

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

WILMS TÜMÖRÜNDE MİKRO-RNA' LAR

AYLİN ÇALLI
ORCID: 0000-0003-4148-5924

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
Moleküler Tıp Doktora Programı
DOKTORA TEZİ

İZMİR
OCAK 2024

TEZ KODU: DEU.HSI. PhD -2014970172

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

WILMS TÜMÖRÜNDE MİKRO-RNA' LAR

AYLİN ÇALLI
ORCID: 0000-0003-4148-5924

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
Moleküler Tıp Doktora Programı
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdener ÖZER
ORCID: 0000-0001-5743-5222

İZMİR
OCAK 2024

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “WILMS TÜMÖRÜNDE MİKRO-RNA’LAR” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri akademik kurallar içerisinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel ahlak ve etik kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Aylin ÇALLI

01.01.2024

TEŞEKKÜR SAYFASI

Tez danışmanım, örnek almaktan gurur duyduğum Sayın Prof. Dr. Erdener ÖZER'e doktora ve tez çalışmalarım boyunca kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana verdiği destek ve özverili rehberliği için, paha biçilemez deneyimlerini ve bilgilerini esirgemediği için derin şükranlarımı sunmaktan büyük bir mutluluk duyuyorum.

Tezimin izleme komitesinde yer alan; desteğini ve şefkatini her daim gösteren, bilgi ve deneyimlerini aktaran, her daim zamanını sevgiyle ayıran Sayın Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL'e ve geri bildirimleri ve yorumları ile tezimin daha etkin ve iyi sonuçlandırılmasında kılavuz olduğu için Sayın Doç. Dr. Can KÜÇÜK'e minnettarlığımı belirtmek isterim.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ başta olmak üzere tüm Değerli Öğretim Üyeleri'ne ve tüm çalışanlarına doktora eğitimim boyunca engin bilgi birikimlerini benimle paylaştıkları ve yardımları için çok teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini paylaştan, desteğini esirgemeyen Prof. Dr. İsmail YILMAZ ve Uzm. Dr. Gizem ISSIN'a çok teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel analizi boyunca bilgi deneyimleriyle çalışmama büyük katkı veren, dostluğunu her daim hissettiren Sevgili Prof. Dr. Özlem EGE ORUÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

Çocukluğumdan itibaren hedeflerimi sevgiyle gerçekleştirmemi mümkün kıldıkları için ve hep yanımda oldukları ve hissettirdikleri için Sevgili Aileme minnetle sevgiyle sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman her durumda sevgiyle ayakta durmamı sağlayan, sevgilerini ve desteklerini her daim hissettiren, dünyama sonsuz mutlu anlamlar getiren Biricik Kızıma ve Biricik Oğluma sağlıklı mutlu uzun ömürler diliyorum. Dayanıklılığı, nezaketi, sevgisi, gülümsemesi ve güldürmesiyle benim her zaman itici gücüm olan onsuz ne yapardım dediğim Sevgili Eşim Dr. Çağlar ÇALLI'ya derin sevgilerimi yolluyorum. İYİ Kİ VARSINIZ.

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	I
ŞEKİLLER DİZİNİ	II
SİMGELER VE KISALTMALAR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.Wilms Tümörlerinde Epidemiyoloji	4
2.2.Wilms Tümörlerinde Genetik	4
2.3.Wilms Tümörlerinde Klinikopatolojik Prognostik Faktörler	6
2.4.Wilms Tümöründe MikroRNA'lar	14
2.5.Elongasyon Faktör-2 Kinaz, MikroRNA ve Kanser	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1.Araştırmanın Tipi	25
3.2.Araştırmanın Yeri ve Zamanı	25
3.3.Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	25
3.4.Araştırmanın Materyali	25
3.5.Araştırmanın Değişkenleri	26
3.6.Araştırmada Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeleri	26
3.6.1.Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereçleri	26
3.6.2.Araştırmada Kullanılan Kitler	26
3.7.Araştırma Takvimi ve Planı	27
3.8.Yöntemler	29
3.8.1.Olgu bloklarının mi-RNA analizi için hazırlanması	29
3.8.2.Deparafinizasyon, RNA izolasyon Basamakları	31
3.8.3. RNA Derişimlerinin Belirlenmesi	34
3.8.4. Total RNA'dan Komplementer DNA Sentezi	35
3.8.5. MiRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	37
3.8.6. Hedef miRNA Ekspresyon Verilerinin Normalizasyonu ve Ekspresyon Profillerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi	39
3.9.İstatistiksel analiz	39

3.10.Araştırmanın Sınırlılıkları	40
4. BULGULAR	41
4.1.Çalışma Örnekleminin Tanımlayıcı Demografik Verileri	41
4.2.Çalışma Örneklemin MiR-603 ve MiR-877 Ekspresyon Analizi ve Klinik ve Patolojik Parametrelerle İlişkisi	44
5.TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
7. KAYNAKLAR	54
8. EKLER	66



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Tedavi sınıflandırmasında prognostik önemi olan bilinen faktörler	9
Tablo 2. Wilms tümöründe patolojik alt tipler	10
Tablo 3. WT olgularında NWTSG/COG ve SIOP histolojik risk sınıflandırması	12
Tablo 4. Wilms Tümörlerinde NWTSG/COG Evreleme Sistemi	13
Tablo 5. Wilms Tümörlerinde SIOP Evreleme Sistemi	14
Tablo 6. Ayrıntılı çalışma takvimi	28,29
Tablo 7. Revers transkripsiyon reaksiyonu için karışım protokolü	36
Tablo 8. Revers Transkripsiyon için süre-sıcaklık programı	36
Tablo 9. RT-qPCR 20 µl'lik reaksiyonu için kullanılacak solüsyon miktarları	38
Tablo 10. Çalışmada RT-qPCR 20 µl'lik reaksiyonu için solüsyon miktarları	38
Tablo 11. Klinikopatolojik özellikler ve miR603 ve Mir877 ekspresyonları	42
Tablo 12. Klinikopatolojik özellikler ve miR603 ve Mir877 ekspresyonları	43
Tablo 13. Yaş ile miR-603 istatistiksel anlamlı ilişkisi	45
Tablo 14. Mikro RNA-603 disregülasyonu ile cinsiyet, lateralite, tümör çapı, tümör ağırlığı, blastemal baskınlığının istatistiksel değerlendirmesi	45
Tablo 15. Mikro RNA-603 ekspresyon düzeyleri ile evre, AC metastazı, nüksün istatistiksel değerlendirmesi	46
Tablo 16. Olguların risk grupları ile mir-603 düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi	46
Tablo 17. Hastaların RT ve preoperatif KT tedavisi ile miR-603 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel değerlendirme	46
Tablo 18. Yaş ve cinsiyet ile miR-877 istatistiksel değerlendirmesi	47
Tablo 19. Lateralite, tümör çapı, tümör ağırlığı, blastemal baskınlığının miR-877 düzeyi ile istatistiksel değerlendirmesi	47
Tablo 20. Evre, AC metastazı ve nüksün miRNA-877 ekspresyon düzeyleri ile istatistiksel değerlendirmesi	48
Tablo 21. Olguların risk gruplarının miR-603 düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi	48
Tablo 22. Mikro RNA-877 ve olguların RT ve preoperatif KT tedavisi	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Wilms Tümöründe Anaplazi	11
Şekil 2. MikroRNA Biyogenezi	16
Şekil 3. Protein sentezinde eEF2 ve eEF2K uzama aşamasında rolü	22
Şekil 4. Tümör mikroçevre koşullarının eEF2K üzerindeki etkileri	23
Şekil 5. Wilms Tümöründe Histolojik Alt Tipler	30
Şekil 6. Wilms Tümörlerinde Demonstratif Tümör Alanının İşaretlenmesi	30
Şekil 7. Wilms Tümörlerinde Tümör Dokusunun ependorf tüplerine alınması	31
Şekil 8. RNA izolasyonunda deparafinizasyon uygulama basamakları	32
Şekil 9: RNA izolasyonu basamakları	34
Şekil 10. RNA konsantrasyonunun belirlenmesi	35
Şekil 11. Örneklerin RT-qPCR aşamaları	39
Şekil 12. Olguların miR-603 ekspresyon düzeyleri	44
Şekil 13. Olguların miR-877 ekspresyon düzeyleri	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

WT	Wilms Tümörü
NWTSG	Ulusal Wilms Tümör Çalışma Grubu
COG-RTC	Çocuk Onkoloji Grubu Böbrek Tümörü Komitesi
SIOP-RTSG	Uluslararası Pediatrik Onkoloji Derneği Böbrek Tümörü Çalışma Grubu
KT	Kemoterapi
RT	Radyoterapi
ABD	Amerika Birleşik Devleti
GS	Genel sağkalım
MiRNA, miR	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
WAGR	Wilms tümörü, aniridia, genitor-üriner anomaliler, büyüme geriliği ve mental gerilik
IGF-2	İnsülin benzeri büyüme faktörü 2
RISC	RNA kaynaklı susturma kompleksi
SBÜ	Sağlık Bilimleri Üniversitesi
FFPE	Formaline fikse parafine gömülü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-qPCR	Kantitatif gerçek zamanlı ters transkripsiyon PCR
c-DNA	Komplementer DNA
RT	Reverse Transkripsiyon
RNU6b	Küçük kodlama yapmayan RNA geni
tRNA	Taşıyıcı RNA
eEF	Ökaryotik uzama faktörleri
eEF2K	Ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz
eEF2	Ökaryotik uzama faktörü 2
mTORC1	Memeli hedefi rapamisin kompleksi 1
AMPK	Adenosin monofosfatla aktiveleştirilen protein kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
HMGA	Yüksek hareketlilik grubu A
LSHK	Larengeal skuamöz hücreli karsinom

WILMS TÜMÖRÜNDE MİKRO-RNA' LAR

Doktora Tezi

Aylin ORGEN ÇALLI

**Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı**

ÖZET

En yaygın pediatrik böbrek malignitesi olan Wilms tümörü (WT) klinik, histolojik ve moleküler olarak heterojen malign tümördür. Patogenezin WT'de daha iyi anlaşılması, yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine olanak sağlayacaktır. Bu nedenle çalışmamızda miR-603 ve miR-877'nin WT gelişiminde ve prognozunda rolünü analiz etmeyi amaçladık.

Wilms tümör (WT) tanısı almış 24 formalinle fıkse parafine gömülmüş doku örneğinden ve 24 normal böbrek dokusunda miR-603 ve miR-877'nin göreceli ekspresyon seviyeleri, ters transkripsiyon-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) aracılığıyla tespit edildi ve miR-603 ve miR-877 ekspresyonunun klinikopatolojik prognostik parametrelerle ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirildi.

Normal dokuya göre tümör dokusunda olguların 8'inde miRNA-603 ekspresyonunda artış ekspresyonun 16 olguda ise azaldığı saptandı. MiRNA-877 ekspresyonunda ise olguların yaklaşık %60'ında aşağı regülasyonu dikkati çekti. MiR-603 ve miR-877 ekspresyon değerleri klinikopatolojik parametrelerle istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 4 yaş ve daha büyük olan bireylerde istatistiksel olarak anlamlı derecede miR-603 ekspresyonunun daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Diğer parametrelerle anlamlılık saptanmadı.

Çalışmamız Wilms tümöründe mi-RNA 603 ve 877'nin klinikopatolojik kriterlerle karşılaştırıldığı ilk çalışma olması açısından önem arz etmektedir. Verilerimiz ışığında WT olgularında miR-603 ve miR-877'nin down-regülasyonunun WT patogenezinde rol oynayabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamız daha büyük örneklem büyüklüğüne sahip ileri çalışmalar için ilk bulgu niteliğindedir.

Anahtar Szckler: Wilms, tümör, mikroRNA, miRNA-603, miRNA-877

Tezin Sayfa Adedi: 66

Danışman: Prof. Dr. Erdener zer

MICRO-RNAS IN WILMS TUMOR

PhD Thesis

Aylin ORGEN CALLI

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

Wilms tumor (WT), the most common pediatric kidney malignancy, is a clinically, histologically, and therapeutically heterogeneous malignant tumor. A better understanding of the pathogenesis in WT will allow the identification of new therapeutic targets. Therefore, in our study, we aimed to analyze the role of miR-603 and miR-877 in the development and prognosis of WT.

The relative expression levels of miR-603 and miR-877 were determined in 24 formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples diagnosed with WT, as well as in 24 normal kidney tissues, using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The association expression of miR-603 and miR-877 with clinicopathological prognostic parameters was statistically evaluated.

Compared to normal tissue, an increase in miRNA-603 expression was observed in 8 cases, while a decrease was noted in 16 cases. Additionally, approximately 60% of the cases showed down-regulation of miRNA-877 expression. Statistical evaluation of miR-603 and miR-877 expression values with clinicopathological parameters revealed a statistically significant increase in miR-603 expression in individuals aged four years and older ($p < 0.05$). No statistical significance was found with other parameters.

Our study is noteworthy, as to the best of our knowledge, it is the first to compare miRNA-603 and miRNA-877 with clinicopathological criteria in Wilms tumor. Our findings suggest that the down-regulation of miR-603 and miR-877 in WT cases may be implicated in its pathogenesis, providing a foundational insight for subsequent studies with larger sample sizes.

Key Words: Wilms, tumor, microRNA, miRNA-603, miRNA-877

Page number: 66

Advisor: Prof. Dr. Erdener Ozer

1. GİRİŞ VE AMAÇ:

Nefroblastom olarak da bilinen Wilms tümörü (WT) en sık görülen dördüncü pediatrik kanser olup çocuklarda en sık görülen böbrek kanseridir. İlk kez 1899'da adını aldığı Alman doktor Dr. Max Wilms tarafından tanımlanan WT genellikle beş yaşından küçük çocuklarda saptanmaktadır. En yüksek insidansla 2-3 yaşlarında ortaya çıkar (1-3). Çocukluk çaının embriyonel tümörleri arasında sınıflandırılan WT'nün nedeni kesin olarak bilinmemekle birlikte genito-üriner sistemin normal embriyolojik gelişimiyle genetik değişikliklerden kaynaklandığı belirtilmektedir. Wilms tümör ile ilişkilendirilen genetik değişikliklerden WT1, CTNNB1 ve WTX gen değişiklikleri olguların yaklaşık 1/3'ünde saptanmaktadır. TP53 ve MYNC geni WT ilişkili diğer genlerden biridir. TP53 mutasyonu ve 1p, 1q, 11p15 ve 16q kromozomlarındaki heterozigosite kaybı olan olgularda kötü prognoz söz konusudur (1).

Vakaların çoğunluğu sporadiktir, ancak %10-15'i Beckwith-Wiedemann, Denys-Drash veya WAGR (WT, aniridi, genitor-üriner anomaliler, mental gerilik ve büyüme geriliği) gibi tümör gelişimine yatkınlık yaratan genetik malformasyon sendromlarıyla ilişkili olarak ortaya çıkar (4).

Tedavi planlarının ortaya çıktığı iki uluslararası multidisipliner konsorsiyum; daha önce Ulusal Wilms Tümör Çalışma Grubu (NWTSG) olarak bilinen Kuzey Amerika'daki Çocuk Onkoloji Grubu Böbrek Tümörü Komitesi (COG-RTC) ve Avrupa'daki Uluslararası Pediatrik Onkoloji Derneği Böbrek Tümörü Çalışma Grubu (SIOP-RTSG) dur. COG-RTC protokolleri, mümkün olan vakalarda ön cerrahiye zorunlu kılmakta ve erken histolojik tanı ile adjuvan tedaviyi birlikte yönlendiren lenf nodu değerlendirmesi yoluyla daha doğru evreleme yapıldığını savunmaktadır (5). Cerrahi rezeksiyonun aynı zamanda belirli alt gruplarda kemoterapiye maruz kalmayı en aza indirme veya önleme fırsatı da sağladığı da belirtilmektedir. SIOP protokolü ise, lokal ilerlemiş veya metastatik hastalık olmasa bile biyopsi olmadan neoadjuvan kemoterapiyi (KT) ve ardından cerrahi rezeksiyonu önermektedir. Adjuvan tedavi daha sonra histolojik tümör özelliklerine göre uyarlanır. Bu yaklaşım, tümör boyutunun küçültülmesine neden olur, cerrahi rezeksiyonu kolaylaştırır ve ameliyat sırasında tümörün yayılma olasılığını azaltır (6). Ancak preoperatif kemoterapi, neoplastik hücrelerin lenf düğümlerinden yok

edilmesi ve buna bağlı olarak daha düşük post-operatif tümör evresi gibi önemli evreleme bilgilerinin kaybına yol açabilir.

Günümüzde cerrahi rezeksiyon, adjuvan ve/veya neoadjuvan KT ve bazı durumlarda radyoterapiden (RT) oluşan bir kombinasyon terapisi lokalize WT için %90'ı, metastazlı WT için %75'i ve WT nüksü durumunda %50'yi aşan bir genel sağkalıma (GS) ulaşmaktadır (7).

Multidispliner klinik çalışmalar ile WT biyolojisinin giderek daha iyi anlaşılması ile tedavi direnci ve kötü prognoz ile ilişkili moleküler belirteçlerin tanımlanması nedeniyle WT olgularında genel sağ kalım oranı artmıştır. Ancak bazı olgularda düşük sağ kalım oranları söz konusudur ve tedaviye bağlı uzun vadeli yan etki izlenmektedir (8). Genel sağ kalım ve semptomsuz (olaysız) sağ kalım oranlarının azalmasına ilişkin risk faktörleri şunlardır; indüksiyon KT sinden sonra tümör içindeki üçte ikiden fazla blastemal hücre (SIOP protokolü, hastaların %8-9'u), anaplastik histoloji (hastaların %5-10'u), 1p/16q kromozomlarında heterozigosite kaybı (LOH) (sırasıyla hastaların %12 ve 17'si), metastaz (hastaların %12-17'si), iki taraflı WT (hastaların %5-8'i) ve WT nüksü (hastaların %20'si) (9-15). Bu olgular yoğun kemoterapi ve radyoterapiye gereksinim duymaktadır ve tedaviye bağlı yan etkiler açısından risk taşımaktadır. Genel olarak, WT hastalarının %25'inde böbrek yetmezliği, kalp toksisitesi, pulmoner kısıtlayıcı hastalık, kısırlık ve ikincil maligniteler gibi sonradan ortaya çıkan yan etkiler izlenmektedir (16,17).

Anormal fetal nefrogenezden kaynaklanan WT değişen derecelerde blastemal, epitelyal ve stromal histolojik komponentden oluşmaktadır. WT prognoza dayalı olarak olumlu ("favorable") ve olumsuz ("unfavorable") olmak üzere iki histopatolojik tipi tanımlanmıştır (18). Olumsuz grup, anaplazili (aşırı nükleer ve sitolojik atipi) Wilms tümörlerini içerir. Olumlu histolojiye sahip tümörler, anaplastik (olumsuz) histolojiye sahip olanlardan daha iyi prognoza sahiptir. Anaplazi, Wilms tümörlerinin yaklaşık %5'inde mevcuttur ve daha büyük çocuklarda daha sık görülür ve yaklaşık 5 yaşında zirveye ulaşır (5). Anaplazi (belirgin nükleer ve sitolojik atipi) varyantı Afrika kökenli Amerikalı hastalarda daha sık görülmektedir. Anaplazi, doğası gereği fokal veya yaygın olabilir; fokal alt tip biraz daha iyi prognoz sergiler.

Anaplazi içeren olgular daha büyük çocuklarda daha sık görülür (19). Özellikle "yaygın anaplastik" histolojili evre IV (<%30) WT olgularında, beş yıllık sağkalım oranı düşüktür (20). Bu nedenle, yeni biyobelirteç keşfi WT olgularında hem düşük riskli tümörlerin aşırı tedavisini hem de yüksek riskli tümörlerin yetersiz tedavisini azaltabilir ve gereksiz morbiditeyi ve istenmeyen sonuçları sınırlandırabilir.

MiRNA'lar (miRNA), yaklaşık 18-23 nükleotid içeren tek sarmallı, kodlamayan, kısa RNA molekülleridir (21). MiRNA'lar, hedef genlerinin mRNA'ların translasyona uğramayan 3' bölgesine (3'-UTR'ler) tamamlayıcı dizilere doğrudan bağlanarak translasyonun inhibisyonuna ve/veya mRNA bozulmasına neden olan kritik gen düzenleyicileri olarak görev yapmaktadır (22). MiRNA'lar hücre çoğalması, gelişimi, farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynar (23,24). Son yıllarda giderek artan miRNA çalışmalarında insan genlerinin yaklaşık %30'unun miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir ve miRNA'ların kanser gelişiminde rol oynadığı vurgulanmaktadır (25-27). Onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu düzenleyebildikleri için onkogenler ve tümör baskılayıcılar olarak tanımlanmakta, tanısal ve prognostik amaçlarla miRNA analizinin önemi vurgulanmaktadır (28).

Kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rolleri olan miRNA disregülasyonu WT dahil olmak üzere çoğu insan malignitesinde gözlenmektedir (29-40). Mikro RNA'lar arasında miRNA-21, miRNA-140-5p ve miRNA-155-5p en kapsamlı şekilde çalışılmış olanlardır. MiRNA-21'in sürekli olarak aşırı eksprese edildiği gösterilmiş ve PTEN ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile korelasyonu nedeniyle WT'nin kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir (31,32). Öte yandan, WT'de tipik olarak aşağı regüle edilen miRNA-140-5p ve miRNA-155-5p nin hücresel proliferasyonu inhibe etme ve metastazı önleme potansiyeli gösterilmiştir (33,34).

Oldukça heterojen tümör grubu olan WT patogenezinde yer alan karmaşık biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılması; daha iyi tanı, etkin risk sınıflandırması, hasta yönetimi, daha iyi prognoz ve survi oranlarına olanak sağlayacaktır. WT'de doğru biyobelirteçlerin tanımlanmasının tedavinin standartlaştırılmasına katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızın amacı, WT olgularında miRNA-603 ve miRNA-877'nin potansiyel bir prognostik biyobelirteç olarak rolünü belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Wilms Tümörlerinde Epidemiyoloji

Wilms tümörü çocukluk çağı böbrek tümörlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. Çocuklarda böbrek tümörlerinin görülme sıklığı, büyüme hızı, tipi ve tedaviye yanıtı erişkin böbrek kanserlerinden önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Çocuklarda böbrek tümörlerinin çoğu embriyonel kökenli iken erişkinlerde daha sıklıkla karsinom izlenmektedir. Aksine böbrek hücreli karsinomlar, sarkomlar ve böbreğin diğer tümörleri çocuklarda oldukça nadirdir. Bununla birlikte çocukluk çağı böbrek tümörleri erişkin tümörlere göre tedaviye daha iyi yanıt verir (41).

Wilms tümörü kızlarda daha sık izlenmektedir. WT hastalarının ortalama tanı yaşı 3-4 yıldır ve vakaların %90'ına 7 yaşından önce tanı konmaktadır (42). Tümör, beyaz ırktan olgular arasında hafif bir kız üstünlüğüne sahip olan birkaç çocukluk çağı kanserinden biridir. Buna karşılık, Asyalı çocuklarda hastalık yaşamın ikinci yılında zirveye ulaşır ve Doğu Asya popülasyonunda erkek çocuklarda kızlardan daha fazla görülme sıklığı izlenmiştir. Bu tümörün görülme sıklığındaki topografik farklılıklar gösterilmiş olmasına rağmen, tümörün görülme sıklığı coğrafi bölgelerden ziyade neredeyse tamamen etnik gruplara göre değişmektedir. Bildirilen en yüksek oranlar siyah Afrika kökenlilerde, en düşük oranlar ise Asya kökenlilerdedir. Bu varyasyon WT etiyojisinde genetik faktörlerin en önemli rolü oynadığını düşündürmektedir (43, 44). Tümör genellikle tek böbrekte ortaya çıkar. Senkron iki taraflı ve multifokal tümörler olguların yaklaşık %20'sinde görülür ve daha erken yaşta ortaya çıkma eğilimindedir (45,46). Wilms tümörü yetişkinlerde son derece nadirdir ve tüm böbrek tümörlerinin %1'inden azını oluşturur (47).

2.2. Wilms Tümörlerinde Genetik

Olguların %5'inde yatkınlık sendromları, 50'den fazla sendromun ilişkili olduğu bilinen WT oluşumuna neden olabilir (44). En yaygın sekiz tanesi tanımlanmış olup, WT1 gen anormallikleri sonucu genito-üriner malformasyonu olanlar ve aşırı büyüme fenotipi olanlar olarak iki ayrı kategoriye ayrılmıştır. İlk kategoride yer alan WAGR sendromu ve Denys-Drash sendromudur. İkinci kategoride ise Perlman and Beckwith-Wiedemann sendromu bulunmaktadır.

WAGR (WT, aniridia, genitor-üriner anomaliler, büyüme geriliği ve mental

gerilik) WT1 ve PAX6 genlerini içeren 11p13 delesyonu ile ilişkilidir ve %45-57 olguda WT gelişmektedir. Denys-Drash sendromunda ise kromozom 11 (11p13) üzerinde bulunan Wilms tümör baskılayıcı geni WT1'deki nokta mutasyonlardan kaynaklanmakta olup, olguların yaklaşık %74'ünde WT gelişme riski söz konusudur (48).

Kromozom 11p15 üzerinde lokalize WT2 geni ile ilişkili aşırı büyüme sendromu olan Beckwith-Wiedemann sendromu abdominal duvar defektleri, makroglosi ve makrozemi ile karakterizedir. Moleküler temeli karmaşıktır ve 11p15 bölgesi içindeki telomerik Alan 1 (İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF-2) ve H19) ve sentromerik Alan 2 (KCNQ1, KCNQ1OT1 ve CDKN1C) olarak 2 alanda bulunan damgalanmış genlerin ekspresyonu izlenmektedir. Farklı genotiplerin analizi, yalnızca IGF2 ekspresyonunda artışla sonuçlananların WT geliştirme riskinin artmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (49-51). Bu lokustaki değişikliklerin, WT geliştirme riski yüksek olan izole hemi-hipertrofisi olan bir hasta alt grubunun da temelinde yattığı düşünülmektedir (49). Bu sendromlu olgularda WT gelişme riski %5-10 dolayında iken Perlman (makrozomi, adacık hücresi hiperplazisi, renal hamartomlar ve atipik yüz şekli) sendromlu bireylerde ise %64 dolayındadır (48).

İlk olarak 1971'de Alfred G. Knudson tarafından tanımlanan ve “Knudson hipotezi” olarak adlandırılan iki vuruşlu modelde fenotipik bir değişikliğe neden olması için mutasyonlar veya epigenetik susturma yoluyla ilgili genin her iki allelinin de etkisiz hale getirilmesi gerektirdiği belirtilmektedir (52). Wilms tümör geninin iki kopyasının da etkisizliğine neden olan bu model hem hereditör sendromlar bağlamında hem de sporadik WT'de kabul edilen bir model oluşturmaktadır (45).

Ancak WT'nin çoğunluğu germ-line mutasyonları ve/veya konjenital yatkınlık sendromları bağlamında gelişmez aksine daha çok sporadik mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Wilms tümöründe en iyi karakterize edilen somatik mutasyonlar; konjenital sendromlara çok benzer şekilde WT1 ve IGF2'nin ekspresyonu, Wnt/ β -catenin (CTNNB1 protein) sinyal yolağının aktivasyonu ve TP53 ve MYCN'deki mutasyonlardır. WT1 geni delesyon veya nokta mutasyonu sporadik Wilms tümörlerinin %10-20'sinde izlenmektedir (53-57).

Wilms tümörlerini moleküler patogeneze göre alt sınıflandırmaya yönelik

öneride bulunulmuştur. Tip 1 tümörler olarak adlandırılan tümörler daha genç yaş, stromal baskın histoloji, interlober nefrojenik kalıntıların varlığı, WT1 geninin inaktivasyonu ve beta katenin aktivasyonu ile sınıflandırılırken tanı sırasında ileri yaş, perilobar nefrojenik kalıntı varlığı ve IGF2'nin ekspresyonu ile karakterize olan olgular tip 2 olarak belirtilmektedir (4,58). Ancak kompleks patojenik mekanizmaların söz konusu olduğu heterojen WT olgularında gerçekte böyle bir sınıflandırma muhtemelen basit kalmaktadır.

P53 mutasyonu WT'nin %5'inde görülür ve anaplastik histolojiye sahip hastaların ise %75'inde bulunur hatta fokal anaplazili tümörlerde sadece anaplastik alanlarda inaktivasyonun izlenmesi dikkat çekicidir (56,59,60).

Wilms tümör oluşumunda rol oynayan spesifik genlere ek olarak, özellikle heterozigozite kaybı (LOH) başta olmak üzere kromozomal bölgelerdeki kayıplar ve kazanımlar sık izlenmektedir. Özellikle de 1q, 2, 7q, 8, 12 ve 13 numaralı kromozomların kazanımları ve 1p, 7p, 16q ve 22q numaralı kromozom kayıpları yaygın olarak görülür (56,61). Bu tür kromozomal değişikliklerin araştırılması hız kazanmış ve tedaviyi yönlendirmek için biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır.

Amerika Birleşik Devleti (ABD) NWTSG 5 çalışmasının analizinde, olumlu histolojiye sahip WT'de, kromozom 16p ve 1p'nin LOH'sinin mevcut olması durumunda nüksetme ve ölüm riskinin arttığı gözlemlenmiştir (9). Bu moleküler belirteç mevcut COG WT risk sınıflandırma protokolünün risk sınıflandırmasına dahil edilmiştir. Benzer retrospektif analizler, 16q kaybı için benzer modeller tanımlamış ve Avrupa SIOP WT 2001 çalışmasında 1p ve/veya 16q'de LOH için tümörlerin analiz çalışmaları yapılmıştır. Ancak birleşik 1p ve 16q kaybı vakaların yalnızca %2,6-4,6'sında tanımlanır ve dolayısıyla uygulanabilirliği sınırlıdır (9,62,63). Buna karşılık;1q kromozomunun kazanımı, Wilms tümöründe en yaygın sitogenetik bulgulardan biridir ve WT olgularının yaklaşık %30'unda izlenmektedir. Çalışmalarda olumsuz biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (64-67).

2.3. Wilms Tümörlerinde Klinikopatolojik Prognostik Faktörler

Tüm malignitelerde olduğu gibi WT'lü bireylerde de prognostik faktörlerin belirlenmesi, belirli kişilere en uygun tedavinin uygulanması açısından önem taşımaktadır. Yaş, tümör lateralitesi, boyutu, anaplazi varlığı başta olmak üzere belirli klinikopatolojik faktörler WT olgularında sağkalımı etkileyen önemli

bağımsız parametrelerdir.

Yaş ve tümör ağırlığı: Genç yaş olumlu bir prognostik faktördür. WT olgularını yaş gruplarına göre sınıflandıran çalışmalarda tanı anında artan yaşın olumsuz bağımsız bir faktör olduğu gösterilmiştir (68-77). Evre I, olumlu histolojiye sahip WT olgularının ileri yaş grubunda daha kötü prognoz gösterdikleri ve semptomsuz sağ kalım oranlarının daha düşük olduğu saptanmıştır (68). NWTSG'nun yürüttüğü çalışmada tanı anında ileri yaş ile nüks ve ölüm riskinin artması arasında anlamlı ilişki olduğu belirtilmiştir (74). Destekleyici bir bulgu olarak yaşamın ilk yılında teşhis edilen WT'de anaplazinin neredeyse hiç görülmemesi ve yaşamın ikinci yılında nadir olmasıdır (75). Bununla birlikte, olumlu histolojiye sahip hasta grubunda bile "evre veya histoloji kadar güçlü bir prognostik faktör olmasa da" ileri yaş olumsuz bir faktör olarak görünmektedir. Yaş COG çalışmalarının risk sınıflandırma şemasına yalnızca evre I, olumlu histoloji WT bağlamında dahil edilmektedir. Özellikle tümör ağırlığı 550 gramdan az olan, evre I, olumlu histolojili tümörleri olan 2 yaşından küçük hasta grubunun olağanüstü prognoza sahip oldukları vurgulanmıştır (77,78).

Tümör lateralitesi: Bilateral WT tüm WT'nin %5-8'ini oluşturmaktadır. Unilateral WT olgularına göre yüksek nüks ve risk oranıyla daha kötü prognoz sergilemektedir (70,78).

Patolojik prognostik faktörler: Fetal böbrek; üreter tomurcuğundan (toplama kanallarını oluşturur) ve metanefrik mezenkim/blastemadan (stromayı ve mezenkimden epitelyal geçiş yoluyla proksimal tübüler yapılar, glomerüller, proksimal ile distal tübüller ve Henle kulpunu oluşturur) gelişir (45). Her iki gelişim yolu da transkripsiyon faktörleri, proto-onkogenler, sinyal molekülleri olarak görev yapan polipeptit büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri tarafından düzenlenir.

Nefrojenik kalıntılar, bebeklerin yaklaşık %1'inde izlenen böbrekte yaşamın 36. haftasından sonra hala mevcut olan embriyonal metanefrik doku alanlarıdır. Wilms tümörünü andıran histolojik özelliklere sahip, kalıcı olgunlaşmamış böbrek dokusunun kapsülsüz alanlarıdır. Normal böbrek parankimine olgunlaşmayı başaramayan kalıcı embriyonik kalıntı odaklarından oluşan nefrojenik kalıntıların varlığı, erken böbrek gelişiminde farklılaşmanın bozulmasına işaret eder. Nefrojenik kalıntılar Beckwith tarafından 'Wilms tümörü oluşturacak şekilde indüklenebilen

hücreleri tutan, anormal derecede kalıcı nefrojenik hücrelerin odağı' olarak tanımlanmıştır (79).

Nefroblastomatozis terimi ise multifokal veya diffüz nefrojenik kalıntılar anlamına gelmektedir. Bilateral vakaların %90'ında nefrojenik kalıntılar mevcut olup bunun germ hattında veya gelişen embriyonun çok erken dönemlerinde meydana gelen mutasyonları/epimutasyonları yansıttığı düşünülmektedir (4,79).

Nefrojenik kalıntılar perilober (böbrek korteksinin periferinde lokalize) ve intralober (böbrek lobülünün herhangi bir yerinde lokalize) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Perilober nefrojenik kalıntılar overgrowth sendromlarıyla birliktedir ve interlober olanlara göre malign potansiyeli daha düşüktür. Nefrojenik kalıntılar; regrese olabilir, hiperplaziye uğrayabilir ve sessiz kalabilir (4,79,80). Hiperplastik nefrojenik kalıntılar premalign WT'dir. Wilms tümörlerinin bir kısmının nefrojenik kalıntılardan geliştiği düşünülmektedir ve WT olan hastaların %40'ında nefrojenik kalıntı tespit edilmiştir (4,79). Bu nedenle tanımlanması önemlidir ve hastanın yakından izlenmesini gerektirir.

Nefrojenik kalıntılarının Wilms tümörlerinin öncü lezyonları olduğu düşünülmektedir. Nefrojenik kalıntılarının WT'ne progresyonun her aşamasının, tersine çevrilebilir epigenetik mekanizmalar yani epimutasyon formundaki stabil somatik değişikliklerin kazanılmasından kaynaklandığı varsayılmaktadır. Geniş kapsamlı Kuzey Amerika NWTSG evre 3,4 ve 5 Wilms tümörlü 5.934 hastanın %42'sinde (%20 perilober, %18 intralober, %4 perilober+intralober) nefrojenik kalıntı varlığı tespiti edilmiştir (4).

NWTSG/COG WT olgularında ilk tedavi yaklaşımı olarak cerrahiye (nefrektomiye) önermektedir (81). NWTS-5 protokolü primer nefrektomiye, ardından adjuvan kemoterapi ve radyoterapiyi önermektedir. NWTS 5 çalışmalarına göre, çok büyük boyutlu tümörlerde, çift taraflı olgularda, alt vena kavada hepatik ven seviyesinin üzerinde tümör trombusu olduğunda ve çocukta yaygın akciğer metastazı nedeniyle solunum sıkıntısı ortaya çıktığında preoperatif KT verilmesi ilkesi benimsenmektedir (82).

SIOP; 6 aydan küçük çocuklar hariç, evre 1 Wilms tümörü de dahil olmak üzere tüm hastalara preoperatif kemoterapi önermektedir. Bu yaklaşımın önemli nedeni kemoterapisiz cerrahi girişimlerde tümör hücresi “dökülme-saçılma”

oranlarının yüksek raporlanmış olmasıdır. Ancak SIOP yaklaşımının dezavantajı ise; benign tümörlere gereksiz kemoterapi verilme (%1.3) ve WT olmadığı anlaşılan tümörlere uygunsuz tedavi verilme (%5) olasılığıdır. Her iki yaklaşımın da kendine ait yararları ve dezavantajları vardır ve Wilms tümörü olan çocukların tedavisi için bir protokol rejimi olarak benimsenmeden önce bunların anlaşılması zorunludur (8,53,69,71,72,81,83,84).

Bir tedavi yaklaşımıyla sonucu öngören bir prognostik faktör, mutlaka başka bir tedavi yaklaşımıyla aynı prognostik değere sahip olmayabilir. Ancak COG ve SIOP yaklaşımlarının ikisinde risk sınıflandırması histopatolojik özelliklere dayandırılmaktadır (Tablo 1). Tümör histolojisi, her iki yaklaşımda belki de Wilms tümörü için en güçlü prognostik faktördür. Diffüz anaplazili WT ve blastemal ağırlıklı WT (ameliyat öncesi kemoterapi sonrası) yüksek riskli tümörler olarak kabul edilir ve daha agresif tedavi gerektirir. Tümörün ve normal böbreğin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi, ameliyat sonrası tedavinin temelini oluşturan WT'nin doğru alt tiplendirilmesi ve evrelemesi için kritik öneme sahiptir. Ayrıca nefrojenik kalıntıların tanımlanması ve doğru yorumlanması, prognozu ve tedaviyi etkileyebileceğinden dikkatli patolojik değerlendirme gereklidir.

Güvenilir ve zamanında histopatolojik yaklaşım, tanı koymada ve postoperatif kemoterapinin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. WT olgularında dikkatli histopatolojik değerlendirme hem SIOP hem de NWTSG/COG risk sınıflandırmasında kritik önem sahiptir (8,53,69,71,83,85,86).

Tablo 1. Tedavi sınıflandırmasında prognostik önemi olan bilinen faktörler

• NWTSG/COG	• SIOP
• Tümör Evresi • Tümör Histolojisi • Primer nefrektomi sonrası tümör ağırlığı • Hasta yaşı • Akciğer nodül yanıtı (Evre IV) • 1p ve 16q heterozigosite kaybı (LOH) • 1q kazanımı • 11p15 LOH (sadece çok riskli WT [tanı yaşı <2, evre I, anaplazi yok, tümör ağırlığı <550])	• Tümör Evresi (preoperative KT öncesi ve sonrası) • Tümör Histolojisi • Preoperative KT sonrası tümör volümü • Akciğer nodül yanıtı (Evre IV)

Wilms tümörü histopatolojik olarak farklılaşmamış embriyonik metanefrik mezenkime benzeyen blastemal hücre, epitelyal ve stromal komponentleri içeren trifazik bir tümördür. Ancak bu üçünden herhangi biri belirli bir tümörde baskın olabilir (Tablo 2) (18,31,72,75,83).

