



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÖBREK KANSERİNDE *VHL*, *PBRM1* VE *SETD2* GENLERİ TANIYA
UYGUN BELİRTEÇ MİDİR? MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

ROZHGAR ABDULLAH MOHAMMED

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ

Gaziantep

2013

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BÖBREK KANSERİNDE *VHL*, *PBRM1* VE *SETD2* GENLERİ TANIYA
UYGUN BELİRTEÇMİDİR? MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

ROZHGAR ABDULLAH MOHAMMED

Tez Savunma Tarihi: 05.11.2013

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr.Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ

Tez Danışmanı

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

Tez Jürisi İmzası

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK

Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ

BEYAN

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

05.11.2013

ROZHGAR ABDULLAH MOHAMMED

TEŞEKKÜR

Öncelikle sahip olduğum her şey için Yüce Allah’a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmam süresince, bana yardım eden ve desteklerini esirgemeyen herkese teşekkür ederim. Destek, yardım ve yönlendirmelerinden dolayı danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ’ye teşekkür ederim. Yardım ve desteklerinden dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Ahmet ARSLAN’a, değerli öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya İĞCİ, Yrd. Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI’yasansuz teşekkürlerimi sunarım. Yardımlarından dolayı Emine BAYRAKTAR, Esra GEYİK, Recep BAYRAKTAR ve İbrahim BOZGEYİK’e teşekkür ederim.

Son olarak rüyalarımı gerçekleştirmem için bana her zaman destek olan ve yardım eden değerli aileme ve beni destekleyen ve yardım eden bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE VE KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ.....	x
RESİM LİSTESİ.....	xi
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Kanser	6
2.2. Kanserin Ayırıcı Özellikleri.....	7
2.3.Kanserin Genetik ve Epigenetik Nedenleri.....	8
2.3.1. Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler	8
2.3.2. Epigenetik değişimler	8
2.4. Böbrek Anatomisi	9
2.5. Böbrek Fizyolojisi.....	11
2.6. Böbrek Kanseri	11
2.6.1. Böbrek tümörlerinin çeşitleri	11
2.6.2. Böbrek kanserinin epidemiyolojisi	12
2.6.3. Böbrek kanserlerinin risk faktörleri	12
2.6.4. Böbrek tümörü patolojisi	13
2.6.5. Böbrek kanserinin evreleri	14
2.7. Böbrek Kanserinde Oluşan Moleküler Değişiklikler	17
2.7.1. Kalıtsal RCC	17
2.7.2. Sporadik renal hücreli karsinom	18
2.8. RCC'nin Epigenetiği.....	18
2.9. Von Hippel-Lindau (VHL) Geni	20
2.9.1. VHL geninin yapısı ve işlevi	20

2.9.2. <i>VHL</i> Geni Mutasyonları	21
2.9.3. HIF'in <i>VHL</i> aracılığı ile düzenlenmesi.....	21
2.9.4. <i>VHL</i> geni yolağı	21
2.10. <i>Polibromo 1</i> Geni (<i>PBRM1</i>)	22
2.10.1. <i>PBRM1</i> geninin yapısı	22
2.10.2. <i>PBRM1</i> 'in İşlevi	23
2.10.3. <i>PBRM1</i> genindeki mutasyonlar	23
2.11. SET Domain İçeren Protein 2 Geni (<i>SETD2</i>)	24
2.11.1. <i>SETD2</i> geninin yapısı ve işlevi	24
2.11.2. <i>SETD2</i> geninde meydana gelen mutasyonlar.....	25
2.12. Böbrek Kanseri İle İlişkilendirilmiş Diğer Genler.....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Örneklerin Toplanması	27
3.2. Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	29
3.3. RNA Eldesi	32
3.4. Tamamlayıcı DNA sentezi.....	34
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	35
2.5.2. PCR iyileştirilmesi (Optimization)	36
3.6. GAPDH çoğaltımı.....	38
3.7. Elektroforez	39
3.9. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm (SSCP) Yöntemi	41
3.9.1.1. Camların hazırlanması.....	41
3.9.1.2. Poliakrilamid jelin hazırlanması.....	42
3.9.1.3. Yükleme için örneklerin hazırlanması	42
3.9.1.4. PAGE jeldeki örneklerin boyanması	42
3.10. PCR Dizileme yöntemi	43
3.10.1. Dizileme öncesi hazırlık aşaması	43
3.10.1.1. PCR ürünlerinin ExoSAP ile temizlenme protokolü	43
3.10.1.2. Döngüsel Dizileme Tepkimesi	44
3.10.1.3. PCR ürünlerini temizlemek için Sephadex spin-kolon protokolü	44

3.11. Gen ifade analizi ölçümü	45
3.12. İstatistiksel analizler	46
4. BULGULAR	47
4.1. Gen İfadesi Sonuçları.....	47
4.2. SSCP sonuçları	53
4.3. Dizileme sonuçları	54
5. TARTIŞMA.....	58
6. KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	1

SİMGİ VE KISALTMALAR

RCC	Renal hücreli karsinom
VHL	Von Hippel- Lindau
HPRC	Kalıtsal Papiller Renal kanser
HLRCC	Kalıtsal leiomyomatozis renal kanser
BHD	Birt-Hogg-Dubé
pVHL	Von Hippel- Lindau protein
HIF	Hipoksi indüklenbilir faktör
Rbx1	Ring-Box 1
EPAS1	Endotel PAS domain-içeren protein 1
PBRM1	polibromodomain 1
SETD2	SET domain-içeren protein 2
BAF180	BRG1-ilişkili faktor 180
SWI/SNF	SWItch/sukroz NonFermentable
mRNA	Mesajcı RNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
CpG	Sitosin-fosfat-guanin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
TNM	Tümör Nod Metastaz
AJCC	Amerikan Ortak Kanser Komitesi

IVC	Inferior vena cava
FRC	Ailesel renal kanser
mTOR	Rapamisinin memeli hedefi
TSC1	Tuberoskleroz 1
TSC2	Tuberoskleroz 2
JARID1C	Jumonji/ARID domain-içeren protein 1C
MLL2	Miyeloid / Lenfoid veya Karışık Lineage Lösemi 2
KDM5C	Lizin (K)-spesifik demetilaz 5C
KDM6A	Lizin (K)-spesifik demetilaz 6A
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
PDGF	Trombositten Türetilmiş Büyüme Faktörü
TGF α	Büyüme Faktörü Dönüşümü α
Cul2	Cullin-2
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
GLUT1	glikoz transporte 1
ATP	Adenozin-5'-trifosfat
HMG	Human Molecular Genetics
ccRCC	Berrak hücreli renal hücre karsinomu
BD1-6	Bromo Domain 1-6
BAH2	Bromo-Adjacent Homology Domains 2

HMG	Yüksek Mobilite Grubu domaini
H3	Histon 3
POLR2A	Polymeraz (RNA) II (DNA Directed) Polipeptid A
NF2	Nörofibromatoz 2 geni
MET	Mezenkimal-epitel geçiş
HGFR	Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptör
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
S6K1	Ribosomal protein S6 kinaz beta-1
EIF4EBP1	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E-bağlayıcı protein 1
EDTA	etilendiamintetraasetik asit
TBE	Tris-borat-EDTA
SSCP	Tek zincirli Konformasyon Polimorfizmi
RNA	Ribonukleik asit
RLT	RNAasy Lizis Doku
cDNA	Komplementer DNA
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
AB	Applied Biosystem
MJ	Master of Journalism
EtBr	etidyum Bromür
TEMED	Tetrametiletildiamin

APS	Amonyum Persülfat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pRCC	Papiler Renal hücreli karsinom
S100A1	S100 kalsiyum bağlayıcı protein a1
AKT	V-akt fare timoma viral onkogen (Protein Kinaz B)
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz
MAPK	Mitojen ile aktive olan protein kinaz
c-Myc	Myelocytomatosis Viral Onkogen Homolog
LOH	Heterozigosite kaybı
p53	Protein p53
DLEC1	Deleted In Lung And Esophageal
miRNA	MikroRNA
PAGE	polyacrilamid jel elektroforezi
Exo-Sap	Exonuclease I -Shrimp Alkaline Phosphatase
Pb1	Protein polybromo-1
UTX	Ubiquitously-Transcribed Protein On The X Chromosome TPR

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kanserin ayırıcı özellikleri: kanserin altı ayırt edici niteliğinin gösterimi (24).	7
Şekil 2.2. Böbreğin boyuna kesiti (30).	10
Şekil 2.3. Renal nefronun morfolojik yapısının görünümü (4).	14
Şekil 2.4. Renal hücreli karsinomun TNM evrelemesinin şematik gösterimi (37). A, Evre T1 tümör < 7 cm. B, Evre T2 tümör > 7 cm. C ve D, Evre T3a preinefrik yağı içeren tümörsler (C) ve komşu adrenal bezi (D). E, Evre T3b renal ven veya inferior vena kava içeren tümör (IVC) diyaframa inferior. F, Evre T3c tumor diyaframa superior IVC içeren tümör.	15
Şekil 2.5. RCC genetiğinde rol alan Histon 3 modifikasyonlarının gösterimi (43).	19
Şekil 2.6. Kromozom 3'te <i>VHL</i> geninin yerleşimi (16).	20
Şekil 2.7. Von Hippel-Lindau gen ve protein yapısı. A) <i>VHL</i> geni üç ekzondan oluşur (gri). B) <i>VHL</i> proteinin yapısı, GXEEX 8 tekrar motif (pembe), α -domain (mor) ve β -domain (mavi) (13).	20
Şekil 2.8. RCC ile ilişkili yolların sinyal iletim özeti (12).	22
Şekil 2.9. Kromozom 3'te <i>PBRM1</i> geninin yerleşimi (16).	23
Şekil 2.10. <i>PBRM1</i> (BAF180) proteinin şematik gösterimi. BD1-6: Bromodomain 1-6; BAH1 ve BAH2: bromo-bitişik homoloji domain 1 ve 2; HMG; Mobilite grup domain. (17).	24
Şekil 2.11. Kromozom 3'te <i>SETD2</i> geninin yerleşimi (16).	25
Şekil 3.1. Üreli denatüre poliakrilamid jel sonuçları Image J (v1.46r) programı ile ölçülmüştür.	45

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. RCC'nin TNM Evrelemesi; Amerikan Kanser Ortak Komitesinin mevcut sürümünden uyarlanmıştır.	16
Tablo 2.2. TNM evre grupları.....	16
Tablo 2.3. Böbrek kanserinin kalıtsal sendromları: kromozomal yerleşim, etkilenen genler ve yolaklar.....	17
Tablo 2.4. Renal hücreli tümörlerin en sık görülen alt tipleri: frekans ve kromozomal değişiklikler.	18
Tablo 3.1. Böbrek kanseri tipi ve cinsiyetine göre hasta örneklerinin toplam sayısı.	28
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar, markaları ve üreticileri.	29
Tablo 3.3. Kullanılan kimyasallar, markaları ve üreticileri.	30
Tablo 3.4. Kullanılan çözeltiler ve kimyasal içerikleri.	31
Tablo 3.5. Toplam RNA miktarları ve kalitesi.	32
Tablo 3.6. cDNA sentezi bileşenleri ve miktarları.....	34
Tablo 3.7. cDNA sentez enzimlerinin bileşenleri.	35
Tablo 3.8. Primer dizileri, <i>VHL</i> , <i>PBRM1</i> ve <i>SETD2</i> genlerinin hedef bölge PCR ürün uzunlukları ve optimum bağlanma sıcaklıkları.....	36
Tablo 3.9. PCR reaksiyonun bileşenleri ve 25µL toplam hacimdeki miktarları.....	36
Tablo 3.10. Gradient PCR Koşulları	37
Tablo 3.11. PCR reaksiyonun bileşenleri ve 25µL toplam hacimdeki miktarları.....	38
Tablo 3.12. <i>GAPDH</i> PCR koşulları.	39
Tablo 3.13. Üreli poliakrilamid jel bileşenleri	40
Tablo 3.14. ExoSAP ile PCR ürünlerini temizleme koşulları.....	43
Tablo 3.15. Her bir reaksiyon için döngüsel dizileme protokolü aşağıdaki şekildedir. .	44
Tablo 3.16. Dizileme PCR tepkimesi için ısı koşulları.....	44
Tablo 3.17. PCR ürünlerini temizlemek için hazırlanan Sephadex spin-kolonların bileşenleri.....	44

RESİM LİSTESİ

- Resim 3.1.** % 2'lik agaroz jel elektroforezi ve etidiyum bromür boyaması analiz edilen gradient PCR ürünlerinin görüntüleri. M: Marker (100 bp). Ürün bağlanma sıcaklığı bütün reaksiyonlar için numara 3 olarak seçilmiştir. 37
- Resim 4.1.** *PBRM1* geninin % 7'lik üreli poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş nitrat ile boyama sonuçları. Bantlar ifade seviyesinin miktarını göstermektedir, kırmızı renkler normal ve tümör örneklerinin numaralarıdır.47
- Resim 4.2.** *SETD2* geninin % 7'lik üreli poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş nitrat ile boyama sonuçları. Bantlar ifade seviyesinin miktarını göstermektedir, kırmızı renkler normal ve tümör örneklerinin numaralarıdır.47
- Resim 4.3.** *VHL* geninin % 7'lik üreli poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş nitrat ile boyama sonuçları. Bantlar ifade seviyesinin miktarını göstermektedir, kırmızı renkler normal ve tümör örneklerinin numaralarıdır.48
- Resim 4.4.** *GAPDH* geninin % 17'lik üreli poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş nitrat ile boyama sonuçları. Bantlar ifade seviyesinin miktarını göstermektedir, kırmızı renkler normal ve tümör örneklerinin numaralarıdır.48
- Resim 4.5.** *SETD2* geni için gümüş nitrat boyama sonrası % 7'lik poliakrilamid jel görüntüsü. SSCP sonucunda farklı bantlar (genotipler) gözlemlenememiştir.53

ÖZET

BÖBREK KANSERİNDE *VHL*, *PBRM1* VE *SETD2* GENLERİ TANIYA UYGUN BELİRTEÇ MİDİR? MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ROZHGAR ABDULLAH MOHAMMED

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tez danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ
Kasım 2013, 68 sayfa

Böbrek kanseri ürolojik kanserlerin en ölümcül olanıdır ve yetişkin malignitelerin % 3' ünü oluşturur. Böbrek kanseri tek bir hastalık olmakla birlikte renal hücreli tümörler dahil olmak üzere farklı birçok türü bulunmaktadır. *VHL* geni RCC ile ilişkisi olduğu bilinen tümör baskılayıcı bir gendir. *VHL*, hipoksi indüklenebilir faktörlerin bir negatif düzenleyicisi olarak fonksiyon gösterir. Son zamanlarda yapılan dizi analizi çalışmalarında, ccRCC'de histon modifikasyonunda ve kromatin şekillenmesinde görev alan *PBRM1* ve *SETD2* gibi genlerde birçok yeni ve sık görülen mutasyonlar tanımlanmıştır. *PBRM1* geni, tümör baskılayıcı olan *VHL* geninden sonra en çok mutasyon görülen ikinci gendir. Bu gen, belirli genlerin transkripsiyonel aktivasyonunda ve baskılanmasında görev alan BAF180 proteinini kodlamaktadır. *SETD2* geni, histon H3'ün 36. pozisyonundaki lizin amino asitinin trimetilasyonundan sorumlu bir histon metiltransferazı kodlamaktadır. Aynı zamanda tümör gelişiminde baskılayıcı bir rol alabilir. Bu çalışmada, böbrek kanseri çeşidine ve hastaların cinsiyet, ortalama yaş gibi klinik özelliklerine göre gruplanan 30 çift örnek, gen ifadesi, SSCP ve Sanger dizileme teknikleri ile analiz edilmiştir. *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* genlerinin aşağı yönlü düzenlendiği bulunmuştur. Ancak, Wilcoxon testi ile yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir sonuca varılamamıştır ($p>0,05$). Yapılan mutasyon taraması sonuçlarına göre farklı bir genotip saptanamamıştır. Sonuç olarak, taranan üç genin mRNA seviyesinde düşüş görülmüştür. RCC'nin patogenezinde görev alan moleküler mekanizmaların anlaşılması, böbrek kanseri moleküler hedefli ilaçların geliştirilmesi adına önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek kanseri, *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, Gen ifadesi analizleri, Mutasyon taraması

ABSTRACT

ARE *VHL*, *PBRM1* AND *SETD2* GENES DISTINCTIVE DIAGNOSTIC MARKERS FOR KIDNEY CANCER? A MOLECULAR INVESTIGATION

ROZHGAR ABDULLAH MOHAMMED
Master's thesis, Department of Medical Biology
Supervisor: Asist. Prof. Dr. Mehri IGCI
November 2013, 68 Pages

Kidney cancer is the most lethal urological cancer and accounts for 3% of adult malignancies. Kidney cancer is not a single disease; it is made up of a number of different types including renal cell tumours as the most common type. *VHL* gene is a tumor suppressor, it is best known with RCC. The *VHL* functions as negative regulator of hypoxia inducible factors. Recent sequencing efforts have identified several novel frequent mutations of histone modifying and chromatin remodeling genes in ccRCC including *PBRM1* and *SETD2*. The *PBRM1* gene is the second most common mutated gene after *VHL*, a tumor suppressor gene. It encodes the BAF180 protein, which involved in transcriptional activation and repression of selected genes. *SETD2* encodes a histone methyltransferase, which is responsible for trimethylation of the lysine residue at position 36 of histone H3 and may play a role in suppressing tumor development. In this study, 30 paired tumor and normal samples that were grouped according to the types of kidney cancer and clinical characteristics of patients, including gender and average age were observed with gene expression analysis, SSCP and sequencing technique. Three of genes *VHL*, *PBRM1* and *SETD2* were relatively downregulated. However, statistically no significance found by Wilcoxon signed rank test ($p > 0,05$). As a result of gene screening no mutation (no different genotype) was observed. In conclusion, the mRNA expression levels of three genes were insignificantly downregulated. Understanding the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of RCC has aided the development of molecular-targeted drugs for kidney cancer.

Keywords: Kidney cancer, *VHL*, *PBRM1*, *SETD2*, Expression analysis, Mutation screening

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Böbrek kanseri terimi, böbrekte ve renal pelviste ortaya çıkan herhangi bir kanser anlamına gelmektedir (1). Ancak, meydana genel birçok tümör, böbreğin filtrasyon kısmında yer alan tübüllerdeki hücrelerden oluşan renal hücreli karsinomlardır (RCC; Renal cell carcinoma) (1). Böbrek kanseri, ürolojik kanserler arasında en yaygın üçüncü ve bütün kanser türleri arasında yedinci sırada yer almaktadır (1). Dünya çapındaki görülme sıklığı, her yıl 209 000 yeni vaka ve 102 000 ölüm vakasıdır (2). Hem kadınlarda hem erkeklerde görülmekle beraber, erkeklerde 1,5 kat daha fazla görülmektedir (1,3). İnsanlarda böbrek kanserlerinin büyük bir kısmını (% 80-85) renal parankimden oluşan renal RCC'dir (4). Geriye kalan kısmının büyük çoğunluğu (% 15-20) renal pelvis tranzisyonel hücreli karsinom oluştururken, anjiyomiyolipom, nefroblastoma (Wilms Tümörü) gibi diğer neoplazmalar nadir olarak görülmektedir (4,5). Çocuklarda en sık görülen böbrek kanseri, özgün genetik anormallikler ve biyolojik davranış gösteren Wilms tümörüdür (6).Yapılan çalışmalarda böbrek kanserinin, cinsiyet, yaş, tütün, obezite, aile öyküsü, hipertansiyon, diyet ve çeşitli boyalara maruz kalmayı içeren çalışma şartları gibi birçok risk faktörü ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (7,8). Böbrek kanseri olan hastalar genellikle çok az belirti göstermektedirler (1,9). Hastalık erken safhada tanımlanırsa tedavisi vardır, ancak metastatik böbrek kanserleri genellikle ölümcüldür (1,9).

RCC, renal tübül epitelinde oluşan kanserler için kullanılan bir terimdir. RCC, genetik ve morfolojik özelliklerine bağlı olarak ayırt edilebilen; berrak hücreli RCC, papiller RCC, kromofob RCC ve böbrek onkositom olmak üzere dört ana histopatolojik durumdan oluşur (2,5). Birçok RCC vakası sporadiktir ve hastaların % 4'üne kadarında ise kalıtsal yatkınlık vardır. Bu vakalar arasında von Hippel-Lindau (VHL) hastalığı, kalıtsal papiller böbrek kanseri (HPRC), kalıtsal leiomyomatozis ve böbrek kanseri (HLRCC) ve Birt-Hogg-Dube (BHD) sendromu yer almaktadır (10). RCC'nin kalıtsal sendromlarına sebep olan genlerin belirlenmesi, sporadik RCC hakkında moleküler bilgilerin temelini oluşturur (2). Genomda yapılan çalışmalar, farklı RCC alt tipleri ile ilişkili yaygın genetik varyantların anlaşılmasını sağlamıştır (11). Sporadik yetişkin RCC'ye yol açan moleküler mekanizmalar kapsamlı ve karmaşıktır (11).

RCC ile ilişkili olduğu en çok bilinen gen von Hippel-Lindau (*VHL*) genidir. Bu geninin inaktivasyonu kalıtsal ve sporadik berrak hücreli RCC vakaların neredeyse % 100'ünü oluşturmaktadır (12). Bu gen; göz, beyin, omurilik, böbrek, pankreas ve böbreküstü bezleri kanseri ile eşlik eden ailesel bir sendrom olan VHL hastalığı ile ilişkilendirilmiş lokustan pozisyonel klonlama ile belirlenmiştir (12).

