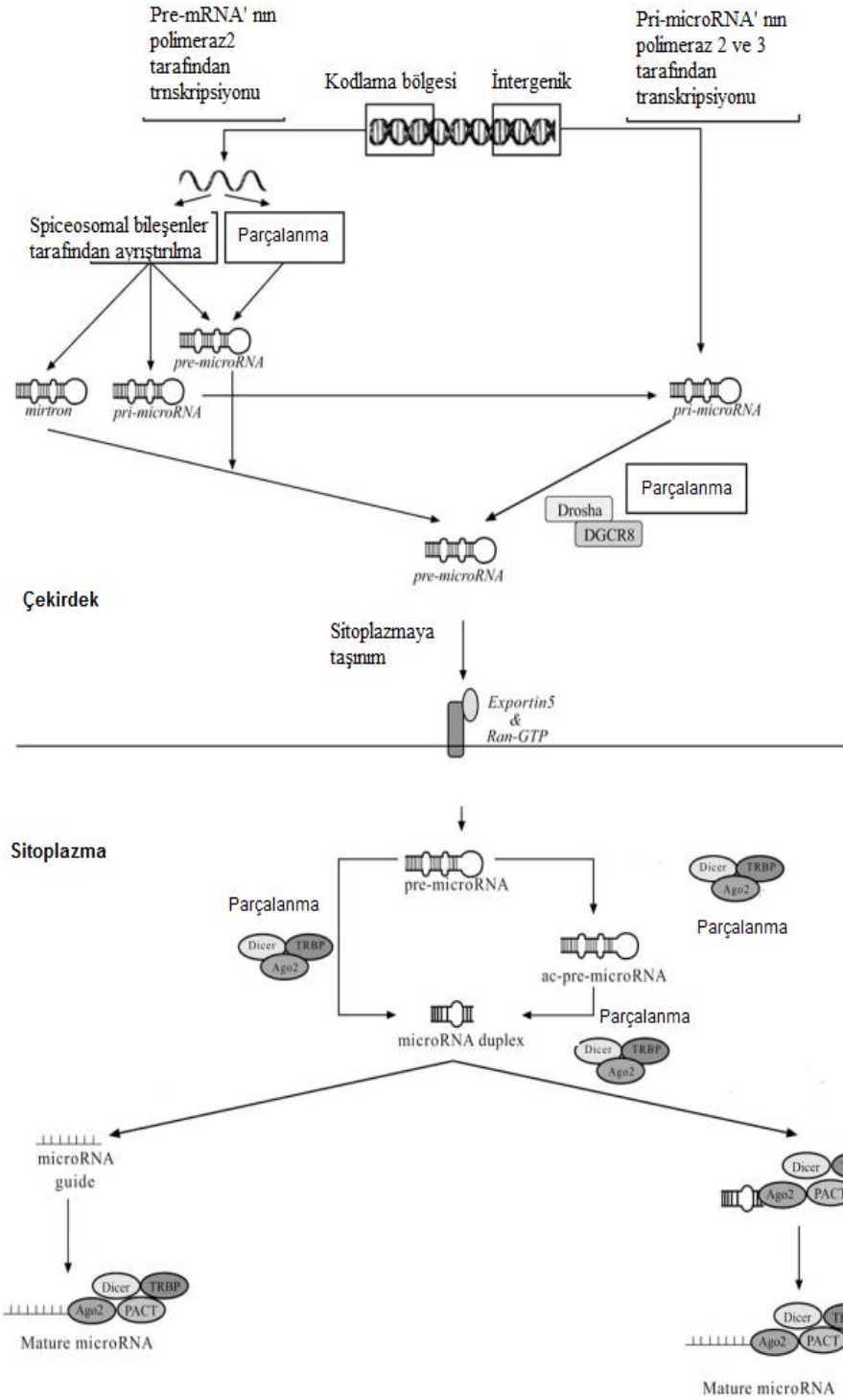
2.4 MikroRNA

MikroRNA' lar (miRNA' lar), çeşitli biyolojik bağlamlarda gen ifadesinin transkripsiyon sonrası baskılayıcıları olarak hareket eden kısa, ortalama 21-23 nükleotid uzunluğunda, evrimsel olarak korunmuş, protein kodlamayan düzenleyici RNA' larıdır (Dexheimer PJ ve Cochella L, 2020; Annese T vd., 2020). İlk mikroRNA olan lin-4' ün 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*' ta keşfedilmesini takiben miRNA' lar tüm hayvan model sistemlerinde tespit edilmiş ve bazılarının türler arasında yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir. Çoğu miRNA, DNA dizilerinden birincil miRNA' lara (pri-miRNA' lar) kopyalanır ve öncül miRNA' lara (pre-miRNA' lar) ve olgun miRNA' lara dönüştürülür. Genellikle, miRNA' lar hedef gen üzerindeki mRNA' ların 3' transkripsiyon yapılmamış-çevrilmemiş bölgesi-(3' UTR' si) ile etkileşime girerek gen ifadesini baskırlar. Ancak, miRNA' ların 5' UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri dahil olmak üzere diğer bölgelerle etkileşimleri de bildirilmiştir. Dahası, miRNA' ların belirli koşullar altında gen ifadesini aktive ettiği de gösterilmiştir (O'Brien J vd., 2018). Literatürde, miRNA' ların hücresel farklılaşma, çoğalma, apoptoz ve gelişim gibi çok sayıda biyolojik süreçlerde kritik düzenleyiciler olduğu ve çeşitli hastalıklar ile ilişkili oldukları gösterilmiştir. Düzensizliklerinin tümör başlangıcı ve ilerlemesinde rol oynayabileceği de rapor edilmiştir. Tümörlerde, farklı hücresel yollara katılan onko-miRNA' lar veya onkösüpresör-miRNA' lar olarak hareket edebilirler (Annese T vd., 2020; Tan W vd., 2018).

2.4.1 İnsanlarda mikroRNA' ların Sentezi

miRNA' ların biyogenezi, diğer çeşitli proteinlerle birlikte miRNA moleküllerini de kodlayan gen kümelerinden veya miRNA genleri olarak adlandırılan spesifik DNA dizilerinden meydana gelir. Alternatif olarak, miRNA' lar protein kodlayan bir genin intronu veya UTR' si içinde de lokalize olabilirler (Annese T vd., 2020). Günümüzde tanımlanmış miRNA' ların birçoğu intrageniktir ve çoğunlukla başka bir protein kodlayan genin intronlarında ve nadiren de ekzonlarında işlenirken, geri kalanı intergeniktir, bir genden bağımsız olarak transkribe edilir ve kendi promotörleri tarafından düzenlenir (O'Brien J vd., 2018). MikroRNA sentezinde esasen iki komponent vardır, birincisi çekirdekde gerçekleşen başlangıç ve ikincisi

de sitoplazmada gerekleŖen tamamlanma süreçleridir. İtronlar içindeki miRNA' ların (intragenik miRNA' lar) ekirdekdeki sentez baŖlangıcı, RNA polimeraz II tarafından öncül mRNA (pre-mRNA)' nın transkribe edilmesiyle gerekleŖir. Takiben intronlar pre-mRNA' dan çıkarılır veya pre-mRNA spliceosomal bileŖenler tarafından ayrıştırılır ve sonuç olarak mirtron, pri-miRNA veya pre-miRNA olmak üzere üç olası miRNA öncü molekülünden biri oluŖturulmuŖ olur. İntergenik miRNA' ların çekirdekdeki sentez baŖlangıcı ise RNA polimeraz II veya III tarafından transkripsiyonla birincil miRNA (pri-miRNA) molekülünün oluŖturulmasını ve akabinde bu molekülün DGCR 8 ve bir endonükleaz olan Drosha enziminden oluŖan kompleks tarafından yapılan kırılmayla pre-miRNA' ya dnŖtirlmesiyle gerekleŖir. Sentezlenen miRNA öncüleri pre-miRNA formunda (intragenik yolakda oluŖan mirtron ve pri-miRNA' lar pre-miRNA' ya dnŖtirlr, yine bu yolakdan elde edilen ve intergenik yolakdan sağlanan pre-miRNA' lar ise doğrudan) Exportin 5 ve Ran-GTP adı verilen bir nükleositoplazmik taŖıyıcı ile sitoplazmaya yönlendirilir ve ikinci sentezin ikinci basamağı baŖlar. Sitoplazmada pre-miRNA, insan immün yetmezlik virüsü transaktif edici yanıt RNA-bağlayıcı protein (TRBP) ile birlikte sitoplazmik endonükleazlar olan Dicer enzimi ve endonükleaz aktivitesi gösteren Argonaute 2 proteini (Ago2)' nin katılım gösterdiği kompleks reaksiyonla miRNA dpleksi' ne dnŖtirr. Daha sonra, miRNA dpleksi, Ago2, TRBP, protein kinaz r-aktif edici protein (PACT) ve Dicer' den oluŖan kompleksle [RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) olarak isimlendirilir] bir araya gelerek olgun miRNA ortaya ıkmıŖ olur (Macfarlane LA ve Murphy PR, 2011). miRNA sentezi Ŗekil 2.4.1' de zetlenmiŖtir.



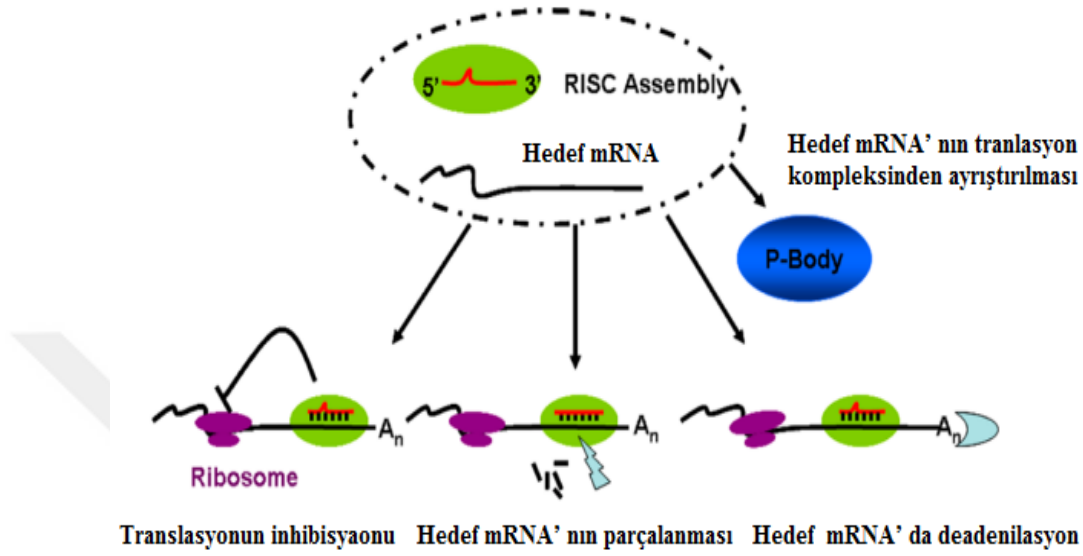
Şekil 2.12. miRNA sentezi şematik gösterimi (Macfarlane LA ve Murphy PR, 2011).

2.4.2 İnsanlarda mikroRNA' ların Genel Etki Mekanizmaları ve Fonksiyonları

Bugüne dek yapılan çalışmalar insan vücudunda miRNA' lara hücre çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalması gibi süreçlerde kritik roller atfetmiş ve onları normal

gelişim, apoptoz, hücre içi sinyalizasyon, gen ifadesi, doku gelişimi, materyal metabolizması, homeostaz ve bazı hastalıklar sırasında önemli oyuncular olarak göstermiştir (Vidigal JA ve Ventura A, 2015; Fabian MR ve Sonenberg N, 2012; Dong H vd., 2013; Dong Z vd., 2022). miRNA genleri insan genomunun yalnızca %1 ila %3' ünü oluşturmalarına rağmen. Bununla birlikte, miRNA' ların insan vücudundaki protein kodlayan genlerin yaklaşık %30 ila %60' ını düzenlediği tahmin edilmektedir (Dong Z vd., 2022). Genel olarak, miRNA' lar sahip oldukları RISC susturma kompleksleri ile hedef mRNA' lara bağlayarak gen ifadesini baskılar (Fabian MR ve Sonenberg N, 2012). Hedef tanıma öncelikle miRNA' nın 5' ucundaki 6 nükleotitlik bir uzantı dizisi tarafından belirlenir (Dong H vd., 2013). Bu dizi hedef mRNA' nın 3' ucundaki UTR' si ile etkileşime girerek bağlanma gerçekleşir. Ancak, miRNA' ların mRNA' ların 5' UTR bölgesine ve hatta kodlama dizisi ve gen promotörleri dahil olmak üzere diğer bölgelerle etkileşimleri de bildirilmiştir (O'Brien J vd., 2018; Dong H vd., 2013). Bu aşamada gen ifadesinin baskılanması RISC' nin hedeflere bağlanmasının ardından translasyonun inhibisyonu, hedef mRNA' nın parçalanması, hedef mRNA' da deadenilasyon veya hedef mRNA' nın translasyon kompleksinden ayrıştırılmasıyla meydana gelir (Dong H vd., 2013). Bazı durumlarda, miRNA' ların belirli koşullar altında gen ifadesini aktive ettiği de gösterilmiştir (O'Brien J vd., 2018). miRNA ve hedef arasındaki tamamlayıcılık derecesi, miRNA- mRNA etkileşim mekanizmasını ayırt eden önemli bir belirleyici faktördür. Buna göre, miRNA ve mRNA ile bağlanma mükemmelde yakın olduğunda hedef mRNA' da parçalanma meydana gelir. Bağlanma daha düşük özgünlükte olduğunda ise hedef mRNA' nın translasyonu baskılanır (Dong H vd., 2013). Bugüne kadar insanlarda 1000' den fazla miRNA tanımlanmıştır (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/miRNA/>) ve bunlar insan genomunun %30' dan fazlasını hedefleyebilir. Daha da önemlisi, tek bir gen birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir ve aynı şekilde, tek bir miRNA' nın birden fazla hedefi olabilir. Bu açıdan bakıldığında miRNA biyolojisi karmaşık ve yüksek oranda düzenlenmiş bir gen düzenleme modülüdür (Dong H vd., 2013; Dong Z vd., 2022). miRNA' lar bağışıklık yanıtı, insülin salgılanması, nörotransmitter sentezi ve viral replikasyon gibi çeşitli hücrel aktivitelere de rol oynamaktadır. Dahası son zamanlarda yapılan genom çapında analizler, insan malignitelerinde düzensiz miRNA ifadeleri de tanımlamıştır (Dong H vd., 2013). miRNA' lar onkogenik veya tümör baskılayıcı yolları modüle edebilirken, miRNA' ların kendileri de

onkogenler veya tümör baskılayıcılar tarafından düzenlenebilir. Bu nedenle miRNA ifade profilleri, çeşitli hastalıklarda ve kanserde biyobelirteç olarak kullanılabilir veya genetik potansiyel ilaç hedefleri olarak bu hastalıkların tedavisinde de kullanılabilir (Dong H vd., 2013).



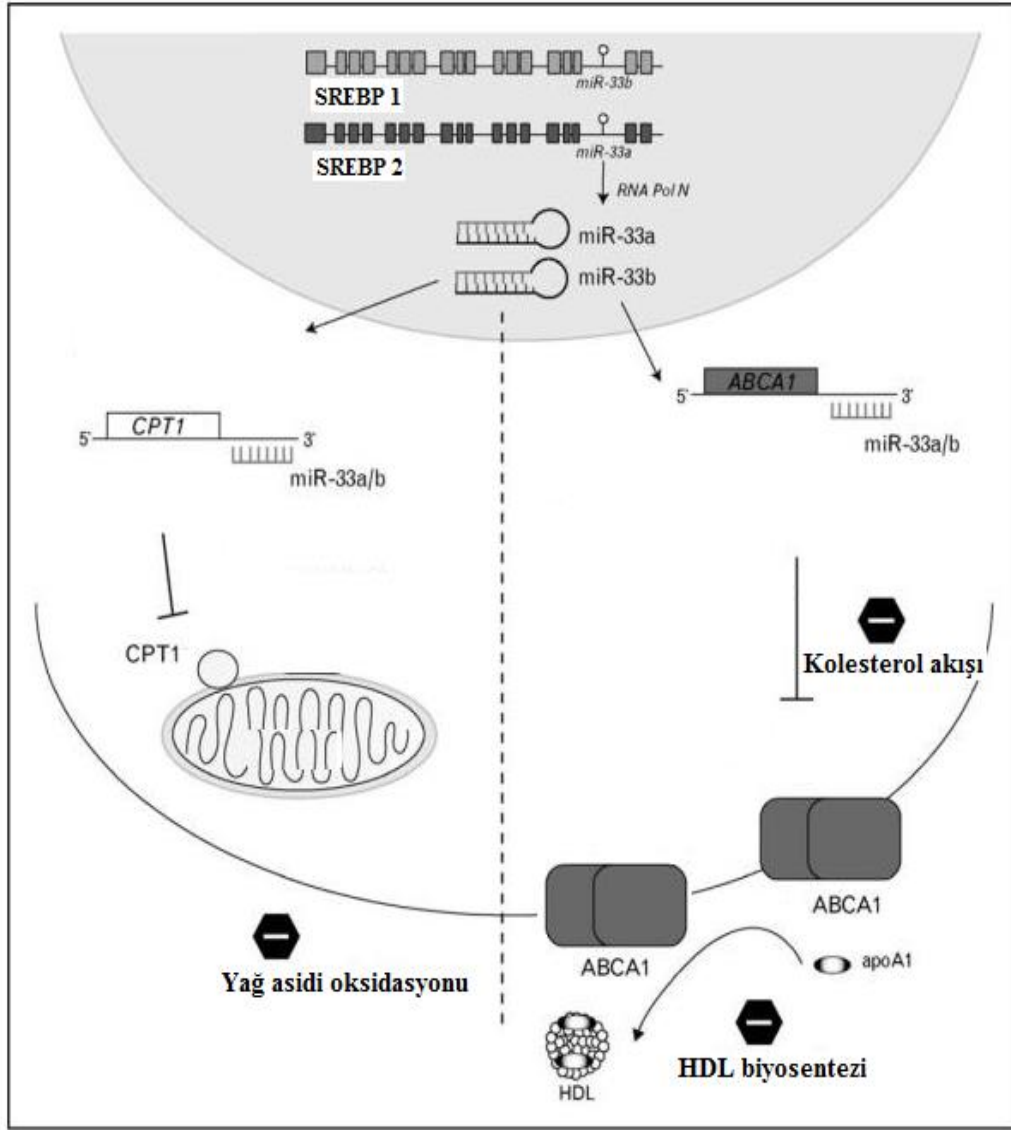
Şekil 2.13. miRNA'ların gen düzenleme mekanizmaları: translasyonun inhibisyonu, hedef mRNA'nın parçalanması, hedef mRNA'da deadenilasyon veya işleme gövdesinde (P-gövdesi) hedef mRNA'nın translasyon kompleksinden ayrıştırılmasıyla meydana gelir (Dong H vd., 2013).

2.4.3 mikroRNA'ların Lipid Metabolizması ile İlişkisi

Keşfedildiklerinden beri, miRNA'ların insanlarda metabolizma homeostazının önemli düzenleyicileri olduğu öne sürülmüştür. miRNA'ların lipid metabolizmasındaki rollerini kanıtlayan çok sayıda çalışma sonucu bildirilmiştir. Örneğin, lipoprotein-bağlı özellikle de yüksek yoğunluklu lipoproteine (HDL) bağlı miRNA'ların endokrin düzenleyiciler olarak rol alabileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak, miRNA'ların lipoproteinle taşınması, kardiyometabolik hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için potansiyel miRNA tabanlı klinik uygulamaların geliştirilmesi için kullanılabileceği de bildirilmiştir (Desgagné V, Bouchard L ve Guérin R, 2017; Aryal B vd., 2017).

Lipid metabolizması hücresel düzeyde sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu düzenlemede en klasik süreç transkripsiyonel düzeyde sağlanırken (örneğin SREBP ve LXR

tarafından), miRNA' ların da kolesterol homeostazı ve yağ asidi oksidasyonunda yer alan lipid metabolizması genlerinin güçlü transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olduğu tespit edilmiştir (Fernández-Hernando C vd., 2011). Lipid ve lipoprotein metabolizmasında yer alan miRNA' ların sayısı, konu ile ilgili çalışmaların son yıllarda artışı ile, önemli ölçüde artmıştır. Özellikle miR-33 ve miR-122 lipid metabolizmasında önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Aryal B vd., 2017). miR-33' ün CPT 1 enzimi gibi yağ asidi β -oksidasyonunda yer alan proteinleri kodlayan çeşitli transkriptlerin translasyonunu inhibe ederek yağ asidi degradasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Buna göre, miR-33 inhibisyonunun yağ asidi oksidasyonunun artmasına ve karaciğerde yağ depolarının birikiminin azalmasına neden olacağı bildirilmiştir (Jeon SM, Chandel NS ve Hay N, 2012). Ayrıca miR-33' ün, ABCA 1 gibi kolesterol taşıyıcılarının ifadesini azaltarak kolesterol akışını ve HDL biyogenezini düzenlediği de gösterilmiştir (Jeon SM, Chandel NS ve Hay N, 2012). Gerçekten de, şimdiye kadar, lipid ve lipoprotein metabolizmasını düzenleyen en iyi karakterize edilmiş miRNA miR-33a ve miR-33b' dir (Desgagné V, Bouchard L ve Guérin R, 2017; Aryal B vd., 2017). Günümüzde, kolesterol alımı ve sentezinde rol oynayan genlerin kontrolünde bir ana anahtar olan SREBP 2 geninin intron 16' sında bulunan intronik bir miRNA olan miR-33a, lipid metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar rol üstlenen bir transkripsiyon sonrası düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır (Fernández-Hernando C vd., 2011).



Şekil 2.14. miR-33 ile kolesterol taşınımı ve yağ asidi oksidasyonunda rol oynayan genlerin ifadesinin baskılanması (Fernández-Hernando C vd., 2011). SREBP 1 ve 2 aktivasyonu sırasıyla miR-33b ve miR-33a'nın birlikte transkripsiyonu ile sonuçlanır. Bu miRNA'lar aynı anda CPT 1 gibi yağ asidi metabolizmasında ve ABCA 1 gibi kolesterol taşınmasında (rol oynayan genlerin ifadesini inhibe eder. miR-33a/b aktivasyonunun sonucu, yağ asidi β -oksidasyonunun azalması ve kolesterolün HDL yoluna hareketinin azalmasıdır.

2.4.4 İnsanlarda mikroRNA'lar ve Kanser İlişkisi

Kanserlerde aşırı eksprese edilen miRNA'ların, genellikle hücre farklılaşmasını veya apoptozu ve/veya tümör baskılayıcı genleri kontrol eden genleri olumsuz yönde düzenleyerek tümör gelişimini teşvik edebilen ve 'onkomir' olarak adlandırılan onkogenler olduğu düşünülmektedir (Tan W vd., 2018). Bununla birlikte, sayıları pek az da olsa, let-7, miR-15/16, miR-34 ve miR-200 gibi tümör baskılayıcı miRNA'lar

da mevcuttur ve bunlar onkogenleri ve/veya hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden genleri negatif olarak inhibe ederek tümör gelişimini önler (Otmani K ve Lewalle P, 2021).

Örneğin, miR-21 meme, kolorektal, akciğer ve pankreas kanseri, glioblastoma, nöroblastoma, lösemi ve lenfomada aşırı eksprese edilir. miR-21 in vitro olarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozunu, migrasyonunu, invazyonunu ve idamesini etkiler ve kanserli hücrelerin sağkalımı ile ilişkilidir (Tan W vd., 2018). miR-17-92 kümesi, miRNA' lar 17, 18a, 19a, 20a, 19b-1 ve 92a-1' den oluşan polikistronik bir transkripttir ve akciğer kanseri ve lenfomada önemli ölçüde aşırı eksprese edilir. miRNA' ların tümör proteini p53 yolağı, protein kinaz B sinyal yolu gibi yolaklarla etkişimleri de gösterilmiştir (Tan W vd., 2018). Bir miRNA olan Let-7' nin ifadesinin bazı kanser türlerinde azaldığı ve kötü sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, miR-34a ifadesinin kaybı prostat kanserinde metastaz ve nüks ile ilişkili bulunmuştur. miR-34 ailesinin p53' ün ifadesini ve mutasyonunu düzenleyebileceği de rapor edilmiştir (Tan W vd., 2018).

2.4.5 Renal Hücreli Karsinomda mikroRNA' lar

Bir dizi çalışma, RHK doku örneklerinde ve normal dokularda farklı şekilde ifade edilen miRNA' ları ve hedef genlerini göstermiştir. Diğer bazı çalışmalarda, RHK doku örneklerinde bir dizi miRNA' nın düzensizliğini bildirmiştir (Ghafouri-Fard S, 2020). Örneğin, Gottardo ve ark. (Gottardo F vd., 2007), normal böbrek örneklerine kıyasla RCC hastalarından elde edilen doku örneklerinde miR-28, miR-185, miR-27 ve let-7f-2' nin ifadelerinin arttığını göstermişlerdir. Wulfken ve ark. (Wulfken LM vd., 2011) da, RHK hastalarında serum ve doku örneklerinde sırasıyla 109 ve 36 miRNA' nın aşırı ifadesini bildirmişlerdir. Nakada ve ark. (Nakada C vd., 2008), BHRHK ve kromofob RHK' de sırasıyla 37 ve 51 miRNA ifadesinde azalma olduğunu ortaya koymuşlardır. Bir başka çalışmada ise, Tang ve ark. (Tang K ve Xu H, 2015) RHK hastalarının doku, idrar veya serum örneklerinde miRNA' ların tanısal ve prognostik değerini irdemişler ve miR-21, miR-210, miR-141, miR-200c ve miR-429 gibi miRNA' ların değişen ifadelerinin RHK hastalarında cerrahi sonrası kansere özgü kötü sağkalım ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, miRNA' lar RHK patogeneze katılmaktadır. Dahası, bu miRNA' ların hastaların serum ve idrar örneklerinde izlenebilir olması, RHK için bu

moleküllerin potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilmesine ve belki de gelecekte miRNA' ları içeren veya miRNA' ları hedefleyen etkin tedavi modalitelerinin oluşturulmasına olanak sağlayacaktır.

2.5 BİYOİNFORMATİK

Son yıllardaki teknolojik gelişmeler, fenotiplerin genetik temelini anlaşılması için hatırı sayılır imkanlar sunmuştur. Bu imkanlardan kuşkusuz en önemlisi insan genomunun gizeminin çözülmesine olanak sağlanmasıdır. Bu amaçla bir uluslar arası araştırma projesi olan İnsan genom projesi ortaya çıkmıştır. İnsan genom projesi insan genetik materyalinin tamamının (yani tüm genomun) kimyasal dizilimini deşifre etmek, genomda bulunan 50.000 ila 100.000 genin tamamını tanımlamak ve hastalıklarla ilişkisini ortaya çıkarmayı hedeflemiş ve bu anlamda başarı ile sonuçlanmıştır (Diniz WJ ve Canduri F, 2017; Collins FS ve Fink L, 1995). İnsan genom projesi ile benzeri görülmemiş zenginlikte biyolojik veri üretilmiştir (Bayat A, 2022). Bununla birlikte mRNA, proteinler ve protein metabolitlerinin derinlemesine irdelenmesini sağlayan teknolojik fırsatlar sayesinde hücresel mekanizmaların çözümlenmesine olanak sağlayan yine oldukça zengin biyolojik veri de bilimin hizmetine sunulmuştur (Vailati-Riboni M, Palombo V ve Loo JJ, 2017; Martorell-Marugán J vd., 2019). Günümüzde, hücre, doku veya organizma bağlamında, belirli bir biyolojik numunedeki genleri irdelenmesi genomik, mRNA' nın irdelenmesi transkriptomik, proteinlerin irdelenmesi proteomik ve protein metabolitlerinin irdelenmesi ise metabolomik olarak isimlendirilmektedir. Yani, Omik kelimesi, biyolojik bilimlerde genomik, transkriptomik, proteomik veya metabolomik gibi -omik ile biten bir çalışma alanını ifade eder. Sonundaki -ome, sırasıyla genom, proteom, transkriptom veya metabolom gibi çalışma nesnelerine hitap etmek için kullanılır (Vailati-Riboni M, Palombo V ve Loo JJ, 2017). Son yıllarda, epigenomik yani DNA dizisinde kodlananlar dışındaki kalıtsal değişikliklerin incelenmesi ile ilgilenen araştırmalar da yürütülerek, epigenetik çalışmalar çatısı altında, DNA' da değişiklik olmadan gen aktivitesini değiştiren faktörler de irdelenmeye başlanmıştır (Chen C vd., 2023).