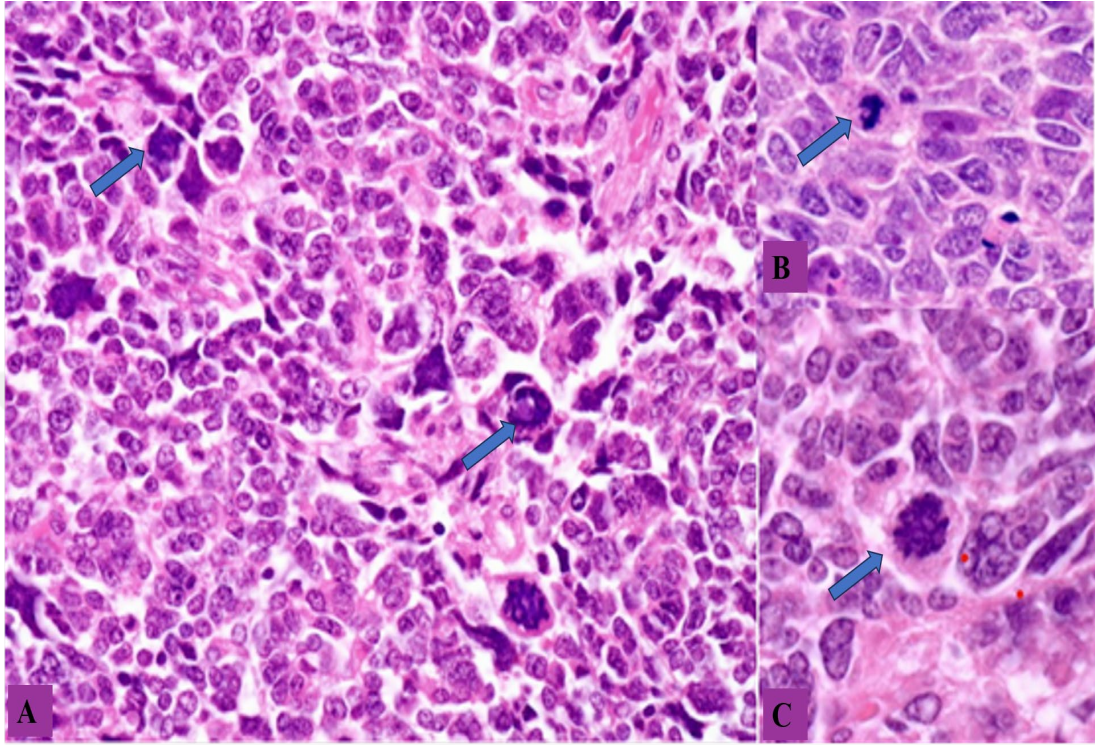
Tablo 2. Wilms tümöründe patolojik alt tipler

HİSTOLOJİK ALT TİP	ÖZELLİKLER
❖ EPİTELYAL	İyi diferansiye ((glomerüler benzeri yapılar ve küçük, olgun tubüller), orta diferansiye (tubüller ve papiller yapılar), Kötü diferansiye (rozet benzeri yapılar)
❖ STROMAL	Embriyonik mezenşime benzeyen miksoid veya iğsi hücreler, Düz kas, fibroblast ve iskelet kası farklılaşması görülebilir.
❖ BLASTEMAL	Sıkı düzenlenimde, küçük/orta büyüklükte farklılaşmamış hücreler
❖ MİKST	Hiçbir komponentin baskın olmadığı tümörler

Histolojik alt tiplerin sınıflandırmasında epitelyal tipte; tümör dokusunun 2/3'ü epitelyal, diğer kısım ise genellikle stromal alanlardan oluşmaktadır. Stromal tipte ise WT dokusunun 2/3'ü stromal, kalan kısım ise genellikle epitelyal alanlardan oluşmaktadır. Tümör dokusunun 2/3'ü blastemal alanlardan oluşuyorsa blastemal tip olarak adlandırılır. Hem epitelyal tipte hem de stromal tipte; tümörün %10'undan fazlasında blastemal alan varsa artık mikst tip olarak tanımlanır.

Anaplazi WT'nin %5 ila %10'unda görülür. Yaygın bir bulgu olarak anaplazi kemoterapiye dirençle ilişkilidir ve ileri evre hastalıkta daha kötü prognoza işaret eder. Anaplazi TP53 mutasyonlarıyla bağlantılıdır. WT'de anaplazi, büyük hiperkromatik çekirdeklere (genellikle bitişik anaplastik olmayan çekirdeklerin en az 3 katı büyüklüğünde) sahip hücrelerin ve atipik tri/multipolar mitotik figürlerin varlığı olarak tanımlanır (Şekil 1) (84). Fokal anaplazi ise, primer intrarenal tümör içinde keskin sınırlı anaplazi kriterleri gösteren bir veya iki odağın varlığı olarak tanımlanır. Diğer alanlarda anaplazi veya belirgin nükleer atipi (nükleer unrest) yoktur. Sınırları belirsiz anaplazi odağı; renal sinüs damarları, ekstrakapsüler infiltrasyonlar ile nodal veya uzak metastazlar dahil olmak üzere herhangi bir ekstrarenal bölgede anaplazi; rastgele bir biyopsi örneğinde anaplazi, fokal anaplazi

çevresinde diğer tümör alanlarında belirgin nükleer atipi (nükleer unrest); tümörün farklı alanlarından alınan birden fazla kesitte anaplazi varlığı “diffüz anaplazi” olarak tanımlanır. (85-89).



Şekil 1. Wilms Tümöründe Anaplazi (A:hiperkromatik büyük nükleus; B,C: atipik mitotik figürler (<https://www.webpathology.com>))

NWTSG/COG histolojik risk sınıflandırmasında WT anaplazinin olup olmamasına göre olumlu ("favorable") ve olumsuz ("unfavorable") olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır. COG protokolüne göre olumlu histolojik tip olgularında yoğun tedaviye gerek yoktur ve blastemal baskın tip yüksek risk faktörü olarak değerlendirilmez. Ancak Avrupa'da ağırlıklı olarak SIOP tarafından küresel ortak çalışmalar yürütülmekte ve ameliyat öncesi kemoterapi önerilmektedir (72,90). Patolojinin SIOP sınıflandırması, toplam nekrozun oranına ve geri kalan uygun hücrelerdeki baskın hücre formuna dayanır ve üç farklı risk grubuna ayrılır. KT sonrası blastemal baskın tip, yüksek risk grubunda sınıflandırılır ve bu gruptaki olgulara yoğun tedavi verilmektedir (82,85,91,92).

Her iki yaklaşımda da morfolojik olarak tanımlanan yaygın anaplazinin varlığı yüksek risk olarak değerlendirilmektedir. İki grup, SIOP tarafından orta risk olarak

kabul edilen ve yakın zamanda COG tarafından yüksek risk kategorisine yerleştirilen fokal anaplaziyi sınıflandırma kategorisi konusunda farklılık göstermektedir.

Tablo 3. WT olgularında NWTSG/COG ve SIOP histolojik risk sınıflandırması

NWTSG/COG	SIOP (preoperative KT)	SIOP (primer cerrahi)
İYİ HİSTOLOJİLİ WT	DÜŞÜK RİSK	DÜŞÜK RİSK
Anaplazi bulgusu yok	Mezoblastik nefroma	Mezoblastik nefroma
FOKAL ANAPLAZİLİ WT	Kistik parsiyal diferansiye nefroblastoma	Kistik parsiyal diferansiye nefroblastoma
Primer tümör içerisinde anaplazi ≥ 1 ayrı odağa sınırlı, böbrek dışı tutulum yok	Komplet (tamamı) nekrotik WT	
Anaplazi dışında nükleer unrest yok	ORTA RİSK	ORTA RİSK
DİFFÜZ ANAPLAZİLİ WT	Epitelyal, stromal, mikst ya da regresif tipte WT	Non-anaplastik nefroblastoma ve varyantları
Lokelize olmayan anaplazi	Fokal anaplazi WT	Fokal anaplazi WT
Renal sinüs damarları, ekstrakapsüler infiltrasyonlar ile nodal veya uzak metastazlar dahil olmak üzere herhangi böbrek dışında anaplazi	YÜKSEK RİSK	YÜKSEK RİSK
Lokelize anaplazi dışında bir alanda nükleer unrest	Blastemal tip WT	Diffüz anaplazili WT
Rastgele biyopsi örneğinde anaplazi	Diffüz anaplazili WT	Berrak hücreli sarkom
Bir veya daha fazla alanda ve kesit kenarında anaplazi	Berrak hücreli sarkom	Rabdoid tümör
	Rabdoid tümör	

Wilms Tümöründe Evreleme: Tümör evresi WT için orijinal prognostik faktördür. NWTSG'nun ilk 1969 çalışmasında, evrelemenin prognostik önemi belirlenmişti ve tedavi rejimlerini belirlemek için kullanılıyordu. Artan sayıda çalışmalarda; alt grupların farklı prognozlara sahip olduğunu gösteren veriler ortaya çıktıkça, evreleme yıllar içinde değişikliklere uğradı. Farklı tedavi stratejileri farklı evreleme sistemlerine dayanmaktadır. COG evreleme sistemi çoğu durumda primer nefrektomiden elde edilen patoloji analizine dayanır. SIOP evrelemesi ameliyat öncesi uygulanan kemoterapi sonrası sonuçlarına dayanmaktadır. Bu kadar dikkat çekici yaklaşım farklılıklarına rağmen, iki kılavuzla tedavi edilen hastaların genel hayatta kalma oranı %90'ın üzerinde olmasıyla benzerdir. NWTSG/COG evreleme

sistemindeki en son değişiklik, lokal tümör dökülmesi olan hastaların, lokal yayılma olmayan hastalara göre daha yüksek nüks oranlarına sahip olduğu gözlemine dayanarak, "lokal tümör dökülmesi" olan hastaların evre II'den evre III'e geçirilmesi şeklindedir (93,94). İleri evre hastalığı olan hastalar daha yoğun kemoterapi ve ek radyoterapi ile tedavi edilmektedir. WT'de COG ve SIOP gruplarının Evreleme Sistemi Tablo 4 ve Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 4. Wilms Tümörlerinde NWTSG/COG Evreleme Sistemi

NWTSG/COG EVRELEME	
EVRE I	*Tümör böbrekte sınırlı, tam rezeksiyon (+) (cerrahi sınırlar negatif) * Renal kapsüle invazyonu veya renal sinüs damarlarında tutulum yok *Nodal ya da hematojen metastaz yok *Tümör rüptüre değil yada cerrahi öncesi biyopsi alınmamış
EVRE II	*Tümör böbrek kapsülü dışına uzanıyor ancak tam rezeksiyon (+) (cerrahi sınırlar negatif) *Renal kapsül ve sinüs damar invazyonu (+) *Nodal ya da hematojen metastaz yok
EVRE III	*Karın içine sınırlı; rezidüel tümör ya da non-hematojen metastazlar *Bölgesel (abdominal) lenf nodu metastazı *Periton infiltrasyonu (pozitif peritoneal sitoloji) ya da tümör implantları *Cerrahi öncesi ya da sırasında herhangi bir düzeyde tümör dökülmesi *Cerrahi öncesi tümör biyopsisi (ince iğne aspirasyonu dahil) • Cerrahi sınırdaki tümör (+)
EVRE IV	Karın dışı hematojen veya lenf nodu metastazı
EVRE V	İki taraflı böbrek tümörü (Her iki böbrek belirtilen kriterlere göre ayrı ayrı evrelenir) (örn; Evre I-V, alt evre II [sağ], alt evre I[sol])

Tablo 5. Wilms Tümörlerinde SIOP Evreleme Sistemi

SIOP EVRELEME	
EVRE I	*Tümör böbrekte sınırlı, tam rezeksiyon (cerrahi sınırlar negatif) *Renal kapsül tümörle infiltre olabilir ama dış yüzeye ulaşmaz. Perirenal yağ dokusunda bulunsa bile (psödo) kapsül ile çevrelenmiş görünümde **Renal sinüs damar tutulumu yok
EVRE II	*Tümör böbrek dışına çıkmış ancak tam rezeksiyon var *Renal kapsül ve/veya perirenal yağ dokusu penetrasyonu var *Renal sinüse infiltre ve/veya renal parankim dışındaki kan /lenfatik damarlarına invazyon var fakat tam rezeksiyon (+) *Tümör komşu organlara ya da vena kavaya infiltre ancak tam rezeksiyon (+)
EVRE III	*Cerrahi sınır dışına uzanan tam olmayan tümör cerrahisi (makroskopik ya da mikroskopik kalıntı) *Nekrotik tümör ya da kemoterapiye bağlı değişiklikleri de dahil olmak üzere abdominal lenf bezi tutulumu *Cerrahi öncesi ya da esnasında tümör rüptürü *Peritoneal implant *Cerrahi sınırda tümör trombusu var *Rezeksiyon öncesi cerrahi/kama biyopsi (iğne biyopsisi hariç)
EVRE IV	Karın dışı yayılım, hematogen veya lenf nodu metastazı
EVRE V	İki taraflı böbrek tümörü (Her iki böbrek belirtilen kriterlere göre ayrı ayrı evrelenir (örn; Evre I-V, alt evre II [sağ], alt evre II[sol])

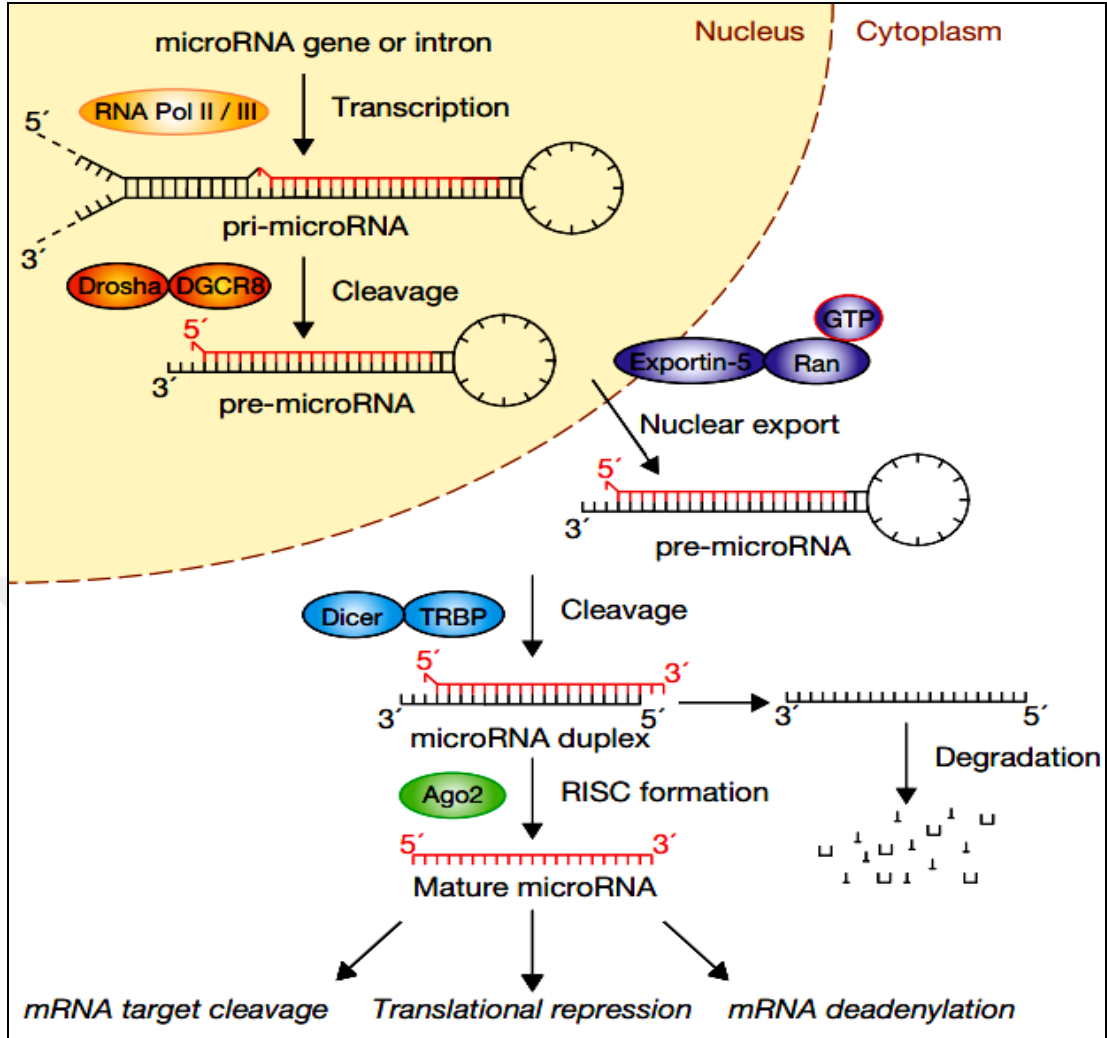
2.4. Wilms Tümöründe Mikro RNA'lar

Mikro RNA'lar, hem fizyolojik hem de patolojik süreçleri kontrol eden gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileridir. MiRNA'lar, transkripsiyon sonrasında gen ekspresyonunu düzenleyen, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, kısa, tek sarmallı, kodlamayan RNA'lardır (95). Hedef genlerin 3'translasyona uğramamış bölgesinde miRNA'lar ve mRNA'lar arasındaki etkileşim, mRNA translasyonunun bozulmasına veya inhibisyonuna yol açar. Biyoinformatik analizlere göre, insan genomunun protein kodlayan genlerinin %30-60'ı miRNA'lar tarafından kontrol edilmektedir (96).

MiRNA moleküllerinin keşfinden bu yana onlara olan ilgi giderek artmaktadır. Rollerini hala tam olarak anlayamamıştır ancak fizyolojik ve patolojik

süreçlerde önemli etkiye sahip olduklarına şüphe yoktur. Dokularda ve kanda bulunan miRNA'ların ekspresyon seviyesinin düzensizliği hemen hemen tüm hastalıklarda bulunur ve bu da bunların patolojik süreçlerde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Toplanması kolay kan ve balgamda dolaşımdaki miRNA'ların varlığı ve stabilitesi, bu moleküllerin invaziv olmayan biyobelirteçler olarak kullanımını oldukça umut verici hale getirmektedir. Şimdiden elde edilen sonuçlar, miRNA moleküllerinin kanserin erken teşhisine yönelik taramaların geliştirilmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. 2019'a kadar insanlarda yaklaşık 2300 farklı miRNA tanımlanmıştır (97). İlginçtir ki, bir miRNA molekülü birçok hedef mRNA'ya bağlanabilir. Buna karşılık, bir mRNA molekülü farklı miRNA'lar tarafından inhibe edilebilir. Hedef mRNA molekülleri ile etkileşimin etkisi, bağın tamamlayıcılığına ve miRNA veya mRNA'nın ekspresyon seviyesine bağlıdır (97).

MiRNA biyogenezi birincil miRNA (pri-miRNA) transkriptinin RNA polimeraz II veya III tarafından üretilmesi ile başlamaktadır. Çekirdekte Drosha-DGCR8 (pasha) mikroişlemci kompleksi tarafından birincil (pri-miRNA) bölünmesi gerçekleşir. Ortaya çıkan saç tokası yapısındaki prekürsör miRNA (pre-miRNA) lar olgun miRNA'ların oluşum sürecinin tamamlanması için RAN-GTPaz ilişkili exportin-5- tarafından çekirdekten sitoplazmaya transferi sağlanır. Sitoplazmada çift sarmallı RNA bağlayıcı protein TRBP ile kompleks halindeki DICER olarak adlandırılan ikinci bir RNase III enzimi tarafından pre-miRNA saç tokasını, olgun uzunluğuna (18-24 nükleotid) kadar böler ve miRNA dupleksine neden olur. MiRNA dupleksi Argonaute (Ago2) proteinleri ile birlikte RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) yüklenir. RNA yoluyla susturmayı indükleyen kompleksin, her iki olgun mikro-RNA dupleks dizisini de içerdiği görülmektedir. MiRNA'nın baskılanmasına neden olmak için muhtemelen termodinamik stabiliteye bağlı olarak amaçlanan bu dupleksin yolcu miRNA zinciri olarak da adlandırılan bir ipliği degrade olup yok edilmektedir. RISC kılavuz zinciri olarak da adlandırılan tek miRNA zincirini mesajcı RNA'daki tamamlayıcı sekansa yönlendirir. Bağlı mRNA sonuç olarak ya bozular ya da inhibe edilir ve gen susturulmuş olur. MRNA ya iki parçaya bölünür; poli(A) kuyruğunun kısaltılması yoluyla istikrarsızlaştırılır ya da ribozomlar tarafından etkinliği azalmış proteinlere dönüştürülür (Şekil 2) (98).



Şekil 2. MiRNA Biyogenezi

Mikro RNA'ların tümör farklılaşması, çoğalması ve metastazında rol oynayan farklı genlerin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (99). Kanser hücrelerinin çoğalması, invazyonu, migrasyonu ve metastazı gibi önemli süreçleri düzenleyerek kanser gelişimine ve ilerlemesinde rol oynar. Mikro RNA'lar, hedef transkriptlere bağlanarak onların ekspresyonunu değiştirir ve bu da kanser hücrelerinin büyümesini, yayılmasını ve invaziv özelliklerini etkileyebilmektedir. Düzenledikleri hedef gene bağlı olarak miRNA'lar, onkogenleri baskılayarak "tümör baskılayıcı miR'ler" olarak veya tümör baskılayıcı genleri hedef alarak "onko-miR'ler" olarak görev yapabilir. Bununla birlikte, bir dizi miRNA tümör tipine bağlı olarak hem tümör baskılayıcı hem de onko-miR rolleri oynar. Mikro RNA'ların kanserdeki rolü; miRNA genlerinin amplifikasyonu veya delesyonu, epigenetik düzensizlikler ve primer miRNA'nın düzenlenmesini sağlayan transkripsiyon faktörlerinin anormal

aktivitesi ve miRNA biyogenez yolundaki genlerde kusurların sonucu ortaya çıkmaktadır (100).

Wilms tümörü yüksek derecede genetik ve epigenetik heterojenite sunar. Mikro RNA'ların, tümör gelişiminde yer alan epigenetik mekanizmalarda rol oynadığı ve çok çeşitli transkripsiyon faktörleriyle etkileşimleri yoluyla çok sayıda hücreyel yola dahil olduğu bilinmektedir. Genomik ve transkriptomiklerden epigenetiğe kadar moleküler teknolojilerdeki ilerlemeler, WT moleküler yapısına eşi benzeri görülmemiş bir bakış açısı sağlamaktadır. WT için miRNA'lar gibi doğru biyobelirteçlerin tanımlanması, yanlış teşhis ve kötü tedaviyi önlemeye yardımcı olabilir ve risk sınıflandırması hakkında değerli bilgiler sağlayarak tedavinin standartlaştırılmasına katkıda bulunabilir.

WT'nin kodlayıcı olmayan miRNA'ların düzensizliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. MiRNA-140-5p, miRNA-200c, miRNA-155-5p, miRNA-1180, miRNA-21, miRNA-22-3p, miRNA-483-5p, miRNA-92a-3p, miRNA-483-3p, miRNA-572, miRNA- 539 ve miRNA-613, bu tümördeki düzensiz miRNA'lar arasındadır (32-34, 101-115).

MiRNA-140-5p ekspresyonunun WT dokularında aşağı regüle olduğu ve miRNA-140-5p'nin, WT ilerlemesini IGF-1R/AKT ve TGFBR1/SMAD2/3 yolları yoluyla düzenleyebileceği ve bu bağlamda tümör baskılayıcı işlevlere sahip olabileceği vurgulanmaktadır (33). Başka bir çalışmada; miRNA-140-5p ve miRNA-92a-3p'nin, FRS2'yi hedefleyerek WT hücrelerinin çoğalmasını, göçünü, istilasını ve indüklenen apoptozunu inhibe ettiği belirtilmiştir (34). Benzer bir çalışmada; FRS2'yi doğrudan hedef alarak WT proliferasyonunu, invazyonunu baskılamada çok önemli rol oynayan miRNA-200c-3p'nin WT'de aşağı regülasyonu saptanmıştır (102). Bu sonuçları destekler şekilde; invitro olarak miRNA 613'ün FRS-2'yi hedefleyerek WT ilerlemesi ve metastazı üzerinde tümör baskılayıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (103).

Normal dokularla karşılaştırıldığında, WT numunelerinde miRNA-200c'nin aşağı regülasyonunu gösterilmiştir. Wilms tümör hücrelerinin miRNA-200c ile transfekasyonu, hücrelerin çoğalma yeteneğinin yanı sıra koloni oluşturma kapasitesinin de zayıflamasına neden olmuştur. Aynı çalışmada miRNA 200c'nin

yukarı regülasyonu, aynı zamanda Bcl-2/Bax düzeylerini ve WT hücrelerinin apoptoz oranını arttırmıştır. Ayrıca miRNA-200c'nin yukarı regülasyonu, hücre içi fosforile Akt seviyelerini ve bunun proteini GLUT1 ekspresyonunu azaltmıştır. Birlikte ele alındığında bu gözlemler; miRNA-200c'nin yukarı regülasyonu, hücre proliferasyonunu inhibe edebilir ve Akt/GLUT1 sinyalinin baskılanması yoluyla hücre apoptozunu destekleyebilir yorumuna gidilmiştir (104).

Wilms tümörlerinde fonksiyonel deneylerle PI3K sinyal yolunun aynı zamanda WT gelişimini düzenleyen miRNA-155-5p/IGF2 ekseninde de yer aldığı doğrulanmış, miRNA-155-5p'nin IGF2'yi hedef alarak baskılayıcı görev gördüğü belirtilmiştir. Aynı çalışmada miRNA-155-5p'nin, IGF2'yi bağlayarak ve inhibe ederek PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu etkisiz hale getirdiği vurgulanarak tümör hücrelerinde hücre çoğalmasını, göçünü, istilasını inhibe ettiğini ve hücre apoptozunu desteklediği hipotezini önermişlerdir (105).

WT dokularında miRNA-21 ekspresyon seviyeleri, bitişik tümörlü olmayan böbrek dokularına kıyasla yüksek ve PTEN protein seviyeleri ise daha düşük bulunmuştur. Yüksek miRNA-21 seviyeleri ve düşük PTEN seviyelerinin, WT olgularında yaş (> 24 ay), geç klinik evre, olumsuz histopatolojik tip ve lenfatik metastaz ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Yüksek miRNA-21 seviyeleri ile düşük PTEN seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon izlenmiştir. MiRNA-21'in aşırı ifadesi, PTEN'i hedef alarak WT'nin agresif davranışından sorumlu olduğuna işaret edilmiştir (32). Diğer bir çalışmada miRNA-21'in, WT hücrelerinde PTEN/Akt yolu yoluyla tümör proliferasyonunun baskılanmasına aracılık ettiği sonucuna varılmıştır (106).

WT'de MiRNA-22-3p'nin azalmış ekspresyonu ve AKT3'ün ise artmış düzeyi saptanmıştır. Aynı çalışmada; miRNA-22-3p'ün AKT3 aşağı regülasyonu yoluyla tümör proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (107).

Wilms tümör örneklerinde miRNA-1180 ekspresyonunun komşu normal dokuyla karşılaştırıldığında arttığı bulunmuştur. MiRNA-1180'in p73'ü hedef alarak WT'nin apoptozunu indükleyebileceğine dikkat çekilmiştir (108).

Kromozom 11p15 üzerindeki IGF2 geninin intron 2'sinde yer alan miRNA-483.5p'nin yüksek riskli WT olgularında yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir. Wilms tümör patogenezinde önemli bir role sahip olan IGF2 konakçı geniyle birlikte

eksprese edildiği düşünülmektedir (38). Benzer bir çalışmada ise, WT dokusunda normal böbrek dokusundan daha yüksek bir miRNA-483-5p ekspresyonu saptanmış ve onkogen olarak işlevine işaret edilmiştir (109).

Wilms tümöründe, miRNA-92a-3p'nin NOTCH1'i hedefleyerek tümör ilerlemesini bloke ettiği gösterilmiştir. Ayrıca miRNA-92a-3p'nin WT dokularında aşağı regüle edildiği ve düşük miRNA-92a-3p ekspresyonunun akciğer metastazı ile anlamlı şekilde korele olduğu saptanmıştır (110).

MiRNA-483-3p yüksek ekspresyonu, fetal böbrekle karşılaştırıldığında WT'nin %73'ünde ve tümörsüz böbrek dokularıyla karşılaştırıldığında vakaların %100'ünde saptanmıştır (111).

Wilms tümör hücrelerinin çoğalması, kemosenitivite, göçü ve invazyonu üzerindeki rolünü inceleyen çalışmada miRNA-483-3p nin yukarı regülasyonunun doksorubisin tedavisinden sonra WT hücrelerinin hayatta kalmasını arttırdığı bunun aksine miRNA-483-3p nin aşağı regülasyonunun doksorubisin tedavisinden sonra WT hücrelerinin hayatta kalma oranını azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, MiRNA-483-3p, BAX ve Bcl-2 ekspresyonu düzenleyerek WT hücrelerinde doksorubisin kaynaklı apoptozu inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca miRNA-483-3p'nin, WT hücrelerinde E-kadherin, N-kadherin, ve vimentinin ekspresyonunu etkileyerek epitelyal-mezenkimal geçişi düzenlediği gösterilmiş, WT hücrelerinde miRNA-483-3p'nin PTEN'in 3'-UTR'sine bağlanmasıyla anormal ekspresyonundan sonra PTEN ve p-AKT ekspresyon seviyelerinin değiştiği izlenmiştir. Sonuç olarak; miRNA-483-3p'nin WT hücrelerinde proliferasyon ve ilerlemede önemli roller oynadığı, potansiyel bir prognostik biyobelirteç olarak hizmet edebileceği ve WT'de kemoterapi yanıtını öngörebileceği öne sürülmüştür (112). Wilms tümör dokularında miRNA-572'nin artmış ekspresyonu gösterilmiş ve miRNA-572'nin WT'de epitelyal-mezenkimal geçiş ve CDH1'i hedef alarak tümör metastazı üzerinde etkili olduğu vurgulanmıştır (113).

Wilms tümör dokularında miRNA-539'un ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Wilms tümöründe miRNA-539'un aşağı regülasyonunun, NWTs-5 evresi, lenf nodu metastazı ve histolojik tip ile istatistiksel anlamlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca düşük miRNA-539 ekspresyonu, WT hastalarında daha kısa genel sağkalım oranıyla ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmada

miRNA-539'un, JAG1-Notch1/3 ifadesini negatif olarak düzenleyerek WT'nün ilerlemesini inhibe ettiği belirtilmekte ve miRNA-539'un WT'nün tanı ve prognozunun değerli bir göstergesi olmalı varsayımında bulunmaktadır (114). Başka bir çalışmada ise; miRNA-539-3p'nin uzun kodlamayan RNA olan DLEU2'nin hedefi olduğu doğrulanmıştır. Aynı çalışmada; DLEU2 susturulmasının, miRNA-539-3p'yi serbest bırakarak tümör hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu azalttığı ve hücre apoptozunu arttırdığı saptanmıştır (115).

Wilms tümöründe tedavi öncesi tanısal biyopsi örneklerinde KT direncini öngörebilecek; miRNA-193a.5p ve miRNA-27a'nın aşağı regülasyonu ve miRNA-483.5p, miRNA-628.5p, miRNA-590.5p, miRNA-302a ve miRNA-367'nin yukarı regülasyonu gösterilmiştir. Wilms tümöründe diferansiyel olarak eksprese edilen bu miRNA'lardan birinin, WT olgularında kemoterapiye yanıtın belirlenmesinde tek başına anahtar bileşen olmasının mümkün olabileceği vurgulanmıştır. Bu miRNA'ların aslında kemoterapötik yanıtın karmaşık yollarını düzenlemede birlikte çalışabileceği ve gelecekteki çalışmalarda bir miRNA imzası olarak değerlendirilebileceğine dikkat çekilmiştir (38).

Görüldüğü üzere bugüne kadar toplanan kanıtlar, miRNA'ların Wilms tümöründe geçerli tanısal, prognostik ve öngörücü belirteçleri temsil edebileceğini göstermektedir. Özellikle arşivlenen parafin dokularında miRNA belirteçlerinin tanımlanması, miRNA'ların aday prognostik ve prediktif belirteçler olarak tanımlanmasının ötesinde, miRNA'ların yeni bir terapötik hedef sınıfı kullanılabilirliğini araştırmaya olanak sağlamıştır. Formalinle fikse parafine gömülü (FFPE) örneklerinden miRNA ekstraksiyonuna ilişkin metodolojik çalışmalar mevcuttur. Mikro RNA'nın kısa uzunlukta olması ve yüksek stabilitesi onu bozulmaya karşı dirençli hale getirmektedir. Hatta taze dondurulmuş dokuyla (frozen) karşılaştırma analizlerinde, 7-10 yıllık FFPE doku bloklarının verimli ekstraksiyona izin verdiği öne sürülmüştür. Arşivlenen dokulardaki bu miRNA biyobelirteçlerinin tanımlanması, tespit metodolojilerinin yeni geliştirilmesi ve iyileştirilmesiyle kolaylaştırılmıştır (116-118).

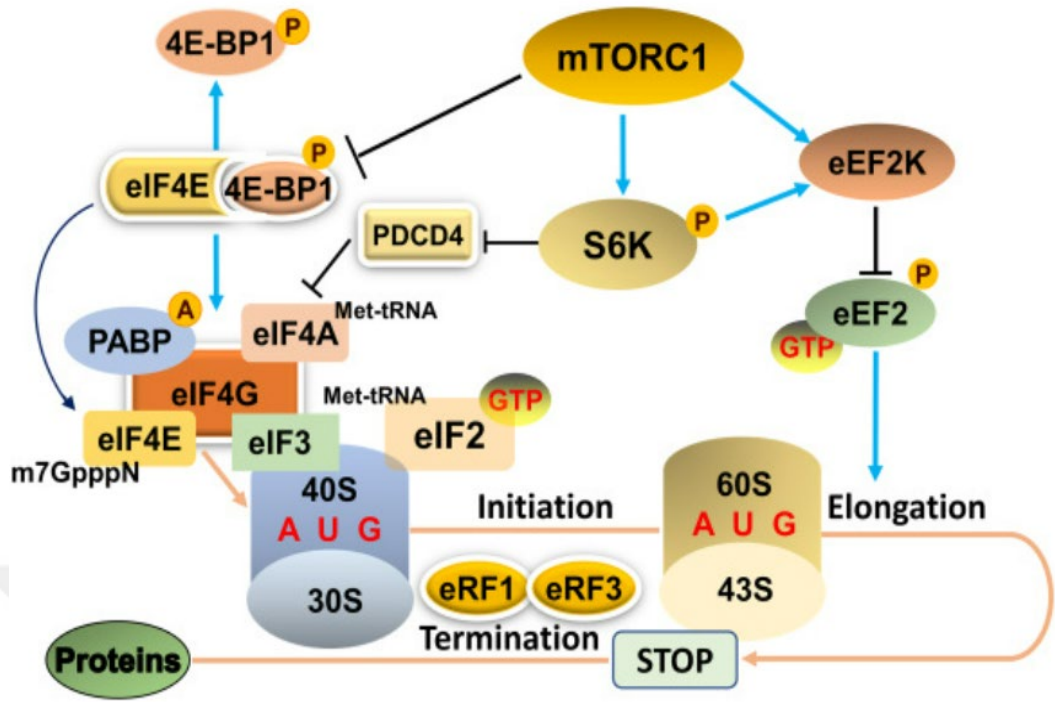
Kantitatif gerçek zamanlı ters transkripsiyon PCR (RT-qPCR), düşük düzeydeki miRNA'ları yüksek hassasiyetle tespit edilmesini sağlayarak aynı zamanda yanlış pozitif sonuç olasılığını en aza indirerek yüksek özgüllükle miRNA

analizi için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir (118). RT-qPCR, düşük RNA seviyelerini bile tespit etmek için güvenilir, tekrarlanabilir ve oldukça kantitatif bir yöntemidir. Piyasada birçok gelişmiş cihaz ve ticari prob bulunmaktadır ve kalite standartları nispeten stabildir, bu da testin doğruluğunu garanti eder.

2.5. Elongasyon Faktör-2 Kinaz, MiRNA ve Kanser

Etkin hücre fonksiyonu, DNA'nın mRNA'ya dönüştürülmesi ve ardından mRNA'nın proteine doğru şekilde çevrilmesi gibi sıkı kontrol edilen süreçleri gerektirir. Protein sentezi, hücrelerin temel bir metabolik sürecidir ve deregülasyonu, hücresel fonksiyonları kritik olarak etkiler. Protein sentezi (mRNA translasyonu) büyüme ve gelişme sırasında hassas bir şekilde düzenlenen hücresel bir süreçtir ve bunun kontrolü, hücredeki fizyolojik süreçlerin sürdürülmesi için esastır. Translasyon kontrolü, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Translasyon; başlatma, uzama ve sonlandırma üç basamağından oluşur. Protein sentezinin önemli düzenleyici mekanizmalarından biri ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz (eEF2K), ökaryotik uzama faktörü 2 (eEF2) yoludur. Polipeptit zincirini uzatmak için, amino-asil tRNA'lar, taşıyıcı RNA (tRNA)'nın anti-kodonunu mRNA'nın kodonuyla eşleştirerek ribozoma getirir. Bu aşamanın yürütülmesinden çeşitli ökaryotik uzama faktörleri (eEF'ler) sorumludur. eEF1A ve eEF1B, amino asil-tRNA'ların ribozoma alımında rol oynar. eEF2, bitişik amino asitler arasında peptit bağı oluştuktan sonra ribozomun RNA boyunca translokasyonunu etkiler. Uzama faktörlerinden eEF2, uzatılmış peptidil-tRNA'nın ribozomun A'dan P bölgelerine translokasyonunu katalize eden ve protein sentezinin uzama aşamasında önemli bir rol oynayan bir gendir. Hücrelerde eEF2, mRNA translasyonunun uzama fazı sırasında ribozomun translokasyonuna ve uzama hızına aracılık etmektedir.

Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz III olarak da bilinen EF2K hücrelerde protein sentezinin düzenlenmesinde rol oynayan bir enzimdir ve protein sentezinin negatif düzenleyicisi olarak görev yapar. Bu enzim ribozomlara bağlı olan eEF2'yi fosforile ederek protein sentezini kontrol eder. Özellikle eEF2K, eEF2'yi inhibe ederek ribozoma olan afinitesini azaltıp ribozom ile etkileşimini bozar ve translasyonun uzamasının yavaşlamasına ve protein sentezinin bloke edilmesine neden olur (119-122) (Şekil 3).