Tümör baskılayıcı olan *VHL* geni, 3. kromozomun kısa kolunda (3p25-26) yer almaktadır (13). 10 kb uzunluğunda olan bu gen üç ekzondan oluşmaktadır ve iki tane protein (pVHL19 ve pVHL30) kodlamaktadır (13). *VHL* proteini 214 amino asitten oluşmakta ve α ve β domeinleri olmak üzere iki tane yapısal domein içermektedir (13). *VHL*, hipoksiye karşı hücrel cevapta yer alan genleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörü ailesi olan hipoksi indüklenebilir faktörlerin (HIF) negatif düzenleyicisidir (14). pVHL'lerin en iyi tanımlanmış fonksiyonu, pVHL, Elongin C, Elongin B, Cullin 2 ve Rbx1'den oluşan E3 ubiquitin protein ligaz kompleksinin substrat tanıma bileşeni olarak görev almasıdır (13). Bu komplekste, pVHL ubiquitin aracılı proteoliziz için hipoksi indüklenebilir faktör 1 (HIF-1 α) ve hipoksi indüklenebilir faktör 2 (HIF-2 α , ayrıca EPAS1 olarakta bilinir) transkripsiyon faktörlerinin α alt ünitesini hedeflemektedir (13).

Son zamanlarda yapılan dizi analizi çalışmalarında, ccRCC'de histon modifikasyonunda ve kromatin şekillenmesinde görev alan *PBRM1* ve *SETD2* gibi genlerde birçok yeni ve sık görülen mutasyonlar tanımlanmıştır (15). *PBRM1* ve *SETD2* genleri, *VHL*'nin genellikle kayıp olan 3p lokusuna (yaklaşık % 90) yakın bir yerde bulunmaktadır (15).

Tümör baskılayıcı bir gen olan *PBRM1* geni, kromozom 3p21'de yer almaktadır ve BAF180 proteinini kodlamaktadır. BAF180 proteini, belirli genlerin transkripsiyonel aktivasyonunda ve baskılanmasında yer alan SWI/SNF kromatin şekillenme kompleksinin kromatin hedefleme alt ünitesidir (12,16). *PBRM1* hücre çoğalmasında negatif düzenleyici olarak görev alır (16). *PBRM1* mutasyonları ileri evredeki hastalarda yaygın olarak görülmektedir ve *PBRM1* protein ifadesindeki kayıp, ileri tümör evresi, düşük farklılaşma derecesi ve kötü hastalık seyri ile ilişkilendirilmiştir (17). *PBRM1* mutasyonları ve/veya protein ifadesindeki kayıp berrak hücreli RCC'nin büyük bir bölümünde gösterilmiştir (17). Bu nedenle *PBRM1* geni *VHL*'den sonra en sık mutasyona uğrayan ikinci genidir (15).

SETD2 geni, 3. kromozomun kısa (p) kolunda (3p21-31) yer almaktadır. Prematur terminasyon kodonlarını içeren ve histon H3'ün 36. pozisyonundaki lizin amino asitinin trimetilasyonundan sorumlu histon metiltransferazı kodlayan biriken transkriptlerin analizi sonucu bulunmuştur (12,18).

Son zamanlarda *SETD2* geninin yeni nesil dizileme (next-generation sequencing), mikrodizin tabanlı analizler ve fare transgen analizleri gibi ileri teknoloji metodları kullanılarak RCC ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (12).

Bu çalışmanın amacı, böbrek kanserinde moleküler tanı belirteçlerinin moleküler tekniklerle belirlenmesidir. Bu teknikler; *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin mRNA ifadesi ve mutasyon tarama analizlerini içermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

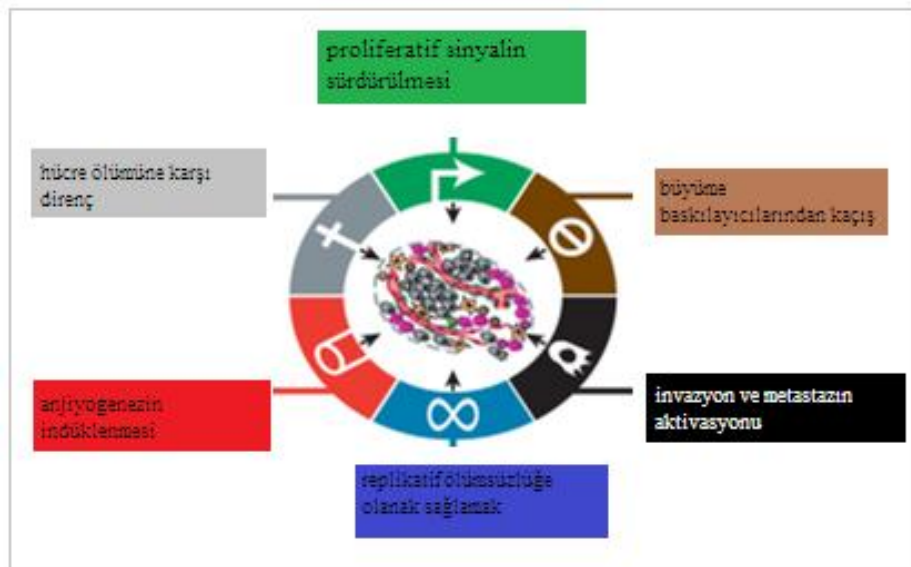
2.1. Kanser

Kanser, önemli bir halk sağlığı sorunu temsil eden yaygın bir hastalıktır (1). Kanser, primer lezyonda hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması ve metastatik hücrelerin oluşmasıdır (1). Bunlar çevredeki dokulara istila yeteneğine sahiptirler (1). Sistemik olarak yayılırlar ve ikincil lezyonları oluştururlar (1). Bu hastalık, belirli proto-onko genler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen somatik mutasyonların birikimi sonucu oluşan tek bir hücreden köken alan bir hastalıktır (1). Mutasyonların büyük çoğunluğu çevresel faktörlerden (vakaların % 90-95'i) oluşur, aynı zamanda kalıtsal faktörlerden kaynaklanmaktadır (19). Tütün, beslenme ve obezite, enfeksiyonlar, radyasyon, fiziksel aktivite eksikliği ve çevresel kirleticiler kansere sebep olan yaygın çevresel faktörlerdir (19). Bu çevresel faktörler hücrelerin genetik materyalinde anormalliklere sebep olmakta ya da bu anormallikleri arttırmaktadır (19). Bu düzenleyici genlerdeki kalıtsal ve kazanılmış anormallikler kontrolsüz hücre büyümesine ve kanser gelişimine yol açabilir (20). Kanser, aslında ilişkili bir grup hastalığı tanımlayan genel bir terimdir (20). Kanser, çabuk ortaya çıkabilirler, ancak bazı kanserlerin hasta için zararlı hale gelmesi uzun yıllar alabilir (20). Kanser, basitçe tek bir mutasyonu baz alarak anlaşılamaz (20). Bir mutasyonun etkileri bir hücrede diğer mutasyonların ortaya çıkması ile görülür ve mutant hücrelerin oluşması ile tümör ve hasta bazında görülür(20). Kanser, sınırlı kaynaklar için savaşan fenotipik ve genetik heterojen hücre populasyonlarını kapsayam karmaşık evrimsel bir sistemdir (21).

Kanser, vücudun herhangi bir dokusunda gelişebilir ve geliştiği organ veya hücre tipine göre isimlendirilir (22). Kanser tipleri geniş kategorilerde sınıflandırılabilir (22). Kanser ana kategorileri şu şekildedir: Karsinom; deri veya epitel hücrelerde (iç veya dış organ) ve dokularda oluşan kanserler, böbrek, akciğer ve meme gibi (22). Sarkoma; kemik, kıkırdak, yağ, kas, kan damarları ya da diğer bağ veya destekleyici doku hücrelerinde meydana gelen transformasyonlar sonucu oluşan kanserlerdir (22). Lenfoma veya miyelom: immun sistem hücrelerinde oluşan kanserlerdir (22). Lösemi kan üreten dokularda oluşan kanserlerdir (22).

2.2. Kanserin Ayırıcı Özellikleri

On yıl önce, Hanahan ve Weinberg onlarca yıllık yoğun kanser araştırmalarını özetleyen kanserin altı tane ayırıcı özelliğini tasvir etmişlerdir (23). Sağlıklı ve kanserli hücreler arasındaki fenotipik farklılıkları tanımlamışlardır (21). Kanserin ayırt edici özellikleri, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında gerekli olan altı biyolojik yetenek içermektedir (24). Ayırt edici özellikler, neoplastik hastalığın karmaşıklığını rasyonelize etmek için bir düzenleme ilkesi teşkil etmektedir (24). Bunlar, hücre ölümüne karşı direnç, proliferatif sinyalin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılarından kaçış, replikatif ölümsüzlüğe olanak sağlamak, anjiyogenezin indüklenmesi ve invazyon ve metastazın aktif olmasını içermektedirler (24,25). Bu ayırt edici özelliklerin altında genetik çeşitlilik üreten ve kazanılmasını hızlandıran genomik karasızlık, birçok ayırt edici fonksiyonu teşvik eden inflamasyon yatmaktadır (24). Son on yıldaki kavramsal ilerleme, bu listeye enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık yıkımından kaçınma gibi iki potansiyel ayırıcı özellik daha eklemiştir (24). Kanser hücrelerine ek olarak, tümörler karmaşık başka bir boyut sergilmektedirler: tümör mikroçevresini oluşturarak ayırıcı özelliğin kazanılmasına katkıda bulunan, görünüş olarak normal hücrelerden oluşan toplanmış bir repertuar içermektedir (24). Bu kavramların yaygın olarak uygulanabilirliğinin tanınması insan kanser tedavisi için yeni araçların geliştirilmesini etkileyecektir (24).



Şekil 2.1. Kanserin ayırıcı özellikleri: kanserin altı ayırt edici niteliğinin gösterimi (24).

2.3.Kanserin Genetik ve Epigenetik Nedenleri

2.3.1. Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler

Kanser genellikle, kanseri teşvik eden onkogenler ve önleyen tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki gen sınıfında oluşan mutasyonlar sonucunda meydana gelmektedir (4). Bu gibi mutasyonlar genin fonksiyonunda kayba ya da fonksiyonunun artmasına sebep olabilir (3). Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünün içinde ve dışındaki geçişlerin düzenlenmesinde rol olan ve terminal farklılaşma yolunda rolü olan proteinleri kodlayan önemli düzenleyici genlerdir (3). Tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerde meydana gelen bozukluklar, kontrolsüz hücre bölünmesine sebep olmaktadır, dolayısıyla kansere sebep olmaktadır (3). Tümör baskılayıcı fonksiyonun tamamen kaybolması için her iki allel kopyasının da inaktif olması zorunludur, yani tümör baskılayıcı genler resesif durumdadır (3). Tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonları genellikle hücre döngüsünün ve DNA replikasyonunun düzenlenmesinin bozulmasına, programlı hücre ölümünün baskılanmasına (apoptoza) veya koruyucu bağışıklık sistemi hücreleri ile tümör hücrelerinin bozulmuş etkileşimine sebep olmaktadır (4). Mutajenik sinyallerin iletiminde ve uygulamasında yer alan onkogenlerdeki fonksiyon kazanımı mutasyonları, hücrelerin hiperaktif büyümesi ve çoğalması ile sonuçlanmaktadır (3,4). Proto-onko genlerin allellerinin herhangi bir kopyasında meydana gelen mutasyon, mutant genin oluşması için yeterlidir, dolayısıyla alt sinyal yollarını etkileyebilir (3,4). Onkogenler genellikle baskın şekilde davranırlar (3).

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler dışında oluşan mutasyonlar, tümörögenез, hücrede meydana gelen genetik değişikliklerin oranını arttıran herhangi bir olay ile meydana gelebilir (4). Örneğin; hücresel DNA tamir mekanizmasında oluşan kalıtsal veya kendiliğinden oluşan hasarlar, mutasyonların artmasına ve genetik veya genomik kararsızlığa yol açabilir (4).

2.3.2. Epigenetikdeğişimler

Son 10-15 yılda elde edilen bilgiler, genetik değişimlerin yanında epigenetik değişimlerinde tümör gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (2). Epigenetik düzenleme genellikle DNA (replikasyon sonrası metilasyon), protein (histon modifikasyonları ve polycomp grup protein kompleksleri) ve RNA (RNA interferens) seviyelerinde olmaktadır (4,26). Kanser hücrelerinde DNA

metilasyonundaki anormal durumlar 20 yıldan fazla süredir bilinmektedir ve genel hipometilasyon ve bölgeye özgü hipermetilasyon tümör hücrelerinde sık görülen olaylardır (26). Hipermetilasyon, yüksek oranda bir genin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelmektedir, bunun sonucunda transkripsiyonun baskılanmasına sebep olmaktadır (4). Kanserde DNA hipometilasyonunun biyolojik önemi çok az anlaşılmıştır (4). Mevcut modelde öngörüldüğü üzere özendirici bölge (promoter) metilasyonu ve tümör baskılayıcı ve DNA tamir genlerindeki transkripsiyonel susturulma ve bu genlerde meydana gelen mutasyonlar göz ardı edilemeyecek sıklıktadır (4).

DNA metilasyonu dışında histon asetilasyonunda oluşan değişimler gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Etkin olmayan kromatin aracılı histon deasetilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin susmasında kritik öneme sahip bir bileşendir (27). Farklı histon deasetilaz inhibitörleri kanser tedavisi için şu anda klinik çalışmalarda yer almaktadır (27).

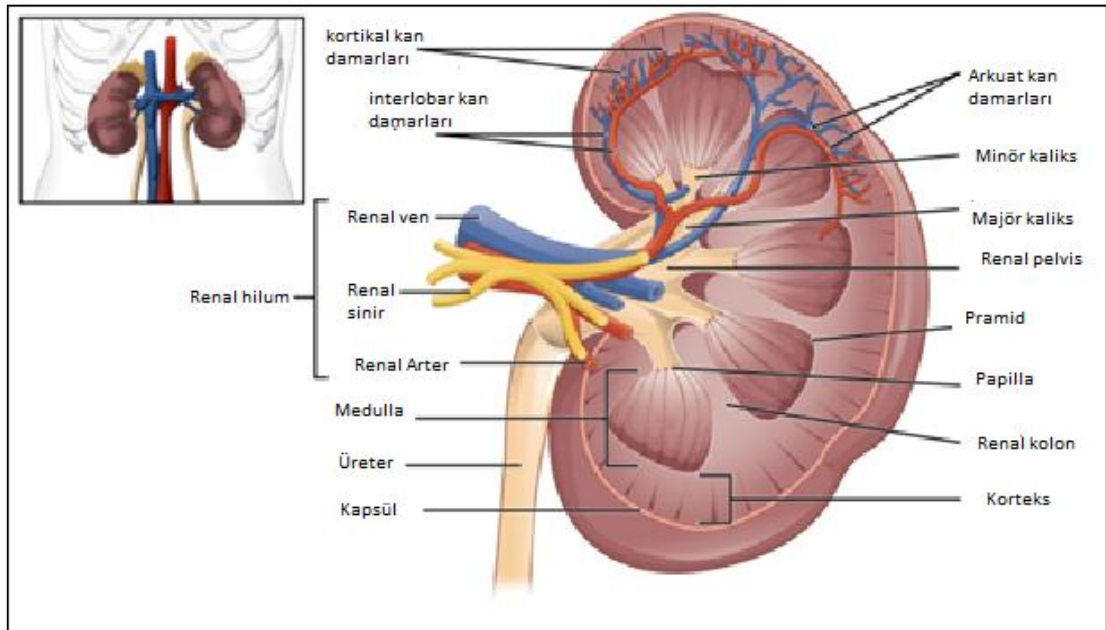
2.4. Böbrek Anatomisi

Böbrekler peritonun arkasında, omurganın her iki yanında posterior karın duvarının üst kısmında bulunan iki kırmızımsı kahverengi organlardır ve yaklaşık olarak 10 cm uzunluğunda, genişliği 5 cm ve kalınlığı 2.5 cm boyutlarındadır (28,29). Kısmen kaburga örtüsünün altında yer alırlar (29). Karaciğerin sağ büyük lobundan dolayı sağ böbrek sol böbrekten daha düşük bir seviyede yer alır (28). Böbrekler solunum ile hafifçe hareket eder (28).

Böbreğin bir üst kutbu ve alt kutbu (anterior yüzeyi ve posterior yüzey), (medial sınır ve bir lateral sınır) vardır. Medial sınır içbükeydir ve hilum olarak adlandırılan bir dikey yarığı vardır (29). Hilum renal sinus olarak adlandırılan büyük bir boşluğun içine uzanmaktadır (29). Hilum renal ven, renal arter, üreter, lenfatik ve sempatik sinir liflerini iletir (29). Hilumda renal damar enteriordadır, renal arterin iki dalı damra posteriordur, üreter bu iki artere posteriordur, renal arterin üçüncü dali üretere posteriordur (29). Fibros kapsülü böbreği dış kısmına yakın olarak çevreler (29). Perirenal yağ, fibro kapsülü sarar (29). Renal fascia, böbreği, böbrek üstü bezini ve perirenal yağı sarar (29). Renal fascia, psoas fascia ve transversalis fascia ile devam eder (29). Bu fascialar ve yağ, böbreği posterior karın duvarına bağlar (29).

Böbrek dış bir korteks ve iç medullaya sahiptir (29). Medulla, yaklaşık bir düzine böbrek piramitlerinde oluşur (konik) (29). Piramitlerin tabanları dış yöne bakar ve apikalleri (renal papilla) içeri doğru bakmaktadır (29). Korteks, piramitler arasında uzanır (renal kolonlar) (29). Çizgiler piramitlerden kortekse doğru uzar (meduller yollar) (29). Renal sinüs renal pelvis (üreterin üst genişlemiş parçası) ile kaplanmıştır (29). Pelvis, 2-3 ana kalikslere bölünmüştür ve her ana kaliks 2-3 küçük kalikse bölünmüştür (29). Renal papilla minor kalikslere girinti yapar (29).

Arterial beslenme aorttan gelen renal arterlerden sağlanır (29). Her renal arter beş segmental artere ayrılır (29). Her bir segmental arterden her piramit için bir lobar arter çıkar (29). Renal maddeye girmeden önce her lobar arter iki veya üç tane interlobar arter yayar (29). İnterlobar arterler kortekse doğru yayılırlar (29). Medulla korteks bağlantısında interlobar arter, piramitlerin tabanları üzerine kavis yapan arcuate arterlere açılır (29). Arcuate arterler, korteksten çıkan birçok interlobuler artere açılır (29). Afferent glomeruler arteriorler interlobuler arterin dalları gibi çıkarlar (29).



Şekil 2.2.Böbreğin boyuna kesiti (30).

2.5. Böbrek Fizyolojisi

Birçok insan, böbreğin önemli bir fonksiyonu olan metabolizma veya sindirim yoluyla oluşan atık maddelerin vücuttan atılması hakkında bilgi sahibidir (31). Böbreğin ikinci bir fonksiyonu vücut sıvılarının miktarının ve içeriğinin kontrol edilmesi açısından önemlidir (31). Su ve vücuttaki neredeyse bütün elektrolitler için sıvı alımı ve çıkışı arasındaki denge yüksek oranda böbrekler tarafından sağlanır (31). Böbreklerin bu düzenleyici fonksiyonu hücrelerin aktivitelerini gerçekleştirebilmeleri için kararlı bir iç çevrenin korunmasını sağlar (31).

2.6. Böbrek Kanseri

Böbrek kanseri, ürolojik kanserler arasında en yaygın üçüncü ve bütün kanser türleri arasında yedinci sırada yer almaktadır. 2010 yılında ABD’de 58240 yeni vaka ve 13040 renal böbrek kanserinden ölüm vakası olduğu bildirilmiştir (1,32). Böbrek kanseri tek bir hastalık değildir; böbrekte oluşan birçok çeşit kanserden oluşmaktadır (8). Yetişkin popülasyonunda renal hücreli karsinoma (RCC) böbrek neoplazmlarının en çok görülen türüdür (34). Diğer kanserlere benzer şekilde böbrek kanserleri kalıtsal olabileceği gibi kalıtsal olmayıp sporadik de olabilir (35). Sporadik formu soliter olma eğilimindedir ve genellikle 40, 50 ve 60’lı yaşlardaki hastalarda görülür (35). Kalıtsal formu multifokal ve bilateral olma eğilimindedir ve genellikle erken yaşta başlar (35). Böbrek kanseri olan hastalar genellikle çok az belirler, semptomlar veya laboratuvar anormallikleri gösterirler ve genellikle (% 30) metastatik evrede tanıları konulur, tanı konulanların % 9’u ise tedavi için geç kalınmıştır (9). Erken safhada yakalanırsa hastalık tedavi edilebilir, ancak metastatik böbrek kanseri ölümcüldür (1). Tipik olarak ikincil böbrek tümörleri, akciğer, yumuşak dokularda, kemiklerde, karaciğerde, deride ve merkezi sinir sisteminde bulunur (4).

2.6.1. Böbrek tümörlerinin çeşitleri

İnsanlarda böbrek tümörlerinin büyük çoğunluğu (% 80-85) renal parakindem köken alan RCC’dır. Geriye kalan kısmının büyük çoğunluğu (% 15-20) renal pelvis tranzisyonel hücreli karsinom oluştururken, anjiyomiyolipom, nefroblastoma (Wilms Tümörü) gibi diğer neoplazmalar nadir olarak görülmektedir (4,5). Renal neoplazmalar, Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) histopatolojik sistemine göre özgün alt tiplere sınıflandırılmıştır (5). WHO sistemi histopatolojik tümör alt tiplerini belirgin klinik

davranışa ve genetik mutasyonlara göre belirlemektedir (5). Histopatolojik tümör alt tipleri, histolojik karakterlerine göre RCC (% 70), papiller RCC (% 15), kromofob RCC (% 10) ve onkositom (% 5) alt sınıflara ayrılmıştır (4). Anjiyomiyolipom en sık görülen yetişkin mezankimal tümördür (%1) (5). Ayrıca WHO sistemi, yeni tanımlanmış klinik, morfolojik ve genetik faktörlerle nadir görülen renal malignite formlarını içermektedir (5). Örnek olarak; Xp11.2 translokasyonu ile ilişkilendirilmiş renal karsinom, Bellini toplama kanallarının karsinomu renal medüller karsinom ve musinoz tübüler içsi hücreli karsinom (mucinous tubular spindle cell carcinoma) verilebilir (5).