En çok kullanılan ileri teknoloji ürünü omik teknikleri arasında yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) ve kütle spektrometresi tabanlı teknikler yer

almaktadır. NGS tabanlı teknikler genomik, epigenomik ve transkriptomik için sıklıkla kullanılırken, kütle spektrometresi tabanlı teknikler proteomik ve metabolomikleri yüksek verimli bir şekilde tanımlamak veya ölçmek için kullanılır (Das T vd., 2020). NGS tabanlı genomik çalışmalar tipik olarak hem kodlayan hem de kodlamayan bölgelerin DNA dizisini genom çapında analiz etmek için tasarlanmıştır. NGS tabanlı epigenomik teknikler genellikle DNA protein etkileşimlerini veya kromatin erişilebilirliğini haritalamak için kullanılan ChIP-seq (kromatin immünopresipitasyonu) analizi, DNase1-seq (DNase I aşırı duyarlı bölgeler dizileme) analizi veya FAIRE-seq (düzenleyici elementlerin formaldehit destekli izolasyonu ile dizileme) analizi ile gerçekleştirilir. DNA-RNA etkileşimini haritalamak için ChiRP-seq (RNA saflaştırması ile kromatin zolasyonu) ve DNA metilasyonunu haritalamak için ise tüm genom bisülfid/dizi tabanlı dizileme analizleri uygulanır. NGS odaklı transkriptomik çalışmalarında ise RNA dizileme (RNA-seq) teknikleri ile mRNA, miRNA ve diğer düzenleyici RNA' lar dahil olmak üzere RNA moleküllerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi gerçekleştirilir (Das T vd., 2020).

Tablo 2.5. Genomik, epigenomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik için gerekli olan farklı teknikler ve ilgili işlevleri.

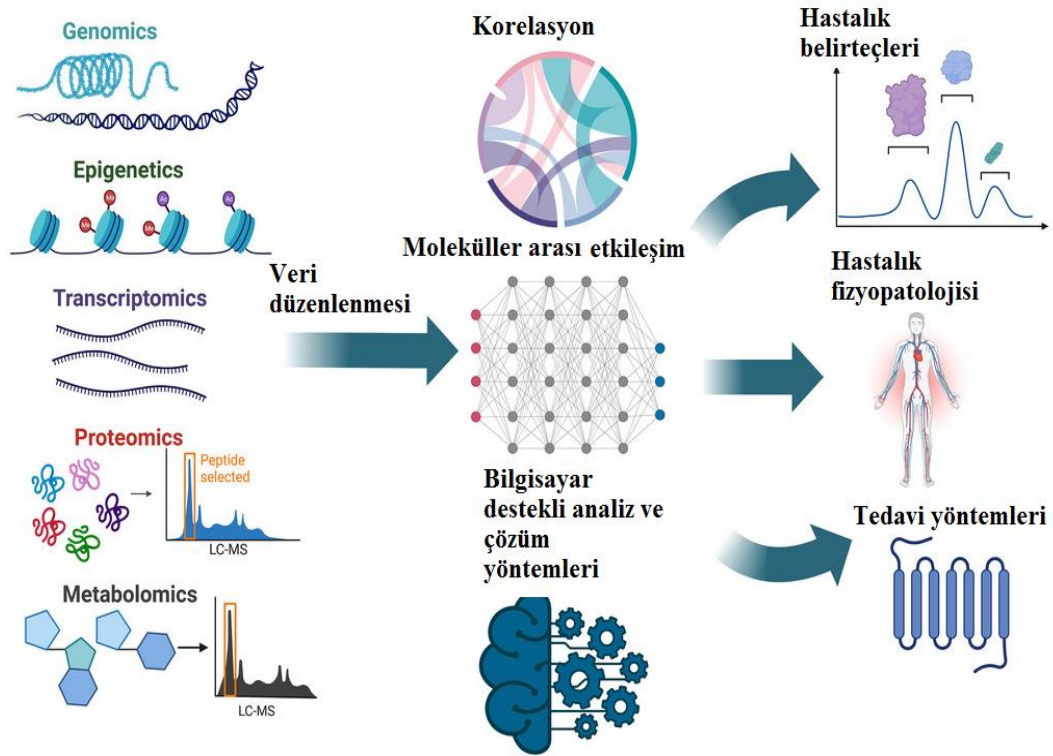
Omik tipi	Teknik yöntem	Uygulama
Genomik	NGS	Yüksek verimli tüm genom ve tüm ekzom dizileme.
	ChIP-seq	Transkripsiyon faktörleri ve ilişkili proteinler için genom çapında DNA bağlanma bölgelerinin tanımlanması.
	DNase1-seq	Genom boyunca aktif gen düzenleyici elementlerin tanımlanması.
Epigenomik	FAIRE-seq	Düzenleyici aktiviteye sahip DNA bölgelerinin tanımlanması.

Transkriptomik	ChiRP-seq	RNA' ların genomik konumlarının ve bağlı proteinlerinin tespiti.
	Bisülfıt/dizi tabanlı dizileme	Genom boyunca metilasyon modelinin ve bölgelerinin belirlenmesi.
	RNA-seq	mRNA, miRNA ve diğer düzenleyici RNA' lar dahil olmak üzere yeni transkriptlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi
Proteomik	LC-MS/MS tabanlı kütle spektrometresi	Çeşitli biyolojik koşullarda proteinlerin tespiti ve miktar tayini.
	RPPA	Çeşitli biyolojik koşullarda protein tespiti ve miktar tayini.
Metabolomik	LC-MS tabanlı kütle spektrometresi	Metabolik yollarda yer alan seçilmiş moleküllerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi.

NGS, Yeni nesil dizileme; **ChiP-seq**, Kromatin immünopresipitasyon dizileme; **DNase 1-seq**, DNase I aşırı duyarlı bölgeler dizileme; **FAIRE**, Düzenleyici elementlerin formaldehit destekli izolasyonu; **ChiRP**, RNA saflaştırması ile kromatin izolasyonu; **RNA-seq**, RNA dizileme; **LC-MS/MS**, Sıvı kromatografi tandem kütle spektrometresi; **RPPA**, Ters faz protein dizisi.

Tüm bu teknolojik omik tekniklerin yükselişi, modern biyomedikal araştırmalarda moleküler verilerin patlamasıyla sonuçlanmıştır (Martorell-Marugán J vd., 2019). Genlerin, proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin özellikleri hakkında elde edilen bu büyük miktardaki küresel verinin (multiomik veri) tıp ve moleküler biyoloji alanlarında araştırmalar için fevkalade kaynak sağlaması nedeniyle bu verilerin toplanması, verilere erişimin sağlanması ve verilerin kullanılması büyük önem arz

etmektedir (Martorell-Marugán J vd., 2019). İşte bu noktada, verilere erişimi sağlamak ve özellikle verilerin analizi ve yorumlanmasına olanak sağlamak amacıyla biyoinformatik bilimi ortaya çıkmıştır. Biyoinformatik, hesaplama ve analiz araçları kullanılarak biyolojik verilerin elde edilmesi, detaylı analizi ve yorumlanmasının uygulanması olarak tanımlanmaktadır ve bilgisayar bilimi, matematik, fizik ve biyolojiden yararlanan disiplinler arası bir alandır. Bu bağlamda, özetle, biyoinformatik, modern biyoloji ve tıpta veri yönetimi için gereklidir (Bayat A, 2022). Bioinformatik araçlar çoğunlukla internet erişilebilirliğine bağlı bilgisayar yazılım programlarını içerir. Dünya çapında yaygın olarak kullanılabilen çeşitli programlar ve veritabanları kullanılarak omik verilerine ulaşmak günümüzde oldukça kolaylaşmıştır. Klinisyenlerden, moleküler biyologlara kadar, tüm araştırmacılar açık erişimli web siteleri üzerinden erişim ile temel biyoinformatik araçları kullanarak omik verilerini analiz etmek için bu karmaşık yazılım programlarını kullanabilirler (Bayat A, 2022).



Şekil 2.15. Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi alanlarda biyoinformatik yöntemler ile veri entegrasyonunun nihai amacı, hastalık biyobelirteçlerini keşfetmek, fenotipik spektrumu ve mekanizmaları doğrulamak ve terapötik hedefleri belirlemektir (Chen C vd., 2023).

2.5.1 Kanserle İlgili Omik Verileri için Halka Açık Çevrimiçi Kaynaklar

Kanserle ilişkili çevrimiçi omik veri havuzları şu anda kanserle ilişkili hücresel süreçler ve mekanizmalar hakkındaki araştırmalarda çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu kaynaklar sayesinde hızlı hipotez oluşturma ve doğrulama için farklı veri kümelerini sistematik bir şekilde entegre etmek artık mümkün hale gelmiştir. Bu çevrimiçi kaynaklar, tek bir kanser türünde veya pan-kanser tarzında değiştirilmiş moleküler kalıpları keşfetmek için bir platform sağlar (Das T vd., 2020). Kansere özgü ham ve analiz edilmiş verileri içeren çok sayıda açık erişimli veri tabanı bulunmakla birlikte, bunların en yaygın olarak kullanılanları TCGA, Uluslararası Kanser Genom Konsorsiyumu (The International Cancer Genome Consortium, ICGC), Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, COSMIC), Patoloji Atlası, Gen İfadesi Omnibus (Gene Expression Omnibus, GEO) ve Proteomik Tanımlamalar (PRoteomics IDentifications, PRIDE)' dir (Das T vd., 2020). Esasen, bunlar arasında da, en yaygın kullanılanı TCGA veritabanıdır. Nitekim, TCGA ile ilişkili çok çeşitli halka açık veri portalları ve çoklu-omik analiz araçları bulunmaktadır (Das T vd., 2020).

Tablo 2.6. Sık kullanılan tek ve çoklu-omik veri tabanları.

Veri tabanı	Veri tabanı Tipi	Omik tipi	Klinik veri	Analiz özelliği	Veri seti mukayesesi
TCGA	Kansere özgü	Genomik	+	+	+
		Epigenomik			
		Transkriptomik			
	Kansere özgü	Proteomik			
ICGC	Kansere özgü	Genomik	+	+	+
	Kansere özgü	Transkriptomik			
COSMIC	Genel	Genomik	+	+	+
	Genel				
Patoloji Atlası		Proteomik	+	+	+
GEO		Transkriptomik	+	+	-
PRIDE		Proteomik	-	-	-

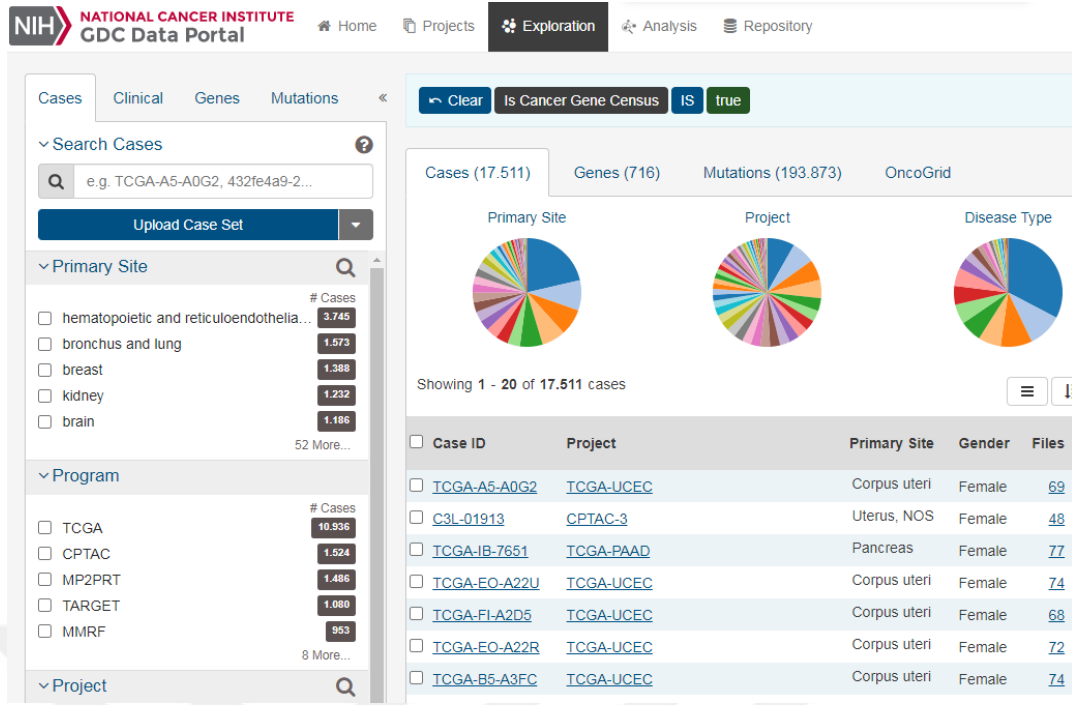
TCGA, Kanser Genom Atlası; ICGC, Uluslararası Kanser Genom Konsorsiyumu; COSMIC, Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu; GEO, Gen İfadesi Omnibus ve PRIDE, PRoteomics IDentifications.

2.5.1.1 TCGA Veri Tabanı

Kansere özgü multi-omik veri kaynaklarının en önde gelenlerinden biri, primer kanser ve eşleştirilmiş normal örneklerini karakterize eden TCGA' dır (Das T vd., 2020). Günümüzde kanser araştırmalarında oldukça sık başvurulanan TCGA veri tabanı 37 kohortu kapsayan 33 farklı kanser türünden olguların olduğu 20.000' den fazla primer kanseri ve eşleştirilmiş normal örneklerine ait verileri içermektedir. TCGA yaklaşık 2,5 petabayttan fazla genomik, epigenomik ve transkriptomik veri içerdiği bilinmektedir (Das T vd., 2020). TCGA veri tabanı kanser doku ve hücrelerinde NGS tabanlı tekniklerle belirlenmiş olan tek nükleotid varyantlarını (small nucleotide variants, SNV' ler), DNA metilasyonunu, kopya sayısı değişikliklerini (copy number alterations, CNA' lar) ve mRNA/miRNA ifadeleri bilgileri gibi TCGA projesinin esas hedefi olan verileri içermektedir. Genom, epigenom ve transkriptoma ek olarak, proteomik verileri eklemek için 2013 yılında TCGA projesinin bir parçası olarak yeni araştırma yapılmıştır (Vlachavas EI vd., 2021; Li J vd., 2013). Bu çalışmada, RPPA yöntemi TCGA veri tabanındaki çok sayıda tümör ve hücre hattı örneği üzerinde protein ifade verileri üretilerek, farklı kanser türlerine sahip bireylerde yaklaşık 200 farklı proteinin ifadesi ölçülmüş ve elde edilen veriler farklı bir veri tabanı olan kanser proteom atlası (The Cancer Proteome Atlas-TCPA)' da depolanmıştır (Li J vd., 2013; Akbani R, vd., 2014). Bununla birlikte, ilerleyen yıllarda protein analizi için daha özgün ve verimli bir yöntem olan LC-MS/MS tabanlı kütle-spektrometri' nin keşfi ve yine TCGA veri tabanındaki örneklerde kullanımı ile elde edilen proteomik veriler ise klinik proteomik tümör analiz konsorsiyumu (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium –CPTAC)' da bulunmaktadır (Das T vd., 2020). Yani özetle, TCGA örneklerinden kanser genomunun gizemini çözmek adına NGS yöntemleriyle genomik araştırmalar yapıp veriler elde edildiği gibi kütle spektrometresi teknikleriyle proteomik analizler yapılarak da veriler elde edilmiştir. Ancak bu veriler farklı veri tabanlarında depolanmaktadır. TCGA çoklu-omik verilerine farklı veri portalları kullanılarak ulaşılabilir ve bu verilerin doğrudan veya dolaylı kullanımları ile veri analizleri yapılabilir (Das T vd., 2020). Bu veri portallarından bazıları temelde TCGA verilerine çok yönlü erişimi ve analizi sağlamayı amaçlarken, diğerleri ise farklı veri setlerinin yanı sıra TCGA verileri üzerinden analiz yapmaya olanak sağlarlar ancak verilere ulaşım imkanı sağlamazlar. İlk gruba örnek olan en popüler veri portalları genomik veri ortaklığı (genomic data commons, GDC),

cBioPortal, kanser proteom atlası, TPCA, Gen ifadesi profillemeye interaktif analizi (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA), UCSC Xena, UALCAN ve LinkedOmics' dir. Tüm bu portallar çok çeşitli kullanıcı dostu özelliklere sahip olup genel olarak bireysel kanser türlerinde artış veya azalış gösteren gen ifadelerini ortaya koyma; tümör ve normal örnekler arasında ve ayrıca bireysel kanser evreleri, tümör derecesi, ırk, vücut ağırlığı veya diğer klinikopatolojik özelliklere dayalı çeşitli tümör alt gruplarında genlerin ifadesini analiz ederek karşılaştırabilme; ve, gen ifade seviyesinin ve klinikopatolojik özelliklerin hasta sağkalımı üzerindeki etkisini tahmin edebilme gibi analizleri gerçekleştirmeye imkan verirler. Ancak bu portallar arasında, ileri analizler, grafikler, ulaşılabilen veri setleri gibi çeşitli parametrelerle ilgili farklılıklar mevcuttur. İkinci grup veri portalları sınırlı olanaklar sağladığından bilimsel literatürde kullanımları nisbeten daha sınırlıdır (Zhang Z vd., 2019; Nicora G vd., 2020).

GDC, Amerikan ulusal kanser enstitüsü' nün (NCI) açık erişimli (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) veri portalıdır. GDC veri portalı 67 proje, 68 farklı kanser türü ve klinik verileri bulunan 44 binden fazla olgu içeren multimodal kanser genomik çalışmalarının kapsamlı analizini sağlayan en büyük ölçekli konsorsiyumdur. GDC bünyesinde bilim insanları TCGA' nın yanı sıra NCI' ın CPTAC verileri, etkili tedaviler üretmek için terapötik olarak uygulanabilir araştırma uygulamaları (Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments, TARGET) ve Genomik Kanıt Neoplazi Bilgi Değişimi (Genomics Evidence Neoplasia Information Exchange, GENIE) gibi diğer veri setleriyle birlikte 3 petabayttan fazla veriye erişebilmektedir (Das T vd., 2020; Vlachavas EI vd., 2021). Bu veri portalı, kullanıcıların hastalık bölgesi, kanser türü, demografik veri materyali, tedavi, mutasyon etkisi vb. gibi kriterlere göre verileri filtrelemesine olanak sağlar. Kaplan-Meier sağkalım grafikleri oluşturarak sağkalım analizi sunabilir. Ancak, GDC veri portalı ile pan-kanser omik karşılaştırması mümkün değildir (Das T vd., 2020).



Şekil 2.16. GDC veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (<https://portal.gdc.cancer.gov/>).

cBioPortal, kanser genomik verilerine ulaşmak ve analiz etmek için oldukça yaygın kullanılan ve Memorial Sloan Kettering Kanser Merkezi (MSKCC) tarafından geliştirilmiş olan açık erişimli web tabanlı bir platformdur (<http://cbioportal.org>) (Gao J vd., 2013). cBioPortal'ın arayüzü aynı anda birden fazla veri setinin analizine izin verir. Bu sayede CNA'lar, gen amplifikasyonu ve mRNA ifadesi ve gen metilasyonu verileri üzerinden analizler kolaylıkla yapılabilir. Buna ek olarak, sağkalım analizi (Kaplan-Meier grafikleri), ortak ifade analizi ve korelasyon grafikleri gibi görselleştirme özellikleri de sağlar (Das T vd., 2020). cBioPortal, MutationMapper ve OncoPrinter olmak üzere iki farklı web aracına sahiptir. MutationMapper, 3D protein yapısı veritabanlarıyla bağlantılı olup mutasyonların proteinlere göre potansiyel etkilerini araştırmak için kullanılabilir. Öte yandan OncoPrinter, somatik mutasyonlar ve CNA'lar gibi genomik değişikliklerin diyagramlarını oluşturabilir. Ancak, cBioPortal veri portalında, tümöre komşu normal dokulara ait veri setleri bulunmamakta, bu da tümör ve tümör olmayan örneklerin karşılaştırmasını mümkün kılmamaktadır (Das T vd., 2020).

cBioPortal
FOR CANCER GENOMICS

Data Sets Web API Tutorials/Webinars FAQ News Visualize Your Data About cBioPortal Installations

Query Quick Search **Beta!**

Select Studies for Visualization & Analysis: 0 studies selected (0 samples) Data type Search...

Category	Count
PanCancer Studies	10
Pediatric Cancer Studies	14
Immunogenomic Studies	8
Cell lines	3
Adrenal Gland	2
Ampulla of Vater	1
Biliary Tract	15
Bladder/Urinary Tract	21
Bone	3
Bowel	19
Breast	26
CNS/Brain	25
Cervix	3

Quick select: TCGA PanCancer Atlas Studies Curated set of non-redundant studies

Looking for **AACR Project GENIE**, the largest public clinicogenomic cancer dataset? It's available [here](#).

PanCancer Studies

- ☐ MSK-IMPACT Clinical Sequencing Cohort (MSK, Nat Med 2017)
- ☐ Metastatic Solid Cancers (UMich, Nature 2017)
- ☐ MSS Mixed Solid Tumors (Broad/Dana-Farber, Nat Genet 2018)
- ☐ SUMMIT - Neratinib Basket Study (Multi-Institute, Nature 2018)
- ☐ TMB and Immunotherapy (MSK, Nat Genet 2019)
- ☐ Tumors with TRK fusions (MSK, Clin Cancer Res 2020)
- ☐ Cancer Therapy and Clonal Hematopoiesis (MSK, Nat Genet 2020)
- ☐ China Pan-cancer (Origimed, Nature 2022)
- ☐ Pan-cancer analysis of whole genomes (ICGC/TCGA, Nature 2020)
- ☐ MSK MetTropism (MSK, Cell 2021)

Pediatric Cancer Studies

- ☐ Pediatric Preclinical Testing Consortium (CHOP, Cell Rep 2019)
- ☐ Pediatric Acute Lymphoid Leukemia - Phase II (TARGET, 2018)
- ☐ Pediatric Rhabdoid Tumor (TARGET, 2018)
- ☐ Pediatric Wilms' Tumor (TARGET, 2018)
- ☐ Pediatric Acute Myeloid Leukemia (TARGET, 2018)
- ☐ Pediatric Neuroblastoma (TARGET, 2018)

Şekil 2.17. cBioPortal veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (<http://cbioportal.org>).

TCPA, yukarıda da kısaca bahsedildiği gibi, TCGA tümör örneklerinin ve hücre hatlarının RPPA verilerini içeren protein verileri olan web portalıdır (<https://tcpaportal.org/tcpa/>). Bu portal, ayrıntılı bir analiz ve görselleştirme olanakları ile RPPA verileri üzerinden proteinler arasında korelasyon analizi, protein ifadesi ile prognoz korelasyonu analizi, iki farklı tümör tipi arasında protein ifadesinin karşılaştırılması ve tümör tipleri arasında farklı şekilde ifade edilen proteinlerin tanımlanmasına olanak sağlar. Ayrıca, RPPA bağlantılı sağkalım analizi, protein-ilâç analizi ve ağ-görselleştirme modülleri de bu portal tarafından sağlanmaktadır (Das T vd., 2020; Vlachavas EI vd., 2021).



The Cancer Proteome Atlas (TCPA) is a joint project of the Departments of [Systems Biology](#) and [Bioinformatics & Computational Biology](#) at [The University of Texas MD Anderson Cancer Center](#).

This website is free for academic non-profit institutions; Other users need a commercial license.

Şekil 2.18. TCPA veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (<https://tcpaportal.org/tcpa/>).

GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), TCGA verileri ile birlikte, genetik varyantlar ve gen ifadesi arasındaki ilişkiyi normal dokular ve bireyler arasında incelemek için geliştirilen bir veri bankası olan Genotip-Doku İfadesi (GTEx) verilerini entegre eder (Zeng J vd., 2021). Yani, normal dokulardaki bir genin ifade profiline ait verilere GTEx üzerinden erişerek TCGA verilerindeki kanserli dokular ile karşılaştırılmasına olanak sağlar. Böylece, korelasyon analizi, hasta sağkalım analizi ve birlikte ifade analizi gibi analizleri mümkün kılar (Das T vd., 2020). Ayrıca, yeni kanser hedeflerini ve belirteçlerini araştırmak için kanser alt tiplerini, hedef genleri, alelleri ve farklı ifade seviyelerini araştırmaya olanak sağlar (Zeng J vd., 2021).



GEPIA

Gene Expression Profiling Interactive Analysis

Single Gene Analysis

Cancer Type Analysis

Multiple Gene Analysis

Enter gene name:

The indicators in search box are "symbol" or "alias (newest symbol)".

e.g. ERBB2/ENSG00000141736/2064

GoPIA!

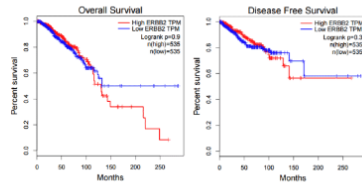
Profile

Boxplots

Stage Plots

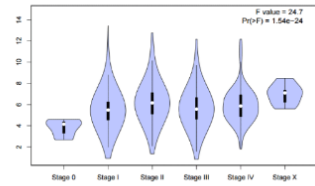
Survival Analysis

Similar



Survival analysis

Normal/cancer comparison



Analyze expression by stage

Gene comparison

Şekil 2.19. GEPIA veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

UCSC Xena, TCGA, ICGC, TARGET ve GTEx gibi veri tabanları ve portalından veriler içeren hacimli bir veri portalıdır (<https://xena.ucsc.edu/>). Somatik mutasyon, kopya sayısı, metilasyon, gen ve protein ifadeleri ve klinik bilgiler gibi çok sayıda verileri içeren çalışmalara olanak sağlar (Goldman M vd., 2018). Bu aracın temel özelliklerinden biri, veri bilgilerine görselleştirme uygulayarak veri kümeleri arasında daha kolay karşılaştırma yapılabilmesine olanak sağlamaktır. UCSC Xena ayrıca, istatistiksel veri sonuçları ve sağ kalım analizlerine ilaveten yüksek çözünürlüklü elektronik tablolar, dağılım grafikleri, çubuk grafikler, kutu grafikleri sunar (Goldman M vd., 2018).

UCSC Xena

See the bigger picture

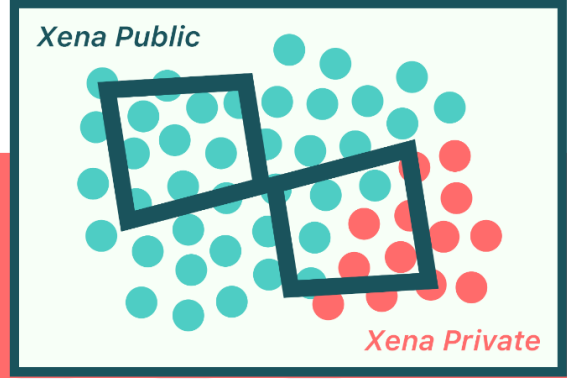
An online exploration tool for public and private, multi-omic and clinical/phenotype data

Launch Xena

Tutorials and walkthroughs

Don't know where to start? Jump in with one of our tutorials or "How do I ..." walkthroughs

Tutorials



Şekil 2.20. GEPIA veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (<https://xena.ucsc.edu/>).

UALCAN, TCGA gen ifadesi verilerinin derinlemesine analizlerini gerçekleştirmek için kullanımı kolay, etkileşimli bir web portalıdır (<http://ualcan.path.uab.edu/>). UALCAN' ın açılımı esasen Birmingham Aabama Üniversitesi kanser veri analizi portalı (The University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal)' dır. TCGA, CPTAC ve Çocuk Beyin Tümörü Doku Konsorsiyumu (The Children Brain Tumor Tissue Consortium, CBTTC) verilerine ulaşım sağlayabilen bu web portalı; gen ifade verileri, hasta sağkalım bilgilerini gösteren grafikler ve çizimler, miRNA kodlayan genlerle araştırma, metilasyon verilerine ulaşma, pan-kanser analizi yapabilme ve GTEx ile bağlantı veri analizi yababilmeye olanak tanır (Das T vd., 2020; Chandrashekar DS vd., 2017).

Welcome to UALCAN

Yes! You All Can

The University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal

UALCAN is a comprehensive, user-friendly, and interactive web resource for analyzing cancer OMICS data. It is built on PERL-CGI with high quality graphics using javascript and CSS. UALCAN is designed to, **a)** provide easy access to publicly available cancer OMICS data (TCGA, MET500, CPTAC and CBTN), **b)** allow users to identify biomarkers or to perform in silico validation of potential genes of interest, **c)** provide graphs and plots depicting expression profile and patient survival information for protein-coding, miRNA-coding and lincRNA-coding genes, **d)** evaluate epigenetic regulation of gene expression by promoter methylation, **e)** perform pan-cancer gene expression analysis, **f)** Provide additional information about the selected genes/targets by linking to HPRD, GeneCards, Pubmed, TargetScan, The human protein atlas, DRUGBANK, Open Targets and the GTEx. These resources allow researchers to gather valuable information and data about the genes/targets of interest, **g)** provide clinical proteomic consortium data analysis including total/phospho-proteins and **h)** provide pediatric brain tumor gene expression and protein expression analysis.