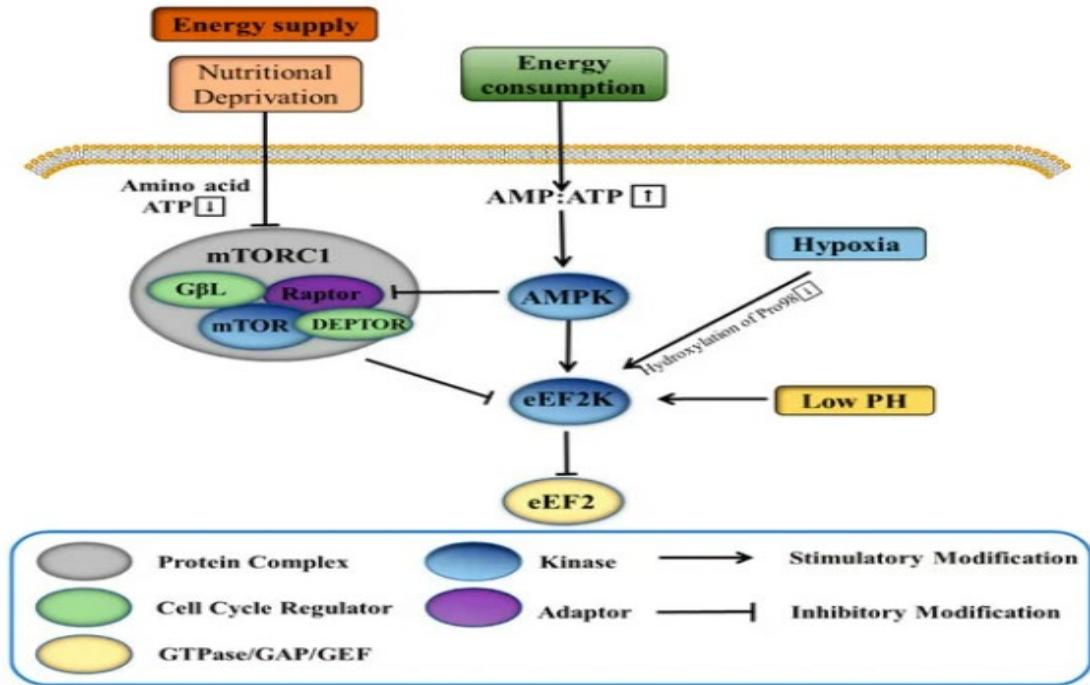


Şekil 3. Protein sentezinde eEF2 ve eEF2K uzama aşamasında rolü

Stresli hücrelerin, özellikle de kanser hücrelerinin hayatta kalabilmesi için eEF2K'nın gerekli olduğu düşünülmektedir. Büyüme faktörü yoksunluğu, besin eksikliği, oksidatif stres gibi durumlarda eEF2K'nın aktivasyonu yoluyla otofajinin indüklenmesi, enerji tasarrufu sağlamak ve metabolik stres sırasında hücrenin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu desteklemektedir. Aktive edilen eEF2K, hedef eEF2'yi Thr56'da fosforile ederek etkisiz hale getirir ve uzama faktörünün ribozoma olan afinitesini azaltarak peptit uzamasının sona ermesine neden olur. Bu bilgiler ışığında, protein sentezini teşvik eden stres ve büyüme faktörleri gibi diğer uyarıların eEF2K aktivitesini inhibe etmesi gerektiği varsayımına varılmıştır (120-122).

Memeli hedefi rapamisin kompleksi 1 (mTORC1) ve adenosin monofosfatla aktifleştirilen protein kinaz (AMPK) gibi eEF2K'nın aktivitesi de besin algılama yollarıyla sıkı bir şekilde düzenlenir. Enerji tükenmesi (hücrelerin glikoz açlığı), AMPK yoluyla eEF2K'ı aktive ederken aminoasit açlığı eEF2K'ın negatif düzenleyicisi olan mTORC1'i inhibe eder. Son çalışma verileri eEF2K'nın kanser hücrelerinin besin yoksunluğuna dayanma kabiliyeti için önemli olduğunu göstermektedir. Stres koşullarında hücresel enerji sensörü olan AMPK, mTORC1'i

fosforile ederek inhibe eder. Sonuç olarak, mTORC1 aracılı eEF2K inhibisyonu da baskılanmış olur. Eş zamanlı olarak AMPK, eEF2K'yi fosforile ederek aktive eder dolayısıyla eEF2K'nin hedefi olan eEF2'nin, Thr56 üzerinde fosforilasyonuna ve inhibisyonuna neden olur. Özel bir protein kinaz olan eEF2K tarafından eEF2'nin fosforilasyonu, eEF2'nin ribozoma olan afinitesini azaltır ve uzama safhasını inhibe ederek protein sentezini azaltır. Böylece amino asitler ve adenosin trifosfat (ATP) gibi hücresel kaynakları korur. Birlikte ele alındığında kanserlerin AMPK-eEF2K-eEF2 yolunu, yüksek enerji ve metabolik taleplerini karşılamak için kullanabildiklerini göstermektedir (120,122) (Şekil 4).



Şekil 4. Tümör mikroçevre koşullarının eEF2K üzerindeki etkileri.

Son yıllarda giderek artan çalışma verileri ışığında; eEF2K'nin çeşitli tümör dokularında yüksek düzeyde eksprese edildiği ve meme kanseri, kolon kanseri, hepatoselüler karsinom ve prostat kanseri gibi birçok malignite türlerinin gelişimi ve prognozu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Diğer süreçlerin yanı sıra eEF2K; tümörde hücre döngüsünün, çoğalmanın, otofajinin, apoptozun, anjiyogenезin, invazyon ve metastazın düzenlenmesine de katılabilmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı eEF2K, kanserde hedef yönelik tedavide potansiyel bir terapötik hedeftir. Son yıllarda eEF2K'nin işlevi üzerine derinleşen araştırmalarla birlikte, eEF2K inhibitörlerinin geliştirilmesine olan ilginin artması da dikkat çekmektedir (120-126).

Kanser hücreleri tipik olarak protein sentezi oranında güçlü bir artış gerektiren hızlı büyümeleriyle karakterize edilir. Bununla birlikte, protein sentezinin negatif bir düzenleyicisi olmasına rağmen, eEF2K birçok kanserde aktive edilir ve yüksek ekspresyonu söz konusudur. Sonuç olarak; bu veriler eEF2K'nin kanser hücresinin hayatta kalmasında koruyucu bir rol oynadığını gösterir. Çalışma verileri ışığında; eEF2K'nin tümör proliferasyonu, tümör oluşumu, invazyon ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (120-126). Örneğin; hepatoselüler karsinomda yüksek düzeyde eEF2K ekspresyonu, metastatik ve kötüleşen karaciğer kanser türüyle ilişkili bulunmuştur. Ayrıca eEF2K'nin, PI3K/Akt ve STAT3 sinyallemeye yoluyla anjiyogenezi aktive ettiği gösterilmiştir (124). Benzer şekilde eEF2K'nin; Src ve MAPK/ERK ve siklin D1 dahil olmak üzere kritik yolların düzenlenmesinde rol oynadığı, akciğer kanserinde kötü prognoz ile ilişkili olduğu, tümör büyümesini ve ilerlemesini teşvik ettiği ve dolayısıyla akciğer kanserinde yeni potansiyel terapötik hedef olabileceği vurgulanmıştır (125).

Translasyonun kontrolü, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve miRNA'lar, mRNA çevirisinin düzenlenmesinde rol alır. Bugüne kadar miRNA'ların protein sentezinin düzenlenmesine mRNA kararsızlaştırma veya translasyonel baskılama olmak üzere iki şekilde katkıda bulunduğu çok açıktır. Ne yazık ki bugüne kadar; miRNA'lar tarafından translasyonel inhibisyonun mekanizması net olarak açıklanamamıştır. Translasyonel inhibisyonun tanımlanmış üç seviyesinin (başlangıç, uzama ve sonlanma) her birinde translasyonel inhibisyonu destekleyen birçok çalışmanın bulunması, translasyonel inhibisyon sırasında üçünün de koordineli olarak durduğunu veya yavaşladığını göstermektedir (127).

MiRNA-34a'nın eEF2K ve FOXM1 mRNA'larının 3'-çevrilmemiş bölgesine doğrudan bağlandığı ve ekspresyonlarını baskılayarak meme karsinomlarında tümör hücre proliferasyonunun, motilitesinin ve invazyonunun inhibisyonuna yol açtığını gösterilmiştir (128). Küçük hücreli dışı akciğer kanser olgularında, miRNA-449b'nin eEF-2 kinazını hedefleyerek tümör hücrelerine radyo-duyarlılık kazandırdığı saptanmıştır (129). Meme karsinom hücrelerinde eEF2K'nın doğrudan düzenleyicisi olan miRNA-22-3p'nin ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir.

Biz de çalışmamızda; Wilms tümörlerinde eEF2K ilişkili olduğu bilinen miRNA-603 ve miRNA-877 ekspresyon analizini ve prognostik önemini araştırdık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Tez araştırmamız retrospektif analitik çalışma niteliğindedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamız 01.07.2018-01.07.2023 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Kliniği birlikteliğinde yürütülmüştür. Araştırmada, tümör örneklerinde miRNA düzeylerinin ölçülmesinde Sağlık Bilimleri Üniversitesi (SBÜ) Sultan Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği'nde mevcut bulunan moleküler cihaz ve ekipman, kabin ve santrifüjler kullanılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgularla WT tanısı alan olgular arasından miRNA analizi için yeterli tümör ve kontrol normal böbrek dokusu olan olgular çalışmaya dahil edilmiştir.

İkincil bir primer tümörü bulunmayan veya farklı bir nedenle kemoterapi-radyoterapi almayan, WAGR, Denys-Drash, Beckwith-Wiedemann sendromu gibi genetik predispozan sendromu bulunmayan, ailesinde Wilms tümör hikayesi bulunmayan ve Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'nda klinik takip ve tedavi verilerine ulaşılabilen olgular çalışmaya dahil edildi.

Çalışmadan dışlama kriterleri:

Parafin bloklarına ulaşılamayan ve parafin bloğunda miRNA analizi için yeterli tümör dokusu olmayan olgular çalışmadan çıkarılmıştır.

3.4. Araştırmanın Materyali

Çalışmada histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgularla WT tanısı alan 24 hastanın formalinde fikse parafine gömülü doku blokları kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: Anaplazi varlığı, evre, risk skalası

Bağımsız değişken: MiRNA-603 ve miRNA-877

3.6. Araştırmada Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeleri

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereçleri

SBÜ Sultan Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Servisi, Moleküler Patoloji Laboratuvarı'nda bulunan aşağıda listelenen araç ve gereçler çalışmamızda kullanılmıştır:

- ⊙ Sabit açılı santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Sigma-Aldrich, Munich, Germany)
- ⊙ Vorteks (Vortex V-1 Plus, Biosan Ltd., Riga, Latvia)
- ⊙ Blok Isıtıcı (Digital Dry Baths/Block Heaters (Thermo Fisher Scientific, 88870005)
- ⊙ Buzdolabı +2-8 (MR-PRA 100 ve 300 Series
- ⊙ Laboratory/ Pharmaceutical Refrigerator, Labfreez, China)
- ⊙ Derin Dondurucu -20Co ve -80Co (Frost Lab, Beijing Institute of Technology, China)
- ⊙ Mikro hacimli spektrofotometre (NanoDrop2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific)
- ⊙ Plate santrifüj (NF 800 R, Nüve, Ankara, Türkiye)
- ⊙ Termal döngü cihazı (Veriti 96 kuyucuklu termal dongü cihazı, ABI, Applied Biosystems, USA)
- ⊙ qPCR cihazı (7500 real time PCR sistemi ABI, Applied Biosystems, USA)

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Kitler

- ❖ INVITROGEN Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit Thermo Scientific/Ambion, USA (catalog no. AM1975)

- ❖ Taqman MicroRNA Reverse transcription kiti (Thermo Scientific/Ambion, USA, catalog no. 4366596)
- ❖ TaqMan® Small RNA Assay (Thermo Scientific/Ambion, USA, catalog no. 4427975)
- ❖ TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Scientific/Ambion, USA, catalog no. 4304437)

3.7. Araştırma Takvimi ve Planı

Bu çalışma Helsinki Deklarasyonu kurallarına uygun olarak yürütülmüş olup, Etik Kurul Onayı İzmir Katip Çelebi Üniversitesi girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulu 29.11.2017 tarihli ve 285 sayılı karar numarası ile alınmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Kliniği'nde, WT tanısı almış olgular içerisinde yeterli tümör bloğu olan 24 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Olgulara ait yaş, cinsiyet, patolojik prognostik faktörler; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji arşiv raporlarından ve Probel Hastane Bilgi Yönetim sisteminden, klinik prognostik faktörler ve sağ kalım süreleri Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'ndan elde edilmiştir.

Tüm vakalara ait formalinle tespit edilmiş ve parafine gömülmüş (FFPE) rutin doku takip metodu ile hazırlanmış parafin blokların tümör kesitlerinin Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı lamları, 2 uzman patolog tarafından tekrar gözden geçirildi. Histopatolojik prognostik faktörler her hasta için tek tek not edildi.

Tümör hücrelerinin en yoğun olduğu WT alanları ve bunlara karşılık gelen neoplastik olmayan normal böbrek dokusu, mikroskop altında işaretlendikten sonra 5 mikron kalınlığındaki parafin kesitlerinden manuel olarak disseke edildi ve 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi.

Deparafinizasyon ve rehidrasyondan sonra; total RNA, üreticinin FFPE doku için uygun kitin belirtilen talimatlarına uygun olarak 'Recover All Total Nükleik Asit İzolasyon Kiti' kullanılarak izole edildi. RNA konsantrasyonu bir NanoDrop 1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü. Toplam on nanogram RNA, 'Taqman MicroRNA Reverse transcription' kiti kullanılarak küçük kodlama yapmayan RNA geni (RNU6b), miRNA 603 ve miRNA 877 ters transkripsiyonu gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR, 7500 Real-Time PCR sisteminde (ABI,

Applied Biosystems, ABD), ‘TaqMan® Small RNA Assay’ ve ‘TaqMan Universal PCR Master Mix’ kullanılarak 20 ul numune hacmi (7,67 µL’si nükleaz içermeyen su) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm numuneler üç kopya halinde çalıştırıldı ve her deneyde şablonsuz kontroller gerçek numunelerin yanında test edildi. Ham RT-qPCR verileri, ‘Applied Biosystems7500 Real-Time PCR yazılımı sürüm 2.0’ kullanılarak elde edildi ve hedeflenen miRNA'ların ekspresyon seviyelerini analiz etmek için (Ct) floresan değerinin eşik değerini geçtiği (Threshold çizgisini kestiği) değerleri kullanıldı. İfade seviyeleri, RNU6B (endojen kontrol) ifadesine göre normalleştirildi. MiRNA bağıl miktarları, karşılaştırmalı Ct yöntemi ($\Delta\Delta CT = \Delta CT$ [tümör doku örneği] – ΔCT [karşılık gelen neoplastik olmayan böbrek dokusu]) kullanılarak belirlendi. Her bir tümör numunesi ile buna karşılık gelen neoplastik olmayan böbrek dokusu arasındaki iki miRNA'nın ekspresyonundaki kat değişiklikleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak belirlendi.

MiRNA'lara yönelik kat değişiklikleri grafiksel ve sayısal olarak ifade edildi. Log2 ile dönüştürülmüş miRNA ekspresyon seviyeleri belirlendikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar SPSS versiyon 20.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel güven düzeyi 0,95 ($\alpha = 0,05$) olarak belirlendi.

Tablo 6. Ayrıntılı çalışma takvimi

İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Kim(ler) Tarafından Gerçekleştirildiği	Zaman Aralığı
Etik Kurul onayı	İKÇÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu	29.11.2017
Klinik izlemi olan olgulardan çalışmaya dahil edilecek olguların seçilmesi, hazırlanması	Prof. Dr Erdener Özer Doç. Dr. Aylin Orgen Çallı	6 ay
Moleküler Çalışma için doku kesitlerinden quantitative reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (2-step RT-PCR) ile miRNA analizi	Doç. Dr. Aylin Çallı	8 ay
Ekspresyon seviyeleri belirlendikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak karşılaştırılması	Doç. Dr. Aylin Çallı, Prof. Dr. Özlem Ege Oruç	1 ay

Doktora programı kapsamında değerlendirilmesi amacıyla çalışmaya ait bir adet başlıca yazar olmak üzere 2 adet SCI E dergide yayın, başlıca yazar ulusal 1 adet derleme, başlıca yazar 2 adet uluslararası kongrede poster sunumu	Doç. Dr. Aylin Çallı	18 ay
Tezin yazılması ve düzenlenmesi	Doç. Dr. Aylin Çallı	6 ay

3.8. Yöntemler

3.8.1. Olgu bloklarının miRNA analizi için hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen hastalara ait rezeksiyon materyalinden hazırlanan tümörlü blokların hematoksilin-eosin (H&E) boyalı kesitleri ışık mikroskobunda 2 uzman patolog tarafından yeniden gözden geçirildi.

Tüm olguların epitelyal, blastemal ve stromal bileşenlerinin oranlarına göre histolojik alt tiplendirme yapıldı (Şekil 5).

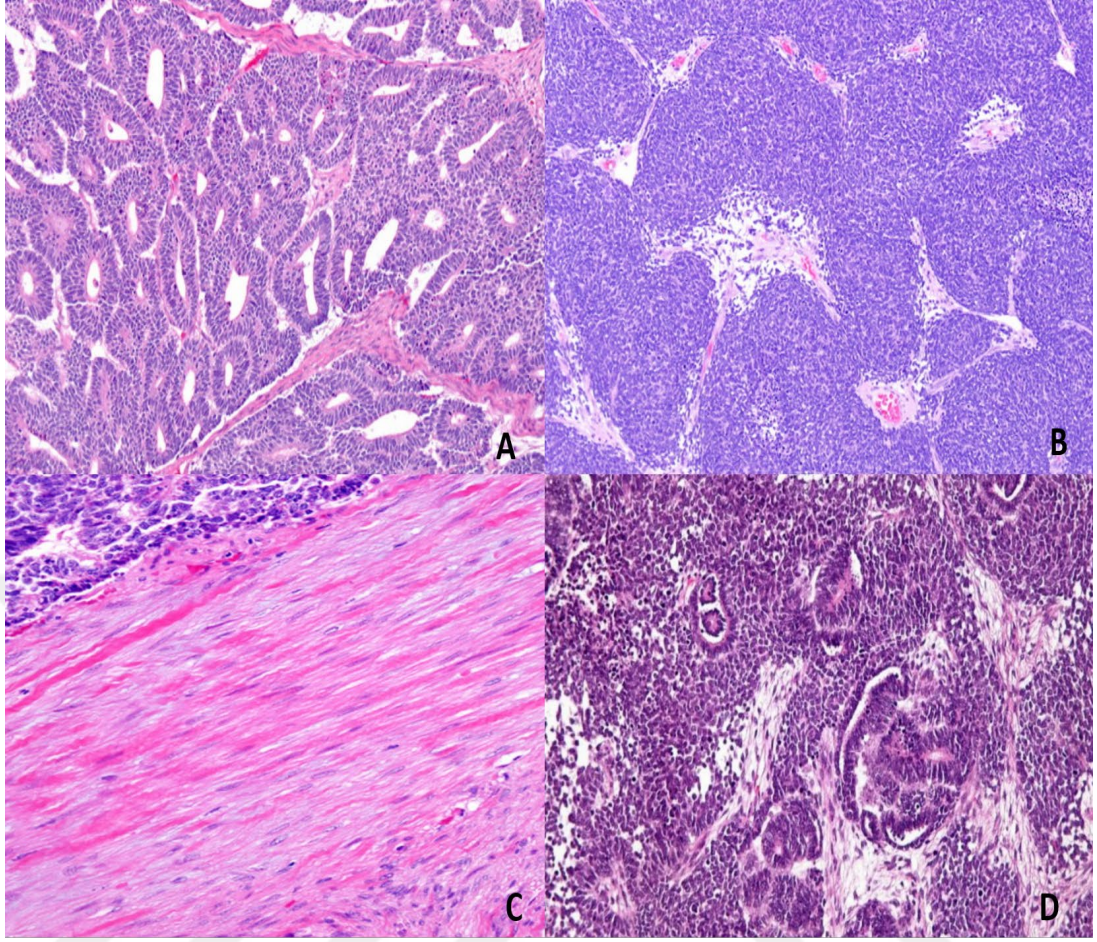
Anaplazi varlığı ve yaygınlığı ise CAP WT protokolünde belirtilen kriterler baz alınarak değerlendirildi ve olgular fokal anaplazili- WT ve diffüz anaplazili- WT olacak şekilde belirlendi.

Tez çalışması için yeterli tümör alanı içeren demonstratif H&E lamlarda en çok tümör hücresi içeren ancak inflamasyon, hemoraji ve nekroz içermeyen alanlar işaret kalemi ile ışık mikroskobu altında işaretlendi.

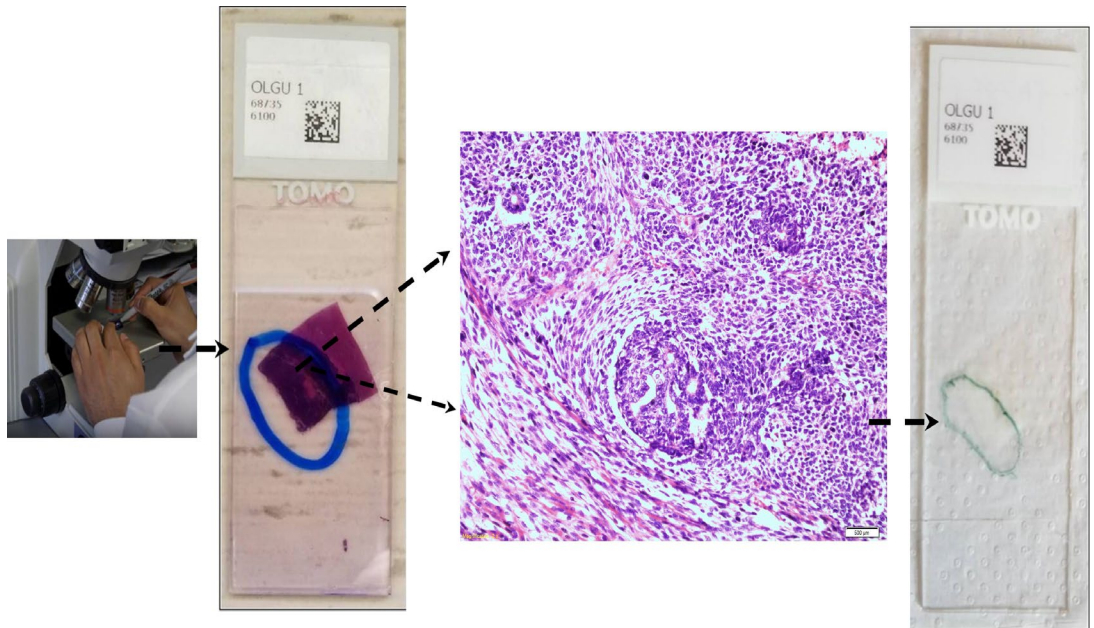
Seçilen her bir bloktan 5'er µm kalınlığında, 4-10 sayı aralığında doku kesitleri hazırlandı. H&E boyalı lamlarda işaretli bölümün izdüşümüne uyan dışındaki alanlar bistürü ucu ile lamlardan uzaklaştırıldı (Şekil 6).

Her bir olguya ayrı ayrı izole tümör alanları steril mikrosantrifüj tüpü (1.5 ml'lik) içerisine bistürü ucu (11 numaralı) kullanılarak toplandı.

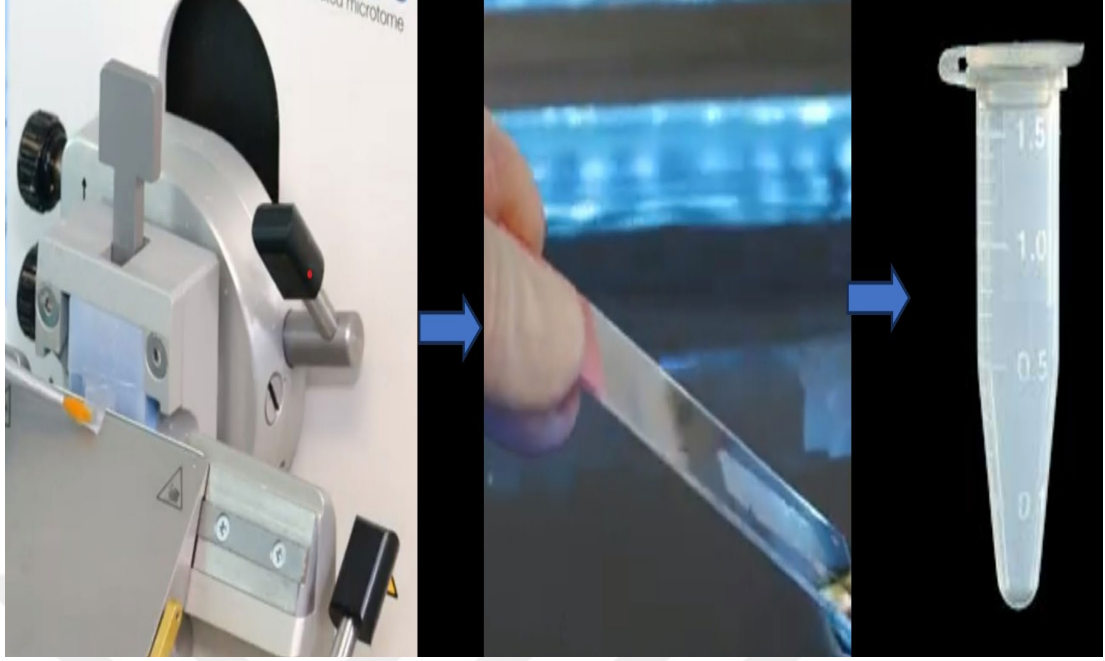
Aynı şekilde her bir WT olgusunun tümörsüz normal böbrek parankimi içeren bloğundan 5'er µm kalınlığında, 4-10 sayı aralığında doku kesitleri hazırlandı ve steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı (Şekil 7).



Şekil 5. Wilms Tümöründe Histolojik Alt Tipler (A-epitelyal, B-blastemal, C-stromal, D-mikst)



Şekil 6. Wilms Tümörlerinde Demonstratif Tümör Alanının İşaretlenmesi



Şekil 7.Wilms Tümörlerinde Tümör Dokusunun ependorf tüplerine alınması

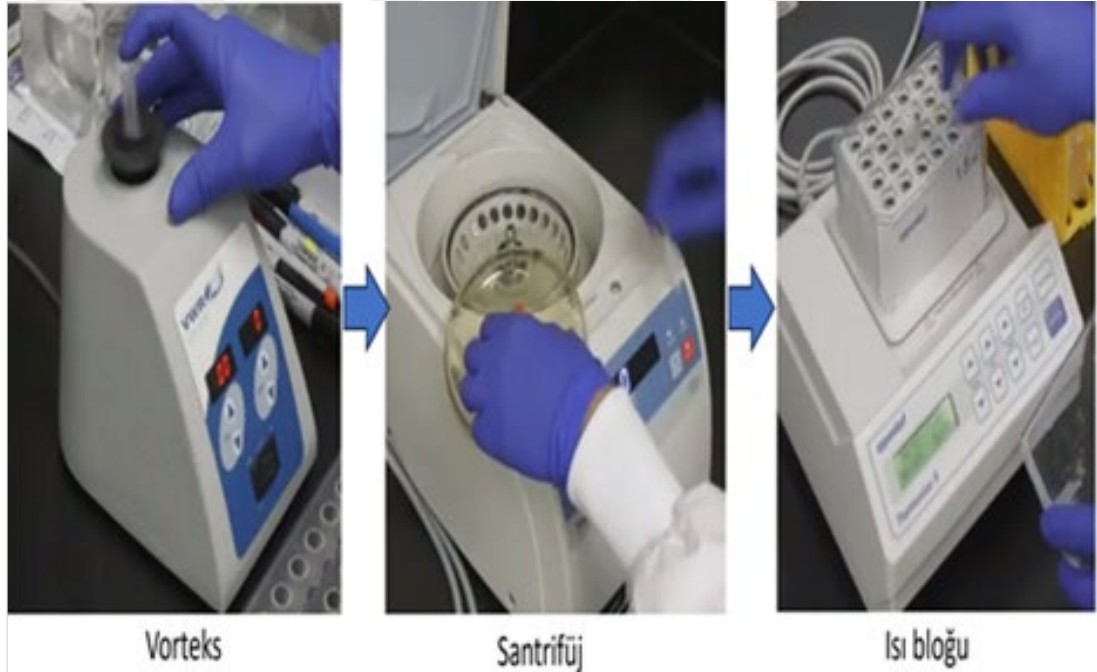
3.8.2. Deparafinizasyon, RNA izolasyon Basamakları

Deparafinizasyon ve rehidrasyon sonrası doku kesitlerinden, ‘INVITROGEN Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit Thermo Scientific/Ambion, USA catalog no. AM1975’, üreticinin talimatlarına uyularak RNA izolasyon prosedürü gerçekleştirildi. İzolasyon kitinin seçilmesinin nedeni; miRNA’lar da dahil olmak üzere toplam nükleik asitlerin formalinde fikse parafine gömülü (FFPE) dokulardan izolasyonu için optimize edilmiş olmasıdır.

- ❖ Çalışmaya dahil edilen her bir olguya ait miRNA analizi için seçilmiş FFPE bloklarından hazırlanan tümör dokusu içeren mikrosantrifüj tüplerine 1 ml ksilen eklendikten sonra 30 sn vortekslendi.
- ❖ Daha sonra örnekler santrifüj cihazında iki dakika 14.000 rpm’de santrifüj edildi.
- ❖ Parafinin eriyebilmesi için ısı bloklarında (50°C) üç dakika inkübasyona bırakıldı.
- ❖ İki dakika 14.000 rpm’de santrifüj edilerek pellet oluşumu sağlandı.
- ❖ Oluşan pellete dokunmadan, pipetleme ile süpernatant uzaklaştırıldı.
- ❖ Ksilen ekleme, santrifüj pellet oluşum basamakları tekrarlandı ve süpernatant

doku pelletine dokunmadan uzaklaştırıldı.

- ❖ Pellet üzerine ksileni uzaklaştırabilmek için, 1 ml %100'lük etanol eklenerek 30 sn vortekslendi.
- ❖ 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra pellet oluşturuldu. Pipetleme ile doku pelletine dokunmadan, süpernatantın uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra etanolu uzaklaştırmak için yine pipetleme ile doku pelletine dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
- ❖ Doku pelleti biyolojik kabin içerisinde tüpler ağzı açık şekilde 50°C'deki ısı bloklarında 20 dk doku tamamen kuruyana ve olası etanol buharlaşana kadar inkübe edildi (Şekil 8).

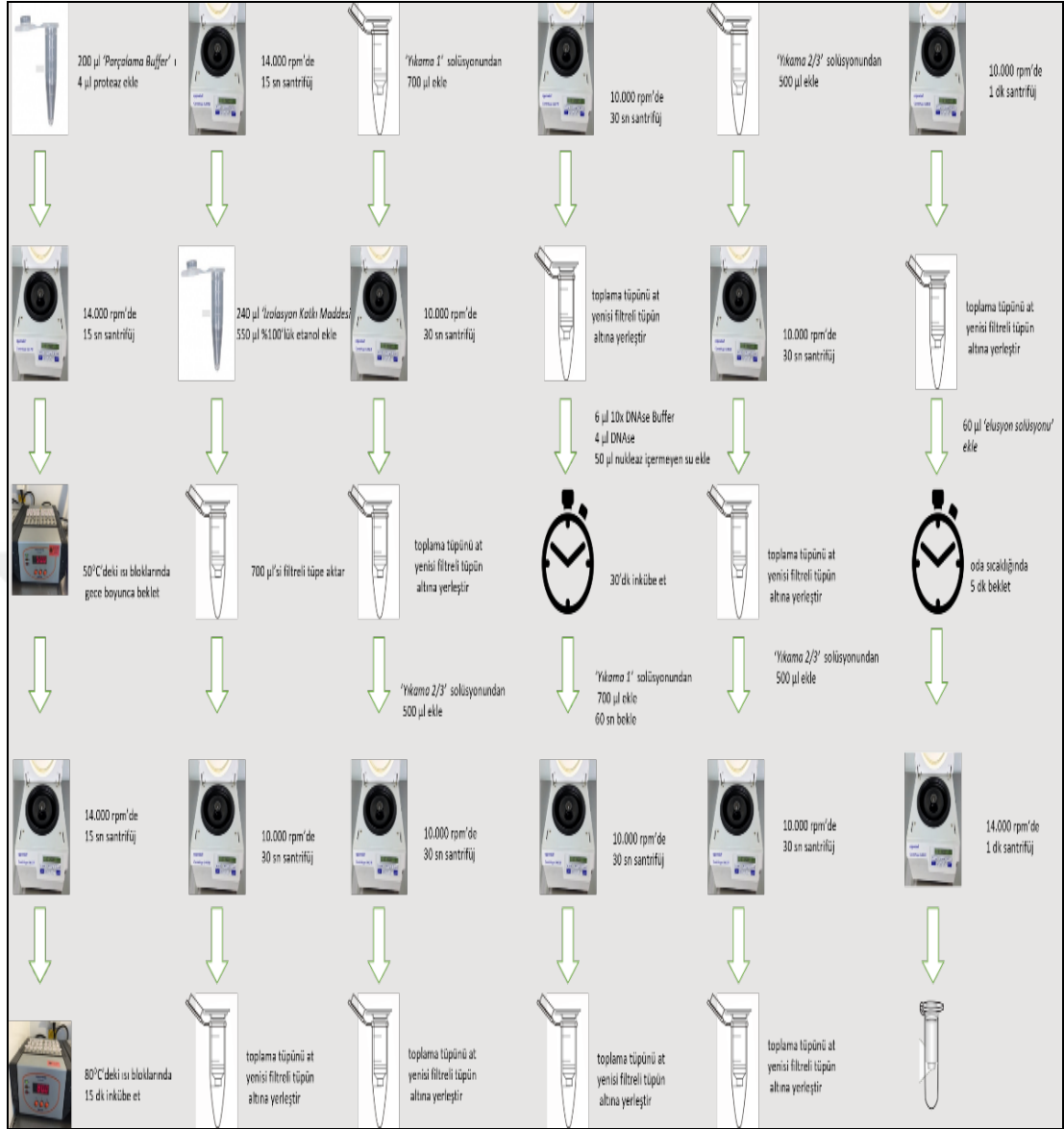


Şekil 8. RNA izolasyonunda deparafinizasyon uygulama basamakları

- ❖ Dokunun parçalanması için her mikrosantrifüj tüpü içerisinde bulunan deparafinize doku örneğinin üzerine 200 µl 'Lizis Buffer' ile 4 µl proteaz eklenerek düşük hızda vortekslendi.
- ❖ 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edilmiş mikrosantrifüj tüpleri 50°C'deki ısı bloklarında gece boyunca inkübe edildi.
- ❖ Her bir mikrosantrifüj tüpüne 240 µl 'İzolasyon Katkı Maddesi' solüsyonu ve

550 µl %100'lük etanol eklenip pipetlenerek karıştırılarak, 700'er µl'si hazırlanan her bir filtreli tüpe aktarıldı.

- ❖ 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılarak, yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi. Mikrosantrifüj tüpü içerisindeki karışımın kalanı, filtreli tüpe aktarılıp, bu işlem tekrarlanarak filtrenin yıkanması aşamasına geçildi.
- ❖ Filtreli tüpün merkezine ekstraksiyon kiti içerisinde bulunan 'Yıkama 1' adlı solüsyondan 700 µl eklenerek 10.000 rpm'de 30 sn santrifüjlendikten sonra toplama tüpü atıldı. Yenisi filtreli tüpün altına konuldu.
- ❖ Kit içerisinde bulunan 'Yıkama 2/3' adlı solüsyondan, 500 µl eklenerek 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi ve sonrasında toplama tüpü atıldı. Filtreli tüpün altına yeni toplama tüpü yerleştirildikten sonra filtrede kalan sıvının tamamen uzaklaştırılması için toplama tüpü ve filtreli tüp tekrar 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj gerçekleştirildi. Toplama tüpü atılarak yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi.
- ❖ Sonra yıkama aşamasına geçilerek filtreli tüpler üzerine 'Yıkama 1' adlı solüsyondan, 700 µl eklenerek 60 sn oda sıcaklığında bırakıldı. Sonrasında toplama tüpü ve filtreli tüp 30 sn 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Hemen sonrasında toplama tüpü atılarak yeni toplama tüpü, filtreli tüpün altına yerleştirildi.
- ❖ Ekstraksiyon kitinde bulunan 'Yıkama 2/3' adlı solüsyondan filtreli tüpün merkezine 500 µl eklendi. Toplama tüpü ve filtreli tüp 10.000 rpm'de 30 sn santrifüjlenerek sonrasında toplama tüpü atıldı. Filtreli tüpün altına yeni toplama tüpü yerleştirilerek aynı işlem bir kez daha tekrarlandı.
- ❖ Filtre içerisinde herhangi sıvı kalmaması için toplama tüpü ve filtreli tüp 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlenerek toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpü yerleştirilen filtreli tübün içine elüsyon solüsyonundan 60 µl eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında toplama ve filtreli tüp bir dk 14.000 rpm'de santrifüj edilerek total RNA eldesi tamamlanmış oldu (Şekil 9).



Şekil 9: RNA izolasyonu basamakları

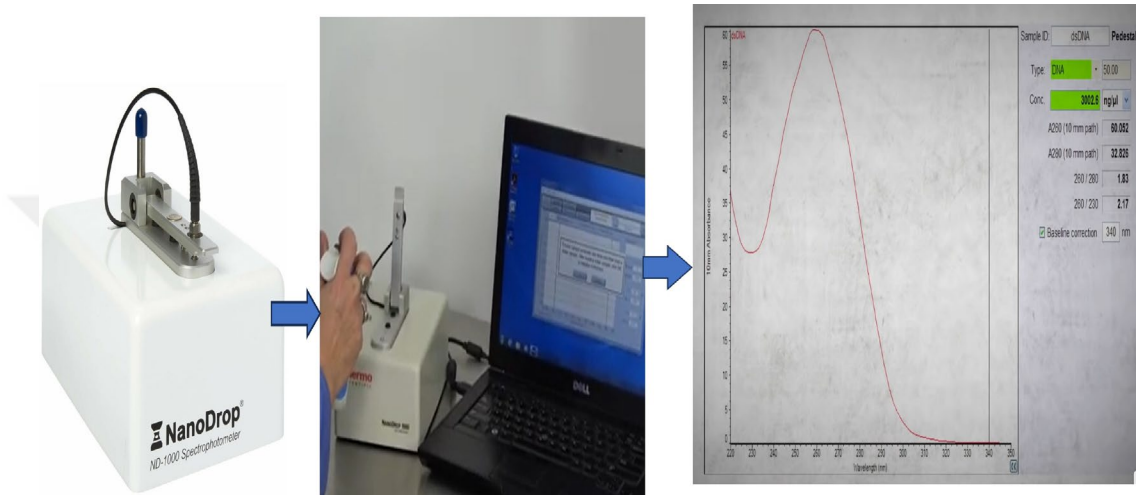
*Narlı, Akciğer ve Baş Boyun Bölgesi Skuamöz Hücreli Karsinomlarında miRNA Ekspresyon Profiline Anatomik Lokalizasyonunun Tespitine Katkısı

3.8.3. RNA Derişimlerinin Belirlenmesi

*Nanodrop 1000, Thermo Scientific, USA markalı spektrofotometre cihazında ölçülen 230nm, 260 nm ve 280 nm değerleri kullanılarak izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonlarının ve saflık derecelerinin hesaplanması, karşılaştırılması ve sonuçların uygulama aşamaları açısından değerlendirilmesi yapıldı. Optik dansite (absorbans) farklı dalga uzunluklarında: 230nm (kontaminasyon emilimi ve arka plan emilimi), 260nm (nükleik asitlerin maksimum emilimi), 280nm (proteinlerin maksimum emilimi) ölçüldü. RNA molekölü için 260

nm’de okunan 1 optik dansite 40 µg/ml’ye karşılık gelmektedir. RNA konsantrasyonu (µg/ml) = (optik dansite 260 x seyreltme faktörü x 40 µg/ml) /1000 formülü kullanılarak ölçüldü.