2.6.2. Böbrek kanserinin epidemiyolojisi

Epidemiyoloji kanser kökeni hakkındaki birçok soruya cevap vermek için önemli bir araçtır (36). Cinsiyet, yaş, coğrafik dağılımdaki farklılıklar ve böbrek kanseri gelişimi ile ilişkili çoklu klinik faktörler ortaya konmuştur (36). ABD’de böbrek kanseri, kanserlerin % 4’ünü ve kansere bağlı ölümlerin % 2’sini oluşturur (11). Üçüncü en sık görülen genitoürenal kanserdir (8). Tahminlere göre, ABD’de 2010 yılında, 58240 yeni böbrek kanseri vakası ve 13040 böbrek kanserine dayalı ölüm olduğu bildirilmiştir (32). Bu da ABD’de görülen kansere bağlı ölümlerin % 2,3’ünü oluşturmaktadır (32). Görülme sıklığı erkeklerde kadınlara göre 2-3 kat daha fazladır ve siyah ırkta beyaz ırka göre az orandadaha fazladır (32). Birçok tümörler, 50 ve 70 yaşları arasında görülmekte, ortalama yaş olarak 66 yaşında görülmekte ve ölüm yaşı da 70 olarak belirtilmektedir (32).

2.6.3. Böbrek kanserlerinin risk faktörleri

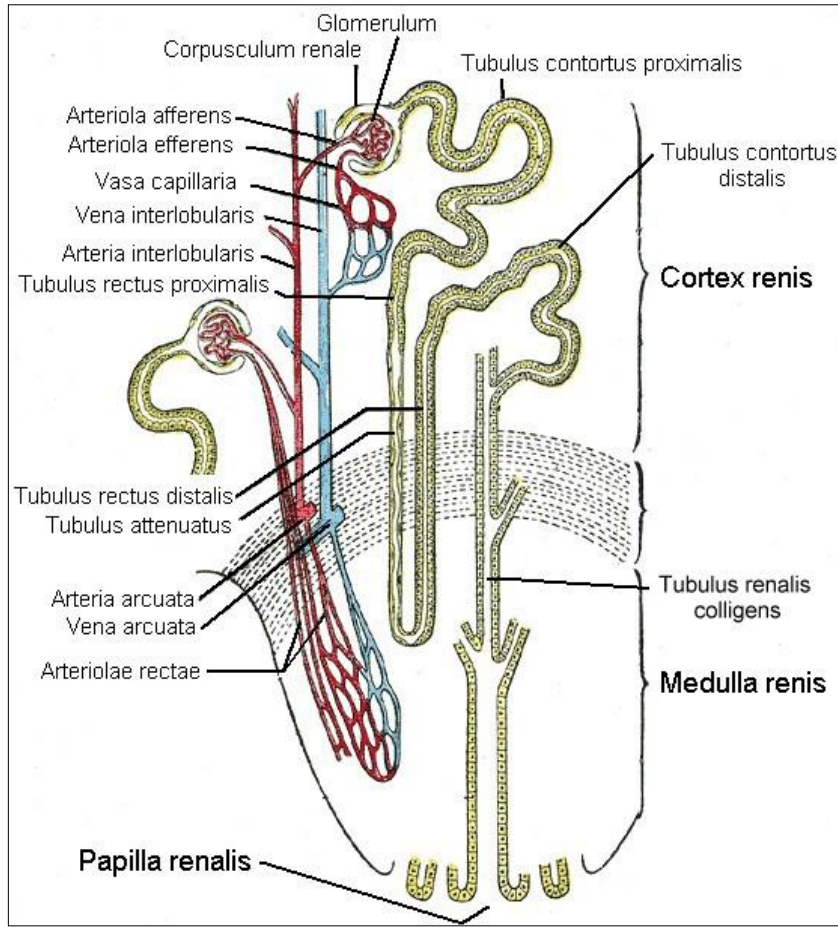
Böbrek kanserinin sebepleri bilinmemektedir (7). Epidemiyolojik bulgulara göre, erkek cinsiyet, 50 yaş sonrası ve son evre renal hastalıklar böbrek kanserinin gelişimi için risk faktörleridir (7). Birçok sayıda risk faktörü RCC ile ilişkilendirilmiştir, bunlardan en iyi bilineni sigara kullanımıdır (8). Erkeklerde RCC’nin % 30’u, kadınlarda ise % 24’ü sigara ile ilişkilendirilmiştir (8). Obezite, hipertasyon ve deri boyaları gibi bazı maddelere maruz kalma, kadmiyum petrol ürünleri ve asbestorler diğer risk faktörleri arasında yer almaktadır (7). Ayrıca, diet faktörleri ve diüretikler gibi ilaçlar, yüksek yağ ve protein içeriğine sahip beslenme, kahve tüketimi, kırmızı ve işlenmiş etin yüksek oranda tüketimi böbrek kanseri ile ilişkilendirilmiştir (7). HIV enfeksiyonuna bağlı

immuno baskılanmış durum, enfekte popülasyonunda RCC'nin görülme sıklığını belirlemektedir ve enfekte olmayan insanlara göre 8.5 kat daha yüksektir (36).

Böbrek kanserinin özgün nedeni bilinmemekle birlikte, genetik anormallikler her histolojik alt tipte daima mevcuttur (7). Bu anormalliklerden herhangi birine öyküsünde sahip olan hastalar, büyük bir ölçüde artmış böbrek kanseri riski taşımaktadırlar (7). Ancak, kalıtsal böbrek kanserleri hastalığın toplam görülme sıklığının yalnızca küçük bir kısmını oluşturmaktadır (7). Böbrek kanseri büyük çoğunlukla sporadik genetik olaylar, çevresel maruziyet ve hasta faktörlerinin birlikteliği ile oluşmaktadır (7).

2.6.4. Böbrek tümörü patolojisi

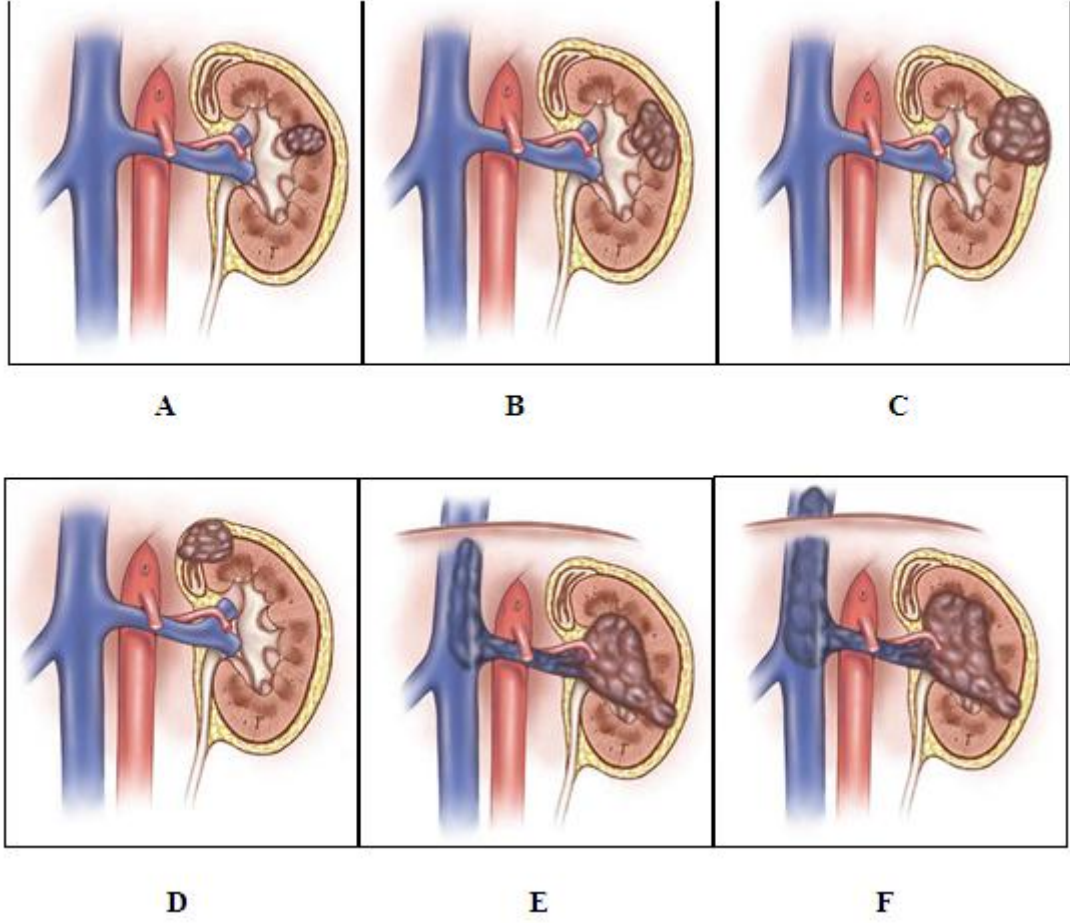
Renal toksikoloji ve patoloji renal medulla ve papillayı çevreleyen dış kısmını saran korteks ile oluşan böbreğin karmaşık işlevsel anatomisiyle yakından ilişkilidir. Böbreğin fonksiyonel ünitesi nefrondur. Nefron glomerulus, proksimal tübül, Henle kulbu, distal tübül ve toplama kanalından oluşmaktadır. Ayrıca proksimal tübül üç segmente ayrılmaktadır: post-glomerüler kısımdan (P1) oluşan kontortus proksimal tübül ve aktif endositoz / lizozomal aparat içeren proksimal tübülün daha distal kısmı (P2). Dolayısıyla, protein bağlı toksik kısımların yanı sıra lizozomal aşırı yüklenme ile ilişkili yaralanmayı göstermektedir. Sonraki P3 segmentinin düz kısmı (rektus proksimal tübül) xenobiotica'nın metabolik aktivasyonu ve taşıyıcı ilişkili birikimi ile yaralanmaya çok duyarlı kısmı göstermektedir.



Şekil 2.3. Renal nefronun morfolojik yapısının görünümü (4).

2.6.5. Böbrek kanserinin evreleri

Tümör, lenf nodülü ve metastaz (TNM) sınıflandırması AJCC (American Joint Committee on Cancer)'ye göre onaylanmıştır (32). TNM sisteminin en büyük avantajı tümör trombozu olan bireyler ile lokal nodal hastalığı olanları net bir şekilde ayırt edebilmesidir (32). Evreleme sistemleri yayılma modlarını göstermek için tasarlanmıştır. (Şekil2.4) Evreleme sistemleri tedavi seçeneklerinin sınıflandırılması, prognoz ve sağ kalım özelliklerinin değerlendirilmesi için kullanılır (37). TNMevreleme sistemi Tablo 2.1 ve Tablo 2.2' de gösterilmiştir (37).



Şekil 2.4. Renal hücreli karsinomun TNM evrelemesinin şematik gösterimi (37). A, Evre T1 tümör < 7 cm. B, Evre T2 tümör > 7 cm. C ve D, Evre T3a preinefrik yağı içeren tümörsler (C) ve komşu adrenal bezi (D). E, Evre T3b renal ven veya inferior vena kava içeren tümör (IVC) diyaframa inferior. F, Evre T3c tumor diyaframa superior IVC içeren tümör.

Tablo2.1. RCC'nin TNM Evrelemesi; Amerikan Kanser Ortak Komitesinin mevcut sürümünden uyarlanmıştır.

Evre	Tanımı
TX	
T0	Öncül tümörü bilinmeyen
T1	Öncül tümörü yok
T1a	Tümör çapı en büyük < 7 cm, böbrek ile sınırlı
T1b	Tümör çapı en büyük < 4 cm, böbrek ile sınırlı
T2	Tümör çapı >4 ancak <7, böbrek ile sınırlı
T3	Tümör çapı ≥ 7 , böbrek ile sınırlı
T3a	Tümör büyük damarlar içine uzanır veya böbreküstü bezlerine invazyon ancak, Gerota fasciası veya perinefrik dokulara değil
T3b	Tümör böbreküstü bezi veya perinefrik dokulara invasyon ama Gerota fascia ötesinde değil
T3c	Tümör kabaca diyafram üzerinde vena kava içine uzanır
T4	Tümör Gerota facianın ötesine invazyon
NX	Bölgesel lenf nodları tespit edilememiş
N0	Hiçbir bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek bir bölgesel lenf nodu metastazı
N2	Birden fazla bölgesel lenf nodu metastazı
MX	Uzak metastaz tanımlanmamış
M0	Uzak metastazı yok
M1	Uzak metastaz

Tablo 2.2. TNM evre grupları.

Evre grupları	T evre	N evre	M evre
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N0	M0
IV	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	Herhangi T	N2	M0
	Herhangi T	Herhangi N	M0

2.7. Böbrek Kanserinde Oluşan Moleküler Değişiklikler

2.7.1. Kalıtsal RCC

RCC'nin kalıtsal formları tüm vakaların % 5'ni oluşturmaktadır. Kalıtsal RCC sporadik RCC'nin oluşumuna neden olan moleküler yolların anlaşılmasında ve karakterizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Böbrek kanserinin kalıtsal formları sıklıkla multifokal, bilateral tümörler olarak ortaya çıkmaktadır ve çok erken yaşlarda görülebilmektedir, dolayısıyla böbrek kanseri erken yaşlarda başlamaktadır (33,38).

1979 yılında Cohen ve arkadaşları kalıtsal böbrek kanseri öyküsü olan bir ailede 10 hasta bireyin 8'inde kromozom 3'ün kısa kolu ile kromozom 8'in uzun kolu arasında bir translokasyon tespit etmişlerdir. Eğer ailesiel renal kanser bir ailenin birden fazla üyesinde varsa bu tek bir maligniteyi veya tumor koleksiyonunu gösterir (38).

Her bir kalıtsal sendrom özgül bir moleküler değişim ile karakterizedir ve dolayısıyla ayırıcı tanıyı doğrulamak için genetik analiz yapılabilir (2). Aşağıdaki tabloda kalıtsal RCC sendromunun özellikleri gösterilmektedir

Tablo 2.3. Böbrek kanserinin kalıtsal sendromları: kromozomal yerleşim, etkilenen genler ve yollar.

Sendrom	Kromozom	Gen/protein	Olası yolak
Von Hippel-Lindau	3p	VHL	HIF1
Birt-Hogg-Dube	17p	Folikülin	mTOR
Kalıtsal papiller renal karsinom	7q	c-Met	Hepatosit büyüme faktörü/MET
Kalıtsal leiomyomatozis	1q	Fumarat hidrataz	Krebs döngüsü/HIF1
renal hücreli karsinom	9q/16p	TSC1/TSC2	mTOR
Tuberoskleroz			

2.7.2. Sporadik renal hücreli karsinom

Birçok böbrek kanseri sporadiktir. Kansere neden olan kimyasallar veya diğer dış risk faktörlerinin muhtemel etkilerinden kaynaklanan hücre değişiklikleri doğumdan yıllar sonra ortaya çıkmaktadır (39). von Hippel–Lindau hastalığı tumor baskılayıcı geni (*VHL*)’nin somatik değişimi sporadik berrak hücreli renal hücreli karsinomada en sık raslanan genetik değişikliktir. Spesifik kromozomal bozukluklar birçok renal kanserin alttipinde gösterilmiştir (Tablo2.4) (2).

Tablo 2.4. Renal hücreli tümörlerin en sık görülen alt tipleri: frekans ve kromozomal değişiklikler.

Alt tip	Kromozom değişiklikleri	Frekans, %
Berrak hücreli RCC	3p, +5q, 9, 10, 14	70–75
Papiller RCC	+7, +17, +3, +12, +20	10–15
Kromofob RCC	1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 kombinasyonu	5–7
Onkositom	1, 14	5

2.8. RCC’nin Epigenetiği

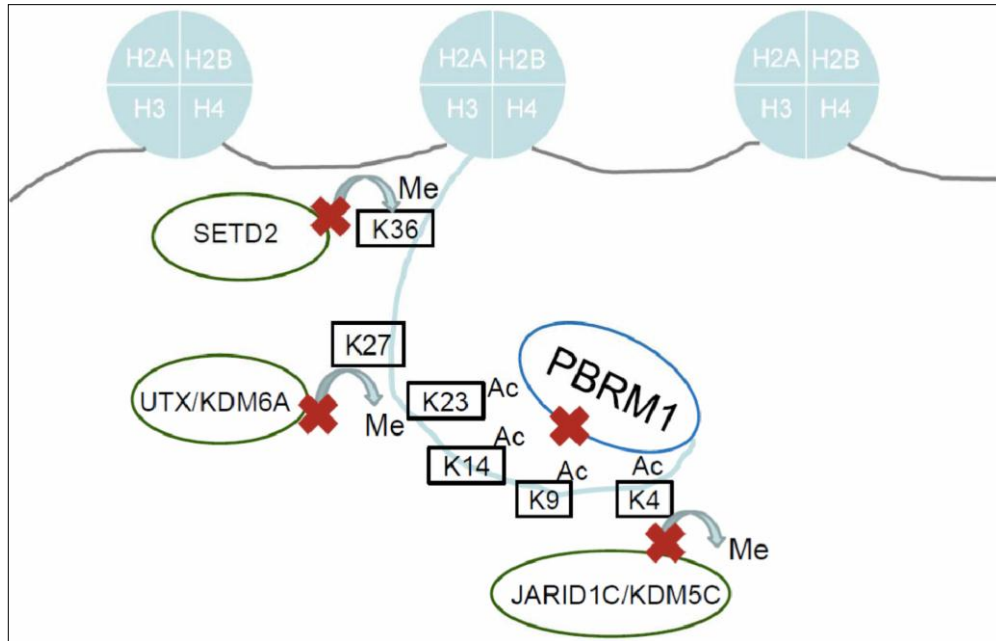
Epigenetik değişimler kanserin belirgin özelliklerindendir ve renal tumörögenezdeki roller gün geçtikçe ortaya çıkmaktadır (41). Epigenetik değişimler, örneğin anormal DNA metilasyonu ve histon protein modifikasyonu insan kanserlerinde sık görülmektedir ve tumor gelişimin önemli faktörleri olarak tanımlanmaktadır (42).

Epigenetik değişimler RCC de önemli bir yere sahiptir çünkü büyük çaptaki dizileme çalışmaları tümörlerin % <10’da *VHL* geni ve *PBRM1* haricinde aday tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğradığını göstermiştir.

Son zamanlarda yapılan dizileme çalışmalarında *SETD2*, *UTX* ve *JARID1C* gibi genlerde mutasyon saptanmıştır bu RCC'nin patogenizinde rol alan epigenetik faktörleri göstermektedir (42). VHL promotör bölgesi metilasyonu ile epigenetik olarak inaktive olan ilk tanımlanan insan tümör baskılayıcı genlerindendir (42). Mutasyona uğrayan genler nükleozom konumlandırma ve histon kuyruk modifikasyonları ile kromatin düzenlenmesiyle ilişkilendirilmiştir (43).

İnsan RCC'lerin yaklaşık % 40'ında mutasyona uğramış olan PBRM1 Polibromo BRG1-ilişkili faktör kompleksin (PBAF, SWI/SNFB) bir parçasıdır (43).

PBAF, SWI/SNF gibi bir nükleozom tekrar düzenleyici olarak işlev gösterir ve transkripsiyonel düzenlemede yer aldığı gösterilmiştir (43). Sık olmamakla birlikte iki metil transfreazda, MLL2 ve SETD2, ve iki dametilazda, JARID1C (KDM5C) ve UTX (KDM6A) mutasyonlar tanımlanmıştır (Şekil 2.5) (43)

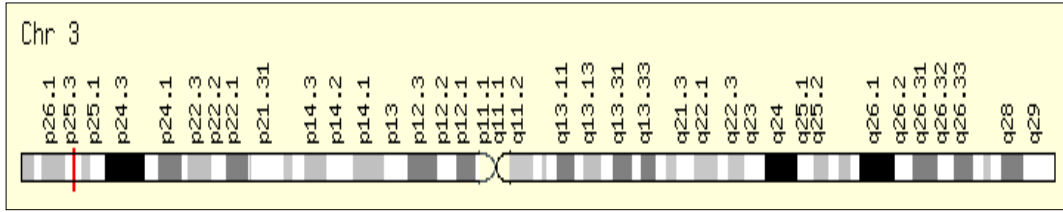


Şekil 2.5. RCC genetiğinde rol alan Histon 3 modifikasyonlarının gösterimi (43).

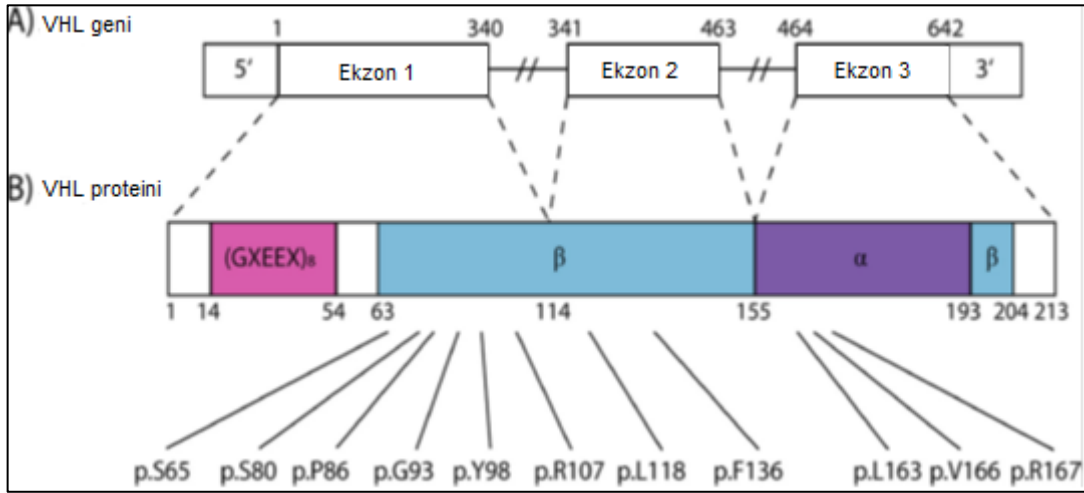
2.9. Von Hippel-Lindau (VHL) Geni

2.9.1. VHL geninin yapısı ve işlevi

RCC ile ilişkili olduğu en iyi bilinen gen Von Hippel-Lindau (VHL) genidir (12). VHL geni tümör baskılayıcı bir gendir ve kromozom 3p25'te yapılan linkage analizleri ile haritası çıkarılmıştır (Şekil 2.6). VHL geni 1993'te pozisyonel klonlama taktiği ile izole edilmiştir (10). VHL geni en iyi hipoksi indüklenabilir faktörü (HIF) negatif olarak düzenleyen bir E3 ubiquitin ligaz olarak bilinir (39). VHL geni üç ekson bölgesi içerir ve VHL protein yapısında 8 tekrar motifi, α -domain ve β -domain bulunur (Şekil 2.7) (13).