Follow us on Twitter 

Please cite:

- 1) Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, Netto GJ, Qin ZS, Kumar S, Manne U, Creighton CJ, Varambally S. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. 2022 Mar;25:18-27. doi: 10.1016/j.neo.2022.01.001 [PMID: 35078134]
- 2) Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Rodriguez IP, Chakravarthi BVSK and Varambally S. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia*. 2017 Aug;19(8):649-658. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002 [PMID:28732212]

Updated slides from a presentation about UALCAN cancer database at Dana-Farber Cancer Institute [Download](#)

Şekil 2.21. UALCAN veri portalı web sitesi ana sayfasından kesit (<http://ualcan.path.uab.edu/>).

LinkedOmics, TCGA’ dan çoklu-omik verileri ve klinik verileri analiz etmeyi sağlayan göreceli daha yeni bir veri portalıdır (<http://www.linkedomics.org/>). 32 kanser türünde, gen ve miRNA ifadeleri, SNV’ ler, metilasyon, klinik veriler ve mutasyonlar dahil olmak üzere çeşitli veri türlerini ile analizlere imkan sunar. Bu portal ile sağkalım verileri ve analiz edilen parametrelerle klinikopatolojik bilgiler arasındaki ilişkinin belirlenmesi de gerçekleştirilebilir. Ayrıca hedef gen ifadesi ile pozitif ve negatif korelasyon gösteren genlerin gen ısı haritalarını ortaya koymak da mümkündür (Zeng J vd., 2021; Vasaikar SV vd., 2018).

LinkedOmics 
Analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types

About

Login

Citation

OMICS Datatype

Data Source

Manual and tutorial

News/Update

Share Your Data

Browser Compatibility

ABOUT

LinkedOmics is publicly available portal that includes multi-omics data from all 32 TCGA Cancer types and 10 Clinical Proteomics Tumor Analysis Consortium (CPTAC) cancer cohorts.

The web application has three analytical modules: LinkFinder, LinkInterpreter and LinkCompare. LinkFinder allows users to search for attributes that are associated with a query attribute, such as mRNA or protein expression signatures of genomic alterations, candidate biomarkers of clinical attributes, and candidate target genes of transcriptional factors, microRNAs, or protein kinases. Analysis results can be visualized by scatter plots, box plots, or Kaplan-Meier plots. To derive biological insights from the association results, the LinkInterpreter module performs enrichment analysis based on Gene Ontology, biological pathways, network modules, among other functional categories. The LinkCompare module uses visualization functions (interactive venn diagram, scatter plot, and sortable heat map) and meta-analysis to compare and integrate association results generated by the LinkFinder module, which supports multi-omics analysis in a cancer type or pan-cancer analysis.

LinkedOmics provides a unique platform for biologists and clinicians to access, analyze and compare cancer multi-omics data within and across tumor types.

Şekil 2.22. LinkedOmics veri portal web sitesi ana sayfasından kesit (<http://www.linkedomics.org/>).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 KULLANILAN MATERYALLER

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’ de verilmiştir.

3.1.2 Hücre Hatları ve Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 2’ de verilmiştir.

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Ekler bölümünde Tablo 3’ te verilmiştir.

3.1.4 Kullanılan Tamponlar

Çalışmada kullanılan tamponların içeriği Ekler bölümünde Tablo 4’ de verilmiştir.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 TCGA Veri Tabanında Yer Alan BHRHK Hastalarında AMPK ve miR-33a İfadeleri ile Klinikopatolojik Özellikler Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi.

TCGA verilerine, Kasım 2023’ te berrak hücreli renal karsinoma (Kidney Renal Clear Cell Carcinoma, KIRC) kohortu (TCGA-KIRC) olarak adlandırılan BHRHK’ li hastalar için açık erişimli cBioPortal, UCSC Xena, UALCAN ve LinkedOmics veritabanları aracılığıyla erişildi. Bu web portalları üzerinden TCGA verilerine erişilmiş ve analiz için ön veri setleri kullanılmıştır. Bu veri setlerindeki tüm analizler her bir portalın içerisinde yerleşik çevirim içi istatistiksel araçlar

kullanılarak uygulandı. Kullanılan istatistiksel yöntemler aşağıda her bir veri portalı için verilen detaylı açıklamalarda belirtildi.

3.2.1.1 cBioPortal Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri

Bu portal üzerinden, başlangıçta, AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinde (RNA-seq V2, RSEM, log2) normal dokuya oranla ifade düzeylerinde değişim olup olmadığının yüzdesel olarak belirlenmesi amaçlandı. Takiben, kanserli dokularda AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadeleri çevirim içi ki-kare testi ile patolojik tümör derecesine, tümör çapına dayalı patolojik tümör T evresine (pT evresi), lenf nodu tutulumuna dayalı patolojik N evresine (pN evresi) ve tümör yayılımına dayalı patolojik M evresine (pM evresi) göre karşılaştırıldı. Son olarak, bu gen ekspresyonlarında değişim olan ve olmayan hasta gruplarında çevirim içi Kaplan-Meier eğrisi ve Log-rank test değerlendirmeleriyle sağ kalım analizleri uygulandı. Şekil 3.1' de web portalına ait AMPK 1 analizi (Bu veri portalında AMPK 1 geni, diğer bir isimlendirmesi olan PRKAA 1 adıyla kodlandığından, bu isim ile veri girişi sağlanmıştır) için ilk giriş sayfası gösterilmektedir. İfade seviyelerindeki değişiklik için medyandan standart sapmaları temsil eden Z skor eşik değeri ± 2.0 olarak kabul edildi.

cBioPortal
FOR CANCER GENOMICS

Data Sets Web API Tutorials/Webinars FAQ News Visualize Your Data About cBioPortal Installations

Query Quick Search **Beta!**

Selected Studies: [Modify](#) Kidney Renal Clear Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas) (512 total samples)

Select Genomic Profiles:

- ☐ Mutations
- ☐ Structural Variant
- ☐ Putative copy-number alterations from GISTIC
- ☒ mRNA Expression. Select one of the profiles below:
 - ☐ mRNA expression z-scores relative to diploid samples (RNA Seq V2 RSEM)
 - ☐ mRNA expression z-scores relative to all samples (log RNA Seq V2 RSEM)
 - ☒ mRNA expression z-scores relative to normal samples (log RNA Seq V2 RSEM)
- Enter a z-score threshold $\pm$ 2.0
- ☐ Protein expression z-scores (RPPA)

Select Patient/Case Set:
To build your own case set,
try out our enhanced Study View.

All samples (512)

Enter Genes:

Hint: Learn Onco Query Language (OQL) to write more powerful queries

User-defined List

PRKAA1

All gene symbols are valid.

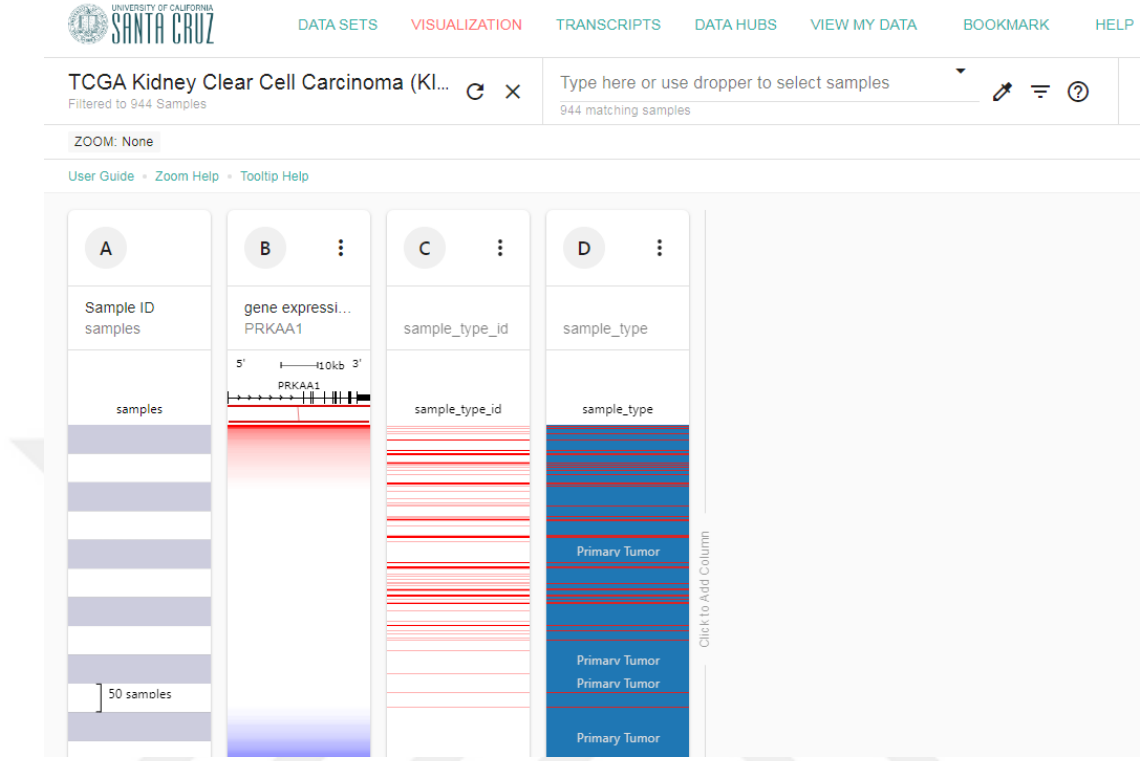
Submit Query

Şekil 3.1. cBioPortal veri portalı üzerinden AMPK 1 mRNA ifadesi analizi için veri giriş aşamasının ekran görüntüsü görseli. (Bu veri portalında AMPK 1 geni, diğer bir isimlendirmesi olan PRKAA 1 adıyla kodlandığından, bu isim ile veri girişi sağlanmıştır.)

3.2.1.2 UCSC Xena Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri

Bu portal üzerinden, TCGA veri setinde kayıtlı BHRHK hastalarına ait primer tümör dokusu ve normal doku örneklerindeki AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadeleri [RNA-Seq, log2 (norm_count+1)] karşılaştırıldı. Karşılaştırmada çevirim içi bağımsız t- test kullanıldı ve box-plot grafik elde edildi. Takiben, kanserli dokularda AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadeleri patolojik tümör derecesine, pT evresi, pN evresi ve pM evrelerine göre karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmalarda ise çevirim içi One-way Anova testi kullanıldı ve box-plot grafikler elde edildi. Son olarak, kanserli doku AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin BHRHK hastalarında toplam sağkalım (Overall survival, OS) ve hastalığa özgü sağkalım (Disease specific survival, DSS) üzerine etkileri çevirim içi Kaplan-Meier eğrisi ve Log-rank test değerlendirmeleriyle irdelendi. Şekil 3.2' de web portalına ait AMPK 1 analizi (Bu veri portalında AMPK 1 geni, diğer bir isimlendirmesi olan PRKAA 1 adıyla

kodlandığından, bu isim ile veri girişi sağlanmıştır) için ilk giriş sayfası gösterilmektedir.



Şekil 3.2. UCSC Xena veri portalı üzerinden AMPK 1 mRNA ifadesi analizi için veri girişi aşamasının ekran görüntüsü görseli. (Bu veri portalında AMPK 1 geni, diğer bir isimlendirmesi olan PRKAA 1 adıyla kodlandığından, bu isim ile veri girişi sağlanmıştır.)

3.2.1.3 UALCAN Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri

Bu portal üzerinden, TCGA veri setinde kayıtlı BHRHK hastalarına ait primer tümör dokusu ve normal doku örneklerindeki CPTAC veri tabanı kökenli AMPK 1 ve AMPK 2 protein ifadeleri karşılaştırıldı. Bu aşamada protein ifadelerine ait medyandan standart sapmaları temsil eden medyan Z skor değerleri (Bu veri portalında, CPTAC’ den alınan log2 spektral sayım oranı değerleri önce her bir numune profili içinde normalleştirilmiş, ardından numuneler arasında normalleştirilmiştir) çevirim içi bağımsız t- test ile kıyaslandı ve box-plot grafik elde edildi. Takiben, kanserli dokularda AMPK 1 ve AMPK 2 protein ifadeleri patolojik tümör derecesine göre karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmalarda ise çevirim içi One-way Anova testi kullanıldı ve box-plot grafikler elde edildi. Şekil 3.3’ de web portalına ait AMPK 1 analizi (Bu veri portalında AMPK 1 geni, diğer bir isimlendirmesi olan

PRKAA 1 adıyla kodlandığından, bu isim ile veri girişi sağlanmıştır) için ilk giriş sayfası gösterilmektedir.

Welcome to UALCAN analysis page.

Yes! You All Can

The **U**niversity of **AL**abama at Birmingham **CAN**cer data analysis Portal

TCGA GeneTCGA miRNATCGA lncRNAPrognostic markers

Scan by gene(s)

Enter gene symbol(s)

PRKAA1

TCGA dataset

Kidney renal clear cell carcinoma ▼

ExploreClear form

Şekil 3.3. UALCAN veri portalı üzerinden AMPK 1 protein ifadesi analizi için veri giriş aşamasının ekran görüntüsü görseli. (Bu veri portalında AMPK 1 geni, diğer bir isimlendirmesi olan PRKAA 1 adıyla kodlandığından, bu isim ile veri girişi sağlanmıştır.)

Takiben, yine bu portal üzerinden, TCGA veri setinde BHRHK olgularında miR33a ifadesinin (miRNA-seq, RPM) primer tümör dokusu ve normal dokudaki ifade düzeyleri değerlendirilip bağımsız t testi ile karşılaştırıldı. Primer tümör dokularında ise patolojik tümör derecesine göre miR-33a ifadelerinin karşılaştırılması da One-way Anova testi kullanılarak yapıldı. Son olarak, TCGA-KIRC kohortundaki BHRHK olgularında mir-33a ifadesi ile sağ kalım arasındaki ilişki Kaplan-Meier eğrisi ve Log-rank test değerlendirmeleriyle irdelendi. Şekil 3.4’ de web portalına ait miR-33a analizi için ilk giriş sayfası gösterilmektedir.

Welcome to UALCAN analysis page.

Yes! You All Can

The University of Alabama at Birmingham Cancer data analysis Portal

TCGA Gene

TCGA miRNA

TCGA lncRNA

Prognostic markers

Scan by miRNA(s)

Enter miRNA identifier(s)

TCGA dataset

Kidney renal clear cell carcinoma

Explore

Clear form

Şekil 3.4. UALCAN veri portalı üzerinden mir-33a ifadesi analizi için veri giriş aşamasının ekran görüntüsü görseli.

3.2.1.4 LinkedOmics Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri

Bu portal üzerinden, TCGA veri setinde kayıtlı BHRHK hastalarına ait kanserli doku örneklerindeki miR-33a (miRNA-seq, RPKM, log2) ifade değerleri ile AMPK 1 ve AMPK 2 gen ifade düzeyleri arasındaki korelasyonu belirlemek için çevirim içi Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Şekil 3.5’ de web portalına ait miR-33a korelasyon analizi için ilk giriş sayfası gösterilmektedir.

LinkedOmics
Analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types

New Analysis

- Select Cancer Type
- Select Search dataset, for ex. Mutation datatype
- Select Specific Population (optional)
- Select Search attribute, for ex. TP53
- Select Target dataset, for ex. mRNA Expression (RNAseq) datatype
- Select Statistical Method
- Click 'SUBMIT' button

Analyzed Results

STEP-1: SELECT CANCER COHORT

Show 5 entries

Cancer Type	Sample cohort
Kidney renal clear cell carcinoma (KIRC)	☒ TCGA_KIRC
Acute Myeloid Leukemia (LAML)	☐ TCGA_LAML
Adrenocortical carcinoma (ACC)	☐ TCGA_ACC
Bladder urothelial carcinoma (BLCA)	☐ TCGA_BLCA
Brain Lower Grade Glioma (LGG)	☐ TCGA_LGG

Showing 1 to 5 of 63 entries

STEP-2: SELECT SEARCH DATASET

Show 5 entries

Select	Sample cohort	Institute	Data type	Platform	Date	Institute	Analysis level	Pipeline
☒	TCGA_KIRC	BDGSC	miRNASeq	HS miR	01/29/2016	BI	Gene	Firehose_RPKM_log2
☐	TCGA_KIRC	BDGSC	miRNASeq	GA miR	01/29/2016	BI	Gene	Firehose_RPKM_log2
☐	TCGA_KIRC	BDGSC	miRNASeq	GA miR	01/29/2016	BI	Isoform	Firehose_RPKM_log2
☐	TCGA_KIRC	BI	SCNA	SNP 6.0	01/29/2016	BI	Focal	Firehose_GISTIC2
☐	TCGA_KIRC	BI	SCNA	SNP 6.0	01/29/2016	BI	Focal	Firehose_GISTIC2_threshold

Showing 1 to 5 of 16 entries

STEP-2b: SELECT SAMPLE DATASET (Optional)

Click to view

STEP-3: SELECT SEARCH DATASET ATTRIBUTE

hsa-mir-33a

STEP-4: SELECT TARGET DATASET

Show 5 entries

Select	Sample cohort	Institute	Data type	Platform	Date	Institute	Analysis level	Pipeline
☐	TCGA_KIRC	UNC	RNAseq	GA RNA	01/29/2016	BI	Gene	Firehose_RSEM_log2
☒	TCGA_KIRC	UNC	RNAseq	HiSeq RNA	01/29/2016	BI	Gene	Firehose_RSEM_log2
☐	TCGA_KIRC	MDA	RPPA	MDA RPPA	01/29/2016	BI	Analyte	Firehose_RPPA
☐	TCGA_KIRC	MDA	RPPA	MDA RPPA	01/29/2016	BI	Gene	Firehose_RPPA
☐	TCGA_KIRC	BDGSC	miRNASeq	GA miR	01/29/2016	BI	Gene	Firehose_RPKM_log2

Showing 1 to 5 of 16 entries

STEP-5: SELECT STATISTICAL METHOD

Spearman Correlation test

Submit Query

Şekil 3.5. LinkedOmics veri portalı üzerinden miR-33a ve AMPK 1/2 korelasyon analizi için veri giriş aşamasının ekran görüntüsü görseli.

3.2.2 BHRHK Hücre Hatlarında AMPK ve miR-33a İfade Seviyelerinin Belirlenmesi için Hücre Kültürü Yöntemleri

Bu araştırmada BHRHK hücre hatları olan A-498 (BHRHK alt tipi bazı araştırmacılar tarafından çelişkili kabul edilse de, literatürde BHRHK olarak kabul edilir [Brodaczewska KK vd., 2016]) ve Caki-1 hücreleri kullanıldı. A-498 hücreleri için %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve 100 µg/ml penisilin/streptomisin eklenmiş EMEM (Eagle' s Minimum Essential Medium) besiyeri kullanılırken, Caki-1 hücreleri için %10 FBS ve 100 µg/ml penisilin/streptomisin içeren McCoy's 5A besiyeri kullanıldı. Tüm hücreler 37 °C' de, %5 CO2 ve %20 O2 içeren inkübatörde kültüre edildi.

Hücrelerin pasajı için, besiyeri mediyumu uzaklaştırılarak arındırılmış hücre tabakaları pH= 7.4 fosfat tamponlu salin (PBS, Thermo fisher, USA) ile yıkanıp 37 °C inkübatörde 5 dakika boyunca 2 mM PBS içeren solüsyonda tripsin (0.5 g/L) ile muamele edildi. Tripsin aktivitesini bloke etmek için hücreler, eklenen tripsin hacminin iki katı hacimde %10 FBS içinde toplandı ve 300 x g' de 5 dakika santrifüj edildi.

Takiben, hücre sayımı değerlendirmesi için, süpernatant atıldı ve pellet yeniden Complet mediya ile süspanse edilerek yeterli seyreltme sağlandı ve süspansiyonun 10 µl' lik alikotları hemositometreye yerleştirildi. Alanın dört köşesindeki karelerdeki hücreler inverted mikroskop kullanılarak sayıldı ve ardından ortalama hücre sayısı hesaplandı. Mililitre başına hücre sayısı “(sayılan hücre sayısının ortalaması x seyreltme faktörü) / (1 kare alan x hazne derinliği)” formülüne göre belirlendi.

3.2.3 BHRHK Hücre Hatlarında AMPK 1 Proteini α Katalitik Alt Birim (AMPK 1 α) İfadelerinin Belirlenmesi için Protein İzolasyonu

3.2.3.1 BHRHK Hücrelerinden Protein İzolasyonu

Hücreler 60 mm hücre kültür kaplarında büyütüldükten sonra 1X PBS ile yıkanıp ve 1X PBS eklenerek hücre kazıyıcı yardımıyla kazınarak toplandı. Eppendorf tüplerine toplanan hücreler, 1X Proteaz inhibitör kokteyli içeren Hücre Lizis Çözültisi (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent) ile 20 dk. inkübasyon sonrası 16.000 x g' de 20 dakika +4 °C' de santrifüj edilerek süpernatant total protein lizatı olarak temiz tüplere alındı ve -20 °C' de saklandı.

3.2.3.2 İzole Edilen Proteinlerin Bradford Yöntemi ile Miktar Tayini

Elde edilen proteinlerin miktarları Bradford yöntemi uygulanarak saptandı. Bu amaçla, total protein lizatı örneğinden 1 µl alınıp 1,5 µg, 3 µg, 4,5 µg, 6 µg ve 7,5 µg gibi artan oranlarda Bovine Serum Albumin (BSA) eklendikten sonra 96- kuyucuklu plakanın kuyucuklarına eklendi. Akabinde, kuyucuklara 200 µl Bradford Solüsyonu ilave edilip 5 dakika oda sıcaklığında ışık almayan ortamda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, mikropilaya okuyucuda 595 nm' de absorbans ölçümü yapıldı. Ölçüm

sonrası, örnek miktarları konsantrasyon ve absorbens değerlerine dayanan konsantrasyon- absorbens grafiği ve standart eğrisi denklemine göre hesaplandı.

3.2.3.3 İmmunoblotlama

- **Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)- Poliakrilamid Jelin Hazırlanması**

Bradford yöntemi ile protein miktarları tespit edildikten sonra immunoblotlamanın ilk aşaması için %12' lik poliakrilamid jelde protein ağırlıklarına göre ayrıştırma uygulandı. Bu aşamada hazırlanan jelin içeriği Ekler bölümünde Tablo 5' de verilmiştir. İlk olarak %12' lik yürütme jeli içeriği hazırlanıp, bu jel 1 mm boşluğa sahip camlar arasına dökülmüş ve üzerlerine izopropanol eklenmiştir. Dökülen jel polimerleştikten sonra izopropanol uzaklaştırılmış ve fazla izopropanol filtre kağıdı ile temizlenmiştir. Daha sonra %4' lük yükleme jeli içeriği hazırlanmış ve yürütme jelinin üzerine dökülmüştür. 1 mm boşluklu cama uygun taraklar camlar arasına yerleştirilerek yükleme jeli polimerleşmeye bırakılmıştır.

- **Protein Örneklerinin Hazırlanması ve SDS-Poliakrilamid Jele Yüklmesi**

Bradford yöntemiyle tayin edilen 40 µg protein örneği 5X Laemmli yükleme tamponu ile 4:1 oranında karıştırıldıktan sonra 95 °C' de 5 dakika inkübe edildi. Daha önceden hazırlanmış olan jellerdeki taraklar çıkarılarak dikey elektroforez sistemine yerleştirildi ve camlar arasına ve tankın içine SDS-PAGE yürütme tamponu ilave edildi. Hazırlanan örnekler 10000 x g' de 30 saniye +4 °C' de santrifüj edildikten sonra ilk kuyucuğa protein marker ve diğer kuyucuklara örnekler yüklendi. Yükleme sonrasında 70-80 V' ta yaklaşık 3 saat yürütme gerçekleştirildi. Bu işlem tamamlandıktan sonra, jelde ayrılan proteinler poliviniliden florür (PVDF) membrana transfer edildi.

- **Proteinlerin Membrana Transfer Edilmesi ve Bloklama**

Yürütme işlemi sonrası yükleme jeli ayrıştırıldıktan sonra yürütme jeli ele alınıp önce distile suya sonra transfer tamponuna alındı. Metanol içerisinde aktifleştirilmiş PVDF membran da distile suyla muamele sonrası filtre kağıtları ve süngerler ile birlikte transfer tamponuna alındı. Takiben, sünger-filtre kağıdı- membran-jel-filtre kağıdı-sünger sırasıyla hazırlanmış olduğumuz transfer sandviç aparatı transfer tankına alınıp tankın transfer tamponu ile doldurulmasıyla bir sonraki aşamaya geçildi. Bu aşamada, 220 A akımda protein büyüklüklerine göre 20 dakika-1 saat

arası süre içerisinde membrana transfer gerçekleştirildi. Transfer sonrası membran %5' lik yağsız bloklama sütüne çözeltisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

- **Membrana Antikor Uygulaması ve Görüntü Alınması**

Yağsız süt çözeltisinde bloklanan membranlar, sırasıyla 1:500-1:1000 ve 1:1000-1:3000 aralığında kullanılan primer ve sekonder AMPK antikorları ile +4 °C' de bir gece inkübe edildikten sonra 1X TBS-Tween ile üç defa 15' er dakika yıkandı. Takiben, bu membran HRP-bağlı sekonder antikora alınarak +4°C' de yine gece boyu inkübe edildi. Gece sonunda, inkübasyon bitimiyle membranlar üç defa 10' ar dakika TBS-T ve bir defa 5 dakika TBS ile yıkandı. Görüntülerin eldesi için ECL kemiluminesans kit solüsyonları olan A ve B tampon çözeltileri 1:1 oranında karıştırılıp 5 dakika inkübe edildikten sonra membranlar bu çözeltiye alınarak üç dakika beklenilmesinin ardından membran görüntüleme karışımı hazırlandı. Sonrasında kemiluminesans görüntüleme sisteminde kemilünesans ışımalar ChemiDoc Görüntüleme Sistemi ile görüntülendi.

3.2.4 BHRHK Hücre Hatlarında miR-33a İfade Seviyelerinin Kantatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q PCR) ile Gösterilmesi

3.2.4.1 miRNA İzolasyonu

Hücreler 60 mm hücre kültür kaplarında büyütüldükten sonra QIAzol solüsyonu ile inkübe edildikten sonra hücrelerden miRNeasy Mini Kit protokolüne uygun olarak miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu aşamada, hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak QIAzol solüsyonu eklenmesini takiben kültür kabının yüzeyi yıkanarak hücrelerin kalkması ve parçalanması sağlandı. Akabinde, parçalanmış hücrelerde nükleoproteinlerin optimal parçalanması için kaldırılan hücreler 1,5 ml santrifüj tüpünde toplanarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Bu hücre lizatının üzerine kloroform eklenerek 15 sn vorteks yardımıyla çalkalanmasından sonra, lizat oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Takiben tüpler 12.000 x g' de 15 dk +4 °C' de santrifüj edildikten sonra üst şeffaf faz temiz bir 1,5 ml santrifüj tüpüne alınarak üzerine %70 etanol eklenip vorteks elle karıştırıldı ve sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Bu karışım daha sonra RNeasy MinElute Spin Kolonuna aktarıldı ve oda sıcaklığında 8000 x g' de 15 saniye boyunca santrifüj edildi. Sonrasında spin kolonlara RWT tamponu eklenerek, 8000g' de 15 saniye santrifüj edilmek suretiyle kolonlar yıkandı. Akabinde, kolonlara iki kez üst üste RPE tamponu eklenerek

santrifüj işlemi tekrarlandı ve kolonlar maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmek suretiyle kurutuldu. Buna müteakip, örnek 1.5 mL' lik steril tüplere aktarıldıktan sonra, 50 µL RNaz içermeyen saf su eklenerek 8000 x g' de 1 dakika santrifüj edilip miRNA' larca zengin 200 nt' ten kısa RNA' lar toplandı ve RNA' ların varlığı ve kalitesi % 1.5 agaroz jelde 150V' da elektroforez edilerek kontrol edildi ve NanoDrop spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı. Sonuç olarak, miRNA' lar cDNA sentez reaksiyonu için hazır hale getirildi ve örnek -80 °C' de saklandı.

3.2.4.2 İzole Edilen miRNA' ların cDNA' lara Çevrimi

İzolasyonu yapılan total miRNA örnekleri miScript II RT kiti kullanılarak cDNA' ya çevrildi. Kit üretici protokolüne göre kullanıldı. Buna göre, 2 µl 10x miScript Nükleik karışımı, 4 µl 5x miScript Hispect solüsyonu, 2 µl miScript Revers Transkriptaz Karışımı ve 2 µl RNAaz içermeyen su' dan oluşan 10 µl' lik solüsyon oluşturularak buna daha önceden elde ettiğimiz total miRNA solüsyonundan 10 µl eklenerek 20 µl' lik örnekler oluşturuldu. Akabinde, transkriptaz inhibisyonu için 95 °C' de 5 dk inkübasyon gerçekleştirildi ve örnekler buz üzerinede soğutulduktan sonra -20 °C' de saklandı.