*Optik dansite 260/280 oranı, RNA saflığının göstergesi olarak kullanıldı. Bu oranın 1,9-2,0 arasında bulunduğu örnekler saflık açısından çalışmaya elverişli kabul edildi. Bir sonraki basamak için -20°C’de saklandı (Şekil 10).



Şekil 10. RNA konsantrasyonun belirlenmesi

3.8.4. Total RNA’dan Komplementer DNA Sentezi

Her bir WT örneğinden elde edilen 10 nanogram total RNA’dan Taqman MicroRNA Reverse transcription kiti (Thermo Scientific/Ambion, USA, catalog no. 4366596) kullanılarak revers transkripsiyon işlemi ile komplementer DNA (c-DNA) sentezi gerçekleştirildi. Tüm doku örneklerinin miRNA-603 ve miRNA-877 hedef miRNA’larına ve RNU6b endojen kontrol miRNA’sına yönelik c-DNA sentezi gerçekleştirildi.

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için ‘TaqMan® MicroRNA revers transkriptaz kiti’ içinde bulunan kullanılacak revers transkripsiyon master miks hacmi, pipetlemeden kaynaklanan kayıplar da dikkate alınıp hesaplandı. Analiz için gerekli miktarda hazırlanan revers transkripsiyon master miks hacmi ve karışım protokolü Tablo-7’de belirtilmiştir.

Tablo 7. Revers transkripsiyon reaksiyonu için karışım protokolü

Solüsyon	15 µl'lik RT reaksiyonu için kullanılacak miktar
100mM dNTPs (dTTP ile birlikte)	0.15 µL
50 U/µL MultiScribe™ reverse transkriptaz	1.00 µL
10× RT Buffer	1.50 µL
20 U/µL RNase inhibitor	0.19 µL
DNAaz ve RNAaz içermeyen distile su	4.16 µL
Total miktar	7 µL

Tabloda belirtilmiş miktarlarda RNAaz içermeyen su, RT Buffer, dNTP Mix, RNase inhibitör; yazılan sıra ile 0,5 mL'lik santrifüj tüpüne eklendikten sonra son olarak da ters transkriptaz enzimi eklendi. Hazırlanmış revers transkripsiyon karışımı, 96 kuyucuk içeren plakalarda belirlenmiş alanlara tek tek dağıtıldıktan sonra 'TaqMan® microRNA Assay (Thermo Scientific/Ambion, USA, catalog no. 4427975) kiti' içerisindeki 5X RT primerden 3 µL, total RNA örneklerinden ise 5 µL her bir kuyucuğa eklendi. Kontaminasyon riskini önlemek için her plakada her bir hedefe yönelik, 1.00 µL DNAaz/ RNAaz içermeyen distile su içeren karışımlar da hazırlanarak eklendi. Hazırlanan plaka hafifçe vortekslenerek sonrasında santrifüj edildi. Sonrasında 96 kuyucuklu termal döngü cihazında (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler) reaksiyon hacmi 15 µl'e ayarlanarak, Tablo 8'de belirtilen süre-sıcaklık programında revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 8. Revers Transkripsiyon için süre-sıcaklık programı

Basamak	Süre	Sıcaklık
Bekleme	30 dk	16 °C
Bekleme	30 dk	42 °C
Bekleme	5 dk	85 °C
Bekleme	∞	4

Örnekler RT-qPZR yönteminde daha sonra kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.8.5. MiRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu çalışılması ‘7500 real time PCR (ABI, Applied Biosystems, USA)’ cihazında yapıldı. Analizde kullanılan miRNA’lar için RNU6B referans olarak seçildi. Kontrol ve tümör örneklerinde hem hedeflenen miRNA’lara hem de referans olarak seçilen RNU6B’ye özgü primer ve prob kullanılarak ekspresyon seviyeleri saptandı. Her bir hastanın tümörlü ve kontrol doku örneklerine ait miRNA-603 ve miRNA-877 hedef miRNA’larına yönelik PCR karışımları, RNU6b endojen kontrol ve RNA içermeyen kontaminasyon örnekleri aynı anda 96 kuyucuklu plakalarda hazırlandı.

Reaktiflerin Çözülmesi ve Karıştırılması: ‘TaqMan® Gene Expression Assays (20X)’ve cDNA örnekleri, buz üzerinde çözüldü ve hafifçe vortekslendi ve hızlıca çevrildi. Hesaplanan reaksiyon sayısının %10-20 fazlası miktarda stok şişesinden alınarak uygun büyüklükteki santrifüj tüplerine alıktlandı.

qPCR Reaksiyon Çözeltilisinin Hazırlanması: Firmanın önerileri doğrultusunda 1 µl ‘TaqMan MicroRNA Assay (Thermo Scientific/Ambion, USA, catalog no. 4427975)’ de bulunan floresan işaretli 20X primer, 10 µl ‘TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Scientific/Ambion, USA, catalog no. 4304437)’, 7.67 µL DNAaz/ RNAaz içermeyen distile su ve her bir hedef miRNA’ya ait 1.33 µl c-DNA ürünü ile toplam hacmi 20 µL olacak şekilde, PCR karışımları düzenlendi. Aynı örnekler 3 defa (triplicate) çalışıldı. (Tablo 10). İhtiyaç duyulan hacmin, %10 fazlasını kapsayacak PCR karışımı hazırlandı.

qPCR Reaksiyonunun Çalıştırılması: Hazırlanan RT-qPCR karışımları 96 kuyucuklu plakaların, çalışma şablonunda belirlenmiş alanlarına eklendi. Revers transkriptaz plakalarında, her bir hedefe yönelik kontaminasyon kontrolü için kullanılan, distile su içeren c-DNA örneklerinin 1,33 µL’si de RT-qPCR plakalarına eklendi. Plakalar NF 800/R santrifüj cihazında 1 dk santrifüj edilerek RT-qPCR reaksiyonu için real time PCR cihazına yüklendi.

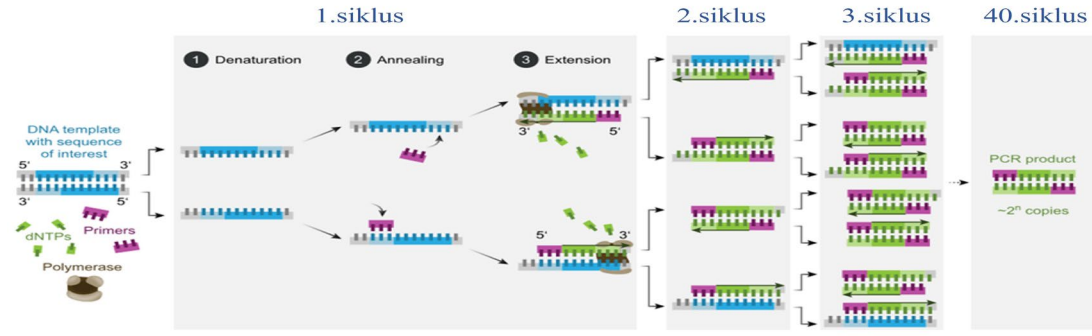
Tablo 9. RT-qPCR 20 µl'lik reaksiyonu için kullanılacak solüsyon miktarları

Solüsyon	RT-qPCR 20 µl'lik reaksiyonu için kullanılacak solüsyon miktarları	
	Tek reaksiyon	Üç reaksiyon
TaqMan® Small RNA Assay (20x)	1.00 µL	3.60 µL
Revers transkripsiyon ile sentez edilen c-DNA ürünü	1.33 µL	4.80 µL
TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2X)	10.00 µL	36.00 µL
Nükleaz içermeyen steril su	7.67 µL	27.61 µL
Toplam hacim	20.00 µL	72.01 µL

Termal döngü parametreleri standart çalışma modunda ve firmanın belirttiği şekilde ayarlanarak uygulandı (Tablo 10). Gerçekleştirilen optimizasyon çalışması sonucunda; '7500 real time PCR cihazı' reaksiyon hacmi 20 µl ayarlanarak amplifikasyon işlemi 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Real time PCR cihazında '7500 software v2.0.6' ile floresan ışımaya miktarları, PCR ile çoğaltılan moleküllerin sayısı ile doğru orantılı olarak artan floresan sinyali veren floresan boyalar aracılığıyla her döngüden sonra olmak üzere 40 siklus boyunca ölçüldü (Şekil 11).

Tablo 10. Çalışmada RT-qPCR 20 µl'lik reaksiyonu için solüsyon miktarları

AŞAMA	ENZİM AKTİVASYONU		PCR	
	BEKLEME		40 DÖNGÜ	
			DENATÜRASYON	BAĞLANMA
SICAKLIK	95°C	95°C	95°C	60°C
ZAMAN	2 dakika	10 dakika	15 saniye	60 saniye



Şekil 11. Örneklemin RT-qPCR aşamaları

3.8.6. Hedef miRNA Ekspresyon Verilerinin Normalizasyonu ve Ekspresyon Profillerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi

RT-qPCR analizlerinde; örnek toplama ve hazırlanması, RNA izolasyonu, ters transkripsiyon reaksiyonu sırasındaki farklılıklar ile PCR etkinliği ve hatalar, sonuçların güvenilirliği açısından risk oluşturmaktadır. Hataların en düşük düzeye indirgenmesi için uygun bir normalizasyon metodu ile elde edilen verilerin normalize edilmesi gerekmektedir. Verilerin kantitatif olarak birbiriyle karşılaştırılabilir olması için RT-qPCR uygulamalarında her dokuda eşit miktarda ekspresyonu olduğu düşünülen referans genlere olan farkının alınması ve bunun PCR uygulamasındaki logaritmik DNA kopya sayısı artışıyla ilişkilendirilmesi gerekir. Normalizasyon olarak bilinen bu yöntemde hedef miRNA'ların PCR amplikasyon ürünleri ile ilişkili Ct değerleri, endojen referans gen olarak seçilen miRNA'ların Ct değerleri ile karşılaştırılmaktadır. RT-qPCR cihazında, 7500 software v2.0.6 ile her örnek için ΔR_N 'de önemli artışın olduğu ilk siklus, yani floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri geçtiği döngü olan Ct (cycle threshold) değeri tespit edildi. Başka deyişle; Ct değeri (threshold cycle) kantitatif real-time PCR'da floresans ile ölçülen eşik değerdir.

Çalışmada RT-qPCR normalizasyonu için $\Delta\Delta CT$ yöntemi kullanılmıştır. Tüm hücrelerde eşit düzeyde ekspresyonu olduğu düşünülen referans miRNA olarak seçilen RNU6b, endojen kontrol için kullanılmıştır. Bunun için; $(Ct \text{ hedef miRNA} - Ct \text{ referans miRNA})$ formülü kullanılmıştır.

Elde edilen C_T değerleri kullanılarak, örneklere ait $\Delta\Delta CT$ [$\Delta\Delta CT = (\text{tümörlü dokuya ait hedef miRNA'nın } C_T \text{ değeri} - \text{tümörlü dokuya ait endojen kontrol}$

miRNA'nın (Rnu6b) C_T değeri) – (normal dokuya ait hedef miRNA'nın C_T değeri - normal dokuya ait endojen kontrol miRNA'nın (RNU6b) C_T değeri)] değeri hesaplandı. Normal dokuya göre, tümörlü dokuda hedef miRNA'nın ekspresyon seviyesindeki değişiklik olan *fold change* için ise $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülünden faydalanılmıştır. WT örnekleri için C_T değeri, $\Delta\Delta CT$ ve *fold change* değerleri belirlendi.

3.9. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel hesaplamalar için IBM Statistical Package for the Social Sciences 23 yazılımı kullanıldı. Analizler %95 güven aralığı ile yapıldı ve p< 0,05 değeri istatistiksel anlamlılığın göstergesi olarak kabul edildi.

Tümörlü dokuda, normal dokuya göre hedef miRNA'nın ekspresyon seviyesindeki değişiklik olan fold change değerlerinin, oransal veri olması nedeniyle Log2 dönüşümü uygulandı. İstatistiksel analizlerin tamamında, bu dönüştürülmüş veriler kullanıldı. MiRNA ekspresyon düzeyindeki farklılık analizi yapılabilmesi için öncelikle veriler normallik ve varyansın homojenliği açısından Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi.

MiR603 ve miR877 değerlerinin prognostik parametreler ile istatistiksel olarak değerlendirmesi yapılırken iki kategorili değişkenler için Mann-Whitney U testi üçlü gruplarda Kruskal-Wallis H Testi kullanıldı. Değişkenlerimiz minimum, maksimum, medyan, ortalama $\pm$ standart sapma olarak özetlendi.

3.10. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Birincisi, WT vakalarının nadir olmasının bir sonucu olarak az sayıda hasta çalışmaya dahil edildi. İkincisi ise WT olgularının intratümöral genetik heterojeniteye sahip olmasıdır. Üçüncü olarak çalışmamız retrospektif bir çalışma olduğundan, az sayıda olguda bazı değişkenlere ulaşılması mümkün olamadı. Son olarak, çocukların takip süresi kısaydı, bu da uzun vadeli prognozu doğrulamayı imkânsız hale getirdi. Bu nedenle; miRNA 603 ve miRNA 877'nin uzun vadeli prognostik değerinin araştırılması için geniş ölçekli ve prospektif klinik araştırmaların gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında WT'de miRNA-603 ve miRNA-877 ekspresyonlarının RT-qPCR ile analizi ve ekspresyon düzeylerinin klinikopatolojik parametrelerle korelasyon ilişkisine bakılmıştır.

4.1. Çalışma Örneklerinin Tanımlayıcı Demografik Verileri

Ocak 2005-2020 tarihler arasında WT tanısı almış ve çalışmaya dahil edilen 24 olgu mevcuttu.

Olguların 17'si preoperatif kemoterapi, 7'sinde ise öncelikli olarak cerrahi tedavi uygulandı. Dokuz olguya postoperatif radyoterapi uygulandı.

Olguların 13'ü kız, 11'i erkekti. Hastaların 8'inin yaşı 4 yaşından küçük (%33), 16'sı 4 yaşından büyüktü (%66). Yaş ortalaması 52 ay olarak saptandı.

Olguların tamamında tümör tek taraf böbrekte (unilateral) izlendi.

Tümör çapı 3-14.5 cm aralığında olup, ortalama tümör çapı ise 8.8 cm olarak belirlendi.

Olguların çoğunluğunda tümör ağırlığı ise 600 gr'dan düşüktü. Tümör ağırlığı 117-1298 g aralığında ve ortalama tümör ağırlığı 490 g idi.

Olguların %16.6'sında blastemal histolojik tip, %8.5'inde stromal, %29'unda mikst, %25'inde regresif, %12.5'inde ise ağırlıklı olarak epitelyal ve %8.5'inde kistik parsiyel diferansiye histolojik tip gözlemlendi.

Altı olguda anaplazi tespit edildi. 24 olgunun %2'inde diffüz, birinde ise fokal anaplazi mevcuttu.

13 olgu evre I-II iken, 11 olgu evre III-IV saptandı. Olguların %25 inde akciğer metastazı görüldü. Olguların yalnız 3'ünde ise rekürrens söz konusuydu.

Çalışmanın takip süresi ortalama olarak 16 ile 196 ay arasında değişim gösterdi. WT olgularının ortalama yaşam süresi %83 olarak hesaplandı.

Çalışma olgularının klinikopatolojik özellikleri Tablo 11, Tablo 12'de özetlenmiştir.

Tablo 11. Klinikopatolojik özellikler ve miRNA-603 ve MiRNA-877 ekspresyonları

OLGU	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon	Tümör çapı	Tümör ağırlığı	Histolojik tip	Anaplazi
1	F	11	UNİLATERAL-sağ	10 cm	600 gr	BLASTEMAL	WT- DİFFÜZ Anaplazi
2	F	2	UNİLATERAL-sol	8 cm	284 gr	EPİTELYAL	YOK
3	F	6	UNİLATERAL-sol	3 cm	122 gr	MİKST	WT- DİFFÜZ Anaplazi
4	M	2	UNİLATERAL-sol	6.5 cm	260 gr	REGRESİV	WT- DİFFÜZ Anaplazi
5	F	2	UNİLATERAL-sol	11 cm	810 gr	STROMAL	WT- FOKAL Anaplazi
6	F	3	UNİLATERAL-sol	14 cm	608 gr	MİKST	YOK
7	M	12	UNİLATERAL-sol	7 cm	400 gr	REGRESİV	YOK
8	F	8	UNİLATERAL-sağ	8 cm	400 gr	REGRESİV	YOK
9	M	3	UNİLATERAL-sağ	14.5 cm	1250 gr	STROMAL	YOK
10	F	5	UNİLATERAL-sağ	6 cm	117 gr	BLASTEMAL	YOK
11	F	4	UNİLATERAL-sol	13 cm	805 gr	KPDN	YOK
12	F	7	UNİLATERAL-*	*	*	MİKST	WT- DİFFÜZ Anaplazi
13	M	16	UNİLATERAL-sağ	9 cm	646 gr	MİKST	YOK
14	M	1	UNİLATERAL-sol	10.5 cm	337 gr	MİKST	YOK
15	M	9	UNİLATERAL-sağ	14 cm	1298 gr	REGRESİV	YOK
16	M	4	UNİLATERAL-sol	5.5 cm	168 gr	REGRESİV	YOK
17	F	6	UNİLATERAL-sol	5.5 cm	200 gr	REGRESİV	YOK
18	F	4	UNİLATERAL-sol	6 cm	167 gr	MİKST	YOK
19	F	3	UNİLATERAL-sağ	BİLİNMIYOR	*	MİKST	WT- DİFFÜZ Anaplazi
20	F	4	UNİLATERAL-sol	7.5 cm	410 gr	BLASTEMAL	YOK
21	M	2	UNİLATERAL-sol	UNKNOWN	*	KPDN	YOK
22	M	6	UNİLATERAL-sağ	4 cm	119 gr	EPİTELYAL	YOK
23	M	17	UNİLATERAL-sol	UNKNOWN	*	BLASTEMAL	YOK
24	M	30	UNİLATERAL-sol	13.5 cm	800 gr	EPİTELYAL	YOK

*bilinmiyor

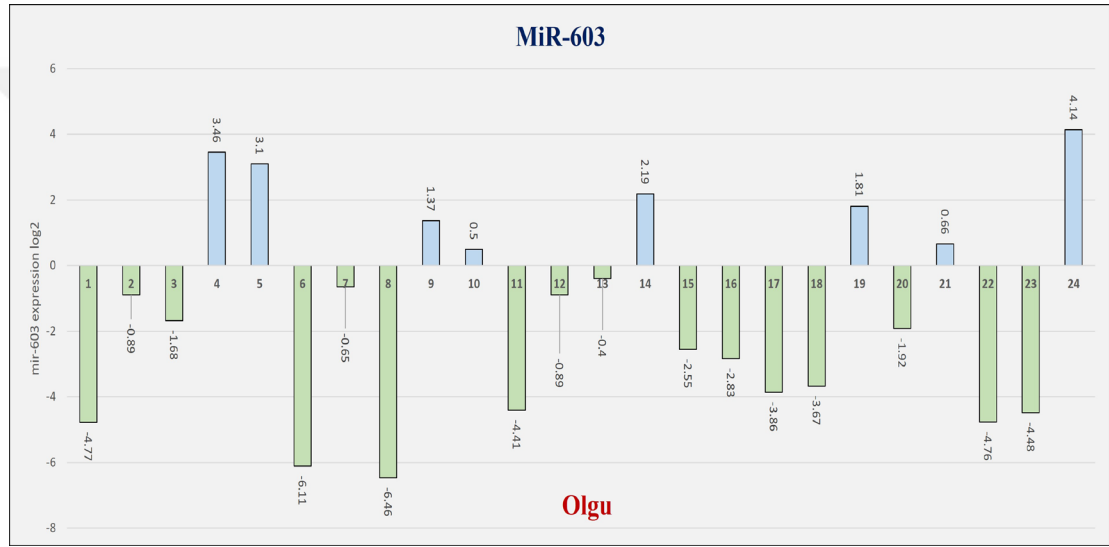
Tablo 12. Klinikopatolojik özellikler ve miRNA-603 ve MiRNA-877 ekspresyonları

OLGU	PRE-OP KT	RT	AC metastaz	Nüks	Overall Survi (ay)	miRNA- 603 fold change	miRNA- 603 log	miRNA- 877 fold change	miRNA- 877 log
1	VAR	VAR	VAR	YOK	16	0,04	-4,77	0,13	-3,00
2	*	YOK	YOK	YOK	*	0,54	-0,89	0,76	-0,40
3	VAR	VAR	YOK	YOK	121	0,31	-1,68	0,38	-1,39
4	*	YOK	YOK	YOK	114	11,00	3,46	3,02	1,59
5	VAR	VAR	YOK	YOK	122	8,56	3,10	0,30	-1,72
6	*	*	YOK	YOK	120	0,01	-6,11	0,69	-0,54
7	VAR	YOK	YOK	YOK	174	0,64	-0,65	0,29	-1,79
8	VAR	VAR	YOK	YOK	186	0,01	-6,46	1,04	0,05
9	VAR	VAR	YOK	YOK	196	2,58	1,37	2,09	1,06
10	VAR	YOK	VAR	VAR	36	1,41	0,50	1,15	0,20
11	VAR	YOK	YOK	YOK	84	0,05	-4,41	0,52	-0,95
12	VAR	VAR	YOK	YOK	62	0,54	-0,89	1,32	0,40
13	VAR	VAR	YOK	YOK	70	0,76	-0,40	2,08	1,05
14	VAR	YOK	YOK	VAR	11	4,57	2,19	0,53	-0,91
15	VAR	YOK	YOK	YOK	89	0,17	-2,55	2,25	1,17
16	VAR	YOK	YOK	VAR	82	0,14	-2,83	0,65	-0,62
17	VAR	YOK	VAR	YOK	59	0,07	-3,86	2,33	1,22
18	*	YOK	YOK	YOK	120	0,08	-3,67	0,99	-0,02
19	YOK	YOK	YOK	YOK	108	3,52	1,81	2,52	1,33
20	YOK	YOK	YOK	YOK	143	0,26	-1,92	2,23	1,16
21	YOK	YOK	YOK	YOK	82	1,58	0,66	0,85	-0,24
22	YOK	YOK	YOK	YOK	43	0,04	-4,76	0,33	-1,60
23	VAR	VAR	VAR	VAR	180	0,04	-4,48	0,04	-4,55
24	*	*	YOK	*	*	17,66	4,14	1,02	0,03

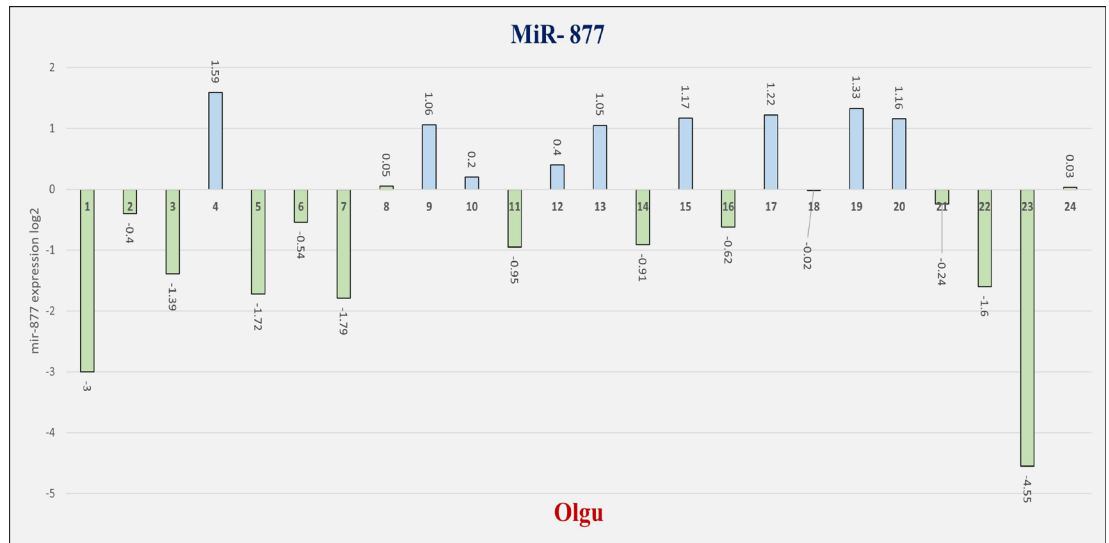
*bilinmiyor

4.2. Çalışma Örneklerinin MiRNA-603 ve MiRNA-877 Ekspresyon Analizi ve Klinik ve Patolojik Parametrelerle İlişkisi

Olguların miRNA-603, miRNA-877 ve RNU6B ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile belirlendi. Normal dokuya göre tümör dokusunda olguların 8'inde miRNA-603 ekspresyonunda artış, 16 olguda ise azaldığı saptandı (Şekil 12). MiRNA-877 ekspresyonunda ise olguların yaklaşık %60'ında azalma izlendi (Şekil 13). No 1, 2, 3, 6, 7, 11, 16, 18, 22 ve 23 numaralı olgularda ise hem miRNA-603 hem miRNA-877 ekspresyonunda azalma dikkati çekti.



Şekil 12. Olguların miRNA-603 ekspresyon düzeyleri



Şekil 13. Olguların miRNA-877 ekspresyon düzeyleri

Olguların miRNA-603 ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik veriler arasında istatistiksel ilişki değerlendirildiğinde yaş ile miRNA-603 ekspresyon düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlendi (Tablo 13).

Tablo13. Yaş ile miRNA-603 istatistiksel anlamlı ilişkisi

		miRNA-603					p
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medyan	Ortalama±SS	
Yaş	4 yastan küçük	8	-6.11	3.46	1.59	0.69±3.07	0.017
	4 yaş ve büyük	16	-6.46	4.14	-2.68	-2.41±2.59	

Ancak cinsiyet, lateralite, tümör çapı, tümör ağırlığı, blastemal baskınlığı ile miRNA-603 ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon saptanmadı (Tablo 14).

Tablo 14. Mikro RNA-603 disregülasyonu ile cinsiyet, lateralite, tümör çapı, tümör ağırlığı, blastemal baskınlığının istatistiksel değerlendirmesi

		miRNA-603					P
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medyan	Ortalama±SS	
Lateralite	Unilateral sağ	8	-6.46	1.81	-1.47	-1.91±3.17	0.519
	Unilateral sol	15	-6.11	4.14	-1.68	-1.12±3.23	
Tümör Çapı	<7cm	7	-4.75	3.45	-2.83	-1.83±2.90	0,782
	≥7cm	13	-6.47	4.14	-0.89	-1.34±3.45	
Tümör Ağırlığı	<550 gr	12	-6.46	3.45	-1.81	-1.71±2.86	0.817
	≥550 gr	8	-6.11	4.14	-1.47	-1.20±3.84	
Blastemal baskınlık	Baskın değil	20	-6.46	4.14	-0.89	-1.12±3.19	0.278
	Baskın	4	-4.77	0.50	-3.19	-2.66±2.47	
Anaplazi	Yok	18	-6.46	4.14	-2.23	-1.89±2.95	0.230
	Var	6	-4.77	3.45	0.45	0.17±3.19	
Cinsiyet	Kadın	13	-6.46	3.09	-1.92	-2.25±2.96	0.125
	Erkek	11	-4.76	4.14	-0.40	-0.35±3.04	

Olguların tümör evresi, nüks ve akciğer metastazı ile miRNA-603 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunamadı (Tablo 15).

Tablo 15. Mikro RNA-603 ekspresyon düzeyleri ile evre, AC metastazı, nüksün istatistiksel değerlendirmesi

		miRNA-603					p
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medyan	Ortalama±SS	
Evre	I-II	13	-6.46	3.45	-0.89	-1.32±2.75	0.885
	III-IV	11	-6.11	4.14	-2.55	-1.45±3.58	
AC Metastazı	Yok	18	-6.11	4.14	-0.89	-0.86±2.97	0.125
	Var	6	-6.46	1.37	-4.16	-2.95±3.14	
Nüks	Yok	20	-6.46	3.45	-1.80	-1.77±2.89	0.523
	Var	3	-4.47	2.19	0.50	-0.59±3.46	

Olguların risk skalası ile miRNA-603 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 16).

Tablo 16. Olguların risk grupları ile miRNA-603 düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi

		miRNA-603					p
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medyan	Ortalama±SS	
Risk grupları	Düşük risk	3	-4.40	0.65	-2.55	-2.09±2.56	0.575
	İntermediate risk	14	-6.46	3.45	-2.37	-2.07±3.06	
	Yüksek risk	6	-4.77	3.09	-0.19	-0.32±2.79	

Hastaların RT ve preoperatif KT tedavisi ile miRNA-603 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel anlamlılık izlenmedi (Tablo 17).

Tablo 17. Hastaların RT ve preoperatif KT tedavisi ile miRNA-603 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel değerlendirme

		miRNA-603					p
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medyan	Ortalama±SS	
Pre-op KT	Var	17	-6.46	3.45	-0.89	-1.46±3.04	0.674
	Yok	6	-4.75	1.81	-2.79	-2.06±2.76	

Olguların miRNA-877 ekspresyon düzeylerinin klinikopatolojik veriler arasında istatistiksel ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı.

Yaş ve cinsiyet ile miRNA-877 arasında anlamlı ilişki izlenmedi (Tablo 18).

Tablo 18. Yaş ve cinsiyet ile miRNA-877 istatistiksel değerlendirmesi

		miRNA-877					p
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medyan	Ortalama± SS	
Cinsiyet	Kadın						0.839
	Erkek	13	-3.00	1.33	-0.02	-0.28±1.26	
		11	-4.55	1.59	-0.24	-0.44±1.78	
Yaş	4 yastan küçük	8	-1.72	1.59	-0.32	0.02±1.18	0.501
	4 yaş ve daha büyük	16	-4.55	1.22	0.00	-0.54±1.62	

Benzer şekilde; lateralite, tümör çapı, tümör ağırlığı, blastemal baskınlığı ile miRNA-877 ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon saptanmadı (Tablo 19).

Tablo 19. Lateralite, tümör çapı, tümör ağırlığı, blastemal baskınlığının miRNA-877 düzeyi ile istatistiksel değerlendirmesi

		miRNA-877					p
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medya	Ortalama± SS	
Lateralite	Unilateral sağ	8	-3.00	1.33	0.63	0.03±1.56	0.220
	Unilateral sol	15	-4.55	1.59	-0.54	-0.61±1.49	
Tümör Çapı	<7cm	7	-1.60	1.59	-0.02	-0.09±1.22	0.552
	≥7cm	13	-3.00	1.17	-0.40	-0.37±1.31	
Tümör Ağırlığı	<550 gr	12	-1.79	1.59	-0.21	-0.21±1.13	0.758
	≥550 gr	8	-3.00	1.17	-0.26	-0.36±1.50	
Blastemal baskınlık	Baskın değil	20	-1.79	1.59	-0.13	-0.11±1.09	0.394
	Baskın	4	-4.55	1.16	-1.40	-1.55±2.68	
Anaplazi	Yok	18	-4.55	1.22	-0.13	-0.32±1.41	0.947
	Var	6	-3.00	1.59	-0.49	-0.46±1.85	

Vakaların tümör evresi, nüks ve akciğer metastazı ile miRNA-877 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 20).

Tablo 20. Evre, AC metastazı ve nük ile miRNA-877 ekspresyon düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi

		miRNA-877					p
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medyan	Ortalama±SS	
Evre	I-II	13	-1,79	1,59	-0,24	-0,18±1,09	0.750
	III-IV	11	-4,55	1,33	-0,02	-0,56±1,89	
AC Metastazı	Yok	18	-1,79	1,59	-0,32	-0,19±1,11	1.000
	Var	6	-4,55	1,22	0,13	-0,84±2,37	
Rekürrens	Yok	20	-3,00	1,59	-0,13	-0,16±1,30	0.273
	Var	3	-4,55	0,20	-0,91	-1,75±2,49	

Hastaların risk grupları ile miRNA-877 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunamadı (Tablo 21).

Tablo 21. Olguların risk gruplarının miRNA-603 düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi

		miRNA-877					p
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medyan	Ortalama±SS	
Risk grupları	Düşük risk	3	-0.95	1.17	-0.24	-0.01±1.08	0.875
	İntermediate risk	14	-4.55	1.59	-0.21	-0.31±1.63	
	Yüksek risk	6	-3.00	1.33	-0.59	-0.69±1.61	

Olguların RT ve preoperatif KT tedavisi ile miRNA-877 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı (Tablo 22).

Tablo 22. Mikro RNA-877 ve olguların RT ve preoperatif KT tedavisi

		miRNA-877					p
		Sayı	Minimum	Maksimum	Medyan	Ortalama±SS	
Pre-op KT	Var	17	-3.00	1.59	-0.40	-0.27±1.28	1.000
	Yok	6	-4.55	1.33	-0.13	-0.65±2.19	
RT	Var	9	-4.55	1.06	-0.62	-0.97±1.90	0.186
	Yok	14	-1.79	1.59	0.00	0.06±1.12	

5. TARTIŞMA

WT, moleküler, terapötik ve prognostik farklılıkları olan genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Tümör heterojenliği nedeniyle Wilms tümörlerinin biyolojik davranışını tahmin etmek zordur. Wilms tümörlerinin tedavisinde önemli ilerlemelere rağmen, yeni ve bireysel terapötik yaklaşımları belirlemek için yeni biyobelirteçlerin tanımlanması gerekmektedir. MiRNA'ların anormal ekspresyonları Wilms tümöründe geniş çapta rapor edilmiştir ve düzensiz miRNA'lar WT patogenezinde ve ilerlemesinde önemli roller oynamaktadır (32-40, 101-115).

Tahmin edilen miRNA hedef genlerinin kapsamlı yeni bir veri tabanı olan miRbase'de listelenen yaklaşık 2000 miRNA arasında miRNA-603, yakın zamanda tiroit hücrelerinde siklin D1 ve siklin D2 genlerini hedef alan miRNA CHIP mikrodizisi yöntemiyle keşfedilmiştir (130). Mussnich P ve arkadaşları, tiroit hücrelerinde yüksek hareketlilik grubu A (HMGA) proteinleri tarafından miRNA-603'ün negatif düzenlendiğini göstermiştir. Aynı çalışmada miRNA-603'ün kanser hücrelerinde sıklıkla aşırı eksprese edilen, hücre çoğalmasına ve göçüne katkıda bulunan siklin D1 ve hücre döngüsünün G1/S geçişinde çok önemli bir role sahip olan siklin D2 genlerini hedeflediği saptanmıştır. Siklin D1/2 proteinlerinin miRNA-603 tarafından düzenlenmesi, hücre transformasyonunda miRNA-603 düzensizliğinin rolünü kesinlikle açıklamaktadır (130).

Larengeal skuamöz hücreli karsinom (LSHK) olgularında 738 miRNA'nın ekspresyon profillerinin analiz çalışmasında 7 miRNA'nın yalnızca LSHK grubunda eksprese edildiği tespit edilmiş ve bu miRNA'lardan beşinin (miRNA-603, miRNA-331-3p, miRNA-1303, miRNA-660-5p ve miRNA-212-3p) LSHK'a spesifik olduğu vurgulanmıştır (131). Ek olarak miRNA-603'ün merkezi sinir sisteminin tümör oluşumunda rol oynadığı saptanmıştır (132-135). Kolorektal karsinomlu 102 olguluk seride; çalışma verileri ışığında, miRNA-603'ün kolorektal tümör oluşumunda rol oynayabileceği ve has-miRNA-603'teki genetik polimorfizmin kolorektal karsinom duyarlılığı ile ilişkili olduğunu düşündürdüğü belirtilmektedir (136).

Çalışma verileri ışığında miRNA-603'ün farklı tümörlerde farklı roller oynadığı bilinmektedir. Bazı tümör gruplarında bir oncomiR (137-139) olarak etki gösterdiği izlenirken, miR603'ün meme ve over kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiği bildirilmiştir (140-143).

Over kanseri dokularındaki miRNA-603 seviyesinin çevre dokuya göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca miRNA-603, over kanserinin malignitesini inhibe etmek için heksokinaz-2'yi hedeflediği gösterilmiştir. Over kanser hücrelerinde miRNA-603'ün aşırı ekspresyonu, glikoz tüketimi, laktat üretimi ve heksokinaz-2 ekspresyonundaki azalmayla kanıtlandığı gibi Warburg etkisini inhibe eder, in vitro tümör hücre proliferasyonunu ve invazyonunu azaltır (141). Benzer olarak; miRNA-603, kanser hücrelerinin çoğalması, invazyonu ve kemoradyasyonuna duyarlılığı ile ilgili genlerin bir kısmını düzenleyen bir tümör baskılayıcı miRNA olarak kabul edilmektedir (132,134,140). Tedavi almış nüks etmiş akut promyelositik lösemili olgularda yeni tanı alan hastalara kıyasla miRNA-603 ekspresyonu son derece düşük olduğu tespit edilmiş ve Tropomyozin ilişkili kinaz B ekspresyonu ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (142).

Meme karsinomlarında miRNA-603'ün tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü vurgulanmıştır. MiRNA-603 ekspresyonunun, eEF2K'nin düzenlenmesi yoluyla meme karsinom proliferasyonu, migrasyonu/metastazı ve tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca miRNA-603 bazlı gen terapisinin veya eEF2K hedefli yaklaşımların meme karsinomlarına karşı potansiyel bir terapötik strateji olabileceğine dikkat çekilmiştir (140).