Şekil 2.6. Kromozom 3'te VHL geninin yerleşimi (16).



Şekil 2.7. Von Hippel-Lindau gen ve protein yapısı. A) VHL geni üç ekzondan oluşur (gri). B) VHL proteinin yapısı, GXEEEX 8 tekrar motifi (pembe), α -domain (mor) ve β -domain (mavi) (13).

2.9.2. VHL Geni Mutasyonları

Böbrek kanseri hastalarının tümörlü dokuları *VHL* genindeki değişiklikler için test edildiğinde, mutasyonlar berrak hücreli böbrek kanseri olan hastalarda yüksek oranlarda tespit edilmiştir(44). Papiller, kromofob, toplama kanalı böbrek kanseri veya onkositomlu hastaların tümörlü dokularında *VHL* geninde mutasyon saptanamamıştır. Nickerson ve ark. berrak hücreli böbrek kanseri olan hastalarından alınan tümörlü dokuların % 91’de *VHL* geninde mutasyon ve metilasyon saptamışlardır (44).

2.9.3. HIF’in VHL aracılığı ile düzenlenmesi

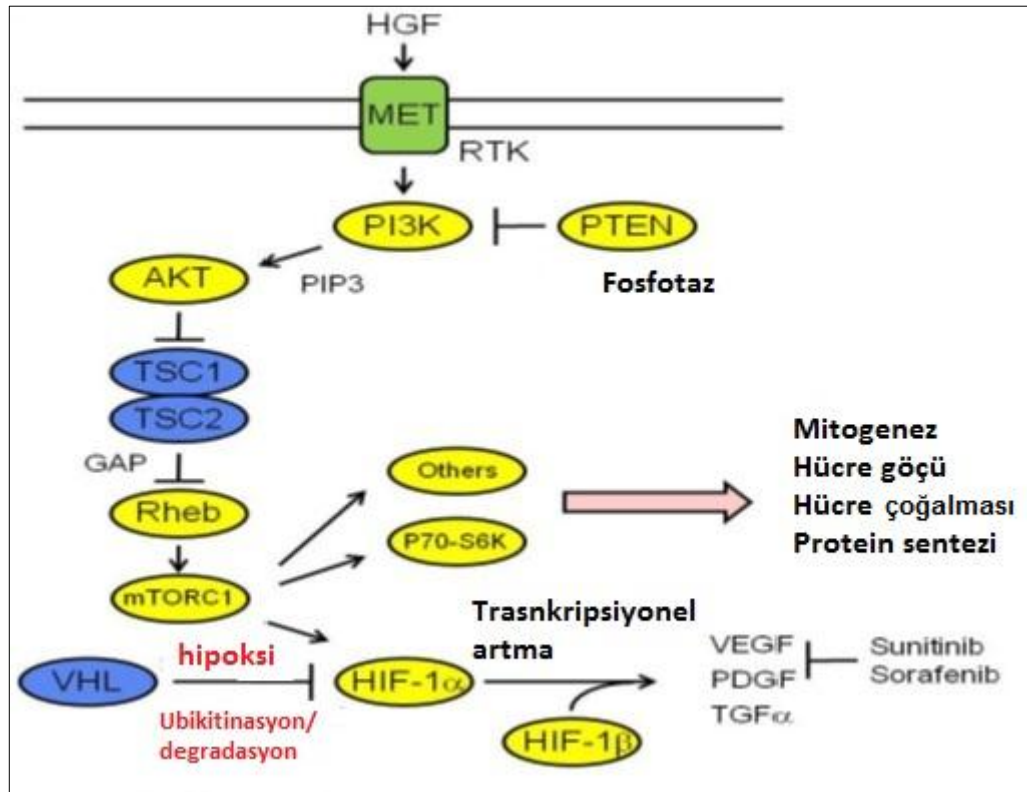
VHL yoksun RCC’nin moleküler patogenezi anlamada önemli bir nokta normoksi koşulları altında olmasıydı, pVHL kompleksi HIF α alt birimleri bağlanır ve çoklu ubiquitinleyerek hedeflenmesini ve proteozom tarafından yıkılmasını sağlar (43). HIF ve pVHL arasındaki etkileşim HIF’in prolil kalıntılarından prolil hidroksilaz enzimi ile posttranslasyonel hidroksilasyonu aracılığı ile sağlanan enzimatik bir reaksiyondur (43). Bu kavrama uygun olarak pVHL’nin en önemli işlevi HIF’i düzenlemesidir, *VHL* mutasyonları ile ilişkilendirilmiş birçok hastalığın pVHL ve HIF arasındaki etkileşimi ortadan kaldırdığı tahmin edilmektedir (43). Ayrıca, farelerde yapılan çalışmalar HIF aktivasyonunun (özellikle HIF-2 α olarak) *VHL* kaybı sırasında görülen fenotiplerin çoğunluğuna aracılık ettiğini göstermektedir (43).

2.9.4. VHL geni yolağı

VHL geni 30-kDa büyüklüğünde *VHL* proteinini kodlamaktadır ve 213 amino asit uzunluğundadır. *VHL* geni hipoksi-indüklenebilir faktörler (HIFs)’in düzenlenmesinde yer almaktadır (10,12,44). *VHL* proteini elongin B, elongin C and cullin-2 ile kompleks oluşturmaktadır ve bu kompleksin ubiquitin ligaz E3 aktivitesi vardır. Böylelikle transkripsiyon faktörleri HIF-1 ve HIF-2’nin α altbirimi HIF α ’nın ubiquitinlenerek yıkılımını sağlar. HIF α HIF β ile dimer oluşturarak VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü) ve TGF α (transforme edici büyüme faktörü α) gibi hipoksi-indüklenebilir genlerin transkripsiyonunu düzenler (12,44). pVHL, hipoksi-indüklenebilir faktörler (HIF) gibi özgün proteinlere doğrudan bağlanan yapıda substrat almacı görevi görür ve daha sonra ubiquitin prolitik yolağı aracılığı ile yıkılması için onları hedefler (10).Berrak hücreli renal hücreli karserde *VHL*

geninin elongin C/B and Cul2'ye bağlanan alfa domaininde veya HIF'i yıkılıma hedefleyen beta domaininde mutasyon olduğunda HIF yıkılmaz ve yüksek oranda birikir (44). Sonuç olarak ortaya HIF'in VEGF, PDGF, EGFR ve GLUT1 gibi alt sinyal yolu bileşenlerinin aşırı ifade edilmesi çıkar (Şekil 2.8) (44).

VHL'nin durumu VHL hastalığının tedavisinde ve böbrek kanseri hastalarında önem arz etmektedir (12). VEGF ve PDGF gibi HIF' e duyarlı gen ürünleri tümörlerin anjiyogenezini aktive etmektedir ve bu nedenle iyi tedavi hedefleridir. VEGF ve PDGF inhibitörleri, sunitinib ve sorafenib FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır (12).



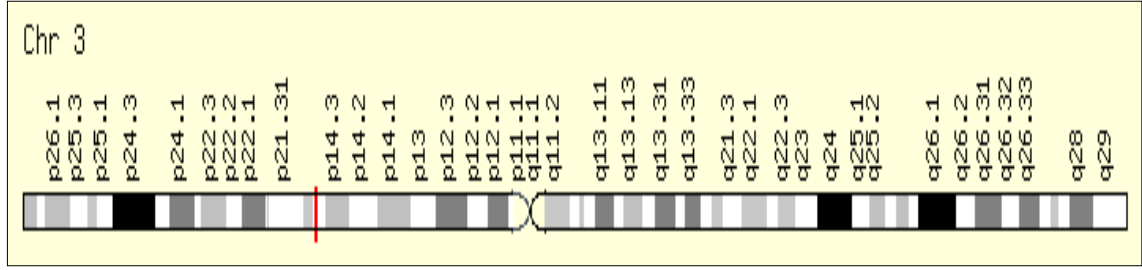
Şekil 2.8. RCC ile ilişkili yolların sinyal iletim özeti (12).

2.10. Polibromo 1Geni (PBRM1)

2.10.1. PBRM1 geninin yapısı

PBRM1, kromozom 3'ün kısa (p) kolunun 21'inci pozisyonunda yer alan tümör baskılayıcı bir gendir (Şekil 2.9.) (16). Bu genin resmi adı polibromo 1'dir. Ayrıca,

PBRM1 geni BAF180 ve PB1 olarakta bilinmektedir (17). *PBRM1* geni 27 ekson içermektedir (18).



Şekil 2.9. Kromozom 3'te *PBRM1* geninin yerleşimi (16).

2.10.2. *PBRM1*'in İşlevi

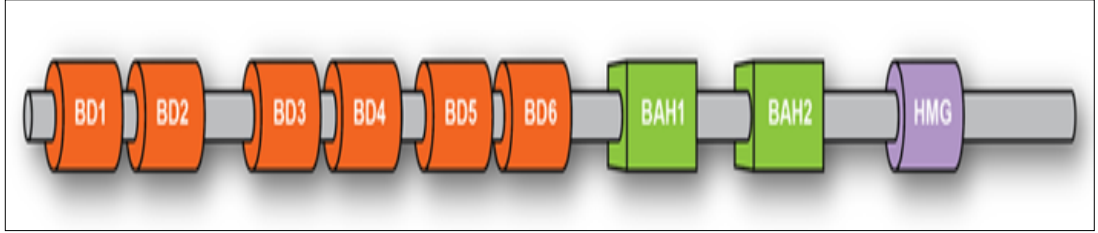
Bu genin knock-down edilmesi kanser hücrelerinin koloni oluşturmalarını ve göçünü hızlandırmıştır. Buda bu genin tümör baskılayıcı bir gen olabileceğini göstermektedir (12). Bu lokus ATP-bağımlı kromatin-yeniden şekillenme komplekslerinin bir altbirimini kodlamaktadır (12). Kodlanan protein, nükleer hormon almaçları tarafından ligand bağımlı transkripsiyonel aktivasyonu için gerekli olan komplekslerin integral bir bileşeni olarak tanımlanmıştır (DNA-nükleozom topoloji değişimi) (16).

BAF180 proteini, replikasyon, DNA tamiri ve hücre çoğalması / farklılaşmasını düzenleyen SWI / SNF kromatin yeniden şekillenme kompleksinin kromatin hedefleyici altbirimidir (12). *PBRM1* geni, histon kuyruklarında asetillenmiş lizin kalıntılarına bağlanmada yer alan altı bromodomainden oluşmaktadır. İki komşu bromo homoloji domaini; protein-protein etkileşimi ve HMG DNA bağlanma domaini açısından önemlidir (46). *PBRM1* geni hücre çoğalmasının negatif düzenleyisi olarak davranır (16).

2.10.3. *PBRM1* genindeki mutasyonlar

Son zamanlarda, böbrek kanseri ile ilişkili yeni bir gen olan *PBRM1* geni ekzom dizileme ile bir seri primer berrak hücreli böbrek karsinomda (ccRCC) tanımlanmıştır (15). Yapılan çalışmada, çalışmaya dahil edilen vakaların yaklaşık % 40'ında *PBRM1* geni mutasyonu tanımlanmıştır. Bu *PBRM1*'in *VHL* geninden sonra böbrek

kanseriyle ilişkilendirilmiş ikinci en önemli gen olduğunu göstermektedir(15). PBRM1'in germinal mutasyonları henüz rapor edilmemiştir (15). PBRM1'in birinci domain en çok mutasyon görülen bölgedir (15). Şekil 2.10'da PBRM1'in şematik diyagramı gösterilmiştir (15).



Şekil 2.10. PBRM1 (BAF180) proteinin şematik gösterimi. BD1-6: Bromodomain 1-6; BAH1 ve BAH2: bromo-bitişik homoloji domain 1 ve 2; HMG; Mobilite grup domain. (17).

2.11. SET Domain İçeren Protein 2 Geni (*SETD2*)

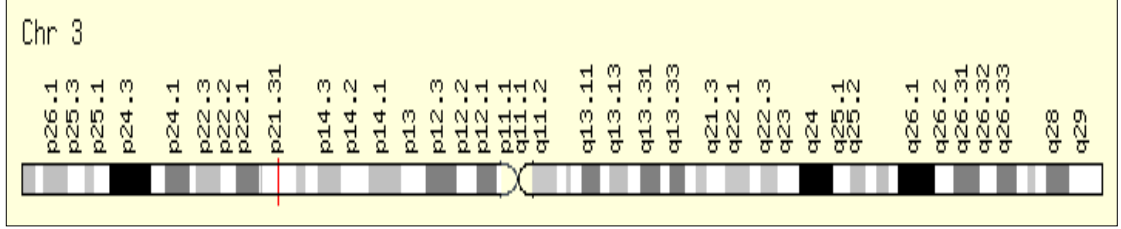
2.11.1. *SETD2* genin yapısı ve işlevi

SETD2 geni 1998 yılında keşfedilmiştir ve başlangıçta Huntingtin etkileşimli protein olarak tanımlanmıştır (45). *SETD2* geni kromozom 3p21.31 bölgesinde yer almaktadır (Şekil 2.11) (18).

SETD2 prematür sonlanma kodonu içeren birikmiş transkriptlerin analizleri sonucu bulunmuştur. *SETD2* histon H3'ün 36'ncı pozisyonundaki lizinlerin trimetilasyonundan sorumlu bir histon metiltransferaz kodlamaktadır ve tümör gelişiminin baskılamasında rol oynayabilir (12). Histon H3'ün bu lizin kalıntıların metilasyon durumu modifikasyonu kromatin yapısını düzenlemekte ve transkripsiyonel kontrolü sağlamaktadır (46).

SETD2 geni 21 ekson ve 20 intron bölgesi içermektedir (18). *SETD2*'nin rolü histon metiltransferaz'dır. Bu histon metiltransferaz histon H3'ü 'Lys-36' kalıntılarından metillemektedir (16). H3 'Lys-36' metilasyonu epigenetik transkripsiyonel aktivasyon için özgün bir işarettir (16). Muhtemelen uzama (elongation) sırasında hiperfosforilize POLR2A aracılığıyla kromatin yapının modülasyonunda bir rol oynamaktadır (16).

DNA'ya promotör bölgelerden bağlanarak transkripsiyon aktivatörü olarak davranabilir (16).



Şekil 2.11. Kromozom 3'te *SETD2* geninin yerleşimi (16).

2.11.2. *SETD2* geninde meydana gelen mutasyonlar

Son zamanlarda yayınlanan birçok yeni makalede histon lizin metiltransferaz dahil olmak üzere histon-modifiye edici enzimlerin çeşitli kanser patolojilerinde fonksiyon kaybı ya da kazancı yer almıştır (45). Teknolojik gelişimler ccRCC'de *SETD2* ve diğer genler de dahil olmak üzere somatik olarak mutasyona uğramış çok sayıda genin keşfine olanak sağlamıştır (47). *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, ve *SETD2* ccRCC'lerin % 90'ından fazlasından delesyona uğrayan kromozom 3p üzerinde bir bölgede yer almaktadır (47).

2.12. Böbrek Kanseri İle İlişkilendirilmiş Diğer Genler

Son zamanlarda yeni nesil dizileme, mikrodizin tabanlı analizler ve fare transgen analizleri gibi ileri yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda, *MET* geni, *TSC1/TSC2* genleri, *BAP1* ve *NF2*'ninde dahil olduğu bir çok gen RCC ile ilişkilendirilmiştir (12).

MET protoonkogeni *MET VHL* geninde mutasyon olmayan kalıtsal papiller RCC'de bulunmuştur. Ayrıca hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR) olarak da bilinmektedir(12,17). *MET* geni kromozom 7'nin q kolunun 31'inci pozisyonunda yer almaktadır (16).

MET tirozin kinaz aktivitesi gösterir. HGF bu kinazın aktifleşmesini ve böylelikle mitogenez ve hücre göçü sinyallerinin başlamasını sağlar (Şekil 2.8) (12). *MET* mutasyonları tümör büyümesi, anjiyogenez ve metastazı tetiklemesiyle kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (17).

İki tümör baskılayıcı gen olan *TSC1* ve *TSC2*, berrak hücreli RCC, kromofob RCC ve papiller RCC gibi birçok RCC tipine dönüşmesiyle bilinen bir tuberoz skleroz kompleksi çalışmasında bulunmuştur (12). *TSC1* *TSC2* ile kompleks oluşturarak besin aracılı veya büyüme faktörü ile uyarılmış S6K1 ve EIF4EBP1 fosforilasyonunu mTORC1'i negatif olarak düzenleyerek baskılar (17). BAP1 bir tümör baskılayıcı olarak rol oynamaktadır ve berrak hücreli RCC vakalarının %15'inde inaktive olan bir nükleer deubikutinazı kodlamaktadır (12).

BAP1'deki mutasyonlar PBRM1 gibi diğer tümör baskılayıcı genlerde olduğu gibi berrak hücreli RCC'nin alt tiplerini belirlemektedir (Tüm berrak hücreli RCC vakaların % 70'i) (12).

NF2 *nakavt* fare çalışmaları ile yapılan analizler sonucu bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır (12). Farelerde 6-10 ay içerisinde hiperaktif epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyali ile karakterize böbrek tümörü gelişmiştir (12). NF2 gen ürünü Merlin'in hiperaktif EGFR sinyalini baskılamasıyla tümörögenез baskıladığı gösterilmiştir (12).

Wilms tümörü veya nefroblastoma, çocuklarda en sık görülen birincil böbrek tümörüdür (6). Birçok vaka 2 ila 5 yaş arası çocuklarda görülmektedir (6). Bu tümör çocukluk tümörlerinin birçok önemli özelliklerini göstermektedir: konjenital malformasyon ve tümör riski arasındaki ilişki, tümör ve gelişmekte olduğu organ arasındaki histolojik benzerlik, ve son olarak çocukluk tümörlerinin tedavisinde önemli başarılar yer almaktadır (6).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Örnekler Gaziantep Üniversitesi Üroloji Anabilim dalında toplanmıştır. Toplam olarak 60 örnek analiz edilmiştir. Çalışmaya böbrek kanseri çeşidine göre gruplandırılmış 30 hastaya ait normal ve tümör dokusudahil edilmiştir ve cinsiyet ve yaş ortalaması da dahil olmak üzere hastaların klinik özellikleri gösterilmiştir (Tablo 3.1). Böbrek dokuları çalışma zamanına kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çalışmaya dahil olanlardan onam alınmıştır ve çalışma yerel etik komite kurul tarafından onaylanmıştır. Karar numarası: 02.04.2013/137.

Tablo 3.1.Böbrek kanaseri tipi ve cinsiyetine göre hasta örneklerinin toplam sayısı.

Örnek no	Yaş	Cinsiyet	Kanser türü	İnvazyon kapasitesi	Konumu
1	57	K	Renal hücreli karsinom		Sol
2	44	E	Renal hücreli karsinom		Sol
3	64	K	Papiller RCC		Sağ
4	71	K	Renal hücreli karsinom		Sol
5	63	E	Renal hücreli karsinom		Sağ
6	61	K	Renal hücreli karsinom		Sağ
7	68	E	Papiller RCC	İnvazif değil	Sol
8	61	K	Renal hücreli karsinom	İnvazif değil	Sol
9	34	K	Renal hücreli karsinom		
10	77	E	Renal hücreli karsinom		Sağ
11	68	E	Renal hücreli karsinom		Sağ
12	55	E	Papiller RCC		Sağ
13	66	E	Renal hücreli karsinom		Sol
14	63	E	Papiller RCC		Sağ
15	69	E	Renal hücreli karsinom	İnvazif değil	
16	46	E	Renal hücreli karsinom		Sol
17	66	E	Renal hücreli karsinom	İnvazif değil	Sol
18	51	E	Renal hücreli karsinom		
19	64	E	Renal hücreli karsinom		Sağ
20	54	E	Papiller RCC		Sol
21	59	E	Renal hücreli karsinom		Sağ
22	66	E	Berrak hücreli RCC		Sağ
23	64	E	Kromofob RCC		
24	70	E	Berrak hücreli RCC		Sağ
25	41	E	Klasik RCC	İnvazif	Sağ
26	65	E	Berrak hücreli RCC		Sol
27	38	E	Renal Anjiyolipoma		Sağ
28	51	E	Berrak hücreli RCC		Sağ
29	54	E	Onkositom RCC		Sağ
30	55	E	Berrak hücreli RCC		Sol

3.2. Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan cihazlar, kimyasallar ve çözeltiler Tablo 3.2, 3.3 ve 3.4’te gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar, markaları ve üreticileri.