3.2.4.3 Kantatif Gerçek Zamanlı Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantative Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction, RT-qPCR)

Hücre hatlarımızda miR-33a ifadeleri tek basamaklı RT-qPCR ile kantatif olarak değerlendirildi. RT-qPCR için koşullar şu şekilde ayarlandı: 94 °C' de 15 sn denatürasyon, 55 °C' de 30 sn bağlanma, 70 °C' de 30 sn uzama döngüsü 40 defa tekrarlandı. Reaksiyon en az iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş olup, elde edilen Ct değerleri endojen kontrol U6 küçük nükleer RNA (U6 small nuclear RNA, RNU6B)' ye göre normalize edilerek analiz edildi. Bu bağlamda, hem hedeflenen miRNA' ya özgü primer ve prob kullanılmış hem de referans olarak seçilen RNU6B' ye özgü primer ve prob kullanılarak ifade seviyeleri belirlendi. Öncelikle iki ayrı tüpte RNU6B ve miR-33a primerleri için ayrı ayrı 10 µl 2X SYBR Green Karışımı, 2 µl 10X miScript Universal Primer, 2 µl 10X miScript Primer Assay, 2 µl Kalıp cDNA ve 4 µl RNaz içermeyen su kullanılarak 20 µl' lik karışım hazırlandı. Karışım, 96' lık plakalara her bir kalıp için ikişer ölçüm yapılmak üzere yerleştirildi. Bu şekilde elde edilen plakalar CFX Connect RT- PCR cihazına yerleştirilerek yukarıda da

belirtildiği gibi 94 °C’ de 15 sn denatürasyon, 55 °C’ de 30 sn bağlanma, 70 °C’ de 30 sn uzama döngüsüyle 40 defa tekrarlanarak RT-qPCR gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası elde edilen Ct değerleri kullanılarak ΔC_t üzerinden hücrelerdeki miRNA ekspresyonlarındaki kat değişimi (fold change, FC) hesaplanmıştır. miR-33a için 5’-TGGATATCCACACCAGGGTCCGAGGTATTCCGGTGTGGATATCCATGCAATG primer dizisi, RNU6B için ise 5’ CACGGAAGCCCTCACACCGTGTCTGTTTC primer dizisi kullanılmıştır.

3.2.5 BHRHK Hücrelerine miR-33a-mimik ve Anti-miR-33a Transfeksiyonu

3.2.5.1 miR-33a Mimik Transfeksiyonu

Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde bir gün önceden ekilip, tutunarak çoğalmaları sağlandı. Ertesi gün 2,5 µl 20 nM miR-33a-mimik solüsyonu ile 122,5 µl serum içermeyen besiyeri (OptiPRO SFM) bir tüpte karıştırılarak 125 µl’ lik karışım elde edildi. Eş zamanlı olarak, başka bir tüpte 2,5 µl Lipofectamine RNAiMAX reaktifi, 122,5 µl serum içermeyen besiyeri (OptiPRO SFM) ile karıştırılarak ikinci bir 125 µl’ lik karışım elde edildi ve her ikisi de 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. miR-25-mimik negatif kontrolü için de aynı işlemler yapıldı. Takiben, miR-33a-mimik içeren besi yeri ile Lipofectamine RNAiMAX reaktifi içeren besi yerleri birbiri ile karıştırılarak 250 µl’ lik karışım oluşturuldu. Yine benzer şekilde, miR-25-mimik negatif kontrolü içeren besi yeri ile Lipofectamine RNAiMAX reaktifi içeren besi yerleri birbiri ile karıştırılarak 250 µl’ lik bir karışım daha elde edildi. Hazırlanan her iki karışım da 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerin üzerinden mevcut besiyeri [A-498 hücrelerinde EMEM ve Caki-1 hücrelerinde McCoy’s 5A uzaklaştırılarak yerine 2250 µl serum içermeyen besiyeri (OptiPRO SFM) eklendi. Daha sonra, miR-33a-mimik + Lipofectamine RNAiMAX reaktifi karışımından 250 µl her bir kuyucuğa eklendi. Negatif kontrol olarak kullanılacak kuyucuğa ise 250 µl miR-33a-mimik negatif kontrol + Lipofectamine RNAiMAX reaktifi karışımı eklendi. Bu uygulamalardan sekiz saat sonra serum içermeyen besiyeri (OptiPRO SFM) uzaklaştırılarak, kuyucuklara yeniden eski besiyerleri (A-498 hücreleri için EMEM ve Caki-1 hücreleri için McCoy’s 5A) eklendi. Besi yeri değişiminden 24 ve 48 saat sonra miRNA izolasyonları için QIAzol solüsyonu eklenmesiyle yukarıda daha önce tanımladığımız şekilde miRNA izolasyonu yapıldı. Sonrasında ise, yine yukarıda

belirtilen şekilde elde edilen miRNA' lar cDNA' lara çevirilerek, RT-qPCR ile kantatif ölçümleri yapıldı.

3.2.5.2 Anti-miR-33a Transfeksiyonu

Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde bir gün önceden ekilip, tutunarak çoğalmaları sağlandı. Ertesi gün 15 µl 10 µM anti-miR-33a solüsyonu ile 110 µl serum içermeyen besiyeri (OptiPRO SFM) bir tüpte karıştırılarak 125 µl' lik karışım elde edildi. Eş zamanlı olarak, başka bir tüpte 2,5 µl Lipofectamine RNAiMAX reaktifi, 122,5 µl serum içermeyen besiyeri (OptiPRO SFM) ile karıştırılarak ikinci bir 125 µl' lik karışım elde edildi ve her ikisi de 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Anti-miR-33a negatif kontrolü için de aynı işlemler yapıldı. Takiben, anti-miR-33a içeren besi yeri ile Lipofectamine RNAiMAX reaktifi içeren besi yerleri birbiri ile karıştırılarak 250 µl' lik karışım oluşturuldu. Yine benzer şekilde, anti-miR-33a negatif kontrolü içeren besi yeri ile Lipofectamine RNAiMAX reaktifi içeren besi yerleri birbiri ile karıştırılarak 250 µl' lik bir karışım daha elde edildi. Hazırlanan her iki karışım da 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerin üzerinden mevcut besiyeri (A-498 hücrelerinde EMEM ve Caki-1 hücrelerinde McCoy's 5A) uzaklaştırılarak yerine 2250 µl serum içermeyen besiyeri (OptiPRO SFM) eklendi. Akabinde, bir önceki aşamada elde edilen karışımlar serum içermeyen besiyeri (OptiPRO SFM)' ne sahip hücrelerin olduğu sırasıyla deney ve negatif kontrol kuyucuklarına eklendi. Bu uygulamalardan sekiz saat sonra serum içermeyen besiyeri (OptiPRO SFM) uzaklaştırılarak, kuyucuklara yeniden eski besiyerleri (A-498 hücreleri için EMEM ve Caki-1 hücreleri için McCoy's 5A) ile birlikte baicalein eklendi. Bu işlemten 24 ve 48 saat sonra miRNA izolasyonları için QIAzol solüsyonu eklenmesiyle yukarıda daha önce tanımladığımız şekilde miRNA izolasyonu yapıldı. Sonrasında ise, yine yukarıda belirtilen şekilde elde edilen miRNA' lar cDNA' lara çevirilerek, RT-qPCR ile kantatif ölçümleri yapıldı.

3.2.6 AMPK ve miR-33a İfade Seviyesi ile İlişkili Olarak Düzenlenen Yağ Asidi Metabolizmasının Hücre içi Lipid Boyamayla İncelenmesi

BODIPY boyama yöntemi ile hücre içi nötral lipid taneciklerinin dağılımı değerlendirildi. Bu amaçla, miR-33a mimik ve anti-miR-33a transfeksiyonları başarıyla tamamlanan hücreler 2 µM BODIPY 493/503 ile oda sıcaklığında 15 dk

boyandı. Boyanan hücreler, daha sonra, floresan mikroskopunda (493/503 nm) analiz edildi.

3.2.6.1 BODIPY ile Floresan Boyama

miR-33a mimik ve anti-miR-33a transfeksiyonları başarıyla tamamlanan hücreler, 6 kuyucuklu petride kuyu başına 3×10^5 hücre/mL olacak şekilde yağ asidi içermeyen besiyeri (fatty acid free BSA) içinde 0,5' er mL ekilerek, 37 °C 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda, hücreler % 4 paraformaldehit ile oda ısısında 30 dk. fikse edildi ve ardından, % 0,1 Triton X-100 ile 15 dk. inkübe edilerek permeabilizasyon işlemi yapıldı. Eş zamanlı olarak, 1 mL dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülmüş 1,3 mg BODIPY 493/503 çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti 1:2,500 oranında dilüe edilerek 2 µM BODIPY 493/503 solüsyonu elde edildi. Takiben bu solüsyon ve yağ asidi içermeyen besiyeri (fatty acid free BSA) karışımından oluşan 0,5 mL hacminde 2X Invitrogen BODIPY 493/503 boya çözeltisi hazırlandı. Hemen sonrasında, bu karışım elle kuvvetlice çalkalayıp karıştırıldıktan sonra, hazırlık sonrası lam üzerine alınmış hücrelere eklendi ve hafifçe karıştırıldı. Ardından, oda sıcaklığında 15 dk. karanlık ortamda inkübe edilerek boyama sağlandı ve mikroskopta görüntüleme aşamasına geçildi. Hücreler floresan ataçmanlı mikroskopta aqua filtre ile 493 nm excitation / 503 nm emission dalga boylarında görüntülenerek fotoğraflar çekildi.

3.2.7 İstatistiksel Analiz

TCGA veri setleri üzerinden yapılan istatistiksel analizler, kullanılan web portalları üzerinden çevirim içi araçlar kullanılarak yapıldı ve kullanılan istatistiksel yöntemler yukarıda her bölüm altında belirtildi. Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve ortalamaları alınmıştır. RT-qPCR cihazında kaydedilen Ct değerleri kullanılarak 2-ΔCt yöntemi (kat değişimi, Fold change-FC) ile miRNA ifadesi analizleri yapıldı. Elde edilen verilerden GraphPad Prism6 programında istatistiksel analizler yapıldı. Kontrol grubundaki ve miR-33a mimik ve anti-miR-33a transfeksiyonları sonrası deney gruplarındaki miR-33a seviyelerinin çoklu karşılaştırmaları için non-parametrik Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Bütün sonuçlar için $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Protein ekspresyonlarındaki değişiklikler, membran görüntülerinin Image J programı ile analiz edilerek, sonuçlar, β-aktin protein ekspresyon oranları kullanılarak normalize edildi.

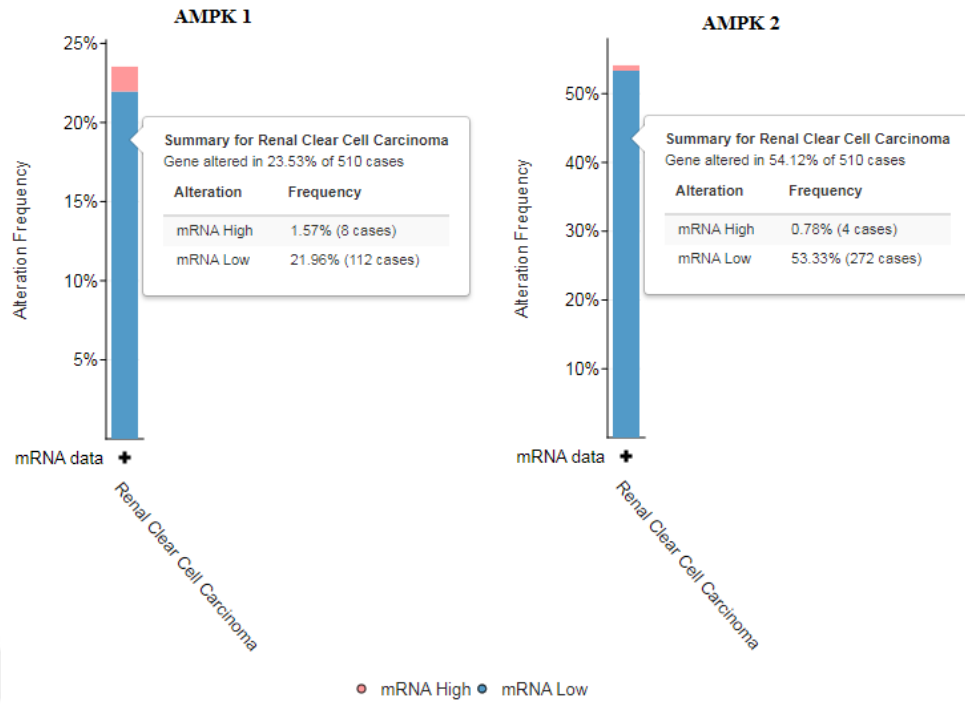
4 SONUÇLAR

4.1 TCGA Veri Setinde BHRHK Hastalarında AMPK ve miR-33a İfadeleri ile Klinikopatolojik Özellikler Arasındaki İlişkiler

4.1.1 cBioPortal Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri

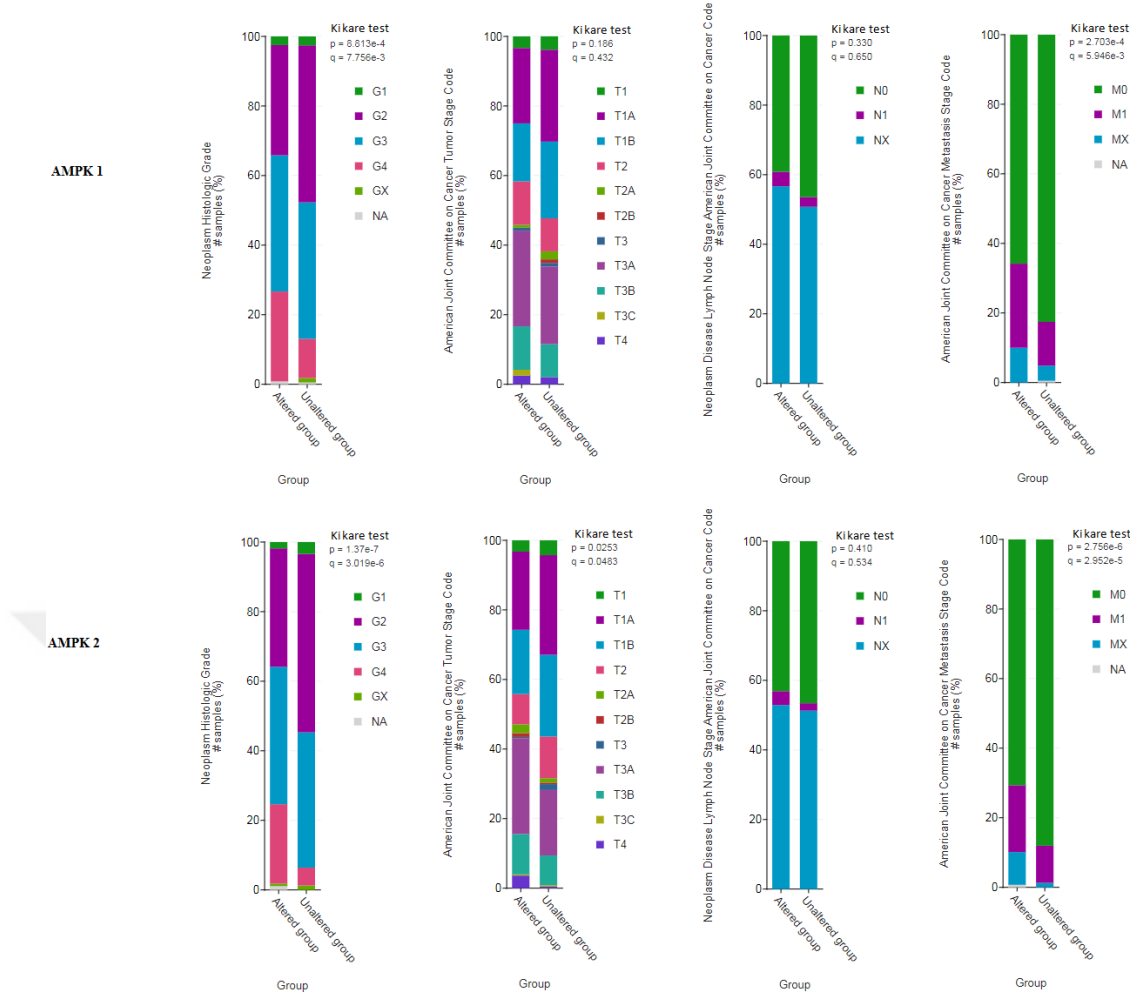
cBioPortal web portalında TCGA-KIRC verilerine AMPK 1 ve AMPK 2 ifadelerini değerlendirmek üzere erişildiğinde; median mRNA ifadeleri log2 RNA-seq V2, RSEM olarak ulaşılabilir 512 hasta örneği saptandı. Bu 512 hasta örneğinin tümünde mRNA ifade verileri, normal ve kanserli doku örnekleri, klinikopatolojik özelliklerden pT, Pn, OS ve DSS bilgileri mevcuttu. Patolojik tümör derecesi verileri olguların %99,4'ünde, pM verileri ise olguların %99,6'ında ulaşılabilirdi.

Olguların ne kadarında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinde etkilenme olduğu irdelendiğinde, 510 hastaya ait veriyi içeren sonuçlara ulaşıldı. Buna göre olguların %23,53'ünde AMPK 1 ifadesinde etkilenme (8 olguda artış, 112 olguda ise azalma), olguların %54,12'sinde ise AMPK 2 ifadesinde etkilenme (4 olguda artış, 272 olguda azalma) olduğu saptandı (Şekil 4.1).



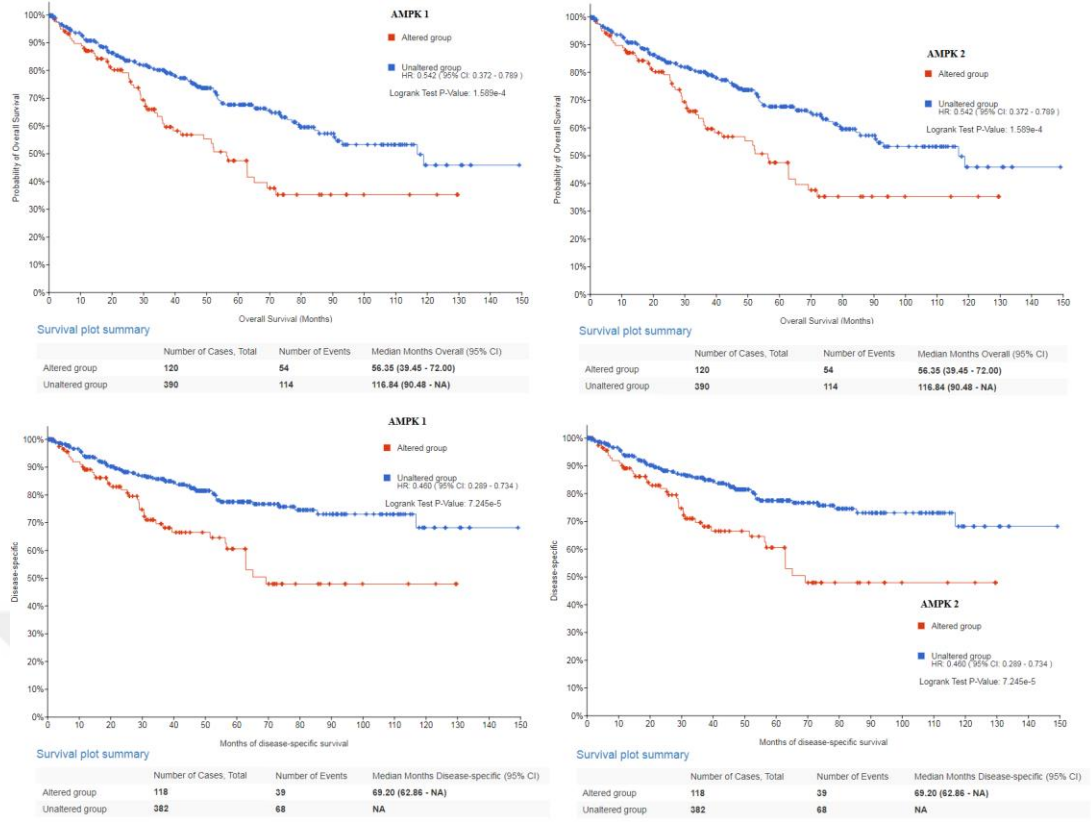
Şekil 4.1. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokularında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinde etkilenme oranları.

Bir sonraki analizde, patolojik AMPK 1 mRNA ifadesinde değişiklik olan grupta patolojik tümör derecesi grade 3 ve grade 4 hastalık oranı, değişiklik olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek saptandı. Benzer şekilde, metastatik hastalık oranı da mRNA ifadesinde değişiklik olan grupta anlamlı derecede daha yüksekti. Öte yandan, pT ve pN hastalık oranları her iki grupta benzerdi (Şekil 4.2). Bu bulgulara göre, büyük çoğunluğunda AMPK 1 mRNA ifadesinde azalma şeklinde değişiklik olan etkilenmiş grupta patolojik olarak daha kötü tümör parametreleri mevcuttu. Yani, sonuç olarak, AMPK 1 mRNA ifadesinde azalma kötü patoloji ile ilişkili olabilir. AMPK 2 mRNA ifadesinde değişiklik olan grupta da patolojik tümör derecesi grade 3 ve grade 4 hastalık oranı, değişiklik olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek saptandı. Buna ek olarak, pT3 ve pT4 hastalık oranları ile metastatik hastalık oranları da AMPK 2 mRNA ifadesinde değişiklik olan grupta anlamlı derecede daha yüksekti. pN hastalık oranları ise her iki grupta benzerdi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. TCGA-KIRC olgularında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinde etkilenme olan grup ile olmayan grup arasındaki klinikopatolojik özelliklerin karşılaştırılma sonuçları.

Son olarak, AMPK 1 ve AMPK 2 gen ifadelerinde değişim olan ve olmayan hasta gruplarında çevirim içi Kaplan-Meier eğrisi ve Log-rank test değerlendirmeleriyle sağ kalım analizleri uygulandı ve her iki genin de ifadeleri değişmiş olgularda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış OS ve DSS değerleri saptandı (Şekil 4.3).

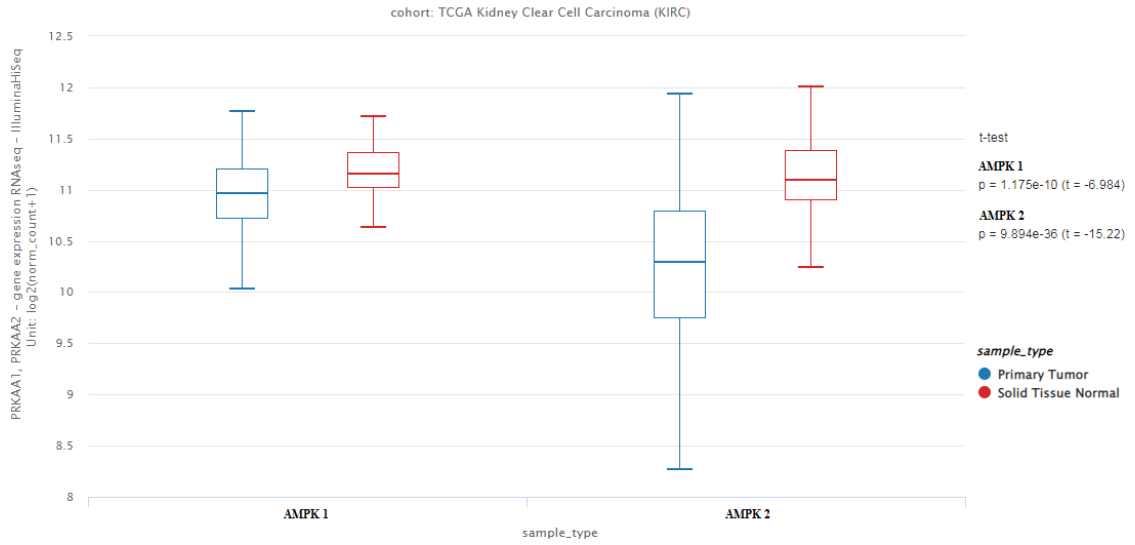


Şekil 4.3. TCGA-KIRC olgularında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinde etkilenme olan grup ile olmayan grup arasındaki sağ kalım parametreleri karşılaştırılması.

Büyük çoğunluğunu mRNA ifadesinde azalma olarak izlediğimiz AMPK 1 ve AMPK 2 gen ifadesi değişmiş olgu gruplarında sağ kalımların daha az olması, dolaylı olarak bu gen ifadelerinde azalmanın daha kötü sağ kalım ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

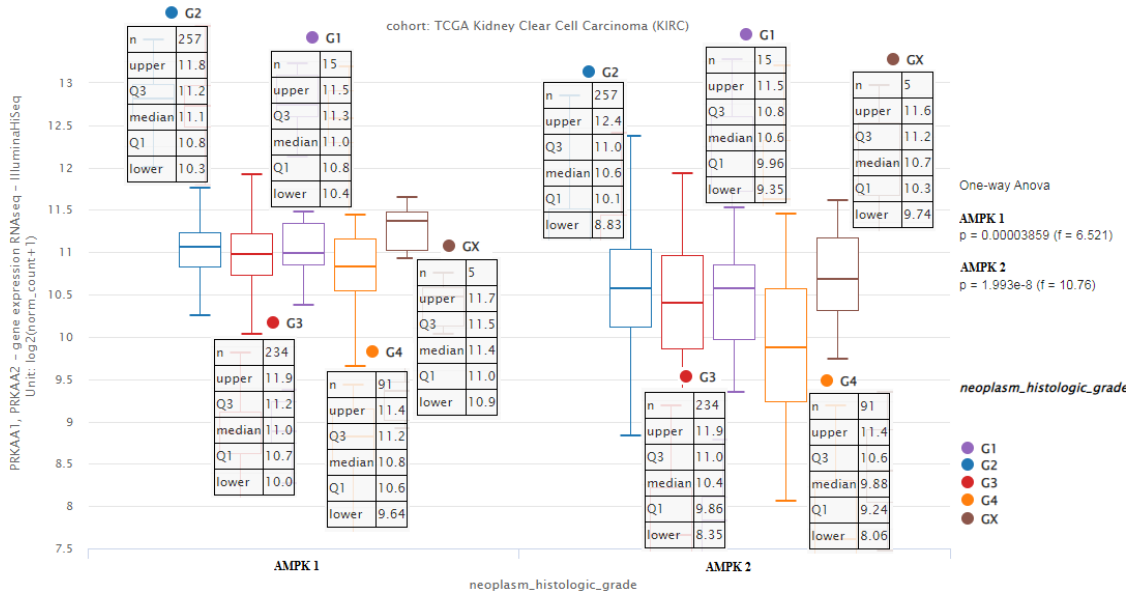
4.1.2 UCSC Xena Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri

Bu kısımdaki analiz sonuçlarımızda, TCGA veri setinde kayıtlı BHRHK hastalarına ait primer tümör dokusu (n= 533) ve normal doku (n= 72) örneklerindeki AMPK 1 mRNA ifade düzeyleri sırasıyla; median 11,0 (10,0-11,8) ve 11,2 (10,6-11,7) log2 (norm_count+1) olarak belirlendi (p= 1,175e⁻¹⁰, Şekil 4.4). AMPK 2 mRNA ifade düzeyleri ise sırasıyla 10,3 (8,27-11,9) ve 11,1 (10,2-12,0) log2 (norm_count+1) saptandı (p= 9,894e⁻³⁶, Şekil 4.4).



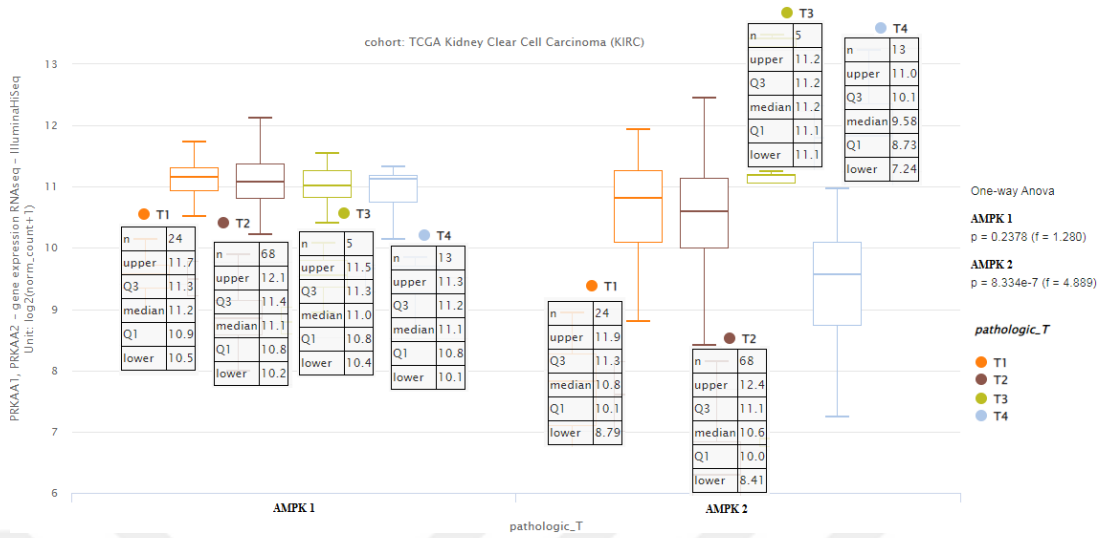
Şekil 4.4. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokusu ve normal dokudaki AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.