Çalışmamızda diğer çalışmalar benzer şekilde; Wilms tümör olgularının doku örneklerinde normal dokuya göre miRNA-603'ün azaldığı saptanmıştır. Bu verilere dayanarak biz de WT olgularında miRNA-603'ün tümör baskılayıcı olarak rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

Meme karsinomlarında polimeraz zincir reaksiyonu kısıtlama parça uzunluğu polimorfizmi yöntemiyle Hsa-miRNA-603 rs11014002 C>T polimorfizmlerinin etkisini analiz eden çalışma, Mir603 rs11014002 T alelinin meme karsinom riskinin azaltılmasına katkıda bulunabileceğini ileri sürmektedir. Ayrıca hsa-miRNA-603 rs11014002 genotipi ile klinikopatolojik özellikler arasında anlamlı ilişki olmadığı belirtilmiştir (144).

Çalışmamızda olguların miRNA-603 ekspresyon düzeylerinin klinikopatolojik veriler arasında istatistiksel ilişkisi değerlendirildiğinde yaş ile miRNA-603 ekspresyon düzeyi arasında istatistiksel anlamlı ilişki izlendi ($p < 0.05$).

Wilms tümöründe 4 yaşından büyük çocuklarda küçüklere nazaran daha kötü

prognoz gösterdikleri belirtilmiştir (68). Özellikle, 48 aydan daha büyük bir yaşta olmanın WT hastalarında bağımsız bir advers prognostik faktör olduğuna dikkat çekilmiştir. Pritchard-Jones ve arkadaşları; 4 yıllık kümülatif olaysız sağkalımın, uygun histolojiye sahip hasta grubunda bile 4 yaşından büyük hastalarda anlamlı olarak daha kötü olduğunu bulmuşlardır (68). Altta yatan potansiyel mekanizma, 4 yaşından büyük hastaların ileri tümör evresi göstermesi ve doğası gereği farklı biyolojik özelliklere ve spesifik moleküler değişikliğe sahip olması olabilir. Hol ve arkadaşları; büyük yaş grubundaki olguların tanıda daha yüksek evreye, yüksek riskli histoloji tiplerine ve büyük hacimli tümörlere sahip olduğunu göstermiştir (145). Çalışmamızda yaş ile miRNA-603 ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon, miRNA-603 anormal ekspresyonunun kötü prognosis ile ilişki olabileceği varsayımını akla getirmektedir.

Tez çalışmamızda diğer klinikopatolojik parametrelerle miRNA-603 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

MiRNA-877 6p21.33'te bulunur ve birçok biyolojik süreçte önemli düzenleyici roller oynar. Önceki çalışmalar miRNA-877'nin birden fazla tümör tipinin gelişiminde aktif olarak yer aldığını göstermiştir (146-154).

Pankreas duktal adenokarsinomlarında potansiyel tanısal ve prognostik biyobelirteç olarak beş miRNA (miRNA-16-2-3p, miRNA-890, miRNA-3201, miRNA-602 ve miRNA-877) tanımlanmıştır. Bunlardan biri olan miRNA-877'nin anlamlı derecede yüksek sağ kalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur (146). Hepatosellüler karsinom hastalarında miRNA-877'nin ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde aşağı regüle edildiğini gösterilmiştir. Ayrıca hepatosellüler karsinom hücre hatlarında miRNA-877'nin, FOXM1'i hedefleyerek paklitaksel tedavisinin duyarlılığını etkileyebileceği saptanmıştır (147). Li ve arkadaşları; miRNA-877-3p'nin mesane kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü, çünkü aşırı ekspresyonunun p16 geninin ekspresyonunu aktive ederek mesane kanseri büyümesini inhibe edebileceği belirtilmiştir (148).

Hepatosellüler karsinom örneklerinde miRNA-877-5p düzeylerinin, komşu normal dokulara göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu saptanmıştır ($p < 0.01$). Düşük miRNA-877 ekspresyonu, hepatosellüler karsinomlu olgularda histolojik derece ve lenf nodu metastazı, evre ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. MiRNA-

877'nin düşük ekspresyon seviyelerini sergileyen hepatosellüler karsinomlu hastaların genel hayatta kalma ve hastalıksız hayatta kalma oranları daha kısa olarak belirtilmiştir. Ayrıca miRNA-877'nin, hepatosellüler karsinom ilerlemesinde bir tümör baskılayıcı olduğu belirtilmekte ve hastaların kötü prognozunu öngörmede bağımsız bir biyobelirteç olarak kabul edilmesi vurgulanmaktadır (149).

Renal hücreli karsinom dokularında, miRNA-877'nin ekspresyon seviyelerinin aşağı regüle edildiği, eEF2K ekspresyon seviyelerinin ise yukarı regüle edildiği saptanmıştır. MiRNA-877'nin doğrudan eEF2K'ye bağlandığı, dolayısıyla transkripsiyonunu inhibe ettiği ve karsinom hücrelerinin çoğalmasını önlediği gösterilmiştir. Ayrıca, miRNA-877'nin eEF2K/eEF2 sinyal kaskadını modüle ederek renal hücreli karsinom hücre proliferasyonunu ve göçünü baskıladığı belirtilmektedir (150).

Mide karsinomlarında da miRNA-877-5p seviyeleri kontrollere göre daha düşük saptanmıştır. Aynı çalışmada miRNA-877-5p/FOXM1 ekseninin mide kanseri ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı gösterilirken, miRNA-877-5p'nin mide kanseri için yeni bir potansiyel terapötik hedef olduğunu öne sürülmektedir (151).

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında miRNA-877-5p'nin azaldığı saptanmış ve bir tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı belirtilmiştir. Çalışma verileri, miRNA-877-5p'nin FOXM1'i hedef alarak tümör oluşumunu ve kanser gelişimini baskıladığını ortaya çıkarmıştır. MiRNA-877-5p/FOXM1, akciğer karsinomu tedavisi için potansiyel bir hedef sağlayabilecek, karsinom gelişimini düzenleyen yeni bir yol olarak tanımlanmaktadır (152).

Benzer çalışmada, miRNA-877 ekspresyonunun akciğer karsinom dokularında ve hücre hatlarında azaldığı saptanmıştır. MiRNA-877 düşük ekspresyonunun; klinik evre, lenf nodu metastazı, diferansiyasyon ve prognoz ile korele olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, miRNA-877'nin aşırı ekspresyonu, ACP5'i aşağı regüle ederek aynı zamanda PI3K/AKT yolunu etkisiz hale getirerek akciğer karsinom hücrelerinin malign biyolojik davranışlarını inhibe etmektedir (153).

Serviks karsinomlarında azalan miRNA-877'nin, yüksek FIGO evresi ve lenf nodu metastazı ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur. MiRNA-877'nin doğrudan MACC1'i hedefleyerek serviks kanser hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu engellediği gösterilmiştir (154)

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak mir-877 ekspresyonunun, WT olgularında kontrol gruba göre düşük ekspresyonu saptanmıştır. Ancak prognostik parametreler ile mir-877 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Verilerimiz ışığında WT patogenezinde miRNA-603 ve miRNA-877'nin tümör supresör miRNA olarak etkili olduğunu düşünmekteyiz. Tez çalışmamız; Wilms tümöründe miRNA 603 ve 877'nin klinikopatolojik kriterlerle karşılaştırıldığı ilk çalışma olması açısından önem arz etmektedir. Çalışmamız daha büyük örneklem büyüklüğüne sahip ileri çalışmalar için ilk bulgu niteliğinde olması açısından dikkat çekicidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Wilms tümör (WT) tanısı almış 24 olguda miRNA-603 ve miRNA-877 ekspresyonunun yaş, evre, anaplazi, metastaz, nüks gibi klinikopatolojik prognostik parametrelerle ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirildi.
- Normal dokuya kıyasla tümör dokusunda miRNA-603 ve miRNA-877 ekspresyonunda azalma (down-regülasyon) saptandı.
- MiRNA-603 ve miRNA-877 ekspresyon değerleri klinikopatolojik parametrelerle istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 4 yaş ve daha büyük olan bireylerde miRNA-603 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p < 0.05$).
- Çalışmamız Wilms tümöründe miRNA 603 ve 877 ekspresyonunun klinikopatolojik kriterlerle karşılaştırıldığı ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır.
- Verilerimiz WT olgularında miRNA-603 ve miRNA-877'nin down-regülasyonunun WT patogenezinde tümör supresör miRNA'lar olarak etkili rol oynayabileceğine ışık tutmaktadır.
- Çalışma verilerimiz, daha büyük örneklem büyüklüğüne sahip ileri çalışmalar için ilk bulgu niteliğindedir. Bu nedenle, Wilms tümörlerinde miRNA-603 ve miRNA-877'nin prognostik değerinin araştırılması için geniş ölçekli ve prospektif klinik araştırmaların gerekli olduğu kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Pastore G, Znaor A, Spreafico F, Graf N, Pritchard-Jones K, Steliarova-Foucher E. Malignant renal tumors incidence and survival in European children (1978–1997): report from the automated childhood cancer information system project. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2103–14.
2. Xie W, Wei L, Guo J, Guo H, Song X, Sheng X. Physiological functions of Wilms' tumor 1-associating protein and its role in tumorigenesis. *J Cell Biochem*. 2019; 120(7): 10884-10892.
3. Oh L, Hafsi H, Hainaut P, Ariffin H. P53, stem cell biology and childhood blastomas. *Curr Opin Oncol*. 2019; 31(2): 84-91
4. Breslow NE, Beckwith JB, Perlman EJ, Reeve AE. Age distributions, birth weights, nephrogenic rests, and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47: 260–7.
5. Pizzo PA, Poplack DG, Adamson PC, Blaney SM, Helman L. Principles and Practice of Pediatric Oncology, 7th ed. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health; 2016.
6. Brok J, Treger TD, Gooskens SL, van den Heuvel-Eibrink MM, Pritchard-Jones K. Biology and treatment of renal tumours in childhood. *Eur J Cancer*. 2016; 68: 179–195.
7. Dome JS, Mullen EA, Dix DB, Gratias EJ, Ehrlich PF, Daw NC, ve arkadaşları. Impact of the first generation of children's oncology group clinical trials on clinical practice for Wilms tumor. *J Natl Compr Canc Netw* 2021; 19: 978–85.
8. Spreafico F, Fernandez CV, Brok J, Nakata K, Vijanic G, Geller J, ve arkadaşları. Wilms tumor. *Nat Rev Dis Primers*. 2021; 7: 75.
9. Grundy PE, Breslow NE, Li S, Perlman E, Beckwith JB, Ritchey ML, ve arkadaşları. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the national Wilms tumor study group. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7312–21.
10. Brok J, Lopez-Yurda M, Tinteren HV, Treger TD, Furtwängler R, Graf N, ve arkadaşları. Relapse of Wilms' tumor and detection methods: a retrospective analysis of the 2001 renal tumor study group-international society of pediatric oncology Wilms' tumor protocol database. *Lancet Oncol*. 2018; 19: 1072–81.
11. Daw NC, Chi YY, Kalapurakal JA, Kim Y, Hoffer FA, Geller JI, ve arkadaşları. Activity of vincristine and irinotecan in diffuse anaplastic Wilms tumor and therapy outcomes of stage II to IV disease: results of the children's oncology group AREN0321 study. *J Clin Oncol* 2020; 38: 1558–68.
12. Ehrlich P, Chi YY, Chintagumpala MM, Hoffer FA, Perlman EJ, Kalapurakal JA, ve arkadaşları. Results of the first prospective multi-institutional treatment study in children with bilateral Wilms tumor (AREN0534): a report from the children's oncology group. *Ann Surg* 2017; 266: 470–8.

13. Charlton J, Irtan S, Bergeron C, Pritchard-Jones K. Bilateral Wilms tumor: a review of clinical and molecular features. *Expert Rev Mol Med*. 2017;19:e8.
14. Verschuur A, Van Tinteren H, Graf N, Bergeron C, Sandstedt B, de Kraker J. Treatment of pulmonary metastases in children with stage IV nephroblastoma with risk-based use of pulmonary radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 3533–9.
15. Warmann SW, Furtwangler R, Blumenstock G, Armeanu S, Nourkami N, Leuschner I, ve arkadaşları. Tumor biology influences the prognosis of nephroblastoma patients with primary pulmonary metastases: results from SIOP 93-01/GPOH and SIOP 2001/GPOH. *Ann Surg*. 2011; 254: 155–62.
16. Wong KF, Reulen RC, Winter DL, Guha J, Fidler MM, Kelly J, ve arkadaşları. Risk of adverse health and social outcomes up to 50 years after Wilms tumor: the British childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol*. 2016; 34: 1772–9.
17. Termuhlen AM, Tersak JM, Liu Q, Yasui Y, Stovall M, Weathers R, ve arkadaşları. Twenty-five year follow-up of childhood Wilms tumor: a report from the childhood cancer survivor study. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 1210–6.
18. Beckwith JB, Palmer NF. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer*. 1978 ;41: 1937–48
19. Green DM, Beckwith JB, Breslow NE, Faria P, Moksness J, Finklestein JZ, ve arkadaşları. Treatment of children with stages II to IV anaplastic Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. *J Clin Oncol*. 1994; 12: 2126–31.
20. PDQ® Pediatric Treatment Editorial Board. PDQ Wilms Tumor and Other Childhood Kidney Tumors Treatment [Internet]. Bethesda, MD: National Cancer Institute Press; 2020
21. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012; 148(6): 1172–1187
22. Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136: 215–233.
23. Mei Q, Li X, Guo M, Fu X, Han W. The miRNA network: Micro-regulator of cell signaling in cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014; 14: 1515–1527.
24. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33: 1290–1297.
25. Giannakakis A, Coukos G, Hatzigeorgiou A, Sandaltzopoulos R, Zhang L. miRNA genetic alterations in human cancers. *Expert Opin Biol Ther*. 2007;7: 1375–1386.
26. Mezzanzanica D, Canevari S, Cecco LD, Bagnoli M. miRNA control of apoptotic programs: Focus on ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011; 11: 277 286.

27. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2013; 9: 287–314.
28. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*. 2015; 5: 1122–1143.
29. Cheerla N, Gevaert O. MicroRNA based pan-cancer diagnosis and treatment recommendation. *BMC Bioinf*. 2017; 18(1): 32.
30. Andersen GB, Tost J. Circulating miRNAs as biomarker in cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2020; 215: 277–298.
31. Cui M, Liu W, Zhang L, Guo F, Liu Y, Chen F, ve arkadaşları. Clinicopathological parameters and prognostic relevance of miR-21 and PTEN expression in Wilms' tumor. *J Pediatr Surg*. 2017; 52(8): 1348–1354.
32. Cui M, Liu W, Zhang L, Guo F, Liu Y, Chen F, ve arkadaşları. Over-expression of miR-21 and lower PTEN levels in Wilms' tumor with aggressive behavior. *Tohoku J Exp Med*. 2017; 242(1): 43–52.
33. Liu Z, He F, OuYang S, Li Y, Ma F, Chang H, ve arkadaşları. MiR-140-5p could suppress tumor proliferation and progression by targeting TGFBR1/SMAD2/3 and IGF-1R/AKT signaling pathways in Wilms' tumor. *BMC Cancer*. 2019; 19(1): 405.
34. Li JL, Luo P. MiR-140-5p and miR-92a-3p suppress the cell proliferation, migration and invasion and promoted apoptosis in Wilms' tumor by targeting FRS2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020; 24(1): 97-108.
35. Schmitt J, Backes C, Nourkani-Tutdibi N, Leidinger P, Deutscher S, Beier M, ve arkadaşları. Treatment-independent miRNA signature in blood of wilms tumor patients. *BMC Genom*. 2012; 13: 379.
36. Ludwig N, Nourkani-Tutdibi N, Backes C, Lenhof HP, Graf N, Keller A, ve arkadaşları. Circulating serum miRNAs as potential biomarkers for nephroblastoma. *Pediatr. Blood Cancer*. 2015; 62(8): 1360–1367.
37. Kakkar D, Mallick S, Ahmad A, Goswami A, Agarwala S, Gupta AK, ve arkadaşları. Differential expression of miRNA in histological subtype of Wilms tumor. *Pediatr Surg Int*. 2022; 38(2): 257–267.
38. Watson JA, Bryan K, Williams R, Popov S, Vujanic G, Coulomb A, ve arkadaşları. MiRNA profiles as a predictor of chemoresponsiveness in Wilms' tumor blastema. *PLoS One*. 2013; 8(1)
39. Liu CL, Wang WH, Sun YL, Zhuang HW, Xu M, Chen HF, et al. MiR-144-3p inhibits the proliferation and metastasis of pediatric Wilms' tumor cells by regulating Girdin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018; 22(22): 7671–7678.
40. Shen J, Shu Q. Silencing of lncRNA MEG8 Represses the Viability, Migration, and Invasion of Wilms' Tumor Cells through Mediating miR-23a-3p/CRK Axis. *Urol Int*. 2022; 106(10): 1075-1087.
41. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, ve arkadaşları. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006; 56: 106–130.

42. Mitry E, Ciccolallo L, Coleman MP, Gatta G, Pritchard-Jones K; EUROCARE Working Group. Incidence of and survival from Wilms' tumour in adults in Europe: data from the EUROCARE study. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 2363–2368.
43. Fukuzawa R, Breslow NE, Morison IM, Dwyer P, Kusafuka T, Kobayashi Y, ve arkadaşları. Epigenetic differences between Wilms' tumors in white and east-Asian children. *Lancet*. 2004; 363:446-51.
44. Szychot E, Apps J, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor: Biology, diagnosis and treatment. *Transl Pediatr*. 2014; 3: 12–24.
45. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumor: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 699-712.
46. Buckley KS. Pediatric genitourinary tumors. *Curr Opin Oncol*. 2011; 23: 297-302
47. Segers H, van den Heuvel-Eibrink MM, Pritchard-Jones K, Coppes MJ, Aitchison M, Bergeron C, ve arkadaşları. Management of adults with Wilms' tumor: recommendations based on international consensus. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11:1105-13
48. Kamien B, Ronan A, Poke G, Sinnerbrink I, Baynam G, Ward M, ve arkadaşları. A Clinical Review of Generalized Overgrowth Syndromes in the Era of Massively Parallel Sequencing. *Mol Syndromol*. 2018; 9: 70-82.
49. Scott RH, Stiller CA, Walker L, Rahman N. Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumor. *J Med Genet*. 2006; 43: 705-15.
50. DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP. Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Widemann syndrome with cancer and birth defect. *Am J Hum Genet*. 2002; 70: 604-611.
51. Scott RH, Walker L, Olsen ØE, Levitt G, Kenney I, Maher E, ve arkadaşları. Surveillance for Wilms tumor in at-risk children: pragmatic recommendations for best practice. *Arch Dis Child* 2006; 91: 995-9.
52. Knudson AG, Jr, and Strong LC. Mutation and Cancer: A Model for Wilms' Tumor of the Kidney. *J Natl Cancer Inst*. 1972;48, 313–324.
53. Pritchard-Jones K, Vujani GM. Recent Developments in the Molecular Pathology of Paediatric Renal Tumors. *The Open Pathology Journal*. 2010; 4: 32-9.
54. Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008; 47: 461-70.
55. Ravenel JD, Broman KW, Perlman EJ, Niemitz EL, Jayawardena TM, Bell DW, ve arkadaşları. Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93: 1698-703.

56. Williams RD, Al-Saadi R, Natrajan R, Mackay A, Chagtai T, Little S, ve arkadaşları. Molecular profiling reveals frequent gain of MYCN and anaplasia-specific loss of 4q and 14q in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50: 982-95.
57. Wegert J, Wittmann S, Leuschner I, Geissinger E, Graf N, Gessler M. WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009; 48: 1102-11.
58. Fukuzawa R, Anaka MR, Heathcott RW, McNoe LA, Morison IM, Perlman EJ, ve arkadaşları. Wilms tumor histology is determined by distinct types of precursor lesions and not epigenetic changes. *J Pathol*. 2008; 215: 377-87.
59. Popov SD, Vujanic GM, Sebire NJ, Chagtai T, Williams R, Vaidya S, ve arkadaşları. Bilateral Wilms tumor with TP53-related anaplasia. *Pediatr Dev Pathol*. 2013; 16: 217-23.
60. Natrajan R, Little SE, Sodha N, Reis-Filho JS, Mackay A, Fenwick K, ve arkadaşları. Analysis by array CGH of genomic changes associated with the progression or relapse of Wilms' tumor. *J Pathol*. 2007; 211: 52-9.
61. Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Mitelman F. Wilms tumors develop through two distinct karyotypic pathways. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004; 150: 9-15.
62. Messahel B, Williams R, Ridolfi A, A'hern R, Warren W, Tinworth L, ve arkadaşları. Allele loss at 16q defines poorer prognosis Wilms tumor irrespective of treatment approach in the UKW1-3 clinical trials: A Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG) study. *Eur J Cancer*. 2009; 45: 819-26.
63. Wittmann S, Zirn B, Alkassar M, Ambros P, Graf N, Gessler M. Loss of 11q and 16q in Wilms tumors is associated with anaplasia, tumor recurrence, and poor prognosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007; 46: 163-70.
64. Hing S, Lu YJ, Summersgill B, King-Underwood L, Nicholson J, Grundy P, ve arkadaşları. Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors. *Am J Pathol*. 2001; 158: 393-8.
65. Bown N, Cotterill SJ, Roberts P, Griffiths M, Larkins S, Hibbert S, ve arkadaşları. Cytogenetic abnormalities and clinical outcome in Wilms tumor: a study by the U.K. cancer cytogenetics group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol*. 2002; 38: 11-21.
66. Perotti D, Spreafico F, Torri F, Gamba B, D'Adamo P, Pizzamiglio S, ve arkadaşları. Genomic profiling by whole-genome single nucleotide polymorphism arrays in Wilms tumor and association with relapse. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012; 51: 644-53.
67. Gratias EJ, Jennings LJ, Anderson JR, Dome JS, Grundy P, Perlman EJ. Gain of 1q is associated with inferior event-free and overall survival in patients with favorable histology Wilms tumor: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. 2013; 119: 3887-94.

68. Pritchard-Jones K, Kelsey A, Vujanic G, Imeson J, Hutton C, Mitchell C; United Kingdom Children's Cancer Study Group; Wilm's Tumor Working Group. Older age is an adverse prognostic factor in stage I, favorable histology Wilms' tumor treated with vincristine monochemotherapy: a study by the United Kingdom Children's Cancer Study Group, Wilm's Tumor Working Group. *J Clin Oncol*. 2003; 21(17): 3269-75.
69. D'Angelo P, Di Cataldo A, Terenziani M, Bisogno G, Collini P, Di Martino M, ve arkadaşları: AIEOP Wilms Tumor Working Group. Factors possibly affecting prognosis in children with Wilms' tumor diagnosed before 24 months of age: A report from the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP) Wilms Tumor Working Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(12).
70. Tang F, Zhang H, Lu Z, Wang J, He C, He Z. Prognostic Factors and Nomograms to Predict Overall and Cancer-Specific Survival for Children with Wilms' Tumor. *Dis Markers*. 2019; 2019: 1092769.
71. Dome JS, Graf N, Geller JI, Fernandez CV, Mullen EA, Spreafico F, ve arkadaşları. Advances in Wilms Tumor Treatment and Biology: Progress Through International Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015; 33(27): 2999-3007.
72. Ehrlich PF, Anderson JR, Ritchey ML, Dome JS, Green DM, Grundy PE, ve arkadaşları. Clinicopathologic findings predictive of relapse in children with stage III favorable-histology Wilms tumor. *J Clin Oncol*. 2013; 31(9): 1196-201.
73. Sonn G, Shortliffe LM. Management of Wilms tumor: current standard of care. *Nat Clin Pract Urol*. 2008; 5(10): 551-60.
74. Breslow N, Sharples K, Beckwith JB, Takashima J, Kelalis PP, Green DM, ve arkadaşları. Prognostic factors in nonmetastatic, favorable histology Wilms' tumor. Results of the Third National Wilms' Tumor Study. *Cancer*. 1991; 68(11): 2345-53.
75. Bonadio JF, Storer B, Norkool P, Farewell VT, Beckwith JB, D'Angio GJ. Anaplastic Wilms' tumor: clinical and pathologic studies. *J Clin Oncol*. 1985; 3(4): 513-20.
76. Green DM, Breslow NE, Beckwith JB, Takashima J, Kelalis P, D'Angio GJ. Treatment outcomes in patients less than 2 years of age with small, stage I, favorable-histology Wilms' tumors: a report from the National Wilms' Tumor Study. *J Clin Oncol*. 1993; 11(1): 91-5.
77. Larsen E, Perez-Atayde A, Green DM, Retik A, Clavell LA, Sallan SE. Surgery only for the treatment of patients with stage I (Cassady) Wilms' tumor. *Cancer*. 1990; 66(2): 264-6.
78. Han Q, Li K, Dong K, Xiao X, Yao W, Liu G. Clinical features, treatment, and outcomes of bilateral Wilms' tumor: A systematic review and meta-analysis. *J Pediatr Surg*. 2018; 53(12): 2465-2469.

79. Beckwith JB, Kiviat NB, Bonadio JF. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr Pathol.* 1990; 10: 1-36.
80. Conrad V, Fernandez JIG, Peter F. Ehrlich, D. Ashley Hill, John A. Kalapurakal. Renal tumors, in *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, D.G.P. Philip A. Pizzo, Editor. Wolters Kluwer: Philadelphia; 2016. 753-771.
81. Metzger ML, Dome JS. Current therapy for Wilms' tumor. *Oncologist.* 2005; 10(10): 815–26.
82. Boccon-Gibod L, Rey A, Sandstedt B, Delemarre J, Harms D, Vujanic G, ve arkadaşları. Complete necrosis induced by preoperative chemotherapy in Wilms' tumor as an indicator of low risk: Report of the international society of paediatric oncology (SIOP) nephroblastoma trial and study 9. *Med Pediatr Oncol.* 2000; 34: 183–90.
83. Mitchell C, Pritchard-Jones K, Shannon R, Hutton C, Stevens S, Machin D, ve arkadaşları. Immediate nephrectomy versus preoperative chemotherapy in the management of non-metastatic Wilms' tumour: Results of a randomised trial (UKW3) by the UK Children's Cancer Study Group. *Eur J Cancer.* 2006; 42: 2554–2562.
84. Vokuhl C, Vogelgesang W, Leuschner I, Furtwängler R, Graf N, Gessler M, ve arkadaşları. 1q gain is a frequent finding in preoperatively treated Wilms tumors, but of limited prognostic value for risk stratification in the SIOP2001/GPOH trial. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014; 53: 960–962.
85. Vujančić GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, de Kraker J. SIOP Nephroblastoma Scientific Committee. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol.* 2002;38(2):79-82.
86. Dome JS, Perlman EJ, Graf N. Risk stratification for wilms tumor: current approach and future directions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2014:215-23. doi: 10.14694/EdBook_AM.2014.34.215.
87. Faria P, Beckwith JB, Mishra K, Zuppan C, Weeks DA, Breslow N, ve arkadaşları. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms tumor—New definitions with prognostic significance: A report from the national Wilms tumor study group. *Am J Surg Pathol.* 1996; 20: 909–920.
88. Phelps HM, Kaviany S, Borinstein SC, Lovvorn HN 3rd. Biological Drivers of Wilms Tumor Prognosis and Treatment. *Children (Basel).* 2018; 5(11): 145.
89. Nelson MV, van den Heuvel-Eibrink MM, Graf N, Dome JS. New approaches to risk stratification for Wilms tumor. *Curr Opin Pediatr.* 2021; 33: 40–48.
90. Grundy P, Perlman E, Rosen NS, Warwick AB, Glade Bender J, Ehrlich P, ve arkadaşları. Current issues in Wilms tumor management. *Curr Probl Cancer.* 2005; 29(5): 221-260.

91. Delemarre JF, Sandstedt B, Harms D, Boccon-Gibod L, Vujanović GM. The new SIOP (Stockholm) working classification of renal tumours of childhood. *International Society of Paediatric Oncology. Med Pediatr Oncol.* 1996; 26(2): 145-146.
92. Vujanović GM, Sandstedt B. The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach. *J Clin Pathol.* 2010; 63(2): 102-109.
93. Kalapurakal JA, Li SM, Breslow NE, Beckwith JB, Ritchey ML, Shamberger RC, ve arkadaşları. Intraoperative spillage of favorable histology wilms tumor cells: influence of irradiation and chemotherapy regimens on abdominal recurrence. A report from the National Wilms Tumor Study Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010; 76(1): 201-6.
94. Green DM, Breslow NE, D'Angio GJ, Malogolowkin MH, Ritchey ML, Evans AE, ve arkadaşları. Outcome of patients with Stage II/favorable histology Wilms tumor with and without local tumor spill: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(1):134-9.
95. Wang J, Zhang KY, Liu SM, Sen S. Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer. *Molecules.* 2014; 19(2): 1912-38.
96. Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science.* 2008; 319: 1785–6.
97. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, ve arkadaşları. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: 3353–3364.
98. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(3): 228-34.
99. Baranwal S, Alahari SK. MiRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer.* 2010; 126(6): 1283-90.
100. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016; 1: 15004.
101. Taheri M, Hussien BM, Abdullah SR, Ghafouri-Fard S, Jamali E, Shojaei S. Dysregulation of non-coding RNAs in Wilms tumor. *Pathol Res Pract.* 2023; 246: 154523.
102. Li T, Zhao P, Li Z, Wang CC, Wang YL, Gu Q. miR-200c-3p Suppresses the Proliferative, Migratory, and Invasive Capacities of Nephroblastoma Cells via Targeting FRS2. *Biopreserv Biobank.* 2019; 17(5): 444-451.
103. Wang HF, Zhang YY, Zhuang HW, Xu M. MicroRNA-613 attenuates the proliferation, migration and invasion of Wilms' tumor via targeting FRS2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017; 21(15): 3360-3369.
104. Zhao GZ, Niu YQ, Li ZM, Kou D, Zhang L. MiR-200c inhibits proliferation and promotes apoptosis of Wilms tumor cells by regulating akt signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020; 24(12): 6623-6631

- 105.Luo X, Dong J, He X, Shen L, Long C, Liu F, ve arkadaşları. MiR-155-5p exerts tumor-suppressing functions in Wilms tumor by targeting IGF2 via the PI3K signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2020; 125: 109880.
- 106.Zhang X, Liu C, Li H, Guo L. Effects of miR-21 on proliferation and apoptosis of WT cells via PTEN/Akt pathway. *Exp Ther Med.* 2020; 19(3): 2155-2160.
- 107.Luo B, Ma L, Xing X, Wang ZR, Teng Q, Li SG. MiR-22-3p regulates the proliferation and invasion of Wilms' tumor cells by targeting AKT3. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020; 24: 5996-6004.
- 108.Jiang X, Li H. MiR-1180-5p regulates apoptosis of Wilms' tumor by targeting p73. *Onco Targets Ther.* 2018; 11: 823-831.
- 109.Orgen Calli A, Issin G, Yilmaz I, Ince D, Tural E, Guzelis I, ve arkadaşları. The association of miR-204 and mir-483 5p expression with clinicopathological features of Wilms tumor: Could this provide foresight? *Jpn J Clin Oncol.* 2023; 29: hyad113
- 110.Zhu S, Zhang L, Zhao Z, Fu W, Fu K, Liu G, Jia W. MicroRNA-92a-3p inhibits the cell proliferation, migration and invasion of Wilms tumor by targeting NOTCH1. *Oncol Rep.* 2018; 40(2): 571-578.
- 111.Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, ve arkadaşları. Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Res.* 2010; 70: 3140–9.
- 112.Che G, Gao H, Tian J, Hu Q, Xie H, Zhang Y. MicroRNA-483-3p Promotes Proliferation, Migration, and Invasion and Induces Chemoresistance of Wilms' Tumor Cells. *Pediatr Dev Pathol.* 2020; 23(2): 144-151.
- 113.Zhang C, Lv GQ, Cui LF, Guo CC, Liu QE. MicroRNA-572 targets CDH1 to promote metastasis of Wilms' tumor. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019; 23(9): 3709-3717.
- 114.Su H, Wang X, Song J, Wang Y, Zhao Y, Meng J. MicroRNA-539 inhibits the progression of Wilms' Tumor through downregulation of JAG1 and Notch1/3. *Cancer Biomark.* 2019; 24(1): 125-133.
- 115.Yong J, He J, Ning F. Long noncoding RNA DLEU2 regulates the progression of Wilm's tumor via miR-539-3p/HOXB2 axis. *J Pediatr Urol.* 2023; 19(1): 25-32.
- 116.Howe K. Extraction of miRNAs from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Tissues. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1509: 17–24.
- 117.Liu A, Xu X. MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol.* 2011;724: 259–267.
- 118.Dijkstra JR, Mekenkamp LJ, Teerenstra S, De Krijger I, Nagtegaal ID. MicroRNA expression in formalin-fixed paraffin embedded tissue using real time quantitative PCR: the strengths and pitfalls. *J Cell Mol Med.* 2012; 16(4): 683-90.

119. Taylor DJ, Nilsson J, Merrill AR, Andersen GR, Nissen P, Frank J. Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *EMBO J.* 2007; 26: 2421–2431.
120. Ho CJ, Gorski SM. Treatment response in triple-negative breast cancer: a role for eEF2 kinase-mediated autophagy? *Ann Transl Med.* 2020;8(9):572.
121. Jiang SL, Mo JL, Peng J, Lei L, Yin JY, Zhou HH, ve arkadaşları. Targeting translation regulators improves cancer therapy. *Genomics.* 2021; 113(1 Pt 2): 1247-1256.
122. Xie CM, Liu XY, Sham KW, Lai JM, Cheng CH. Silencing of EEF2K (eukaryotic elongation factor-2 kinase) reveals AMPK-ULK1-dependent autophagy in colon cancer cells. *Autophagy.* 2014;10(9):1495-508.
123. Zhang B, Zou J, Zhang Q, Wang Z, Wang N, He S, ve arkadaşları. Progress in the Development of Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase (eEF2K) Natural Product and Synthetic Small Molecule Inhibitors for Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(5): 2408.
124. Zhou Y, Li Y, Xu S, Lu J, Zhu Z, Chen S, ve arkadaşları. Eukaryotic elongation factor 2 kinase promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma via PI3K/Akt and STAT3. *Int J Cancer.* 2020;146(5):1383-1395.
125. Bircan HA, Gurbuz N, Pataer A, Caner A, Kahraman N, Bayraktar E, ve arkadaşları. Elongation factor-2 kinase (eEF-2K) expression is associated with poor patient survival and promotes proliferation, invasion and tumor growth of lung cancer. *Lung Cancer.* 2018; 124: 31-39.
126. Wang XM, Xie JL, Proud CG. Eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K) in cancer. *Cancers (Basel)* 2017; 9: 162.
127. Cannell IG, Kong YW, Bushell M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem Soc Trans.* 2008; 36(Pt 6): 1224-31.
128. Bayraktar R, Ivan C, Bayraktar E, Kanlikilicer P, Kabil NN, Kahraman N, ve arkadaşları. Dual Suppressive Effect of miR-34a on the FOXM1/eEF2-Kinase Axis Regulates Triple-Negative Breast Cancer Growth and Invasion. *Clin Cancer Res.* 2018; 24(17): 4225-4241.
129. Ji C, Xu Q, Guo L, Wang X, Ren Y, Zhang H, ve arkadaşları. EEF-2 Kinase-targeted miR-449b confers radiation sensitivity to cancer cells. *Cancer Lett.* 2018; 418: 64-74.
130. Mussnich P, D'Angelo D, Leone V, Croce CM, Fusco A. The High Mobility Group A proteins contribute to thyroid cell transformation by regulating miR-603 and miR-10b expression. *Mol Oncol.* 2013; 7(3): 531-42.
131. Ayaz L, Görür A, Yaroğlu HY, Ozcan C, Tamer L. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(9):1499-506.
132. Kushwaha D, Ramakrishnan V, Ng K, Steed T, Nguyen T, Futralan D, ve arkadaşları. A genome-wide miRNA screen revealed miR-603 as a MGMT-regulating miRNA in glioblastomas. *Oncotarget.* 2014; 5:4026–4039.

133. Guo M, Zhang X, Wang G, Sun J, Jiang Z, Khadarian K, ve arkadaşları. MiR-603 promotes glioma cell growth via Wnt/beta-catenin pathway by inhibiting WIF1 and CTNNBIP1. *Cancer Lett.* 2015; 360: 76–86.
134. Ramakrishnan V, Xu B, Akers J, Nguyen T, Ma J, Dhawan S, ve arkadaşları. Radiation-induced extracellular vesicle (EV) release of miR-603 promotes IGF1-mediated stem cell state in glioblastomas. *EBioMedicine.* 2020; 55: 102736.
135. Shabana AM, Xu B, Schneiderman Z, Ma J, Chen CC, Kokkoli E. Targeted liposomes encapsulating miR-603 complexes enhance radiation sensitivity of patient-derived glioblastoma stem-like cells. *Pharmaceutics.* 2021;13(8).
136. Wang FJ, Ding Y, Mao YY, Jing FY, Zhang ZY, Jiang LF, ve arkadaşları. Associations between hsa-miR-603 polymorphism, lifestyle-related factors and colorectal cancer risk. *Cancer Biomark.* 2014; 14(4): 225-31.
137. Ma C, Zhan C, Yuan H, Cui Y, Zhang Z. MicroRNA-603 functions as an oncogene by suppressing BRCC2 protein translation in osteosarcoma. *Oncol Rep.* 2016; 35(6): 3257–3264.
138. Lin YX, Wu XB, Zheng CW, Zhang QL, Zhang GQ, Chen K, ve arkadaşları. Mechanistic Investigation on the Regulation of FABP1 by the IL-6/miR-603 Signaling in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2021:857965
139. Dong X, Wang Y, Qu Y, Liu J, Feng X, Xu X. MicroRNA-603 Promotes Progression of Cutaneous Melanoma by Regulating TBX5. *Comput Math Methods Med.* 2021:1888501.
140. Bayraktar R, Pichler M, Kanlikilicer P, Ivan C, Bayraktar E, Kahraman N, ve arkadaşları. MicroRNA 603 acts as a tumor suppressor and inhibits triple-negative breast cancer tumorigenesis by targeting elongation factor 2 kinase. *Oncotarget.* 2017; 8: 11641–11658.
141. Wang F, Li J, Li L, Chen Z, Wang N, Zhu M, ve arkadaşları. Circular RNA circ_IRAK3 contributes to tumor growth through upregulating KIF2A via adsorbing miR-603 in breast cancer. *Cancer Cell Int.* 2022; 22(1): 81.
142. Lu J, Wang L, Chen W, Wang Y, Zhen S, Chen H, ve arkadaşları. MiR-603 targeted hexokinase-2 to inhibit the malignancy of ovarian cancer cells. *Arch Biochem Biophys.* 2019; 661: 1-9.
143. Li H, Hou J, Fu Y, Zhao Y, Liu J, Guo D, Lei R, Wu Y, Tang L, Fan S. miR-603 promotes cell proliferation and differentiation by targeting TrkB in acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2023;102(12):3357-3367.
144. Hashemi M, Sanaei S, Mashhadi MA, Hashemi SM, Taheri M, Ghavami S. Association study of hsa-mir-603 rs11014002 polymorphism and risk of breast cancer in a sample of Iranian population. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2015; 61(8): 69-73.
145. Hol JA, Lopez-Yurda MI, Van Tinteren H, Van Grotel M, Godzinski J, Vujanic G, ve arkadaşları. Prognostic significance of age in 5631 patients with Wilms tumor prospectively registered in International Society of

- Paediatric Oncology (SIOP) 93-01 and 2001. PLoS One. 2019; 14(8): e0221373
146. Su Q, Zhu EC, Qu YL, Wang DY, Qu WW, Zhang CG, ve arkadaşları. Serum level of co-expressed hub miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cancer*. 2018; 9: 3991–3999.
147. Huang X, Qin J, and Lu S. Up-regulation of miR-877 induced by paclitaxel inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation through targeting FOXM1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8: 1515–1524.
148. Li S, Zhu Y, Liang Z, Wang X, Meng S, Xu X, ve arkadaşları. Up-regulation of p16 by miR-877-3p inhibits proliferation of bladder cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(32): 51773-51783.
149. Yan TH, Qiu C, Sun J, Li WH. MiR-877-5p suppresses cell growth, migration and invasion by targeting cyclin dependent kinase 14 and predicts prognosis in hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018; 22: 3038–3046.
150. Shi Q, Xu X, Liu Q, Luo F, Shi J, He X. MicroRNA-877 acts as a tumor suppressor by directly targeting eEF2K in renal cell carcinoma. *Oncology Letters*. 2016; 11(2): 1474–1480.
151. Wu K, Yu Z, Tang Z, Wei W, Xie D, Xie Y, ve arkadaşları. MiR-877-5p Suppresses Gastric Cancer Cell Proliferation Through Targeting FOXM1. *Onco Targets Ther*. 2020; 13: 4731-4742.
152. Liu Z, Wang X, Cao L, Yin X, Zhang Q, Wang L. MicroRNA-877-5p Inhibits Cell Progression by Targeting FOXM1 in Lung Cancer. *Can Respir J*. 2022; 2022: 4256172.
153. Bai X, He C, Fu B, Kong X, Bu J, Zhu K, ve arkadaşları. MicroRNA-877 contributes to decreased non-small cell lung cancer cell growth via the PI3K/AKT pathway by targeting tartrate resistant acid phosphatase 5 activity. *Cell Cycle*. 2020; 19(23): 3260-3276.
154. Meng F, Ou J, Liu J, Li X, Meng Y, Yan L, ve arkadaşları. MicroRNA-877 is downregulated in cervical cancer and directly targets MACC1 to inhibit cell proliferation and invasion. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019; 18(5): 3650–3658.