Cihaz	Marka	Üretim Yeri
Magnetik karıştırıcı	Velp	İtalya
Buzdolabı	Bosch	Türkiye
İnkübatör	Uniequip	Almanya
Vorteks	VELP	İtalya
Santifürüj 5810R	Eppendorf	Almanya
Mikropipet seti	Eppendorf	Almanya
Biyolojik güvenlik	Bilser	Türkiye
Mikrosantrifüj 5425D	Eppendorf	Almanya
Termal döngü cihazı (PCR)	AB	Singapur
Yatay jel elektroforezi	EC apparatus	ABD
Mikrodalga fırın	Arçelik	Türkiye
Otoklav	Hirayama	Japonya
Yatay karıştırıcı	J.P.SELECTA	İspanya
Spektrofotometre	NanoDropTechnologies	ABD
Ultraviyole transilluminator	UVPBioChemisystem	ABD
Su arıtma sistemi	Kats Scientific	İngiltere
Hassas terazi	Shimadzu	Japonya
Nükleotid dizisi analiz cihazı	AB	Singapur
Dikey jel elektroforezi	Owl Separation system	Prostmouth, ABD

Tablo 3.3.Kullanılan kimyasallar, markaları ve üreticileri.

Kimyasal Madde	Marka	Üretim yeri
Borik asit	Carlo Erba	İtalya
Etidyum bromür	Sigma	Almanya
Akrilamid	Sigma	Almanya
Bis-akrilamid	Sigma	Darmstadt, Almanya
Amonyumpersülfat	Fermentase	AB
Asetik asit	Carlo Erba	İtalya
Formaldehid	Merck	Darmstadt, Almanya
Sigma cote	Sigma	St. Louis, ABD
Binding Silane	Promega	Mannheim, Almanya
Gelsave	Merck	Darmstadt, Almanya
10X amonyum sülfat (PCR Buffer)	Fermentase	AB
Na ₂ CO ₃	Merck	Darmstadt, Almanya
MgCl ₂	Fermentase	AB
Tris	Fermentase	AB
dNTP	Fermentase	AB
Taq DNA polimeraz	Fermentase	AB
Agaroz	Prona	Madrid, İspanya
EDTA	Merck	Darmstadt, Almanya
Sodium tiyosülfat	Merck	Darmstadt, Almanya
TEMED	Sigma	St. Louis, ABD
100 bp marker	Fermentase	AB

Bromofenol Blue	Merck	Darmstadt, Almanya
Orange G	Sigma	Almanya
Etil alkol	Sigma	Almanya
Sephadex G-50	Sigma	Isveç
BigDye	Invitrogen	ABD
Asetik asit	GENIE®Probe regulation	İngiltere
Gümüş nitrat	Merck	Darmstadt, Almanya
Formaldehid	Merck	Darmstadt, Almanya

Tablo 3.4. Kullanılan çözeltiler ve kimyasal içerikleri.

Çözelti	İçerik
10X TBE	108,9 g Tris 55 g borik asit 9,37 g EDTA 1000 ml distile su
Üreli poliakrilamid	42 g üre 14 ml akrilamid bis-akrilamid %10 10 ml TBE
49,1akrilamid: bis-akrilamid	49 g akrilamid 1 g bisakrilamid 100 ml'ye distile sui le tamamlanır
SSCP yükleme buffer	8 mL formamid 2 ml distile su 0.025 g bromophenol blue 0.025 g xylene cyanol
Gümüş nitrat	2 g gümüş nitrat 2.5 mL of 37% formaldehid 2 lt distile su
Sodyum karbonat	60 g Sodyum karbonat 420 ml (10mg/mL) sodium tiyosülfat 2.5 mL of 37% formaldehid

	2 lt distile su
6X Orange G yükleme boyası	% 60 gliserol 15%Orange G 10mM Tris - HCl Ph 7,6 60 mM EDTA
Etidyum bromür	0,5 Etidyum bromür 1 ml distile su
Exo-Sap	Exonuclease I (10 U/µl) Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/µl) 5x dizitamponu Steril su

3.3. RNA Eldesi

Böbrek biyopsilerinden RNA eldesi Rneasy Total RNA Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Dokular 700 µl RLT liziz tamponu kullanılarak Polytron rotor – statör cihazından homojenize edildi. Daha sonra kromozomal DNA’yı parçalamak amacıyla 10 defa enjektör iğnesi ile aspire edildi. Hücre peletleri 10 defa enjektör iğnesi ile aspire edilerek 700 µl RLT liziz tamponu ile tekrardan sulandırıldı. RNA spin kolonlardan 40 µl dietilpirokarbonat ile muamele edilmiş su ile elde edildi. RNA miktar tayini 4 ul hacimde bölünmüş RNA’lardan spektrofotometrik yöntemle yapıldı. ($A_{260} - A_{320}$) / ($A_{280} - A_{320}$) oranı 1.7 olan ve/veya 0,5 µg’dan az olan RNA’lar çalışmaya dahil edilmedi. Tablo 3.5’te total RNA miktarları ve kalitesi gösterilmiştir.

Tablo 3.5.Toplam RNA miktarları ve kalitesi.

Örnek	Konsantrasyon ng/µL	260/280
1N	1592.076	2.093
1T	3001.575	1.782
2N	1965.882	2.068
2T	1203.03	2.085
3N	1658.319	2.077
3T	2939.419	1.9
4N	2229.782	2.093

4T	871.098	2.097
5N	933.361	2.078
5T	592.003	2.03
6N	56.864	2.003
6T	73.454	1.895
7N	2019.64	2.082
7T	2496.017	2.052
8N	1335.745	2.082
8T	1277.417	2.075
9N	2842.605	1.796
9T	3029.377	1.388
10N	933.361	2.078
10T	204.342	2.03
11N	1920.844	2.109
11T	1252.796	2.094
12N	2542.87	2.035
12T	2048.686	2.102
13N	1404.37	2.086
13T	369.865	2.085
14N	14.467	1.697
14T	39.966	1.966
15N	12.322	1.744
15T	16.014	1.888
16N	3110.082	1.561
16T	3144.817	1.214
17N	2748.671	1.914
17T	1539.505	2.053
18N	2820.112	1.215
18T	3006.285	1.86
19N	18.605	1.655
19T	10.49	1.522
20N	21.525	1.932
20T	20.775	1.992
21N	315.932	2.101
21T	482.891	2.075
22N	1361.41	2.102
22T	133.735	2.05
23N	20.155	1.586
23T	28.609	1.56

24N	227.833	2.049
24T	56.611	1.909
25N	53.744	1.877
25T	9.262	1.674
26N	21.525	1.554
26T	11.579	1.591
27N	24.79	1.549
27T	12.71	1.565
28N	10	1.723
28T	39.872	1.501
29N	1098	2.014
29T	325.734	2.055
30N	38.151	1.987
30T	92.508	2.052

3.4. Tamamlayıcı DNA sentezi

Tamamlayıcı DNA (cDNA) mesajcı RNA kalıbından revers transkriptaz ve DNA polimeraz enzimleri tarafından katalize edilen bir reaksiyon ile sentezlenmiştir.

Bu çalışmada, protoScript Tek Zincir cDNA Sentez kiti (BioLabs, İngiltere) kullanılmıştır. Çalışma alanı % 70'lik (h/h) etanol kullanılarak temizlenmiştir ve bütün aşamalarda filtreli uç kullanılmıştır. Bileşenler çözündürülerek buz üzerinde tutulmuştur. DNA kontaminasyonunu test etmek amacıyla revers transkriptaz yokluğunda bir kontrol reaksiyonu konulması önerilmektedir. RNA miktarları ve kaliteleri aynı olmadığı için her örnek için farklı miktarlarda RNA kullanılmıştır.

Tablo 3.6.cDNA sentezi bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar (µl)
Toplam RNA	*
d(T)23VN(50 µM)	2 µl
Nucleaz içermeyen su	**
Toplam hacim	8 µl

* Tablo 3.5 ve 3.6'da gösterildiği gibi RNA miktarları ve kaliteleri aynı olmadığı için her örnek için farklı miktarlarda RNA kullanılmıştır.

** Her örnek için farklı miktarlarda nükleaz-arı H₂O kullanılmıştır.

RNA 70°C’de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiştir ve sonra Tablo 3.7’de gösterilen bileşenler eklenmiştir.

Tablo 3.7.cDNA sentez enzimlerinin bileşenleri.

Bileşen	Miktar (µl)
M-MuLV Tepkime karışımı	10 µl
M-MuLVEenzim karışımı	2 µl

Toplamda 20 µl cDNA reaksiyonu 42°C’de bir saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 80°C’de 5 dakika bekletilerek enzimler etkisiz hale getirilmiştir. Sonra, 30 µl H₂O kullanılarak reaksiyonlar PCR için 50 µl’ye seyreltilmiştir. Sonra yapılacak PCR çoğaltımları için cDNA ürünleri -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) in vitro olarak DNA ve cDNA hedef dizilerinin çoğaltılmasıdır. PCR tekniği bu çalışmada *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genlerini çoğaltmak amacıyla kullanılmıştır. SDSC workbench çevrimiçi primer tasarım programı yardımıyla üç çift primer ve bir çift *GAPDH* primerleri tasarlanmıştır.

PCR reaksiyonundaki bütün malzemeler sterilize edilmiştir ve PCR karışımı steril kabin içerisinde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu MJ Research, AB Applied Biosystem PCR cihazları kullanılarak yapılmıştır.

3.5.1. Primer Tasarımı

Bir primer, DNA sentezi için bir başlangıç noktası görevi gören bir nükleik asit ipliğidir.

Primerlerin seçimi dizilerin hedef bölgesine bağlıydı. *VHL* geni izoform 1 (Gi: 319655736 ref NM_000551.3 Homo sapiens von Hippel-Lindau tumor suppressor, mRNA), *PBRM1* geni domain 1(Gi: 186287197 ref NM_018313.4 Homo sapiens polybromo 1, mRNA), ve bir çift *SETD2* geni primeri (Gi: 197313747 ref NM_014159.6 Homo sapiens SET domain containing 2, mRNA) tasarlanmıştır. Çevrimiçi primer tasarlama programı <http://workbench.sdsc.edu> kullanılmıştır. Bu

primerlerin dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve PCR ürün uzunlukları Tablo 3.8’de gösterilmiştir.

Tablo 3.8. Primer dizileri, VHL, PBRM1 ve SETD2 genlerinin hedef bölge PCR ürün uzunlukları ve optimum bağlanma sıcaklıkları.

Primer adı	Dizi 5’ten 3’ e doğru	Optimum bağlanma sıcaklığı	PCR ürün boyutu
<i>VHL</i> (isoform1)	AGATGCAGGGACACACGATG		
FW Primer	ATCCGTTGATGTGCAATGCG	53 °C	273 bp
RV Primer			
<i>PBRM1</i> (domain1)	TCCAACGTGTAGATCCTATTGCCG		
FW Primer	CATCTGCTTCTCCTTTCTGAACA	55,4°C	394 bp
RV Primer			
<i>SETD2</i>	ACGTCATGGGCTGTCTTTGT		
FW Primer	TTGGGAGTGTCTGTGTCAGC	54,1°C	300 bp
RV Primer			

2.5.2. PCR iyileştirilmesi (Optimization)

Gradient PCR yapmak için her primer çifti için örnek cDNA kullanılmıştır. Çoğaltma AB PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Bütün primerler için optimum erime sıcaklıkları agaroz jel elektroforezi sonuçları ile belirlenmiştir. Kullanılan gradient PCR karışımı Tablo 3.9’da gösterilmiştir.

Tablo 3.9. PCR reaksiyonun bileşenleri ve 25µL toplam hacimdeki miktarları

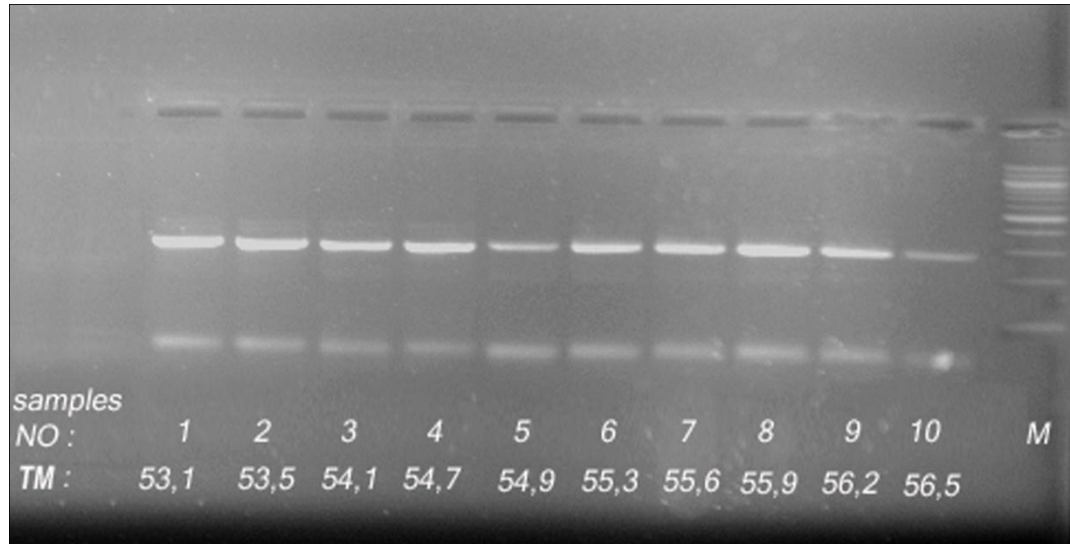
Kimyasal madde	Miktar (µL)
dH ₂ O	14.875µL
10X PCR buffer amonyum sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	2.5µL
25 mM MgCl ₂	2µL
2 mM dNTP	1.5µL
20 mM Forward primer	1µL
20 mM Revers primer	1µL
5 U/ML Taq DNA polimeraz	0,125 µL
cDNA template	2µL
Karışım	25µL

PCR programı Tablo 3.10’da yer verilen değişkenlere göre 35 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tablo 3.10. Gradient PCR Koşulları

Aşama	Sıcaklık	Zaman
1. Ön denaturasyon	95°C	3 dk
2.Denaturasyon	95°C	30 sn
3.Primer bağlanması	55°C - 60°C	30 sn
4. Uzama	72°C	30 sn
	35 döngü	
5.Son uzama	72°C	2 dk
	4°C	0

Son ürünler % 2’lik agaroz jel elektroforezi ve etidiyum bromür boyamasıyla analiz edilmiştir. Jel 140 voltta 30 dakika yürütülmüştür. cDNA parçaları UV ışığı ile görüntülenmiştir. Optimum bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir. Gradient PCR sonrası yapılan agaroz jel elektroforezi görüntülerine göre bütün primerler için 54,1°C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Resim 3.1. % 2’lik agaroz jel elektroforezi ve etidiyum bromür boyaması analiz edilen gradient PCR ürünlerinin görüntüleri. M: Marker (100 bp). Ürün bağlanma sıcaklığı bütün tepkimeler için 54,1 olarak seçilmiştir.

Bütün primer çiftleri için en uygun bağlanma sıcaklıklarını belirlemek için gradient PCR aynı koşullar altında yapılmıştır.

3.6. GAPDH çoğaltımı

Hamarat genler (Housekeeping genes) özgün promotör elementler içerirler. Buda her hücrede devamlı olarak ifade edilmelerini sağlar (48). Ancak, hamarat genlerin moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılması ifade seviyelerinin hücreden hücreye, örnekten örneğe, muameleden muameleye ve/veya hastadan hastaya değişmediği öngörüsünden gelmektedir (48).

Her metodolojinin kanıtlanması gerekirken, kanıtlanmış alternatif bir normalizasyon bilgisinin yokluğunda hamarat gen ifadesinin biyolojik dalgalanmaya sahip olduğunu belirlemek zordur (48). Bir hücre iskeleti proteini olan β -Actin ve bir glikoliz enzimi olan GAPDH ifade tutarlılığı oldukça rapor edilen en çok kullanılan iki hamarat gendir (48). GAPDH (hamarat gen) ifade seviyesi; *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin ifade seviyelerini ölçmek için kullanılmıştır. GAPDH PCR tepkimesi bileşenleri Tablo 3.11’de gösterilmiştir.

Tablo 3.11. PCR reaksiyonun bileşenleri ve 25 μ L toplam hacimdeki miktarları.

Kimyasal madde	Miktar (μ L)
dH ₂ O	15.875 μ L
10X PCR tamponu; (NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 μ L
25 mM MgCl ₂	2 μ L
2 mM dNTP	2 μ L
Fw primer	0.25 μ L
Rv primer	0.25 μ L
5 U/ML Taq DNA polimeraz	0,125 μ L
cDNA kalıp	2 μ L
Karışım	25 μL

PCR programı Tablo 3.12’de yer verilen değişkenlere göre 25 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tablo 3.12.GAPDH PCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre
1. ön denaturasyon	94°C	5 dk
2. denaturasyon	94°C	30 sn
3. primer bağlanması	65C	30 sn
4.uzama	72°C	30 sn
	25 döngü	
5.son uzama	72°C	5 dk
	4°C	0

3.7. Elektroforez

Elektroforez bir karışımdaki molekülleri ayırmak için farklı elektrik kuvveti uygulanarak yapılan bir yöntemdir. Özellikle proteinlerin ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin ayrımı için kullanılmaktadır(49).

DNA molekülleri negatif yüklüdürler. Bir elektriksel alanda pozitif kutba doğru yürürler (49). Bir molekülün yürüme hızına etki eden iki faktör vardır.Bunlar molekülün şekli ve kütlece ağırlığıdır (49).

Bu çalışmada agaroz jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforez ve denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi yöntemleri kullanılmıştır.

3.7.1. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi PCR reaksiyonlarının verimliliğini test etmek amacıyla kullanılmaktadır. Örnekler % 2'lik agaroz jelde yürütülerek DNA'nın UV ışığı altında görünebilir olmasını sağlayan bir bileşik ile boyanmaktadır. Etidium bromür (EtBr) rutin olarak agaroz jelde DNA'nın boyanmasında kullanılmaktadır. Bizim cDNA örneklerimiz 140 voltta 30 dakika elektroforez edilmiştir. PCR ürün büyüklükleri 270-400 baz çifti arasında değişmekteydi.

3.7.2. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)

Poliakrilamid jeller akrilamid ve genellikle N,N'-metilenbisakrilamid gibi bir çapraz bağlama maddesinin polimerizasyonu ile oluşan kimyasal olarak çapraz-bağlanmış jellerdir (50). Reaksiyon bir serbest radikal polimerizasyonudur ve genellikle başlatıcı olarak amonyum persülfat ve katalizör olarak N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine

(TEMED) kullanılması ile gerçekleşir. (50). Hazırlaması agaroz jelden daha çok zaman almaktadır. Ancak, agaroz jele kıyasla birçok avantajları vardır (50). Aynı zamanda büyük bir çözümleme gücü vardır ve çözümleme kaybı olmadan büyük miktarlarda cDNA barındırabilirler. Ayrıca poliakrilamid jellerinden elde edilen cDNA son derece saftır (50).

2.7.3. Denatüre Poliakrilamid / Üre Jel Elektroforez Yöntemi

Denatüre poliakrilamid jel *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin mRNA ifade seviyelerini ölçmek amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca, *GAPDH* (hamarat gen) üre denatürasyonu ile ölçülmüştür.

1. % 7'lik poliakrilamid jeli çözeltisi denatüre edildi ve Table 3.13'te gösterilen bileşenlerle ile karıştırıldı.

Tablo 3.13. Üreli poliakrilamid jel bileşenleri

Kimyasal bileşen	Miktar (µL)
50% akrilamid/bisakrilamid	14 ml
10X TBE Buffer	10 ml
Üre	42 g
Deiyonize su	100 ml ye tamamlanır

2. Çözelti, tamamıyla karışımının sağlanması ve ürenin çözülmesi için manyetik karıştırıcı yardımıyla kuvvetlice çalkalandı.
3. 45 µl TEMED eklenip karışımın sağlanması için çevirilmeye devam edildi. Hemen ardından 400 µl amonyum persülfat çözeltisi eklenip karıştırıldı.
4. Akrilamid, jel camlar arasına döküldü ve tarak takıldı.
5. Jelin üstüne yerleştirilen tarak akrilamid polimerize olurken camların ayrılmaması için sıkıştırıldı ve jel 45- 60 dakika polimerleşmeye bırakıldı.
6. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, tarak ve bütün ayırıcılar jelden çıkarıldı. Elektroforez tankının alt haznesi 1X TBE tamponu ile dolduruldu. Jel tankın alt haznesine camlar ve jelin altı arasında baloncuk olmayacak şekilde yerleştirildi.

- Jelin camları elektroforez tankının üstüne sıkıştırıldı ve tankın üst haznesi kuyucukların üstü kapanacak şekilde 1X TBE tamponu ile dolduruldu.
7. 60 W (watt)'ta 60 dakika ön-yürütme gerçekleştirildi.
 8. Kuyucuklar üre ve jel parçacıklarını uzaklaştırmak amacıyla 1X TBE tamponu ile yıkandı.
 9. 4 µl PCR ürünü ve 2 µl yükleme boyası karıştırıldı ve 95°C' de 5 dakika denatüre edildi. Hemen ardından en az beş dakika olmak üzere buz üzerine alındı. Her bir seyreltilmiş örnekten 6 µl % 7 poliakrilamid jelin kuyularına yüklendi.
 10. Jel, 2,5 saat boyunca 60 W (Watt)'ta yürütüldü.
 11. Jel, gümüş nitrat ile boyanmıştır (gümüş boyama; SSCP boyama kısmında detaylı olarak anlatılmıştır). Daha sonra jel UV ışık altında incelendi.

3.9. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm (SSCP) Yöntemi

SSCP analizi dizi değişimlerini (tek nokta mutasyonları ve diğer küçük ölçekli değişiklikler) elektroforetik yürüme farklılığı aracılığıyla tanımlamak amacıyla kullanılmaktadır (51). Bu farklılıklar potansiyel olarak DNA molekülünün yapısında konformasyonel değişikliklere sebep olabilir (51). Denatürasyonun olmadığı koşullarda ve düşük sıcaklıklarda, tek zincirli DNA molekülleri nükleotit dizilerine bağlı olarak özgül konformasyon gösterebilirler (51). Bu konformasyonel değişimler moleküllerin yürümesinde saptanabilir farklılıklara sebep olabilirler (51). SSCP analizleri, basitlik ve kullanım kolaylığı nedeniyle yaygın olarak dizi değişimlerinin tespiti için kullanılan bir tekniktir (51). cDNA parçaları (fragmanları) işaretli PCR parçaların otoradyografisi, gümüş boyama, etidiyum bromür veya floresan etiketli primerler görüntülenebilmektedir. Ancak bizim çalışmamızda gümüş boyama kullanılmıştır (51).