Kanserli dokularda AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadeleri patolojik tümör derecesine kıyaslandığında, her ikisi de yüksek dereceli olgularda anlamlı derecede daha az ifade edilmekteydi (sırasıyla; $p < 0,001$ ve $p = 1,993e^{-8}$, Şekil 4.5).



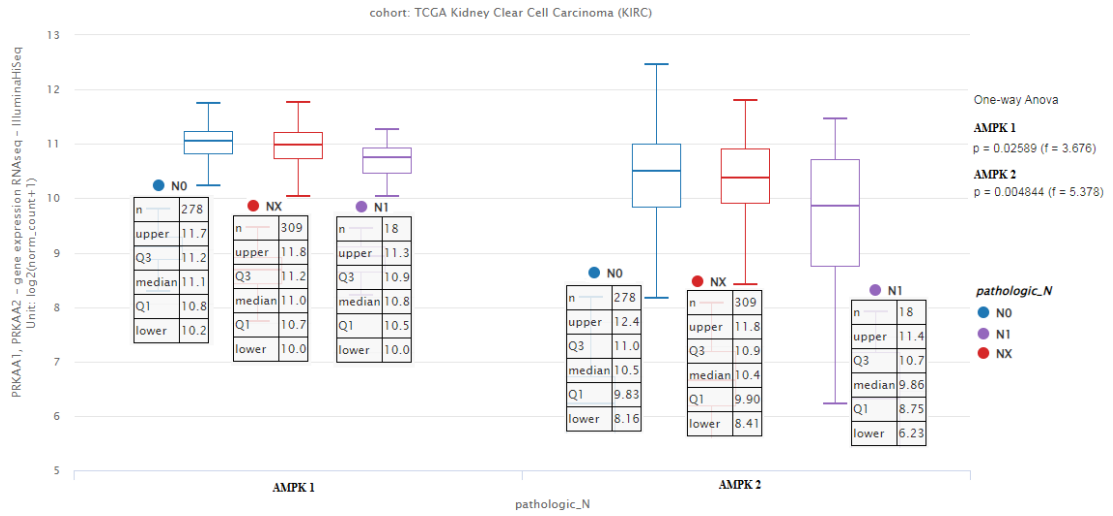
Şekil 4.5. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokularında patolojik tümör derecesine göre AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.

pT evresine göre kıyaslama yapıldığında AMPK 1 ifadesi anlamlı farklılık göstermezken, AMPK 2 ifadesi yüksek T evreli olgularda anlamlı derecede daha düşük saptandı (sırasıyla; $p = 0,23$ ve $p = 8,334e^{-7}$, Şekil 4.6).

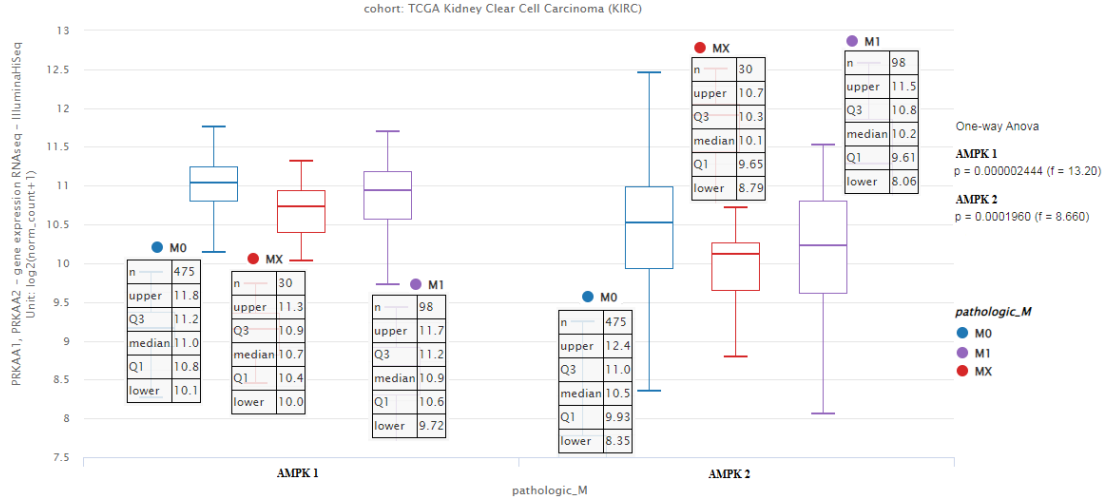


Şekil 4.6. TCGA-KIRC olgularında pT evresine göre AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.

pN evresi ve pM evrelerine göre yapılan kıyaslamalarda ise her iki gen ifadesinde de N+ ve M+ olgularda anlamlı derecede düşüklük saptandı (sırasıyla; $p = 0,02$ ve $p = 0,004$, Şekil 4.7, ve $p < 0,001$ ve $p < 0,001$, Şekil 4.8)

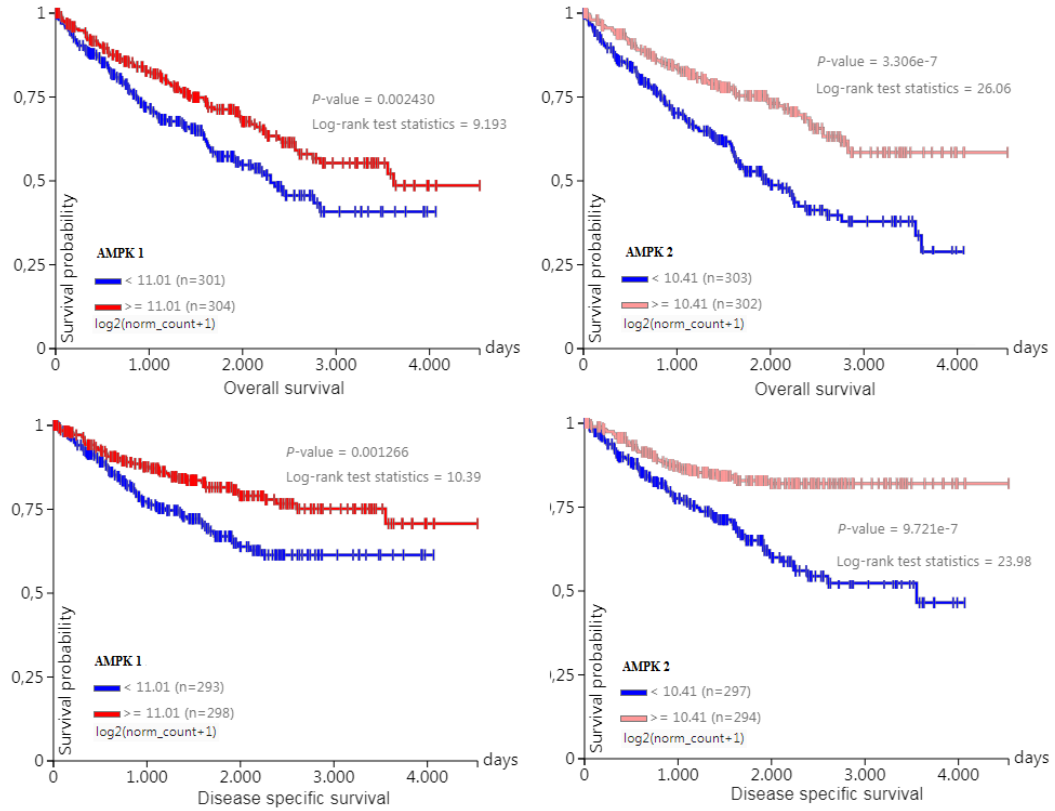


Şekil 4.7. TCGA-KIRC olgularında pN evresine göre AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.8. TCGA-KIRC olgularında pM evresine göre AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerinin karşılaştırılması.

Ayrıca, primer tümör dokularında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadeleri düşük olan BHRHK hastalarında, bu genlerin ifadeleri normal olan olgulara göre anlamlı derecede daha düşük OS ve DSS oranları saptandı (Şekil 4.9).

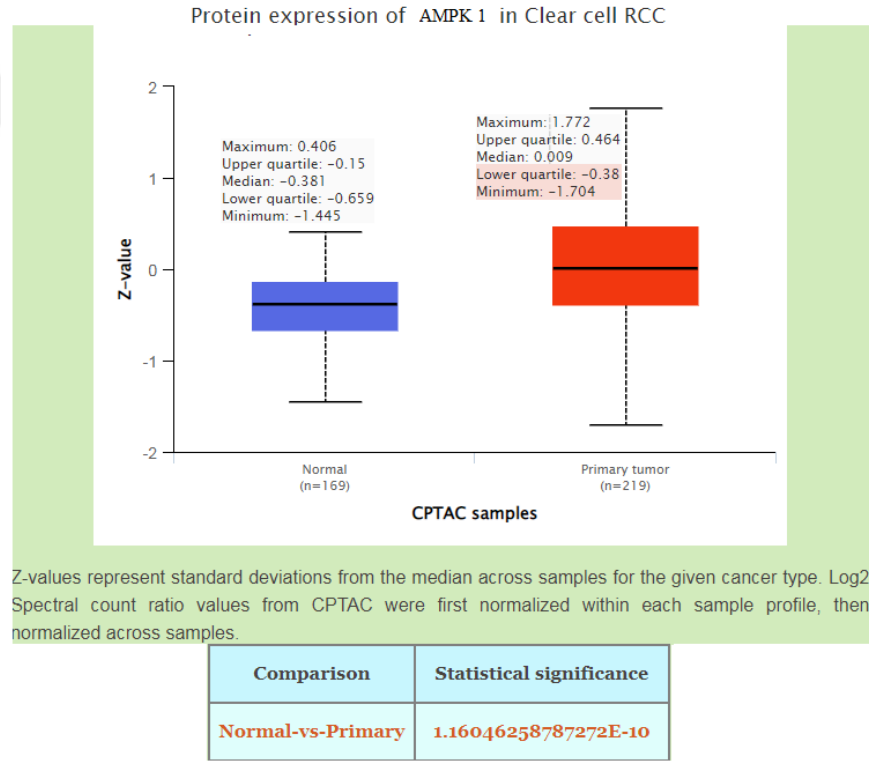


Şekil 4.9. TCGA-KIRC olgularında AMPK 1 ve AMPK 2 mRNA ifadelerine göre OS ve DSS grafikleri.

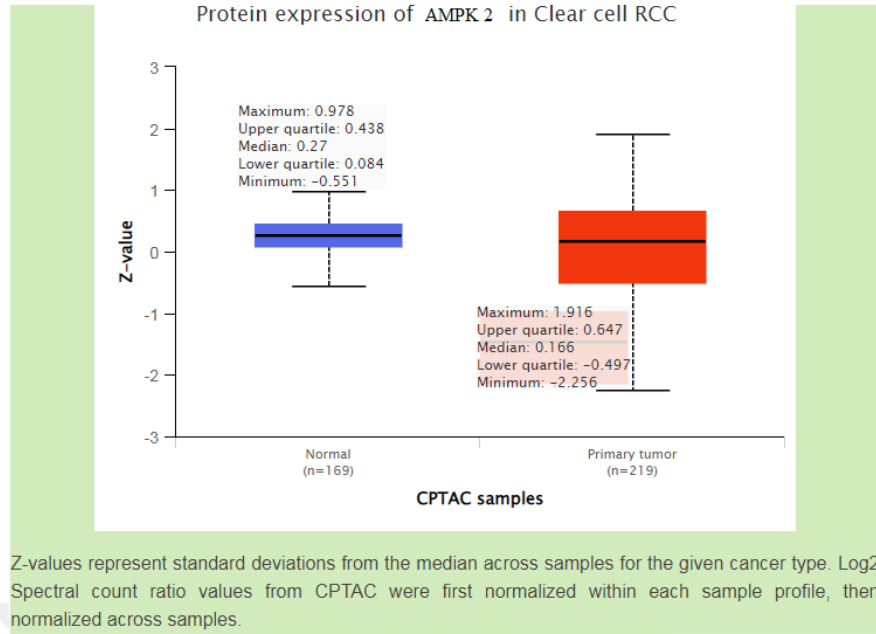
4.1.3 UALCAN Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri

UALCAN web portalında TCGA-KIRC verilerine AMPK 1 ve AMPK 2 protein ifadelerini değerlendirmek üzere erişildiğinde; median Z skorlar olarak ulaşılabilir 388 hasta örneği (219 primer tümör dokusu, 169 normal doku) saptandı.

BHRHK hastalarına ait primer tümör dokusu ve normal doku örneklerindeki CPTAC veri tabanı kökenli AMPK 1 ve AMPK 2 protein ifadelerinin karşılaştırılması sonucunda; transkripsiyon düzeyindeki bulguların tam tersine primer tümör dokularında AMPK 1 protein ifadesinin normal dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı [sırasıyla, median Z skorlar= -0,381 (-0,659 - -0,15) vs. 0,009 (-1,704 - 0,464), $p= 1,160e^{-10}$, Şekil 4.10]. Diğer yandan, AMPK 2 protein ifadesi ise primer tümör dokularında anlamlı derecede azalmış izlendi [sırasıyla, median Z skorlar= 0,166 (-0,497 - 0,647) vs. -0,27 (0,084 - 0,978), $p= 1,139e^{-2}$, Şekil 4.11].



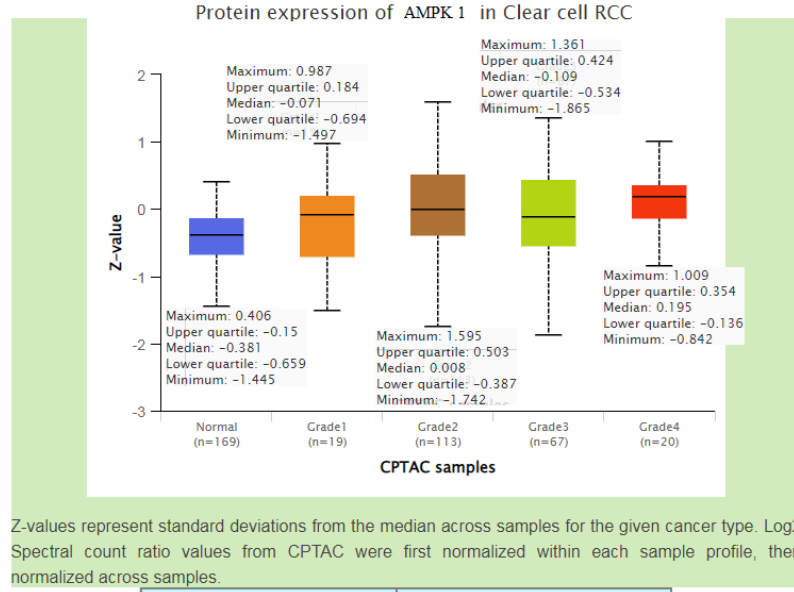
Şekil 4.10. TCGA-KIRC olgularında primer tümör ve normal doku örneklerinde AMPK 1 protein ifadeleri.



Comparison	Statistical significance
Normal-vs-Primary	1.394537E-02

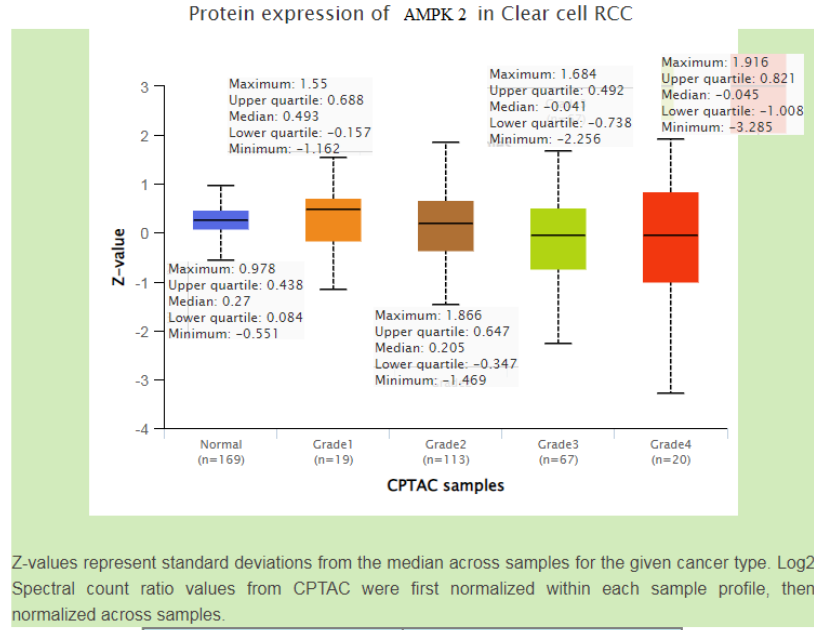
Şekil 4.11. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokusu ve normal doku örneklerinde AMPK 2 protein ifadeleri.

Kanserli dokularda AMPK 1 ve AMPK 2 protein ifadeleri patolojik tümör derecesine göre karşılaştırıldığında; AMPK 1 protein ifadesinin artan patolojik tümör derecesi ile birlikte anlamlı derecede artma eğiliminde olduğu, AMPK 2 protein ifadesinin ise anlamlı derecede azalma eğilimi gösterdiği izlendi (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).



Comparison		Statistical significance	
Normal-vs-Grade1	2.190646E-01	Grade1-vs-Grade3	2.413646E-01
Normal-vs-Grade2	1.12530560526528E-06	Grade1-vs-Grade4	7.976402E-02
Normal-vs-Grade3	1.835840E-04	Grade2-vs-Grade3	9.956481E-01
Normal-vs-Grade4	3.087704E-03	Grade2-vs-Grade4	2.926267E-01
Grade1-vs-Grade2	2.121728E-01	Grade3-vs-Grade4	3.180100E-01

Şekil 4.12. TCGA-KIRC olgularında patolojik tümör derecesine göre primer tümör dokularında AMPK 1 protein ifadeleri.

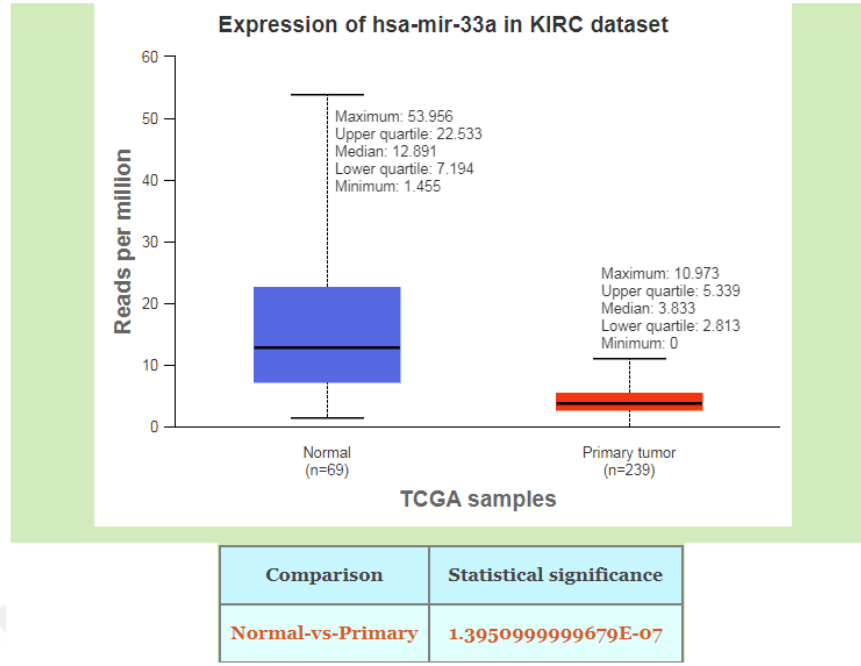


	Comparison	Statistical significance	
Normal-vs-Grade1	3.283936E-01	Grade1-vs-Grade3	1.017565E-02
Normal-vs-Grade2	3.321147E-01	Grade1-vs-Grade4	1.360447E-01
Normal-vs-Grade3	5.479384E-03	Grade2-vs-Grade3	5.889939E-02
Normal-vs-Grade4	2.438995E-01	Grade2-vs-Grade4	3.794939E-01
Grade1-vs-Grade2	1.732026E-01	Grade3-vs-Grade4	9.895695E-01

Şekil 4.13. TCGA-KIRC olgularında patolojik tümör derecesine göre primer tümör dokularında AMPK 2 protein ifadeleri.

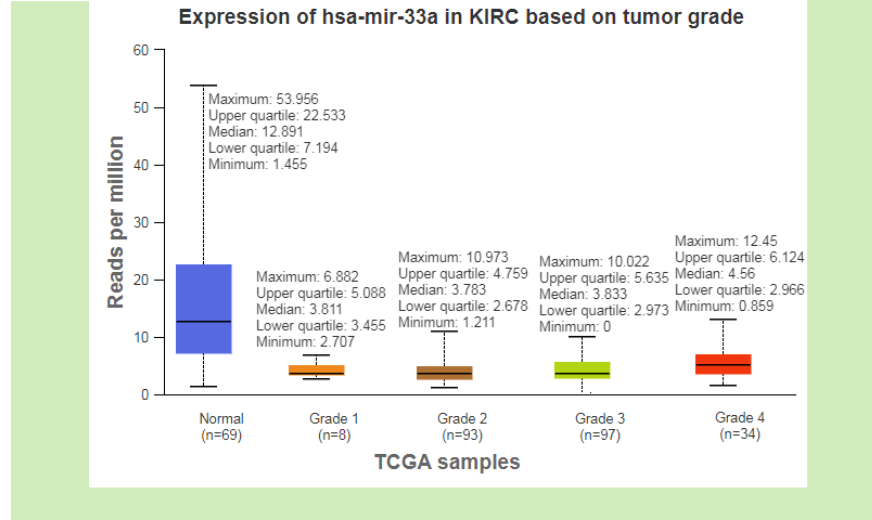
UALCAN web portalında TCGA-KIRC verilerine miR-33a ifadelerini değerlendirmek üzere erişildiğinde; miR-33a ifadelerine (miRNA-seq, RPM) ulaşılabilir 308 hasta örneği (239 primer tümör dokusu, 69 normal doku) saptandı. Primer tümör dokusunda miR-33a ifadeleri belirlenmiş 239 olgunun, 232' sinde patolojik tümör derecesi bilimekteyken, 7' sinde ise bilinmemekteydi.

TCGA veri setinde kayıtlı BHRHK hastalarına ait primer tümör dokusu ve normal doku örneklerindeki miR-33a ifadelerinin karşılaştırılması sonucunda; primer tümör dokularında miR-33a ifadesinin normal dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu saptandı [sırasıyla, median ifadeler = 3,833 (2,813 - 5,339) vs. 12,891 (7,194 - 22,533) miRNA-seq, RPM, $p = 1,395e^{-7}$, Şekil 4.14].



Şekil 4.14. TCGA-KIRC olgularında primer tümör dokusu ve normal doku örneklerinde miR-33a ifadeleri.

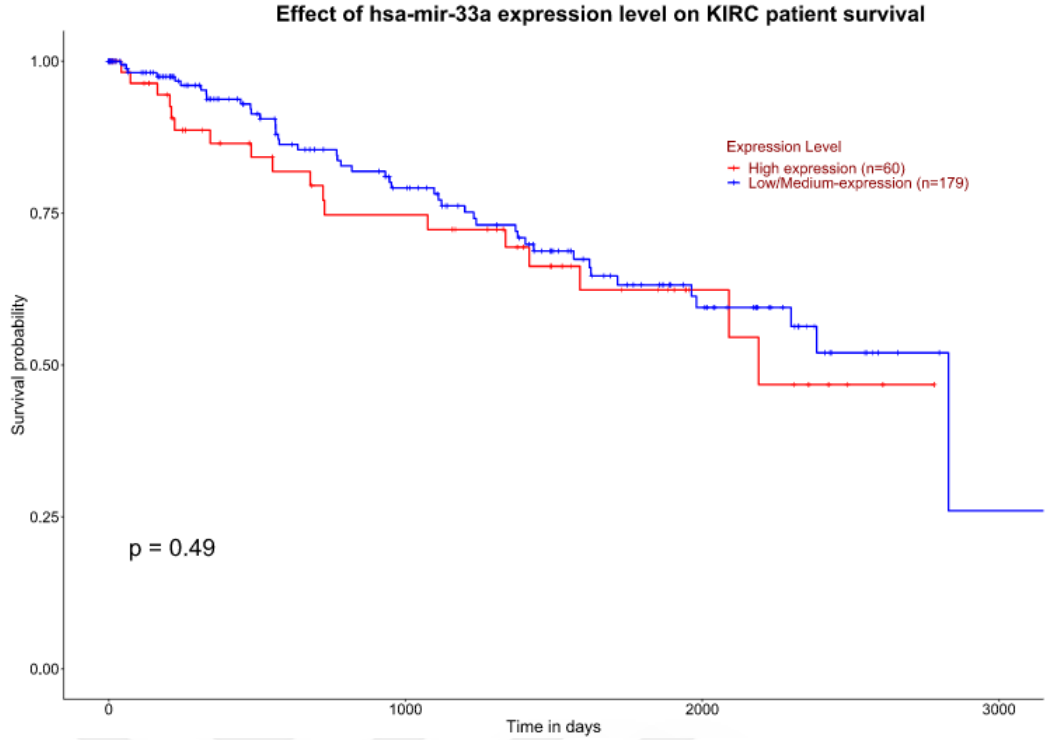
Kanserli doku örneklerinde miR-33a ifadeleri pT evresine göre karşılaştırıldığında ise; miR-33a ifadesinin değişen pT evrelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gösterdiği saptandı ve ifade seviyelerinin pT evresi ilerledikçe artma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15).



Comparison		Statistical significance	
Normal-vs-Primary		1.395099999679E-07	
Normal-vs-Grade 1	1.62659996583159E-09	Grade 1-vs-Grade 3	2.580000E-02
Normal-vs-Grade 2	1.7755999999799E-05	Grade 1-vs-Grade 4	1.365950E-02
Normal-vs-Grade 3	2.16450000145585E-08	Grade 2-vs-Grade 3	3.341400E-01
Normal-vs-Grade 4	6.6580000021477E-07	Grade 2-vs-Grade 4	8.416200E-01
Grade 1-vs-Grade 2	7.576100E-02	Grade 3-vs-Grade 4	2.250400E-01

Şekil 4.15. TCGA-KIRC olgularında farklı pT evrelerinde miR-33a ifadeleri.

TCGA veri setinde kayıtlı BHRHK olgularında miR-33a ifadelerinin sağ kalımla ilişkisi irdelendiğinde elde edilen sonuçlar ikisi arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını gösterdi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. TCGA-KIRC olgularında miR-33a ifadeleri ile sağ kalım (overall survival, OS) arasındaki ilişki.

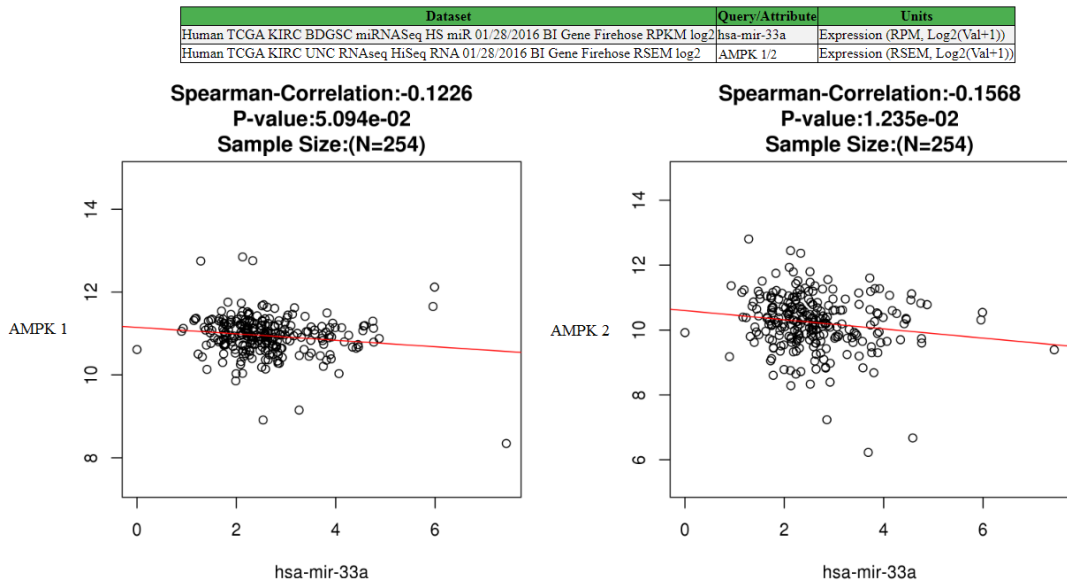
4.1.4 LinkedOmics Üzerinden Yapılan TCGA Veri Analizleri

LinkedOmics web portalında TCGA-KIRC verilerine miR-33a ve AMPK 1/2 ifadelerinin korelasyonunu değerlendirmek üzere erişildiğinde; toplam 537 BHRHK olgusunda (pT1=275, pT2=69, pT3=182 ve pT4=11 olgu), miRNA ifade bilgileri (miRNA-seq log2, RPKM) olan 254 hasta ve mRNA ifade bilgileri (RNA-seq log2, RSEM) olan 533 hasta örneği saptandı.

miR-33a ifadesi ile AMPK 1 ve AMPK 2 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki genel BHRHK popülasyonunda değerlendirildiğinde, miR-33a ifadesinin her iki genin de ifadesiyle negatif yönde zayıf korelasyon gösterdiği belirlendi (sırasıyla, $p=1,312e^{-2}$ ve $p=1,517e^{-2}$, Şekil 4.17). İlgili Spearman korelasyon eğrileri Şekil 4.18’de gösterilmektedir.