8. EKLER

8.1. Etik kurul raporu

8.2. Özgeçmiş

8.3. Doktora tezi ile ilgili yayınlanmış makale





T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

GİZLİ

Sayı : 31829978-050.01.04-E.1700086631
Konu : Girişimsel Olmayan Etik Kurulu
Kararı

04/12/2017

Sayın Doç. Dr. Aylin ÇALLI

WILMS TÜMÖRÜNDE MİKRO-RNA LAR adlı araştırma başvuru dosyanız kurulumuzda gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir. Çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına kurulumuzun **29.11.2017 tarihli ve 285 sayılı karar numarası** ile toplantıya katılan etik kurul üyelerinin **oy birliği** ile karar verilmiştir. Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır

Doç. Dr. Orhan GÖKALP
Etik Kurul Başkanı

Belge Doğrulamak İçin: <http://ubs.ikc.edu.tr/ERMS/Record/ConfirmationPage/Index> adresinden H4FF7PU kodu girerek belgeyi doğrulayabilirsiniz.

Adres : İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Çiğli Ana
Yerleşkesi 35620 Çiğli/İzmir - TÜRKİYE

Bilgi İçin İrtibat : Bülent Maral - Memur

Telefon : (0 232) 3293535 (Santral)

Belgegeçer No : (0 232) 3860888

İnternet Adresi : www.ikc.edu.tr

e-posta : bulent.maral@ikc.edu.tr



[WoS JOURNAL INFO](#)

» [JAPANESE JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY](#)

ABBREVIATION:	JPN J CLIN ONCOL
ISSN:	0368-2811
EISSN:	1465-3621
CATEGORY / QUARTILE:	ONCOLOGY - SCIE(Q3)
WoS CORE CITATION INDEXES:	SCIE - Science Citation Index Expanded
IMPACT FACTOR (IF):	2.4
JOURNAL CITATION INDICATOR (JCI):	0.49
CITATIONS:	6,138
OPEN ACCESS SUPPORT:	Hybrid and Open Access Support
COUNTRY:	JAPAN
STATUS IN WoS CORE:	Active
PUBLISHER:	Oxford University Press

[Check with Clarivate MJL »](#)

[Check with SCIMAGO »](#)

[Check with SCOPUS »](#)

[Check with ISSN »](#)

** In order to submit a manuscript to this journal, please read the guidelines for authors in the [journal's homepage](#).*

*** For a more in-depth analysis of the journal, you should subscribe and check it out on [Journal Citation Reports \(JCR\)](#).*

Original Article

The association of miR-204 and mir-483 5p expression with clinicopathological features of Wilms tumor: Could this provide foresight?

Aylin Orgen Calli^{1,*}, Gizem Issin², Ismail Yilmaz³, Dilek Ince⁴, Ersin Tural⁵, Ismail Guzelis¹, Refik Emre Cecen⁴, Hatice Nur Olgun⁴, Deniz Gokcay⁶ and Erdener Ozer⁶

¹Department of Pathology, Ataturk Training and Research Hospital, Izmir Katip Celebi University, Izmir, Turkiye,

²Department of Pathology, Mengucek Gazi Training and Research Hospital, Erzincan Binali Yildirim University, Erzincan, Turkiye, ³Department of Pathology, Istanbul Sultan Abdulhamid Han Training and Research Hospital, Medical Sciences University, Istanbul, Turkiye, ⁴Department of Pediatric Oncology, Institute of Oncology, Izmir Dokuz Eylul University, Izmir, Turkiye, ⁵Department of Pediatrics, Istanbul Sultan Abdulhamid Han Training and Research Hospital, Medical Sciences University, Istanbul, Turkiye and ⁶Department of Pathology, Izmir Dokuz Eylul University, Izmir, Turkiye

*For reprints and all correspondence: Aylin Orgen Calli, Department of Pathology, Ataturk Training and Research Hospital, Izmir Katip Celebi University, Gazeteci Hasan Tahsin Street, Basinsitesi, Izmir 35360, Turkiye. E-mail: calliaylin@gmail.com

Received 3 March 2023; Editorial Decision 6 August 2023; Accepted 8 August 2023

Abstract

Background: Wilms tumor is the most common cancer of the kidney that occurs during childhood, and histologically, it mimics renal embryogenesis. With the development and improvement of up-to-date treatment protocols, the survival rates of Wilms tumor have increased. However, metastases or local relapses are still observed in 15% of patients. The search for reliable biomarkers to identify at-risk patients is ongoing to predict the variability in treatment success. Currently, the evaluation of clinical, histopathological and genetic features are common diagnostic methods; however, epigenetic features can be examined with microRNA expression analyses and might allow us to comment on the behavior of the tumor and treatment response.

Methods: In this study, we aimed to evaluate the relationship between microRNA-204 and microRNA-483-5p expression with clinicopathological data and the effect on Wilms tumor survival. For this purpose, the expression levels of RNU6B, microRNA-204 and microRNA-483-5p were evaluated in tumor and normal tissue by qreal time-polymerase chain reaction. We also investigated the relationship between microRNA expression levels with the clinicopathological and histological features of Wilms tumor.

Results and conclusion: The results of our study indicate that the relative expression levels of microRNA-204 in Wilms tumor tissues were significantly lower than that in adjacent normal tissues. By contrast, tumor tissue had a higher microRNA-483-5p expression than the corresponding normal tissues. A statistically significant difference between microRNA-204 expression level with age and the presence of anaplasia was observed. The upregulation of microRNA-483-5p was found to have a significant correlation with patients after preoperative chemotherapy and complete tumor necrosis. Taken together, our data suggest that microRNA-204 could play a critical role as a tumor suppressor, whereas microRNA-483-5p acts as an oncogene in Wilms tumor progression. More importantly,

microRNA-204 might be a novel predictive biomarker for anaplastic histology and could be useful for developing therapeutic interventions targeting this marker.

Key words: Wilms tumor, micro-RNA, miR-204, miR-483-5p

Introduction

Wilms tumors (WTs) account for 5% of childhood malignant tumors, and they are the most common neoplasm of renal origin in children. WTs account for 90% of kidney tumors observed in childhood. It is an embryological tumor that histologically mimics renal embryogenesis and consists of various combinations of stromal, blastema and epithelial elements. WTs are diagnosed before the age of 6 in 90% of patients; the typical age of diagnosis is 3–4 years (1). The development of evidence-based treatment protocols by multidisciplinary collaborative groups in the last 40 years has significantly increased the long-term survival rates in WTs. However, 15% of WT patients have metastasis or recurrence. This suggests that poor prognostic factors are effective after the first treatment regimen (2,3).

Anaplasia has been shown to be a marker for poor prognosis in WT. Anaplasia refers to cellular resistance to treatment as opposed to the cells becoming metastatic or aggressive. Survival is lower in patients with anaplastic WTs; therefore, treatment should be intensified (4–7). Similar to other childhood cancers, a quarter of survivors experience chronic severe health problems even years after diagnosis due to chemotherapy and radiotherapy as protocols of WT treatment. These include long-term heart disease, lung disease, kidney failure, infertility, secondary cancers and deaths due to treatment-related toxicity (8,9).

It is important to consider that the primary goal in the treatment of WT is to achieve the highest cure rates by treating patients according to well-defined risk groups, reducing the frequency of acute and late toxicity and minimizing the cost of treatment. It is important to establish a prognostic model using multiple variables that underlie a wide range of genetic and clinical pathological factors in children with different WT stages and to identify prognostic factors that can provide valuable guidance in formulating an accurate therapeutic regimen for each patient.

MicroRNAs (miRNAs/miRs) are a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression by inducing mRNA degradation or silencing by post-transcriptionally binding to the non-translated 3' region of target mRNAs (10). The identification of miRNAs and their target molecules has paved the way for research into the causes of cancer. Numerous studies on the effect of miRNAs in cancer emphasize their important role as biomarkers in cancer diagnosis and prognosis. miRNA dysregulation, which has important roles in cancer development and progression, is observed in most human malignancies, including WTs. miRNA dysregulation contributes to cancer development and progression, including uncontrolled continuous cell division, prevention of cell death, metastasis and development of new blood vessels (11–13). Recent evidence suggests that miRNAs have an important role in the formation of WTs (14–16). Furthermore, miRNA expression has been shown to be associated with the tumor type and subtype (17).

The potential role of miRNAs, including the miR-17~92 cluster, miR-185, miR-204 and miR-483, has been demonstrated in WTs (15,18). Watson et al. suggest a significant role for miRNAs in the molecular response to chemotherapy and showed that upregulation of miR-483-5p might be predictive of chemoresistance in WTs (19).

Recent studies indicated the downregulation of miR-204 in nephroblastoma (20,21).

The identification of miRNA biogenesis may shed light on more accurate classification of prognostic groups and potential targeted molecular treatment strategies for WTs. To explore this important issue, we aimed to identify the relationships between miRNA 204 and miRNA-483-5p expression with pathogenesis and prognosis in WTs.

Patients and methods

Case selection

The current study was conducted after approval from the Ethics Committee of the Izmir Katip Celebi University School of Medicine, Izmir, Turkey, according to the most recent version of Declaration of Helsinki (2017-GOKAE-285). The retrospective study was performed with pathologically proven 24 cases of WT from the departmental archives of Dokuz Eylul University between January 2005 and February 2020. The clinico-pathological parameters and survival data were collected based on our institutional electronic medical records, pathology reports as well as the treating clinicians. The exclusion criteria for this study were as follows: cases with predisposing syndromes associated with an increased risk of WT (22), such as WT-aniridia-genital anomalies-retardation syndrome, Denys-Drash syndrome, Beckwith-Wiedemann syndrome, having a family history of WT, other known and treated cancer history and unavailable clinical data. Only cases with an adequate, representative, formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor block for the miRNA analysis were included in this study. The tumor-containing slides of each case were reviewed independently by two experienced pathologists to confirm the diagnosis and to determine the prevalence of anaplasia (focal or diffuse) according to the criteria specified in the CAP WT protocol. The tumors histological classified into three groups as follows: low-risk, intermediate-risk and high-risk WTs.

RNA extraction from tissue samples and quantitative real-time polymerase chain reaction of miRNAs

A detailed review of the literature determined which miRNAs might have prognostic potential in WT. To better understand the promising key role of the miRNAs, two miRNAs (miRNA 204 and miRNA 483-5p) were chosen for our study. Then, FFPE tissue sections of 5 µm from each representative block were placed into 1.5 ml microcentrifuge tubes. After deparaffinization and rehydration, total RNA was extracted from the tumor and adjacent non-tumoral tissue specimen FFPE blocks using The RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit Total Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher, Catalog number; AM1975) according to the manufacturer's recommended protocol. The final RNA concentration was quantified with a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Briefly, 10 ng of total RNA were reverse transcribed for RNU6b, miRNA 204 and miRNA 483-5p using the Applied Biosystems® TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit according to the manufacturer's protocol.

The real-time polymerase chain reaction (PCR) was conducted on ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) using TaqMan MicroRNA Assays and TaqMan Universal PCR Master Mix with a sample volume of 20 μ l (7.67 μ l nuclease-free water), 10 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix as recommended by the manufacturer. All samples were tested in triplicate, and no template controls were tested alongside the actual samples in each experiment.

The RQ study output was analyzed using Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Software version 2.0, and the cycle threshold (Ct) values were used to analyze the expression levels of targeted miRNAs. The expression levels of a miRNA relative to RNU6B (endogenous control) were calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method. Normalized expression values (Δ Ct) were then averaged within panels and differences between each WT tumor sample tissue sample and adjacent non-neoplastic normal tissue determined via the conventional $\Delta\Delta$ Ct method, where $\Delta\Delta$ Ct = (Δ Ct tumor – Δ Ct normal), and the fold-change was calculated as $2^{-\Delta\Delta$ Ct.

Statistical analysis

Data obtained in this study were analyzed using SPSS version 15.0 software. Fold changes for miRNAs were expressed graphically and numerically. Descriptive statistics were expressed as the mean and standard deviation. Comparisons between parameters were performed for Log₂-transformed miRNA expression levels using Student's *t* test. The confidence level for statistical significance was defined as 95% (*P* < 0.05).

Results

This study recruited paraffin blocks of 24 cases of patients with WT. The mean age was 52.4 months (range = 7–132 months), with 8 patients being under 4 years and 16 patients being 4 years and older. The mean tumor size was 8.8 cm and the mean tumor weight was 490 g (range = 3–14.5 cm and 117–1298 g, respectively). Four (16.6%) cases were predominantly blastemal histological type, two (8.5%) were stromal, seven (29%) were mixed, six (25%) were regressive, three (12.5%) were predominantly epithelial and two (8.5%) were cystic partially differentiated. The present study included 11 patients with Stage I disease, 2 patients with Stage II disease, 6 patients with Stage III disease and 5 patients with Stage IV disease.

Anaplasia (focal and diffuse) was identified in six patients (12%) based on the distribution of anaplastic changes (enlarged, atypical mitotic figures and marked enlargement of the nuclei) within the tumor. The clinicopathological characteristics of the WT patients are summarized in Table 1.

To investigate the potential dysregulation of miR-204 and miR-483-5p in WT tissues, the miRNA expression levels were detected by real-time PCR. The data presented in Fig. 1 show that the relative expression levels of miR-204 in WT tissues were significantly lower compared with their paired, adjacent non-tumor tissues (Fig. 1). On the contrary, expression of miR-483-5p was significantly increased in tumor tissue compared with normal tissue (Fig. 2). Our results reveal that the downregulation miR-204 in WT tissues was associated with the patient's age and anaplastic histology. The downregulation of miR-204 was significant in cases older than 4 years. miR-204 downregulation was remarkably restricted in cases with anaplasia. The upregulation of miR-483-5p was not associated with clinicopathological factors (Table 2).

Discussion

WT is a genetically heterogeneous disease, with molecular, therapeutic and prognostic differences. It is difficult to predict the biological behavior of WTs due to tumor heterogeneity. Despite significant progress in the treatment of WTs, it is necessary to identify new biomarkers to determine new and individual therapeutic approaches with increased selectivity, efficiency and reduced toxicity. For several years, dysregulated miRNAs were cited in the pathogenesis mechanism and prognosis of various cancers (11–14). Consistent with these investigations, during the last decades, many studies have investigated miRNA function in WTs (15–21). With the accumulation of evidence for the deregulation of miRNAs being linked to the development and progression of WTs, potential promising biomarkers with clinical utility have emerged. miR-204 and miR-483-5p are both miRNAs that play important roles in various biological processes. They have been studied in the context of different diseases, but few studies have examined the role of miR-204 and miR-483-5p in WT (16,19–24,31,32). miR-204 and miR-483-5p expression profiling is currently at the center of this research interest.

miR-204 is associated with a number of biological pathways that act as a tumor suppressor by enhancing apoptosis, conferring chemotherapy resistance on cancer cells and inhibiting cancer stem cell self-renewal and the epithelial to mesenchymal transition (23). miR-204 inhibits the growth of tumors, while its decreased expression encourages the development and spread of tumors (24). Downregulation of miR-204 has been reported in various types of cancers, including kidney, ovarian, hematological and colon cancers (23–26).

miR-204 has been found to be downregulated in tumor tissues compared with normal kidney tissues. Recent studies have shown that restoring miR-204 expression can inhibit cell proliferation and induce apoptosis in WT cells, suggesting a tumor-suppressive role for miR-204 in WT (19,21). Koller et al. reported that the expression levels of miR-204 were significantly lower in WTs than in the corresponding normal tissue (21). Similar findings in Hohenstein et al.'s (22) study showed the downregulation of miR-204 in WTs. Similarly, Ludwig et al. (16) showed the inverse correlation of miR-204 and the oncogenic transcription factor Meis homeobox 1, which is consistent with the results of Koller et al. In our study group, miR-204 expression levels are significantly decreased in tumor tissue compared with paired adjacent normal tissues.

Anaplastic WTs make up 5–8% of all WTs and is more commonly seen in advanced staged patients when compared with WTs without anaplasia. The criteria for diagnosing anaplasia include the presence of large atypical mitotic figures and markedly enlarged hyperchromatic nuclei. These tumors are typically aneuploid. Anaplasia may present as either focal or diffuse. Focal anaplasia is defined as a discrete, sharply demarcated area of anaplasia. Diffuse anaplasia is considered an unfavorable prognostic feature for patients who have undergone primary nephrectomy. Anaplasia is an adverse prognostic feature, particularly in advanced staged patients, and given that anaplasia is regarded as a chemoresistant cell clone, its detection is essential for both prognosis and treatment (1,8). WT without anaplasia is typically considered a favorable histology. In patients with WT, the evidence of anaplasia presents strong independent prognostic factors. Anaplastic histology is considered as the most aggressive and high-risk subtype of WT. Anaplastic WT is associated with a higher risk of recurrence and poorer prognosis compared with other histological subtypes (1,4–8). Our findings revealed that miR-204 expression levels significantly correlated with evidence of anaplasia in WT tissue (*P* < 0.05). To the best of our knowledge,

Table 1. Baseline clinicopathological characteristic features of cases

Case ID	Gender	Age (years)	Preoperative KT	Tumor, size and weight (cm-g)	Stage	Histological type	Anaplasia	Lung Metastasis	Recurrence	Overall survival (months)	mir-204-fold change	mir-483-5p fold change
Case-1 ^a	F	11	Yes	10 cm-600 g	IV	Blastomal	WT-diffuse anaplasia	Yes	No	16	0.298	1032
Case-2	F	2	Yes	8 cm-284 g	I	Epithelial	NO	No	No	Unknown	0.151	0.323
Case-3	F	6	Yes	3 cm-122 g	II	Mixed	WT-diffuse anaplasia	No	No	121	0.003	3647
Case-4	M	2	Yes	6.5 cm-260 g	I	Regressive	WT-diffuse anaplasia	No	No	114	0.356	40853
Case-5	F	2	Yes	11 cm-810 g	IV	Stromal	WT-focal anaplasia	No	No	122	68897	0.612
Case-6	F	3	Yes	14 cm-608 g	III	Mixed	No	No	No	120	0.020	14496
Case-7	M	12	Yes	7 cm-400 g	I	Regressive	No	No	No	174	0.019	1918
Case-8	F	8	Yes	8 cm-400 g	I	Regressive	No	Yes	No	186	0.001	3059
Case-9	M	3	Yes	14.5 cm-1250 g	IV	Stromal	No	Yes	No	196	0.013	43468
Case-10 ^a	F	5	Yes	6 cm-117 g	I	Blastomal	No	Yes	Yes	36	0.013	60455
Case-11	M	4	Yes	13 cm-805 g	III	CPDN	No	No	No	84	0.067	16953
Case-12	F	7	Yes	Unknown	I	Mixed	WT-diffuse anaplasia	No	No	62	0.025	38067
Case-13	M	16	Yes	9 cm-646 g	III	Mixed	No	No	No	70	0.030	184365
Case-14	M	1	Yes	10.3 cm-337 g	I	Mixed	No	No	Yes	11	0.203	3444
Case-15	M	9	Yes	14 cm-1298 g	I	Regressive	No	No	No	89	0.001	71933
Case-16	M	4	Yes	5.5 cm-168 g	I	Regressive	No	No	No	82	0.054	56801
Case-17 ^a	F	6	Yes	5.5 cm-200 g	II	Regressive	No	Yes	No	59	0.024	1376
Case-18	F	4	No	6 cm-167 g	III	Mixed	No	No	No	120	0.042	15715
Case-19	F	3	No	Unknown	III	Mixed	WT-diffuse anaplasia	No	No	108	7469	1118
Case-20	F	4	No	7.5 cm-410 g	I	Blastomal	No	No	No	143	0.006	Unknown
Case-21	M	2	No	Unknown	I	CPDN	No	No	No	82	0.443	0.367
Case-22	M	6	No	4 cm-119 g	I	Epithelial	No	No	No	43	0.545	1418
Case-23	M	17	No	Unknown	IV	Blastomal	No	Yes	Yes	180	0.122	0.087
Case-24	M	30	Unknown	13.5 cm-800 g	IV	Epithelial	No	No	Unknown	Unknown	0.008	0.222

F, female; M, male; CPDN, cystic partially differentiated nephroblastoma.

^aExitus.

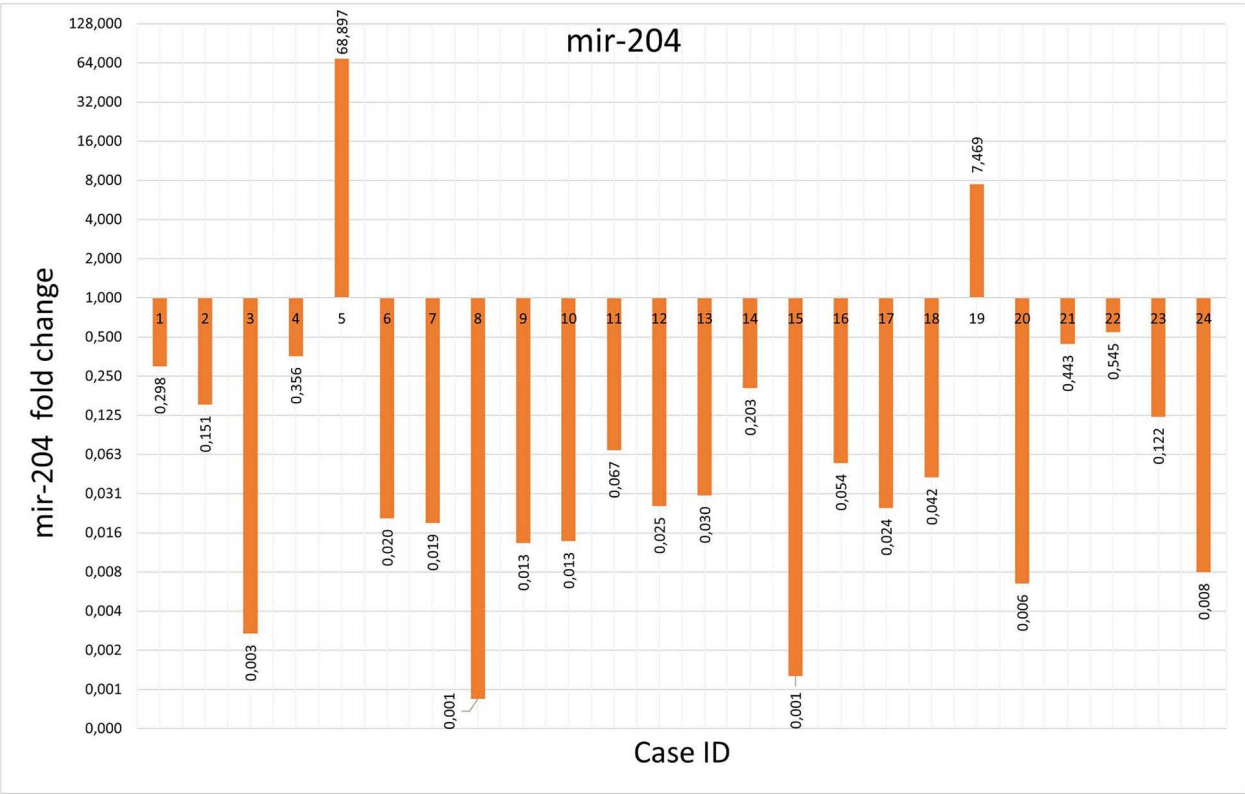


Figure 1. WT cases mir-204 fold changes.

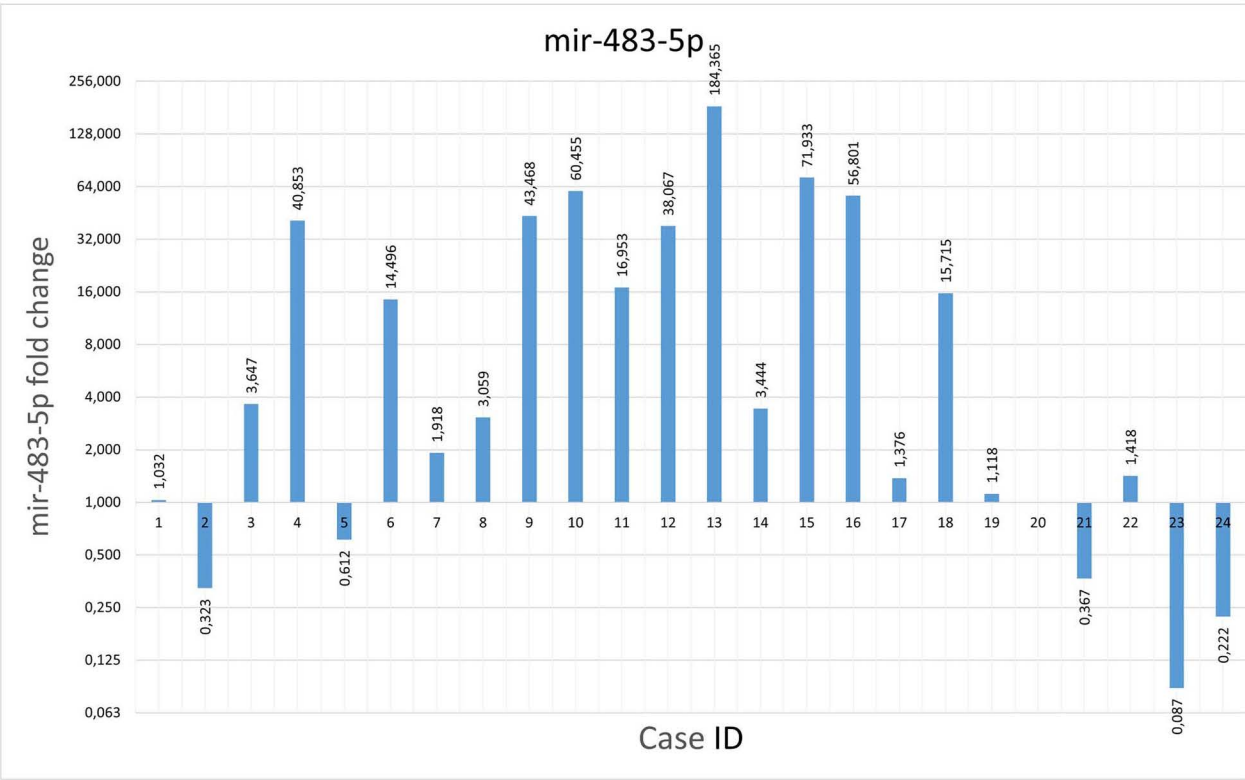


Figure 2. WT cases mir-483-5p fold changes.

Table 2. Summary of Student's *t* test result between clinicopathological features and log2 transformed mir-204 and miR-483-5p expression level

Clinicopathological parameters	mir-204 log2				mir-483 log2			
	N	Mean	Std. Deviation	P	N	Mean	Std. deviation	P
Gender								
Female	13	−40.445	445.901	0.893	12	20.745	248.233	0.814
Male	11	−42.564	278.449		11	24.002	383.550	
Age								
1.00 (<4 years old)	8	−13.226	412.257	0.005	8	16.016	295.391	0.495
2.00 (≥4 years old)	16	−55.511	260.855		15	25.655	326.862	
Laterality								
Right	7	−38.434	419.168	0.841	7	36.807	328.592	0.106
Left	16	−41.986	373.201		15	13.521	286.984	
Tumor diameter								
1.00 (<7 cm)	7	−44.733	266.229	0.886	7	34.149	244.091	0.413
2.00 (≥7 cm)	13	−47.276	415.962		12	22.463	316.023	
Radiotherapy								
Absent	14	−39.596	326.112	0.858	13	18.540	293.713	0.605
Present	9	−42.589	468.148		9	25.929	364.532	
Tumor weight								
1.00 (<600 g)	12	−49.687	286.323	0.632	11	24.193	249.634	0.663
2.00 (≥600 g)	8	−41.435	473.592		8	30.309	353.743	
Stage								
1 (I and II)	13	−47.332	294.142	0.408	12	22.034	273.532	0.967
2 (III and IV)	11	−34.424	450.159		11	22.595	364.940	
Anaplasia								
Absent	18	−50.709	257.225	0.030	17	23.135	334.194	0.836
Present	6	−13.537	532.421		6	19.945	269.641	
Lung metastasis								
Absent	18	−36.968	389.916	0.320	17	24.320	305.636	0.614
Present	6	−54.758	295.616		6	16.587	356.054	
Recurrence								
Absent	20	−40.422	396.747	0.936	19	25.942	285.469	0.539
Present	3	−38.487	207.953		3	13.917	473.471	

this is the first study in which the miR-204 expression correlated with anaplastic histology in WTs. Consequently, miR-204 could be a predictive marker to assess the presence of anaplasia, thereby identifying patients at risk for adverse outcomes, who might be eligible for neoadjuvant chemotherapy. To fully understand the molecular mechanisms and clinical implications of miRNA-204 in WT, especially in anaplastic histology, further research is necessary.

We also observed a relation between the patient's age and mir-204 expression level. There is a large amount of evidence showing that being more than 4 years old is an adverse prognostic factor (27–29). Studies have advocated that being at an age older than 48 months was an independent adverse prognostic factor in WT patients. Pritchard-Jones et al. found that the cumulative 4-year event-free survival was significantly worse for patients older than 4 years, even in the group of patients with favorable histology (27). The underlying potential mechanism could be that patients older than 4 years present advanced tumor stage and have intrinsically different biological characteristics and specific molecular alteration. Hol et al. demonstrated that older patients more frequently have a higher stage at diagnosis, high-risk histology types and large volume tumors (30). Our findings show that mir-204 expression is lower in the group of patients aged 4 years and older. In light of these findings, the decrease in the mir-204 level can be interpreted as a

poor prognosis marker. Therefore, mir-204 is promising in terms of being a prognostic biomarker.

Insulin-like growth factor 2 (IGF2)-derived miR-483 transcribes a miRNA duplex consisting of two strands (5p and 3p). More often, only one of the two strands becomes functional, whereas one strand is degraded during miRNA biogenesis, also called miRNA strand selection. Moreover, depending on cellular pathways in different tumor types, both miR-5p and miR-3p could be expressed in the same tumor type. Up to now, accumulated evidence indicates that the expression of miR-483-5p is dysregulated in various cancers and has several distinct roles in different cancers. Veronese et al. showed that miR-483-3p is overexpressed in WT samples compared with non-tumoral kidney tissues. They also suggest that miR-483-3p can co-operate with IGF2 or act as an autonomous oncogene (31). A recent study revealed that miR-483-5p is upregulated dramatically in high-risk WTs compared with normal adult and fetal kidneys. It was also observed that the upregulation of miR-483-5p was frequently affected in tandem with IGF2 in WTs (20). By contrast, Liu et al. reported that miR-483-5p was downregulated in WT tissues compared with normal adjacent tissues by targeting MAP kinase-interacting serine/threonine protein kinase 1. Correlation analyses showed that the downregulation of miR-483-5p positively correlated with unfavorable histology subtypes, lymphatic metastasis and late clinical stage (Stages III and

IV) (32). We observed that miR-483-5p expression was significantly higher in the tumor samples of all patients with WT compared with their normal counterpart. However, we did not find any relationship between the mir-483 expression and histopathological features, prognosis or survival. This result may be due to the relatively small number of Stage III/IV cases in our study group.

Consequently, we recognize that the sample size of this study is small and the number of statistical comparisons is large. Altogether, we speculated that the present small exploratory study provides preliminary evidence that miR-204 might play a critical role as a tumor suppressor, while miR-483-5p is upregulated and acts as an oncogene in WT progression. We suggest that miR-204 can be utilized in the prediction of anaplastic histology in WT. Future studies will need to address the underlying cellular mechanisms, particularly to determine the relationship between miR-204 expression and anaplasia. These findings are further supported by large-scale miR-204 and miR-483-5p analyses for explaining the real genetic landscape of tumor heterogeneity of WTs. This could allow for new potential specific and alternative therapies that can be more efficient and less toxic.

Consequently, miR-204 could be a predictive marker to assess the presence of anaplasia, thereby identifying patients at risk for adverse outcomes, who might be eligible for neoadjuvant chemotherapy. We speculated that our study results might be useful for future, better-designed studies with a greater number of samples aimed at understanding how miR-204 is associated with anaplasia. We believe that miR-204 is a promising candidate biomarker that may indicate poor prognosis in WTs.

We think that understanding the role of miRNAs like mir-204 and mir-483-5p in WTs can provide insights into the molecular mechanisms underlying the development and progression of this disease.

Acknowledgement

All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

This research received no external funding.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mv N, van den Heuvel-Eibrink MM, Graf N, Dome JS. New approaches to risk stratification for Wilms tumor. *Curr Opin Pediatr* 2021;33:40–8.
2. Brok J, Lopez-Yurda M, Tinteren HV, et al. Relapse of Wilms' tumour and detection methods: a retrospective analysis of the 2001 Renal Tumour Study Group-International Society of Paediatric Oncology Wilms' tumour protocol database. *Lancet Oncol* 2018;19:1072–81.
3. Pater L, Melchior P, Rübe C, et al. Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer* 2020;68:e28257.
4. van den Heuvel-Eibrink MM, Hol JA, Pritchard-Jones K, et al. Position paper: rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol. *Nat Rev Urol* 2017;14:743–52.
5. Zhang LJ, Liu W, Gao YM, Qin YJ, Wu RD. The expression of IL-6 and STAT3 might predict progression and unfavorable prognosis in Wilms' tumor. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;435:408–13.
6. Geller JL. Current standards of care and future directions for 'high-risk' pediatric renal tumors: anaplastic Wilms tumor and Rhabdoid tumor. *Urol Oncol* 2016;34:50–6.
7. Daw NC, Chi YY, Kim Y, et al. Treatment of stage I anaplastic Wilms' tumor: a report from the Children's Oncology Group AREN0321 study. *Eur J Cancer* 2019;118:58–66.
8. Kalapurakal JA, Dome JS, Perlman EJ, et al. Management of Wilms' tumor: current practice and future goals. *Lancet Oncol* 2004;5:37–46.
9. Peterson S, Norkool PA, Takashima J, Grigoriev Y, et al. Early and late mortality after diagnosis of Wilms tumor. *J Clin Oncol* 2009;27:1304–9.
10. Termuhlen AM, Tersak JM, Liu Q, et al. Twenty-five year follow-up of childhood Wilms tumor: a report from the childhood cancer survivor study. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:1210–6.
11. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
12. Cortez MA, Ivan C, Zhou P, Wu X, Ivan M, Calin GA. MicroRNAs in cancer: from bench to bedside. *Adv Cancer Res* 2010;108:113–57.
13. Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1273–81.
14. Garofalo M, Croce CM. microRNAs: master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011;51:25–43.
15. Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumor. *Nat Commun* 2014;5:4039.
16. Ludwig N, Werner TV, Backes C, et al. Combining miRNA and mRNA expression profiles in Wilms tumor subtypes. *Int J Mol Sci* 2016;17:475.
17. Zhang L, Gao X, Zhou X, et al. Identification of key genes and microRNAs involved in kidney Wilms tumor by integrated bioinformatics analysis. *Exp Ther Med* 2019;18:2554–64.
18. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834–8.
19. Yu X, Li Z, Chan MT, Wu WK. The roles of microRNAs in Wilms' tumors. *Tumor Biol* 2016;37:1445–50.
20. Watson JA, Bryan K, Williams R, et al. miRNA profiles as a predictor of chemoresponsiveness in Wilms' tumor blastema. *PloS One* 2013;8:e53417.
21. Koller K, Pichler M, Koch K, et al. Nephroblastomas show low expression of microR-204 and high expression of its target, the oncogenic transcription factor MEIS1. *Pediatr Dev Pathol* 2014;17:169–75.
22. Hohenstein P, Pritchard-Jones K, Charlton J. The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors. *Genes Dev* 2015;29:467–82.
23. Li T, Pan H, Li R. The dual regulatory role of miR-204 in cancer. *Tumour Biol* 2016;37:11667–77.
24. Yang F, Bian Z, Xu P, Sun S, Huang Z. MicroRNA-204-5p: a pivotal tumor suppressor. *Cancer Med* 2023;12:3185–200.
25. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:857–66.
26. Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, et al. VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. *Cancer Cell* 2012;21:532–46.
27. Pritchard-Jones K, Kelsey A, Vujanec G, et al. Older age is an adverse prognostic factor in stage I, favorable histology Wilms' tumor treated with vincristine monochemotherapy: a study by the United Kingdom Children's Cancer Study Group, Wilm's tumor working group. *J Clin Oncol* 2003;21:3269–75.
28. Reinhard H, Schmidt A, Furtwangler R, et al. Outcome of relapses of nephroblastoma in patients registered in the SIOP/GPOH trials and studies. *Oncol Rep* 2008;20:463–7.
29. Irtan S, Jitlal M, Bate J, et al. Risk factors for local recurrence in Wilms tumor and the potential influence of biopsy – the United Kingdom experience. *Eur J Cancer* 2015;51:225–32.
30. Hol J, Lopez-Yurda M, Van Tinteren HJ, et al. Prognostic significance of age in 5631 patients with Wilms tumor prospectively registered in International Society of Paediatric Oncology (SIOP) 93-01 and 2001. *PloS One* 2019;14:e0221373.
31. Veronese A, Lupini L, Consiglio J, et al. Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Res* 2010;70:3140–9.
32. Liu K, He B, Xu J, et al. miR-483-5p targets MKNK1 to suppress Wilms' tumor cell proliferation and apoptosis in vitro and in vivo. *Med Sci Monit* 2019;25:1459–68.