3.9.1. SSCP tekniği yöntemi

3.9.1.1. Camların hazırlanması

U şeklinde ve dikdörtgen şeklinde camlar kullanılmıştır ve bu camlar kullanılmadan önce temizlenmelidir. Camlar etanol (% 70) kullanılarak temizlenmiştir. Bu aşama üç defa tekrar edilmiştir. Sonra 1000 µl jel tutucu çözelti U cam üzerine yavaşça ve dikkatlice peçete ile yayılmıştır ve 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. Bağlanma çözeltisi (6 µl silan + 10µl % 0.5'lik asetik asit 2000 µl % 96'lık etanol içerisinde

eklenir) dikdörtgen cam üzerine yavaşça ve dikkatlice peçete ile yayılmıştır ve 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, ayırıcılar bir camın her iki yanına ve alt kısmına yerleştirilmiştir ve sonra diğer camın üzerine yerleştirilerek camların kaymaması için kısıkaçlarla tutturulmuştur.

3.9.1.2. Poliakrilamid jelin hazırlanması

Poliakrilamid jel 49 gr akrilamid ile 1 gr bisakrilamidin (49:1 akrilamid/bisakrilamid) beher içerisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır ve hacim arı su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Poliakrilamid jelin son derişimi % 50 (w/v) olmuştur. Jel karışımı şöyledir: 80 ml arı su, 14 ml poliakrilamid jeli stok çözeltisi, 6 ml 10x TBE tamponu, 450 µl amonyum persülfat çözeltisi ve 45 µl TEMED. Karışımındaki poliakrilamid jel derişimi % 7 olmuştur. Jel hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek camlar arasına dökülmelidir. Köpekbalığı-dişli tarak jelin en üstüne yerleştirilmiş ve jel en az 45 dakika olmak üzere polimerize olmaya bırakılmıştır.

Kısıkaçlar, tarak ve katı jel camların altından ve üstünden temizlenmiştir. Sonra bu camlar elektroforez cihazın tankına U camı dikdörtgen camın arkasına gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Tankın alt ve üst kısmı 1X TBE ile doldurulmuştur. Tarağın dişleri yükleme için kuyucuk oluşturmak amacıyla jelin üst kısmına iki cam arasına yerleştirilmiştir. Jelin kullanıma hazırlamak amacıyla amacıyla 450 voltta 30 dakika ön yürütme yapılmıştır.

3.9.1.3. Yükleme için örneklerin hazırlanması

3 µl PCR ürünü ve 7 µl yükleme boyası karıştırılarak 95°C'de 4 dakika denatüre edilmiştir ve hemen en az beş dakika olmak üzere buzun üzerine alınmıştır. Seyreltilmiş her bir örnekten 4 µl % 7'lik poliakrilamid jelin kuyularına yüklenmiştir. Elektroforez dikey bir elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler 1x TBE tamponu içerisinde (Tris–borat 89 mM, 2 mM EDTA, pH 8.0) 430 voltta, 400 MA'de 16:30 saat yürütülmüştür.

3.9.1.4. PAGE jeldeki örneklerin boyanması

Jelin olduğu cam % 10 asetik asit içeren leğenin içerisine yerleştirilmiş ve 10 dakika çalkalayıcıya konmuştur. Sonra, 10 dakika dH₂O içerisinde yıkanmıştır. Jel boyanmak için gümüş nitrat çözeltisi içeren leğenin içerisine yerleştirilerek 60 dakika

yerleştirilmiştir. Sonra 10 saniyelik kısa bir yıkama yapılmış ve cam DNA bantları gözüken kadar soğuk geliştirme çözeltisi (Geliştirme çözeltisi: 60 mg/l anhidroz sodyum karbonat+420 Ml sodyum tiyosülfat+2.5ml/l soğuk formaldehid çözeltisi) içeren yeni bir leğene alınmıştır. Ondan sonra, jel % 10 asetik asit içerisine konulmuştur. Son olarak 10 dakika dH₂O ile yıkanmıştır.

3.10. PCR Dizileme yöntemi

VHL, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin altı cDNA parçası (fragman) poliakrilamid jelden çıkarılmış ve PCR için cDNA kalıbı kaynağı olarak kullanılmıştır. Diğer substratların oranları Tablo 3.9’ da gösterildiği gibi yukarıdakilerle aynıdır. PCR tepkimesinde her bir örnek için toplam hacim 25 µL’dir ve Table 3.10’da gösterilen PCR koşulları ile aynı olacak şekilde PCR cihazında (AB) çalıştırılmıştır. PCR ürünleri % 2’lik agaroz jel elektroforezinde 140 voltta 30 dakika yürütülmüştür.

3.10.1. Dizileme öncesi hazırlık aşaması

3.10.1.1. PCR ürünlerinin ExoSAP ile temizlenme protokolü

ExoSAP karışımı steril su, ekzonükleaz I (10U/µl), karides alkalın fosfataz (1 U/µl)’dan oluşmaktadır. Kalıbın dizilemeye hazır hale gelmesi için ekzonükleaz I primerlerin, karides alkalın fosfataz serbest nükleotitlerin yıkılmasını sağlamaktadır.

ExoSap karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

5 µl PCR ürünü+2 µl ExoSap.

cDNA kalıbının temizlenmesi Tablo 3.14’te gösterilen koşullarda AB PCR cihazındagerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.14.ExoSAP ile PCR ürünlerini temizleme koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre
1 – Arta kalan primerler parçalanır	37C	30 dk
2 –Enzim parçalanır	85C	15 dk
	4C	∞

3.10.1.2. Döngüsel Dizileme Tepkimesi

BigDye ışığa yüksek derecede duyarlı olduğu için döngüsel dizileme tepkimesinin hazırlanması için bütün ışık kaynaklarının kapatılması gerekmektedir. Döngüsel dizileme protokolü Tablo 3.15’te verilmiştir.

Tablo 3.15. Her bir reaksiyon için döngüsel dizileme protokolü aşağıdaki şekildedir.

Kimyasal madde	Miktar
DNA	1µl
Fw primer (0.8 µM)	2µl
5X BigDye tampon	2µl
BigDye (v3. 0) karışımı	1µl
ddH ₂ O	4µl

Daha sonra cDNA örnekleri çoğaltım için PCR cihazına yerleştirilmiştir. Ayarlanan program Tablo 3.16’da verilmiştir.

Tablo 3.16. Dizileme PCR tepkimesi için ısı koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre
1.Ön denatürasyon	96°C	1 dk
2.Denatürasyon	96°C	10 sn
3. Primer bağlanması	50°C	5 sn
4.Uzama	60°C	30 sn
	25 döngü	
	4° C	∞

3.10.1.3. PCR ürünlerini temizlemek için Sephadex spin-kolon protokolü

Sephadex çözeltisi Tablo 3.17’de verilmiştir.

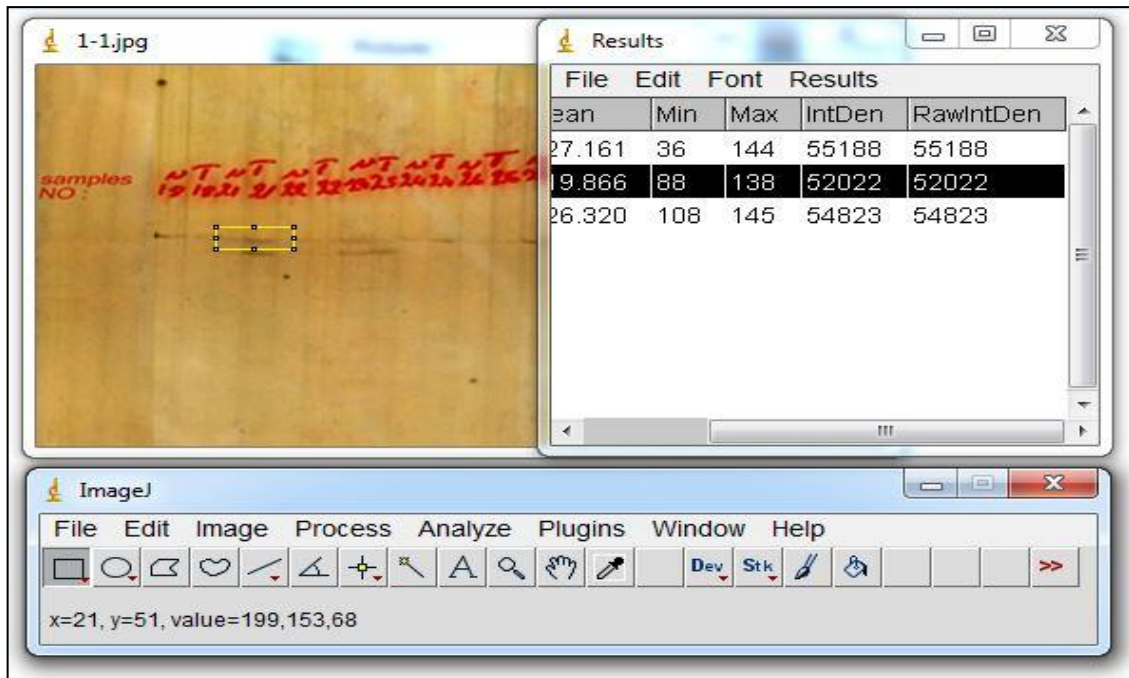
Tablo 3.17. PCR ürünlerini temizlemek için hazırlanan Sephadex spin-kolonların bileşenleri

Bileşen	Miktar
Sephadex G-50 toz	4g
ddH ₂ O	42ml

Hazırlanan çözelti 45 dakika karıştırmak amacıyla vortekse bağlanmıştır. Boş toplama kolonları 1,5 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş ve herbir toplama kolonuna 850 µl sephadex çözeltisi konulmuştur. Tüpler 3,800 rpm'de 2 dk çevrilmiştir ve toplama kolonları yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir. Ondan sonra, 10µl PCR ürünü hazırlanan kolonlara kolon matrisine değdirilmeden tam orta kısma gelecek şekilde konulmuştur. Sonra tüpler 3,800 rpm'de 2 dk çevrilmiştir.

3.11. Gen ifade analizi ölçümü

Bu çalışmada mRNA ifade seviyeleri ImageJ programı kullanılarak ölçülmüştür. (Şekil 3.2) (versiyon 1.46r, <http://imagej.nih.gov/ij/>).



Şekil 3.1. Üreli denatüre poliakrilamid jel sonuçları Image J (v1.46r) programı ile ölçülmüştür.

3.12. İstatistiksel analizler

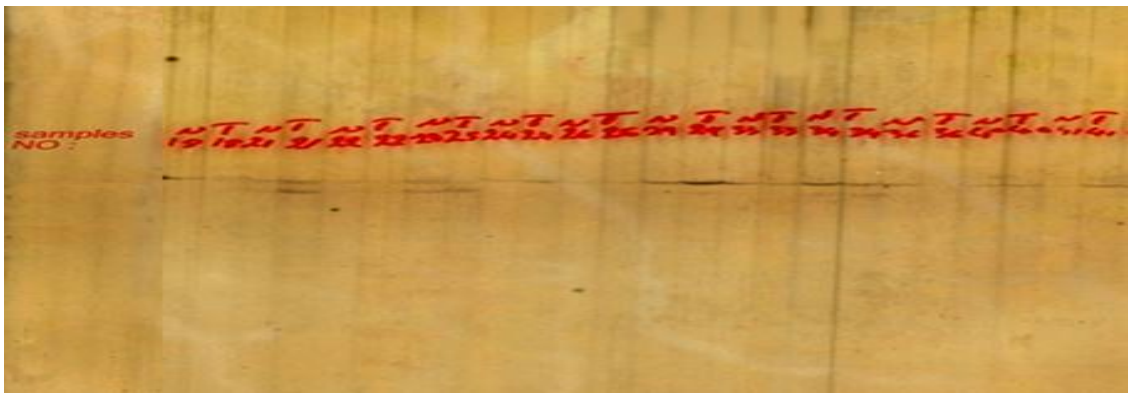
İstatistiksel analizler Wilcoxon testi kullanılarak yapılmıştır. $p \leq 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Gen İfadesi Sonuçları

Bu çalışmada *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2*'nin hedef dizi bölgeleri % 7'lik üreli poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmıştır ve gümüş nitrat ile boyanmıştır (Resim4.1, 4.2 ve 4.3).

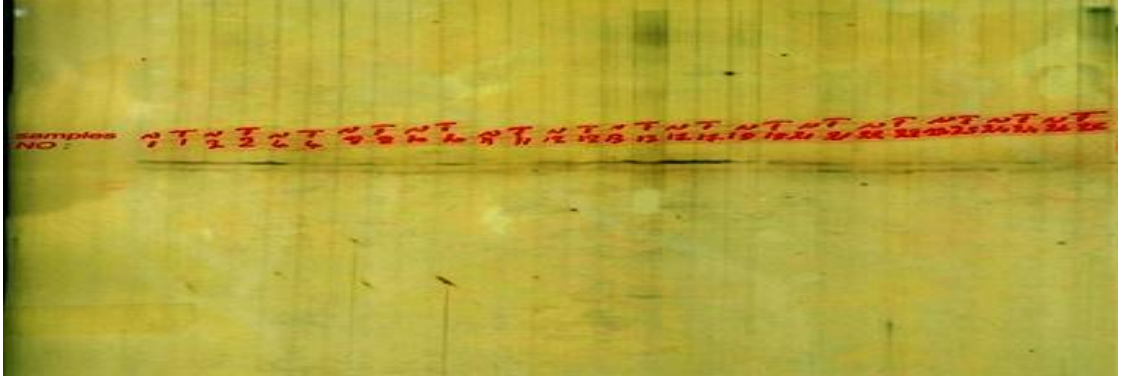
GAPDH (hamarat gen) denatüre poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmıştır. Aşağıdaki şekiller gen ifadesi sonuçlarını göstermektedir (Resim4.4).



Resim 4.1. *PBRM1* geninin % 7'lik üreli poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş nitrat ile boyama sonuçları. Bantlar ifade seviyesinin miktarını göstermektedir, kırmızı renkler normal ve tümör örneklerinin numaralarıdır.



Resim 4.2. *SETD2* geninin % 7'lik üreli poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş nitrat ile boyama sonuçları. Bantlar ifade seviyesinin miktarını göstermektedir, kırmızı renkler normal ve tümör örneklerinin numaralarıdır.

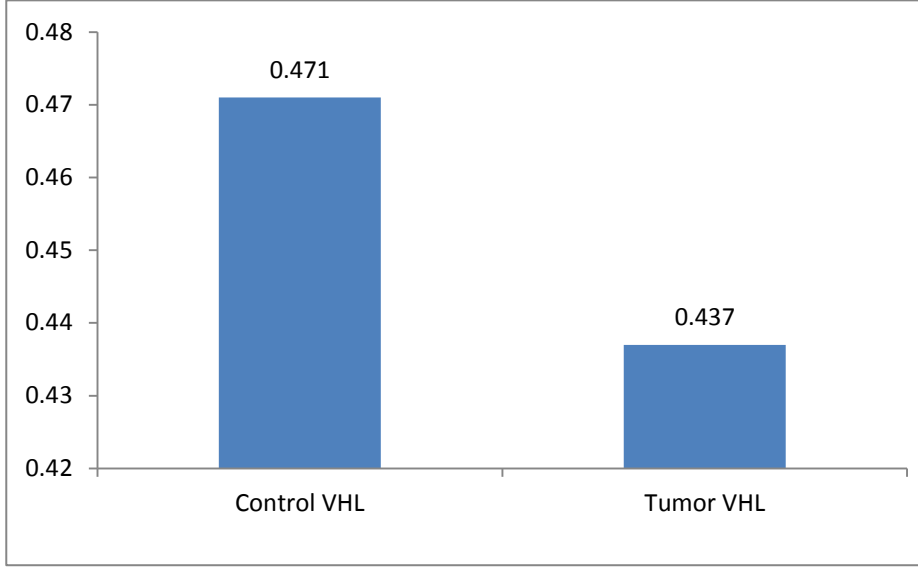


Resim 4.3. VHL geninin % 7'lik üreli poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş nitrat ile boyama sonuçları. Bantlar ifade seviyesinin miktarını göstermektedir, kırmızı renkler normal ve tümör örneklerinin numaralarıdır.



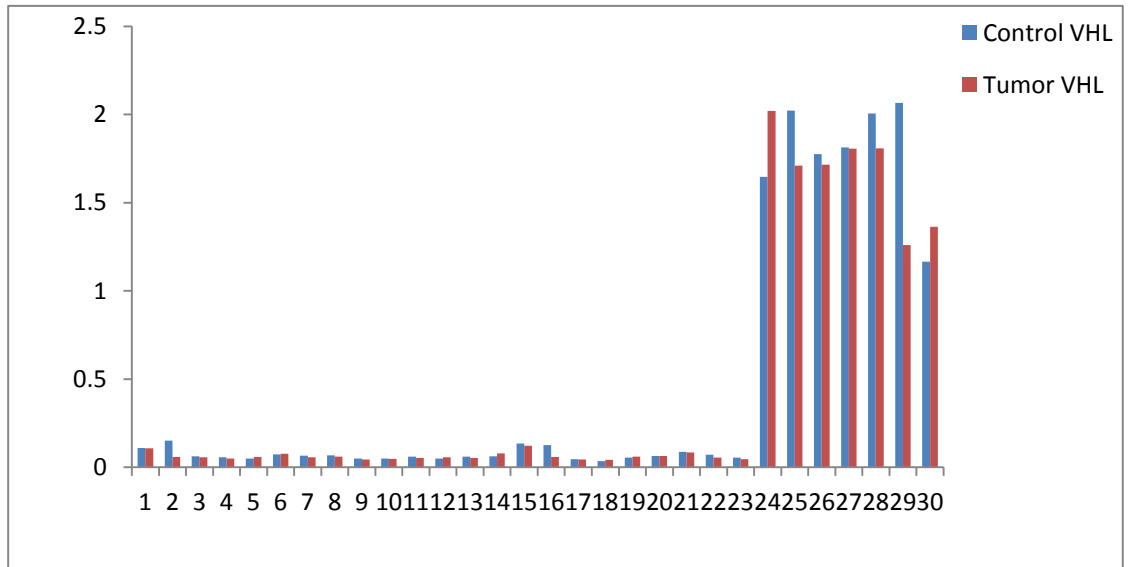
Resim 4.4. GAPDH geninin % 7'lik üreli poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş nitrat ile boyama sonuçları. Bantlar ifade seviyesinin miktarını göstermektedir, kırmızı renkler normal ve tümör örneklerinin numaralarıdır.

VHL geninin ifade seviyesi kanserli ve normal olmak üzere 30 çift taze dokudan elde edilmiştir. Denatüre poliakrilamid jel sonuçları ImageJ (version 1.46r) programı ile ölçülmüştür. Tümörlü örneklerin mRNA ifade seviyesi kontrol grubunun ifade seviyesine kıyasla düşmüştür. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir (Wilcoxon testi, $p = 0,312$). Hem kontrol grubunun hemde tümör grubunun mRNA ifade seviyeleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



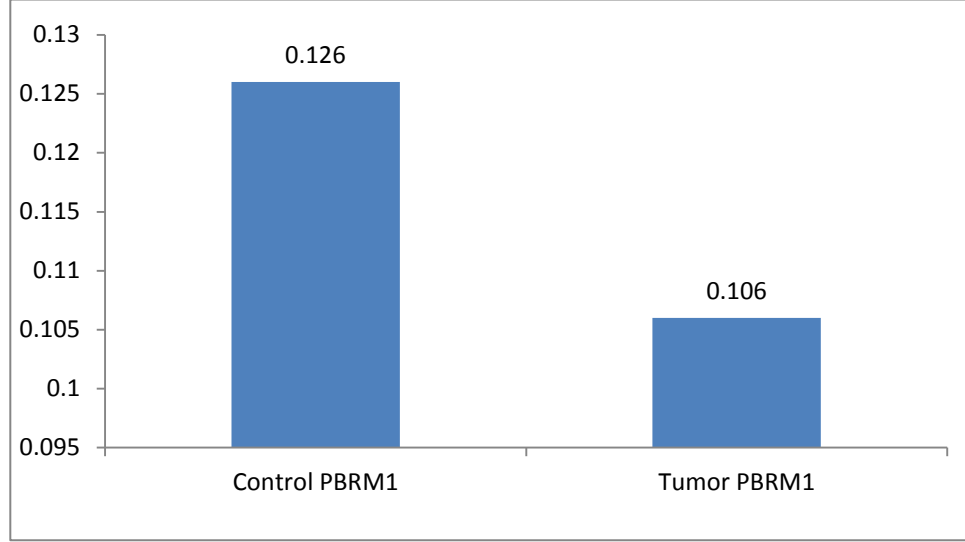
Şekil 4.1. *VHL/GAPDH* geninin normal ve tümör için kantitatif mRNA ifade seviyesi (Wilcoxon test; $p=0,312$). Kontrollerin ortalama mean değeri = 0.471, tümörlerin ortalama mean değeri = 0.437.

VHL geninin ifade seviyesi kanserli ve normal olmak üzere 30 çift hastadan elde edilmiştir. Her hasta farklı ifade seviyesine sahipti. Normal ve tümörlü grubun karşılaştırılması Şekil 4.2’de verilmiştir. 30 kanser hastasının 18 tümörlü dokusundaki mRNA ifade seviyesi normal kontrol grubuna kıyasla düşmüştür. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.