ID	ID-149971								
Dataset	Sample cohort	Institute	Data type	Platform	Date	Institute	Analysis level	Pipeline	Sample size
Search dataset:	TCGA_KIRC	BDGSC	miRNASeq	HS miR	01/28/2016	BI	Gene	Firehose_RPKM_log2	Attribute: hsa-mir-33a, Patients: 254
Target dataset:	TCGA_KIRC	UNC	RNAseq	HiSeq RNA	01/28/2016	BI	Gene	Firehose_RSEM_log2	Attributes: 20159, Patients: 533
Overlap of Samples = (254) SD: 254/TD: 533									
Statistical Method: Spearman Correlation test									
Target Gene/Attribute Spearman Correlation P-value FDR (BH)									
AMPK 2			-1.568e-01	1.235e-02	8.275e-02				
AMPK 1			-1.226e-01	5.094e-02	1.925e-01				

Şekil 4.17. TCGA-KIRC olgularında miR-33a ve AMPK 1/2 gen ifadeleri ilişkisi.



Şekil 4.18. TCGA-KIRC olgularında miR-33a ve AMPK 1/2 gen ifadeleri ilişkilerine ait Spearman korelasyon grafikleri.

Ancak, BHRHK olguları pT1 ve pT2 evre olgular ile pT3 ve pT4 olgular şeklinde iki alt gruba ayrılarak miR-33a ifadesi ile AMPK 1 ve AMPK 2 gen ifade düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ise, sadece pT1 ve pT2 evreli olgularda miR-33a ifadesiyle AMPK protein ifadeleri arasında negatif yönde zayıf korelasyon saptanırken (sırasıyla, $p=4,190e^{-2}$ ve $p=2,593e^{-2}$, Şekil 4. 19); ileri evre pT3 ve pT4 olgularda herhangi anlamlı korelasyon saptanmadı (sırasıyla, $p=8,302e^{-1}$ ve $p=2,896e^{-1}$, Şekil 4.19).

ID	ID-152879								
Dataset	Sample cohort	Institute	Data type	Platform	Date	Institute	Analysis level	Pipeline	Sample size
Search dataset:	TCGA_KIRC	BDGSC	miRNASeq	HS miR	01/28/2016	BI	Gene	Firehose_RPKM_log2	Attribute:hsa-mir-33a, Patients:254
Target dataset:	TCGA_KIRC	UNC	RNAseq	HiSeq RNA	01/28/2016	BI	Gene	Firehose_RSEM_log2	Attributes:20159, Patients:533
Subset (Selected patients):	pathology_T_stage t1 [N:275],pathology_T_stage t2 [N:69]								
Statistical Method:	Spearman Correlation test								
Target Gene/Attribute  Spearman Correlation  P-value  FDR (BH) 									
AMPK 2			-1.725e-01			2.593e-02		1.793e-01	
AMPK 1			-1.576e-01			4.190e-02		2.270e-01	

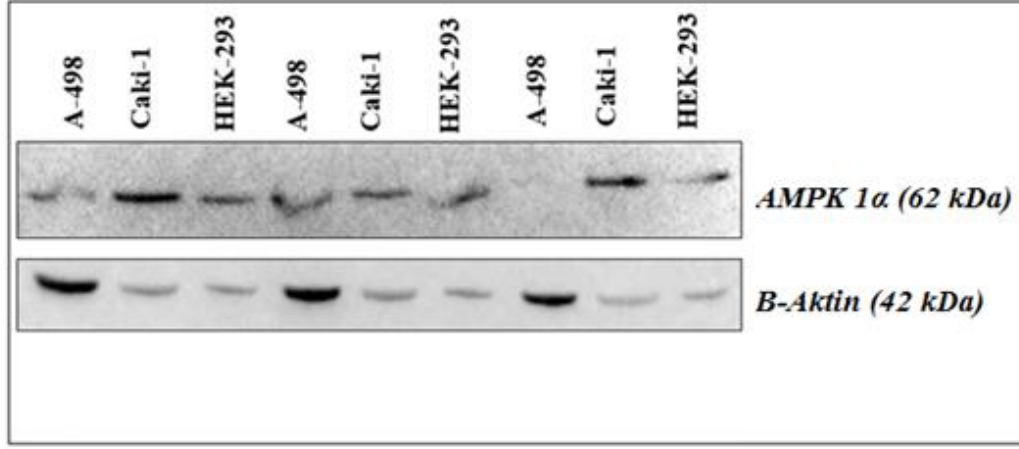
ID	ID-152878								
Dataset	Sample cohort	Institute	Data type	Platform	Date	Institute	Analysis level	Pipeline	Sample size
Search dataset:	TCGA_KIRC	BDGSC	miRNASeq	HS miR	01/28/2016	BI	Gene	Firehose_RPKM_log2	Attribute:hsa-mir-33a, Patients:254
Target dataset:	TCGA_KIRC	UNC	RNAseq	HiSeq RNA	01/28/2016	BI	Gene	Firehose_RSEM_log2	Attributes:20159, Patients:533
Subset (Selected patients):	pathology_T_stage t4 [N:11],pathology_T_stage t3 [N:182]								
Statistical Method:	Spearman Correlation test								
Target Gene/Attribute  Spearman Correlation  P-value  FDR (BH) 									
AMPK 2			-1.148e-01			2.896e-01		6.978e-01	
AMPK 1			-2.333e-02			8.302e-01		9.559e-01	

Şekil 4.19. TCGA-KIRC olgularında PT evresine göre alt gruplardaki miR-33a ve AMPK 1/2 gen ifadeleri ilişkisi.

4.2 BHRHK Hücre Hatlarında Moleküler Analizler

4.2.1 BHRHK Hücre Hatlarında AMPK 1 α Protein İfadeleri

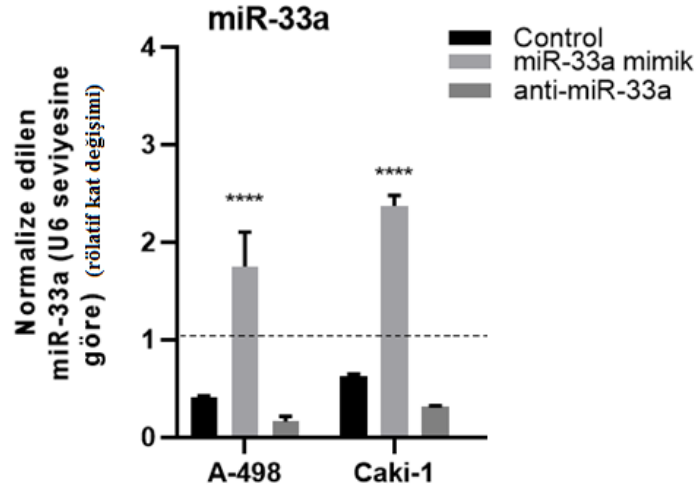
AMPK 1 α ifadesi metastatik olmayan primer BHRHK hücresi kaynaklı A-498 hücre hattında kontrol hücre hattına göre anlamlı derecede azalmış izlendi. Bu ifade düzeyi metastatik BHRHK hücresi kaynaklı Caki-1 hücre hattına göre de daha düşük seviyedeydi. Bununla birlikte, metastatik Caki-1 hücre hattı AMPK 1 α protein ifadesi, kontrol hücre ve A-498 hücre hatlarına göre oldukça artmış izlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. A-498 ve Caki-1 hücre hatlarında AMPK 1α protein ifadeleri. A-498, Caki-1 ve HEK-293 hücrelerine ait 30 µg'lık protein lizatları %10' luk SDS-PAGE jelde yürütülmüştür. Normalizasyon β-Aktin'e göre yapılmıştır.

4.2.2 BHRHK Hücre Hatlarında Bazal ve miR-33a-mimik ve anti-miR-33a Transfeksiyonları Sonrası miR-33a İfade Seviyeleri

qRT-PCR sonuçlarına göre miR-33a ifadesinin Caki-1 hücrelerinde A-498 hücrelerine kıyasla daha yüksek ifade edildiği gözlemlendi. miR-33a mimik ve anti-miR-33a transfeksiyonları sonrası miR-33a seviyelerinde iki hücre hattında da kontrollerine kıyasla en az iki kat değişim farkı gerçekleşti. Veriler kontrollere göre normalize edilip miRNA'ların kat değişimi kontrol miRNA olan U6 snRNA ile normalize edildiğinde, A-498 hücrelerinde kontrol grubunda miR-33a ifadesi 0,4 iken, miR-33a mimik transfeksiyonu sonrası 1,2 ve anti-miR-33a transfeksiyonu sonrası ise 0,18 olarak belirlendi. Caki-1 hücrelerinde ise; kontrol grubundaki 0,6 oranındaki miR-33a ifadesi, miR-33a mimik ve anti-miR-33a transfeksiyonları sonrası sırasıyla 2,3 ve 0,3 olarak saptandı (Şekil 4.21). Bu durumda hedeflenen miR33-a ifadelerindeki en az iki kat değişim başarıyla sağlandı.

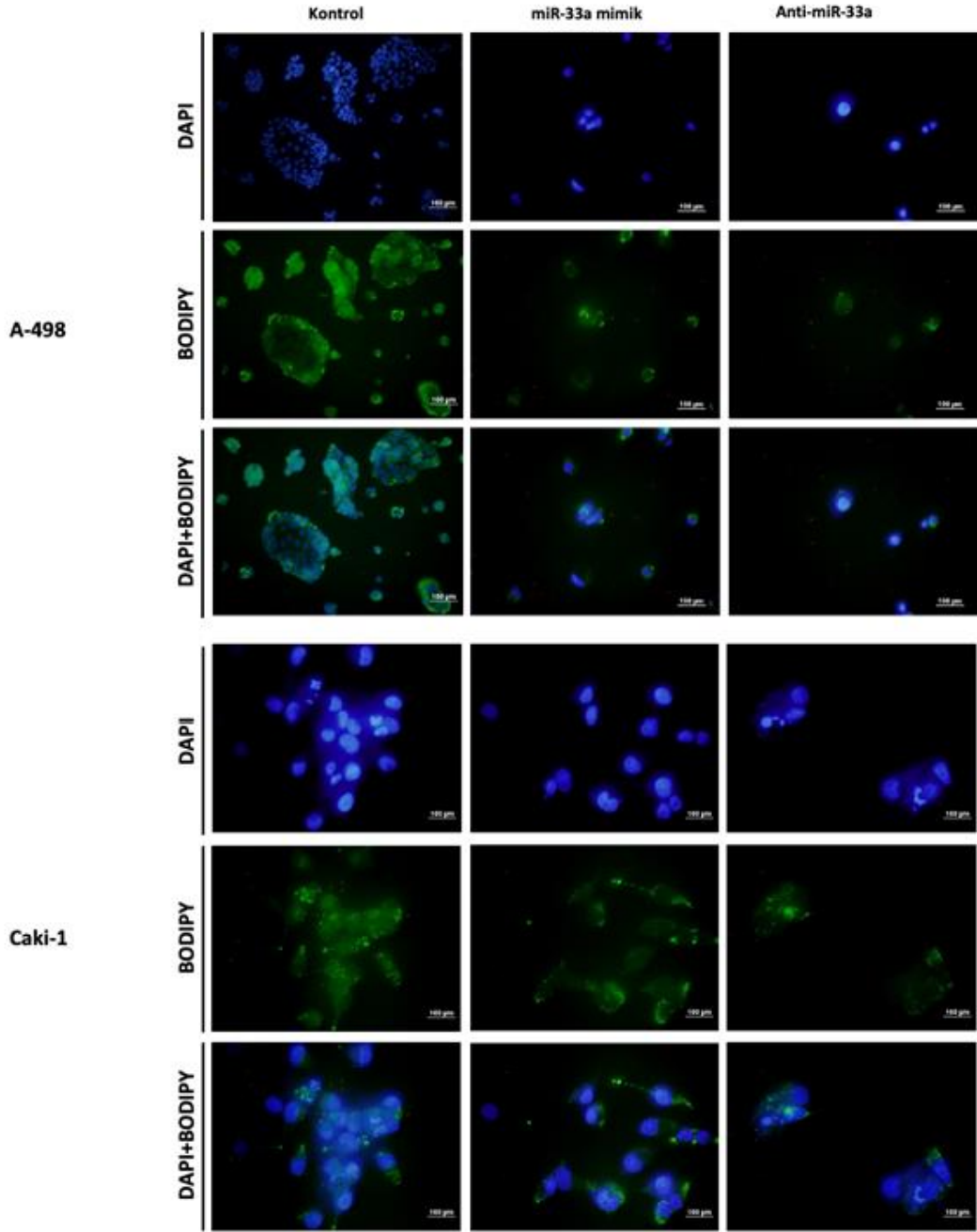


Şekil 4.21. A-498 ve Caki-1 hücre hatlarında bazal ve mir-33a-mimik ve anti-mir-33a transfeksiyonları sonrası mir-33a ifade seviyeleri.

miR-33a ifadeleri qRT-PCR ile incelenmiştir. İfade düzeyleri ortalama ve ortalamanın standart hatası (SEM) değerleri ile gösterilmiştir (Hata çubukları SEM' i göstermektedir). ****, $P < 0.001$.

4.2.3 BHRHK Hücre Hatlarında miR-33a İfade Seviyelerindeki Modülasyonlarla Hücre İçi Lipid Birikimi Değişiklikleri

Yağ damlacıklarının gözlemlenmesi ve hücre içi lipid içeriğine miR-33a modülasyonlarının etkisinin gözlenmesi için BODİPY floresan boyası ile hücre çekirdeğinin boyanmasını sağlayan DAPI boyası eş zamanlı olacak şekilde uygulandı. Daha önce AMPK 1α protein ifadesinin Caki-1 hücre hattına nazaran daha az olduğu gösterilen A-498 hücre hattında, beklenildiği gibi, hücre içi lipid birikimi daha fazla izlendi. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde kontrol gruplarına göre miR-33a mimik transfeksiyonlarına bağlı olarak lipid içeriğinde belirgin değişim olmadığı gözlemlendi. Anti-miR-33a transfeksiyonlarının ise, A-498 ve Caki-1 hücrelerinde doğal lipid oranında azalmaya sebep olduğu izlendi (Şekil 4.22). Öte yandan, hücre içi lipid oranlarındaki azalma Caki-1 hücre hatlarında daha belirgin olarak gözlemlendi.



Şekil 4.22. A-498 ve Caki-1 berrak hücreli renal hücreli karsinoma hücrelerinde mimik miR-33a veya anti-miR-33a uygulamalarına bağlı olarak hücre içi lipid değişiklikleri. BODIPY (orta panel) ve DAPI (üst panel) ve DAPI ile BODIPY (alt panel). DAPI, nükleus boyaması için kullanılmıştır. BODIPY, doğal lipidlerin boyanmasını sağlamıştır.

5 TARTIŞMA

Hücrel enerji dengesinin ana moleküllerinden olan AMPK, hücrel enerji homeostazının sürdürülmesinde kilit bir metabolik sensör olmasının yanı sıra çeşitli metabolik ve fizyolojik etkilere de katkıda bulunur (Qu YY vd., 2020; Zhu M vd., 2022). AMPK sinyalizasyonundaki anormallik obezite, enflamasyon, diyabet ve kanser gibi kronik hastalıkların gelişimine yol açan belirleyici faktörlerden biridir (Keerthana CK vd., 2023). Yapısal olarak AMPK, β ve γ düzenleyici alt birimleriyle birlikte katalitik bir α alt biriminden oluşan ve evrimsel olarak korunmuş bir serin/treonin kinazdır (Yan Y vd., 2018; Yan Y vd., 2023). ATP üretiminin azalması ve yüksek hücre içi AMP seviyeleri nedeniyle ortaya çıkan AMP/ATP oranındaki artışın bir sonucu olarak hücrelerde indüklenen metabolik stres, sonuç olarak AMPK' nın aktivasyonuna yol açar. AMPK ayrıca hücre içi Ca^{2+} artışları, glukoz açlığı ve DNA hasarı ile AMP/ATP' den bağımsız mekanizmalar yoluyla da aktive olabilir (Hawley SA vd., 2005; Woods A vd., 2005; Hurley RL vd., 2005; Zhang CS vd., 2017; Vara-Ciruelos D vd., 2018; Fu X vd., 2008; Sanli T vd., 2010). Bu süreçlerde ortaya çıkan allosterik değişiklikler, AMPK katalitik α alt biriminin aktivasyon döngüsü içinde treonin 172' nin (Thr172) fosforilasyonunu teşvik eder ve AMPK aktivasyonu tamamlanır (Xiao B vd., 2011). AMPK' nın lipid metabolizması üzerine etkileri kuşkusuz hücre enerji dengesindeki önemli rolünün temel bir bileşenidir. AMPK yağ asitlerinin de novo sentezinde hız sınırlayıcı adımı bloke ederek yağ asidi sentezini azaltır. Bu etkisini asetil-CoA' nın malonil-CoA' ya dönüşümünde rol oynayan ACC' yi fosforilleyerek sağlar (Steinberg GR ve Kemp BE, 2009). AMPK aktivasyonu aynı zamanda SREBP inhibisyonu ile de yağ asidi üretiminin azaltılmasını sağlayabilir (Wolfgang MJ vd., 2006). AMPK' nın lipid katabolizmasını hızlandırmadaki rolü de aynı derecede önemlidir. AMPK yağ

asitlerinin mitokondriye taşınmasını kolaylaştırır ve CPT lenzimi aktivitesini artırarak yağ asitlerinin oksidasyonunu hızlandırır (Wolfgang MJ vd., 2006). AMPK aktivasyonu, aynı zamanda, çoklu hücre ölüm mekanizmaları ile de ilişkili bulunmuştur. Hücre içi AMPK ifadesi, hücre döngüsü kontrol noktalarını, otofajiyi, mitofajiyi ve apoptozu etkiler. AMPK, otofaji ve mitofajiyi teşvik eder ve p53, p21 ve p27' nin aktivasyonu yoluyla apoptotik programı başlatabilir (Naik PP vd., 2021; Sinha RA vd.; 2015). Buna uygun olarak, birçok çalışma AMPK aktivatörleri ile tümör hücrelerinde azalmış sağ kalım ortaya çıktığını rapor etmiştir. Örneğin, meme kanseri hücre hatlarında metformin aracılı AMPK aktivasyonu ile antikanser etkilerin ortaya çıktığı gösterilmiştir (Li X vd., 2015; Zou YF vd.; 2017). AMPK aktivasyonunun ayrıca meme kanseri hücrelerinde p53' e bağlı apoptotik etkileri indüklediği de bildirilmiştir. Başka bir araştırma ise, AMPK aktivatörü olan MT 63-78' in mTORC 1 blokajı ve de novo lipogenezin baskılanması yoluyla androjene duyarlı ve kastrasyona dirençli prostat kanserinde mitotik durmayı ve apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur (Zadra G vd., 2014). Yine benzer şekilde, AMPK aktivatörleri olan AICAR ve metformin' in hepatoselüler karsinom hücrelerinde azalmış proliferasyona ve hücre döngüsünde duraksamaya yol açtıkları gösterilmiştir (Cheng J vd., 2014). Vara-Ciruelos ve ark. (Vara-Ciruelos D vd., 2019), AMPK1 α ' yı kodlayan PRKAA1 geninin delesyonunda farelerde daha erken ve daha agresif lösemi/lenfoma gelişimini göstererek AMPK' nın tümör baskılayıcı etkisini rapor etmişlerdir. Hücre içi lipid birikiminin oldukça karakterize olduğu böbrek kanserinde de AMPK' nın patofizyolojide rol oynayabileceği teorik olarak oldukça mümkündür (Qi X vd., 2021). AMPK' nın antitümöral etkileri böbrek kanserinde de gösterilmiştir ve AMPK' nin mTOR bağımlı apoptoz mekanizması ile RHK hücrelerinde tümör büyümesini baskıladığı rapor edilmiştir (Pan Z vd., 2023). Bir başka çalışma ise, AICAR veya metformin aracılı AMPK aktivasyonunun, RHK hücrelerinde büyümenin baskılanması ve apoptozunun indüklenmesi ile sonuçlandığını bildirmiştir (Woodard J vd., 2010). Öte yandan, AMPK' nın, hipoksi ve besin açlığı gibi koşullardan kaynaklanan hücresel enerji seviyelerindeki azalmaya yanıt olarak aktive olması, tümör ilerlemesiyle ilişkili metabolik ve enerjik streslerin hafifletilmesinde kritik öneme sahiptir (Keerthana CK vd., 2023). Strese yanıt veren bir molekül olarak, AMPK tümör oluşumuna katkıda bulunan kritik bir faktör olabilir. Metabolik stres altında, AMPK aktivasyonu ATP tüketen süreçleri inhibe ederken ATP üreten katabolik yolları teşvik eder. Böylece, AMPK tetiklenmesi ile

lipidlerin, RNA' ların ve proteinlerin sentezi gibi çoğu anabolik biyoaktivite yavaşlayarak akut hücrel programlar için enerji korunur ve hücre büyümesinin engellenmesiyle DNA hasarı onarımı için bir süre sağlanır (Steinberg GR ve Kemp BE, 2009; Wang Z vd., 2018; Luo Z, Zang M ve Guo W, 2010). Sonuç olarak, AMPK, stres altındaki hücrelerde hücrel bir yakıt sensörü olarak ATP üretiminin devamlılığını sağlayabilir. ATP' nin kanser hücrelerinde büyüme, hayatta kalma ve apoptoz gibi süreçlerde rol aldığı düşünüldüğünde, AMPK' nin stres altında ATP seviyesinin modülasyonu için kanser hücrelerine olumlu sağ kalım etkileri sağlayabileceği akla uzak gelmemektedir (Ke R vd., 2018). Gerçekten de, AMPK' nin tümör baskılayıcı olduğunu rapor eden çalışmaların yanı sıra, literatürde, AMPK' nin tümör hücreleri üzerine koruyucu etkilerinin ve tümör oluşumunu teşvik edici etkilerinin olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Vara-Ciruelos, Russell FM ve Hardie DG, 2019). Bunlardan en önemlisi, T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) modeli oluşturulan farelerde tümör gelişimini takiben AMPK 1 α baskılanması ile dalak, lenf düğümleri ve kemik iliğindeki tümör hücrelerinin gelişiminin engellendiği ve farelerin sağ kalımının arttığını gösteren çalışmadır (Luo Z, Zang M ve Guo W, 2010). Bu araştırmada, akut lösemi hücrelerinde AMPK' nin metabolik stresi ve apoptozu azaltan mitokondriyal yolları teşvik ettiği vurgulanmıştır. Bu çalışmadan birkaç yıl sonra yapılan başka bir çalışma ise, tam aksine, T-ALL modeli oluşturulan farelerde tümör gelişimi henüz tamamlanmamışken AMPK 1 α baskılanması ile daha erken ve agresif bir akut lösemi gelişimini bildirmişlerdir (Vara-Ciruelos D vd., 2019). Bu iki çalışma birlikte ele alındığında, AMPK 1 α ' nın, T-ALL gelişimi sırasında bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiği, tümör oluşuktan sonra ise paradoks olarak bunun yerine bir tümör destekleyicisine dönüştüğü görülmektedir (Kishton RJ vd., 2016; Vara-Ciruelos D, Dandapani M ve Hardie DG, 2020). Akut miyeloid lösemi (AML) fare modelinin kullanıldığı bir başka çalışmada da AMPK' nin tümör promotörü olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Saito Y vd. 2015). Bu çalışmada, AMPK eksikliğinin kemik iliğinden alınan öncül tümör hücrelerinde reaktif oksijen türlerini (ROS) artırarak DNA hasarına sebep olduğunu ve bu durumun AMPK yokluğunda hücrelerin kemik iliğinde strese karşı özellikle savunmasız kalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Saito Y vd. 2015). Benzer şekilde, AMPK eksikliği olan tümör hücrelerinin strese maruz kaldıklarında sağ kalımlarının azaldığı gözlenmiştir. AMPK 1 α ' nın baskılandığı tümör hücrelerinin, glukoz açlığı veya hücre dışı matrisin ayrılmasıyla oluşturulan stres

nedenli hücre ölümüne karşı daha hassas olduğunun gösterilmesi bunun en iyi örneğidir (Jeon SM, Chandel NS ve Hay N, 2012). Buna göre, AMPK, ATP homeostazındaki işlevine ek olarak, glukoz sınırlamaları, bağımsız büyüme ve *in vivo* solid tümör oluşumu gibi enerji stresi koşulları altında kanser hücrelerinin hayatta kalması için kritik bir işleve sahiptir (Jeon SM, Chandel NS ve Hay N, 2012). Bu bulguları destekleyen, üstelik RHK hücrelerinde Liu ve ark. (Liu M vd., 2019) tarafından 2019’ da yayımlanan bir araştırmada; yazarlar RHK hücrelerinde metformin tedavisinin AMPK aktivasyonuna yol açtığını, bunun da normal koşullarda hücre proliferasyonunu baskıladığını, ancak glikoz yoksunluğu koşullarında hücre proliferasyonunu artırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, AMPK’ nın papiller ve berrak hücreli RHK hücrelerinde, AMPK aracılı otofaji aktivasyonu sonrası p53 degradasyonuna neden olarak böbrek kanseri hücrelerinde büyümeyi çoğaltıcı ve migrasyona olumlu etkileri olabileceği de bildirilmiştir (Patergnani S vd., 2020). Biz, bu tez çalışmamızda, TCGA veri setinde yer alan BHRHK olgularında, AMPK 1 ve 2’ nin normal dokulara oranla tümör hücrelerinde mRNA seviyesinde azaldığını ve bu azalmanın genellikle artmış tümör derecesi, ileri tümör evresi ve azalmış sağ kalım gibi kötü klinikopatolojik parametrelerle ilişkili olduğunu belirledik. Protein seviyesinde AMPK ifadelerini incelediğimizde ise, BHRHK olgularına ait tümör dokularında AMPK 2’ in yine azalmış olmasına rağmen AMPK 1’ in artmış olduğunu belirledik. Dahası, AMPK 1 protein ifadesinin artan patolojik tümör derecesi ile birlikte artma eğiliminde olduğunu gözlemledik. Bildiğimiz kadarıyla, günümüzde, herhangi bir deneysel çalışma birincil amaç olarak BHRHK hücre hatlarında modülasyon yapılmaksızın bazal AMPK protein ifadelerini incelememiştir. Bu amaçla gerçekleştirdiğimiz hücre hatları analizlerimizde, AMPK 1 α ifadesi primer BHRHK hücresi kaynaklı A-498 hücre hattında kontrol hücre hattına göre anlamlı derecede azalmışken, metastatik Caki-1 hücre hattında kontrol hücre ve A-498 hücre hatlarına göre oldukça artmış izlendi. Elde ettiğimiz bu bulgular, daha önce T-ALL hücrelerinde gösterilmiş olduğu gibi, daha erken evre BHRHK’de AMPK 1 α ’ nın tümör baskılayıcı, ileri evre BHRHK’ de ise tümör promotörü etkilere sahip olabileceğine işaret edebilir. Bizim primer tümör kaynaklı A-498 hücrelerimizde AMPK 1 α protein ifadesinin azalması, AMPK 1 α ’ nın bu evrede tümör baskılayıcı olarak hizmet edebileceği düşünüldüğünde, bu hücrelerde tümör regenezise katkıda bulunduğu hipotezini destekleyebilir. Benzer şekilde, metastatik BHRHK hücre hatlarında saptamış olduğumuz artmış AMPK 1 α ifadesi

ise, artan tümör saldırganlığı ile birlikte artmış hücre çoğalması sonucunda artan enerji ihtiyacı ve metabolik strese karşı AMPK 1 α 'nın tümör hücrelerini koruduğu ve hayatta kalmasını sağladığı hipotezine oldukça uygun görünmektedir. AMPK'nın tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığını gösteren kanıtlarla birlikte, kanser metastazında da düzenleyici rolü olduğuna dair, az sayıda çalışmayla da olsa, kanıtlar olması yine bu hipotezin destekleyicisi sayılabilir (Dong Y vd., 2023; Cai Z vd., 2020). Örneğin, nükleer AMPK'nın paradoksal olarak metabolik stres altındaki malign RHK hücrelerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve metastatik kapasitesini desteklediğinin ortaya konulmuş olması (Jung M vd., 2019), bizim (metastatik Caki-1 hücrelerinde artmış AMPK 1 α protein ifadesini ortaya koyduğumuz) hücre hattı analiz sonuçlarımızı ve buna bağlı yukarıdaki hipotezimizi açıkça doğrular niteliktedir. Sonuç olarak, AMPK'nın kanser patofizyolojisinde çifte rol oynayabileceği gerçeği (Wang Z vd., 2018; Konieczny P vd., 2023; Hardie DG, 2015), bizim bulgularımızla da BHRHK için desteklenmiş bulunmaktadır. Bununla birlikte, AMPK 1 α 'nın modülasyonları ile BHRHK hücrelerindeki sağ kalım değişiklikleri ve yayılım yeteneklerinin hücresel düzeyde irdelenmesi muhakkak ki hipotez düzeyinden daha kesin sonuçlar elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