[WoS JOURNAL INFO](#)

» **[VIRCHOWS ARCHIV](#)**

ABBREVIATION:	VIRCHOWS ARCH
ISSN:	0945-6317
EISSN:	1432-2307
CATEGORY / QUARTILE:	PATHOLOGY - SCIE(Q2)
WoS CORE CITATION INDEXES:	SCIE - Science Citation Index Expanded
IMPACT FACTOR (IF):	3.5
JOURNAL CITATION INDICATOR (JCI):	1.16
CITATIONS:	8,781
OPEN ACCESS SUPPORT:	Hybrid and Open Access Support
COUNTRY:	GERMANY
STATUS IN WoS CORE:	Active
PUBLISHER:	Springer-Verlag

Check with Clarivate MJL »

Check with SCIMAGO »

Check with SCOPUS »

Check with ISSN »

** In order to submit a manuscript to this journal, please read the guidelines for authors in the [journal's homepage](#).*

*** For a more in-depth analysis of the journal, you should subscribe and check it out on [Journal Citation Reports \(JCR\)](#).*

Molecular alterations in malignant blue nevi and related blue lesions

Ismail Yilmaz¹ · Mehmet Gamsizkan² · Sule Ozturk Sari³ · Banu Yaman⁴ · Cuyan Demirkesen⁵ · Aylin Heper⁶ · Aylin Orgen Calli⁷ · Gizem Narli¹ · Zafer Kucukodaci¹ · Ufuk Berber⁸ · Dilaver Demirel¹ · Taner Akalin⁴ · Murat Demiriz⁹ · Nesimi Buyukbabani³

Received: 8 April 2015 / Accepted: 16 September 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Malignant blue nevi (MBN) are extremely rare dermal melanocytic tumors that arise in association with atypical cellular blue nevi (ACBN), cellular blue nevi (CBN), common blue nevi (BN), or de novo. The frequency of *BRAF*, *NRAS*, and *KIT* mutations in malignant melanoma varies according to histological subtype and localization. These mutations are rarely observed in blue nevi, which have recently been shown to carry activating mutations in *GNAQ/GNA11* genes. Only few small molecular studies of MBN have been published. The aim of the present study was to analyze in MBN and related blue lesions such as ACBN, CBN, and BN the prevalence of *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *GNAQ*, and *GNA11* gene mutations and their association

with clinicopathological features. We included in our study 12 MBN, 6 ACBN, 29 CBN, and 35 common BN diagnosed between 1996 and 2014. Sanger sequencing method was used for mutation analysis. Overall, *GNAQ* exon 5 mutation was the most frequent alteration (46 %), in 2 of 12 (17 %) MBN, 1 of 6 (17 %) ACBN, 22 of 29 (76 %) CBN, and 13 of 35 (37 %) common BN. *BRAF* V600E and *GNA11* exon 5 mutations were respectively detected in 3 of 12 (25 %) and in 2 of 12 (17 %) MBN while none in ACBN, CBN, and common BN. None of the cases harbored *NRAS* exon 2/3, *KIT* exon 9/11/13/17/18, or *GNAQ/GNA11* exon 4 mutations. *GNAQ* gene exon 5 mutations are rare in MBN and ACBN but frequent in CBN and common BN. Remarkably, *BRAF* V600E and *GNA11* exon 5 mutations were only detected in MBN, whereas none were found in ACBN, CBN, or common BN. Our data contribute new elements to the limited data on molecular alterations in MBN.

✉ Ismail Yilmaz
isyilmaz@gata.edu.tr

- ¹ Department of Pathology, Gulhane Military Medical Academy, Haydarpasa Training Hospital, Istanbul, Turkey
- ² Department of Pathology, Erzurum Military Hospital, Erzurum, Turkey
- ³ Istanbul Faculty of Medicine, Department of Pathology, Istanbul University, Istanbul, Turkey
- ⁴ Faculty of Medicine, Department of Pathology, Ege University, Izmir, Turkey
- ⁵ Cerrahpasa Faculty of Medicine, Department of Pathology, Istanbul University, Istanbul, Turkey
- ⁶ Faculty of Medicine, Department of Pathology, Ankara University, Ankara, Turkey
- ⁷ Department of Pathology, Izmir Katip Celebi University, Ataturk Training and Research Hospital, Izmir, Turkey
- ⁸ Department of Pathology, Corlu Military Hospital, Corlu, Tekirdag, Turkey
- ⁹ Faculty of Medicine, Department of Pathology, Gulhane Military Medical Academy, Ankara, Turkey

Keywords *BRAF* · *GNAQ* · *GNA11* · Mutation · Malignant · Blue nevi

Introduction

Malignant blue nevi (MBN) are extremely rare malignant melanocytic neoplasms that account for 0.3 % of all melanomas in Turkey [1] and arise in association with atypical cellular blue nevi (ACBN), cellular blue nevi (CBN), common blue nevi (BN), or de novo [2]. MBN are highly aggressive tumors, and currently, there is no effective therapy for metastatic disease [3]. MBN belong to a group of tumors arising from melanocytes that are not associated with surface epithelium. The group also includes blue nevus and variants, nevus of Ota, nevus of Ito, Mongolian spot, uveal nevus, uveal melanoma, and primary melanocytic neoplasms of the central nervous system [4–7].

A large proportion of cutaneous melanomas show mutations in *BRAF* and *NRAS* genes that are part of the *Ras/Raf*/mitogen-activated protein kinase (*MAPK*) signaling pathway, which regulates proliferation, senescence, survival, and differentiation of melanocytes. These mutations induce increased activity downstream of the *MAPK* pathway, which stimulates growth of melanoma cells [8]. *BRAF* mutations are frequently found in superficial spreading melanomas and in melanomas arising on non-chronically sun-damaged skin such as trunk and proximal extremities [8]. In contrast, *BRAF* mutations are rarely found in uveal melanomas or in melanomas arising from mucosa and internal organs that are sun protected [9–11]. *NRAS* mutations are more frequently seen in nodular melanomas and in melanomas arising on chronically sun-damaged skin such as extremities [12–15]. *KIT* is a receptor tyrosine kinase and binds stem cell factor. *KIT* mutations result in autophosphorylation and downstream activation of the *MAPK*, *PI3K/Akt*, and *JAK/STAT* pathways. *KIT* mutations are more frequently seen in acral lentiginous and lentigo maligna melanoma and in melanomas arising on mucosal sites [16, 17].

BRAF, *NRAS*, and *KIT* mutations are rarely observed in blue nevi and their variants. Recently, activating mutations in *GNAQ/GNA11* genes have been shown in blue nevi, in a mutually exclusive pattern [4]. Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha (*GNAQ*) and guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha-11 (*GNA11*) genes encode members of the q-class G-protein α subunits that mediate signals from G-protein-coupled receptors to the *MAPK* pathway. *GNAQ* is important in melanocyte homeostasis and survival of melanocytes early in neural crest development [18]. *GNAQ* behaves similarly to the oncogenes *GNAQ* and *NRAS*, via *MAPK* activation [5]. Mutations in *GNAQ* or *GNA11* lead to constitutive activation of the *MAPK* pathway and result in diffuse skin hyperpigmentation due to an increase in intradermal melanocytes. *GNAQ* mutations are not encountered as germline mutations [4, 5, 19].

Although the molecular genetics of cutaneous melanomas have been investigated in numerous studies [8, 11–17], molecular studies in MBN are generally limited to a few cases [4, 5, 20–22] due to its rarity and lack of large series. The molecular events that lead to the development of MBN are poorly understood. Van Raamsdonk et al. reported *GNAQ/GNA11* mutation analysis of 6 MBN [4, 5]. Loghavi et al. reported *BRAF* and *GNAQ* mutation analyses of 5 and 6 MBN, respectively [22]. Held et al. reported *GNAQ*, *GNA11*, *BRAF*, *NRAS*, and *KRAS* mutation analyses in eight atypical blue tumors that were diagnosed as melanocytic tumors of uncertain malignant potential [23].

While it has been shown that somatic mutations of the *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, and *GNAQ/GNA11* genes in melanomas may have an important role in treatment planning, differential diagnosis, and providing information on the origin of a melanoma metastasis, these alterations are not well studied in MBN. We studied these mutations in MBN and their association with

clinicopathological features such as age, sex, histological type, tumor localization, metastasis status, and prognosis. We also included 6 ACBN, 29 CBN, and 35 common BN. This represents the largest study of *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *GNAQ*, and *GNA11* mutations in MBN cases reported to date.

Materials and methods

Patients and tissues

In this study, conducted under the auspices of “Turkish Dermatopathology Working Group”, 12 MBN (from seven different institutions examined between 1996 and 2014), 6 ACBN, 29 CBN, and 35 common BN were included. Because of the lack of consensus in the histological diagnosis of MBN in the literature (24), absence of epidermal involvement, presence of histologically associated blue nevus area, the history of blue nevus-like lesion and exclusion of a possible metastatic melanoma were required as essential criteria. For this retrospective study, clinical characteristics of patients such as age, sex, localization, size, lymph node, and distant metastasis status and follow-up data were collected.

The cases were discussed and reviewed in a meeting with participation of experienced dermatopathologists from each contributing institution. The diagnosis of MBN was based on histological criteria such as absence of junctional activity, distinctly malignant component associated with CBN, large size (>1 cm), infiltrative margins, multinodular configuration, asymmetry, epithelioid cell morphology, necrosis, nuclear pleomorphism, cellular atypia, hypercellularity, large eosinophilic nucleoli, mitotic rate (>2/mm²), atypical mitotic figures, and vascular invasion [24–28]. The most significant and determinant histomorphological criteria to reach the diagnosis of malignancy were the presence of large geographical necrosis and/or atypical mitotic figures [25]. The diagnosis of CBN/BN was established according to standard histopathological criteria [24–29]. Cases different from CBN, due to one or more of the following characteristics: asymmetry, large size (>1 cm), cytological atypia, focal necrosis, increased cellularity, and mitotic rate (>1/mm²) [24–29], but considered insufficient for a diagnosis of MBN, were classified as ACBN.

Mutation analysis

Mutations in exon 15 of *BRAF* gene; exons 2 and 3 of *NRAS* gene; exons 9, 11, 13, 17, and 18 of *KIT* gene; and exons 4 and 5 of *GNAQ* and *GNA11* genes (well-known hotspot regions for oncogenic mutations) were analyzed by PCR-based direct sequencing using representative formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples. Tumor tissue (for MBN, only malignant areas) was manually microdissected from 5- μ m thick unstained histological sections. After deparaffinization and rehydration, DNA was isolated from each dissected sample using QIAamp DNA

FFPE Tissue Kit (50) (catalog no. 56404) (QIAGEN, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. DNA concentration was assessed spectrophotometrically using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). PCR amplification was performed in a Thermal Cycler (ABI, Applied Biosystems, USA) using HotStarTaq DNA Polymerase Kit (catalog no. 203205) (QIAGEN, Hilden, Germany) and appropriate primers which are listed in Table 1.

PCR reactions were run as total volume of 50- μ l reaction mixture consisting of nuclease-free water, 5 μ l 10X PCR Buffer, 25 mM MgCl₂ [(2 μ l for *BRAF* exon 15; *KIT* exons 9, 11, 17, and 18; and *NRAS* exon 3) (1 μ l for *KIT* exon 13 and *GNAQ* exons 4 and 5) (none for *GNAI1* exons 4 and 5 and *NRAS* exon 2)], 2- μ l 10-mM dNTP mix (ABI, Applied Biosystems, USA), 5 μ l of each primer (4 pmol/ μ l), 0.25 μ l of Hot Start Taq DNA Polymerase, and 50 ng of each tumor DNA. After an initial denaturation at 95 °C for 15 min, 42 cycles were performed of 30 s denaturation at 95 °C; 30 s annealing at 60 °C (*BRAF* exon 15, *NRAS* exon 3, and *GNAQ* exon 5), at 58 °C (*KIT* exons 9 and 18), at 56 °C (*GNAI1* exon 4 and *GNAQ* exon 4), at 55 °C (*GNAI1* exon 5 and *NRAS* exon 2), at 54 °C (*KIT* exon 17), or at 53 °C (*KIT* exons 11 and 13); and 30 s extension at 72 °C, followed by final extension of 10 min at 72 °C. PCR products (5 μ l of each PCR reaction) were analyzed by electrophoresis with 2 μ l of loading dye on a 2 % agarose gel. Reagent contamination control was achieved by examining lane for "no DNA" blank tube. PCR products were then purified using PureLink® PCR Purification Kit (catalog no. K3100-01) (Invitrogen Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions and submitted to direct sequencing in both directions (forward and reverse) using reagents from the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, Applied Biosystems, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. After ethanol precipitation, subsequent products were run on the ABI-3730 (48 capillary) automatic sequencer (Applied

Biosystems, USA). Bidirectional sequence traces were analyzed with SeqScape® Software v3.0 (Applied Biosystems, USA) and manually reviewed. All mutations were confirmed by repeated bidirectional sequencing on the ABI sequencer.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS for Windows version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Chi-squared and Fisher's exact tests were used to assess associations between mutation status, sex, and tumor localization. Mann–Whitney *U* test was used to assess associations between mutational status, age, and tumor size. The *p* value was set at <0.05.

Results

Clinicopathological findings

Mean age of MBN patients (44.3 years) was significantly higher compared with that of ACBN (24.3 years), CBN (27 years), and common BN patients (34.9 years). The number of female and male patients was almost equal in each group. The mean size of MBN (25 mm) was higher than that of the other lesions (ACBN 18.7 mm, CBN 15.8 mm, and common BN 6.8 mm). The most common localizations were the scalp for MBN (6/12) and ACBN (3/6), the buttocks or the sacrococcygeal area for CBN (15/29), and the extremities for common BN (18/35).

All MBN showed multinodular configuration and none showed junctional activity (Fig. 1a). All had distinctly malignant component associated with CBN (Fig. 1b), considered as the pre-existing blue nevus-like lesion. Five of 12 patients had a history of congenital nevus, and seven patients had a variable but generally long history (2 to 60 years) reminiscent of a cellular blue nevus in the same area of the tumor. None of the

Table 1 Primer sequences of each exon

Gene	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
<i>BRAF</i> exon 15	TCATAATGCTTGCTCTGATAGG	GGCCAAAAATTTAATCAGTGG
<i>NRAS</i> exon 2	GAAAGCTTTAAAGTACTGTAGATGTGG	AGATGATCCGACAAGTGAGAGA
<i>NRAS</i> exon 3	CCCCTTACCCTCCACACC	CACAAAGATCATCCTTTCAGAGAA
<i>KIT</i> exon 9	AAGTATGCCACATCCCAAGT	ATGGTCAATGTTGGAATGAA
<i>KIT</i> exon 11	CCAGAGTGTCTAATGACTGA	GTTTCAGGTGGAACAAAAACA
<i>KIT</i> exon 13	CATCAGTTTGCCAGTTGTG	ATCTAGCATTGCCAAAATCA
<i>KIT</i> exon 17	AAAAAGTTAGTTTTCACTCTTTACAA	TCGAAAGTTGAACTAAAAATCC
<i>KIT</i> exon 18	GTACTCAAGTTATCACTCCACATTT	TCAAGAAGATGCTCTGAGTCTAAT
<i>GNAQ</i> exon 4	CCGTAGACAGCTTTGGTGTG	TTACCAAATGTACTCAAGGCATAA
<i>GNAQ</i> exon 5	TTTTCCCTAAGTTTGTAAGTAGTGC	CCCACACCCTACTTTCTATCATTTAC
<i>GNAI1</i> exon 4	CTACCTGACCGACGTTGACC	GGCAAATGAGCCTCTCAGTG
<i>GNAI1</i> exon 5	AGCCGATGTCAGTCTGGTGT	AAAGGCAGAGGGAATCAGAGG

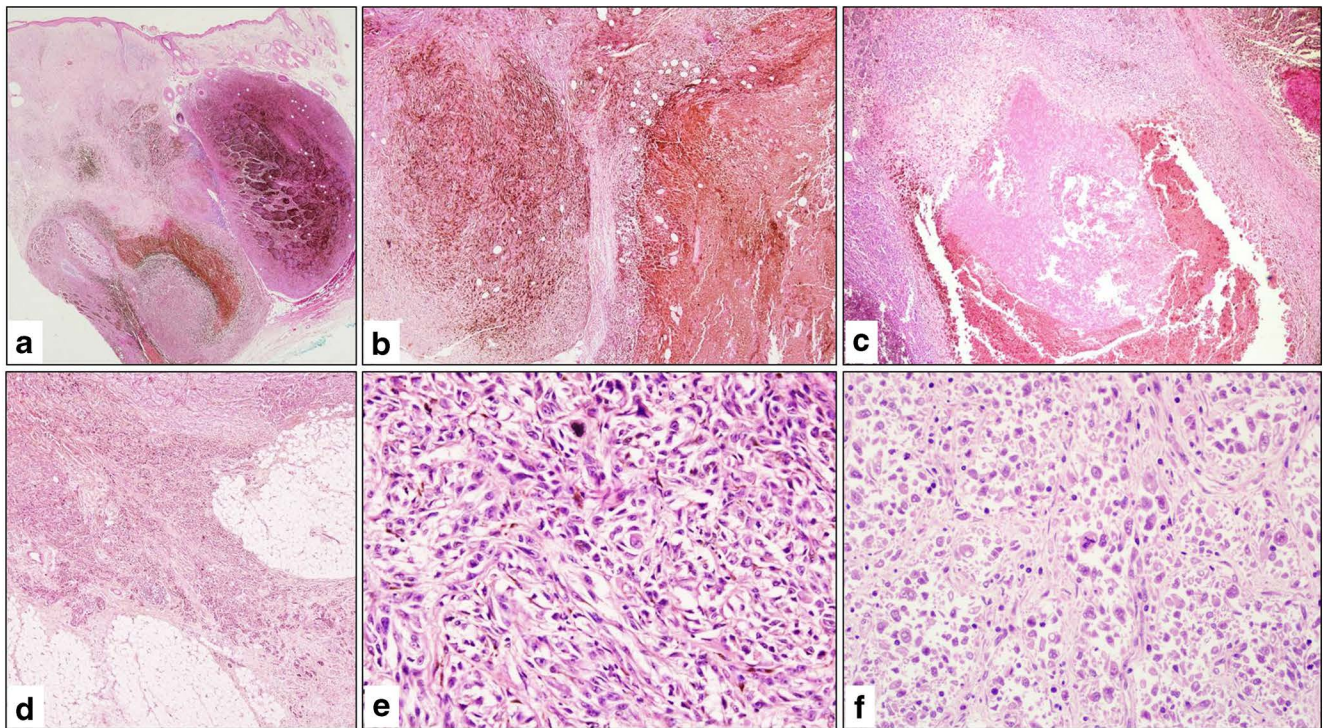


Fig. 1 Representative features of MBN cases. **a** Absence of junctional activity and cellular pigmented nodules can be seen in low-power view ($\times 1$, case 12). **b** Associated blue nevus area and necrosis ($\times 2$, case 7). **c** A

large foci of geographic necrosis ($\times 4$, case 12). **d** Infiltrating margins ($\times 4$, case 10). **e** Marked nuclear pleomorphism ($\times 40$, case 10). **f** Atypical mitosis ($\times 40$, case 11)

patients had a history of previous melanoma. Eight of 12 MBN were ≥ 20 mm in size (Table 4). Nine had infiltrating margins (Fig. 1d). All had marked cellular atypia (Fig. 1e) and mitotic figures. Eight MBN had large foci of tumor necrosis (Fig. 1c), four cases had atypical mitoses (Fig. 1f), and two had both. One of the two MBN without necrosis or atypical mitosis had vascular invasion, and the other had lymph node metastasis and developed a local recurrence after 1 year. Large foci of tumor necrosis or atypical mitoses, the most specific features of MBN, were absent in all ACBN.

Mutation analysis

Mutation analysis showed that 43 of 82 cases (52 %) harbored a mutation in *BRAF*, *GNAQ*, and *GNAI1* genes (Table 2). All mutations were somatic (Fig. 2).

Overall, *GNAQ* exon 5 mutations were the most frequent (46 %). The mutations affected position 209 of *GNAQ* exon 5, resulting in a glutamine to leucine substitution, mostly (95 %, 35/37) caused by a single (*CAA>CTA*) adenine to thymine transition at codon 626 (626A>T) or in two cases (5 %, 2/37) caused by cytosine-adenine to thymine-thymine (*CAA>TTA*) transition at codons 625 and 626 (625_626CA>TT).

Two of MBN (case nos. 2 and 12) and one of ACBN harbored a *GNAQ* Q209L mutation (Table 4). *GNAQ* exon 5 mutation frequency was highest (76 %) in CBN, whereas it was 37 % in common BN (Table 2).

A *GNAI1* exon 5 mutation was detected in two (Fig. 3, case nos. 7 and 11; Table 4) of 12 MBN but not in ACBN, CBN, or common BN. A mutation affecting glutamine amino acid at position 209 of *GNAI1*

Table 2 Distribution of mutations in MBN, ACBN, CBN, and common BN groups

Mutation			MBN	ACBN	CBN	Common BN	Total
<i>GNAQ</i> exon 5	Q209L	626A>T	2/12 (16.7 %)	1/6 (16.7 %)	20/29 (69 %)	12/35 (34.3 %)	38/82 (46.3 %)
		625_626CA>TT	—	—	2/29 (6.9 %)	—	—
	Q209P	626A>C	—	—	—	1/35 (2.9 %)	—
<i>GNAI1</i> exon 5	Q209L	626A>T	2/12 (16.7 %)	—	—	—	2/82 (2.4 %)
<i>BRAF</i> exon 15	V600E	1799T>A	3/12 (25 %)	—	—	—	3/82 (3.7 %)
<i>NRAS</i> exon 2/3, <i>KIT</i> exon 9/11/13/17/18, and <i>GNAQ/GNAI1</i> exon 4			—	—	—	—	—
Total number of mutations			7/12 (58.3 %)	1/6 (16.7 %)	22/29 (75.9 %)	13/35 (37.1 %)	43/82 (52.4 %)

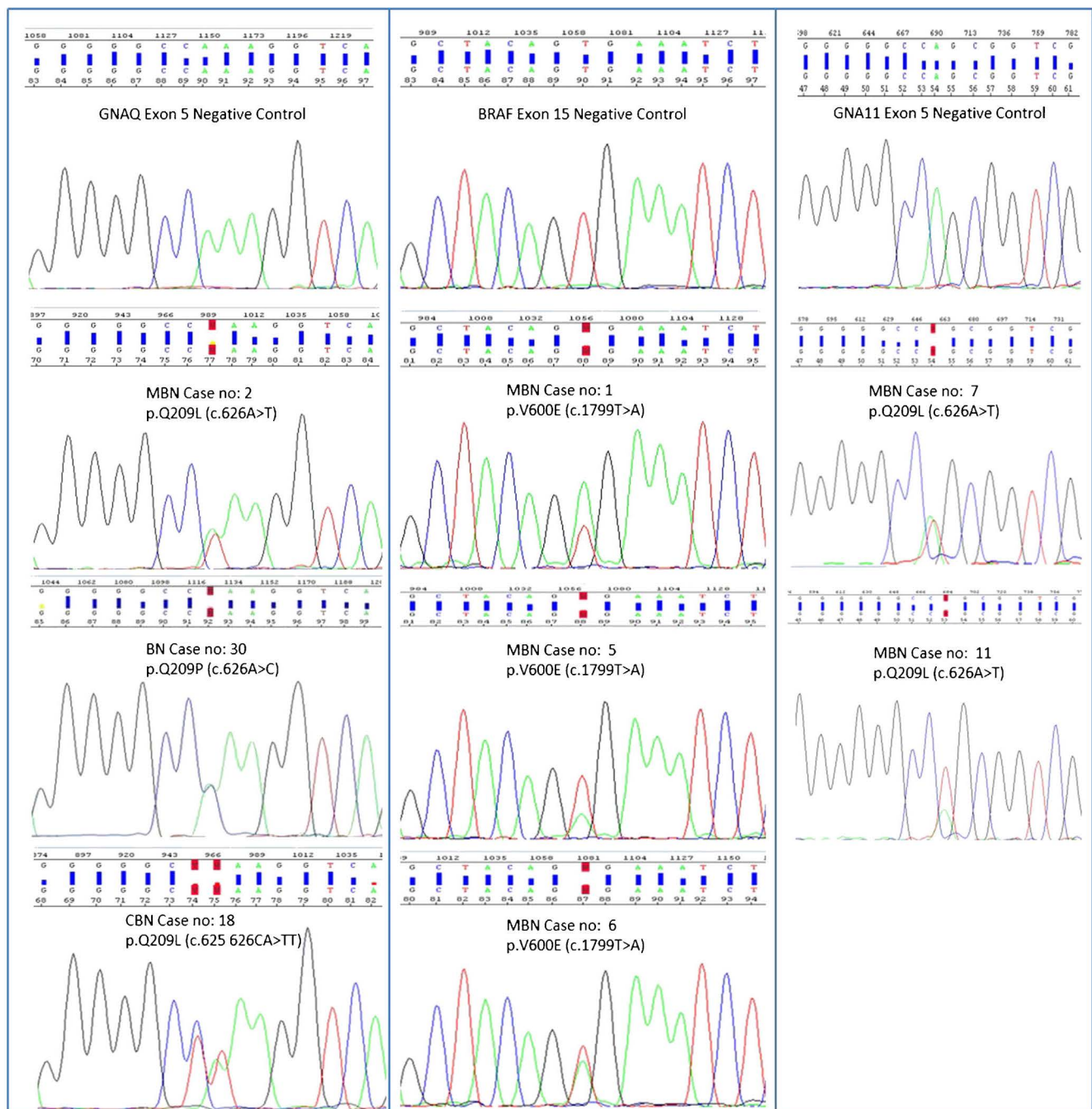


Fig. 2 Samples of forward sequencing electropherograms of mutated cases for *BRAF*, *GNAQ*, and *GNAI1* genes. In the lower parts, mutated cases and the corresponding region of the IVS-000 polyclonal control DNA's reference sequence (upper) are shown

exon 5 resulted in a substitution to leucine (Q209L), caused by a single (CAG>CTG) adenine to thymine transition at codon 626 (626A>T).

BRAF mutation was seen in three (Fig. 4, case nos. 1, 5, and 6; Table 4) of 12 MBN. All *BRAF* mutations concerned a valine to glutamic acid substitution at position 600 (V600E), caused by thymine to adenine transition (GTG>GAG) at codon 1799 (1799T>A). We found no *BRAF* mutations in ACBN, CBN, or common BN.

None of the cases harbored *NRAS* exon 2/3, *KIT* exon 9/11/13/17/18, or *GNAQ/GNAI1* exon 4 mutations.

BRAF-, *GNAQ*-, or *GNAI1*-mutated MBN and CBN cases were mostly located on the scalp (5/6, $p=0.079$) and on the buttocks (13/15, $p=0.321$), respectively; this was not statistically significantly different. No mutations were detected in any blue nevi located on the face. We observed no significant association between mutation status and sex, age, or size ($p>0.05$) (Table 3).

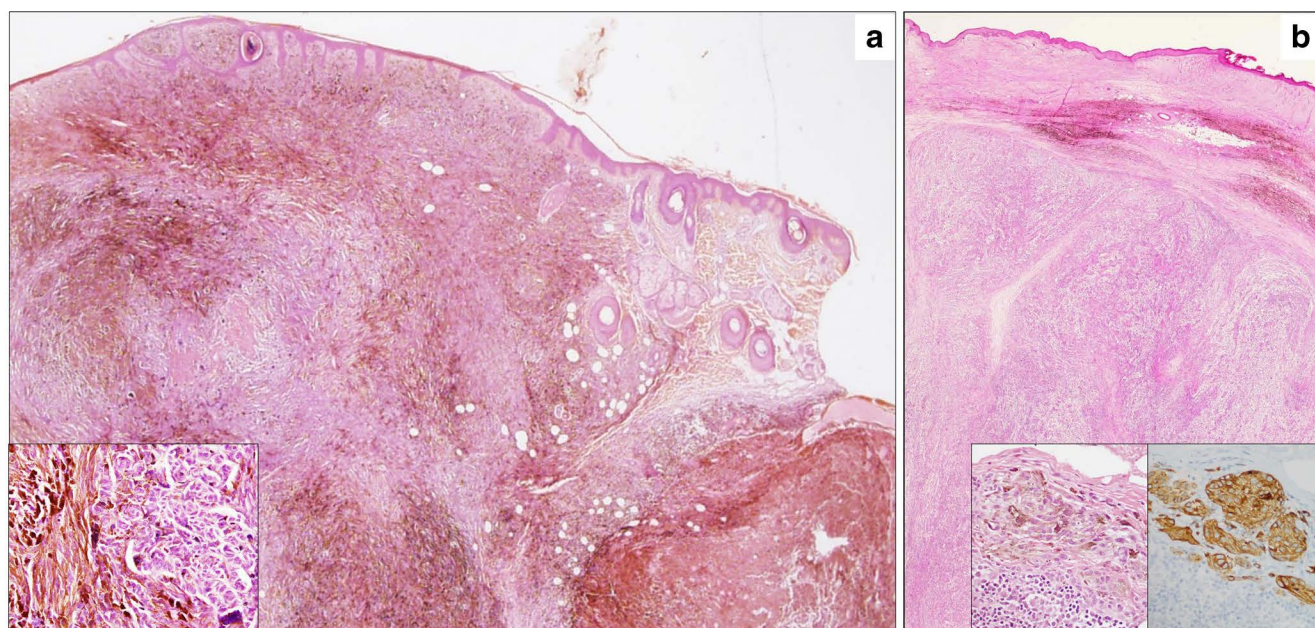


Fig. 3 H&E sections of MBN with *GNAI1* Q209L mutation. **a** Case 7, on low-power view, associated cellular blue nevus pattern and a nodular area with large foci of necrosis in the right bottom corner ($\times 1$); in the insert, high-power view of tumor consisting of spindle, epithelioid, and

multinuclear cells with abundant melanin pigment ($\times 40$). **b** Case 11, cellular nodule sharply demarcated from the associated blue nevus area in the dermis ($\times 1$); in the insert, high-power view of H&E and melan-A immunostaining sections of lymph node metastasis ($\times 40$)

Follow-up data

Follow-up data were available for eight patients with MBN. The median follow-up period was 4.3 years (range 0.7–10 years). The remaining four patients with MBN were lost to follow-up. However, according to the government-held national records, these patients had died of unknown causes. Of the eight patients with MBN who had follow-up data, six were alive without disease and two had died of the disease (Table 4), both with distant metastasis. Six of the patients with

MBN had distant and/or lymph node metastases. Follow-up data for all patients with ACBN were available with a median of 3.8 years (range 1–10 years); all were non-metastatic and alive without recurrence.

Of the six patients with metastatic MBN, one had a *BRAF*, one had a *GNAI1*, and two had a *GNAQ* mutation. Of the six patients with non-metastatic MBN, two had a *BRAF* and one had a *GNAI1* mutation. Overall, mutation frequencies did not differ between patients with metastatic and non-metastatic MBN (Table 4). One of the two patients with MBN, who

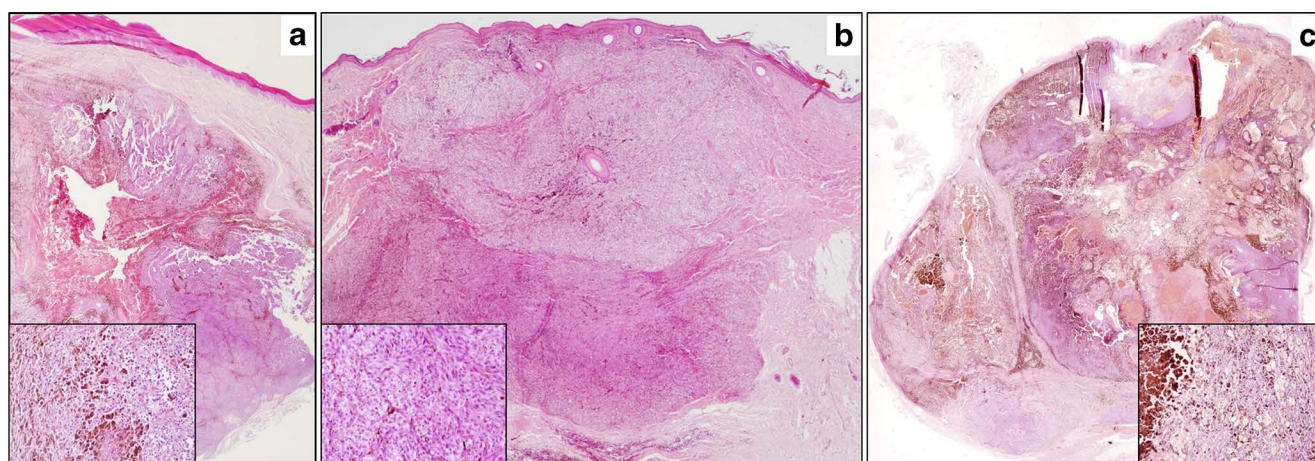


Fig. 4 H&E sections of MBN with *BRAF* V600E mutation. **a** Case 1, associated CBN component in upper left part ($\times 1$); in the insert, high-power view of necrosis and surrounding spindle and epithelioid cells ($\times 20$). **b** Case 5, expansile nodule of cellular blue nevus area ($\times 1$); in the insert, high-power view of densely packed cells with prominent

nucleoli and a mitotic figure in the center ($\times 40$). **c** Case 6, CBN pattern in the left and cellular nodule with large foci of geographic necrosis ($\times 1$); in the insert, high-power view of necrosis and surrounding pleomorphic epithelioid cells ($\times 20$)

Table 3 The distribution of mutated and wild-type cases in MBN, ACBN, CBN, and common BN groups according to age, size, sex, and localization

		MBN		ACBN		CBN		Common BN	
		Mutated	Wild type (WT)	Mutated	WT	Mutated	WT	Mutated	WT
Mean age (years) (range)		44.4 (19–70)	44 (4–77)	12 (12–12)	26.8 (2–74)	28.8 (2–73)	21.4 (12–39)	33.4 (9–57)	35.7 (17–74)
Mean size (mm) (range)		22.9 (11–40)	29 (16–50)	26 (26–26)	17.2 (10–25)	13 (5–47)	24.6 (6–45)	7.2 (4–15)	6.5 (3–40)
Sex	Female	4/7 (57.1 %)	3/7 (42.9 %)	0/2 (0 %)	2/2 (100 %)	12/16 (75 %)	4/16 (25 %)	9/17 (52.9 %)	8/17 (47.1 %)
	Male	3/5 (60 %)	2/5 (40 %)	1/4 (25 %)	3/4 (75 %)	10/13 (76.9 %)	3/13 (23.1 %)	4/18 (22.2 %)	14/18 (78.8 %)
Localization	Scalp	5/6 (83.3 %)	1/6 (16.7 %)	1/3 (33.3 %)	2/3 (66.7 %)	4/6 (66.7 %)	2/6 (33.3 %)	2/7 (28.6 %)	5/7 (71.4 %)
	Buttocks	–	2/2 (100 %)	–	2/2 (100 %)	11/13 (84.6 %)	2/13 (15.4 %)	–	1/1 (100 %)
	Extremities	2/3 (66.7 %)	1/3 (33.3 %)	–	1/1 (100 %)	5/7 (71.4 %)	2/7 (28.6 %)	9/18 (50 %)	9/18 (50 %)
	Trunk	–	–	–	–	2/3 (62.5 %)	1/3 (37.5 %)	2/4 (50 %)	2/4 (50 %)
	Facial	–	1/1 (100 %)	–	–	–	–	–	5/5 (100 %)

had died of the disease, had *GNAQ* exon 5 mutation, and the other was wild type for all these five genes. The clinical outcome of MBN patients with *BRAF*, *GNAQ*, and *GNAI1* mutations did not differ from the wild type. Furthermore, patients with MBN harboring different mutations did not display any variation in clinical outcome (Table 4).

Discussion

There are many histological variants of blue nevi, but the differential diagnosis of MBN is especially important in view

of its poor prognosis and tendency to recur or metastasize to the lymph nodes, lungs, liver, and other organs. The optimal treatment of MBN is not clear, and the genetic factors participating in MBN evolution have not been studied extensively, due to its rarity. The recent development of targeted therapies in metastatic melanoma revealed the importance of molecular studies also in MBN.

MBN usually present as blue, grey, or black demarcated plaques or nodules with a size of 1 to 10 cm. The most common site is the scalp [26]. According to literature, the mean age of development is 45.7 years with no significant sex predominance [22]. In our study, the mean age of patients with

Table 4 Clinical features, follow-up data, and mutation status of 12 MBN and 6 ACBN patients

No	Mutation status	Sex	Age (year)	Size (mm)	Localization	Lymph node metastasis	Distant metastasis	Follow-up (years)	Follow-up data
MBN1	<i>BRAF</i> -V600E	M	20	30	Extremity	+	–	5	Alive without disease
MBN2	<i>GNAQ</i> -Q209L	M	63	20	Extremity	+	–	4	Alive without disease
MBN3	WT	M	65	50	Extremity	–	–	–	Exitus with unknown reason
MBN4	WT	F	70	40	Facial	–	–	–	Exitus with unknown reason
MBN5	<i>BRAF</i> -V600E	M	70	12	Scalp	–	–	–	Exitus with unknown reason
MBN6	<i>BRAF</i> -V600E	F	24	21	Scalp	–	–	1	Alive without disease
MBN7	<i>GNAI1</i> -Q209L	F	56	11	Scalp	–	–	9	Alive without disease
MBN8	WT	F	4	21	Buttocks	+	–	10	Alive without disease
MBN9	WT	M	4	18	Scalp	+	+(Lung)	0.7	Exitus with disease
MBN10	WT	F	77	16	Buttocks	–	–	–	Exitus with unknown reason
MBN11	<i>GNAI1</i> -Q209L	F	19	26	Scalp	+	–	3	Alive without disease
MBN12	<i>GNAQ</i> -Q209L	F	59	40	Scalp	–	+(Liver)	2	Exitus with disease
ACBN1	WT	M	74	25	Scalp	–	–	3	Alive without disease
ACBN2	<i>GNAQ</i> -Q209L	M	12	26	Scalp	–	–	1	Alive without disease
ACBN3	WT	M	13	12	Extremity	–	–	10	Alive without disease
ACBN4	WT	M	2	10	Scalp	–	–	3	Alive without disease
ACBN5	WT	F	12	14	Buttocks	–	–	5	Alive without disease
ACBN6	WT	F	33	25	Buttocks	–	–	1	Alive without disease

MBN was 44.3 years with no sex predilection. The mean size of MBN was larger than that of other lesions. The most common localizations were the scalp in MBN and ACBN, the buttocks or the sacrococcygeal area in CBN, and the extremities in common BN. Clinicopathological features such as sex, age, size, localization, metastasis status, and clinical outcome of patients with *BRAF*, *GNAQ*, and *GNAI1* mutations did not differ with that of wild-type patients. Held et al. also found no significant correlation between mutation status and outcome [23].