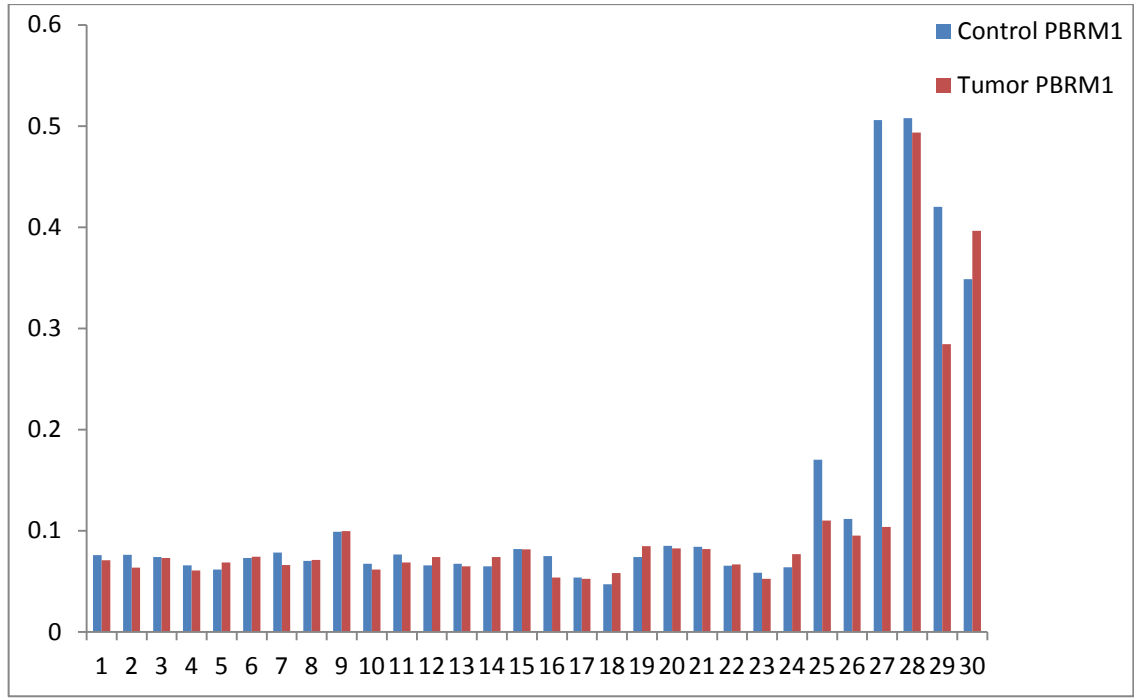
Şekil 4.2. *VHL/GAPDH* geninin normal ve tümör için mRNA ifade seviyesi. 30 kanser hastasının 18 tümörlü dokusundaki mRNA ifade seviyesi normal kontrol grubuna kıyasla düşmüştür. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tümör örneklerinde *PBRM1* geninin kantitatif mRNA ifade seviyesi normallere kıyasla az oranda düşmüştür. Ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamsızdı (Wilcoxon test; $p = 0,168$). Hem kontrol grubunun hemde tümör grubunun mRNA ifade seviyesi Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



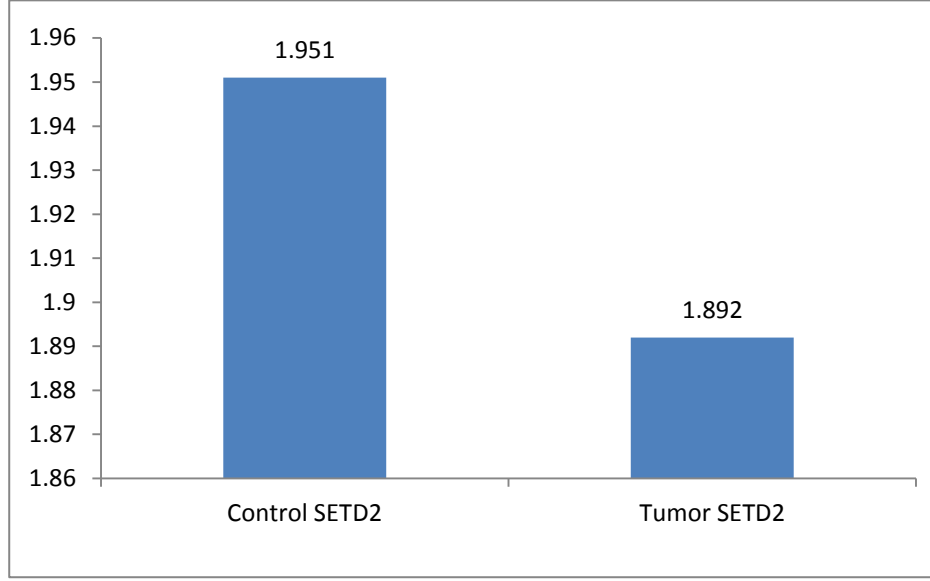
Şekil 4.3. *PBRM1/GAPDH* geninin normal ve tümör için mRNA ifade seviyesi (Wilcoxon testi; $p=0,168$). Kontrollerin ortalama mean değeri = 0.126, tümörlerin ortalama mean değeri = 0.106.

Her hastanın *PBRM1* geni mRNA ifade seviyesi farklı idi. Normal ve tümörlü grubun karşılaştırılması Şekil 4.4'te verilmiştir. 17 hastanın tümörlü dokusunda mRNA ifade seviyesi normal gruba kıyasla düşmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.



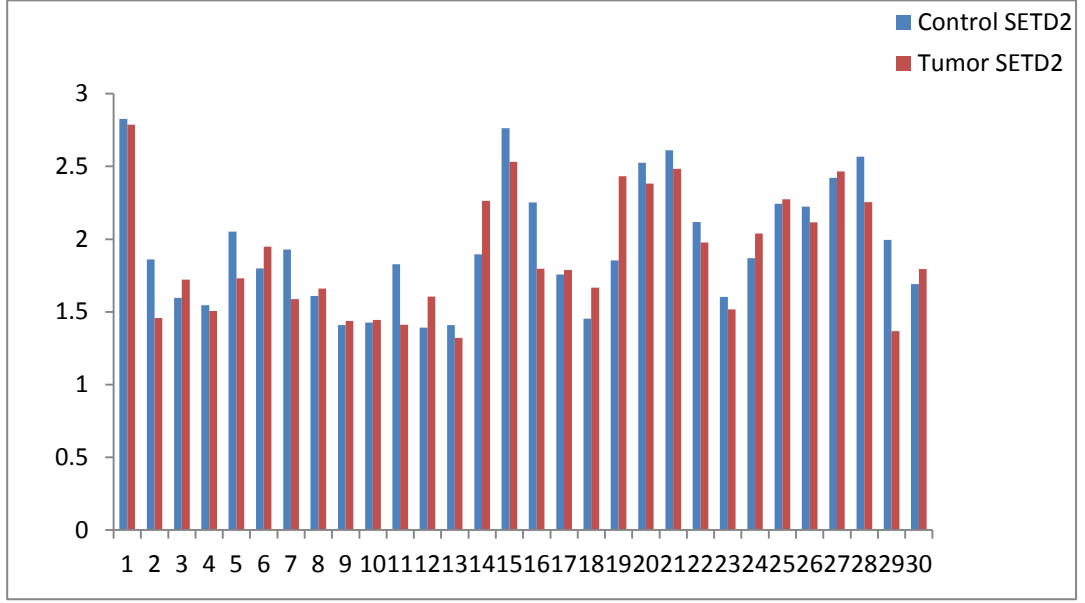
Şekil 4.4. *PBRM1 /GAPDH* geninin normal ve tümör için mRNA ifade seviyesi. 17 hastanın tümörlü dokusunda mRNA ifade seviyesi normal gruba kıyasla düşmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tümör örneklerinde *SETD2* geninin mRNA ifade seviyesi normallere kıyasla düşmüştür. Ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir (Wilcoxon test; $p=0,226$). Hem kontrol grubunun hem de tümör grubunun *SETD2* geni mRNA seviyesi Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. *SETD2/GAPDH* geninin normal ve tümör için mRNA ifade seviyesi (Wilcoxon testi; $p=0,226$). Kontrollerin ortalama mean değeri = 1.951, tümörlerin ortalama mean değeri = 1.892

Her hastanın SETD2 geni mRNA ifade seviyesi Şekil 4.6'da gösterildiği gibi farklı idi. 16 hastanın tümörlü dokusunda mRNA ifade seviyesi normal gruba kıyasla düşmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

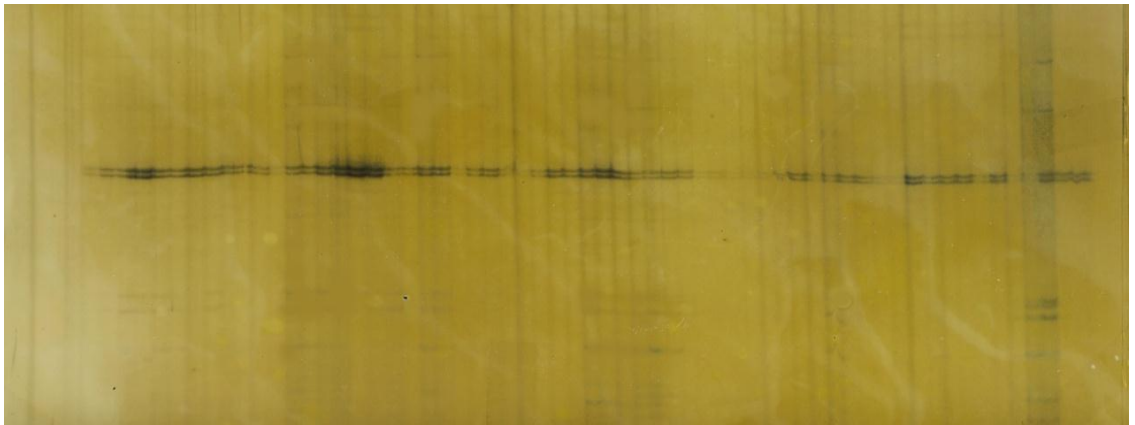


Şekil 4.6. *SETD2* /*GAPDH* geninin normal ve tümör için mRNA ifade seviyesi. 16 hastanın tümörlü dokusunda mRNA ifade seviyesi normal gruba kıyasla düşmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

4.2. SSCP sonuçları

VHL, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin mRNA dizilerinin üç hedef bölgesi taranmıştır.

Bu çalışmada farklı bantlar (farklı genotipler) gösterilmek istenmiştir. *VHL* izoform 1, Polibromo domain 1 ve *SETD2*'nin rastgele bir bölgesi % 7'lik poliakrilamid jelde elektroforez edilmiştir. SSCP sonuçlarında farklı bantlar gözlemlenememiştir. Hem tümör hemde normal örneklerin sonuçları Resim 4.5'te gösterilmiştir.



Resim 4.5. *SETD2* geni için gümüş nitrat boyama sonrası % 7'lik poliakrilamid jel görüntüsü. SSCP sonucunda farklı bantlar (genotipler) gözlemlenememiştir.

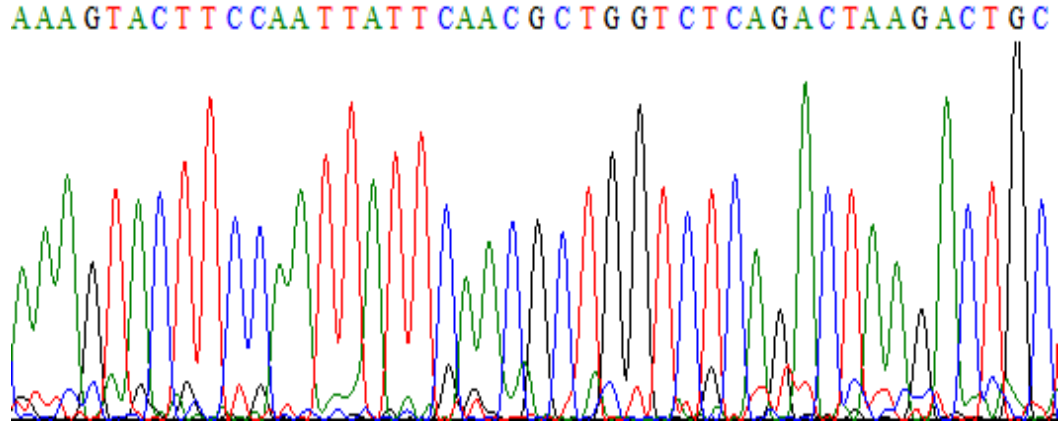
4.3. Dizileme sonuçları

Poliakrilamid jel elektroforezi ile SSCP tekniği muhtemel gen mutasyonlarını tanımlamak için kullanılmıştır. Ancak, örneklerde farklı bantlar saptanamamıştır. Sonra, *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genleri için üç çift örnek seçilmiştir. Bu dizi analizi tekniği ile SSCP sonuçlarını desteklemek amacıyla yapılmıştır.

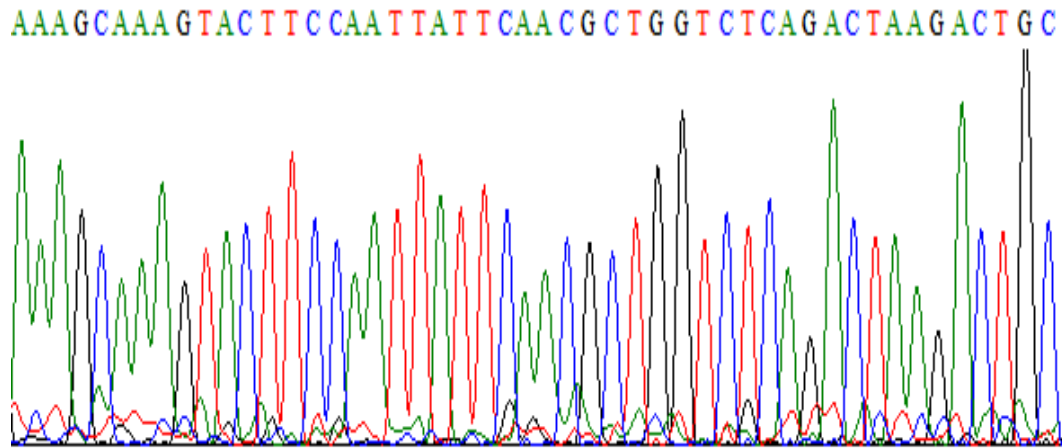
VHL, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin DNA dizileri hasta örneklerinin elde edilen DNA dizi sonuçları (Query Sequence) ile karşılaştırmak amacıyla NCBI web sitesinden elde edilmiştir.

Ancak, referans dizilerle karşılaştırıldığında üç hedef bölgenin PCR dizilerinde bir farklılık saptanamamıştır. Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9’da dizileme sonuçları gösterilmektedir.

Query 1 AAAGTACTTCCAATTATTCAACGCTGGTCTCAGACTAAGACTGC 44
 Sbjct 47076092 AAAGTACTTCCAATTATTCAACGCTGGTCTCAGACTAAGACTGC 47076049



A)

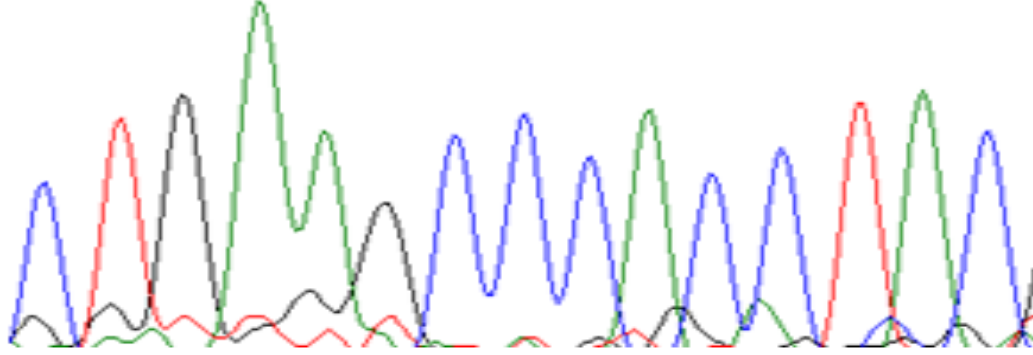


B)

Şekil 4.7. *SETD2* geninin dizileme sonuçları. A) Normal örneklerde *SETD2* geni dizileme ile analiz edilmiştir. B) Hasta örneklerinde *SETD2* geni dizileme ile analiz edilmiştir, bir farklılık bulunamamıştır.

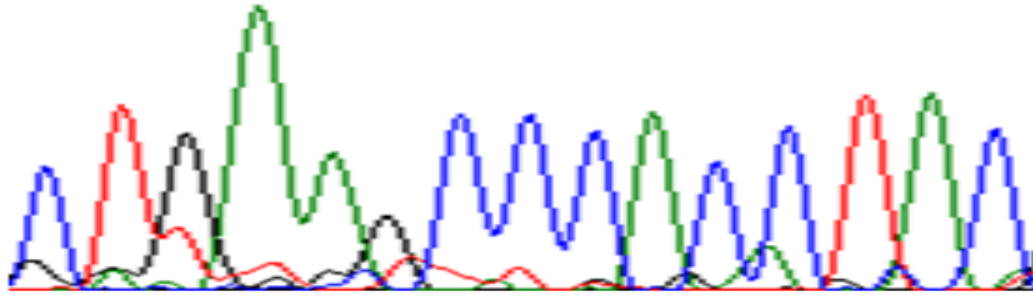
Query	1	CTGAAGCCCACCTAC	15
Sbjct	172088558	CTGAAGCCCACCTAC	172088544

C T G A A G C C C A C C T A C



A)

C T G A A G C C C A C C T A C

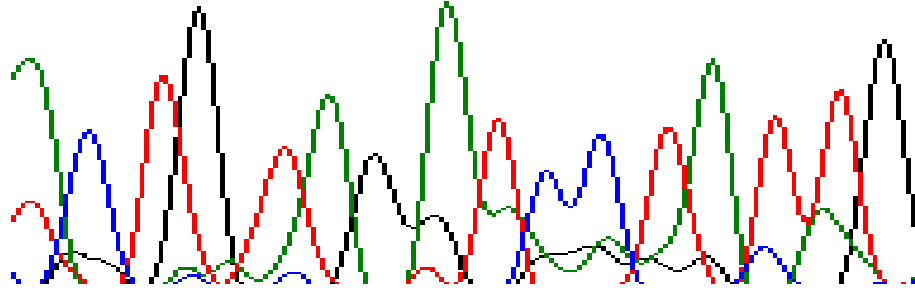


B)

Şeil 4.8. *VHL* geninin dizileme sonuçları. A) Normal örneklerde *VHL* geni dizileme ile analiz edilmiştir. B) Hasta örneklerinde *VHL* geni dizileme ile analiz edilmiştir, bir farklılık bulunamamıştır.

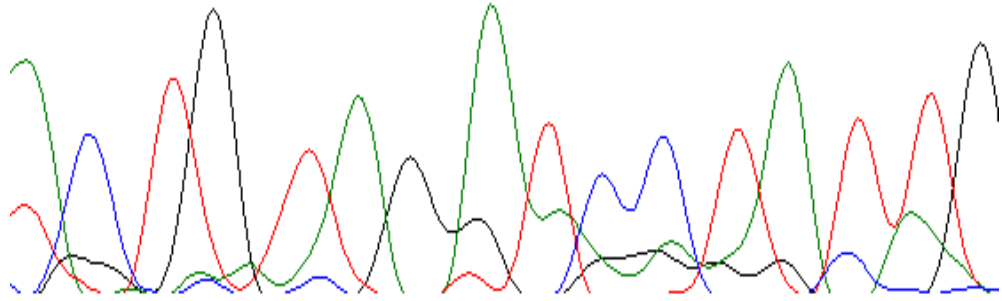
Query	22	AACTGTAGATCCTAT	36
Subject	106540386	AACTGTAGATCCTAT	106540372

A C T G T A G A T C C T A T T G



A)

A C T G T A G A T C C T A T T G



B)

Şekil 4.9. *PBRM1* geninin dizileme sonuçları. A) Normal örneklerde *PBRM1* geni dizileme ile analiz edilmiştir. B) Hasta örneklerinde *PBRM1* geni dizileme ile analiz edilmiştir, bir farklılık bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, moleküler teknikler kullanarak böbrek karsinomunda *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin mRNA ifade seviyeleri ve bu genlerin mutasyonel taramasının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Tümör baskılayıcı bir gen olan *VHL* yüksek oranda RCC ile ilişkilendirilmiştir ve bu genin inaktivasyonu kalıtsal ve sporadik berrak hücreli RCC vakalarının neredeyse % 100'ünü oluşturmaktadır (10,12). 1993 yılında pozisyonel klonlama tekniği ile izole edilmiştir (10). *VHL* gen ürünü VHL proteini (pVHL) α ve β domainden oluşmaktadır. VHL proteini birincil olarak sitoplazmada bulunur ancak sitoplazma ve çekirdek arasında taşınabilir. Bu aktivite kendisinin transkripsiyonun düzenlenmesindeki ve büyüme faktörlerinin üretilmesindeki işlevi açısından önemlidir (10). pVHL α domaini aracılığıyla Elongin'nin B ve C alt birimleri, RING-box proteini Rbx120, ve ubikutin E3 ligaz protein kompleksini oluşturmak için Cullin ile kararlı bir kompleks oluşturur (10). pVHL kompleksin substrat alması görevini görerek hipoksi-indüklenebilir faktör (HIF) gibi özgül proteinlere bağlanmayı sağlar. Böylelikle daha sonra ubikutin proteolitik yolağı aracılığı ile yıkılmaları için hedefler (10).