Gen ifadesinin transkripsiyon sonrası baskılayıcıları olarak hareket eden kısa, ortalama 21-23 nükleotid uzunluğunda, evrimsel olarak korunmuş, protein kodlamayan düzenleyici RNA'lar olan miRNA'ların hücresel farklılaşma, çoğalma, apoptoz ve gelişim gibi çok sayıda biyolojik süreçlerde kritik düzenleyiciler olduğu ve çeşitli hastalıklar ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (Dexheimer PJ ve Cochella L, 2020; Annese T vd., 2020). miRNA'ların insanlarda metabolik homeostazın önemli düzenleyicileri olarak da işlev görebileceği bildirilmiştir. Bu bağlamda, lipid ve lipoprotein metabolizmasını düzenlenmesinde rol alabilecekleri irdelendiğinde, lipid metabolizmasını düzenleyen en iyi karakterize edilmiş miRNA'nın miR-33a olduğu tespit edilmiştir (Desgagné V, Bouchard L ve Guérin R, 2017). İnsanlarda miR-33a, lipid metabolizmasında önemli rol alan SREBP genleri SREBP 1 ve SREBP 2'nin intronik bölgelerinde kodlanır (Fernández-Hernando C vd., 2011). miR-33a, temel olarak, hücre içi kolesterol biyosentezini ve alımını artırırken kolesterol çıkışını ve atılımını azaltır. Ayrıca, yağ asidi oksidasyonuna katkıda bulunan birçok geni baskılayarak hücresel yağ asidi metabolizmasını düzenler. Böylece, yağ asidi oksidasyon mekanizmasının ifadesini değiştirip oksidasyonu azaltıcı etki gösterir

(Desgagné V, Bouchard L ve Gu  rin R, 2017; Fern  ndez-Hernando C vd., 2011). Sonuç olarak, miR-33a hücre içi lipid metabolizmasında anabolizan etki gösterdiğinden, hücre içi lipid birikiminin karakterize olduğu BHRHK patofizyolojisi ile teorik olarak ilişkili olabilir. Gerçekten de miRNA düzensizliklerinin tümör başlangıcı ve ilerlemesinde rol oynayabileceği literatürde kapsamlıca gösterilmiştir. miRNA'lar tümörlerde, farklı hücresel yola  lara katılan onko-miRNA' lar veya onkosupres  r-miRNA' lar olarak hareket edebilirler (Annese T vd., 2020; Tan W vd., 2018; Otmani K ve Lewalle P, 2021). Örneğin miR-33a ve kanser ile ilişkisi göz önüne alınacak olursa, literatürde, miR-33a' nın prostat kanseri, safra kesesi kanseri, melanom, osteosarkom ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde bir tümör baskılayıcı miRNA olarak rol oynadığı tanımlanmıştır (Gao C, Wei J, Tang T ve Huang Z, 2020). miR-33a' nın bu etkileri farklı kanser türlerinin her birinde çok sayıda araştırma yapılarak irdelenirken, miR-33a' nın RHK' deki klinik önemi ve etkisi tam olarak anlaşılamamış ve sadece Jiang ve ark. (Jiang K vd., 2019) tarafından yapılan tek bir çalışma ile değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada, literatüre uygun olarak, miR-33a aşırı ifadesinin RHK hücrelerinin büyümesini kontrol grubuna göre önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, hücre içi lipid metabolizmasının en önemli düzenleyici miRNA'sı olan miR33a' nın, lipid metabolizması değişiklikleri ile karakterize RHK' de hücre içi lipid metabolizmasına olan etkilerinin araştırılması oldukça gerekli görünmektedir. Hal buki, şu ana dek, bu konu üzerinde henüz herhangi bir biyo-informatik veya deneysel çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmamızda, önce TCGA veri setindeki BHRHK olgularında miR-33a ifadesi ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişkiyi, takiben de, BHRHK hücre hatlarında miR-33a modülasyonlarının hücre içi lipid birikimine etkilerini araştırarak literatürdeki bu eksikliği gidermeye çalıştık. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, TCGA veri setinde kayıtlı BHRHK olgularına ait primer tümör dokularında miR-33a ifadesinin normal dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha d    k olduğu saptandı. Ancak, kanserli doku örneklerinde miR-33a ifadeleri pT evresine göre karşılaştırıldığında ise; miR-33a ifadesinin değişen pT evrelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gösterdiği saptandı ve ifade seviyelerinin pT evresi ilerledikçe artma eğiliminde olduğu gözlendi. Bu sonuçlarımız, AMPK' da olduğu gibi, miR-33a' nın da BHRHK' da karmaşık etkileri olabileceğini ve ileri evre BHRHK hücrelerinde artmış olan miR-33a ifadesinin baskılanması ile kanser hücrelerine kar  şı gelişimi ve çoğalmayı durdurucu

müdaheleye imkan sağlanabileceğini işaret etmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızın hücre hatlarını içeren analiz kısmında, lipid metabolizması üzerine etki gösteren bu miRNA' nın modülasyonlarının, BHRHK' de lipid metabolizmasına katalizan etki göstererek dolaylı yoldan antikanser etki gösterip gösteremeyeceğini irdledik. Sonuç olarak, A-498 ve Caki-1 hücrelerinde kontrol gruplarına göre anti-miR-33a transfeksiyonlarına bağlı olarak azalmış hücre içi lipid birikimi olduğunu saptadık. Öte yandan, bu azalma, ileri evre metastatik BHRHK hücrelerinden oluşan Caki-1 hücre hatlarında daha belirgin olarak gözlemlendi. Bu bulgularımız, yukarıda söz ettiğimiz hipotezi destekler nitelikteydi. Literatürde, anti-miR-33 ile tedavinin kanser dışı hücrelerde lipid metabolizmasına etkilerini deneysel olarak araştıran birçok çalışma var iken, kanser hücreleri üzerine etkilerinin irdelendiği sonuçlara ait yeterli veri bulunmamaktadır. Söz konusu kanser dışı hücre araştırmalarında, miR-33a blokajı ile aterosklerozda gerileme ve miR-33b blokajı ile alkolik karaciğer hastalığında iyileşme gibi hücre içi lipid birikiminde azalmayla karakterize sonuçlar elde edilmiştir (Karunakaran D vd., 2015; Miyagawa S vd., 2023). Bu sonuçlar, kanser hücreleri üzerinde ilk defa elde ettiğimiz güncel sonuçlarımız ile uyumlu görünmektedir. Ayrıca, literatürde, yağ asidi metabolizmasında önemli rolleri olan miR33-a ve AMPK ilişkisi irdelendiğinde, anti-miR-33 tedavisi ile adipoz dokuda yağ asidi metabolizmasında katabolizan etki gösteren AMPK ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Karunakaran D vd., 2015). Benzer şekilde, analizi yapılan TCGA veri setine göre de, BHRHK olgularında miR-33a ile AMPK ifadeleri arasında negatif yönde anlamlı, ancak, zayıf korelasyon mevcuttu. Ancak, olgular tümör patolojik T evresi alt gruplarına göre detaylı irdelendiğinde, pT1 ve pT2 evreli BHRHK olgularında bu korelasyon yine izlenirken; pT3 ve pT4 evreli BHRHK olgularında miR33-a ve AMPK arasında anlamlı herhangi korelasyon saptanmadı. Bu açıdan bakıldığında, ileri evreli BHRHK hücrelerinde, artmış AMPK seviyesine azalmış miR-33a yanıtı eşlik etmeyerek lipid katabolizmasından korunabilme olanağı olacaktır. Gerçekten de, bu hipotezle uyumlu olarak, hücre hattı analizlerimizle; primer tümör hücrelerine kıyasla daha yüksek AMPK 1 α ifadesi sergileyen ileri evre metastatik Caki-1 hücrelerinin, yine primer tümör hücrelerine oranla daha yüksek miR33-a ifadesine sahip olduğunu göstermiş bulunmaktayız. Bu durum, belki de, metastatik BHRHK hücresinde, zaten AMPK ifadesine bağlı artabilecek hücre içi lipid katabolizmasına karşı koruyucu bir önlem olarak lipid anabolizmanı miR33-a' yı tüketmemek adına bir savunma mekanizması olabilir. Tüm bu hipotezler birlikte

değerlendirildiğinde; anti-miR-33 blokajı ile lipid katabolizmasını hızlandırarak agresif BHRHK hücrelerinde dolaylı antikanser etki oluşturulabileceği sonucuna varılabilir ve dahası, ileri evre BHRHK olgularında miR-33a tedaviye yönelik etkin bir hedef olabilir.

Tüm çalışmalarda olduğu gibi mevcut tez çalışmamızda da bazı limitasyonlar bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi artmış AMPK 1 α ifadesinin modülasyonu ile metastatik BHRHK hücrelerindeki sağ kalım ve yayılım karakteristiklerine ait bulgularımızın olmaması ve miR33-a modülasyonları ile AMPK protein ifadeleri arasındaki ilişkinin hücre hatlarına ait sonuçlarının olmaması gösterilebilir. Ancak, yine de, ortaya koyduğumuz hipotezlerin TCGA veri seti analizleriyle hücre hattı analizlerinin birlikte yorumlanması ve kapsamlı literatür eşliğinde değerlendirilmesi çalışmamızın olumlu yönleri olarak ele alınabilir. Sonuç olarak, bulgularımız, BHRHK patogenezinde yağ asit metabolizması ilişkili AMPK ve miR-33a'nın karmaşık rolü olabileceğini düşündürecek kanıtlar olarak ele alınabilir. Hücre hatlarından elde ettiğimiz sonuçlara göre, ileri evre BHRHK' de AMPK ve miR-33a'nın tümör lehine olumlu etkiler gösterebileceği hipotezinin, mevcut literatürle birlikte ele alındığında, olası olduğu ve AMPK 1 α protein seviyesi daha yüksek olan ileri evre metastatik hücrelerde anti-miR-33a ile müdahalenin hücre içi lipid birikimini önemli ölçüde azalttığı saptandı. Bu sonuç, miR-33a' nın özellikle ileri evre BHRHK tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini desteklemekle birlikte, bu konuda daha kapsamlı ve net sonuçlar için miR-33a' nın hücre sağkalımı ve proliferasyonu üzerine etkilerinin de ayrıntılı irdelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKÇA

Abern MR, Tsivian M, Polascik TJ, Coogan CL. “Characteristics and outcomes of tumors arising from the distal nephron”. *Urology*. 2012 Jul;80(1):140-6.

Akbani R, Ng PK, Werner HM, Shahmoradgoli M, Zhang F, Ju Z, vd. “ A pan-cancer proteomic perspective on The Cancer Genome Atlas”. *Nat Commun*. 2014 May 29;5:3887.

Andreiana BC, Stepan AE, Mărgăritescu C, Al Khatib AM, Florescu MM, Ciurea RN, vd. “Histopathological prognostic factors in clear cell renal cell carcinoma”. *Curr Heal Sci J*. 2018 Jul-Sep;44(3):201-205.

Annese T, Tamma R, De Giorgis M, Ribatti D. “microRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis”. *Front Oncol*. 2020;10:581007.

Aryal B, Singh AK, Rotllan N, Price N, Fernández-Hernando C. “MicroRNAs and lipid metabolism”. *Curr Opin Lipidol*. 2017 Jun;28(3):273-280.

Athanazio DA, Amorim LS, da Cunha IW, Leita KRM, da Paz AR, Gomes RPX, vd. “Classification of renal cell tumors – current concepts and use of ancillary tests: recommendations of the Brazilian Society of Pathology”. *Surg Exp Pathol* 2021;4, 4. <https://doi.org/10.1186/s42047-020-00084-x>

Bayat A. “Science, medicine, and the future: Bioinformatics”. *BMJ*. 2002 Apr 27;324(7344):1018-22.

Bazinet RP, Layé S. “Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease”. *Nat. Rev. Neurosci*. 2014;15:771–785.

Brodaczewska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarneka AM. “Choosing the right cell line for renal cell cancer research”. *Mol Cancer*. 2016; 15:83.

Browning L, Colling R, Verrill C. ‘‘WHO/ISUP grading of clear cell renal cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma; validation of grading on the digital pathology platform and perspectives on reproducibility of grade’’. *Diagn Pathol*. 2021 Aug 21;16(1):75.

Bukavina L, Bensalah K, Bray F, Carlo M, Challacombe B, Karam JA, vd. ‘‘Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update’’. *Eur Urol*. 2022 Nov;82(5):529-542.

Cai Z, Li CF, Han F, Liu C, Zhang A, Hsu CC, vd. ‘‘Phosphorylation of PDHA by AMPK Drives TCA Cycle to Promote Cancer Metastasis’’. *Mol Cell*. 2020 Oct 15;80(2):263-278.e7.

Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA. ‘‘Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL’’. *J. Lipid Res*. 1998;39:777–788.

Chakraborty S, Balan M, Sabarwal A, Choueiri TK, Pal S. ‘‘Metabolic reprogramming in renal cancer: Events of a metabolic disease’’. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021 Aug;1876(1):188559.

Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi B, vd. ‘‘UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses’’. *Neoplasia*. 2017;19:649–58.

Chen C, Wang J, Pan D, Wang X, Xu Y, Yan J, vd. ‘‘Applications of multi-omics analysis in human diseases’’. *MedComm (2020)*. 2023;4(4):e315.

Cheng J, Huang T, Li Y, Guo Y, Zhu Y, Wang Q, vd. ‘‘AMP-activated protein kinase suppresses the in vitro and in vivo proliferation of hepatocellular carcinoma’’. *PloS One* 2014 Apr 7;9(4):e93256.

Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, vd. ‘‘Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: Fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero’’. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(11):6358–6363.

Chow WH, Dong LM, Devesa SS. ‘‘Epidemiology and risk factors for kidney cancer’’. *Nat Rev Urol*. 2010 May;7(5):245-57.

Chowdhury B, Porter EG, Stewart JC, Ferreira CR, Schipma MJ, Dykhuizen EC. ‘‘PBRM1 Regulates the Expression of Genes Involved in Metabolism and Cell Adhesion in Renal Clear Cell Carcinoma’’. *PLoS One*. 2016; 11(4):e0153718. doi: 10.1371/journal.pone.0153718.

Collins FS, Fink L. ‘‘The Human Genome Project’’. *Alcohol Health Res World*. 1995;19(3):190-195.

Collins JM, Neville MJ, Hoppa MB, Frayn KN. ‘‘De novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase are coordinately regulated in the human adipocyte and protect against palmitate-induced cell injury’’. *J. Biol. Chem*. 2010;285:6044–6052.

Cui W, Luo W, Zhou X, Lu Y, Xu W, Zhong S, vd. ‘‘Dysregulation of Ketone Body Metabolism Is Associated With Poor Prognosis for Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients’’. *Front Oncol*. 2019 Dec 17;9:1422.

Dal Bello B, Rosa L, Campanini N, Tinelli C, Torello Viera F, vd. ‘‘Glutamine Synthetase Immunostaining Correlates with Pathologic Features of Hepatocellular Carcinoma and Better Survival after Radiofrequency Thermal Ablation’’. *Clinical Cancer Research*. 2010 Apr 1;16(7):2157-66.

Darré T, Folligan KU, Kpatcha TM, Kanassoua K, Sewa E, Daré S, vd. ‘‘Evolution of the Histo-Epidemiological Profile of Urological Cancers in Togo’’. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Feb 1;18(2):491-494.

Das T, Andrieux G, Ahmed M, Chakraborty S. ‘‘Integration of Online Omics-Data Resources for Cancer Research’’. *Front Genet*. 2020;11:578345.

Desgagné V, Bouchard L, Guérin R. ‘‘microRNAs in lipoprotein and lipid metabolism: from biological function to clinical application’’. *Clin Chem Lab Med*. 2017 May 1;55(5):667-686.

Desgagné V, Bouchard L, Guérin R. ‘‘microRNAs in lipoprotein and lipid metabolism: from biological function to clinical application’’. *Clin Chem Lab Med*. 2017 May 1;55(5):667-686.

Dexheimer PJ, Cochella L. ‘‘MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:409.

Diniz WJ, Canduri F. REVIEW-ARTICLE Bioinformatics: an overview and its applications. *Genet Mol Res*. 2017 Mar 15;16(1).

Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. ‘‘MicroRNA: function, detection, and bioanalysis’’. *Chem Rev*. 2013;113(8):6207-33.

Dong Y, Hu H, Zhang X, Zhang Y, Sun X, Wang H, vd. ‘‘Phosphorylation of PHF2 by AMPK releases the repressive H3K9me2 and inhibits cancer metastasis’’. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):95.

Dong Z, Liao Z, He Y, Wu C, Meng Z, Qin B, vd. ‘‘Advances in the Biological Functions and Mechanisms of miRNAs in the Development of

Osteosarcoma". *Technol Cancer Res Treat*. 2022;21:15330338221117386.

Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foulfelle F. "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis". *Biochimie*. 2004;86:839–848.

Fabian MR, Sonenberg N. "The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC". *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19:586–593.

Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. "Lipid classification, structures and tools". *Biochim Biophys Acta*. 2011;1811:637–647.

Felipe-Abrio B, Verdugo-Sivianes EM, Carnero A. "c-MYB- and PGC1a-dependent metabolic switch induced by MYBBP1A loss in renal cancer". *Mol Oncol* 2019 Jul;13(7):1519-1533.

Feng WW, Zuppe HT, Kurokawa M. "The Role of CD36 in Cancer Progression and Its Value as a Therapeutic Target". *Cells*. 2023;12(12):1605.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, vd. "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018". *Eur J Cancer*. 2018 Nov;103:356-387.

Fernández-Hernando C, Suárez Y, Rayner KJ, Moore KJ. "MicroRNAs in lipid metabolism". *Curr Opin Lipidol*. 2011 Apr;22(2):86-92.

Fisel P, Kruck S, Winter S, Bedke J, Hennenlotter J, Nies AT, vd. "DNA methylation of the SLC16A3 promoter regulates expression of the human lactate transporter MCT4 in renal cancer with consequences for clinical outcome". *Clin Cancer Res*. 2013; 19(18): 5170–81.

Fu X, Wan S, Lyu YL, Liu LF, Qi H. "Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation". *PLoS ONE* 2008;3, e2009.

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. "Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma". *Am J Surg Pathol*. 1982;6:655–663.

Ganti S, Taylor SL, Aboud OA, Yang J, Evans C, Osier MV, vd. "Kidney tumor biomarkers revealed by simultaneous multiple matrix metabolomics analysis". *Cancer Research*. 2012; 72(14):3471–3479.

Gao C, Wei J, Tang T, Huang Z. "Role of microRNA-33a in malignant cells". *Oncol Lett*. 2020 Sep;20(3):2537-2556.

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, vd. "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal". *Sci Signal*. 2013 Apr 2;6(269):pl1.

Ghafouri-Fard S, Shirvani-Farsani Z, Branicki W, Taheri M. "MicroRNA Signature in Renal Cell Carcinoma". *Front Oncol*. 2020;10:596359.

Gkolfinopoulos S, Psyrri A, Bamias A. "Clear-cell renal cell carcinoma - A comprehensive review of agents used in the contemporary management of advanced/metastatic disease". *Oncol Rev*. 2021 Feb 26;15(1):530.

Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Available at: <https://gco.iarc.fr/> (Accessed on January 23, 2023).

Goldman M, Craft B, Brooks A, Zhu J, Haussler D. "The UCSC Xena platform for cancer genomics data visualization and interpretation". *BioRxiv [Preprint]* 2018.10.1101/326470

Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, Calin GA, Fassan M, Bassi P, vd. "Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers". *Urol Oncol*. 2007 Sep-Oct;25(5):387-92.

Guo D, Reinitz F, Youssef M, Hong C, Nathanson D, Akhavan D, vd. "An LXR Agonist Promotes Glioblastoma Cell Death Through Inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-Dependent Pathway". *Cancer Discovery* 2011 Oct;1(5):442-56.

Hakimi AA, Reznik E, Lee CH, Creighton CJ, Brannon AR, Luna A, vd. "An Integrated Metabolic Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma". *Cancer Cell*. 2016 Jan 11;29(1):104-116.

Han N, Yuan M, Yan L, Tang H. "Emerging Insights into Liver X Receptor α in the Tumorigenesis and Therapeutics of Human Cancers". *Biomolecules*. 2023 Jul 28;13(8):1184.

Hardie DG. "Molecular Pathways: Is AMPK a Friend or a Foe in Cancer?" *Clin Cancer Res*. 2015;21(17):3836-40.

Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, vd. "Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase". *Cell Metab*. 2005;2: 9–19.

Heravi G, Yazdanpanah O, Podgorski I, Matherly LH, Liu W. "Lipid metabolism reprogramming in renal cell carcinoma". *Cancer Metastasis Rev*. 2022 Mar;41(1):17-31.

Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, vd. "Renal cell carcinoma". *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 9;3:17009.

Huang KL, Mashl RJ, Wu Y, Ritter DI, Wang J, Oh C, vd. ‘‘Pathogenic germline variants in 10,389 adult cancers’’. *Cell*. 2018 Apr 5;173(2):355-370.e14.

Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. The ‘‘Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases’’. *J. Biol. Chem*. 2005;280:29 060–29 066.

Igal RA. ‘‘Stearoyl-CoA Desaturase-1: A Novel Key Player in the Mechanisms of Cell Proliferation, Programmed Cell Death and Transformation to Cancer’’. *Carcinogenesis* 2010;31:1509–15.

Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, vd. ‘‘Human fatty acid synthase: Properties and molecular cloning’’. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(19):8695–8699.

Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 2012;485, 661–665.

Jiang K, Sun F, Zhu J, Luo G, Ban Y, Zhang P. ‘‘miR-33a inhibits cell growth in renal cancer by downregulation of MDM4 expression’’. *Mol Genet Genomic Med*. 2019 Aug;7(8):e833.

Jung M, Lee JH, Lee C, Park JH, Park YR, Moon KC. ‘‘Prognostic Implication of pAMPK Immunohistochemical Staining by Subcellular Location and Its Association with SMAD Protein Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma’’. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1602.

Karunakaran D, Richards L, Geoffrion M, Barrette D, Gotfrit RJ, Harper ME, vd. ‘‘Therapeutic Inhibition of miR-33 Promotes Fatty Acid Oxidation but Does Not Ameliorate Metabolic Dysfunction in Diet-Induced Obesity’’. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(12):2536-43.

Ke R, Xu Q, Li C, Luo L, Huang D. ‘‘Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism’’. *Cell Biol Int*. 2018;42(4):384-392.

Keerthana CK, Rayginia TP, Shifana SC, Anto NP, Kalimuthu K, Isakov N, vd. ‘‘The role of AMPK in cancer metabolism and its impact on the immunomodulation of the tumor microenvironment’’. *Front Immunol*. 2023;14:1114582.

Kim Y, Choi JW, Lee JH, Kim YS. ‘‘Expression of lactate/H(+) symporters MCT1 and MCT4 and their chaperone CD147 predicts tumor progression in clear cell renal cell carcinoma: immunohistochemical and The Cancer Genome Atlas data

analyses''. *Hum Pathol.* 2015; 46(1):104–12.

Kishton RJ, Barnes CE, Nichols AG, Cohen S, Gerriets VA, Siska PJ, vd. "AMPK is essential to balance glycolysis and mitochondrial metabolism to control T-ALL cell stress and survival''. *Cell Metab.* 2016 Apr 12;23(4):649-62.

Konieczny P, Adamus T, Sułkowski M, Skrzypek K, Majka M. Impact of AMPK on cervical carcinoma progression and metastasis. *Cell Death Dis.* 2023 Jan 19;14(1):43.

Koundouros N, Poulogiannis G. "Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer''. *Br J Cancer.* 2020;122(1):4-22.

Krajewski KM, Pedrosa I. "Imaging Advances in the Management of Kidney Cancer''. *J Clin Oncol.* 2018 Oct 29;36(36):JCO2018791236.

Kuang H, Liao L, Chen H, Kang Q, Shu X, Wang Y. "Therapeutic Effect of Sodium Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor Dapagliflozin on Renal Cell Carcinoma''. *Med Sci Monit.* 2017; 23: 3737–3745.

Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, vd. "Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy''. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul 5;91(14):6379-83.

LaGory EL, Wu C, Taniguchi CM, Ding CC, Chi JT, von Eyben R, vd. "Suppression of PGC-1 α Is Critical for Reprogramming Oxidative Metabolism in Renal Cell Carcinoma''. *Cell Rep* 2015; 12(1):116–127.

Langbein S, Frederiks WM, zur Hausen A, Popa J, Lehmann J, Weiss C, vd. "Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer''. *Int J Cancer.* 2008; 122(11):2422–8.

Leibovich BC, Lohse CM, Crispen PL, Boorjian SA, Thompson RH, Blute ML, "Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma''. *J Urol.* 2010 Apr;183(4):1309-15.

Li J, Lu Y, Akbani R, Ju Z, Roebuck PL, Liu W, vd. "TCPA: a resource for cancer functional proteomics data''. *Nat Methods.* Nat Methods. 2013 Nov;10(11):1046-7.

Li N, Zhou ZS, Shen Y, Xu J, Miao HH, Xiong Y, vd. "Inhibition of the sterol regulatory element-binding protein pathway suppresses hepatocellular carcinoma by repressing inflammation in mice''. *Hepatology.* 2017;65(6):1936–1947.

Li X, Wang L, Zhou XE, Ke J, de Waal PW, Gu X, vd. "Structural basis of AMPK regulation by adenine nucleotides and glycogen''. *Cell Res.* 2015

Jan;25(1):50-66.

Liang K, Dai JY. "Progress of potential drugs targeted in lipid metabolism research". *Front Pharmacol*. 2022 Dec 16;13:1067652.

Linehan WM, Rathmell WK. "Kidney cancer". *Urol Oncol*. 2012 Nov-Dec;30(6):948-51.

Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. "The Genetic Basis of Kidney Cancer: A Metabolic Disease". *Nat Rev Urol*. 2010;7:277–85.

Liu M, Zhang Z, Wang H, Chen X, Jin C. "Activation of AMPK by metformin promotes renal cancer cell proliferation under glucose deprivation through its interaction with PKM2". *Int J Biol Sci*. 2019;15(3):617-627.

Ljungberg B, Albiges L, Bedke J, Bex A, Capitanio U, Giles RH, vd. "EAU guidelines on renal cell carcinoma 2023". *European Association of Urology 2023*; Arnhem, The Netherlands

Luo Z, Zang M, Guo W. "AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth". *Future Oncol*. 2010 ;6(3):457-70.

Macfarlane LA, Murphy PR. "MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer". *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-61.

Martorell-Marugán J, Tabik S, Benhammou Y, del Val C, Zwir I, Herrera F, vd. Deep Learning in Omics Data Analysis and Precision Medicine. In: Husi H, editor. Computational Biology [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2019 Nov 21. Chapter 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK550335/> doi: 10.15586/computationalbiology.2019.ch3

Massari F, Ciccarese C, Santoni M, Brunelli M, Piva F, Modena A, vd. "Metabolic alterations in renal cell carcinoma". *Cancer Treat Rev*. 2015 Nov;41(9):767-76.

McCauley C, Anang V, Cole B, Simmons GE Jr. "Potential Links Between YB-1 and Fatty Acid Synthesis in Clear Cell Renal Carcinoma". *Med Res Arch*. 2020;8(10):10.18103/mra.v8i10.2273.

Medeiros LJ, Jones EC, Aizawa S, Aldape HC, Cheville JC, Goldstein NS, vd. "Grading of renal cell carcinoma. Workgroup no. 2. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer (AJCC) ". *Cancer*. 1997 Sep 1;80(5):990-1.

Medes G, Thomas A, Weinhouse S. "Metabolism of neoplastic tissue. IV. A

study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro''. *Cancer Res.* 1953;13:27–29.

Menendez JA, Lupu R. ‘‘Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis’’. *Nature Reviews Cancer*, 2007; 7(10): 763–777.

Menendez JA, Lupu R. ‘‘Oncogenic properties of the endogenous fatty acid metabolism: molecular pathology of fatty acid synthase in cancer cells’’. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006; 9(4):346–57.

Menendez JA. Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochim Biophys. Acta*. 2010;1801:381–391.

Miyagawa S, Horie T, Nishino T, Koyama S, Watanabe T, Baba O, vd. ‘‘Inhibition of microRNA-33b in humanized mice ameliorates nonalcoholic steatohepatitis’’. *Life Sci Alliance*. 2023 Jun 1;6(8):e202301902.

Moch H, Amin MB, Berney DM, Comp  rat EM, Gill AJ, Hartmann A, et. al. ‘‘The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours’’. *Eur Urol*. 2022 Nov;82(5):458-468.

Mohd AB, Ghannam RA, Mohd OB, Elayan R, Albakri K, Huneiti N, vd. ‘‘Etiologies, Gross Appearance, Histopathological Patterns, Prognosis, and Best Treatments for Subtypes of Renal Carcinoma: An Educational Review’’. *Cureus*. 2022 Dec 9;14(12):e32338.