The discovery of the *GNAQ*-Q209 mutations in blue nevi [5] provided new insight in the molecular pathogenesis of these melanocytic neoplasms. However, data about the frequency of *GNAQ* mutations in MBN, ACBN, CBN, and common BN are limited. Van Raamsdonk et al. demonstrated *GNAQ* mutations in 33 % (2/6) of MBN [4]. Loghavi et al. detected no *GNAQ* mutation in six MBN [22]. To date, only three more cases of MBN with *GNAQ* mutation have been reported in the English literature [20, 21]. Held et al. found no *GNAQ* mutations in any of eight atypical blue tumors [23]. In previous studies, the frequency of *GNAQ* mutations in CBN and common BN ranged between 26.7–72.2 and 40–65 %, respectively (Table 5) [4, 23, 32, 33]. Our results show that *GNAQ* exon 5 mutations are rare in MBN (17 %) and ACBN (17 %) but frequent in CBN (76 %) and common BN (37 %).

GNAI1 somatic mutations were found to be common in uveal melanoma and melanocytoma of CNS [4, 7], but to our knowledge, only two studies [4, 23] have reported *GNAI1* mutations in MBN, ACBN, CBN, or common BN, the other studies failing to demonstrate any [5, 21, 33]. Van Raamsdonk et al. demonstrated *GNAI1* mutations in 17 % (1/6) of MBN, 8 % (3/36) of CBN, and 8 % (5/60) of common BN [4]. Furthermore, Held et al. reported *GNAI1* mutation in 13 % (1/8) of atypical blue tumors [23]. It is noticeable that we detected *GNAI1* exon 5 mutation only in two MBN. Although *GNAQ* and *GNAI1* have amino acid sequences that are 90 % homologous and have overlapping functions in melanocytes [34], there appear to be differences in their role in melanocytic neoplasia [4]. Van Raamsdonk et al. emphasized that *GNAI1* mutations may have a more potent effect on melanocytes compared to mutations in *GNAQ* [4]. In their study, this assumption was reached because *GNAI1* mutations were detected rarely in blue nevi and more commonly found in uveal melanoma metastases, in locally advanced primary uveal melanomas and in primary uveal melanomas originating from the ciliochoroidal region, which is a prognostically adverse feature. The authors also found that the mouse *GNAI1* Dsk7 mutation is more tumorigenic than the *GNAQ* Dsk1 mutation [34]. In another study, Held et al. studied 15 CBN with deep-penetrating features and eight atypical blue tumors but detected *GNAI1* mutation in only one atypical blue tumor which is

Table 5 A meta-analysis of *BRAF*, *GNAQ*, and *GNAI1* mutation frequencies according to groups of MBN, ACBN, CBN, and common BN in our and previous studies

Gene	Study	MBN	ACBN	CBN	Common BN
<i>BRAF</i>	Our results	3/12 (25 %)	0/6 (0 %)	0/35 (0 %)	0/35 (0 %)
	Yazdi et al.	–	–	–	0/20 (0 %)
	Held et al.	0/1 ^a (0 %)	3/8 ^b (37.5 %)	3/15 ^c (20 %)	–
	Saldanha et al.	1/1 (100 %)	–	–	3/25 (12 %)
	Loghavi et al.	0/5 (0 %)	–	–	–
<i>GNAQ</i>	Our results	2/12 (16.7 %)	1/6 (16.7 %)	22/29 (75.9 %)	13/35 (37.1 %)
	Van Raamsdonk et al.	2/6 (33.3 %)	–	26/36 (72.2 %)	39/60 (65 %)
	Held et al.	1/1 ^a (100 %)	0/8 ^b (0 %)	4/15 ^c (26.7 %)	–
	Emley et al.	–	–	4/9 (44 %)	4/10 (40 %)
	Lamba et al.	–	–	–	6/13 (46 %)
	North et al.	2/2 ^a (100 %)	–	–	–
	Loghavi et al.	0/6 (0 %)	–	–	–
	Our results	2/12 (16.7 %)	0/6 (0 %)	0/35 (0 %)	0/35 (0 %)
<i>GNAI1</i>	Van Raamsdonk et al.	1/6 (16.7 %)	–	3/36 (8.3 %)	5/60 (8.3 %)
	North et al.	0/2 ^a (0 %)	–	–	–
	Lamba et al.	–	–	–	0/13 (0 %)
	Held et al.	–	1/8 ^d (12.5 %)	0/15 ^c (0 %)	–

Source: [4, 20–23, 30–33]

^a Case reports

^b Atypical blue tumors that were diagnosed as melanocytic tumors of uncertain malignant potential

^c CBN with deep penetrating features

^d Local recurrence after 11 years

presented with local recurrence after 11 years [23]. These two studies and our results suggest that in the group of blue nevi and related tumors, *GNAII* mutations might be associated with malignancy.

Few studies have investigated *BRAF* mutation in blue lesions (Table 5). Loghavi et al. found no *BRAF* mutation in 5 MBN [22]. Held et al. detected no *BRAF* mutation in a single case of MBN [20] but found V600E mutation in three of eight atypical blue tumors and in 3 of 15 CBN with features of deep-penetrating nevi, which can be difficult to differentiate from melanoma based on histopathological features alone [23]. Yazdi et al. reported no *BRAF* mutation in 20 common BN [30]. Saldanha et al. found *BRAF* mutation in a single case of MBN and in three cases of 25 common BN [31], the only study that has reported *BRAF* mutation in MBN as yet. We demonstrated three additional MBN with a *BRAF* V600E mutation, while we observed none in ACBN, CBN, and common BN. Clinicopathological features were not different between *BRAF*-mutated and wild-type MBN cases. However, this finding may have important therapeutic implications because specific *BRAF* inhibitors like vemurafenib may be effective in patients with advanced MBN who harbor *BRAF* mutations.

The data about *NRAS* and *KIT* mutations in blue nevi and its variants are limited. Saldanha et al. found no *NRAS* mutations in any of 15 common BN [31]. However, Held et al. reported *NRAS* mutation in 1 of 15 CBN with features of deep-penetrating nevi [23] and Emley et al. reported *NRAS* mutation in 1 of 27 blue nevi [32]. Ohashi et al. found no *KIT* expression with immunohistochemistry in any of 4 common BN [35]. To our knowledge, ours is the first PCR-based study that investigated mutations of *KIT* gene in MBN, ACBN, CBN, and common BN. Although we did not detect *NRAS* or *KIT* mutations in any of the blue lesions, our study contributes to the limited data in the literature about the molecular alterations in MBN.

In summary, we found somatic mutations in the *GNAQ* gene to be rare in MBN and ACBN but frequent in CBN and common BN. In our study, mutations in *GNAII* gene were detected only in MBN, which may be suggestive of malignancy in blue lesions. Furthermore, finding *BRAF*, *GNAQ*, and *GNAII* mutations in 7 of 12 (58 %) MBN emphasizes the importance of ongoing studies in molecular targeted therapies. Although the clinicopathological features, as well as the clinical outcomes of MBN cases with *BRAF*, *GNAQ*, and *GNAII* mutations did not differ from the wild-type cases, the diagnostic, prognostic, predictive, and therapeutic values of these mutations need to be determined in further studies.

Acknowledgments This study was approved by the medical ethics committee of Gulhane Military Medical Academy, Haydarpasa Training Hospital (Approval No. 2014-42/24/27.03.2014), and was conducted in accordance with the Helsinki Declaration Principles.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Gamsizkan M, Yilmaz I, Buyukbabani N et al (2014) A retrospective multicenter evaluation of cutaneous melanomas in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(23):10451–6
- Duteille F, Duport G, Larregue M et al (1998) Malignant blue nevus: three new cases and a review of the literature. *Ann Plast Surg* 41:674–8
- Granter SR, McKee PH, Calonje E et al (2001) Melanoma associated with blue nevus and melanoma mimicking cellular blue nevus: a clinicopathologic study of 10 cases. *Am J Surg Pathol* 25:316–23
- Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB et al (2010) Mutations in *GNAII* in uveal melanoma. *N Engl J Med* 363(23):2191–9
- Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G et al (2009) Frequent somatic mutations of *GNAQ* in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 457(7229):599–602
- Van Raamsdonk CD, Barsh GS, Wakamatsu K et al (2009) Independent regulation of hair and skin color by two G protein-coupled pathways. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:819–826
- Murali R, Wiesner T, Rosenblum MK et al (2012) *GNAQ* and *GNAII* mutations in melanocytomas of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 123(3):457–9
- Daud A, Bastian BC (2012) Beyond *BRAF* in melanoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 355:99–117
- Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P et al (2003) Lack of *BRAF* mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2876–8
- Edwards RH, Ward MR, Wu H et al (2004) Absence of *BRAF* mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J Med Genet* 41:270–2
- Wong CW, Fan YS, Chan TL et al (2005) *BRAF* and *NRAS* mutations are uncommon in melanomas arising in diverse internal organs. *J Clin Pathol* 58:640–4
- Edlundh-Rose E, Egyhazi S, Omholt K et al (2006) *NRAS* and *BRAF* mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res* 16:471–478
- Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS et al (2012) *NRAS* mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 118:4014–4023
- Lee JH, Choi JW, Kim YS (2011) Frequencies of *BRAF* and *NRAS* mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* 164:776–784
- Solus JF, Kraft S (2013) Ras, Raf and MAP kinase in melanoma. *Adv Anat Pathol* 20(4):217–26
- Curtin JA, Busam K, Pinkel D et al (2006) Somatic activation of *KIT* in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 24(26):4340–6
- Torres-Cabala CA, Wang WL, Trent J et al (2009) Correlation between *KIT* expression and *KIT* mutation in melanoma: a study of 173 cases with emphasis on the acral-lentiginous/mucosal type. *Mod Pathol* 22(11):1446–56
- Shin MK, Levorsoe JM, Ingram RS et al (1999) The temporal requirement for endothelin receptor-B signaling during neural crest development. *Nature* 402:496–501
- Hawkes JE, Campbell J, Garvin D et al (2013) Lack of *GNAQ* and *GNAII* germ-line mutations in familial melanoma pedigrees with uveal melanoma or blue nevi. *Front Oncol* 3:160

20. Held L, Metzler G, Eigentler TK et al (2012) Recurrent nodules in a periauricular plaque-type blue nevus with fatal outcome. *J Cutan Pathol* 39(12):1088–93
21. North JP, Yeh I, McCalmont TH et al (2012) Melanoma ex blue nevus: two cases resembling large plaque-type blue nevus with subcutaneous cellular nodules. *J Cutan Pathol* 39(12):1094–9
22. Loghavi S, Curry JL, Torres-Cabala CA et al (2014) Melanoma arising in association with blue nevus: a clinical and pathologic study of 24 cases and comprehensive review of the literature. *Mod Pathol* 27(11):1468–78
23. Held L, Eigentler TK, Metzler G et al (2013) Proliferative activity, chromosomal aberrations, and tumor-specific mutations in the differential diagnosis between blue nevi and melanoma. *Am J Pathol* 182(3):640–5
24. Barnhill RL, Argenyi Z, Berwick M et al (2008) Atypical cellular blue nevi (cellular blue nevi with atypical features): lack of consensus for diagnosis and distinction from cellular blue nevi and malignant melanoma (“malignant blue nevus”). *Am J Surg Pathol* 32(1):36–44
25. Zembowicz A, Phadke PA (2011) Blue nevi and variants: an update. *Arch Pathol Lab Med* 135(3):327–36
26. Martin RC, Murali R, Scolyer RA et al (2009) So-called “malignant blue nevus”: a clinicopathologic study of 23 patients. *Cancer* 115(13):2949–55
27. Ainsworth AM, Folberg R, Reed RJ et al (1979) Melanocytic nevi, melanocytomas, melanocytic dysplasias, and uncommon forms of melanoma. In: Clark WH Jr, Goldman LI, Mastrangelo MJ (eds) *Human malignant melanoma*. Grune & Stratton, New York, pp 167–208
28. Barnhill RL (2014) Pathology of melanocytic nevi and malignant melanoma. In: Piepkorn M, Busam KJ (eds) *Pathology of melanocytic nevi and malignant melanoma*, Third Edition 3rd edn. Springer, New York, pp 271–300, **331–487**
29. Yaman B, Kandiloğlu G, Kumbaraci BS et al (2015) Atypia and differential diagnosis in cellular blue nevi: clinicopathological study of 21 cases. *Türk Patoloji Derg* 31(2):89–94
30. Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ et al (2003) Mutations of the *BRAF* gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 121(5):1160–2
31. Saldanha G, Purnell D, Fletcher A et al (2004) High *BRAF* mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types. *Int J Cancer* 111(5):705–10
32. Emley A, Nguyen LP, Yang S et al (2011) Somatic mutations in *GNAQ* in amelanotic/hypomelanotic blue nevi. *Hum Pathol* 42(1):136–40
33. Lamba S, Felicioni L, Buttitta F et al (2009) Mutational profile of *GNAQ*209 in human tumors. *PLoS One* 4(8), e6833
34. Van Raamsdonk CD, Fitch KR, Fuchs H et al (2004) Effects of G-protein mutations on skin color. *Nat Genet* 36:961–8
35. Ohashi A, Fumasaka Y, Ueda M et al (1996) c-*KIT* receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanotic naevi. *Melanoma Res* 6(1):25–30



19. ULUSAL JİNEKOLOJİ ve OBSTETRİK *Kongresi*

18-22 MAYIS 2022, ANTALYA

BİLDİRİ ÖZET KİTABI

KOMİTELER

TJOD YÖNETİM KURULU BAŞKANI

BÜLENT TIRAŞ

İKİNCİ BAŞKAN

İSMAİL METE İTİL

GENEL SEKRETER

VOLKAN KURTARAN

SAYMAN

GAZİ YILDIRIM

YÖNETİM KURULU ÜYELERİ

(Soyadı Sırasına Göre Düzenlenmiştir.)

SAMET BAYRAK

ERAY ÇALIŞKAN

CANSUN DEMİR

MELİKE DOĞANAY

TALİP GÜL

ATEŞ KARATEKE

ALİ KOLUSARI

ERDAL SAK

SELÇUK SÖYLEMEZ

FATİH ŞENDAĞ

ERCAN YILMAZ

SALON E**09:00-10:30 SERBEST BİLDİRİ OTURUMU - 13***Oturum Başkanları: Edip Aydın, Erdoğan Aslan*

- SS-199** Mikro-RNA 21 ve 143: Dediferansiye Endometrial Adenokarsinomlarda prognostik öneme sahip bilyobelirteç mi?
- SS-112** Erken Evre Serviks Kanseri Uterin İnvazyonu Predikte Eden Faktörler
- SS-129** Üçüncü basamak jinekolojik onkoloji kolposkopi polikliniğine HPV 16-18 dışı diğer yüksek riskli tipler pozitif gelen hastaların sonuçlarının incelenmesi
- SS-132** Sitoloji Sonucu Normal Olup Hpv Testinde 16/18 Saptanan Hastalar ile Diğer Yüksek Riskli Alt tip Saptanan Hastaların Kolposkopi Sonuçlarının Karşılaştırılması: Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği (ASCCP) 2018 klavuzu rehberliğinde
- SS-137** İzole Servikal HPV Tip 16 Pozitifliğinin Sitopatolojik ve Histopatolojik Sonuçlara Etkisi
- SS-150** Diagnostik eksizyonel işlem yapıp patoloji sonucu servisit rapor edilen olguların değerlendirilmesi
- SS-154** Eksizyonel prosedür yapılan ve spesimde cerrahi sınır pozitif raporlanan olgularda klinik ve histopatolojik parametreleri değerlendirilmesi
- SS-178** Ulusal servikal kanser tarama programının servikal kanser tanısı alan hastaların tanı anındaki figo evresi üzerindeki etkisi
- SS-228** Squamous Cell Carcinoma of the Cervix in Pregnancy at 16th Week
- SS-083** Rektus flep rekonstruksiyonu ile radikal vulvektomi ve sol inguinal lenfadenektomi, postoperatif yara bakımı
- SS-111** Vajinada Kitle ile Prezente Olan Figo Evre 4a Endometrium Kanseri Olgusu Sunumu
- SS-175** Vulvanın düz kas tümörleri ve literatür özeti: Vulvar STUMP olgusu

10:30-11:00**KAHVE MOLASI**

The association of mir-204 ... The association of mir-204 and mir-483 5p expression with clinicopathologi...

MENU

The association of mir-204 and mir-483 5p expression with clinicopathological features of Wilms tumour: could provide foresight?

By	Calli, AO (Calli, A. Orgen) ; Issin, G (Issin, G.) ; Yilmaz, I (Yilmaz, I.) ; Ince, D (Ince, D.) ; Guzelis, I (Guzelis, I.) ; Tural, E (Tural, E.) ; Cecen, RE (Cecen, R. E.) ; Olgun, HN (Olgun, H. N.) ; Kabakci, D (Kabakci, D.) ; Ozer, E (Ozer, E.)
Source	VIRCHOWS ARCHIV Volume: 481 Issue: SUPPL 1 Page: S90-S90 Supplement: 1 Special Issue: SI Meeting Abstract: PS-06-005
Published	SEP 2022
Indexed	2022-09-14
Document Type	Meeting Abstract
Addresses	1 Izmir Katip Celebi Univ, Izmir, Turkey
Categories/ Classification	Research Areas: Pathology
Web of Science Categories	Pathology
Language	English
Accession Number	WOS:000842770700285



ISSN

0945-6317

eISSN

1432-2307

IDS Number

3X0YD

See fewer data fields

Citation Network

In Web of Science Core Collection

0

Citations

0

Cited References

Use in Web of Science

0

0

Last 180 Days Since 2013

This record is from:

Web of Science Core Collection

• Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)

Suggest a correction

If you would like to improve the quality of the data in this record, please [Suggest a correction](#)

AYLİN ÇALLI

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

İKÇÜ ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ PATOLOJİ KLİNİĞİ YEŞİLYURT

Öğrenim Bilgileri

23 Ocak 2015 - Şu Anda (8 yıl 11 ay)

Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (DR)

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.54 / 4.0

01 Kasım 1996 - 01 Ocak 2001 (4 yıl 3 ay)

Tıpta Uzmanlık, Anadal/Normal Öğretim, İKÇÜ ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ, TÜRKİYE

Tez Başlığı: Mide Adenokarsinomlarında p53 Ekspresyonu ve Diğer Konvansiyonel Prognostik Parametrelerle İlişkisi

Tez Konusu: Mide Adenokarsinomlarında p53 Ekspresyonu

Tarih: 2000

01 Eylül 1989 - 01 Haziran 1995 (5 yıl 10 ay)

Yüksek Lisans, Tezsiz Program, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIP EĞİTİMİ (DR)

Diploma Numarası: 8052

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Eylül 2012 - Şu Anda (11 yıl 4 ay) (Tam Zamanlı)

DOÇ. DR., DOÇ. DR., İKÇÜ ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

01 Şubat 2001 - Şu Anda (22 yıl 11 ay) (Tam Zamanlı)

UZMAN (DR.), UZMAN, İKÇÜ ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: Orta)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Kanser Moleküler Biyolojisi

Anahtar Kelimeler

Patoloji

Dermatopatoloji

Moleküler Patoloji

Histopatoloji

Cerrahi Patoloji
Hematopatoloji
Genital Patoloji
Moleküler Belirteçler
Moleküler Tanı
İnsan Moleküler Genetiği
Moleküler Sınıflandırma

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

A. O. CALLI, G. ISSIN, I. YILMAZ, D. INCE, E. TURAL, I. GUZELIS, R. E. CECEN, H. N. OLGUN, D. GOKCAY & E. OZER, The association of miR-204 and mir-483 5p expression with clinicopathological features of Wilms tumor: Could this provide foresight?, JAPANESE JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2023, 0368-2811, null, 7.

K. B. PAYZIN, K. SAVASOGLU, I. ALACACIOGLU, E. E. DALGIC, B. B. KUCUKZEYBEK, A. O. CALLI, S. BENER & S. PAYZIN, <i>BCR</i>-<i>ABL1</i>-Negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms and Pulmonary Hypertension: A Prospective Long-Term Follow-up Study of the Impact of Pulmonary Hypertension on Survival, CLINICAL LYMPHOMA MYELOMA & LEUKEMIA, 2021, 2152-2650, 21, 2, 7.

A. ÇALLI, Wilm's Tümöründe Mikro-RNA Ların Önemi., SELÇUK TIP DERGİSİ, 2021, 1017-6616, 37, 1, 90-95.

A. O. CALLI, Y. DERE, A. SARI, F. DIRILENOGLU, I. ONUR & K. IMRE, Evaluation of Stromal Myofibroblasts in Laryngeal Dysplasia and Invasive Squamous Cell Carcinoma, INDIAN JOURNAL OF OTOLARYNGOLOGY AND HEAD & NECK SURGERY, 2019, 2231-3796, 71, 6.

S. UN, A. S. DINDAR, A. C. ERDAL, A. O. CALLI, O. KOSE, E. M. YORULMAZ, H. TURK & Y. YILMAZ, Bilateral Primary Renal Lymphoma Presenting with Acute Renal Failure, JOURNAL OF UROLOGICAL SURGERY, 2017, 2148-9580, 4, 4, 3.

F. GEDİZ, A. F. YILMAZ, B. PAYZIN, T. YUKSEL, A. O. CALLI & S. KOBAK, Development of Hodgkin lymphoma in a patient with sarcoidosis, REUMATISMO, 2017, 0048-7449, 69, 2, 4.

F. S. AFSAR, S. S. UYSAL, F. M. SALIS & A. O. CALLI, Napkin psoriasis, PEDIATRICS INTERNATIONAL, 2016, 1328-8067, 58, 5, 3.

B. B. KUCUKZEYBEK, A. VATANSEVER, A. O. CALLI & T. REZANKO, Strumal Carcinoid of the Ovary: A Case Report, MEANDROS MEDICAL AND DENTAL JOURNAL, 2016, 2149-9063, 17, 2, 4.

M. DEMIRCI, N. BARAN, A. UZUM, A. O. CALLI, S. GUL-YURTSEVER & T. DEMIRDAL, Cutaneous Alternariasis in a Patient With Renal Transplant, JUNDISHAPUR JOURNAL OF MICROBIOLOGY, 2015, 2008-3645, 8, 5, 3.

I. YILMAZ, M. GAMSIZKAN, S. O. SARI, B. YAMAN, C. DEMIRKESEN, A. HEPER, A. O. CALLI, G. NARLI, Z. KUCUKODACI, U. BERBER, D. DEMIREL, T. AKALIN, M. DEMIRIZ & N. BUYUKBABANI, Molecular alterations in malignant blue nevi and related blue lesions, VIRCHOWS ARCHIV, 2015, 0945-6317, 467, 6, 10.

S. ERTUGRUL, G. ERTUGRUL, A. IMRE, E. PINAR, C. CALLI, A. O. CALLI & S. ONCEL, Predictors of neck metastasis in early stage oral cavity cancer, ENT UPDATES, 2015, 2149-7109, 5, 2, 5.

Y. DERE, A. O. CALLI, I. ALACACIOGLU, B. B. KUCUKZEYBEK, S. BENER & B. PAYZIN, Correlation of Nm23 and P27 Expression in Nodal Diffuse Large B Cell Lymphomas with Clinicopathologic Parameters and the Effect on Prognosis, ERCIYES MEDICAL JOURNAL, 2014, 2149-2247, 36, 2, 5.

K. B. PAYZIN, K. SAVASOGLU, I. ALACACIOGLU, F. OZDEMIRKIRAN, B. B. MUTLU, S. BENER, A. O. CALLI, B. B. KUCUKZEYBEK & S. AKSUN, JAK2 V617F Mutation Status of 232 Patients Diagnosed With Chronic Myeloproliferative Neoplasms, CLINICAL LYMPHOMA MYELOMA & LEUKEMIA, 2014, 2152-2650, 14, 6, 9.

S. N. GORGEL, E. SEFİK, V. OLGUNELMA, E. SAHİN, U. BALCI & A. O. CALLI, Primary non-Hodgkin follicular lymphoma of the prostate: A case report, TURKISH JOURNAL OF UROLOGY, 2014, 2149-3235, 40, 1, 2.

L. DEMİR, M. AKYOL, S. BENER, K. B. PAYZIN, C. ERTEN, I. SOMALI, A. CAN, A. DIRİCAN, V. BAYOGLU, Y. KUCUKZEYBEK, A. ALACACIOGLU, A. O. CALLI & M. O. TARHAN, Prognostic Evaluation of Breast Cancer Patients with Evident Bone Marrow Metastasis, BREAST JOURNAL, 2014, 1075-122X, 20, 3, 9.

A. O. CALLI, M. TUNAKAN, H. KATILMIS, S. KILCIKSIZ & S. OZTURKCAN, Soft Tissue Giant Cell Tumor of Low Malignant Potential of the Neck: A Case Report and Review of the Literature, TURKISH JOURNAL OF PATHOLOGY, 2014, 1018-5615, 30, 1, 5.

B. B. KUCUKZEYBEK, A. O. CALLI, Y. KUCUKZEYBEK, S. BENER, Y. DERE, A. DIRİCAN, K. B. PAYZIN, F. OZDEMIRKIRAN & M. O. TARHAN, The prognostic significance of bone marrow metastases: Evaluation of 58 cases, INDIAN JOURNAL OF PATHOLOGY AND MICROBIOLOGY, 2014, 0377-4929, 57, 3, 4.

A. GURBUZ, U. YETKİN, K. C. CEYLAN, A. O. CALLI & I. YUREKLİ, Concomitant giant cardiopericardial and right pulmonary hydatid cysts, TURK GOGUS KALP DAMAR CERRAHISI DERGISI-TURKISH JOURNAL OF THORACIC AND CARDIOVASCULAR SURGERY, 2013, 1301-5680, 21, 3, 3.

O. KARAASLAN, G. CALISKAN, O. K. SILISTRELI, E. SONMEZ & A. O. CALLI, KIMURA'S DISEASE: TWO CASE REPORTS AND REVIEW OF THE LITERATURE, TURKISH JOURNAL OF PLASTIC SURGERY, 2013, 1300-6878, 21, 3, 4.

A. O. CALLI, Y. MORGUL, I. ALACACIOGLU, S. BENER & B. PAYZIN, Langerhans Cell Sarcoma of the Axillary Lymph Node: A Case Report and Review of the Literature, TURKISH JOURNAL OF HEMATOLOGY, 2013, 1300-7777, 30, 2, 6.

B. B. KUCUKZEYBEK, S. BENER, A. O. CALLI, T. D. PAKSOY & B. PAYZIN, Prognostic Significance of Bcl-2 and p53 Protein Expressions and Ki67 Proliferative Index in Diffuse Large B-cell Lymphoma, TURKISH JOURNAL OF HEMATOLOGY, 2013, 1300-7777, 30, 3, 8.

T. REZANKO, A. A. SARI, M. TUNAKAN, A. O. CALLI & A. A. ALTINBOGA, Epithelioid schwannoma of soft tissue: unusual morphological variant causing a diagnostic dilemma, ANNALS OF DIAGNOSTIC PATHOLOGY, 2012, 1092-9134, 16, 6, 6.

A. O. CALLI, T. REZANKO, S. YIGIT & B. PAYZIN, Lymphoma of the cervix: A diagnostic pitfall on cervicovaginal smear, JOURNAL OF CYTOLOGY, 2012, 0970-9371, 29, 3, 3.

A. O. CALLI, A. SARI, F. CAKALAGAOGU, A. A. ALTINBOGA, C. CALLI & S. ONCEL, Mast cells positive for cluster of differentiation 117 protein: are they players or conductor in the orchestra of cholesteatoma?, JOURNAL OF LARYNGOLOGY AND OTOTOLOGY, 2012, 0022-2151, 126, 8, 5.

A. AKSOY-ALTINBOGA, A. A. SARI, T. REZANKO, M. HACIYANLI & A. O. CALLI, Parathyromatosis: Critical Diagnosis Regarding Surgery and Pathologic Evaluation, KOREAN JOURNAL OF PATHOLOGY, 2012, 1738-1843, 46, 2, 4.

A. O. CALLI, A. SARI, F. CAKALAGAOGLU, A. A. ALTINBOGA & S. ONCEL, ETS-1 proto-oncogene as a key newcomer molecule to predict invasiveness in laryngeal carcinoma, PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE, 2011, 0344-0338, 207, 10, 6.

A. O. CALLI, A. SARI, G. EVCIM, A. ALTINBOGA, C. SADULLAHOGLU & M. ERMETE, The enigmatic role of nucleophosmin in malignant melanoma: Does it have an effect?, INDIAN JOURNAL OF PATHOLOGY AND MICROBIOLOGY, 2011, 0377-4929, 54, 3, 5.

M. A. TUNCBILEK, C. CALLI, S. ONCEL, E. PINAR & A. O. CALLI, Investigation of HPV Infection and P53 Expression in Laryngeal Verrucous Carcinoma, TURKIYE KLINIKLERI TIP BILIMLERI DERGISI, 2010, 1300-0292, 30, 1, 7.

C. CALLI, K. TUGYAN, S. ONCEL, E. PINAR, F. DEMIRTASOGLU, A. O. CALLI, B. TOLON, O. YILMAZ & A. KIRAY, Effectiveness of Royal Jelly on Tympanic Membrane Perforations: An Experimental Study, JOURNAL OF OTOLARYNGOLOGY-HEAD & NECK SURGERY, 2008, 1916-0216, 37, 2, 6.

A. GURBUZ, U. YETKIN, H. YASA, M. AKSUN & A. O. CALLI, Giant right femoral pseudoaneurysm - Diagnosed 7 years after cardiac catheterization, TEXAS HEART INSTITUTE JOURNAL, 2008, 0730-2347, 35, 2, 2.

O. TETIK, U. YETKIN, A. O. CALLI, G. ILHAN & A. GURBUZ, Occlusive Arterial Disease after Radiotherapy for Testicular Cancer: Case Report and Review of the Literature, VASCULAR, 2008, 1708-5381, 16, 4, 3.

U. YETKIN, G. ILHAN, A. O. CALLI, M. YESIL & A. GURBUZ, Severe calcific chronic constrictive tuberculous pericarditis, TEXAS HEART INSTITUTE JOURNAL, 2008, 0730-2347, 35, 2, 2.

S. KILCIKSIZ, T. GOKCE, A. BALOGLU, A. CALLI, C. KAYNAK, B. KILIC, E. ESKI, G. NALBANTOGLU & H. A. YIGITBAS, Characteristics of synchronous- and metachronous-type multiple primary neoplasms: A study of hospital-based cancer registry in Turkey, CLINICAL GENITOURINARY CANCER, 2007, 1558-7673, 5, 7, 8.

S. C. KILCIKSIZ, C. KAYNAK, E. ESKI, O. YERSAL, I. UNLU, A. CALLI, A. SARI, A. BALOGLU, G. NALBANTOGLU & H. A. YIGITBAS, Evaluation of multiple primary tumors and single tumors characteristics: a study from hospital-based cancer registry in Izmir, TURK ONKOLOJİ DERGISI-TURKISH JOURNAL OF ONCOLOGY, 2007, 1300-7467, 22, 2, 8.

C. OZBEK, B. EMRECAN, A. O. CALLI & A. GURBUZ, Intimal sarcoma of the pulmonary artery - with retrograde extension into the pulmonic valve and right ventricle, TEXAS HEART INSTITUTE JOURNAL, 2007, 1526-6702, 34, 1, 3.

A. O. CALLI, M. ERMETE, A. SARI, A. AKKALP & A. C. YILDIZ, Giant Cell Fibroblastoma: Case Report, ERCIYES MEDICAL JOURNAL, 2006, 2149-2247, 28, 2, 4.

A. O. CALLI, M. DOGAN, M. T. OZTOP, T. DOGRULUK & K. YORUKOGLU, Ossifying Fibromyxoid Tumor: A Case Report, ERCIYES MEDICAL JOURNAL, 2006, 2149-2247, 28, 3, 3.

A. O. CALLI, M. A. UYAROGLU, A. SARI, M. ERMETE & K. BAL, SMALL CELL CARCINOMA OF BLADDER: A CASE REPORT, TURKISH JOURNAL OF UROLOGY, 2005, 2149-3235, 31, 4, 3.

U YETKİN, A ORGENÇALLI, G YUNCU & A GURBUZ, Large mediastinal teratoma originating from the aortic adventitia, TEXAS HEART INSTITUTE JOURNAL, 2004, 0730-2347, 31, 3, 4.

L YİLİK, N. OZSOYLER, N YAKUT, B EMRECAN, H YASA, A. ÇALLI & A GURBUZ, Passive infusion - A simple delivery method for retrograde cardioplegia, TEXAS HEART INSTITUTE JOURNAL, 2004, 0730-2347, 31, 4, 6.

Bildiriler

A. O. ÇALLI & K. KURT, A case report: balloon cell malignant melanoma. , Poster Presentation, 35th European Congress of Pathology, 09 Eylül 2023, 13 Eylül 2023.

K. KURT, A. ORGEN ÇALLI & A. SARI, Incidence and clinicopathological features of mismatch repair deficient (MMR-d) endometrioid type endometrial adenocarcinomas:a tertiary single-centre data from Turkey. , Poster Presentation, 35th European Congress of Pathology, 09 Eylül 2023, 13 Eylül 2023.

A. O. ÇALLI, G. ISSIN, İ. YILMAZ, D. İNCE, İ. GÜZELİŞ, E. TURAL, R. E. ÇEÇEN, H. N. OLGUN, D. KABAKÇI & E. ÖZER, The association of mir-204 and mir-483 5p expression with clinicopathological features of Wilms tumour: could provide foresight? , Poster Presentation, 35th European Congress of Pathology, 03 Eylül 2022, 07 Eylül 2022.

A. O. ÇALLI, Fascin Positive Desmoplastic Melanoma:5 case reports. , Poster Sunumu, International Molecular Medicine Symposium by the Bosphorus , 16 Mayıs 2019, 18 Mayıs 2019.

D. Ö. BÜYÜKTALANCI, E. ÇAKIR, B. BOLAT KÜÇÜKZEYBEK, S. D. ALTINDAĞ, A. ORGEN ÇALLI, S. BENER, A. F. YILMAZ & H. D. KİPER ÜNAL, Anatomic distribution and histological subtypes of primary gastrointestinal lymphomas a preliminary study. , Poster Sunumu, 30th European Congress of Pathology , 08 Eylül 2018, 12 Eylül 2018.

N. D. AKTAŞ, S. Ş. UYSAL, K. H. KELEKÇİ & A. ORGEN ÇALLI, Subungual Melanoma: a case report. , Poster Sunumu, 2nd International Dermatology and Cosmetology Congress , 15 Mart 2017, 18 Mart 2017.

F. YILMAZ, T. YÜKSEL, F. GEDİZ, A. ORGEN ÇALLI, F. H. DİLEK, F. ŞENGÜL & K. B. PAYZIN, Common Symptom Due to a Rare Diagnosis in Elderly Men: Chronic Lymphocytic Leukemia and Mantle Cell Lymphoma Involvement of the Prostate., Poster Sunumu, VII. International Eurasian Hematology Congress VI. Uluslararası Avrasya Hematoloji Kongresi , 13 Ekim 2016, 16 Ekim 2016.

F. DİRİLENOĞLU, A. F. YILMAZ, E. KAYA, E. KALENDER, F. ÖZDEMİRKIRAN, B. BOLAT KÜÇÜKZEYBEK & A. ORGEN ÇALLI, CD56 and EMA immunoexpressions in multiple myeloma: Any prognostic relevance? , Poster Sunumu, 27th European Congress of Pathology, 05 Eylül 2015, 09 Eylül 2015.

F. ÖZDEMİRKIRAN, E. ÇOBAN, B. BOLAT KÜÇÜKZEYBEK, A. F. YILMAZ, A. ORGEN ÇALLI & K. B. PAYZIN, Primary Breast Lymphoma; Single Center Experience. , Poster Sunumu, 5th International Congress on Leukemia Lymphoma Myeloma, 21 Mayıs 2015, 23 Mayıs 2015.

F. , E. ÇOBAN, A. F. YILMAZ, B. BOLAT KÜÇÜKZEYBEK, A. ORGEN ÇALLI & K. B. PAYZIN, Primary Thyroid Lymphoma; Single Center Experience, Poster Sunumu, 5th International Congress on Leukemia Lymphoma Myeloma, 21 Mayıs 2015, 23 Mayıs 2015.

A. O. ÇALLI, İ. YILMAZ, M. A. UYAROĞLU, T. REZANKO, F. H. DİLEK & E. AYDIN, The Analysis of BRAF and N-RAS Mutation in Spindle and Desmoplastic Melanoma. , Poster Sunumu, International Congress of Molecular Medicine,, 20 Mayıs 2015, 22 Mayıs 2015.

U. YETKİN, S. YAZMAN, K. DÖNMEZ, Z. İ. AKYILDIZ, A. ORGEN ÇALLI, Ö. ASLAN, H. MOLLAMEHMETOĞLU & A. GÜRBÜZ, Two separate giant pericardial cysts located at both cardiophrenic sinuses within anterior pericardium of the same case, Poster Sunumu, 24th Annual World Congress of the WSCTS , 06 Eylül 2014, 10 Eylül 2014.

E. ÇELİK, U. YETKİN, İ. YÜREKLİ, K. DÖNMEZ, K. ERGÜNEŞ, A. ORGEN ÇALLI & A. GÜRBÜZ, A giant expanding brachial artery pseudo aneurysm maturing one year after coronary catheterization., Poster Sunumu, International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery, 24 Nisan 2014, 27 Nisan 2014, 360 - null.

U. YETKİN, H. ÇAKIR, S. YAZMAN, İ. YÜREKLİ, Z. İ. AKYILDIZ, A. ORGEN ÇALLI, K. ERGÜNEŞ & A. GÜRBÜZ, A case with extraordinary giant fibrillary right ventricular myxoma extending to the pulmonary artery. , Poster Sunumu, 22. Annual Congress (Meeting) Of The Asian Society For Cardiovascular And Thoracic Surgery , 03 Nisan 2014, 06 Nisan 2014, 386 - null.

Yönetilen Tezler

L. G. MUSTAFA (Tez Yazarı) , A. ÇALLI (Tez Danışmanı) , Endometrioid tipte endometrial adenokarsinomlarda figo derecelendirmesi, ikili derecelendirme ve modifiye nottingham derecelendirme önerileri, interobserver uyum oranları ve bu sistemlerin prognostik prediktif değerleri, 2019.

Y. DERE (Tez Yazarı) , A. ÇALLI (Tez Danışmanı) , Nodal difüzyonlu B hücreli lenfomalarda NM23 ve P27 ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle korelasyonu ve prognoza etkisi?, 2011.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0