Teknolojik gelişmeler ccRCC'de *PBRM1* (Polibromo 1) ve *SETD2* (SET domain içeren protein 2) dahil olmak üzere somatik olarak mutasyona uğrayan birçok sayıda genin tanımlanmasına olanak sağlamıştır (47). *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genleri kromozom 3p üzerinde ccRCC'lerin % 90'nından fazlasında delesyona uğrayan bir bölgede bulunmaktadır (47). *PBRM1* tümör baskılayıcı bir gen olarak rapor edilmiştir (12). Kromozom 3p21 üzerinde bulunmaktadır ve BAF180 proteinini kodlamaktadır. BAF180 proteini, replikasyon, DNA tamiri ve hücre çoğalması / farklılaşmasını düzenleyen SWI / SNF kromatin yeniden şekillenme kompleksinin kromatin hedefleyici altbirimidir (12).

SETD2 tümör baskılayıcı bir gendir (12). *SETD2* erken sonlanma kodonu içeren birikmiş transkriptlerin analizleri sonucu bulunmuştur. *SETD2* histon H3'ün 36'ncı pozisyonundaki lizinlerin trimetilasyonundan sorumlu bir histon metiltransferaz kodlamaktadır ve bu şekilde mRNA ayıklanma ve transkripsiyonun uzamasının (tümör gelişimini baskılar) kontrolünü sağlar (12,52). Son zamanlarda yayınlanan birçok yeni

makalede histon lizin metiltransferaz dahil olmak üzere histon-modifiye edici enzimlerin çeşitli kanser patolojilerinde işlev kaybı ya da kazancı yer almıştır (45). *SETD2* mutasyonları sonraki zamanlardada ortaya çıkabilmektedir. Ancak *VHL* ve *PBRM1* mutasyonları erken safhalarda görülmektedir (47). Yapılan birçok gen ifade profili çalışmalarında tip 1 ve tip 2 papiller karsinom, klasik ccRCCs, onkositom, kromofob karsinom ve renal pelvisin ürotelyal karsinomu gibi RCC'nin histolojik alt tiplerini ayırt etmek için gen ifadesi modelleri ortaya atılmıştır (2).

Gen ifadesi analizleri birçok tanıya yönelik özgün belirteç göstermiştir (2). pRCC'de a-metil açıl-KoA rasemöz, renal onkositom ve kromofob RCC ayırt etmek için S100A1, ccRCC'de yüksek oranda ifade edilen glutatyon S-transferaz bu belirteçlere örneklerdir (2,11). Gordan ve ark. berrak hücreli RCC'yi VHL inaktivasyonunun olup olmasına ve HIF-1 α , HIF-2 α veya HIF-2 α aşırı ifadesinin olup olmasına göre alt tiplere ayırmışlardır (42). VHL inaktivasyonunun olmadığı tümörlerde ve olduğu tümörlerde HIF-1 α ve HIF-2 α ifade ediliyorsa artmış AKT/mTOR ve ERK/MAPK sinyali (ikincisi daha anjiyojenik olmasına rağmen) saptanmıştır (42). Ancak, VHL inaktivasyonu içeren berrak hücreli RCC'de sadece HIF-2 aşırı ifadesi saptanmıştır ve buda artmış c-Myc aktivitesine bağlı olarak yüksek çoğalma ve replikasyon stresine dirence bağlanmıştır (42). Berrak hücreli RCC'nin bu alt tiplendirilmesi hedeflenmiş tedavi uygulanmalarına alt yapı sağlayabilir (42). Önceki yapılan çalışmalarda, ccRCC tümörogenezinde VHL kaybının yeterli olmadığını göstermiştir ve ek genetik değişikliklerin gerekliliğini akıla getirmiştir. Ayrıca, LOH araştırmaları sayesinde 3p21 "gatekeeper" ccRCC mutasyonunun gerekliliği rapor edilmiştir (46). Birçok kanser *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* mutasyonlarına birlikte sahiptir. Bu üç gen kromozom 3p'de saptanmıştır bu da mutasyonların işlevsel olarak anlamsız olduğunu göstermektedir (46).

Ignacio Varela ve ark. (46) ccRCC gelişiminde PBRM1 inaktivasyonun ikinci büyük mutasyon olduğunu göstermişlerdir. Neredeyse bütün (36/38) PBRM1 mutant olgular hipoksi grubunda yer almıştır (46). PBRM1 mutasyonunun klinik hastalığın ilerlemesindeki katkısının anlaşılması ve neticesi ve bunun yanı sıra SWI/SNF kompleksinin kaybı terapötik olarak renal kanser araştırmalarının önemli alanlarıdır (46).

Ping Xie ve ark. SETD2'nin hdm2'nin P2 promotör bölgesini hedefleyerek hdm2 ifadesini baskıladığını ve p53 protein kararlılığını arttırdığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, bu bulgular histon metiltransferaz SETD2 transkripsiyon faktörü p53 işbirliğiyle seçici olarak bir grup genin transkripsiyonunu kontrol edebileceğini göstermiştir (53).

Bizim çalışmamızda, Şekil 4.1, 4.3 ve 4.5'te gösterildiği üzere *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin mRNA ifade seviyesi düşmüştür. Ancak, Wilcoxon testine göre bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Bluysen ve ark. (40) *VHL* ifadesinin düştüğünü saptamışlardır.

PBRM1'in işlevsel inaktivasyonu pVHL işlev kaybı ile birlikte saldırgan tümör davranışının kilit yönlerinin geliştirilmesinin kolaylaştırılmasında önemli bir olaydır (53). Kromatin modifikasyonunda *PBRM1*'in rolü dikkate alındığında, bu proteinin inaktivasyonu ile hasara uğrayan gen ifade yollarının ccRCC için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açabilir (53). Epigenetik değişiklikler kanser hücrelerinin özelliğidir ve böbrek tümörü gelişimi ve ilerlemesinde rolleri vardır (41). Son 10 yılda yapılan çalışmalar epigenetik değişikliklerin renal tümörögenizde önemli rol bir rol oynadığını göstermiştir (2,41). Bu RCC'de özel bir ilgi alanıdır çünkü büyük ölçekli dizileme çalışmaları *PBRM1* ve *VHL* genleri haricindeki aday tümör baskılayıcı genlerin tümörlerin % <10'da mutasyona uğradığını göstermiştir (2).

Anormal DNA metilasyonu, değişmiş kromatin yeniden şekillenmede değişiklikleri, mikroRNA ifade bozukluğu, yalnızca RCT'lerin ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde değil ayrıca hastalık tespiti, tanı, prognoz değerlendirilmesi, tedaviye yanıt tahmini için umut verici bir biyobelirteç sınıfını teşkil eder (41). En çok çalışılmış epigenetik değişiklik CpG dinükleotidlerinde guaninin önünde bulunan sitozinde DNA'nın metilasyonudur (57). CpG genel olarak insan genom dizisinde az görülürken insan genlerinin yaklaşık yarısının promotor bölgelerinde CpG adacıkları denilen CpG zengin bölgeler bulunur, bunlar normal hücrelerde genellikle metillenmemiştir (57). Zhang ve ark. (2) DLEC1 (tumour suppressor gene on 3p22.3) promotor metilasyonunun ileri tümör evresinin yanı sıra sınıflandırılması ile de ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu arasındaki denge gen ifadesi, DNA tamiri, gelişim süreci ve tümör oluşumu için anahtar bir genetik mekanizma görevi görmektedir

(58). Dolayısıyla, bu dengeyi bozacak herhangi bir sebep anormal hücre işlevine hatta kansere yol açabilir (58). Yong Wang ve ark, (58) H4K16'nın asetiltransferazı olan hMOF'un renal hücreli karsinomun patogeneğinde yer aldığını rapor etmişlerdir ve bu epigenetik değişiklik CA9 bağlı olmayan yeni bir RCC tanı belirteci olabileceğini göstermektedir.

PBRM1 kromatinin yeniden şekillenmesinde yer alır ve bu gen birçok ccRCC'de kesilmiştir, bu da anormal kromatin biyolojisinin ccRCC'de büyük rol oynadığını göstermektedir (2). Dolayısıyla, epigenetik olaylarla ilişkilendirilmiş biyobelirteçler yüksek bir olasılıkla tanımlanabilir (2). Yapılacak yeni çalışmalar DNA metilasyonunu RCC'nin sınıflandırılmasında yararlı olup olmadığını kanıtlamak zorundadır (2). Yine de metilasyon çalışmaları gen ifadesinin düzenlenmesi işlemlerini anlamamızda önemli bilgiler sunacaktır ve DNA metil transferaz inhibitörleri gibi metilasyon modifiye ajanlarının kullanımı ile muhtemelen yeni terapilerin temelini oluşturacaktır (2).

Bir mikroRNA ifade çalışması tümör gelişimi, tümör ilerlemesi ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir (2). Khella ark. (2) primer tümörlü uzak metastazları analiz ederek metastazda belirgin miRNA ifadesi bulmuşlardır. Bazı primer tümör örnekleri uzak metastazla birlikte değerlendirilmiştir. Buda primer tümörlerin metastazaözgün belirtilerinin olduğunu göstermektedir (2). Yapılan birçok çalışmada *VHL*'nin bazı tip mutasyonlar içerdiğini ortaya konmuştur. Gillian L ve ark. üç örnekle yaptıkları çalışmada *VHL* geninde 2 nokta mutasyonu tanımlamışlardır (54). Cherkasova ve ark. (55) ccRCC' hücre hatlarının 14'dünden 9'unda *VHL* geninin üç eksonunda amino asit değişikliğine veya dur kodonuna dönüşen mutasyonlar ve delesyonlar saptanmıştır. Varela ark. üç çerçeve kayması insersiyonu, iki çerçeve delesyonu, altı yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyon saptamışlardır.

Hakimi ve ark. (52), 11 işlev kaybı ve 3 tane düşük etkili yanlış anlamlı mutasyon tanımlamışlardır. 11 tümör arasından *SETD2* işlev kaybı mutasyonu olanların 10 tanesi evre 3, 2 tanesi metastatik ve 2 tanesinde sonradan metastaz şeklindedir. Toplamda, *SETD2* mutasyonlu primer tümörlü hastaların toplam metastatik olma hızı 36% (4/11) idi, buda *SETD2* ile kanser metastazında işlevsel bir bağın olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin sıkça mutasyona uğrayan bölgeleri SSCP ve dizi analizi yöntemleri ile tahlil edilmiştir. Ancak, bu bölgelerde mutasyon saptanamamıştır. *VHL* geninin iki izoformu vardır. Biz çalışmamızda izoform 1'i analiz ettik. *PBRM1* altı bromodomainden oluşmaktadır. Bu çalışmada yalnızca domain 1 ve *SETD2* geninin rastgele bir bölgesi analiz edilmiştir.

Bu üç ccRCC kanseri geninin fiziksel bağlantısı potansiyel etkileşim ile birlikte birçok ccRCC vakasında görülen büyük ölçekli 3p LOH için en önemli anahtar faktör olabilir (45). Varela ve ark. 107 vakadan 55'inde *VHL* mutasyonu ile birlikte *PBRM1* mutasyonu saptamışlardır. Çarpıcı bir şekilde, *SETD2* mutasyonu taşıyan 9 vakanın hepsinde *PBRM1* veya *VHL* geninde mutasyon saptanmıştır. Bu 9 vakadan 6'sında üç gendede mutasyon saptanmıştır (45).

Sonuç olarak, *VHL*, *PBRM1* ve *SETD2* genlerinin mRNA ifade seviyeleri az oranda düşmüştür ($p>0,05$). RCC patogenizinde yer alan moleküler mekanizmaların anlaşılması böbrek kanseri için moleküller hedefli ilaçlar geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Böbrek tümörü ve biyobelirteçler arasındaki ilişkiyi anlamak için epigenetik analiz, miRNA analizi ve immünohistokimya gibi ileri seviyede analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Litwin MS. Urologic diseases in america. Washington. 2007; 337 - 341.
2. Kerstin Junker, Vincenzo Ficarra, Eugene D. Kwon, Bradley C. Leibovich, R. Houston Thompson, Egbert Oosterwijk. Potential role of genetic markers in the management of kidney cancer. European urology. 2013; 63: 333–340.
3. Jim Cassidy, Donald Bisset, Roy A.J. Spence, Miranda Payne. Oncology. New york. 2006; 30-31.
4. Kerstin Stemmer. Molecular characteristics of kidney cancer. phd thesis. Biology, der Universität Konstanz. 2008; 1–5.
5. Q. Yin-Goen, J. Dale, W.L. Yang, J. Phan, R. Moffitt, J.A. Petros, M.W. Datta, M.B. Amin, M.D. Wang and A.N. Young. Advances in molecular classification of renal neoplasms. Histol Histopathol. 2006; 21: 325-339.
6. Vinay Kumar, MBBS, MD, FRCPath, Abul K. Abbas, MBBS, Nelson Fausto, MD and Richard Mitchell, MD, PhD. Basic Pathology. 8th Edition. 2007; 271.
7. Stella Pelengaris and Michael khan. The molecular biology of cancer. 2nd edition. 2013; 5-10.
8. Rajer. Kidney cancer. Radiol Oncol. 2007; 41: 64-71.
9. Bertrand Perroud, Nelly Valkova, Amy Dhirapong, Pei Yin Lin, Oliver Fiehn¹, Dietmar Kültz and Robert H Weiss. Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. BioMed Central. 2006; 1-17.
10. Darwin L. Lim, MB, BS(Hons), Fracs (Urol); Stephen E. Pautler, MD, FRCSC. Current understanding of the molecular mechanisms of kidney cancer: a primer for urologists. Canadian Urological Association. 2007; 1:12 - 20.

11. Leslie J, Farber, Kyle Furge, Bin Tean Teh. Renal Cell Carcinoma Deep Sequencing Recent Developments. *Curr Oncol Rep*. 2012; 14:240–248.
12. Ryoiti Kiyama, Yun Zhu and Tei-ichiro Aoyagi. *Renal Tumor*. 2013; 3 - 7.
13. Mette Dandanell, Lone Sunde, Finn C Nielsen and Thomas V O Hansen. Identification of 3 novel VHL germ-line mutations in Danish VHL patients, *BMC Medical Genetics*. 2012; 13:54,1–6.
14. Yanlai Lai, Kevin Hakal, Susan T. Weintraub, and Yuzuru Shiio. Proteomic dissection of the VHL interactome. *NIH Public Access*. 2011; 10(11): 5175–5182.
15. Ari Hakimi, James Wren, Mithat Gonen, Omar Abdel-Wahab et al. Clinical and Pathologic Impact of Select Chromatin Modulating Tumor Suppressors in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *NIH Public Access*. 2012; 63(5): 848–854.
16. <https://www.google.iq/#q=genetic+home+reference>.
17. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MACC1> AS1&search=macc1 03-08-2012 14:30.
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508357> 01/10/2012 23: 02.
19. John Wiley&Sons. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. Sixth Edition. 2003; 1–8.
20. Neha Agarwal. Herbal medicine: alternative treatment for cancer therapy. *IJPSR*. 2011; 2(9): 2249-2258.
21. <http://www.kidney.org.au/KidneyCancer/tabid/799/Default.aspx>.

22. Craig A. Almeida, Sheila A. Barry. Cancer: Basic science and clinical aspects. January. Wiley-Blackwell. 2010; 1-6.
23. Kristian Pietrasa. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. Elsevier. 2010; 316: 1324–1331.
24. Douglas Hanahan¹, and Robert A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Elsevier Inc. 2011; 144: 646 - 674.
25. Tony Gutschner and Sven Diederichs. The hallmarks of cancer. Landes bioscience. 2012; 9: 703–719.
26. Tabitha M Hardy and Trygve O Tollefsbol. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. 2011; 3(4): 503–518.
27. David E. Sterner and Shelley L. Berger. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. 2000; 64: 435-459.
28. Keith L Moore PhD, FIAC, FRSM, FAAA , Anne M. R. Agur BSc (OT), MSc, PhD , Arthur F Dalley PhD. Clinically Oriented Anatomy. Fifth edition. 2006; 290 - 295.
29. Lippincott Williams and Wilkins, Richard S. Snell. clinical anatomy. 7th ed. 2004.
30. <http://cnx.org/content/m46429/latest/?collection=col11496/latest>.
31. Guyton and Hall. Medical Physiology. Elsevier 12th edition. 2011; 303 - 306.
32. Hari Koul, Kyle O. Rove, Luiza Crompton, Sweaty Koul, Randall B. Meacham, Fernando J. Kim. Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review. Am J Cancer Res. 2011; 2: 240-254.

33. Nadeem Dhanani, Gennady Bratslavsky, and W. Marston Linehan. Molecular Genetics in Inherited Renal Cell Carcinoma: Identification of Targets in the hereditary syndromes. Humana Press. 2009; 12 - 33.
34. Androu Arsanious, Georg A Bjarnason and George M Yousef. From bench to bedside: current and future applications of molecular profiling in renal cell carcinoma. BioMed Central. 2009; 8: 1–11.
35. Marston Linehan. Molecular genetics of kidney cancer implications for the physician,BUMC PROCEEDINGS. 2000; 13: 368–371.
36. D. Pascual and A. Borque. Epidemiology of Kidney Cancer. Hindawi Publishing Corporation. 2008; 1–7.
37. Chaan S. Ng Christopher G. Wood Paul M. Silverman Nizar M. Tannir Pheroze Tamboli Carl M. Sandler. Renal Cell Carcinoma: Diagnosis, Staging, and Surveillance. AJR journal. 2008; 191: 1220–1232.
38. E. A. S. GlenW. Barrisford, Inger L. Rosner, W. Marston Linehan,2 and Gennady Bratslavsky. Familial Renal Cancer:Molecular Genetics and SurgicalManagement. International Journal of Surgical Oncology. 2011; 1–11.
39. Hannah L. Bader and Tien Hsu. Systemic VHL gene functions and the VHL disease. NIH Public Access. 2012; 586(11): 1562–1569.
40. Masahiro Yao, Takeshi Kishida, Noboru Nakaigawa, Masaya Baba, et al. VHL Tumor Suppressor Gene Alterations Associated With Good Prognosis in Sporadic Clear-Cell Renal Carcinoma. Journal of the National Cancer Institute. 2002; 94: 1569–1575.
41. Rui Henrique, Ana Silvia and Carmen Jeronimo. The epigenetics of renal cell tumors: from biology to biomarkers. Frontiers genetic. 2012; 3: 1–13.

42. Eamonn R. Maher. Genomics and epigenomics of renal cell carcinoma. Elsevier. 2013; 23: 10–17.
43. Eric Jonasch, Ian Davis, Sean Bailey et al. State-of-the-science: An update on renal cell carcinoma. NIH Public Access. 2012; 10(7): 859–880.
44. Marston Linehan, Gennady Bratslavsky, Peter A. Pinto, Laura S. Schmidt, Len Neckers, Donald Bottaro, and Ramaprasad Srinivasan. Molecular Diagnosis and Therapy of Kidney Cancer. NIH Public Access. 2010; 61: 329–343.
45. Gerben Duns, Inge van Duivenbode, et al. Histone Methyltransferase Gene SETD2 Is a Novel Tumor Suppressor Gene in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. American Association for Cancer Research. 2010; 70: 4287-4291.
46. Ignacio Varela, Keiran Raine, Dachuan Huang, Choon Kiat Ong, Philip Stephens, et. al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. Nature. 2011; 469: 539–542.
47. James Brugarolas, PhD. PBRM1 and BAP1 as Novel Targets for Renal Cell Carcinoma. The Cancer Journal. 2013; 19: 324 - 332.
48. M. D. E M Glare, M J Bailey, E H Walters. b-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. 2013; 765 - 770.
49. T. A. Brown. Gene cloning and DNA analysis. Sixth Ed: Wiley Blackwell. 2010.
50. Patricia Barriland Silvia Nates. Gel electrophoresis - Principles and Basics: InTech. 2012.
51. www.appliedbiosystems.com/about/offices.cfm.

52. Ari Hakimi, James Wren, Mithat Gonen, Omar Abdel-Wahab et al. Clinical and Pathologic Impact of Select Chromatin Modulating Tumor Suppressors in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. NIH Public Access. 2012; 63(5): 848–854.
53. Ping Xie, Chunyan Tian, Liguang An, Jing Nie, Kefeng Lu, Guichun Xing, Lingqiang Zhang, Fuchu He. Histone methyltransferase protein SETD2 interacts with p53 and selectively regulates its downstream genes. Science direct. 2008; 20: 1671–1678.
54. K. F. Gillian L. Dalgliesh¹, Chris Greenman¹, Lina Chen¹ et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. Nature. 2010; 463: 360 - 363.
55. Elena Cherkasova, Elizabeth Malinzak, Sheila Rao, Yoshiyuki Takahashi et al. Inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor leads to selective expression of a human endogenous retrovirus in kidney cancer. NIH Public Access. 2011; 30(47): 4697–4706.
56. Steven Skates and Othon Iliopoulos. Investigative Approach Molecular Markers for Early Detection of Renal Carcinoma. American Association for Cancer Research. 2004; 10: 6296–6301.
57. Amanda M. Hoffman, BSc and Paul Cairns, PhD. The Epigenetics of Kidney Cancer and Bladder Cancer. NIH Public Access. 2011; 3(1): 19–34.
58. Yong Wang, Rui Zhang, Donglu Wu, Zhihua Lu, Wentao Sun, Yong Cai, Chunxi Wang and Jingji Jin. Epigenetic change in kidney tumor: downregulation of histone acetyltransferase MYST1 in human renal cell carcinoma. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2013; 32: 1 - 8.

ÖZGEÇMİŞ

Benim adım Rozhgar Abdullah Khailany. Iraklıyım. 01/06/1985 tarihinde Erbilde doğdum. Salahaddin Üniversitesi Eğitim Bilimi Fakültesi Biyoloji bölümünden 2010 yılında mezun oldum. Gaziantep Üniversitesi'nde yüksek lisansa kabul edildim. Gaziantep Üniversitesi'nde, yüksek lisans eğitimime Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Bölümünde 2011 tarihinde başladım. İngilizce eğitimimi British International Institute'de aldım. Kurs dokuz ay sürdü. Windows, word, powerpoint ve excel gibi birçok bilgisayar programı bilmekteyim. Benim ana dilim Kürtçedir ve Türkçe, İngilizce ve Arapça konuşabilmekteyim.