Monaco ME. ‘‘Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes’’. *Oncotarget*. 2017 Apr 25;8(17):29487-29500.

Moore LE, Jaeger E, Nickerson ML, Brennan P, De Vries S, Roy R, vd. ‘‘Genomic copy number alterations in clear cell renal carcinoma: associations with case characteristics and mechanisms of VHL gene inactivation’’. *Oncogenesis* 2012 Jun 25;1(6):e14.

Muglia VF, Prando A. ‘‘Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings’’. *Radiol Bras*. 2015;48(3):166–174.

Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, vd. ‘‘Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria’’. 2011 Nov 20;481(7381):385-8.

Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, Lam ET. ‘‘Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology’’. *F1000Res*. 2018 Mar 12;7:307.

Naik PP, Mukhopadhyay S, Praharaj PP, Bhol CS, Panigrahi DP, Mahapatra KK, vd. "Secretory clusterin promotes oral cancer cell survival via inhibiting apoptosis by activation of autophagy in AMPK/mTOR/ULK1 dependent pathway". *Life Sci.* 2021 Jan 1;264:118722.

Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y, Tanigawa M, Yoshimoto T, Narimatsu T, vd. "Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c". *J Pathol.* 2008 Dec;216(4):418-27.

Natesan V, Kim SJ. "Lipid Metabolism, Disorders and Therapeutic Drugs Review". *Biomol Ther (Seoul).* 2021;29(6):596-604.

Nicora G, Vitali F, Dagliati A, Geifman N, Bellazzi R. "Integrated Multi-Omics Analyses in Oncology: A Review of Machine Learning Methods and Tools". *Front Oncol.* 2020;10:1030.

Nogueira V, Hay N. "Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy". *Clin Cancer Res.* 2013; 19(16): 4309–14.

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation". *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402.

Ohlrogge JB, Jaworski JG. "Regulation of fatty acid synthesis". *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1997;48:109-136.

Olzmann JA, Carvalho P. "Dynamics and functions of lipid droplets". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019;20:137–155.

Otmani K, Lewalle P. "Tumor Suppressor miRNA in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment: Mechanism of Deregulation and Clinical Implications". *Front Oncol.* 2021;11:708765.

Ozcan A, Shen SS, Zhai QJ, Truong LD. "Expression of GLUT1 in primary renal tumors: morphologic and biologic implications". *Am J Clin Pathol.* 2007; 128(2) :245–54.

Padala SA, Kallam A. Clear Cell Renal Carcinoma. [Updated 2023 May 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557644/>

Pan Z, Huang J, Song H, Xiao Y, Liu T, Zeng Y, vd. "PLCL1 suppresses tumour progression by regulating AMPK/mTOR-mediated autophagy in renal cell

carcinoma''. *Aging* (Albany NY). 2023;15(19):10407-10427.

Pandey J, Syed W. Renal Cancer. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558975/>

Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, vd. "Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience''. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 20;23(12):2763-71.

Patergnani S, Guzzo S, Mangolini A, dell'Atti L, Pinton P, Aguiari G. "The induction of AMPK-dependent autophagy leads to P53 degradation and affects cell growth and migration in kidney cancer cells''. *Exp Cell Res*. 2020;395(1):112190.

Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016 Jan 12;23(1):27-47.

Perroud B, Ishimaru T, Borowsky AD, Weiss RH. "Grade-dependent proteomics characterization of kidney cancer'' *Mol Cell Proteomics* 2009 May;8(5):971-85

Petan T, Jarc E, Jusovic M. "Lipid droplets in cancer: guardians of fat in a stressful world''. *Molecules*. 2018 Aug 3;23(8):1941.

Qayyum T, McArdle P, Orange C, Seywright M, Horgan P, Oades G, vd. "Reclassification of the Fuhrman grading system in renal cell carcinoma-does it make a difference?'' *Springerplus*. 2013 Aug 10;2:378.

Qi X, Li Q, Che X, Wang Q, Wu G. "The Uniqueness of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Summary of the Process and Abnormality of Glucose Metabolism and Lipid Metabolism in ccRCC''. *Front Oncol*. 2021;11:727778.

Qian X, Yang Z, Mao E, Chen E. "Regulation of fatty acid synthesis in immune cells''. *Scand J Immunol*. 2018;88(5):e12713.

Qu YY, Zhao R, Zhang HL, Zhou Q, Xu FJ, Zhang X, vd." Inactivation of the AMPK-GATA3-ECHS1 Pathway Induces Fatty Acid Synthesis That Promotes Clear Cell Renal Cell Carcinoma Growth''. *Cancer Res*. 2020 Jan 15;80(2):319-333.

Quan Y, Dai J, Zhou S, Zhao L, Jin L, Long Y, vd."HIF2 α -induced upregulation of RNASET2 promotes triglyceride synthesis and enhances cell migration in clear cell renal cell carcinoma''. *FEBS Open Bio*. 2023 Apr;13(4):638-654.

Rabjerg M, Gerke O, Engvad B, Marcussen N. "Comparing World Health

Organization/International Society of Urological Pathology Grading and Fuhrman Grading with the Prognostic Value of Nuclear Area in Patients with Renal Cell Carcinoma''. *Uro.* 2021; 1(1):2-13.

Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. ''Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes''. *PPAR Res.* 2010;2010:612089.

Rezende RB, Drachenberg CB, Kumar D, Blanchaert R, Ord RA, Ioffe OB, vd. ''Differential diagnosis between monomorphic clear cell adenocarcinoma of salivary glands and renal (clear) cell carcinoma''. *Am J Surg Pathol.* 1999 Dec;23(12):1532-8.

Riesenberg R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, vd. '' Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma''. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 1;13(23):6993-7002.

Rohrig F, Schulze A. ''The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer''. *Nat Rev Cancer.* 2016; 16(11):732–749.

Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, vd. ''De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation''. *Cancer Res.* 2010 Oct 15;70(20):8117-26.

Saito K, Arai E, Maekawa K, Ishikawa M, Fujimoto H, Taguchi R, vd. ''Lipidomic Signatures and Associated Transcriptomic Profiles of Clear Cell Renal Cell Carcinoma''. *Sci Rep* 2016;6:28932.

Saito Y, Chapple RH, Lin A, Kitano A, Nakada D. ''AMPK protects leukemia-initiating cells in myeloid leukemias from metabolic stress in the bone marrow''. *Cell Stem Cell* 2015;17, 585–596.

Sanli T, Rashid A, Liu C, Harding S, Bristow RG, Cutz JC, vd. ''Ionizing radiation activates AMP-activated kinase (AMPK): a target for radiosensitization of human cancer cells''. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010;78, 221–229.

Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. ''Cancer statistics, 2023''. *CA Cancer J Clin.* 2023 Jan;73(1):17-48.

Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Beroud C, Demont J, vd. '' Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma''. *Carcinogenesis* 2002; 23(5) :759–68.

Sinha RA, Singh BK, Zhou J, Wu Y, Farah BL, Ohba K, vd. ''Thyroid

hormone induction of mitochondrial activity is coupled to mitophagy via ROS-AMPK-ULK1 signaling''. *Autophagy* 2015;11(8):1341–57.

Steinberg GR, Kemp BE. ‘‘AMPK in Health and Disease’’. *Physiol Rev* 2009; 89:1025–78.

Stepanovska Tanturovska B, Manaila R, Fabbro D, Huwiler A. ‘‘Lipids as Targets for Renal Cell Carcinoma Therapy’’. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 7;24(4):3272.

Su X, Abumrad NA. ‘‘Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction’’. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009;20:72–77.

Suburu J, Gu Z, Chen H, Chen W, Zhang H, Chen YQ. ‘‘Fatty acid metabolism: Implications for diet, genetic variation, and disease’’. *Food Biosci.* 2013 1;4:1-12.

Swami U, Nussenzeig RH, Haaland B, Agarwal N. ‘‘Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement’’. *Ann Transl Med.* 2019 Mar;7(Suppl 1):S18.

Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Haab BB, vd. ‘‘Gene Expression Profiling of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Gene Identification and Prognostic Classification’’. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 Aug 14;98(17):9754-9.

Tan W, Liu B, Qu S, Liang G, Luo W, Gong C. ‘‘MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy’’. *Oncol Lett.* 2018;15(3):2735-2742.

Tang K, Xu H. ‘‘Prognostic value of meta-signature miRNAs in renal cell carcinoma: an integrated miRNA expression profiling analysis’’. *Sci Rep.* 2015; 5:10272.

Teloken PE, Thompson RH, Tickoo SK, Cronin A, Savage C, Reuter VE, vd. ‘‘Prognostic impact of histological subtype on surgically treated localized renal cell carcinoma’’. *J Urol.* 2009 Nov;182(5):2132-6.

Temiz MZ, Colakerol A, Sonmez SZ, Gokce A, Canitez IO, Ozsoy S, vd. ‘‘Prognostic Role of Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase Family Genes in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A Comprehensive Bioinformatics Analysis Confirmed with External Validation Cohorts’’. *Clin Genitourin Cancer.* 2023 Feb;21(1):91-104.

Thaib PKP, Rahaju AS. ‘‘Clinicopathological profile of clear cell renal cell carcinoma’’. *International Journal of Health & Medical Sciences.* 2022; 5(1), 91-100.

Tracey TJ, Steyn FJ, Wolvetang EJ, Ngo ST. ‘‘Neuronal lipid metabolism: multiple pathways driving functional outcomes in health and disease’’. *Front. Mol. Neurosci.* 2018;11:10.

Trott JF, Kim J, Abu About O, Wettersten H, Stewart B, Berryhill G, vd. ‘‘Inhibiting tryptophan metabolism enhances interferon therapy in kidney cancer’’. *Oncotarget* 2016 Oct 11;7(41):66540-66557.

Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, deKernion JB, Belldegrun A. ‘‘Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria’’. *J Urol.* 2000 Apr;163(4):1090-5; quiz 1295.

Vailati-Riboni M, Palombo V, Loor JJ. What Are Omics Sciences? In: Ametaj, B. (eds) ‘‘Periparturient Diseases of Dairy Cows’’. Springer, Cham. 2017, https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1

Vara-Ciruelos D, Dandapani M, Gray A, Egbani EO, Evans AM, Hardie DG. ‘‘Genotoxic damage activates the AMPK- α 1 isoform in the nucleus via Ca^{2+} /CaMKK2 signaling to enhance tumor cell survival’’. *Mol. Cancer Res.* 2018;16: 345–357.

Vara-Ciruelos D, Dandapani M, Russell FM, Grzes KM, Atrih A, Foretz M, vd. ‘‘Phenformin, but not metformin, delays development of T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma via cell-autonomous AMPK activation’’. *Cell Rep* 2019 Apr 16;27(3):690-698.e4.

Vara-Ciruelos D, Russell FM, Hardie DG. ‘‘The strange case of AMPK and cancer: Dr Jekyll or Mr Hyde? ’’. *Open Biol.* 2019;9(7):190099.

Vara-Ciruelos D, Dandapani M, Hardie DG. ‘‘AMP-Activated Protein Kinase: Friend or Foe in Cancer?’’ *Annu Rev Canc Biol.* 2020, 4, 1–16.

Vasaikar SV, Straub P, Wang J, Zhang B. ‘‘LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types’’. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:D956-d963.

Vidigal JA, Ventura A. ‘‘The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies’’. *Trends Cell Biol.* 2015;25(3):137-47.

Vlachavas EI, Bohn J, Ückert F, Nürnberg S. ‘‘A Detailed Catalogue of Multi-Omics Methodologies for Identification of Putative Biomarkers and Causal Molecular Networks in Translational Cancer Research’’. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):2822.

Volpe A, Novara G, Antonelli A, Bertini R, Billia M, Carmignani G, vd. “Chromophobe renal cell carcinoma (RCC): oncological outcomes and prognostic factors in a large multicentre series”. *BJU Int.* 2012 Jul;110(1):76-83.

Vriens K, Christen S, Parik S, Broekaert D, Yoshinaga K, Talebi A, vd. “Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity”. *Nature.* 2019;566:403–406.

Wang Q, Zhang W, Qi X, Li J, Liu Y, Li Q, vd. “The mechanism of liver X receptor regulates the balance of glycoFA synthesis and cholesterol synthesis in clear cell renal cell carcinoma”. *Clin Transl Med.* 2023 May;13(5):e1248.

Wang Y, Yu W, Li S, Guo D, He J, Wang Y. “Acetyl-CoA Carboxylases and Diseases”. *Front Oncol.* 2022;12:836058.

Wang Z, Wang N, Liu P, Xie X. AMPK and Cancer. In: Cordero, M., Viollet, B. (eds) AMP-activated Protein Kinase. *Experientia Supplementum*, vol 107. Springer, Cham, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43589-3_9

Warburg OP, Negelein E. “Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle”. *Biochem Zeitschr*”. 1927;152:309–344.

Weiss RH. “Metabolomics and Metabolic Reprogramming in Kidney Cancer”. *Semin Nephrol.* 2018 Mar;38(2):175-182.

Wettersten HI, Hakimi AA, Morin D, Bianchi C, Johnstone ME, Donohoe DR, vd. “Grade-Dependent Metabolic Reprogramming in Kidney Cancer Revealed by Combined Proteomics and Metabolomics Analysis”. *Cancer Res.* 2015 Jun 15;75(12):2541-52.

Wettersten HI. “Reprogramming of Metabolism in Kidney Cancer. *Semin Nephrol.* 2020 Jan;40(1):2-13.

Weyandt JD, Thompson CB, Giaccia AJ, Rathmell WK. “Metabolic Alterations in Cancer and Their Potential as Therapeutic Targets”. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2017;37:825-832.

WHO Classification of Tumours Editorial Board. Urinary and Male Genital Tumours. In: WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 8. 2022. ISBN 978-92-832-4512-4.

Williamson SR. “Renal cell carcinoma classification: what matters?” *Diagnostic Histopathology.* 2022 June; 28(6); 301-308.

Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, Suwa A, Asaumi M, Matsumoto S, vd. “The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis”. *Proc*

Natl Acad Sci. 2006 May 9;103(19):7282-7.

Woodard J, Joshi S, Viollet B, Hay N, Plataniias LC. "AMPK as a therapeutic target in renal cell carcinoma". *Cancer Biol Ther*. 2010;10(11):1168-77.

Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, vd. "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells". *Cell Metab*. 2005;2:21-33.

Wu X, Qin L, Fako V, Zhang JT. "Molecular Mechanisms of Fatty Acid Synthase (FASN)-Mediated Resistance to Anti-Cancer Treatments". *Adv Biol Regul*. 2014;54:214-21.

Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, vd. "MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels". *PLoS One*. 2011;6(9):e25787.

Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmen D, vd. "Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP". *Nature*. 2011;472(7342):230-3.

Yan Y, Mukherjee S, Harikumar KG, Strutzenberg TS, Zhou XE, Suino-Powell K, vd. "Structure of an AMPK complex in an inactive, ATP-bound state". *Science*. 2021 Jul 23;373(6553):413-419.

Yan Y, Zhou XE, Xu HE, Melcher K. "Structure and physiological regulation of AMPK". *Int J Mol Sci*. 2018; 19(11):3534.

Yoon CY, Shim YJ, Kim EH, Lee JH, Won NH, Kim JH, vd. "Renal cell carcinoma does not express argininosuccinate synthetase and is highly sensitive to arginine deprivation via arginine deiminase". *Int J Cancer*. 2007 Feb 15;120(4):897-905.

Young MD, Mitchell TJ, Vieira Braga FA, Tran MGB, Stewart BJ, Ferdinand JR, vd. "Single-cell transcriptomes from human kidneys reveal the cellular identity of renal tumors". *Science*. 2018 Aug 10;361(6402):594-599.

Yuan Y, Yang X, Li Y, Liu Q, Wu F, Qu H, vd. "Expression and Prognostic Significance of Fatty Acid Synthase in Clear Cell Renal Cell Carcinoma". *Pathol Res Pract*. 2020 Nov;216(11):153227.

Zadra G, Photopoulos C, Tyekucheva S, Heidari P, Weng QP, Fedele G, vd. "A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis". *EMBO Mol Med*. 2014 Apr;6(4):519-38.

Zeng J, Zhang H, Tan Y, Wang Z, Li Y, Yang X. "Genetic alterations and

functional networks of m6A RNA methylation regulators in pancreatic cancer based on data mining''. *J Transl Med* 2021 Jul 30;19(1):323.

Zhang CS, Hawley SA, Zong Y, Li M, Wang Z, Gray A, vd. "Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK''. *Nature*. 2017 Aug 3;548(7665):112-116.

Zhang Q, Yang Z, Han Q, Bai H, Wang Y, Yi X, vd. "G6PD promotes renal cell carcinoma proliferation through positive feedback regulation of p-STAT3''. *Oncotarget* 2017; 8(65):109043–109060.

Zhang Y, Narayanan SP, Mannan R, Raskind G, Wang X, Vats P, vd. "Single-cell analyses of renal cell cancers reveal insights into tumor microenvironment, cell of origin, and therapy response''. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jun 15;118(24):e2103240118.

Zhang Z, Li H, Jiang S, Li R, Li W, Chen H, vd. "A survey and evaluation of Web-based tools/databases for variant analysis of TCGA data''. *Brief Bioinform*. 2019;20(4):1524-1541.

Zhao Z, Liu Y, Liu Q, Wu F, Liu X, Qu H, vd. "The mRNA Expression Signature and Prognostic Analysis of Multiple Fatty Acid Metabolic Enzymes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma''. *J Cancer*; 2019 Oct 21;10(26):6599-6607.

Zhou J, Simon JM, Liao C, Zhang C, Hu L, Zurlo G, vd. "An oncogenic JMJD6-DGAT1 axis tunes the epigenetic regulation of lipid droplet formation in clear cell renal cell carcinoma''. *Mol Cell*. 2022;Aug 18;82(16):3030-3044.e8.

Zhu H, Wang X, Lu S, Ou K. "Metabolic reprogramming of clear cell renal cell carcinoma''. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Jun 6;14:1195500.

Zhu M, Shen W, Li J, Jia N, Xiong Y, Miao J, vd. "AMPK Activator O304 Protects Against Kidney Aging Through Promoting Energy Metabolism and Autophagy''. *Front Pharmacol*. 2022 Mar 2;13:836496.

Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. "International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality''. *Eur Urol*. 2015; Mar;67(3):519-30.

Zou YF, Xie CW, Yang SX, Xiong JP. "AMPK activators suppress breast cancer cell growth by inhibiting DVL3-facilitated wnt/ β -catenin signaling pathway activity''. *Mol Med Rep*. 2017;15(2):899–907.

EKLER

Ek Tablo 1. Kullanılan cihazların listesi

Adı	Ürün Kodu	Firma
pH metre	A111	Thermo Scientific
Manyetik karıştırıcı / Isı Bloğu	SB162	Stuart
Hassas terazi	LE6202S	Sartorius
Distile su cihazı	TANKPE030	Millipore
Ultra Saf Su Cihazı	Direct Q-5UV	Millipore
Çalkalamalı inkübatör	Excella E25	New Brunswick Scientific
Soğutmalı Santrifüj	5430R	Eppendorf
Soğutmalı Santrifüj	5810R	Eppendorf
Buz makinası	AF80	Scotsman
Sonikatör	UW2070	Bandelin
Analog tüp roller	SRT9D	Stuart Equipment
Manyetik stand	DynaMag-2	Invitrogen
Tüp döndürücü	SRT6D	Stuart
Mikroplaka okuyucu	iMark	BioRad
Dikey jel elektroforez sistemi	Mini Protean Tetra Cell 1658004	BioRad
Güç kaynağı	PowerPac Basic	BioRad
Transfer sistemi	TransBlot Turbo 10016505C	BioRad
Kemiluminesans Görüntüleme Cihazı	ChemiDoc MP 1708280	BioRad
Termal Döngüleyici	MyCycler	BioRad
Su banyosu	BM302	Nüve

UV Transillüminatör Görüntüleme Cihazı	GelDoc XR	BioRad
Laminar Flow	HeraSafe KS 12	Thermo Scientific
Mini Spin Cihazı	Mini-6k	MiuLab

Ek Tablo 2. Kullanılan hücre kültürü donanımları

Adı	Ürün Kodu	Firma
6-kuyucuklu plaka	92006	TPP
12-kuyucuklu plaka	92012	TPP
96-kuyucuklu plaka	92096	TPP
25 cm ² hücre kültür kabı	90026	TPP
75 cm ² hücre kültür kabı	90076	TPP
60 mm hücre kültür kabı	93060	TPP
100 mm hücre kültür kabı	93100	TPP
Serolojik pipet (5ml)	94005	TPP
Serolojik pipet (10ml)	94010	TPP
0,22 µm şırınga filtresi	99722	TPP
Enjektör	6944425888871, Yeşil uç iğneli 21G	Astraject
CO ₂ inkübatör	HeraCell 150i 51026280	Thermo Scientific
CO ₂ inkübatör	HeraCell 150	Thermo Scientific
Hücre kazıyıcı	280 mm	Greiner Bio-One
15 ml falkon	91015	TPP
50 ml falkon	91050	TPP
Hemositometre	40441	Assistent Germany
Kriyovial tüp	5042000C	CAPP
Pipet ucu (1000 µl)	5130130	CAPP
Pipet ucu (200 µl)	4130075	CAPP
Pipet ucu (10 µl)	5030010	CAPP

Ek Tablo 3. Kullanılan kimyasalların listesi

Adı	Ürün Kodu	Firma
Tris Baz	648310	Calbiochem
Tris-HCl	648317	Calbiochem
Triton-X-100	T8787-100ML	Sigma
Sığır Serum Albumin (BSA)	A2153	Sigma Aldrich
Akrilamid/Bisakrilamid %30 37,5:1	A3699	Sigma Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	1177GR100	Neofroxx
APS	A2941	Applichem
TEMED	A1148	Applichem
İzopropanol	34863	Sigma Aldrich
Gliserol	GB0232	BioBasic
Bromfenol mavisi	A2331,0025	AppliChem
Glisin	3570	Calbiochem
Protein Marker	PageRuler Plus 26620	Thermo Scientific
PVDF membran	88518	Thermo
Yağsız Süt Tozu	1172KG001	Biofroxx
Tween-20	822184	Merck
p-Kumarik Asit	C9008	Sigma Aldrich
Luminol	A2185	Applichem
Ponceau S	A1405	Applichem
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	107209	Merck
FBS	10500-064	Gibco
Penisilin-Streptomisin	P06-07350	PAN BioTech
RPMI Besiyeri	P04-18047	PAN BioTech

EMEM Besiyeri	P04-03590	PAN BioTech
McCoy's 5A Besiyeri	BE12-688F	Lonza
DMEM:F12 Besiyeri	D8437-500ML	Sigma
HEK293	CRL-1573	ATCC
A498 hücreleri	CRL-1435	ATCC
CAKI-1 hücreleri	HTB-38	ATCC
HEK-293 hücreleri	CRL-1740	ATCC
Trypsin-EDTA	SH30042.01	Hyclone
DMSO	D8418	Sigma Aldrich
DAPI	1322MG025	Biofroxx
10X PBS	P04-53500	Pan Biotech
Absolute Etanol	100983.2511	Merck
Etanol	CAS 64-17-5	Alko Med
Endojen Biyotin Bloklama Kiti	E21390	Thermo Scientific
Streptavidin-FITC konjugat	SA1001	Invitrogen
FuGene HD Transfeksiyon Ajanı	E2311	Promega
Higromisin	1358MG250	Neofroxx
PureZol RNA İzolasyon Ajanı	7326890	Bio-Rad
Kloroform	UN1888	Applchem
iScript cDNA Sentez Kiti	1708891	Bio-Rad
iQ SYBR Green Supermix	170-8880	Bio-Rad
RNase free dH ₂ O	129112	Qiagen
Amicon falkon santrifugal filtre	UFC900324	Merck

M-PER Protein Reagent	Mammalian Extraction	78501	Thermo Scientific
Tripan mavisi		EBT-001	NanoEnTek
Asetik asit		27225	Sigma Aldrich
Amonyum Asetat		101115.1000	Merck

Ek Tablo 4. Kullanılan tamponların içeriği

Bakteri Total Protein İzolasyonu için Lizis Tamponu	20 mM Tris-HCl pH: 7,5, 300 mM NaCl, 2M Üre, %2 Triton X-100, 1mg/ml Lizozim ve 1X EDTA içermeyen Proteaz İnhibitor Kokteyli karıştırılarak hazırlanır.
Memeli Hücre Lizis Tamponu (Cell lysis buffer, CLB)	10 ml M-PER Memeli Protein Ekstraksiyon ajanına 1 tablet Proteaz inhibitör eklenerek hazırlanmıştır. +4°C’ de saklanmıştır.
Bovine Serum Albumin (BSA, Protein Standardı)	0,015 gram BSA tartılmış, 10 ml distile suda çözülmüş ve 0,22 µm’ lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır. +4°C’ de saklanmıştır.
Amonyum Persülfat	0,1 gram amonyum persülfat tartılmış ve 1 ml distile suda çözdürülerek kullanılmıştır. -20°C’ de saklanmıştır.
5X Laemmli Yükleme Tamponu	60 mM Tris-HCl pH:6,8, %2 SDS, %10 Gliserol, %5 β-merkaptoetanol, %0,01 Bromfenol mavisi karıştırılarak hazırlanır.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu	10X konsantrasyonda Yürütme tamponu hazırlamak için 30,3 gram Tris, 114 gram Glisin ve 1 gram SDS tartılmış, 500 ml distile suda çözdürülmüş ve pH' ı 8.3' e ayarlandıktan sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde
	hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10 seyreltilerek 1X konsantrasyona dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır. +4°C' de saklanmıştır.
Transfer Tamponu	10X konsantrasyonda Transfer tamponu hazırlamak için 33,3 gram Tris ve 144 gram Glisin tartılmış, 500 ml distile suda çözdürülmüş ve pH' ı 8.3' e ayarlandıktan sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 100 ml 10X Transfer tamponu, 150 ml metanol ve 750 ml distile su ile 1X' e dönüştürülerek kullanılmıştır. +4°C' de saklanmıştır.

10X TBS	10X konsantrasyonda TBS tamponu hazırlamak için 86,6 gram NaCl ve 12,11 gram Tris tartılmış, 500 ml distile suda çözündürülmüş ve pH' ı 8' e ayarlandıktan sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10 seyreltilerek 1X konsantrasyonu dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
TBS-Tween (TBS-T)	500 ml 1X TBS ile 500 µl Tween TM -20 karıştırılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
%5 Bloklama Sütü	2,5 gram yağsız süt tozu tartılmış ve 50 ml' ye TBS-T ile tamamlanmıştır.
Kumarik Asit	0,15 gram P-kumarik asit 10 ml DMSO' da çözündürülerek hazırlanmıştır. +4°C' de saklanmıştır.
Luminol	0,44 gram Luminol 10 ml DMSO' da çözündürülerek hazırlanmış ve -20°C' de saklanmıştır.
Membran Stripleme Tamponu	15 gram glisin, 1 gram SDS ve 10 ml Tween-20 yaklaşık 800 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra pH' ı 2,2' ye ayarlanmış ve son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

10X PBS	10X konsantrasyonda PBS tamponu hazırlamak için 80 gram NaCl, 2 gram KCl, 14,4 gram Na ₂ HPO ₄ ve 2,4 gram KH ₂ PO ₄ , 500 ml distile suda çözdürülmüş ve pH' ı 7,4' e ayarlandıktan sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10 seyreltilerek 1X konsantrasyonu dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
10X TBE	10X konsantrasyonda TBE tamponu hazırlamak için 108 gram Tris ve 55 gram Borik asit 500 ml distile suda çözdürülmüş, 40 ml 0,5 M EDTA (pH:8) eklenmiş ve son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10
	seyreltilerek 1X konsantrasyonu dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır.
Dot Blot Bağlanma Tamponu	15 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ karıştırılarak hazırlanmıştır.
PBB Tamponu	0,1 gram BSA tartılmış ve 20 ml 1X PBS içerisinde çözülerek PBB çözeltisi hazırlanmıştır. +4°C' de saklanmıştır.

Permeabilizasyon Çözeltisi	10 µl Triton-X-100 10 ml 1X PBS ile karıştırılarak hazırlanmıştır. +4°C’ de saklanmıştır.
İmmunofloresan Bloklama Tamponu	0,1 gram BSA, 5 ml 1X PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. +4°C’ de saklanmıştır.
Hücre Medyası	Temin edilen EMEM, McCoy’ s 5a ve RPMI besiyerleri, son konsantrasyonları %10 FBS %1 Penisilin-Streptomisin olacak şekilde karıştırılıp 0,22 µm’ lik filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. +4°C’ de saklanmıştır.

Ek Tablo 5. %4-12’ lik SDS-Poliakrilamid Jel içeriği

	%12 Yürütme Jeli (Alt Jel)	%4 Yükleme Jeli (Üst Jel)
dH ₂ O	1,7 ml	1,537 ml
Tris-HCl	1,25 ml (1,5 M, pH 8.8)	0,625 ml (0,5 M, pH 6.8)
% 10 SDS	50 µl	25 µl
Akrilamid/Bisakrilamid %30 37,5:1	2 ml	0,335 ml
%10 APS	40 µl	12,5 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl